

荧光光谱法结合多元曲线分辨-交替 最小二乘法研究伞形花内酯与 牛血清白蛋白的相互作用

刘根兰¹, 倪永年^{1,2}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047;

2. 南昌大学化学系, 南昌 330031)

摘要 在模拟人体生理条件下(pH=7.4), 用荧光光谱法结合多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)研究伞形花内酯与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用. 采用两种不同的试剂滴加模式对伞形花内酯与BSA的相互作用进行研究, 对经典的荧光光谱数据矩阵加以扩展, 增加了实验数据的信息量; 进而应用MCR-ALS对该扩展的荧光光谱矩阵进行迭代计算, 较好地分辨出作用过程中浓度变化趋势图, 并计算出伞形花内酯与BSA的表观结合常数和结合比. 通过同步荧光光谱法发现伞形花内酯对BSA的构象有一定的影响.

关键词 伞形花内酯; 牛血清白蛋白; 荧光光谱法; 多元曲线分辨-交替最小二乘法

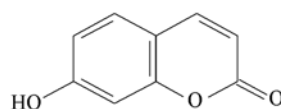
中图分类号 O657.39

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)07-1339-05

血清白蛋白是生命体血浆中含量最丰富的蛋白质, 能与许多内源和外源性化合物结合, 具有贮运内源代谢产物和外源药物小分子及离子等重要生理功能, 因此研究药物小分子与蛋白质之间的相互作用具有重要的理论意义^[1].

目前, 利用荧光光谱法研究某些金属离子及药物小分子与蛋白质的结合反应, 已引起了生命科学、化学、药学及临床医学科研工作者的普遍关注. 同样, 中药有效成分与生物大分子相互作用的研究也同样受到关注^[2]. 香豆素是邻羟基桂皮酸内酯, 广泛分布于高等植物中, 尤其以芸香科和伞形科为主. 香豆素类药物为常用的药物, 具有抗菌、解痉、扩张冠状动脉、抗癌及祛风湿等作用. 伞形花内酯(Umbelliferone, UM)属于简单香豆素类, 其化学名为7-羟基香豆素(结构见Scheme 1). 香豆素类药物与蛋白质的相互作用已有相关文献报道^[3~5], 但未见有结合化学计量学方法的研究.



Scheme 1 Structure of umbelliferone

MCR-ALS 是较好的数据矩阵解析方法, 能为体系中各组分提供各种光谱信息, 但是对于实验现象不明显或光谱重叠严重的复杂体系, 由于数据矩阵可能缺秩, 数据信息量相对较少, 难以得到合理的分辨结果. 本文采用荧光光谱法结合解析能力较强的多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)^[6,7]研究了伞形花内酯与牛血清白蛋白的相互作用. 通过两种不同的实验模式得到扩展的荧光光谱数据矩阵, 并用MCR-ALS处理数据, 全面地分析了伞形花内酯与BSA相互作用的过程.

1 方法原理

1.1 渐进因子分析(EFA)

渐进因子分析法^[8,9]是常用于解出MCR-ALS方法中所要优化的初始值的方法. 它利用因子分析所

收稿日期: 2008-03-07.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20562009)、江西省自然科学基金(批准号: 0620041)、生物传感及化学计量学重点实验室(湖南大学)基金(批准号: 2005-22)及长江学者及创新团队项目基金(批准号: IRT0540)资助.

联系人简介: 倪永年, 男, 教授, 主要从事化学计量学等方面的研究. E-mail: ynni@ncu.edu.cn

得到的特征值为其基本出发点, 计算时逐步渐进地延拓到整个矩阵, 从而得到各物种在该数据矩阵中的出现点和消失点, 即浓度窗口. 以下式来计算 X_i 子阵的本征值:

$$X_i = TP^T \quad (1)$$

式中, $T(i \times N)$ 为得分矩阵, $P^T(N \times N)$ 为载荷矩阵, N 为纯物种数. X_i 由数据矩阵 X 的第 $i = 1, 2, \dots, p$ 行所组成.

将各数据子阵 X_i 本征值的对数 $\lg(EV_i)$ 对有序变量(如浓度)作图, 本征值高于噪音本征值时, 表明有一新物种出现. 将后向 EFA 与前向 EFA 相结合, 本征值曲线图中先出现的成分亦首先消失. 某化合物在两种曲线下共同存在的部分, 称为浓度窗口.

1.2 多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)

MCR-ALS 算法是一种基于双线性的化学计量学方法, 对于一个二维光谱数据矩阵 D 表示如下:

$$D = CS^T + E \quad (2)$$

其中光谱矩阵 D 和误差矩阵 E 的维数均为 $N_c \times N_s$, C 是浓度矩阵, 其维数为 $N_c \times N$; S^T 是纯光谱矩阵, 其维数为 $N \times N_s$. N_c 是光谱曲线数, N_s 是波长点数, N 是化学组分数.

由 EFA 分析得到的各组分的浓度窗口中的对应浓度变化曲线可组成初始值浓度矩阵 C , 通过以下两式交替运算, 可得到逼近的可能解.

$$S^T = C^+ D \quad (3)$$

$$C = D(S^T)^+ \quad (4)$$

其中矩阵 C^+ 为矩阵 C 的伪逆矩阵, 矩阵 $(S^T)^+$ 为矩阵 S^T 的伪逆矩阵. 式(3)由 $S^T \geq 0$ 限制, 式(4)由 $C \geq 0$ 限制. 每一次迭代均可获得光谱矩阵 S 和浓度矩阵 C 的新估计值. 不断地重复迭代运算, 直至收敛. 在迭代运算中, 选择正确的组分数至关重要, 它能最大程度地与原始数据拟合, 并能给出具有物理和化学意义的浓度分布曲线和光谱曲线.

1.3 扩展数据矩阵

矩阵的扩展能消除旋转不确定性^[10], 并可解决矩阵的分辨和定量分析问题^[11,12]. 本文将两种不同试剂滴加模式所得到的作用体系的荧光光谱测量数据矩阵在列方向上叠加形成一扩展矩阵, 所得新矩阵的行数为两个单个矩阵行数的总和, 可由下式表示:

$$\begin{bmatrix} D^{BSA} \\ D^{UM} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C^{BSA} \\ C^{UM} \end{bmatrix} S^T + \begin{bmatrix} E^{BSA} \\ E^{UM} \end{bmatrix} \quad (5)$$

式中, D^{BSA} 和 D^{UM} 分别为伞形花内酯加入 BSA 中和 BSA 加入伞形花内酯中的荧光光谱数据矩阵, C^{BSA} 和 C^{UM} 分别为上述两种不同滴加模式的浓度矩阵; 而 E^{BSA} 和 E^{UM} 分别为这两种滴定模式的误差矩阵. S^T 为各组分的纯光谱矩阵.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

伞形花内酯(中国药品生物制品检定所)储备液: 以二次蒸馏水配成 1.5×10^{-3} mol/L 的溶液, 使用时用二次水稀释至所需浓度; 牛血清白蛋白(上海华美生物有限公司, 纯度 99%, 分子量 66000): 以 100 mL 50 mmol/L NaCl 的溶液配制成 1.5×10^{-3} mol/L 的储备液, 保存于 4 °C 以下, 使用时根据需要进行稀释. BSA 纯度用质量浓度为 1.0 g/L 的纯 BSA 在 279 nm 处的吸光值为 0.667 来标定. 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH = 7.4): 先配制 0.2 mol/L 的 Tris 溶液, 准确称取 2.4223 g 三羟基甲氧基氨基甲烷(上海蓝季科技发展公司), 溶于二次水中后, 再移入 100 mL 的容量瓶中并定容, 取出 25 mL 于 100 mL 的容量瓶中, 再加入 45 mL 0.1 mol/L 的盐酸溶液, 用二次水定容. 实验所用试剂均为分析纯, 水为二次蒸馏水.

PE LS-55 荧光分光光度计, 配 1.0 cm 荧光比色皿. 实验条件: 狭缝宽度 $\lambda_{ex} = \lambda_{em} = 13$ nm, 扫描速度 1500 nm/min. 智能型超级恒温水槽 ZC-10(宁波天恒仪器厂), pH 酸度计(Orion 公司).

2.2 实验过程

实验 1: 在 pH = 7 的 Tris-HCl 缓冲溶液中, 固定 BSA 的浓度 (2.47×10^{-7} mol/L), 然后加入不同浓度的伞形花内酯 ([UM]: [BSA] 比例分别为 0, 0.1, 0.2, ..., 2.2, 以 0.1 的间隔递增), 放置 10 min 至反应平衡, 再测其荧光光谱, 得到数据矩阵 D^{BSA} .

实验 2: 固定伞形花内酯浓度 (3.01×10^{-7} mol/L), 然后加入不同浓度的 BSA 溶液 ([BSA]: [UM] 比例分别为 0, 0.05, 0.10, ..., 1.10, 以 0.05 的间隔递增), 放置 10 min 至结合平衡, 再测其荧光光谱, 得到数据矩阵 D^{UM} . 实验中加入试剂的体积远小于初始溶液体积, 体积稀释效应可以忽略. 实验温度为 37 °C. 荧光光谱测定波长范围为 300 ~ 520 nm, 间隔 0.5 nm 采集数据, 共 441 个数据点; 样品个数均为 23 个. 由实验 1 和实验 2 获得的所有数据组成的扩展矩阵的维数为 $(23 + 23) \times 441$.

实验 3: 固定 BSA 的浓度 (3.05×10^{-7} mol/L), 然后加入不同浓度的伞形花内酯 ([UM]: [BSA] 比例分别为 0, 0.27, 0.54 和 0.81), 再测其同步荧光光谱 ($\Delta\lambda = 60$ nm).

3 结果与讨论

3.1 伞形花内酯对 BSA 内源性荧光的影响

BSA 分子含有 585 个氨基酸残基, 其中色氨酸、酪氨酸及苯丙氨酸残基能发射荧光. 由于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基在蛋白质分子内部的空间距离为 7 ~ 10 nm, 彼此之间的共振能量转移会导致酪氨酸及苯丙氨酸残基的荧光猝灭, 所以在很多情况下, 蛋白质的荧光光谱似乎只显示色氨酸残基的荧光, 其峰值在 350 nm 左右^[13].

当将伞形花内酯加入到 BSA 溶液中时(实验 1), BSA 在 350 nm 处的荧光发射峰因猝灭而导致荧光强度降低, 而峰形无明显变化, 最大发射波长红移[图 1(A)], 这可能是由于色氨酸残基与伞形花内酯之间形成复合物所引起的. 同时, 随着伞形花内酯的不断加入, 在 450 nm 处有一新的荧光峰出现, 荧光强度逐渐增大, 但峰形和峰位无明显变化, 该峰是伞形花内酯自身的荧光发射峰. 而在 390 nm 处有一等发射点, 说明反应过程中存在一平衡关系^[14]. 当将 BSA 加入到伞形花内酯溶液中时(实验 2), 350 nm 处的荧光强度均匀增加, 而 450 nm 处的荧光强度变化很小, 两峰的峰形和峰位几乎不变[图 1(B)].

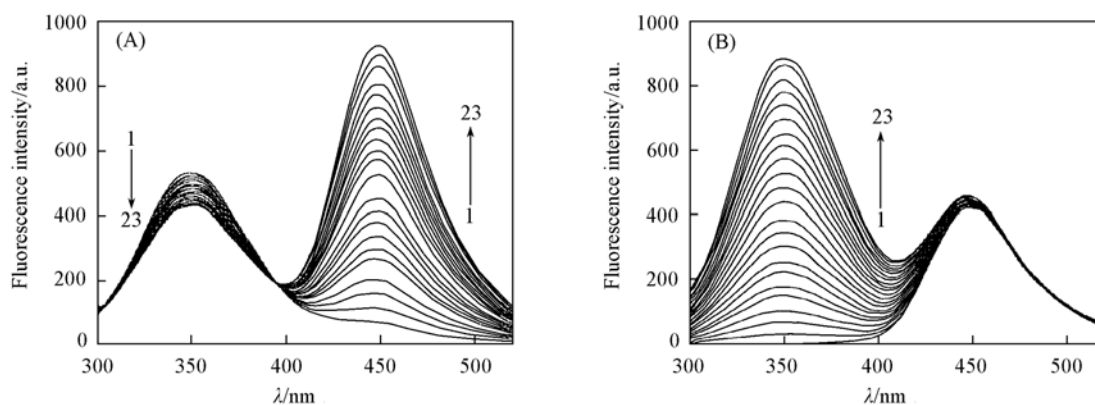


Fig. 1 Fluorescence emission spectra of experiment 1(A) and experiment 2(B)

(A) 1—23: [UM]: [BSA] = 0, 0.1, 0.2, ..., 2.2; (B) 1—23: [BSA]: [UM] = 0, 0.05, 0.10, ..., 1.10.

3.2 矩阵的扩展及 MCR-ALS 法的应用

通过图 1 难以确定实验中是否有新物质生成, 也无法直接判断该猝灭方式是简单的荧光猝灭还是光谱叠加. 为深入地研究该体系, 现将两组荧光光谱数据矩阵 D^{BSA} 和 D^{UM} 加以合并扩展, 并结合化学计量学 MCR-ALS 法对该扩展数据矩阵进行分辨. 在计算过程中, 先采用 EFA 确定组分数 ($N = 3$) 及初始迭代浓度矩阵(见图 2), 然后通过迭代求出估计的纯物质光谱矩阵, 再用最小二乘法得到估计的浓度矩阵, 其计算结果用于下一轮迭代, 直到收敛.

通过 MCR-ALS 解析得到体系中各物质的浓度变化趋势图[见图 3(A)和(B)], 可确认该体系的

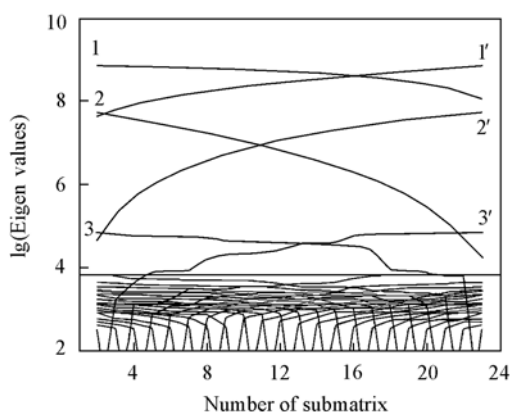


Fig. 2 Evolving factor analysis plot for the fluorescence data obtained in experiments 1 and 2

1, 2, 3, and 1', 2', 3' are the curves obtained from the forward and backward factor analysis, respectively.

的两张浓度趋势图上可以看出, 在实验 1 中, 当 $[UM]:[BSA]$ 比例为 1.8 时, 反应达到平衡 [图 3(A)], 由式(6)计算得到常数 K_{app} 为 3.89×10^6 L/mol, $\lg K_{app}$ 为 6.59; 在实验 2 中, 当 $[BSA]:[UM]$ 比例为 0.75 时反应达到平衡 [图 3(B)], 由式(6)计算得到常数 K_{app} 为 9.68×10^6 L/mol, $\lg K_{app}$ 为 6.98. 两个实验所得到的定量结果比较接近, 由此可见, 图 3 中的浓度趋势图比较可靠.

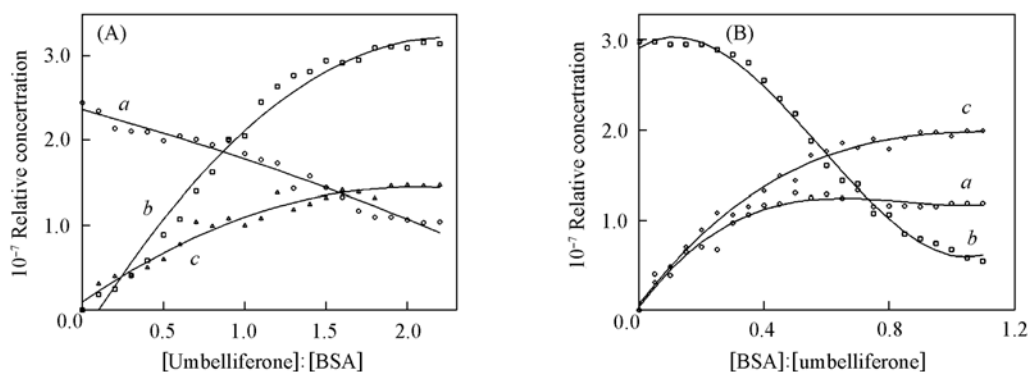


Fig. 3 Equilibrium concentrations of BSA, umbelliferone and BSA-UM of experiment 1 (A) and experiment 2 (B) extracted by the MCR-ALS chemometrics method

a. BSA; b. umbelliferone; c. BSA-umbelliferone.

3.3 伞形花内酯对 BSA 构象的影响

血清白蛋白在溶液中存在同分异构体^[15,16]. pH 值在 4.5 ~ 7.5 之间为 *N* 型, pH 值在 4.5 ~ 3.0 之间转变为部分酸膨胀的 *F* 构象, pH > 8 时为另一种膨胀的 *B* 构象. 3 种构象能可以逆转换. 利用同步荧光光谱可以了解药物分子对蛋白质构象的影响. 在 $\Delta\lambda = 15$ nm 时所测得的同步荧光光谱只显示酪氨酸残基的光谱特性; 而在 $\Delta\lambda = 60$ nm 时测得的同步荧光光谱仅表现出色氨酸残基的光谱特性. 因为其氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 故而由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化. 发射波长的红移表明氨基酸残基所处环境的极性增加, 蓝移则极性减弱. 通常可通过色氨酸残基的同步荧光光谱图来判断蛋白质构象的变化. 本实验在 $\Delta\lambda = 60$ nm 的条件下, 对伞形花内酯与 BSA 的相互作用进行了同步荧光光谱扫描 (图略), 结果发现, 随着伞形花内酯的加入, 色氨酸残基的最大发射峰红移了 3 nm. 此现象说明色氨酸残基所处环境的极性增大, 疏水性减弱, 肽链的伸展程度也有所增加^[17]. 因此伞形花内酯对 BSA 的构象有一定的影响.

参 考 文 献

[1] XU Yan (徐岩), HUANG Han-Guo (黄汉国), SHEN Han-Xi (沈含熙). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 1998, 26(5):

化学组分数为 3, 完全对应于 EFA 解析的结果. 这表明在所考察的范围内, 本体系中共含有三种物质, 分别是 BSA、伞形花内酯和 BSA-UM 络合物. 显然, 以上所得到的结果和解释只有通过矩阵的扩展才能获得, 因通过这种扩展可从多个方面获得反应体系的性质, 而用一般的方法则很难得到.

根据 MCR-ALS 解析出的各组分浓度变化趋势图, 可以很直观地监测到反应过程中各组分的浓度变化, 并且可以由此算出表观结合常数 K_{app} :

$$K_{app} = [BSA-UM]/([UM][BSA]) \quad (6)$$

式中, $[BSA-UM]$, $[UM]$ 和 $[BSA]$ 分别为络合物、伞形花内酯和 BSA 的游离浓度. 从解析出

1494—1498

- [2] HE Ji-Xiang(贺吉香), JIANG Chong-Qiu(江崇球), WANG Hong-Jian(王洪鉴), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 1999, **20**(10): 1548—1550
- [3] LIU Xue-Feng(刘雪峰), XIA Yong-Mei(夏咏梅), CAO Yu-Hua(曹玉华), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(1): 150—152
- [4] LIU Xue-Feng(刘雪峰), XIA Yong-Mei(夏咏梅), FANG Yun(方云), *et al.*. Acta Chim. Sinica(化学学报)[J], 2004, **62**(16): 1484—1490
- [5] LIU Jia-Qin(刘家琴), ZHAI Hong-Lin(翟红林), ZHANG Ji-You(张继友), *et al.*. Chinese J. Spectros. Lab. (光谱实验室)[J], 2006, **23**(3): 602—605
- [6] Hamilton J. H., Gemperline P. J. J. Chemom. [J], 1990, **4**(1): 1—13
- [7] Izquierdo-Ridora A., Saurina J., Hernandez-Cassou S., *et al.*. Chemom. Intell. Lab. Syst. [J], 1997, **38**(1): 183—196
- [8] Maeder M., Zuberbuhler A. D. Anal. Chimica Acta[J], 1986, **181**(2): 287—291
- [9] Maeder M. Anal. Chem. [J], 1987, **59**(3): 527—530
- [10] Tauler R., Smilde A. K., Henshaw J. M., *et al.*. Anal. Chem. [J] 1994, **66**(8): 3337—3344
- [11] Tauler R. Chemom. Intell. Lab. Syst. [J], 1995, **30**(1): 133—146
- [12] Malinowski E. R. J. Chemom. [J], 1989, **3**(1): 49—60
- [13] Khan M. M., Tayyab S. Biochem. Biophys. Acta[J], 2001, **1545**(2): 263—277
- [14] BAI Hai-Xin(白海鑫), YANG Cheng(杨成), YANG Xiu-Rong(杨秀荣). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(2): 227—233
- [15] Honore B., Pedersen P. O. Biochem. J. [J], 1989, **258**(1): 199—204
- [16] LIANG Hong(梁宏), SONG Zhong-Rong(宋仲容), ZHOU Yong-Qia(周永洽). Spectros. Spectral Anal. (光谱学与光谱分析)[J], 1994, **14**(6): 39—42
- [17] Hu Y. J., Liu Y., Pi Z. B. Bioorg. Med. Chem. [J], 2005, **13**(24): 6609—6614

Fluorescence Spectrometric Study on the Interaction Between Umbelliferone and Bovine Serum Albumin with the Use of MCR-ALS

LIU Gen-Lan¹, NI Yong-Nian^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract Under the imitated physiological conditions (pH = 7.4), the interaction between umbelliferone and bovine serum albumin (BSA) was investigated by the fluorescence spectroscopy and the multivariate curve resolution-alternating least squares method (MCR-ALS). In this work, the interaction between umbelliferone and bovine serum albumin (BSA) was studied by performing two different kinds of titration modes. The two spectroscopic data matrices were augmented, and then the information of experiment data was increased. The augmented experiment data matrix was analyzed by the MCR-ALS method. This procedure allowed the recovery of the concentration profiles for each species and the calculation of the [BSA]: [Umbelliferone] ratio in the complex and the apparent equilibrium constant. The effect of umbelliferone on the conformation of BSA was also analyzed *via* synchronous fluorescence spectrometry.

Keywords Umbelliferone; BSA; Fluorescence spectroscopy; MCR-ALS

(Ed.: A, G)