

# 伊文思蓝与牛血清白蛋白相互作用的研究

马丽英 姜吉刚 赵虎<sup>a</sup> 王怀友<sup>a</sup>

(滨州医学院化学教研室 山东省烟台市莱山区观海路 346 号 264003)

<sup>a</sup>(山东师范大学化学化工与材料科学学院 济南市文化东路 250014)

**摘要** 利用荧光光谱和紫外吸收光谱研究了伊文思蓝(Evans blue, EB)与牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的相互作用。伊文思蓝与牛血清白蛋白作用,使牛血清白蛋白的荧光发生猝灭,利用 Stern-Volmer 方程和荧光寿命的测定,确定了伊文思蓝对牛血清白蛋白的荧光猝灭为静态猝灭和非辐射能量转移。实验测得伊文思蓝与牛血清白蛋白的结合常数  $K_{BSA-EB}$  为  $1.122 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 结合点数  $n$  为 0.994; 根据 Foerster 非辐射能量转移理论,得到伊文思蓝与牛血清白蛋白之间的能量转移效率  $E$  为 0.276, 作用距离  $r$  为 3.14 nm。同时,利用同步荧光光谱研究了牛血清白蛋白的构象变化。

**关键词** 伊文思蓝; 牛血清白蛋白; 荧光猝灭; 非辐射能量转移

中图分类号: O 657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2009)06-1620-06

## 1 前言

血清白蛋白是血浆中最为丰富的重要载体蛋白,具有存储和转运内源性代谢产物和外源性药物小分子的重要生理功能,通过荧光发射峰、荧光强度、能量转移及荧光寿命等研究可以为蛋白质的结构及所处的微环境提供有用信息<sup>[1]</sup>。近年来,利用荧光分析技术表征白蛋白结合能力和结合点的研究多有报道<sup>[2-4]</sup>,但多数文章没有测得荧光寿命,只能对荧光猝灭的类型进行推测,无法直接得到荧光猝灭的类型。伊文思蓝(Evans blue, EB)是一种常用的无毒生物染色剂,常用于血浆及血容量分析,也可用于动物血管蛋白质渗漏的定量和形态研究<sup>[5,6]</sup>,EB 作为荧光探针对于牛血清白蛋白与氨苄青霉素之间的竞争反应研究已经报道<sup>[7]</sup>,EB 结构式见图 1。

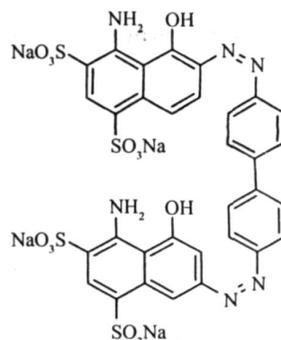


图 1 EB 分子结构

本文用伊文思蓝作荧光探针,利用荧光光谱和紫外-可见吸收光谱研究了伊文思蓝猝灭牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的反应。测得了猝灭前后牛血清白蛋白的荧光寿命和荧光强度,探讨了荧光猝灭的机理;得到了反应常数和结合点数;根据 Foerster 非辐射能量转移理论,得到了伊文思蓝与牛血清白蛋白之间的能量转移效率和作用距离;还利用同步荧光研究了牛血清白蛋白的构象变化。

山东省自然科学基金(批准号: Y2006B31)资助

联系人, 电话: (0535) 6913205; E-mail: maliyingbz@163.com

作者简介: 马丽英(1965—), 女, 山东省滨州市人, 副教授, 主要从事光化学分析研究。

收稿日期: 2009-05-06; 接受日期: 2009-05-14

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

LS-50 荧光分光光度计(英国 Perkin-Elmer 公司); FL S920 稳态/瞬态荧光检测仪(英国 Edinburgh 公司); UV-265 紫外可见分光光度计(日本岛津, 1cm 石英皿); pH S-3C 型酸度计(上海雷磁仪器厂); Millipore 超纯水系统(美国 Direct-Q 3 公司)。

EB (Fluka 46160) 储备液: 准确称取 0.0989g 伊文思蓝标准品, 用水溶解定容至 100mL, 得浓度为  $1.029 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液, 使用前用水稀释至  $1.029 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  工作液, 4℃ 下避光保存。

BSA (北京红兴化学试剂分装厂) 储备液: 准确称取 0.3303g 牛血清白蛋白标准品, 用水溶解定容至 100mL, 得浓度为  $1.001 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液, 使用前用水稀释得  $1.001 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  工作液, 4℃ 下避光保存。

pH = 7.17 缓冲液, 由浓度为  $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和  $1/15 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液按体积比 3:7 混和制得。

其他试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水(电阻率  $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )。

### 2.2 实验方法

(1) 在 10mL 比色管中依次加入 1.0mL BSA 溶液 ( $C_{\text{BSA}} = 1.001 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、不同体积的 EB 溶液 ( $C_{\text{EB}} = 1.029 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、2.0mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液 (pH = 7.17), 加水稀释至刻度摇匀, 室温下放置 30min, 在  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 264/340\text{nm}$ , 扫描速度  $240\text{nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 狭缝宽度皆为 10nm 的条件下绘制荧光光谱;  $\Delta\lambda = 35\text{nm}$ , 在不同浓度 EB 下测定酪氨酸残基的同步荧光光谱;  $\Delta\lambda = 70\text{nm}$ , 在不同浓度 EB 下测定色氨酸残基的同步荧光光谱。

(2) 在 10mL 比色管中准确加入 0.5mL EB 溶液 ( $C_{\text{EB}} = 1.029 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、不同体积的 BSA 溶液 ( $C_{\text{BSA}} = 1.001 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、2.0mL  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液 (pH = 7.17), 加水稀释至刻度, 摇匀, 室温下放置 30min, 绘制吸收光谱。

## 3 结果与讨论

### 3.1 牛血清白蛋白的发射光谱

按照实验方法(1), 分别绘制 BSA 及加入 EB 后的荧光发射光谱, 结果见图 2。BSA 分子中因含有色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基而能发射较强的荧光, 所以 BSA 是内源性荧光物质。在保持 BSA 浓度固定不变的情况下, 随 EB 浓度的增加, BSA 的内源性荧光强度有规律的降低, 峰位置及峰形基本保持不变, 表明 EB 能猝灭 BSA 的内源荧光, 二者之间存在相互作用。

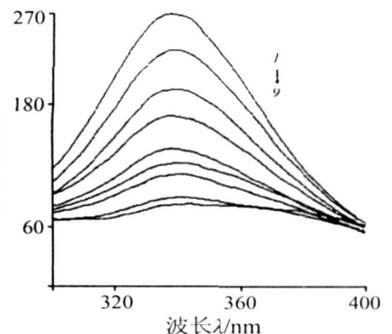


图 2 不同浓度 EB 中 BSA 的荧光光谱  
 $C_{\text{BSA}} = 1.001 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{\text{EB}}/10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 曲线 1—9: 0, 1.029, 2.058, 3.087, 4.116, 5.145, 6.174, 8.232, 10.29;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液 (pH = 7.17)。

### 3.2 伊文思蓝的吸收光谱

按照实验方法(2), 分别绘制 EB 及加入 BSA 后的吸收光谱, 结果见图 3。由图 3 所示, BSA 在波长 460—750nm 范围内没有吸收, EB 的最大吸收在 620nm。随着加入 BSA 的浓度逐渐增大, EB 的吸收程度逐渐降低, 表明伊文思蓝与牛血

清蛋白发生反应生成了新物质。

### 3.3 酸度的影响

试验了 pH 对 BSA-EB 体系相对荧光强度的影响(图 4)。pH = 11.0 左右时相对荧光强度最大,但为了测定生理条件下 BSA 与 EB 的反应,选择 pH = 7.17 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  的缓冲溶液控制溶液酸度。

### 3.4 试剂加入顺序的影响

按照实验方法(1),测定了试剂加入顺序对荧光强度的影响,实验表明,要得到最强荧光,试剂的理想加入顺序为:BSA、EB、缓冲溶液。

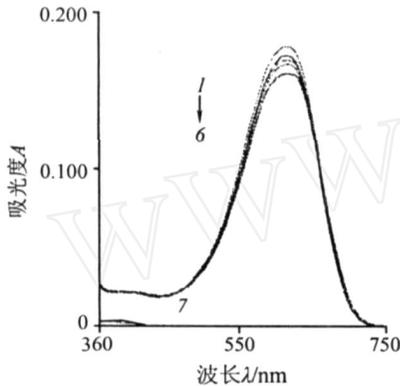


图 3 不同浓度 BSA 中 EB 的吸收光谱

$C_{EB} = 5.145 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{BSA}/10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 曲线 1—6: 0, 0.6006, 0.8008, 1.001, 2.002, 3.003; 曲线 7 是 BSA 的吸收光谱,  $C_{BSA} = 1.001 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液 (pH = 7.17)。

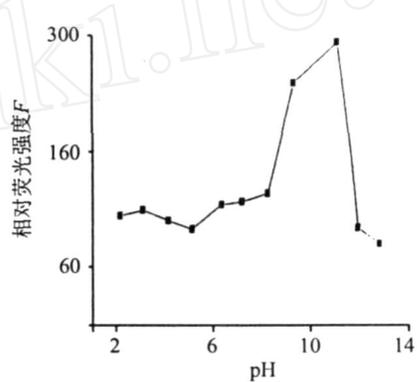


图 4 pH 对 BSA-EB 荧光强度的影响

$C_{BSA} = 1.001 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $C_{EB} = 5.145 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3.5 反应时间对猝灭体系的影响

按照实验方法(1),测定了反应时间对 BSA-EB 体系相对荧光强度的影响,结果表明,BSA-EB 相对荧光强度在 30min 后达到稳定,因此选择混合后反应 30min 测定荧光光谱和吸收光谱。

### 3.6 荧光猝灭机理

实验结果表明,EB 对 BSA 的荧光有猝灭作用。猝灭机理可分为静态猝灭、动态猝灭以及静态动态混合猝灭<sup>[8]</sup>。动态猝灭是指猝灭剂分子与激发态荧光分子之间的相互作用而导致的荧光猝灭,其作用过程遵从 Stern-Volmer 方程<sup>[9]</sup>

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \tag{1}$$

式中:  $K_q$ ——双分子猝灭过程的速率常数;  $K_{sv}$ ——Stern-Volmer 猝灭常数;  $[Q]$ ——猝灭剂浓度。猝灭过程若为静态猝灭,即猝灭剂分子与基态荧光分子反应生成非荧光物质而导致荧光猝灭,荧光强度与猝灭剂浓度之间的关系为

$$F_0/F = 1 + K [Q] \tag{2}$$

式中:  $K$ ——配合物的形成常数。式(1)及式(2)说明静态和动态猝灭的 Stern-Volmer 曲线均为直线。但在许多情况下静态猝灭与动态猝灭同时存在,混合猝灭

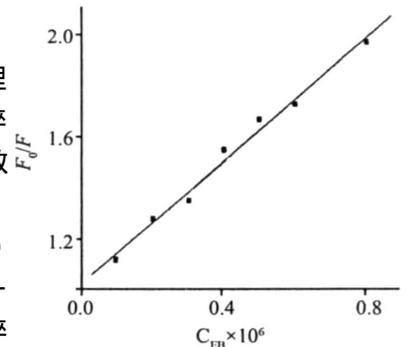


图 5 EB 猝灭 BSA 的 Stern-Volmer 曲线

$C_{EB} = 1.029 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Stern-Volmer 曲线满足下面关系式

$$F_0/F = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (3)$$

式中:  $K_D, K_S$  ——分别为动态猝灭和静态猝灭常数。混合猝灭的 Stern-Volmer 曲线向上弯曲。

为了确定荧光猝灭机理的类型, 按照实验方法(1)测定不同浓度 EB 下 BSA 的相对荧光强度, 结果见图 5。Stern-Volmer 曲线为线性, 线性回归方程为:  $F_0/F = 1.023 + 1.209 \times 10^6 C$ , 相关系数  $r = 0.994$ 。说明 EB 对 BSA 的荧光猝灭机理不是静态动态混合猝灭。

区分静态猝灭和动态猝灭最确切的方法是对荧光寿命的测量。在静态猝灭情况下, 猝灭剂的存在不会改变荧光分子激发态的寿命,  $\tau_0/\tau = 1$ ; 而在动态猝灭情况下, 猝灭剂的存在使荧光寿命缩短,  $\tau_0/\tau = F_0/F$ 。为了更准确地分辨 EB 对 BSA 的猝灭类型, 测得了 BSA 的荧光寿命  $\tau_0$  和 BSA-EB 的荧光寿命  $\tau$ (图 6、图 7)。 $\tau_0 = 6.32\text{ns}, \tau = 5.88\text{ns}; \tau_0/\tau < 1$ , 可以确定 EB 对 BSA 的荧光猝灭属于静态猝灭。

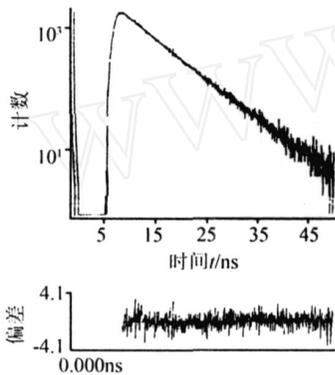


图 6 BSA 的荧光寿命

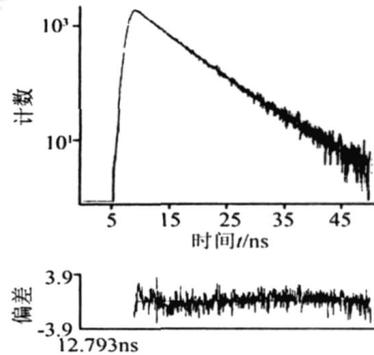


图 7 EB 存在下 BSA 的荧光寿命

静态荧光猝灭是指基态荧光分子与猝灭剂结合形成非荧光物质, 而导致荧光强度减弱的现象。假定一个荧光分子可以结合  $n$  个猝灭剂分子, 生成常数为  $K$ 。则

$$nQ + B \rightleftharpoons Q_n B$$

$$K = [Q_n B] / ([Q]^n [B]) \quad (4)$$

式中:  $B$  ——有荧光的生物分子;  $Q$  ——具有猝灭作用的药物分子;  $Q_n B$  ——生物分子与猝灭剂生成的非荧光物质。设  $[B]_0$  ——生物分子的总浓度;  $[B]$  ——未反应的生物分子浓度; 则  $[Q_n B] = [B]_0 - [B]$ 。由  $([B]_0 - [B]) / [B] = (F_0 - F) / F$  及式(4)可得  $[Q_n B] / [B] = K [Q]^n$ , 荧光强度和猝灭剂浓度之间的关系可推导为<sup>[10]</sup>

$$\lg[(F_0 - F) / F] = \lg K + n \lg [Q] \quad (5)$$

以  $\lg[(F_0 - F) / F]$  对  $\lg [Q]$  作图可得一直线, 由直线斜率和截距即可求出猝灭剂与生物分子的结合常数  $K$  及结合点数。实验测得伊文思蓝与牛血清白蛋白的结合常数(如图 8 所示),  $K_{BSA-EB} = 1.122 \times 10^6 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 结合点数  $n = 0.994$ , 相关系数  $r = 0.993$ , 说明在实验条件下, 一分子 BSA 大约只结合一个 EB 分子。

### 3.7 牛血清白蛋白与伊文思蓝之间的能量转移

根据 Foerster 非辐射能量转移理论<sup>[11]</sup>, 当给体能发射荧光, 其荧光发射光谱与受体的吸收光谱有一定程度的重叠, 且给体与受体之间最大距离不超过 7nm 时, 将会发生非辐射能量转移现象, 能量转移效率为:

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r_0^6) \tag{6}$$

式中:  $F$  和  $F_0$ ——分别为存在和不存在能量受体时能量给体的荧光发射强度;  $r_0$ ——给体与受体之间的距离;  $R_0$ ——能量转移效率为 50% 时的给体与受体临界距离;  $R_0$  可由下式求出。

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi_D J \tag{7}$$

式中:  $K^2$ ——偶极的空间取向系数;  $N$ ——介质的折射率;  $\Phi_D$ ——供体的荧光量子产率;  $J$ ——供体的荧光光谱和受体的吸收光谱重叠部分的积分。

$$J = \int F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda / \int F(\lambda) d\lambda \tag{8}$$

式中:  $F(\lambda)$ ——供体在波长  $\lambda$  时的荧光强度;  $\epsilon(\lambda)$ ——受体在波长  $\lambda$  时的摩尔吸收系数;  $E$ ——供体与受体之间的能量转移效率。

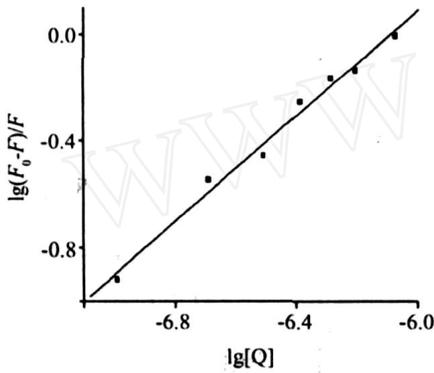


图 8  $\lg(F_0 - F)/F$  对  $\lg[Q]$  曲线

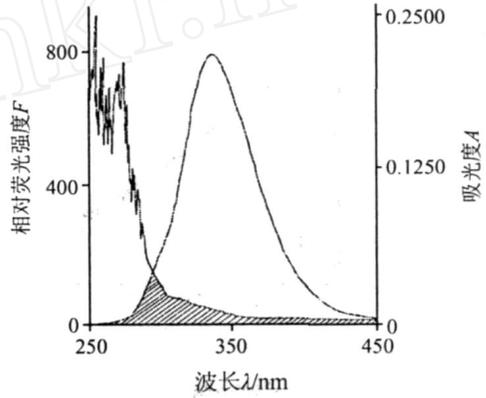


图 9 EB 吸收光谱与 BSA 荧光光谱的重叠

EB 的吸收光谱与 BSA 的荧光光谱的重叠见图 9。将图中的光谱重叠部分分割成极小的矩形, 结合式(8)求得重叠积分  $J = 1.514 \times 10^{-14} \text{cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。BSA 中最大荧光发射波长在 340nm 附近的能量转移只有色氨酸残基, 荧光量子产率取  $\Phi_D = 0.15$ , 取向因子取  $K^2 = 2/3$ , 折射率取  $N = 1.336$ <sup>[12]</sup>, 从公式(7)得到  $R_0 = 2.67 \text{nm}$ ; 由公式(6)得到能量转移效率  $E = 0.276$ , EB 与 BSA 色氨酸残基之间的距离是 3.14nm, 说明 EB 对 BSA 内源荧光的猝灭属于静态猝灭和非辐射能量转移。

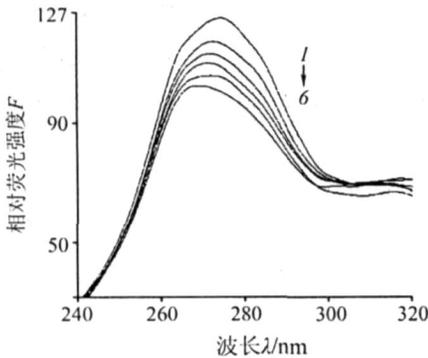


图 10 BSA 的同步荧光光谱( $\Delta\lambda = 35 \text{nm}$ )

$C_{\text{BSA}} = 1.001 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , (pH = 7.17)  
 $C_{\text{EB}}/10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 曲线 I——6: 0, 1.029, 2.058, 3.087, 5.145, 8.232.

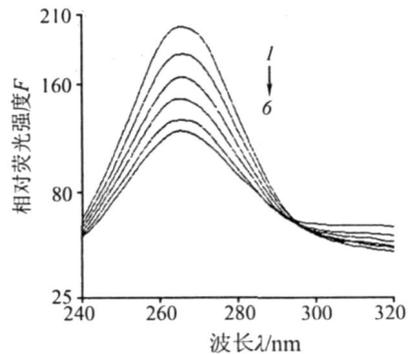


图 11 BSA 的同步荧光光谱( $\Delta\lambda = 70 \text{nm}$ )

$C_{\text{BSA}} = 1.001 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , (pH = 7.17)  
 $C_{\text{EB}}/10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ : 曲线 I——6: 0, 1.029, 2.058, 3.087, 5.145, 8.232.

### 3.8 伊文思蓝对牛血清白蛋白构象的影响

氨基酸残基最大发射波长与其所处的微环境极性有关, 可用同步荧光法根据最大发射波长的改变判断蛋白质构象的变化<sup>[13]</sup>。按照实验方法(1), 在不同EB浓度下, 分别测得 $\Delta\lambda=35\text{nm}$ (图10)和 $\Delta\lambda=70\text{nm}$ (图11)的同步荧光光谱。

$\Delta\lambda=35\text{nm}$ 时主要为酪氨酸残基的荧光, 而 $\Delta\lambda=70\text{nm}$ 时主要为色氨酸残基的荧光。由图10和图11可以看到, 随EB浓度的增加, 酪氨酸残基的发射波长发生了明显的蓝移, 而色氨酸残基的发射波长无明显变化。这说明加入EB后BSA的构象发生了变化, 酪氨酸残基所处环境的疏水性逐渐提高, 肽链的伸展程度有所减少。除了蛋白质的构象变化之外, 图中所示, 色氨酸残基荧光明显强于酪氨酸残基, 说明色氨酸为BSA中的主要的发光物质。

## 参考文献

- [1] Deep S, Ahluwalia J C. Interaction of Bovine Serum Albumin with Anionic Surfactants[J]. *Phys Chem. Chem. Phys.*, 2001, **3**(20): 4583—4591.
- [2] Wang Y Q, Zhang H M, Zhang G *et al*. Interaction of the Flavonoid Hesperidin with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study[J]. *J. Luminescence*, 2007, **126**(1): 211—218.
- [3] Wang Y P, Wei Y L, Dong C. Study on the Interaction of 3,3-Bis(4-Hydroxy-1-Naphthyl)-Phthalide with Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy[J]. *J. Photochem. Photobiol. A*, 2006, **177**(1): 6—11.
- [4] Haldar B, Mallick A, Chattopadhyay N. Interaction of Pyrene-end-capped Poly(ethylene oxide) with Bovine Serum Albumin and Human Serum Albumin in an Aqueous Buffer Medium: A Fluorometric Study[J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2005, **80**(3): 217—224.
- [5] Saria A, Lundberg J M. Evans Blue Fluorescence: Quantitative and Morphological Evaluation of Vascular Permeability in Animal Tissues[J]. *J. Neurosci Methods*, 1983, **8**(1): 41—49.
- [6] Uyama O, Okamura N, Yanase M *et al*. Quantitative Evaluation of Vascular Permeability in the Gerbil Brain After Transient Ischemia Using Evans Blue Fluorescence[J]. *J. Cerebral Blood Flow Metab.*, 1988, **8**(2): 282—284.
- [7] 赵虎, 庞艳玲, 张敏等. 伊文思蓝作荧光探针研究牛血清白蛋白与氨苄青霉素之间的竞争反应[J]. *高等学校化学学报*, 2008, **29**(3): 482—487.
- [8] Lakowicz J R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [M]. 2nd ed New York: Plenum Press, 1986. 264.
- [9] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓等. 荧光分析法[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1990. 115—118.
- [10] Alain M, Michel B, Michel D. How to Illustrate Ligand-Protein Binding in a Class Experiment: An Elementary Fluorescent Assay [J]. *J. Chem. Educ.*, 1986, **63**(4): 365—366.
- [11] 杨频, 高飞, 马贵斌. 生物无机化学导论[M]. 西安: 西安交通大学出版社, 1991. 152—158.
- [12] Cyril L, Earl J K, Sperry W M. *Biochemists Handbook* [M]. London: E & F N. Spon Ltd. Press, 1961. 83.
- [13] 郭彦青, 李建晴, 卫艳丽等. 荧光光谱法研究荧光桃红与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *分析科学学报*, 2007, **23**(3): 277—279.

## Studies on the Interaction Between Evansblue and Bovine Serum Albumin by Fluorescence Spectrophotometry

MA Li-Ying JIANG Ji-Gang ZHAO Hu<sup>a</sup> WANG Huai-You<sup>a</sup>

(Department of Chemistry, Binzhou Medical College, Yantai, Shandong 264003, P. R. China)

<sup>a</sup>(College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, P. R. China)

**Abstract** The interaction of Evansblue (EB) and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence spectroscopy and ultraviolet spectroscopy. The experimental results showed that EB could quench the inner fluorescence of BSA by forming the BSA-EB complex. It was found that both static quenching and non-radiation energy transfer led to the fluorescence quenching. The binding constants ( $K$ ) between EB and BSA were  $1.122 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ , and the binding sites ( $n$ ) were 0.994. According to Foerster theory of non-radiation energy transfer the binding distance ( $r=3.14\text{nm}$ ) and the efficiency of energy transfer ( $E=0.276$ ) were also obtained. The effect of EB on the conformational change of BSA was also analyzed by synchronous fluorescence spectroscopy.

**Key words** Evansblue; Bovine Serum Albumin; Fluorescence Quenching; Non-Radiation Energy Transfer