

碱性介质中茜素黄 R 与牛血清白蛋白作用的荧光法研究

张欢¹, 王兴明^{1*}, 王清成¹, 石荣铭¹, 丁立生²

1. 西南科技大学材料科学与工程学院化学系, 四川 绵阳 621010

2. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041

摘要 在碱性条件下, 采用荧光光谱法研究了茜素黄 R(alizarin yellow R, AYR)与牛血清白蛋白(BSA)结合反应的光谱特征。研究表明, pH 11.00, 激发波长为 393 nm 时, BSA 的发射峰位于 641 nm, 且 AYR 对 BSA 有较强的荧光猝灭作用, AYR 在 BSA 分子上荧光敏感部位有五个结合位点; 由温度对 AYR-BSA 体系荧光猝灭速率的影响和动态猝灭常数 K_{SV} 以及静态猝灭结合常数 K_{LB} 的计算得出, AYR 对 BSA 内源荧光的猝灭机制属于形成 BSA-AYR 复合物的静态猝灭, 荧光猝灭常数为 $1.6 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; 由反应前后热力学函数 $\Delta H^\theta < 0$, $\Delta S^\theta < 0$ 以及 AYR 对 BSA-CBBG(CBBG-考马斯亮蓝 G)体系具有荧光猝灭作用推出, 茜素黄 R 与牛血清白蛋白之间的作用力主要是氢键和范德华力。

主题词 茜素黄 R; 牛血清白蛋白; 荧光光谱

中图分类号: O675.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2006)08-1508-05

引言

蛋白质是由许多氨基酸聚合而成的生物大分子化合物, 是生命的最基本物质之一。蛋白质不仅对于维持生命是十分重要和必不可少的, 同时对生命遗传密码的翻译、信息的转录、DNA 等都有密切关系。许多有机小分子都能和蛋白质发生作用, 用小分子染料作为生物探针来了解和揭示生物大分子的结构和功能, 以及来阐明生物体内新陈代谢、药物分子与生物大分子之间的作用过程, 具有重要的理论价值和潜在的实用价值。生化工作者已经在近中性条件下, 对不少有机小分子与牛血清白蛋白的相互作用进行了研究, 获得有应用价值和理论价值的研究成果^[1-4]。本实验用荧光光谱法研究在较强碱性环境中茜素黄(AYR)与牛血清白蛋白(BSA)相互作用的光谱特征, 得出了 AYR 与 BSA 结合反应的结合常数、结合过程的热力学性质变化等参数, 并对 AYR 与 BSA 间的作用力进行了研究。

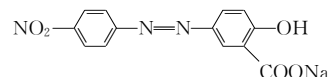
1 实验部分

1.1 仪器与试剂

RF-5301PC 荧光分光光度计(日本岛津公司), HA-

180M 电子分析天平(日本 AND 公司)。

茜素黄(AYR, 成都化学试剂厂, 分析纯)的结构式见 Scheme 1,



Scheme 1 Structure of AYR

B-R 缓冲溶液: 准确移取 2.71 mL 85% 的正磷酸, 2.36 mL 冰乙酸, 并称取 2.470g 硼酸, 用水定容至 1 000 mL, 用 $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 值。BSA 溶液: 准确称取 BSA (上海伯奥生物科技有限公司, 分析纯)0.1675 g 于 25 mL 容量瓶中, 以 B-R 缓冲溶液定容, 浓度为 $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。AYR 溶液: 准确称取 AYR0.0155 g 于 50 mL 容量瓶中, 以 B-R 缓冲溶液定容, 浓度为 $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在 10 mL 比色管中, 依次加入茜素黄 R 溶液和 $1.00 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛血清白蛋白溶液, 摇匀, 然后以 B-R 缓冲溶液定容, 摇匀。激发波长为 393 nm, 狭缝宽度为 5 nm, 用 RF-5301PC 荧光分光光度计在不同的实验条件下, 以缓冲液为参比, 进行荧光光谱测定。

收稿日期: 2005-11-01, 修订日期: 2006-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(40072020)和四川省教育厅自然科学基金重点项目(2000-A56)资助

作者简介: 张欢, 女, 1969 年生, 西南科技大学材料科学与工程学院化学系讲师 * 通讯联系人

2 结果与讨论

2.1 介质 pH 值及 AYR-BSA 体系的激发波长

分别用 pH 值为 10.50, 11.00, 11.50 的 B-R 缓冲溶液配制一定浓度的 BSA-AYR 溶液体系, 经测定 pH 值对 BSA-AYR 体系的发射光谱的影响如图 1。可见体系 pH 值的改变对其最大激发波长与荧光强度都有较大的影响。当 pH 值分别为 10.50, 11.00, 11.50 时, AYR-BSA 体系的最大激发波长分别为 377, 393 和 399 nm; pH 11.00 时, 体系的荧光强度最大。因此本实验中 AYR-BSA 体系的 pH 值选定为 11.00, 激发波长设定为 393 nm, 该条件下 BSA 的发射峰位于 641 nm。

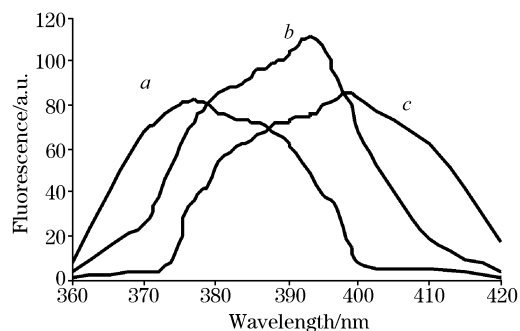


Fig. 1 The effect pH on fluorescence spectra of AYR-BSA ($\lambda_{\text{ex}} = 393 \text{ nm}$)

$c_{\text{BSA}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{AYR}} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$
a: pH 10.50; b: pH 11; c: pH 11.50

2.2 AYR 对 BSA 的荧光猝灭作用及结合位点数

固定 BSA 浓度, 逐步增加 AYR 浓度, 以 393 nm 为激发波长, 扫描 BSA-AYR 体系的荧光发射光谱, 见图 2。由图 2 可见, 随着 AYR 溶液浓度的升高, 641 nm 处 BSA 的荧光逐渐被猝灭。在激发波长为 393 nm 时, AYR 自身的荧光较弱, 实验表明由于 AYR 的存在, BSA 的荧光被减弱, 也就是说 BSA 与 AYR 之间发生了相互作用。

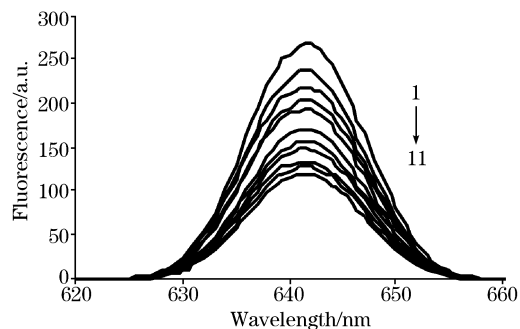


Fig. 2 The effect of AYR on fluorescence spectra of BSA ($\text{pH } 11.00$, $\lambda_{\text{ex}} = 393 \text{ nm}$)

$c_{\text{BSA}} = 0.667 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{\text{AYR}} (1 \sim 11) = 0 \sim 0.667 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

根据 AYR 对 BSA 荧光的猝灭作用, 利用摩尔比法可测定 AYR 在 BSA 分子上色氨酸残基所在区域的结合数, 见图 3。图 3 中曲线表明, 当 $c_{\text{AYR}}/c_{\text{BSA}} \leq 5$ 时, BSA 的荧光猝灭程度较大; 当 $c_{\text{AYR}}/c_{\text{BSA}} > 5$ 后, BSA 的荧光猝灭程度开始减小, 结合逐渐达到饱和, 表明 AYR 在 BSA 分子上荧光敏感部位有五个结合位点。

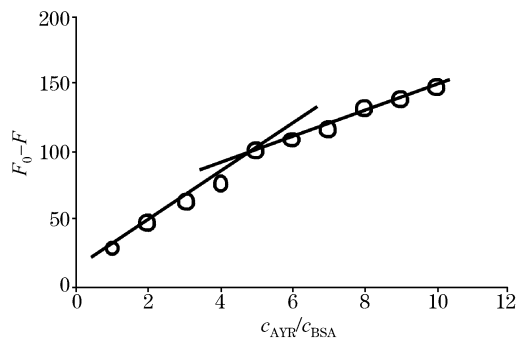


Fig. 3 The effect of AYR on fluorescence spectra of BSA ($\text{pH } 11.00$, $\lambda_{\text{ex}} = 393 \text{ nm}$)

$c_{\text{BSA}} = 0.667 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

2.3 AYR-BSA 体系荧光猝灭机理及猝灭常数

由 AYR 对 BSA 的荧光猝灭光谱图可知, AYR 与 BSA 之间发生了相互作用, 产生了能量转移。

荧光能量转移可分为辐射能量转移和非辐射能量转移。若发生辐射能量转移, 会导致荧光物质的荧光光谱畸变^[5]。图 2 中 BSA 的荧光光谱没有畸变, 因此 BSA 与 AYR 之间的能量转移应为非辐射能量转移。非辐射能量转移包括分子内能量转移和分子间能量转移。若 BSA 与 AYR 结合生成复合物, 则两者之间的能量转移为分子内能量转移, 即静态猝灭。静态猝灭是由于发生了配合作用而产生不发荧光的配合物, 并对蛋白质的二级结构可产生影响; 若 BSA 与 AYR 为分子间能量转移, 则为动态猝灭, 仅仅是一种能量转移或电子转移过程, 不影响蛋白质的结构。因此, 判断能量转移是发生在分子内还是分子间, 就是判断 BSA 与 AYR 之间是否结合生成了复合物。

体系荧光猝灭是动态猝灭作用还是静态猝灭作用, 有两种判定方法。一是温度变化法^[6], 对于碰撞猝灭来说温度效应始终是正值, 温度升高将增大扩散系数, 从而增大双分子猝灭常数; 但对于静态猝灭而言, 情况往往相反, 温度升高时, 以络合物形式存在的分子更少, 温度升高可能引起复合物的稳定性下降, 从而减小静态猝灭的程度; 二是可以分别用动态猝灭常数 K_{SV} (即 Stern-Volmer 猝灭常数) 和静态猝灭结合常数 (K_{LB}) 来描述荧光体分子与猝灭剂分子之间相互作用的程度和作用机制^[5, 7]。

2.3.1 温度对 AYR-BSA 体系荧光猝灭的影响

根据 Stern-Volmer 方程, 作不同温度时的 $(F_0/F) \sim c_{\text{AYR}}$ 回归直线, 根据直线斜率随温度的变化, 可以判断荧光猝灭的机理。如果温度升高, 直线斜率增大, 则为动态猝灭; 反之, 则为静态猝灭。图 4 为 BSA-AYR 体系在不同温度时的 Stern-Volmer 图。由图 4 进行定性判断, 由于随温度升高,

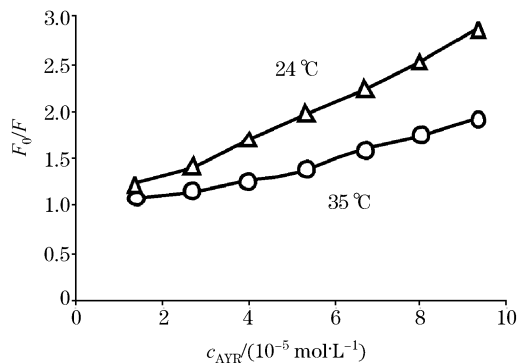


Fig. 4 Stern-volmer plots of AYR vs BSA

(pH 11.00, $\lambda_{ex} = 393$ nm)

$c_{BSA} = 2 \times 10^{-5}$ mol \cdot L $^{-1}$

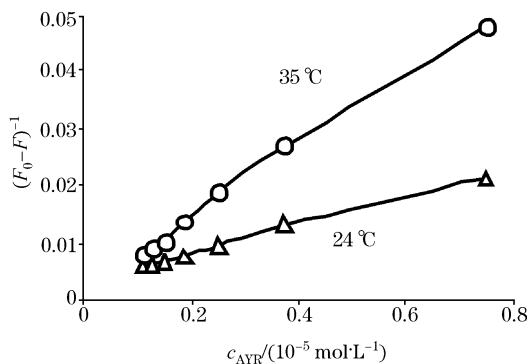


Fig. 5 Double-reciprocal curves of AYR vs BSA

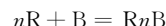
(pH 11.00, $\lambda_{ex} = 393$ nm)

$c_{BSA} = 2 \times 10^{-5}$ mol \cdot L $^{-1}$

直线斜率减小,表明猝灭过程应为生成 BSA-AYR 复合物的静态猝灭。

2.3.2 动态猝灭常数 K_{SV} 和静态猝灭结合常数 K_{LB}

设生物大分子与有机小分子成键时有 n 个等同的独立的结合部位,且已结合的有机小分子之间无相互作用,当生物大分子(B)与荧光猝灭剂(R)相互作用时,则发生下述反应



若 F_0 , F 分别表示无猝灭剂存在和有猝灭剂存在时体系的荧光强度, $[R]$ 为荧光猝灭剂浓度,当生成物不发荧光时,由文献[8, 9]得 Stern-Volmer 关系式为

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[R] = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [R] \quad (1)$$

其中, K_{SV} 为动态猝灭常数,单位是 $L \cdot mol^{-1}$,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平衡时的量效关系。 K_q ($K_q = K_{SV} \tau_0^{-1}$) 称为动态荧光猝灭速率常数,单位是 $L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$,描述生物大分子与荧光猝灭剂分子的扩散和碰撞对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响。 τ_0 为无猝灭剂存在时荧光分子的平均寿命,荧光分子的平均寿命取 $10^{-8} s^{-1}$ 。

静态猝灭结合常数 K_{LB} 与荧光强度、猝灭剂浓度之间的关系可以用 Lineweaver-Burk 双倒数函数表示,即

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} \cdot F_0^{-1} [R]^{-1} \quad (2)$$

其中, K_{LB} 的单位是 $L \cdot mol^{-1}$,它反映了在本实验条件下 AYR 与 BSA 的结合反应达到平衡时的量效关系。当温度分别为 24, 35 $^{\circ}C$ 时,按照实验方法测出加入不同浓度的 AYR 后 BSA 荧光强度的变化,由(1), (2)式分别作出 BSA 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线(见图 4)和 Lineweaver-Burk 双倒数曲线(见图 5);对图中的曲线进行线性拟合得到的直线方程、相关系数等见表 1。

Table 1 Regression equations and interrelated coefficients

(24 $^{\circ}C$; $F_0 = 265.192$; 35 $^{\circ}C$; $F_0 = 261.55$)

	Regression equations	r^2	r
Fig. 4(24 $^{\circ}C$)	$F_0/F = 0.2078 \times 10^5 c_{AYR} + 0.883$	0.995 1	0.997 5
Fig. 4(35 $^{\circ}C$)	$F_0/F = 0.1058 \times 10^5 c_{AYR} + 0.8837$	0.979 8	0.989 8
Fig. 5(24 $^{\circ}C$)	$(F_0 - F)^{-1} = 0.0243 \times 10^{-5} c_{AYR}^{-1} + 0.0032$	0.996 6	0.998 3
Fig. 5(35 $^{\circ}C$)	$(F_0 - F)^{-1} = 0.0622 \times 10^{-5} c_{AYR}^{-1} + 0.0019$	0.993 2	0.996 6

从图 4 中直线斜率可以求得室温(24 $^{\circ}C$)时, $K_{SV} = 0.2078 \times 10^5 L \cdot mol^{-1}$ 。荧光分子的 $\tau_0 \approx 10^{-8} s$,由 $K_{SV} = K_q \tau_0$ 可得 $K_q = 2.078 \times 10^{12} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$ 。一般认为,各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2 \times 10^{10} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$,显然,AYR 对 BSA 猝灭过程的速率常数远远大于扩散控制的 K_q 值,所以猝灭过程是生成 BSA-AYR 复合物的静态猝灭。

由 AYR 作用于 BSA 的 Lineweaver-Burk 曲线 $y = 0.0243 \times 10^{-5} x + 0.0032$ ($r = 0.9983$) 得, $K_{LB} = 1.6 \times 10^4 L \cdot mol^{-1}$ 。即 AYR 对 BSA 的荧光猝灭常数为 $1.6 \times 10^4 L \cdot mol^{-1}$ 。

2.4 荧光猝灭过程中热力学性质变化

当温度变化不大时,结合反应的焓变 ΔH 可看成—个常

数,根据热力学公式(3), (4) 和(5) 式可以求得结合反应的 ΔH^{θ} , ΔS^{θ} , ΔG^{θ} 等热力学函数的变化值,见表 2。

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (3)$$

$$\Delta G^{\theta} = -RT \ln(K^{\theta}) \quad (4)$$

$$\ln(K_2/K_1) = (\Delta H/R) \cdot (1/T_1 - 1/T_2) \quad (5)$$

2.5 AYR 与 BSA 之间的作用力

有机小分子与生物大分子的作用力包括静电作用力、氢键作用力、范德华力和疏水作用力等。不同小分子与蛋白质结合的作用力类型也不相同。当温度变化不大时,结合作用的焓变 ΔH 可以近似看作一个常数,根据反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小,可以判断药物与蛋白质之间的主要作用力。药物与蛋白质的结合反应能否自发进行取决于体系的 ΔG 是否小于 0,由式(3)可见, ΔH 的减少或

者 ΔS 的增加, 或者两者兼有, 都有利于结合反应的自发进行^[10-13]。Ross^[11] 等根据大量的实验结果, 总结了判断生物大分子与小分子结合作用力类型及生物大分子自身作用力类型的热力学规律, 即疏水作用力使体系的 ΔH 和 ΔS 变正, 氢键

或范德华力使体系的 ΔH 和 ΔS 变负, 静电作用力使体系的 $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$ 。从上述结果可以看出, 茜素黄 R 与牛血清白蛋白之间的作用力主要是氢键和范德华力。

Table 2 The binding constants and the thermodynamic parameters

	K_{SV} /(L · mol ⁻¹)	K_q /(L · mol ⁻¹ · s ⁻¹)	K_{LB} /(L · mol ⁻¹)	ΔH^θ /(kJ · mol ⁻¹)	ΔS^θ /(J · mol ⁻¹ · K ⁻¹)	ΔG^θ /(kJ · mol ⁻¹)
24 °C	2.078×10^4	2.078×10^{12}	1.55×10^4	-63.97	-135.05	-23.84
35 °C	1.058×10^4	1.058×10^{12}	6.15×10^3		-135.06	-22.35

2.6 CBBG-250 与 BSA, AYR 的作用

考马斯亮蓝 G-250(CoomassieG-250)(CBBG-250)是一种甲基取代的三苯基甲烷, 分子中含磺酸基的蓝色染料。考马斯亮蓝 G-250 能与蛋白质通过范德华力相互作用形成蛋白质-考马斯亮蓝复合物蓝色溶液, 且蛋白质-考马斯亮蓝复合物溶液的颜色深浅与蛋白质的浓度成正比^[14]。

由于考马斯亮蓝 G-250 能与蛋白质之间、茜素黄 AYR 与蛋白质之间都存在范德华作用力, 若牛血清白蛋白溶液中加入考马斯亮蓝 G-250 和茜素黄 AYR 两种小分子时, 必然相互影响与牛血清白蛋白的作用。

经研究表明, 考马斯亮蓝 G-250 对牛血清白蛋白具有荧

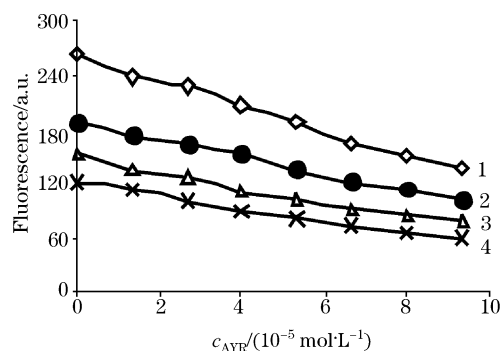


Fig. 6 The effect of c_{AYR} on fluorescence spectra of BSA-CBBG ($\lambda_{ex} = 393 \text{ nm}$)

$$c_{BSA} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1};$$

1: $c_C : c_B = 0$; 2: $c_C : c_B = 0.5$; 3: $c_C : c_B = 1$; 4: $c_C : c_B = 1.5$

光猝灭作用。本文研究了 AYR 的浓度对 BSA-CBBG 体系荧光强度的影响以及 AYR 对 BSA-CBBG 体系的荧光猝灭作用, 分别见图 6 和图 7。(c_C 表示 CBBG-250 的浓度, c_B 表示 BSA 的浓度)。

图 6 和图 7 表明, 当 AYR 浓度一定时, BSA-CBBG 体系中 $c_C : c_B$ 比值逐渐增大, 体系的荧光强度逐渐减小, AYR 对 BSA-CBBG 体系的荧光猝灭作用逐渐减弱; 当 BSA-CBBG 体系中 $c_C : c_B$ 比值为定值时, 体系的荧光强度随 AYR 浓度的增大而减小。

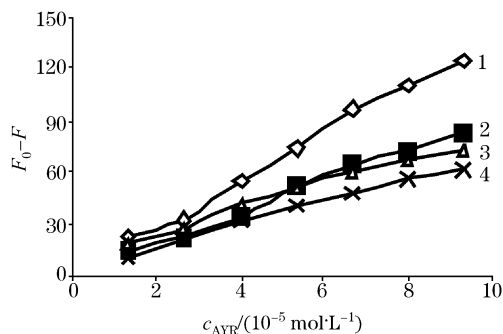


Fig. 7 Plots of $(F_0 - F)$ vs c_{AYR} on AYR to BSA-CBBG ($\lambda_{ex} = 393 \text{ nm}$)

$$c_{BSA} = 2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1};$$

1: $c_C : c_B = 0$; 2: $c_C : c_B = 0.5$; 3: $c_C : c_B = 1$; 4: $c_C : c_B = 1.5$

由图 7 得 AYR 与 BSA-CBBG-250 体系作用的线性方程和相关系数, 见表 3。

Table 3 Regression equations and interrelated coefficients of the interaction between AYR and BSA-CBBG-250

E	Regression equations	r^2	r
$c_C : c_B = 0$	$F_0 - F = 13.571 \times 10^5 c_{AYR} + 1.408$	0.992 2	0.996 1
$c_C : c_B = 0.5$	$F_0 - F = 9.088 6 \times 10^5 c_{AYR} + 0.883 7$	0.990 4	0.995 2
$c_C : c_B = 1$	$F_0 - F = 7.029 4 \times 10^5 c_{AYR} + 10.672$	0.982 1	0.991 0
$c_C : c_B = 1.5$	$F_0 - F = 6.452 7 \times 10^5 c_{AYR} + 4.061 4$	0.989 6	0.994 8

AYR 对 BSA-CBBG 体系具有荧光猝灭作用, 其猝灭作用产生的原因在于: 一是 AYR 和还没有与 CBBG-250 结合的 BSA 的部分氨基酸残基作用, 二是 AYR 部分地取代了

BSA-CBBG 结合体系中的 CBBG-250。实验进一步说明茜素黄 R 与牛血清白蛋白之间存在范德华力。

参 考 文 献

- [1] HUANG Kai-xun, LIU Qiong, YANG Xiang-liang, et al(黄开勋, 刘 琼, 杨祥良, 等). Progress in Chemistry(化学进展), 2004, 16(2): 308.
- [2] 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.
- [3] Erkens J H F, Dieleman S J, DressendoÈrfer R A. Journal of Steroid Biochem. Molec. Biol., 1998, 67(2): 153.
- [4] Hu Shen, Zhang Le, Norman J. Journal of Chromatography A, 2001, 924: 369.
- [5] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorescence Analytical Methods(荧光分析法). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 112.
- [6] Penzer G R. Translated by ZHU Da-chang, CHEN Jian, ZHU Shi-sheng(祝大昌, 陈 剑, 朱世盛译). Molecular Luminescence Analytical Methods(Fluorescence and Phosphorescence Methods)(分子发光分析法·荧光和磷光法). Shanghai: Fudan University Press(上海: 复旦大学出版社), 1985. 17.
- [7] Mudd J B, Dawson P J, Tseng Sam. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1997, 338(2): 338.
- [8] Joan Q Zhong, Yelena Freyzon, Daniel J. Biomolecular Engineering, 2004, 21: 67.
- [9] YANG Man-man, YANG Pin, ZHANG Li-wei(杨曼曼, 杨 频, 张立伟). Chinese Science Bulletin(科学通报), 1994, 39(1): 31.
- [10] XIAO Hou-rong, SHENG Liang-quan, SHI Chun-hua, et al(肖厚荣, 盛良全, 施春华, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(1): 78.
- [11] Ross D P, Subramanian S. Biochemistry, 1981, 20: 3096.
- [12] CUI Feng-lin, FAN Jing, LI Jian-ping. Bioorganic Medicinal Chemistry, 2004, 12: 151.
- [13] GAO Zhi-yu, XUE Min-zhao, LIU Yan-gang, et al(高志宇, 薛敏钊, 刘燕刚, 等). Photographic Science and Photochemistry(感光科学与光化学), 2002, 20(4): 269.
- [14] ZHOU Xian-wan, HU Xiao-qian(周先碗, 胡晓倩). Instrumental Analysis and Experimental Technology of Biochemistry(生物化学仪器分析与实验技术). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2002. 24.

Fluorescence Study on the Interaction of Alizarin Yellow R and Bovine Serum Albumin in Alkali Solution

ZHANG Huan¹, WANG Xing-ming^{1*}, WANG Qing-cheng¹, SHI Rong-ming¹, DING Li-sheng²

1. Institute of Chemistry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China

2. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract The interaction of alizarin yellow R (AYR) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by fluorescence method in alkali buffer solution. It was shown that AYR had a powerful ability to quench the BSA fluorescence at excitation and emission wavelengths of $\lambda_{\text{ex}} = 393 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 641 \text{ nm}$ in the medium solution of pH 11.00, and there were five binding sites of AYR to BSA; The combination reaction of AYR with BSA was a static quenching process, and from the effects of temperature on the fluorescence quenching rate of AYR-BSA and the Stern-Volmer quenching constant (K_{SV}) and the Lineweaver-Burk quenching constant (K_{LB}), the binding constant was calculated to be $K = 1.6 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; as the enthalpy change $\Delta H^\theta < 0$ and entropy change $\Delta S^\theta < 0$, and AYR has an ability to quench the BSA-CBBG fluorescence, it can be deduced that the Van der Waals force and hydrogen bond are the main binding forces between AYR and BSA.

Keywords Alizarin yellow R; Bovine serum albumin; Fluorescence spectra

(Received Nov. 1, 2005; accepted Feb. 9, 2006)

* Corresponding author