

杀鼠剂溴鼠灵与牛血清白蛋白相互作用的光谱法研究

段云青^{1,2}, 雷焕贵¹, 闵顺耕^{2*}, 段志青³

1. 山西农业大学文理学院, 山西 太谷 030801

2. 中国农业大学理学院, 北京 100093

3. 中国医学科学院医学生物研究所, 云南 昆明 650118

摘要 利用紫外吸收光谱, 荧光光谱和同步荧光技术研究了牛血清白蛋白和杀鼠剂溴鼠灵的相互作用。结果表明溴鼠灵对牛血清白蛋白的内源荧光有较强的猝灭作用, 两者形成了新的复合物, 属于静态荧光猝灭, 并且伴随着分子内的非辐射能量转移。通过双倒数及双对数曲线计算了不同温度下的猝灭速率常数 K_{SV} , 结合位点数 n , 结合常数 K_A , 并根据相对应的热力学参数判断二者之间主要为疏水作用力。依据 Förster 非辐射能量转移理论求出了溴鼠灵和蛋白质间的结合距离 r , 确定了溴鼠灵在蛋白质上的结合位置。在 20 和 30 °C 时 r 分别为 2.84 和 2.87 nm。同步荧光光谱显示, 与溴鼠灵作用后 BSA 分子的二级结构发生了改变。初步探讨了二者的结合模式与作用机制: 溴鼠灵分子通过静电引力靠近蛋白质的疏水腔, 并以疏水作用力与疏水腔中的氨基酸残基发生相互作用, 导致色氨酸残基微环境极性变化。其结果不但阻止了酪氨酸残基与色氨酸残基间的能量转移, 而且使色氨酸残基与溴鼠灵分子间产生非辐射能量转移, 从而猝灭 BSA 的内源荧光。

关键词 溴鼠灵; 牛血清白蛋白; 荧光猝灭光谱; 相互作用

中图分类号: S482.5 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)11-2998-05

引言

血清白蛋白(SA)是动物体内的输送蛋白, 具有贮运内源代谢产物和外源小分子等重要生理功能, 能和许多内源性和外源性的物质可逆结合。利用各种方法从不同角度考察 SA 与外源小分子之间的相互作用, 已经引起了生命科学、化学、药学及临床医学科研工作者的普遍关注。对人畜具有毒副作用的小分子与蛋白质分子作用特征的研究方兴未艾^[1]。溴鼠灵(BDF)属于第二代抗凝血杀鼠剂, 结构式如 Scheme 1 所示。因其灭鼠效果好, 尤其是大面积应用效果十分显著, 已广泛应用于野外及室内灭鼠^[2]。其与牛血清白蛋

白(BSA)相互作用的研究尚未见文献报道。

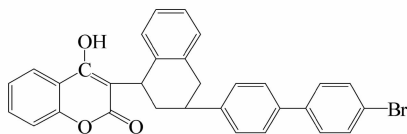
本文详细研究了 BDF 与 BSA 的相互作用, 结果有助于阐明 BDF 在体内的存储和转运过程及其生物毒理效应, 蛋白质构象变化, 以及 BDF 与 BSA 间相互识别机制等。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日立 F-4500 荧光分光光度计(日本 Hitachi 公司), UV-1901 型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司), 雷磁 PHS-3C 型酸度计(上海精密科学仪器有限公司), 微量移液器; 超声波清洗仪; 恒温水浴箱。

牛血清白蛋白 BSA(华美生物工程公司)配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 4 °C 保存备用; 溴鼠灵 BDF(农业部药检所)配成 $5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液(含 1% 乙醇), 4 °C 保存, 使用时用水稀释; 4-羟基香豆素(4-HC, Sigma)储备液 ($5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 含 1% 乙醇), 4 °C 保存, 使用时用水稀释; 磷酸缓冲液(pH 7.4); 其他试剂均为分析纯, 实验用水



Scheme 1 Chemical structure of brodifacoum

收稿日期: 2008-10-10, 修订日期: 2009-01-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(20575076)和山西省高校科技研究开发项目(20051223)资助

作者简介: 段云青, 女, 1975 年生, 山西农业大学文理学院副教授 e-mail: dddy56@sina.com

* 通讯联系人 e-mail: minsg@263.net

为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

向 1 cm 比色皿中准确加入 3 mL $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液, 逐次加入 BDF (实验过程中, 加入 BDF 的体积小于 $10 \mu\text{L}$, 不超过溶液总体积的 0.1%, 故体积变化可以忽略), 扫描 240~350 nm 范围内的紫外吸收光谱(光谱带宽为 2 nm); 固定 $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$, 扫描 300~500 nm 之间的荧光光谱; 固定 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 或 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$, 分别记录 BDF 与 BSA 作用的同步荧光光谱。(荧光光谱测定条件: 激发和发射狭缝皆为 5 nm, 电压 700 V, 扫描速度 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$)。

2 结果与讨论

2.1 BSA 和 BDF 相互作用的吸收光谱

图 1 吸收光谱表明, 当 BSA 和 BDF 单独存在时, 最大吸收分别位于 280 和 267 nm 处; 随着 BDF 浓度的增加, BSA 吸收峰有所增强并发生蓝移, 表明 BSA 和 BDF 发生了相互作用。

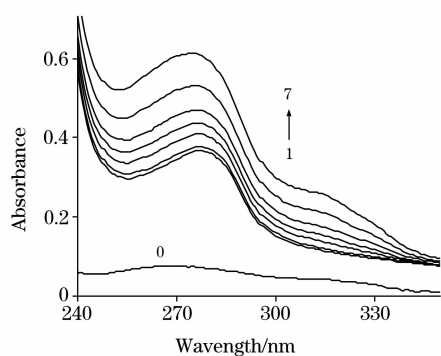


Fig. 1 Absorption spectra of BSA with various concentrations of BDF

pH 7.4; $20 \text{ }^\circ\text{C}$; 0: $c_{\text{BSA}}=0$, $c_{\text{BDF}}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1~7: $c_{\text{BSA}}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, c_{BDF} : 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.2 BDF 对 BSA 荧光发射的猝灭作用

图 2 是 BSA 溶液中加入 BDF 后的稳态荧光光谱。可以看出, 随着 BDF 的加入, BSA 的荧光被明显猝灭, 同时伴随

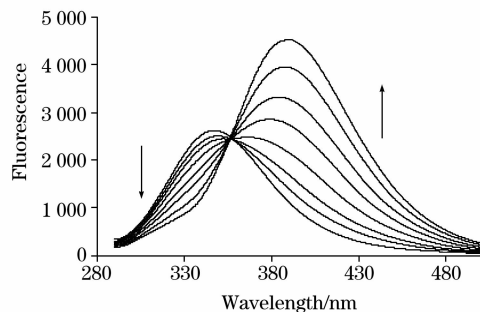


Fig. 2 Emission spectra of BSA-BDF as a function of the concentrations of BDF $20 \text{ }^\circ\text{C}$, $c_{\text{BSA}}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, c_{BDF} increased from 0 to $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The arrows indicate the change in BDF concentration

着光谱的明显红移, 说明 BDF 的加入引起 BSA 荧光团的微环境极性增强。由 357 nm 处出现的等发射点, 推测 BDF 与 BSA 之间可能形成了新的复合物。光谱的明显红移, 预示蛋白质的二级结构发生了变化^[3], 也暗示着 BDF 与 BSA 之间存在能量转移。

荧光猝灭根据猝灭方式的不同, 可分为静态猝灭和动态猝灭。假设是动态猝灭, 可根据 Stern-Volmer 方程^[4]: $F_0/F = 1 + K_{\text{SV}}[Q] = 1 + K_q\tau_0[Q]$ 判断, 其中 F_0 和 F 分别为猝灭剂加入前后体系的荧光强度, K_q 为猝灭常数, K_{SV} 为双分子猝灭过程常数, τ_0 为猝灭剂不存在时生物大分子的平均荧光寿命, $[Q]$ 为猝灭剂浓度。结果如图 3 所示。取 $\tau_0 = 10^{-8} \text{ s}$, 由上式可计算体系的 K_q , 数据见表 1。表 1 中各温度下作用方程线性关系明显, 说明只有一类荧光体; K_{SV} 随着温度的升高而降低, 且 K_q 值远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数 $2 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, 由此可以推断, 荧光猝灭方式不是动态猝灭, 而为静态猝灭^[4]。

当药物小分子与生物大分子结合时, 结合常数和结合位点数可以由下面两式来求得: Lineweaver-Burk 方程 $(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_A^{-1}F_0^{-1}[Q]^{-1}$ 及 $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg[Q]$ ^[5], 式中的 K_A 和 n 分别为此反应的结合常数和结合位点。通过双倒数曲线(图 4) 和双对数曲线(图 5) 求得不同温度下的 K_A 和 n (表 1)。由 K_A 值可知, BSA 与 BDF 之间存在较强的相互作用; 由 n 值可知, BSA 与 BDF 结合时至少存在 1 个单独的结合位点。

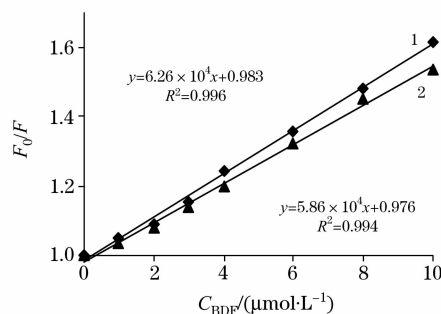


Fig. 3 Stern-Volmer curves of the interaction between BSA and BDF

1: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; $c_{\text{BSA}}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

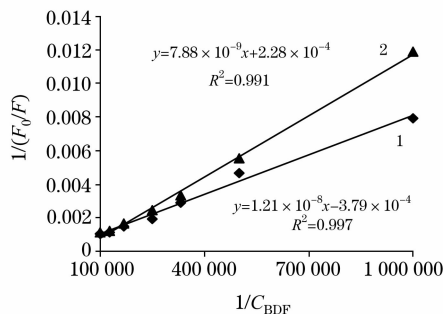
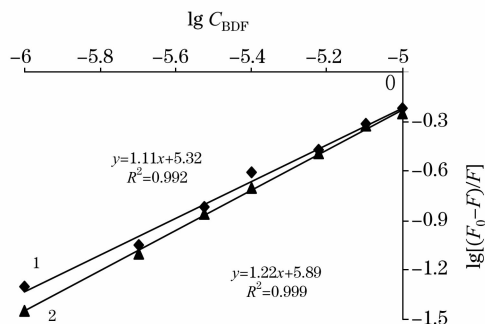


Fig. 4 Double reciprocal Lineweaver-Burk plots of the interaction between BDF and BSA

1: $20 \text{ }^\circ\text{C}$; 2: $30 \text{ }^\circ\text{C}$; $c_{\text{BSA}}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=347 \text{ nm}$

Table 1 Concerned constants of the quenching process in the binding of BDF with BSA

| T/°C | Stern-Volmer equation | R ² | K _{SV} /(L·mol ⁻¹) | K _q /L·(mol·s) ⁻¹ | K _A /L·mol ⁻¹ | n |
|------|--------------------------------|----------------|---|---|-------------------------------------|------|
| 20 | y=6.08×10 ⁴ x+0.986 | 0.996 | 6.08×10 ⁴ | 6.1×10 ¹² | 2.53×10 ⁴ | 1.11 |
| 30 | y=5.86×10 ⁴ x+0.976 | 0.994 | 5.86×10 ⁴ | 5.9×10 ¹² | 3.31×10 ⁴ | 1.22 |

Fig. 5 Quenching function of $\lg[(F_0 - F)/F] - \lg[Q]$ at different temperature

1: 20 °C; 2: 30 °C; $c_{\text{BSA}} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 347 \text{ nm}$

2.3 BDF 与 BSA 间的偶极-偶极能量转移

根据 Förster 非辐射能量转移理论, 在供体与受体浓度相等的条件下, 如果能量给体分子的荧光发射光谱与能量受体分子的吸收光谱有足够重叠, 且两者之间距离不超过 7 nm, 二者就可能通过偶极-偶极相互作用发生非辐射能量转移, 导致供体荧光猝灭^[6]。图 6 为 BSA 的荧光光谱和 BDF 吸收光谱的重叠图。用矩形分割法求得图中光谱重叠部分的面积, 即重叠积分为 $3.188 \times 10^{-15} \text{ mL}^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 进而得到临界距离 $R_0 = 2.60 \text{ nm}$ 。最后计算出 BDF 在 20 和 30 °C 时与 BSA 结合位置距色氨酸残基的距离 r 分别为 2.84 和 2.87 nm。

对于荧光共振能量转移来说, 激发态的给体与受体间的有效距离通常为 2~7 nm^[7]。BDF 与 BSA 荧光残基间的距离在能量转移的有效距离范围之内, 可以推断在 BSA 与 BDF 之间发生了非辐射能量转移, 并且结合距离 r 大于能量转移效率为 50% 时的临界距离 R_0 , 说明非辐射能量转移引起荧光猝灭的概率比静态猝灭要小。

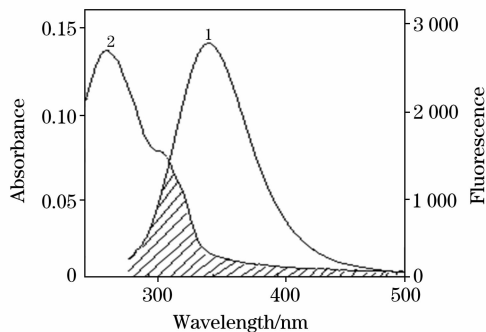


Fig. 6 Overlapped spectra of the fluorescence spectrum of BSA (1) and the absorption spectrum of BDF (2)

$c_{\text{BSA}} = c_{\text{BDF}} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.4; $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$

2.4 BDF 与 BSA 结合的热力学参数及作用力

小分子与生物大分子的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。Ross^[8] 等根据大量的实验结果, 总结了判断生物大分子与小分子结合作用力类型的热力学规律: 疏水作用使体系的 ΔH 和 ΔS 变正, 氢键或范德华力使体系的 ΔH 和 ΔS 变负, 静电作用力使体系的 $\Delta H \approx 0$ 和 $\Delta S > 0$ 。根据热力学方程求得 BDF 与 BSA 作用的有关热力学参数见表 2。 $\Delta G < 0$, 说明此反应在 293 K 时能自发进行; 由 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, 可以认为 BDF 与 BSA 之间的作用力主要为疏水作用。

Table 2 Thermodynamic constants and binded force for the binding of BDF with BSA

| | ΔH / $10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ | ΔS / $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ | $\Delta G(293 \text{ K})$ / $10^4 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ | Binded force |
|---------|--|--|---|--------------|
| BSA-BDF | 2.22 | 151.32 | -2.47 | 疏水作用 |

2.5 BDF 对 BSA 构象的影响

蛋白质分子的三种内源荧光生色团的普通荧光光谱发射峰严重重叠, 难以区分, 而用同步荧光光谱则可以将其区分开来, 这种光谱可用于蛋白质构象变化的分析。由 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 所得到的同步荧光光谱图分别显示蛋白质中酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基的光谱特征^[9]。因为氨基酸残基的最大荧光波长与其所处环境的疏水性有关, 如果氨

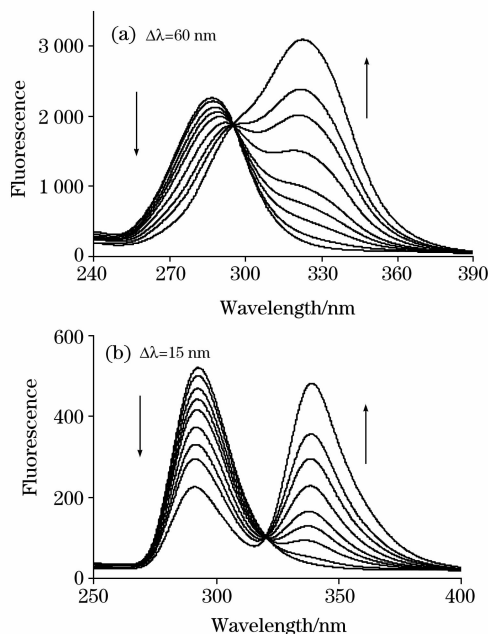


Fig. 7 Synchronous fluorescence spectrum of BSA-BDF

$c_{\text{BSA}} = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, c_{BDF} : 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

The arrows indicate the change in BDF concentration

基酸所处环境的疏水性降低, 则其最大发射波长红移, 所以由荧光波长的改变可判断蛋白质构象的变化^[10, 11]。

图 7 为加入 BDF 后 BSA 的同步荧光图。Trp 残基的最大发射波长明显红移(本实验范围内, 从 287 nm 移至 322 nm), 说明 BDF 的引入使 BSA 中 Trp 残基的微环境极性增加, 疏水性降低, 肽键的伸展程度有所增加, 蛋白结构变疏松。而 Tyr 残基的最大发射波长只略微发生蓝移(从 293~290 nm), 表明 Tyr 残基的微环境疏水性略有增强, BSA 的结构变得紧密。结果证实, 与 BDF 作用后 BSA 分子的二级结构发生了改变。

从荧光猝灭的幅度看, 相同浓度的 BDF 导致 BSA Trp 残基和 Tyr 残基同步荧光的降幅分别为 41% 和 57%。这表明 BDF 分子可以进入 BSA 的立体结构中, 不但直接猝灭 Trp 残基的荧光, 而且还能阻断 Trp 同 Tyr 残基之间的能量转移, 表现为对 Tyr 残基的荧光猝灭。

2.6 BDF 与 BSA 结合模式与作用机制

BSA 分子序列中存在两个色氨酸残基, 分别处于 134 位

和 212 位, 134 位 Trp 残基相对而言比较暴露于亲水环境中, 而 212 位残基则深埋于疏水环境中^[12], 故 BSA 的荧光主要来自第 212 位的 Trp 残基, 因而 BDF 应该主要与 212 位的 Trp 残基相结合而猝灭其荧光。

SA 的疏水腔分别由 3 个结构域 I, II, III 构成, 疏水腔的入口处主要是一些带电荷的氨基酸残基, 而在 BSA 分子表面存在着较大的疏水裂隙^[13]与这些疏水腔连通。故小分子物质的疏水性将成为影响其与蛋白质结合的一个重要因素。BDF 分子中也包含着极性基团(如羟基、溴), 所以在 BDF 和 HSA 分子间也存在着一定的静电引力。推测二者的作用机理如下: BDF 分子通过静电引力靠近疏水腔, 并因香豆素母环、苯环及溴联苯基的疏水性以疏水作用力与疏水腔中的氨基酸残基发生相互作用, 导致 Trp 残基微环境极性增强, 疏水性降低, 引起蛋白质的构象变化。其结果不但阻止了 Tyr 残基与 Trp 残基间的能量转移, 而且使 Trp 残基与 BDF 分子间产生非辐射能量转移, 从而猝灭 BSA 的内源荧光。

参 考 文 献

- [1] YAN Cheng-nong, ZHANG Hua-xin, LIU Yi, et al(颜承农, 张华新, 刘义, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2005, 63(18): 1727.
- [2] Pieter S, Van Heerden, Barend C B. Tetrahedron, 1997, 53(17): 6045.
- [3] Maurice R E, Camillo A G. Anal. Biochem., 1981, 114: 199.
- [4] XU Jin-gou, WANG Zun-ben(许金钩, 王尊本). Fluorescence Analysis Method(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2006. 64.
- [5] HU Yan-jun, LIU Yi, WANG Jia-bo, et al. J. Pharm. Biomed. Anal., 2004, 36(4): 915.
- [6] Sklar L A, Hudson B S, Simoni R D. Biochemistry, 1977, 16: 5100.
- [7] Majoul I, Straub M, Duden R, et al. Rev. Mol. Biotech., 2002, 82: 267.
- [8] Ross P D, Subramanian S. Biochem. 1981, 20 (11): 3096.
- [9] Wang Y Q, Zhang H M, Zhang G C, et al. J. Mol. Struct., 2006, 830: 40.
- [10] Burstein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Photochem. Photobio., 1973, 18: 263.
- [11] ZHU Keng, TONG Shen-yang(朱 铿, 童沈阳). Chem. J. Chin. Univ.(高等学校化学学报), 1996, 17(4): 539.
- [12] Shobini J, Mishra A K, Sandhya K, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2001, 57: 1133.
- [13] Ulrich K H. J. Pharmacol Rev., 1981, 33: 17.

Spectroscopic Study on Interaction of Rodenticide Brodifacoum with Bovine Serum Albumin

DUAN Yun-qing^{1, 2}, LEI Huan-gui¹, MIN Shun-geng^{2*}, DUAN Zhi-qing³

1. College of Art and Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

2. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China

3. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, China

Abstract The mutual interaction of bovine serum albumin (BSA) with brodifacoum (3-[3-(4'-bromophenyl-4)1,2,3,4-tetrahydro-2H-chromeno[2,3-b]pyridin-2-yl]-4-hydroxyl-coumarin), an anticoagulant rodenticide, was investigated by ultra-violet spectroscopy, fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy under physiological conditions. It was proved that the intrinsic fluorescence quenching of BSA by brodifacoum was the result of the formation of brodifacoum-BSA complex. And this quenching is mainly due to static fluorescence quenching. The quenching rate constant (K_{SV}), binding site number (n) and binding constant (K_A) at different temperatures were calculated from the double reciprocal Lineweaver-Burk plots and the quenching function of $\lg[F_0 -$

$F)/F] - \lg[Q]$ plots. The thermodynamic parameters indicated that the process of binding was a spontaneous molecular interaction and the hydrophobic force played a major role in stabilizing the brodifacoum BSA complex. The binding distance r between brodifacoum and BSA was 2.84 and 2.87 nm at 20 and 30 °C, respectively, which was obtained based on Forster theory of non-radiation energy transfer. The synchronous spectroscopy of BSA and brodifacoum-BSA revealed that the BSA conformation had changed in the presence of brodifacoum. The binding mode and interaction mechanism were suggested as follows: brodifacoum molecules are closed with amino acid residues with electric charge on the hydrophobic cavities of BSA by electrostatic interaction, and binded to the Trp212 residues inside of BSA hydrophobic cavities by hydrophobic interaction force, thereby changed the microenvironment around the Trp residues. The interaction prevented the energy transfer between Tyr and Trp residues, moreover, caused to a non-radiation energy transfer from Trp residues in BSA to brodifacoum, and finally leded of the quenching the intrinsic fluorescence of BSA.

Keywords Brodifacoum; Bovine serum albumin; Fluorescence quenching spectroscopy; Interaction

* Corresponding author

(Received Oct. 10, 2008; accepted Jan. 20, 2009)

(上接 2993 页)

13-17 2009 Materials Research Society Spring Meeting,
San Francisco, CA;

Contact: Materials Research Society, 506 Keystone Drive, Warrendale, PA 15086-7573; Tel. (724) 779-3003, Fax: (724) 779-8313;

E-mail: info@mrs.org

Web site: http://www.mrs.org/s_mrs/index.asp

13-17 SPIE Defense, Security, and Sensing 2009,
Orlando, FL;

Contact: SPIE, P. O. Box 10, Bellingham, WA 98227-0010; Tel. (360) 676-3290, or (888) 504-8171, Fax: (360) 647-1445;

E-mail: meetinginfo@SPIE.org

Web site: <http://spie.org/defense-security-sensing.xml>

19-23 Third International Congress on Operando Spectroscopy (Operando-III): Recent Developments and Future Perspectives in Spectroscopy of Working Catalysts,

Rostock-Warnemünde, Germany;

Contact: Secretariat: Operando III, Leibniz-Institut für Katalyse, an der Universität Rostock, Albert-Einstein-Strasse 29 a, D-18059 Rostock, Germany; Tel. 49 (0)381 1281 169, Fax: 49 (0)381 1281 51169;

E-mail: operando@catalysis.de

Web site: <http://www.catalysis.de/operando>

26-30 Fourier Transform Spectroscopy Meeting,

Vancouver, British Columbia, Canada;

Contact: OSA Customer Services, Tel. (202) 416-1907, Fax: (202) 416-1096;

E-mail: custserv@osa.org

Web site: <http://www.osa.org/meetings/topicalmeetings/FTS/>

May 2009

31-June 4 ASMS 2009 - 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry,
Philadelphia, PA;

Contact: American Society for Mass Spectrometry, 2019 Galisteo St., Building I-1, Sante Fe, NM, 87505; Tel. (505) 989-4517, Fax: (505) 989-1073;

E-mail: office@asms.org

Web site: <http://www.asms.org/>

(下转 3006 页)