

烟碱与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究

盛良全¹, 闫向阳², 徐华杰¹, 童红武², 刘少民^{2*}

1. 阜阳师范学院化学系, 安徽 阜阳 236041

2. 中国科学技术大学烟草与健康研究中心, 安徽 合肥 230052

摘要 在 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸氢二钠-柠檬酸体系中, 采用荧光光谱、紫外吸收光谱研究了牛血清白蛋白(BSA)与烟碱的相互作用。荧光滴定表明这种相互作用使 BSA 的内源荧光猝灭, 尼古丁和 BSA 形成 1:1 稳定复合物。不同温度和酸度下的猝灭作用证实其静态猝灭行为和疏水作用机制。紫外吸收光谱和同步荧光光谱表明, 相互作用引起 BSA 构象变化, 而同步荧光光谱提示结合位点更接近于色氨酸。

关键词 烟碱; 牛血清白蛋白; 紫外吸收光谱; 荧光光谱

中图分类号: O614.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)02-0306-03

引言

烟碱即尼古丁[3-(1-甲基-2-吡咯烷基)吡啶]是一种主要存在于烟草中的生物碱, 在烟草中的含量一般为 1%~2%, 占烟草总植物碱的 95%; 在卷烟烟气中的含量约为 1 mg/支。尼古丁被认为是导致人吸烟上瘾的主要因子。动物诱变实验证明尼古丁具有协同致癌作用, 而其亚硝化衍生物是确定的器官专属性致癌物。细胞实验表明高剂量的尼古丁会诱导 CHO 细胞染色体畸变率和姐妹染色单体交换频率显著提高, 提示尼古丁可能具有一定的遗传毒性。加速质谱实验^[1, 2]显示尼古丁在小鼠体内与鼠肝 DNA 和鼠肝组蛋白均发生加合, 进一步的体外光谱实验^[3]表明尼古丁与鼠肝组蛋白的相互作用使蛋白质的构象发生了变化, 推测尼古丁可以通过改变组蛋白的构象来影响染色体的结构、功能和基因表达。除此之外, 尼古丁对一些生物酶活性存在显著的影响^[4, 5]。因此, 尼古丁对生物组织和生物分子的作用行为和毒性值得广泛关注。由于血清蛋白在结合和运输内源性和外源性化合物中扮演重要角色, 有关小分子底物与其相互作用的研究十分活跃, 但具有潜在致癌性的尼古丁与 BSA 等生物大分子相互作用的研究报道甚少。文献^[6, 7]通过系列光谱实验发现尼古丁与一些血蛋白存在相互作用, 但并未做深入研究。我们的实验证实尼古丁和 BSA 可形成 1:1 稳定复合物, 探讨了其疏水作用机制, 认为相互作用引起 BSA 构象变化。这些结论对尼古丁的体内转运和脱变机制的深入研究具有一定参考价值。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

CARY ECLIPSE 荧光分光光度计(Varian); UV-1600 紫外-可见分光光度计(北京第二光学仪器厂); pH-3 通用型酸度计(成都市三可仪器有限公司)。BSA(上海丽珠生物有限公司), 用二次蒸馏水配制成 $0.66 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; 烟碱, 用二次蒸馏水配制成 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; 磷酸氢二钠、柠檬酸均为分析纯, 配制 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同酸度的系列缓冲溶液。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光光谱

取 1 只 1 cm 的石英比色皿, 加入 0.2 mL BSA 储备液及 2.0 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.0 的缓冲液, 然后依次加入不同量的烟碱, 作用 5 min。选择激发波长为 280 nm, 激发和发射通带均为 10 nm。测量 300~400 nm 的荧光光谱; 固定激发和发射波长间隔 $\Delta\lambda$ 分别为 20 和 60 nm, 记录同步荧光光谱。

1.2.2 紫外吸收光谱

取 2 只 1 cm 的石英比色皿, 样品池中加入 1 mL BSA 储备液和 1 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.0 的缓冲液, 参比池中加入 1 mL 二次蒸馏水和 1 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 8.0 的缓冲液, 然后在 2 个比色皿中同时依次加入不同量的 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 烟碱, 作用 5 min 后, 记录室温下 190~330 nm 范围内的紫外吸收光谱。

收稿日期: 2005-11-28, 修订日期: 2006-03-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270321)和安徽省高等学校省级自然科学基金项目(2006KJ125B)资助

作者简介: 盛良全, 1965 年生, 阜阳师范学院化学系教授 * 通讯联系人 e-mail: liusm@ustc.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

图1记录了荧光滴定过程 BSA 内源荧光的变化,表明在实验范围内 300~400 nm 荧光强度不断降低,且有蓝移趋势。蛋白质荧光的变化在一定程度上反映了蛋白质分子中荧光发色团本身及周围环境的变化,说明烟碱与 BSA 发生了相互作用。这种作用可能引起 BSA 中荧光发色团的微环境及蛋白质分子构象行为的变化。

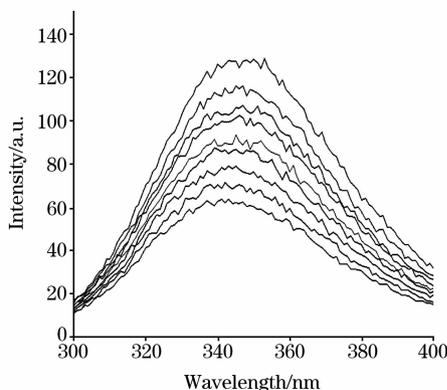


Fig. 1 Effect of nicotine on the fluorescence spectra of BSA $c_{\text{BSA}} = 6.6 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, from up to down $c_{\text{Nic}} = 0, 2.4 \times 10^{-4}, 1.8 \times 10^{-3}, 2.4 \times 10^{-3}, 4.1 \times 10^{-3}, 6.5 \times 10^{-3}, 9.7 \times 10^{-3}, 1.3 \times 10^{-2}, 1.6 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

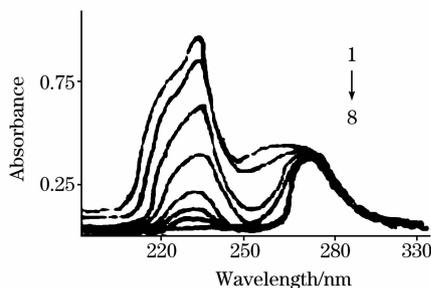


Fig. 2 Effect of nicotine on the absorption spectra of BSA $c_{\text{BSA}} = 6.6 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, from 1 to 8. $c_{\text{Nic}} = 0, 1.6 \times 10^{-3}, 2.0 \times 10^{-3}, 4.0 \times 10^{-3}, 6.0 \times 10^{-3}, 8.0 \times 10^{-3}, 1.0 \times 10^{-2}, 1.2 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

2.2 荧光猝灭机理及结合常数的初步确定

荧光猝灭由动态猝灭和静态猝灭所引起。一般情况下,动态和静态猝灭可依据不同温度下的猝灭特征加以区别。对于动态猝灭,温度的升高将增加有效碰撞的离子数和加剧电子转移过程,使荧光物种的猝灭常数随着温度的升高而增大;若是静态猝灭,则温度的升高将降低复合物的稳定性使猝灭常数减小。假设荧光体与猝灭体由于热运动等发生双分子碰撞时引起动态猝灭,则该猝灭服从 Stern-Volmer 方程

$$F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q]$$

其中 F_0 与 F 分别为加入猝灭体 Q 前后的荧光强度, K_q 为双

分子猝灭常数, τ_0 为生物分子的荧光寿命, K_{SV} 是 Stern-Volmer 猝灭常数;而当荧光体与猝灭体之间形成不发荧光的 1:1 型复合物时,静态猝灭满足 Stern-Volmer 方程 $F_0/F = 1 + K_s[Q]$ 和 Lineweaver-Burk 方程

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

实验分别记录了 20, 25 和 30 °C 下牛血清白蛋白与烟碱作用的荧光光谱,利用不同温度下的实验结果,以 F_0/F 对相应的 $[Q] \times 10^6$ 作 Stern-Volmer 曲线拟合,表 1 的结果表明 Stern-Volmer 曲线呈现良好的线性关系,且随着温度升高 Stern-Volmer 曲线斜率逐渐降低,说明烟碱对 BSA 荧光猝灭效应归于静态猝灭机制。按生物分子的荧光寿命 τ_0 为 10 ns,计算双分子猝灭常数远大于最大动态扩散猝灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,进一步表明其静态猝灭行为。以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 拟合 Lineweaver-Burk 方程,不同温度下的线性相关系数 r 依次为 0.991 9, 0.997 8, 0.995 9,可见该双倒数亦呈现良好的线性关系,再次确定为静态猝灭。求算结合常数 K_A ($K_A = \frac{1}{K_D}$) 分别为 $8.85 \times 10^4, 4.40 \times 10^4$ 和 $1.10 \times 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

Table 1 The slopes K_{SV} for the Stern-Volmer curves, their correlation coefficients r and the dynamic quenching constants K_q at different temperatures

$T/^\circ\text{C}$	$K_{\text{SV}}/(\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})$	r	$K_q(\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
20	5.79×10^4	0.985 8	5.71×10^{12}
25	3.75×10^4	0.992 9	3.74×10^{12}
30	1.25×10^4	0.997 5	1.20×10^{12}

2.3 结合位点数 n 及结合常数 K_A 的进一步计算

设烟碱与 BSA 形成 n 个结合位点的复合物,可获得求算 K_A 和 n 的公式

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg[\text{Nic}]$$

按上述公式分别作不同温度下 $\lg[(F_0 - F)/F] \sim \lg[\text{Nic}]$ 的双对数拟合,获得的 K_A 和 n 见表 2。可以看出,烟碱与 BSA 结合常数与 2.2 节结果基本相符,结合位点数均近似为 1。

Table 2 The binding constants K_A , the binding numbers n and their correlation coefficients r at different temperatures

$T/^\circ\text{C}$	$K_A(\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})$	r	n
20	2.33×10^4	0.989 4	1.18
25	1.72×10^4	0.998 1	1.04
30	1.74×10^4	0.999 0	1.01

2.4 作用力类型的判定

猝灭体和生物大分子的相互作用力主要有氢键,范德华力,静电引力和疏水力几种类型。当温度相差不大时,可以把反应焓变看成一个常数,由 Lineweaver-Burk 方程中不同温度下的结合常数 K_A ,根据下列方程计算出反应焓变、自由能和熵变。

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

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G = -RT\ln K_2$$

通过计算得出 ΔH , ΔG , ΔS 分别为 $1.19 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$, $-2.38 \times 10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$, $119.80 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, 即烟碱与 BSA 的相互作用焓变 $\Delta H > 0$, 熵变 $\Delta S > 0$, 表明牛血清白蛋白与烟碱的主要作用力为疏水作用力^[8]。

实验同时考察了 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 和 10.0 等 8 种不同酸度下烟碱与牛血清白蛋白的相互作用, 结果表明相互作用的结合常数大致相等, 分别为 2.80×10^4 , 3.13×10^4 , 4.28×10^4 , 1.24×10^4 , 1.67×10^4 , 1.5×10^4 , 2.69×10^4 , $3.22 \times 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, 进一步说明这种相互作用主要为疏水相互作用。

2.5 相互作用对蛋白质构象的影响

2.5.1 紫外吸收光谱

图 2 为烟碱对 BSA 紫外吸收光谱的影响, 在研究体系中 BSA 显示了 2 个特征的蛋白质吸收带, 其峰位置分别为 230 和 278 nm, 随着烟碱的不断加入, 230 nm 的特征峰迅速降低, 表明烟碱与牛血清白蛋白发生了较强的相互作用并引

起蛋白质构象的改变。目前对蛋白质构象变化的研究主要集中在分析 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的二级构象含量之间的变化^[9-11], 而这种变化与其相对应的氨基酸环境和光谱特征有关, 因此由光谱特征的变化可获得蛋白质构象变化的情况。以 BSA 为例, 在 230 nm 附近由肽键的 C=O 的 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起的吸收与蛋白质的 α -螺旋含量有关, 在 278 nm 附近的吸收峰是其肽键上色氨酸和酪氨酸等芳香环 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起的。当加入烟碱时, 230 nm 的吸收峰随着烟碱浓度的增大而减小, 说明烟碱与牛血清白蛋白结合后, 使蛋白质的分子构型发生变化, α -螺旋减少。

2.5.2 同步荧光光谱

实验考察了烟碱与 BSA 相互作用的同步荧光光谱, 结果表明酪氨酸和色氨酸残基的同步荧光光谱都表现出与普通荧光不同的猝灭特征, 290 nm 左右的主峰荧光强度下降, 表明整个 BSA 大分子更趋向于折叠态, α -螺旋含量减少; 而 340 nm 左右荧光增强, 说明发色团微环境疏水性增强, 更证明疏水作用机制。相比之下, 色氨酸残基荧光的变化比酪氨酸残基更显著, 说明结合位点更接近于色氨酸残基。

参 考 文 献

- [1] Li X S, Wang H F, Shi J Y, et al. Radiocarbon, 1996, 38(2): 347.
- [2] Wu X H, Wang H F, Liu Y F, et al. Radiocarbon, 1997, 39(2): 293.
- [3] WU Xiao-hong, SUN Hong-fang, LIU Yuan-fang(吴小红, 孙红芳, 刘元方). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1999, 44(23): 2504.
- [4] GAN Zhen-hai, ZHUANG Qian-kun, ZHANG Jian-xun(甘震海, 庄乾坤, 张建勋). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2002, 30(4): 385.
- [5] LIN Lin, CHEN Xi-qiao, ZHAO Fu-qun, et al(林琳, 陈锡桥, 赵福群, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2004, 62(10): 1003.
- [6] WANG Yan, CHENG Yan, SUN Hong-fang. Chinese Chemical Letters, 2000, 11(3): 247.
- [7] WANG Hai-fang, WANG Yan, CHENG Yan, et al. Chinese Science Bulletin, 2002, 47(7): 538.
- [8] ZHU Keng, LI Na, LI Ke-an, et al(朱铿, 李娜, 李克安, 等). Chemical Reagents(化学试剂), 1999, 21(1): 17.
- [9] SHENG Liang-quan, LIU Shao-min, ZHANG Yan, et al(盛良全, 刘少民, 张燕, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(5): 888.
- [10] MA Guo-zheng, TAN Fei, JIANG Yong-jun, et al(马国正, 谭非, 蒋勇军, 等). Acta Phys.-Chem. Sin.(物理化学学报), 2005, 21(2): 123.
- [11] CHANG Xi-jun, HUANG Yan, HE Qun.(常希俊, 黄燕, 贺群). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2005, 63(3): 223.

Study on the Interaction between BSA and Nicotine

SHENG Liang-quan¹, YAN Xiang-yang², XU Hua-jie¹, TONG Hong-wu², LIU Shao-min^{2*}

1. Department of Chemistry, Fuyang Teachers College, Fuyang 236041, China

2. Research Center of Tobacco and Health, University of Science and Technology of China, Hefei 230052, China

Abstract The interaction of BSA and NIC was investigated by absorption spectra, fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy. In the system of sodium phosphate dibasic-citric acid of $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, fluorescence titration showed that the fluorescence intensity of BSA at 342 nm was quenched when NIC was added, NIC was capable of binding with BSA to form a 1 : 1 complex and the quenching mechanism of BSA affected by NIC was shown to be a static quenching procedure by calculating the binding number n and binding constant K . NIC decreased the intensity of the characteristic absorption peak of BSA, showing that the binding of NIC to BSA had strong impact on protein conformation with the decrease in α -helical content of the protein. Synchronous fluorescence indicated that the binding of NIC to BSA is near tryptophan subunit.

Keywords Nicotine (NIC); BSA; Absorption spectroscopy; Fluorescence spectroscopy; Synchronous fluorescence spectroscopy

* Corresponding author

(Received Nov. 28, 2005; accepted Mar. 28, 2006)