[Article]

doi: 10.3866/PKU.WHXB201310281

www.whxb.pku.edu.cn

牛血清白蛋白与十二烷基硫酸钠作用的机理

宁爱民* 孟磊 赵仲麟 郑先福 宛新生
(河南农业大学理学院, 郑州 450002)

摘要: 利用电动势法得到了牛血清白蛋白(BSA)与十二烷基硫酸钠(SDS)相互作用的结合等温线. 通过四阶导数紫外光谱法和荧光光谱法研究了相互作用过程中芳香族氨基酸残基微环境极性的变化. 通过研究发现, 随着SDS浓度的逐渐增大, SDS在BSA上的平均结合数(ν)逐渐增大, 色氨酸(Trp)残基所处微环境的极性在减弱后保持基本不变, 酪氨酸残基所处微环境的极性在明显增强后稍有减弱, 苯丙氨酸残基所处微环境的极性略有增强. 结果表明, 当 ν 由0增大到14时, SDS主要结合在BSA的Trp-213附近并逐渐形成聚集体, 从而诱导BSA由结构域IIA开始逐渐展开. 此后, SDS呈正协同作用的特点与BSA结合, ν 急剧增大. 当 ν 约为302时, SDS在BSA上的结合基本达到饱和, BSA的构象趋于稳定.

关键词: 电动势; 四阶导数紫外光谱; 荧光光谱; 芳香族氨基酸残基; 微环境; 极性; 结合位点
中图分类号: O647

Mechanism of Interaction between Bovine Serum Albumin and Sodium Dodecyl Sulfate

NING Ai-Min* MENG Lei ZHAO Zhong-Lin ZHENG Xian-Fu WAN Xin-Sheng
(College of Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, P. R. China)

Abstract: The binding isotherms of the interaction between bovine serum albumin (BSA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained using electromotive force measurements. Changes in the microenvironmental polarity of aromatic amino acid residues during the interaction were studied using fourth-derivative ultraviolet spectroscopy and fluorescence spectroscopy. The average number (ν) of SDS molecules bound to BSA increased with increasing SDS concentration. The polarity of tryptophan (Trp) residues decreased gradually and then remained almost constant. The polarity of tyrosine residues increased significantly and then decreased a little. The polarity of phenylalanine residues increased very slightly. The results show that SDS molecules bind to BSA in the vicinity of Trp-213 when ν gradually increases from 0 to 14. BSA unfolds from domain IIA, induced by SDS aggregates formed near Trp-213. The ν value then increases rapidly as a result of positive cooperative binding. When the ν value reaches about 302, saturation binding is achieved and the BSA conformation remains almost unchanged.

Key Words: Electromotive force; Fourth-derivative ultraviolet spectroscopy; Fluorescence spectroscopy; Aromatic amino acid residue; Microenvironment; Polarity; Binding site

1 引言

研究表面活性剂与蛋白质的相互作用在生命

科学和工业应用中都具有重要的意义. 随着现代科学技术的不断发展, 研究方法日益完善. 在诸多研

Received: July 15, 2013; Revised: October 28, 2013; Published on Web: October 28, 2013.

*Corresponding author. Email: nam001@126.com; Tel: +86-371-63558130.

The project was supported by the National Natural Science Foundation of China (31100067).

国家自然科学基金(31100067)资助项目

© Editorial office of *Acta Physico-Chimica Sinica*

究蛋白质大分子与表面活性剂相互作用的方法中, 结合等温线法可以直观地反映蛋白质与表面活性剂的相互作用及其结合程度, 并能够体现二者相互作用的特征. 获得结合等温线的方法包括平衡透析法,¹ 凝胶色谱法,² 表面张力法,³ 荧光光谱法,⁴⁻⁶ 电动势法⁷⁻¹¹等. 前两种方法耗时较长且实验过程中需做繁琐的化学分析.¹² 表面张力法的前提条件是要保证溶液表面张力的变化只决定于游离表面活性剂浓度的变化, 不考虑蛋白质大分子结构变化对溶液表面张力的影响.³ 荧光光谱法根据蛋白质荧光强度的变化得到结合等温线,⁴⁻⁶ 但在蛋白质与表面活性剂相互作用的过程中, 引起其荧光强度变化的因素不仅仅是二者之间的相互结合, 还有其它比较复杂的原因.¹² 利用表面活性剂选择性膜电极通过电动势法测定则可以直接得到游离表面活性剂的浓度和结合等温线, 而该方法在表面活性剂与蛋白质大分子相互作用中的应用还较少.

电动势法的研究只能对表面活性剂与蛋白质相互作用的具体机理以及蛋白质大分子结构的变化提供有限的信息.⁷⁻¹¹ 这些方面的研究主要借助于紫外光谱、荧光光谱、圆二色光谱等方法. 但对于表面活性剂与蛋白质大分子相互作用机理的研究, 不同文献的报道不太一致, 主要集中在初始结合阶段结合位点的确定和蛋白质结构域的展开顺序上. 例如, 牛血清白蛋白(BSA)与不同表面活性剂相互作用时, 有的文献^{13,14}报导主要的结合位点是在BSA的色氨酸(Trp)残基附近, 有的文献^{15,16}报导在结构域III附近, 还有的文献⁴报导在结构域IB或IIIB附近. 作为研究蛋白质与表面活性剂相互作用时最常见的体系, 即BSA与十二烷基硫酸钠(SDS)的体系, 对于SDS与BSA结合的初始阶段, Paul等¹⁷通过荧光探针法认为SDS主要结合在BSA的Trp-213附近, Chakraborty等¹⁸通过表面张力法等认为SDS主要结合在BSA大分子的外围, Gelamo等¹⁹通过荧光光谱和分子模拟法认为SDS主要结合在BSA的Trp-134附近. 由于对初始阶段结合位点看法不一, 所以SDS诱导BSA展开或变性的机理以及BSA构象的具体变化也各不相同.¹⁷⁻¹⁹

蛋白质大分子构象的变化, 往往会引起氨基酸残基微环境极性的改变. 常规紫外光谱法和荧光光谱法可以用来探测蛋白质大分子及其内部所处微环境极性的变化. 但是, 常规紫外光谱法主要研究蛋白质中芳香族氨基酸残基整体微环境的变化,^{17,18}

蛋白质内源荧光法主要研究Trp残基(295 nm激发)或Trp与酪氨酸(Tyr)残基整体(280 nm激发)所处微环境极性的变化,^{13,20-23} 荧光探针法重点检测探针所处位置附近蛋白质大分子微环境的变化.^{13,24-26} 而导数紫外光谱法可以检测不同类型芳香族氨基酸残基微环境极性的变化, 从而研究蛋白质等生物大分子构象的变化. Su等²⁷利用二阶导数紫外光谱法, Chatani²⁸和Fan²⁹等利用四阶导数紫外光谱法分别研究了温度和pH值对蛋白质等生物大分子构象及芳香族氨基酸残基微环境的影响, 但导数紫外光谱法在蛋白质与表面活性剂相互作用中的应用仅有极少量文献^{30,31}进行过简单的报道.

本文首先用表面活性剂选择性膜电极通过电动势法研究SDS在BSA上的结合, 然后用灵敏度较高²⁹的四阶导数紫外光谱法研究相互作用过程中芳香族氨基酸残基微环境极性的变化, 并结合BSA内源荧光和芘荧光探针法对相互作用的机理以及BSA构象的变化进行分析.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白($\geq 98\%$)和芘(荧光用)购自美国Sigma公司; 十二烷基硫酸钠(化学纯, 用乙酸乙酯-丙酮混合溶剂重结晶提纯至符合纯度标准, 即水溶液的表面张力与表面活性剂的浓度曲线上不出现极小点), 布洛芬(纯度99%), 氯化血红素(生物试剂)购自国药集团化学试剂有限公司; 苯基丁氮酮(纯度 $> 98.0\%$)购自TOKYO化学工业有限公司. 实验用其它试剂均为分析纯, 蒸馏水为石英亚沸三次蒸馏水.

TU-1901型双光束紫外可见分光光度计(中国北京普析通用仪器有限责任公司), Cary Eclipse型荧光分光光度计(美国VARIAN公司), SDC-II型数字电位差综合测试仪(中国南京桑力电子设备厂), PHSJ-4A型pH计和DDSJ-308A型电导率仪(中国上海雷磁精密科学仪器有限公司).

2.2 溶液的配制

配制 $5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液⁴(含 $9.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$ 和 $4.05 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$), 并用pH计校正pH为7.40. 该缓冲溶液的离子强度 $I=0.0131 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 以下溶液均用此缓冲溶液配制.

配制一系列SDS浓度分别为 $1.0 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的30个SDS溶液, 用于表面活性剂选择性膜电极标准曲线的确定及电导率的测定.

用缓冲溶液配制约 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液, 然后用紫外光谱法 (280 nm 摩尔消光系数^{19,22} 为 $4.4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) 测定并调整浓度为 $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 以下溶液中 BSA 均用此储备液配制.

配制一系列含有 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA, SDS 浓度分别为 $0, 1.0 \times 10^{-5} - 6.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 31 个 BSA-SDS 混合溶液. 24 h 后用于电动势、BSA 的紫外光谱和荧光光谱的测定.

配制一系列含有 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA, $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 芘, SDS 浓度分别为 $0, 1.0 \times 10^{-5} - 6.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 31 个 BSA-SDS-芘混合溶液. 超声振荡 0.5 h, 稳定 1 h 后测量芘的稳态荧光发射光谱.

配制含有 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA, 不含和含有 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 位点标记物(苯基丁氮酮, 布洛芬, 氯化血红素), SDS 浓度分别为 $0, 1.0 \times 10^{-5} - 7.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间的四组混合溶液. 24 h 后测定 BSA 的荧光光谱.

2.3 电动势的测定

根据文献^{7,11,32} 并作适当改进制备的 SDS 选择性膜电极为负极, Ag-AgCl 参比电极为正极, 一系列 SDS 浓度不同的待测溶液(SDS 溶液或 BSA-SDS 溶液)为电解质溶液, 组成原电池.^{10,11} 用恒温水浴保持待测溶液温度恒定在 $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 5 min 后, 用电位差综合测试仪测定电池电动势. 每个溶液间隔三秒钟测定两次并取平均值. 所研究的原电池为 $\text{Ag}|\text{AgCl(s)}|\text{SDS}(1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}, \text{含 } 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl})|\text{含电话活性物质的 PVC 膜}|\text{待测溶液}|\text{AgCl(s)}|\text{Ag}$. 该电池的电动势为¹⁰

$$E = E^0 - \frac{RT}{F} \ln a_s \approx E^0 - \frac{RT}{F} \ln c_{s,f} \quad (1)$$

式中 E 和 E^0 分别为电池电动势和标准电动势, R 、 F 、 T 分别为气体常数、法拉第常数、绝对温度, a_s 为所研究溶液中表面活性剂阴离子的活度, 在很稀的溶液中可近似用表面活性剂在溶液中的游离浓度 $[c_{s,f}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})]$ 来代替.¹⁰

2.4 紫外光谱的测定

在 25°C 时, 用紫外可见分光光度计扫描前述配制的一系列 BSA-SDS 溶液在 $250 - 350 \text{ nm}$ 范围内分辨率为 1.0 nm 的吸收光谱, 并用 Excel 文件保存数据. 然后通过 OriginLab 8.0 软件进行四阶导数运算, 并拟合为在两组原始数据之间有九个内插值的三次样条函数, 得到分辨率为 0.1 nm 的四阶导数紫外光谱.^{27,29}

2.5 荧光光谱的测定

BSA-SDS 溶液中 BSA 内源荧光光谱的测定. 在 25°C 时, 固定激发波长为 295 nm , 激发和发射带宽均为 5 nm , 用荧光分光光度计于 $300 - 450 \text{ nm}$ 范围内扫描 BSA 的荧光发射光谱.

BSA-SDS-芘溶液中芘荧光光谱的测定. 在 25°C 时, 选择激发波长为 335 nm , 激发带宽为 5 nm , 发射带宽为 2.5 nm , 用荧光分光光度计于 $350 - 450 \text{ nm}$ 范围内测定芘的荧光光谱. 平行测定两次, 记录第一峰与第三峰荧光强度并取平均值.

BSA-SDS-位点标记物溶液中 BSA 内源荧光光谱的测定. 在 25°C 时, 固定激发波长为 280 nm , 激发和发射带宽均为 5 nm , 用荧光分光光度计于 $290 - 450 \text{ nm}$ 范围内扫描 BSA 的荧光发射光谱. 平行测定两次, 记录荧光峰强度并取平均值.

3 结果与讨论

3.1 BSA 与 SDS 相互作用过程中的结合等温线

图 1 是 25°C 时所研究电池的电动势及 SDS 溶液电导率与表面活性剂总浓度 ($c_{s,t}$) 之间的关系曲线. 由图 1 可以看出, 在没有 BSA 存在的情况下, 所制备膜电极的电极电势的线性响应范围为 $1.0 \times 10^{-5} - 5.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 膜电极电势响应斜率(直线斜率)为 $-58.74 \text{ mV} \cdot \text{decade}^{-1}$, 与膜电极的理论响应斜率 $-59.15 \text{ mV} \cdot \text{decade}^{-1}$ 比较接近, 表明该电极具有“Nernst 响应行为”,^{8,33} 且对 SDS 阴离子响应灵敏. 曲线的转折点对应表面活性剂的临界胶束浓度 (CMC).³³ 由图 1 可得, 利用电动势法测定的 SDS 在缓冲溶液中的 CMC 为 $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 与文献^{2,34}

图 1 25°C 时电动势(E) (内插图: 电导率(κ))与 SDS 浓度($c_{s,t}$)之间的关系

Fig.1 Variations of electromotive force (E) (inset: conductivity (κ)) with SDS concentrations ($c_{s,t}$) at 25°C

值($5.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)基本吻合, 并与作者通过电导率法测定的结果基本一致(图1中插图), 说明所制备的表面活性剂选择性膜电极的电势能良好地反映溶液中 $c_{s,f}$ 的变化。

由图1还可以看出, 当BSA存在时, E 与SDS在缓冲溶液中的数值产生了偏离, 这是由于SDS在BSA上结合引起的,¹⁰ 所以可以由式(1)计算出BSA存在时, 溶液中游离的SDS浓度, 从而由下式^{9,10}计算得到SDS在BSA上的平均结合数(ν):

$$\nu = \frac{c_{s,b}}{c_{\text{BSA}}} = \frac{c_{s,t} - c_{s,f}}{c_{\text{BSA}}} \quad (2)$$

式中 c_{BSA} 是BSA的浓度, $c_{s,b}$ 是结合在BSA上的SDS浓度。

以平均结合数 ν 为纵坐标, 以 $c_{s,f}$ 或 $c_{s,t}$ 为横坐标, 作图得到SDS在BSA上的结合等温线,⁷⁻¹¹ 如图2所示. 该等温线的变化趋势与表面张力法³和荧光光谱法⁴⁻⁶得到的其它表面活性剂与BSA的结合等温线类似。

由图2可以看出, 当 $c_{s,t}$ 由 1.0×10^{-5} 逐渐增大到 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ν 由0缓慢增大到14左右, 但当 $c_{s,t}$ 大于 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 由于大量协同结合作用的存在,^{7,10} ν 急剧增大. 随着结合过程的不断进行, 当溶液中游离的SDS浓度达到其在缓冲溶液中的CMC时, SDS就可以形成自由胶束, 此时SDS在BSA上的结合基本达到饱和.^{12,35} 由自定义函数⁹进行非线性曲线拟合后的结合等温线(图2中的实线)可以得到, 此时饱和结合数 ν_{sat} 大约为302, 对应的 $c_{s,t}$ 约为 $1.03 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 即当SDS总浓度达到此值时, SDS在BSA上的结合基本达到饱和, 并在溶液开始形成自由胶束. 该结果与Valstar等³⁵通过动

图2 25 °C时BSA与SDS相互作用的结合等温线

Fig.2 Binding isotherms for the interaction between BSA and SDS at 25 °C

$c_{s,f}$: free surfactant concentration

态光散射法及Takeda等²通过凝胶色谱法得到的结果(pH=5.6或7.0, $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA中 $c_{s,t}$ 为 $7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)较为接近, 由于离子强度和pH对BSA与SDS的结合影响不大,²⁶ 这两种方法得到的饱和浓度若换算为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA溶液中的值, 约为 $1.05 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 但相比Paul等¹⁷(pH=7.4, $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA中 $c_{s,t}$ 为 $7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)与Das等²⁰(pH=8.4, $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA中 $c_{s,t}$ 为 $4.7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)通过内源荧光法得到的结果要大一些. 这是由于BSA与SDS结合达到一定程度时, 虽然BSA内源荧光强度不变, 但是二者的结合仍有可能发生,¹² 即实际上的结合还没有达到饱和, 所以通过内源荧光法得到的结果就会小一些, 测定得到的 ν_{sat} 也比电动势法小一些. 例如, De等⁶通过295 nm激发后的BSA荧光强度的测定得到, pH=7.0, $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA溶液中, SDS的饱和结合浓度为 $5.6 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ν_{sat} 为187, 很明显都比电动势法得到的结果小. 因此, 在研究蛋白质与表面活性剂相互作用的等温线时, 电动势法比荧光光谱法适用的表面活性剂的浓度范围要更大一些。

3.2 BSA与SDS相互作用过程中的四阶导数紫外光谱

图3是25 °C时SDS与BSA相互作用过程中, 几个不同SDS浓度下的BSA四阶导数紫外光谱图. 由图3可以看出, 在BSA-SDS溶液中, BSA的四阶导数紫外光谱图中有七个特征的吸收峰.^{28,29} 其中, 253、258、264和268 nm附近为苯丙氨酸(Phe)残基的四个特征峰, 278 nm附近为Tyr残基的特征峰, 284 nm附近是Tyr/Trp的一个特征重叠峰, 290.5 nm

图3 25 °C时BSA-SDS溶液中BSA的四阶导数紫外光谱

Fig.3 Fourth-derivative ultraviolet spectroscopy of BSA in the solutions of BSA-SDS at 25 °C

$c_{\text{SDS}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: (a) 0, (b) 7×10^{-5} , (c) 1×10^{-4} ,

(d) 4×10^{-4} , (e) 1×10^{-3} , (f) 6×10^{-2}

图4 25 °C时各芳香族氨基酸残基特征吸收峰波长与SDS浓度之间的关系

Fig.4 Variations of the characteristic wavelengths of absorption peaks of aromatic amino acid residues with SDS concentrations at 25 °C

附近为Trp残基的特征峰.通过对四阶导数紫外光谱图的分析,可得Trp、Tyr及Phe残基特征紫外吸收峰波长(分别用 $\lambda_{UV,Trp}$ 、 $\lambda_{UV,Tyr}$ 及 $\lambda_{UV,Phe}$ 表示)与SDS浓度之间的关系,如图4所示.

由图4可以看出,随着SDS浓度的逐渐增大,不同类型芳香族氨基酸残基特征吸收峰波长的变化趋势不同,说明它们所处微环境的极性变化不同.^{28,29}对于Trp残基,当SDS浓度介于 $3.0 \times 10^{-5} - 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, $\lambda_{UV,Trp}$ 由289.4 nm增大到290.8 nm,其所处微环境的极性明显减弱.对于Tyr残基,当SDS浓度介于 $4.0 \times 10^{-4} - 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, $\lambda_{UV,Tyr}$ 由278.7 nm减小到276.6 nm,其所处微环境的极性显著增强;当SDS浓度介于 $4.0 \times 10^{-3} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, $\lambda_{UV,Tyr}$ 由276.6 nm增大到277.0 nm,其所处微环境的极性稍有减弱.对于Phe残基,当SDS浓度介于 $3.0 \times 10^{-3} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, $\lambda_{UV,Phe}$ 由268.9 nm减小到268.7 nm,其所处微环境的极性稍有增强.

3.3 BSA与SDS相互作用过程中BSA的荧光光谱和芘的荧光光谱

在BSA-SDS溶液中,当激发波长为295 nm时得到的发射荧光仅由Trp残基产生,根据荧光峰波长($\lambda_{flu,Trp}$)变化可检测Trp残基所处微环境极性的变化.^{5,6,20,21,25}图5a是25 °C时,pH=7.40的BSA-SDS溶液中BSA在激发波长为295 nm时 $\lambda_{flu,Trp}$ 与SDS浓度之间的关系图.

当芘在溶液中浓度小于 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可依次在373、379、384、390和397 nm附近观察到五个荧

图5 25 °C时BSA内源荧光峰波长(a)及芘荧光 I_1/I_3 (b)与SDS浓度之间的关系

Fig.5 Variations of the wavelengths of fluorescence emission peaks of BSA (a) and I_1/I_3 values of pyrene (b) with SDS concentrations at 25 °C

光发射峰.对蛋白质与表面活性剂的混合体系而言,芘荧光光谱中第一峰(373 nm)与第三峰(384 nm)荧光强度之比(I_1/I_3)可描述芘分子所处微环境的极性大小,从而用来探测表面活性剂与蛋白质作用过程中蛋白质结构的变化.^{13,24-26}图5b是25 °C时,pH=7.40的BSA-SDS溶液中芘荧光光谱 I_1/I_3 与SDS浓度之间的关系图.在pH=7.40,离子强度 $I=0.0131 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液中芘的 I_1/I_3 约为1.81,²⁶而在此缓冲溶液中加入BSA以后,芘的 I_1/I_3 降为1.32,这是由于此时芘分子主要存在于BSA表面附近的非极性微区中,从而导致芘的 I_1/I_3 降低.²⁶

由图5a可以看出,当SDS浓度介于 $3.0 \times 10^{-5} - 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时, $\lambda_{flu,Trp}$ 由349 nm减小到330 nm,荧光发射峰发生明显蓝移,说明Trp残基所处微环境的极性明显减弱,^{20,21,25}这与前述四阶导数紫外光谱得到的结论一致.由图5b可以看出,当SDS浓度介于 $3.0 \times 10^{-4} - 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间时,芘的 I_1/I_3 逐渐由1.32降为1.07,说明此时BSA开始逐渐展开,内部一些非极性微区逐渐暴露,芘分子主要存在于这些极性更小的非极性微区中,²⁶从而导致芘的 I_1/I_3 逐渐减小.

3.4 BSA与SDS相互作用初始阶段结合位点的确定

为了确定SDS与BSA相互作用初始阶段的结合位点,选择了苯基丁氮酮、布洛芬、氯化血红素分别作为结合位点I(SudlowI)、结合位点II(SudlowII)以及结构域I的位点标记物^{16,36}进行竞争结合实验.通过测定含有 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA,不含和含有

图6 竞争结合实验的Stern-Volmer曲线
Fig.6 Stern-Volmer plots of competitive binding experiments

$1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 位点标记物, SDS 浓度分别为 0 、 $1.0 \times 10^{-5} \sim 7.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间的四组混合溶液中 BSA 的荧光光谱, 以不加 SDS 时的荧光强度 I_0 与加入不同浓度 SDS 时的荧光强度 I 的比值 (I_0/I) 对 SDS 浓度作图, 得到这些体系的 Stern-Volmer 曲线,^{16,36} 如图 6 所示. 直线的斜率即为 SDS 与 BSA 结合的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_{sv} .

由图 6 可以得到, 在不加和加入苯基丁氮酮、布洛芬以及氯化血红素后, 猝灭常数 K_{sv} 分别为 6.829×10^3 、 4.282×10^3 、 6.179×10^3 、 $6.542 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 在加入苯基丁氮酮后猝灭常数明显减小, 所以在 SDS 与 BSA 相互作用的初始阶段, SDS 主要结合在位于结构域 IIA 的结合位点 I 附近,³⁶ 即 Trp-213 附近位置, 与文献^{17,21} 得到的结论吻合.

3.5 BSA 与 SDS 相互作用机理的分析

通过对图 2、图 4 和图 5 进行比较, 可以将 BSA 与 SDS 相互作用的过程分为五个阶段. 各阶段的相关参数如表 1 所示.

依据表 1 数据, 对 BSA 与 SDS 相互作用的机理分析如下. (1) 当 SDS 浓度介于 $1.0 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ν 介于 0 到 1 之间, $\lambda_{UV,Trp}$ 、 $\lambda_{UV,Tyr}$ 、 $\lambda_{UV,Phe}$ 、 $\lambda_{flu,Trp}$ 保持基本不变, 各芳香族氨基酸残基微环境的极性基本不变,^{21,28} 说明此时 SDS 在 BSA 上结合量很少, 或者 SDS 只是分散于 BSA 表面附近区域,¹⁸ 所以

BSA 的构型没有发生变化. 同时芘分子主要存在于 BSA 表面附近的非极性微区中,²⁶ 芘的 I_1/I_3 基本不变.

(2) 当 SDS 浓度介于 $3.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ν 从 1 缓慢增大到 14, $\lambda_{UV,Trp}$ 由 289.4 nm 逐渐增大到 290.8 nm, $\lambda_{flu,Trp}$ 由 349 nm 逐渐减小到 330 nm, Trp 残基微环境的极性逐渐减弱.^{12,21,29} 竞争结合实验的结论说明, 此时 SDS 主要结合在位于 BSA 结构域 IIA 的 Trp-213 附近位置, SDS 分子中非极性烷基链的聚集使 Trp-213 所处微环境的极性减弱.^{12,21} 但此时 $\lambda_{UV,Tyr}$ 和 $\lambda_{UV,Phe}$ 几乎不变, Phe 和 Tyr 残基处微环境的极性基本不变, 芘的 I_1/I_3 也基本不变, 说明 BSA 的构象还没有发生明显变化. 这种结果的出现可以根据 BSA 的结构进行解释. BSA 大分子由三个结构域 I、II、III 组成(见图 7), 每个结构域又由两个亚结构域 A 和 B 组成, 从而形成一个心型形状的大分子.³⁷ 在结构域 I 和 III 之间有一个约 1 nm 宽的裂缝, 从而在亚结构域 IIA 和 IIIA 处形成两类主要的结合位点 I (SudlowI) 和结合位点 II (SudlowII), 结合位点 I 位于亚结构域 IIA 的凹穴中.³⁷ 该凹穴内壁由一些氨基酸残基的憎水侧链形成, 其中包括 Trp-213、Leu-218、Phe-222、Leu-233、Leu-237、Leu-259、Ala-260、Ile-289、Ala-290 等, 凹穴开口处环绕着碱性氨基酸残基 Arg-256、Lys-221、Arg-217、Arg-198、Arg-194、His-241、Arg-217 等.³⁸ 在 pH=7.4 的介质中, 凹穴开口处带正电荷, 是阴离子的主要结合位点.³⁸ 所以, 当 SDS 在 BSA 上开始结合时, SDS 非极性的烷基链结合在 BSA 内腔中的 Trp-213 附近位置, 并且逐渐形成聚集体, 从而导致 Trp 残基所处的微环境的极性逐渐减弱.^{17,21} 但此时 BSA 的构象还没有发生明显变化, Phe 和 Tyr 残基所处微环境的极性以及芘的 I_1/I_3 都保持基本不变.

(3) 当 SDS 浓度介于 $4.0 \times 10^{-4} \sim 4.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ν 从 14 迅速增大到 120, 说明此时 SDS 与 BSA 发生了显著的协同结合作用.^{7,10} 由于 $\lambda_{UV,Trp}$ 和 $\lambda_{flu,Trp}$ 基本保持不变, Trp 残基所处微环境的极性基本不变,^{21,29} 所以 SDS 非极性的烷基链结合在 BSA 内腔中 Trp-

表 1 25 °C 时 BSA 与 SDS 相互作用过程中的有关参数

Table 1 Parameters for the interaction between BSA and SDS at 25 °C

Stage	$c_{SD}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	ν	$\lambda_{UV,Trp}/\text{nm}$	$\lambda_{UV,Tyr}/\text{nm}$	$\lambda_{UV,Phe}/\text{nm}$	$\lambda_{flu,Trp}/\text{nm}$	I_1/I_3
1	$1.0 \times 10^{-5} \sim 3.0 \times 10^{-5}$	0-1	~289.4	~278.7	~268.9	~349	~1.32
2	$3.0 \times 10^{-5} \sim 4.0 \times 10^{-4}$	1-14	289.4-290.8	~278.7	~268.9	349-330	~1.32
3	$4.0 \times 10^{-4} \sim 4.0 \times 10^{-3}$	14-120	~290.8	278.7-276.6	~268.9	~330	1.32-1.07
4	$4.0 \times 10^{-3} \sim 0.01$	120-302	~290.8	276.6-277.0	268.9-268.7	~330	~1.07
5	0.01-0.06	~302	~290.8	~277.0	~268.7	~330	~1.07

图7 BSA结构示意图

Fig.7 Scheme of structure of BSA

The structure was obtained from the Protein Data Bank (ID code 3V03) and prepared using PyMOL software.

213附近形成的聚集体基本已达饱和。¹⁷但是, $\lambda_{UV,Tyr}$ 由278.7 nm减小到276.6 nm, Tyr残基所处微环境的极性显著增强, 芘的 I_1/I_3 由1.32降为1.07, 芘分子逐渐处于极性更小的非极性微环境中。²⁶这是由于 Trp-213残基附近已达饱和的SDS聚集体的形成影响到IIA和IIIA之间界面非极性基团间的堆积作用,³⁷致使BSA由结构域II区开始逐渐展开,¹²并首先暴露出更多侧链极性较大的氨基酸残基(如Tyr残基等)于溶剂中,¹⁷从而导致Tyr残基所处微环境的极性逐渐增强。同时, 芘分子进入到已展开的BSA大分子极性更小的非极性微区中, 引起芘的 I_1/I_3 逐渐降低。但是此阶段 $\lambda_{UV,Phe}$ 几乎没有变化, 侧链极性较小的Phe残基所处微环境的极性变化很小, 其仍主要处在BSA的非极性微区中。¹⁷

(4)当SDS浓度介于 $4.0 \times 10^{-3} - 1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ν 从120增大到302左右达到饱和(前述3.1节)。该阶段中 $\lambda_{UV,Trp}$ 和 $\lambda_{flu,Trp}$ 基本还保持不变, Trp残基所处微环境的极性几乎不变, Trp-213残基附近SDS聚集体仍处于饱和状态。^{6,21}芘的 I_1/I_3 也基本保持不变, 芘分子已处于相对比较稳定的非极性微区中。²⁶但是, 随着 ν 的进一步增大, $\lambda_{UV,Tyr}$ 由276.6 nm增大至277.0 nm, Tyr残基微环境的极性反而稍有减弱。这可能是由于SDS在Tyr残基附近的结合取代了其周围的部分溶剂水分子或电解质离子, 甚至形成了聚集体, 从而导致Tyr残基微环境的极性稍有减弱。 $\lambda_{UV,Phe}$ 由268.9 nm减小至268.7 nm, Phe残基所处微环境的极性稍有增强, 说明此阶段BSA仍在进一步展开, 更

多的Phe残基逐渐暴露于溶剂中。

(5)当SDS浓度大于 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $\lambda_{UV,Trp}$ 、 $\lambda_{UV,Tyr}$ 、 $\lambda_{UV,Phe}$ 、 $\lambda_{flu,Trp}$ 以及芘的 I_1/I_3 几乎均不再变化, Trp、Tyr和Phe残基所处微环境的极性几乎不变, SDS在BSA上的结合已基本达到饱和, BSA展开后的构象趋于稳定,¹² SDS浓度的进一步增大只影响溶液中自由胶束的形成。³⁹

4 结论

通过电动势法、四阶导数紫外光谱法并结合BSA内源荧光和芘荧光探针法的研究发现, 在25 °C、pH=7.40、离子强度 $I=0.0131 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲溶液中, 当BSA浓度为 $1.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 随着SDS浓度的逐渐增大, SDS在BSA上的平均结合数 ν 不断增大, 不同类型芳香族氨基酸残基所处微环境的极性变化各不相同, BSA大分子逐渐展开。当SDS浓度小于 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, ν 由0缓慢增大到14。在此阶段, SDS主要结合在BSA位于IIA结构域的Trp-213附近位置, Trp残基所处微环境的极性逐渐减弱。当SDS浓度大于 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Trp-213附近形成的SDS的聚集体诱导BSA由IIA结构域开始逐渐展开, Tyr残基所处微环境的极性明显增强, 同时暴露出更多的结合位点, SDS呈正协同结合的特点在BSA上结合, ν 急剧增大到120。当SDS浓度大于 $4.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SDS在BSA上进一步的协同结合, 使Tyr残基所处微环境的极性稍有减弱, 同时BSA继续不断展开, Phe残基所处微环境的极性稍有增强。当SDS浓度达到约 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SDS在BSA上的结合基本达到饱和, ν_{sat} 约为302, 各芳香族氨基酸残基微环境的极性均不再变化, BSA构象保持基本稳定。

References

- (1) Jones, M. N.; Skinner, H. A.; Tipping, E. *Biochem. J.* **1975**, *147*, 229.
- (2) Takeda, K.; Miura, M.; Takagi, T. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *82*, 38. doi: 10.1016/0021-9797(81)90121-1
- (3) Dixit, N.; Zeng, D. L.; Kalonia, D. S. *Int. J. Pharm.* **2012**, *439*, 317. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.09.013
- (4) Ge, Y. S.; Tai, S. X.; Xu, Z. Q.; Lai, L.; Tian, F. F.; Li, D. W.; Jiang, F. L.; Liu, Y.; Gao, Z. N. *Langmuir* **2012**, *28*, 5913. doi: 10.1021/la204212s
- (5) Pi, Y.; Shang, Y.; Peng, C.; Liu, H.; Hu, Y.; Jiang, J. *Biopolymers* **2006**, *83*, 243.
- (6) De, S.; Girigoswami, A.; Das, S. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**,

- 285, 562. doi: 10.1016/j.jcis.2004.12.022
- (7) Blanco, E.; Messina, P.; Ruso, J. M.; Prieto, G.; Sarmiento, F. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 11369. doi: 10.1021/jp060795h
- (8) Peyre, V.; Lair, V.; André, V.; Maire, G.; Kragh-Hansen, U.; Maire, M.; Möller, J. V. *Langmuir* **2005**, *21*, 8865. doi: 10.1021/la0507232
- (9) Rafati, A. A.; Ghasemian, E. *J. Mol. Liq.* **2009**, *144*, 131. doi: 10.1016/j.molliq.2008.10.010
- (10) Bordbarb, A. K.; Taheri-Kafrani, A. *Colloids Surf. B* **2007**, *55*, 84. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.11.012
- (11) Kurawaki, J.; Kusumoto, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *225*, 265. doi: 10.1006/jcis.2000.6762
- (12) Anand, U.; Jash, C.; Mukherjee, S. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 15839. doi: 10.1021/jp106703h
- (13) Zhou, T.; Ao, M.; Xu, G.; Liu, T.; Zhang, J. *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *389*, 175. doi: 10.1016/j.jcis.2012.08.067
- (14) Singh, T.; Bharmoria, P.; Morikawa, M.; Kimizuka, N.; Kumar, A. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 11924. doi: 10.1021/jp303609h
- (15) Shu, Y.; Liu, M.; Chen, S.; Chen, X.; Wang, J. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 12306. doi: 10.1021/jp2071925
- (16) Hu, M.; Wang, X.; Wang, H.; Chai, Y.; He, Y.; Song, G. *Luminescence* **2012**, *27*, 204. doi: 10.1002/bio.1333
- (17) Paul, B. K.; Samanta, A.; Guchhait, N. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 6183. doi: 10.1021/jp100004t
- (18) Chakraborty, T.; Chakraborty, I.; Moulik, S. P.; Ghosh, S. *Langmuir* **2009**, *25*, 3062. doi: 10.1021/la803797x
- (19) Gelamo, E. L.; Silva, C. H. T. P.; Imasato, H.; Tabak, M. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1594*, 84. doi: 10.1016/S0167-4838(01)00287-4
- (20) Das, S.; Sylvain, M. R.; Fernand, V. E.; Losso, J. N.; El-Zahab, B.; Warner, I. M. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *363*, 585. doi: 10.1016/j.jcis.2011.07.044
- (21) Deep, S.; Ahluwalia, J. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 4583. doi: 10.1039/b105779k
- (22) Li, Y.; Wang, X.; Wang, Y. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 8499. doi: 10.1021/jp060532n
- (23) Wang, X.; Liu, J.; Sun, L.; Yu, L.; Jiao, J.; Wang, R. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 12479. doi: 10.1021/jp307516a
- (24) Turro, N. J.; Lei, X. G. *Langmuir* **1995**, *11*, 2525. doi: 10.1021/la00007a035
- (25) Wu, D.; Xu, G.; Sun, Y.; Zhang, H.; Mao, H.; Feng, Y. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 708. doi: 10.1021/bm061033v
- (26) Vasilescu, M.; Angelescu, D. *Langmuir* **1999**, *15*, 2635. doi: 10.1021/la981424y
- (27) Su, R.; Qi, W.; He, Z.; Zhang, Y.; Jin, F. *Food Hydrocolloids* **2008**, *22*, 995. doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.05.021
- (28) Chatani, E.; Nonomura, K.; Hayashi, R.; Balny, C.; Lange, R. *Biochemistry* **2002**, *41*, 4567. doi: 10.1021/bi011365e
- (29) Fan, H.; Vitharana, S. N.; Chen, T.; O'Keefe, D.; Middaugh, C. R. *Mol. Pharm.* **2007**, *4*, 232. doi: 10.1021/mp060097h
- (30) Webb, S. D.; Cleland, J. L.; Carpenter, J. F.; Randolph, T. W. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 543.
- (31) Zhang, Y.; Deng, Y.; Lu, M.; Craig, D. Q. M.; Li, Z. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *337*, 322. doi: 10.1016/j.jcis.2009.05.056
- (32) Lee, J.; Moroi, Y. *Langmuir* **2004**, *20*, 4376. doi: 10.1021/la030433q
- (33) Wang, C.; Tam, K. C. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 5156. doi: 10.1021/jp045468t
- (34) Moriyama, Y.; Watanabe, E.; Kobayashi, K.; Harano, H.; Inui, E.; Takeda, K. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 16585. doi: 10.1021/jp8067624
- (35) Valstar, A.; Almgren, M.; Brown, W. *Langmuir* **2000**, *16*, 922. doi: 10.1021/la990423i
- (36) Ding, F.; Li, X. N.; Diao, J. X.; Sun, Y.; Zhang, L.; Sun, Y. *Chirality* **2012**, *24*, 471. doi: 10.1002/chir.v24.6
- (37) He, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, *358*, 209. doi: 10.1038/358209a0
- (38) Bujacz, A. *Acta Cryst.* **2012**, *D68*, 1278.
- (39) Santos, S. F.; Zanette, D.; Fischer, H.; Itri, R. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *262*, 400.