

光谱法研究绿原酸 和牛血清白蛋白的相互作用

孙艳辉, 魏亚玲, 吴霖生, 张 余

(滁州学院化学与生命科学系, 安徽滁州 239012)

摘 要: 为了解绿原酸和牛血清白蛋白的相互作用, 在模拟动物生理条件下, 采用荧光光谱和紫外-可见吸收光谱结合 Stern-Volmer 方程、double-reciprocal 方程和热力学公式来研究绿原酸与牛血清白蛋白相互作用特征。结果表明: 绿原酸和牛血清白蛋白在 298K 和 310K 两个温度下的结合常数分别为 $1.869 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $1.574 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 结合位点分别为 1.18 和 1.16; 且热力学参数 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 、 $\Delta G < 0$; 结合距离小于 7nm。因此, 绿原酸对牛血清白蛋白有较强的荧光静态猝灭作用, 符合静态猝灭过程, 结合力为疏水作用。

关键词: 绿原酸, 牛血清白蛋白, 相互作用, 荧光光谱, 紫外光谱

Study on the interaction of chlorogenic acid and bovine serum albumin by spectrum

SUN Yan-hui, WEI Ya-ling, WU Ling-sheng, ZHANG Cuan

(Department of Chemistry and Life Sciences, Chuzhou University, Chuzhou 239012, China)

Abstract: To study the interaction of chlorogenic acid and bovine serum albumin, the fluorescence spectroscopy, UV-visible absorption spectroscopy, Stern-Volmer equation, double-reciprocal equation and formula of thermodynamics were used to obtain binding characteristics of the interaction in a simulated physiological conditions of animals. The results showed: the binding constants of chlorogenic acid and bovine serum albumin at 298.02K and 310.02K were 1.869×10^5 and $1.574 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, binding site were 1.18 and 1.16, respectively, and the thermodynamic parameters were $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$, $\Delta G < 0$. And their combined distance was less than 7nm. Chlorogenic acid on bovine serum albumin had a stronger role in fluorescence quenching, in line with the static quenching process for hydrophobic binding.

Key words: chlorogenic acid; cattle serum albumin; interaction; fluorescence spectrum; UV-visible absorption spectrum

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)04-0129-03

功能小分子与血清白蛋白之间的相互作用是目前研究热点^[1-3], 这一研究将有助于了解功能小分子在人体内的运输及功能特性的表达。绿原酸是存在于金银花、杜仲、茵陈等多种植物中的一类苯丙素类化合物, 绿原酸具有广泛的抗菌作用、抗炎、抗病毒、保肝利胆等方面的药理作用, 是非常被看好的天然活性物质^[4-6]。当前对绿原酸的研究大多集中于活性方面, 对其与生物大分子相互作用方面的研究未见报道。本文运用荧光光谱和紫外可见光谱研究

了绿原酸与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用, 由荧光猝灭现象和 Förster 非辐射能量转移理论求得了绿原酸与 BSA 的结合常数、结合位点和结合距离, 从热力学参数推出二者之间的作用力类型。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛血清白蛋白 上海源聚生物科技有限公司, 分子量为 65000Da, 以水配成 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 的储备液, 保存备用; 绿原酸 中国药品生物制品检定所, 分子量为 345.30Da, 用水配成 $9.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的储备液; 水 去离子水; pH = 6.86 的磷酸盐缓冲液, 0.5mol/L 的 NaCl 溶液。

Cary eclipse 型分子荧光分光光度计、Cary 100 Scan 型紫外-可见分光光度计 Varian, 美国瓦里安公司; 精密天平, 恒温水浴锅。

1.2 实验方法

收稿日期: 2009-06-22

作者简介: 孙艳辉 (1978-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 生物资源综合利用。

基金项目: 安徽省应用化学重点学科基金项目资助; 安徽高等学校省级自然科学研究项目 (KJ2008B227); 滁州市重点科技计划项目 (2008036)。

分别在编号为 0#~9# 的 50mL 容量瓶中依次加入 5mL 缓冲液、4mL NaCl 溶液、1mL BSA 储备液。再按编号顺序依次加入 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9mL 的绿原酸储备液。最后用去离子水分别定容至刻度,摇匀,置于恒温水浴锅中,放置 30min 后测定。

荧光光谱:以 280nm 为激发波长,290~500nm 波长范围内扫描荧光发射光谱;分别固定 $\Delta\lambda = 15$ 、60nm,在 250~320nm 波长范围内进行同步扫描,得到同步荧光光谱;激发和发射狭缝均为 5nm。波长扫描速度为 500nm/min。

紫外吸收光谱:以去离子水作参比,测定绿原酸在 200~500nm 波长范围内的紫外吸收光谱。

2 结果与讨论

2.1 绿原酸对 BSA 的荧光猝灭光谱

按 1.2 的方法在 298K 温度下进行实验,得到如图 1 所示荧光光谱。

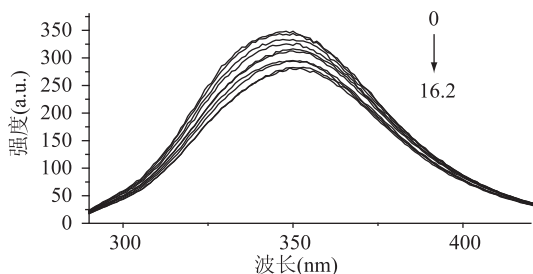


图 1 绿原酸对 BSA 荧光发射光谱的影响

BSA 由于其自身的色氨酸残基和酪氨酸残基产生 $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 280\text{nm}/340\text{nm}$ 的内源荧光,而绿原酸在实验条件下并无明显的荧光产生,故可忽略其荧光干扰。从图 1 中可以看出,随着绿原酸浓度的增加 ($0 \sim 16.2 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$),BSA 的荧光强度有规律地减弱,且最大发射波长略有红移(从 350~353.07nm,最大发射峰红移了 3.07nm)。因而绿原酸在与 BSA 的相互作用过程中能明显地猝灭 BSA 的荧光。

2.2 绿原酸对 BSA 的荧光猝灭机理

为确定绿原酸对 BSA 荧光猝灭类型,选用 298K 和 310K 两个实验温度,分别测定荧光猝灭光谱。先按动态猝灭的 Stern-Volmer^[7] 方程处理:

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

式中: F_0 和 F 分别为未加入猝灭剂 Q 及加了猝灭剂 Q 的荧光强度, K_q 为双分子猝灭过程速率常数, τ_0 是猝灭剂不存在时生物大分子的平均寿命, K_{sv} (L/mol) 是动态猝灭常数。

根据式(1),以 F_0/F 对绿原酸浓度 $[Q]$ 作图,得到绿原酸对牛血清白蛋白荧光的 Stern-Volmer 猝灭曲线,结果如图 2 所示。可以看出, F_0/F 随着绿原酸浓度的增加逐渐增大,二者线性关系良好。计算求得作用温度为 298K 和 310K 时的荧光猝灭常数 K_{sv} 分别为 1.64×10^4 、 $1.60 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和猝灭过程速率常数 K_q 分别为 1.64×10^{12} 、 $1.60 \times 10^{12} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

由于 BSA 的荧光猝灭曲线斜率 K_{sv} 随着温度的升高而降低。因而,初步推断绿原酸对牛血清白蛋白荧光的猝灭为静态猝灭过程^[8]。据文献^[9]可知,生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 2.0×10^{10}

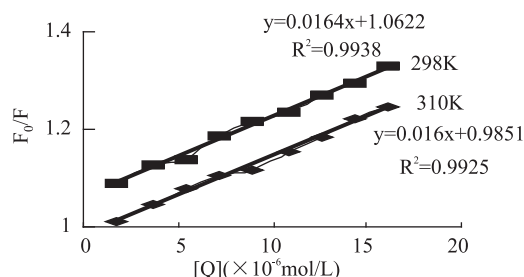


图 2 F_0/F 对 $[Q]$ 的 Stern-Volmer 猝灭曲线

$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。无论是在 298K 还是 310K,绿原酸对 BSA 的荧光猝灭速率常数都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。由此进一步确定,绿原酸对 BSA 荧光的猝灭是由于形成了复合物而引起的静态猝灭。

2.3 结合常数和结合位点数

对于静态猝灭过程,荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光分子与猝灭剂分子间的结合常数表达式推导出^[10]。

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

式(2)中: K_A 为结合常数, n 为结合位点数。根据式(2),结合荧光猝灭光谱数据,以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 作线性拟合图,结果如图 3 所示。

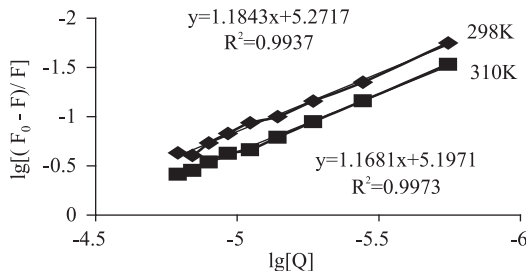


图 3 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 的线性拟合图

由图 3,计算绿原酸与 BSA 作用温度为 298K 和 310K 时的结合常数 K_A 分别为 1.869×10^5 和 $1.574 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,结合位点数分别为 1.18 和 1.16。可以看出,温度对绿原酸与 BSA 的结合常数影响不大, K_A 值均为 10^5 数量级,表明绿原酸与 BSA 之间的结合作用较强,可加快绿原酸在血液中运输和转载。另外,绿原酸与牛血清白蛋白的结合位点数近似为 1,表明绿原酸和牛血清白蛋白形成 1:1 的复合物。

2.4 结合的热力学参数及作用力类型

小分子与蛋白作用力主要有氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。不同小分子与蛋白结合力的类型是不同的。当温度变化不大时,反应的焓变 ΔH 可以看作是一个常数。根据反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小,可以判断小分子与蛋白质间的主要作用力类型。根据热力学参数关系式^[11],计算热力学参数列于表 1。

表 1 绿原酸与 BSA 结合过程的热力学参数

T (K)	ΔH ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)	ΔG ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
298	10.99	137.78	-30.07
310	10.99	135	-30.84

由表 1 结果可知, $\Delta G < 0$, $\Delta S > 0$,说明绿原酸与 BSA 之间的相互作用是熵增加,Gibbs 自由能降低的

自发作用过程;而 $\Delta H > 0$, 根据 Ross 等^[12] 的观点, 绿原酸与 BSA 之间结合力主要是疏水作用力。

2.5 结合距离的计算

根据 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移原理^[13]: 供能体的荧光发射光谱与受能体的吸收光谱有足够的重叠;供能体与受能体之间的距离不超过 7nm 时, 将会发生非辐射能量转移现象, 从而使荧光体荧光猝灭。非辐射能量转移效率 E 、供能体与受能体之间的结合距离 r 及临界能量转移距离 R_0 之间有下列关系:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad \text{式(3)}$$

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

$$J = \Sigma [F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 \cdot \Delta\lambda] / \Sigma [F_D(\lambda) \cdot \Delta\lambda] \quad \text{式(5)}$$

式中: R_0 是能量转移效率为 50% 时的临界距离。在本文实验条件下, K^2 为偶极空间取向因子, 取向因子 K^2 取荧光给体和受体随机分布的平均值 $2/3$, Φ 为给体 BSA 的荧光量子产率, 取 BSA 中残基的量子产率 $\Phi = 0.13$, n 为介质的折射指数, 一般取水和有机物折射指数的平均值 $n = 1.336$, J 为蛋白质的荧光发射光谱与绿原酸的吸收光谱间的重叠积分, 式中: $F(\lambda)$ 为荧光给体在波长 λ 处的荧光强度; $\varepsilon(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数。能量转移效率 E 由 $E = 1 - F/F_0$ 求出, 式中: F 为 $[BSA]:[Q] = 1:1$ 时的 BSA 的荧光强度^[14]。

对 298K 时的 $9.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ BSA 的荧光光谱和 $9.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 绿原酸的紫外-可见吸收光谱作重叠光谱图如图 4 所示, 可以看出, BSA 的荧光发射光谱和绿原酸的紫外吸收光谱有较大的重叠。根据式(5)求得重叠积分 $J = 2.984 \times 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。将上述数值代入式(4), 求得 $R_0 = 4.08 \text{ nm}$; 再由式 $E = 1 - F/F_0$ 求得能量转移效率 $E = 0.198$; 最后由 R_0 、 E 经式(3)计算出绿原酸和 BSA 中色氨酸残基的作用距离 $r = 5.18 \text{ nm}$ 。

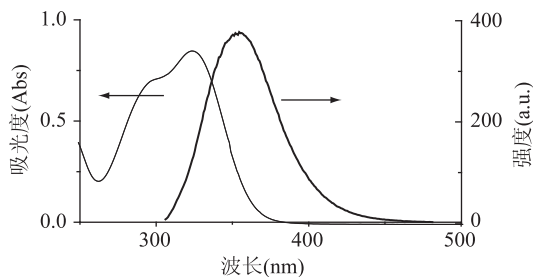


图4 298K 时 BSA 荧光光谱和绿原酸吸收光谱的重叠图

由计算结果可知, 绿原酸与 BSA 荧光性氨基酸残基间的空间距离小于 7nm, 表明非辐射能量转移是引起 BSA 荧光猝灭的原因之一, BSA 与绿原酸之

间可以发生能量转移, 使 BSA 荧光猝灭, 据此推测非辐射能量转移与静态猝灭共同导致了 BSA 的荧光猝灭。

3 结论

3.1 绿原酸对 BSA 的荧光有一定的猝灭作用, 且该作用过程为静态猝灭过程。

3.2 绿原酸与 BSA 之间以疏水作用力结合, 且存在非辐射能量转移。

3.3 绿原酸与 BSA 形成近似 1:1 的复合物, 且结合常数是 10^5 数量级, 这说明绿原酸与 BSA 之间的结合作用较强, 有利于在血液中的运输和转载。

参考文献

- [1] 屈凌波, 王玲, 等. 葛根素及其衍生物与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 化学学报, 2007, 65 (21): 2417-2422.
- [2] 马萍, 庄稼, 等. 人血清白蛋白与酸性绿兰 K 相互作用机理的光谱学研究[J]. 应用化学, 2008, 25(9): 1032-1036.
- [3] 周秋华, 王彦卿, 等. 单宁酸与牛血红蛋白相互作用的光谱研究[J]. 化学研究与应用, 2008, 20(7): 816-819.
- [4] 许东颖, 家荣, 永周. 银花中绿原酸提取方法的比较和优化研究[J]. 陕西师范学院学报: 自然科学版, 2003, 20(2): 17-20.
- [5] 黄绍重. 绿原酸的提取及应用[J]. 应用化工, 2006, 35(6): 467-468.
- [6] 胡宗福, 于文利, 等. 绿原酸清除活性氧和抗脂质过氧化的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 128.
- [7] Mohamed A Awad, Anton de Jager, Lucie M van Westing. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation[J]. Scientia Horticulturae, 2000, 83(3): 249-263.
- [8] Mcmenamy R H. Albumin Structure, Function and Uses[M]. Oxford: Dergamon Press, 1977: 143.
- [9] 梅平, 颜承农. 曙红 Y 与牛血清白蛋白结合反应特征的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, 26(12): 2306-2310.
- [10] 上官云凤, 童金强, 等. 双噬达莫与牛血清白蛋白结合热力学特征的荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(3): 543-546.
- [11] 杨曼曼, 杨频, 张立伟. 荧光法研究咖啡酸类药物与白蛋白的相互作用[J]. 科学通报, 1994, 39(1): 31-35.
- [12] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association relation: forces contribution to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096-3102.
- [13] 杨频, 高飞. 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 494-495.
- [14] 赵妍, 韩凤梅, 等. 荧光猝灭法对肉桂酸与人血清白蛋白间的相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(4): 904-907.

权威 · 全面 · 核心 · 实验 · 领先