

张玉明,倪志华. 杆菌肽与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):245-247.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.072

杆菌肽与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱

张玉明¹, 倪志华^{1,2}

(1. 河北大学生命科学学院,河北保定 071002;2. 河北省生物工程技术研究中心,河北保定 071002)

摘要:利用荧光光谱法研究杆菌肽与牛血清白蛋白的相互作用,结果表明,杆菌肽可使牛血清白蛋白的内源荧光发生猝灭。在不同温度下研究杆菌肽对牛血清白蛋白的荧光猝灭作用,利用 Stern - Volmer 方程处理试验数据,证明荧光猝灭机理属于静态猝灭。杆菌肽与牛血清白蛋白具有 1 个结合位点,计算得到不同温度下杆菌肽与牛血清白蛋白的结合常数(K_A)为 3.38×10^4 L/mol (298 K)、 2.92×10^4 L/mol (308 K)、 1.56×10^4 L/mol (318 K)。通过计算热力学参数可知,杆菌肽与牛血清白蛋白的相互作用是吉布斯自由能降低的自发过程,且二者间的主要作用力类型为静电作用。三维荧光光谱试验显示,杆菌肽的加入引起牛血清白蛋白构象的变化,表现为蛋白质内部色氨酸残基所处微环境的疏水性降低。

关键词:杆菌肽;牛血清白蛋白;相互作用;荧光光谱;猝灭;热力学参数

中图分类号: Q631 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0245-03

杆菌肽是一种药用饲料添加剂,在畜牧养殖业应用广泛,具有促进动物生长、抑制肠道中有害微生物生长、提高机体免疫力的作用^[1],被誉为绿色抗生素饲料添加剂。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)是血浆中含量最丰富的蛋白质之一,在血液中主要具有维持渗透压、缓冲 pH 值等作用^[2]。BSA 可与多种阳离子、阴离子、其他小分子物质结合,具有储运内源性代谢产物、外源性药物的重要生理功能;因此,BSA 与药物分子的相互作用研究已受到重视^[2-3]。杆菌肽被摄入机体后,极有可能与血液中的 BSA 结合,以复合物形式在体内吸收、转运。研究杆菌肽与 BSA 之间的相互作用,有助于了解药物在体内的运输分布和代谢,对于阐明杆菌肽的药理作用和药代动力学具有重要意义。荧光光谱法是研究蛋白质等生物大分子与各种小分子相互作用的重要手段^[4]。应用荧光光谱法研究杆菌肽与 BSA 间的相互作用,着重阐述杆菌肽与 BSA 的荧光猝灭机理、结合常数、热力学常数,并使用三维荧光技术研究杆菌肽对 BSA 高级结构的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

F97pro 型荧光分光光度计(上海棱光技术有限公司),BS110S 型精密电子分析天平(德国 sartorius 公司),HH 系列数控恒温水浴锅(金坛市科析仪器有限公司),明澈-D 型超纯水机(Millipore 公司)。杆菌肽(上海金穗生物科技有限公司),牛血清白蛋白(北京索莱宝科技有限公司),其他试剂均

为分析纯。以 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.4)为溶剂,配制 0.1 mmol/L 的 BSA 标准溶液。杆菌肽使用超纯水配成 1.0 mmol/L 的标准溶液。

1.2 方法

准确移取一定量的杆菌肽标准溶液于 10 mL 具塞玻璃试管中,加入 BSA 标准溶液 1.0 mL,于一定温度下恒温放置 1 h。在激发和发射光栅狭缝均为 5 nm、激发波长为 280 nm 时,扫描 270 ~ 500 nm 波长范围内 BSA、BSA-杆菌肽的荧光光谱。在激发波长 270 ~ 400 nm、发射波长 270 ~ 400 nm 范围内进行三维荧光扫描,比较溶菌酶与杆菌肽-溶菌酶体系的荧光等高线。

2 结果与分析

2.1 荧光猝灭光谱

BSA 分子因含有色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等氨基酸残基而发射内源荧光,其中色氨酸的荧光强度最大。激发光为 280 nm 时,可认为蛋白质所呈现的荧光源自分子中的色氨酸^[5]。荧光猝灭指任何降低某样品荧光强度的过程,分子间的相互作用可导致荧光猝灭。

由图 1 可知,BSA 溶液在波长 280 nm 光激发下可在 333.4 nm 处具有最大荧光发射峰。在 BSA 浓度保持恒定的情况下,BSA 的内源性荧光强度随杆菌肽浓度的增加而有规律地降低,表明杆菌肽对 BSA 的内源荧光发生了猝灭作用。随着杆菌肽的加入,BSA 的最大荧光发射峰出现红移。杆菌肽浓度为 50 nmol/L 时,BSA 溶液体系的最大荧光发射峰由 333.4 nm 变化为 357.8 nm,即红移了 24.4 nm。一般认为,蛋白质中色氨酸残基的最大发射峰与其所处环境的极性密切相关,由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。上述现象表明杆菌肽的加入使 BSA 构象发生了变化,色氨酸残基所处环境疏水性降低,杆菌肽与 BSA 分子发生了相互作用。

2.2 杆菌肽对 BSA 的荧光猝灭机理

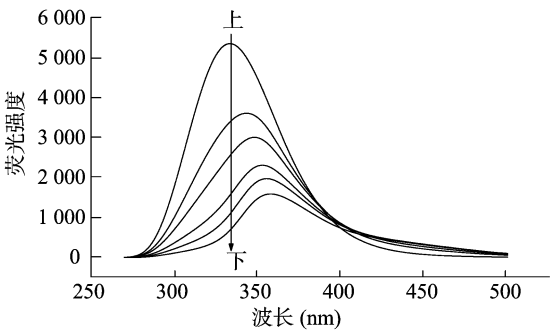
有机小分子对蛋白质的荧光猝灭作用主要分为动态猝灭

收稿日期:2015-08-05

基金项目:河北省科技计划(编号:15222912);河北省保定市科学技术研究与发展指导计划(编号:15ZN001);河北大学中西部提升综合实力专项资金。

作者简介:张玉明(1979—),男,山东章丘人,博士,讲师,主要从事应用生物化学研究。E-mail:zhangyuming@hbu.edu.cn。

通信作者:倪志华,硕士,讲师,主要从事生物化学与分子生物学研究。Tel:(0312)5079364;E-mail:nizhihua@hbu.edu.cn。



BSA浓度为10 μmol/L, 从上至下杆菌肽浓度分别为 0、10、20、30、40、50 nmol/L
图1 杆菌肽对 BSA 的猝灭作用

和静态猝灭^[6]。动态猝灭主要是一种能量转移或电子转移过程,不影响蛋白质的结构和生理活性;静态猝灭主要是由于小分子和蛋白质等生物大分子发生了相互作用,可能生成不发荧光的配合物。一般认为,动态猝灭是荧光体与猝灭剂之间因相互碰撞而使荧光被猝灭的过程,温度升高可增加分子碰撞的机会,从而提高猝灭效率;静态猝灭是荧光体与猝灭剂之间形成了基态配合物,温度升高使配合物的稳定度下降,从而减小静态猝灭的程度。动态猝灭和静态猝灭均符合 Stern - Volmer 关系式^[7]:

$$F/F_0 = 1 + K[Q] \tag{1}$$

式中: F_0 、 F 分别表示加入猝灭物质前后测得的荧光强度; $[Q]$ 为猝灭剂的摩尔体积分; K 在静态猝灭时为配合物的形成常数,在动态猝灭时为动态猝灭常数 K_{SV} 。

$$K_{SV} = K_q T_0 \tag{2}$$

式中: K_q 为荧光猝灭速率常数,反映体系中分子在扩散和相互碰撞过程中对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响。一般认为,各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭过程速率常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ ^[8]。 T_0 为不存在猝灭剂时荧光物质的平均寿命,一般为 10^{-8} s 。在同一温度下,杆菌肽对 BSA 的荧光猝灭效应随其浓度的增加呈线性增大(图 2)。 F_0/F 对 $[Q]$ 线性良好,相关系数均在 0.99 以上,表明杆菌肽与 BSA 的相互作用只存在一种猝灭机制。由图 2 中直线的斜率可求出 K 值,假设其为动态猝灭,由式(2)可求出 K_q 值(表 1)。

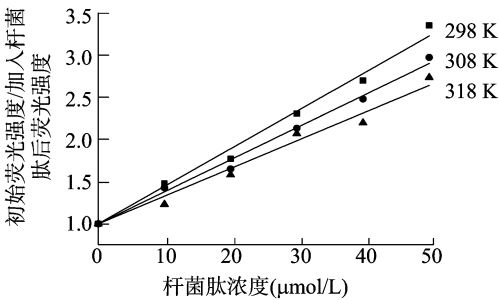


图2 不同温度下杆菌肽对 BSA 的荧光猝灭作用

由表 1 可知,随着温度的升高,BSA 的猝灭曲线斜率下降, K 值降低,表明杆菌肽对 BSA 荧光的猝灭作用随温度升高而降低。由此可推断猝灭过程为形成化合物所引起的静态猝灭,而不是由于分子碰撞所引起的动态猝灭。动态猝灭与扩散有关,温度升高时将增大扩散系数,从而增大双分子猝灭

常数;反之温度升高可使配合物的稳定度下降,从而减小静态猝灭的程度。本试验结果表明,杆菌肽对 BSA 的猝灭过程符合静态猝灭规律。杆菌肽对 BSA 的 K_q 值在 10^{12} 数量级,远大于各类猝灭剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$,表明杆菌肽对 BSA 的荧光猝灭作用不是动态猝灭。

表 1 杆菌肽对 BSA 的荧光猝灭常数

温度 (K)	动态猝灭常数 (L/mol)	荧光猝灭速率常数 [$\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$]	相关系数
298	4.53×10^4	4.53×10^{12}	0.998 4
308	3.87×10^4	3.87×10^{12}	0.999 0
318	3.34×10^4	3.34×10^{12}	0.997 5

2.3 杆菌肽与 BSA 的结合常数及结合位点数

对于静态猝灭过程,蛋白质与小分子的结合位点数可由式(3)导出^[9]:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg [Q] \tag{3}$$

以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [Q]$ 作图,从直线的斜率和截距可求得蛋白质与小分子的结合位点数(n)、结合常数(K_A)。温度分别为 298、308、318 K 时, $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg [Q]$ 的线性关系良好,相关系数均达到 0.99 以上(表 2)。杆菌肽与溶菌酶的结合位点数均接近于 1,表明二者近似以 1 : 1 形式结合生成复合物,温度对结合比例影响不大。 K_A 值均为 10^4 数量级,表明杆菌肽与 BSA 的结合作用较强,BSA 可承担杆菌肽在机体中的运输作用。

表 2 杆菌肽与 BSA 的结合常数

温度 (K)	结合常数 (L/mol)	结合位点数	相关系数
298	3.38×10^4	0.97	0.991 3
308	2.92×10^4	0.95	0.994 3
318	1.56×10^4	0.87	0.992 5

2.4 杆菌肽与 BSA 的结合热力学参数及结合力类型

小分子物质和蛋白质的相互作用力主要有疏水作用力、氢键、范德华力、静电引力等^[10]。根据热力学参数的关系式可分别求得焓变(ΔH)、熵变(ΔS)、生成自由能变(ΔG)。Ross 等根据大量试验结果总结出药物分子间作用力类型与热力学参数的关系,体系的 $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 为疏水作用力, $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 为氢键或范德华力, $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$ 为静电作用力,温度变化范围不大时可近似将作用过程的焓变(ΔH)看作常数^[11]。根据热力学公式(4)、(5)、(6)及不同温度下的结合常数,可求得相应的热力学参数(表 3)。

$$\Delta G = -RT \ln K_A; \tag{4}$$

$$\ln(K_{A2}/K_{A1}) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R; \tag{5}$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T. \tag{6}$$

表 3 杆菌肽与 BSA 作用的热力学参数

温度 (K)	焓变 (J/mol)	生成自由能变 (J/mol)	熵变 [$\text{J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$]
298	-302.7	-2.59×10^4	85.68
308	-302.7	-2.63×10^4	84.49
318	-302.7	-2.55×10^4	79.30

由表 3 可知,杆菌肽与 BSA 相互作用时热力学参数 $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S > 0$,可认为二者间的作用力主要为静电相互作

用。反应的自由能变 $\Delta G < 0$, 表明杆菌肽与 BSA 的相互作用是自发进行的。反应的 $\Delta H < 0$, 表明其为放热反应, 升高温度将不利于反应进行, 这与上述结论相符合, 即杆菌肽对 BSA 的猝灭机制为静态猝灭。

2.5 杆菌肽与 BSA 相互作用的三维荧光光谱

三维荧光光谱是以激发波长(x 轴)、发射波长(y 轴)、荧光强度(z 轴)为坐标的三维荧光矩阵光谱, 同时可用强度等高线代替三维图谱对被测组分进行直观描述。三维荧光光谱不仅具有测量灵敏、选择性高的优点, 且样品的荧光信息得以更全面的展现, 极有利于综合考查样品的组分分布、构型变化特征^[12]。三维荧光光谱可直观表明蛋白质分子中 Trp 残基的微环境变化, 从而推断蛋白质分子的构象变化。鄢远等首次将三维荧光光谱法用于测定溶液状态下蛋白质的构象, 结果表明该方法是研究蛋白质构象的有效方法^[13]。

在激发波长 270 ~ 400 nm、发射波长 270 ~ 400 nm 范围内进行三维荧光扫描, 得到 BSA 与杆菌肽-BSA 体系相应的强度等高线(图 3)。以峰的类型来看, 图 3-a、3-b 中均存在 2 条“铅笔”形纹线, 其共同特征为激发波长(λ_{ex})等同于发射波长(λ_{em}), 是典型的瑞利散射峰^[14]。图 3-a、3-b 中瑞利散射线左上方 $\lambda_{ex} = 300$ nm 处均存在“指纹”形纹线, λ_{em} 分别为 340、360 nm 左右。该“指纹”形纹线符合 $\lambda_{ex} < \lambda_{em}$ 的规律, 是荧光峰的典型特征^[14]。

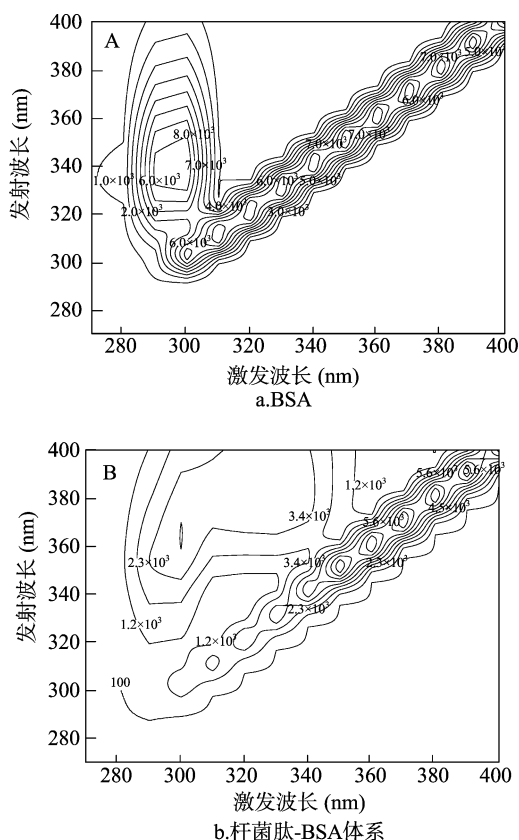


图3 BSA及杆菌肽-BSA体系的三维荧光光谱等高线
试验中BSA、杆菌肽的浓度分别为100、20 $\mu\text{mol/L}$

以峰的位置来看, 加入杆菌肽后 BSA 的瑞利散射峰起始位置、荧光峰位置均无显著变化。以峰的强度来看, 图 3-b 中“铅笔”“指纹”形纹线变得稀疏, “指纹”形纹线的变化趋

势尤为明显。可见, 加入杆菌肽后瑞利散射峰和荧光峰的相对强度均有不同程度的降低。

BSA 的空间结构由 3 个结构域组成, 每个结构域由 2 个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 几乎所有疏水性氨基酸残基均包埋在圆筒内部而构成疏水腔^[9]。杆菌肽分子与 BSA 的结合部位可能均处于这种疏水腔中, 由于杆菌肽与 BSA 发生反应生成一种新复合物, 从而导致疏水微环境极性的改变, 进而引起 BSA 构象的变化。三位荧光光谱结果验证了本试验结论, 即杆菌肽与 BSA 发生了相互作用, 荧光猝灭机制属于静态猝灭。

3 结论

利用荧光光谱法研究了杆菌肽与 BSA 的相互作用, 杆菌肽对 BSA 的内源荧光具有较强的猝灭作用, 原因是杆菌肽与 BSA 分子结合形成复合物。分别测定不同温度下杆菌肽与 BSA 的结合常数、结合位点、热力学参数, 结果表明杆菌肽对 BSA 的荧光猝灭机制为静态猝灭, 二者的结合主要基于静电作用, 约形成 1 个结合位点。三维荧光光谱研究表明, 杆菌肽与 BSA 的结合导致了蛋白质分子内部疏水微环境极性的改变, 进而导致 BSA 构象的变化。

参考文献:

- [1] 张玉明, 倪志华, 李宝库. 杆菌肽产生菌的分离鉴定及其发酵条件初步研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 153-157.
- [2] 王安萍, 曾建忠, 殷帅文, 等. 苦味酸与牛血清蛋白相互作用的光谱研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(23): 68-72.
- [3] 宋兰兰, 周瑞, 景浩. 基于 Stern-Volmer 与 Tachiya 模型分析牛血清白蛋白与花青素的相互作用[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 99-104.
- [4] 吴秋华, 周欣, 臧晓欢, 等. 白藜芦醇与人血清白蛋白相互作用的光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(1): 226-230.
- [5] 赵红辉, 韦庆益, 宁正祥, 等. 二氢杨梅素与胰蛋白酶相互作用特性的研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 53-55.
- [6] 杨媛媛, 王东跃, 郝国宏, 等. 白藜芦醇与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(6): 99-103.
- [7] 马贵斌, 高飞, 任斌知, 等. 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(12): 1193-1197.
- [8] Vaughan W M, Weber G. Oxygen quenching of pyrenebutyric acid fluorescence in water: a dynamic probe of the microenvironment[J]. Biochemistry, 1970, 9(3): 464-473.
- [9] 颜承农, 童金强, 熊丹, 等. 荧光光谱法研究培氟沙星与牛血清白蛋白结合反应特征[J]. 分析化学, 2006, 34(6): 796-800.
- [10] 任凤莲, 谭小艳, 杨春生, 等. 反白藜芦醇与牛血清白蛋白相互作用的多光谱法研究[J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 630-634.
- [11] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102.
- [12] 邹华, 周享春, 鲍翠. 食用色素苋菜红与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2015(5): 61-66.
- [13] 鄢远, 许金钩, 陈国珍. 三维荧光光谱法研究蛋白质溶液构象[J]. 中国科学: B辑 化学, 1997(1): 16-22.
- [14] 张国文, 王安萍, 蒋婷, 等. 荧光光谱法研究橙皮苷与牛血清白蛋白相互作用特征[J]. 分析实验室, 2008, 27(1): 1-4.