

文章编号:1004-4213(2011)07-1082-5

牛血清白蛋白与荧光增白剂相互作用的 荧光光谱法研究

潘可亮,李树伟

(四川师范大学 化学与材料科学学院,成都 610066)

摘 要:应用荧光光谱法研究了牛血清白蛋白与荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 的相互作用. 通过 Stern-Volmer 方程、Lineweaver-Burk 方程和双对数曲线进行计算,研究了 FWA 对 BSA 内源荧光的猝灭机制. FWA 对 BSA 内源荧光的猝灭主要为静态猝灭和荧光共振能量转移猝灭. 测定了荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 对 BSA 的猝灭常量和扩散常量(283 K),确定了荧光增白剂与 BSA 结合位点数均为 1. 根据 Förster 非辐射能量转移理论,计算了 BSA 与荧光增白剂分子间的结合距离和能量转移效率. 通过测定 283 K 和 298 K 时供体与受体分子间结合常量,计算了 BSA 与荧光增白剂作用的热力学参量. BSA 与 FWA 作用的 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$, 并以此确定了 BSA 与荧光增白剂分子主要通过静电力进行作用.

关键词:荧光增白剂;牛血清白蛋白;荧光猝灭;荧光共振能量转移;相互作用

中图分类号:O657. 3 O433

文献标识码:A

doi:10. 3788/gzxb20114007. 1082

0 引言

荧光增白剂(Fluorescent Whitening Agent, FWA)是一类通过吸收短波长紫外光,发射 400~500 nm 可见光的荧光染料,广泛用于造纸、印染、涂料、塑料和合成洗涤剂行业. FWA 能影响生物膜结构^[1]并具有致敏性,光致敏性,潜在的抑制凝血和伤口愈合作用及三致作用^[2]. 国家规定严禁在食品中添加 FWA,但近期在食品中非法添加的情况较多. 4, 4'-双(2-磺酸基苯乙烯基)-1, 1'-联苯(FWA CBS-X), 4, 4'-二[4-(2-羟乙基)氨基]-6-(4-磺酸基苯胺)-1, 3, 5-三嗪-2-氨基-二苯乙烯-2, 2'-二磺酸钠盐(FWA BBU)和 4, 4'-双-(4-羟乙胺基-2-苯胺基)-1, 3, 5-三嗪)氨基-二苯乙烯-2, 2'-二磺酸钠盐(FWA VBL)分别是合成洗涤剂, 印染和造纸中应用最多的三种. 也是人体最容易接触的三种 FWA. 其分子毒理学方面的基础研究很少. 血清白蛋白是动物血清中含量最丰富的一种蛋白质,测定血清白蛋白的变化,可为毒理和药理学研究提供有价值的资料及数据. 牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)与人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)的分子量相近,氨基酸序列高度相似,价廉易得^[3-5],且含有两个色氨

酸残基,使之带有内源荧光^[6],不需使用荧光探针标记即可直接通过荧光共振能量转移(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)法或同步荧光法测定其构象变化^[7-9]. 因此,实验选择研究 BSA 与 FWA 的相互作用,模拟 FWA 分子在人体内的分子毒理学特性.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-380 型荧光分光光度计(天津港东), UV-4802 紫外可见分光光度计(尤尼柯), 电子天平(Sartorius, 0.1mg), PHS-4C⁺ 数显 pH 计(成都世纪方舟).

FWA VBL、CBS-X、BBU: 均为山西青山化工产品($\geq 98\%$),用无水乙醇重结晶二次,用二次亚沸水配制成 1×10^{-3} mol/L 储备液. BSA: FluKa, BR, ($\geq 98\%$, 分子量 68 000),用 ctris = 0.05 mol/L, pH = 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制成 4×10^{-5} mol/L 储备液. 硫酸奎宁: AR, 成都科龙,用 0.05 mol/L H₂SO₄ 配制成 1×10^{-4} mol/L 储备液. L-色氨酸: BR, 成都科龙,用 ctris = 0.05 mol/L, pH = 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液配制成 1×10^{-3} mol/L 储备液. 使用时适当稀释. 实验所用其

基金项目:国家自然科学基金(No. 20975029)资助

第一作者:潘可亮(1985-),男,硕士研究生,主要研究方向为分子发光分析方面的研究. Email: aaapkl@gmail.com

导师(通讯作者):李树伟(1955-),男,教授,主要研究方向为分子光谱方面的研究. Email: lsw0525@sohu.com

收稿日期:2010-12-06; **修回日期:**2011-03-21

它药品均为分析纯,所用缓冲溶液依照实验手册配制.实验用水为二次亚沸水.

1.2 实验方法

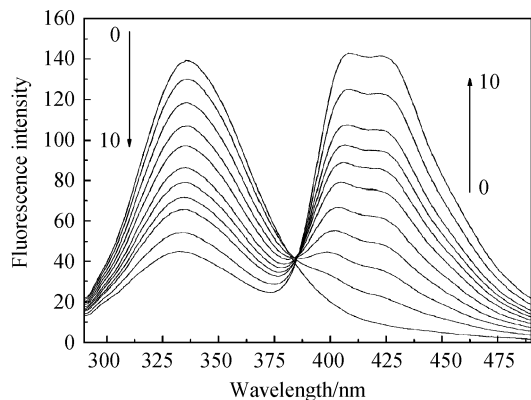
准确移取 2.00 mL 1×10^{-6} mol/L 的 BSA 溶液于 10 mm 石英比色皿中,用微量注射器吸取浓度均为 1×10^{-4} mol/L 的荧光增白剂水溶液进行荧光滴定.每次加入 1 μ L.加入荧光增白剂后混合均匀,避光静置 10 min,以 280 nm 为激发波长,扫描 290~490 nm 范围内的荧光光谱.由于加入的液体体积远小于原溶液体积,文中所涉及及计算均忽略体积变化.

以 0.05 mol/L H_2SO_4 介质中硫酸奎宁荧光量子产率 0.55 为参比,测定荧光增白剂 VBL、CBS-X、BBU 的荧光量子产率;以 L-色氨酸在 280 nm 波长激发时荧光量子产率 0.14 为参比,测定 BSA 的荧光量子产率^[10].

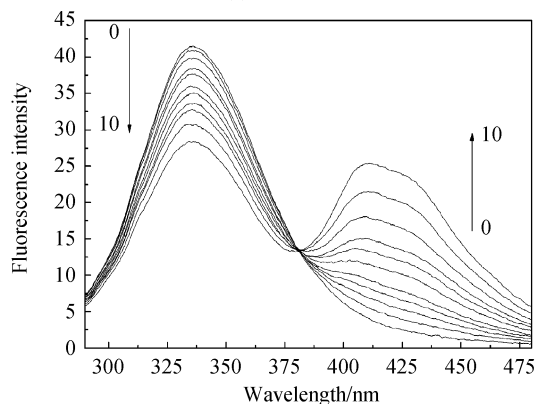
2 结果与讨论

2.1 荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 与 BSA 之间的能量转移研究

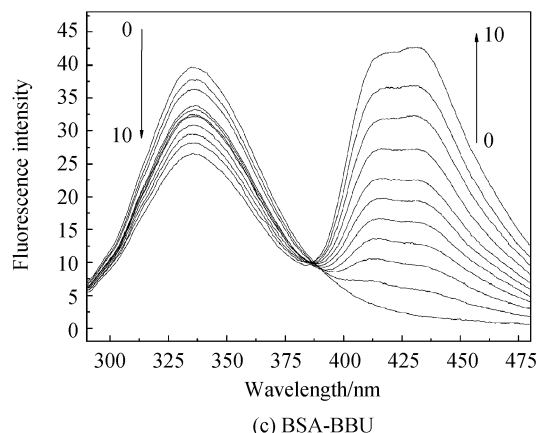
如图 1, $T = 283$ K, $c_{BSA} = 4 \times 10^{-6}$ mol/L, $c_{BBU} = (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0) \times 10^{-6}$ mol/L 时,荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 具有相似的激发和发射光谱,且激发



(a) BSA-CBS-X



(b) BSA-VBL



(c) BSA-BBU

图 1 BSA 与荧光增白剂 CBS-X、VBL 和 BBU 之间的能量转移光谱

Fig. 1 The fluorescence resonance energy transfer spectra of BSA-CBS-X, BSA-VBL and BSA-BBU

光谱均与 BSA 的发射光谱有较大程度的重叠,因此 BSA 分子与荧光增白剂分子间有明显的能量转移现象发生.

根据 Förster 理论,能量转移效率定义为

$$E = \frac{K_I}{\tau_B^{-1} + K_T} = 1 - \frac{I_{BF}}{I_B} = \frac{R_0^6}{r^6 + R_0^6}$$

式中 I_{BF} 、 I_B 分别为荧光增白剂存在和不存在时 BSA 的荧光强度; τ_B 为 BSA 的荧光寿命; r 为荧光增白剂分子与 BSA 分子之间的结合距离; R_0 为临界能量转移距离,介于 1~10 nm 之间,通常不超过 7 nm^[11],且 $R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} J \Phi$, N 为介质折射常量, Φ 为 BSA 的荧光量子产率, K 为取向因子,它和两个振子之间夹角有关,随机分布时 $K^2 = 2/3$, J 为光谱重叠积分,它与荧光增白剂的发射光谱及 BSA 的吸收(激发)光谱重叠程度有关可表示为

$$J = \frac{\int F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int F(\lambda) d\lambda}$$

取混合体系的平均折射率 $n = 1.366$ ^[12], BSA 中 Trp 残基的荧光量子产率以 L-Trp 作参比计算为 0.118,结果见表 1.

表 1 BSA 与荧光增白剂分子间能量转移

Table 1 The fluorescence resonance energy transfer between BSA and FWAs

	$\lambda_{ex}/$ nm	$\lambda_{em}/$ nm	Y_f	E	$10^{15} J/(cm^6 \cdot L \cdot mol^{-1})$	$R_0/$ nm	$r/$ nm
CBS-X	352	427	0.60	0.677	5.25	2.17	1.92
BBU	350	430	0.50	0.336	0.714	2.28	2.55
VBL	348	428	0.22	0.317	0.305	2.91	3.31

虽然三种荧光增白剂的最大激发发射波长极为接近,激发发射光谱形状相似,且荧光量子产率均较高;但在能量转移效率,临界能量转移距离和结合距离上差别很大,说明三者与 BSA 之间可能存在不同的作用方式.

2.2 荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 与 BSA 作用的荧光猝灭机理

荧光物质的动态猝灭符合 Stern-Volmer 方程： $F_0/F=1+Kq\tau_0[Q]=1+K_{SV}[Q]$ 。 F_0 和 F 分别为无猝灭剂和猝灭剂存在时，供体的荧光强度， $[Q]$ 为猝灭剂浓度， K_{SV} 为 Stern-Volmer 猝灭常量。 K_q 为生物大分子与荧光猝灭剂双分子扩散碰撞猝灭速率常量^[3]。 以 $[Q]$ 对 F_0/F 作图，如图 2。

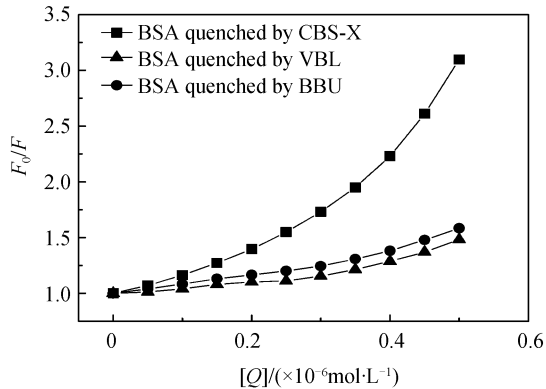


图 2 BSA 与 FWA 作用的 Stern-Volmer 曲线
Fig. 2 Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of BSA by FWAs

由图 2 可以看出，BSA 与荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 相互作用的 Stern-Volmer 曲线线性关系较差。 但与动态静态联合猝灭方程

$$\left(\frac{F_0}{F}-1\right)/[Q]=(K_{SV}+K)+K_{SV} * K[Q]$$

所描述的 Stern-Volmer 曲线随猝灭剂浓度增加而逐渐偏向 Y 轴相吻合(式中 K 为荧光体-猝灭剂配合物形成常量)。 可见 BSA 与荧光增白剂分子的动态猝灭程度较低。

按静态猝灭处理数据。 荧光物质的静态猝灭符合 Lineweaver-Burk 方程^[5]

$$(F_0-F)^{-1}=F_0^{-1}+K_{LB}^{-1}F_0^{-1}[Q]^{-1}$$

以 $1/[Q]$ ($\times 10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) 对 $(F_0-F)^{-1}$ 作图，Lineweaver-Burk 曲线如图 3，各猝灭过程的猝灭

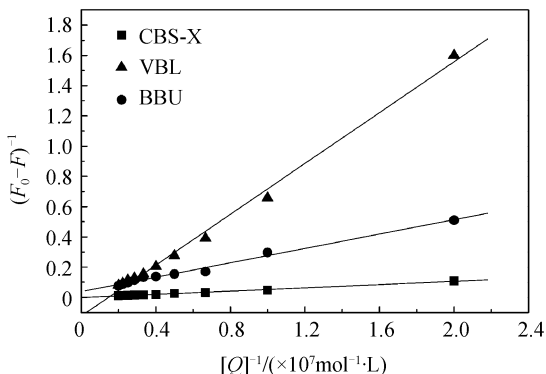


图 3 BSA 与 FWA 作用的 Lineweaver-Burk 曲线
Fig. 3 Lineweaver-Burk curves of fluorescence quenching of BSA by FWAs

表 2 荧光增白剂对 BSA 的猝灭常量

Table 2 The quenching constant of BSA by FWAs

	$K_{SV}/(\times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/(10^{13} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{LB}/(\times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$
CBS-X	39.13	29.58	47.37
BBU	9.485	9.498	8.565
VBL	8.253	8.276	7.493

常量如表 2。

荧光增白剂对 BSA 猝灭的 Lineweaver-Burk 曲线表现出良好的线性关系，且静态猝灭常量大于动态猝灭常量约一个数量级。 BSA 与荧光增白剂双分子扩散碰撞猝灭速率常量远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常量($2.0 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$)^[5]，图 1 中 BSA 与荧光增白剂的荧光光谱虽然在 380 nm 左右有等发射点出现，说明存在固定的结合方式，但在猝灭过程中供体和受体荧光发射波长与形状均未发生变化，说明 BSA 与荧光增白剂分子结合产生新的荧光物质的可能性小；BSA 的荧光猝灭主要包括静态猝灭和通过非辐射能量转移的形式转换为 FWAs 的荧光能量，即共振能量转移猝灭。

2.3 结合常量、结合数、热力学常量的计算及作用方式的判断

荧光强度，猝灭剂浓度，结合常量及结合数之间的关系可表示为： $\lg F/(F_0-F)=\lg l/K_a+n\lg(l/[Q])$ ，该式可转化为： $\lg(F_0-F)/F=\lg K_a+n\lg[Q]$ 。 K_a 为平衡常量， $[Q]$ 为猝灭剂浓度， n 为结合数。 以 $\lg[Q]$ 对 $\lg(F_0-F)/F$ 作图^[5]，如图 4。

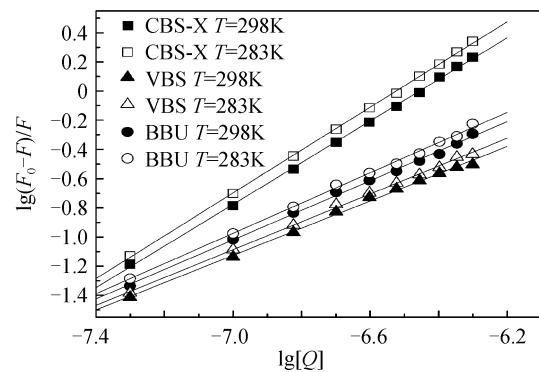


图 4 FWA 浓度与 BSA 荧光强度的双对数曲线
Fig. 4 The double logarithmic curves of fluorescence intensity of BSA with the concentrations of FWAs

BSA 与荧光增白剂分子作用的双倒数曲线表现出良好的线性关系，由曲线斜率可得 BSA 与荧光增白剂分子结合数；由曲线截距可得 BSA 与荧光增白剂分子相互作用的结合常量^[6]。 根据得到的不同温度下的结合常量及以下各式可得 BSA 与荧光增白剂分子作用的热力学参量；BSA 与荧光增白剂分子的作用方式有以下判断依据：

当 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为疏水作用力; 当 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时, 主要作用力为氢键和范德华力; 当 $\Delta H < 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为静电引力. 各热力学参量可由 $\ln(K_{a_2}/K_{a_1}) = (1/T_1 - 1/T_2)(\Delta H/R)$, $\Delta G = -RT \ln K_a$, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ^[6] 求得, 数据见表 3.

表 3 BSA 与荧光增白剂分子作用的结合常量、结合位点数及热力学参量

Table 3 The binding constants and the thermodynamic parameters of BSA with FWAs

	T/K	$K_B/$ (L · mol ⁻¹)	n	$\Delta H/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G/(\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{K}^{-1})$
CBS-X	283	3.763×10^9	1.468	-38.76	-51.88	46.36
	298	1.639×10^9	1.427		-52.57	46.34
BBU	283	1.891×10^6	1.036	-21.87	-34.01	42.90
	298	1.183×10^6	1.013		-34.65	42.89
VBL	283	3.946×10^5	0.955	-20.30	-30.32	35.41
	293	2.553×10^5	0.933		-30.85	35.40

从结合数可以看出, 荧光增白剂分子与 BSA 分子的结合数均为 1, 荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 均与 BSA 有较大的结合常量. 三者均主要以静电力与 BSA 分子结合.

3 结论

从结合位点数可以看出, 荧光增白剂分子与 BSA 分子的结合位点数均为 1, 荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 均与 BSA 有较大的结合常量. 三者均主要以静电力与 BSA 分子结合. 而疏水力较弱, 可见磺酸基和羟基的作用较强. 由以上数据可以看出, 荧光增白剂 CBS-X、BBU、VBL 均与 BSA 分子有较弱的结合作用. 说明荧光增白剂在可能进入人体的各种小分子中较易与蛋白质结合^[13].

实验所得荧光量子产率、能量转移效率、光谱重叠积分、Stern-Volmer 猝灭常量、Lineweaver-Burk 猝灭常量、双分子扩散碰撞猝灭速率常量、结合常量和结合位点数等数据均为 CBS-X > BBU > VBL. 而临界能量转移距离和结合距离则相反. 可能是 CBS-X 分子中联苯结构以单键相连, 使 CBS-X 分子中的磺酸基具有更高的反应活性. 而以二苯乙烯为母体的 BBU 及 VBL 分子则不具有这一特性. 由于三者均未能与 BSA 分子共价结合, 说明荧光增白剂分子

在与蛋白质分子的作用中仍与其它小分子存在竞争关系. 不过, 虽然结合过程可逆, 但造成的蛋白质构象变化可能是不可逆的.

参考文献

- [1] SHIGEYUKI M, MADOKA N, SHOHEI O. Nucleopolyhedrovirus enhancement by a fluorescent brightener in *Mythimna separata* [J]. *Appl Entomol Zool*, 2003, **38**(1): 87-96.
- [2] GILLBERG B O. Petite mutants induced in yeast by optical brighteners [J]. *Mutat Res*, 1971, **13**: 149.
- [3] YAN J H, YI L, LI X Z, *et al.* Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2005, **750**: 174-178.
- [4] BROTTATI C, SAMITA B. Interaction of BSA with proflavin: A spectroscopic approach [J]. *Journal of Luminescence*, 2009, **129**: 34-39.
- [5] SUSANA S, NUNO M, VICTOR DE F. Interaction of different polyphenols with Bovine Serum Albumin (BSA) and Human Salivary α -Amylase (HSA) by fluorescence quenching [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, **55**: 6726-6735.
- [6] GELAMO E L, TABAK M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2000, **56**: 2255-2271.
- [7] YANG Yun, YANG Ai-ling. Synchronous fluorescence spectra of standard PAHs and their mixed solutions [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2010, **39**(11): 1976-1980.
杨云, 杨爱玲. 标准芳烃及其混合溶液的同步荧光光谱分析 [J]. *光子学报*, 2010, **39**(11): 1976-1980.
- [8] LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. 3rd ed. New York: Springer Science & Business Media, 2006: 443-445.
- [9] STRYER L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler [J]. *Annu Rev Biochem*, 1978, **47**: 819-846.
- [10] GRABOLLE M, SPIELES M, LESNYAK V, *et al.* Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots: suitable procedures and achievable uncertainties [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, **81**(15): 6285-6294.
- [11] WANG L X, CHEN T S, QU J L, *et al.* Photobleaching-based quantitative analysis of fluorescence resonance energy transfer inside single living Cell [J]. *Journal of Fluorescence*, 2010, **20**(1): 27-35.
- [12] DENISIO M, TOGASHI, ALAN G R. Assessing protein - surface interactions with a series of multi-labeled BSA using fluorescence lifetime microscopy and Förster Energy Resonance Transfer [J]. *Biophysical Chemistry*, 2010, **152**: 55-64.
- [13] YAN Jun-hua, HUA Guang-Yu, JIA Xin-dong, *et al.* Spectroscopic studies on the interaction between 3, 4, 5-trimethoxybenzoic acid and bovine serum albumin [J]. *Spectrochimica Acta Part A*, 2006, **65**: 988-992.

Interaction for Bovine Serum Albumin with Fluorescent Whitening Agent by Fluorescence Spectroscopy

PAN Ke-liang, LI Shu-kei

(College of Chemistry & Materials, Sichuan Normal University, Chengdu 610066, China)

Abstract: Interaction of bovine serum albumin(BSA) with fluorescent whitening agent(FWA) CBS-X, BBU and VBL were studied by fluorescence spectrometry. The quenching mechanism of intrinsic fluorescence of BSA with FWAs were studied by Stern-volmer curve, Lineweaver-Burk curve and double reciprocal curve. The experimental results show that static quenching and fluorescence resonance energy transfer quenching are the main factors of the quenching mechanism of intrinsic fluorescence. The quenching constants and diffusion constants between BSA and FWAs(283 K) were measured, and all of the numbers of binding sites are 1. Based on the theory of Förster energy transfer spectroscopy, the binding distance r and the energy transfer efficiency between BSA and FWAs were obtained. The thermodynamic parameters of binding reactions were determined by the binding constants in 283K and 298K. All of the reaction enthalpies and the entropy were decreased. According to these, the interaction between BSA and FWAs were driven mainly by electrostatic force.

Key words: Fluorescent Whitening Agent (FWA); Bovine Serum Albumin (BSA); Fluorescence quenching; Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET); Interaction