

五氯酚对牛血清白蛋白的荧光猝灭作用

于兵川^{1,2}, 吴洪特², 周培疆^{1*}, 南淑清¹, 陆光汉³, 宋丰³

(1. 武汉大学资源与环境科学学院, 武汉 430079; 2. 长江大学化学与环境工程学院, 荆州 434025; 3. 华中师范大学化学学院, 武汉 430072)

摘要:用荧光光谱和紫外吸收光谱法研究了五氯酚对牛血清白蛋白(BSA)的荧光猝灭作用. 结果表明, 五氯酚可以有规律地使BSA内源荧光猝灭, 其猝灭机理可认为是五氯酚与BSA形成复合物的静态猝灭; 并获得了不同温度下, 五氯酚与BSA作用的结合常数和热力学参数. 根据所得结果可推断五氯酚与BSA的作用力为疏水作用力和静电作用力. 同时由Forster非辐射能量转移理论计算得出了五氯酚与BSA结合位置的距离.

关键词:五氯酚; 牛血清白蛋白(BSA); 相互作用; 荧光猝灭

中图分类号:X131 **文献标识码:**A **文章编号:**0250-3301(2006)05-0977-04

Fluorescence Quench of Bovine Serum Albumin by Pentachlorophenol

YU Bing-chuan^{1,2}, WU Hong-te², ZHOU Pei-jiang¹, NAN Shu-qing¹, LU Guang-han³, SONG Feng³

(1. College of Resources and Environmental Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. College of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The interaction between pentachlorophenol and bovine serum albumin (BSA) were studied using fluorescence spectra and ultraviolet-visible light absorption spectra. The results show that the fluorescence of BSA was quenched regularly by the pentachlorophenol, the mechanism of the fluorescence quench was investigated. The binding constants and thermodynamic parameters of pentachlorophenol with BSA were obtained at different temperatures. The hydrophobic interaction force and electrostatic force played a main role in the binding of pentachlorophenol with BSA. The distances of binding site between pentachlorophenol and BSA were also obtained according to the theory of Forster's non-radiative energy transfer.

Key words: pentachlorophenol; bovine serum albumin(BSA); interaction; fluorescence quench

近年来,持久性有机污染物因其所具有的持久性、高毒性、生物蓄积性和半挥发性而倍受关注. 五氯酚(Pentachlorophenol, PCP)属1998年在泛欧环境部长会议上提出的16种需加以控制的持久性有机污染物之一^[1],曾作为除草剂、防腐剂 and 灭钉螺剂等而被广泛应用^[2, 3]. 美国环保署(EPA)早在1976年就将其列为优先控制污染物和潜在致癌物,我国环境检测总站在80年代末期也将其列入中国环境优先控制污染物“黑名单”^[4~6]. 近年来PCP虽已禁止生产和使用,但在环境中仍经常检测到PCP的残留^[4, 7]. 血清白蛋白是血液中含有最丰富的蛋白质,具有许多重要的生理功能,能和许多内源及外源性化学物质以各种方式结合,并携带着这些物质通过血液在体内进行转运、运输、分配和代谢^[8~10]. 环境化学污染物进入生物体后,一部分要和血清白蛋白结合,然后被转运到其它组织部位释放出来,产生危害. 对环境化学污染物与血清白蛋白相互作用研究对揭示环境化学污染物在体内蓄积、代谢和危害机理具有重要意义. 目前这方面研究主要集中在

重金属^[11, 12]及表面活性剂^[13, 14]与血清白蛋白的相互作用. 五氯酚与蛋白质相互作用的研究则鲜见报道. 本文在模拟生理条件下,用荧光光谱和紫外吸收光谱方法,研究了五氯酚与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)相互作用,获得了五氯酚与BSA相互作用的结合常数、结合热力学常数及结合位置等参数,这对于阐明五氯酚在生物体内的转运过程和危害机理具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

F-3010 荧光分光光度计(日本,日立公司),510型超级恒温器(上海实验仪器厂),UV-1601PC 紫外-可见分光光度计(日本,岛津公司),PHS-3C 精密pH计(上海精密科学仪器有限公司雷磁仪器厂).

五氯酚(上海青浦合成试剂厂),牛血清白蛋白

收稿日期:2005-05-29;修订日期:2005-07-06

基金项目:国家自然科学基金项目(20177018)

作者简介:于兵川(1964~),男,副教授,主要研究方向为环境化学污染物, E-mail: yubc@163.com

* 通讯联系人, E-mail: Zhoupi@whu.edu.cn

(BSA)(Amresco 公司), Tris(Amresco 公司), HCl, NaCl,所有化学试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水.

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

Tris,HCl 配成 $c_{\text{Tris}}=0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液;以 Tris-HCl 缓冲溶液配成 $c_{\text{NaCl}}=0.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 溶液;以 Tris-HCl 缓冲溶液配成 $c_{\text{BSA}}=1.0\times10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA 溶液;首先用无水乙醇配成 $c_{\text{PCP}}=0.001\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 五氯酚贮备液,使用时以 Tris-HCl 缓冲溶液将其稀释成 $c_{\text{PCP}}=1.0\times10^{-5}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 工作液.

1.2.2 荧光光谱测定

在 10mL 比色管中依次加入 2.0mL NaCl 溶液,2.0mL BSA 溶液和一定量的五氯酚溶液,以 Tris-HCl 缓冲溶液定容为 10mL,在激发波长为 284nm,激发和发射狭缝均为 5nm,扫描速率为 $120\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$,测定 300~500nm 荧光发射光谱.

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

蛋白质分子中含有色氨酸、酪氨酸残基,因而具有内源荧光.在五氯酚配制过程中,有乙醇进入体系,经过测定,进入体系的乙醇浓度对 BSA 荧光没有影响.本实验对 BSA 荧光光谱测定和对含不同浓度五氯酚体系荧光光谱测定均在相同 Cl^- 浓度 ($0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)下进行,实验过程中 Cl^- 不会对实验结果产生影响.固定 BSA 浓度,不同五氯酚浓度下体系荧光发射光谱变化示于图 1.从图 1 可以看出,不同浓度五氯酚的加入使 BSA 的荧光发生有规律的猝灭,而荧光最大发射峰位置未发生明显位移.

2.2 荧光猝灭机理

荧光猝灭过程可分为动态猝灭和静态猝灭^[8],若此过程为动态猝灭,则应符合 Stern-Volmer 方程^[15~17]:

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

式(1)中, F_0 为未加猝灭剂时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, $[Q]$ 为猝灭剂浓度, τ_0 为猝灭剂不存在时荧光分子平均寿命,对生物大分子来说,其 $\tau_0=10^{-8}\text{s}$, k_q 为动态荧光猝灭速率常数, K_{sv} 为 Stern-Volmer 动态猝灭常数,其中:

$$K_{sv} = k_q\tau_0 \quad (2)$$

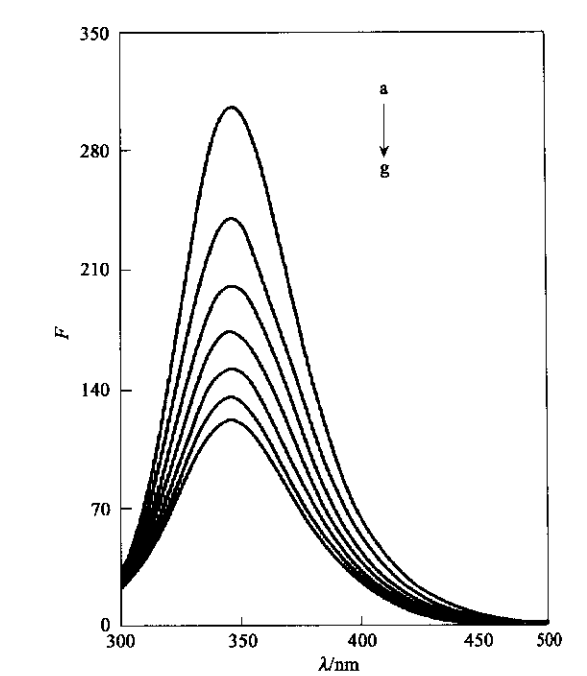
若此过程为静态猝灭,则应符合 Lineweaver-

Burk 方程^[15~17]:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K^{-1}F_0^{-1}[Q]^{-1} \quad (3)$$

式(3)中 K 为五氯酚与 BSA 结合常数.

根据不同温度下蛋白质荧光猝灭光谱,作出相应的 Stern-Volmer 和 Lineweaver-Burk 图,如图 2 和图 3 所示.



pH=7.40, $\lambda_{ex}=284\text{nm}$, $c_{\text{BSA}}=2.0\times10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, c_{PCP} (单位: $\times10^{-6}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (a→g): 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0

图 1 五氯酚对 BSA 荧光的影响
Fig.1 Effect of PCP on fluorescence spectra of BSA

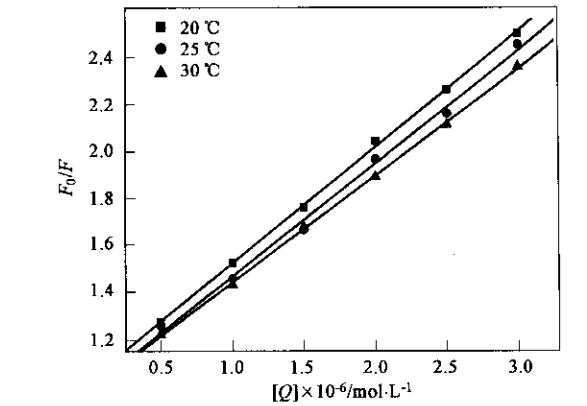


图 2 五氯酚对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图
Fig.2 Stern-Volmer figure of PCP on fluorescence quenching of BSA

由图 2 和图 3 可看出, F_0/F 与 $[Q]$ 及 $(F_0 - F)^{-1}$ 与 $[Q]^{-1}$ 线性关系良好.由图 2、图 3 及式(1), (2), (3)可分别得出不同温度下五氯酚与 BSA 相互

作用的 K_{sv} , k_q 和 K 值列于表 1.

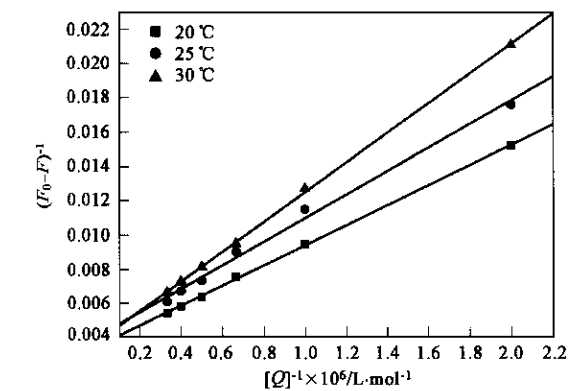


图 3 五氯酚对 BSA 荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 图
Fig.3 Lineweaver-Burk figure of PCP on fluorescence quenching of BSA

表 1 不同温度下五氯酚与 BSA 相互作用常数					
Table 1 Interaction constants of PCP to BSA at different temperatures					
$t/^{\circ}\text{C}$	$K_{sv}/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$k_q/\text{L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{s})^{-1}$	$R(\text{Stern-Volmer})$	$K/\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$	$R(\text{Lineweaver-Burk})$
20	4.94×10^5	4.94×10^{13}	0.999 6	6.02×10^5	0.999 8
25	4.80×10^5	4.80×10^{13}	0.997 7	5.96×10^5	0.996 8
30	4.54×10^5	4.54×10^{13}	0.999 8	4.39×10^5	0.999 8

猝灭.从表 1 中数据可看出,五氯酚和血清白蛋白的结合常数较大,说明五氯酚可以由血清白蛋白携带着在体内进行转运、贮存和分配.

2.3 五氯酚与 BSA 相互作用

2.3.1 五氯酚与 BSA 相互作用力

小分子和生物大分子之间作用力主要有氢键、范德华力、静电作用力和疏水作用力等.如果温度变化不大,反应焓变 ΔH 可视为常数,通过(4)~(6)式可分别计算出反应焓变 ΔH ,吉布斯自由能变 ΔG 和熵变 ΔS .

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H (1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (4)$$
$$\Delta G = -RT \ln K \quad (5)$$
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

将表 1 中有关数据代入式(4)、(5)和(6),计算出五氯酚与 BSA 相互作用热力学参数列于表 2. $\Delta H<0$, $\Delta S>0$,五氯酚与 BSA 的结合是一个放热反应,伴随着正的 ΔS 值,因此,此结合过程是由熵控制的.在水溶液中,小分子化合物与低介电性大分子内部结合过程中, $\Delta S>0$ 是两者以疏水作用力结合的主要热力学特征,同时, $\Delta H<0$, $\Delta S>0$ 也是水溶液中各种离子间以静电作用力相互作用的热力学特征^[9,18,19].在实验条件下(pH7.40),PCP 有一定程度的离解^[20],因此,五氯酚与 BSA 之间主要由疏

在动态猝灭过程中,温度升高有利于荧光体和猝灭剂分子间的有效碰撞,从而使猝灭速率加快, k_q 或 K_{sv} 增大(Stern-Volmer 直线斜率增大),且最大散射碰撞猝灭速率常数为 $2.0\times10^{10} \text{ L}\cdot(\text{mol}\cdot\text{s})^{-1}$.而对于静态猝灭,是由于荧光体和猝灭剂之间发生了非辐射能量转移,二者形成了复合物而引起.温度升高,将使复合物稳定性下降, K 值减小(Lineweaver-Burk 直线斜率增大).

由图 2、图 3 和表 1 可看出,随温度升高, Stern-Volmer 直线斜率减小, k_q 和 K_{sv} 值减小,而 Lineweaver-Burk 直线斜率增大, K 值减小,且荧光猝灭速率常数 k_q 值远大于最大散射碰撞猝灭速率常数,表明五氯酚对 BSA 的荧光猝灭不是由于动态碰撞所引起,而是由于形成了复合物而引起的静态

水作用力和静电作用力相结合.

表 2 五氯酚与 BSA 相互作用热力学参数			
Table 2 Thermodynamic parameters of the interaction of PCP with BSA			
$t/^{\circ}\text{C}$	ΔH / $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	ΔS / $\text{J}\cdot(\text{mol}\cdot\text{K})^{-1}$	ΔG / $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
20	-17.74	50.11	-32.43
25		51.05	-32.96
30		49.51	-32.75

2.3.2 五氯酚与 BSA 结合位置

五氯酚紫外吸收光谱与 BSA 荧光发射光谱的重叠光谱示于图 4.从图 4 可看出,五氯酚紫外吸收光谱与 BSA 荧光发射光谱有较大程度重叠.根据

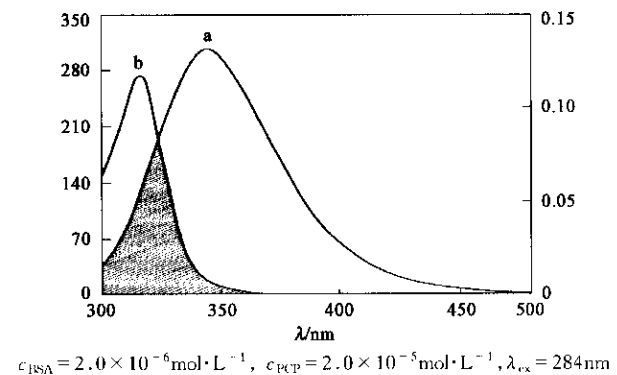


图 4 BSA 荧光光谱(a)与 PCP 紫外吸收光谱(b)重叠图
Fig.4 Overlap of the fluorescence spectrum of BSA (a) with the UV absorptionspectrum of PCP (b)

Forster 非辐射能量转移理论^[16,21,22],当满足以下条件时,2 种化合物分子之间将会发生非辐射能量转移. 供能体能够产生荧光;供能体的荧光发射光谱与受能体吸收光谱有较大重叠;供能体与受能体的距离很近,不超过 7nm. 能量转移效率不仅与给体-受体间距离有关,而且与其临界能量转移距离有关. 给体-受体间能量转移效率 E 可由式(7)计算:

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (7)$$

式(7)中 R_0 为转移效率为 50% 时的临界距离, r 为给体-受体间距离.

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} k^2 n^{-4} \phi J \quad (8)$$

式(8)中 k^2 为偶极空间取向因子, n 为介质折射指数, ϕ 为给体荧光量子产率, J 为给体荧光发射光谱与受体吸收光谱的重叠积分.

$$J = \frac{\sum (F_\lambda \cdot \epsilon_\lambda \cdot \lambda^4 \cdot \Delta\lambda)}{\sum (F_\lambda \cdot \Delta\lambda)} \quad (9)$$

式(9)中 F_λ 是给体在波长 λ 处的荧光强度, ϵ_λ 是受体在波长 λ 处的摩尔吸光系数. 能量转移效率 E 可由式(10)计算得到:

$$E = 1 - F/F_0 \quad (10)$$

因此,只要得到 E 、 k^2 和 n ,并通过实测光谱积分求出 J ,就可计算得出 R_0 和 r . BSA 的内源荧光主要由色氨酸残基产生,在实验条件下, $k^2 = 2/3$, $\phi = 0.15$, $n = 1.336$ ^[6,11],通过式(10)可求出 E ,将图 4 光谱重叠部分(阴影部分)分割成极小矩形按式(9)积分可得 $J = 8.896 \times 10^{-17} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$,将以上值分别代入式(7)、(8),即可得出 $R_0 = 1.16 \text{ nm}$, $r = 1.15 \text{ nm}$. 从计算结果可看出, R_0 和 r 皆小于 7nm,说明五氯酚与 BSA 作用过程中发生了非辐射能量转移,两者形成了复合物. 同时也进一步说明五氯酚对 BSA 的荧光猝灭属静态猝灭机理^[21,22].

3 结论

五氯酚可以和 BSA 结合使 BSA 内源荧光发生有规律的猝灭,猝灭机理为静态猝灭,作用过程中两者发生了非辐射能量转移,形成了复合物,结合常数较大,说明血清白蛋白可以携带五氯酚在体内进行转运、贮存和分配,五氯酚与 BSA 之间主要由疏水作用力和静电作用力相结合. 对五氯酚与 BSA 结合的其它相关化学表征研究工作将进一步深入进行.

参考文献:

[1] 史雅娟,吕永龙,任鸿昌,等. 持久性有机污染物研究的国际发展动态[J]. 世界科技研究与发展, 2003, 25(2): 73~78.

[2] Pallerla S, Chambers R P. Reactor development for biodegradation of pentachlorophenol [J]. Catalysis Today, 1998, 40: 103~111.

[3] Orser C S, Large C C. Molecular analysis of pentachlorophenol degradation[J]. Biodegradation, 1994, 5: 277~288.

[4] 张宗炳. 杀虫剂的分子毒理学[M]. 北京: 农业出版社, 1987. 122.

[5] 迟杰, 黄国兰, 杨彬. 五氯酚在表面微层水与表层水间的分配行为[J]. 环境科学, 1999, 20(6): 18~21.

[6] 戴友芝, 施汉昌, 冀静平, 等. 含五氯酚废水的生物降解性和微生物毒性试验[J]. 环境科学, 2000, 21(2): 40~45.

[7] 张兵, 郑明辉, 刘芑岩, 等. 五氯酚在洞庭湖环境介质中的分布[J]. 中国环境科学, 2001, 21(2): 165~167.

[8] 张晓威, 赵凤林, 李克安. 环丙沙星与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 高等学校化学学报, 1999, 20(7): 1063~1067.

[9] Liu J Q, Tian J N, Tian X, et al. Interaction of isofraxidin with human serum albumin [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12: 469~474.

[10] Guillaume Y C, Guinchard C, Berthelot A. Affinity chromatography study of magnesium and calcium binding to human serum albumin: pH and temperature variations[J]. Talanta, 2000, 53: 561~569.

[11] Qu S S, Liu Y, Wang T Z, et al. Thermodynamiss of binding of cadmium to bovine serum albumin[J]. Chemosphere, 2002, 46: 1211~1214.

[12] Shen X C, Liang H, Guo J H, et al. Studies on the interaction between Ag^+ and human serum albumin [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2003, 95: 124~130.

[13] Gelamo E L, Tabak M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2000, 56: 2255~2271.

[14] Kelley D, McClements D J. Interactions of bovine serum albumin with ionic surfactants in aqueous solutions[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17: 73~85.

[15] Jiang C Q, Gao M X, Meng X Z. Study of the interaction between daunorubicin and human serum albumin and the determination of daunorubicin in blood serum samples[J]. Spectrochimica Acta Part A, 2003, 59: 1605~1610.

[16] 朱铿, 童沈阳. 吡啶酸, 氟脲酸与 HSA, IgG 相互作用的研究[J]. 化学学报, 1997, 55: 405~410.

[17] Jiang C Q, Gao M X, He H X. Study of the interaction between terazosin and serum albumin synchronous fluorescence determination of terazosin[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 452: 185~189.

[18] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reaction: forces contribution to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20: 3096~3102.

[19] Liu J Q, Tian J N, He J P, et al. Spectrofluorimetric study of the binding of daphnetin to bovine serum albumin[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 35: 671~677.

[20] Ken K C Tse, Shang-Lien Lo. Desorption kinetic of PCP-contaminated soil: effect of temperature[J]. Water Research, 2002, 36: 284~290.

[21] Cui F L, Fan J, Li J P, et al. Interactions between 1-benzoyl-4-p-chlorophenyl thiosemicarbazide and serum albumin: investigation by fluorescence spectroscopy [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2004, 12: 151~157.

[22] Jiang M, Xie M X, Zheng D, et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin [J]. Journal of Molecular Structure, 2004, 692: 71~80.