

芦丁与牛血清白蛋白相互作用的研究

徐金明¹,陶慧林²,张辉¹

(1.黄山学院 化学系,安徽 黄山 245041;2.桂林工学院 材料与化学工程系,广西 桂林 541004)

摘要:采用荧光光谱(三维荧光、时间驱动模式)和紫外-可见吸收光谱研究了芦丁(Rutin)与牛血清白蛋白(BSA)间的相互作用,讨论了药物对BSA构象的影响,证实了二者间相互作用为单一的动态猝灭过程,求出了猝灭常数,并依据能量转移理论确定了药物与蛋白质相互作用的最近距离。

关键词:芦丁;牛血清白蛋白;荧光猝灭;三维荧光

中图分类号:O657.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-447X(2008)05-0053-04

1 引言

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白质,它能与许多内源性及外源性化合物结合,起到存储与转运的作用。研究药物与血清白蛋白之间的作用,有助于了解药物在体内的运输和分布情况,对于阐明药物的作用机制、药代动力学以及药物的毒性都有非常重要的意义。在这方面已有较多研究。^[1-9]芦丁为维生素P属的一种,是一种脱氢黄素酮的糖苷,在食物中常与维生素C共存。维生素P是一种氢的传递体,可能参与体内氧化还原酶的作用,能影响甲状腺的活动,并使肾上腺素免于氧化。在体内能增强维生素C的作用和促进维生素C在体内蓄积,体内缺乏时毛细血管脆性增加,其主要药理作用是维持血管弹性,增强毛细血管抵抗力,降低其脆性与通透性,并促进其细胞增生和防止血细胞凝集。

马贵斌等^[1]曾应用荧光偏振技术研究了芦丁(Rutin)与人血清白蛋白(HSA)的相互作用,认为是一静态猝灭体系,给出了二者缔合的解离常数和距离。

本文研究了芦丁与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用,对于阐明药物的运输过程以及其在体内的作用机制具有一定的意义。由于发射光谱呈锯齿状,强度偏差大,会导致测量误差偏大。用时间驱动(TimeDrive)模式可以有效地解决这个问题。在求解J时,没有采用小矩形分割法^[2-9],首次利用Excel和Origin7.5直接求积分,简单快捷。

2 实验部分

2.1 仪器和试剂

LS55 荧光分光光度计(美国PE公司),FA1004型电子分析天平(上海市天平仪器厂),UV-1901型紫外-可见分光光度计(北京普析仪器公司),pHS-3C精密pH计(上海雷磁仪器厂)。

牛血清白蛋白、芦丁($C_{27}H_{30}O_{16} \cdot 3H_2O$)和三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)均为生化试剂(均购自于中国医药集团上海化学试剂公司)。牛血清白蛋白标准溶液($1.00 \times 10^{-5} \text{mol/L}$):准确称取0.3400g牛血清白蛋白溶于少量水中,再定容于500mL容量瓶,贮存于0-4℃的冰箱中。芦丁标准溶液($1.00 \times 10^{-4} \text{mol/L}$):

收稿日期:2008-05-04

基金项目:黄山学院科研基金资助(2007xkj014)

作者简介:徐金明(1971-),安徽望江人,黄山学院化学系讲师,研究方向为光谱分析。

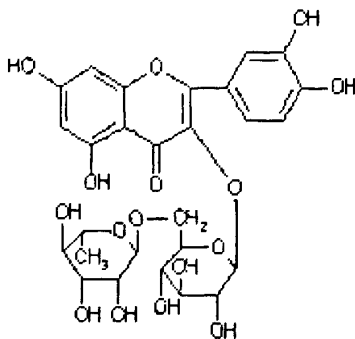


图 1 芦丁的结构

准确称取 0.0689g 芦丁溶于少量 0.1mol/L NaOH 溶液中,再加水定容于 1000mL 容量瓶中,置冰箱中贮存。缓冲溶液:用 1:1 (体积比) 的盐酸滴加到 0.1mol/L Tris 溶液中,在 pH 计上调成 pH7.20 的 Tris-HCl 缓冲溶液。NaCl 溶液:0.5mol/L。其它所用试剂均为分析纯,实验用水均为亚沸水。

2.2 实验方法

在 9 个 25ml 比色管中依次加入 5ml Tris-HCl 缓冲液,2ml NaCl 溶液,2.5ml BSA 溶液,再加入体积的 2.00×10^{-5} mol/L Rutin 溶液(0,0.50,1.00,2.00,3.00,4.00,5.00,6.00,7.00ml),最后用亚沸水溶液稀释至刻度后混匀。

荧光光谱测定: Volt (电压) = -750V, slit_{ex}/slit_{em} = 10.0/5.0nm。固定激发波长 220nm, 绘制 300-450nm 的发射光谱; 三维荧光光谱, 激发波长范围为 210-310nm、步长为 5nm, 发射光谱范围为 280-500nm; 以 TimeDrive (时间驱动) 模式测量荧光强度, Duration (持续时间) = 64.0s, DataInterval = 1.0s, 在区间 [2.00, 62.00] 内求曲线与横坐标之间的面积 (即对时间积分)。

紫外吸收光谱: 以缓冲溶液和 NaCl 溶液的混合液作参比, 来测定药物与蛋白质溶液的紫外吸收光谱。

3 结果与讨论

3.1 荧光光谱和三维荧光光谱

BSA 分子中因含有色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基而能发射较强的内源荧光, 所以 BSA 是荧光体。图 2 (经 3 次 Golay-Savitzky 多项式平滑) 和图 3 (TimeDrive) 表明, 在保持 BSA 浓度固定不变的情况下, 随着芦丁浓度的加, BSA 的内源性荧光强度有规律的降低, 峰位置及峰形基本保持不变, 表明芦丁能猝灭 BSA 的荧光, 二者之间存在相互作用。在

220nm 激发波长下芦丁无荧光发射, 因此, 研究中不用考虑内滤光效应的干扰。

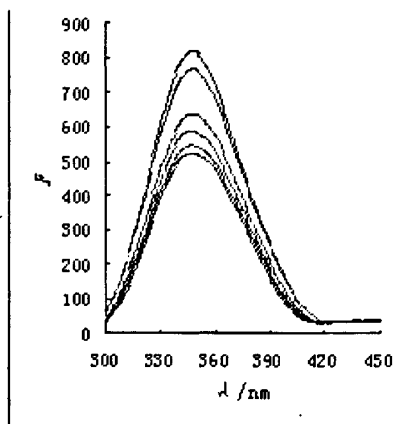


图 2 芦丁对 BSA 荧光发射光谱的影响

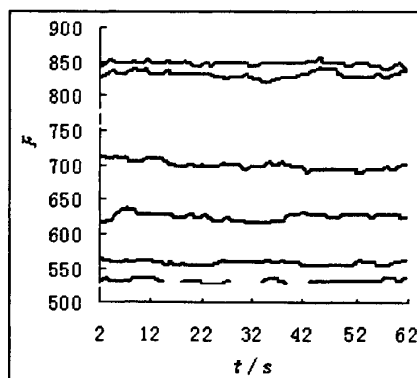
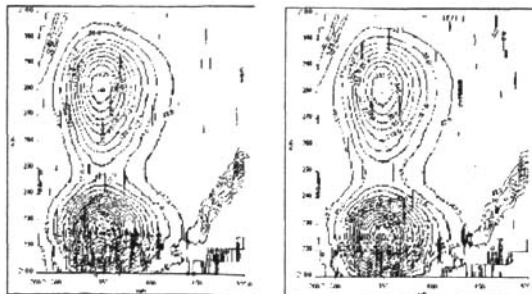


图 3 芦丁对 BSA 的 TimeDrive 图

图 4 是三维荧光光谱图。提取物浓度不同, 但最大激发和发射峰的位置 ($\lambda_{ex}=225/280\text{nm}$, $\lambda_{em}=349\text{nm}$) 没有变化, 只是荧光强度减弱; BSA 的瑞利散射和二次瑞利散射峰起始位置也无明显变化。BSA 的三维荧光光谱的形状在加入 Rutin 前后没有改变, 这说明 Rutin 的加入没有使蛋白质的构象发生变化, 可认为两者间为非辐射能量转移。同时也说明 Rutin 与蛋白质之间没有反应。



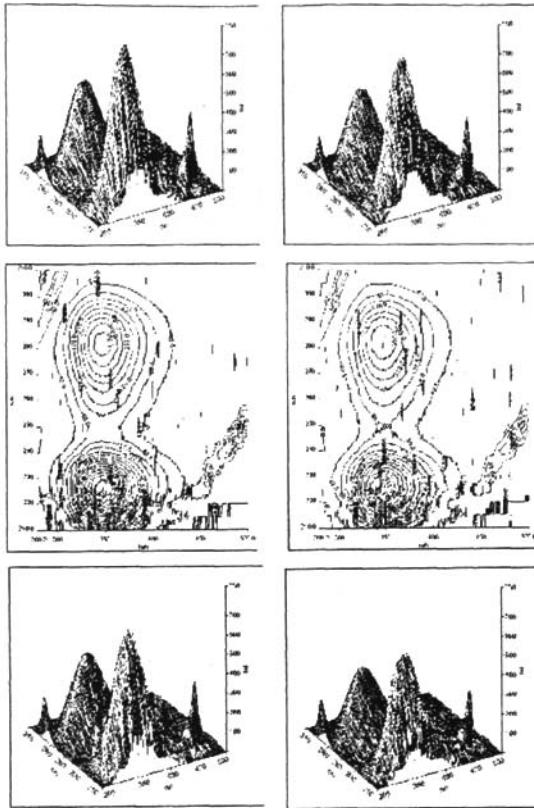


图 4 三维荧光光谱的等高图和投影图

3.2 猝灭机理及猝灭常数的确定

荧光猝灭过程通常可以分为动态猝灭和静态猝灭。^[9]动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间的相互作用过程。其作用过程遵循 Stern-Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 C_Q = 1 + K_{sv} C_Q \quad (1)$$

式中, F_0 为未加入猝灭剂时荧光物质的荧光强度; F 为猝灭剂浓度等于 C_Q 时荧光物质的荧光强度; K_q 为双分子猝灭过程的速率常数; τ_0 为没有猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命; K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数, C_Q 是双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率。静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物, 从而导致荧光物质荧光强度降低的过程, 此过程可用下式描述:

$$F_0/F = 1 + K C_Q \quad (2)$$

式中 K 是基态配合物的形成常数。比较式(1)和式(2)可以看到, 无论是静态猝灭还是动态猝灭, F_0/F 与 C_Q 之间均存在着线性关系, 因而, 仅仅通过测量荧光强度所得到的荧光猝灭数据, 无法判断猝灭现象究竟是属于动态还是静态的。区分动态猝灭与静态猝灭可以通过以下几个方面来确定:^[9] 一是测量反应前

后体系吸收光谱的变化; 二是做改变温度实验; 三是测量荧光寿命。后者由于仪器条件的限制而应用较少。

3.2.1 吸收光谱的变化

分别测定了两种不同浓度的芦丁 ($1.25\text{ml} 2.00 \times 10^{-5}\text{mol/L}$, $3.00\text{ml} 1.00 \times 10^{-4}\text{mol/L}$) 和 BSA ($2\text{ml} 1.00 \times 10^{-5}\text{mol/L}$) 以及它们的混合物的紫外吸收光谱。把单组分的芦丁、BSA 紫外吸收光谱加合, 两种情况均与混合物的紫外吸收光谱完全重合。表明药物的加入并未使 BSA 的紫外吸收发生变化, 药物对 BSA 的荧光猝灭是它与 BSA 基态分子间所发生的相互作用的结果, 即猝灭机理为动态猝灭。

3.2.2 温度的影响

分别测定了 18°C (室温) 与 30°C 下, 不同浓度的芦丁对 BSA 的荧光猝灭情况。从图 4 ($F_0/F-C_Q$ 图) 中可以看出, 温度变化较大, 但斜率变化较小。猝灭机理有待进一步研究。

3.2.3 猝灭常数的测定

根据式(1), 由图 5 各直线斜率可以求出 K_{sv} , 大分子的 τ_0 一般约 10^{-8}s ,^[9] 则可以进一步求出 K_q [$K_q(18^\circ\text{C})/K_q(30^\circ\text{C}) = 1.10/1.18 \times 10^{13}$]

3.3 荧光给体-受体间距离的求取

根据 Förster 能量转移理论,^[10] 转移效率 (E)、能量供体和能量受体之间的结合距离 (r)、临界能量转移距离 (R_0) 及供能体的荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分 (J) 之间的关系为:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) = 1 - F/F_0 \quad (3)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-28} (K^2 \cdot \Phi \cdot n^{-4} \cdot J) \quad (4)$$

$$J = \int F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F(\lambda) d\lambda \quad (5)$$

R_0 通常取能量转移效率为 50% 时的临界距离; K^2 为偶极空间取向因子, 可取能量受、供体各向随机分布的平均值 $2/3$; Φ 为能量供体的荧光量子产率, 通常取蛋白质中色氨酸的量子产率 0.118, n 为介质折射

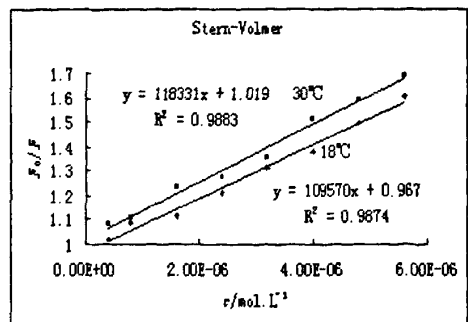


图 5 Rutin 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer

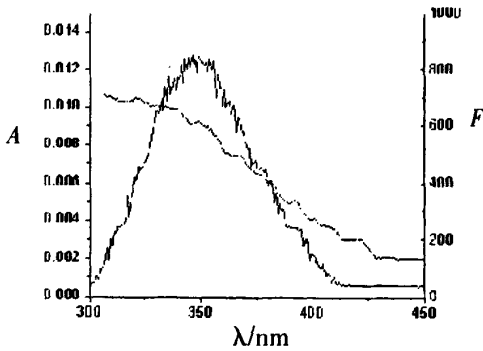


图 6 牛血清白蛋白的荧光发射光谱和芦丁的紫外吸收光谱
 指数,一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336, $F(\lambda)$ 为荧光能量供体在波长为 λ 的荧光强度, $e(\lambda)$ 为能量受体在波长为 λ 时的摩尔吸光系数。图 6 为 (pH=7.2,18℃) 等物质的量的芦丁的吸收光谱与 BSA 的荧光光谱的重叠光谱。利用 Excel 数据处理功能(间隔为 0.5nm)和 Origin7.5 求积分功能,得到 $J=1.24 \times 10^{-14} \text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。可由(4)式求出 R_0 值,当 $c(\text{Rutin}):c(\text{BSA})=1:1$ 时, $E=1-F/F_0=0.078$,由(3)式求出 r 值,得 $r=3.84\text{nm}$ 。可以认为 Rutin 对 BSA 的荧光猝灭作用主要源于 212 位色氨酸残基。

参考文献:

[1]张宝林,王文清,白凤莲.葱醌及黄酮类化合物与人血清白蛋白的结合反应研究[J].高等学校化学学报,1994,15(3):373-785.
 [2]马贵斌,高飞,任斌知,杨频.荧光法研究药物分子与人血清白蛋白的结合作用[J].化学学报,1995,53:1193-1197.
 [3]朱铿,童沈阳.荧光黄与蛋白质相互作用的研究[J].高等学校化学学报,1996,17(4):539-542.
 [4]张晓威,赵凤林,李克安.环丙沙星与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].高等学校化学学报,1999,20(7):1063-1067.
 [5]王敬政,贺吉香,江崇球.芦荟大黄素与血清白蛋白的相互作用[J].分析化学,2001,29(7):782-78.
 [6]颜承农,上官云凤,童金强,刘义,等.双噻达莫与牛血清白蛋白结合热力学特征的荧光光谱法研究[J].光谱学与光谱分析,2003,23(3):543-546.
 [7]易平贵,商志才,俞庆森,邵爽,等.丝裂霉素 C 与牛血清白蛋白结合作用的研究[J].化学学报,2000,58(12):1649-1653.
 [8]王春,吴秋华,王志,陈大刚.槲皮素与牛血清白蛋白相互作用的研究[J].光谱学与光谱分析,2006,26(9):1672-1675.
 [9]陈国珍,黄贤智,郑朱梓,许金钧,等.荧光分析法(第二版)[M].北京:科学出版社,1990:56-57,112-132.
 [10]杨频,高飞.生物无机化学原理[M].北京:科学出版社,2002:494-495.

责任编辑:胡德明

Studies on the Reaction between Rutinand Bovine Serum Albumin

Xu Jinming¹, Tao Huilin², Zhang Hui¹

(1. Department of Chemistry, Huangshan University, Huangshan245041, China; 2.Department of Material and Chemical Engineering, Guilin University of Technology, Guilin541004, China)

Abstract: The reaction between Rutin and bovine serum albumin (BSA) was studied using 3D fluorescence spectra and ultra-violate spectra. The conformational change of BSA due to the addition of extract was discussed. It was proved that only dynamic quenching existed between Rutin and BSA. Quenching constant was obtained and the distance between Rutin and BSA was determined according to the theory of energy transfer.

Keywords: Rutin;Bovine serum albumin; Fluorescence quenching