

光谱法研究十二烷基苯磺酸钠与牛血清白蛋白的相互作用

王 欢, 王晓玲

(咸阳师范学院 化学与化工学院 陕西 咸阳 712000)

摘要:在 pH = 7.40 的 Tris - HCl 缓冲溶液体系中, 通过荧光光谱法研究了十二烷基苯磺酸钠与牛血清白蛋白的相互作用。运用 Stern - Volmer 方程和 Lineweaver - Burk 方程计算了其相互间的猝灭常数、结合常数及结合位点数, 在 298、308 和 318 K 时的表观结合常数分别为 0.410 8、0.360 5 和 0.048 98 L · μmol⁻¹, 其相应的结合位点数分别为 1.044、1.041 和 0.902 6, 利用热力学参数确定了分子间的作用过程是自发的, 作用力主要是静电作用力。同步荧光光谱表明相互作用对蛋白质构象影响不大。

关键词:十二烷基苯磺酸钠; 牛血清白蛋白; 相互作用; 荧光光谱

中图分类号: TQ423.11 文献标识码: A 文章编号: 1001 - 1803(2012)01 - 0006 - 04

Study of mutual action between bovine serum albumin and sodium dodecyl benzene sulfonate by spectrometry

WANG Huan, WANG Xiao - ling

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xianyang Normal University, Xianyang, Shaanxi 712000, China)

Abstract: Mutual action between sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) and bovine serum albumin (BSA) was investigated via fluorescence spectroscopy in a buffer solution composed of H₂NC(CH₂OH)₃ · HCl at pH = 7.40. Their mutual quenching constants (K_q), apparent binding constants (K_A) and binding site values (n) were calculated by using Stern - Volmer Equation and Lineweaver - Burk Equation. The apparent binding constants between SDBS and BSA at temperature of 298, 308 and 318 K were obtained as 0.410 8, 0.360 5 and 0.048 98 L · μmol⁻¹ respectively; and the corresponding binding site values were 1.044, 1.041 and 0.902 6 respectively. Analysis of thermodynamic parameters showed that the action process between the molecules is carried out spontaneously; and the action was caused by electrostatic force. Synchronous fluorescence spectra showed that the mutual action has no effect on the conformation of the protein molecules.

Key words: sodium dodecyl benzene sulfonate; bovine serum albumin; mutual action; fluorescence spectrum

十二烷基苯磺酸钠(SDBS)生产成本低、性能好,是家用洗涤剂用量最大的合成表面活性剂^[1]。牛血清白蛋白(BSA)是牛血清中的主要蛋白质,其含量约占牛血清蛋白总量的一半,在血液中参与维持渗透压及物质运输,性质比较稳定,来源丰富,在分子生物学和细胞生物学方面有广泛的应用,可以同许多内源性和外源性的化合物结合,起到存储与转运作用^[2]。关

于表面活性剂与牛血清白蛋白等一些生物分子间相互作用的研究与探讨一直是研究的热点,但SDBS与BSA相互作用的报道还不多^[3-7],对二者之间相互作用的机制还缺少合理的解释。作者采用荧光光谱法研究了SDBS与BSA之间的相互作用,计算结合常数及结合位点数,并用同步荧光光谱技术考察了BSA构象的变化,以期为以后的实验提供一些参考。

收稿日期:2011-10-18; 修回日期:2011-12-03

作者简介:王欢(1982-),女,陕西咸阳市人,讲师,硕士,电话:18292914139, E-mail: xinyi32003@yahoo.com.cn.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白 (Roche10735078001, BSA, 相对分子质量为 68 000), 由西安国安生物科技有限公司提供; 十二烷基苯磺酸钠 (SDBS), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris), 分析纯, 阿拉丁试剂公司; 盐酸, 分析纯, 天津市红岩化学试剂厂; 实验用水均为二次蒸馏水。

RF-5301PC 型荧光光谱仪, 日本岛津公司; SPECORD 50 型紫外可见分光光度计, 德国耶拿公司; PB-10 型普及型 pH 仪, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; DK-91-1 型电热恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 实验方法

向几支 10 mL 比色管中加入 1.00 mL $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液和 2.00 mL $\text{pH} = 7.40$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液, 再依次加入不同体积的 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SDBS 溶液, 用二次蒸馏水定容至刻度, 摇匀。在 298, 308 和 318 K 恒温 0.5 h 后, 固定荧光激发波长为 285 nm, 狭缝宽度为 3 nm, 测定荧光强度 (F), 绘制 300 ~ 450 nm 的荧光猝灭光谱图。固定荧光激发与发射的波长差为 20 和 60 nm, 进行同步荧光光谱扫描并绘制同步荧光光谱图。

2 结果与讨论

2.1 荧光猝灭作用

BSA 本身的色氨酸残基和酪氨酸残基在波长 340 nm 处会产生内源荧光, 而 SDBS 没有荧光产生。作者测定了 SDBS 对 BSA 的荧光猝灭光谱, 实验结果见图 1。由图 1 可知, BSA 的浓度为 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

时, 随着 SDBS 的浓度增大, BSA 的荧光强度逐渐降低, 这表明 SDBS 对 BSA 有明显的猝灭作用。

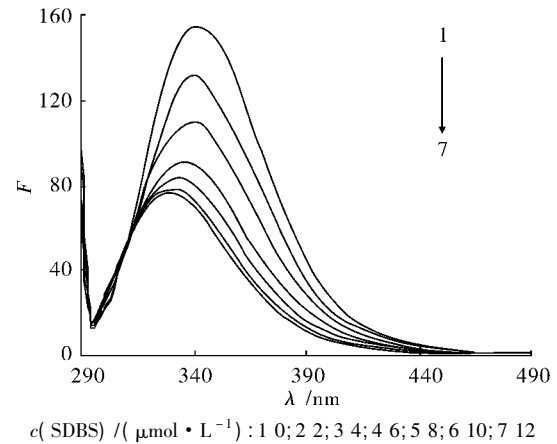


图 1 SDBS 对 BSA 的荧光猝灭光谱图

Fig. 1 Fluorescence quenching spectra

一般情况下, 荧光猝灭有动态猝灭、静态猝灭和非能量转移等。动态猝灭是猝灭剂和荧光物质激发态分子之间的相互作用过程, 静态猝灭是猝灭剂和荧光物质基态分子发生作用导致荧光猝灭的过程^[8]。在不同温度下, 测得不同浓度下的 SDBS 对 BSA 的荧光猝灭光谱。假设 SDBS 对 BSA 的荧光猝灭归因于分子碰撞引起的动态猝灭, 则按 Stern-Volmer 方程 $F_0/F = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_{sv} \cdot [Q]$ 进行拟合。式中 F 和 F_0 分别为存在和不存在能量受体时能量给予体的荧光发射强度; K_q 为双分子表观猝灭常数; τ_0 为不存在猝灭剂时 BSA 荧光体的荧光寿命, 生物大分子的荧光寿命^[9] 约为 $1.0 \times 10^{-8} \text{ s}$; $[Q]$ 为猝灭剂浓度; K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数。以 F_0/F 对 $c(\text{SDBS})$ 作图, 由直线斜率 (K_{sv}) 和 τ_0 算出 298, 308 和 318 K 时的 K_q 结果见表 1。表 1 结果表明, Stern-Volmer 方程呈良好线性关系。由于各类猝灭剂对生物大分子的 K_q 约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[10], 表 1 中 K_q 值远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 且 K_{sv} 随温度的升高而减小, 表明 SDBS 对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭。

表 1 不同温度下的猝灭常数

Tab. 1 Quenching constants at different temperatures

T/K	线性方程	相关系数 R	$K_{sv} / (\text{L} \cdot \mu\text{mol}^{-1})$	$K_q / (\text{L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
298	$F_0/F = 0.9868 + 0.2372c(\text{SDBS})$	0.9994	0.2372	2.372×10^7
308	$F_0/F = 1.0154 + 0.2099c(\text{SDBS})$	0.9968	0.2099	2.099×10^7
318	$F_0/F = 1.0439 + 0.1517c(\text{SDBS})$	0.9994	0.1517	1.517×10^7

依据 Lineweaver-Burk 双倒数曲线方程 ($F_0 - F$)⁻¹ = $F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} \cdot F_0^{-1} \cdot [Q]^{-1}$, 以 ($F_0 - F$)⁻¹ 对 $c(\text{SDBS})^{-1}$ 作出 298, 308 和 318 K 时的双倒数函数关

系图, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 不同温度下的双倒数方程呈良好的线性关系。通过计算得到 298, 308 和 318 K 时的静态猝灭常数 K_{LB} 分别为 0.1993,

0.164 8和 0.223 0 L · μmol⁻¹。数据表明 ,SDBS 对 BSA 的结合常数较大 ,说明二者间有较强的结合力。

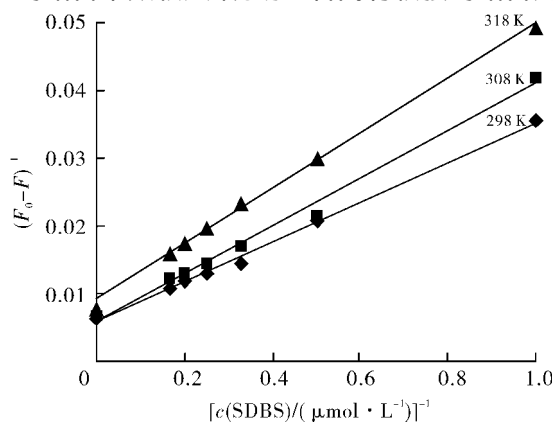


图 2 不同浓度的 SDBS 对 BSA 的 Lineweaver - Burk 双倒数曲线

Fig. 2 Plot of Lineweaver - Burk Equation showing the relation of $(F_0 - F)^{-1}$ of BSA vs. $c(\text{SDBS})^{-1}$

2.2 结合常数和结合位点数的计算

小分子与 BSA 之间的相互作用可以采用位点结合模型来描述 ,公式为 $\lg [(F_0 - F) / F] = \lg K_A + n \cdot \lg c(\text{SDBS})$ 。式中 K_A 为表观结合常数; n 为结合位点数。以 $\lg [(F_0 - F) / F]$ 对 $\lg c(\text{SDBS})$ 作图(图 3) ,由直线截距及斜率可计算出 SDBS 与 BSA 的表观结合常数及相应的结合位点数。

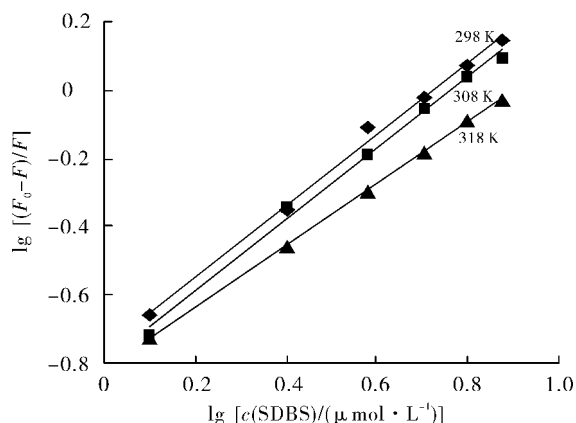


图 3 基于荧光猝灭的 SDBS 对 BSA 的双对数曲线图

Fig. 3 Double - logarithm relation of $\lg [(F_0 - F) / F]$ vs. $\lg c(\text{SDBS})$

由图 3 可见 $\lg [(F_0 - F) / F]$ 对 $\lg c(\text{SDBS})$ 曲线的线性关系良好; 298 ,308 和 318 K 时的 K_A 分别为 0.410 8 ,0.360 5 和 0.048 98 L · μmol⁻¹; n 分别为 1.044 ,1.041 和 0.902 6。由 K_A 和 n 值可看出 ,SDBS 与 BSA 存在相互作用 ,且两者之间只存在一个结合部位 ,结合位点数为 1。BSA 的序列分析认为 1 分子 BSA 含 19 个酪氨酸和 2 个色氨酸^[11] ,酪氨酸的荧光主要通过能量转移给色氨酸而发出; 2 个色氨酸分别

位于 134 位和 212 位 ,134 位色氨酸因处于亲水环境中发生了荧光猝灭 ,因此 BSA 的内源荧光主要来自 212 位的色氨酸 ,即 1 分子的 SDBS 结合到 BSA 的 212 位色氨酸上。

2.3 热力学分析

小分子和生物大分子的相互作用力主要有氢键作用力、范德华作用力、静电作用力和疏水作用力几种类型。 $\Delta H > 0$ 且 $\Delta S > 0$ 时 ,主要是疏水作用; $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S < 0$ 时 ,主要是范德华作用和氢键作用; $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S > 0$ 时则是静电作用^[12]。当温度变化不大时 ,焓变可以看作是一个常数 ,根据下列方程可以计算出自由能变、反应焓变和熵变。

$$\Delta G = -RT \ln K_A \quad (1)$$

$$\ln (K_{A2} / K_{A1}) = \Delta H (1/T_1 - 1/T_2) / R \quad (2)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

式中 R 为气体状态常数; T 为热力学温度; K_{A1} 和 K_{A2} 是在不同温度下的表观结合常数。由上 3 式计算出来的热力学参数数据见表 2。

表 2 作用过程中相关热力学参数
Tab. 2 Thermodynamic parameters in action process

T /K	ΔH /(kJ · mol ⁻¹)	ΔS /(J · K ⁻¹ · mol ⁻¹)	ΔG /(kJ · mol ⁻¹)
298	-9.962	74.05	-32.03
308		74.02	-32.76

从表 2 中可以看出 ,体系的 $\Delta G < 0$,说明反应过程是自发进行的; $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S > 0$ 则表明 SDBS 与 BSA 间的结合力主要是静电作用力。

2.4 SDBS 对 BSA 构象的影响

为了证实 SDBS 与 BSA 之间的相互作用以及带来的结构上的改变 ,考察了不同浓度的 SDBS 对 1.0 μmol · L⁻¹ BSA 的同步荧光光谱的影响。由于发光基团为 BSA 的色氨酸残基和酪氨酸残基 , $\Delta\lambda = 20$ nm 只表现出酪氨酸残基的荧光 ,而 $\Delta\lambda = 60$ nm 只表现出色氨酸残基的荧光^[13-14]。因为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以判断残基所处环境的变化 ,从而判断蛋白质构象的变化。图 4 为 SDBS 对 BSA 的同步荧光光谱。由图 4 可知 ,酪氨酸残基和色氨酸残基的最大发射波长随 SDBS 浓度的增加基本上没有改变 ,说明 SDBS 的加入对 BSA 构象的影响不大 ,色氨酸残基荧光猝灭程度比酪氨酸残基更显著 ,说明结合位点更接近于色氨酸残基。

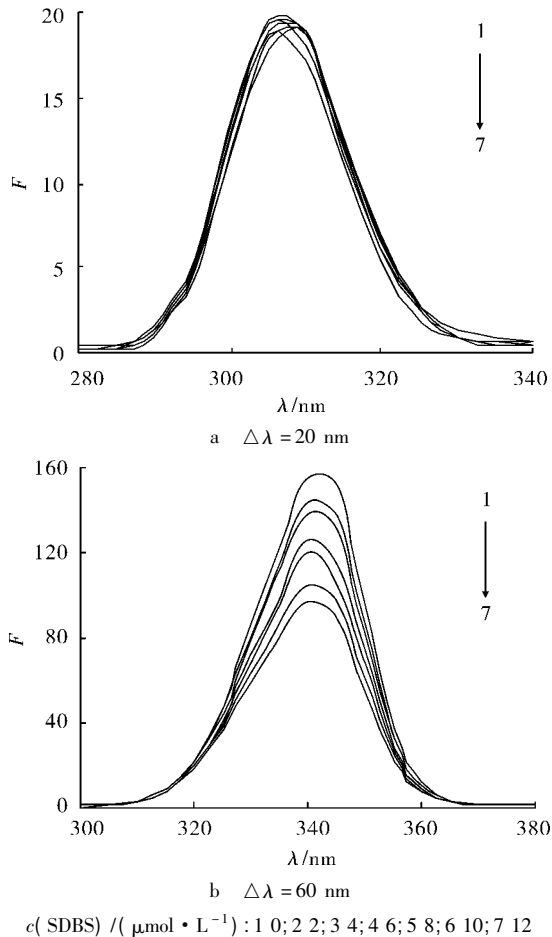


图4 同步荧光光谱图

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra

3 结论

在 SDBS 存在时,BSA 荧光光谱发生了明显的猝灭。猝灭常数 K_{sv} 随温度升高而减小,说明该体系的猝灭过程是由于分子间彼此结合形成了具有一定结构的化合物所引起的静态猝灭。由计算得到的相关热力学参数可判断 SDBS 和 BSA 主要通过静电作用力结合。

从所得结合常数看,SDBS 与 BSA 的结合常数较大,且结合反应的吉布斯自由能小于 0,说明 SDBS 能自发的与 BSA 结合,它们的结合服从位点结合模型。同步荧光光谱表明 SDBS 的加入对 BSA 构象的影响不大。

参考文献:

- [1] 王世荣,李祥高,刘东志,等.表面活性剂化学[M].2版.北京:化学工业出版社,2010:73-74.
- [2] 陶慰孙,李惟,姜涌明,等.蛋白质分子基础[M].北京:高等教育出版社,1987:227-231.
- [3] 胡梦瑶,彭毛,吴辉,等.荧光法研究表面活性剂 CTAB 与蛋白质的相互作用[J].生物化学学报,2008,19(5):23-27.
- [4] 邵爽,胡晓环,游金宗,等.N-烷基-N,N-二(2-羟乙基)-N-甲基溴化铵与牛血清白蛋白的相互作用[J].物理化学学报,2010,26(11):2997-3001.
- [5] 王守业,徐小龙,刘清亮,等.荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J].化学进展,2001,13(14):257-259.
- [6] 盛良全,闫向阳,徐华杰,等.烟碱与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究[J].光谱学与光谱分析,2007,27(2):306-308.
- [7] 李改仙,李建晴,魏玉霞,等.四碘荧光素与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J].光谱学与光谱分析,2005,25(8):1277-1280.
- [8] 陈国珍.荧光分析法[M].北京:科学出版社,1990:122.
- [9] LAKOWICZ J R,WEBER G. Quenching of fluorescence by oxygen: A probe for structural fluctuations in macromolecules[J]. Biochemistry, 1973,12:4161-4170.
- [10] 杨频,高飞.生物无机化学原理[M].北京:科学出版社,2002:59.
- [11] 潘祖亭,马勇,王巍.荧光光谱法研究克伦特罗与蛋白质的结合作用[J].分析实验室,2004,23(1):5-8.
- [12] ROSS D P,SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability[J]. Biochemistry,1981,20:3096-3099.
- [13] MILLER J M, AHAMAD T A, FELLA F. Derivative fluorescence spectroscopy[J]. Anal Proc,1982,19(1):37-41.
- [14] MILLER J N. Recent advances in molecular luminescence analysis[J]. Proc Anal Div Chem Soc,1979,16:203-208.

正确认识功效型牙膏

社会的发展引领人们口腔保健意识的增强。在现代人的日常生活中,一种“全方位保护口腔健康”的理念正贯穿于具体的生活细节。一直以来,很多消费者对日常生活中天天要使用的牙膏存有种种疑问,尤其是近年来,如何选用功效型牙膏,成为消费者一个似懂非懂的热门话题。

到底什么是功效型牙膏呢?在国家发改委颁布的《功效型牙膏标准》中,功效型牙膏的定义为:除具有牙膏基本功能外,兼有预防或减轻某些口腔问题、促进口腔健康的牙膏为功效型牙膏;针对改善口腔问题,主要包括但不限于:防龋、抑制牙菌斑、抗菌、抗本质敏感、减轻牙龈有关问题、消除或减轻口臭、除渍增白、抗牙结石等。功效型牙膏在普通牙膏的基础上,添加了某些特殊成分,在减轻和缓解口腔问题和健康口腔等方面,具有明显的功效。

消费者在选用功效型牙膏辅助预防口腔疾病的时候,值得注意的是,功效型牙膏不是药物,对于较为严重的口腔疾病,应当去正规的专科医院接受治疗。当然,在治疗期间可继续使用功效型牙膏作为辅助治疗。