

# 荧光光谱法研究萘酚绿 B 与牛血清白蛋白相互作用特征

颜承农<sup>1</sup>, 谢泽钰<sup>1</sup>, 梅平<sup>1</sup>, 刘义<sup>2</sup>

1. 长江大学化学与环境工程学院, 湖北 荆州 434023

2. 武汉大学化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072

**摘要** 在不同温度下,研究了萘酚绿 B(NGB)作用于牛血清白蛋白的荧光猝灭光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱和紫外-可见吸收光谱特征。分别用 Stern-Volmer 方程和 Lineweaver-Burk 双倒数方程等处理实验数据,证实了在试验浓度和温度范围内, NGB 与 BSA 可相互作用形成复合物,荧光猝灭作用符合静态猝灭作用特征,作用力主要是疏水作用力和静电作用力;得到了相互作用的相关参数  $K_{LB}$ ,  $H$ ,  $G$  和  $S$  等的平均值分别为  $1.411 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $-5.707 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $-30.25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  和  $79.95 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ , 结合位点数为 1.258, 为研究 NGB 对蛋白质构象的影响和在生物体内的生物学效应等提供了重要信息。

**关键词** 萘酚绿 B; 牛血清白蛋白; 荧光猝灭光谱; 三维荧光光谱; 紫外吸收光谱; 热力学参数

**中图分类号**: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2007)12-2542-04

## 引言

蛋白质是重要的生命物质,它与营养、发育、遗传、新陈代谢等生命活动密切相关。研究蛋白质等生物大分子与小分子相互作用特征,探讨相互作用的热力学性质、结合力性质和相互作用的机理等,对于研究小分子的生物学效应,促进蛋白质组学的研究和发展有着重要的意义<sup>[1]</sup>。萘酚绿 B(Naphthol green B, 简称 NGB)是一种稳定性比较好的有机染料。本研究是在实验条件下,扫描 NGB 作用于牛血清白蛋白(bovine serum albumin, 简称 BSA)的荧光猝灭光谱、同步荧光光谱、三维荧光光谱和紫外-可见吸收光谱,分别用 Stern-Volmer 方程和 Lineweaver-Burk 方程等处理实验数据,证实了 NGB 与 BSA 可相互作用形成具有一定结构的复合物,作用力主要是疏水作用力和静电作用力,得到了相互作用常数和热力学参数,这在蛋白质组学研究中具有重要意义,也为研究 NGB 的染色机理,探讨释放到环境中的 NGB 产生的生物学效应对蛋白质构象的影响等提供重要信息。

## 1 仪器与方法

### 1.1 仪器与试剂

LS55 型荧光分光光度计(美国 PE 公司), UV-1100 型可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司), AY-120 电子分析

天平(日本岛津公司), SYC-15 超级恒温水浴(南京桑力电子设备厂)。

NGB(中国医药公司北京采购供应站,分子式为  $\text{C}_{30}\text{H}_{15}\text{FeN}_3\text{Na}_3\text{O}_{15}\text{S}_3$ , 摩尔质量 878.48)储备液:  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; NGB 工作液:  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; BSA(上海生物化学试剂厂)溶液:  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; NaCl 溶液:  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.40)。所用试剂均为分析纯,水为二次去离子水,经检测均无荧光杂质。

### 1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中依次加入 2.0 mL NaCl 溶液、2.0 mL Tris-HCl 缓冲溶液、2.0 mL BSA 溶液及一定量的 NGB 工作液,用二次蒸馏水定容。选择  $\lambda_{\text{ex}} = 282 \text{ nm}$ , 激发光和发射光狭缝宽度分别为 15 和 2.5 nm, 在 250~480 nm 范围内扫描 BSA 的荧光光谱、BSA 在 NGB 作用下的荧光猝灭光谱、同步荧光光谱和三维荧光光谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 NGB 对 BSA 的荧光猝灭光谱

蛋白质中因含有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Try)和苯丙氨酸(Phe)等氨基酸残基而产生较强的内源荧光,蛋白质是荧光体;NGB 在与 BSA 相互作用的过程中能不同程度地猝灭 BSA 的荧光,NGB 是荧光猝灭剂。按实验方法分别扫描了 22, 28, 34, 40, 46 等温度下 BSA 和 BSA-NGB 体系的荧

收稿日期: 2006-08-02, 修订日期: 2007-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170010)和湖北省自然科学基金项目(2005ABA067)资助

作者简介: 颜承农, 1948 年生, 长江大学化学与环境工程学院教授 e-mail yancn0405@163.com

光猝灭光谱。34 的 BSA 的荧光光谱和在 NGB 作用下 BSA 的荧光猝灭光谱见图 1。

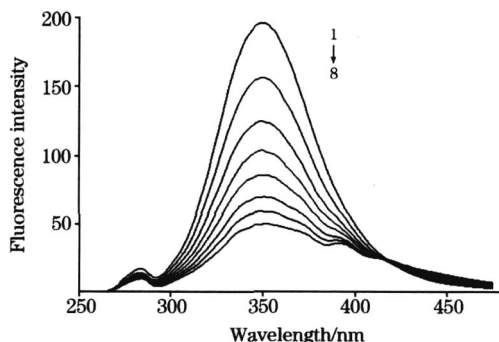


Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of BSA with NGB as quencher added

$c_{\text{NGB}}$  of curves 1~8/ $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 0, 3.000, 6.000, 8.999, 12.00, 15.00, 18.00, 21.00;  $c_{\text{BSA}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

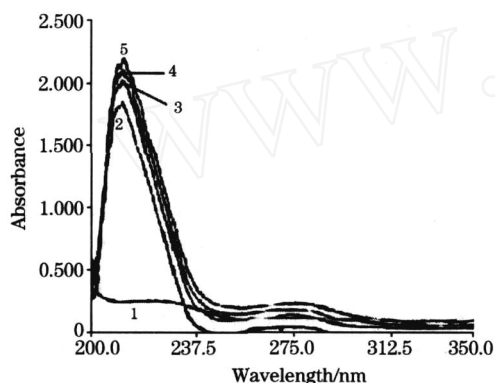


Fig. 2 UV absorbance spectra of NGB(1), BSA(2) and BSA-NGB(3~5)

## 2.2 NGB 对 BSA 的荧光猝灭作用描述

荧光猝灭作用因猝灭机理不同可分为动态猝灭、静态猝灭和非辐射能量转移猝灭作用等。动态猝灭和静态猝灭作用可分别用 Stern-Volmer 方程(即  $I_F^0/I_F = 1 + K_{\text{SV}}c_q = 1 + K_q \cdot c_{\text{NGB}}$ )和 Lineweaver-Burk 双倒数方程(即  $(I_F^0 - I_F)^{-1} = (I_F^0)^{-1} + K_{\text{LB}}(I_F^0)^{-1} \cdot c_{\text{NGB}}$ ) 进行描述。其中  $K_{\text{SV}}$  为动态猝灭常数,  $K_q$  为动态荧光猝灭速率常数, 通常最大动态荧光猝灭速率常数约为  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ;  $K_{\text{LB}}$  为静态荧光猝灭常数。在温度分别为 22, 28, 34, 40, 46 时, 观察加入 NGB 后 BSA 荧光强度的变化。由实验数据分别作出 Stern-Volmer 曲线和 Lineweaver-Burk 双倒数曲线, 对实验数据线性拟合得到直线方程、相关系数等(见表 1)。由于溶液很稀, 所测得的化学计量常数  $K_{\text{LB}}$  近似等于热力学常数; 当温度变化不大时, 结合反应的焓变  $H$  可看成常量, 由热力学公式可求得相关热力学参数<sup>[2-7]</sup>(见表 2)。

## 2.3 荧光猝灭作用性质和相互作用力

由 NGB 对 BSA 作用的实验结果可以看出, Lineweaver-Burk 双倒数曲线的线性关系明显优于 Stern-Volmer 曲线的线性关系; 动态猝灭作用的  $K_q$  值一般都小于  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , 但表 2 中  $K_q$  值大于  $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ; 相互作用的吉布斯自由能小于零, 相互作用常量  $K_{\text{LB}}$  达到  $1.411 \times 10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 说明它们之间的相互作用能自发进行, 且作用产物稳定性良好。而 BSA, NGB 和 BSA-NGB 体系的紫外-可见吸收光谱的吸收峰强度和吸收峰位置明显有别(如图 2);  $\lambda = 60 \text{ nm}$  和  $\lambda = 15 \text{ nm}$  时等波长差的同步荧光光谱主要分别反映蛋白质中 Trp 和 Tyr 氨基酸残基的荧光光谱特征<sup>[8]</sup>, 按照实验方法分别得到  $\lambda = 60 \text{ nm}$  和  $\lambda = 15 \text{ nm}$  时, BSA 和 BSA 与 NGB 作用的同步荧光光谱, 如图 3(a)和图 3(b), 随着 NGB 浓度的增加, Trp 的发射波长红移, Tyr 的发射波长蓝移; 图 1 中在 410 nm 处形成了一个等荧光强度发射点。这些都是 BSA 与 NGB 相互作用生成一种新复合物的佐证。因此, 该体系的荧光猝灭可能主要是静态猝灭作用而不是动态猝灭作用。

Table 1 Regression equations and correlation coefficient

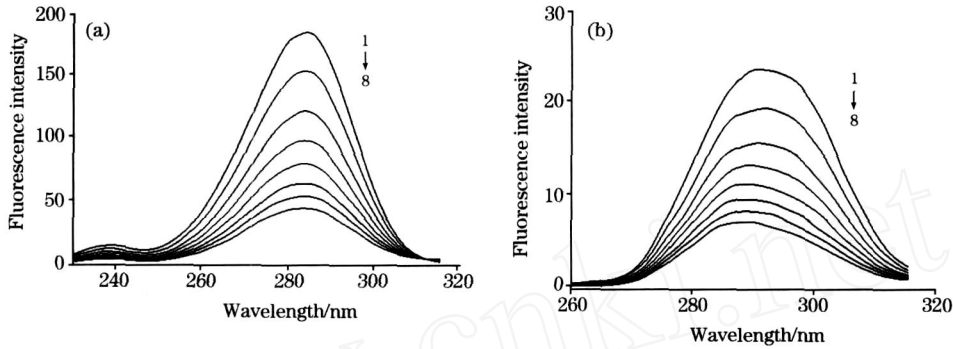
Curve	$t/\text{s}$	Regression equations	Correlation coefficient
Stern-Volmer equations	22	$I_F^0/I_F = 0.5869 + 4.074 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9869
	28	$I_F^0/I_F = 0.6598 + 3.934 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9923
	34	$I_F^0/I_F = 0.6473 + 3.813 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9918
	40	$I_F^0/I_F = 0.7058 + 3.817 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9963
	46	$I_F^0/I_F = 0.7005 + 3.921 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9957
Lineweaver-Burk equations	22	$(I_F^0 - I_F)^{-1} = 3.578 \times 10^{-3} + 2.262 \times 10^{-8} c_{\text{NGB}}$	0.9997
	28	$(I_F^0 - I_F)^{-1} = 3.639 \times 10^{-3} + 2.422 \times 10^{-8} c_{\text{NGB}}$	0.9995
	34	$(I_F^0 - I_F)^{-1} = 3.623 \times 10^{-3} + 2.701 \times 10^{-8} c_{\text{NGB}}$	0.9997
	40	$(I_F^0 - I_F)^{-1} = 3.595 \times 10^{-3} + 2.835 \times 10^{-8} c_{\text{NGB}}$	0.9994
	46	$(I_F^0 - I_F)^{-1} = 3.921 \times 10^{-3} + 2.874 \times 10^{-8} c_{\text{NGB}}$	0.9993

有机小分子与蛋白质相互作用的主要部位是蛋白质上的精氨酸、赖氨酸、组氨酸和 N 端氨基等碱性氨基酸残基。根据 Ross<sup>[9]</sup> 等所总结的判断生物大分子与有机小分子等作用

力性质的热力学规律, 即疏水作用力可使体系的  $H$  和  $S$  增大, 氢键力或 Vander Waals 力有可能使体系的  $H$  和  $S$  减小, 静电作用力使  $H < 0$ ,  $S > 0$ 。由表 2 所列数据可以

**Table 2 Binding constants of protein with naphthol green B and thermodynamic parameters**

<i>t</i> /	$K_{SV}/(L \cdot mol^{-1})$	$K_q/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	$K_{LB}/(mol \cdot L^{-1})$	$H/(kJ \cdot mol^{-1})$	$S/(J \cdot K^{-1})$	$G/(kJ \cdot mol^{-1})$
22	$6.941 \times 10^5$	$6.941 \times 10^{13}$	$1.582 \times 10^5$		80.19	- 29.36
28	$5.962 \times 10^5$	$5.962 \times 10^{13}$	$1.502 \times 10^5$		80.14	- 29.83
34	$5.890 \times 10^5$	$5.890 \times 10^{13}$	$1.341 \times 10^5$	- 5.707	79.57	- 30.13
40	$5.407 \times 10^5$	$5.407 \times 10^{13}$	$1.268 \times 10^5$		79.46	- 30.58
46	$5.597 \times 10^5$	$5.597 \times 10^{13}$	$1.364 \times 10^5$		80.41	- 31.36
Average	$5.959 \times 10^5$	$5.959 \times 10^{13}$	$1.411 \times 10^5$	- 5.707	79.95	- 30.25



**Fig 3 Synchronous fluorescence spectra (a) ( $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$ ) and (b) ( $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$ )**  
 $c_{NGB}$  of curves 1 ~ 8/  $\times 10^{-6}\text{ mol} \cdot L^{-1}$ : 0, 3.000, 6.000, 8.999, 12.00, 15.00, 18.00, 21.00;  
 $c_{BSA} = 2.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot L^{-1}$ ;  $c_{NaCl} = 0.1\text{ mol} \cdot L^{-1}$

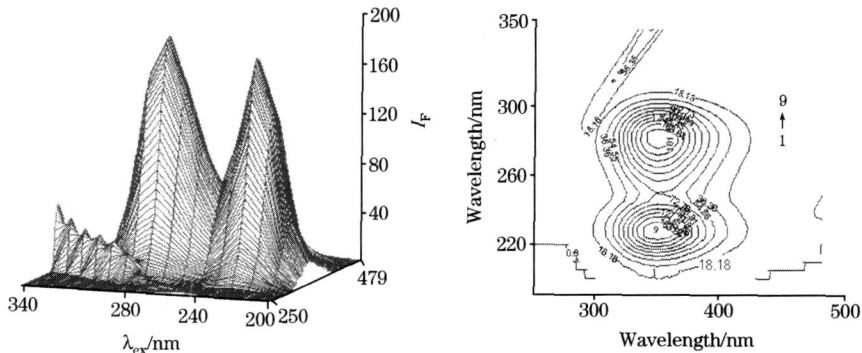
认为, NGB 与 BSA 之间的作用力可能主要是静电作用力。

金属和有机小分子等与蛋白质等生物大分子相互作用位点数可以由  $\lg(I/I_0) = \lg K + n \lg c_{NGB}$  求得, 其中斜率  $n$  为结合位点数。由不同温度下的实验数据作图, 求得其结合位点数  $n$  的平均值为 1.258。

**2.4 NGB 对 BSA 构象的影响**

三维荧光光谱能提供更多有关研究对象的重要信息。NGB 与 BSA 作用前后荧光猝灭光谱和等波长差的同步荧光光谱的波长变化, 以及三维荧光光谱的变化, 都可以提供蛋白质构象变化的相关信息。在水溶液中, BSA 主要由疏水作用力维持其空间结构和疏水腔, 几乎所有的疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒内部。NGB 与 BSA 作用后, 在荧光发射光谱中 BSA 的  $T_{rp}$  的峰位有明显红移, 其对应的同步荧光光

谱证实了这种红移现象见图 3(a)。图 4 和图 5 分别是 BSA (浓度为  $2.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot L^{-1}$ ) 和 BSA-NGB (浓度分别为  $2.0 \times 10^{-5}$  和  $2.1 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot L^{-1}$ ) 体系的三维荧光光谱和等荧光强度图谱, 图中各有一个主峰和一个次峰。BSA 中加入 NGB 后, 峰顶的相对荧光强度和坐标均有变化, 主峰强度和峰顶坐标由 199.9 (349.5, 285.3 nm) 变为 78.4 (350.0, 280.0 nm), 次峰强度和峰顶坐标由 188.0 (350.5, 234.9 nm) 变为 73.5 (348.9, 227.0); 在图 4 和图 5 中, 主、次峰荧光强度的比值分别为 1.063 1 和 1.061 1; 主峰的激发波长蓝移 5.3 nm, 次峰的激发波长蓝移 7.9 nm, 发射波长蓝移 1.6 nm。这些都说明水溶液中的 BSA 因加入 NGB 改变了微环境, 形成了一种新的构象<sup>[10]</sup>。



**Fig 4 Three-dimensional fluorescence spectra and contour spectra of BSA**  
 $c_{BSA} : 2.0 \times 10^{-5}\text{ mol} \cdot L^{-1}$

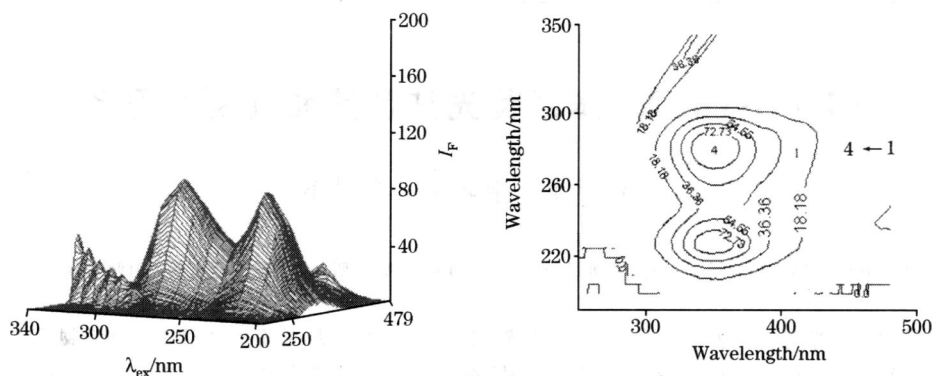


Fig 5 Three-dimensional fluorescence spectra and contour spectra of BSA in presence of NGB

$$c_{\text{BSA}}: 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; c_{\text{NGB}}: 2.0998 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

### 参 考 文 献

- [ 1 ] WANG Zhi-zhen, ZOU Cheng-lu(王志珍, 邹承鲁). Acta Biochimica et Biophysica Sinica (生物化学与生物物理学报), 1998, 30(6): 533.
- [ 2 ] YANG Pin, GAO Fei(杨 频, 高 飞). Principle of Bioinorganic Chemistry(生物无机化学原理). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2005. 57.
- [ 3 ] Yang Manman, Yang Pin, Zhang Liwei. Chinese Science Bulletin, 1994, 39(9): 734.
- [ 4 ] Mauricios B, Guilherme L I. J. Phys. Chem. B, 1998, 102: 4678.
- [ 5 ] YAN Cheng-nong, SHANGGUAN Yun-feng, TONGJin-qiang, et al(颜承农, 上官云凤, 董金强, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2003, 23(3): 543.
- [ 6 ] BI Xin-ying, CHI Yan-hua(毕欣颖, 迟燕华). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(11): 2097.
- [ 7 ] YAN Cheng-nong, MEI Ping, XIONG Dan, et al(颜承农, 梅 平, 熊 丹, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(12): 2307.
- [ 8 ] HUANG Bo, YANG Tian-ming(黄 波, 杨天鸣, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2002, 60(10): 1867.
- [ 9 ] Ross D P, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [ 10 ] YAN Cheng-nong, JU Xiang, LIU Yi, et al(颜承农, 鞠 香, 刘 义, 等). Chinese Journal Analytical Chemistry(分析化学), 2005, 33(6): 759.

## Study on the Binding Reaction Features Between Naphthol Green B and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectrophotometry

YAN Cheng-nong<sup>1</sup>, XIE Ze-yu<sup>1</sup>, MEI Ping<sup>1</sup>, LIU Yi<sup>2</sup>

1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Jinzhou 434023, China

2. College of Chemistry and Molecule Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

**Abstract** At different temperatures, the binding of naphthol green B(NGB) to bovine serum albumin (BSA) was studied by the fluorescence spectroscopy, three-dimensional fluorescence spectrum, synchronous fluorescence spectrum and ultra-violet spectrum. It was shown that this compound has a quite strong ability to quench the fluorescence from BSA. After analyzing the fluorescence quenching data according to Stern-Volmer equation and Lineweaver-Burk equation, it was found that BSA had reacted with naphthol green B and formed a new compound, the quenching action was due to static fluorescence quenching, and the action force was electrostatic interaction. According to the Lineweaver-Burk equation and thermodynamic equation, the average value of the binding constant ( $K_{\text{LB}}: 1.411 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), the thermodynamic parameters ( $H: -5.707 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,  $G: -30.25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  and  $S: 79.95 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$ ) and the amounts of binding sites(1.258) were obtained, providing important information for the research on the configuration modification of BSA because of the added naphthol green B, biological effects in a living body, and the coloration mechanism of naphthol green B.

**Keywords** Naphthol green B; Bovine serum albumin; Fluorescence spectrum; Three dimensional fluorescence spectrum; Ultra-violet spectrum; Thermodynamic parameters

(Received Aug. 2, 2006; accepted Jan. 28, 2007)