

文章编号: 1000-7032(2015)12-1458-06

硝基羟乙唑与溶菌酶反应机制的荧光光谱研究

刘保生*, 韩 荣, 李志云, 李彤彤, 李改霞

(河北大学化学与环境科学学院 河北省分析科学技术重点实验室, 河北 保定 071002)

摘要: 分别在 298, 310, 318 K 温度下, 利用荧光光谱法研究了 pH = 7.40 生理条件下硝基羟乙唑 (TRI) 与溶菌酶 (LYSO) 的相互作用机理。结果表明, TRI 与 LYSO 间通过静态猝灭方式相互作用。测定了 LYSO 与 TRI 反应的结合常数、结合位点数。利用反应过程的热力学参数, 确定了 LYSO-TRI 体系的作用力类型; 由 Hill 系数得出了 LYSO 或 TRI 的协同性; 根据非辐射能量转移理论, 确定了 TRI 到 LYSO 的结合距离, 同时采用同步光谱法考察了 TRI 对 LYSO 构象的影响。

关键词: 荧光光谱法; 同步光谱法; 溶菌酶; 硝基羟乙唑; 反应机理

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

DOI: 10.3788/fgxb20153612.1458

Investigation of The Interaction Mechanism Between Lysozyme and Trichazol Using Fluorescence Spectroscopic Method

LIU Bao-sheng*, HAN Rong, LI Zhi-yun, LI Tong-tong, LI Gai-xia

(Key Laboratory of Analytical Science and Technology of Hebei Province, College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China)

* Corresponding Author, E-mail: lbs@hbu.edu.cn

Abstract: The interaction mechanism of trichazol (TRI) to lysozyme (LYSO) at different temperatures (298, 310, 318 K) was investigated using fluorescence spectroscopy under simulative physiological conditions. The results clearly demonstrated that TRI caused strong quenching of the fluorescence of LYSO by a static quenching mechanism. The binding constants were order of magnitude of 10^4 and the number of binding site in the interaction was closed to 1. The thermodynamic parameters of LYSO-TRI system were determined as follows; negative ΔH and positive ΔS , which indicated that electrostatic interaction played a major role in the binding reaction. The effect of cooperative binding of TRI was quantified by Hill's coefficient (n_H) and the values of n_H were slightly more than 1 in the systems, which indicated weakly positive cooperativeness in the interaction of TRI with LYSO. The binding distance (r) between TRI and LYSO was obtained based on the Förster nonradioactive resonance energy transfer and r was less than 7 nm. Furthermore, the effect of TRI on the conformation of LYSO was analyzed by using the synchronous fluorescence spectroscopy.

Key words: fluorescence spectroscopy; synchronous fluorescence spectroscopy; lysozyme; trichazol; interaction mechanism

1 引言

溶菌酶(lysozyme, LYSO)^[1]是一种广泛存在于生物体内唾液、眼泪、血液、淋巴组织等部位的免疫球蛋白, 单体分子的多肽链由 129 个氨基酸残基组成, 包括 6 个色氨酸残基(Trp 28、Trp 62、Trp 63、Trp 108、Trp 111 和 Trp 123)、3 个酪氨酸(Tyr)残基和 4 对二硫键来维持构型。另外, LYSO 一个重要的功能就是可以运载小分子物质^[2], 通过与药物小分子的结合作用达到治愈疾病的效果。

硝基羟乙唑(TRI)^[3]是现今结构简单并且应用广泛的抗厌氧菌的药物, 主要用于治疗拟杆菌、弯曲杆菌、梭状芽孢杆菌等厌氧菌感染的治疗。目前关于 LYSO 的研究较多, 但没有报道过与 TRI 作用机制的研究。本文通过荧光光谱法、同步光谱法来研究 TRI 和 LYSO 的相互作用信息及 TRI 对 LYSO 构象的影响, 为更好地了解药物在体内的输送和作用机制提供了重要信息。

2 实验

2.1 仪器与试剂

实验仪器: 日本 SHIMADZU 制作所的 RF-5301PC 荧光分光光度计和 UV-265 紫外可见分光光度计; 上海雷磁仪器厂的 pH S-3C 型精密酸度计; 南京桑力电子设备厂的 SYC-15_B 型超级恒温水浴。

试剂: 溶菌酶(LYSO, 美国 Sigma 公司, 纯度 ≥99%) 配成浓度为 2.0×10^{-5} mol/L 的储蓄液; 硝基羟乙唑(TRI) 标准品(美国 Sigma 公司, 纯度 ≥99%) 配成 1.0×10^{-3} mol/L 的储蓄液, 用时依次稀释; Tris-HCl 缓冲溶液(内含 0.15 mol/L NaCl, pH = 7.40)。实验用水为二次蒸馏水, 溶液于 4 °C 冰箱保存。TRI 的结构式如图 1 所示。

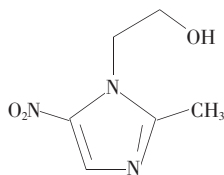


图 1 硝基羟乙唑的结构式

Fig. 1 Chemical structure of TRI

用“内滤光效应”公式^[4]对实验所测荧光强度进行校正:

$$F_{\text{cor}} = F_{\text{obs}} \times e^{(A_{\text{ex}}+A_{\text{em}})/2}, \quad (1)$$

校正后和观察到的 LYSO-TRI 体系荧光强度用 F_{cor} 和 F_{obs} 表示, TRI 在激发和发射波长处的吸光度值用 A_{ex} 和 A_{em} 表示。

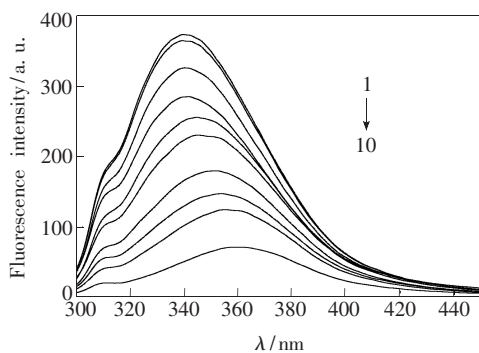
2.2 实验步骤

在 298, 310, 318 K 下, 在一系列 10 mL 比色管中依次加入 1.0 mL 的 Tris-HCl 缓冲溶液、0.2 mL 浓度为 2.0×10^{-5} mol/L 的 LYSO 溶液及不同浓度的 TRI 溶液, 定容、摇匀, 水浴静置 20 min。激发波长 $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm 或 295 nm, 狭缝宽度 5 nm, 扫描 LYSO-TRI 体系的荧光光谱。同时固定波长差 $\Delta\lambda = 15$ nm 以及 $\Delta\lambda = 60$ nm, 记录 LYSO-TRI 体系的同步荧光光谱。

3 结果与讨论

3.1 LYSO-TRI 体系的荧光猝灭光谱

TRI 对 LYSO 的荧光猝灭见图 2 ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm 时的谱图与其类似)。由图 2 可知, TRI 能够猝灭 LYSO 的荧光且 LYSO 发射峰红移 20 nm, 表明 TRI 与 LYSO 作用生成复合物^[5]。



$$C_{\text{LYSO}} = 4.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}; 1 \sim 10; C_{\text{TRI}} = (0, 0.2,$$

$$1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 13, 18) \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

图 2 LYSO-TRI 体系的荧光发射光谱 ($T = 298$ K, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm)

Fig. 2 Fluorescence emission spectra of LYSO-TRI system ($T = 298$ K, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm)

将实验数据用 Stern-Volmer 方程^[6]处理:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [L] = 1 + K_{\text{sv}} [L], \quad (2)$$

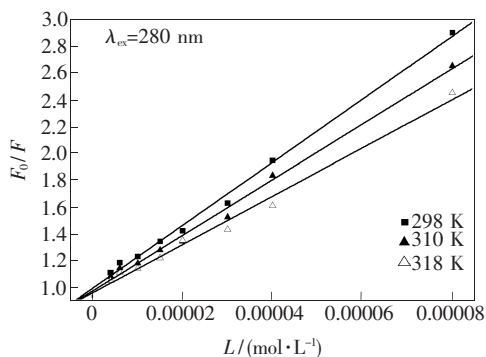
式中 F_0 、 F 分别为无、有 TRI 时的荧光强度; τ_0 为分子荧光平均寿命, 约为 10^{-8} s; K_{sv} 为 Stern-Volmer 猝灭常数; $[L]$ 为 TRI 的浓度; K_q 为猝灭速率常数。所得数据列于表 1。LYSO-TRI 体系的 Stern-Volmer 曲线见图 3, 可以看出, LYSO 的相对荧光强度 F_0/F 和猝灭剂 TRI 浓度呈现良好的线

表 1 不同温度下 TRI 与 LYSO 的猝灭反应参数

Table 1 Quenching reactive parameters of TRI and LYSO at different temperatures

$\lambda_{\text{ex}}/\text{nm}$	T/K	$K_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{\text{sv}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	r_1	$K_a/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	r_2
280	298	2.35×10^{12}	2.35×10^4	0.997 8	1.78×10^4	1.05	0.994 5
	310	2.01×10^{12}	2.01×10^4	0.994 3	1.51×10^4	1.01	0.993 4
	318	1.80×10^{12}	1.80×10^4	0.999 2	1.35×10^4	0.99	0.992 7
295	298	2.34×10^{12}	2.34×10^4	0.998 3	1.76×10^4	1.03	0.994 7
	310	1.99×10^{12}	1.99×10^4	0.992 4	1.50×10^4	1.01	0.993 6
	318	1.79×10^{12}	1.79×10^4	0.995 6	1.34×10^4	0.96	0.997 8

r_1 为方程 $F_0/F-[L]$ 的线性相关系数; r_2 为方程 $\log(F_0-F)/F-\log\{[D_1]-n[B_1](F_0-F)/F_0\}$ 的线性相关系数。



$$C_{\text{LYSO}} = 4.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$$

$$C_{\text{TRI}} = 4.0 \times 10^{-6} \sim 8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

图 3 不同温度时的 TRI 对 LYSO 的荧光猝灭 Stern-Volmer 曲线

Fig. 3 Stern-Volmer plots for the quenching of LYSO by TRI at different temperatures

性关系,线性相关系数达到了 0.99 以上。曲线斜率即 K_{sv} 值列于表 1。由表 1 可知, K_{sv} 随着温度的升高而减小及 K_q 值均大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ^[7], 都表明 TRI 对 LYSO 的猝灭过程是由反应生成复合物而引起的静态猝灭过程^[8]。对该过程,用公式(3)^[9]处理实验所得数据:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = n \log K_a +$$

$$n \log \left\{ [D_1] - n \frac{F_0 - F}{F_0} [B_1] \right\}, \quad (3)$$

式中 $[D_1]$ 、 $[B_1]$ 分别为 TRI 和 LYSO 的总浓度。由曲线截距、斜率,可得到结合常数 K_a 及位点数 n 值,结果列于表 1。由表 1 可知,LYSO-TRI 体系结合位点数 n 约为 1,即 TRI 与 LYSO 形成 1:1 的复合物;体系的结合常数 K_a 随温度的升高而降低,进一步表明 TRI 与 LYSO 相互作用方式为静态猝灭^[10]。

3.2 LYSO-TRI 体系作用力类型

LYSO-TRI 体系的作用力类型可以由 LYSO 与 TRI 反应的热力学参数进行推断,热力学参数由公式(4)、(5)^[11]得出:

$$R \ln K = \Delta S - \Delta H/T, \quad (4)$$

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

温度范围变化较小时,反应的焓变 ΔH 可以看作定值^[12], ΔH 可以由 $R \ln K$ 对 T^{-1} 作图得到。为了增加 ΔH 的准确度,我们又测定了 293 K 和 303 K 两个温度的结合常数(实验步骤同 2.2 节),计算结果见表 2。由表 2 可知,反应过程中的 $\Delta G < 0$,表明 LYSO 与 TRI 的结合反应是自发的; $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$,表明 LYSO 与 TRI 的结合以静电作用力为主^[13]。

表 2 不同温度下 LYSO-TRI 体系的热力学参数 ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$)Table 2 Thermodynamic parameters of LYSO-TRI at different temperatures ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$)

T/K	$K_a/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	r_3	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
293	1.95×10^4			44.01	-24.06
298	1.78×10^4			43.90	-24.25
303	1.63×10^4	-11.17	0.997 1	43.78	-24.43
310	1.51×10^4			43.98	-24.80
318	1.35×10^4			43.95	-25.14

r_3 为方程 $R \ln K - T^{-1}$ 的线性相关系数

3.3 药物协同性

蛋白质与配体结合的协同性定量分析一般用 Hill 系数 n_H 表现出来^[14]:

$$\lg \frac{Y}{1-Y} = \lg K + n_H \lg [L], \quad (6)$$

其中, K 为结合常数, Y 为结合饱和分数, n_H 为 Hill 系数。

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{Q}{Q_m - Q}, \quad (7)$$

在荧光实验中:

$$Q = \frac{F_0 - F}{F_0}, \quad (8)$$

式中, $1/Q_m$ 为以 $1/Q$ 对 $1/[L]$ 作图的截距。计算结果列于表 3。由表 3 可知: 温度分别在 298, 310, 318 K 时, n_H 值都略大于 1, 表明 TRI 与 LYSO 反应后, 促进了后继配体与 LYSO 的作用, 但这种效应很微弱, 即存在较弱的正协同作用; 并且随温度的升高, 这种正协同效应依次减弱, 说明后继配体随着温度的升高较难与 LYSO 结合, 结合常数也就随着减小^[15]。

表 3 不同温度下 LYSO-TRI 体系的 Hill 系数 n_H ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$)

Table 3 Hill coefficient of LYSO-TRI systems at different temperatures ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$)

T/K	n_H	r_4
298	1.153	0.995 4
310	1.132	0.996 7
318	1.064	0.993 8

r_4 为方程 $\lg[Y/(1-Y)] - \lg[L]$ 的线性相关系数

3.4 LYSO-TRI 体系的结合距离

根据 Förster 非辐射能量转移理论, 能量供体 LYSO 与能量受体 TRI 间距离 r 、能量转移效率 E 和 E 是 50% 时的临界能量转移距离 R_0 之间的关系^[16]:

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6), \quad (9)$$

$$R_0^6 = 8.78 \times 10^{-25} K^2 \Phi N^{-4} J, \quad (10)$$

$$J = \frac{\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda}{\sum F(\lambda) \Delta\lambda}, \quad (11)$$

式中, F_0 为 LYSO 的荧光强度; F 为 LYSO 和 TRI 浓度为 1:1 的荧光强度; K^2 是取向因子, 取 LYSO 和 TRI 各向随机分布的平均值 2/3; N 为溶剂水

的折射率, 取有机物和水的平均值为 1.336; Φ 为没有 TRI 存在时 LYSO 的荧光量子产率, 取 LYSO 中 Trp 的量子产率 0.15; LYSO 的荧光发射光谱和 TRI 的紫外吸收光谱见图 4, 阴影部分即重叠积分 J ; $F(\lambda)$ 、 $\varepsilon(\lambda)$ 分别为在波长 λ 处 LYSO 的荧光强度和 TRI 的摩尔吸光系数。由公式计算得到的 E 、 J 、 R_0 、 r 列于表 4。从表 4 可知 $r < 7 \text{ nm}$, 说明 LYSO 与 TRI 间存在非辐射能量转移, 使 LYSO 与 TRI 更容易发生能量的传递^[17]; 随着体系温度的升高, 能量转移效率 E 减小且结合距离 r 增大, 使得体系生成的 LYSO-TRI 复合物的稳定性降低, 结合常数减小。这进一步说明 TRI 与 LYSO 之间通过静态猝灭方式相互作用^[18]。

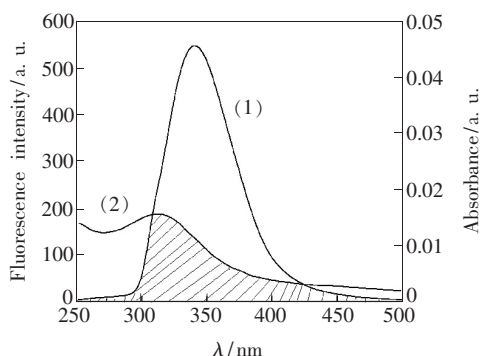


图 4 LYSO 的荧光发射光谱 ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$) (1) 和 TRI 的紫外吸收光谱 (2), $T = 298 \text{ K}$, $C_{\text{TRI}} = C_{\text{LYSO}} = 8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 。

Fig. 4 Overlap of the fluorescence emission spectrum of LYSO ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$) (1) and the absorption spectrum of TRI (2). $T = 298 \text{ K}$, $C_{\text{TRI}} = C_{\text{LYSO}} = 8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$.

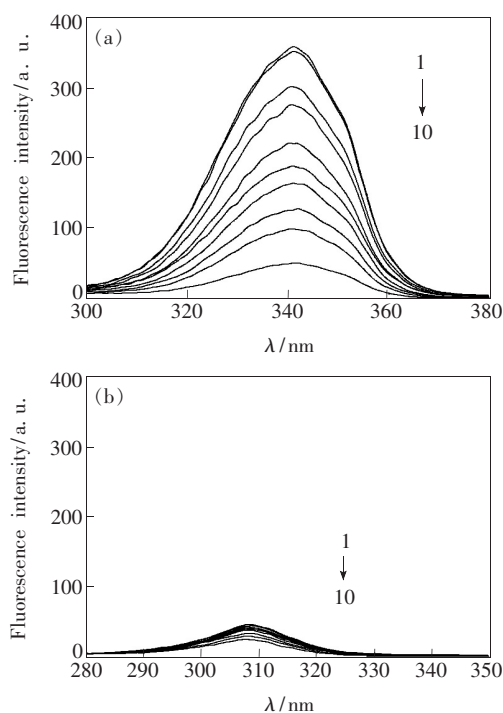
表 4 不同温度下 LYSO 与 TRI 之间的结合参数

Table 4 Binding parameters between LYSO and TRI at different temperatures

T/K	$E/\%$	$J/(\text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	R_0/nm	r/nm
298	3.98	6.57×10^{-15}	2.38	4.07
310	3.28	6.46×10^{-15}	2.37	4.19
318	2.66	6.23×10^{-15}	2.35	4.32

3.5 LYSO-TRI 体系的同步荧光光谱

一般来说, 同步荧光光谱可以提供蛋白质荧光团的微环境信息, 图 5 反映的就是 LYSO-TRI 体系的同步荧光光谱。对于 LYSO 而言, $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 仅反映 LYSO 中 Trp 残基的光谱信息, 即包括残基的荧光强度和极性的改变, 而 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 反



$C_{\text{LYSO}} = 4.0 \times 10^{-7}$ mol/L; $1 \sim 10: C_{\text{TRI}} = (0, 0.2, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10, 13, 18) \times 10^{-5}$ mol/L

图 5 LYSO-TRI 体系的同步荧光光谱。(a) $\Delta\lambda = 60$ nm; (b) $\Delta\lambda = 15$ nm。

Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra of LYSO-TRI system. (a) $\Delta\lambda = 60$ nm. (b) $\Delta\lambda = 15$ nm.

映的是 LYSO 中 Tyr 残基的光谱信息^[19]。当 $\Delta\lambda = 60$ nm 时, LYSO-TRI 体系的 Trp 残基的荧光强度随 TRI 浓度的升高而减少, 进一步表明 TRI 猝灭了 LYSO 的荧光; 但当 $\Delta\lambda = 15$ nm 时, 体系的 Tyr 荧光强度基本不变, 这说明 TRI 作用于 LYSO 时, Trp 残基几乎不参与体系的反应。另外, 由图 5 可知发射峰位置未发生位移, 说明 TRI 对 LYSO 的作用并没有改变 Trp、Tyr 残基所处的微环境的极性, 也就是说 LYSO 的构象并没有发生改变^[20]。

4 结 论

TRI 以静态猝灭方式与 LYSO 作用并伴有非辐射能量转移, TRI 与 LYSO 反应的结合常数均为 10^4 数量级, 结合位点数约为 1, 表明它们相互作用形成 1:1 复合物。TRI 与 LYSO 间以静电作用力相互结合, 并且结合过程中 TRI 对后继配体有较弱的正协同效应。该机制研究有助于了解溶菌酶作为一种模型蛋白与药物小分子的作用机理, 有助于了解药物在体内的运输和代谢过程, 为药物的动力学和临床医学研究提供了重要信息。

参 考 文 献:

- [1] Krishnamoorthy S, Shanmugam A, Malaichamy I. Probing the binding interaction of thionine with lysozyme: A spectroscopic and molecular docking investigation [J]. *Dyes Pigments*, 2015, 112:210-219.
- [2] Wang Z, Li D J, Jin J. Study on the interaction of puerarin with lysozyme by spectroscopic methods [J]. *Spectrochim. Acta A*, 2008, 70(4):866-870.
- [3] Li X Y. Interaction of metronidazole with bovine serum albumin by using fluorescence and resonance light scattering spectra [J]. *Acta Phys. Chim. Sinica* (物理化学学报), 2007, 23(2):262-267 (in Chinese).
- [4] Wang Q, He J W, Yan J, et al. Spectroscopy and docking simulations of the interaction between lochnericine and bovine serum albumin [J]. *Luminescence*, 2015, 30(2):240-246.
- [5] Teng Y, Ji F Y, Li C, et al. Interaction mechanism between 4-aminoantipyrine and the enzyme lysozyme [J]. *J. Lumin.*, 2011, 131(12):2661-2667.
- [6] Wang W P, Min W N, Chen J R, et al. Binding study of diprophylline with lysozyme by spectroscopic methods [J]. *J. Lumin.*, 2011, 131(4):820-824.
- [7] Paramaguru G, Kathiravan A, Selvaraj S, et al. Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 175(1-3):985-991.
- [8] Zhu J F, Li D G, Wu L M, et al. Binding analysis of farrerol to lysozyme by spectroscopic methods [J]. *Spectrochim. Acta A*, 2007, 68(2):354-359.
- [9] Ding F, Zhao G Y, Huang J L, et al. Fluorescence spectroscopic investigation of the interaction between chloramphenicol and lysozyme [J]. *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, 44(10):4083-4089.
- [10] Wang Y Q, Chen T T, Zhang H M. Investigation of the interactions of lysozyme and trypsin with biphenol A using spectroscopic methods [J]. *Spectrochim. Acta A*, 2010, 75(3):1130-1137.

- [11] Wang Y Q, Zhang H M, Zhang G C, *et al.* Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study [J]. *J. Lumin.*, 2007, 126(1):211-218.
- [12] Zhang G W, Chen X X, Guo J B, *et al.* Study on the interaction of hesperidin or icariin with lysozyme by fluorescence spectroscopy [J]. *Spectrosc. Spect. Anal.* (光谱学与光谱分析), 2009, 29(1):184-187 (in Chinese).
- [13] Xu Q, Deng D D, Cao Z J, *et al.* Interaction between serum albumin and four flavones by fluorescence spectroscopy and molecular docking [J]. *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学), 2010, 38(4):483-487 (in Chinese).
- [14] Liang H, Bian H D, Tu C Q, *et al.* Binding equilibrium study between La(III) and HSA or BSA [J]. *Chem. J. Chin. Univ.* (高等学校化学学报), 2001, 22(1):21-25 (in Chinese).
- [15] Liu B S, Yang C, Wang J, *et al.* Luminescence mechanism study of the conjugation reaction between cefpirome sulfate and bovine serum albumin [J]. *Chin. J. Lumin.* (发光学报), 2011, 32(3):293-299 (in Chinese).
- [16] Zhao X C, Liu R T, Teng Y, *et al.* The interaction between Ag^+ and bovine serum albumin: A spectroscopic investigation [J]. *Sci. Total. Environ.*, 2011, 409(5):892-897.
- [17] Wang N, Ye L, Yan F F, *et al.* Spectroscopic studies on the interaction of azelnidipine with bovine serum albumin [J]. *Int. J. Pharm.*, 2008, 351(1-2):55-60.
- [18] Li D J, Cao X X, Ji B M. Spectrophotometric studies on the interaction between myricetin and lysozyme in the absence or presence of Cu^{2+} or Fe^{3+} [J]. *J. Lumin.*, 2010, 130(10):1893-1900.
- [19] Zhang G W, Chen X X, Guo J B, *et al.* Spectroscopic investigation of the interaction between chrysin and bovine serum albumin [J]. *J. Mol. Struct.*, 2009, 921(1-3):346-351.
- [20] Hu Y Y, Xu S Q, Zhu X S, *et al.* Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses [J]. *Spectrochim. Acta A*, 2009, 74(2):526-531.



刘保生(1963 -),男,河北保定人,研究员,1992年于河北大学获得硕士学位,主要从事分子发光学理论与应用的研究。

E-mail: lbs@hbu.edu.cn