

# 用荧光参数表征牛血清白蛋白溶液的构象变化过程

晋可, 张家兴, 尹宗宁\* (四川大学华西药学院靶向药物与释药系统教育部重点实验室, 成都 610041)

**摘要:**目的 对牛血清白蛋白在盐酸胍中的构象变化过程进行研究, 根据荧光参数的变化, 建立蛋白构象与环境变化的关系, 从分子水平探讨蛋白质构象变化而致不稳定的原因。方法 采用内源性荧光法, 荧光淬灭法及荧光探针法研究牛血清白蛋白在盐酸胍中的构象变化过程。结果 在变性过程中, 随着盐酸胍浓度的增加, 牛血清白蛋白内源性色氨酸荧光峰位先蓝移后红移, 荧光强度逐步衰减; 8-苄氨基-1-萘磺酸-牛血清白蛋白结合物荧光峰位逐步红移, 荧光强度逐渐衰减; 丙烯酰胺对牛血清白蛋白的荧光淬灭常数  $K_{SV}$  在盐酸胍浓度为  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时降至最低  $3.469 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。结论 在盐酸胍诱导的变性过程中, 牛血清白蛋白的色氨酸残基所处区域构象经历了一个先紧缩后舒展的三态过程。而 8-苄氨基-1-萘磺酸探针结合位点与色氨酸残基可能位于牛血清白蛋白的不同区域, 且构象变化更为灵敏。

**关键词:** 蛋白稳定性; 荧光参数; 色氨酸荧光; 荧光探针; 临界浓度

doi: 10.11669/cpj.2013.07.010 中图分类号: R944 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2013)07-0531-06

## Characterizing the Conformational Change Process of Bovine Serum Albumin Solution by Fluorescence Parameters

JIN Ke, ZHANG Jia-xing, YIN Zong-ning\* (Key Laboratory of Drug Targeting and Novel Drug Delivery Systems, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To study the conformational change process of bovine serum albumin (BSA) in guanidinium chloride through evaluating the fluorescence parameters, thus to elucidate the phenomenon from molecular level and to establish the relationship between the conformation of protein and the environment. **METHODS** Intrinsic tryptophan fluorescence, fluorescence quenching and fluorescence probes spectrophotometry were selected to study the denaturation process of BSA in guanidinium chloride. **RESULTS** An attenuation of intensity was observed both in BSA and ANS-BSA conjugates with the increasing concentration of guanidinium chloride. A red shift on fluorescence emission peak occurred in the ANS-BSA conjugates, while the same result appeared in BSA only after a blue shift. The fluorescence quenching constant  $K_{SV}$  reduced to its minimum  $3.469 \times 10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  in  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  guanidinium. **CONCLUSION** It was shown that the denaturation process of BSA in guanidinium chloride was consistent with a three-state model, and the conformational change of the binding site on BSA of ANS was much more sensitive than that of tryptophan residue.

**KEY WORDS:** protein stability; fluorescence parameter; tryptophan fluorescence; fluorescent probes; critical concentration

蛋白类药物有着比化学药物更加低毒、高效的优点, 在人类健康方面的巨大贡献越来越为人们所重视, 生物技术的发展让药用蛋白制剂的商品化生产成为现实。然而蛋白质的不稳定性在很大程度上限制了其医学以及商业应用, 其中蛋白构象的稳定性与完整性是发展蛋白类药物制剂的关键问题。

血清白蛋白 (serum albumin, SA) 是血液循环中含量最丰富的蛋白质之一, 具有贮存、转运以及机体保护等重要的生理功能<sup>[1]</sup>。其中, 牛血清白蛋白 (BSA) 由于相对分子质量小, 溶解度大, 常常作为理想的蛋白模型进行蛋白质理化性质、结构与功能的体外研究, 具有广泛的应用价值。BSA 是由 580 个氨基

酸残基组成的单肽链蛋白质, 相对分子质量约为 66 000, 共 17 对二硫键, 在其 134 及 212 位各含有一个色氨酸残基 (Trp134, Trp212), 具有内源性荧光。其中 Trp212 位于结构域 II, 被包裹于 BSA 分子内部的疏水环境中; Trp134 位于结构域 I, 此区域更加靠近 BSA 分子表面<sup>[2]</sup>。盐酸胍是常用的离子型变性剂, 具有强极性, 与溶液中的非极性溶剂或非极性取代基以及蛋白及多肽分子中氨基酸的极性侧链发生强烈的相互作用。因此, 可以通过疏水性较强的色氨酸残基的内源性荧光变化反映其微环境的变化, 从而对盐酸胍变性过程中 BSA 的构象变化进行动态研究。

目前, 研究蛋白质结构与构象变化的方法主要

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3097305)

作者简介: 晋可, 女, 硕士研究生 研究方向: 蛋白质溶液的稳定性与缓释制剂 Tel/Fax: (028)85502917 E-mail: yzn@scu.edu.cn

\* 通讯作者: 尹宗宁, 男, 教授, 博士生导师 研究方向: 药物新剂型

包括圆二色谱法<sup>[3,4]</sup>、共振光散射光谱法<sup>[5]</sup>和荧光光谱法<sup>[2,6-10]</sup>等。本实验以 BSA 作为模型蛋白,采用内源性荧光法,荧光淬灭法及荧光探针法对 BSA 在盐酸胍中的变性过程进行研究,根据荧光参数的变化,描述 BSA 在盐酸胍中的变化过程及构象变化的临界浓度,从分子水平探讨蛋白质构象变化的原因,并尝试建立蛋白构象随环境变化的规律,为蛋白类药物稳定性的研究及应用提供理论支持。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

BSA (Roche 公司,进口分装);1,8-ANS (Sigma 公司);三(羟甲基)氨基甲烷(天津市科密欧化学试剂有限公司);盐酸胍(国药集团化学试剂有限公司);配制 pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液;实验用水为双蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

RF-5301PC 荧光分光光度计 (Shimadzu 公司);BSI24S 型电子天平 (Satorius 公司);超声波清洗器 (中船七院七二六所);Five Easy pH 计 (Mettler Toledo 公司);HH-2 数显恒温水浴锅 (国华电器有限公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 盐酸胍对 BSA 内源性荧光的影响** 配制盐酸胍终浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4 mol · L<sup>-1</sup>, BSA 终浓度为 8.8 × 10<sup>-7</sup> mol · L<sup>-1</sup> 的溶液各 5 mL。以相应浓度盐酸胍溶液作为空白,扫描牛血清白蛋白溶液经不同盐酸胍溶液变性后的内源性荧光光谱,所有实验均在 25 °C 完成。荧光条件:激发波长为 295 nm,扫描波长为 310 ~ 400 nm,狭缝宽度为 5 nm,扫描速度为 slow。

### 1.2.2 荧光淬灭实验研究盐酸胍对 BSA 的影响

配制盐酸胍终浓度分别为 0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1 mol · L<sup>-1</sup>, BSA 终浓度为 8.8 × 10<sup>-7</sup> mol · L<sup>-1</sup> 的溶液各 5 mL。再向上述各组盐酸胍浓度溶液中加入一定体积的 0.5 mol · L<sup>-1</sup> 丙烯酰胺储备液,使丙烯酰胺终浓度 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.12 mol · L<sup>-1</sup>。按“1.2.1”项下的方法测定其内源性荧光光谱。

### 1.2.3 荧光探针实验研究盐酸胍对 BSA 的影响

配制盐酸胍终浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4 mol · L<sup>-1</sup>, BSA 终浓度为 8.8 × 10<sup>-7</sup> mol · L<sup>-1</sup>, ANS 终浓度为 0.5 × 10<sup>-6</sup> mol · L<sup>-1</sup> 得溶液各 5 mL。以 370 nm 为激发波长,扫描其 400 ~ 600 nm 内 ANS-BSA 结合物的外源

性荧光光谱,狭缝宽度为 5 nm,扫描速度为 slow,温度为 25 °C。

## 2 结果与讨论

### 2.1 盐酸胍对 BSA 内源性荧光的影响

在 BSA 的内源性荧光光谱中,当激发波长为 280 nm 时可同时激发 Tyr 和 Trp 残基,由于存在 Tyr 向 Trp 残基的能量转移,荧光强度均表现为 Trp 残基的荧光,Tyr 与 Trp 的荧光不能被区分。而采用 295 nm 作为激发波长则可以选择性激发 Trp 的荧光,根据其荧光光谱的变化反映其微环境的变化:当 Trp 处于疏水环境中,其峰位向短波方向移动,反之亦然。

**2.1.1 最大发射波长及相对位移 ( $F_{310}/F_{375}$ )<sup>[11]</sup> 的变化** 荧光光谱中光谱位移 (spectral shift) 可以用来表征蛋白质的去折叠过程,又称为相对位移 (relative shift)。光谱位移通过采用荧光光谱“blue edge”与“red edge”的荧光强度比率表示,反映了 Trp 残基的荧光光谱形状和位置,也可用于检测蛋白质的构象改变。BSA 内源性荧光光谱相对位移可以采用 310 与 375 nm 处荧光强度的比值 ( $F_{310}/F_{375}$ ) 表示,而外源性荧光光谱可以采用 450 与 525 nm 处荧光强度的比值 ( $F_{450}/F_{525}$ ) 表示<sup>[11]</sup>。

天然态 BSA 的最大发射波长 ( $\lambda_{max}$ ) 为 343 nm (图 1,2),根据 3 种基本色氨酸残基微环境的特点<sup>[12]</sup>,可推断天然态 BSA 中大部分 Trp 残基固定在蛋白质分子表面,并与水的自由接触受到限制,即 BSA 的内源性荧光主要由 Trp134 提供。

当盐酸胍浓度为 0 ~ 0.8 mol · L<sup>-1</sup> 时, $\lambda_{max}$  在极小范围内波动,但并未发生显著改变;而相对位移值

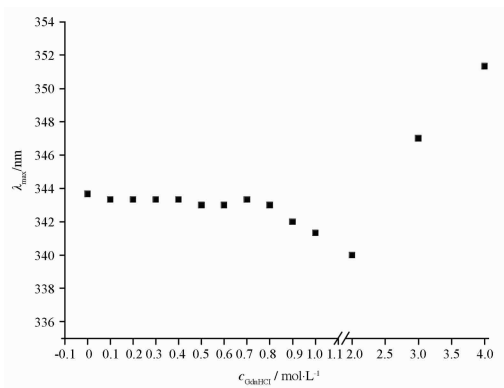


图 1 内源性最大荧光峰位随盐酸胍浓度的变化图

Fig. 1 The  $\lambda_{\text{max}}$  of intrinsic tryptophan fluorescence emission peak in different concentrations of guanidinium chloride (Gdn HCl)

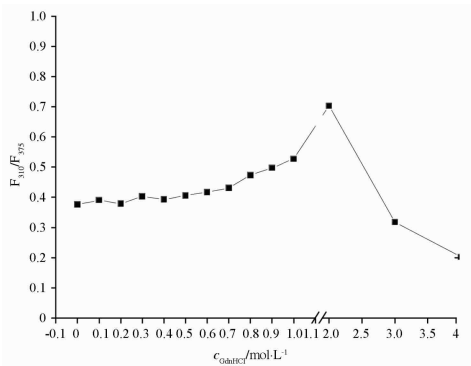


图2 荧光光谱相对位移随胍浓度的变化图

Fig. 2 The relative displacement of intrinsic tryptophan fluorescence emission peak in different concentrations of guanidium chloride (Gdn HCl)

在盐酸胍  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  后即发生显著的单向变化。说明采用特征参数  $F_{310}/F_{375}$  用于表征蛋白质构象变化的状态与光谱的形状和位置,检测蛋白质的构象改变比  $\lambda_{\text{max}}$  更为灵敏。而盐酸胍浓度为  $0 \sim 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  这一过程可视为生物大分子在不同环境条件下通过调整其结构与构象,以适应环境的变化,此时 BSA Trp 残基区域的微环境与天然态基本相同,  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  可认为是 Trp 残基区域对盐酸胍耐受的临界浓度。

当盐酸胍浓度从  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  增加至  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,相对位移值逐渐升高,至  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时达到最大,而  $\lambda_{\text{max}}$  也蓝移至最大,相比天然态蓝移  $3 \text{ nm}$  左右;  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  后盐酸胍浓度继续增加,相对位移值继续降低,  $\lambda_{\text{max}}$  继续红移,至  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以上时,  $\lambda_{\text{max}}$  红移至  $347 \text{ nm}$  甚至更高。由此可推断 BSA 在盐酸胍中的变性过程中,其 Trp 残基所处区域经历了一个先紧缩后舒展的三态过程,即当盐酸胍浓度为  $0.5 \sim 2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,BSA 经历了 Trp 被深埋于更加疏水而非溶剂暴露的致密中间态,有研究者将这种部分折叠的中间态称为“熔球态”(molten globules),这是一种致密的无序球状结构,具有蛋白的部分二级结构、结构域和类似天然态的拓扑结构,但是缺乏一个确定的三级结构<sup>[13]</sup>。而  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  可认为是盐酸胍引起 BSA 构象由熔球态到解旋伸展的临界浓度。当胍浓度高于这一临界浓度后,Trp 残基开始向亲水的溶剂环境暴露,BSA 逐渐解旋伸展,至胍浓度高于  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  后,Trp 峰位红移至  $347 \text{ nm}$  甚至更高,说明此时色氨酸残基已经从蛋白质的疏水环境中完全暴露于亲水溶液环境中,BSA 处于不可逆去折叠态。

2.1.2 最大荧光强度的变化 在低浓度  $0 \sim 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸胍范围内,BSA 的荧光强度在一定范围内出现波动,并未发生显著改变(图 3),这与峰位变化结果一致,进一步说明此时 BSA 仍处于天然态,  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  是盐酸胍引起 BSA Trp 残基区域构象变化的临界浓度。

当盐酸胍浓度至  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  后,随着浓度的增加,荧光强度逐渐下降,整个过程与峰位的变化有所不同,这是因为 BSA Trp 残基的荧光强度不仅受残基所处微环境性质的影响,还受分子内能量转移效应与荧光淬灭效应的影响。当 BSA 处于熔球态时,虽然 Trp 残基被包埋在蛋白质分子内部更加疏水的环境中,但可能与向其转移能量的 Tyr 基团距离过远或与荧光淬灭基团距离过近,从而最终表现为荧光强度的降低。

对上述实验结果通过多项式拟合,得到最大荧光强度 ( $y$ ) 与盐酸胍浓度 ( $x$ ) 之间关系方程:  $y = -0.020 4x^4 + 0.189 8x^3 - 0.526 9x^2 + 0.226 4x + 0.988 8, r^2 = 0.996 4$ 。通过对该方程取二阶导数后计算得到:当盐酸胍浓度为  $1.274 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时荧光强度下降最快,可认为其是盐酸胍变性过程中引起 BSA 内源性荧光强度变化最为显著的临界浓度。当盐酸胍浓度为  $3.377 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,荧光强度变化最为缓慢,即当盐酸胍浓度增加至  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  以上时,荧光强度的下降趋势趋于平缓并达到最低,仅为天然态的  $38\%$  左右,主要是因为此时 Trp 已经完全暴露于溶剂的亲水环境中,BSA 处于不可逆去折叠态,这与峰位变化的结果一致。  $3.377 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  可认为是盐酸胍引起 BSA Trp 残基区域不可逆去折叠的临界浓度。

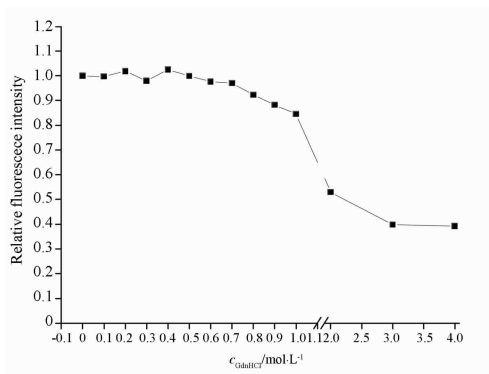


图3 内源性最大荧光强度随胍浓度的变化图

Fig. 3 The intensity of intrinsic tryptophan fluorescence emission peak in different concentrations of guanidium chloride (Gdn HCl)

**2.1.3 热力学计算** 进一步分析 BSA 在盐酸胍中的变性曲线(图 3),该去折叠曲线呈现“S”形。如果蛋白质的去折叠过程没有共价键的断裂,在蛋白质天然态与去折叠态之间存在着序变过程,这一过程的吉布斯自由能变化  $\Delta G_U$  即可反映蛋白质构象的稳定性,还可用于测定结构相似蛋白质的稳定性差异<sup>[14]</sup>。

在“S”形变性曲线下,每一变性剂浓度条件下的蛋白状态均可以描述为在天然态(N)与去折叠态(U)中的平衡,这一过程可以用平衡常数  $K_U$  来表示, $K_U$ 与变性过程去折叠分数  $F_d$ 相联系<sup>[14]</sup>。

$$F_d = \frac{X_N - X}{X_N - X_U}$$

$$K_U = \frac{F_d}{1 - F_d} = \frac{X_N - X}{X - X_U}$$

其中, $X_N$ 和  $X_U$ 分别代表蛋白天然态及去折叠态时的监测值,即 2 种状态下 BSA 内源性荧光发射光谱的最大荧光强度值, $X$ 代表蛋白质去折叠过程中的监测值,即不同盐酸胍浓度下 BSA 内源性荧光发射光谱的最大荧光强度值。相应去折叠态的标准吉布斯自由能可以用 Van't Hoff 方程(1)<sup>[14]</sup>表示:

$$\Delta G_U^0 = -RT \ln K_U = -RT \ln \frac{X_N - X}{X - X_U} \quad (1)$$

对同一蛋白质,在变性因素(变性剂浓度)改变过程中所产生的物理参数变化是根据天然蛋白质与变性蛋白质平衡反应而变化的。而  $\Delta G_U^0$ 与变性剂的浓度成直线关系<sup>[14]</sup>,即:

$$\Delta G_U^0 = \Delta G_{UH_2O}^0 - mc_d \quad (2)$$

其中  $m$  表示  $\Delta G_U^0$ 随变性剂浓度( $c_d$ )改变的速率, $\Delta G_{UH_2O}^0$ 表示在没有变性剂存在下的标准吉布斯自由能,衡量着蛋白质对该变性条件的稳定性, $\Delta G_{UH_2O}^0$ 越大,表明蛋白构象越稳定。

以荧光强度(fluorescence intensity, FI)作为参数  $X$ ,按照上述公式得到  $K_U$ 。由公式(1)计算得到  $\Delta G_U^0$ ,对盐酸胍浓度作图, $\Delta G_U^0$ 在胍浓度 0.6 ~ 3 mol · L<sup>-1</sup>时得到一次方程: $Y = 11\ 027 - 7\ 433X$ ( $r^2 = 0.980$ ),对应公式(2),得到  $\Delta G_{UH_2O}^0 = 11.0\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , $m = 7\ 433\ \text{kJ} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-2}$ 。结合前期 BSA 胍变性实验结果,经计算  $\Delta G_{UH_2OUrea}^0 = 37.1\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , $m_{Urea} = 6\ 314\ \text{kJ} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-2}$ 。由此可知,BSA 在胍中更为稳定,盐酸胍对于 BSA 的影响更大,这主要是因为盐酸胍是一种离子型变性剂,可通过正离子效应减弱维持蛋白质三级结构的静电作用。

## 2.2 荧光淬灭实验研究盐酸胍对 BSA 的影响

由实验结果可知,随着丙烯酰胺浓度的增大,BSA 的内源性荧光有规律的下降,实验所得数据按照 Stern-Volmer 方程<sup>[10]</sup>处理:

$$F_0/F = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (3)$$

式中  $F_0$ 和  $F$ 分别为淬灭剂加入前后 BSA 溶液的荧光强度; $[Q]$ 为淬灭剂浓度; $K_{sv}$ 为淬灭常数,数值等于 50% 荧光强度被淬灭时淬灭剂的浓度; $K_q$ 为动态淬灭速率常数; $\tau_0$ 为淬灭剂不存在时物质的荧光寿命,生物大分子的荧光平均寿命一般为  $10^{-8}\ \text{s}$ 。

按上式以  $F_0/F$ 对  $[Q]$ 作图,得到直线,由直线斜率可得  $K_{sv}$ ,结果见表 1,由  $K_{sv}$ 对盐酸胍浓度作图(图 4)。

由表 1 结果可知,丙烯酰胺淬灭天然态 BSA 的淬灭常数  $K_{sv} = 5.661\ 4\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,其动态淬灭速率常数  $K_q = 5.661\ 4 \times 10^8\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,小于各类淬灭剂对生物大分子的  $K_q$ 最大值  $2.0 \times 10^{10}\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,说明其对 BSA 的荧光淬灭属于动态淬灭机制。这是因为丙烯酰胺是一种不带电荷的中性淬灭剂,可以进入蛋白质的疏水内核,与其疏水内核中的 Trp 发生碰撞而导致荧光淬灭<sup>[15]</sup>。而这一过程是由短暂存在于蛋白基质的孔穴介导的,孔穴短

表 1 基于荧光淬灭实验计算的 Stern-Volmer 常数

Tab. 1 Stern-Volmer constant from the data of fluorescence quenching test

$c_{GdnHCl}$ /mol · L <sup>-1</sup>	$c_{acrylamide}$ /mol · L <sup>-1</sup>							$K_{sv}$ / L · mol <sup>-1</sup>
	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	0.12	
0	1.000	1.117	1.164	1.281	1.403	1.602	1.731	5.661
0.2	1.000	1.107	1.242	1.300	1.399	1.504	1.610	5.098
0.4	1.000	1.073	1.134	1.233	1.301	1.419	1.506	4.058
0.5	1.000	1.025	1.094	1.156	1.247	1.344	1.486	3.469
0.6	1.000	1.112	1.221	1.191	1.276	1.424	1.433	3.821
0.8	1.000	1.100	1.151	1.252	1.345	1.442	1.542	4.402
1	1.000	1.071	1.173	1.318	1.428	1.495	1.610	5.072

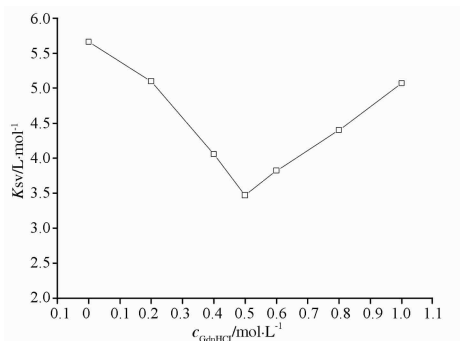


图 4 丙烯酰胺淬灭常数  $K_{sv}$ 同盐酸胍浓度的关系

Fig. 4 The  $K_{sv}$  of acrylamide in different concentrations of guanidinium chloride

暂形成的频率决定了淬灭剂扩散进入疏水核的过程,可以通过  $K_{SV}$  值的变化反映。因此可以借助  $K_{SV}$  值间接反映蛋白质基质性质和构象的变化。

从图 4 可知,在盐酸胍浓度为  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,BSA 的  $K_{SV}$  减小至最低  $3.469 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,此时丙烯酰胺进入蛋白色氨酸疏水核的速率最小,说明此时蛋白结构最为紧密,淬灭剂接近 Trp 残基的程度最小,而该浓度前后,其淬灭常数均增大,可能反应了两种不同的蛋白构象。结合内源性荧光的结果,可推测  $0.4 \sim 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  可作为盐酸胍引起 BSA Trp 残基区域天然构象发生质变的临界浓度。

### 2.3 荧光探针实验研究盐酸胍对 BSA 的影响

8-苯胺基-1-萘磺酸(1,8-ANS)是一种疏水荧光探针,在水溶液中基本不发荧光,通过非共价作用结合到蛋白质分子的非极性区域时,荧光强度大为加强,当结合区域亲水性增加时,荧光峰位红移,荧光强度降低<sup>[16]</sup>。

**2.3.1 最大发射波长及相对位移 ( $F_{450}/F_{525}$ )<sup>[11]</sup> 的变化** 随着盐酸胍浓度的增大,结合物的最大发射波长逐渐红移,相对位移值逐渐下降(图 5,6)。

**2.3.2 最大荧光强度的变化** 随着盐酸胍浓度的增大,结合物的最大荧光强度逐渐下降,至  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  胍浓度时,最大荧光强度几乎降为 0(图 7)。综合峰位变化的结果,说明 BSA 在变性过程中,随着盐酸胍浓度的增加,探针结合区域的构象逐渐松散并逐步向溶剂暴露,其微环境亲水性逐渐增加。与 BSA 内源性荧光参数变化相比较,结合物荧光峰位并未经历熔球态过程,可推测 ANS 结合区域与 Trp 残基可能处在 BSA 的不同区域。而且在低浓度  $0 \sim 0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸胍中,结合物的荧光峰位已经开始红移,荧光强度也开始逐步下降。而当盐酸胍浓度增加至  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,结合物的荧光强度便不

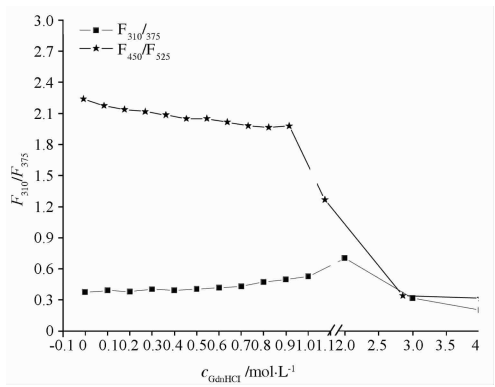


图 6 ANS 荧光光谱相对位移随胍浓度的变化图  
Fig. 6 The relative displacement of the ANS-BSA conjugates fluorescence emission peak in different concentrations of guanidinium chloride

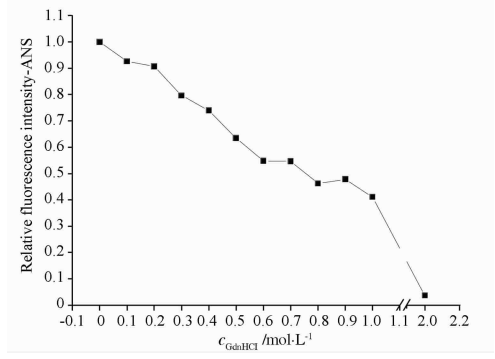


图 7 ANS-BSA 结合物中 ANS 荧光峰强度随胍浓度变化图  
Fig. 7 The intensity of the ANS-BSA conjugates fluorescence emission peak in different concentrations of guanidinium chloride

再下降,几乎为 0,说明该浓度后 BSA-ANS 结合区域已经几乎完全暴露于亲水溶剂中,ANS 从结合位点脱落为游离态<sup>[11]</sup>。上述结果都说明相较于 Trp 残基区域,ANS 结合区域对于盐酸胍的影响更为敏感。

### 3 结论

由内源性荧光,荧光淬灭及荧光探针实验结果可知,BSA 在盐酸胍的变性过程中,随着盐酸胍浓度的增加,其构象变化包括了 Trp 残基与 ANS 结合区域两个不同部分的变化:其中 ANS 结合区域对于盐酸胍更为敏感,低浓度变性剂即可引起其构象变化:逐渐松散并向亲水溶剂暴露,至盐酸胍浓度为  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时已经完全暴露于溶剂中,处于不可逆去折叠态。而 Trp 残基区域可耐受低浓度盐酸胍的影响, $0.4 \sim 0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为其可耐受的盐酸胍浓度,随后其构象变化经历了先紧缩后伸展的三态过程, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  为打破其熔球态平衡的临界浓度,至盐酸胍浓度为  $3.377 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时已经完全暴露于溶剂

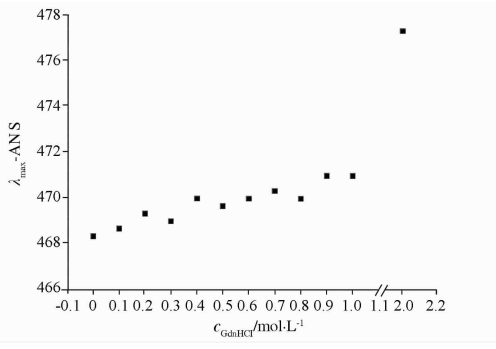


图 5 ANS-BSA 结合物中最大荧光峰位随胍浓度变化图  
Fig. 5 The  $\lambda_{\max}$  of the ANS-BSA conjugates fluorescence emission peak in different concentrations of guanidinium chloride