

光谱法研究呋苄西林钠与牛血清白蛋白的作用

杨朝霞^{a b} 张友玉^{a*} 杨 琴^a 姚守拙^a

(^a湖南师范大学化学化工学院, 化学生物学及中药分析省部共建教育部重点实验室 长沙 410081;

^b吉首大学化学化工学院 吉首)

摘 要 采用紫外、荧光、红外光谱法研究了磷酸缓冲液中呋苄西林钠(FBS)与牛血清蛋白(BSA)的相互作用。结果表明, FBS与 BSA有较强的相互作用, FBS对 BSA内源荧光有猝灭作用, 静态猝灭是引起 BSA荧光猝灭的主要原因。按照 Stern-Volmer方程和双对数方程分析处理实验数据, 得到了不同温度下 FBS与 BSA反应的结合常数和结合位点数, 常温(26℃)下, 分别为 1.04×10^5 和 1.09。实验结果还表明, FBS与 BSA之间的相互作用影响了 BSA的二级结构, 使其构象发生变化。

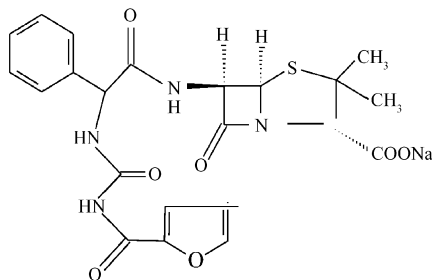
关键词 紫外光谱, 荧光光谱, 红外光谱, 荧光猝灭, 呋苄西林钠, 牛血清白蛋白

中图分类号: O614

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2007)08-0858-05

呋苄西林钠(Furbenicillin Sodium, FBS)又名呋布西林钠(其结构如下), 是酰胺类半合成广谱青霉素, 与大肠杆菌和绿脓杆菌有较强的作用, 对大肠杆菌的青霉素结合蛋白(penicillin-binding protein, PBP) PBP₂和 PBP₃有高度亲和力, 对绿脓杆菌的 PBP₁和 PBP₂, PBP₃的亲和力优于哌拉西林, 对 PBP₂, PBP₃的亲和力超过了第三代头孢哌酮, 对绿脓杆菌具有高度活性, 外膜穿透力强, 是最有应用价值的抗绿脓杆菌的抗生素^[1]。为探索呋苄西林与蛋白质分子的作用机理, 本文应用紫外光谱(UV-Vis)、分子荧光光谱和 FTIR-ATR光谱研究其与牛血清白蛋白(BSA)的作用机理以及对蛋白质的二级结构的影响。



1 实验部分

1.1 仪器和试剂

TU-1221型紫外-可见分光光度计(北京普析通用公司); F-4500型荧光分光光度计(日本日立); Nexus670型傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet Instrument Co., Madison, WI), 配以衰减全反射附件(ATR 45°入射角, ZnSe晶片), 氘代硫酸三甘肽(DTGS)检测器; OMNIC 5.1数据处理软件, 谱峰拟合使用GRAMS/A软件(Galactic Industry Inc., Salem, NH)。

将呋苄西林钠(FBS)配制成 1.08×10^{-4} mol/L水溶液作为储备液; 牛血清蛋白(Sigma美国)纯度>99%, 分子量 68 000 加二次蒸馏水配制成 3.94×10^{-4} mol/L储备溶液, 置于 1~4℃冰箱保存, 用于紫外和荧光测定。红外测试的溶液另行配制。试验用 PH=7.3的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液(1.914 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和 0.1816 g KH_2PO_4 加水至 100 mL)。

1.2 实验方法

1.2.1 紫外光谱测定 移取 1 mL 1.08×10^{-4} mol/L呋苄西林钠或 BSA溶液于 10 mL容量瓶中, 加入 2 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液, 以二次蒸馏水稀释至刻度, 同浓度的缓冲液为参比, 用紫外分光光度计测量吸光度。波长扫描范围 500~200 nm, 中速扫描。

1.2.2 荧光光谱测定 分别移取 1 mL BSA(3.94×10^{-4} mol/L)溶液于系列 10 mL容量瓶中, 依次加入

2006-10-20收稿, 2007-02-15 修回

国家自然科学基金(20335020, 20675030)和教育部重点课题以及湖南省教育厅重点项目(207076, 06A035)资助

通讯联系人: 张友玉, 女, 博士, 教授; E-mail: zhangyy@hnu.edu.cn 研究方向: 光谱电化学与电分析化学

系列间隔 0.5 mL 的 1.08×10^{-4} mol/L 呋苄西林钠溶液及 2 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (PH=7.3), 以二次蒸馏水稀释至刻度, 测量荧光强度。同时, 测定无呋苄西林钠的空白溶液的荧光强度。 $\lambda_{\text{ex}}=279\text{ nm}$; 激发和发射狭缝宽度分别为 5.0 和 2.5 nm; 扫描速度为 1200 nm/min。

1.2.3 红外光谱测定 分别移取 2 mL $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液于 2 个 10 mL 容量瓶中, 其中 1 份加 1 mL FBS 溶液 (7.5×10^{-4} mol/L), 以二次蒸馏水稀释至刻度得 FBS 溶液和缓冲液。以缓冲液为空白, 收集 BSA (7.5×10^{-5} mol/L) 的红外光谱, 以上述 FBS 溶液为空白, 收集同浓度的 BSA 和 FBS 混合体系的红外光谱图。红外测试 4 cm^{-1} 分辨率, 扫描 256 次。蛋白质溶液的谱图差减不含蛋白质的缓冲溶液谱图, 以谱图在 $1800 \sim 2200\text{ cm}^{-1}$ 呈一条平滑直线为差减终点判据。差减后得到的蛋白质红外光谱图在谱带范围内 (酰胺 I 带 $1700 \sim 1600\text{ cm}^{-1}$) 进行 2 点基线校正。采用 7 点 Savitsk-Gol 函数平滑后, 做二阶导数和付立叶去卷积, 估计出各子峰的峰位和半峰宽。手动选定各子峰的峰位和半峰宽, 采用 Gauss 函数对谱图进行多次拟合使残差最小, 重叠在一起的不同谱带完全分离开。确定各子峰与不同二级结构的对应关系后根据其积分面积计算各种二级结构所占的相对百分含量^[3,4]。

2 结果与讨论

2.1 FBS 对 BSA UV 吸收光谱的影响

BSA、FBS、FBS-BSA (1:1) 复合体系的紫外吸收光谱如图 1 所示。图中曲线 a 为 FBS 和 BSA 的吸收光谱加合, 曲线 b 为 FBS-BSA 复合体系的吸收光谱。从图中可以看出, FBS-BSA 复合体系与单独 FBS、BSA 的吸收光谱加合相比, 发生了减色效应。吸收光谱的变化表明, FBS 和 BSA 发生了作用。

2.2 FBS 与 BSA 相互作用的荧光光谱研究

由于蛋白质中含有色氨酸、酪氨酸残基, 因此, 蛋白质具有内源荧光 (BSA $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}=279/349\text{ nm}$)。由图 2 可以看出, 随着 FBS 浓度增加, BSA 的内源荧光强度有规律地降低, 且发射峰峰位和峰形不变, 说明 FBS 对 BSA 的内源荧光有猝灭作用。

猝灭剂对荧光物质的猝灭机理通常可分为动态猝灭和静态猝灭, 动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子间的能量转移或电子转移过程, 静态猝灭则是由于与猝灭剂发生配合作用, 产生了不发荧光的配合物。荧光猝灭符合 Stern-Volmer 方程^[1]:

$$F_0/F = 1 + Kc$$
 (1)

式中, F_0 为无猝灭剂时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, K 为猝灭常数, c 为猝灭剂浓度。本文对不同温度下 BSA 相对荧光强度 F_0/F 对猝灭剂 FBS 的浓度 C_{FBS} 作图 (图 3)。图中可见, BSA 相对荧光强度 F_0/F 与呋苄西林钠浓度呈良好的线性关系。直线斜率为荧光猝灭常数 K , 结果列于表 1。通常生物大分子的最大动态猝灭常数 $K < 100\text{ L/mol}$, 猝灭常数远大于 100 L/mol 的荧光猝灭过程是静态猝灭过程^[5]。由表 1 结果可知, 在不同温度下 FBS 对 BSA 的荧光猝灭常数均远大于 100 L/mol , 因此, FBS

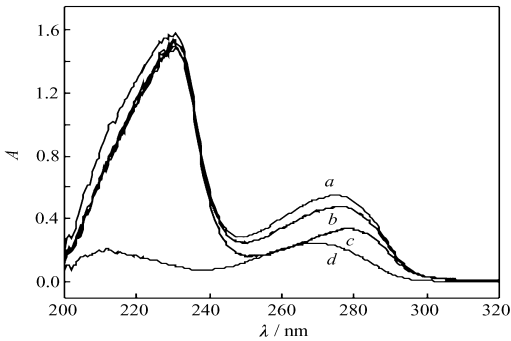


图 1 FBS、BSA 和 FBS-BSA 混合溶液的紫外光谱图
Fig 1 UV spectra of FBS, BSA and FBS-BSA solutions
a: Sum of absorbance of BSA and FBS
b: FBS-BSA, c: BSA, d: FBS
 $C(\text{BSA}) = C(\text{FBS}) = 1.08 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$

表 1 不同温度下呋苄西林钠对牛血清白蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 方程与猝灭常数

Table 1 Stern-Volmer equations and quenching constants for BSA fluorescence quenching with Furbenicillin Sodium at different temperatures

quenching agent	t/°C	$F_0/F \sim C(\text{FBS})$ equation	$10^{-4} K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$
Furbenicillin Sodium	16	$F_0/F = 10.2 \times 10^4 \cdot C(\text{FBS}) + 0.69$ ($r = 0.9864$)	10.2
	26	$F_0/F = 9.4 \times 10^4 \cdot C(\text{FBS}) + 0.71$ ($r = 0.9901$)	9.4
	36	$F_0/F = 7.6 \times 10^4 \cdot C(\text{FBS}) + 0.75$ ($r = 0.9972$)	7.6

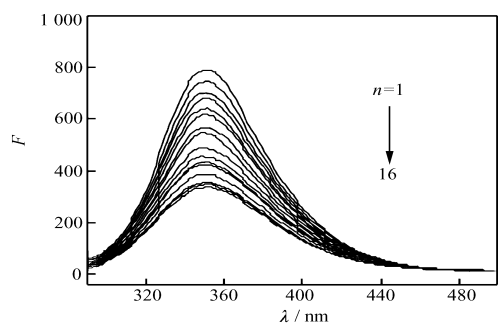


图 2 呋苄西林钠对 BSA 的荧光猝灭

Fig 2 The effect of FBS on fluorescence spectra of BSA solutions

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}=279\text{ nm}/349\text{ nm}$ $c(\text{BSA})=1.08\times10^{-5}\text{ mol/L}$
 $c(\text{FBS})=n\times3.6\times10^{-6}\text{ mol/L}$ ($n=1, 2, 3, \dots, 16$)

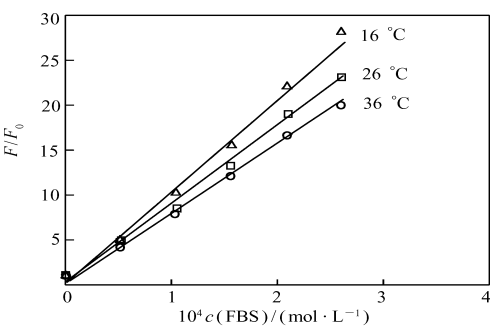


图 3 不同温度下 FBS 与 BSA 作用的

Stern-Volmer 图

Fig 3 Stern-Volmer plots of the interaction of FBS and BSA at different temperatures

对 BSA 的荧光猝灭属于静态猝灭。另外,该研究体系中, FBS 对 BSA 的荧光猝灭曲线斜率随温度的升高而降低,即猝灭常数随温度的升高而降低,进一步证明该过程为静态猝灭^[9]。

在 FBS 对 BSA 的荧光静态猝灭过程中,假设 BSA 有 n 个相同且独立的可与 FBS 结合的位点,则 BSA 与 FBS 的配合反应可表示为:



其平衡常数:

$$K_b = \frac{c_{(\text{FBS})_n(\text{BSA})}}{c_{\text{FBS}}^n c_{\text{BSA}}} \tag{3}$$

式中, c_{BSA} 为游离荧光发光体 BSA 的浓度, c_{FBS} 是猝灭剂呋苄西林钠的浓度, $c_{(\text{FBS})_n(\text{BSA})}$ 是配合物浓度。

因荧光发光体总浓度为 $c_{\text{BSA},0} = c_{(\text{FBS})_n(\text{BSA})} + c_{\text{BSA}}$,
当 $c_{\text{FBS}} \gg c_{\text{BSA},0}$ 时,以猝灭剂的起始浓度 ($c_{\text{FBS},0}$) 代替其平衡浓度 (c_{FBS}) 则:

$$K_b = (c_{\text{BSA},0} - c_{\text{BSA}}) / (c_{\text{FBS},0}^n c_{\text{BSA}}) \tag{4}$$

因体系的荧光强度与荧光物质的游离浓度呈正比 (所生成的配合物是非荧光性的) 即:

$$c_{\text{BSA}} / c_{\text{BSA},0} = F / F_0 \tag{5}$$

由式 (4) 和式 (5) 可得:

$$\lg((F_0 - F) / F) = \lg K_b + n \lg c_{\text{FBS},0} \tag{6}$$

根据方程 (6), 由图 4 ($\lg[(F_0 - F) / F] \sim \lg c_{\text{FBS},0}$) 曲线拟合得到的方程、平衡常数与结合位点数列于表 2。结果可以看出, BSA 与 FBS 的结合位点数 n 均等于 1, 说明每一个 BSA 分子与 1 个 FBS 分子结合形成配合物, 其结合常数随温度升高而减小, 这可以理解为当温度升高, 有利于 FBS 与 BSA 的结合产物的离解, 使平衡常数 K_b 减小, 进一步证明了 FBS 对 BSA 为静态猝灭。

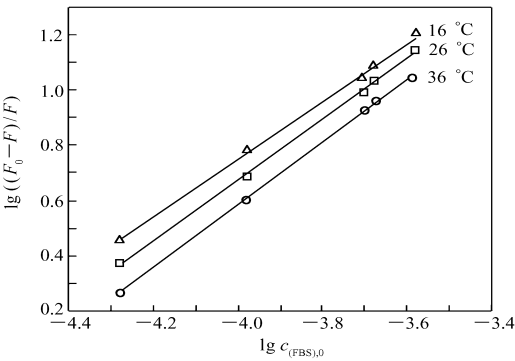


图 4 不同温度下 $\lg((F_0 - F) / F)$ 与

$\lg c_{\text{FBS},0}$ 的曲线图

Fig 4 Plots of $\lg((F_0 - F) / F)$ vs $\lg c_{\text{FBS},0}$ at different temperatures

表 2 不同温度下呋苄西林钠对牛血清白蛋白荧光猝灭对数方程及其参数

Table 2 Logarithm equation and its parameters for BSA fluorescence quenching by Furbenicillin Sodium at different temperatures

quenching agent	t/°C	$\lg((F_0 - F) / F) \sim \lg c_{\text{FBS},0}$ equation	$K_b / (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n
Furbenicillin Sodium	16	$\lg((F_0 - F) / F) = 1.13 \lg c_{\text{FBS},0} + 5.12$ ($r = 0.9898$)	1.31×10^5	1.13
	26	$\lg((F_0 - F) / F) = 1.09 \lg c_{\text{FBS},0} + 5.02$ ($r = 0.9921$)	1.04×10^5	1.09
	36	$\lg((F_0 - F) / F) = 1.04 \lg c_{\text{FBS},0} + 4.94$ ($r = 0.9913$)	8.7×10^4	1.04

对呋苄西林钠的紫外吸收谱与 BSA的荧光发射光谱进行比较(图 5所示)。图中可见,呋苄西林钠的紫外吸收谱与 BSA的荧光谱没有重叠,因此,推断呋苄西林钠对 BSA的荧光猝灭作用不属于荧光共振能量转移。

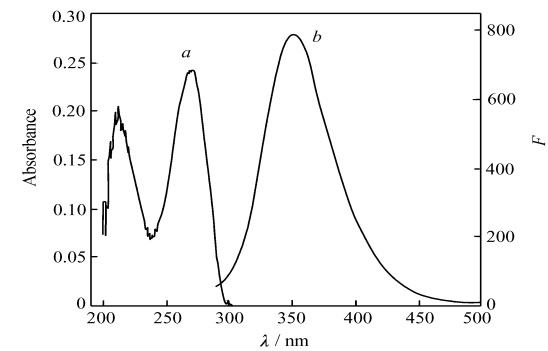


图 5 FBS吸收光谱 (a)与 BSA荧光光谱 (b)
Fig 5 (a) UV spectrum of FBS and
(b) the fluorescence spectrum of BSA

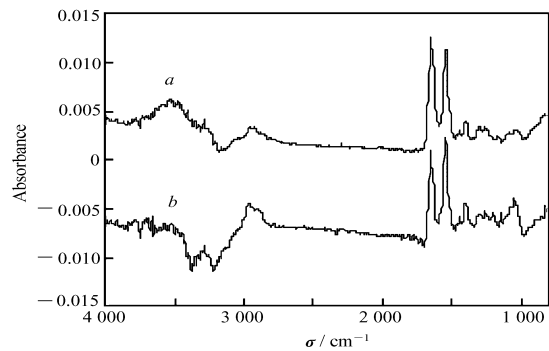


图 6 BSA(a)及 BSA与 FBS反应后 (b)的红外光谱图
Fig 6 IR spectra of (a) BSA and (b) FBS-BSA
c(BSA)=7.5×10⁻⁵ mol/L, c(FBS)=7.5×10⁻⁵ mol/L
The background spectrum of 0.05 mol/L PBS solution (a) or
PBS solution containing 7.5×10⁻⁵ mol/L FBA (b)

2.3 BSA二级结构成分变化的 R谱分析

图 6为 BSA及 BSA与 FBS反应后的红外光谱图。图中可见,加 FBS后,BSA酰胺 I 带 1636 cm⁻¹和 II带 1545 cm⁻¹的相对强度发生明显变化,说明 BSA和 FBS反应后,BSA分子结构发生了变化。蛋白质的红外光谱中,酰胺 I 带及酰胺 II带(1240 cm⁻¹),在一定程度上能反映蛋白质二级结构的变化,且酰胺 I 带对蛋白质分子二级结构变化更敏感,所以,酰胺 I 带的变化可近似地表征蛋白质分子二级结构的类型。但在 R谱中酰胺 I 带是不同二级结构谱的叠加,因此需用去卷积和通过曲线拟合进行谱带展开。当酰胺 I 带为 1695~1658 cm⁻¹时为 β转角结构,当酰胺 I 带为 1658~1650 cm⁻¹时则为 α螺旋结构,当酰胺 I 带为 1650~1640 cm⁻¹时则为无规则卷曲结构,当酰胺 I 带为 1640~1610 cm⁻¹时为 β折叠结构。图 7为 BSA及 BSA与同浓度 FBS结合后 R谱的曲线拟合。拟合结果中 α螺旋,β转角,β折叠各子峰以及无规则卷曲结构的峰面积所占百分数见表 3。与 FBS作用后 BSA的 R谱曲线拟合结果与单纯 BSA的 R谱曲线拟合结果相比有较大变化,蛋白质和 FBS作用后,α螺旋和无规则卷曲结构减少,β折叠相应增加,β转角变化不大,表明蛋白质二级结构由 α螺旋结构和无规则卷曲结构向 β-折叠转变。这一结果说明了蛋白质分子中肽链出现部分展开,与蛋白质热变性的结果比较相似^[12]。

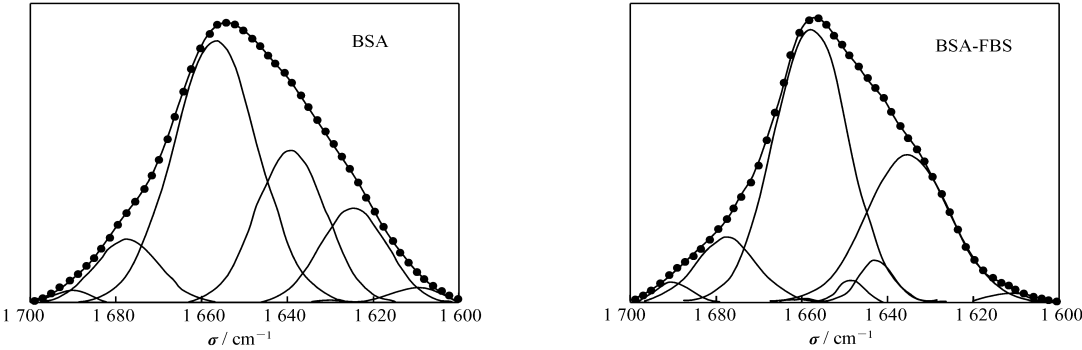


图 7 BSA和 FBSBSA的酰胺 I 带 (1700~1600 cm⁻¹)曲线拟合图
Fig 7 IR curve fitting of the amide I (1700~1600 cm⁻¹) region of bulk BSA or FBS-BSA
c(BSA)=7.5×10⁻⁵ mol/L, c(FBA)=7.5×10⁻⁵ mol/L
The background spectrum of 0.05 mol/L PBS solution for BSA or PBS containing 7.5×10⁻⁵ mol/L FBS for FBS-BSA

表 3 BSA和 FBS与同浓度 FBS结合后主要二级结构所占的百分数

Table 3 Secondary structures(%) of BSA and FBS-BSA

	α -helix	β -turn angle	β -pleated sheet	Random
BSA	49.8	10.1	11.5	23.9
BSA+ FBS	41.9	14.3	31.6	11.1

参 考 文 献

1

MA Yu Zhuo(马玉卓), LIU Ying Xiang(刘鹰翔), ZHOU Yu Ping(周玉平), MEI Wen Jie(梅文杰), SHE Zhi Gang(佘志刚). Chinese J Med Chem(中国药物化学杂志)[J], 2006 16 51

2

WEI Min Ji(魏敏吉), LI Jia Tai(李家泰), DONG Shan Nian(董善年). Chinese J Pharm Anal(药物分析杂志)[J], 2001 21 225

3

BYERDM, SUSI H. Biopolymers[J], 1986 25 469

4

Abbott T P, Wolf W J, Victor Y. Appl Spectrosc[J], 1991 45(10): 1 665

5

LIU Yong Ming(刘永明), LI Gui Zhi(李桂芝). Chinese J Appl Chem(应用化学)[J], 2004 21 621

6

LI Gui Zhi(李桂芝), LIU Yong Ming(刘永明), GUO Xin Yun(郭新运), WANG Jin Jun(王进军). Acta Chim Sin(化学学报)[J], 2006 64(7): 679

7

YANG Pin(杨频). Intro Bioinorg Chemistr(生物无机化学导论)[M]. Xi'an(西安): Xi'an Jiaotong University Press(西安交大出版社), 1991

8

MA Hui Lian(马慧莲), LIU Han Zhi(刘含智), WANG Li Ping(王丽萍), XU Shu Kun(徐淑坤), LI Wei(李惟). Chinese J Anal Chem(分析化学)[J], 2005 33 1 335

9

Moulton S E, Barisci J N, Mcauliffe A J, Wallace G G. Colloid Surf A[J], 2003 220 159

10

Liu Y Xie M X, Kang J Zheng D. Spectrochim Acta Part A[J], 2001 59 2 747

11

XIE Meng Xia(谢孟峡), JIANG Min(蒋敏), LI Song(李蕊), LU Yuan(刘媛). Acta Chim Sin(化学学报)[J], 2004 62 1 460

12

LIU Yuan(刘媛), XIE Meng Xia(谢孟峡), KANG Juan(康娟). Acta Chim Sin(化学学报)[J], 2003 61 1 305

Spectroscopic Study on the Interaction of Furbenicillin Sodium with Bovine Serum Albumin

YANG Zhao Xia^{a, b}, ZHANG You Yu^{a*}, YANG Qin^a, YAO Shou Zhuo^a
(^a Key Laboratory of Chemical Biology & Traditional Chinese Medicine
Research Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081;
^b College of Chemistry and Chemical Engineering, Jishou University, Jishou)

Abstract Bonding reaction of Furbenicillin Sodium(FBS) with bovine serum albumin(BSA) was studied by means of UV-Vis fluorescence and infrared spectroscopy. The experimental results suggest that there is strong interaction between FBS and BSA, and FBS has a strong quenching effect on the BSA fluorescence. It is confirmed from fluorescence data that the quenching effect of FBS on the BSA fluorescence is a single static quenching process. The fluorescence quenching data was analyzed using the Stern-Volmer equation and double logarithm equation. The binding constant and binding sites were 1.04×10^5 and 1.09 at ambient temperature(26 °C), respectively. It is revealed from the above results that the bonding of FBS with BSA leads to a significant change of the secondary structure of BSA.

Keywords UV-Vis spectroscopy, fluorescence spectroscopy, infrared spectroscopy, fluorescence quenching, furbenicillin sodium, bovine serum albumin