

# 柿子单宁对牛血清白蛋白的荧光猝灭作用研究

顾海峰<sup>1</sup>, 梁晋鄂<sup>2</sup>, 李春美<sup>1,\*</sup>, 徐玉娟<sup>1,3</sup>, 陈美红<sup>1</sup>, 胡婉峰<sup>1</sup>

(1.华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070; 2. 中国食品工业协会, 北京 100073;

3.广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省果蔬深加工重点实验室, 广东 广州 510610)

**摘 要:** 采用荧光光谱和紫外吸收光谱法研究了柿子单宁对牛血清白蛋白(BSA)的荧光猝灭作用。结果表明, 柿子单宁可以有规律地使 BSA 内源荧光猝灭, 其猝灭机理可认为是柿子单宁与 BSA 形成复合物的静态猝灭, 并获得了不同温度下柿子单宁与 BSA 作用的结合常数和热力学参数。根据所得结果可推断柿子单宁与 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柿子单宁与 BSA 结合位置的距离。

**关键词:** 柿子单宁; 牛血清白蛋白; 相互作用; 荧光猝灭

## Fluorescence Quench to Bovine Serum Albumin by Persimmon Tannin

GU Hai-feng<sup>1</sup>, LIANG Jin-e<sup>2</sup>, LI Chun-mei<sup>1,\*</sup>, XU Yu-juan<sup>1,3</sup>, CHEN Mei-hong<sup>1</sup>, HU Wan-feng<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Food Industry Associations of China, Beijing 100073, China ;

3. Sericulture and Farm Produce Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Guangdong for Deep Processing of Fruits and Vegetables, Guangzhou 510610, China)

**Abstract:** The interaction between persimmon tannin and bovine serum albumin (BSA) and the mechanism of fluorescence quench were studied by fluorescence spectroscopy and ultraviolet-visible absorption spectroscopy. The results showed that the fluorescence of BSA is quenched regularly by persimmon tannin. The binding constants and thermodynamic parameters of persimmon tannin with BSA are obtained at different temperatures. The hydrophobic interaction force and electrostatic force play a main role in the binding of persimmon tannin with BSA. The distances of binding site between persimmon tannin and BSA are also obtained according to the theory of Forster's non-radiative energy transfer.

**Key words:** persimmon tannin; bovine serum albumin (BSA); interaction; fluorescence quench

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)06-0104-04

血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白, 它能和许多内源性和外源性物质广泛结合, 携带这些物质在体内进行转运、分配和代谢。因此研究药物与血清白蛋白的相互作用对阐明药物的作用机制具有重要的理论意义。有关血清白蛋白与一些药物如芦丁、芦荟大黄素、香豆素等的相互作用有研究报道<sup>[1-3]</sup>, 但柿子单宁与血清白蛋白的相互作用未见文献报道。

柿子单宁是柿子的主要药理活性成分, 具有显著的抗病毒、解蛇毒、抗氧化等活性。本实验在生理 pH 条件下研究柿子单宁与牛血清白蛋白和人血清白蛋白之间的相互作用, 并用荧光猝灭法求得柿子单宁与蛋白配合物的形成常数, 探讨它们之间的主要作用力类型, 并根据

Forster 非辐射能量转移理论求出结合位置。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

FP-6500 荧光分光光度计(带恒温装置) 日本 JASCO 公司; UV2265 型紫外分光光度计 日本岛津公司; pH523C 型酸度计 上海雷磁仪器厂。

柿子单宁制备: 新鲜果肉去皮打浆后, 以含 1% HCl 的无水甲醇作为提取介质, 料液比 1:12, 90℃加热回流, 提取 3 次, 每次 40min。合并提取液抽滤, 将滤液过 AB-8 大孔树脂纯化后, 再经聚砜超滤膜分级得到含量为 93.4% 的缩合单宁。其结构经初步分析由表没

收稿日期: 2007-07-18

基金项目: 广东省农业科技攻关计划项目(2007A020200003-2)

作者简介: 顾海峰(1982-), 男, 硕士, 研究方向为天然产物化学。E-mail: ericwind1982@126.com

\* 通讯作者: 李春美(1973-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然活性成分化学。E-mail: lichmyl@126.com

食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(EGC)、(表)没食子儿茶素(EG)GC 及一种未知结构的单体组成的聚合物,凝胶渗透色谱法测定分子量分布为  $1.16 \times 10^4 \sim 1.54 \times 10^4$ U。

配制 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(pH7.4, 含 0.1mol/L NaCl 以维持溶液离子强度), 并以此为溶剂配制  $1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 的 BSA 标准溶液(卫生部上海生物制品研究所), 以及浓度分别为  $4.5 \times 10^{-5}$ mol/L 的柿子单宁溶液。

## 1.2 方法

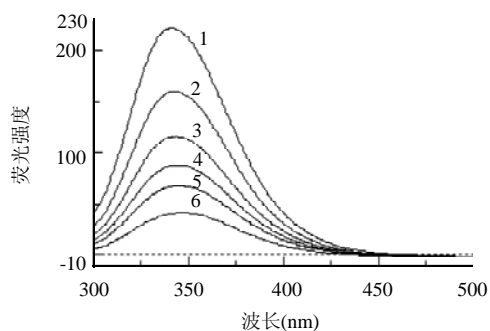
在 10ml 比色管中依次加入 2.0ml Tris-HCl 缓冲溶液, 2.0ml BSA 溶液和一定量的柿子单宁溶液, 以 Tris-HCl 缓冲溶液定容为 10ml。以 280nm 为激发波长, 激发光栅和发射光栅狭缝均为 5nm, 扫描速率为 200nm/min, 分别在 25、30、35℃ 下测定 300~500nm 的荧光发射光谱。

另用 Tris-HCl 缓冲溶液配制柿子单宁溶液, 测定其在 300~500nm 的紫外吸收光谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 柿子单宁对 BSA 荧光光谱的影响

BSA 分子中的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基能够发射荧光, 因而 BSA 是内源性荧光物质。当激发波长在 280nm 时, BSA 荧光发射峰在 340nm 附近。固定 BSA 溶液浓度不变, 向其中加入柿子单宁, 结果表明随着柿子单宁浓度的增加, BSA 内源荧光强度有规律地降低, 但发射峰位及峰形变化不大(图 1), 这说明柿子单宁对 BSA 的荧光有猝灭作用。



1~6. BSA 浓度为  $2.0 \times 10^{-6}$ mol/L, 柿子单宁浓度分别为  $4.5 \times 10^{-7}$ 、 $9.0 \times 10^{-7}$ 、 $13.5 \times 10^{-7}$ 、 $18.0 \times 10^{-7}$ 、 $22.5 \times 10^{-7}$ mol/L。

图 1 不同浓度柿子单宁对 BSA 荧光发射光谱的影响

Fig.1 Effects of concentration of persimmon tannin on fluorescence emission spectrum of BSA

### 2.2 荧光猝灭机理

荧光猝灭的类型一般分为动态猝灭(又称碰撞猝灭)和静态猝灭两种<sup>[4]</sup>。若柿子单宁对 BSA 的猝灭归因于分子碰撞引起的动态猝灭, 则应符合 Stern-Volmer 方程<sup>[5-6]</sup>:

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

式中,  $F_0$  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;  $\tau_0$  为猝灭剂不存在时荧光分子平均寿命, 对 BSA 来说, 其  $\tau_0$  约为 6.2ns<sup>[7]</sup>;  $k_q$  为动态荧光猝灭速率常数;  $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 猝灭常数,  $K_{sv} = k_q \tau_0$ 。

若此过程为静态猝灭, 则应符合 Lineweaver-Burk 方程<sup>[5-6]</sup>:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K^{-1} F_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (2)$$

式中,  $K$  为柿子单宁与 BSA 结合常数。

根据不同温度下蛋白质荧光猝灭光谱, 绘制  $F_0/F - [Q]$  的 Stern-Volmer 关系图, 如图 2 所示。

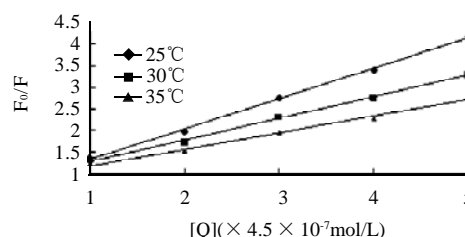


图 2 柿子单宁对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Fig.2 Stern-Volmer figure of persimmon tannin on fluorescence quenching to BSA

根据不同温度下蛋白质荧光猝灭光谱, 绘制  $(F_0 - F)^{-1} - [Q]^{-1}$  的双倒数 Lineweaver-Burk 图, 如图 3 所示。

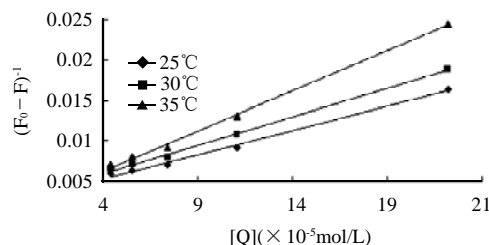


图 3 柿子单宁对 BSA 荧光猝灭的 Lineweaver-Burk 图

Fig.3 Lineweaver-Burk figure of persimmon tannin on fluorescence quenching to BSA

由图 2、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、3 及式(1)、(2)、(3)可分别得出不同温度下柿子单宁与 BSA 相互作用的  $K_{sv}$ 、 $k_q$  和  $K$  值(表 1)。

表 1 不同温度下柿子单宁与 BSA 相互作用常数

Table 1 Interaction constants of persimmon tannin and BSA at different temperatures

T (°C)	$K_s$ (L/mol)	$k_q$ (L/mol · s)	$K$ (L/mol)	$R^2$ (Lineweaver-Burk)	$R^2$ (Stern-Volmer)
25	$8.44 \times 10^5$	$1.36 \times 10^{13}$	$8.44 \times 10^5$	0.9945	0.9978
30	$6.89 \times 10^5$	$1.11 \times 10^{13}$	$6.99 \times 10^5$	0.9978	0.9980
35	$5.04 \times 10^5$	$0.81 \times 10^{13}$	$5.04 \times 10^5$	0.9977	0.9940

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  $2.0 \times 10^{10} \text{L/mol} \cdot \text{s}^{[2]}$ 。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、3 和表 1 可看出, 随着温度升高, 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  $k_q$  值远远大于最大散射碰撞猝灭速率常数, 表明柿子单宁对 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猝灭, 且两者结合常数为  $10^5$  量级, 表明柿子单宁与 BSA 作用属于极强范围<sup>[1]</sup>。

### 2.3 柿子单宁与 BSA 络合的热力学性质

小分子与蛋白质等生物大分子之间的作用力包括氢键、范德华力、静电引力、疏水作用力等。当温度变化不太大时, 反应的焓变可看作一个常数。由方程式(4)、(5)可分别计算出反应焓变  $\Delta H$ , 吉布斯自由能变  $\Delta G$  和熵变  $\Delta S$ 。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K \quad (5)$$

表 2 柿子单宁与 BSA 相互作用热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters of interaction of persimmon tannin and BSA

T(°C)	$\Delta H(\text{kJ/mol})$	$\Delta S(\text{J/mol} \cdot \text{K})$	$\Delta G(\text{kJ/mol})$
25	-29.02	16.07	-33.81
30		16.11	-33.90
35		14.94	-33.62

将表 1 中数据代入式(4)、(5)可求得柿子单宁与 BSA 结合的热力学参数(表 2)。 $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S > 0$  表明柿子单宁与 BSA 的结合是一个放热反应, 熵增加是该作用过程的主要热力学驱动因素。在水溶液中, 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<sup>[8]</sup>。因此初步判断柿子单宁与 BSA 之间主要由疏水作用力和静电作用力相结合。

### 2.4 柿子单宁与 BSA 结合位点数

设生物大分子有  $n$  个相同且独立的结合位置, 与则有  $nQ + P \rightleftharpoons QnP$ 。式中  $P$  为荧光生物大分子;  $Q$  为猝灭剂分子;  $QnP$  为生成物, 其生成常数为  $K$ 。若荧光体总浓度  $[P_0] = [QnP] + [P]$  ( $[P]$  为游离荧光体浓度), 则有  $[QnP] = [P_0] - [P]$ 。在静态猝灭中, 荧光体的荧光强度与

其游离浓度成正比。

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg [Q] \quad (6)$$

通过其斜率和截距计算得柿子单宁与 BSA 的结合位点数  $n$  为 0.99。

### 2.5 柿子单宁与 BSA 作用距离的计算

图 4 表明 BSA 的荧光光谱图和柿子单宁的紫外吸收光谱图有较大程度重叠。根据 Forster 偶极-偶极非辐射能量转移理论<sup>[9-10]</sup>, 当化合物满足以下条件时, 将发生非辐射能量转移: 供能体发射荧光; 供能体的荧光发射与受能体的吸收光谱有足够的重叠; 供能体与受能体足够接近, 最大距离不超过 7nm。能量转移效率与给体和受体间的距离  $r$  及临界能量转移距离  $R_0$  有关, 给体与受体间能量转移效率可由式(7)计算。

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

式中,  $R_0$  是转移效率为 50% 时的临界距离;  $r$  为给体-受体距离。

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

式中,  $K^2$  为偶极空间取向因子;  $n$  为介质的折射指数;  $\phi$  为给体的荧光量子产率;  $J$  为给体的荧光发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠积分。

$$J = \int (F_\lambda \cdot \epsilon_\lambda \cdot \lambda^4 \cdot d\lambda) / \int (F_\lambda \cdot d\lambda) \quad (9)$$

式中,  $F_\lambda$  为荧光给体在波长  $\lambda$  时的荧光强度;  $\epsilon_\lambda$  为受体在波长  $\lambda$  时的摩尔吸光系数。

能量转移效率可式(10)计算。

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

BSA 的内源荧光主要由色氨酸残基产生, 在实验条件下  $K^2 = 2/3$ ,  $\phi = 0.15$ ,  $n = 1.336$ <sup>[11]</sup>。将图 4 中 BSA 的荧光光谱图和柿子单宁的紫外吸收光谱图重叠部分(阴影部分)分割成极小的矩形面积按式(9)求和, 得光谱的重叠积分  $J = 2.998 \times 10^{-15} \text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$ 。上述实验条件下, 将上述数值代入式(8), 求得  $R_0 = 2.09 \text{nm}$ ; 再由式(10)求出能量转移效率(柿子单宁浓度为  $2.25 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ )为  $E = 0.8179$ ; 最后由式(7)求得 BSA 色氨酸残基与柿子单宁的作用距离为  $r = 1.63 \text{nm}$ 。从计算结果可以看出,  $R_0$  和  $r$  皆小于 7nm, 说明柿子单宁与 BSA 作用过程中发生了非

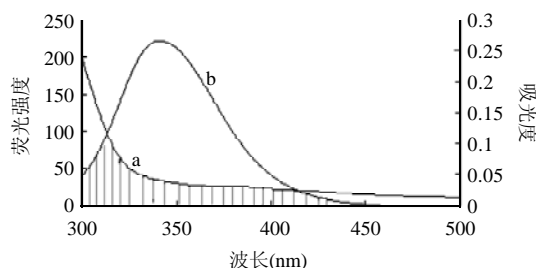


图 4 BSA 荧光光谱(a)与柿子单宁紫外吸收光谱(b)重叠图

Fig.4 Overlapping of fluorescence spectrum of BSA (a) with UV absorption spectrum of persimmon tannin (b)

辐射能量转移, 两者形成了复合物, 且结合紧密。同时也进一步说明了柿子单宁对 BSA 的荧光猝灭属于静态猝灭机理。

### 3 结 论

柿子单宁可以和 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, 柿子单宁与 BSA 之间主要由疏水作用力和静电作用力相结合, 说明 BSA 可以携带柿子单宁在体内进行转运、贮存和分配。对柿子单宁与 BSA 及人血清白蛋白等其他相关蛋白结合的化学表征还有待于进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 王敬政, 贺吉香, 江崇球. 芦荟大黄素与血清白蛋白的相互作用[J]. 分析化学, 2001, 29(7): 782-784.
- [2] 原华平, 关洪亮, 顾青, 等. 硫唑嘌呤与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究[J]. 分析试验室, 2006, 25(3): 81-85.
- [3] 俞天智, 杨汝栋. 芦丁与血清白蛋白的作用研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(4): 763-765.
- [4] 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.
- [5] JIANG M, XIE M X, ZHENG D. 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.
- [6] 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.
- [7] GELAMOA E L, SILVA C, TMASATO H, et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modeling[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1594: 84-99.
- [8] LIU J Q, TIAN J N, HE J P. Spectrofluorimetric study of the binding of daphnetin to bovine serum albumin[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 35: 671-677.
- [9] CUI F L, FAN J, LI J P. Interactions between 1-benzoyl-4-p-chlorophenyl thiosemicarbazide and serum albumin investigation by fluorescence spectroscopy[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2004, 12: 151-157.
- [10] 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.
- [11] QU S S, LIU Y, WANG T Z. Thermodynamics of binding of cadmium to bovine serum albumin [J]. Chemosphere, 2002, 46: 1211-1214.