

牛血清白蛋白与 Indo-1 相互作用的 荧光光谱法研究

白海鑫^{1,2}, 杨成¹, 杨秀荣¹

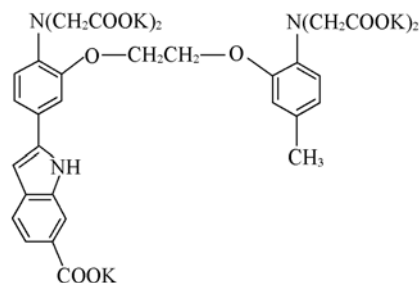
(1. 中国科学院长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室, 长春 130022;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 以牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)与荧光探针 Indo-1 为蛋白质和配体模型, 基于 Indo-1 的荧光强度与 BSA 的分析浓度间的关系, 建立了计算二者相互作用位点数的方法, 并利用荧光共振能量转移及各种荧光技术对 Indo-1 和 BSA 的相互作用进行了研究. 结果表明, Indo-1 在 BSA 中有 3 个作用位点, 这 3 个作用位点与 BSA 中的 212 位色氨酸(Trp 212)间的距离分别为 2.93, 2.57 和 2.40 nm; Indo-1 通过疏水性作用进入到 BSA 的 3 个疏水性空腔. 在荧光猝灭实验中, 通过 Microlab 500 系列进样器和 PTI 荧光仪的联用实现了荧光强度的自动和实时记录.

关键词 牛血清白蛋白; 荧光探针 Indo-1; 结合位点数; 相互作用; 荧光光谱法

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2007)02-0227-07

荧光光谱技术已被用于环境监测、临床化学、DNA 序列测定、遗传分析、细胞识别以及细胞内物质的定位和运动等方面的研究^[1]. 监测荧光强度的变化是研究蛋白质与其它物质相互作用时极为有效的手段之一^[2,3]. 已有诸多关于荧光光谱法研究蛋白质和配体相互作用的报道^[4~9], 并提出了一些计算蛋白质与配体间作用位点数的方法^[10~14]. 血清白蛋白是血液中含有最丰富的蛋白质之一, 在配体的传输与存贮方面起着重要的作用^[15,16]. 关于荧光探针 Indo-1 (Scheme 1) 与其它蛋白的相互作用的研究已有报道^[17~19], 而有关牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)与 Indo-1 的相互作用的研究仍未见报道. 因此, 本工作以 BSA 与 Indo-1 为蛋白质和配体模型, 用荧光光谱法研究其相互作用, 并试图建立一个计算其相互作用位点数的新方法, 这对用荧光光谱法研究蛋白质与配体的相互作用具有重要的意义和借鉴作用.



Scheme 1 Structure of Indo-1

1 实验部分

1.1 试剂

BSA 与 Indo-1 均购自 Sigma 公司, 并于冰箱中贮存. 将一定量的 BSA 溶于 10 mL 水中制得其贮备溶液, 其准确浓度由分光光度法测定, 稀释贮备液以获得工作液. Indo-1 的溶液于临用前配制, 并于试验间隙避光保存. 不同酸度的缓冲溶液由质量分数为 1% 的 HEPES 与盐酸配制而成. 实验用水由 Millipore Milli-Q 系统过滤, 至其电阻率达 18.2 M Ω 后方可使用. 其它所用试剂均为分析纯.

1.2 实验仪器

荧光发射光谱、激发光谱和荧光强度均用 PTI 公司的激光诱导荧光仪测定, 该仪器配有样品搅拌子、光路为 1.0 cm 且容量为 4.0 mL 的石英样品池以及丹麦产 Heto CBN 8-30 型控温仪. 在荧光猝灭实

收稿日期: 2006-08-21.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20475052)资助.

联系人简介: 杨秀荣(1946 年出生), 女, 博士, 研究员, 主要从事生物分析研究. E-mail: xryang@ciac.jl.cn

验中,将 Microlab 500 系列进样器和该荧光仪联用,并用 PTI 软件的 TIMEBASED 模式监测荧光强度的变化,从而实现对荧光强度的自动、实时记录.吸收光谱用美国 Varian 公司的 Cary 500 型分光光度计和光径为 1.0 cm、容量为 1.4 mL 的石英比色皿来测量.

2 结果与讨论

2.1 BSA 和 Indo-1 的相互作用

吸收光谱(图 1)研究结果表明,当 BSA 和 Indo-1 单独存在时,其最大吸收分别在 280 和 340 nm 处;二者共存时,在 280 nm 附近吸光度值无明显改变,而 355 nm 处出现一个新的吸收峰;相对于 Indo-1 的吸收光谱,新吸收峰在 300 ~ 380 nm 范围内的峰强有明显的降低,且最大吸收的峰位由 340 nm 移至 355 nm. 表明 BSA 和 Indo-1 发生了相互作用.

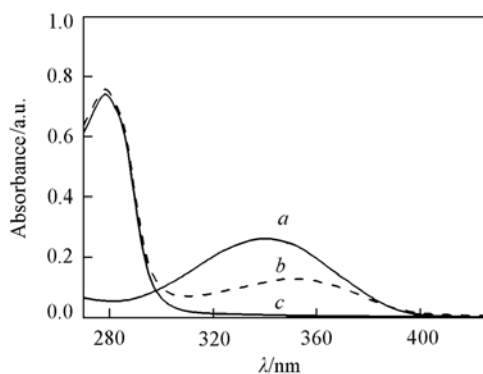


Fig. 1 Absorption spectra of differently determined solutions

Both concentrations of BSA and Indo-1 are 20 $\mu\text{mol/L}$ whether they existed separately or together. The determined solutions were buffered with 1% HEPES (pH = 7.4).
a. Indo-1; b. BSA-Indo-1; c. BSA.

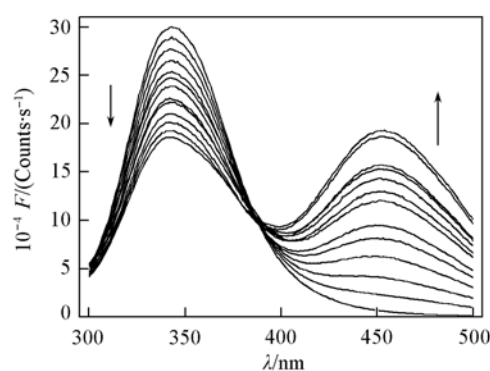


Fig. 2 Emission spectra of BSA-Indo-1 as a function of the concentration of Indo-1

BSA concentration was 2.0 $\mu\text{mol/L}$. Indo-1 concentration increased from 0 to 6.0 $\mu\text{mol/L}$, respectively. The measurements were carried out at room temperature with an excitation at 284 nm. The solutions' acidity was pH = 7.4. The arrows indicate the changes of the signals as a function of Indo-1 concentration.

荧光光谱实验结果表明,无论 BSA 还是 Indo-1 的荧光都会因对方的存在而发生荧光猝灭.以 284 nm 为激发波长时,最大发射波长 342 nm 处的荧光强度随 Indo-1 浓度的增加而降低,同时在 454 nm 处有一新的荧光峰出现,其峰强随着 Indo-1 浓度的增加而增大(图 2).实验中观察到的等发射点(图 2 中所有荧光谱线的共同交点位于约 388 nm 处)表明,该光谱是由两种组分的光谱线性加和而成的,并在二者间存在一平衡关系^[20].此外,以 335 nm 为激发波长测量了 Indo-1 的荧光光谱和 BSA 量的变化关系.结果表明,随着 BSA 量的增加,最大发射波长处的荧光强度随之降低.上述结果均表明,在 BSA 和 Indo-1 之间发生了相互作用.

此外,只有 BSA 和 Indo-1 共存时在 362 和 454 nm 波长处才会出现新的最大激发与发射,故该光谱峰系 BSA-Indo-1 复合体系所特有的.因此,研究酸度对二者相互作用的影响时,以 362 nm 为激发波长,考察该复合体系的荧光光谱随 pH 的变化.

2.2 pH 对 BSA 和 Indo-1 相互作用的影响

结果表明,当 pH 为 4.0 ~ 9.6 时,在上述光谱条件下,BSA 的荧光强度几乎为零,可忽略不计;而 BSA-Indo-1 体系的荧光强度远远大于 Indo-1 单独存在时的荧光强度,故此时测得的荧光强度可认为是 BSA-Indo-1 复合体系的荧光.此时 BSA-Indo-1 体系的最大发射波长位于 454 nm;Indo-1 的最大发射波长在 393 ~ 475 nm 间变动,这是因为 pK_a 接近 7^[21] 的 Indo-1 的质子化与去质子化形式具有不同的光谱性质,从而使其在不同的酸度呈现不同的光谱特征^[22].在 pH = 7.0 ~ 8.0 范围内,Indo-1 的最大发射波长位于 393 nm 左右,与 BSA-Indo-1 具有最大的发射波长差.综合考虑上述结果及生理 pH 值,故实验中选择 pH = 7.4 为溶液的酸度.

2.3 BSA 和 Indo-1 间的荧光猝灭方式

为研究 Indo-1 对 BSA 荧光的猝灭机制, 研究了不同温度下 BSA 的荧光强度随 Indo-1 浓度的变化情况. 通过 Stern-Volmer 方程^[23]

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 c_q \quad (1)$$

作图并进行线性拟合得图 3. 上式中 F_0 和 F 分别为无和有猝灭剂 (Indo-1) 存在时的荧光强度; k_q 为猝灭剂对生物大分子的荧光猝灭常数; τ_0 为无猝灭剂时荧光基团的荧光寿命; c_q 为猝灭剂的浓度. 对于生物大分子, τ_0 的平均值为 10^{-8} s 左右^[18]. 由图 3 中直线的斜率和 τ_0 的值可算出在温度为 275, 290.5 和 310 K 时的 k_q 值分别为 2.681×10^{13} , 2.892×10^{13} 和 3.169×10^{13} $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 结果表明, 温度升高使猝灭增强. 因所得 k_q 值远大于各种猝灭剂对生物大分子的最大扩散常数 2.0×10^{10} $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, 故 Indo-1 对 BSA 荧光的猝灭是因二者形成复合物而引起的静态猝灭^[12].

2.4 BSA 和 Indo-1 间相互作用力的类型

为研究二者相互作用力的类型, 将 Indo-1 对 BSA 荧光猝灭的实验数据代入修正的 Stern-Volmer 方程^[24]:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_A} + \frac{1}{f_A K_A c_q} \quad (2)$$

式中, K_A 为 Stern-Volmer 猝灭常数, f_A 为猝灭剂, 对初始荧光可接近百分数. 以 $F_0/(F_0 - F)$ 对 $1/c_q$ 作图, 根据所得的直线斜率 $(f_A K_A)^{-1}$ 和截距 $(f_A)^{-1}$ 求出 K_A 的值 (表 1). 由于 K_A 具有较大的数值, 故 BSA 和 Indo-1 间存在较强的相互作用. 此外, K_A 还随温度的升高而增大.

Table 1 Thermodynamic parameters on the interaction between BSA and Indo-1

Temperature/K	$K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G^0/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta H^0/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S^0/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$
275.0	9.89×10^5	-31.6		
290.5	1.17×10^6	-33.7	6.96	140
310.0	1.40×10^6	-36.5		

用与文献[25]相似的方法计算出相关的热力学参数. 因焓变 (ΔH^0) 基本上与温度变化无关, 故焓变 (ΔS^0) 和吉布斯自由能变 (ΔG^0) 可由下列关系式求得:

$$\ln K_A = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R \quad (3)$$

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (4)$$

式(3)中, K_A 具有与之在式(2)中相同的意义; R 为气体常数. 所求得的热力学参数 ΔG^0 , ΔH^0 和 ΔS^0 的值见表 1. $\Delta G^0 < 0$ 表明 BSA 和 Indo-1 的相互作用为一自发过程; $\Delta H^0 > 0$ 和 $\Delta S^0 > 0$ 表明二者是通过疏水性相互作用的, 且不排除质子化作用的存在^[26]. 由上述热力学参数值可知, 自由能变 (ΔG^0) 主要受熵变 (ΔS^0) 控制, 表明疏水性作用在该过程中占主导地位^[26]. 在 BSA 内有 3 个相似的结构域 Site I, Site II 和 Site III, 而每个结构域均由两个相似的亚结构域组成一个桶状结构^[27]. 几乎所有的疏水性氨基酸都位于这些结构域内并形成疏水性空腔^[12]. 由此推知, Indo-1 与 BSA 是通过疏水性相互作用并进入到 BSA 的疏水性空腔. 当然, 这也不排除质子化作用的存在.

此外, $\Delta H^0 > 0$ 表示 BSA 和 Indo-1 的相互作用为一吸热过程, 即温度升高会促进二者的相互作用, 从荧光猝灭的角度来说, 温度升高使猝灭增强. 这一结论与图 3 中所示结果相一致, 即随着温度的升高猝灭常数增大, 荧光猝灭的程度加剧. 虽然依据温度与静态猝灭的关系来看, 应该是温度升高使猝

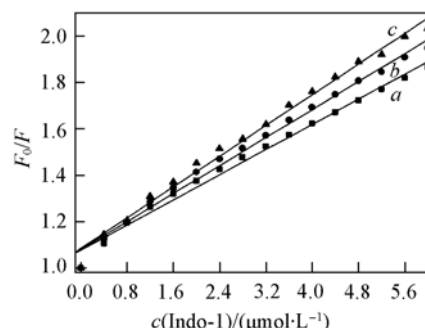


Fig. 3 Stern-Volmer plots at different temperatures

The BSA concentration is $2.00 \mu\text{mol/L}$; the concentrations of Indo-1 were increased from 0 to $6.00 \mu\text{mol/L}$. The measurements were carried out at temperature 275 (a), 290.5 (b) and 310 K (c) with an excitation at 284 nm, emission at 342 nm.

The solutions pH value is 7.4.

灭减弱,但这只是针对那些具有较弱键合力的猝灭剂与荧光物质而言的^[28]. 由于 k_q 与 K_A 均有较大的数值,故BSA和Indo-1间存在较强的荧光猝灭和相互作用,则二者间的键合力也较强.

2.5 Indo-1在BSA中的作用位点数

用BSA对Indo-1荧光猝灭的实验数据来研究二者间的作用位点数,建立了一个用荧光光谱法计算蛋白质与配体间作用位点数的新方法,其推导过程如下:

令 $[L]$ 为未与BSA结合的Indo-1浓度; $[L']$ 为与BSA结合的Indo-1浓度; c_L ($c_L = [L] + [L']$)为所有Indo-1总浓度; $[P]$ 为未与Indo-1结合的BSA浓度; c_p 为BSA的总浓度;则以335 nm为激发波长时,在393 nm处测得的荧光强度可表示为

$$F = k[L] + k'[L'] + k_p[P] \quad (5)$$

式中, k , k' 及 k_p 均为与各组分的荧光强度和被测物浓度有关的常数.在此实验条件下,Indo-1的浓度为定值,BSA的浓度为一个递增的变量,故加入的BSA几乎完全与Indo-1结合,所以此时的 $[P]$ 值非常小,并且在Indo-1的最大激发与最大发射波长处得到的 k_p 远远小于 k' 和 k ,故 $k_p[P]$ 可以忽略不计,故式(5)可改写为

$$F = k[L] + k'[L'] \quad (6)$$

将 $[L] = c_L - [L']$ 代入式(6)可得

$$F = k'[L'] + k\{c_L - [L']\} \quad (7)$$

令 $\Delta k = k - k'$ 及 $F_0 = kc_L$, F_0 为BSA不存在时测得的荧光强度, Δk 在选定实验条件下为定值,则式(7)可变形为

$$[L'] = (F_0 - F)/\Delta k \quad (8)$$

BSA和Indo-1反应体系的平衡常数可表示为

$$K = [L']/[L][P] \quad (9)$$

由于Indo-1是过量的,故体系中 $[P]$ 值极小,令 $k_{cp} = [P]/c_p$,则 $[P] = k_{cp}c_p$,代入式(9)并变形得

$$Kk_{cp} = [L']/[L]c_p \quad (10)$$

令

$$K_c = Kk_{cp} = [L']/[L]c_p \quad (11)$$

将 $[L] = c_L - [L']$ 和式(8)代入式(11)得

$$K_c = \frac{(F_0 - F)/\Delta k}{c_L c_p - c_p(F_0 - F)/\Delta k} \quad (12)$$

表2中的结果表明,在给定条件下 K_c 为一常数.

Table 2 The data used for calculating the value of K_c [$\Delta k = 4.57 \times 10^{11}$ counts/(s · mol⁻¹ · L) was calculated based on c_L and the intercept in Fig. 4]

c_p /(mol · L ⁻¹)	F /(counts · s ⁻¹)	$(F_0 - F)/\Delta k$	$[c_L c_p - c_p(F_0 - F)]/\Delta k$	$\lg K_c$
0	8.82×10^5	0	0	—
2.0×10^{-7}	6.64×10^5	4.78×10^{-7}	3.04×10^{-13}	6.20
4.0×10^{-7}	5.10×10^5	8.13×10^{-7}	4.75×10^{-13}	6.23
6.0×10^{-7}	4.25×10^5	1.00×10^{-6}	6.00×10^{-13}	6.22
8.0×10^{-7}	3.43×10^5	1.18×10^{-6}	6.57×10^{-13}	6.25
1.0×10^{-6}	2.86×10^5	1.30×10^{-6}	6.96×10^{-13}	6.27
1.2×10^{-6}	2.74×10^5	1.33×10^{-6}	8.04×10^{-13}	6.22
1.4×10^{-6}	2.51×10^5	1.38×10^{-6}	8.67×10^{-13}	6.20
1.6×10^{-6}	2.01×10^5	1.49×10^{-6}	8.16×10^{-13}	6.26
1.8×10^{-6}	1.93×10^5	1.51×10^{-6}	8.85×10^{-13}	6.23
2.0×10^{-6}	1.69×10^5	1.56×10^{-6}	8.81×10^{-13}	6.25

将式(12)变形为

$$(F_0 - F)/\Delta k = K_c c_L c_p - K_c c_p (F_0 - F)/\Delta k \quad (13)$$

将式(13)两边同除以 $(F_0 - F)K_c c_L - c_p$ 得

$$(F_0 - F)^{-1} = (\Delta k c_L)^{-1} + (\Delta k K_c c_L)^{-1} c_p^{-1} \quad (14)$$

蛋白质分子中能与配体作用的平均位点数可表示为

$$\bar{N} = [L'] / c_p \quad (15)$$

将式(8)代入式(15)得

$$(F_0 - F) = \bar{N} \Delta k c_p \quad (16)$$

再将式(16)代入式(13)得

$$\bar{N} = K_c c_L - K_c \bar{N} c_p \quad (17)$$

由上述内容可知, 在选定的实验条件下 K_c 及 c_L 均为定值. 因此, 式(17)的最大值也就是最大结合位点数 $N = K_c c_L$, 即每个蛋白质分子中所含有的能与配体作用的位点数. 将 $N = K_c c_L$ 代入式(14)得

$$(F_0 - F)^{-1} = (\Delta k c_L)^{-1} + (\Delta k N)^{-1} c_p^{-1} \quad (18)$$

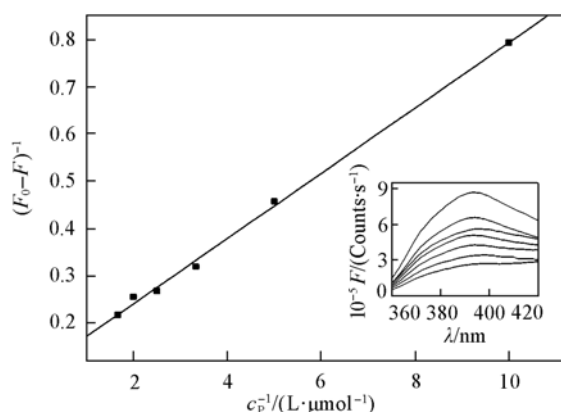


Fig. 4 Plot of $(F_0 - F)^{-1}$ versus c_{p-1} at room temperature

The concentration of Indo-1 was 2.00 $\mu\text{mol/L}$ and the concentration of BSA increased from 0 to 0.60 $\mu\text{mol/L}$. The fluorescence intensity at 393 nm was measured with an excitation at 335 nm and pH = 7.4. As quenched by BSA, the emission spectra of Indo-1 were presented as insert.

推导出结合位点数 $N = c_{L, \max} / c_p$. 但实验数据点 $c_{L, \max}$ (当 BSA 中的全部作用位点刚好都与 Indo-1 结合时所需 Indo-1 的浓度) 的选择将会给计算结果带来较大的误差. 因此, 建议在用此方法研究蛋白质和配体的结合位点数时, 以配体浓度 c_L 为定值.

国内外学者已建立了一些计算蛋白质和配体间作用位点数的方法, 但它们在实际应用中有诸多限制, 如作为计算生物大分子与小分子配体之间结合位点数的经典方法之一的 Scatchard 作图法^[10, 11], 只有在游离配体浓度已知时才适用, 而这却是荧光光谱法所难以实现的; 也有根据蛋白质的荧光强度和配体浓度间的关系来计算二者作用位点数的方法^[12~14], 但其应用的前提是蛋白质内的作用位点必须相互等同且独立. 本文提出的计算蛋白质和配体作用位点数的方法不受上述条件的限制, 无论蛋白质和配体都有荧光, 还是其中之一有荧光, 都可以用它计算蛋白质和配体之间的结合位点数. 尽管本文建立的方法与文献[29]的有些相似, 但基本原理不同, 并有自己的优点, 如该方法是基于荧光光谱法建立的, 与吸收光谱相比, 它具有更高的灵敏度. 在荧光分析中, 还可通过改变激发和发射波长来避免干扰, 而吸收光谱却无法做到这一点. 此外, 该方法的数据处理相对比较简单^[30, 31], 因此, 它具有更为广泛的应用前景.

2.6 BSA 和 Indo-1 间的荧光共振能量转移 (FRET)

FRET 是指激发态能量从激发态的给体 (D) 转移到受体 (A). 给体与受体间的距离可根据 Förster 无辐射能量转移理论^[32] 求算:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (20)$$

式中, F_D 和 F_{DA} 分别为当受体不存在和存在时测得的荧光强度; E 为能量转移效率; r 为能量给体与受

因为在选定实验条件下 N , Δk 和 c_L 均为定值, 故以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 c_p^{-1} 作图可得一条直线. 图 4 中的结果表明, $(F_0 - F)^{-1}$ 和 c_p^{-1} 间有较好的线性关系. 图 4 中的插图为 BSA 对 Indo-1 荧光猝灭过程的光谱图. 分别以 10^5 counts/s 和 $\mu\text{mol/L}$ 为荧光强度和浓度单位, 可得与式(18)相符的线性回归方程:

$$(F_0 - F)^{-1} = 0.10943 + 0.06841 c_p^{-1} \quad (19)$$

其相关系数为 $\gamma = 0.9980$. 由线性回归方程的斜率 $(\Delta k N)^{-1}$ 、截距 $(\Delta k c_L)^{-1}$ 和 c_L 的大小可求出 $N = 3.07$, 即 Indo-1 在 BSA 中有 3 个作用位点, 与血清白蛋白中有 3 个结构域^[27] 的结论相一致. 结果表明, 这一计算蛋白质与配体间作用位点数的方法是可靠的.

若以 c_p 为定值时, 用类似的方法也可

体间的距离; R_0 为与 $E = 50\%$ 相对应的给体与受体间的距离:

$$R_0 = 0.211 [k^2 n^{-4} \Phi J \lambda]^{1/6} \quad (21)$$

在上式中, Φ 为受体不存在时给体的量子产率; n 为介质的折射率; k^2 为给体-受体偶极子间能量传递的空间取向因子, 通常其取值为 $2/3$; 重叠积分 $J(\lambda)$ 表示给体的发射光谱与受体的吸收光谱间的重叠程度:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda} \quad (22)$$

式中, $F_D(\lambda)$ 指给体在波长范围 λ 至 $\lambda + \Delta\lambda$ 内的荧光强度值; $\varepsilon_A(\lambda)$ 为受体在波长 λ 处的摩尔消光系数, 其单位通常为 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$. 根据上述关系可求出 $J(\lambda)$, R_0 和 E 的值, 进而求出 r 值.

图 5 示出了 BSA 的发射光谱与 Indo-1 的吸收光谱的重叠情况. 根据实验结果求得的重叠积分面积为 $9.59 \times 10^{13} L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1} \cdot nm^4$. 此外, Φ , n 和 k^2 分别取值为 0.118 , 1.336 和 $2/3$ ^[26]. 由此可依据式(20)算出 R_0 的值为 2.44 nm. 此外, 由实验数据可算出当 Indo-1 和 BSA 的摩尔比分别为 $1:1$, $2:1$ 和 $3:1$ 时的能量转移效率为 $E_1 = 0.249$, $E_2 = 0.425$ 和 $E_3 = 0.523$. 用与文献[12]相似的处理方法, 依据上述关系可求出 BSA 的 212 位色氨酸 Trp212 (给体) 与其 3 个结合位点上 Indo-1 (受体) 间的距离分别为 $r_1 = 2.93$, $r_2 = 2.57$ 和 $r_3 = 2.40$ nm. 对于荧光共振能量转移来说, 激发态的给体与受体间的有效距离通常为 $2 \sim 7$ nm^[33]. 结果表明, 所求得的 r 值均在能量转移的有效距离范围之内. 因此, 在 BSA 和 Indo-1 之间发生了荧光共振能量转移.

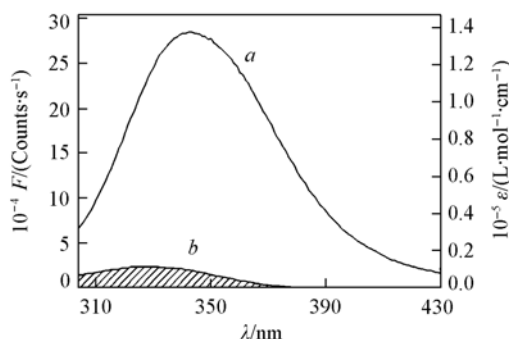


Fig. 5 Fluorescence spectrum of BSA(a) and the absorption spectrum of Indo-1(b) at room temperature

Both the concentrations of BSA and Indo-1 are $2 \mu mol/L$. All the measurements were carried out with solution pH = 7.4. The emission spectrum was excited at 284 nm.

参 考 文 献

- [1] Lakowicz J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition[M], New York: Kuwer Academic/Plenum Publisher, 1999: 1—248
- [2] Romer J., Bichkel M. H. J. Pharm. Pharmacol. [J], 1979, **31**: 7—11
- [3] Bhattacharyya M., Chaudhuri U., Poddar R. K. Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1990, **167**: 1146—1153
- [4] Zhao H., Su W., Luo Y. H., et al. Spectrochim. Acta, A[J], 2006, **65**: 846—851
- [5] Subbiah D., Ashok K. M. J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 2005, **38**: 556—563
- [6] Hirshfield K. M., Toptygin D., Grandhige G., et al. Biophys. Chem. [J], 1996, **62**: 25—38
- [7] Richieri G. V., Anel A., Kleinfeld A. M. Biochemistry [J], 1993, **32**: 7574—7580
- [8] Olson M. K., Hollingworth S., Baylor S. M. Biophys. J. [J], 1988, **54**: 1089—1104
- [9] Kurebayashi N., Harkins A. B., Baylor S. M. Biophys. J. [J], 1993, **64**: 1934—1960
- [10] Cantor C. R., Schimmel P. R. Biophysical Chemistry, Part III: The Behavior of Biological Macromolecules[M], San Francisco: Freeman, 1980: 849—886
- [11] Martin A., Bustamante P., Chun A. H. C. Protein Binding, Physical Pharmacy[M], London: Lea and Febiger, 1993: 268—270
- [12] YI Ping-Gui(易平贵), SHANG Zhi-Cai(商志才), YU Qing-Sen(俞庆森), et al. Acta Chim. Sinica(化学学报) [J], 2000, **58**(12): 1649—1653
- [13] ZHANG Yong(张勇), ZHANG Gui-Zhu(张贵珠), WANG Yue-Mei(王月梅). Chinese J. Anal. Sci. (分析科学) [J], 2000, **16**(6): 445—449
- [14] YANG Man-Man(杨曼曼), YANG Pin(杨频), ZHANG Li-Wei(张立伟). Chinese Sci. Bull. (科学通报) [J], 1994, **39**(1): 31—35
- [15] Vallner J. J. J. Pharm. Sci. [J], 1997, **66**: 447—465

- [16] Carter D. C. , Ho J. X. . Adv. Protein Chem. [J], 1994, **45**: 153—203
- [17] Ikenouchi H. , Peeters G. A. , Barry W. H. . Cell Calcium[J], 1991, **12**: 415—422
- [18] Owen C. S. , Shuler R. L. . Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 1989, **163**: 328—333
- [19] Bancel F. , Salmon J. M. , Vigo J. , *et al.* . Cell Calcium[J], 1992, **13**: 59—68
- [20] Gryniewicz G. , Poenie M. , Tsien R. Y. . J. Biol. Chem. [J], 1985, **260**(6): 3440—3450
- [21] Ribou A. C. , Vigo J. , Viallet P. , *et al.* . Biophys. Chem. [J], 1999, **81**: 179—189
- [22] Morelle B. , Salmon J. M. , Vigo J. , *et al.* . Anal. Biochem. [J], 1994, **218**: 170—176
- [23] Lakowicz J. R. . Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition[M], New York: Kuwer Academic/Plenum Publisher, 1999: 239
- [24] Lakowicz J. R. . Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition[M], New York: Kuwer Academic/Plenum Publisher, 1999: 248
- [25] Tian J. , Liu J. , Tian X. , *et al.* . J. Mol. Struct. [J], 2004, **691**: 197—202
- [26] Philip D. , Ross Sabramarian S. . Biochemistry[J], 1981, **20**: 3096—3102
- [27] Krang-Hansen U. . Pharmacol. Rev. [J], 1981, **33**(1): 17—53
- [29] Wei Y. J. , Li K. A. , Tong S. Y. . Talanta[J], 1996, **43**: 1—10
- [28] Lakowicz J. R. . Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition[M], New York: Kuwer Academic/Plenum Publisher, 1999: 240
- [30] YANG Bin-Sheng(杨斌盛). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 1998, **19**(7): 1057—1061
- [31] CHI Yan-Hua(迟燕华), ZHUANG Jia(庄稼), LI Na(李娜), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 1999, **20**(11): 1697—1702
- [32] Förster T. . Modern Quantum Chemistry, Vol. 3[M], New York: Academic Press, 1996: 93
- [33] Majoul I. , Straub M. , Duden R. , *et al.* . Rev. Mol. Biotech. [J], 2002, **82**: 267—277

Studies on Interaction of Bovine Serum Albumin with Indo-1 by Fluorescence Spectroscopic Method

BAI Hai-Xin^{1,2}, YANG Cheng¹, YANG Xiu-Rong^{1*}

- (1. State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry,
Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China;
2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The binding-site number was calculated by using fluorescence spectroscopic method with bovine serum albumin(BSA) and Indo-1 as protein and ligand models, respectively. The method for calculating binding-site number in BSA for Indo-1 was developed based on the relationships between the changes of Indo-1 fluorescence intensity and the analytical concentration of BSA. And the interaction of BSA with Indo-1 was investigated comprehensively by using fluorescence techniques as well as fluorescence resonance energy transfer, and the thermodynamic parameters were calculated according to the changes of enthalpy on temperature. Three binding sites in BSA for Indo-1 were revealed, and the distances from Trp212 in BSA to the three binding sites were 2.93, 2.57 and 2.40 nm, respectively. It was also proved that Indo-1 embedded into the three hydrophobic cavities of BSA by hydrophobic association. This paper provided a use for reference on calculating the binding-site number in protein for ligand and studying their interactions by fluorescence spectroscopic methods. In fluorescent quenching experiments, fluorescence changes were automatically recorded in real time by combining Microlab 500 Series Dispenser and PTI fluorescence apparatus.

Keywords Bovine serum albumin; Fluorescence probe Indo-1; Binding-site number; Interaction; Fluorescence spectroscopic method

(Ed. : A, G)