

## 邻羟基苯基荧光酮荧光光度法测定牛血清白蛋白

黄应平<sup>1</sup>, 顾彦<sup>2</sup>, 方艳芬<sup>1</sup>, 刘玉良<sup>1</sup>, 朱圣姬<sup>1</sup>, 罗光富<sup>1</sup>

1. 三峡大学 Alan G. Macdiarmid 再生能源研究所, 湖北 宜昌 443002

2. 三峡大学机械与材料学院, 湖北 宜昌 443002

**摘要** 研究了邻羟基苯基荧光酮(*o*-HPF)荧光光度法测定牛血清白蛋白(BSA)的反应条件,在 pH 7.90 的 B-R 缓冲溶液中,邻羟基苯基荧光酮(*o*-HPF)与 BSA 作用形成稳定的结合物,导致体系荧光猝灭,依据其荧光猝灭程度与外加 BSA 量的关系而建立定量测定 BSA 的方法。该方法具有良好的选择性和稳定性,由于采用二元体系,实验操作简单,干扰少,灵敏度较高,测定 BSA 线性范围为  $0.028 \sim 13.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,方法测定 BSA 回归方程为  $\Delta F = 431.51c(10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) + 457.78$ ,相关系数  $r = 0.997$ 。测定方法中重金属离子如 Pb(II) 等对 BSA 测定允许量较低,其余物质的存在对 BSA 的测定干扰较小。通过对 *o*-HPF 与 BSA 作用荧光猝灭常数的测定及热力学常数计算,讨论了 *o*-HPF 与 BSA 的作用机理,表明 *o*-HPF 与 BSA 作用方式主要为静电引力的非共价作用力,BSA 对 *o*-HPF 荧光猝灭为分子间形成了结合物而引起的静态猝灭。

**关键词** 邻羟基苯基荧光酮;牛血清白蛋白;荧光光度法

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)06-1336-04

### 引言

蛋白质研究对生命科学、生物化学、临床医学等都有十分重要的意义,通过研究蛋白质与探针有机小分子的作用方式,可以了解其结构与功能之间的关系,揭示生命现象的奥秘。而蛋白质的定量分析是生化、药物、食品及临床分析最常涉及的内容,也是临床检验中诊断疾病及检查疾病治疗康复情况的重要指标,又是许多生化药物分离提纯和质量检验中最常用的手段,某些生命物质如酶、多肽、蛋白质及蛋白质激素的分离纯化更是离不开蛋白质的定量测定。因此蛋白质的定量测定在生命科学、临床医学和化学研究中占有十分重要的地位<sup>[1]</sup>。

蛋白质的定量分析方法有很多,从最早的浊度法、凯氏定氮法,到目前研究最多、应用最广、操作较为简便的分子光谱分析法,还有新发展起来的共振瑞利散射法、高效液相色谱法、毛细管电泳分析法等,这些方法各有优点<sup>[2]</sup>。在分子光谱分析法中,光度法应用广泛,荧光法灵敏度比分光光度法高,目前荧光光度法用于蛋白质测定主要是外源荧光法(荧光探针法),其主要应用的荧光探针试剂包括染料探针和稀土离子等<sup>[3]</sup>。苯基荧光酮在金属元素等测定具有很好的应

用<sup>[4,5]</sup>,其作为染料探针试剂用于蛋白质的测定报道不多<sup>[6,7]</sup>,由于其一般采用三元体系,其测定方法较为复杂。本文研究了邻羟基苯基荧光酮(*o*-HPF)荧光光度法测定牛血清白蛋白(BSA)的反应条件,在 pH 7.90 的 B-R 缓冲溶液中,*o*-HPF 与 BSA 作用形成稳定的结合物,导致体系荧光猝灭,据此方法可定量测定微量蛋白质,该方法具有良好的选择性和稳定性,实验操作简单,干扰少,灵敏度高,测定牛血清白蛋白线性范围为  $0.028 \sim 13.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过对 *o*-HPF 与 BSA 作用荧光猝灭常数的测定及热力学常数计算,讨论了 *o*-HPF 与 BSA 的作用机理,表明 *o*-HPF 与 BSA 作用方式主要为静电引力的非共价作用力。

### 1 实验部分

#### 1.1 主要仪器和试剂

F-4500 荧光分光光度计(日立);pHS-2F 数字 pH 计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);TB-85 型超级恒温器(上海第二五金厂)。

*o*-HPF(自行合成), $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇溶液;BSA(生化试剂,上海伯奥生物科技有限公司), $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水溶液,冰箱于  $1 \sim 4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存;混合酸,  $1:25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

收稿日期:2006-10-26,修订日期:2007-01-29

基金项目:国家自然科学基金项目(50639070,20373074),湖北省青年杰出人才基金项目(2005ABB030)和湖北省教育厅自然科学基金重大项目(2004Z001)资助

作者简介:黄应平,1954年生,三峡大学 Alan G. Macdiarmid 再生能源研究所教授 e-mail: huangyp@ctgu.edu.cn

采用 3.92 g  $H_3PO_4$  (2.71 mL 85% 正磷酸) + 2.47 g 硼酸 + 2.40 g 乙酸 (2.36 mL 冰乙酸) 配制; B-R 缓冲溶液: 由 0.2 mol  $\cdot L^{-1}$  NaOH 和 1 : 25 mol  $\cdot L^{-1}$  混合酸配制系列不同酸度的缓冲溶液, 用酸度计校正 pH 值。

实验过程中用水均为去离子水, 试剂均为分析纯。

## 1.2 实验方法

于 10 mL 比色管中准确依次加入 1.0 mL pH 7.90 B-R 缓冲溶液, 0.3 mL  $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\cdot L^{-1}$  *o*-HPF 和 1.0 mL  $1.0 \times 10^{-6}$  mol  $\cdot L^{-1}$  BSA, 用二次水定容至 5 mL 摇匀, 静置 10 min 后。在 F-4500 荧光分光光度计上扫描荧光光谱或在激发波长 494 nm, 发射波长 534 nm, 狭缝 5 nm 条件下测量其荧光强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 荧光光谱

在 *o*-HPF 一定浓度条件下, 逐步增加 BSA 浓度, 以 494 nm 为激发波长, 狭缝 5.0 nm, 扫描体系 534 nm 处的荧光发射光谱, 结果见图 1。随着 BSA 浓度的增加, 体系的荧光猝灭程度逐渐增强。苯基荧光酮类试剂由于其结构具有很好的三苯甲烷类结构的共轭特性, 其结构取代基中拥有羟基基团, 具有很好的荧光性能<sup>[8]</sup>, 体系中加入 BSA 时, 其 *o*-HPF 荧光猝灭, 依据其荧光猝灭程度与外加 BSA 量的关系可以建立定量测定 BSA 的方法。

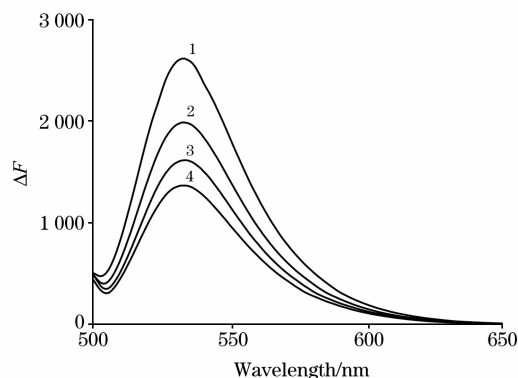


Fig. 1 Fluorescence spectra

$c_{o\text{-HPF}} = 6.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot L^{-1}$ ;  $c_{BSA}$  (curves 1-4): 0,  $4.0 \times 10^{-8}$ ,  $1.2 \times 10^{-7}$ ,  $2.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot L^{-1}$ ; B-R buffer pH 7.90

### 2.2 适宜反应条件选择

#### 2.2.1 酸度的影响

试验了不同 pH 值的 B-R 缓冲溶液对体系荧光猝灭强度的影响。在 pH 7.1~8.3 范围内 *o*-HPF 与 BSA 作用荧光猝灭  $\Delta F$  较大, pH < 7.1 或 pH > 8.3 时,  $\Delta F$  减少。pH 值对测定  $\Delta F$  的影响与 *o*-HPF 结构特性及其与 BSA 作用特点有关。酸性条件下, BSA 在小于 4.7 等电点时, 分子结构带负电荷其不利于与带负电官能团的 *o*-HPF 作用, 而使  $\Delta F$  不大; 但在碱性介质中 *o*-HPF,  $F$  值不大<sup>[8]</sup>, 而使  $\Delta F$  较小。试验缓冲溶液用量影响表明, 用量为 0.5~1.5 mL 时, 体系的  $\Delta F$  最大且恒定, 实验选用 pH 为 7.90 的缓冲溶液 1.0 mL。

#### 2.2.2 *o*-HPF 试剂用量的影响

固定 BSA 浓度为  $2.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot L^{-1}$ , 当 *o*-HPF 用量为 0.3 mL 时, 体系的荧光猝灭强度达到最大值。实验选择 0.3 mL 的 *o*-HPF ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol  $\cdot L^{-1}$ )。

#### 2.2.3 反应时间对体系的影响

当  $c_{o\text{-HPF}} = 6.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot L^{-1}$ ,  $c_{BSA} = 2.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot L^{-1}$  时体系在 20 min 内  $\Delta F$  稳定性好, 实验选择的反应时间为 10 min。

#### 2.2.4 反应温度对体系的影响

按实验方法进行, 体系随温度升高,  $\Delta F$  明显增加。在 65~80  $^{\circ}C$  时, 反应迅速, 并且在 65~80  $^{\circ}C$  时  $\Delta F$  保持不变且达到最高值。当温度达到 100  $^{\circ}C$  时, 体系荧光猝灭程度减小, 可能是温度增大使 BSA 变性所致。为了使实验的操作简单和方便, 实验选择在室温下进行 (32  $^{\circ}C$ )。

### 2.3 BSA 的响应及其标准曲线

在确定的最佳实验条件下, 取不同浓度的 BSA 与  $6.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot L^{-1}$  *o*-HPF 反应, 于 533 nm 处测定荧光强度, 以  $\Delta F$  对 BSA 浓度绘制标准曲线, 图 2 表明 BSA 在 0.028~13.65  $\mu g \cdot mL^{-1}$  浓度范围内,  $\Delta F$  响应信号与 BSA 浓度呈现线性关系, 其回归方程为  $\Delta F = 431.51c(10^{-7} \text{ mol} \cdot L^{-1}) + 457.78$ , 相关系数  $r = 0.997$ , 其方法测定 BSA 为高灵敏测定体系<sup>[6, 7]</sup>, 方法简单。

### 2.4 干扰物质的影响

试验了无机、有机干扰物质对测定 BSA 的影响。从表 1 中可以看出重金属离子如 Pb(II) 等对 BSA 测定允许量较低, 其余物质的存在对 BSA 的测定干扰较小。

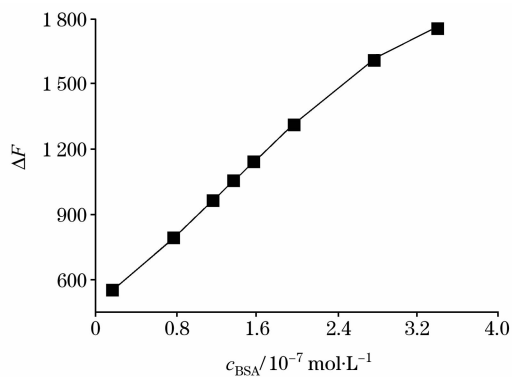


Fig. 2 Working curve

$c_{o\text{-HPF}} = 6.0 \times 10^{-7}$  mol  $\cdot L^{-1}$ , B-R buffer pH 7.90

Table 1 Influence of foreign substance

干扰物质	共存量/( $\mu g \cdot mL^{-1}$ )	干扰物质	共存量/( $\mu g \cdot mL^{-1}$ )
Li <sup>+</sup>	40	Ca <sup>2+</sup>	400
K <sup>+</sup>	80	Pb <sup>2+</sup>	0.05
Mn <sup>2+</sup>	0.1	CPB	750
Ni <sup>2+</sup>	0.2	Gly-Leu	46
Co <sup>2+</sup>	42	L 丙-Aa	52
Zn <sup>2+</sup>	0.3	尿素	680
Na <sup>+</sup>	100		

## 2.5 *o*-HPF 与 BSA 作用机理探讨

### 2.5.1 猝灭常数和热力学常数的测定及计算

荧光猝灭过程通常有动态猝灭和静态猝灭两类, 动态猝灭是猝灭剂和荧光物质的激发态分子之间所发生的相互作用过程, 过程遵从 Stern-Volmer 方程<sup>[9]</sup>

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

式中  $K_{SV}$  为 Stern-Volmer 猝灭常数, 反映了生物大分子与荧光猝灭剂在动态猝灭过程中彼此和相互碰撞到达平衡时的量效关系。  $K_q$  为生物大分子与荧光猝灭双分子扩散碰撞猝灭速率常数, 描述生物大分子与荧光剂分子之间因为分子的扩散和彼此碰撞时对生物大分子荧光寿命衰减速率的影响。  $\tau_0$  为没有猝灭剂存在下荧光分子的平均寿命, 生物大分子的荧光平均寿命取  $10^{-8}$  s。  $[Q]$  为猝灭剂浓度。

静态猝灭是指猝灭剂和荧光物质分子在基态时发生配合作用, 生成不发光的配合物从而导致荧光体荧光强度降低的过程。这一过程遵从 Lineweaver-Burk 双倒数函数曲线<sup>[10]</sup>

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

式中  $K_{LB}$  是静态猝灭结合常数,  $[Q]$  为猝灭剂浓度。

按实验方法, 分别在温度为 26 和 36 °C, 对 *o*-HPF 为  $6.0 \times 10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup> 时, 测出加入不同量的 BSA 体系的  $F_0$  和  $F$  值。由(1)和(2)式分别测绘 *o*-HPF 荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线和双倒数曲线, 见图 3 和图 4。对其进行拟合得

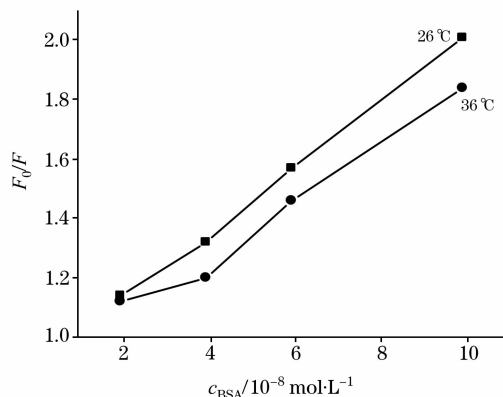


Fig. 3 Curve of  $F_0/F$  vs  $c_{BSA}$

$c_{o-HPF} = 6.0 \times 10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup>, B-R buffer pH 7.90

到的直线方程及相关系数见表 2。

由图 3, 图 4 和表 2 可见, 曲线有良好的线性关系, 且随着温度升高, 猝灭曲线斜率降低, 通过曲线斜率可求得猝灭过程的结合常数。由于各类猝灭剂对生物大分子的最大  $K_q$  值为  $2.0 \times 10^{13}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>, 而表 3 中可看出 BSA 对 *o*-HPF 荧光猝灭速率常数  $K_q$  值大于  $2.0 \times 10^{13}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>-1</sup>。可见 BSA 对 *o*-HPF 荧光猝灭不是由于分子扩散和碰撞而引起的动态猝灭, 而是分子间形成了结合物而引起的静态猝灭<sup>[9, 10]</sup>。

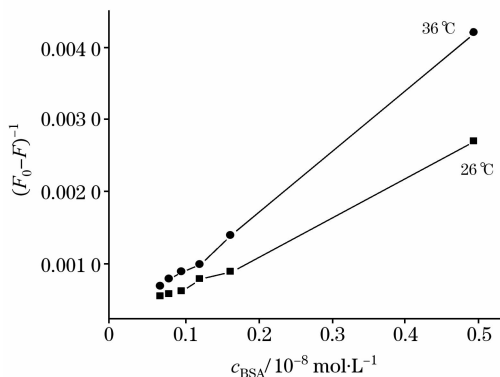


Fig. 4  $(F_0 - F)^{-1}$  vs  $c_{BSA}$

$c_{o-HPF} = 6.0 \times 10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup>, B-R buffer pH 7.90

Table 2 Stern-Volmer and Lineweaver-Burk double-reciprocal equation under different temperature

温度/°C	回归方程	相关系数
26	$F_0/F = 1 + 9.0 \times 10^6 [BSA]$	0.999
36	$F_0/F = 1 + 8.0 \times 10^6 [BSA]$	0.990
26	$(F_0 - F)^{-1} = 0.0003 + 8.23 \times 10^{-11} [BSA]^{-1}$	0.998
36	$(F_0 - F)^{-1} = 0.00013 + 5.07 \times 10^{-11} [BSA]^{-1}$	0.999

当温度变化不大时, 结合常数的焓变  $\Delta H$  可看成是一个常数, 根据(3), (4), (5)3 个热力学公式可以求得结合常数的  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$  等热力学函数的变化。

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

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

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

Table 3 Binding constants of  $\Delta H$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta G$

温度/°C	$K_{SV} (\times 10^6)$ /(L · mol <sup>-1</sup> )	$K_q (\times 10^{14})$ /(L · mol <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )	$K_{LB} (\times 10^6)$ /(L · mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ /(kJ · mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ /(J · K <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ /(kJ · mol <sup>-1</sup> )
26	9.0	9.0	3.89	-18.43	64.52	-37.72
36	8.0	8.0	3.16	-18.43	64.79	-38.45

有机小分子与蛋白质等生物大分子结合的作用力类型有疏水作用力、氢键、和静电引力。从热力学观点看, 在一定的温度和压力下, 结合反应能否自发进行取决于体系的  $\Delta G$ , 而  $\Delta H$  的减少或者  $\Delta S$  的增加都有利于结合反应的自发进

行。根据 Ross<sup>[10]</sup> 总结出的判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律结论见表 4。因此可以判断 *o*-HPF 与 BSA 的作用力是以静电引力为主的非共价作用力<sup>[10]</sup>。

**Table 4 Thermodynamic regularity of bond strength between biomacromolecule and small molecule**

$\Delta H > 0, \Delta S > 0$	$\Delta H < 0, \Delta S < 0$	$\Delta H < 0, \Delta S > 0$
疏水作用力	氢键	静电引力

### 3 样品的分析

按实验方法进行, 通过加入回收法测量样品, 见表 5。

结果表明, 该方法测定 BSA 具有较好的准确性。

**Table 5 Determination of BSA in samples ( $n=3$ )**

	BSA 浓度/ $10^{-8}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	实测值/ $10^{-8}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			平均值/ $10^{-8}$ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	相对标准 偏差/%	回收率 /%
1	4.00	3.94	3.91	3.87	3.91	3.06	97.8
2	8.00	8.22	8.10	8.16	8.16	0.74	102
3	10.00	10.71	9.90	10.18	10.10	1.18	101
4	14.00	13.78	13.05	13.73	13.52	3.02	96.57
5	18.00	18.25	18.25	18.86	18.45	1.91	102.5

### 参 考 文 献

- [1] Uirich Kragh-Hansen. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1981, 33(1): 17.
- [2] Lin L, Tong S Y. Anal. Biochem., 1996, 233: 151.
- [3] Saito Y A. Anal. Chim. Acta, 1985, 178(2): 337.
- [4] HUANG Ying-ping, ZHANG Hua-shan(黄应平, 张华山). Chin. J. Anal. Chem. (分析化学), 2000, 28(2): 164.
- [5] HUANG Ying-ping, ZHANG Hua-shan(黄应平, 张华山). Chin. J. Anal. Chem. (分析化学), 2003, 31(7): 894.
- [6] Guo Z X, Shen H X. Analyst, 1999, 124: 1093.
- [7] WEI Qin, DU Bin(魏 琴, 杜 斌). Chin. J. Anal. Chem. (分析化学), 2004, 32(3): 370.
- [8] HUANG Ying-ping, ZHANG Hua-shan(黄应平, 张华山). Metallurgical Analysis(冶金分析), 2001, 21(2): 34.
- [9] ZHANG Huan, WANG Xing-ming, WANG Qing-cheng, et al(张 欢, 王兴明, 王清成, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(8): 1508.
- [10] YI Ping-gui, LIU Jun-feng, SHANG Zhi-cai, et al(易平贵, 刘俊峰, 商志才, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(6): 826.

## Study on the Determination of Bovine Serum Albumin Using *o*-Hydroxyphenylfluorone Reagent with Fluorescence Spectrophotometry

HUANG Ying-ping<sup>1</sup>, GU Yan<sup>2</sup>, FANG Yan-fen<sup>1</sup>, LIU Yu-liang<sup>1</sup>, ZHU Sheng-ji<sup>1</sup>, LOU Guang-fu<sup>1</sup>

1. China Three Gorges University Alan G. MacDiarmid Institute for Renewable Energy, Yichang 443002, China

2. College of Mechanical and Material Engineering, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

**Abstract** The reactions were studied for the determination of bovine serum albumin (BSA) using *o*-hydroxyphenylfluorone (*o*-HPF) as fluorescence probe reagent with fluorescence spectrophotometry. In the B-R medium, *o*-HPF reacts with BSA to form the stable complex compound. The reaction system of *o*-HPF and BSA was binary system, and the method for the determination of BSA was of good selectivity and stability and simplicity. The linear range of *o*-HPF fluorescence spectrophotometric method was 1.32-18.54  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The quenching constant and thermodynamics constant of the fluorescence effects between BSA and *o*-HPF were calculated. The results showed that the non-covalent binding forces were the binding force between *o*-HPF and BSA.

**Keywords** *o*-hydroxyphenylfluorone (*o*-HPF); Bovine Serum Albumin (BSA); Fluorescence spectrophotometry

(Received Oct. 26, 2006; accepted Jan. 29, 2007)