

血清白蛋白与小分子化合物相互作用的荧光光谱研究

黄锐^{1,2}, 夏之宁^{1*}, 龚萍³

1. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044
2. 西南政法大学刑事侦查学院, 重庆 401120
3. 重庆医药高等专科学校, 重庆 400030

摘要 以牛血清白蛋白-Triton X-100和牛血清白蛋白-盐酸西布曲明两个体系为实例, 考察了以血清白蛋白和小分子化合物为荧光检测对象所获得的相互作用信息的差异。发现两种方法获得的分子间结合常数差异显著, 说明在以血清白蛋白为检测对象的传统荧光光谱法中, 以色氨酸基团的荧光光谱所表达的信息来代表整个蛋白分子的相互作用信息是不准确的。文章提出了以荧光小分子化合物为检测对象的改进荧光光谱方法和荧光背景扣除方法, 前者能全面表达相互作用过程中分子的整体信息, 后者实现了荧光光谱交叠体系的荧光光谱法相互作用分析。

关键词 血清白蛋白; 相互作用分析; 改进荧光光谱法

中图分类号: O644.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)01-0161-04

引言

血清白蛋白(serum albumin, SA)在哺乳动物体内起着重要的贮存和运输作用^[1]。因此, SA与内源或外源物质的相互作用一直是生命科学、临床医学和环境科学重要的研究课题。SA是一种内源性荧光大分子, 用荧光光谱法可以简便、灵敏、直观地反映出它与其他物质之间的相互作用情况。所以, 荧光光谱法成为人们研究血清白蛋白与其他物质相互作用的主要手段^[2-6]。

目前, 在人们以SA为对象的相互作用研究中, 通常以280~300 nm的紫外光作为激发光, 得到SA的最大荧光发射波长(λ_{em})在340~350 nm。通过对比加入作用物质前后SA在 λ_{em} 处荧光强度值的变化可获得两者的相互作用信息。然而, SA含有20种氨基酸, 其中只有芳香族类的三种氨基酸, 即色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸具有荧光, 它们又因其各自的发色团(侧链基团)不同而具有不同的荧光光谱, 其 λ_{em} 分别为348, 303和282 nm^[7]。由此可见, 传统的荧光光谱法得到的SA的荧光光谱只是色氨酸的荧光性质的反映。显然, SA中色氨酸所占比例是有限的, 而其他19种氨基酸都可能参与到相互作用过程中, 甚至具有更强的结合能力, 但由于其他氨基酸不具有荧光或不能被检测到, 它们与作用对象之间的结合信息不能体现在SA的荧光光谱上。因此, 用色氨酸

的荧光光谱所表达的信息来代表整个蛋白分子在相互作用过程中的变化情况是不准确的。

我们认为, 以SA为对象的传统荧光光谱法的不准确性是因为物质局部产生的信息被当作了整体信息。如果与SA作用的物质是具有荧光的小分子, 那么, 荧光小分子所表达的荧光信号是其分子性质的整体反映。因而, 以小分子为检测对象, 考察体系中SA对小分子荧光性质的影响, 便能获得二者相互作用的准确信息。

本文以牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)与Triton X-100(TX)和盐酸西布曲明(sibutramine hydrochloride, SH)相互作用体系为研究对象, 分别以生物大分子(BSA)和小分子(TX, SH)为荧光源, 对体系的相互作用进行了荧光光谱法研究, 获得了其各自的结合常数, 并通过紫外光谱法对其结果进行了验证。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

牛血清白蛋白(BSA): 生化试剂(>98%), Genview公司, 分子量68 000; Triton X-100(TX): 生化试剂(>98%), Genview公司, 分子量674; 盐酸西布曲明(sibutramine hydrochloride, SH): 原料药(>98.5%)由重庆盛华曦药物有限公司提供; 其他试剂均为分析纯; 实验中所有溶液均用

收稿日期: 2006-12-26, 修订日期: 2007-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(20775096)和教育部跨世纪人才培养计划项目(教技函[2001]3号)资助

作者简介: 黄锐, 女, 1982年生, 重庆大学生物工程学院博士研究生 e-mail: huangrui222@yahoo.com.cn *通讯联系人

去离子水配制。

RF-5301PC 荧光分光光度计, UV2450 紫外-分光光度计 (SHIMADZU 公司)。

1.2 实验方法

缓冲液配制: $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐, $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.0。

传统荧光光谱法: 在一系列 10 mL 容量瓶中, 分别加入相同体积的 BSA 溶液和不同体积小分子化合物 (TX 或 SH) 溶液, 缓冲溶液定容。考察浓度递增的小分子化合物对 BSA 荧光光谱的影响。

改进荧光光谱法: 在一系列 10 mL 容量瓶中, 分别加入相同体积小分子化合物 (TX 或 SH) 溶液和不同体积 BSA 溶液, 缓冲溶液定容。考察浓度递增的 BSA 对小分子化合物荧光光谱的影响。

紫外光谱法: 以与试样中 BSA 浓度相对应的 BSA 溶液作参比, 考察不同浓度 BSA 对小分子化合物紫外吸收光谱的影响。

2 结果与讨论

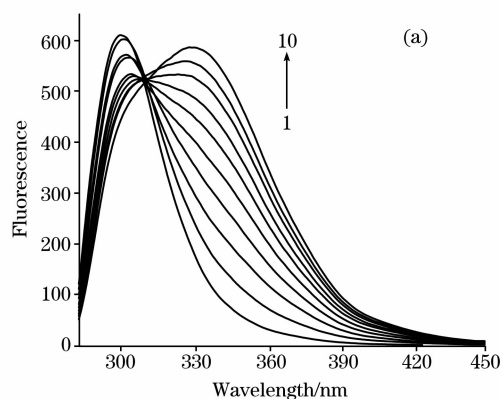
2.1 传统荧光光谱法

2.1.1 BSA-TX 体系的相互作用研究

按照目前研究 BSA 相互作用常用的荧光光谱法, 以浓度一定的 BSA 为荧光检测对象, 考察 TX 的浓度变化对 BSA 荧光性质的影响。观察到随 TX 浓度的增加, BSA 在 340 nm 处的荧光强度逐渐减弱, 而 TX 在 302 nm 处的荧光发射峰随其浓度增加不断升高, 并出现了一个等发射点, 说明 TX 与 BSA 在相互作用过程中产生了新的化合物, 导致 BSA 荧光猝灭。按照 Stern-Volmer 方程^[8]

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (1)$$

式中 F_0 , F 分别为 BSA 溶液中加入荧光猝灭分子前后的荧光发射强度, K_q 为表观猝灭常数, $[Q]$ 为猝灭剂 TX 总浓度,



τ_0 为 BSA 荧光寿命, 约 6 ns ^[9], 按照式(1)对 BSA 在 340 nm 处的荧光强度值进行数据处理, 求得 BSA-TX 的表观猝灭常数 $K_q = 1.7 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 远大于各种猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[10], 说明静态猝灭是 BSA 发生荧光猝灭的主要原因。

对于静态荧光猝灭, 猝灭剂与荧光分子之间的结合常数可由荧光强度与猝灭剂浓度的关系求出^[11]

$$\lg[(F_0 - F)/F] = n \lg[Q] + \lg K \quad (2)$$

按式(2)可以得到拟合曲线方程 $y = 1.0945x + 2.9218$ ($r = 0.9973$), 结合常数 $K_{\text{BSA-TX}} = 8.35 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.1.2 BSA-SH 体系的相互作用研究

以浓度一定的 BSA 为检测对象, 考察不同浓度 SH 对 BSA 荧光性质的影响。同样可以观察到, BSA 在 340 nm 处的荧光强度随 SH 浓度的增加呈递减趋势。根据式(1)求得 BSA-SH 体系的表观猝灭常数 $K_q = 1.0 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 说明 BSA 发生荧光猝灭的主要原因是静态猝灭。按式(2)处理, 求得 $K_{\text{BSA-SH}} = 9.75 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($y = 1.5056x + 2.9891$, $r = 0.9901$)。

2.2 改进荧光光谱法

BSA 含有 582 个氨基酸残基, 其中仅在 134 和 212 位上有 2 个色氨酸残基。显然, 色氨酸给出的荧光信号不能代替 BSA 分子的整体信息。而小分子 TX 和 SH 的荧光信号却可以用来表达整个小分子在相互作用过程中受 BSA 影响的情况。

2.2.1 BSA-TX 体系的相互作用研究

以 TX 为检测对象, 保持其浓度不变, 改变 BSA 的浓度, 得到的荧光光谱如图 1(a)所示。由图可见, 随着 BSA 浓度的增加, TX 在 302 nm 处的最大吸收峰峰高不断降低, BSA 的荧光强度不断增强, 两个荧光发射峰之间也出现了一个等发射点。按式(2)对 TX 在 302 nm 处的荧光强度值进行数据处理, 拟合曲线如图 1(b), 求得结合常数 $K_{\text{BSA-TX}} = 4.58 \times 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

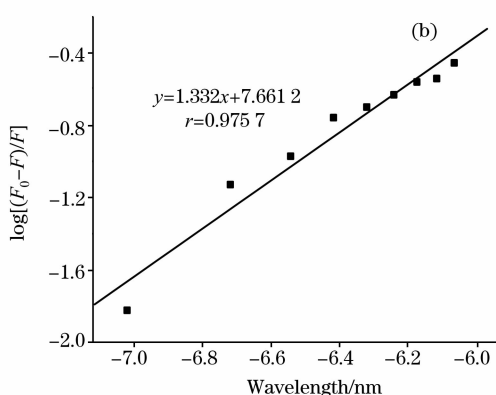


Fig. 1 Fluorescence spectrum of TX ($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) quenched by different concentration of BSA (a) and plot of $\lg[(F_0 - F)/F]$ vs $\lg[\text{BSA}]$ (b) c_{BSA} from 1 to 10: 0; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 ($\times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2.2 BSA-SH 体系的相互作用研究

以 SH 为荧光检测对象, 考察 BSA 对 SH 荧光性质的影响。从图 2(a)中可以看出, 在 SH 的检测条件下, BSA 仍然

具有相当强的发射荧光。SH 的荧光光谱受到严重干扰, 无法从光谱图中得到 BSA 对 SH 影响的明确信息。因此, 本文使用“荧光背景扣除法”进行处理, 消除 BSA 的强荧光背景

干扰。

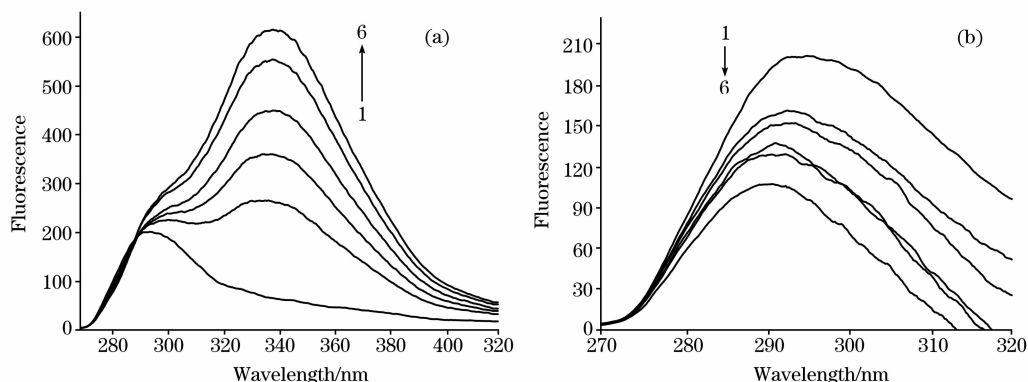


Fig. 2 Interfered fluorescence spectrum with interference (a) actual fluorescence spectrum and (b) of SH ($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) quenched by different concentration of BSA c_{BSA} from 1 to 6: 0; 4.0; 6.0; 8.0; 10; $12 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

假设溶液中 BSA 和 SH 的量远远大于二者结合生成新物质所消耗的量,以图 2(a)中相对应浓度的 BSA 溶液为“参比溶液”,在相同的仪器条件下对其进行荧光扫描,得到不同浓度 BSA 的荧光光谱。SH 在 292 nm 处的实际荧光强度值应为图 2(a)中的 SH 在 292 nm 处的荧光强度值,然后扣除各试样中与 BAS 浓度相对应的 BSA 在 292 nm 处的荧光强度值(在相同实验条件下)。

经过背景扣除,在 SH 受 BSA 浓度变化影响的真实荧光光谱图如图 2(b)。可见随 BSA 浓度的增加,SH 的荧光强度呈递减趋势。按式(2)对 SH 在 292 nm 处的实际荧光强度值进行数据处理拟合,求得二者的结合常数 $K_{\text{BSA-SH}} = 1.38 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

2.3 紫外光谱法研究 BSA-TX 和 BSA-SH 体系的相互作用

BSA 与小分子化合物的结合常数,可以通过 BSA 与化合物发生相互作用前后的吸光度值与化合物浓度之间的关系求出^[12],

$$(A_0 - A)^{-1} = A_0^{-1} + K_A^{-1} A_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (3)$$

以 $(A_0 - A)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作 Lineweaver-Burk 双倒数曲线图,通过斜率和 A_0 可以求得蛋白质与化合物之间的结合常数。

按照 1.2 节紫外光谱法,分别得到 TX 和 SH 与不同浓度 BSA 结合后的紫外光谱图。TX 和 SH 的紫外吸收强度都随 BSA 浓度的增加而不断减弱,且明显红移。通过 TX 和 SH 与 BSA 发生相互作用前后的吸光度值与 BSA 浓度之间的关系,根据式(3)作图,求得两个体系的结合常数分别为 $K_{\text{BSA-TX}} = 3.83 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_{\text{BSA-SH}} = 1.46 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($y = 7.8671x + 3.0129$, $r = 0.9801$; $y = 0.1698x + 0.2481$, $r = 0.9984$) (见图 3)。该结果与 2.2 的结果接近,说明以小分子为检测对象的改进荧光光谱法更能体现真实的相互作用信息,而“荧光背景扣除法”则可以有效消除背景干扰的影响。

3 结论

在对 BSA-TX 和 BSA-SH 体系的相互作用研究中,我们

分别以 BSA 和小分子化合物(TX 和 SH)作为荧光检测对象,得到了不同的结合常数(见表 1)。从结果来看,无论 BSA-TX 体系还是 BSA-SH 体系,以 BSA 为检测对象的传统荧光光谱法得到的结合常数,都远远小于以小分子化合物为检测对象的改进荧光光谱法所得到的结合常数。而采用紫外光谱方法分别对 BSA-TX 和 BSA-SH 体系的相互作用进行了研究后,获得的结合常数分别为 $3.83 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $1.46 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。两个结果均与改进荧光光谱法的结果接近,在数值上,紫外光谱法求得的结合常数均比改进荧光光谱法得到的结果小一个数量级。这种差异可能是由紫外光谱法与荧光光谱法之间本身固有的方法上的差异引起的。

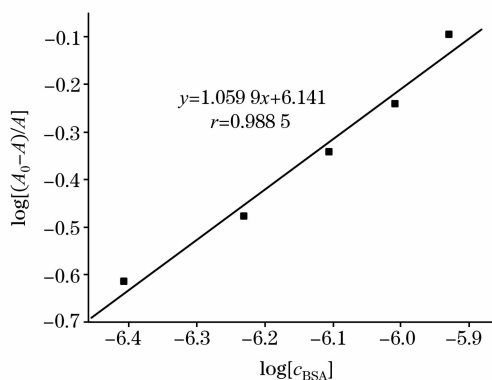


Fig. 3 Plot of $\lg[(A_0 - A)/A]$ vs $\lg c_{\text{BSA}}$ based on Fig. 2 (b)

Table 1 Comparison of the results with different interested analysis in the method of fluorescence spectroscopy

Interaction system	Interested analysis	Equilibrium constant $K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
BSA-TX	BSA	8.35×10^2
	TX	4.58×10^7 (Modified Fs)
BSA-SH	BSA	9.75×10^2
	SH	1.38×10^7 (Modified Fs)

本研究结果充分说明,血清白蛋白与其他物质相互作用的荧光光谱方法研究中,传统方法中以血清白蛋白为荧光信

息源, 获得的相互作用信息具有片面性。而具有荧光性质的小分子却可以体现出真实、全面的信息。对于荧光光谱相互干扰严重的两种物质, 通过“荧光背景扣除法”能获得真实的

荧光光谱, 从而获取有效的相互作用信息, 实现有荧光光谱交叠的体系相互作用的荧光光谱法研究。

参 考 文 献

- [1] Memenamy R H. *Albumin Structure, Function and Uses*, Oxford: Dergamon Press, 1977. 143.
- [2] YU Tian-zhi, YANG Ru-dong(俞天智, 杨汝栋). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2003, 23(8): 763.
- [3] XIE Meng-xia, XU Xiao-yun, WANG Ying-dian, et al(谢孟峡, 徐晓云, 王英典, 等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2005, 63(22): 2055.
- [4] SHENG Liang-guan, YAN Xiang-yang, XU Hua-jie, et al(盛良全, 闫向阳, 徐华杰, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2007, 27(2): 306.
- [5] Shobini J, Mishra A K, Sandhya K, et al. *Spectrochimica Acta Part A*, 2001, 57: 1133.
- [6] Liliana Birla, Ana-Maria Cristian, Mihaela Hillebrand. *Spectrochimica Acta Part A*, 2004, 60: 551.
- [7] Lakowicz J R. *Principle of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983.
- [8] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2nd ed. , New York: Plenum Press, 1999. 237.
- [9] Lakowicz J R, Weker G. *Biochemistry*, 1973, 12 (21): 4171.
- [10] Ware W. J. *Phys. Chem.*, 1962, 66: 455.
- [11] LIU Hui-jun, LIU Wei-ping, CHEN Ai-ping, et al(刘惠君, 刘维屏, 陈爱平, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2004, 24(2): 166.
- [12] LIU Yuan, XIE Meng-xia, KANG Juan(刘媛, 谢孟峡, 康娟). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2003, 61(8): 1305.

Study on the Interaction of Serum Albumin and Micromolecule Compounds by Modified Fluorescence Spectra

HUANG Rui^{1,2}, XIA Zhi-ning^{1*}, GONG Ping³

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China

2. College of Criminal Investigation Law, Southwest University of Political Science and Law, Chongqing 401120, China

3. Chongqing Medical Vocational College, Chongqing 400030, China

Abstract The fluorescence spectroscopy is widely used in the analysis of the interaction between serum albumin (SA) and micromolecule compound, in which SA is measured as the fluorescence source to provide interaction information. A modified method has been compared with the classical method in the present paper, where the micromolecule compounds were used as the interested analytes whose fluorescence spectra were measured. The binding constants obtained based on the classical and modified methods were found much different by studying the two systems, BSA-TX and BSA-SH. The result shows that the classical method has the drawback of taking the fluorescence source of tryptophan instead of all other amino acids groups in SA molecule. Two novel methods were then reported, namely the modified fluorescence spectrometry method and fluorescence background subtracting method. The former could reflect the whole information of the interaction system, while the latter effectively overcame the overlay of spectra in the system, where the fluorescence spectra of the two components interfere with each other terribly. The effectivity of the two novel methods has been proved by ultra-violet spectrometry.

Keywords Serum albumin; Interaction analysis; Modified fluorescence spectra

(Received Dec. 26, 2006; accepted Mar. 26, 2007)

* Corresponding author