

# 乙二胺- $N,N'$ -二邻氨基苯甲酸与牛血清白蛋白 作用的荧光光谱研究

冯 姣 王璟琳 杨斌盛

(山西大学分子科学研究所 太原市坞城路 92 号 030006)

**摘 要** 在  $\text{pH} 7.4, 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 条件下, 采用荧光光谱法研究了乙二胺- $N,N'$ -二邻氨基苯甲酸(EDA)与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。结果表明, EDA 与 BSA 的结合使蛋白质的荧光被猝灭, 条件稳定常数为  $\lg K = 5.81 \pm 0.04$ , 结合位点数为 1, 并依据 Foerster 能量转移理论确定 EDA 与 BSA 色氨酸残基的最近距离  $r$  为  $2.14 \text{ nm}$ 。

**关键词** 乙二胺- $N,N'$ -二邻氨基苯甲酸; 荧光光谱; 牛血清白蛋白

中图分类号: O 657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)02-0505-03

## 1 引言

血清白蛋白是血浆中最为丰富的蛋白质, 它能与许多内源及外源性化合物结合, 起到存储与转运的作用<sup>[1]</sup>, 对生命活动有着十分重要的意义。

在生理条件下乙二胺- $N,N'$ -二邻氨基苯甲酸(EDA)(见图 1)可与金属离子配位形成稳定的配合物。由于苯甲酸基团参与配位而对  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁的微扰, EDA 与金属离子结合表现出明显的光谱变化, 具有研究生命金属的探针特性。据此, 本文研究了 EDA 与血清白蛋白的结合性质。

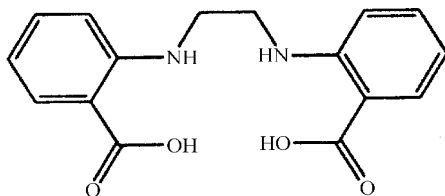


图 1 EDA 的分子结构

## 2 实验部分

### 2.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白(生化试剂, 中国科学院生物化学研究所); 三羟甲基氨基甲烷等均为分析纯; EDA 按照文献[2]合成。

HP 8453 UV-VIS 吸收光谱仪(美国惠普公司); Cary Eclipse 型荧光分光光度计(美国瓦里安公司)。

联系人, 电话: (0351) 7016358; E-mail: yangbs@sxu.edu.cn

作者简介: 冯姣(1976—), 女, 山西省长治市人, 硕士研究生, 主要从事生物无机化学研究工作。

收稿日期: 2009-07-13; 接受日期: 2009-08-25

## 2.2 实验方法

配制 pH 7.4,  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液, 用此缓冲液配制 EDA 和 BSA 溶液。BSA 的浓度通过测定 280nm 处的吸光度确定 ( $\epsilon = 43000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ )<sup>[3]</sup>。

吸收光谱使用 1cm 吸收池用 HP 8453 UV-VIS 吸收光谱仪测定。荧光光谱的测定使用 1cm 荧光池, 激发波长为 280nm, 用 Cary Eclipse 型荧光分光光度计记录 300—550nm 的发射光谱。

## 3 结果与讨论

### 3.1 EDA 对 BSA 荧光猝灭的机理

图 2 为用 EDA 溶液滴定 BSA 的荧光光谱。由图 2 可见, BSA 在 344nm 处出现最大荧光峰(曲线 a), 随着 EDA 的滴加, 该荧光峰逐渐被猝灭, 同时在 403nm 处出现 EDA 的发射峰, 且在 385nm 处存在一个等发射点(曲线 b—l)。相同实验条件下 BSA 不存在时 EDA 的荧光发射光谱如图 2 曲线 r, 可见激发波长为 280nm 时 EDA 在 403nm 处的荧光强度远小于 BSA 存在时的荧光强度, BSA 使 EDA 的荧光强度增强 6 倍, 表明二者间存在着相互作用, 发生了能量转移。

按照 Stern-Volmer 方程<sup>[4]</sup>:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] \quad (1)$$

式中:  $F_0$ ——未加入 EDA 时 BSA 的荧光强度;  $[Q]$ ——猝灭剂 EDA 的浓度;  $F$ ——EDA 存在时 BSA 的荧光强度。将  $F_0/F$  对  $[Q]$  作图可得出双分子猝灭速率常数  $K_q = 1.77 \times 10^{13} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数  $2.0 \times 10^{10} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ <sup>[4]</sup>。因此 EDA 对 BSA 荧光的猝灭为形成复合物所引起的静态猝灭。

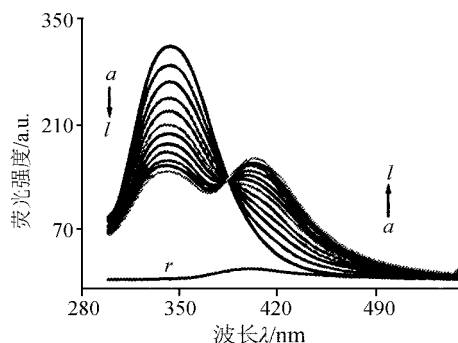


图 2 EDA 滴定 BSA 的荧光光谱

2.0mL BSA ( $5.32 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.4, 温度 18℃,  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 。EDA ( $1.31 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的体积 ( $\mu\text{L}$ ) 由 a 到 l 依次为 a—0; b—10; c—20; d—30; e—40; f—50; g—60; h—70; i—80; j—90; k—100; l—110。r 为 2.0mL  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 中滴加 EDA ( $1.31 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 110  $\mu\text{L}$ ),  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 。

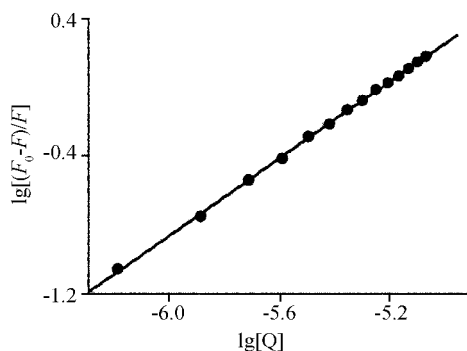


图 3  $\lg[(F_0 - F)/F]$  与  $\lg[Q]$  的关系图

### 3.2 结合常数和结合位点数

设 BSA 具有  $n$  个相互独立且等同的 EDA 结合部位, 条件稳定常数为  $K$ , 根据化学平衡及荧光强度与浓度的关系可得<sup>[5, 6]</sup>:

$$\lg \frac{F_0 - F}{F} = \lg K + n \lg [Q] \quad (2)$$

将  $\lg[(F_0 - F)/F]$  对  $\lg[Q]$  作图, 如图 3。

由图 3 线性拟合得到的直线斜率、截距得出 EDA 与 BSA 作用的结合位点数  $n = 1.11$ , 条件稳定常数  $\lg K = 5.81 \pm 0.04$ , 即 BSA 存在一个 EDA 结合位点。

### 3.3 EDA 与 BSA 色氨酸残基间距离

图 4 为 EDA-BSA 紫外吸收谱和 BSA 荧光光谱的重叠图。按照 Foerster 能量转移理论, 参考文献[6], 使用图 4 中 300—450 nm 波长范围计算得重叠积分  $J = 4.26 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。由测得的 EDA-BSA 为 1 时的能量转移效率  $E = 0.49$  可得结合的 EDA 与 BSA 的色氨酸残基距离  $r = 2.14 \text{ nm}$ 。

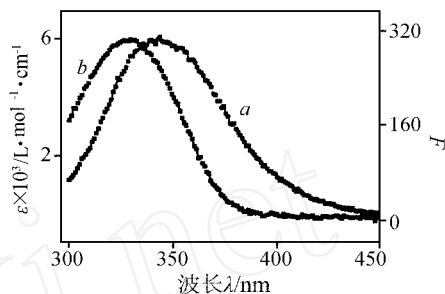


图 4 BSA 荧光光谱(a)与 EDA-BSA 吸收光谱(b)的重叠

## 参考文献

- [1] Ulrich K H. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin[J]. *Pharmacol. Rev.*, 1981, 33(1): 17—53
- [2] Darren J B, Jason R T. Ligand Design and Self-Recognition: A Copper (II) Complex that Dimerizes via Hydrogen Bonds[J]. *Inorganica Chimica Acta*, 2002, 341: 132—134
- [3] Zhang Y, Wilcox D E. Thermodynamic and Spectroscopic Study of Cu(II) and Ni(II) Binding to Bovine Serum Albumin[J]. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, 7: 327—337.
- [4] 杨频, 高飞. 生物无机化学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 495
- [5] 王丽芳, 杨斌盛. 荧光法研究 3-羟基-2-萘甲酸与牛血清白蛋白的作用[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2006, 29(2): 171—174
- [6] Yang B S, Yang P. The Action of Rare Earth Ions with Human Serum Albumin[J]. *Chinese J. Biochem. Biophys.*, 1989, 21(4): 301—305

## Fluorescence Study on the Interaction of Ethylene-N, N'-Dianthranilate and Bovine Serum Albumin

FENG Jiao WANG Jing-Lin YANG Bin-Sheng

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, P. R. China)

**Abstract** In  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl buffer (at pH 7.4), the interaction between ethylene-N, N'-dianthranilate (EDA) and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence and UV-Vis absorption spectra. The quenching mechanism of the combination of BSA with EDA is a static quenching procedure, the conditional stability constant and the number of binding sites were determined as  $\lg K = 5.81 \pm 0.04$ ,  $n = 1$ , respectively. Meanwhile, the distance between donor (Trp in BSA) and acceptor (EDA) was obtained as  $r = 2.14 \text{ nm}$  based on the theory of Foerster energy transfer.

**Key words** EDA; Fluorescence Spectra; BSA