

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2017.03.2016062704

吕达, 郭明, 边平凤. 毛细管电泳法研究邻苯二甲酸酯与牛血清白蛋白分子的相互作用[J]. 环境化学, 2017, 36(3): 496-507.

LYU Da, GUO Ming, BIAN Pingfeng. Studies on the interaction of phthalate esters with bovine serum albumin by capillary electrophoresis[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36(3): 496-507.

毛细管电泳法研究邻苯二甲酸酯与 牛血清白蛋白分子的相互作用*

吕 达¹ 郭 明^{1**} 边平凤²

(1. 浙江农林大学化学系, 临安, 311300; 2. 浙江大学化学系, 杭州, 310027)

摘 要 利用毛细管电泳(Capillary electrophoresis, CE)建立邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl Phthalate, DMP)-牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)相互作用的分析方法. 构建配体 DMP-受体 BSA 相互作用模型. 通过区段-区段动力学法(Plug-plug kinetic, PPK), HD 法(Hummel-Dreyer, HD), 前沿分析法(Frontal analysis, FA)和空峰法(Vacant peak, VP)测定 DMP 与 BSA 的相互作用, 分别运用 Scatchard 方程, Klotz 方程和非线性方程(Non-linear regression)等理论方法获取两者的相互作用参数, 进而分析理论模型适用度. 结果表明, PPK 法、HD 法与 FA 法都适用于 DMP-BSA 体系相互作用的测定, HD 法最优. 模型适用度分析得出非线性回归方程为最适合的理论模型. 相互作用参数测试表明 DMP-BSA 只有单一类型的结合位点且结合强度适中, DMP-BSA 分子水平的测定结果可为 DMP 毒理机制的深入研究提供有益参考.

关键词 邻苯二甲酸二甲酯(DMP), 牛血清白蛋白(BSA), 区段-区段动力学法(Plug-plug kinetic, PPK), HD 法(Hummel-Dreyer, HD), 前沿分析法(Frontal analysis, FA), Scatchard 方程, 非线性方程(Non-linear regression).

Studies on the interaction of phthalate esters with bovine serum albumin by capillary electrophoresis

LYU Da¹ GUO Ming^{1**} BIAN Pingfeng²

(1. Department of Chemistry, Zhejiang Agricultural & Forestry University, Lin'an, 311300, China;

2. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou, 310027, China)

Abstract: The interaction between dimethyl phthalate (DMP) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by capillary electrophoresis (CE). The binding models of DMP (as the ligand) to BSA (as the receptor) were developed. Plug-plug kinetic method (PPK), Hummel-Dreyer method (HD), Frontal analysis method (FA) and Vacant peak method (VP) were used to explore the interaction parameters of the DMP-BSA system. Scatchard, Klotz and non-linear regression equations were adopted to obtain interaction parameters of the system, and the feasible modeling equation was hypothesized. The results showed that PPK, HD and FA can all be used to analyze the DMP-BSA system, and the most suitable CE method is HD. According to the obtained interaction parameters, the most suitable equation is the regression method equation for this system through careful

2016 年 6 月 27 日收稿 (Received: June 27, 2016).

* 国家自然科学基金 (20877072) 和浙江省自然科学基金 (LY14E030016) 资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (20877072) and National Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY14E030016).

** 通讯联系人, Tel: +086-0571-63740852, E-mail: guoming@zafu.edu.cn

Corresponding author, Tel: +086-0571-63740852, E-mail: guoming@zafu.edu.cn

comparative analysis. The binding parameters indicated that the interaction between DMP-BSA was moderate, which had only one type of binding sites.

Keywords: dimethyl phthalate, bovine serum albumin, plug-plug kinetic, Hummel-Dreyer method, frontal analysis method, Scatchard, non-linear regression.

邻苯二甲酸酯类化合物又名酞酸酯(Dimethyl phthalates, DMP),是应用广泛的一类塑化剂.大量使用的邻苯二甲酸酯类化合物极易在环境中释放,严重威胁生态系统的安全.环境中的邻苯二甲酸酯类化合物可以通过不同途径经食物链转移进入人体,对人类的健康构成深远的危害^[1].邻苯二甲酸酯类化合物不仅具有典型的“三致”(致突、致畸、致癌)作用,还具有生殖、胚胎、遗传毒性.目前,邻苯二甲酸酯类化合物的环境安全问题,已经引起环保、卫生、科学界的高度关注.许多政府及研究机构将邻苯二甲酸酯类化合物的环境安全性与污染毒性机制作为研究重点,以期通过控制邻苯二甲酸酯类化合物的毒性,有望最终解决邻苯二甲酸酯类化合物的安全问题.邻苯二甲酸酯类化合物进入人体到受体部位的毒理作用发挥与血浆的储存和运输功能密不可分,而血浆的贮运功能主要由血清白蛋白承担^[2-4].所以研究邻苯二甲酸酯类化合物与血清白蛋白的相互作用,可以获得邻苯二甲酸酯类化合物毒性及新陈代谢过程等重要信息^[5].但是,从已有的文献报道来看,研究主要集中于邻苯二甲酸酯类化合物的环境分布、污染水平、生物累积等方面.因此,在分子水平上探究邻苯二甲酸酯类化合物的环境毒理作用,构建以邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl Phthalate, DMP)为典型代表的邻苯二甲酸酯类化合物的准确有效相互作用研究体系,并发展切实可行的分析方法极有必要.

选择合适的研究载体在 DMP 毒理研究工作中很关键.作为研究与小分子相互作用的模型大分子,牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)不仅具有分子量小、溶解性大、稳定性好、与配体具有很好的亲和性等优势,其更是与人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)具有高度同源性,且比 HSA 更加廉价易得^[6-7].另外,研究工作中选择合适的分析方法同样关键.研究蛋白质与小分子相互作用常用的方法主要有紫外可见光谱法^[8]、红外光谱法^[9]、荧光光谱法^[10-11]、圆二色谱法^[12]、毛细管电泳技术^[13-15]、平衡透析技术^[16-17]、电化学技术^[18-20]、核磁共振技术^[21-22]等.如血清蛋白分子与邻苯二甲酸酯相互作用的主流研究方法为荧光光谱法、圆二色谱法^[23-26].运用不同的分析方法,从不同角度进行相互验证,可得到有效结果并拓宽研究领域.Capillary Electrophoresis(CE)用于研究蛋白质与小分子相互作用的文献报道数量虽然不多,但 CE 具有快速分析、高效分离、样品的低耗量(nmol 级)、受体的纯度要求不高、可选择多种模式、更接近体内的结合行为、适用于多种亲和体系等^[27]优势,可以被选择应用于生物大分子与小分子之间相互作用的研究^[28-29].另外,从文献来看,CE 在生物大分子与小分子相互作用的研究主要集中在酶、多肽等物质,对蛋白质与小分子之间相互作用的研究处于上升阶段^[30-31].

本文选取 DMP 为邻苯二甲酸酯类化合物的典型代表,选择 BSA 作为研究的理想载体,采用多种 CE 方法:Plug-plug kinetic 法、Hummel-Dreyer 法、Frontal analysis 法和 Vacant peak 法.对 DMP 与 BSA 之间的结合反应及相互作用进行研究,并通过结果对方法的的分析效果进行比较研究;通过不同的理论模型方程计算 DMP 与 BSA 的结合参数,同时对分析效果进行比对.从而建立检测 DMP-BSA 相互作用的有效方法,构建生理条件下合理的作用体系.有关结果可为进一步分析 DMP 及其他邻苯二甲酸酯类化合物的毒性作用机理提供有益参考.

1 实验部分(Experimental section)

1.1 仪器与试剂

P/ACE™MDQ 毛细管电泳仪、未涂层熔融石英毛细管柱(60.2 cm×50 μm I.D.,有效长度 50 cm)(美国 Beckman-Coulter 公司);KQ-250DB 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Eppendorf 移液枪(上海肯强仪器有限公司);ZD-2 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂).

牛血清白蛋白(BSA, ≥98%, 上海华美生物工程公司);邻苯二甲酸二甲酯(DMP, ≥99%, 百灵威科技有限公司);磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·2H₂O, ≥99%, 湖试化学试剂有限公司);磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O,

≥99%, 国药集团化学试剂有限公司); N, N 二甲基酰胺(DMF, ≥98%, 天津大学科威公司); 其它试剂均为分析纯试剂, 实验用水为亚沸蒸馏去离子水. 配制浓度为 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液(PBS).

1.2 实验方法

1.2.1 Capillary Electrophoresis 方法运行缓冲液及样品溶液的配制

$0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 分别配制 $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液, 不同浓度梯度 ($1.0 \times 10^{-5} \text{—} 100.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 DMP 溶液和不同浓度梯度 ($1.0 \times 10^{-5} \text{—} 100.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 DMP-BSA 溶液 ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的混合溶液. 所配溶液均用 $0.45 \mu\text{m}$ 混合纤维素酯微孔滤膜过滤并脱气 5 min, 待用.

1.2.2 建立分析 DMP-BSA 体系相互作用的方法

实验前用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH、去离子水、空白缓冲液分别冲洗 5 min, 随后用相应的运行缓冲液冲洗 5 min; 其他测试程序相同.

实验中每两次运行测定程序之间用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH、去离子水以及运行缓冲液分别冲洗 5 min, 各实验测定 3 次, 求平均值.

区段-区段动力学法: 方法分 3 组进样, 前两组电压相同, 第三组改变电压. 电泳条件: 运行缓冲溶液: $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS (pH=7.4); 毛细管温度: $25 \text{ }^\circ\text{C}$; 检测波长: 选 BSA、N, N 二甲基酰胺和 DMP 都有紫外吸收的 214 nm 为检测波长; 运行电压: 第一组、第二组进样时, 电压均保持为 20 kV; 第三组进样时, 为保持结合过程的一致, 先施加 20 kV 的电压 0.5 min, 后调整电压为 15 kV; 为了消除电压变化对峰高的影响, 实验中使用体积比为 0.01% 的 N, N 二甲基酰胺溶液 (PBS 配制) 作为参比; 电泳条件: 压力进样 0.5 psi, 10 s. 进样次序: 0.01% N, N 二甲基酰胺 → BSA ($1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) → DMP ($50.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) (第一组进样时, BSA 区段被缓冲液区段所代替).

简化的 Hummel-Dreye 方法 (Hummel-Dreyer): 该方法在给定的 DMP 浓度条件下分两次进样, 一次样品, 一次空白, 根据二次进样所得的实验数据用于分析 DMP 与 BSA 的结合情况. 以含有不同浓度梯度 DMP 的 PBS 为背景电解质, 以空白 PBS 为空白测试样, 以仅含 BSA 的 PBS 为样品测试样, 进行简化的 Hummel-Dreyer 毛细管电泳 (正极进样) 分析. 检测波长选 BSA 和 DMP 都有紫外吸收的 214 nm 为检测波长. 电泳条件为: 分离电压: 20 kV; 压力进样: 0.8 psi, 60 s; 柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

前沿分析法 (Frontal Analysis): 以 PBS 为空白及运行缓冲液, 以含不同浓度梯度 DMP-BSA 的 PBS 为测试样, 进行毛细管电泳前沿分析 (正极进样). 检测波长选蛋白质和 DMP 都有紫外吸收的 214 nm 为检测波长. 电泳条件为: 分离电压: 20 kV; 压力进样: 0.5 psi, 60 s; 柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

空峰方法 (Vacant Peak): 以含有不同浓度梯度 DMP-BSA 的 PBS 为空白及运行缓冲液, 以 PBS 为进样样品进行空峰方法毛细管电泳分析 (正极进样). 检测波长选蛋白质和 DMP 都有紫外吸收的 214 nm 为检测波长. 电泳条件为: 分离电压: 20 kV; 压力进样: 0.5 psi, 60 s; 柱温: $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 DMP 与 BSA 相互作用的体外检测法

体外检测是评价 DMP-BSA 作用的重要工具, 相比于体内实验, 体外实验重复性好, 受环境影响小, 具有比较方便、经济、易于控制的优点. 在应用毛细管电泳技术的研究中, 设置了空白对照, 中性内标等对比试验来指示 BSA 与 DMP 分子相互作用^[32-35].

2.2 DMP 与 BSA 相互作用的 Capillary Electrophoresis 分析法

毛细管电泳技术研究 BSA 与 DMP 分子相互作用时, DMP 与 BSA 的结合作用为非共价结合, 且是可逆平衡过程, 即: $\text{P} + n\text{D} \rightleftharpoons [\text{D}_n\text{P}]$, 其中 P 代表 BSA, D 代表 DMP, D_nP 为 BSA-DMP 复合物. 毛细管电泳过程中涉及 BSA 与 DMP 的结合 \rightleftharpoons 解离平衡和组分的分离, 由于游离 DMP 与 BSA、BSA-DMP 复合物的质荷比不同, 电泳迁移速率不同, 由此, 可以应用 Plug-plug kinetic 法、Hummel-Dreyer 法、Frontal analysis 法和 Vacant peak 法分离可逆平衡体系中的游离 DMP、游离 BSA 和 DMP-BSA 复合物, 进而通过检测信号分析.

Plug-plug kinetic 法:如果 BSA、DMP 的结合 \rightleftharpoons 解离反应是快反应,毛细管中的载体电解质为 PBS 缓冲液.在第一组样品进样时,首先进样的样品为 DMF,再次进样为空白 PBS,最后进样为 DMP.进样初期就会形成 DMF、空白缓冲液、DMP 的 3 个区段.DMP 的迁移速率更快,则形成 DMF、DMP 两个正峰.第二组进样时,首先进样样品仍为 DMF,再次进样为 BSA,最后进行 DMP 进样.进样过程中,假设 DMP 的迁移速率大于 BSA 的迁移速率,那么 DMP 区段会穿过 BSA 区段,BSA 与 DMP 快速结合形成 BSA-DMP 复合物并达到 $P+nD \rightleftharpoons [D_nP]$ 可逆动态平衡,就形成了含有 BSA、BSA-DMP 复合物及 DMP 的缓冲液区带,在电场驱动下,各组分以不同的迁移速率迁移,并在迁移过程中,不断进行 $P+nD \rightleftharpoons [D_nP]$ 可逆平衡反应.假设 DMP、DMF 的迁移速率大于 BSA 与 BSA-DMP 复合物的迁移速率,那么将会导致 3 个正峰的出现.第三组进样时,进样的样品及顺序不变,改变分离的电压,样品的迁移速率改变,最后仍会出现 3 个正峰,但是保留时间发生了改变(图 1).

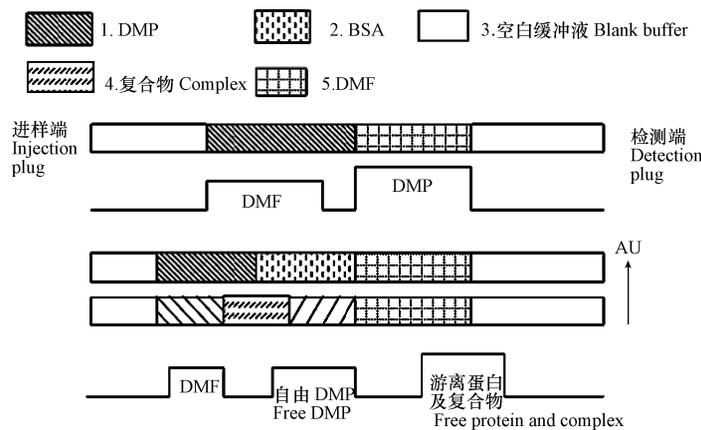


图 1 毛细管电泳中区段-区段动力学方法电泳图

Fig.1 Electropherograms of Plug-plug kinetic in capillary electrophoresis

简化的 Hummel-Dreyer 法:假如 BSA、DMP 的结合 \rightleftharpoons 解离反应是快反应,毛细管中载体电解质为含有一定 DMP 浓度的缓冲液,而进样样品为仅含 BSA 的缓冲液,当样品进样时,在进样区带,载体缓冲溶液中的 DMP 与进样样品中的 BSA 快速结合形成 BSA-DMP 复合物并达到 $P+nD \rightleftharpoons [D_nP]$ 可逆动态平衡,就形成了含有 BSA、BSA-DMP 复合物及 DMP 的缓冲液区带,在电场驱动下,各组分以不同的迁移速率迁移,并在迁移过程中,不断进行 $P+nD \rightleftharpoons [D_nP]$ 可逆平衡反应,如果 BSA、BSA-DMP 复合物的迁移速率大于 DMP 的迁移速率,当 BSA-DMP 复合物从进样端开始迁移时,将在其后面导致一段低于载体电解质缓冲溶液中 DMP 浓度的溶液区带,这是由于进样样品中含有 BSA,平衡反应 $P+nD \rightleftharpoons [D_nP]$ 使得部分游离 DMP 与 BSA 结合,则进样样品区带中游离 DMP 浓度低于载体电解质缓冲溶液中的游离 DMP 浓度.在电场驱动下,样品区带移动时将导致一负峰出现,该负峰相应于溶液区段中 DMP 的浓度低于背景缓冲液中 DMP 浓度的部分,差值部分是与 BSA 结合了,代表结合 DMP 的多少.在迁移过程中,BSA-DMP 复合物总是与缓冲溶液中的游离 DMP 进行结合 \rightleftharpoons 离解平衡反应,当 BSA-DMP 复合物溶液区带到达检测端时,此时 BSA-DMP 复合物区带中的 DMP 的浓度将大于背景缓冲液中 DMP 的浓度,BSA 的吸收峰大于 DMP 的吸收峰,将会导致出现一个正峰,而背景缓冲液中没有 BSA,所以游离蛋白质峰也为正峰.如果 BSA、BSA-DMP 复合物迁移速率相近且与游离 DMP 能够分开,则在电泳图上出现一正一负两个峰(图 2).

在 Frontal Analysis 法中,毛细管的载体电解质为空白 PBS,以含 BSA-DMP 的缓冲液为进样样品,在进样初期,区带内包括未结合的游离 DMP、游离的 BSA 及 BSA-DMP 复合物等 3 种状态,复合物是平衡产物.在电泳过程中,BSA-DMP 复合物在迁移中与缓冲液中的游离 DMP 总是处于不断的动态结合 \rightleftharpoons 解离平衡状态.如果 BSA、BSA-DMP 复合物的迁移速率大于 DMP 的迁移速率,样品组分的区带由初始的叠加状态向分离状态过渡,如果复合物未能完全分离,则检测信号是连续的 3 个平台(图 3)分别代表 DMP 区带、BSA-DMP 复合物区带和 BSA 区带.如果 BSA、BSA-DMP 复合物的迁移速率相近且与游离 DMP 能够完全分离,则检测信号是两个独立的正峰.

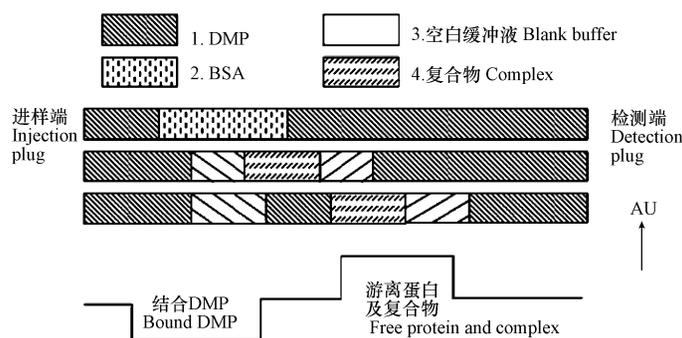


图 2 毛细管电泳中简化的 Hummel-Dreyer 法电泳图

Fig.2 Electropherograms of simplified Hummel-Dreyer in capillary electrophoresis

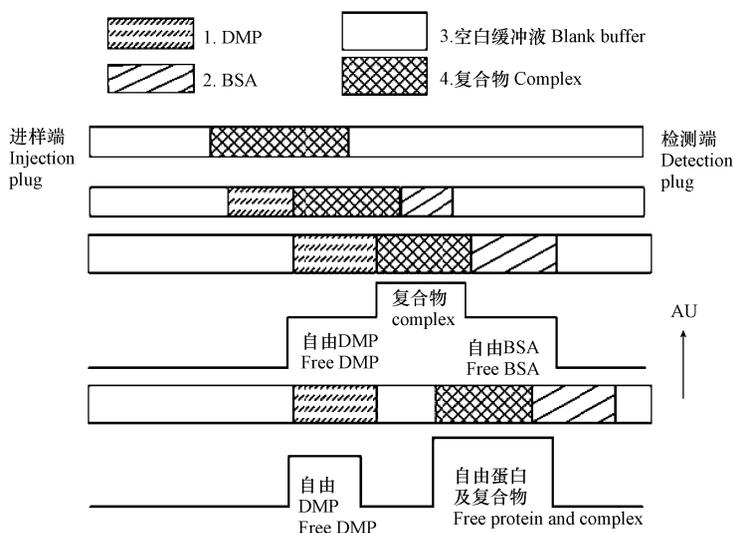


图 3 毛细管电泳中前沿分析方法电泳图

Fig.3 Electropherograms of frontal analysis in capillary electrophoresis

在 Vacant Peak 法中,毛细管中的载体电解质为含有 BSA-DMP 的缓冲液,其中存在 $P+nD \rightleftharpoons [D_nP]$ 的平衡过程.空白 PBS 为样品进样,同样合理认为 BSA、BSA-DMP 复合物的迁移速率大于 DMP 的迁移速率,则在电泳开始时,进样样区段前面的背景缓冲液中,由于 DMP 迁移的慢,将相对滞后(位于进样样区段的前端),而在进样样区段后面的背景缓冲液中,由于 BSA 的迁移速率快,将先于 DMP 分子到达进样样区段,电泳一段时间后,相对滞后的 DMP 区段与电泳较快的 BSA 区段相遇并重合后,即发生新的 $P+nD \rightleftharpoons [D_nP]$ 的平衡可逆反应,形成含有 BSA-DMP 复合物的中间区段,电泳达到稳态迁移(图 4).可以合理地认为 BSA 分子与 BSA-DMP 复合物分子的质荷比近似相等,则 BSA 分子与 BSA-DMP 复合物分子有几乎等同的迁移速率,而 DMP 具有不同的迁移速率,电泳时,如果 DMP 与结合 DMP 能够完全分离,则在色谱图上出现两个负峰.第一个负峰相应于溶液区段中 DMP 的浓度低于背景缓冲液中 DMP 浓度的部分,差值部分即为与 BSA 相结合的 DMP.

2.3 标准曲线的建立

用 PBS 分别配制一系列不同浓度的 DMP ($1.0 \times 10^{-5} - 100.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 标准溶液在上述的电泳条件下进行 CE 的测定,以谱图峰高 (H) 对浓度 (C) 进行线性回归,建立标准曲线.得到线性关系良好的回归方程: $H = 0.0004C + 0.00279$ ($r = 0.9981, n = 6$).

2.4 DMP 与 BSA 相互作用的电泳图

本实验分别用 Plug-Plug Kinetic 法、简化的 Hummel-Dreyer 法、Frontal Analysis 法和 Vacant Peak 法

对 DMP 与 BSA 的相互作用进行了分析, 研究发现空峰法只得出一个峰, 可能是由于这种方法是使用不同浓度梯度的 DMP-BSA 的磷酸盐缓冲液为运行缓冲液, 浓度较大, 完全分离需要的时间长, 而本实验选用的毛细管柱长度有限, 分离时间较短, 所以没有完全分离, 进而引起峰未分离. 所以本实验采用 Plug-plug kinetic 法、简化的 Hummel-Dreyer 法和 Frontal analysis 法进行结果分析, 在本文的邻苯二甲酸酯-蛋白质体系中, 巧妙利用形成 DMP-BSA 结合物后溶液体系的紫外吸收变化来检测, 建立的 Capillary Electrophoresis 方法预期可用于其他邻苯二甲酸酯-蛋白质体系的分析.

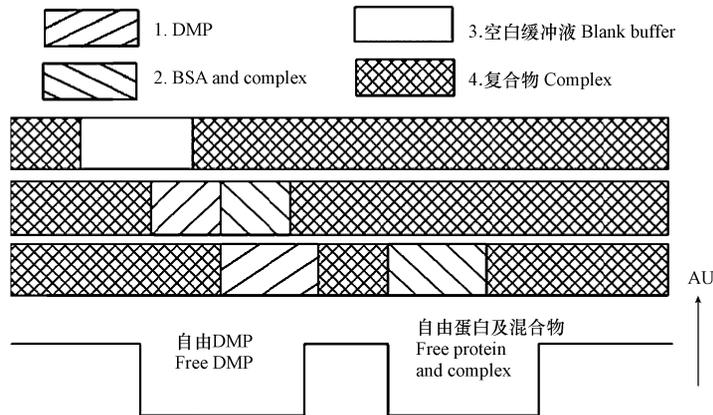


图 4 毛细管电泳中空峰方法电泳图

Fig.4 Electropherograms of vacant peak in capillary electrophoresis

分析图 5 可知, 图中总共出现 3 个峰, 分别为 a 峰、b 峰和 c 峰. 图 5 中, a 峰为 DMP 的紫外吸收峰, b 峰为内标 DMF 的紫外吸收峰, c 峰为 BSA 的紫外吸收峰.

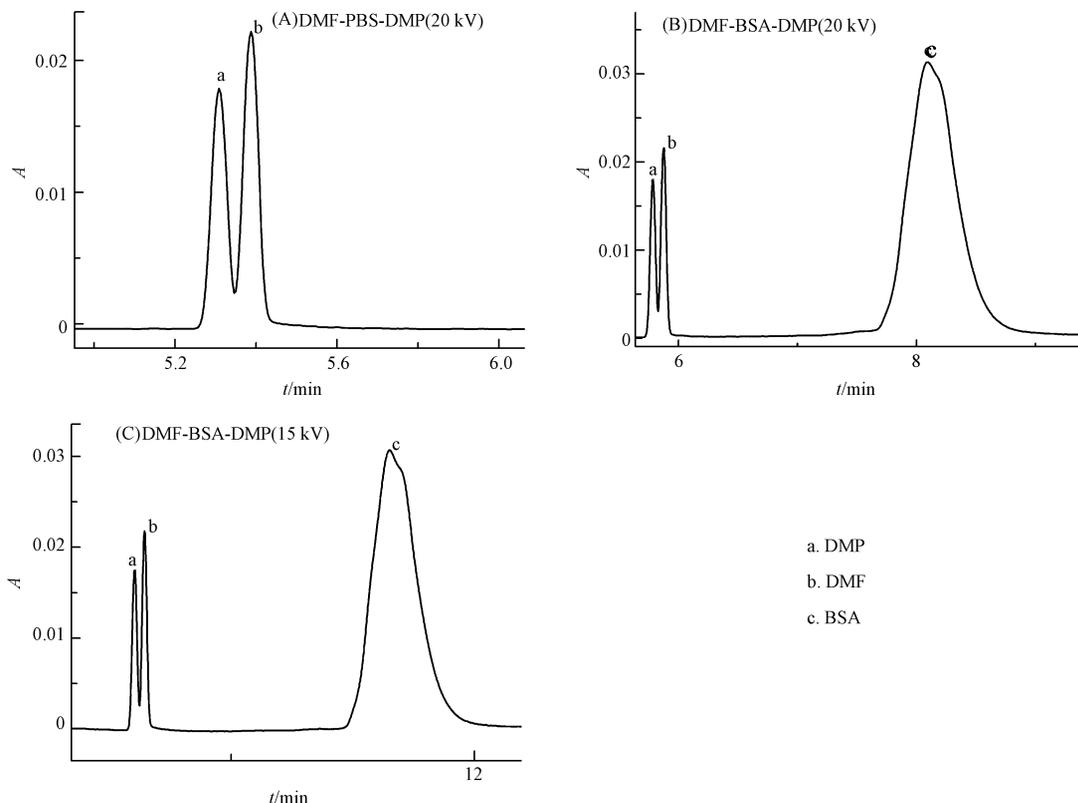


图 5 区段-区段动力学法测得的 DMP 与 BSA 相互作用的电泳图

Fig.5 Electropherograms of BSA in interaction with DMP using Plug-Plug Kinetic

图5A中为第一组进样,样品进样次序为DMF-PBS-DMP,中性内标DMF与DMP的电泳方向与电渗方向相反,由于电渗速率大于溶质电泳速度,所以出现两个正峰,DMP先出峰.在图5B中将PBS更换成BSA进样获得3个正峰,由于BSA与DMF和DMP的质荷比不同,BSA带有负电荷,DMP的迁移速率大于BSA的迁移速率,故DMP区段会穿过BSA区段,DMP与BSA发生可逆结合反应,形成了DMP-BSA复合物,而DMP的迁移速率大于DMF的迁移速率,BSA和复合物的迁移速率最小,BSA与复合物的迁移速率相近,所以DMP先出一个正峰,第二个正峰为DMF,最后正峰为BSA和复合物.在图5C中,进样虽与图B相同,仍会出现3个正峰,改变了分离电压,所以样品的迁移时间都发生变化,可观察到由于电压的减小,最后DMP、DMF、BSA及复合物的保留时间增大.

分析图6、图7可知,图中a峰皆为BSA和DMP-BSA复合物的紫外吸收峰,随着DMP浓度的增大,a峰呈下降趋势,说明DMP与BSA发生了结合,形成了复合物,使BSA的吸收峰降低.图6、图7中b峰都为DMP的紫外吸收峰,随着DMP浓度的增大,b峰的紫外吸收逐渐增大.图6、图7中DMP的峰在BSA峰的前面,这是因为在DMP与BSA混合样中,由于试样中部分DMP与BSA发生可逆结合反应,形成了DMP-BSA复合物,在本实验条件下,DMP与BSA质荷比不同、BSA和DMP-BSA复合物分子带负电荷,其电泳方向与电渗方向相反,由于电渗速率大于电泳速度,DMP的荷质比小于BSA与DMP-BSA复合物的荷质比,故DMP的迁移速率大于BSA与DMP-BSA复合物,出峰于BSA之前,由于BSA与DMP-BSA复合物的荷质比相近,BSA与DMP-BSA复合物没有完全分开,所以会出现1个正峰(a峰).在简化的Hummel-Dreyer法中(图6),负峰(b峰)为实验组溶液区段中DMP浓度低于空白对照试验背景缓冲液中DMP浓度的部分,差值部分即为与BSA结合的DMP;而在前沿分析法中(图7)是以空白缓冲液进样,所以DMP峰为正峰(b峰),即为自由的DMP.

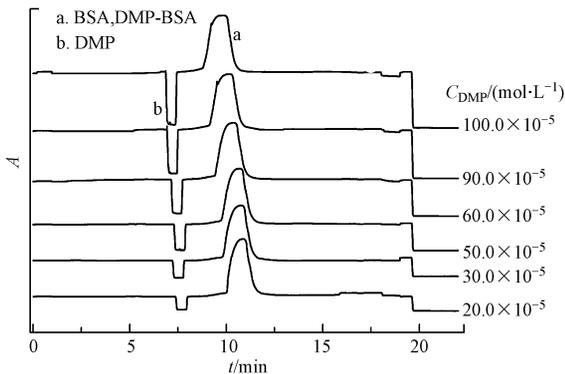


图6 简化的HD法测得的DMP与BSA相互作用的电泳图

Fig.6 Electropherograms of BSA in interaction with DMP using simplified Hummel-Dreyer

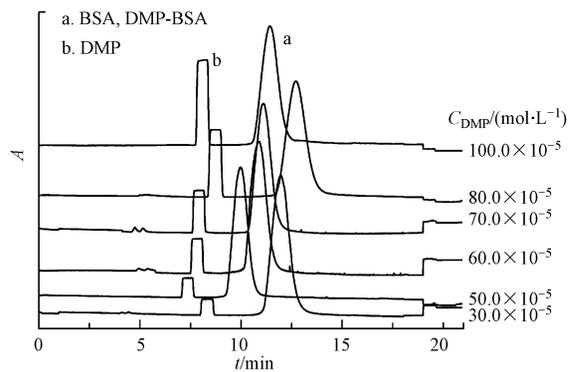


图7 前沿分析法测得的DMP与BSA相互作用的电泳图

Fig.7 Electropherograms of BSA in interaction with DMP using frontal analysis

2.5 DMP与BSA相互作用的结合常数(K)及结合位点数(n)

本工作由所得的实验数据分析DMP-BSA相互作用的结合参数,分别采用Scatchard方程、Klotz方程以及非线性回归方程处理上述体系.

假设蛋白分子与小分子的结合是理想状态即蛋白与小分子的结合位点是相互独立的,其平衡关系可以用下述多级平衡方程式表示:

$$R = \frac{C_b}{C_p} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i C_f}{1 + K_i C_f}$$

其中, R 为结合比, m 为结合位点总类数, n_i 为第 i 类位点数, K_i 为第 i 类位点的结合常数, C_b 是结合小分子的浓度, C_f 是未结合(游离)小分子的浓度, C_p 是蛋白的总浓度.不论小分子与蛋白结合有几个位点,若小分子与所有结合位点的亲和力相同($m=1$),方程可以简化为:

$$R = \frac{nKC_f}{1 + KC_f}$$

即游离小分子的浓度 C_f 与结合比 R 呈非线性关系.此方程可变形为 C_f 与 R 的非线性方程:

$$R = \frac{C_f}{\frac{1}{nK} + \frac{C_f}{n}}$$

可以将此方程简化为 R 与 R/C_f 的线性方程: $R/C_f = -KR + nK$. 这就是著名的 Scatchard^[36] 方程的形式. 在这个方程式中, 根据斜率和截距可直接求出结合常数 K 和结合位点数 n . Klotz 提出了相互作用的 Klotz^[37] 线性方程式:

$$\frac{1}{R} = \frac{1}{n} + \frac{1}{nKC_f}$$

图 8、图 9 结合表 1、2、3 可见, DMP 与 BSA 存在一个结合位点, DMP 与 BSA 之间存在结合强度适中的结合作用. 结合常数 K 值(数量级 $10^3-10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$) 相近, 电泳时游离的 BSA 分子和 DMP-BSA 结合物难以分开, 混合在一起迁移, 可在谱图上(图 6、图 7)见到一个完整的峰, 且在反应前后, 谱图中的峰数目未增加. 由此表明了 DMP-BSA 体系为快速结合反应.

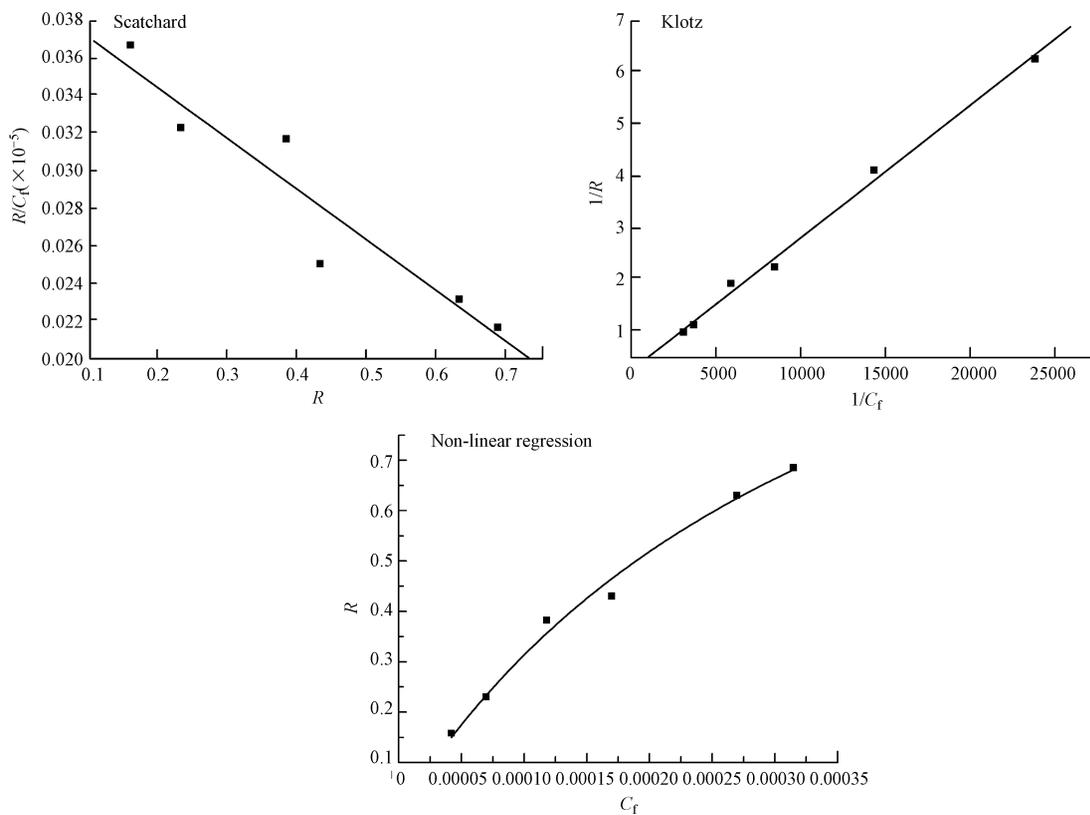


图 8 简化的 HD 法测得的 DMP 与 BSA 相互作用的拟合图

Fig.8 Linear fitting results of BSA in interaction with DMP using simplified Hummel-Dreyer

表 1 BSA 与 DMP 的结合参数

Table 1 The binding parameters of DMP to BSA

方法 Method	理论方法 Theoretical method	$K/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	结合位点数 n	拟合方程 Fitting equation	相关系数 R
HD	非线性回归	2.684×10^3	1.49	$y = x / (0.00025 + 0.66702x)$	0.9892
	Scatchard 线性回归	2.853×10^3	1.43	$y = 0.04088 - 0.02853x$	0.9431
	Klotz 线性回归	3.28×10^3	1.29	$y = 0.7728 + 0.000236x$	0.9970
FA	非线性回归	4.468×10^3	0.61	$y = x / (0.00037 + 1.63313x)$	0.9861
	Scatchard 线性回归	5.819×10^3	0.55	$y = 0.03197 - 0.05819x$	0.9760
	Klotz 线性回归	6.361×10^3	0.52	$y = 1.89215 + 0.0003x$	0.9972

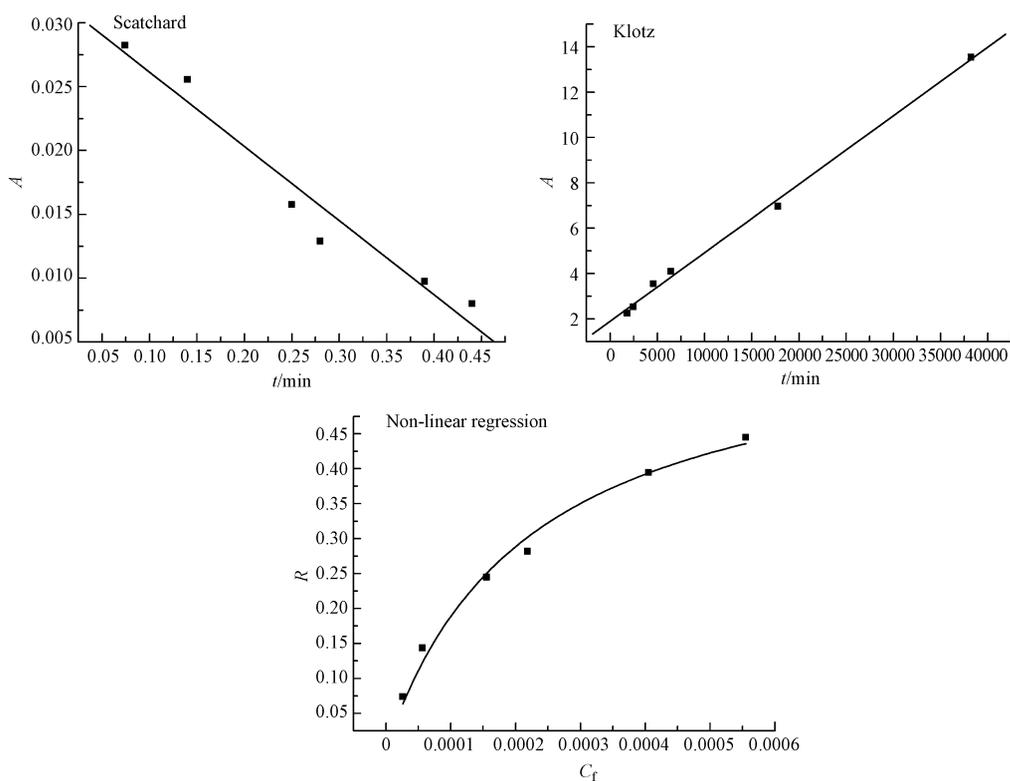


图9 前沿分析法测得的 DMP 与 BSA 相互作用的拟合图

Fig.9 Linear fitting results of BSA in interaction with DMP using frontal analysis

区段-区段动力学方面, DMP 与 BSA 的定量结合常数 K 由结合速率常数 k_{on} 和离解速率常数 k_{off} 的两者比值所确定^[38-39].

通过改变分离电压, 获得不同离解时间下 DMP 或 BSA 的出峰时间和峰高, 采用时间比法, 测定 DMP 与 BSA 相互作用时的离解过程, 求得 k_{off} 后, 利用 k_{off} 求得 k_{on} .

$$K = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}}$$

$$k_{\text{off}} = \frac{1}{t_3 - t_2} \ln \frac{ha_0 - ha_2}{ha_0 - ha_3} = \frac{1}{t_3 - t_2} \ln \frac{hb_0 - hb_2}{hb_0 - hb_3}$$

$$k_{\text{on}} = \frac{1}{t_1(a_0 - b_0)} \ln \frac{b_0 a_1}{a_0 b_1} = \frac{1}{t_1(a_0 - b_0)} \ln \frac{b_0(a_0 - c_1)}{a_0(b_0 - c_1)}$$

本方法中, 设 A 物质为 DMP, B 物质为 BSA, C 物质为 DMP 与 BSA 相互作用后的结合物. a 、 b 和 c 分别为 DMP、BSA 及其结合物的浓度, ha_0 对应于 DMP 浓度为 a_0 时的峰高, ha_2 、 ha_3 、 hb_0 、 hb_2 和 hb_3 代表的含义以此类推. t_2 和 t_3 分别为不同运行电压下 DMP 或 BSA 的出峰时间, 可在保证 A 与 B 结合过程一致的前提下通过改变电压获得. 第二次进样可测定 ha_2 和 t_2 时, 第三次进样即改变电压后可测定 ha_3 和 t_3 , a_0 、 b_0 、 t_1 等参数的计算公式则可参考文献[38].

表2 区段-区段毛细管电泳中动力学参数 k_{on} 的测定 ($n=3$)

Table 2 The determination of k_{off} in plug-plug kinetic capillary electrophoresis ($n=3$)

$a_0 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	ha_0	ha_2	t_2 / min	ha_3	t_3 / min	$k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$
10^{-3}	0.895	0.850	5.684	0.877	7.714	0.009

表 3 区段-区段毛细管电泳中动力学参数 k_{on} 的测定 ($n=3$)Table 3 The determination of k_{on} in plug-plug kinetic capillary electrophoresis ($n=3$)

$a_0/$ (mol·L ⁻¹)	$b_0/$ (mol·L ⁻¹)	t_{DMP}/min	t_1/s	t_{BSA}/min	$c_1/$ (mol·L ⁻¹)	$c_2/$ (mol·L ⁻¹)	k_{on}/s^{-1}
1.000×10^{-3}	0.100×10^{-3}	5.684	29.750	7.371	0.082×10^{-3}	0.050×10^{-3}	200.000

$$K = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{200.000}{0.009} = 2.222 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

3 结论 (Conclusion)

本实验分别用简化的 Hummel-Dreyer 法、Frontal analysis 法、Vacant peak 法、Plug-plug kinetic 法研究了 DMP 与 BSA 的相互作用。应用 Scatchard 方程、Klotz 方程、Regression method 方程, 结合速率相比法测定了 DMP 与 BSA 的结合常数 K 和结合位点 n 。经过对比发现 Plug-plug kinetic 法实验操作简单, 耗时短, 有效获取体系作用参数, 然而数据有限, 有关结合位点的信息不足。Plug-plug kinetic 法适用于本体系作用的快速检测, 侧面验证其他方法。Hummel-Dreyer 法与 Frontal analysis 法皆可分析 DMP-BSA 体系, 两种方法实验出峰清晰, 且随着实验组浓度梯度的递增, 峰高呈现明显的趋势。Hummel-Dreyer 法中代表结合 DMP 的负峰逐渐增高, 代表游离蛋白及复合物的正峰降低; Frontal analysis 法中代表自由 DMP 的正峰逐渐增高, 代表自由蛋白及复合物的正峰降低。Plug-plug kinetic 法简单快捷, Hummel-Dreyer 法与 Frontal analysis 法精准可靠, 综合比较, 简化的 Hummel-Dreyer 法最适用。

研究中使用 3 种不同的方程 (Scatchard 方程、Klotz 方程和非线性方程 (Non-linear regression)) 构建 DMP-BSA 相互作用模型, 3 种方程均有效反映体系的作用效果; Klotz 方程得到结合常数 K 值最大, Scatchard 方程次之, Non-linear regression 最小, 但数量级均为 $10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, DMP-BSA 结合强度适中; Non-linear regression 得到结合位点数 n 最大, Scatchard 方程次之, Klotz 方程最小, 平均皆为 1.0。DMP-BSA 作用只有单一类型的结合位点。综合比较, 通过模型适用度分析得出非线性回归方程是 DMP-BSA 体系的最适方程。

本工作创新应用毛细管电泳技术, 使用多种毛细管电泳方法于分子水平上探究 DMP 毒理机制, 并运用多个方程进行解析, 建立了 DMP-BSA 体系相互作用机制的检测方法, 方法具有耗样量小、可获得全面的结合信息及分析准确、快捷的优点, 能客观的反映 DMP 在体内与 BSA 的结合情况, 对 DMP 与 BSA 的结合规律和机理的进一步探究具有重要意义, 同时可为研究其他类似的邻苯二甲酸酯-蛋白质体系的分子作用机理研究提供有益参考。

参考文献 (References)

- [1] WILINSON J L, HOODA P S, BARKER J. Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products and other emerging contaminants: A review of environmental receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2016, 46: 336-381.
- [2] VARSHNEY A, SEN P, AHMAD E, et al. Ligand binding strategies of human serum albumin: How can the cargo be utilized? [J]. Chirality, 2010, 22(1): 77-87.
- [3] RYAN A J, GHUMAN J, ZUNSZAIN P A, et al. Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin [J]. Journal of Structural Biology, 2011, 174(1): 84-91.
- [4] WAGNER S, ROTHWEILER F, ANHORN M G, et al. Enhanced drug targeting by attachment of an anti alphav integrin antibody to doxorubicin loaded human serum albumin nanoparticles [J]. Biomaterials, 2010, 31(8): 2388-2398.
- [5] SHIBUKAWA A, ISHIZAWA A, KIMURA T, et al. Plasma protein binding study of oxybutynin by high-performance frontal analysis [J]. Journal of Chromatography B, 2002, 768: 177-188.
- [6] DUAN L, YANG L J, XIONG H Y, et al. Studies on the electrochemistry of rutin and its interaction with bovine serum albumin using a glassy carbon electrode modified with carbon-coated nickel nanoparticles [J]. Microchimica Acta, 2013, 180(5-6): 355-361.
- [7] BOURASSA P, KANAKIS C D, TARANTILIS P, et al. Resveratrol, and curcumin bind serum albumin [J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2010, 114(9): 3348-3354.

- [8] KUMAR H, BEHAL I. Volumetric, ultrasonic and UV absorption studies on interactions of antibiotic drug chloramphenicol with glycine and its dipeptide in aqueous solutions at $T=(288.15-318.15)K$ [J]. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 2016, 99: 16-29.
- [9] KARTHIKEYAN S, BHARANIDHARAN G, MANI K A, et al. Determination on the binding of thiazazole derivative to human serum albumin: A spectroscopy and computational approach[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2016, 34: 1-26.
- [10] GHOSH K, RATHI S, ARORA D, et al. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine serum Albumin (BSA)[J]. *Journal of Luminescence*, 2016, 175: 135-140.
- [11] ISLAM M M, SONU V K, GASHNG P M, et al. Caffeine and sulfadiazine interact differently with human serum albumin: A combined fluorescence and molecular docking study[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 152(5): 23-33.
- [12] FABINI E, FIORI G M L, TEDESCO D, et al. Surface plasmon resonance and circular dichroism characterization of cucurbitacins binding to serum albumins for early pharmacokinetic profiling[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 122(15): 166-172.
- [13] VUIGNIER K, SCHAPPLER J, VEUTHEY J L, et al. Drug-protein binding: A critical review of analytical tools[J]. *Analytical of Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398: 53-66.
- [14] DEY B, THUKRAL S, KRISHNAN S, et al. DNA-Protein interactions: methods for detection and analysis[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2012, 365: 279-299.
- [15] 郭明, 刘咪咪, 李铭慧, 等. 不同形态铬离子与牛血清白蛋白结合的反应机制[J]. *环境化学*, 2013, 32(1): 65-70.
GUO M, LIU M M, LI M H, et al. Binding interaction mechanism between different forms of chromium and bovine serum albumin[J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(1): 65-70(in Chinese).
- [16] 张礼和, 王梅祥. 化学生物学进展[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
ZHANG L H, WANG M X. *Advances in Chemicobiology*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005 (in Chinese).
- [17] ROTSCHAFFER J C, ANDES D R, RODVOLD K A. *Antibiotic Pharmacodynamics*[M]. New York: Humana Press, 2016: 109-125.
- [18] LLKHANI H, HUGHES T, Li J, et al. Nanostructured SERS-electrochemical biosensors for testing of anticancer drug interactions with DNA[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80: 257-264.
- [19] BOWATER R P, COBB A M, Pivonkova H, et al. Biophysical and electrochemical studies of protein-nucleic acid interactions[J]. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 2015, 146: 723-739.
- [20] 郭明, 何玲, 孙一新, 等. 槲皮素修饰玻碳电极 (Qu/GCE) 的制备及铜离子-牛血清白蛋白结合反应机制研究[J]. *环境化学*, 2012, 31(9): 1355-1361.
GUO M, HE L, SUN Y X, et al. Investigation of the binding interaction between copper ions and bovine serum albumin on quercetin-modified glassy carbon electrode[J]. *Environmental Chemistry*, 2012, 31(9): 1355-1361(in Chinese).
- [21] ASSFALG M, RAGONA L, PAGANO K, et al. The study of transient protein-nanoparticle interactions by solution NMR spectroscopy[J]. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Protein and Proteomics*, 2016, 1864: 102-114.
- [22] ZOU J, LEE L T, WANG Q Y, et al. Mapping the interactions between the NS4B and NS3 protein of Dengue Virus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89: 3471-3483.
- [23] 袁东. 分子水平上研究邻苯二甲酸酯及稀土离子类污染物对血清白蛋白的毒性分析新方法[D]. 济南: 山东大学, 2011.
YUAN D. New methods for the toxicity analysis of phthalate esters and rare earths with serum albumin at the level of molecule[D]. Jinan: Shandong University, 2011(in Chinese).
- [24] 谢晓芸. 几种典型内分泌干扰物与人血清白蛋白相互作用的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
XIE X Y. The studies of interaction between several typical endocrine disruptors and human serum albumin[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2011(in Chinese).
- [25] 周喜敏. 某些有机小分子与人血清白蛋白的相互作用的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
ZHOU X M. Study on interaction between some small organic molecule and human serum albumin[D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012 (in Chinese).
- [26] 王亚萍. 农药、塑化剂与蛋白质的结合机理研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
WANG Y P. Investigation on the binding mechanism of pesticides and plasticizer with protein[D]. Nanchang: Nanchang University, 2015 (in Chinese).
- [27] DEEB S E, WÄTZIG H, EL-HADY D A, et al. Recent advances in capillary electrophoretic migration techniques for pharmaceutical analysis(2013-2015)[J]. *Electrophoresis*, 2016, 37: 879.
- [28] KLODZINSKA E, JAWORSKI M, KUPCZYK W. A study of interactions between bacteria and antibiotics by capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2012, 33: 3095-3100.
- [29] REDWEIK S, CIANCIULL C, HARA M, et al. Precise fast and flexible determination of protein interactions by affinity capillary electrophoresis. Part 2: Cations[J]. *Electrophoresis*, 2013, 34: 1812-1819.
- [30] ZHANG S, CHENG J, CHEN W J, et al. Interaction between thrombin and natural products of *Millettianita* var. *hirsutissima* using capillary zone electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877: 4107-4114.
- [31] YANG R, ZENG H J, LI J J, et al. Capillary electrophoresis coupled with end-column electrochemiluminescence for the determination of

- ephedrine in human urine, and a study of its interactions with three proteins[J]. *Luminescence*, 2011, 26: 374-379.
- [32] 燕高峰, 毛伟峰, 贾旭东, 等. 两种邻苯二甲酸酯类物质的抗雄激素作用研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(2): 149-154.
YAN G F, MAO W F, JIA X D, et al. Study of anti-androgenic effect of two of phthalate esters[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2016, 28(2): 149-154(in Chinese).
- [33] 陈文婕, 戴红, 陈敏, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对小白鼠肝脏毒性及脂质过氧化损伤[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(1): 93-98.
CHEN W J, DAI H, CHEN M, et al. Hepatotoxic effect and lipid oxidative damage of diethylhexyl phthalate(DHEP) on mice[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(1): 93-98(in Chinese).
- [34] 武宗高, 陈素燕, 周培源, 等. 3种增塑剂单独和联合暴露对MCF-7细胞增殖的影响[J]. *安全与环境学报*, 2015, 15(6): 392-395.
WU Z G, CHEN S Y, ZHOU P Y, et al. Study on the combined effect of the three kinds of plasticizers on the proliferations of MCF-7 cells [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2015, 15(6): 392-395(in Chinese).
- [35] DE WITTE W E, WONG Y C, NEDERPELT I, et al. Mechanistic models enable the rational use of *in vitro* drug-target binding kinetics for better drug effects in patients[J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2016, 11(1): 45-63.
- [36] SCATCHARD G, ANN N Y. The attractions of proteins for small molecules and ions[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1949, 51: 660-672.
- [37] KLOTZ I M, HUNSTON D L. Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites[J]. *Biochemistry*, 1971, 10: 3065-3069.
- [38] 刘春叶, 张雪娇, 苗延青, 等. 毛细管电泳法研究牛血清白蛋白与盐酸异丙肾上腺素的相互作用[J]. *分析科学学报*, 2015, 31(3): 313-317.
LIU C Y, ZHANG X J, MIAO Y Q, et al. Studies on the interaction between bovine serum albumin and hydrochloric acid isoproterenol by capillary electrophoresis[J]. *Journal of Analytical Science*, 2015, 31(3): 313-317 (in Chinese).
- [39] XIA Z N, LI L X, CHEN H, et al. Kinetic parameters of interaction between cell membrane and drug by ppkce[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2011, 32: 851-856.