

选择性酸降解叶绿素产物分析及 与牛血清白蛋白的相互作用

唐 蕾¹, 徐 磊¹, 韩 跃¹, 邵蔚蓝², 陶冠军³, 秦 昉³

(1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

(2 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

(3 江南大学分析测试中心, 江苏 无锡 214122)

[摘要] 脱镁叶绿素 a 可以作为光敏活性剂用于光动力治疗. 从天然植物的叶绿素出发, 采用酸选择性降解、硅胶层析纯化的方法制备脱镁叶绿素 a 得到的产物经液相色谱、二极管阵列检测和质谱分析, 表明其光谱吸收和分子量均与脱镁叶绿素 a 一致. 利用荧光光度法研究了脱镁叶绿素 a 与牛血清白蛋白的相互作用, 结果表明: 脱镁叶绿素 a 与牛血清白蛋白形成 1:1 的配合物, 结合常数为 $5.0 \times 10^5 \text{ L/mol}$.

[关键词] 脱镁叶绿素 a 牛血清白蛋白, 液相色谱-质谱, 荧光光谱

[中图分类号] O641.3 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)01-0084-04

Analysis of Selective Acidic Hydrolysis Product of Chlorophyll and Its Interaction With Bovine Serum Albumin

Tang Lei¹, Xu Lei¹, Han Yue¹, Shao Weilan², Tao Guanjin³, Qin Fang³

(1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(2 School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(3 Testing and Analysis Center, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract As a photosensitizer pheophorbide a (Pheide a) is used in photodynamic therapy. In this study, preparation of pheide a from a chlorophyll mixture utilizing the selective hydrolysis and silica chromatography separation was investigated. The analysis of product using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) with photodiode array detector showed that its absorption spectra and molecular weight were the same with pheide a. Its interaction with bovine serum albumin (BSA) was studied with fluorescence spectra. The results indicated that pheide a bound to BSA with a 1:1 adduct formed which caused the static fluorescence quenching of BSA. The binding constant is $5.0 \times 10^5 \text{ L/mol}$.

Key words pheophorbide a, bovine serum albumin, liquid chromatography-mass spectrometry, fluorescence spectroscopy

卟啉化合物在生物体中具有氧化还原、电子传递等作用. 近年来, 天然以及合成卟啉作为光敏治疗药物在杀伤癌细胞, 消除血液中病毒污染方面得到广泛的研究与关注^[1-3]. 卟啉化合物进入体内必然与细胞膜、蛋白质等大分子物质发生作用. 血清蛋白是血浆中最为丰富的蛋白, 含有多种可配位基团, 能与许多内源及外源性化合物结合起到存储与转运作用. 因而研究卟啉类化合物与血清蛋白质之间的相互作用将有助于了解其在血液中的存在形式及作用机制. 脱镁叶绿素 a (Pheide a) 作为天然卟啉是叶绿素降解的中间产物, 结构明确、稳定, 在红外区有较强的吸收, 光敏活性更为有效. 但是该化合物与蛋白的结合方式尚未见报道. 虽然 Pheide a 在茶叶、柑橘、老化叶中普遍存在, 但含量低, 分离困难. 通过叶绿素酶催化叶绿素

收稿日期: 2007-04-28

基金项目: 教育部工业生物技术重点实验室主任基金 (KL1B-ZR200501) 资助项目.

作者简介: 唐 蕾 (1966-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生化与分子生物学. E-mail: ltang@jiangnan.edu.cn

a水解可以得到 Pheide a 但该方法需要制备纯度较高的底物及酶液, 反应后还必须将 Pheide a 从体系中分离并进一步纯化. Hynninen 等曾根据叶绿素 a b 植醇基酸性水解能力的不同, 开发了直接从叶绿素 a b 混合物制备 Pheide a 的简便方法^[4], 但 Pheide a 纯度不足. 本文在 Hynninen 方法的基础上加以改进, 酸法水解后, 经层析分离纯化产物. 液质联用 (LC-MS) 分析表明, 产物的色谱吸收和相对分子质量均与 Pheide a 一致, 纯度达到要求. 采用荧光光谱法考察了上述 Pheide a 与牛血清白蛋白 (BSA) 的相互作用, 表明二者能够以 1:1 的形式形成复合物, 结合牢固, 并引起 BSA 的静态荧光猝灭. 该结果为研究蛋白质分子与卟啉类小分子的作用机制, 进一步了解 Pheide a 在体内的运输和分布情况提供了信息, 也为临床用药提供了一定的参考.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters Platform ZMD4000 液-质联用仪 (美国 Waters 公司); 荧光分光光度计 650-660 (日本日立公司); BSA (Sigma 公司, 99%), 相对分子质量 65 000 加水配成 1×10^{-4} mol/L 储备液, 置于 1~4℃ 冰箱中保存; GF₂₅₄ 硅胶 (青岛海洋化工厂); 1,4-二氧六环、丙酮、乙醚、盐酸 (分析纯); 甲醇 (色谱纯).

1.2 Pheide a 的制备

参照 Iriyan 法^[5] 从菠菜中提取叶绿素, 采用 Hynninen 法得到 Pheide a 和 b 混合物, 经硅胶薄层层析, 将 Pheide a 带溶于甲醇溶液, 经 0.45 μm 膜过滤后, 用于液相色谱/电喷雾离子质谱 (LC/ESI-MS) 和荧光分析.

1.3 色谱质谱条件

色谱柱: Waters Lichrospher C₁₈ (5 μm, 2.0 × 250 mm id). 流动相: A 100% 甲醇, B 70% 甲醇. 洗脱程序: 0~30 min 60% A. 流速: 0.3 mL/min. 柱温: 35℃. 进样体积: 5 μL. 二极管阵列检测器扫描范围 300~750 nm, 检测波长 666 nm. 采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子方式检测; 扫描范围: 500~1 200 m/z. 毛细管电压: 3.87 kV; 锥孔电压 30 V, 离子源温度 120℃, 脱溶剂气温度: 300℃.

1.4 Pheide a 与 BSA 的相互作用

100 μL BSA 溶液 (1×10^{-4} mol/L) 及适量的 Pheide a 储备液, 0.9% NaCl 定容至 10 mL, 绘制 300~400 nm 的荧光光谱, 并记录激发波长为 280 nm 时 340 nm 处的荧光强度, 激发和发射狭缝为 5 nm.

2 结果与讨论

2.1 Pheide a 的制备及分析

本实验采用选择性酸水解法制备 Pheide a 但薄层层析 (TLC) 显示产物中仍含有少量 Pheide b, 影响后续分析, 为此进一步经硅胶层析, 纯化 Pheide a. 纯化产物经色谱检测发现: 在卟啉的特征吸收波长处出现两个峰, 保留时间分别为 3.71 min 和 3.96 min (图 1A), 二极管阵列检测它们的可见吸收光谱性质相同, 相对分子质量均为 592.3 (图 1B、1C).

卟啉化合物的光谱吸收是由于共轭环系统的 π 电子离域造成的. 所分析的化合物在 300~700 nm 处含有 4 个 Q 带 (663、608、538、508 nm) 和一个 Soret 带 (410 nm) (图 1B). 吸收特征与相对分子质量均与 Pheide a 相符.

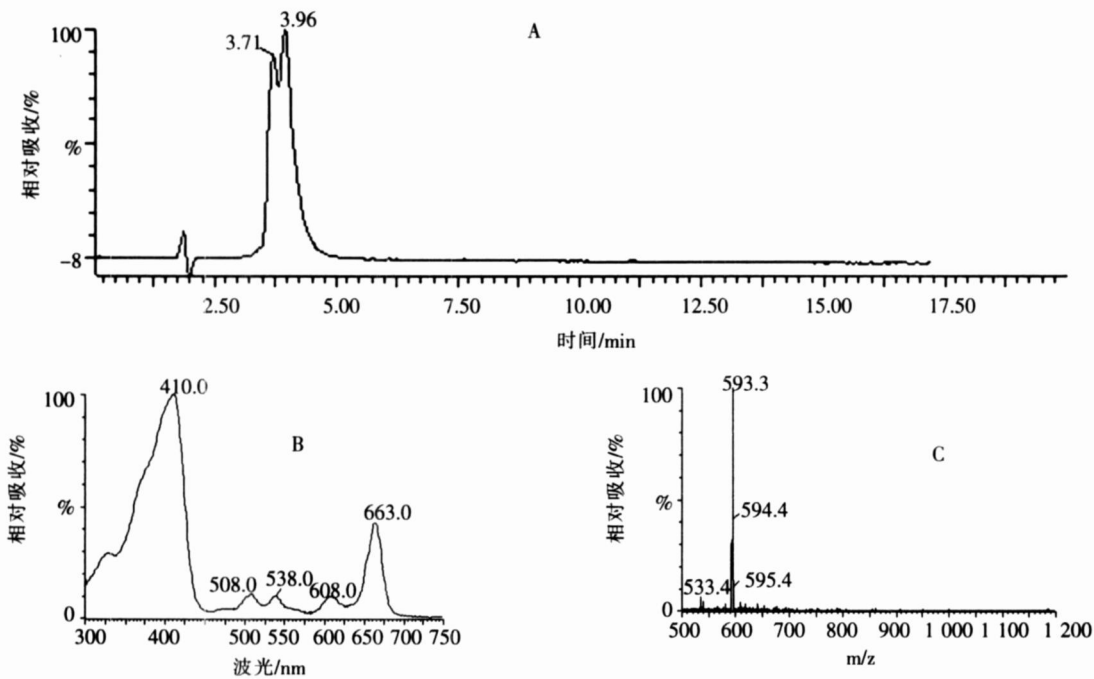
2.2 Pheide a 与 BSA 的相互作用

荧光技术是研究生物大分子与小分子、离子相互作用的重要手段之一. 荧光测试中的发射峰特征、荧光偏振、能量转移及荧光寿命等指标可以对蛋白质分子中荧光生色基团的结构及其所处的微环境提供有用信息, 在研究喹诺酮类抗菌药物^[6], 生物碱类抗癌药物^[7] 与 BSA 的相互作用方面均有报道. 本文采用荧光光谱法分析了 Pheide a 与 BSA 之间的相互作用.

2.2.1 Pheide a 对 BSA 的荧光猝灭效应

BSA 的内源荧光来自于分子中色氨酸和酪氨酸残基, Pheide a 的加入减弱了 BSA 的荧光发射强度, 发生了荧光猝灭, 并且最大发射波长显著蓝移, 表明二者之间存在相互作用, 发生了能量转移 (图 2).

荧光猝灭过程通常有动态和静态猝灭之分. 动态猝灭是猝灭剂与荧光体激发态分子之间的相互作用



A. 液相色谱图, B. 吸收光谱图, C. 质谱图
图 1 叶绿素选择性水解产物的 LC-MS 色谱图

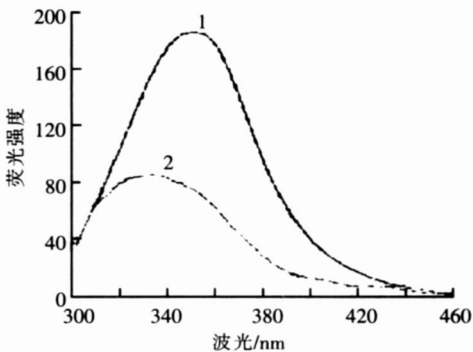
Fig.1 LC-MS spectrometry of chlorophyll selective hydrolysis products

过程; 静态猝灭是猝灭剂与荧光体分子在基态时生成不发光的复合物, 从而导致荧光体强度的降低. 固定 BSA 的浓度, 改变 Pheide a 的浓度, 根据 Stern-Volmer 猝灭方程 $F_0/F = 1 + K [Q]$ 绘制出荧光强度随 Pheide a 浓度变化的曲线 (图 3), 其中 F_0 为猝灭剂不存在时的荧光强度, F 为加入猝灭剂后的荧光强度, Q 为猝灭剂浓度, 此处为 Pheide a 浓度, K 为猝灭常数. 结果表明, F_0/F 与 Pheide a 浓度之间存在着良好的线性关系, 相关系数为 0.996 1, 直线斜率 K 为 $3.1 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 由于生物大分子最大动态猝灭过程的 $K < 100 \text{ L/mol}^{[8]}$, 因此, 判断 Pheide a 造成的是静态猝灭, 即与 BSA 形成配合物引起的猝灭, 而非由碰撞引起的动态猝灭.

2. 2 2 BSA 与 Pheide a 的结合数

根据冯喜增等^[9]提出的有机分子对蛋白质荧光的静态猝灭方程: $\lg(F_0 - F)/F = \lg K + n \lg[Q]$, 其中 K 为有机分子与蛋白质分子的结合常数, n 为结合数. 以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg[Q]$ 作图 (图 4) 可得直线的斜率为 1.0 说明每一个 BSA 分子与一个 Pheide a 分子结合形成配合物. 外推直线截距为 5.7, 求得结合常数为 $5.0 \times 10^5 \text{ L/mol}$

综合以上结果可以得出, 在 Pheide a 与 BSA 的相互作用过程中, 能以摩尔比 1:1 牢固



1. [BSA]=1.0×10⁻⁶ mol/L, 2. 1+[Pheide a]=4.0×10⁻⁵ mol/L

图 2 Pheide a 与 BSA 相互作用的荧光发射光谱图

Fig.2 Emission spectra of the interaction between Pheide a and BSA
 $\lambda_{ex}=280 \text{ nm}$

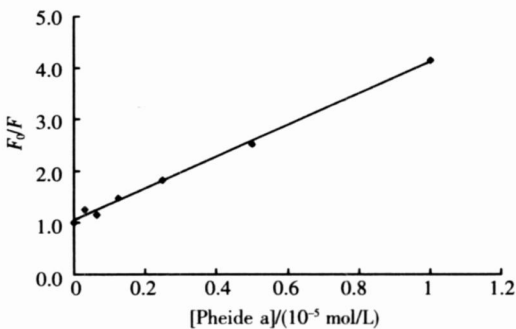


图 3 Pheide a 对 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 图

Fig.3 The Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of BSA by Pheide a [BSA]=1.0×10⁻⁶ mol/L, $\lambda_{ex}=280 \text{ nm}$

结合, 并且形成配合物, 引起 BSA 的静态荧光猝灭. 该结果与同属于卟啉类化合物的胆红素 (BR) 相类似, 2007 年郭兴家等^[10]采用荧光猝灭法分析了 BR 与 BSA 的作用形式为 1:1 复合物的静态猝灭, 37℃ 时结合常数为 $2.99 \times 10^6 \text{ L/mol}$

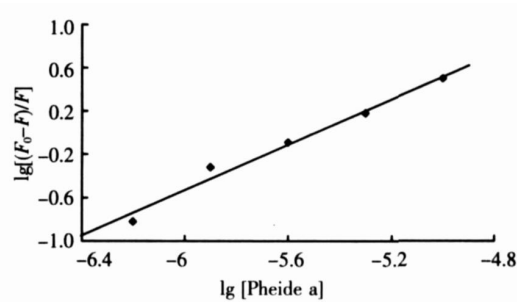


图 4 lg[(F₀-F)/F₀]与 lg[Q]的关系图
Fig.4 Plot of lg[(F₀-F)/F₀] versus lg[Q]

[参考文献]

[1] Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) [J]. J Antimicrob Chemother 1998 42(1): 13-28
[2] Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours [J]. J Photochem Photobiol B 1997, 39(1): 1-18
[3] Ben-Hur E, Horowitz B. Advances in photochemical approaches for blood sterilization [J]. Photochem Photobiol 1995, 62(3): 383-388
[4] Hynninen P, Lotjonen S. Preparation of phorbins derivatives from a chlorophyll mixture utilizing the principle of selective hydrolysis [J]. Synthesis 1980(7): 539-541
[5] Iriyama K, Ogura N, Takamiya A. A Simple method for extraction and partial purification of chlorophyll from plant material using dioxane [J]. J Biochem 1974 76(4): 901-904
[6] 陈昌云, 李小华, 许飞, 等. 普利沙星与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2006 29(1): 62-65.
[7] 曹玺珉, 杜黎明. 吡啶美辛与牛血清白蛋白结合作用的研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(5): 973-977.
[8] 郭灿城, 李和平, 张晓兵, 等. meso-5, 10, 15, 20-四[4-(N-吡咯烷基)苯基]卟啉的合成及对牛血清白蛋白的作用 [J]. 高等学校化学学报, 2003 24(2): 282-287.
[9] 冯喜增, 白春礼, 林璋, 等. 吡啶橙与牛血清白蛋白的相互结合反应 [J]. 分析化学, 1998 26(2): 154-157.
[10] 郭兴家, 李晓舟, 徐淑坤, 等. 荧光猝灭法研究胆红素与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 分析实验室, 2007, 26(4): 11-15.

[责任编辑: 孙德泉]