

# 一种新的磺酸吡啶菁染料的 荧光光谱分析及其应用研究

林旭聪 郭良洽 张丽盆 谢增鸿

(福州大学化学化工学院 福州市鼓楼区工业路 523 号 350002)

**摘要** 研究了一种新型磺酸吡啶菁染料的荧光光谱并应用于蛋白质分析。结果表明,随着染料浓度增大,染料发生  $J$  聚合,荧光峰从 564nm 红移至 605nm。当染料处于较低浓度时,离子强度影响不明显,而在较高浓度, $J$  聚合增强,荧光增强变化明显;乙醇有机试剂显著增强染料荧光,并发生红移。应用于蛋白质分析,染料荧光强度随牛血清蛋白 BSA 或人血清蛋白 HSA 的增加而显著增强,在最优条件下,染料荧光强度与蛋白质浓度成良好线性关系,BSA 线性范围为 0.20—6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,检出限为 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;HSA 线性范围为 0.20—6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,检出限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

**关键词** 磺酸吡啶菁染料, 荧光分析, 蛋白质

中图分类号: O 657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2007)03-0471-06

## 1 前言

蛋白质含量分析在生命科学研究中占有重要地位,其分析方法的一直受到人们的关注<sup>[1]</sup>。目前用于测定蛋白质的方法主要有凯氏定氮法<sup>[2]</sup>、Folin-酚试剂法<sup>[3]</sup>。凯氏定氮法仪器流程复杂,操作繁琐,Folin-酚试剂法在反应中易受干扰,不稳定,在实际应用中受到很大限制。荧光分析法选择性好,灵敏度高而倍受广大分析工作者关注,在生物分子分析等领域应用广泛<sup>[4,5]</sup>。由于蛋白内源荧光弱,借助染料荧光变化来测定蛋白质含量,方法稳定、操作简便、抗干扰能力较高,已广泛用于蛋白质的检测分析。

花菁染料是近年来研究发展的一类以噻唑、吡啶等杂环结构为主的新型生物荧光染料。该类染料经过修饰改性后,形成的磺酸盐易溶于水,光稳定性好,荧光量子产率高,与蛋白质等大分子结合后荧光显著增强,避免了染料自身的荧光干扰,提高了检测的灵敏度,较为适合作为生物大分子的定量分析探针,广泛应用于核酸及其他生物分子的标记和检测<sup>[6,7]</sup>。目前,荧光花菁探针发展迅速<sup>[8]</sup>,自从 1992 年 Rye 等人突破性地合成了性能独特的噻吩橙花菁染料以后,噻唑、噻嗪、噻吩及吡啶化合物荧光探针相继被开发并在生物分析中应用,花菁探针已成为新一代的生物分子荧光探针<sup>[9,10]</sup>,发展前景十分广阔。1-丙磺酸-2-[对( $N,N$ -二甲基胺)-苯乙炔基]-3,3-二甲基吡啶菁-5-磺酸钾是我们新开发的一种性能稳定的水溶性磺酸吡啶菁染料,迄今为止有关该染料的研究尚未见报道,开展光谱性能分析及应用研究对于建立新的蛋白质荧光测定技术具有良好的指导意义。

因此,本文采用 1-丙磺酸-2-[对( $N,N$ -二甲基胺)-苯乙炔基]-3,3-二甲基吡啶菁-5-磺酸钾为荧光探针,研究考察了该染料探针的特征光谱性能及其与血清蛋白的结合反应,研究建立了一种简

资助项目:“十五”国家重大专项课题(2001BA804A 26-7, 2001BA804A 26-9);福建省重点科技项目(2006Y0023)

联系人,电话:(0591)87893229;E-mail:zhxie@fzu.edu.cn

作者简介:林旭聪(1976—),男,福建省漳州市人,讲师,主要从事分子光谱与环境分析。

收稿日期:2007-01-08;接受日期:2007-01-29

便,灵敏、稳定的蛋白质荧光检测新方法,结果较为满意。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Cary Eclipse 荧光光度计(美国瓦里安技术中国有限公司);pHS-3C 酸度计(上海大普仪器厂);

花菁染料: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-磺酸钾(实验室合成),溶于水配成  $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  工作液,避光保存;

牛血清蛋白(BSA,上海纬群生物技术有限公司),人血清蛋白(HSA,美国Sigma公司),0—4 保存。

柠檬酸钠-HCl 缓冲溶液( $\text{pH} = 2.0$ ):移取 3.0mL  $0.10 \text{ mol/L}$  柠檬酸钠溶液及 7.0mL  $0.10 \text{ mol/L}$  盐酸溶液,混匀稀释至 100mL。试剂均为分析纯,实验用水均为二次蒸馏水。

### 2.2 实验方法

在 10mL 容量瓶中按顺序加入菁染料、适量 BSA 蛋白质工作液、1.0mL 柠檬酸-HCl 缓冲液,稀释至刻度,静置 5min;在激发、发射狭缝宽度分别为 10nm 和 5nm 条件下,应用 Varian 荧光分光光度计测定其最大激发和发射波长,扫描测量蛋白质-花菁体系的荧光强度,考察其荧光性能。

## 3 结果与讨论

### 3.1 花菁染料的荧光特征光谱

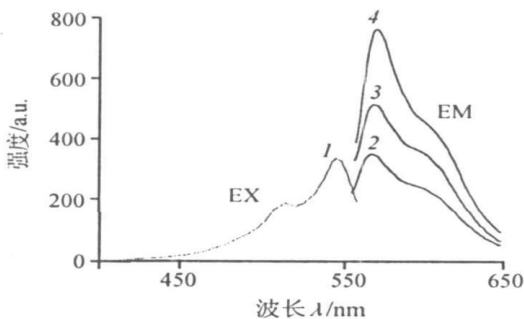


图 1 染料和染料-BSA 体系荧光光谱

$\text{pH} = 2.0$ ; 染料浓度:  $5.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ;

1—染料激发光谱曲线;

2—染料发射光谱曲线,BSA  $0.00 \mu\text{g/mL}$ ;

3—染料-BSA 荧光光谱曲线,BSA:  $4.20 \mu\text{g/mL}$ ;

4—染料-BSA 荧光光谱曲线,BSA:  $8.40 \mu\text{g/mL}$ 。

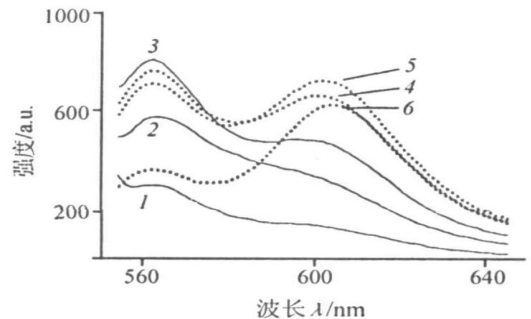


图 2 不同浓度条件的染料荧光光谱

$\text{pH} = 2.0$ ; 染料浓度( $\times 10^{-6} \text{ mol/L}$ );

曲线 1—6 为不同浓度的染料荧光光谱,染料浓度依次为:

1— $5.00$ ; 2— $10.00$ ; 3— $20.00$ ; 4— $50.00$ ; 5— $60.00$ ; 6— $100.00$ 。

实验表明,在较低浓度下,染料分子处于单分子状态,荧光激发波长为 547nm,发射波长为 564nm(图 1 曲线 1—2),荧光强度较弱。随着染料浓度的增加,如图 2 所示,当染料浓度小于  $20.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  时,564nm 处荧光强度依次增强,荧光波长不产生位移;但当浓度大于  $20.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  后,由于染料在高浓度时能形成多聚体,能量吸收谱带从单分子 *M* 谱带红移至 *J* 谱带,体系原来的 564nm 处荧光峰荧光减弱,605nm 处出现新增的荧光峰,红移 41nm,且随着浓度的增大,564nm 处荧光峰荧光明显下降,605nm 处荧光增强(图 2 曲线 4—5),表明了该浓度范围下染料可能发生 *J* 聚合的程度增大,*M* 型分子减少,*J* 聚体增多;当浓度增大到  $100.00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  后,由

于体系中染料分子浓度太大, 分子间激烈碰撞几率大, 激发能量损失大, 引起明显的荧光猝灭, 染料荧光强度整体降低(图 2 曲线 6)。

考察染料-血清蛋白体系的荧光光谱, 如图 1 所示, 染料荧光最大发射波长随着血清蛋白 BSA 浓度的增加而增强, 荧光峰向长波方向移动(红移), 表明在酸性条件下, 蛋白质带正电, 磺酸染料带负电荷, 染料通过电荷吸附接近后, 与蛋白分子氨基、巯基等产生氢键键合作用, 从而使染料结合在蛋白质螺旋结构中, 染料分子受到蛋白质骨架的约束保护, 受水分子的极化作用降低, 荧光增强。同时, 随着蛋白质浓度的增加, 由于蛋白质  $\alpha$ -螺旋结构从原来低浓度的舒展状态转变为高浓度的折迭态, 使得蛋白结构紧密程度增加, 染料结合后受到的空间位阻增大, 更易于形成刚性平面结构, 染料荧光强度相应增大(图 2 曲线 3—4), 可以用于蛋白质的分析测定。

### 3.2 离子强度影响

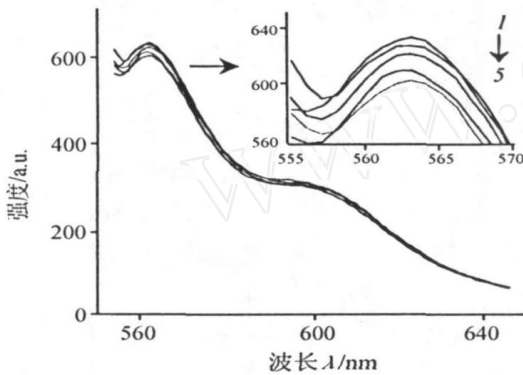


图 3-1 NaCl 对染料荧光强度的影响

pH= 2.0; 染料浓度:  $1.00 \times 10^{-5}$  mol/L;  
曲线 1 至 5 为不同 NaCl 浓度下的荧光光谱, NaCl 浓度依次为 (mol/L): 2.00, 1.00, 0.50, 0.10, 0.

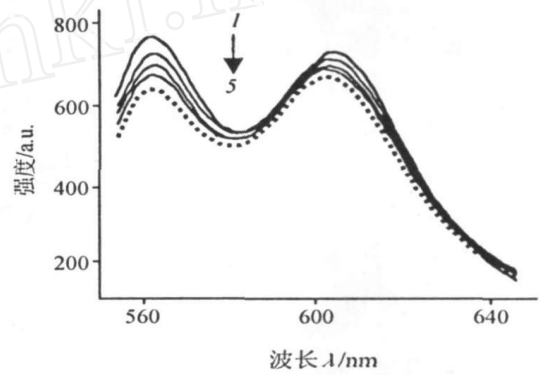


图 3-2 NaCl 对染料荧光强度的影响

pH= 2.0; 染料浓度:  $6.00 \times 10^{-5}$  mol/L;  
曲线 1 至 5 为不同 NaCl 浓度下的荧光光谱, NaCl 浓度依次为 (mol/L): 2.00, 1.00, 0.50, 0.10, 0.

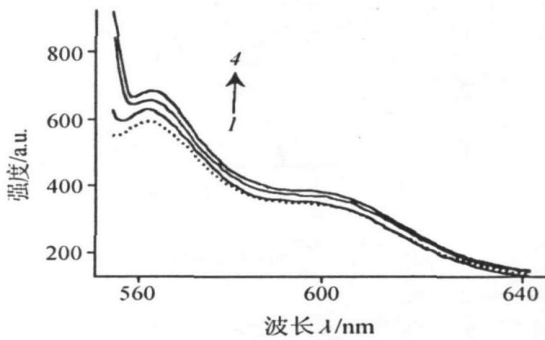


图 4-1 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 对染料荧光强度的影响

pH= 2.0; 染料浓度  $1.00 \times 10^{-5}$  mol/L;  
曲线 4 至 1 为不同 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度下的荧光光谱, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度依次为 (mol/L): 2.00, 1.50, 0.50, 0.

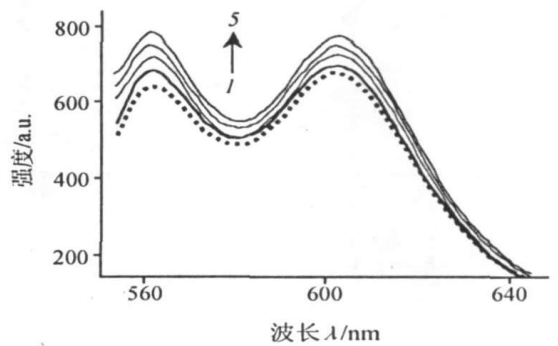


图 4-2 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 对染料荧光强度的影响

pH= 2.0; 染料浓度  $6.00 \times 10^{-5}$  mol/L;  
曲线 5 至 1 为不同 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度下的荧光光谱, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度依次为 (mol/L): 2.00, 1.50, 1.00, 0.50, 0.

应用 NaCl 和 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 测定无机盐离子对染料荧光的影响。在极性水溶液中, 染料溶解度良好, 当染料浓度较低 ( $10.00 \times 10^{-6}$  mol/L) 时, 主要以单分子存在, 相互接近时静电斥力大, 难于有效形成 J 型聚集体<sup>[11]</sup>; 当溶液中加入无机盐离子后, 染料离子间静电斥力减弱, 水分子的定向排列作用

增强,使得染料分子得到一定程度的聚集,提高了激发光能量的有效吸收率,荧光得到增强。如图 3-1, 4-1 所示,随着  $\text{NaCl}$  和  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  浓度的增大,564nm 处的荧光峰强度均得到小幅度增强。在  $\text{NaCl}$  为  $2.00\text{mol/L}$  时,荧光最大增强值达到 40, $\text{Na}_2\text{SO}_4$  为  $2.00\text{mol/L}$  时,最大增强值为 85。

当染料浓度较高( $6.00 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ )时,在溶液中,染料存在较大浓度的染料单分子和  $J$  型聚集集体。随着离子强度的增大,溶液中存在的染料单分子受到无机盐电荷屏蔽作用,排列紧密性增强,提高了激发光能量的有效吸收率,564nm 处荧光得到较大幅度增强。由于  $J$  聚集集体是由 6 个以上染料分子组成的聚集结构<sup>[11]</sup>,在水溶液中电荷强度大,当无机盐浓度增加时,溶液离子强度增大,电荷屏蔽作用增大,大大降低了  $J$  聚集体离子间的静电斥力,使得染料分子  $J$  聚集集体聚合程度进一步增强,605nm 峰荧光增强。如图 3-2, 4-2 所示,当  $\text{NaCl}$  为  $2.00\text{mol/L}$  时,564nm 处的荧光增强值达 110,605nm 处的荧光增强值约为 60; $\text{Na}_2\text{SO}_4$  在相同浓度下,荧光增强值分别为 165 和 90。

实验结果表明,当染料浓度较低时,低浓度的无机盐对染料荧光影响较小,在生化条件下( $\text{NaCl}$  为 0.5% (约  $0.1\text{mol/L}$ )),无机盐对染料荧光影响小于 3%,染料测定生物分子不会盐浓度的较大干扰。

### 3.3 有机试剂(乙醇)影响

应用乙醇调节体系中有机溶剂的浓度。结果表明,当染料浓度较低( $1.00 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ )时,加入乙醇,增大了溶液的介电常数,明显降低了染料之间的静电斥力,使低浓度染料趋向发生紧密排列,少量发生  $J$  聚合,如图 5-1 所示,染料 564nm 峰荧光强度得到显著加强,605nm 峰也得到小幅度增大;但当乙醇比例较高(大于 50%)时,有机相比例增大,介电常数增大,染料溶解于乙醇后离子间静电排斥减少<sup>[11]</sup>,趋向形成较低聚合度的聚合体,荧光向长波方向移动,当加入乙醇为 6.00mL 时荧光大大增强,增强值约为 400,荧光向长波方向移动了 10nm。

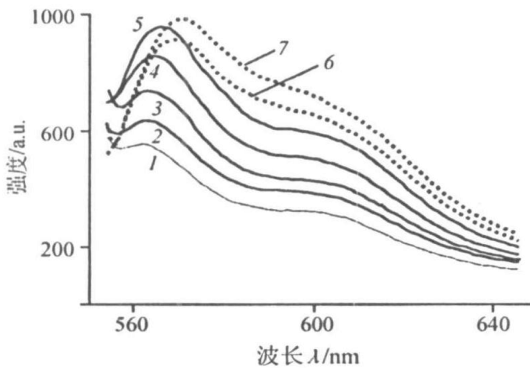


图 5-1 乙醇含量的影响

pH=2.0; 染料浓度  $1.00 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ ;  
曲线 1 至 7 为不同乙醇体积下的荧光光谱,乙醇体积依次为  
(mL): 0, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00, 5.00, 6.00。

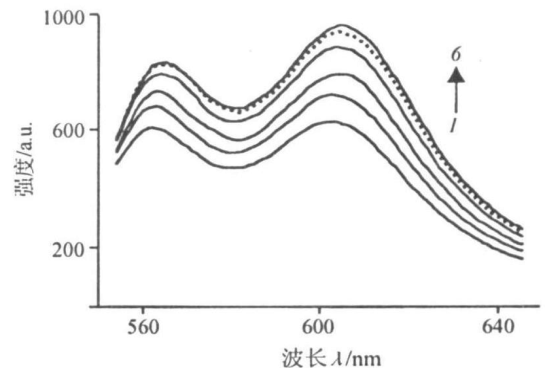


图 5-2 乙醇含量的影响

pH=2.0; 染料浓度  $6.00 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ ;  
曲线 1 至 6 为不同乙醇体积下的荧光光谱,乙醇体积依次为  
(mL): 0, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 3.00。

当染料浓度较高( $6.00 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ )时,随着离子强度的增大,溶液中存在的染料单分子受到乙醇溶剂化效应影响,趋向发生紧密排列,564nm 荧光得到较大幅度增强;另外,随着乙醇比例增大高(大于 50%)时,有机相比例增大,水中高浓度的带负电荷的  $J$  聚集集体在极性较弱的乙醇中分散度明显下降,聚合临界浓度降低, $J$  聚合体含量随着乙醇加入量增大而增多,605nm 峰荧光强度增强。但当乙醇比例达到 30% 时,染料  $J$  聚合体离子浓度较高,在有机相中易聚合凝析,如图 5-2 曲线 6 (以虚线表示),荧光强度整体降低。以上结果表明,有机试剂乙醇对染料荧光影响较为明显。

### 3.4 分析应用

#### 3.4.1 染料浓度优化

如图 6 所示, 当染料浓度小于  $8.00\mu\text{mol/L}$ , 血清蛋白与染料探针作用随着染料浓度的增加而加强, 荧光增强值逐渐上升; 当染料浓度大于  $8.00\mu\text{mol/L}$ , 血清蛋白与染料的作用趋向饱和, 由于体系荧光随着染料浓度的上升, 背景值增强并在较高浓度(大于  $20.00\mu\text{mol/L}$ )时产生聚合, 导致蛋白-染料作用体系的荧光增强度明显降低。实验表明, 当吡啶菁染料的浓度为  $8.00\mu\text{mol/L}$  时, 体系荧光增大最为明显。

#### 3.4.2 pH 优化

当 pH 为 1.0—2.0 时, 血清蛋白 BSA 与花菁染料体系的荧光强度随 pH 增加而增强, 如图 7 所示, 当 pH = 2.0 (柠檬酸钠-HCl 缓冲体系) 时, BSA 与花菁染料的荧光强度最大; 当 pH 继续增加, pH 为 2.0—5.0 时, 由于蛋白分子构型随着体系酸度下降而改变<sup>[7]</sup>, 与染料作用减弱, 体系荧光增强程度降低。

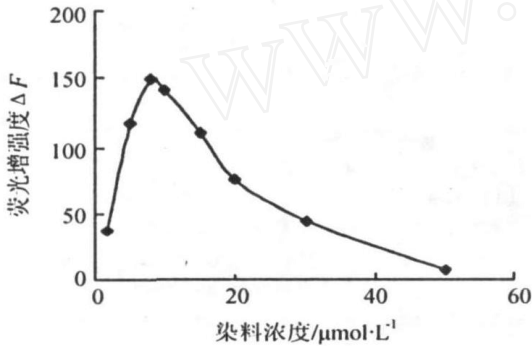


图 6 不同浓度染料浓度荧光增强曲线

pH = 2.0; BSA:  $4.20\mu\text{g/mL}$ 。发射波长  $564\text{nm}$ 。

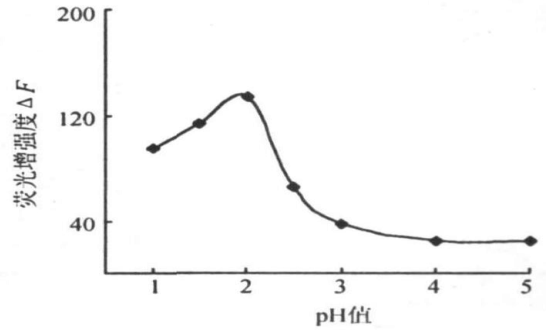


图 7 pH 影响曲线

pH = 2.0; 染料浓度  $8.00\mu\text{mol/L}$ 。BSA:  $4.20\mu\text{g/mL}$ 。

#### 3.4.3 共存物质影响

研究考察了无机盐离子、氨基酸等对吡啶菁染料荧光强度的影响。如表 1, 大部分物质对检测干扰较小, 允许较大浓度存在。Cu(II)、Al(III)、Mg(II) 可能与染料产生络合作用, 对荧光测定具有较大的影响。

表 1 共存物质影响

共存物质	允许浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	相对误差 (%)	共存物质	允许浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	相对误差 (%)
Fe <sup>3+</sup>	268.6	5.0	肌氨酸	350.0	4.3
Ba <sup>2+</sup>	728.2	5.0	L-谷氨酸	500.0	4.7
Zn <sup>2+</sup>	657.7	5.4	$\beta$ -丙氨酸	200.0	5.5
Ca <sup>2+</sup>	100.0	4.4	抗坏血酸	200.0	5.1
Mg <sup>2+</sup>	8.000	4.6	四氯甲基溴化铵	400.0	3.9
Al <sup>3+</sup>	0.5560	4.4	半胱氨酸	6.770	5.7
Cu <sup>2+</sup>	0.4720	4.5	氨基乙酸	17.58	4.3
K <sup>+</sup>	1000	3.4	腺嘌呤	7.548	4.1
甘氨酸	700.0	3.7	胸腺嘧啶	8.088	4.6
盐酸硫胺	12.00	4.0			

染料  $8.00\mu\text{mol/L}$ , BSA  $4.20\mu\text{g/mL}$ , pH = 2.0, 0.5% NaCl

### 3.4.4 校准曲线测定

在优化条件下,分析测定血清蛋白,如图 8 所示,在 0.20—6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,BSA 荧光强度呈线性,线性方程为  $y = 110.31x - 2.4209$ ,  $r^2 = 0.994$ ,检出限 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;在 0.20—6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内 HSA 荧光强度呈线性,线性方程为  $y = 74.004x + 37.629$ ,  $r^2 = 0.994$ ,检出限 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。测定 BSA 血清合成样品,回收率为 93.0%—103.8%,见表 2。

表 2 血清合成样品的测定 (n=3)

加入量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	测定量 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	回收率 (%)
2.00	1.86	93.0
3.00	2.92	97.3
4.00	4.15	103.8

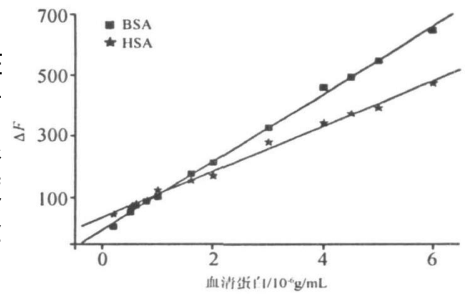


图 8 蛋白质测定校准曲线

pH=2.0; 染料 8.00  $\mu\text{mol/L}$ 。发射波长 564nm。

## 参考文献

- [1] Zheng H, Ma ao Y, Li D. Dye-Binding Protein Assay Using a Long Wave Absorbing Cyanine Probe [J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, **318**: 86—90.
- [2] 陈辉, 刘振林, 张忠义. 凯氏定氮法测定牛奶中蛋白质的不确定度分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2004, **14**(3): 373—374.
- [3] 王建森, 刘保生, 孙艳梅等. 蛋白质光度法定量分析研究现状[J]. *光谱实验室*, 2005, **22**(3): 599—606.
- [4] 林旭聪, 谢增鸿, 郭良洽等. 核酸-桑色素-铝(III)三元荧光体系的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2004, **24**(10): 1230—1234.
- [5] 汪新, 刘金水, 王伦. 丁基罗丹明B-表面活性剂体系荧光光谱法测定人血清蛋白[J]. *光谱实验室*, 2005, **22**(2): 337—340.
- [6] 陈蓁蓁, 张宁, 张文申等. 蛋白质分子荧光探针研究及其应用新进展[J]. *分析化学*, 2006, **34**(9): 1341—1347.
- [7] Yamoluk SM, Kryvovotenko D V, Balanda A O. Proteins and Cyanine Dyes: Synthesis and Spectroscopic Studies of Benzo thiazob-4-[1, 2, 6-Tri-methylpyridinium] Monomethine Cyanine Dyes for Fluorescent Detection of Bovine Serum Albumin in Solutions[J]. *Dyes and Pigments*, 2001, **51**: 41—49.
- [8] Funovics M, Weissleder R, Tung C H. Protease Sensors for Bioimaging[J]. *Anal Bioanal Chem.*, 2003, **377**(6): 956—963.
- [9] Pham W, Medarova Z, Moore A. Application of a Water-Soluble Near-Infrared Dye for Cancer Detection Using Optical Imaging[J]. *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**(3): 735—740.
- [10] Ye Y, Borch S, Kao J, Achilefu S. Synthesis and Multivalent Carbocyanine Molecular Probes: Synthesis and Applications [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**(1): 51—61.
- [11] 宫永宽, 魏永锋, 党高潮等. 一种菁染料在溶液中的聚集状态研究 [J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 1997, **27**(1): 49—52.

## Spectrofluorometric Analysis of a New Sulfonic Indole Cyanine Dye and Its Application to Protein

L N Xu-Cong GUO Liang-Qia ZHANG Li-Pen XIE Zeng-Hong

(Chemistry and Engineering College of Fuzhou University, Fuzhou 350002, P. R. China)

**Abstract** A new Sulfonic Indole cyanine dye shows a fluorometric spectrum with maximum emission wavelength at 564nm, which moves to 605nm as cyanine dye polymerized at some high concentration. Effect of ion intensity is not notable in the dilute solution. The addition of ethanol results in the enhancement of the fluorescence with a red shift. The titled dye became a sensitive fluorescence probe for albumin in bovine (BSA) or albumin from human serum (HSA). Under the optimum condition, the fluorescence intensity was in a good linearity with albumin, and then calibration curves were obtained in the range of 0.20—6.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for BSA or HSA with detection limits of 0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively.

**Key words** Sulfonic Indole Cyanine Dye, Spectrofluorometric Analysis, Protein