

• 研究论文 •

变温下荧光猝灭和加强理论公式合理性的比较

杨曼曼 席小莉 杨 频*

(山西大学化学化工学院分子科学研究所 化学生物学与分子工程教育部重点实验室 太原 030006)

摘要 通过荧光和紫外方法研究盐酸左氧氟沙星、氟罗沙星、加替沙星和沃氟沙星四种喹诺酮类药物与人血清白蛋白(HSA)的作用,在不同温度下对荧光加强和猝灭理论公式的等价性和精细差异进行了比较,结果表明:在不同温度下两种理论公式尽管在求取解离常数上所得结果都可视为有效,但猝灭方程的双倒数图反而不及荧光加强方程的双倒数图与体现动态、静态猝灭机理的猝灭曲线一致.对于能量转移效率 E ,我们首次定义:按自由荧光体白蛋白的荧光强度 F_0 和加入药物至荧光不再变化时的荧光强度 F 值计算 F/F_0 ,进而将 F/F_0 代入 $E=1-\frac{F}{F_0}$ 计算能量转移效率 E .它标示出每个体系发生能量转移的最大限度,向体系中再添加药物,已不能发生进一步的猝灭,这一新定义的引入,使得能量转移效率 E 这一量值有可能推广到估算白蛋白运载药物能力的最大限度.

关键词 荧光猝灭和加强;能量转移效率;人血清白蛋白;喹诺酮类药物

Comparison of Reasonableness of the Fluorescence Quenching and Enhancement Equations at Different Temperatures

YANG, Man-Man XI, Xiao-Li YANG, Pin*

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education of China at Institute of Molecular Science, College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract Through the fluorescence and ultraviolet-visible spectrophotometry the action of HSA was studied with the four medicines of levofloxacin hydrochloride, fleroxacin, gatifaxacin and worfloxacin, and the reasonableness of the theories and equations of fluorescence enhancement and quenching at different temperatures was compared. The result shows: at different temperatures the outcomings obtained in determining dissociation constants with such two theories can be seen effective, but the doubly reciprocal curves of quenching equation are not conformed to quenching curves based on dynamic and static quenching mechanism as those of fluorescence enhancement. For the first time energy transfer efficiency E was defined as the fluorescence intensity ratio F/F_0 , where F_0 is the fluorescence intensity of free HSA and F is the fluorescence intensity after addition of medicine till no change of its intensity. It shows the maximum limit when energy transfer occurs in every system, namely no more quenching takes place while addition of more medicine to the solution. The introduction of the new definition makes the energy transfer efficiency E extend to evaluate the limit of the ability of transferring medicine by the albumin possibly.

Keywords fluorescence quenching and enhancement; human serum albumin (HSA); energy transfer efficiency; quinolone-class medicine

喹诺酮类药物在临床上已被广泛应用,具有抗菌谱广、作用强的特点;但对其作用机理,仍有多种不同的

看法,并存在较大的争议^[1~6].对其机理进行研究的一种简单易行的方法就是荧光法.

* E-mail: yangpin@sxu.edu.cn; Tel./Fax: 0351-7011022.

Received October 29, 2005; revised January 17, 2006; accepted March 10, 2006.

应用荧光法研究生物活性小分子与生物大分子的相互作用, 看似简单, 实际上涉及到不少理论方法和作用机理问题. 几年前我们曾分别从荧光猝灭^[7]和荧光加强^[8]两个方面推导得出了新的理论方程并被国内有关同行广泛引用^[9~25]. 我们在文献[25]中主要是在整体层面上论证了荧光猝灭方程和荧光加强方程的等效性, 即实现了对同一类现象(如猝灭)可以用这两种理论公式进行双重处理, 并能得到相同或近似(因为两种理论推导中近似假设的不同)的结果. 问题是: 前文[25]对在两种理论的应用中出现的差异、特点和结果的优劣, 未能给出详细论证, 也未能对变温状态下两种理论处理的结果进行比较. 另外, 我们还发现人们对已有理论公式的应用仍有不少概念模糊的地方, 如: 能量转移效率[见本文式(9)]式中 F_0 和 F 分别为能量受体不存在和存在时能量给予体的荧光发射强度, 而在猝灭实验中, “能量受体存在”有多种浓度, 人们在实际处理中几乎都是选定 1:1 摩尔比一种浓度, 这种处理显然过于简单.

本文拟通过在变温实验条件下, 测定四种喹诺酮类药物与人血清白蛋白作用的荧光光谱作为实例, 对荧光猝灭^[7]和加强^[8]两种理论公式的合理性以及能量转移效率的计算法等常用公式进行更深入地检验和论证.

1 实验部分

1.1 试剂

人血清白蛋白(HSA), 上海化学试剂采供供应站, 电泳纯. 左克(左氧氟沙星), 丽珠集团丽宝生物化学有限公司; 筠菲(氟罗沙星), 沈阳新马药业有限公司; 加迈欣(加替沙星), 浙江亚太药业公司; 君立欣(沃氟沙星), 河南省华鑫制药厂. 以上四种药物均为注射用粉剂. 其它试剂均为国产, 分析纯.

1.2 仪器和方法

HSA 和四种药物用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH=7.4) 配制, 浓度分别为 1×10^{-4} 和 $1\times 10^{-2}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 在 LS-50B 型荧光仪(PE 公司)上测定药物对白蛋白的荧光猝灭. 变温实验用 Huber polystat ccl temperture bath 恒温槽控制温度. 用 Tris-HCl 缓冲液作对照, 1 cm 荧光池, 固定激发波长在 280 nm, 发射谱的扫描范围是 290~500 nm, 测定白蛋白的荧光发射光谱. 测知药物的荧光近似为零, 自由 HSA 在 330 nm 处有较强的荧光. 猝灭实验中首先测定 HSA 浓度为 $1\times 10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (溶液体积为 3 mL) 时的荧光发射谱, 然后测逐次滴加适量(每次加入药物溶液体积为 2 μL 、在假定总体积不变下计算药物浓度)药物猝灭剂后的荧光发射谱. 在作猝灭曲线时, 逐次滴加药物后体系的药物浓度 $[Q]$ 以其与 HSA 浓

度 $[P_0]$ 之比: $[Q]/[P_0]$ 标示. 实验测得体系的猝灭荧光值如表 1.

表 1 在 25 和 45 $^{\circ}\text{C}$ 下向 HSA 溶液逐次分别滴加四种药物时对 HSA 荧光强度(F_0)的次第猝灭(F_n)荧光强度实测值^a

Table 1 The fluorescence intensity (maximum) experimental values F_n of the solution system while titrating gradually and respectively the four medicines to HSA solution (F_0) at 25 and 45 $^{\circ}\text{C}$

药物	F_0	1	2	3	4	5	6
盐酸左氧氟沙星							
25 $^{\circ}\text{C}$	992	866	758	605	478	388	326
45 $^{\circ}\text{C}$	926	733	623	507	397	347	
氟罗沙星							
25 $^{\circ}\text{C}$	985	850	737	645	499	451	365
45 $^{\circ}\text{C}$	964	780	669	593	457	401	341
加替沙星							
25 $^{\circ}\text{C}$	999	899	783	643	540	466	381
45 $^{\circ}\text{C}$	931	771	645	513	423	375	311
沃氟沙星							
25 $^{\circ}\text{C}$	990	770	588	410	309	274	
45 $^{\circ}\text{C}$	941	665	485	341	239	204	

^a HSA, $1\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 药物, 第一次滴加后体系药物浓度 $5\times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1~6 依次等差递增(每次加入 1 或 2 μL 药物原液).

2 原理

2.1 荧光猝灭方程^[26,27]

Stern-Volmer 碰撞猝灭理论方程:

$$F_0/F=1+K_q\tau_0[Q]=1+K_S[Q]$$
 (1)

K_q 是生物分子的猝灭常数, τ_0 是不存在猝灭体时荧光体的荧光寿命, 对生物大分子约为 10 ns^[28], $[Q]$ 是猝灭体的浓度, $K_S=K_q\tau_0$ 是 Stern-Volmer 猝灭常数. 按 Stern-volmer 方程作图如得一直线, 表明只存在一种荧光体, 并且对于猝灭体都是可接近的. 需要指出, 按 Stern-Volmer 方程作图是直线并不一定就是发生了碰撞猝灭, 因为在静态猝灭中, 有时按此方程作图也是直线. 一般区分动态和静态猝灭要根据温度不同的行为来区分.

静态猝灭方程^[7,26,27]:

$$\frac{F_0}{F}=1+K_A[Q]$$
 (2)

对于静态猝灭, 猝灭常数 K_A 就是给体-受体(猝灭体-荧光体)的生成常数. 如果 F_0/F 对 $[Q]$ 作图得直线, 由式(2)可求得该反应的生成常数(即猝灭常数) K_A ; 显然, 它对应于动态猝灭式中的 Stern-Volmer 猝灭常数 K_S . 将式(2)变形可得

$$\frac{1}{F_0-F}=\frac{1}{F_0}+\frac{K_D}{F_0[Q]}$$

(3)

式中解离常数 $K_D=1/K_A$, $[Q]$ 是淬灭剂浓度, F_0 和 F 是自由生物大分子和加入淬灭剂后的荧光强度.

由式(3)的 $(F_0-F)^{-1}$ 对 $[Q]^{-1}$ 作双倒数图, 即可求得解离常数 K_D .

2.2 荧光加强效应^[8]

从荧光敏化角度考察生物大分子同某些配体共存时荧光强度的变化可以导出荧光加强方程式(4). 设生物大分子 P 与配体 M 结合时有 n 个相互独立且等同的结合位置, 在扣除背景荧光后可得:

$$\frac{1}{(\Delta F-F_A)}=\frac{1}{(F_b-F_A)}\left(1+\frac{1}{K_A(nP_t-M_b)}\right)$$

(4)

式中 P_t 为生物大分子的总浓度, 生成物 M_nP 的浓度可表示为 M_b/n , 以及 $M=M_t-M_b$, $P=P_t-(M_b/n)$. 根据式(4), 我们有与变数 $(nP_t-M_b)^{-1}$ 对应的线性函数 $(\Delta F-F_A)^{-1}$, 据此作图, 由斜率可得生成常数 K_A 和结合位置数 n .

2.3 荧光给体-受体间的距离和能量转移机理^[29,30]

根据 Forster 型偶极-偶极无辐射能量转移机理, 转移效率 E 与给体-受体间距离 r 及临界能量转移距离 R_0 有关.

$$E=\frac{R_0^6}{(R_0^6+r^6)}$$

(8)

R_0 是能量转移效率为 50%时的临界距离. R_0 和 r 可由文献[27,28]提供的方法求得:

$$R_0^6=8.8\times10^{-25}(K^2n^{-4}J\phi)$$

(9)

$$J=\frac{\sum F_D(\nu)\epsilon_A(\nu)\nu^{-4}\Delta\nu}{\sum F_D(\nu)\Delta\nu}$$

(10)

当能量转移效率 E 较大时, 可由下式计算:

$$E=1-\frac{F}{F_0}$$

(11)

式中 F_0 和 F 分别为能量受体不存在和存在时能量给予体的荧光发射强度.

3 结果与讨论

3.1 用荧光猝灭理论研究不同温度下药物与人血清白蛋白的作用机理

随着药物的滴定, HSA 荧光在逐渐猝灭, 测得体系的猝灭荧光值如表 1, 按式(2)将 F_0/F 对 $[Q]$ 作图, 从图看

到, 实验点呈轻微向上弯曲, 姑且按线性拟合, 得图 1. 由图 1 直线算得静态猝灭常数(相当于生成常数) K_A 和线性相关系数如表 2.

表 2 四种药物与 HSA 间的静态猝灭常数(对应于生成常数) K_A 和解离常数 $K_D=1/K_A$ 值[基于荧光猝灭公式式(2)由图 1]
Table 2 Static quenching constant K_A , dissociation constant $K_D=1/K_A$ of the four kinds of medicine and HSA, linear interrelation coefficient C [based on fluorescence quenching formula (2) from Figure 1]

药物	$K_A/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K_D/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	C
盐酸左氧氟沙星			
25 ℃	0.780×10^4	12.82×10^{-5}	0.9893
45 ℃	0.728×10^4	13.74×10^{-5}	0.9922
氟罗沙星			
25 ℃	0.638×10^4	15.67×10^{-5}	0.9880
45 ℃	0.626×10^4	15.97×10^{-5}	0.9894
加替沙星			
25 ℃	0.620×10^4	16.13×10^{-5}	0.9933
45 ℃	0.713×10^4	14.03×10^{-5}	0.9958
沃氟沙星			
25 ℃	1.252×10^4	8.00×10^{-5}	0.9942
45 ℃	1.676×10^4	5.97×10^{-5}	0.9925

从图 1 我们首先看到, 4 种药物在不同温度的猝灭曲线接近平行, 即其静态猝灭常数接近相等, 只有沃氟沙星在 45 ℃的直线斜率值略大于 25 ℃时的值, 由此看来此 4 种给体-受体反应基本属于静态猝灭; 其次, 由于不同温度下 F_0/F 对 $[Q]$ 实验点作图呈轻微向上弯曲, 所以它们并不是纯静态反应, 特别是沃氟沙星偏离纯静态反应更多一点; 再次, 由于偏离纯静态反应, 由猝灭曲线得出的解离常数 K_D 显然是不精确的. 为了得到更精确的 K_D , 进而应用式(3)作双倒数图, 可以得到良好的直线如图 2. 由图 2 算得四种药物与 HSA 的解离常数 K_D 、线性相关系数 C 等如表 3.

从猝灭方程观察, 不妨把静态猝灭方程式(2)与动态猝灭方程即 Stern-Volmer 碰撞猝灭方程式(1)联立, 则得:

$$K_A=1/K_D=K_q\times\tau_0$$

(12)

其中, 生物分子的荧光寿命 τ_0 约为 10 ns^[28], 由 K_D 值即可算得两种药物的表观猝灭常数 K_q 值如表 3 和 4. 已知各种猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2.0\times10^{10}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[31]. 由表中数据可以看出, 这些药物对白蛋白的表观猝灭常数 K_q 远大于扩散控制的猝灭常数, 表明这些药物对白蛋白的猝灭主要不是由于动态碰撞引起的.

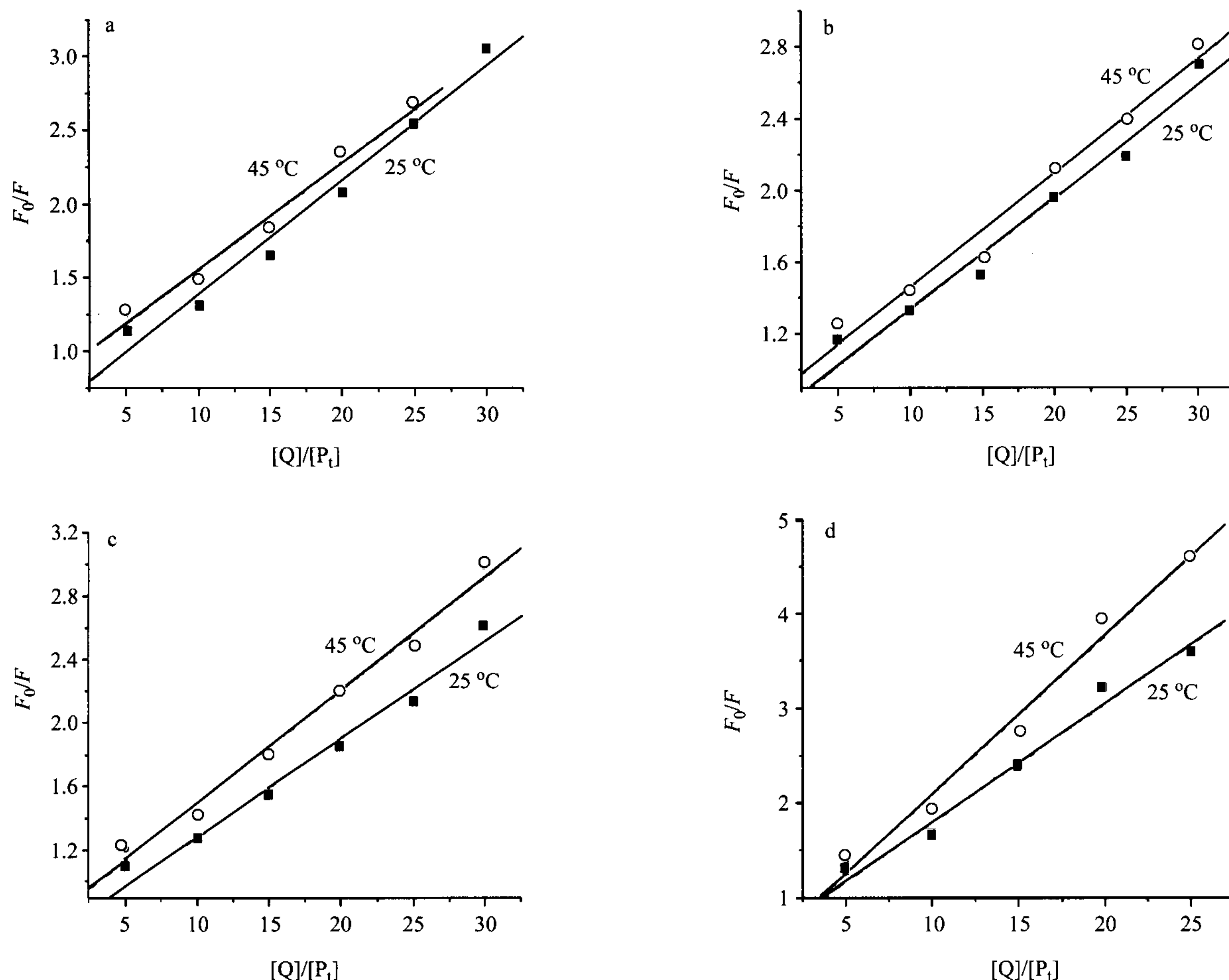


图 1 四种药物对 HSA 的猝灭曲线

(a) 盐酸左氧氟沙星; (b) 氟罗沙星; (c) 加替沙星; (d) 沃氟沙星

Figure 1 The quenching curves of four kinds of medicine to HSA

(a) Levofloxacin Hydrochloride; (b) Fleroxacin; (c) Gatifloxacin; (d) Worfloxacin

3.2 用荧光加强理论公式研究不同温度下药物与白蛋白的作用机理

采用表 1 的实验数据, 应用式(4)作双倒数图, 也得到良好的直线如图 3. 由图 3 算得四种药物与 HSA 的解离常数、线性相关系数如表 4.

由图 3 看到, 四种药物在不同温度下均得到了良好的直线, 但与图 2 不同的是在 25 和 45 °C 下的直线几乎重合.

3.3 关于荧光给体-受体间的作用距离和能量转移效率

关于荧光给体-受体间的作用距离和能量转移效率, 我们应用式(8)~(11)作计算, 显然, 只要得知 E , K^2 , ϕ 和 n , 并通过实测光谱求出积分 J , 就可算出 R_0 和 r . 利用前面测定的人血清白蛋白 HSA 的荧光发射谱和与白蛋白 1:1 摩尔比的药物溶液的吸收谱(图 4), 按照文献[7]的方法, 分别算得两种药物的积分 J 、临界能量转移距离 R 、能量转移效率 E 、给体-受体间距离 r 值如表

3. 其中, 能量转移效率 E 我们首次定义: 按自由荧光体白蛋白的荧光强度 F_0 和加入药物至荧光不再变化时的荧光强度 F 值代入式(11)计算.

4 结论

比较图 2 和 3 可以看到两者明显的差别: 基于荧光猝灭公式(3)得到的图 2, 四种药物在不同温度的直线呈剪式明显分开: 25 °C 的直线在上, 45 °C 的在下; 而基于荧光加强公式(4)得到的图 3, 四种药物在不同温度的直线呈现重合. 由此必然得出: 基于图 2 和荧光猝灭公式(3)算得四种药物在 25 °C 的 K_D 值大于在 45 °C 的 K_D 值(表 3); 而基于图 3 和荧光加强公式(4)算得四种药物在 25 和 45 °C 的 K_D 值基本相等(表 4). 如果我们将图 2, 3 和图 1 进行比较发现, 单从四种药物的直线斜率上看, 图 3 比图 2 更相近图 1, 这意味着由其得出的解离常数和猝灭机理至少在相对意义上更一致, 这就是: 由于在

表 3 四种药物与 HSA 间的解离常数 K_D 、线性相关系数 C 、猝灭常数 K_q 、能量转移效率 E 、作用距离 R_0 和 r 值(基于荧光猝灭公式(3), 给体-受体间的距离取自文献[7])

Table 3 Dissociation constant of the four kinds of medicine and HSA K_D , linear interrelation coefficient C , quenching constant K_q , energy transfer efficiency E , action distance R_0 and r (based on fluorescence quenching formula Eq. 3 and equation of distance of donor-acceptor from [7])

药物	$K_D/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	C	$J/10^{-14}$	R_0/nm	E	r/nm
盐酸左氧氟沙星							
25 °C	3.93×10^{-5}	2.50×10^{12}	0.9985	1.21	2.53	0.671	2.25
45 °C	2.01×10^{-5}	4.98×10^{12}	0.9957	1.16	2.51	0.625	2.31
沃氟沙星							
25 °C	2.14×10^{-5}	4.70×10^{12}	0.9977	3.38	3.00	0.723	2.56
45 °C	1.35×10^{-5}	7.40×10^{12}	0.9994	10.0	3.60	0.783	2.90
氟罗沙星							
25 °C	3.44×10^{-5}	2.90×10^{12}	0.9987	4.31	3.13	0.629	2.86
45 °C	2.31×10^{-5}	4.30×10^{12}	0.9957	0.75	1.59	0.646	1.44
加替沙星							
25 °C	5.10×10^{-5}	1.96×10^{12}	0.9984	0.38	2.09	0.619	1.93
45 °C	2.60×10^{-5}	3.84×10^{12}	0.9987	0.90	2.40	0.666	2.15

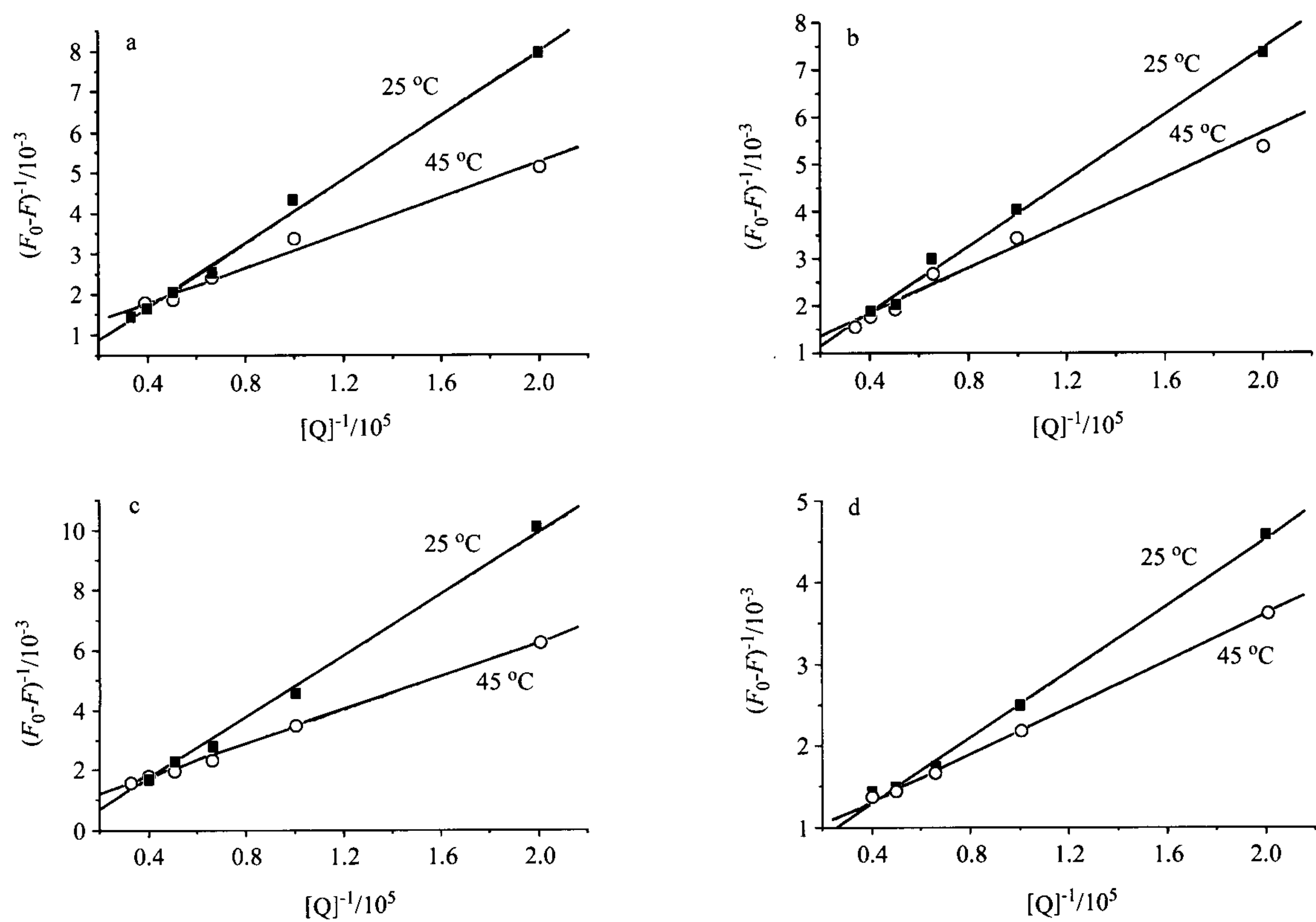


图 2 基于荧光猝灭公式(3)四种药物与 HSA 作用的双倒数图
(a)盐酸左氧氟沙星; (b)氟罗沙星; (c)加替沙星; (d)沃氟沙星

Figure 2 The double reciprocal curves of the action of the four kinds of medicine with HSA based on fluorescence quenching formula (3)

(a) Levofloxacin Hydrochloride; (b) Fleroxacin; (c) Gatifloxacin; (d) Worfloxacin

25 和 45 °C 得出的四种药物的直线斜率基本相同, 所以它们的猝灭基本属于静态机理. 这一结果的有趣在于, 猝灭方程的双倒数[由式(3)]图反而不及荧光加强方程的双倒数[由式(4)]图与体现动态、静态猝灭机理的图 1 猝灭曲线一致.

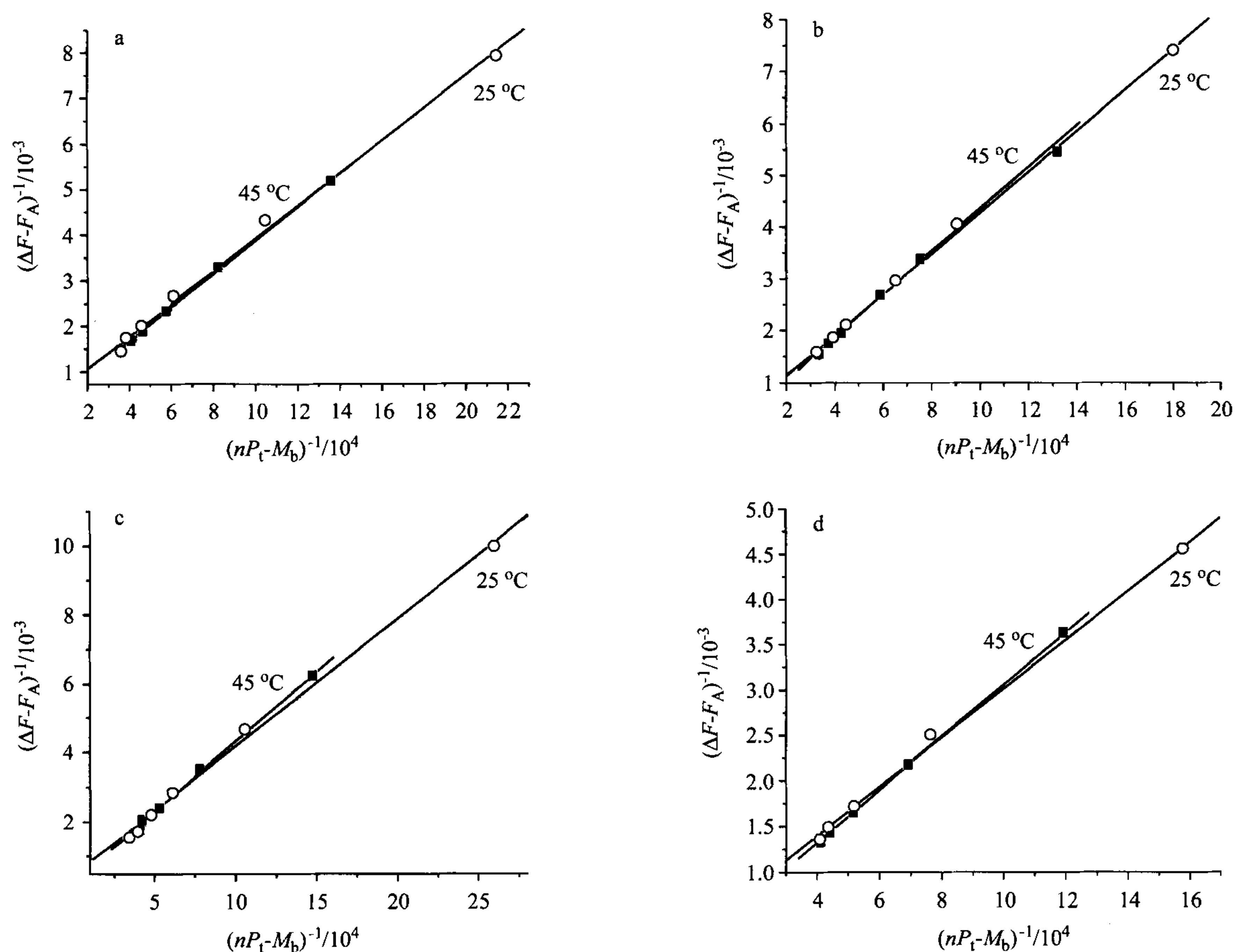


图 3 基于荧光加强公式(4)四种药物与 HSA 作用的双倒数图
(a)盐酸左氧氟沙星; (b)氟罗沙星; (c)加替沙星; (d)沃氟沙星

Figure 3 The double reciprocal curve of the action of the four kinds of medicine and HSA based on fluorescence enhancement formula (4)
(a) Levofloxacin Hydrochloride; (b) Fleroxacin; (c) Gatifloxacin; (d) Worfloxacin

表 4 四种药物与 HSA 间的解离常数 K_D 、线性相关系数 C 、猝灭常数 K_q 、能量转移效率 E 、作用距离 R_0 和 r 值(基于荧光加强公式(4), 给体-受体间的距离取自文献[7])

Table 4 Dissociation constant of the two kinds of medicine and HSA K_D , linear interrelation coefficient C , quenching constant K_q , energy transfer efficiency E , action distance R_0 and r (based on fluorescence enhancement formula Eq. (4) and equation of distance of donor-acceptor from [7])

药物	$K_D/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	C	$J/10^{-14}$	R_0/nm	E	r/nm
盐酸左氧氟沙星							
25 °C	1.16×10^{-5}	8.57×10^{12}	0.9992	1.21	2.53	0.671	2.25
45 °C	1.26×10^{-5}	7.91×10^{12}	0.9997	1.16	2.51	0.625	2.31
沃氟沙星							
25 °C	0.79×10^{-5}	12.6×10^{12}	0.9997	3.38	3.00	0.723	2.56
45 °C	0.59×10^{-5}	16.9×10^{12}	0.9998	10.0	3.60	0.783	2.90
氟罗沙星							
25 °C	1.44×10^{-5}	5.77×10^{12}	0.9995	4.31	3.13	0.629	2.86
45 °C	1.40×10^{-5}	7.14×10^{12}	0.9997	0.75	1.59	0.646	1.44
加替沙星							
25 °C	1.42×10^{-5}	7.07×10^{12}	0.9991	0.38	2.09	0.619	1.93
45 °C	1.26×10^{-5}	7.92×10^{12}	0.9997	0.90	2.40	0.666	2.15

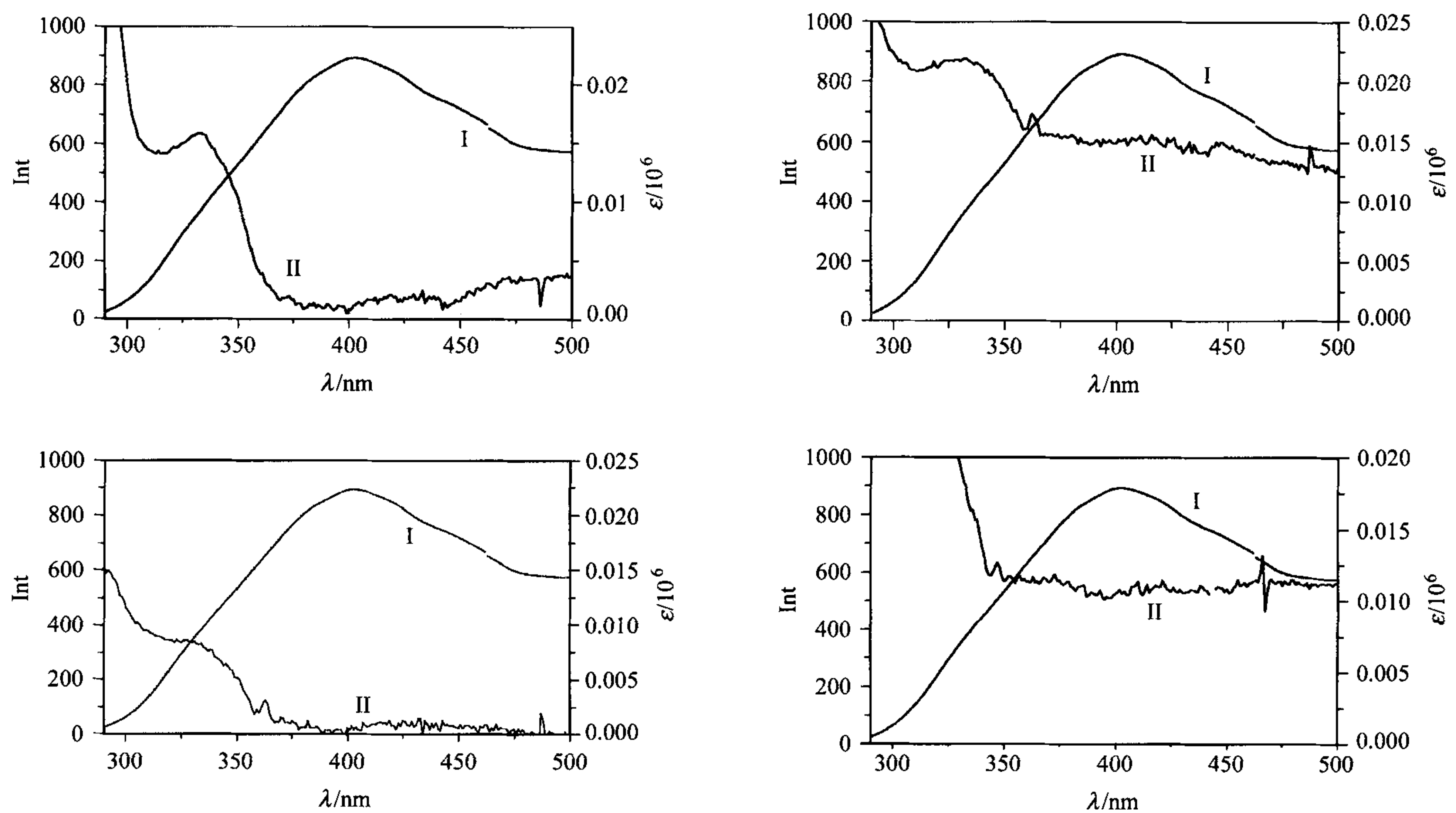


图 4A 25 °C 下 HSA 的荧光发射谱(I)和药物吸收谱(II)的重叠
(a)盐酸左氧氟沙星; (b)氟罗沙星; (c)加替沙星; (d)沃氟沙星

Figure 4A Overlap between the fluorescence emission spectrum (I) of HSA and the absorption spectrum (II) of medicine at 25 °C
(a) Levofloxacin hydrochloride; (b) Fleroxacin; (c) Gatifoxacin; (d) Worfloxacin

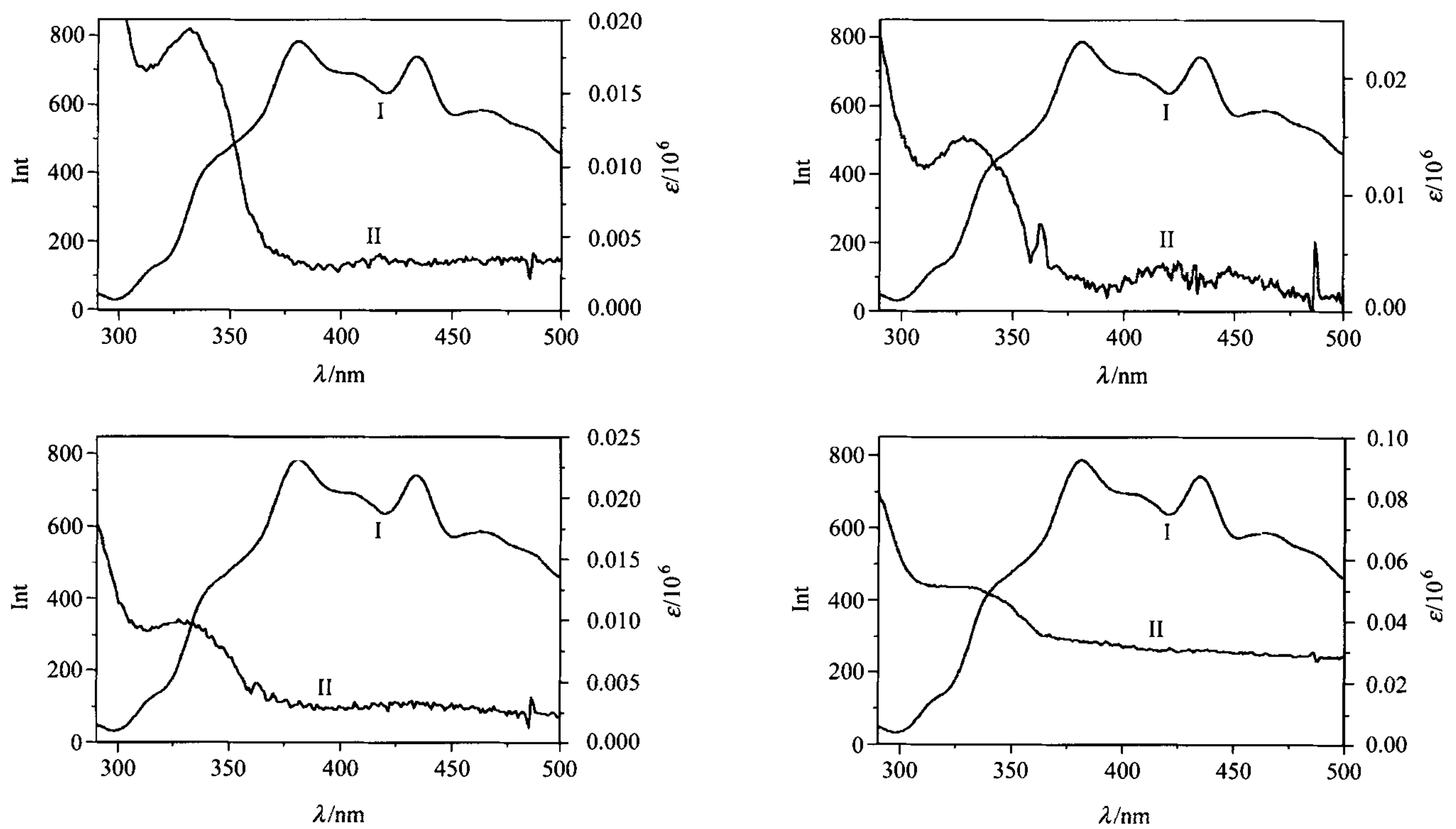


图 4B 45 °C 下 HSA 的荧光发射谱(I)和药物吸收谱(II)的重叠
(a)盐酸左氧氟沙星; (b)氟罗沙星; (c)加替沙星; (d)沃氟沙星

Figure 4B Overlap between the fluorescence emission spectrum (I) of HSA and the absorption spectrum (II) of medicine at 45 °C
(a) Levofloxacin hydrochloride; (b) Fleroxacin; (c) Gatifoxacin; (d) Worfloxacin

在 25 和 45 °C 对于四种药物从静态猝灭方程式(2) $F_0/F=1+K_A[Q]$ 得出的 K_D 值是 $5.97 \times 10^{-5} \sim 15.97 \times 10^{-5}$, 从其式(3)双倒数图得出的 K_D 值是 $1.35 \times 10^{-5} \sim 5.10 \times 10^{-5}$; 从荧光加强双倒数方程式(4)得出的 K_D 值是 $5.9 \times 10^{-6} \sim 1.44 \times 10^{-5}$. 分析这些数值可知, 从猝灭曲线得出的 K_D 值显然偏大, 这是由于其实验点偏离线性所致. 由两类双倒数图得出的 K_D 值是基于猝灭公式(3)的偏大, 基于加强公式(4)的偏小, 但都在相同的数量级, 相差均小于 3.5 倍, 即在同一个数量级, 显然这两类公式所得结果都可视为有效.

在本研究体系中, 四种药物与白蛋白在能量转移效率为 50% 时的临界距离 R_0 值在 1.59~3.60 nm 之间; 其给体-受体间距离 r 值在 1.44~2.90 nm 之间, 即在 45 °C 时的氟罗沙星与白蛋白色氨酸残基之间的距离最小, 其能量转移效率为 65%; 而在 45 °C 时的沃氟沙星的相应距离最大且其能量转移效率高达 78%, 这一结果显示, 最小距离和最大转移效率都在较高的 45 °C 时.

在已有文献中对式(11)能量转移效率 E 的计算, 几乎无例外的^[7~25]都是在 F/F_0 的计算中代入白蛋白与药物为 1:1 摩尔比时的荧光发射谱强度 F 值与自由白蛋白的荧光发射谱强度 F_0 值. 首先, 这样计算对于给体-受体都是分子量差别不是很大的分子是合适的. 而本实验中白蛋白的分子量是 67000~68000, 而药物分子的分子量在 300~400 之间, 两者相差 100 多倍, 一个白蛋白大分子可以结合不等量的许多药物小分子, 用其 1:1 摩尔比的溶液荧光强度 F 值作计算, 不能充分反映两者结合的特征; 其次, 用最大猝灭时药物存在体系的荧光发射谱强度 F 值与自由白蛋白的荧光发射谱强度 F_0 值之比来标示能量转移效率 E , 更能体现该体系发生能量转移的最大限度, 即综合的能量转移效率. 按照本文对 E 值计算新的定义, 我们得出四种药物的能量转移效率在 0.629~0.783 之间, 它标示出每个体系发生能量转移的最大限度, 向体系中再添加药物, 已不能发生进一步的猝灭. 这一新定义的引入, 使得能量转移效率 E 这一量值有可能推广到估算白蛋白运载药物能力的最大限度.

References

- 1 Son, G. S.; Yeo, J. A.; Kim, M. S.; Kim, S. K.; Holmén, A.; Åkerman, B.; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6451.
- 2 Kampranis, S. C.; Maxwell, A. J. *Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22615.
- 3 Vilfan, I. D.; Drevenšek, P.; Turel, I.; Nataša, P. U. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1628*, 111.
- 4 Sissi, C.; Perdonà, E.; Domenici, E.; Feriani, A.; Howells, A. J.; Maxwell, A.; Palumbo, M. *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 195.
- 5 Son, G.-S.; Yeo, J. A.; Kim, J. M.; Kim, S. K.; Moon, H. R.; Nam, W. *Biophys. Chem.* **1998**, *74*, 225.
- 6 Skauge, T.; Turel, I.; Sletten, E. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 239.
- 7 Yang, M.-M.; Yang, P.; Zhang, L.-W. *Chin. Sci. Bull.* **1994**, *39*, 734.
- 8 Yang, P.; Yang, M.-M.; Yang, B.-S. *Chin. J. Chem.* **1996**, *14*, 9.
- 9 Zhu, K.; Tong, S. Y. *Chem. J. Chin. Univ.* **1996**, *17*, 539 (in Chinese).
(朱铿, 童沈阳, 高等学校化学学报, **1996**, *17*, 539.)
- 10 Dong, R. A.; Zhang, F. S.; Song, X. Q. *Chin. Sci. Bull.* **1996**, *41*, 1001 (in Chinese).
(董润安, 张复实, 宋心琦, 科学通报, **1996**, *41*, 1001.)
- 11 Zhu, K.; Tong, S.-Y. *Acta Chim. Sinica* **1997**, *55*, 405 (in Chinese).
(朱铿, 童沈阳, 化学学报, **1997**, *55*, 405.)
- 12 Lu, J.-X.; Zhang, G.-Z.; Zhao, P.; He, X.-W.; Shi, H.-M. *Acta Chim. Sinica* **1997**, *55*, 915 (in Chinese).
(卢继新, 张贵珠, 赵鹏, 何锡文, 史慧明, 化学学报, **1997**, *55*, 915.)
- 13 Yu, T.-Z.; Tao, Z.-Y. *Spectrosc. Spec. Anal.* **1999**, *19*, 453 (in Chinese).
(俞天智, 陶祖贻, 光谱学与光谱分析, **1999**, *19*, 453.)
- 14 Zhu, K.; Tong, S.-Y. *Chin. J. Anal. Chem.* **1996**, *24*, 1263 (in Chinese).
(朱铿, 童沈阳, 分析化学, **1996**, *24*, 1263.)
- 15 Yang, M.-M.; Yang, P.; Xi, X.-L. *Chin. Sci. Bull.* **1997**, *42*, 1429.
- 16 Xi, X.-L.; Yang, M.-M.; Han, X.-J. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2001**, *17*, 781 (in Chinese).
(席小莉, 杨曼曼, 韩小见, 无机化学学报, **2001**, *17*, 781.)
- 17 Yang, P.; Yang, B.-S.; Ci, Y.-X.; Yang, Y.-S. *Basic Med. Sci. Clin.* **1995**, *15*, 255 (in Chinese).
(杨频, 杨斌盛, 慈云祥, 杨燕生, 基础医学与临床, **1995**, *15*, 255.)
- 18 Yang, P.; Ma, G.-B. *Chin. Sci. Bull.* **1990**, *35*, 821.
- 19 Yang, P.; Ren, R.; Yang, B.-S. *Chem. Res. Appl.* **1994**, *6*, 22 (in Chinese).
(杨频, 任蕤, 杨斌盛, 化学研究与应用, **1994**, *6*, 22.)
- 20 Yang, P.; Yang, B.-S.; Wang, J.-L. *Chin. Sci. Bull.* **1989**, *34*, 747.
- 21 Guo, M.-L.; Yang, P.; Yang, B.-S. *Chin. Sci. Bull.* **1996**, *41*, 1098.
- 22 Ma, G.-B.; Yang, P.; Zhai, J. *Chin. Sci. Bull.* **1994**, *39*, 37.
- 23 Yang, P.; Gao, F. *Principle of Bioinorganic Chemistry*, Science Press, Beijing, **2002**, pp. 322~342; pp. 489~494 (in Chinese).
(杨频, 高飞, 生物无机化学原理, 科学出版社, 北京, **2002**, pp. 322~342, pp. 489~494.)
- 24 Yang, P. *Introduction to Bioinorganic Chemistry*, Xi'an Jiaotong University Press, Xi'an, **1991**, pp. 145~166 (in Chinese).

Chinese).

(杨频, 生物无机化学导论, 西安交通大学出版社, 西安, 1991, pp. 145~166.)

25 Yang, M.-M.; Xi, X.-L.; Yang, P. *Chin. Sci. Bull.* **2005**, *50*, 2571.

26 Sikaris, K. A.; Thulborn, K. A.; Sawyer, W. H. *Chem. Phys.* **1981**, *29*, 397.

27 Chatelier, R. C.; Sawyer, W. H. *Eur. Biophys. J.* **1985**, *11*, 179.

28 Lakowica, J. R.; Weber, G. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4161.

29 Forster, I. *Modern Quantum Chemistry*, Academic Press, New York, **1965**.

30 Stryer, L.; Haugland, R. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1967**, *58*, 719.

31 Ware, W. R. *J. Phys. Chem.* **1962**, *66*, 455.

(A0510291 DING, W. F.; FAN, Y. Y.)