

荧光猝灭法研究刚果红与人血清白蛋白的相互作用^①

谢兵 万邦江 秦宗会^②

(长江师范学院化学化工学院 重庆市涪陵区李渡聚龙大道 98 号 408100)

摘要 在 $0.050 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲介质中(内含 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl), 用荧光光谱法在模拟生理条件下, 研究了刚果红与人血清白蛋白的相互作用。在不同温度和不同 pH 值下, 刚果红对人血清白蛋白的荧光猝灭作用为静态猝灭机制。根据荧光猝灭双倒数曲线和位点结合模型计算出的刚果红与人血清白蛋白之间的结合常数相当, 且结合常数与结合位点数都随温度升高而减小, 在 pH 7.4 时最大。根据热力学方法讨论了两者的作用力类型, 由重叠积分面积, 得出两者的结合距离。由此可见, 刚果红与人血清白蛋白之间有很强的结合作用。

关键词 人血清白蛋白; 刚果红; 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(2011)02-0764-06

1 引言

血清白蛋白是人和动物体内血浆中含量最丰富的蛋白质, 它不仅是维持血浆渗透压的主要力量, 在生理上还参与多种内源、外源性物质(如金属离子、脂肪酸、氨基酸、代谢物、胆红素、酶、药物和激素等)的存储和转运, 是一种含有多个配位基团的生物大分子。刚果红为酸碱指示剂, 吸附指示剂, 也是硼酸、氰化物和盐酸等的检定、蛋白质沉淀、胚胎切片、植物粘蛋白、纤维素、弹性组织等的染色^[1]。刚果红(造影剂)在医学上用于静脉注射诊断淀粉样病变。不良反应为重复给药使皮肤变色; 大剂量静脉注射过快, 可引起致命的栓塞性病变和其他严重反应; 也能致癌^[2]。美国哈佛医学院的科学家在 2003 年 1 月 23 日出版的《自然》杂志上报告, 一种常用于医学实验的染料刚果红, 能够阻止脑部一些异常蛋白质积聚, 防治“亨廷顿氏舞蹈病”。关于药物对人血清白蛋白的荧光猝灭有很多报道, 未见刚果红与人血清白蛋白的文献报道。本文研究了人血清白蛋白与刚果红相互作用后的紫外光谱及荧光光谱变化, 其结果对探明人血清白蛋白生理功能与结构变化的关系提供了部分根据, 也为研究药物与人血清白蛋白的相互作用对药物的探索、开发及应用等都具有重要的意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-4500 型荧光分光光度计(日本日立公司); UV-4100 紫外/可见分光光度计(日本日立公司); pH S-3C 数显酸度计(上海理达仪器厂); ZH-2C 超级恒温槽(南京多助科技发展有限公司)。

① 重庆市教委科研(No: KJ101314); 重庆市涪陵区科委科技计划(No: 2008-43, No: 2009-1-15); 长江师范学院科研(2010BJSKY060)

② 联系人, 手机: (0) 15095896665; E-mail: qinzonghui654321@163.com

作者简介: 谢兵(1964—), 男, 重庆市人, 高级实验师, 主要从事化学教育及应用化学研究工作。

人血清白蛋白(HSA, 美国 Sigma 公司, $M_w = 68500$, 纯度: 99%), 刚果红(CGR, 上海试剂三厂, 纯度 > 98%), 均用水配成 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 置于 4°C 冰箱中保存; 三羟甲基氨基甲烷(Tris)为生化试剂, 配成 $0.050 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液(内含 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 以调节离子强度), 准确 pH 值用酸度计校准。其他试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 实验方法

向一系列 10mL 比色管中分别加入 1.0mL $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的人血清白蛋白溶液, 再加入一定量的 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CGR 溶液, 用缓冲溶液定容至刻度, 在一定温度水浴中恒温 3h 后, 测定体系的荧光光谱。测定条件: 比色皿厚为 1cm, 激发和发射狭缝宽度均为 5nm, 激发光波长 $\lambda_{ex} = 280\text{nm}$, 扫描速率 $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。并扫描紫外光谱。

3 结果与讨论

3.1 紫外吸收光谱

固定 HSA 溶液浓度不变, 改变刚果红浓度, 以水为参比, 紫外扫描混合溶液的吸收光谱(图 1)。可以看出, 随着刚果红浓度的增加, 在扫描波长范围内吸光度有规律的增大。在人血清白蛋白的紫外最大吸收峰处, 吸光度同样有规律的增加, 这表明 CGR 与 HSA 之间存在较强的相互作用, 形成了复合物。

3.2 荧光光谱

刚果红本身没有荧光, 人血清白蛋白能够发出荧光, 是因为蛋白质中存在 3 种芳香族氨基酸: 色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸, 由于这些氨基酸结构不同, 通常荧光强度比为 $100:9:0.5$ ^[3], 因此通常认为蛋白质所显示的荧光主要来自色氨酸残基, 而且含色氨酸残基的蛋白质的天然荧光及其变化值可以直接反映蛋白质中色氨酸残基本身和周围环境的变化。由图 2 可知, 在 280nm 激发波长下, 刚果红使人血清白蛋白的荧光发生猝灭, 且随刚果红浓度的增加, 人血清白蛋白的荧光强度逐步降低, 降低的幅度越来越小, 而蛋白质的发射峰的峰位及峰形基本保持不变。也表明两者之间存在着相互作用, 且随刚果红浓度的增加两者的结合趋向饱和。

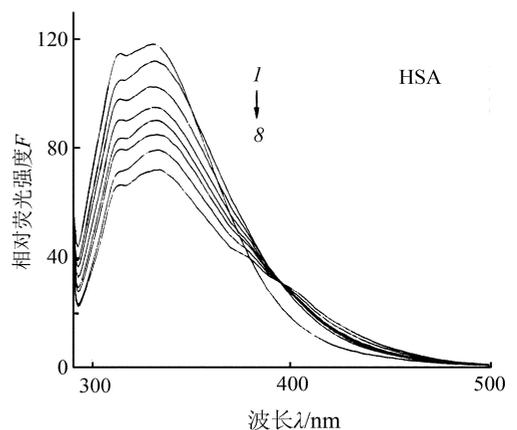
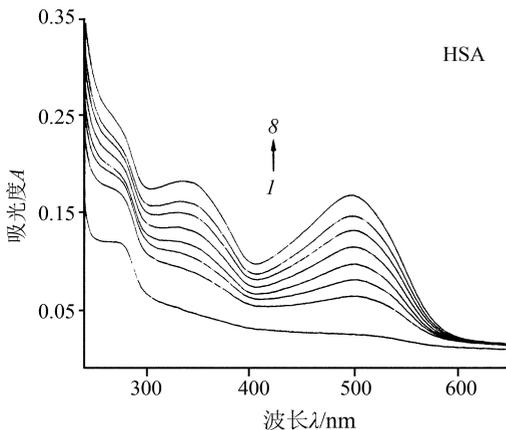


图 1 刚果红对血清白蛋白紫外光谱的影响

pH = 7.40; $C_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 曲线 1—8 的 $C_{\text{CGR}} / \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1$ 。

图 2 刚果红对人血清蛋白发射光谱的影响

$\lambda_{ex} = 280\text{nm}$; 狭缝宽度 = 5nm; pH = 7.40; $C_{\text{HSA}} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 曲线 1—8 的 $C_{\text{CGR}} / \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} = 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5, 1.8, 2.1$ 。

3.3 荧光猝灭过程速率常数和机制

3.3.1 不同温度下猝灭常数和机制

荧光猝灭作用因猝灭机制不同可分为动态猝灭、静态猝灭、能量转移猝灭、光化学反应猝灭等。在动态猝灭过程中,蛋白质等荧光体与荧光猝灭剂分子间的相互作用可用 Stern-Volmer 方程进行描述^[4],即:

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

式中: F ——有猝灭剂时血清白蛋白的荧光强度;
 F_0 ——无猝灭剂时血清白蛋白的荧光强度;
 $[Q](\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ——猝灭剂浓度; $K_{SV}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ ——动态猝灭常数。它反映了生物大分子与荧光猝灭剂分子彼此扩散和相互碰撞到达动态平衡时的量效关系;
 $K_q(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ ——动态荧光猝灭速率常数,它反映了体系中分子的彼此扩散和相互碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响,各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; τ ——无猝灭剂时荧光分子的平均寿命,生物大分子的荧光平均寿命约为 10^{-8}s 。

按照实验方法,分析不同温度下,刚果红与人血清白蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线,如图 3,结果见表 1。从结果可知:在不同温度下,荧光猝灭速率常数 K_q 远远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,且随温度升高, Stern-Volmer 曲线的斜率减小,猝灭常数(K_{SV})逐渐降低,表明刚果红与人血清白蛋白形成了一个没有荧光的复合物,该复合物随着温度的增加,其稳定性下降,从而导致了猝灭常数的降低。说明刚果红对 HSA 的荧光猝灭是静态过程而非动态过程^[5]。

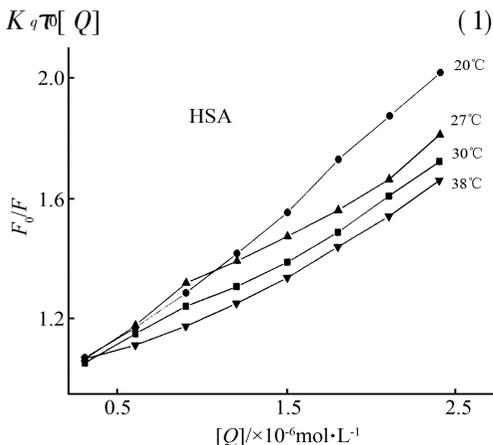


图 3 刚果红与人血清白蛋白的 Stern-Volmer 曲线

表 1 不同温度刚果红对人血清白蛋白猝灭的 Stern-Volmer 方程与猝灭常数

体系	温度 T (K)	回归方程($[Q]$ 单位为 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	r	K_{SV} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_q ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
HSA-CGR	293	$F_0/F = 0.4583 \times 10^6 [Q] + 0.8969$	0.9974	4.583×10^5	4.583×10^{13}
	300	$F_0/F = 0.3339 \times 10^6 [Q] + 0.9836$	0.9960	3.339×10^5	3.339×10^{13}
	303	$F_0/F = 0.3082 \times 10^6 [Q] + 0.9547$	0.9965	3.082×10^5	3.082×10^{13}
	311	$F_0/F = 0.2838 \times 10^6 [Q] + 0.9407$	0.9913	2.838×10^5	2.838×10^{13}

3.3.2 不同 pH 下猝灭常数和机制

在水溶液中, pH 的改变能导致人血清白蛋白的构象发生变化,在酸性条件下, HSA 以部分膨胀构象的形式存在,色氨酸的微环境变得更为疏水,而 CGR 为亲水性物质,因此在此水环境中它们的能量转移效率较低,表现为荧光猝灭相对较低。在近中性条件下(pH 5.5—7.5),人血清白蛋白以正常构象存在,此时,色氨酸的微环境是相对极性的,易于和亲水性的 CGR 结合,能量转移的效率较高,因此荧光猝灭最强。在碱性条件下(pH 8.0—11.0), HSA 以一种不能完全可逆转变为 N 构象的能量受体构象存在,碱性增大,引起色氨酸附近的赖氨酸和精氨酸残基上的正电荷消失,致使荧光猝灭强度降低,同时可能是因为溶剂的碱性增强,碱性溶剂的猝灭效应使 HSA 本身的荧光强度(F_0)降低,导致 ΔF 减小^[6]。

实验不同 pH 下 Stern-Volmer 方程与猝灭常数,结果见表 2。猝灭常数(K_{SV})在中性环境(pH=7.4,血液的正常值)相对较大,在弱酸性(pH=5.0)和弱碱性(pH=9.0)环境下略有降低, K_q 也远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。这说明 HSA 分子中色氨酸周围的微环境在中性 pH 值范围内不发生改变或仅有微小的改变,这与人血清白蛋白的构象转换基本不影响蛋白质的结构相一致,在

pH 值的小幅度变化对蛋白质与刚果红结合能力的影响也很小^[7,8]。说明与蛋白质结合引起荧光猝灭的应该是刚果红分子,以正常构象存在。

表 2 不同 pH 值刚果红对血清白蛋白猝灭的 Stern-Volmer 方程与猝灭常数

体系	pH	回归方程([Q] 单位为 mol · L ⁻¹)	r	K _{SV} (L · mol ⁻¹)
HSA-CGR	5.0	$F_0/F = 0.2862 \times 10^6 [Q] + 1.0422$	0.9970	2.862×10^5
	7.4	$F_0/F = 0.4152 \times 10^6 [Q] + 0.9707$	0.9913	4.152×10^5
	9.0	$F_0/F = 0.2723 \times 10^6 [Q] + 1.0510$	0.9965	2.723×10^5

刚果红使人血清白蛋白的荧光猝灭为静态猝灭,随温度的增加,猝灭常数随之减小;在人体正常 pH 条件下,猝灭常数最大。

3.4 结合位点数及结合常数

静态荧光猝灭作用是指荧光供体分子与荧光猝灭剂分子之间借助分子间力,彼此结合形成了具有一定结构的不发荧光的基态复合物,而导致荧光强度减弱的现象,荧光强度(F)、猝灭剂浓度([Q])以及配合物的解离常数(K_D)之间故遵循 Lineweaver-Burk 双倒数方程^[9]:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_D F_0^{-1} [Q]^{-1} \quad (2)$$

物质与蛋白质之间的相互作用一般采用位点结合模型来描述,依据文献[10]推导出的荧光强度(F)、猝灭剂浓度([Q])与表观结合常数(K_A)及结合位点数(n)之间的关系:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (3)$$

式中: $K_A = 1/K_D$ 。

在不同温度下,对实验结果按公式(2)、(3)处理,见表 3。由表 3 可知,刚果红与人血清白蛋白反应的 K_A 较大,有较强的结合作用,可形成一个结合位点,且结合常数与解离常数基本上成倒数关系,更进一步证明该体系的猝灭过程为静态猝灭。随温度升高, K_A 、 n 减小,这是由于温度升高导致复合物稳定性下降、二者分子间作用力减小所致。

表 3 不同温度的结合平衡常数 K_A 、解离平衡常数 K_D 和结合数 n

体系	温度 T (K)	回归方程([Q] 的单位为 mol · L ⁻¹)	r	K_A (L · mol ⁻¹), K_D (mol · L ⁻¹)	n
HSA-CGR	293	$\lg[(F_0 - F)/F] = 5.6493 + 1.2076 \lg [Q]$	0.9960	4.460×10^5	1.2076
		$(F_0 - F)^{-1} = 0.00567 + 2.1050 \times 10^{-6} F_0^{-1} [Q]^{-1}$	0.9915	2.105×10^{-6}	
	300	$\lg[(F_0 - F)/F] = 5.5475 + 1.1938 \lg [Q]$	0.9986	3.528×10^5	1.1938
		$(F_0 - F)^{-1} = 0.00579 + 2.7641 \times 10^{-6} F_0^{-1} [Q]^{-1}$	0.9983	2.764×10^{-6}	
	303	$\lg[(F_0 - F)/F] = 5.45968 + 1.1879 \lg [Q]$	0.9983	2.882×10^5	1.1879
		$(F_0 - F)^{-1} = 0.00498 + 3.36507 \times 10^{-6} F_0^{-1} [Q]^{-1}$	0.9940	3.365×10^{-6}	
	311	$\lg[(F_0 - F)/F] = 5.3536 + 1.1399 \lg [Q]$	0.9917	2.257×10^5	1.1399
		$(F_0 - F)^{-1} = 0.00521 + 4.6121 \times 10^{-6} F_0^{-1} [Q]^{-1}$	0.9919	4.612×10^{-6}	

3.5 结合反应的热力学性质及作用力

分子和蛋白质等生物大分子常常借助于疏水作用力、静电力、氢键和范德华力等结合形成超分子复合物。不同物质与蛋白质结合的作用力类型不同,根据反应的热力学参数可大致确定作用力类型。根据热力学原理,当温度变化不太大时,反应的焓变 ΔH^0 可看作一个常数,故计算物质与白蛋白结合反应的焓变 ΔH^0 、熵变 ΔS^0 和 Gibbs 自由能变 ΔG^0 有下面公式确定^[11]。

$$\ln k = - \frac{\Delta H_m^0}{RT} + C \quad (4)$$

$$\Delta G_m^0 = - RT \ln k \quad (5)$$

$$\Delta S_m^0 = \frac{\Delta H_m^0 - \Delta G_m^0}{T} \quad (6)$$

作用的 ΔG^0 、 ΔS^0 ，结果列于表 4。Nemethy 与 Scheraga 等根据热力学常数的符号与大小确定了作用力的类型^[12]： $\Delta S > 0$ 可能是疏水和静电作用力； $\Delta S < 0$ 可能为氢键和范德华力； $\Delta H > 0$ 、 $\Delta S > 0$ 为典型的疏水作用力； $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 为氢键和范德华力； $\Delta H \approx 0$ 或较小、 $\Delta S > 0$ 为静电作用力； $\Delta H < 0$ 时静电作用为主要作用力。从水结构的角度来考虑， $\Delta S > 0$ 通常认为疏水相互作用，而且水溶液中离子间的静电作用一般是以 $\Delta S > 0$ 与 $\Delta H < 0$ 为标志的，相反，对于范德华力， ΔH 以及 ΔS 却均为负值。 $\Delta H < 0$ 在静电作用中可能起一定作用，但在真正的静电作用中焓变非常小几乎等于零。

表 4 中结果表明， $\Delta G^0 < 0$ ，说明在等温等压条件下没有非膨胀功存在下，刚果红与人血清白蛋白的结合反应是 Gibbs 自由能驱动的自发过程，而且 $\Delta H^0 < 0$ 和 $\Delta S^0 > 0$ ，同时说明刚果红与人血清白蛋白的结合反应也是由焓、熵驱动的自发过程，并表明两者存在疏水作用和静电作用发生结合反应^[13]。

表 4 刚果红与人血清白蛋白结合的热力学参数

体系	温度 T (K)	K_A ($L \cdot mol^{-1}$)	ΔH_m^0 ($kJ \cdot mol^{-1}$)	ΔG_m^0 ($kJ \cdot mol^{-1}$)	ΔS_m^0 ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
HSA-CGR	293	4.460×1.0^5		- 31.69	8.26
	300	3.528×1.0^5	- 29.27	- 31.86	8.63
	303	2.882×1.0^5		- 31.67	7.92
	311	2.257×1.0^5		- 31.87	8.36

3.6 刚果红与蛋白质的结合距离

依据 Foerster 偶极-偶极非辐射能量转移理论对刚果红与蛋白键合距离进行计算。当两种化合物分子满足以下条件时将发生非辐射能量转移：(1) 供能体(蛋白质)发射荧光；(2) 供能体的荧光发射光谱与受能体(刚果红)的吸收光谱有足够的重叠；(3) 供能体与受能体足够接近，最大距离不超过 7nm。根据 Foerster 能量转移理论，就可以求出药物在蛋白质上的结合位置与蛋白质分子中产生荧光的基团之间的距离，并有如下计算公式：

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (7)$$

式中： E ——能量转移效率； R_0 ——转移效率为 50% 时的临界距离； r ——荧光体与猝灭体之间的真实距离。 F 和 F_0 ——分别存在和不存在能量受体时，能量给体的荧光发射强度。

而临界能量转移距离 R_0 又与偶极空间取向因子 K^2 ，供能体荧光量子产率 Φ 介质折射指数 n 、供能体的荧光发射光谱与受能体吸收光谱的重叠积分 J 有关。遵循的公式：

$$R_0 = 8.8 \times 10^{-25} (K^2 \cdot \Phi \cdot n^{-4} \cdot J) \quad (8)$$

其中 J 的计算如下：

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (9)$$

式中： $F(\lambda)$ ——荧光给体在波长为 λ 时的荧光强度； $\epsilon(\lambda)$ ——受体在波长 λ 时的摩尔吸光系数。图 4 为刚果红与血清白蛋白的重叠光谱图。

将图 4 的重叠积分面积按 (9) 式在 Origin 7.0 软件上计算得： $J_{HSA} = 3.40 \times 10^{-14} cm^3 \cdot L^{-1} \cdot mol^{-1}$ 。由文献[14]知，色氨酸的量子产率为 0.118，折射指数 n 取水和有机的平均值 1.336，取向因子取给体和受体各向随机分布的平均值 $K^2 = 2/3$ 。将以上各量代入公式

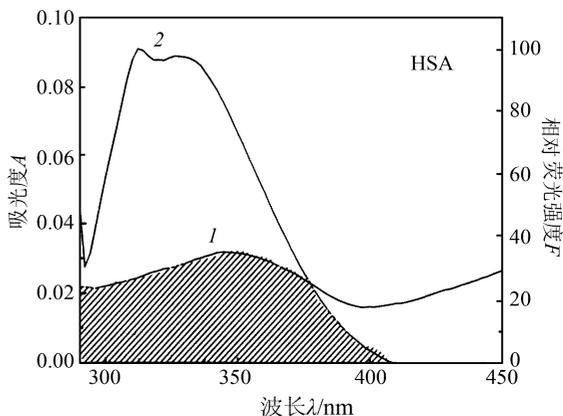


图 4 CGR 的吸收光谱(1)的 HSA 的荧光发射光谱(2)的重叠图

$C_{CGR} = 1.0 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1}$; $C_{HSA} = 1.0 \times 10^{-6} mol \cdot L^{-1}$ 。

(8) 中, 计算得 HSA 临界距离 R_0 为 3.01nm, 由公式(7) 求出蛋白中氨基酸残基与已结合的刚果红分子间的距离 r 为 3.19nm, 符合能量转移理论, 刚果红与血清白蛋白之间发生了非辐射能量转移。随温度升高, 结合距离逐渐增大, 从而验证了温度升高, 结合常数减小的结论。

参考文献

- [1] 中国医药公司上海化学试剂采购供应站. 试剂手册[M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 339.
- [2] 钟玉萍, 武永吉, 庄俊玲. 淀粉样变性 71 例临床分析[J]. 中华内科杂志, 2003, 42(5): 303—305.
- [3] 郭尧君. 荧光实验技术及其在分子生物学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1979. 123.
- [4] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2006. 64—85.
- [5] 马春骥, 李克安, 赵凤林等. 牛血清白蛋白与铬天青 S 作用机理的研究[J]. 化学学报, 1999, 57(4): 389—395.
- [6] 马康, 陈晓青, 陈景文. 荧光光谱法研究三种黄酮类化合物与 BSA 的相互作用[J]. 光谱实验室, 2008, 25(4): 662—668.
- [7] Dockal M, Carter D C, Rüker F. Conformational Transitions of the Three Recombinant Domains of Human Serum Albumin Depending on pH[J]. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(9): 3042—3050.
- [8] Xie M X, Xu X Y, Wang Y D. Interaction Between Hesperetin and Human Serum Albumin Revealed by Spectroscopic Methods[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1724(1): 215—224.
- [9] Mao H B, Matthew A H, You M *et al.* Reusable Platforms for High-Throughput On-Chip Temperature Gradient Assays[J]. *Anal Chem.*, 2002, 74(11): 5071—5075.
- [10] 黄波, 邹国林, 杨天鸣. 阿霉素与牛血清白蛋白结合作用的研究[J]. 化学学报, 2002, 60(10): 1867—1871.
- [11] 付献彩, 沈文霞, 姚天扬等. 物理化学[M]. 第 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2005. 158.
- [12] Ross P D, Subramanian S. Thermodynamic of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability[J]. *Biochem.*, 1981, 20(10): 3096—3102.
- [13] 邵炎, 马博英, 王学杰等. 头孢地嗪钠与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 物理化学学报, 2005, 21(7): 792—795.
- [14] Stryer L. Fluorescence Energy Transfers as a Spectroscopic Ruler[J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 1978, 47(3): 819—846.

Interaction Between Congo Red and Human Serum Albumin by Fluorescence Quenching Method

XIE Bing WANG Bang-Jiang QIN Zong-Hui

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, P. R. China)

Abstract At $0.050 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl buffer medium (containing $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl), the interaction between congo red and human serum albumin (HAS) was studied by fluorescence spectroscopy under simulated physiological conditions. At different temperatures and different pH values, the fluorescence quenching effect of congo red on human serum albumin was a static quenching mechanism. The binding constants of congo red and human serum albumin calculated by fluorescence quenching double reciprocal curves and site binding model are comparable. The binding constant and binding sites are decreased with the increase of temperature, and reach the largest values at pH 7.4. The main types of force were discussed according to thermodynamic method. The binding distance was obtained by the overlap integral area. This method shows that congo red and human serum albumin have a strong interactions.

Key words Human Serum Albumin; Congo Red; Fluorescence Quenching; Binding Reaction