

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¹, 谢泽钰¹, 梅平¹, 刘义²

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} , ΔH^θ , ΔG^θ 和 ΔS^θ 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^[1]。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 °C 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 °C 的 BSA 的荧光光谱和在 NGB 作用下 BSA 的荧光猝灭光谱见图 1。

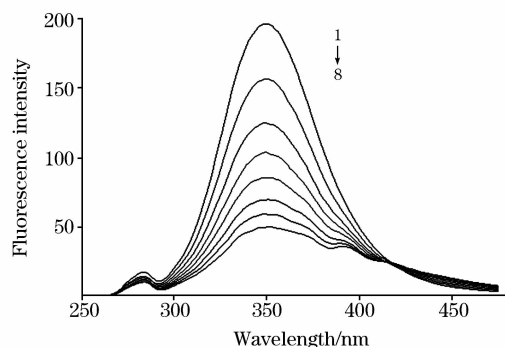


Fig. 1 Fluorescence quenching spectra of BSA with NGB as quencher added

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

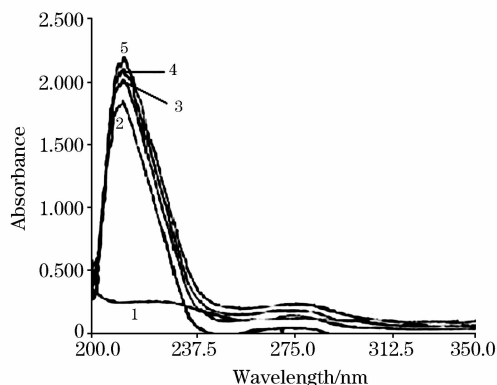


Fig. 2 UV absorbance spectra of NGB(1), BSA(2) and BSA-NGB(3~5)

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 $I_F^0/I_F = 1 + K_{\text{SV}}c_q = 1 + K_q\tau_0 c_{\text{NGB}}$)和 Lineweaver-Burk 双倒数方程(即 $(I_F^0 - I_F)^{-1} = (I_F^0)^{-1} + K_{\text{LB}}^{-1}(I_F^0)^{-1} c_{\text{NGB}}$)进行描述。其中 K_{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_{LB} 为静态荧光猝灭常数。在温度分别为 22, 28, 34, 40, 46 °C 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_{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 ΔH^θ 可看成常量, 由热力学公式可求得相关热力学参数^[2-7](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 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$, 但表 2 中 K_q 值大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$; 相互作用的吉布斯自由能小于零, 相互作用常量 K_{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); $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 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^[8], 按照实验方法分别得到 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 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

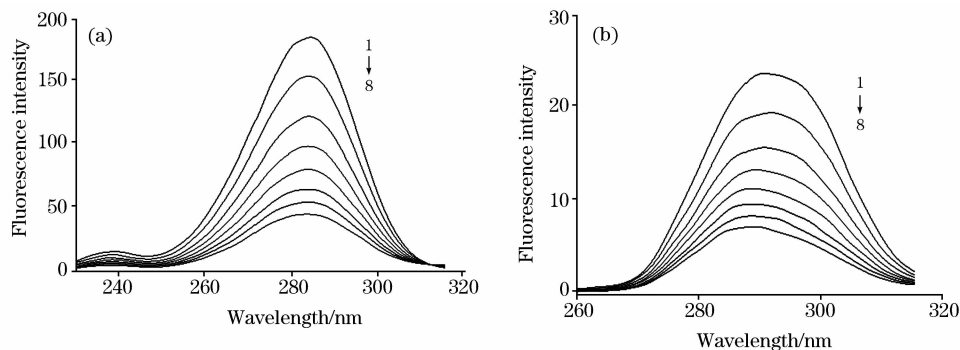
Curve	$t/^\circ\text{C}$	Regression equations	Correlation coefficient
Stern-Volmer equations	22	$I_F^0/I_F = 0.5869 + 4.074 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9869
	28	$I_F^0/I_F = 0.6598 + 3.934 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9923
	34	$I_F^0/I_F = 0.6473 + 3.813 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	0.9918
	40	$I_F^0/I_F = 0.7058 + 3.817 \times 10^5 c_{\text{NGB}}$	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^[9] 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 ΔH 和 ΔS 增大, 氢键力或 Vander Waals 力有可能使体系的 ΔH 和 ΔS 减小, 静电作用力使 $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$ 。由表 2 所列数据可以

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

$t/^\circ\text{C}$	$K_{\text{SV}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_{\text{q}}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{\text{LB}}/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S^\theta/(\text{J} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G^\theta/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
22	6.941×10^5	6.941×10^{13}	1.582×10^5		80.19	-29.36
28	5.962×10^5	5.962×10^{13}	1.502×10^5		80.14	-29.83
34	5.890×10^5	5.890×10^{13}	1.341×10^5	-5.707	79.57	-30.13
40	5.407×10^5	5.407×10^{13}	1.268×10^5		79.46	-30.58
46	5.597×10^5	5.597×10^{13}	1.364×10^5		80.41	-31.36
Average	5.959×10^5	5.959×10^{13}	1.411×10^5	-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/ $\times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 0, 3.000, 6.000, 8.999, 12.00, 15.00, 18.00, 21.00;
 $c_{\text{BSA}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{NaCl}} = 0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

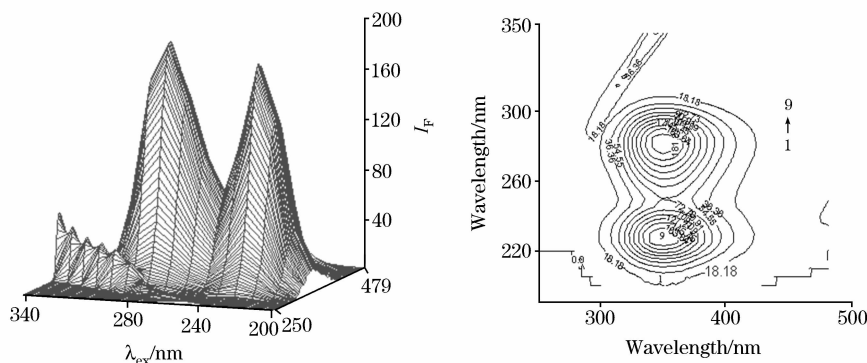
认为, NGB 与 BSA 之间的作用力可能主要是静电作用力。

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 $\lg[(I_F/I_F^0)^{-1}] = \lg K + n \lg c_{\text{NGB}}$ 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 Trp 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 $2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 BSA-NGB (浓度分别为 2.0×10^{-5} 和 $2.1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 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^[10]。

**Fig. 4** Three-dimensional fluorescence spectra and contour spectra of BSA

$c_{\text{BSA}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

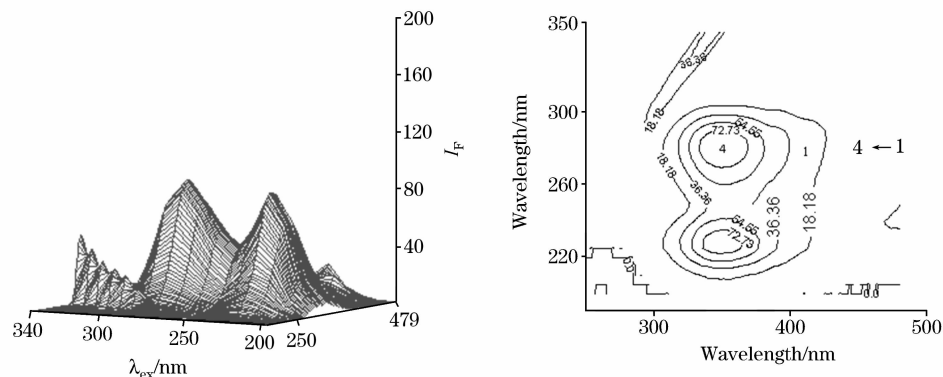


Fig. 5 Three-dimensional fluorescence spectra and contour spectra of BSA in presence of NGB

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

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, TONG Jin-qiang, et al(颜承农, 上官云凤, 童金强, 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 Chimic 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-nong¹, XIE Ze-yu¹, MEI Ping¹, LIU Yi²

1. College of Chemistry and Enviornmental 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($\Delta H^\theta: -5.707 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\Delta G^\theta: -30.25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $\Delta S^\theta: 79.95 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) 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)