

聚乙烯醇与牛血清白蛋白的相互作用 及其构象的影响

王改珍², 贺进田¹, 冯美彦¹, 夏 箐¹

(1. 河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016; 2. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018)

摘要 在生理条件下, 使用凝胶过滤色谱、荧光光谱法、差示扫描量热分析和傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 研究了牛血清白蛋白 (BSA) 与聚乙烯醇 (PVA) 的相互作用. 实验结果表明, PVA 与 BSA 结合形成复合物, 在其相互作用过程中, BSA 色氨酸的发射荧光部分被猝灭, 但是, 相互作用并没有明显改变色氨酸的微环境; 差示扫描量热分析结果提示, BSA 与 PVA 之间的相互作用可能破坏了 PVA 或 BSA 的分子内作用力; 用红外光谱法结合可增强分辨率的傅里叶去卷积技术和高斯曲线拟合技术共同用于对 BSA 与 PVA 复合物冻干粉中 BSA 酰胺 I 带的定量分析, 发现冻干粉 BSA 分子中与分子间相互作用相关的 β -折叠组分含量明显减少, 但是, 可用于衡量冻干状态蛋白质结构完整性的 α -螺旋组分含量没有降低. 对冷冻干燥后样品中的可溶性 BSA 分析结果提示, PVA 可以保护 BSA 冷冻干燥过程中的稳定性.

关键词 聚乙烯醇; 牛血清白蛋白; 傅里叶变换红外光谱; 凝胶过滤; 荧光光谱

中图分类号 O629; O657.3

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)01-0068-04

聚乙烯醇(PVA)是一种用途相当广泛的水溶性高分子聚合物, 已经被广泛用于纺织、食品及建筑等领域, 并且由于PVA毒性很低, 无刺激性, 安全性好, 已经被日本和美国批准用于医药和食品工业^[1]. 最近的研究发现, PVA作为添加剂可以防止蛋白质在水/二氯甲烷界面的变性^[2]. 我们在研制葡激酶突变体K35R的聚乳酸羟基乙酸缓释微球过程中, 发现PVA可以有效保护蛋白质在微球研制过程中的稳定性^[3~5]. 由此推断, PVA可能与蛋白质之间存在相互作用, 这种相互作用可能保护了蛋白质的结构稳定性, 使PVA可能成为新型的蛋白质稳定剂. 本文选择牛血清白蛋白(BSA)作为模型蛋白, 使用凝胶过滤色谱、荧光光谱法、差示扫描量热分析和傅里叶变换红外光谱法研究了BSA与PVA的相互作用, 发现PVA与BSA形成了复合物, 它们的相互作用未改变BSA的高级结构, 并使BSA具有了更好的稳定性.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-2500 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司产品; Perkin Elmer DSC7 型差示扫描量热仪, 美国珀金埃尔默公司产品; Thermo Nicolet Avatar 360 傅里叶红外光谱仪, 美国 Thermo Nicolet 公司产品; HD-1 核酸蛋白检测仪, 上海沪西分析仪器厂有限公司产品; 微量移液器, Eppendorf 公司产品.

BSA, Amresco 产品; PVA(聚合度 87%~89%)分子量 31000~50000, Aldrich 产品; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-150, Pharmacia 产品; 水为 MiLLiQ 系统制备的超纯水.

1.2 凝胶色谱层析

Sephadex G-150 凝胶层析柱(1.5 cm×60 cm)用于检测 BSA 与 PVA 的相互作用, 凝胶柱上样前用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.4)平衡过夜, 控制流速在 20 cm/h. 上样前, 在凝胶柱上先加入 10 mL 18.75 mg/mL PVA 溶液, 然后加入 3.2 mL 12.5 mg/mL BSA 和 18.75 mg/mL PVA 的混合溶液, 用核酸

收稿日期: 2008-04-23.

基金项目: 河北省自然科学基金(批准号: B2006000308)和河北省污染防治与生物技术重点实验室开放基金资助.

联系人简介: 贺进田, 男, 副教授, 主要从事蛋白质结构与功能研究. E-mail: he_jintian@sina.com

蛋白检测仪检测样品峰. 为检验 BSA 的纯度, 用 3.2 mL 12.5 mg/mL BSA 单独过柱进行对照.

1.3 荧光光谱测定

用 0.02 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.4) 配制 BSA 和 PVA 溶液, PVA 无荧光光谱, BSA 在 280 nm 处有一个强吸收荧光光谱峰, 在 340 nm 有一个强发射荧光光谱峰. 检测 1.0 mg/mL BSA 与 0.6 mg/mL PVA 的相互作用过程中 340 nm 处发射荧光强度随时间的变化.

1.4 差示扫描量热分析

5 mg/mL BSA, 3 mg/mL PVA 以及 BSA 和 PVA 混合溶液的热性质由差示扫描量热仪测定, 精确称量样品 2 mg, 在 25 ~ 125 °C 之间以 5 °C/min 的升温速率升温, 采集样品在加热过程中热量的变化.

1.5 傅里叶变换红外光谱及数据处理

样品红外光谱和去卷积谱的获得按文献[4]方法进行.

1.6 BSA 的稳定性测定

将 1 mL 浓度与差示扫描量热分析相同的样品冷冻干燥, 然后分别用 1 mL 去离子水溶解, 观察样品溶解状况; 离心分离除去沉淀, 用 Bradford 试剂测定上清液中 BSA 的含量.

2 结果与讨论

2.1 凝胶层析法分析 BSA 和 PVA 的相互作用

在凝胶层析色谱图上, BSA 呈现单一、对称的色谱峰[图 1(A)]. 而 PVA 与 BSA 混合溶液的凝胶过滤色谱峰发生了明显变化, 色谱峰很不规则[图 1(B)].

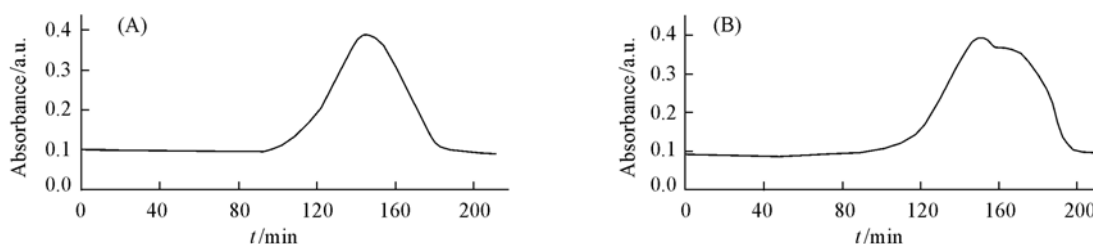


Fig. 1 Elution profiles of BSA(A) and the mixture of BSA and PVA(B) from Sephadex G-150

PVA 分子在 280 nm 不产生紫外吸收, 实验过程中所检测到的吸收峰为 BSA 的吸收峰. 由 PVA 与 BSA 的混合溶液产生不规则色谱峰的结果可以推测, BSA 与 PVA 发生了相互作用. PVA 分子量范围在 31000 ~ 50000 之间, BSA 分子量为 66000, 它们所形成复合物的分子量明显大于 BSA, 因而, Sephadex G-150 凝胶层析柱可以将复合物与 BSA 分离, 但是并没有完全分开, 而是形成了一个肩峰. 此外, 由于 PVA 分子量不均一, 复合物分子量同样不均一, 在色谱图上呈现的色谱峰不对称.

2.2 PVA 与 BSA 之间相互作用的荧光光谱法分析

BSA 的发射荧光光谱峰在 340 nm, 谱峰主要来自于 BSA 中的色氨酸^[6]. 使用 340 nm 的荧光发射强度检测 BSA 与 PVA 的相互作用, 发现其荧光发射强度逐渐下降, 大约至 6.5 min 后趋于平缓, 略有波动(图 2). BSA 的荧光发射强度降低, 说明 PVA 与 BSA 的色氨酸发生了相互作用, 导致了荧光猝灭现象的发生. 进一步检测不同浓度的 BSA 和 PVA 相互作用对 BSA 荧光发射波长的影响发现, 荧光发射波长并未发生明显改变, 说明在相互作用过程中并未导致色氨酸的微环境发生明显变化.

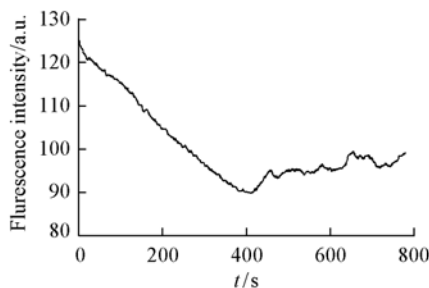


Fig. 2 Change of emission fluorescence intensity of BSA with time during interaction with PVA

2.3 差示扫描量热分析

在热流-温度曲线上, PVA, BSA 及其混合溶液的吸热峰均为单峰, 分别位于 66.7, 62.8 和 67.8 °C (图 3). BSA 在 62.8 °C 左右出现的吸热峰反映了其变性的温度, 蛋白质的高级结构在此温度

时遭到破坏^[7]. PVA 溶液在 66.7 °C 出现了吸热峰, 说明 PVA 本身也存在分子内的相互作用, 对分子内相互作用的破坏产生吸热峰. BSA 与 PVA 混合溶液的吸热峰温度明显比单独的 BSA 和 PVA 的吸热峰温度高, 提示 BSA 与 PVA 之间产生了新的相互作用. 差示扫描量热分析的数据显示, 溶液中 BSA 的变性焓变为 1.78 kJ/g, 溶液中 PVA 的焓变为 1.99 kJ/g, 而 BSA 和 PVA 混合溶液变性焓变为 2.32 kJ/g. 混合物溶液的焓变明显高于单独的 BSA 和 PVA, 然而远远低于二者的加和, 提示 PVA 与 BSA 相互作用过程可能破坏了部分分子内的相互作用.

2.4 PVA 与 BSA 之间相互作用对 BSA 二级结构的影响

PVA 在酰胺 I 带(1600 ~ 1700 cm^{-1}) 范围内没有强红外吸收, 但 PVA 在 1738 cm^{-1} 处有强吸收峰^[4], 其峰尾会影响对酰胺 I 带的定量分析. 因此, 测定混合冻干粉中 BSA 的红外光谱时, 应该扣除 PVA 的影响.

BSA 和扣除 PVA 吸收后的 BSA 的酰胺 I 带去卷积谱的高斯曲线拟合结果见图 4. 1623 cm^{-1} 组分是典型的分子间相互作用形成 β -折叠的吸收峰^[2], 这种分子间相互作用有时会导致蛋白质的变性失活. 在 PVA 与 BSA 复合物的谱图中, 这个组分明显发生了降低. 由此推测, PVA 与 BSA 的相互作用减少了冻干粉中 BSA 分子间的相互作用. 1658 cm^{-1} 组分是 α -螺旋的吸收峰, PVA 与 BSA 的相互作用没有导致螺旋成分的下降; 在蛋白质冷冻干燥过程中, 大量的溶剂水会被蒸发, 蛋白质分子之间的相互作用会导致 β -折叠组分的改变. 因此, β -折叠组分不能用于衡量冻干粉中蛋白质的结构组分, 而 α -螺旋一般不会受到分子间作用的影响. 因而一般使用 α -螺旋结构衡量蛋白质的稳定性^[8-10]. 由此可以推测 PVA 与 BSA 的相互作用减少了冻干品中 BSA 分子间的相互作用, 没有破坏 BSA 的高级结构.

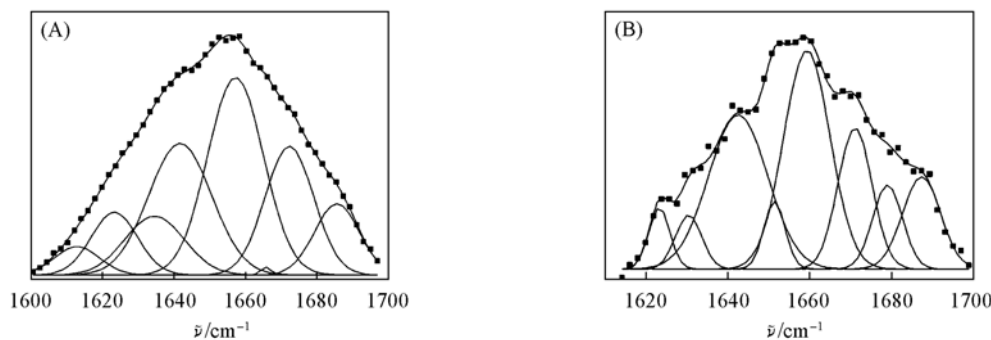


Fig. 4 Deconvoluted amide I band and Gaussian curve-fitting of BSA(A) and BSA within the freeze-dried mixture of PVA and BSA(B)

将冷冻干燥的 PVA 样品用磷酸缓冲液溶解可以明显看到有很多颗粒状沉淀, 为 PVA 的不溶物. PVA 在水中溶解缓慢, 需要加热溶解; 而将 BSA 与 PVA 混合溶液的冻干样品溶解后, 溶液澄清, 没有发现不溶物, 这进一步说明了 BSA 与 PVA 形成了复合物; 将冷冻干燥的 BSA 样品用磷酸缓冲液溶解也有少量沉淀产生, 说明可能在冷冻干燥过程中部分 BSA 发生了沉淀. 测定样品中的 BSA 浓度发现, 含有 PVA 的样品中 BSA 浓度得到了 100% 的保持, 而在未加入 PVA 的样品中 BSA 浓度下降到了原来的 93.6%, BSA 浓度显著下降, 说明 PVA 可以保护 BSA 冻干过程中的稳定性.

综上所述, 以 BSA 作为模型蛋白, 使用分子筛色谱和荧光光谱法研究了 BSA 与 PVA 的相互作用, 发现 PVA 与 BSA 结合形成复合物; 在 BSA 与 PVA 作用过程中, BSA 的色氨酸发射荧光强度随时间降低, 表明 PVA 与 BSA 中的酪氨酸发生了相互作用导致了荧光猝灭. 差示扫描量热分析结果提示, BSA

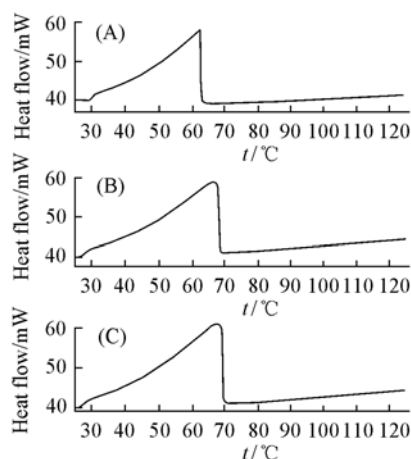


Fig. 3 DSC thermograms of BSA(A), PVA(B) and a mixture solution of PVA and BSA(C)

与 PVA 之间产生了新的相互作用, 并且 PVA 与 BSA 相互作用过程可能破坏了部分分子内的相互作用. 将傅里叶变换红外光谱法与可增强分辨率的傅里叶去卷积技术与高斯曲线拟合技术结合, 共同用于复合物中 BSA 酰胺 I 带的定量分析, PVA 与 BSA 的相互作用减少了冻干粉 BSA 分子中与分子间相互作用相关的 β -折叠组分含量, 但是, 没有降低 α -螺旋组分含量, 说明 BSA 的高级结构没有遭到破坏. 分析冷冻干燥样品中 BSA 的状态, 发现 PVA 可以保护 BSA 冻干过程中的稳定性.

感谢河北师范大学分析实验中心的张建军研究员和河北师范大学化学与材料科学学院的贺全林老师在仪器使用上给予的帮助.

参 考 文 献

- [1] CHEN Qing-Hua(陈庆华), QU Wun(瞿文). *Chin. Pharm. J.* (中国药学杂志)[J], 2000, **35**(3): 147—150
- [2] van de Weert M., Hoehstetter J., Hennink W. E., *et al.*. *J. Control. Release*[J], 2000, **68**(3): 351—359
- [3] He J. T., Su H. B., Li G. P., *et al.*. *Int. J. Pharm.* [J], 2006, **309**(1/2): 101—108
- [4] HE Jin-Tian(贺进田), WANG Gai-Zhen(王改珍), SONG Hou-Yan(宋后燕). *Spectrosc. Spect. Anal.* (光谱学与光谱分析)[J], 2006, **26**(8): 1209—1212
- [5] HE Jin-Tian(贺进田), WANG Gai-Zhen(王改珍), FENG Mei-Yan(冯美彦), *et al.*. *Chin. Pharm. J.* (中国药学杂志)[J], 2007, **42**(8): 593—597
- [6] ZHANG Yu-Ping(张玉平), WEI Yong-Ju(魏永巨), LI Na(李娜), *et al.*. *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学)[J], 2004, **32**(6): 779—782
- [7] Giancola C., De Sena C., Fessas D., *et al.* *Int. J. Biol. Macromol.* [J], 1997, **20**(3): 193—204
- [8] Fu K., Griebenow K., Hsieh L., *et al.*. *J. Control. Release*[J], 1999, **58**(3): 357—369
- [9] Yang T. H., Dong A., Meyer J., *et al.*. *J. Pharm. Sci.* [J], 1999, **88**: 161—165
- [10] Carrasquillo K. G., Costantino H. R., Cordero R. A., *et al.*. *J. Pharm. Sci.* [J], 1999, **88**: 166—173

Interaction Between PVA and BSA and Its Influence on the Conformation of BSA

WANG Gai-Zhen², HE Jin-Tian^{1*}, FENG Mei-Yan¹, XIA Qing¹

(1. *College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China*; 2. *College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China*)

Abstract Gel filtration chromatography, fluorescence spectrophotometry, differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectrophotometry (FTIR) were used to investigate the interaction between polyvinyl alcohol (PVA) and bovine serum albumin (BSA) under physiological conditions. The results show that BSA form complex with PVA. During BSA interaction with PVA, emission fluorescence derived from tryptophan of BSA was partially quenched upon binding to PVA. However, microenvironment of tryptophan was not changed during the binding process. The results of DSC suggest that the interaction of PVA with BSA maybe reduce the intramolecular interaction of BSA or PVA. FTIR spectrometry was combined with resolution enhancement technique Fourier deconvolution and Gaussian curve-fitting procedures to quantitate the spectral information from the amide I bands of BSA within the freeze-dried mixture of PVA and BSA. The results show that the interaction of PVA with BSA affected only the β -sheet content but not α -helix, which is usually used as an indicator of the protein structural integrity in lyophilized state. Analysis of the BSA within the mixture of BSA and PVA suggest that interaction of PVA with the BSA maybe preserve the stability of BSA during lyophilization process.

Keywords Polyvinyl alcohol; Bovine serum albumin; Fourier transform infrared spectrometry; Gel chromatography; Fluorescence spectrometry (Ed. : H, J, Z)