

蛋白质与肝素之间相互作用的光谱法研究

胡勇¹ 扶雄² 陈旭东³ 杨连生²

(1. 广东药学院 食品科学学院, 广东 中山 528458; 2. 华南理工大学 轻化工研究所, 广东 广州 510640; 3. 中山大学 化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘要: 目的 研究牛血清蛋白(BSA)与肝素(HP)在溶液中的相互作用机理。方法 通过共振光散射光谱(RLS)、紫外吸收光谱及荧光光谱来考察 BSA 与 HP 相互作用前后的光谱变化,考察体系的分子结合机理。结果 随着 HP 的持续加入,体系 RLS 强度迅速增加;BSA 在 298 nm 左右的吸收峰不断升高和蓝移;BSA 的荧光强度出现了显著的下降,但当 HP 浓度进一步增大,BSA 的荧光强度反而出现有规律的上升。结论 HP 与 BSA 分子通过电子作用力以及疏水作用力生成分子间复合物,使得体系 RLS 强度增加,同时 BSA 的分子构象发生伸展。此外,BSA 与 HP 分子间的相互作用与 HP 溶液浓度的高低有着密切的关系。

关键词: 牛血清蛋白; 肝素; 相互作用; 光谱学研究

中图分类号: R913 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.01.005

文章编号: 1006-8783(2011)01-0018-05

Study of binding interaction between bovine serum albumin and heparin by spectroscopy

HU Yong¹, FU Xiong², CHEN Xu-dong³, YANG Lian-sheng²

(1. School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical College, Zhongshan, Guangdong 528458, China;
2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510640, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou Guangdong 510275, China)

Abstract: Objective To investigate the interaction mechanism of bovine serum albumin (BSA) and heparin (HP) in solution. **Methods** The spectral changes of resonance light scattering (RLS), UV absorption spectra and fluorescence spectroscopy were analyzed to examine the molecular binding mechanism. **Results** The RLS intensity increased rapidly as HP was added, and the absorption peak of BSA located at about 298 nm appeared rising and blue shifting. Meanwhile, the fluorescence intensity of BSA declined significantly first and then ascended later. **Conclusion** HP molecules can form interpolymeric complexes with BSA by electronic and hydrophobic force, which accounts for the increase of the RLS intensity and the change of proteins' structures. Furthermore, the interaction between BSA and HP has a close relationship with the level of HP concentration.

Key words: bovine serum albumin; heparin; interaction; spectroscopy

蛋白质与多糖的结合是一种重要的生物现象。多糖在细胞外的许多生理功能都依赖于与其他大分子的相互作用,特别是与蛋白质的相互作用^[1-3]。血清蛋白是人体循环系统中最主要的可溶蛋白质,有较强的吸附、结合其他分子和催化生物化学反应

等能力,具有很多重要的生理功能,因而被广泛应用于与健康 and 药物相关的研究中。肝素(HP)是一种由葡萄糖胺、L-艾杜糖醛苷、N-乙酰葡萄糖胺和 D-葡萄糖醛酸交替组成的黏多糖硫酸脂,其在药理上的活性主要依赖于其多糖链与有效蛋白质之间的相

收稿日期: 2010-12-16

基金项目: 国家自然科学基金(50673104)

作者简介: 胡勇(1977-)男,博士,从事功能碳水化合物材料理论与技术研究;通讯作者: 扶雄 教授 Email: lxfu@scut.edu.cn。

网络出版时间: 2011-01-21 16:22 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110121.1622.015.html>

相互作用^[4]。

目前,一些技术已用来研究多糖和蛋白质之间的相互作用,如用荧光光谱和紫外吸收光谱检测多糖/蛋白质复合物的生成,用光散射测定多糖/蛋白质复合物粒子尺寸和在溶液中的扩散系数,用圆二色谱和核磁共振研究蛋白质在多糖/蛋白质复合物形成过程中的构象改变,用毛细管电泳来测定多糖/蛋白质复合物在溶液中的迁移率等^[5-8],但以上研究主要集中在应用方面,而关于其作用机理的研究则少有报道。荧光分析法在生物分子识别和研究生物分子相互作用机理等方面有着广泛的应用^[9]。特别地,当固定激发和发射波长间隔扫描激发单色器和发射单色器时,共振散射光谱可以很轻易地在普通荧光仪上实现,这样可进一步解释大分子间的相互作用本质^[10]。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

RF-5301PC 型荧光分光光度计(日本岛津公司); PHS-40A 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); UV-3150 紫外-可见分光光度计(日本 Jasco 公司); FC-204 电子分析天平(上海天平仪器厂)。

HP 储备液(分析纯,中国医药集团上海化学试剂公司):用水溶解肝素钠 0.010 g 于小烧杯中,搅拌溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,再用水稀释至刻度,摇匀,即配制成 1.0×10^{-4} g/mL 的储备液,使用时再用水稀释成所需的浓度。

牛血清蛋白储备液(BSA,分析纯,上海伯奥生物科技有限公司):用水溶解 0.020 g BSA 于小烧杯中,搅拌溶解后转移至 100 mL 容量瓶中,再用水稀释至刻度,摇匀,即配制成 2.00×10^{-4} g/mL 的储备液,该溶液保存在 $0 \sim 4$ °C 冰箱中待用,使用时再用水稀释成所需的浓度。

1.2 实验步骤

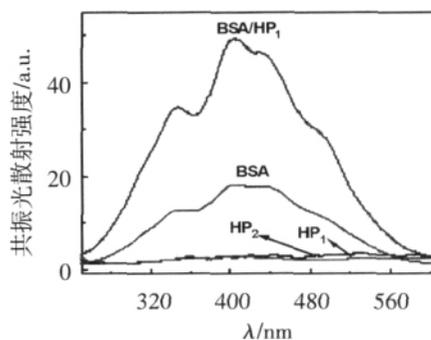
在一系列 10 mL 容量瓶中依次加入磷酸盐缓冲溶液 2.0 mL、BSA 溶液 1.0 mL 及一定量 HP 工作液,用去离子水定容至 10.0 mL,搅拌均匀,放置一段时间用于测试。用 1 cm × 1 cm 样品池,在 RF-5301PC 型荧光光度计上,以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ (即 $\Delta\lambda = 0$ nm) 在 250 ~ 650 nm 进行同步扫描,得到体系的 RLS 光谱图谱,于最大散射峰 402 nm 处测量体系 RLS 强度。狭缝宽度为 1.5 nm,扫描速度为 256 nm/min。选择激发波长为 280 nm,用 RF-5301PC 型荧光光度计在 300 ~ 420 nm 范围内测定一定温度时

体系的荧光光谱。激发和发射通带均为 5 nm,扫描速度为 256 nm/min。利用 UV-3150 紫外-可见分光光度计在 190 ~ 350 nm 内测定单一溶液及混合溶液的紫外光谱。溶液酸度用 PHS-40A 数字 pH 计校正。

2 结果与讨论

2.1 共振光散射光谱(RLS)

用 RF-5301PC 型荧光光度计以 $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ 对 HP、BSA 以及 BSA/HP 体系进行同步扫描,得到如图 1 所示的共振光散射谱图。从图 1 中可以看出,单独的 HP 溶液的 RLS 强度非常微弱,且几乎不随 HP 的浓度增大而变化,说明 HP 在稀溶液中非常稳定,不易出现分子间聚集现象。单独的 BSA 溶液则有较弱的共振光散射峰,最大散射波长出现在 403 nm,此外还有 3 个较小的散射峰,分别位于 345、432、488 nm。这可能是 BSA 在水溶液中存在一定的聚集现象,从而产生较明显的 RLS 散射峰。然而,当 BSA 与微量 HP 作用后,其微弱的 RLS 强度得到了极大的增强,最大散射峰波长出现在 406 nm,同时其他 RLS 峰位也出现了相应的移动,表明 BSA 与 HP 之间可能存在相互作用。HP 是一种阴离子多糖,在低浓度下呈现线性扩展分子,而 BSA 在通常情况下是呈阳离子性质,因此它们之间的电子作用力是最主要的驱动力。一般地,RLS 信号的产生与溶液中形成聚集有关,其强度主要决定于溶液中粒子的直径,故 BSA/HP 体系的 RLS 强度急剧增大可归因于溶液中 BSA/HP 复合物的生成^[11]。



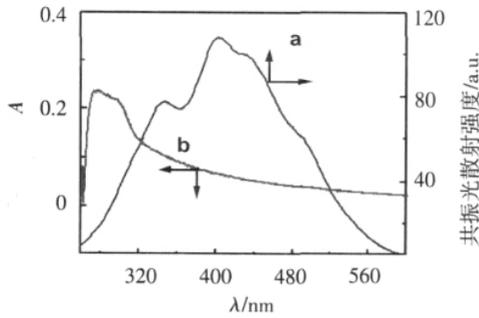
HP₁: 1.33×10^{-8} mol/L; HP₂: 2.00×10^{-8} mol/L;
BSA: 2.46×10^{-6} mol/L

图 1 BSA-HP 体系的共振光散射光谱

Figure 1 RLS spectra of HP, BSA and BSA/HP₁ blend

根据 RLS 理论,RLS 光谱通常位于或者靠近分子的吸收带。但由于分子同时吸收入射光和散射光,因而在通常的 RLS 光谱中,最大散射信号应该出现在共振吸收的低能区^[12]。从图 2 中可见,体系

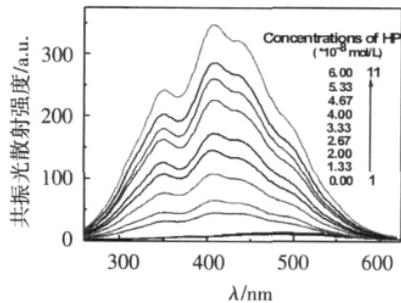
散射峰靠近 BSA/HP 复合物分子吸收带,同时体系的最强散射峰出现在 BSA/HP 复合物的最低吸收处,这表明获得的散射光谱属于共振光散射光谱范畴。基于检测的敏感性,位于 406 nm 的 RLS 散射峰被用作进一步的分析。



a. 共振光散射光谱; b. 紫外吸收光谱

图 2 BSA-HP 体系的共振光散射光谱和紫外吸收光谱
Figure 2 RLS spectra and absorbance spectra of HP-BSA system

图 3 为 HP 的浓度对 BSA 与 HP 之间相互作用的影响情况。从图 3 可见,体系的 RLS 强度随着 HP 的浓度增大而增强,这表明溶液中 BSA 与 HP 之间越来越多地结合。然而,这种体系的 RLS 强度随着 HP 浓度的增大而增强现象只是在一定的浓度范围内出现。当体系中 HP 的浓度超过 1.20×10^{-7} mol/L 时,BSA/HP 复合物的 RLS 强度开始下降。这表明 BSA 与 HP 之间的结合作用与 HP 的浓度高低有密切的关系。这种现象可从两种不同生物大分子相互作用的本质来解释:当 HP 浓度进一步增大时,带正电荷的 BSA 与带负电荷的 HP 之间将会产生一个相互的电荷补偿效应,降低了 HP 分子和 BSA 分子间的静电排斥力,导致 HP 和 BSA 分子的聚集,从而降低了它们之间的结合作用。

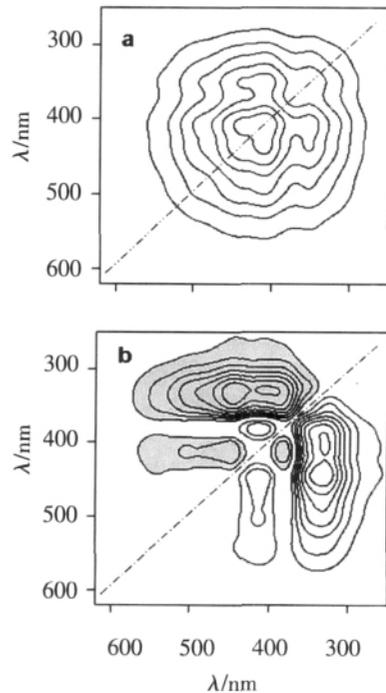


HP₁. 1.33×10^{-8} mol/L; HP₂. 2.00×10^{-8} mol/L;
BSA. 2.46×10^{-6} mol/L

图 3 HP 浓度对 BSA-HP 体系 RLS 的影响
Figure 3 Effect of HP concentration on the RLS spectra of HP-BSA system

二维相关谱是将原来的光谱信号扩展到第二维上,从而可清楚地反映聚合物大分子在外界微扰作用下,分子内各结构单元、官能团发生的变化先后关系^[13]。因此,通过二维相关谱分析可获得某些在一维图谱中无法得到的光谱信息。

根据图 3,将数据导入 2DShine 处理软件,计算得体系的二维同步和异步 RLS 光谱图,见图 4。从图 4(a)同步谱中发现,在 406 nm 处有明显的自相关峰,说明这个峰在观察的区间内其 RLS 强度发生了显著变化,也对溶液中 HP 浓度的改变非常敏感。根据 Noda 相关理论,在图 4(b)异步谱中出现的正交叉相关峰(348 nm/438 nm)说明位于 348 nm 处的 RLS 峰的变化比位于 438 nm 处的要快;正交叉相关峰(348 nm/406 nm)说明位于 348 nm 处的 RLS 峰的变化比位于 406 nm 处的快;负交叉相关峰(383 nm/406 nm)说明位于 383 nm 处的 RLS 峰的变化比位于 406 nm 处的要慢;正交叉相关峰(406 nm/438 nm)说明 406 nm 处的 RLS 峰的变化比位于 438 nm 处的要快。从以上分析可知,越靠近分子最大吸收处,其 RLS 光谱变化越快,表明分子间相互作用越强。

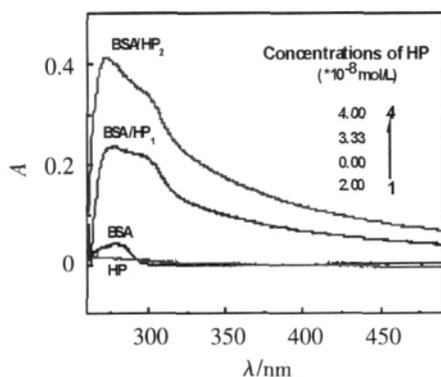


a. 二维同步光谱; b. 二维异步光谱

图 4 HP 与 BSA 相互作用的二维共振光散射光谱
Figure 4 2D RLS correlation spectroscopy of the interaction of BSA and HP in different concentration

2.2 紫外吸收光谱

一般地,蛋白质 280 nm 左右的强吸收峰归因于蛋白质的骨架结构吸收,从而可用来表征蛋白质的构象变化。图 5 显示了 BSA、HP 以及 BSA/HP 复合物在不同 HP 浓度下的吸收光谱图。从图 5 可见,BSA 在 280 nm 处显示出蛋白质特征吸收峰,而 HP 在整个区间内几乎没有任何吸收。然而,当向 BSA 溶液中加入 HP 后,体系在 298 nm 处出现一个明显的新吸收峰,这表明 HP 与 BSA 发生了相互作用并形成了新的复合物^[14]。同时,从图中还可看出,随着 HP 浓度的不断增加,体系在 298 nm 左右的吸收峰强度不断增强和发生蓝移。吸收峰强度升高表明 BSA 分子中螺旋成分的降低,分子发生了伸展,而吸收峰蓝移表明 BSA 骨架结构周围的极性发生了改变。



HP₁: 1.33×10^{-8} mol/L; HP₂: 2.00×10^{-8} mol/L;

BSA: 2.46×10^{-6} mol/L

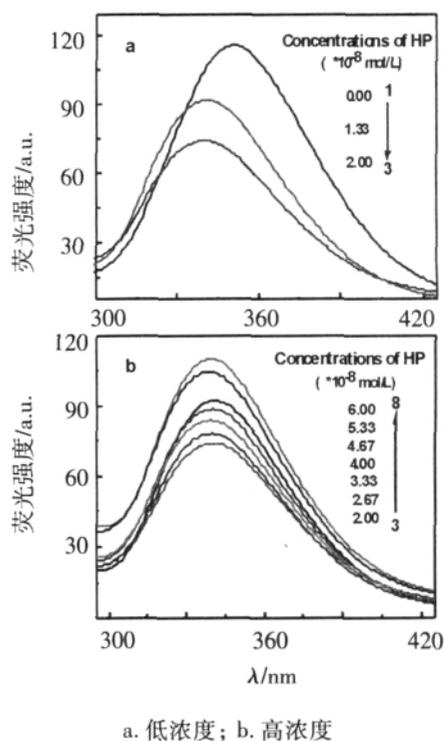
图 5 BSA-HP 体系的紫外吸收光谱

Figure 5 Absorbance spectra of HP-BSA system

2.3 荧光光谱

为进一步验证 BSA 与 HP 之间相互作用机理,用 285 nm 作为激发波长,测定了在不同 HP 浓度下 BSA 的荧光发射光谱,见图 6。如图 6(a) 所示:在较低的 HP 浓度下,随着 HP 加入,BSA 的荧光强度出现了显著的下降,其最大荧光发射峰出现了明显的蓝移,从 351 nm 移到了 340 nm;但随着 HP 浓度的增大,虽然 BSA 的荧光强度继续下降,但其最大发射波长几乎不再移动,这充分表明 HP 与 BSA 发生了相互作用并生成了新的复合物^[15]。原因可能是在 HP 浓度较低时,溶液中 HP 分子链呈现较舒展的构象,从而与 BSA 之间的相互作用较充分,BSA 优先与多糖链无序部分发生结合,从而导致 BSA 荧光生色团所处微环境的疏水性增加,荧光发射峰发生蓝移。

然而,高浓度下的 HP 与 BSA 之间的相互作用却呈现出完全不同的规律。如图 6(b) 所示:随着 HP 浓度的增大,BSA 的荧光强度不但没有被淬灭,反而出现有规律的上升。原因是:一方面,越来越多 BSA/HP 复合物的形成增大了体系的黏度,降低了体系分子扩散速率,限制了 BSA 分子的翻转和内部扭转运动,有利于抑制 BSA 分子之间的相互碰撞,消除 BSA 分子荧光的自猝灭,而且有利于 BSA 荧光的恢复^[16];另一方面,在 HP 分子较高的浓度下,BSA 分子会因电荷补偿效应而发生聚集,从而显著提高体系的荧光强度。



a. 低浓度; b. 高浓度

图 6 HP 浓度对 BSA 荧光光谱的影响

Figure 6 Effect of HP concentration on fluorescence spectra

参考文献:

- [1] HATTORI T, KIMURA K, SEYREK E, *et al.* The use of frontal analysis continuous capillary electrophoresis to compare protein binding by natural and synthetic polyelectrolytes [J]. *Anal Biochem* 2001, 17: 193 - 195.
- [2] ARITA K, BABIKER E E, AZAKAMI H, *et al.* Effect of chemical and genetic attachment of polysaccharides to proteins on the production of IgG and IgE [J]. *J Agric Food Chem* 2001, 49(4): 2030 - 2036.
- [3] JONES O G, McClements D J. Stability of biopolymer particles formed by heat treatment of β -lactoglobulin/pectin electrostatic complexes [J]. *Food Biophys* 2008, 3(2): 191 - 192.

- [4] HATTORI T ,KIMURA K ,SEYREK E ,*et al.* Binding of bovine serum albumin to heparin determined by turbidimetric titration and frontal analysis continuous capillary electrophoresis [J]. *Anal Biochem* ,2001 ,295 (2) :158 - 162.
- [5] SCHAINKA H M ,SMIT J A M. Determination of the osmotic second virial coefficient and the dimerization of β -lactoglobulin in aqueous solutions with added salt at the isoelectric point [J]. *Phys Chem Chem Phys* ,2000 (2) : 1537 - 1541.
- [6] WEINBRECK F ,TROMP R H ,DEKRUIFEK C G. Composition and structure of whey protein/gum arabic coacervates [J]. *Biomacromolecules* ,2004 ,5(4) : 1437 - 1445.
- [7] WANG Xiao-yong ,LI Yu-qing ,WANG Yu-wen ,*et al.* Microstructure of β -lactoglobulin/pectin coacervates studied by small-angle neutron scattering [J]. *J Phys Chem B* , 2007 ,111(3) :515 - 520.
- [8] DUCELA V ,SAULNIERA P ,RICHARDB J ,*et al.* Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements [J]. *Colloid Surface B* 2005 ,41(2 - 3) :95 - 102.
- [9] MI F L. Synthesis and characterization of a novel chitosan-gelatin bioconjugate with fluorescence emission [J]. *Biomacromolecules* 2005 ,6(2) :975 - 987.
- [10] CHEN Xu-dong ,DONG Ye-ping ,FAN Li ,*et al.* Fluorescence for the ultrasensitive detection of peptides with functionalized nano-ZnS [J]. *Anal Chim Acta* 2007 , 582(2) :281 - 287.
- [11] LUO Hong-qu ,LIU Shao-pu ,LI Nian-bin ,*et al.* Resonance rayleigh scattering , frequency doubling scattering and second-order scattering spectra of the heparin-crystal violet system and their analytical application analytica [J]. *Chimica Acta* ,2002 ,468(2) : 275 - 286.
- [12] BORISSEVITCH I E ,TOMINAGA T T ,IMASATO H ,*et al.* Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin: effects upon the porphyrin triplet state characteristics [J]. *J Photochem Photobiol A* ,1998 ,114(3) :201 - 207.
- [13] 沈怡 彭云 武培怡 等. 二维相关振动光谱技术 [J]. *化学进展* 2005 ,12(3) :499 - 513.
- [14] WANG S ,VAN DIJK J ,ODIJK T ,*et al.* Depletion-induced demixing in aqueous protein-polysaccharide solutions [J]. *Biomacromolecules* ,2001 ,2(4) :1080 - 1088.
- [15] TERAMOTO A ,TAKAGI Y ,HACHMORI A ,*et al.* Interaction of albumin with polysaccharides containing ionic groups [J]. *Polym Adv Technol* ,1999 ,10(2) :681 - 686.
- [16] 马贵斌 贾锁堂 王刚 等. 染料在聚乙二醇介质中的荧光光谱和溶剂效应研究 [J]. *光谱学及光谱分析* , 1994 ,14(4) :15 - 17.

(责任编辑: 陈翔)

美国 FDA 批准一种治疗抑郁症新药 Viibryd

美国 FDA 于 2011 年 1 月 21 日批准 Viibryd(有效成分为盐酸维拉佐酮 vilazodone hydrochloride) 用于治疗重度抑郁症。Viibryd 为片剂,分 10、20、40 mg 3 种剂量规格,由位于康涅狄格州纽黑文的 PGxHealth 公司生产。

重度抑郁症的主要症状包括情绪低落、对日常活动无兴趣、体重或食欲剧变、失眠或嗜睡、躁动不安、疲乏、负罪感、厌世、思维缓慢、注意力受损、自杀倾向或自杀意识等。重度抑郁症患者的症状可能各不相同,通常连工作、睡眠、饮食等日常活动都无法正常进行,有些患者甚至终身都有可能重复发病,但部分患者只发病 1 次。

FDA 有关主管官员指出,重度抑郁症对患者影响巨大,药物治疗对不同的患者的作用也不尽相同,因此有必要为患者提供多种药物选择,这非常重要。

在临床试验中,Viibryd 最常见的副作用包括腹泻、恶心、呕吐和失眠等。Viibryd 及其他所有抗抑郁药都在包装盒及说明书中特别注明儿童、青少年及 18 ~ 24 岁成年人服药初期可能会增加患者的自杀倾向及行为,因此用药初期有必要对患者进行严密的监控。

(来源: 美国 FDA 新闻稿 2011-01-21 夏训明编译)