

基于荧光数据计算蛋白质-配体结合常数的方程的对比及应用研究

张静¹, 高焯^{1,2}, 金亮¹, 王鸿辉¹, 周细平¹

1. 河口生态安全与环境健康福建省高校重点实验室, 厦门大学嘉庚学院环境科学与工程学院, 福建 漳州 363105
2. 厦门大学环境与生态学院, 福建 厦门 361102

摘要 蛋白质和配体的结合作用在生物体的生理生化过程中具有重要作用, 是诸多领域的研究热点。研究蛋白质-配体结合作用的一个关键目标, 就是获得两者的结合常数(K_b)以评价其结合作用的强弱。荧光光谱法具有灵敏度高、方便快捷及成本低的优点, 被广泛用于蛋白质-配体结合作用的研究中。应用荧光光谱法时, 借助函数方程对荧光数据进行数学分析来得到 K_b 值是一个关键步骤。因不同方程的适用范围不同, 应用于同一体系所获得的 K_b 值往往存在差异。针对此问题, 一方面讨论了利用荧光光谱数据计算蛋白质和配体结合的 K_b 值的函数方程的推导过程及其适用条件, 总结出不同前提下蛋白质-配体 1:1 和 1:n ($n \geq 2$) 结合时可选择的计算 K_b 值的最优方程。分析表明, 选择最优方程应基于两个前提: a: 蛋白质与配体结合后形成的复合物是否产生荧光; b: 添加的配体浓度是否远大于蛋白质浓度。另一方面, 以人血清白蛋白(HSA)-诺氟沙星(NFX)结合体系作为模型, 对比了由不同方程拟合得到的 K_b 值的差异并探讨了相应原因。结果表明, HSA 与 NFX 为 1:1 结合, 利用最适用该体系的方程(S12)拟合得到其在 298 K 下的 K_b 值为 $5.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 而使用方程(S6)和方程(S24)拟合得到的 K_b 值分别比该值大 28.8% 和 48.6%, 由方程(S17)得到的值则比该值约高 2 个数量级。这直观地展示了选择不适用的方程对所获结果的影响。此外, 将利用荧光光谱法获得的 K_b 值与其他方法获得的数据做了对比, 说明了利用荧光光谱法计算蛋白质-配体 K_b 值的相对可靠性, 同时也指出了该方法的局限性。结果表明, 在利用荧光光谱数据获得蛋白质-配体结合的 K_b 值时, 依据前提条件(即假设 a 和/或 b 是否成立)来选取最适合的函数方程是非常必要的, 其将决定所得结果的可靠性。

关键词 结合常数; 函数方程; 适用条件; 人血清白蛋白; 诺氟沙星

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)11-3494-05

引言

蛋白质作为重要的功能性生物大分子, 在生物体的物质转运、代谢转化、催化作用、信息传递和免疫反应等生命活动中扮演重要角色^[1]。而这些生命活动的发生大多涉及蛋白质-配体的结合作用。因此, 蛋白质与配体结合作用的研究一直以来都是化学、药学、医学、毒理学以及生物学等多种学科领域的热点问题。

在研究蛋白质和配体结合作用时, 评价其结合作用的强弱具有重要意义。以药物分子与生物体转运蛋白质的结合作为例, 其结合作用的强弱直接影响药物在生物体内的药代

动力学和药效学特性^[2]。评价蛋白质和配体结合作用强弱的重要参数是结合常数(K_b)。目前, 多种分析方法可用以获得蛋白质-配体的 K_b 值, 如光谱分析法(荧光、紫外-可见吸收、圆二色、核磁共振和表面等离子体共振光谱法等)及非光谱分析法如平衡透析法、亲和层析法、电化学方法、等温滴定热法和分子对接法等^[3]。其中, 荧光光谱法因其灵敏度高、方便快捷及成本低的优点, 被广泛用于蛋白质和配体结合作用研究中。

利用荧光光谱法获得蛋白质和配体的结合常数, 往往是通过测定配体对蛋白质的荧光猝灭效应, 并借助分析方程对荧光猝灭数据进行数学分析来得到 K_b 值。在该过程中, 因不同函数方程的适用范围不同, 在使用时应据具体情况进行

收稿日期: 2019-11-14, 修订日期: 2020-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(41606119), 福建省自然科学基金项目(2018J05024)和福建省高校杰出青年科研人才培育计划项目(闽教科[2018]47号)资助

作者简介: 张静, 1989年生, 厦门大学嘉庚学院环境科学与工程学院, 河口生态安全与环境健康福建省高校重点实验室副教授
e-mail: jingz421@xujc.com

选择。而以往大量的研究常忽视了这一问题,一些方程被不加选择地使用,使得不同研究者对相同目标物的研究结果相异甚至大相径庭^[4]。那么,这其中必定有一些结果是存在问题的。然而,目前很少有研究透彻地对比分析不同函数方程的立脚点、适用范围及其存在的缺陷,来帮助研究人员方便快速地选择合适且有效的分析方程以避免错误的数据分析。

鉴于此,本文拟对现有且常用的用于计算蛋白质和配体结合常数的函数方程进行对比分析。一方面,通过不同方程的推导过程来明确其使用前提和适用范围。另一方面,选取人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)-诺氟沙星(norfloxacin, NFX)结合反应体系作为模型,在方程的实际应用中考察选择不适用的方程对所获结果的影响。此外,我们还对比了不同分析方法获得的 HSA-NFX 结合反应的 K_b 值,来评估荧光光谱法计算 K_b 值的可靠性。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

NFX(纯度 > 98%) 和 HSA(纯度 > 96%) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。配制 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 为 7.40 的磷酸盐缓冲溶液(PBS),并用其作溶剂,分别配制 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HSA 储备液及 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NFX 储备液,均置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。其余试剂均为分析纯,实验用水为 Milli-Q 超纯水($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

F-4600 型荧光分光光度计(日立高新技术公司,日本); UV-8000S 紫外-可见分光光度计(上海元析仪器有限公司,中国)。

1.2 方法

1.2.1 HSA-NFX 反应体系的配制

荧光猝灭实验体系:向一系列 10 mL 比色管中加入一定量 HSA 和 NFX 储备液,并用 PBS 缓冲液定容至 10 mL,使其中 HSA 浓度为 $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, NFX 浓度分别为 (0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0, 300.0) $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。设置 3 组平行样。

Job's plot 实验体系:样品中固定 HSA 和 NFX 总浓度为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 设置 HSA 的浓度分别为 (0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0, 13.0, 14.0, 15.0, 16.0, 17.0, 18.0, 19.0, 20.0) $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, NFX 的浓度随之变化。设置相应的对照组,对照组溶液中仅含与样品组浓度相同的 HSA,而无 NFX。设置 3 组平行样。

1.2.2 荧光光谱测定

298 K 下,使用 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 石英比色皿,设置激发波长为 282.0 nm,检测 HSA-NFX 反应体系在 290~480 nm 范围内的荧光发射光谱,扫描速度为 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,激发、发射狭缝均为 5 nm。所得荧光强度数据均利用公式 S1 进行内滤效应校正^[4]。

1.2.3 吸收光谱测定

于 298 K 温度下,扫描试液在 190~450 nm 范围内的紫

外-可见吸收光谱,所得数据用于 HSA-NFX 反应体系的荧光内滤效应校正。

2 结果与讨论

2.1 荧光静态猝灭数据分析方法的对比

荧光猝灭分为动态猝灭或静态猝灭,其分别由猝灭剂与荧光团的激发态相互作用或猝灭剂抑制荧光团激发态的形成所产生^[5]。区分静、动态猝灭最有效的方法是测定荧光团的寿命变化。本文所讨论的计算 K_b 值的不同方法仅针对因荧光团和猝灭剂间形成基态复合物所引起的静态猝灭过程。因此,据荧光寿命分析判定猝灭方式为静态猝灭后才可参考本文选择合适的计算方法。

基于蛋白质-配体的复合物模型,并将蛋白质-配体的结合划分为 $1:1$ 和 $1:n$ ($n \geq 2$) 结合两类,在支持信息 S2 部分详细讨论分析了利用荧光光谱数据计算蛋白质和配体结合的 K_b 值的不同函数方程的推导过程及相应的适用条件。由讨论可知,判断假设 a 蛋白质-配体复合物不再产生荧光,和假设 b 添加的配体浓度远大于蛋白质浓度(超过 10 倍)是否成立是选取适用的函数方程的前提条件。为此,我们总结了蛋白质-配体 $1:1$ 和 $1:n$ 结合时在不同情形下可选择分析方程,详见表 1。

2.2 不同数据分析方法在 HSA-NFX 荧光猝灭体系中的应用

在选取上述方程计算 HSA 与 NFX 的结合常数前,需首先确定 HSA 与 NFX 的结合比。由图 1(a)可知,经 Job's plot^[6] 拟合,两条拟合线的交点处 NFX 的摩尔分数 $X_{\text{NFX}} \approx 0.5$,表明 HSA 与 NFX 结合的化学计量数比为 $1:1$ 。在此基础上,进一步研究了不同浓度 NFX 对 HSA 的荧光猝灭情况[见图 1(b)]。由图 1(b)可知,当 NFX 的浓度大于 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HSA 的荧光即基本被完全猝灭。由此判定,在 HSA-NFX 体系中, S2.1 所提出的假设 a 成立,即 HSA-NFX 复合物不再产生荧光。

为讨论需要,选取图 1(b)中 NFX 浓度为 0 至 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的数据点进行后续分析。在此条件下, S2.1 中所提出的假设 b 是不成立的。此时,方程(S12)是计算 HSA 与 NFX 结合常数的最优选择,经非线性拟合得到 HSA 与 NFX 的 K_b 值为 $5.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。如计算时未考虑假设 b 是否成立而选取方程(S6),则经拟合得到的 K_b 值为 $6.44 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,比使用方程(S12)得到的值大 28.8%。

在以往较多的研究中,方程(S17)也常用以计算蛋白质-配体 $1:1$ 结合时的 K_b 值(即默认 $n=1$)^[7]。为对比,利用方程(S17)进行拟合分析得到 K_b 值为 $4.48 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,这比由方程(S12)所得值高 2 个数量级。这是由于:(1)方程(S17)的使用前提为假设 a 和 b 均成立,而对于本文分析的 HSA-NFX 体系,假设 a 成立而假设 b 并不成立;(2)利用方程(S17)拟合时,利用拟合曲线的截距计算 K_b 值时涉及 10 的次方运算,因此拟合过程中斜率 n 的微小变化就可引起 K_b 值较大的改变。在针对 HSA 与保泰松结合常数的研究中,利用方程(S17)拟合得到的 K_b 值比由最优方程或其他分析方法获得的值约低 2 个数量级^[4],这也展现了方程(S17)

表 1 蛋白质-配体 1 : 1 和 1 : n 结合时方程的选择

Table 1 Selection of equations for 1 : 1 or 1 : n protein-ligand binding processes

结合比	假设 a	假设 b	The optimal equation *
1 : 1	成立	成立	$\frac{F_0 - F}{F} = K_b [L_{add}]$ (S6)
	不成立	成立	$\frac{F_0 - F}{F - F_c} = K_b [L_{add}]$ (S7)
			$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_a K_b [L_{add}]} + \frac{1}{f_a}$ (S8)
	成立	不成立	$\frac{F_0 - F}{F_0} = \frac{[P_{add}] + [L_{add}] + \frac{1}{K_b} - \sqrt{([P_{add}] + [L_{add}] + \frac{1}{K_b})^2 - 4[P_{add}][L_{add}]}}{2[P_{add}]}$ (S12)
	不成立	不成立	$\frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} = \frac{[P_{add}] + [L_{add}] + \frac{1}{K_b} - \sqrt{([P_{add}] + [L_{add}] + \frac{1}{K_b})^2 - 4[P_{add}][L_{add}]}}{2[P_{add}]}$ (S13)
	成立	成立	$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg [L_{add}]$ (S17)
1 : n (n ≥ 2)	不成立	成立	$\lg \frac{F_0 - F}{F - F_c} = \lg K_b + n \lg [L_{add}]$ (S18)
	成立	不成立	$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K_b + n \lg \left([L_{add}] - n [P_{add}] \frac{F_0 - F}{F_0} \right)$ (S19)
			$\frac{F_0}{F} = \frac{K_b [L_{add}] F_0}{F_0 - F} - n K_b [P_{add}]$ (S22)
	不成立	不成立	$\lg \frac{F_0 - F}{F - F_c} = \lg K_b + n \lg \left([L_{add}] - n [P_{add}] \frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} \right)$ (S20)
			$\lg \frac{F_0 - F}{F - F_c} = n \lg K_a + n \lg \left([L_{add}] - n [P_{add}] \frac{F_0 - F}{F_0 - F_c} \right)$ (S21)
			$\frac{F_0 - F_c}{F - F_c} = \frac{K_b [L_{add}] (F_0 - F_c)}{F_0 - F} - n K_b [P_{add}]$ (S23)
		$K_b = \frac{\beta}{1 - \beta} \times \frac{1}{[L]}$ (S24)	

* 方程中具体参数意义及推导过程详见支持信息 S2 部分

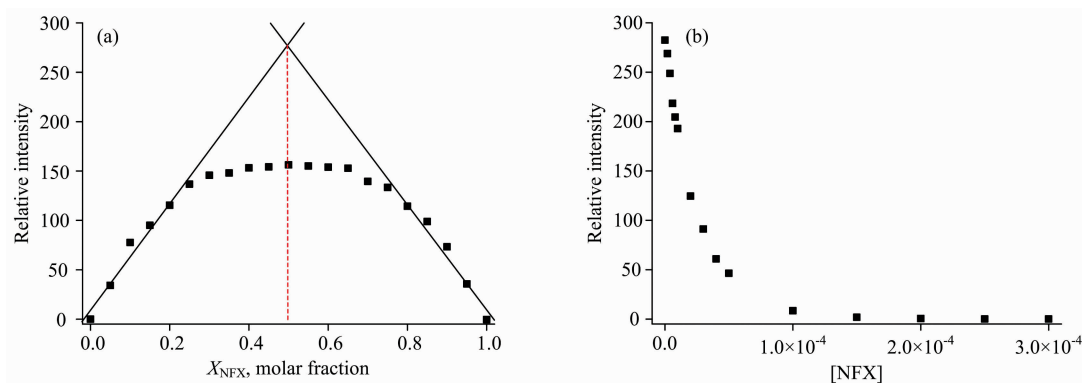


图 1 (a) 总浓度 ([HSA] + [NFX]) 为 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 HSA-NFX 体系荧光猝灭的 Job's Plot; (b) 不同浓度 NFX 存在下 HSA 的相对荧光强度
激发波长 = 282 nm, 发射波长 = 332 nm

Fig. 1 (a) Job's plot for fluorescence quenching of HSA-NFX system at 282 nm excitation with total concentration of $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ([HSA] + [NFX]); (b) The relative fluorescence intensity of HSA in the presence of various concentrations of NFX
Ex = 282.0 nm, Em = 332.0 nm

的缺陷对所得结果产生的较大影响, 佐证了上述判断。此外, 同样默认 n 为 1, 利用方程 (S24) 拟合得到 HSA-NFX 体系的 K_b 值为 $7.43 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 该值比使用方程 (S12) 得到的值大 48.6%。虽如此, 利用方程 (S24) 计算 K_b 值的可靠

性仍强于方程 (S17)。

综上, 在分析假设 a 成立的 HSA-NFX 荧光猝灭体系时, 如直接选用基于假设 b 成立的方程, 得到的 K_b 值将会存在一定的误差; 同时, 应用方程时一些等价的数学变化可

能会引入较大的误差,使所得结果明显不可靠。这提示,在应用上述方程计算 K_b 值时,应按照其使用条件正确选择。然而,令人担忧的是,数据分析时不加选择地使用上述方程的现象仍较为普遍。因此,一些文章中报道的 K_b 值很可能不能真实反映蛋白质-配体间的真实亲和力。

以往研究者在研究 HSA 与 NFX 的结合作用时,除了荧光光谱法,还利用表面等离子共振法、等温滴定热法和亲和毛细管电泳法来获得 K_b 值。于此,我们对比了不同分析方法所获得的结果(表 2)。由表 2 可知,不同分析方法所得的 HSA 与 NFX 的 K_b 值主要集中在 $10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 这一量级。在这些分析方法中,等温滴定热法通常被认为是量化结合亲和力的最准确的方法之一,由其获得的 K_b 值也在这一量级。文献[5]利用荧光光谱法获得 K_b 值,其数值远远大于其他研究的结果(约高 3 个数量级)。这是由于该文所设置的 HSA 和 NFX 浓度并不符合假设 b,却直接使用方程(S17)来拟合数据,放大了误差,其所得结果的准确性值得

斟酌。此外,本文所得的 K_b 值($5.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)与等温滴定热法所得结果[($3.49 \sim 3.85$) $\times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$]存在一定的差异,这是由于两种方法所检测的结合反应过程中的表观数据不同。荧光光谱法检测的是 HSA 与 NFX 结合过程中 HSA 的荧光强度的变化,而除了与 NFX 的结合,还有其他不可控的因素(如 NFX 引起的 HSA 构象变化)也会影响 HSA 的荧光强度。因此,利用荧光光谱法所获得的 K_b 值与真实值仍存在一定的差异。而等温滴定热法检测的是 HSA 与 NFX 结合过程中体系的热量变化,在理想条件下影响实验的因素是可控制的,因此其所得结果更为接近真实值。尽管如此,因荧光光谱法具有简便快速、灵敏度高和成本低的优点,且还能获得蛋白质微观层面的信息,故在蛋白质-配体结合作用的研究中仍值得运用。当然,综合利用多种分析方法来获得和验证蛋白质-配体结合的 K_b 值可获得更为可靠的结果,值得推荐。

表 2 不同分析方法所获得的 HSA-NFX 体系的结合常数

Table 2 The binding constant of HSA-NFX system obtained by different analytical techniques

分析方法	温度/K	$K_b/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	参考文献
荧光光谱法	299.15	5.97×10^4	[8]
	298	2.21×10^7	[5]
	298	4.68×10^4	[9]
	298	5.0×10^4	This work
表面等离子体共振法	298.15	$(1.00 \sim 1.04) \times 10^3$	[10]
等温滴定热法	298	$(3.49 \sim 3.85) \times 10^4$	[11]
亲和毛细管电泳法	298	6.35×10^4	[9]

3 结 论

利用荧光光谱法计算蛋白质-配体结合的 K_b 值时,判定假设 a 和 b 是否成立是选取用于数据处理的最优的函数方程的必要前提。如利用函数方程处理时忽略这一前提条件而选

取了不适用的方程,将使计算出的 K_b 值偏离真实值,从而得到不可靠甚至明显错误的结果。然而,在已有的利用荧光光谱法计算蛋白质和配体的 K_b 值的研究中,不加选择地应用函数方程的问题仍广泛存在。因此,我们希望本文能有助于提高研究者对这一问题的认识,从而在今后的工作中能避免因忽视该问题而获得不可靠的数据。

References

- [1] Du X, Li Y, Xia Y L, et al. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(2): 144.
- [2] ZHAO Xiao-xue, GUO Ming, WANG Yan(赵晓雪, 郭明, 王燕). Spectroscopy and Spectral Analysis (光谱学与光谱分析), 2018, 38(11): 3420.
- [3] Kairys V, Baranauskiene L, Kazlauskienė M, et al. Expert Opinion on Drug Discovery, 2019, 14(8): 755.
- [4] Bakar, K A, Feroz, S R. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 223: 117337.
- [5] Azimi O, Emami Z, Salari H, et al. Molecules, 2011, 16(12): 9792.
- [6] Zhang L L, Liu Y C, Wang Y M. Food Chemistry, 2019, 301: 125294.
- [7] Rahman S, Rehman M T, Rabbani G, et al. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(11): 2727.
- [8] BI Shu-yun, DING Lan, SONG Da-qian, et al(毕淑云, 丁兰, 宋大千, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2005, 63(23): 2169.
- [9] Zhang L W, Wang K, Zhang X X. Analytica Chimica Acta, 2007, 603(1): 101.
- [10] Liu X, Song D Q, Zhang Q L, et al. Sensors and Actuators B-Chemical, 2006, 117(1): 188.
- [11] Paul B K, Ghosh N, Mukherjee S. Journal of Physical Chemistry B, 2015, 119(41): 13093.

Comparisons and Applications of Functional Equations for the Calculation of the Protein-Ligand Binding Constant Based on Fluorescence Spectral Data

ZHANG Jing¹, GAO Xuan^{1,2}, JIN Liang¹, WANG Hong-hui¹, ZHOU Xi-ping¹

1. Key Laboratory of Estuarine Ecological Security and Environmental Health, School of Environmental Science and Engineering, Xiamen University Tan Kah Kee College, Zhangzhou 363105, China
2. College of Environment and Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China

Abstract The binding interactions of proteins with ligands play important roles in the physiological and biochemical processes of organisms. Thus it is a research hotspot in many fields. A key objective of the investigations on Protein-Ligand binding is to obtain their binding constant (K_b) for evaluating the strength of their binding. Fluorescence spectroscopy is widely used in Protein-Ligand binding studies as its high sensitivity, convenience, rapidity and low cost. When applying fluorescence spectroscopy, it is a key step to obtain the K_b value through mathematical analysis of fluorescence data with the aid of a functional equation. However, due to the different application range of different equations, the K_b values obtained by different equations for the same system are often varied. This work discussed the derivation process and the application conditions of the functional equations for calculating the K_b value of Protein-Ligand binding using fluorescence spectral data. Based on this, we summarized the optimal equation for the calculation of the K_b value for Protein-Ligand binding modes of $1:1$ and $1:n$ ($n \geq 2$) under different preconditions. The discussion suggested that the selection of the optimal equation is based on two preconditions: a; Whether the Protein-Ligand complex is fluorescent; b; Whether the ligand concentration is much higher than the protein concentration. On the other hand, the human serum albumin (HSA)-Norfloxacin (NFX) binding system was used as a model, and the difference of the K_b values obtained by the fitting of different functional equations was compared and the corresponding reasons were analyzed. The results showed that HSA bound with NFX in $1:1$ mode, and the K_b value was calculated to be $5.0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 298 K using the most appropriate equation (S12) for this system. However, the K_b values obtained by equation (S6) and (S24) were 28.8% and 48.6% higher than that by equation (S12) respectively, and the value obtained by equation (S17) was about two orders of magnitude higher. This intuitively showed the effect of choosing the inapplicable equation on the final result. In addition, the K_b value obtained by fluorescence spectroscopy in the present work was compared with those obtained by other techniques, indicating the relative reliability of fluorescence spectroscopy for the calculation of the K_b value in Protein-Ligand binding, and also pointing out the limitations of this method. This work warns us that when obtaining the K_b value of Protein-Ligand binding using fluorescence spectral data, it is very necessary to select the most suitable functional equation according to the preconditions (i. e. whether the hypothesis a and/or b are true or not), which will determine the reliability of the obtained results.

Keywords Binding constant; Functional equation; Application condition; Human serum albumin; Norfloxacin

(Received Nov. 14, 2019; accepted Feb. 26, 2020)