# 吲哚基二聚体菁类探针同步荧光测定蛋白质的研究

## 林旭聪, 燕 瑾, 郭良洽, 谢增鸿\*

福州大学化学化工学院,福建福州 350002

摘 要 基于蛋白质对双嵌吲哚染料具有良好的荧光增强作用,以新型水溶性吲哚基同型二聚体探针 I,建 立了一种灵敏的蛋白质同步荧光分析体系。实验考察了吲哚探针的荧光特征、吲哚探针浓度、缓冲体系 p H、 盐浓度等参数对体系荧光的影响。在酸性条件下,蛋白质分子与探针 I 发生结合作用,同步荧光明显增强并 向长波方向发生红移,且同步荧光强度与蛋白质浓度成良好的线性关系。在最优条件下,牛血清白蛋白 BSA 的线性响应范围 5.00 ×10<sup>-7</sup> ~ 2.50 ×10<sup>-5</sup> g · mL<sup>-1</sup>,检测限 (3 / K)为 3 ×10<sup>-8</sup> g · mL<sup>-1</sup>;测定了血清蛋白 BSA 的合成样品,不同浓度 BSA 样品回收率为 98.6% ~ 103.0%,相对标准偏差 1.1% ~ 1.9%;与蛋白质 紫外标准测定法比较,测定偏差为 0.4% ~ 3.9%。

关键词 同步荧光; 吲哚二聚体菁类探针; 蛋白质测定 中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2008)11-2615-04

## 引 言

7

蛋白质定量测定在生命科学、医学和化学研究中具有十 分重要的意义<sup>[1,2]</sup>。蛋白质检测方法有分光光度法<sup>[3]</sup>,荧光 光度法<sup>[47]</sup>、化学发光法<sup>[8]</sup>及电化学法<sup>[9]</sup>。同步荧光光谱法 具有灵敏度高、选择性好、谱带简化等优点,能够有效地减 小体系杂散射光的不良影响,已广泛应用于多组分的同时测 定以及生物分子定量测定分析<sup>[10-12]</sup>,应用前景广阔。目前, 在蛋白质分析方面,采用同步荧光分析法的报道较少<sup>[13]</sup>,发 展潜力良好。

在荧光分析法中,由于蛋白内源荧光弱,高灵敏荧光探 针的筛选也是影响蛋白质分析的关键因素。吲哚花菁探针是 近年来研究发展的新型生物荧光染料<sup>[14]</sup>。由于吲哚基团具 有刚性平面结构,荧光性能良好,同时可以作为结合生物大 分子的嵌入体,测定灵敏度高<sup>[15,16]</sup>,目前吲哚菁类聚合探针 发展迅速,并已在核酸等生物分子分析中得到良好应 用<sup>[17-19]</sup>,发展前景十分广阔。本文研究的二(1-丙磺酸-2-[对 (N,N-二甲基胺)-苯乙烯基]-3,3-二甲基吲哚菁-5-磺酸)同型 聚合体菁类探针 I是我们新开发的一种性能稳定的长链水溶 性吲哚探针,迄今为止有关该探针的研究尚未见报道,对其 展开同步荧光分析研究,对建立新的蛋白质测定技术具有良 好的意义。 本文采用新的水溶性吲哚类双嵌探针 I,研究该探针的 特征光谱性能,考察 pH 和离子强度等因素影响,研究该探 针与血清蛋白的结合反应,建立了一种简便,灵敏、稳定的 新型同步荧光检测蛋白质的分析体系,并用于血清模拟样品 的分析测定,结果良好。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光光度计(Varian, USA); FA1104N 电 子天平(上海); pHS-3C 型酸度计(上海)。

牛血清蛋白 (BSA, Sanland-chem),以二次水配制成浓度为 1.00 mg ·mL<sup>-1</sup>的储备液,使用时稀释成浓度为 50.0 µg ·mL<sup>-1</sup>工作液,置于 4 的冰箱中保存;

吲哚类探针 I(实验室合成),以二次水配制成 3.0 ×10<sup>-5</sup> mol  $\cdot$ L<sup>-1</sup>的工作液,避光保存;

柠檬酸钠-HCl 缓冲液 (p H 2.50):移取 0.10 mol ·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠 (A. R)溶液及 0.10 mol ·L<sup>-1</sup>盐酸溶液,按比例混 合稀释至 100 mL,并用精密酸度计校正。试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

#### 1.2 实验方法

在 10 mL 容量瓶中依次加入 1.0 mL 3.0 ×10<sup>-5</sup> mol · L<sup>-1</sup>吲哚探针溶液, 2.0 mL 缓冲溶液, 适量 50.0 µg ·mL<sup>-1</sup>

收稿日期: 2007-08-08,修订日期: 2007-11-16

基金项目: "十五 '国家重大专项子课题(2001BA804A26-9)和福建省科技重点项目(2006 Y0023)资助 作者简介: 林旭聪, 1976 年生, 福州大学化学系讲师 e-mail: xulin @fzu.edu.cn

\*通讯联系人 e-mail: zhxie @fzu.edu.cn

BSA 溶液,用水稀释至刻度,静置 5 min,测定荧光增强值 *I* = *I* - *I*<sub>0</sub>。

## 2 结果与讨论

2616

#### 2.1 光谱特征分析

实验表明,在酸性条件下,当激发波长为548 nm时,吲 哚探针 I 的荧光发射波长为562 nm, stokes 位移 14 nm。选 择 Stokes 位移值作为同步扫描 ,如图 1,同步荧光在562 nm 处有最大荧光强度,加入适量的 BSA,体系同步荧光强 度显著增强,并随着 BSA 浓度的增大而成比例地增强,发射 波长也随之发生红移。





 $c_{\text{BSA}}$  ( **x**10<sup>-5</sup> g · mL<sup>-1</sup>), 1: 0; 2: 0. 300; 3: 0. 500; 4: 0. 700; 5: 1. 00; 6: 1. 50; 7: 1. 70; 8: 2. 50; 9: 3. 00

当 p H 小于 4.0 时, 血清蛋白分子带正电荷, 吲哚探针 带有多个带负电荷的磺酸基团, 吲哚探针 可以通过正负 电荷吸引接触蛋白分子, 并结合在蛋白质分子上, 使得探针 周围微环境非极性增强, 二聚体吲哚探针 在溶液中因为溶 剂分子作用产生的非辐射去活化现象会得到有效抑制, 荧光 能量损失减少, 如图 1 所示, 体系同步荧光得到增强。同时, 随着 BSA 血清蛋白浓度的增加, 蛋白质 -螺旋结构可能逐 渐转为折迭态, -螺旋结构紧密程度增加<sup>[20]</sup>, 嵌入结合在蛋 白分子内部的探针自由扭动受阻而不易变型, 吲哚平面结构 基团与其他双键形成的共轭体系更为稳定, 在激发光激发下 荧光能量传递效率增大, 且探针外界微环境非极性进一步增 强, 非辐射去活化降低, 体系同步荧光强度逐渐增大(曲线 2 ~9)。

#### 2.2 条件优化

#### 2.2.1 pH影响

当 p H 为 1.50 ~ 2.50 时, BSA 与吲哚探针体系的同步 荧光强度随着 p H 值的增加而增强,如图 2 所示,当 p H 2.50 时, BSA 与吲哚探针作用体系的同步荧光强度最大;当 p H 继续增加, p H 在 2.70 ~ 4.50 时,蛋白分子正电荷随体 系酸度下降而降低,不利于探针外层带有负电荷的磺酸离子 基团与蛋白质分子作用, BSA 与吲哚探针结合作用减弱,体



Fig 2 Curve of pH effect on the increase in synchronous fluorescence intensity

Indole probe I: 3. 0 ×10<sup>-6</sup> mol  $\cdot$ L<sup>-1</sup>;  $c_{BSA}$ : 5. 00 µg  $\cdot$ mL<sup>-1</sup>

实验同时考察了缓冲液的优化条件。应用柠檬酸钠-HCl 缓冲溶液(pH 2 50),实验结果表明,当缓冲液加入体积少 于 1.0 mL 时,pH 缓冲能力较弱,体系同步荧光增强值随缓 冲液加入量增大而增大;当体系缓冲液体积为 2.0 mL 时, 体系同步荧光增强值达到最大并能保持稳定;但是,随着缓 冲液的继续增加(3.0~5.0 mL),溶液中离子强度增大,可 能导致部分蛋白分子折迭态向展开态发生变化<sup>1121</sup>,体系荧 光增强幅度逐渐降低。综合考虑 pH 缓冲能力和同步荧光强 度的影响,体系选择缓冲液加入量为 2.0 mL。

2.2.2 探针浓度优化

如图 3, 当探针浓度小于 3.0 µmol ·L<sup>-1</sup>时,随着染料浓 度的增加,同步荧光增强值逐渐上升; 当探针浓度大于 3.0 µmol ·L<sup>-1</sup>时,血清蛋白与荧光探针的结合作用趋向饱和, 随着荧光探针浓度的上升,体系同步荧光背景值增强,导致 蛋白-探针作用体系的同步荧光增强度明显降低。实验表明, 当吲哚探针浓度为 3.0 µmol ·L<sup>-1</sup>时,体系同步荧光增大最 为明显。



Fig. 3 Effect of the concentration of cyanine on the enhancement of synchronous fluorescence p H 2. 50, c<sub>BSA</sub>: 5. 00 µg ·mL<sup>-1</sup>

#### 2.2.3 NaCl 离子强度的影响

图 4 表明,随着 NaCl 浓度增大,离子强度增大,体系同 步荧光向短波长方向发生蓝移,蛋白分子结构形态可能由折 迭态部分变为展开状态<sup>[15]</sup>,从而与染料的结合能力下降,体 系荧光强度下降(曲线 1 ~ 3);当 NaCl 浓度大于 9.00 ×10<sup>-2</sup> mol·L<sup>-1</sup>,离子强度较大,蛋白分子-螺旋结构从紧密的折

## 迭态转变为展开状态,与吲哚探针 I的结合作用降低,同步 荧光强度趋向稳定(曲线 3~5)。





 $c_{\rm BSA}$ : 5. 00 µg · mL <sup>-1</sup>;

Concentration of NaCl (mol  $\cdot L^{-1}$ ), curve 1: 0; curve 2: 5.00 × 10<sup>-2</sup>; curve 3: 9.00 ×10<sup>-2</sup>; curve 4: 0.125; curve 5: 0.160

#### 2.3 共存物质的干扰

考察研究无机盐离子、氨基酸等物质对花菁染料荧光强 度的影响。如表 1,大部分物质对同步荧光检测干扰较小, Zn(),Cu(),Mn()金属离子在大于9倍量时具有较 大的干扰,Mg()和 K(),部分维生素和氨基酸对体系的 干扰较小,允许在较大浓度条件下共存。

#### 2.4 分析测定

在最佳条件下,同步荧光强度与血清蛋白 BSA 浓度成 良好线性关系(如图 5),BSA 线性响应范围为 5.00 ×10<sup>-7</sup> ~ 2.50 ×10<sup>-5</sup> g ·mL<sup>-1</sup>,线性方程 Y = 21.39 X - 7.591(Y 为同 $步荧光增强值, X 为 BSA 浓度),相关系数 <math>r^2 = 0.9987$ ,检 测限(3 / K)为 3 ×10<sup>-8</sup> g ·mL<sup>-1</sup>。

根据以上实验方法测定血清模拟样品回收率,如表2所示,回收率测定值的相对平均偏差在3%以内,BSA浓度为

Table 1	Effects of the foreign species on				
the fluorescence intensity $^*$					

共存物质	浓度/(×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup> )	测定偏差/%		
Cu()	10	+ 4. 8		
Mg()	1 000	- 4.1		
Al()	100	+ 5. 0		
K( )	3 000	- 4.6		
Zn()	50	+ 4. 7		
Ca()	300	+ 4. 3		
Mn()	50	+ 4. 0		
盐酸硫铵	50	+ 3. 4		
抗坏血酸	1 000	+ 4. 8		
甘氨酸	5 000	- 4.4		
L-谷氨酸	500	+ 4. 6		
-丙氨酸	3 000	- 4.1		
L-半胱氨酸	100	+ 5. 0		
L-丝氨酸	800	+ 4. 5		
L-苯丙氨酸	2 000	+ 4. 2		
L-色氨酸	1 000	- 4.1		

\* Indole probe : 3. 0 ×10<sup>-6</sup> mol ·L<sup>-1</sup>; BSA : 5. 00 µg ·mL<sup>-1</sup>; pH 2. 50

1.00,2.00 和 5.00 µg ·mL<sup>-1</sup>的样品测定回收率分别为 98.6%~103.0%,相对标准偏差 1.1%~1.9%; 与紫外标 准方法比较,测定偏差为 0.4%~3.9%。

Table 2 Detection of several simulant samples

BSA	测定量/	(µg • mL <sup>- 1</sup> )	回收率⁵	<b>RSD</b> <sup>b</sup>	相对测定
/ (µg · mL <sup>- 1</sup> )	紫外法ª	同步荧光法	/ %	/ %	偏差 <sup>b</sup> / %
1. 00	0.98	1. 02	103. 0	1. 9	3. 9
2.00	1.96	1. 98	99. 0	1.3	1. 0
5.00	4.91	4.93	98.6	1.1	0.4

a:蛋白质浓度 <sub>GBSA</sub> (mg ·mL<sup>-1</sup>) = 1.45A<sub>280</sub> - 0.74A<sub>260</sub>; (A<sub>280</sub>和 A<sub>260</sub>分别为蛋白质溶液在 280 和 260 nm 处测得的吸光度值)

b: 同步荧光测定方法

参考文献

- ZHAO Dan-hua, LI Yong xin, ZHU Chang qing(赵丹华,李永新,朱昌青). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(7): 1318.
- [2] LIN Xurcong, GUO Liang-qia, LIN Yan-xia, et al(林旭聪,郭良洽,林艳霞,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(9): 1775.
- [3] CAO Shurxia, ZHAO Yurfen(曹书霞, 赵玉芬). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(10): 1197.
- [4] HUANGJian-hua, MA Hong-min, SUN Shu-ting, et al(黄建华,马洪敏,孙舒婷,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(10): 1899.
- [5] Glunde K, Foss C A, Takagi T, et al. Bioconjugate Chem., 2005, 16(4): 843.
- [6] SHI Yan, ZHENG Wei-wan, WU Xiao-xing, et al (石 燕,郑为完,吴晓星,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(9): 1653.
- [7] LIN Xurcong, WU Meng-hui, GUO Liang-qia, et al(林旭聪,吴孟辉,郭良洽,等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱 分析), 2007, 27(8): 1587.
- [8] LI Yong xin, ZHAO Dam hua, ZHUO Shurjuan, et al (李永新, 赵丹华, 卓淑娟, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学), 2003, 31(5): 638.

- [9] SUN Wei, HAN Jun-ying, JIAO Kui (孙 伟, 韩军英, 焦 奎). Journal of Analytical Science (分析科学学报), 2006, 22(2): 145.
- [10] CHEN Ying, YAO Min-na, TANG Yao-ji, et al(陈 莹,姚闽娜, 唐尧基,等). Spectro scopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(12): 2048.
- [11] ZHANG Yong, ZHU Ya-xian, et al (张 勇, 朱亚先, 等). China Environmental Science (中国环境科学), 2002, 22(4): 289.
- [12] JIAN Ju, DU Jiang-yan, FENG Yu-ying, et al (剑 菊, 杜江燕, 冯玉英, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry (分析化学), 2001, 29(2): 219.
- [13] SHI Yan, YAN Yuan, HUANGJian-feng(石 燕, 鄢 远, 黄坚锋). Journal of Nanchang University (Natural Science) (南昌大学学报 ·理科版), 2000, 24(3): 282.
- [14] Funovics M, Weissleder R, Tung C H. Anal. Bioanal. Chem., 2003, 377(6): 956.
- [15] Laurence P G, Wakelin X Y, Bu Alexand ra Eleftheriou, et al. J. Med. Chem., 2003, 46: 5790.
- [16] Zheng Hong, Chen Xiao-lan, Hua Ming-hui, et al. Analytica Chimica Acta, 2002, 461: 235.
- [17] Schaberlea F A, KuZmin V A, Borissevitch I E. Biochimica and Biophysica Acta, 2003, 1621: 183.
- [18] Ogul 'chansky T Yu, Losytskyy M Yu, Kovalska V B, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2001, 57: 2705.
- [19] Pham W, Lai W F, Weissleder R, et al. Bioconjugate Chem., 2003, 14: 1048.
- [20] Rouzina L , Bloomfied V A. J. Phys. Chem. , 1996 , 100 : 4301.

# Determination of Protein by Synchronous Fluorometric Method with a New Indole Homodimeric Cyanine as Fluorescence Probe

LIN Xu-cong, YAN Jin, GUO Liang-qia, XIE Zeng-hong

Chemistry and Engineering College of Fuzhou University, Fuzhou 350002, China

Abstract Using a new homodimeric hydrophilic indole dye (Dye-I) as fluorescence probe, a sensitive synchronous spectrofluorometric determination for protein was developed. Characteristics of the fluorescence reaction between DYE1 and BSA protein were investigated. Effects of the concentration of the hydrophilic dye, p H value of the buffer solution, and ion-intensity of NaCl were also studied and the optimum condition was gained. At p H of 2. 50, electrostatic interactions of positive charges of the BSA chain and negative charges on the sulfonic groups of DYE1 were carried out. The interactions of the indole group of DYE1 and some active groups of BSA (viz. amido, carboxyl or sulfhydryl) were also achieved, and resulted in the combination of indole group of dye at the chain of BSA, which caused a notable increase in synchronous fluorescence with an observable shift to the longer emission wavelength. Effects of the concentration of indole dye on the determination of BSA were also investigated. With the augmentation of BSA, the -helix structure of BSA molecular would change from the unwrapped state to the enfolded state, which was in favor of restraining free-oscillation of fluorescence probe in the solution and maintaining a high energy transfer efficiency. Such a fact would fuel a high fluorescence enhancement. and the change in fluorescence intensity (F) gained the peak at 3. 00 µmol ·L<sup>-1</sup>. The influences of ion-intensity of NaCl on the fluorescence of BSA-DYE-1 system was visible. Effects of coexistent substances such as amino acid and metal ions such as  $Cu^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , and  $Zn^{2+}$  were also investigated. Most substances showed no notable influences on the determination of BSA except  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  ions. Under the optimum conditions, good calibration curves of the protein were also obtained in the range of 5. 00  $\times 10^{-7}$ -2. 50  $\times 10^{-5}$  g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> (BSA) with a detection limit of 3 ×10<sup>-8</sup> g · mL<sup>-1</sup>. Applied to simulant protein samples at the level of 1.00, 2.00, and 5.00  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> of BSA, the recoveries were in the range of 98. 6 %-103. 0 % with the RSD of 1. 1 %-1. 9 %. Compared with the UV standard method, the relative deviation was obtained in the range of 0. 4 %-3. 9 %.

Keywords Synchronous fluorescence; Homodimeric indole cyanine probe; Determination of protein

(Received Aug. 8, 2007; accepted Nov. 16, 2007)

\* Corresponding author