

牛血清白蛋白与铬天青 S 作用机理的研究

马春琪 李克安* 赵凤林 童沈阳

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

摘要 用三种不同方法相互对照,求出了铬天青 S 与牛血清白蛋白的结合常数和结合个数,提出了蛋白质等电点前后或不同铬天青 S 浓度下,两者存在不同的结合模式.利用 Forster 非辐射能量转移理论确定了铬天青 S 在牛血清白蛋白上的结合位置,利用铬天青 S 对 BSA 的荧光猝灭,对两者的作用机理作了初步探讨.

关键词 铬天青 S,牛血清白蛋白,作用机理

铬天青 S(缩写为 CAS)是三苯甲烷类染料,具有一个磺酸基,在酸性条件下可与蛋白质结合,其颜色由红色变为紫红色,已用于蛋白质的可见分光光度探针^[1]与荧光探针^[2]测定.本文用三种不同方法相互对照,求出了铬天青 S 与牛血清白蛋白的结合常数和结合个数,提出了蛋白质等电点前后或不同铬天青 S 浓度下,两者存在不同的结合模式.利用 Forster 非辐射能量转移理论确定了铬天青 S 在牛血清白蛋白上的结合位置,利用铬天青 S 对 BSA 的荧光猝灭,对作用机理作了初步探讨.

1 实验

1.1 仪器和试剂

UV-265 型紫外-可见分光光度计(岛津); DU-7 型紫外-可见分光光度计(BECKMAN); RF-540 型荧光分光光度计(岛津); Model-821 型酸度计(中山大学).

CAS("Baker"Grade):准确称取 0.1513g 试剂,溶于适量水中,并转移至 250mL 容量瓶中定容,浓度为 1.00×10^{-3} mol/L,使用时适当稀释.牛血清白蛋白(BSA)由 Sigma 公司生产,以二次去离子水配成浓度 6.8 mg/mL 的溶液.pH 由 Britton-Robinson 缓冲溶液控制.所有试剂均为分析纯,实验用水均为二次去离子水.

1.2 实验步骤

在 10 mL 比色管中,分别加入缓冲溶液、CAS 及 BSA 溶液,以水定容,摇匀,静置 10 min,在选定波长下测其吸光度或荧光强度,液池 1cm.

1.3 摩尔吸光系数的测定

1.3.1 CAS 的摩尔吸光系数(ϵ_F) 根据朗伯-比尔定律,以吸光度对 CAS 浓度作图,所得直线斜率即为 ϵ_F .

* 男,53岁,教授

收稿日期:1997-12-08, 修回日期:1998-07-20, 国家自然科学基金(29775003)及高等学校博士学科点专项基金资助项目

1.3.2 BSA-CAS 复合物的摩尔吸光系数(ϵ_B) 固定 CAS 浓度,增加 BSA 的量,使吸光度值达到最大恒定值 A_{\max} ,此时可认为全部染料与 BSA 结合,由 $A_{\max} = \epsilon_B c l$ 即可求得 ϵ_B ,式中 c 为溶液中 BSA 的摩尔浓度.

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱

图 1 为 pH 对 CAS 吸收谱图的影响. pH 2.0 时, CAS 以 H_3L^- 型体存在,最大吸收峰在 470nm; pH < 4 时,随 pH 增大,最大吸收峰红移至 495nm,相应于 CAS 的三级解离, $H_3L^- = H^+ + H_2L^{2-}$; $4 < \text{pH} < 6$ 时,随 pH 提高,最大吸收峰反而紫移,此时相应于 CAS 的四级解离. pH = 2.0 时,以试剂为参比,BSA 的加入使最大吸收峰红移到 544 nm,表明蛋白质可能促使 CAS 发生了三级解离,此酸度下 BSA-CAS 与 CAS 间的吸光度差值最大.

2.2 平衡透析法求结合数与结合常数

按文献[3],将固定量的 BSA($2.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) 放于 12 cm 的透析袋内,将总量(c_T)逐渐增加的 CAS 放于袋外,避光放置 48h. 以水为参比,测定透析袋外溶液 470nm 处的吸光度,计算出游离态 CAS 的浓度 c_F 和结合态 CAS 的浓度 c_B 及每分子 BSA 结合的 CAS 分子个数 n . 所得结果列于表 1, 并绘制 Scatchard 图[3], 见图 2. 由图可见, CAS 低浓度时, CAS 与 BSA 的结合符合 Scatchard 模型, 即有特定结合位置, 最大结合数为 46.7, 结合常数为 $2.64 \times 10^5 \text{ L/mol}$; 高浓度时, n/c_F 趋向于恒定值, n/c_F 对 n 作图为一平行于横轴的直线, 符合 Plasvento 的“相分配模型”的假设[4], 即将 BSA 看作一不同于水的微相, CAS 在水相和蛋白质微相中进行分配, 分配常数 $K_d = n/c_F$ 为一恒定值.

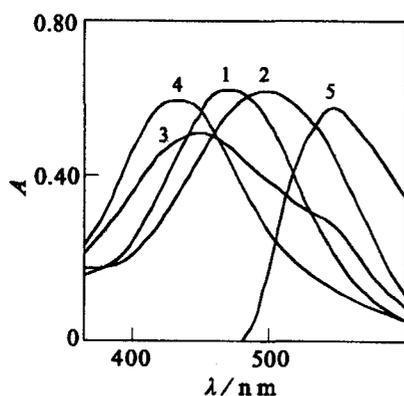


图 1 pH 和 BSA(pH 2.0)对 CAS 的吸收光谱的影响

pH: 1—2.0; 2—4.1; 3—5.0; 4—5.6; 5—BSA

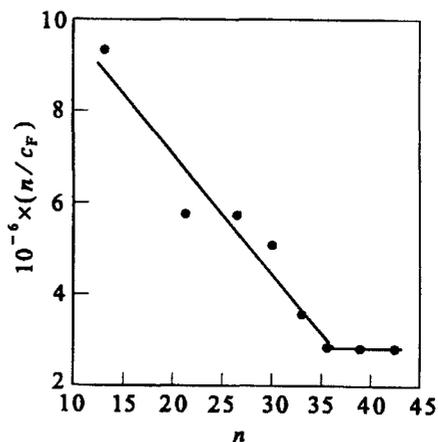


图 2 平衡透析法的 Scatchard 图 (pH 2.0)

同时还作了 BSA 等电点后, pH 5.6 时的平衡透析, n/c_F 近似为一恒定值, 表明此 pH 条件下, CAS 遵循“相分配模型”在水相和蛋白质微相中进行分配.

表 1 平衡透析结果 (pH=2.0)

$c_T \times 10^6$ (mol/L)	$c_F \times 10^6$ (mol/L)	$c_B \times 10^6$ (mol/L)	n	$(n/c_F) \times 10^{-6}$
4.0	1.40	2.60	13.00	9.29
8.0	3.75	4.25	21.25	5.67
10.0	4.70	5.30	26.50	5.64
12.0	6.00	6.00	30.00	5.00
16.0	9.40	6.60	33.00	3.51
20.0	12.90	7.10	35.50	2.75
22.0	14.25	7.75	38.75	2.72
24.0	15.50	8.50	42.50	2.74

2.3 双波长法

该法需首先确定 CAS-BSA 复合物的等吸收波长. 因等吸收波长下, 复合物的吸光度相等, 而含有 BSA 和过量 CAS 溶液的吸光度为复合物及游离 CAS 分子的吸光度之和, 故在两等吸收波长下溶液的吸光度之差便扣除了复合物的吸光度, 仅反映了两不同波长下游离染料分子的吸光度差值, 从而可确定游离染料的浓度.

在 CAS 溶液中, 加入足够过量的 BSA, 可以认为此时 CAS 都与 BSA 结合形成了复合物. 由于 BSA 在可见光区无吸收, 因此所得吸收光谱就是复合物的吸收光谱(图略). 实验中选择等吸收波长为 542 nm 和 486.2 nm. 固定 BSA 的浓度, 在不同 CAS 浓度下测定溶液在上述波长下的吸光度, 所得结果见图 3. 再次表明低浓度下, CAS 与 BSA 的结合符合 Scatchard 模型, 由图求得结合常数为 2.60×10^5 L/mol, 最大结合数为 43.7; 高浓度下, 两者结合模型为“相分配模型”.

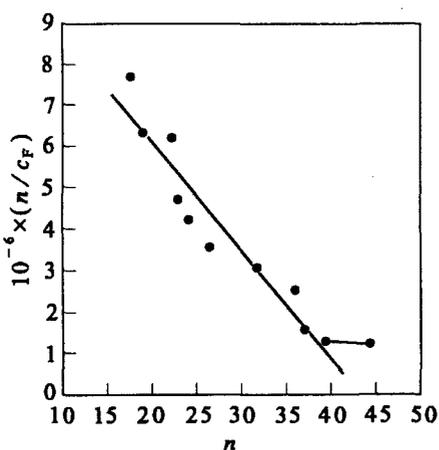


图 3 双波长法的 Scatchard 图
(pH 2.0)

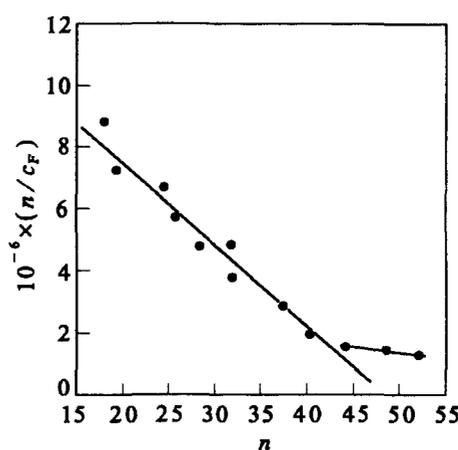


图 4 摩尔比法的 Scatchard 图
(pH 2.0)

2.4 摩尔比法

固定 BSA 的浓度, 改变 CAS 浓度, 以水为参比, 测定溶液 544 nm 的吸光度值, 并按照文献 [5] 的方法处理实验数据, 由下列关系式求得游离染料的浓度:

$$c_B = (A - \epsilon_F c_T) / (\epsilon_B - \epsilon_F) \quad (1)$$

$$c_T = c_B + c_F \quad (2)$$

所得结果代入 Scatchard 方程, 如图 4 所示, 低浓度下, CAS 与 BSA 的最大结合数为 48.7,

结合常数为 $2.66 \times 10^5 \text{ L/mol}$; 高浓度下, CAS 与 BSA 无特定结合位置.

2.5 CAS 在 BSA 上的结合位置

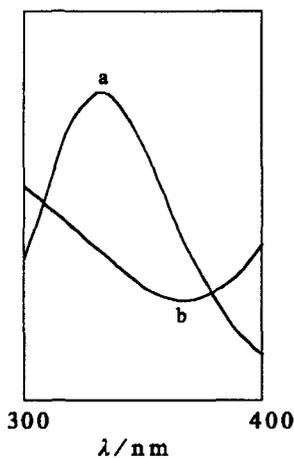


图 5 BSA 的荧光光谱(a)和 CAS 的吸收光谱(b)
(pH 2.0)

根据 Forster 的偶极 - 偶极无辐射能量转移理论^[6], 当两种化合物分子满足以下条件时, 将发生非辐射能量转移: (1) 供能体发荧光; (2) 供能体的荧光发射与受能体的吸收光谱有足够的重叠; (3) 供能体与受能体足够接近, 最大距离不超过 7nm. 能量转移效率与给体和受体间的距离 r 及临界能量转移距离 R_0 有关, 且给体与受体间能量转移效率为:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (3)$$

其中 R_0 是转移效率为 50% 时的临界距离.

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

其中 K^2 为偶极空间取向因子, n 为介质的折射指数, ϕ 为给体的荧光量子产率, J 为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:

$$J = \sum F_D(\nu) \epsilon_A(\nu) \nu^{-4} \Delta\nu / (\sum F_D(\nu) \Delta\nu) \quad (5)$$

其中 $F_D(\nu)$ 为荧光给体在波数 ν 时的荧光强度, $\epsilon_A(\nu)$ 为受体在 ν 时的摩尔吸光系数, 能量转移效率又可由下式得到:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (6)$$

由(3)~(6)式可算出 R_0 和 r .

由图 5 可见, CAS 的紫外 - 可见吸收光谱与 BSA 的荧光光谱有较大程度重叠, 将重叠部分分割成极小的矩形面积可求得重叠积分 J . BSA 有两个色氨酸残基, 分别位于第 134 位和 212 位, 而荧光 ($\lambda_{\text{ex}} = 280\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 335\text{nm}$) 主要由 212 位色氨酸发出. 取色氨酸的量子效率分别为 0.085 ($\text{pH} < 4$)^[7] 和 0.118 ($\text{pH} > 4$)^[8], n 取水和有机物的平均值 1.336^[8], 取向因子取给体 - 受体各向随机分布的平均值 $2/3$ ^[8], 将以上各量代入式(4), 求得临界距离 R_0 . 利用 BSA 与 CAS 摩尔比 1:1 时复合物的荧光强度, 按式(3)和(6)求出不同酸度下 CAS 与 BSA 上第 212 位色氨酸残基间的距离 r . 结果见表 2.

表 2 CAS 在 BSA 上的结合位置

pH	$J \times 10^{15}$ ($\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	R_0 (nm)	E (%)	r (nm)
2.0	5.20	2.20	15.6	2.76
4.1	5.43	2.22	53.5	2.16
5.6	6.75	2.30	50.1	2.30

2.6 BSA 的荧光猝灭

其他分子与荧光体分子相互作用引起的荧光强度降低叫荧光猝灭, 并有动态与静态猝灭之分, 荧光强度与猝灭剂浓度的关系如下式^[6]:

$$F_0/F = 1 + K[Q] \quad (7)$$

F_0 为未加猝灭剂时的荧光强度, $[Q]$ 是猝灭剂浓度. 由式(7)得 Stern - Volmer 猝灭曲线并可从其直线关系判断猝灭过程的静态和动态: 当静态猝灭时, K 为荧光 - 猝灭分子间的结合常数; 动态猝灭时, K 为 Stern - Volmer 常数.

在浓度一定的 BSA 溶液中, 分别加入不同浓度的 CAS, 作出蛋白质荧光猝灭的 Stern - Volmer 图(见图 6). 由图可见, 在 CAS 低浓度区呈线性, 而在较高浓度则呈上升曲线. 图 7 给出

了 CAS 对 BSA 的荧光猝灭谱图,在高浓度染料范围内,发射波长明显紫移。

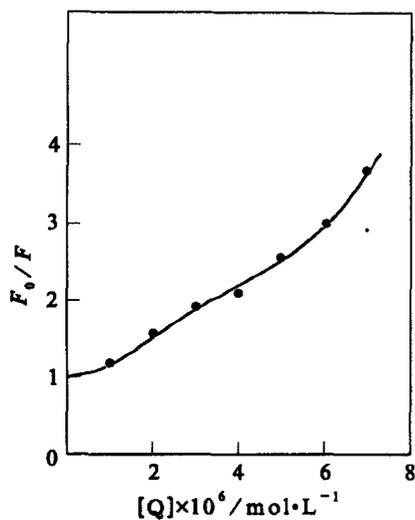


图 6 CAS 对 BSA 荧光猝灭的 Stern - Volmer 图 (pH 2.0)
 $c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

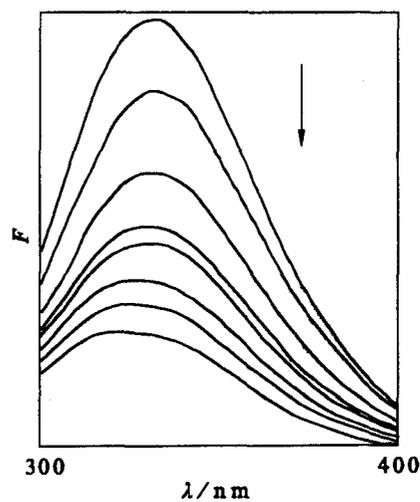


图 7 CAS 对 BSA 的荧光猝灭谱图 (pH 2.0)
 $c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; 曲线 1 ~ 8, $c(\text{CAS}) \times 10^{-7}$ 分别为 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 mol/L

2.7 CAS 对 BSA 构象的影响

使激发波长和发射波长保持固定的波长间距 ($\Delta\lambda$), 同步扫描激发和发射单色器, 可得到同步荧光谱图, 蛋白质的同步荧光光谱已被用来判断蛋白质的构象变化^[9]. 由 $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 所得到的同步荧光谱图仅显示蛋白质酪氨酸残基的光谱特征, 保持 $\Delta\lambda = 60\text{nm}$, 作出的同步荧光

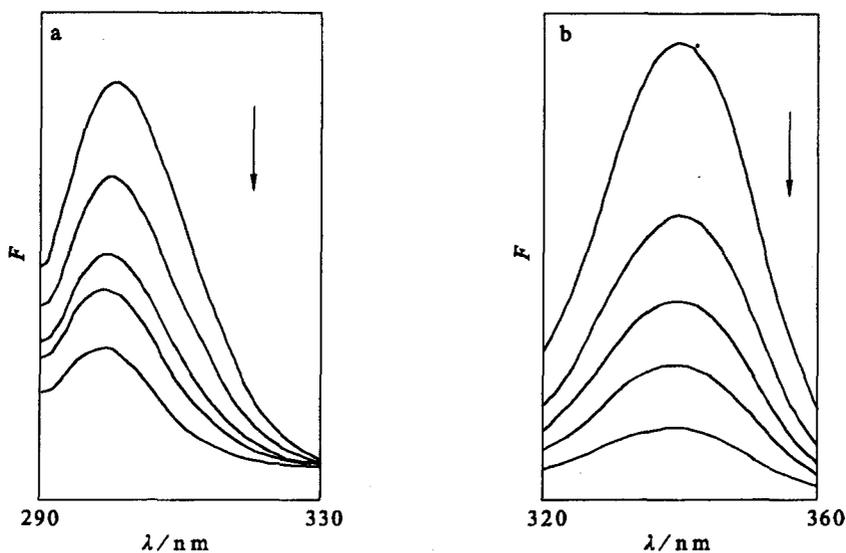


图 8 不同 CAS 浓度下 BSA 的同步荧光谱图 (pH 2.0)

(a) 酪氨酸; (b) 色氨酸

$c(\text{BSA}) = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$; 曲线 1 ~ 5, $c(\text{CAS}) \times 10^{-7}$ 分别为 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mol/L

光谱仅表现出色氨酸的荧光.因残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关,故由发射波长的改变可判断蛋白质的构象变化.

固定蛋白质的量,逐渐增加 CAS 的浓度,并绘 BSA 的同步荧光光谱.图 8a 和 b 分别为 BSA 中酪氨酸和色氨酸残基的荧光光谱图,随 CAS 浓度增大,酪氨酸的发射波长紫移,而色氨酸的荧光发射波长不受影响.

2.8 讨论

一定条件下,增大 pH 和提高 BSA 浓度都使 CAS 的吸收光谱红移,表明在蛋白质存在下,染料自身的离解平衡发生了移动,由酸型变为碱型.但 BSA - CAS 复合物的最大吸收波长(540nm)却远大于 CAS 碱式型体的最大吸收波长(495nm),可作如下解释:因 pH 2.0 时,BSA 带正电荷,CAS 的 H_3L^- 型体荷负电,两者存在静电作用,可能蛋白质的正电荷对染料的共轭 π 电子体系产生微扰,使电子重排, $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁能级差改变,从而引起最大吸收波长大幅度红移.鉴于 BSA 对 CAS 吸光度的影响远比 pH 大,故认为蛋白质的静电场作用,降低了 $\pi \rightarrow \pi^*$ 能级差.

以上三种方法所求结合数和结合常数符合较好,表明三种方法可互为佐证,pH 2.0 时,在低 CAS 浓度下,蛋白质和 CAS 的结合符合 Scatchard 模型;高浓度时,符合相分配模型.酸度对结合模型也有影响,在较高 pH(5.6)下,CAS 以相分配模型与 BSA 结合.可作以下解释:pH 4.7 左右为 BSA 的等电点,等电点前,BSA 与带相反电荷的 CAS 通过静电引力结合;pH > 4.7 时,蛋白质带负电荷,与 CAS 静电排斥,CAS 可能以疏水作用进入 BSA 的疏水微区,遵从相分配模型.随 BSA 上结合的 CAS 数目增多,也可能使 BSA 上产生净的负电荷,使随后结合的 CAS 只能依靠疏水作用与 BSA 结合,从而观察到即便在 pH 2.0 时,CAS 在高浓度时和 BSA 的结合也符合相分配模型.

不同 pH 条件下,CAS 对 BSA 荧光的猝灭能力不同,pH 2.0 时,猝灭能力最弱,结合的 CAS 分子与 BSA 第 212 位色氨酸距离较远;pH 4.1 时,CAS 与该色氨酸距离最近,故能量转移效率最大,几乎猝灭了 BSA 一半的荧光.上述结果再次表明酸度影响 CAS 在 BSA 上的结合部位.

由 pH 2.0 时的猝灭曲线可看出,在 CAS 低浓度区呈线性,而在较高浓度则呈上升曲线,表明在较高浓度下已非单一的静态猝灭.结合图 7 和 8 的同步荧光猝灭谱图看,CAS 不影响色氨酸的荧光发射波长,却在较高浓度下使酪氨酸和 BSA 的荧光发射波长紫移,说明 CAS 与 BSA 的结合,并不影响 BSA 上色氨酸微区的构象;CAS 优先和色氨酸结合,随其浓度增大,CAS 开始结合到酪氨酸微区,并引起该微区 BSA 的构象改变,不仅使荧光光谱图紫移,而且使之偏离静态猝灭.BSA 荧光发射波长紫移程度远大于酪氨酸残基,这是因为除了蛋白质构象的影响,随色氨酸荧光被猝灭,及色、酪氨酸两残基间的能量传递受阻,BSA 渐渐体现出原来被掩盖的酪氨酸短波长的荧光,故而观察到较大的波长紫移.

References

- 1 Wei Yong - Ju, Tong Shen - Yang, Li Ke - An, *Acta Chimica Sinica*, **1995**, 53, 83.
- 2 Y. Saito, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 113, 678.
- 3 G. Scatchard, I. I. Scheiberg, S. H. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 535.
- 4 M. Plaavento, A. Profumo, *Talanta*, **1991**, 58, 1099.
- 5 R. W. Congdon, G. W. Muth, A. G. Splittgerber, *Anal. Biochem.*, **1993**, 213, 407.
- 6 Yang Ping, "Introduction of Bioinorganic Chemistry", Jiaotong University of Xian, Xian, **1991**.
- 7 Zhu Keng, Tong Shenyang, *Fenxi Hxaxue*, **1996**, 24, 1263.
- 8 Yang Manman, Yang Ping, Zhang Liwei, *Chinese Science Bulletin*, **1994**, 39, 31.
- 9 E. A. Brustein, N. S. Vedenkina, M. N. Irkova, *Photochem. Photobio.*, **1973**, 18, 263.

A Study on the Reaction Mechanism between Chrome - Azurol S and Bovine Serum Albumin

MA Chun - Qi LI Ke - An* ZHAO Feng - Lin TONG Shen - Yang

(Department of Chemistry, Peking University, Beijing, 100871)

Abstract In this paper, three different methods were used to study the binding numbers and binding constants of chrome - azurol S (CAS) on bovine serum albumin (BSA), and almost same results were obtained. It is proposed that the concentration of CAS and pH of the solutions affect the binding mode of CAS and BSA. According to the theory of Forster non - radiative energy transfer, the binding sites of CAS on BSA are found. Taking advantage of fluorescence quenching, the reaction mechanism of CAS and BSA is explored.

Keywords chrome - azurol S (CAS), bovine serum albumin, reaction mechanism

(Ed. PAN Bing - Feng)