

# 吡蚜酮与牛血清白蛋白的相互作用

徐巍<sup>1</sup>, 吴霞<sup>1</sup>, 周海平<sup>1</sup>, 刘潇或<sup>1</sup>, 杨景和<sup>1</sup>, 范金勇<sup>2</sup>, 张梅凤<sup>2</sup>

(1. 山东大学化学与化工学院, 济南 250100; 2. 山东省农药研究所, 济南 250100)

**摘要** 利用紫外吸收、荧光、同步荧光光谱及圆二色谱研究了吡蚜酮与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用. 结果发现, 吡蚜酮使 BSA 的紫外吸收峰强度降低, 峰位红移; BSA 的特征荧光峰猝灭, 荧光猝灭常数  $K_{sv}$  随着温度的升高而降低, 表明吡蚜酮与 BSA 发生了较强的相互作用, 且吡蚜酮对 BSA 的荧光猝灭机制属于静态猝灭. 计算了不同温度下的结合常数和结合位点数; 由 van't Hoff 方程计算出体系的  $\Delta H$  和  $\Delta S$  值, 得出二者之间的作用力主要为氢键和范德华力; 根据非辐射能量转移理论确定了给体-受体间的结合距离  $r = 2.4 \text{ nm}$ . 采用同步荧光光谱和圆二色谱考察了吡蚜酮对牛血清白蛋白构象的影响.

**关键词** 吡蚜酮; 牛血清白蛋白; 荧光猝灭; 相互作用

**中图分类号** O657      **文献标识码** A      **文章编号** 0251-0790(2009)11-2175-05

蛋白质是生命现象的物质基础, 而血清白蛋白作为载体蛋白<sup>[1]</sup>, 对脂肪酸、氨基酸、金属离子及药物等在血浆中的传输、分配及新陈代谢<sup>[2]</sup>起着重要作用. 蛋白质与内源性化合物及许多药物分子之间相互作用的研究一直受到人们的关注<sup>[3,4]</sup>, 而与农药分子相互作用的研究报道相对较少<sup>[5]</sup>.

随着人们对环境保护的日益重视, 高毒、高残留及对生态环境影响大的农药品种将被淘汰. 吡蚜酮又名吡嗪酮(Pymetrozine, 简称 Py), 其化学名称为(*E*)-4,5-二氢-6-甲基-4-(3-吡啶亚甲基氨基)-1,2,4-三嗪-3(2*H*)-酮. 吡蚜酮属于吡啶类杀虫剂, 是全新的非杀生性杀虫剂, 它具有高效、低毒、对环境友好的特性, 符合当今农药发展方向, 因此得到了迅速的推广应用<sup>[6]</sup>. 吡蚜酮可用于防治大部分翅目害虫, 尤其是蚜虫科、粉虱科、叶蝉科及飞虱科害虫, 适用于蔬菜、水稻、棉花、果树及多种大田作物<sup>[7-9]</sup>. 鉴于农药的普遍毒性, 吡蚜酮也不可避免地对人有直接或间接的毒性, 故研究吡蚜酮与牛血清白蛋白的相互作用具有重要意义; 又因蛋白质与污染物发生结合作用后, 可减缓污染物的急性和毒性, 所以该研究还可为进一步了解蛋白质在外源污染物对生物体的毒性效应中所起的作用提供基础信息<sup>[10]</sup>.

本实验利用紫外吸收光谱和荧光光谱研究吡蚜酮与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 计算了吡蚜酮与 BSA 结合时的结合常数、结合位点数和结合反应的热力学参数, 利用同步荧光和圆二色谱技术探讨了吡蚜酮对 BSA 构象的影响及吡蚜酮与 BSA 的相互作用特点.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司); U-4100 紫外-可见分光光度计(日本日立公司); JASCO J-810 圆二色光谱仪(日本分光公司); Delta320-S 型酸度计(上海科多仪器有限公司).

牛血清白蛋白(BSA, 上海润捷化学试剂有限公司), 用蒸馏水配制成  $1.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$  储备液, 于  $0 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存; 吡蚜酮(95%), 用无水乙醇配制成  $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  储备液; 质量分数为 9% 的 NaCl 水溶液;  $0.05 \text{ mol/L}$  ( $\text{pH} = 7.4$ ) 的 Tris-HCl 缓冲溶液. 所用试剂均为分析纯, 实验用水均为三次蒸馏水.

### 1.2 实验过程

在  $25 \text{ mL}$  比色管中依次加入  $1.0 \text{ mL}$  质量分数为 9% 的 NaCl 溶液、 $1.0 \text{ mL}$   $0.05 \text{ mol/L}$  Tris-HCl 缓冲溶液、 $1.0 \text{ mL}$   $1.0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$  BSA 及一定体积的吡蚜酮溶液, 用蒸馏水稀释至  $10 \text{ mL}$ , 振荡摇匀,

收稿日期: 2009-03-04.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20575035)和山东省自然科学基金(批准号: Z2008B04)资助.

联系人简介: 吴霞, 女, 博士, 教授, 主要从事光谱分析及生物分析研究. E-mail: wux@sdu.edu.cn

静置 15 min 后测定。

荧光光谱的测定: 1 cm 石英比色池, 在荧光分光光度计上记录 295 ~ 440 nm 波长范围内的荧光发射光谱, 固定发射与激发波长差  $\Delta\lambda = 60$  nm 测定样品的同步荧光光谱。

圆二色谱的测定: 0.1 cm 石英比色池狭缝宽度为 1 nm, 扫描范围为 190 ~ 240 nm, 扫描速度为 50 nm/min, 响应时间为 2 s, 累计次数为 3 次。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光猝灭光谱和猝灭类型

BSA 分子中因含有色氨酸和酪氨酸等氨基酸残基而发射较强的荧光。如图 1 所示, 在 BSA 浓度不变的情况下, 随着吡蚜酮浓度的增加, BSA 的荧光峰位及峰形基本保持不变, 其荧光强度则有规律地降低, 这表明吡蚜酮和 BSA 之间存在相互作用。

荧光猝灭过程通常可分为静态猝灭和动态猝灭<sup>[11]</sup>。对于动态猝灭, 随着温度的升高, 分子有效碰撞的数目将增加, 能量的转移加剧, 荧光猝灭常数随温度的升高而增大; 而对于静态猝灭, 温度升高会降低所形成复合物的稳定性, 导致荧光猝灭常数减小。假设吡蚜酮对 BSA 荧光猝灭为动态猝灭, 应符合 Stern-Volmer 方程<sup>[12]</sup>:

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 c(\text{Py}) = 1 + K_{\text{SV}} c(\text{Py}) \quad (1)$$

式中,  $F_0$  为未加吡蚜酮时 BSA 的荧光强度,  $F$  表示加入吡蚜酮作用后体系的荧光强度,  $k_q$  为双分子猝灭过程速率常数,  $K_{\text{SV}}$  为动态猝灭常数,  $\tau_0$  为未加入猝灭剂时 BSA 的荧光寿命,  $c(\text{Py})$  为猝灭剂吡蚜酮的浓度。

将加入吡蚜酮后 BSA 的荧光强度变化按式(1)处理, 求得在 289, 294 和 299 K 时体系的猝灭常数  $K_{\text{SV}}$  分别为  $1.98 \times 10^4$ ,  $1.95 \times 10^4$  和  $1.94 \times 10^4$  L/mol (相关系数分别为 0.995, 0.996 和 0.995)。按生物大分子荧光平均寿命为  $10^{-8}$  s 计算<sup>[13]</sup>, 其双分子速率常数  $k_q$  分别为  $1.98 \times 10^{12}$ ,  $1.95 \times 10^{12}$  和  $1.94 \times 10^{12}$  L/(mol · s), 而通常猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭常数为  $2 \times 10^{10}$  L/(mol · s)<sup>[14]</sup>, 可见本实验测得的猝灭速率常数  $k_q$  远大于此值; 同时温度升高, 其  $K_{\text{SV}}$  值减小。由此认为吡蚜酮对 BSA 的荧光猝灭并非分子间动态碰撞所致, 而是由于形成复合物所引起的静态猝灭。

### 2.2 结合常数和结合位点数

对于静态猝灭, 荧光强度与猝灭剂浓度之间遵循以下关系式<sup>[15]</sup>:

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

式中,  $F_0$  为未加药物时 BSA 的荧光强度,  $F$  表示药物浓度为  $[Q]$  时 BSA 的荧光强度,  $K$  为结合常数,  $n$  为结合位点数, 即一个 BSA 分子可结合的药物分子的数目。

改变吡蚜酮的浓度, BSA 的荧光强度将发生变化, 按式(2)处理, 将  $\lg[(F_0 - F)/F]$  对  $\lg c(\text{Py})$  作线性回归, 求得在 289, 294 和 299 K 时, Py 与 BSA 结合常数  $K$  分别为  $5.4 \times 10^4$ ,  $3.7 \times 10^4$  和  $2.7 \times 10^4$  L/mol, 结合位点数  $n$  分别为 1.1, 1.0, 1.0, 相关系数分别为 0.999, 0.999, 0.998。可见温度升高, 结合常数降低, 吡蚜酮与 BSA 之间形成较稳定的 1:1 复合物。

### 2.3 吡蚜酮与 BSA 作用力的确定

由不同温度下的  $K$  值, 利用 van't Hoff 方程[式(3)和式(4)], 可获得吡蚜酮与 BSA 相互作用的焓变  $\Delta H$ 、自由能变  $\Delta G$  和熵变  $\Delta S$ (表 1)。

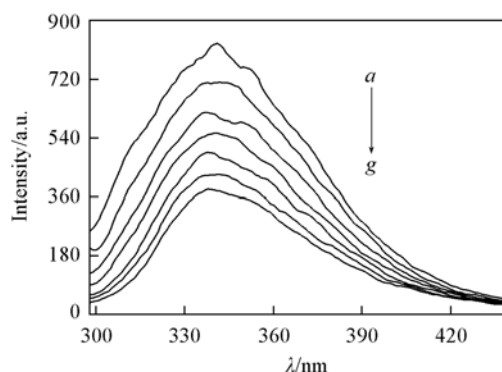


Fig. 1 Effect of pymetrozine on fluorescence spectra of BSA at 16 °C

$\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm,  $c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-5}$  g/mL;  $10^5 c(\text{Py}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ :

a. 0; b. 1.0; c. 2.0; d. 3.0; e. 4.0; f. 5.0; g. 6.0.

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H/R(1/T_1 - 1/T_2) \quad (3)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT\ln K \quad (4)$$

Table 1 Thermodynamic parameters for the binding of Py to BSA

T/K	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
289	-26.18		
294	-25.78	-81.7	-49.8
299	-25.37		

药物小分子与生物大分子间的作用力包括氢键、范德华力、疏水作用力和静电引力等非共价作用力. 根据反应的热力学常数可大致确定作用力类型<sup>[16, 17]</sup>.  $\Delta H > 0$ ,  $\Delta S > 0$ , 主要表现为疏水作用力;  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$  时, 主要表现为氢键和范德华力;  $\Delta H \approx 0$ ,  $\Delta S > 0$ , 主要表现为静电引力. 由表 1 可知,  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$ , 所以可以推断吡啶酮与 BSA 间的作用力主要是氢键和范德华力. 由于吡啶酮分子结构中含有羰基, 因此推测其与蛋白质中的氨基形成了 N—H...O 型氢键.

## 2.4 BSA 与吡啶酮之间的结合距离

依据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移理论<sup>[18]</sup>, 对于小分子与血清白蛋白结合形成的配合物, 其能量转移效率( $E$ )与给体、受体间的距离  $r_0$  的关系如下:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r_0^6) = 1 - F/F_0 \quad (5)$$

式中,  $R_0$  为  $E = 50\%$  时所对应的给体与受体间的临界距离:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} J \Phi \quad (6)$$

式中,  $K^2$  为偶极空间取向因子,  $N$  为介质的折光指数,  $\Phi$  为给体的荧光量子产率,  $J$  表示给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的光谱重叠积分,  $J$  的值可通过下式计算得到:

$$J = \sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda \quad (7)$$

其中,  $F(\lambda)$  为给体在波长  $\lambda$  处的荧光强度,  $\varepsilon(\lambda)$  为受体在波长  $\lambda$  处的摩尔吸光系数,  $\Delta\lambda$  为积分波长间距.

由吡啶酮的紫外吸收光谱和 BSA 的荧光发射光谱的叠加谱(图 2)求得  $J = 4.39 \times 10^{-16} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$ , 在此实验中,  $K^2$ ,  $N$  和  $\Phi$  分别取值为  $2/3$ ,  $1.336$  和  $0.118$ <sup>[16]</sup>, 将这些数值代入式(6)中可求出  $R_0 = 2.1 \text{ nm}$ , 继而求得吡啶酮与 BSA 分子中色氨酸残基间的结合距离  $r = 2.4 \text{ nm}$  (小于  $7 \text{ nm}$ ), 符合能量转移理论, 说明 BSA 与吡啶酮之间发生了能量转移, 导致 BSA 的荧光猝灭.

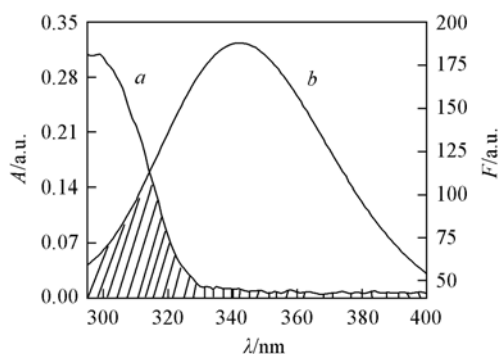


Fig. 2 Overlap spectra of Py absorption spectrum (a) and BSA fluorescence spectrum (b)

$$c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L};$$

$$c(\text{Py}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}.$$

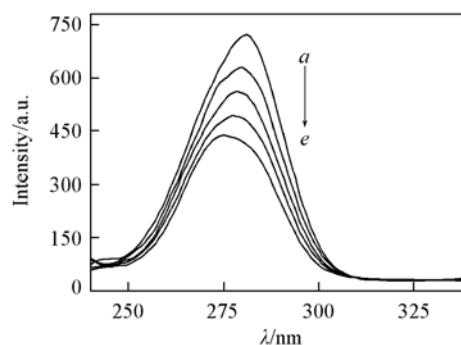


Fig. 3 Effect of Py on Synchronous fluorescence spectra of BSA ( $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ )

$$c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}; 10^5 c(\text{Py}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1});$$

$$a. 0; b. 1.0; c. 2.0; d. 3.0; e. 4.0.$$

## 2.5 BSA 的构象变化

2.5.1 同步荧光光谱 蛋白质的同步荧光光谱在  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  时仅表现出色氨酸残基的荧光. 众所周知, 蛋白质中色氨酸残基的荧光对外界环境极性的影响非常敏感<sup>[19]</sup>, 因此由色氨酸残基的同步荧光峰位的改变可判断蛋白质构象的变化. 波长的红移表明氨基酸残基所处环境的极性增加; 蓝移则表示疏水性增加, 蛋白结构变得紧密<sup>[20]</sup>. 由图 3 可见, 加入吡啶酮后氨基酸残基的同步荧光波长蓝移, 表

明色氨酸残基所处环境的疏水性增加, 蛋白结构变得紧密, BSA 的构象发生了变化. 其原因可能是吡啶酮分子的非极性片段嵌插到 BSA 分子内部, 与位于 212 位的色氨酸残基相互作用引起的.

2.5.2 紫外吸收光谱 蛋白质在远紫外区域的吸收主要是肽键—CONH—所导致的. BSA 在 200 nm 附近的吸收峰变化反映其骨架结构的改变<sup>[21]</sup>. 反应前后 BSA 的吸收光谱如图 4 所示, 可见加入吡啶酮后, BSA 在 192 nm 处的吸收峰波长红移至 195 nm, 吸光度减小. 吸收峰位红移及吸光度减小说明吡啶酮的加入使 BSA 骨架结构周围的微环境极性发生了改变, 并导致 BSA 构象的改变,  $\alpha$ -螺旋含量升高, 发生了去折叠过程.

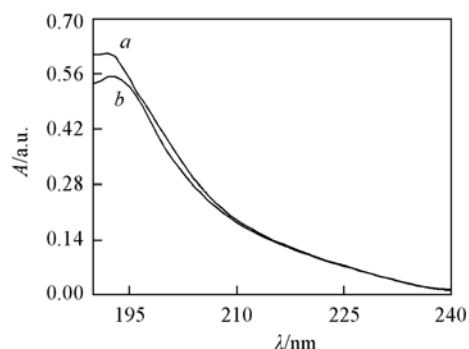


Fig. 4 Absorption spectra of BSA (a) and Py-BSA (b, vs. Py)

$c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ ;  $c(\text{Py}) = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .

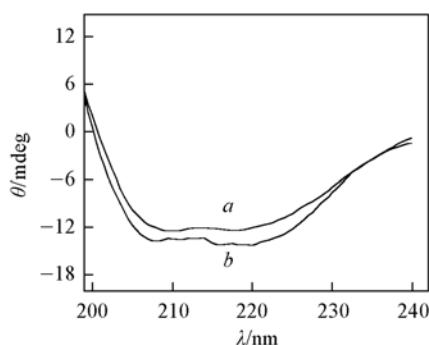


Fig. 5 Circular dichroism spectra of Py-BSA

$c(\text{BSA}) = 2.0 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ ;

$c(\text{Py}) / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ; a. 0; b.  $3.0 \times 10^{-5}$ .

2.5.3 圆二色谱 远紫外圆二色谱(CD)法是研究稀溶液中蛋白质构象变化的一种快速简单的方法<sup>[22]</sup>. 222 和 208 nm 处出现双负吸收峰是典型的  $\alpha$ -螺旋结构蛋白质的 CD 谱特征. 由 CD 谱图可以定性和定量计算蛋白质的构象变化情况.

由图 5 可以看出, 吡啶酮的加入使 BSA 在 222 和 208 nm 处的椭圆率均发生了变化. 通过 CD 谱的二级结构分析软件计算可知, BSA 分子中  $\alpha$ -螺旋含量由 31.6% 增加到 33.4%, 同时,  $\beta$ -折叠的含量由 37.9% 降低为 32.9%, 与紫外吸收光谱得出的结论一致.

综上所述, 吡啶酮对牛血清白蛋白的荧光猝灭属于静态猝灭, 吡啶酮通过氢键或范德华作用力与蛋白质相结合, 它们的结合服从位点结合模型, 形成具有一定稳定性的 1:1 的复合物; 吡啶酮的加入使 BSA 骨架结构周围微环境的极性发生了变化, 导致 BSA 构象的改变,  $\alpha$ -螺旋含量升高, 发生了去折叠过程.

## 参 考 文 献

- [1] Kragh-Hansen U. . Pharmacol. Rev. [J], 1981, **33**: 17—53
- [2] He X. M., Carter D. C. . Nature [J], 1992, **358**: 209—215
- [3] YAO Wu(姚武), GAO Feng(高峰), WANG Lun(王伦). J. Instru. Anal. (分析测试学报) [J], 2005, **24**(1): 76—79
- [4] YAN Cheng-Nong(颜承农), SHANGGUAN Yun-Feng(上官云凤), PAN Zu-Ting(潘祖亭), *et al.* . J. Instru. Anal. (分析测试学报) [J], 2003, **22**(4): 24—27
- [5] YAN Cheng-Nong(颜承农), ZHANG Hua-Xin(张华新), LIU Yi(刘义), *et al.* . Acta Chim. Sinica(化学学报) [J], 2005, **63**(18): 1727—1732
- [6] Fitzgerald J. . Crop Protection [J], 2004, **23**: 801—809
- [7] Bi J. L., Toscano N. C., Ballmer G. R. . Crop Protection [J], 2002, **21**: 49—55
- [8] WU Xiang-Wen(武向文), WANG Ming-Gen(汪明根), CHEN Shi-Jian(陈时健), *et al.* . World Pesticides(世界农药) [J], 2008, **30**: 36—39
- [9] Walker M. K., Stufkens M. A. W., Wallace A. R. . Biological Control [J], 2007, **43**: 31—40
- [10] Xiang G. H., Tong C. L., Lin H. Z. . J. Fluoresc. [J], 2007, **17**(5): 512—521
- [11] YANG Man-Man(杨曼曼), XI Xiao-Li(席小莉), YANG Pin(杨频). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(4): 687—691
- [12] LIANG Hong(梁宏), XING Ben-Gang(邢本刚), WU Qing-Xuan(吴庆轩), *et al.* . Acta Chim. Sinica(化学学报) [J], 1999,

57(2): 161—165

- [13] Owen C. S., Shuler R. L. . Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1989, **163**: 328—333
- [14] CHANG Xi-Jun(常希俊), HUANG Yan(黄艳), HE Qun(贺群). Acta Chim. Sinica(化学学报)[J], 2005, **63**(3): 223—228
- [15] Kandagal P. B., Ashoka S., Seetharamappa J., *et al.* . J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 2006, **41**: 393—399
- [16] Philip D., Ross Sabramarian S. . Biochemistry[J], 1981, **20**: 3096—3102
- [17] 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
- [18] Förster T. . Ann. Phys. [J], 1948, **2**: 55—75
- [19] Joseph R. L. . Principles of Fluorescence Spectroscopy[M], New York: Plenum Press, 1983: 342—362
- [20] MA Chun-Qi(马春琪), LI Ke-An(李克安), ZHAO Feng-Lin(赵凤林), *et al.* . Acta Chim. Sinica(化学学报)[J], 1999, **57**(2): 389—395
- [21] Ran D. H., Wu X., Zheng J. H., *et al.* . J. Fluoresc. [J], 2007, **17**: 721—726
- [22] MA Jing(马静), ZHENG Xue-Fang(郑学仿), TANG Qian(唐乾). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(2): 258—263

## Interaction Between Pymetrozine and Bovine Serum Albumin

XU Wei<sup>1</sup>, WU Xia<sup>1\*</sup>, ZHOU Hai-Ping<sup>1</sup>, LIU Xiao-Yu<sup>1</sup>, YANG Jing-He<sup>1</sup>,  
FAN Jin-Yong<sup>2</sup>, ZHANG Mei-Feng<sup>2</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shandong University, Jinan 250100, China;

2. Shandong Pesticide Research Institute, Jinan 250100, China)

**Abstract** The interaction between pymetrozine(Py) and bovine serum albumin(BSA) was investigated by spectroscopy methods, including fluorescence, ultraviolet absorption(UV) and far-UV circular dichroism(CD) spectroscopies. The quenching mechanism of fluorescence was suggested as static quenching according to the Stern-Volmer equation. The thermodynamic parameters enthalpy change( $\Delta H$ ) and entropy change( $\Delta S$ ) were calculated, which suggested that the binding power between pymetrozine and bovine serum albumin was hydrogen-bond and van der Waals force. According to the Förster non-radiation energy transfer theory, the binding average distance( $r=2.4$  nm) between donor(BSA) and acceptor(Py) was obtained. Furthermore, the investigations of the synchronous fluorescence and CD spectra of the system reveal that the conformation of BSA is changed in the presence of Py.

**Keywords** Pymetrozine; Bovine serum albumin; Fluorescence quenching; Interaction

(Ed.: H, J, Z)