

光谱分析法研究八羧酸酞菁铝配合物与牛血清白蛋白的结合作用

陈奎治¹, 彭亦如^{1*}, 林伟¹, 曹育红¹, 徐国兴², 翁家宝^{1,3}

1. 福建师范大学化学与材料学院, 福建 福州 350007
2. 福建医科大学附属第一医院, 福建 福州 350004
3. 中国科学院福建物质结构研究所结构化学国家重点实验室, 福建 福州 350003

摘要 以八羧酸酞菁铝配合物($\text{AlPc}(\text{COOH})_8$)为红区荧光探针, 用紫外光谱和荧光光谱分析方法研究了($\text{AlPc}(\text{COOH})_8$)与牛血清白蛋白(BSA)的结合作用, 测定了八羧酸酞菁铝与牛血清白蛋白(BSA)的结合位置数和结合常数, 结果分别为 $n=5.7$, $K=5.74 \times 10^5$ 和 $K=3.51 \times 10^5$, 两种分析方法结果基本一致。以氯血红素(HE)、布洛芬(IB)、L-色氨酸(TRP)为分子探针, 用络合竞争法研究了它们对 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ -BSA 体系紫外光谱的影响, 结果表明, 往体系中加入 HE 后, $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 的单体吸收峰增强, 体系由结合态往游离态“转变”, 而加入 TRP 和 IB 后, 吸收光谱未观察到明显的变化, 由此确定 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 的结合点为 Site I。

关键词 八羧酸酞菁铝; 牛血清白蛋白; 竞争络合; 结合常数

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)01-0084-04

引言

红区及近红外荧光检测技术已广泛应用于免疫分析, DNA 测序, 核酸杂交以及蛋白质, 核苷酸, 氨基酸, 肽, 油脂, 胺, 醇和某些金属等方面的检测^[1,2]。但是由于红区及近红外荧光探针试剂分子量较大、水溶性差、发射波长在 630 nm 以下而且成分复杂, 目前获得应用的种类和数量还相当有限。因此研究和开发新的红区及近红外荧光探针仍然是十分重要的。

八羧酸酞菁铝外围的 4 个苯环各带有两个羧基, 具有较好的水溶性, 且发射峰在 697 nm, 受其他荧光物质干扰的可能性很小, 是一类性能优良的红区荧光探针。本文分别采用紫外和荧光光谱分析方法测定了 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 的结合常数、结合位置数和结合位置。

1 仪器及试剂

Cary 50 紫外-可见吸收光谱仪(美国瓦里安公司); RF 540 荧光分光光度计(日本岛津公司); PHS-3C 精密 PH 计(上海雷磁仪器厂)。

$\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 是以均苯四甲酸酐为原料, 钼酸铵为催化剂, 模板反应合成。产物经元素分析、红外、紫外、核磁和热重表征; 牛血清白蛋白(BSA)、氯血红素(HE)、L-色氨酸(TRP)为中国医药(集团)上海化学试剂公司产品, BSA 分子量按 67 000 计算; 布洛芬(IB)为哈尔滨滨凯制药有限公司产品; $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 以 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液溶解配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; BSA 配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; HE, TRP 和 IB 分别配成 $2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液; 缓冲溶液以 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸和 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠按比例配置。试剂均为分析纯。

2 实验结果与讨论

2.1 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 体系的紫外光谱

$\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 体系的吸收光谱^[3]如图 1 所示。其 Q 带最大吸收峰在 694 nm 处, 形状表明主要以单体形式存在。BSA 滴定 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$, 峰形不变, 强度下降而且最大吸收峰位红移至 702 nm 处, 表明 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 可能主要是以单体形式结合。

根据文献^[4], 蛋白质与有机染料在溶液中的结合反应

收稿日期: 2005-12-16, 修订日期: 2006-03-26

基金项目: 福建省自然科学基金项目(C0510007), 福建省青年人才创新项目(2002J019), 福建省教育厅重点项目(JA05195), 结构化学国家重点实验室(040083), 国家自然科学基金项目(20604007)和教育部重点科技项目(206071)资助

作者简介: 陈奎治, 女, 1982 年生, 福建师范大学化学与材料学院在读硕士 e-mail: chenkuizhi@163.com * 通讯联系人

符合以下回归方程

$$\Delta A^{-1} = (\Delta \epsilon c_p)^{-1} + (\Delta \epsilon c_p K)^{-1} c_B^{-1} \quad (1)$$

式中的 ΔA 是加 BSA 溶液与试剂空白溶液吸光度之差, c_p , c_B 分别是 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 和 BSA 的分析浓度, $\Delta \epsilon$ 为结合态与游离态配体平均摩尔吸光系数之差, K 为表观结合常数。在固定 c_p 改变 c_B 的实验中, ΔA^{-1} 与 c_B^{-1} 呈线性关系, 由回归直线的斜率和截距可得 $\Delta \epsilon = 3.33 \times 10^4$ 和 $K = 5.74 \times 10^5$, 根据 $n = Kc_p$ 和 $S = F/n\Delta \epsilon$ 的关系 (F 为牛血清白蛋白的分子量), 分别求得最大结合数 $n = 5.74$ 和桑德尔灵敏度 $S = 0.35$ 。

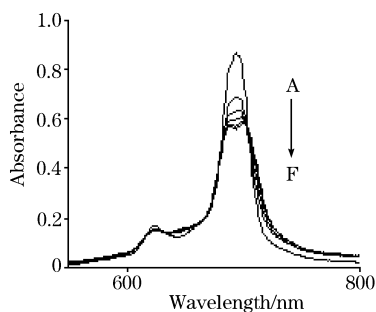


Fig. 1 The absorption spectra of $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ with BSA

25 °C, pH 5, $c_{\text{AlPc}(\text{COOH})_8}$: $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 c_{BSA} : ($\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);
 A: 0; B: 0.2; C: 0.4; D: 0.6; E: 0.8; F: 1.0

2.2 八羧酸酞菁铝对牛血清白蛋白的荧光光谱

BSA 上色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在, 使其具有内源荧光^[5]。用 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ ($0 \sim 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 滴定 BSA ($1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 随着 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 浓度的增大, BSA 荧光强度有规律地降低, 但发射峰位及峰形不变 (如图 2)。 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ -BSA 体系荧光光谱随 pH 值变化而变化, 而当 pH 5 的时候, 荧光猝灭幅度最大, 相互作用最强^[6]。

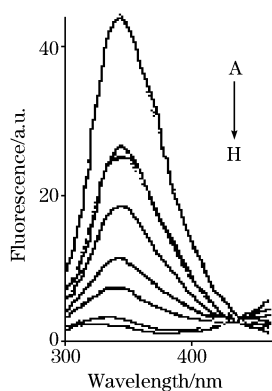


Fig. 2 The fluorescence spectra of $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ with BSA

25 °C, pH 5, c_{BSA} : $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{\text{AlPc}(\text{COOH})_8}$: ($\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$);
 A: 0; B: 0.5; C: 1.0; D: 2.0; E: 3.5; F: 5.0; G: 7.5; H: 10.0

对于 BSA 这样有多个彼此相同又互相独立的键合位置的生物大分子^[7], 有

$$F_0/F = 1 + K_A[Q] \quad (2)$$

F_0 为未加 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 时 BSA 的荧光强度, F 表示加入浓度为 $[Q]$ 的 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 后 BSA 的荧光强度, K_A 为结合常数。可由 (2) 式可推导出

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + F_0^{-1} K_D [Q]^{-1} \quad (3)$$

以 F/F_0 对 $[Q]$ 作的八羧酸酞菁铝的 Stern-Volmer 猝灭曲线如图 3(a), 以八羧酸酞菁铝的 $(F_0 - F)^{-1}$ 对各自的 $[Q]^{-1}$ 作双倒数图如图 3(b)。由图 3(b) 的斜率和 F_0^{-1} 求得 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 的解离常数 $K_D = 2.85 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 由 K_D 换算出结合常数 $K_A = 3.51 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。因为 $K_A = K_q \tau_0$, τ_0 为 BSA 的荧光寿命约为 10^{-8} s , 求得 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 的表观猝灭常数 $K_q = 3.51 \times 10^{13}$, 数量级在 10^{13} 以上^[8-10], 远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散猝灭常数 (约 10^{10}), 说明静态猝灭是引起 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ -BSA 荧光猝灭的主要原因, 进一步说明 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ -BSA 形成了没有荧光的化合物, 导致荧光强度降低。可以认为白蛋白带有较多游离氨基, 在酸性介质中 (pH 5), 由于质子化而呈正电荷状态, 与溶液中带有负电荷的 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 相互作用, 导致荧光物质 BSA 荧光强度降低。

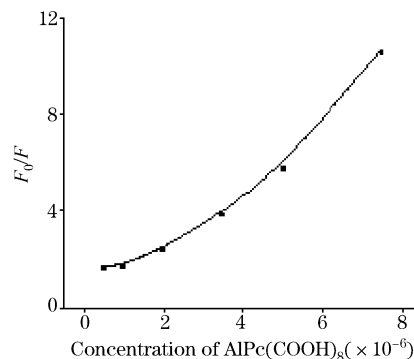


Fig. 3(a) The Stern-Volmer curve of $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ with BSA

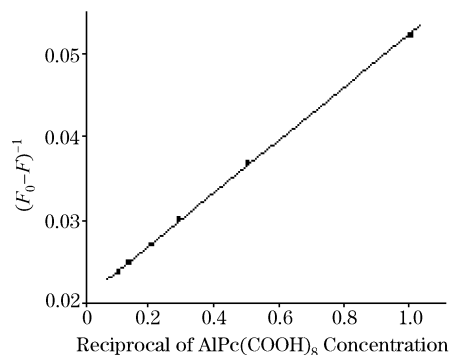


Fig. 3(b) The Lineweaver-Burk curve of $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ with BSA

2.3 竞争络合法研究 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与牛血清白蛋白的结合位置

血清白蛋白的三维晶体结构已探明, 有 3 个类似的结构域: Site I, Site II 和 Site III^[11]。每个结构域又含有 A 与 B₂ 个亚结构域。6 个区域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 某些分子探针对蛋白质不同区域有特异性的结合^[11, 12]。作

为 Site I 的探针有华法令、保泰松和 HE 等；Site II 探针有 IB 和氯灭酸等；Site III 有 TRP。为了探明 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 的结合位置，以 HE, IB, TRP 分别作为白蛋白特定结合位置的分子探针，研究了它们对 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ -BSA 体系紫外吸收光谱的影响，以确定 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 在 BSA 上的结合位置。为了使分子探针充分与体系结合，3 种探针与 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 浓度比分别为： $\text{AlPc}(\text{COOH})_8/\text{HE}$ 为 1/20， $\text{AlPc}(\text{COOH})_8/\text{IB}$ 为 1/20， $\text{AlPc}(\text{COOH})_8/\text{TRP}$ 为 1/1 000。

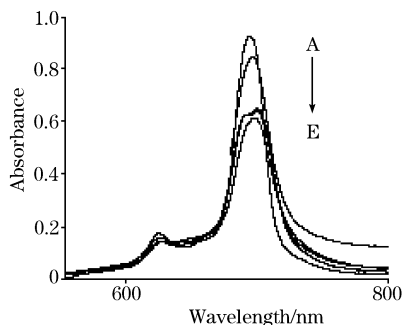


Fig. 4(a) Effects of HE, IB and TRP on absorption spectra of $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ -BSA system (1 : 1)

- A: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 (1 \times 10^5)$;
- B: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} (1 : 1)$;
- C: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} + \text{HE} (1 : 1 : 20)$;
- D: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} + \text{IB} (1 : 1 : 20)$;
- E: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} + \text{TRP} (1 : 1 : 1\ 000)$

在 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 同浓度的体系中，分别滴加 HE, IB, TRP。滴加 HE 后，体系的吸收光谱图 4(a) 发生了明显的变化： $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 的 Q 带单体的特征吸收峰增强，游离酞菁的浓度增加， $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 由结合态往游离态转变。上述结果表明，HE 可以置换与 BSA 结合的

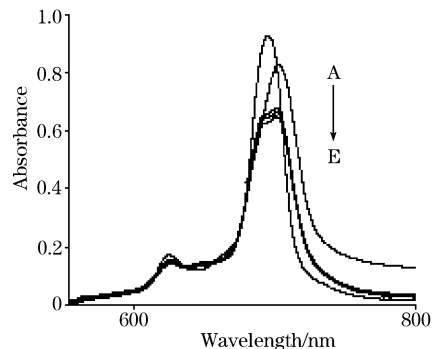


Fig. 4(b) Effects of HE, IB and TRP on absorption spectra of $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ -BSA system (1 : 10)

- A: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 (1 \times 10^5)$;
- B: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} (1 : 1)$;
- C: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} + \text{HE} (1 : 1 : 20)$;
- D: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} + \text{IB} (1 : 1 : 20)$;
- E: $\text{AlPc}(\text{COOH})_8 + \text{BSA} + \text{TRP} (1 : 1 : 1\ 000)$

$\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ ，可以确定 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 的结合点是 Site I。但是 TRP 和 IB 的加入后，体系的吸收光谱并未观察到明显的变化。

为了进一步确定 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 结合的主要结合点，将 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 与 BSA 的浓度比变为 1 : 10，此时 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 几乎全部在主要的结合点上与 BSA 结合，往体系中逐滴加入 HE，从吸收光谱图 4(b) 可以看到游离酞菁的浓度增加；而加入 IB 和 TRP 后吸收谱并无变化。因此，进一步说明了 $\text{AlPc}(\text{COOH})_8$ 主要结合在 BSA 的 Site I 位置。

研究荧光探针与 BSA 的相互作用，在生化领域中也是一项比较热门的课题^[13,14]。

参 考 文 献

- [1] SHE Yuan-bin, CHEN Yu-yun, REN Xiao-yuan, et al(余远斌, 陈玉芸, 任晓媛, 等). Science & Technology in Chemical Industry(化工科技), 1999, 7(2): 21.
- [2] Shirai H, Yagi S, Suzuki A, et al. Makromol. Chem., 1977, 178: 1889.
- [3] ZHANG Hong-yi, LIU Bao-sheng, WANG Fu-li(张红医, 刘保生, 王甫丽). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(2): 342.
- [4] WEI Yong-ju, LI Ke-an, TONG Shen-yang(魏永巨, 李克安, 童沈阳). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 1996, 24(4): 387.
- [5] Eftink M R, Ghiron C A. Analytical Biochemistry, 1981, 114: 199.
- [6] YU Ying, LIAO Jian, HUANG Fa-de(俞英, 廖尖, 黄发德). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(6): 1067.
- [7] ZHANG Xiao-wei, ZHAO Feng-lin, LI Ke-an(张晓威, 赵凤林, 李克安). Chemical J. of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1999, 20(7): 1063.
- [8] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [9] ZHANG Bao-lin, WANG Wen-qing, YUAN Rong-yao(张保林, 王文清, 袁荣尧). Acta Chimica Sinica(化学学报), 1994, 52(12): 1213.
- [10] Kragh-Hannsen U. Pharmacological Rev., 1981, 33(1): 17.
- [11] XU Yan, SHEN Han-xi, HUANG Han-guo(徐岩, 沈含熙, 黄汉国). Chemical J. of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1996, 17(12): 1855.
- [12] Filyasova A I, Kudelina I A. Journal of Molecular Structure, 2001, 560: 173.
- [13] HE Hua, YE Hai-ying, DAI Li, et al(何华, 叶海英, 戴丽, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(3): 480.
- [14] WANG Chun, WU Qiu-hua, WANG Zhi, et al(王春, 吴秋华, 王志, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1672.

Synthesis and Characterization of Octa-Carboxylic Phthalocyanine Aluminum and Its Interaction with Bovine Serum Albumin

CHEN Kui-zhi¹, PENG Yi-ru^{1*}, LIN Wei¹, CAO Yu-hong¹, XU Guo-xing², WENG Jia-bao^{1, 3}

1. College of Chemistry and Materials, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China

2. The First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

3. State Key Laboratory for Structure Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350003, China

Abstract Octa-carboxylic phthalocyanine aluminium (AlPc(COOH)₈) was used as fluorescent probe of infrared region. The interaction of octa-carboxylic phthalocyanine aluminium (AlPc(COOH)₈) and bovine serum albumin(BSA) was studied by UV/Vis and fluorescence spectra methods. The binding constant K_A and n of phthalocyanine aluminium with BSA were determined. The results were $K = 5.74 \times 10^5$, $n = 5.7$ and $K = 3.51 \times 10^5$, for these two methods respectively. The same results by using two different analytical methods were obtained. Besides, hemin chloride(HE), ibuprofen(IB) and L-tryptophan(TRP) were used as probes, and the effects of these probes on the spectra of AlPc(COOH)₈-BSA were studied by competitive binding method. The result indicated that, by adding HE into the AlPc(COOH)₈-BSA system, obvious spectral change of the system was observed, while adding TRP and IB caused no spectral changes. The binding site of octa-carboxylic phthalocyanine aluminium on the BSA was found to be at the I site by competitive binding method.

Keywords Octa-carboxylic phthalocyanine aluminium; Bovine serum albumin; Competitive complexation; Binding constant

(Received Dec. 16, 2005; accepted Mar. 26, 2006)

* Corresponding author