

荧光光谱法研究山梨醇与牛血清白蛋白的相互作用

李丹, 姜新民, 严拯宇*

中国药科大学分析化学教研室, 江苏南京 210009

摘要 采用荧光和紫外吸收光谱法, 研究了利尿脱水药山梨醇(Sorbitol)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。在正常生理条件下, 山梨醇对牛血清白蛋白有较强的猝灭作用, 根据不同的药物浓度、温度及紫外吸收光谱的变化, 判断其猝灭方式可能为静态猝灭, 考察了不同温度、药物浓度等多种条件下 Sorbitol 对 BSA 荧光猝灭的影响。通过 Stern-Volmer 方程和 Lineweaver-Burk 方程的简化形式, 求出在不同温度下反应的结合常数 K_D 分别为 7.4×10^{-5} (25 °C) 和 1.7×10^{-4} (37 °C)、结合位点数 n 为 1。根据反应热力学参数确定了它们之间相互作用的主要形式为电荷作用力。采用同步荧光考察了山梨醇对 BSA 构象的影响, 发现随药物浓度的增大, 色氨酸残基的最大发射波长不变, 而酪氨酸残基所处环境的疏水性改变, 从而导致 BSA 的构象发生了变化。

关键词 山梨醇; 牛血清白蛋白; 荧光光谱; 紫外光谱; 相互作用

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)06-1312-05

引言

山梨醇(Sorbitol)化学名为 1,2,3,4,5,6-己六醇。

山梨醇为利尿脱水药。是甘露醇的异构体, 作用与其相似但较弱。因其大部分以原形由尿液中排出, 形成血液高渗, 可使周围组织脱水。山梨醇进入体内能代谢, 属营养性甜味剂, 但其代谢途径首先是缓慢扩散而被吸收氧化成果糖, 再被利用, 参与果糖代谢途径, 对血糖值和尿糖没有影响, 可以为糖尿病人的甜味剂使用^[1]。

血清蛋白的主要成分是白蛋白, 可与许多内源及外源性化合物结合, 有关蛋白质的结构和功能研究, 是目前生命科学、化学和医学界共同关注和感兴趣的课题^[2-4]。本实验采用荧光法研究了山梨醇与血清白蛋白之间的结合反应, 计算了其结合常数, 并讨论了山梨醇与 BSA 之间的作用力类型, 采用同步荧光技术考察了山梨醇对 BSA 构象的影响。本研究对于山梨醇的药物作用机理提供了可供参考的实验数据与理论根据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

收稿日期: 2007-01-22, 修订日期: 2007-04-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30370404)资助

作者简介: 李丹, 1982年生, 中国药科大学分析化学系硕士研究生

* 通讯联系人 e-mail: yanzhengyujiang@hotmail.com

F-5301PC 型荧光分光光度计(日本岛津公司), pH-2 型 pH 计(上海雷磁分析仪器厂), 恒温水浴(金坛市恒丰仪器厂), 2401 紫外-分光光度计(日本岛津公司)。

牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 南京瑞创生物技术有限公司), 用三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲溶液($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4, 内含 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 维持离子强度)配成 $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备溶液并于冰箱中(温度低于 5 °C)保存。山梨醇贮备液浓度为 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 使用前用二次蒸馏水稀释到刻度。实验所用溶液均以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 水溶液配制, 以维持生理条件下的离子强度, 除 Tris 为生化试剂外, 其余试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 试验方法

于一系列 10 mL 容量瓶中加入 1 mL $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液(考察浓度时例外), 依次加入 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 4.5 mL $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的山梨醇溶液, 再加入 3 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 定容摇匀, 静置 20 min, 测其荧光光谱。固定激发波长为 280 nm, 测其 300~500 nm 的发射光谱。激发, 发射狭缝均为 5 nm, 测定温度分别为 25 和 37 °C。紫外光谱测定温度为 25 °C。

BSA 与药物的同步荧光光谱测定条件同上述荧光光谱,

e-mail: lidan19826688@tom.com

固定荧光发射与激发的波长差分别为 $\Delta\lambda = 60$ nm 和 $\Delta\lambda = 15$ nm, 室温下进行同步荧光扫描。

2 结果与讨论

2.1 猝灭类型的确定

2.1.1 山梨醇对 BSA 的荧光光谱的影响

蛋白质中色氨酸、酪氨酸的存在, 使其具有内源荧光。固定 BSA 的量, 在其中加入山梨醇溶液。随着山梨醇浓度的增加, BSA 的内源荧光强度有规律地降低, 但发射峰位及峰形不变。说明山梨醇对 BSA 的荧光有猝灭作用。按试验方法得到 BSA 的荧光猝灭光谱, 见图 1。

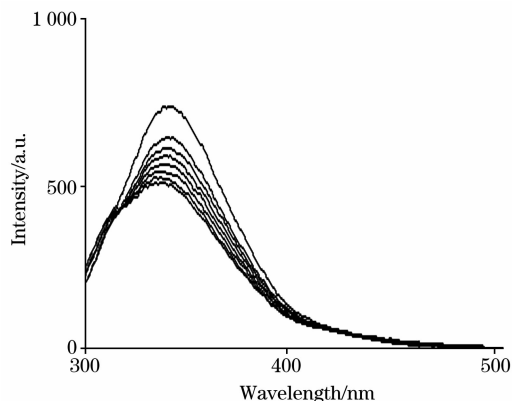


Fig. 1 Effect of sorbitol on fluorescence spectra of BSA

$c_{\text{BSA}} 4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; $c_{\text{Sorbitol}} (1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$, from top to bottom: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5

2.1.2 温度的影响

荧光猝灭作用的有动态猝灭, 静态猝灭和发生非辐射能量转移等^[5]。是动态猝灭还是静态猝灭作用, 可根据结合常数 K_{SV} 随温度的变化关系加以判断。对于动态猝灭作用, 温度升高将有利于荧光体和荧光猝灭剂分子之间的有效碰撞, 并可以促进电子的转移过程, K_{SV} 随温度的升高而增大; 若是静态猝灭, 温度升高, 产物的稳定性降低, 静态猝灭常数 K_{S} 减小^[6, 7]。我们分别测定了正常生理条件下在 25 和 37 °C 时山梨醇对 BSA 的荧光猝灭情况。静态猝灭是药物和蛋白质在基态时生成复合物, 从而导致蛋白质荧光强度降低; 动态猝灭是药物和蛋白质的激发态分子之间的相互作用而导致的荧光猝灭, 可利用 Stern-Volmer 方程: $F_0/F = 1 + K_{\text{q}}\tau_0[Q]$ 进行判断, 式中 F_0 和 F 分别表示猝灭剂不存在和存在时蛋白的荧光强度, $[Q]$ 是猝灭剂浓度, K_{q} 为双分子表现猝灭速率常数, τ_0 为蛋白荧光寿命。从各种条件下的 $(F_0/F - 1) \sim [Q]$ 图(见图 2), 可以求得 $K_{\text{q}}\tau_0 = 8.7 \times 10^3$ (37 °C), 1.2×10^4 (25 °C)。这里 BSA 的荧光寿命 τ_0 约 10^{-8} s, 则 $K_{\text{q}} = 8.7 \times 10^{11}$ (37 °C), 1.2×10^{12} (25 °C)。根据报道, 各类猝灭剂对生物大分子的最大碰撞猝灭速率常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 而本实验所求得的山梨醇对 BSA 的猝灭过程速率常数远远大于此扩散控制的 K_{q} , 说明以上猝灭不是

由碰撞引起的动态猝灭^[8, 9]。可以看出, 在正常生理条件下, 随温度升高直线斜率下降, 表明猝灭为静态机理。

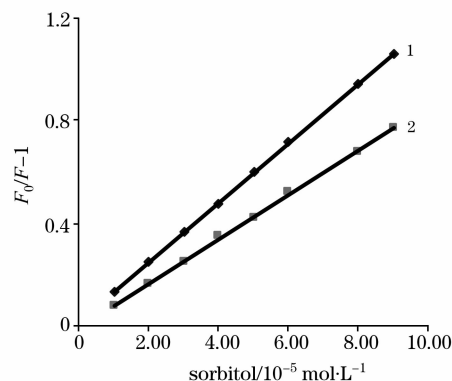


Fig. 2 Stern-Volmer plot of sorbitol vs BSA at pH 7.4(25(1) and 37 °C(2))

2.1.3 吸收光谱的变化

测定了正常生理条件下, $4.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 的紫外吸收曲线及山梨醇与 BSA 等摩尔混合物与山梨醇的差谱。发现在各种条件下, 两图谱均没有重合, 表明药物的加入使 BSA 的紫外吸收发生变化, 故进一步说明猝灭机理为静态猝灭。紫外吸收的差谱图见图 3。

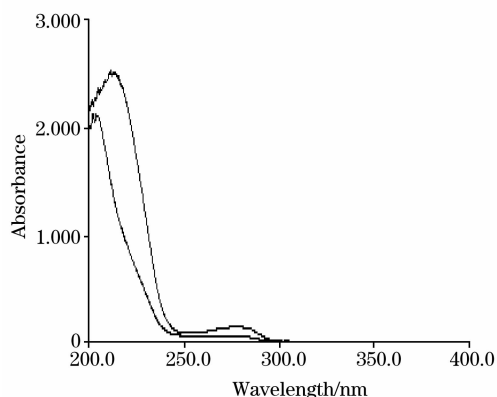
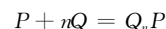


Fig. 3 UV absorption spectra of BSA and differential spectrum of sorbitol and BSA(molar ratio 1 : 1) with sorbitol at pH 7.4, 25 °C

2.2 山梨醇与牛血清白蛋白的结合位点数

山梨醇对牛血清白蛋白的荧光猝灭不是动态猝灭, 就很有可能是由 Sorbitol 与基态的 BSA 之间形成了复合物, 从而产生静态猝灭。假设一个 BSA 分子有 n 个相同且独立的结合位点可与 Sorbitol 结合, 用 P 表示蛋白, Q 表示猝灭剂, Q_nP 表示生成的复合物, 二者之间的猝灭作用可用下式表示^[10]



用 K_A 表示复合物生成常数, 则有

$$K_A = [Q_nP]/([P][Q]^n)$$

不难导出

$$\log K_A + n \log [Q] = \log (F_0/F - 1)$$

$\log(F_0/F - 1)$ 对 $\log[Q]$ 作图(见图 4), 可求得 25 和 37 °C 时

BSA 对 Sorbitol 的结合位点数分别为 1.07 和 0.94, 从而推测山梨醇与牛血清白蛋白二者以 1 : 1 结合。

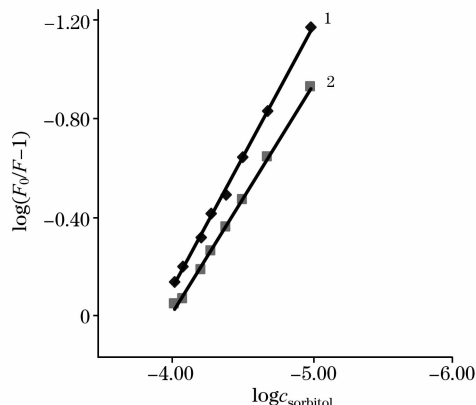


Fig. 4 A plot of $\lg[(F_0 - F)/F]$ vs $\lg c_{\text{Sorbitol}}$ (25 °C (1), $r=0.999\ 5$, 37 °C (2), $r=0.999\ 4$)

2.3 山梨醇与牛血清白蛋白结合常数的计算

对于以 1 : 1 结合的静态猝灭, 山梨醇与牛血清白蛋白结合常数可由它们之间缔合公式求得

$$P + Q \frac{K_A}{A_D} P \cdot Q$$

其生成常数

$$K_A = \frac{[PQ]}{[P][Q]} = \frac{[P]^0 [1 - F/F_0]}{[P]^0 (F/F_0) [Q]} = \frac{[1 - F/F_0]}{(F/F_0) [Q]}$$

进而推出

$$F_0/F = 1 + K_A [Q] \quad (1)$$

而解离常数

$$K_D = 1/K_A = [Q]/(F_0/F - 1)$$

变形为

$$K_D [Q]^{-1} = F_0 (F_0 - F)^{-1} - 1$$

从而得到 Lineweaver-Burk 方程

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D F_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (2)$$

(1)和(2)式均为目前研究者常用的求取蛋白与药物结合常数的公式^[9-14]。由推导过程看, 两者应该是等价的。根据(1)式, 以 $F_0/F - 1$ 对 $[Q]$ 作图(如图 3), 可以求得不同温度下的 K_A ; 而根据(2)式, 以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作图(如图 5), 可以求得不同温度下的 K_D (r 为相关系数)(见表 2)。

Table 1 Binding constants of sorbitol with BSA at different temperatures

	$K_A/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	r	$K_D/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	r
25 °C	1.2×10^4	0.999 2	7.4×10^{-5}	0.999 8
37 °C	8.7×10^3	0.999 9	1.7×10^{-4}	0.999 2

从表中数据可以认为温度对山梨醇与 BSA 之间的结合常数有一定的影响, 同时结合常数显示两者结合不是较稳定且随温度有升高的势, Sorbitol 可在体内被血清白蛋白转运。

2.4 热力学参数的计算及作用力类型的确定

一般药物小分子与蛋白大分子间的非共价相互作用属分

子间的弱相互作用, 包括氢键, 范德华力, 静电和疏水等相互作用的多种形式, 而二者结合的热力学参数可以用于确定它们之间的相互作用, 当温度变化不大时二者结合的焓变 ΔH 可以看作常数^[15-17]。根据公式

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H/R(1/T_1 - 1/T_2)$$

$$\Delta G = -RT \ln K, \Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

用表 1 中的 K_A 值计算热力学参数焓变 ΔH , 熵变 ΔS 和自由能变 ΔG , 其结果见表 2。

利用在正常生理条件下键合常数与温度的关系求得 ΔH 均为负值, ΔS 均为正值, 表明两者之间为电荷作用力。

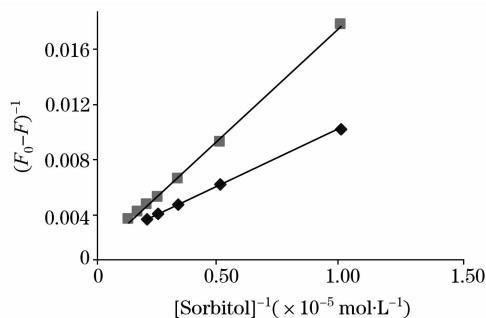


Fig. 5 Lineweaver-Burk plot of BSA quenched by sorbitol at 25 °C and 37 °C

1: 25 °C, $r=0.999\ 5$; 2: 37 °C, $r=0.999\ 4$

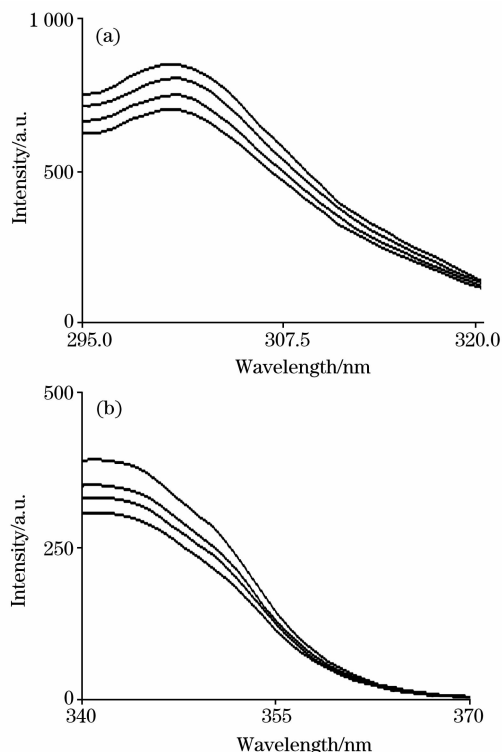


Fig. 6 Synchronous fluorescence spectra of bovin serum albumin with sorbitol

(a): $\Delta\lambda=15\ \text{nm}$; (b): $\Delta\lambda=60\ \text{nm}$; $c_{\text{BSA}} 4.0 \times 10^{-6}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{Sorbitol}} (\times 10 \times 10^{-4}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$, from top to bottom: 0, 2.0, 5.0, 8

Table 2 Thermodynamic constants for the binding of sorbitol with BSA

$T/^\circ\text{C}$	$\Delta H(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
25	-20.58	0.16	-68.91
37	-20.58	0.16	-70.86

2.5 山梨醇对牛血清白蛋白构象的影响

对于蛋白质的同步荧光光谱, $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ 只显示酪氨酸的光谱特性, $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 仅表现出色氨酸残基的荧光。由蛋白质中氨基酸残基的最大荧光发射波长 λ_{max} 与其所处环境的极性的变化可判断蛋白质构象变化^[18, 19]。固定蛋白质浓度, 逐渐增加山梨醇的浓度, 测量 BSA 的同步荧光光谱。图 6(a) 和图 6(b) 分别为 BSA 中酪氨酸和色氨酸残基的荧光光谱图。可以看出 BSA 的荧光主要由酪氨酸残基所贡献。且随山

梨醇浓度的增大, 色氨酸残基的最大发射波长不变, 而酪氨酸残基所处环境的疏水性改变, 导致 BSA 的构象发生了变化。

3 讨 论

实验发现山梨醇对牛血清白蛋白的荧光有猝灭作用, 在正常生理条件下根据 Stern-Volmer 方程计算表现为静态猝灭, 而且紫外吸收光谱也进一步说明猝灭类型是静态猝灭。山梨醇与牛血清白蛋白之间可通过电荷作用形成复合物, 因此可以被白蛋白所贮存、运载, 通过血液循环达到作用部位。这对于从分子水平上了解药物与 BSA 的作用机理及设计合成新药具有一定的指导意义。

参 考 文 献

- [1] YUE Ling, LI Yun-gang, LI Wei, et al(岳玲, 李云刚, 李伟, 等). *Shandong Food Fermentation*(山东食品发酵), 2005, (2): 47.
- [2] FENG Xi-zeng, JIN Rui-xiang, QU Yun, et al(冯喜增, 金瑞祥, 曲芸, 等). *Chem. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), 1996, 17(6): 866.
- [3] TANG Bo, HE Xi-wen, SHEN Han-xi(唐波, 何锡文, 沈含熙). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 1998, 18(1): 21.
- [4] YAN Zheng-yu, PANG Dai-wen, SHAO Xiu-fen, et al(严拯宇, 庞代文, 邵秀芬, 等). *Journal of China Pharmaceutical University*(中国药科大学学报), 2005, 36(3): 230.
- [5] YANG Pin, GAO Fei, MA Gui-bin(杨频, 高飞, 马贵斌). *Bioinorganic Chemistry*(生物无机化学导论). Xi'an: Xi'an Jiaotong University Press(西安: 西安交通大学出版社), 1991.
- [6] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). *Fluorescence Analytical Method*(荧光分析方法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 122.
- [7] YAN Qiu-jun, HE Yu, SONG Gong-wu(闫秋君, 何瑜, 宋功武). *Journal of Hubei University(Natural Science)*(湖北大学学报·自然科学版), 2005, 27(1): 46.
- [8] XIE Wen-jun, FENG Yu-ping, CAO Sheng-li, et al(谢文俊, 冯玉萍, 曹胜利, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(10): 1876.
- [9] YANG Pin, GAO Fei(杨频, 高飞). *Principle of Bioinorganic Chemistry*(生物无机化学原理). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2002.
- [10] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei, et al(杨曼曼, 杨频, 张立伟, 等). *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [11] Joseph R Lakowicz, Gregorio Weber. *Biochemistry*, 1973, 12(21): 4161.
- [12] LU Ji-xin, ZHANG Gui-zhu, ZHAO Peng, et al(卢继新, 张贵珠, 赵鹏, 等). *Acta Chimica Sinica*(化学学报), 1997, 55: 915.
- [13] ZHANG Li-wei, YANG Pin, WANG Qing-wei, et al(张立伟, 杨频, 王庆伟, 等). *Journal of Shanxi University(Nat. Sci. Ed)*(山西大学学报·自然科学版), 1995, 18(1): 36.
- [14] LIU Jiaqin, TIAN Jianniao, HE Wenyin, et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, 35: 671.
- [15] ZHANG Yong, ZHANG Gui-zhu, WANG Yue-mei, et al(张勇, 张贵珠, 王月梅, 等). *Journal of Analytical Science*(分析科学学报), 2000, 16(6): 445.
- [16] YAN Cheng-nong, SHANGGUAN Yun-feng, TONG Jin-qiang, et al(颜承农, 上官云凤, 童金强, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 543.
- [17] Ross D P, Sabramanian S. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096.
- [18] YAN Zheng-yu, SHAO Xiu-fen, JIANG Xin-min, et al(严拯宇, 邵秀芬, 姜新民, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis*(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1494.
- [19] MA Chun-qi, LI Ke-an, ZHAO Feng-lin, et al(马春琪, 李克安, 赵凤林, 等). *Acta Chim. Sin.*(化学学报), 1999, 57(4): 389.

Study of Interaction between Sorbitol and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectrometry

LI Dan, JIANG Xin-min, YAN Zheng-yu*

Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The interaction of sorbitol and bovine serum album (BSA) was studied by fluorescence and ultraviolet absorption spectra. As it is well known to us, the interactional analysis between small molecular drug and biology macromolecule (such as protein, DNA, etc) is one of the important interactional analyses, which can not only offer new biological view but also supply chance for chemist and biochemist to synthesize new drug capable of regulating the biology process effectively. In the present paper, fluorescence spectrophotometry was first employed to study the interaction between BSA and sorbitol. At the same time, the synchronous fluorescence spectroscopy was adopted to review the configuration of BSA influenced by sorbitol, which provides important significance for clinical medication. The results show that sorbitol has strongly quenched the fluorescence of bovine serum albumin in natural physiological condition, the quenching mechanism is a static quenching procedure at different temperatures and drug concentration, and the variational absorption spectra also proves this deduction. At the same time, this article has also examined the influences of sorbitol on the fluorescence quenching of bovine serum albumin at different temperatures and drug concentration. The binding constants and the number of binding sites between sorbitol and BSA were calculated at different temperatures. Furthermore, the enthalpy and entropy changes in the interaction of sorbitol and bovine serum album were also obtained by the equations of Stern-Volmer and Lineweaver-Burk. From the thermodynamic parameters, it can be judged that the primary binding power between sorbitol and BSA is electrostatic force. Moreover, the synchronous fluorescence spectroscopy was applied to examine the effect of sorbitol on the configuration of BSA. The alterative configuration of BSA may be induced by the hydrophobicity environment of tyrosine with the increase in drug concentration. In conclusion, the fluorescence method is highly sensitive and convenient in the study of intermolecular interaction. Further studies in this field will open up the way to applications of biology macromolecule in analytical chemistry and analytical biochemistry.

Keywords Sorbitol; Bovine serum albumin (BSA); Fluorescence spectra; Absorption spectra; Interaction

(Received Jan. 22, 2007; accepted Apr. 26, 2007)

* Corresponding author