

# 二碘荧光素与牛血清白蛋白相互作用的 荧光光谱研究<sup>①</sup>

郭彦青<sup>a, b</sup> 李建晴<sup>b</sup> 卫艳丽<sup>a</sup> 董川<sup>2a</sup>

<sup>a</sup> 山西大学化学化工学院 太原市坞城路 580 号 030006

<sup>b</sup> 晋中学院化学系 山西省晋中市 030600

**摘要** 用荧光光谱法和分光光度法研究了水溶液中二碘荧光素(DIF)与牛血清白蛋白(BSA)的相互结合反应。研究表明 BSA 与 DIF 的结合数为  $n = 1.05$ 。其平衡常数  $K_A = 6.76 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 。根据 Forster 非辐射能量转移理论, 求算了给体(BSA)受体(DIF)间的距离  $r = 2.36 \text{ nm}$  和能量转移效率  $E = 0.59$ 。实验表明, 二碘荧光素与牛血清白蛋白相互结合造成的荧光猝灭为单一的荧光静态猝灭过程。

**关键词** 二碘荧光素, 牛血清白蛋白, 荧光猝灭, 结合反应。

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2006)02-0304-05

## 1 引言

白蛋白是主要的血清蛋白, 它能和许多内源、外源性物质结合<sup>[1]</sup>。一些小分子染料与蛋白质结合, 可引起染料或蛋白质光谱特性的变化, 因此可作为蛋白质的探针<sup>[2,3]</sup>。从而可以从分子水平的角度认识蛋白质与小分子相互作用机理, 为生命科学研究以及药物研究提供有用的信息。

荧光素类化合物可以呈现强烈的荧光发射, 常用做指示剂和生物细胞染色剂。这类化合物在结构上的特殊性导致了它们的理化性质具有某些特性。现在荧光素类化合物在光度分析中已用于金属离子的测定、有机分子、蛋白质研究领域<sup>[4,5]</sup>, 有关荧光素用于牛血清白蛋白定量测定的研究已见报道<sup>[6]</sup>。对这类结合反应的作用机理和平衡规律尚在研究中。本文研究了 DIF 和 BSA 的相互作用, 探讨了 DIF 对 BSA 荧光的猝灭机理, 测得了 DIF 和 BSA 的结合常数、结合位点数。根据 Forster 非辐射能量转移理论, 求算了给体(BSA)受体(DIF)间的距离及能量转移效率。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

日立 F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司); TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司); pH5-2ST 数显酸度计(上海天达仪器有限公司)。

二碘荧光素(DIF): Merk 产品, 用二次水配制成  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  储备溶液, 使用时适当稀释; 牛血清白蛋白(BSA): 国药集团化学试剂有限公司产品, 用二次水配制成  $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$  储备溶液, 使用时适当稀释; Britton-Robison 缓冲溶液: pH= 5.2; 实验用水为亚沸蒸馏器二次蒸馏水。

① 国家自然科学基金(No. 20575037)资助项目

② 联系人, 电话: (0354) 3036743; (0354) 3112068; 手机: 013593077960; E-mail: gyq1963@tom.com

作者简介: 郭彦青(1963—), 男, 山西省晋中市人, 晋中学院化学系高级实验师, 主要从事无机及分析化学的教学实验研究。

董川(1963—), 男, 山西省交城县人, 山西大学化学化工学院教授, 博士生导师, 主要从事药物分析研究。

收稿日期: 2005-11-06; 接受日期: 2005-10-31

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 荧光光谱

在 10mL 比色管中依次加入一定量的 BSA 溶液、DIF 溶液、缓冲溶液,用二次水定容,混匀后在室温下测定其荧光光谱或荧光强度。

### 2.2.2 荧光同步光谱

在 10mL 比色管中依次加入一定量的 BSA 溶液、DIF 溶液、缓冲溶液,用二次水定容,混匀后分别以  $\Delta\lambda=15\text{nm}$  和  $\Delta\lambda=60\text{nm}$  绘制 BSA 的同步荧光光谱(激发和发射狭缝为 5.0/2.5nm)。

## 3 结果与讨论

### 3.1 DIF 对 BSA 荧光的影响

#### 3.1.1 DIF 对 BSA 荧光猝灭的机理

固定 BSA 浓度,改变 DIF 浓度,测得不同浓度的 DIF 时体系的荧光光谱如图 1。由图 1 可见,随着 DIF 浓度的增加,BSA 的荧光逐步被猝灭,这表明 DIF 和 BSA 发生了相互作用。引起 BSA 荧光猝灭的原因可能有静态猝灭或动态猝灭,动态猝灭是一种能量转移或电子转移过程,不影响蛋白质的结构和生理活性。静态猝灭是由于发生了配合反应,通常是产生了不发荧光的配合物,对蛋白质的二级结构可产生影响,并可能影响其生理活性。荧光猝灭符合 Stern-Volmer 猝灭方程:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + \tau K_q [Q] \quad (1)$$

其中,  $F_0$  为猝灭剂不存在时荧光体的发光强度;  $F$  为加入猝灭剂后的荧光强度;  $K_{SV}$  为猝灭常数;  $[Q]$  为猝灭的浓度;  $K_q$  为双分子猝灭过程速率常数;  $\tau$  为荧光体的分子平均寿命。由于生物大分子荧光平均寿命为  $10^{-8}\text{s}$ <sup>[7]</sup>,故可由猝灭曲线的斜率求得常数。实验所得, DIF 对 BSA 的猝灭曲线为(图 2)  $F_0/F = 1 + 4.41 \times 10^7 [Q]$ 。从而求得  $K_{SV} = 4.41 \times 10^7 \text{L/mol}$ ,  $K_q = 4.41 \times 10^{15} \text{L/(mol} \cdot \text{s)}$ 。各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞速率常数为  $2.0 \times 10^{10} \text{L/(mol} \cdot \text{s)}$ <sup>[8]</sup>,显然 DIF 对 BSA 荧光的猝灭过程常数大于扩散控制的速率常数。所以 DIF 对 BSA 荧光的猝灭属静态猝灭。

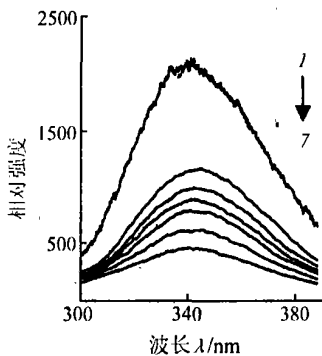


图 1 DIF 对 BSA 荧光光谱的影响

$[\text{BSA}] = 5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ ;

$[\text{DIF}] = (\text{从 } 1 \text{---} 7) = 0.1, 2, 3, 4, 6, 8 (\times 10^{-6} \text{mol/L})$ 。

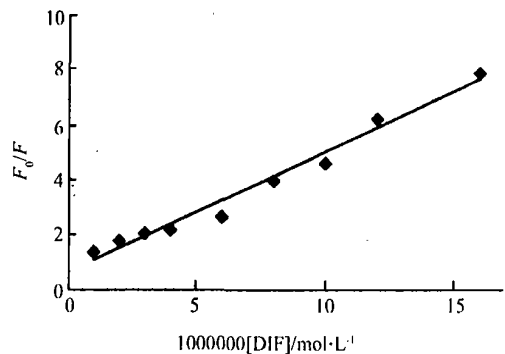


图 2 DIF 对 BSA 的猝灭曲线

$[\text{BSA}] = 5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。

#### 3.1.2 结合常数和结合位点数的测定

对于静态猝灭过程,荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光分子与猝灭剂分子之间的结合常数表达式推导出<sup>[1]</sup>。设生物大分子  $B$  有  $n$  个相同且独立的结合位点,则其与小分子间的猝灭反应可表示为

$$nQ + B = Q_n B$$

其结合常数为  $K_A$ :

$$K_A = [Q_n B] / [Q]^n [B] \tag{2}$$

式中:  $[B]$  是游离荧光体浓度,  $[Q]$  是猝灭剂浓度,  $[Q_n B]$  是配合物浓度。若荧光体总浓度为  $[B_0]$ , 则  $[B_0] = [Q_n B] + [B]$ , 当  $[Q] \gg [B_0]$  时, 以猝灭剂的起始浓度代替其平衡浓度:

$$K_A = ([B_0] - [B]) / [Q]^n [B] \tag{3}$$

在静态猝灭中, 体系的荧光强度  $F$  与其游离浓度成正比(所生成的配合物是非荧光性的)

$$[B] / [B_0] = F / F_0 \tag{4}$$

由(3)和(4)得

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K_A + n \lg [Q] \tag{5}$$

以  $\lg(F_0 - F) / F$  对  $\lg [Q]$  作图(图 3), 由直线截距得结合常数  $K_A = 6.76 \times 10^5 \text{ L/mol}$ , 由斜率求得结合数  $n = 1.05$ 。

### 3.1.3 二碘荧光素与牛血清白蛋白作用方式的研究

BSA 的空间结构由 3 个结构域组成, 每个结构域又由两个亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状, 几乎所有的疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部, 组成疏水性腔。在配合物的形成过程中, 热力学关系为:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S = -RT \ln K_A$$

$\Delta G$  为生成自由能变,  $\Delta S$  为熵变,  $\Delta H$  为焓变,  $K_A$  为平衡常数。由于 DIF 与 BSA 的结合反应温度变化不大, 因此该反应的焓变可以看作是一个常数, 即  $\Delta H \approx 0$ 。因此  $\Delta G = -3.33 \times 10^4 \text{ J/mol}$ ,  $\Delta S = 111.6 \text{ J/(mol} \cdot \text{K}^{-1})$ 。根据热效应与作用力的关系<sup>[9]</sup>可知: DIF 主要通过疏水作用力进入 BSA 的疏水性腔与 BSA 发生相互作用。

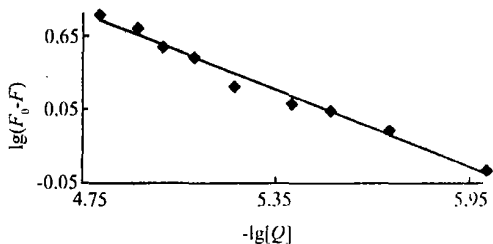


图 3 DIF 的浓度对 BSA 的相对荧光强度的影响

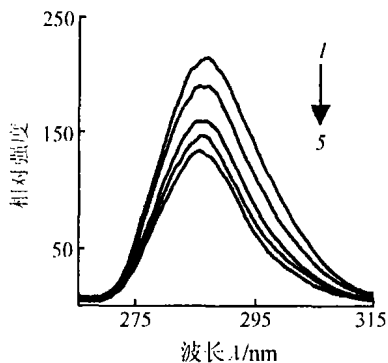


图 4 BSA 的同步荧光光谱

$\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ ,  $[DIF]$  (从 1-5) = 1, 2, 3, 6, 8 ( $\times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )。

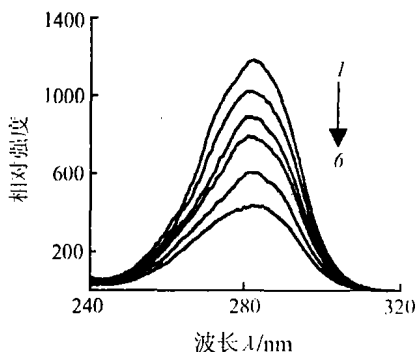


图 5 BSA 的同步荧光光谱

$\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ ,  $[DIF]$  (从 1-6) = 1, 2, 3, 6, 8, 10 ( $\times 10^{-6} \text{ mol/L}$ )。

### 3.1.4 DIF 与 BSA 构象的影响

固定激发波长与发射波长间的间距扫描激发和发射单色器即得同步荧光光谱。这种光谱已被用于蛋白质构象变化的分析, 由  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  所得的同步荧光只显示蛋白质酪氨酸残基的荧光, 由  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  所得的同步荧光只显示蛋白质色氨酸残基的荧光<sup>[10]</sup>。固定 BSA 的浓度, 逐渐增加 DIF

的浓度,分别以  $\Delta\lambda = 15\text{nm}$  和  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$  绘制 BSA 的同步荧光光谱。图 4、图 5 分别为 BSA 中的酪氨酸和色氨酸残基的荧光谱,可以看出在此实验条件下 BSA 的荧光谱主要来自色氨酸残基,且随着 DIF 浓度的增加,色氨酸和酪氨酸的最大发射波长略有移动,表明 DIF 的加入引起了 BSA 构象的变化。

### 3.2 pH 对 DIF 与 BSA 相互作用的影响

溶液酸度会影响 DIF 与 BSA 的相互作用。本文用 Britton-Robison 缓冲溶液考察了 pH 对 DIF 与 BSA 相互作用的影响(图 6)。在 pH= 5.2 条件下,体系的荧光强度变化最大,本文选择 pH= 5.2 进行 BSA 的测定。

### 3.3 DIF 与 BSA 作用距离的计算

#### 3.3.1 计算原理及结果

对于小分子与血清白蛋白结合形成配合物,根据偶极-偶极非辐射能量转移理论即 Forster 理论<sup>[11,12]</sup>,可以求出结合位置与蛋白质分子中发荧光基团之间的距离。能量转移效率  $E$  与给体-受体间的距离  $r$  的关系为:

$$E = 1/[1 + (r/R_0)^6] \quad (6)$$

其中  $R_0$  是能量转移效率( $E$ )为 50% 的临界距离:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} (K^2 n^{-4} \Phi_f J) \quad (7)$$

式中,  $K^2$  为供体受体各项随机分布的取向因子,  $n$  为介质的折射指数,  $\Phi_f$  为给体(BSA)的荧光量子产率,  $J$  表示给体(BSA)的荧光发射光谱与受体(DIF)的吸收光谱间的光谱重叠积分,可表示为

$$J = \sum F_c(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda \sum F_a(\lambda) \Delta\lambda \quad (8)$$

$F_c(\lambda)$  为给体在波长  $\lambda$  至  $d\lambda$  间内的校正荧光强度,  $\epsilon(\lambda)$  为受体在波长  $\lambda$  的摩尔吸光系数。能量转移效率可用下式计算

$$E = 1 - F_c/F_{c0} \quad (9)$$

其中  $F_{c0}$  和  $F_c$  分别为受体不存在和存在时供体的荧光发射强度。只要得到  $E$ 、 $K^2$ 、 $\Phi_f$  和  $n$  并通过测定光谱求出积分  $J$ , 就可以得到  $R_0$  与  $r$ 。BSA 的荧光光谱(1)和 DIF 的吸收光谱(2)如图 7。

将荧光仪所得数据根据公式(8)利用计算机处理求得光谱的重叠积分  $J = 9.22 \times 10^{-15} \text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$ 。在上述条件下,取向因子供体受体各项随机分布的平均值  $K = 2/3$ , 折射指数取水和有机物平均值  $n = 1.335$ ,  $\Phi_f = 0.15$ , 将上述数值代入式(7)求得  $R_0 = 2.52\text{nm}$ 。再通过 DIF 与 BSA 摩尔为 1:1 时配合物的荧光强度,通过(9)式计算得到能量转移效率  $E = 0.59$ 。经式(6)求得 DIF 距色氨酸残基最短距离为  $r = 2.36\text{nm}$ 。

#### 3.3.2 “内滤光效应”的校正

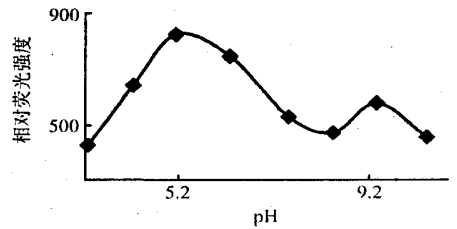


图 6 pH 对 DIF 和 BSA 相互作用的影响

[DIF] =  $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ ;

[BSA] =  $5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。

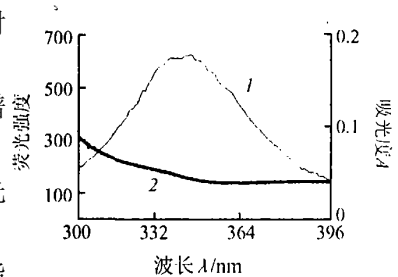


图 7 BSA 的荧光光谱(1)和 DIF 的吸收光谱(2)

[BSA] =  $6 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ ;

[DIF] =  $6 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。

“内滤光效应”。Steiner 等<sup>[13]</sup>提出,如果染料在以上波长的吸收值不超过 0.3 时,其“内滤光效应”可用以下公式予以校正:

$$F_c = F_a \times e^{-(A_1 + A_2)/2} \quad (10)$$

其中  $F_c$  和  $F_a$  分别代表校正后和观察到的荧光强度,  $e$  为自然对数的底数,  $A_1$  和  $A_2$  则是 DIF 在 BSA 的荧光激发波与发射波长处的吸收值(使用 1cm 吸收池)。将荧光仪观察到的荧光强度  $F_a$  及紫外可见分光光度计所得吸收值  $A_1$  和  $A_2$  根据公式(10)利用计算机处理求得  $F_c$  便可校正“内滤光效应”。

## 4 结论

荧光法是研究蛋白与染料作用的重要方法,研究表明 BSA 与 DIF 的结合数为  $n = 1.05$ , 其平衡常数  $K_A = 6.76 \times 10^5 \text{ L/mol}$ , BSA 与 DIF 间的作用距离  $r = 2.36 \text{ nm}$ , 能量转移效率  $E = 0.59$ , 二碘荧光素与牛血清白蛋白相互结合造成的荧光猝灭为单一的荧光静态猝灭过程。以上结论对二碘荧光素作为蛋白质探针的作用机理提供了有用的信息。

## 参考文献

- [1] 冯喜增, 金瑞祥, 曲靶, 何锡文. 各种离子对吡啶与牛血清白蛋白相互结合反应的影响研究[J]. 高等学校化学学报, 1996, **17** (6): 866—869.
- [2] 俞英, 廖尖, 黄发德. 牛血清白蛋白与酸性铬兰 K 结合反应的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2002, **22** (6): 1067.
- [3] 高峰, 朱昌清, 汪乐余, 王伦. 灿烂甲酚蓝与表面活性剂的作用极其在蛋白质测定中的应用[J]. 分析化学, 2002, **30** (3): 324.
- [4] 李建平, 张彦斌, 魏小平. 表面活性剂增敏动力学光度法测定酚[J]. 分析化学, 1998, **26** (5): 586.
- [5] 王海人, 肖忠柏, 宋功武, 詹红菊. 荧光素与牛血清白蛋白作用的光谱研究与分析应用[J]. 分析测试学报, 2001, **20** (4): 45.
- [6] 宋攻武, 方光荣, 李瑛, 万里元. 曙红 Y 与牛血清白蛋白作用的荧光光谱[J]. 分析化学, 2000, **28** (5): 659.
- [7] Lakowicz J R, Weber G. Quenching of Fluorescence by Oxygen—Probe for Structural Fluctuations in Macromolecules[J]. *Biochemistry*, 1973, **12** (21): 4161.
- [8] Ware W R. Oxygen Quenching of Fluorescence in Solution: An Experimental Study of the Diffusion Process[J]. *J. Phys. Chem.*, 1962, **66** (3): 455.
- [9] Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes* [M]. New York: John Wiley and Sons, 1973. 12.
- [10] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Fluorescence and the Location of Tryptophan Residues in Protein Molecules[J]. *Photochem. Photobiol.*, 1973, **18** (4): 263.
- [11] Sklar L A, Hudson B S, Simon R D. Conjugated Polyene Fatty Acids as Fluorescent Probes: Binding to Bovine Serum Albumin [J]. *Biochemistry*, 1977, **16** (23): 5100.
- [12] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [M]. New York: Plenum Press, 1983.
- [13] Steiner R F, Weinryb L. *Excited States of Protein and Nucleic Acid* [M]. New York: Plenum Press, 1971.

# Study on the Interaction between Diiodofluorescein and Bovine Serum Albumins by Fluorescence Spectrometry

GUO Yan-Qing<sup>a,b</sup> LI Jian-Qing<sup>b</sup> WEI Yan-Li<sup>a</sup> DONG Chuan<sup>a</sup>  
*a*(College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, P. R. China)  
*b*(Department of Chemistry, Jinzhong College, Jinzhong, Shanxi 030600, P. R. China)

**Abstract** The interaction between diiodofluorescein (DIF) and bovine serum albumins (BSA) in aqueous solution was studied by fluorescence and ultraviolet-visible absorption spectra. The binding sites is 1.05 and the equilibrium constant  $K_A$  is  $6.76 \times 10^5 \text{ L/mol}$ . The linear relationship of Stern-Volmer curve on the fluorescence of BSA quenched by series of concentrations indicates that the interaction of DIF and BSA is a single static quenching progress. The shortest binding distance ( $r = 2.36 \text{ nm}$ ) and energy transfer efficiency ( $E = 0.59$ ) between donor (BSA) and acceptor (DIF) were obtained by Forster's nonradiative energy transfer mechanism.

**Key words** Diiodofluorescein, Bovine Serum Albumin, Fluorescence Quenching, Binding Reaction.