

# 甲吡铂与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究

彭娟<sup>1,2</sup>, 丁浩<sup>3</sup>, 叶满萍<sup>3</sup>, 胡劲<sup>1</sup>, 普绍平<sup>2\*</sup>, 丛艳伟<sup>2</sup>, 王应飞<sup>2</sup>

(1. 昆明理工大学 材料科学与工程学院, 昆明 650093; 2. 昆明贵研药业有限公司, 昆明 650106;

3. 中国计量大学 光学与电子科技学院, 杭州 310018)

**摘要:** 用稳态荧光光谱及时间分辨荧光技术研究水溶液中甲吡铂与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。加入甲吡铂后, BSA 荧光发射峰从 335 nm 红移到 337.5 nm, 并伴随着荧光强度的猝灭, 表明甲吡铂与 BSA 发生了相互作用; 单指数拟合得到的荧光寿命结果证实, 甲吡铂对 BSA 的猝灭为静态猝灭; 荧光寿命的双指数拟合结果表明, BSA 的内在荧光主要是由第 212 位和第 134 位的色氨酸残基贡献的, BSA 中第 212 位色氨酸残基和苯丙氨酸残基可能是甲吡铂的靶向目标。

**关键词:** 甲吡铂; 牛血清白蛋白(BSA); 稳态荧光; 时间分辨荧光; 荧光寿命

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0676(2020)01-0031-06

## Fluorescence Spectroscopy Study of the Interaction between Picoplatin and Bovine Serum Albumin

PENG Juan<sup>1,2</sup>, DING Hao<sup>3</sup>, YE Man-ping<sup>3</sup>, HU Jing<sup>1</sup>, PU Shao-ping<sup>2\*</sup>, CONG Yan-wei<sup>2</sup>, WANG Ying-fei<sup>2</sup>

(1. Faculty of Materials Science and Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China;

2. Guiyan Pharmaceutical Co. Ltd., Kunming 650106, China;

3. College of Optical and Electronic Technology, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The interaction between picoplatin and bovine serum albumin (BSA) in aqueous solution was studied by steady-state fluorescence spectroscopy and time-resolved fluorescence techniques. With the introduction of picoplatin, the fluorescence emission peak of BSA redshifted from 335 nm to 337.5 nm, accompanied by the quenching of fluorescence intensity, indicating that there was interaction between picoplatin and BSA. The single exponential fitting of the fluorescence decay confirmed that the quenching of the BSA by picoplatin is static. The double exponential fitting of the fluorescence decay indicates that the intrinsic fluorescence of BSA is mainly contributed by the tryptophan (Trp) residues at the 212<sup>th</sup> and 134<sup>th</sup> positions. The 212<sup>th</sup> Trp residue and the phenylalanine (Phe) residue in BSA may be the targets of picoplatin.

**Key words:** picoplatin; bovine serum albumin(BSA); steady-state fluorescence; time-resolved fluorescence; fluorescence lifetime

新一代铂族金属抗癌药物甲吡铂具有高效、广谱、低毒、给药方式多样以及克服交叉耐药能力强等优点<sup>[1-3]</sup>, 目前已在开展 II/III 期临床研究<sup>[4]</sup>。甲吡铂的中文名称为顺式-二氯-氨(2-甲基吡啶)合铂(II),

化学式为  $cis-[PtCl_2(NH_3)(C_6H_7N)]$ , 化学结构如式(1)所示。

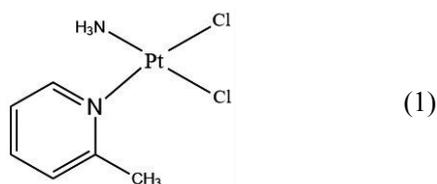
抗癌药进入人体后, 通过血浆的储存和运输到达靶部位, 继而产生药理作用。血清白蛋白是血浆

收稿日期: 2019-07-17

基金项目: 云南省科技计划项目(2016DH008, 抗肿瘤新药仿制创新与成果转化核心技术平台)

第一作者: 彭娟, 女, 高级工程师, 研究方向: 铂类抗肿瘤药物的研究和开发。E-mail: ynpengjuan@163.com

\*通讯作者: 普绍平, 男, 高级工程师, 研究方向: 铂类抗肿瘤药物的研究和开发。E-mail: pushaoping@163.com



中含量最高的一种载体蛋白, 抗癌药与蛋白质相互作用的深入研究, 对阐明抗癌药的作用机制有着重要的意义<sup>[5]</sup>。牛血清白蛋白(BSA)与人血清白蛋白具有高度的同源性, 而且 BSA 价格更低, 也更易获取。

光谱法特别是荧光光谱法、时间分辨荧光技术等已成为研究生物大分子与小分子、离子相互作用的重要手段<sup>[6-7]</sup>, 近年来用于抗癌药物与蛋白质相互作用的研究陆续有报道<sup>[8-13]</sup>。

本文以 BSA 作为血药体系中的载体蛋白, 采用荧光光谱法及时间分辨荧光技术<sup>[14-15]</sup>研究在模拟人体生理 pH 值条件下铂类抗癌药物甲哌铂与 BSA 之间的相互作用。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

荧光光谱采用日本日立 F-2700 型的荧光分光光度计。时间分辨荧光寿命测试采用英国 HORIBA 公司 Tempro 型单光子计数荧光寿命光谱仪进行, 激发光源是波长为 256 nm 的 Nano LED 脉冲光源, 脉宽 1 ns, 自带 DAS6 荧光衰减曲线分析软件。pH 值采用上海精密科学仪器有限公司的雷磁 PHS-25 型 pH 计。两通光和四通光的石英比色皿, 光程均为 10 mm。

BSA 购自上海伯奥生物科技有限公司(纯度为 99%), 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl), NaOH 等均为分析纯试剂。实验用水为去离子水, 经检测无荧光杂质。

### 1.2 溶液配制

1) Tris-HCl 缓冲溶液: 称取 3.94 g Tris-HCl 晶体溶解于 500 mL 的去离子水中, 配成 0.050 mol/L 的溶液, 用 0.6 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 7.4, 静置备用。

2) BSA 母液: 称取 0.040 g BSA 粉末溶解于 50 mL Tris-HCl 缓冲溶液中, 配成 0.80 mg/mL 的 BSA 母液, 静置备用。

3) 甲哌铂母液: 称取 0.0075 g 甲哌铂溶解于 20 mL Tris-HCl 缓冲溶液中, 配成 1.0 mmol/L 的甲哌铂母液, 静置备用。

4) 甲哌铂稀释液系列(编号 a~h): 在 8 个 10 mL 试管中, 分别加入不同量的甲哌铂母液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度, 最终得到 8 个不同浓度甲哌铂稀释液, 对应浓度依次为: 0.0001、0.0005、0.003、0.005、0.007、0.009、0.020 和 0.080 mmol/L。

5) 甲哌铂与 BSA 混合液系列(编号: a'~h'): 在 8 个 5 mL 试管中, 分别依次加入 1 mL BSA 母液和 1 mL 不同浓度甲哌铂稀释液, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至刻度, 混匀静置 2 min, 得到不同浓度的甲哌铂与 BSA 混合液。混合液中 BSA 的浓度 0.16 mg/mL, 甲哌铂浓度依次为: 0.00002、0.0001、0.0006、0.001、0.0014、0.0018、0.0040 和 0.016 mmol/L。

## 1.3 光谱测定

1) 稳态荧光光谱。设定激发波长为 256 nm 时, 测定荧光发射波长范围为 270~450 nm, 设定激发波长为 280 nm 时, 测定荧光发射波长范围为 290~450 nm。扫描速度为 300 nm/min, 狭缝宽度为 5 nm, 光电倍增管电压为 400 V (测量甲哌铂时为 700 V), 对 1.2 中相应的溶液进行测定。

2) 时间分辨荧光。以测量 Tris-HCl 缓冲溶液的衰减曲线作为仪器响应曲线, 狭缝宽度为 12 mm, 最大光子数为 3000, 在室温下测量, 激发波长为 256 nm, 测量波长为 335 nm 和 281 nm, 对 1.2 中溶液系列进行测定, 用指数衰减曲线进行拟合。

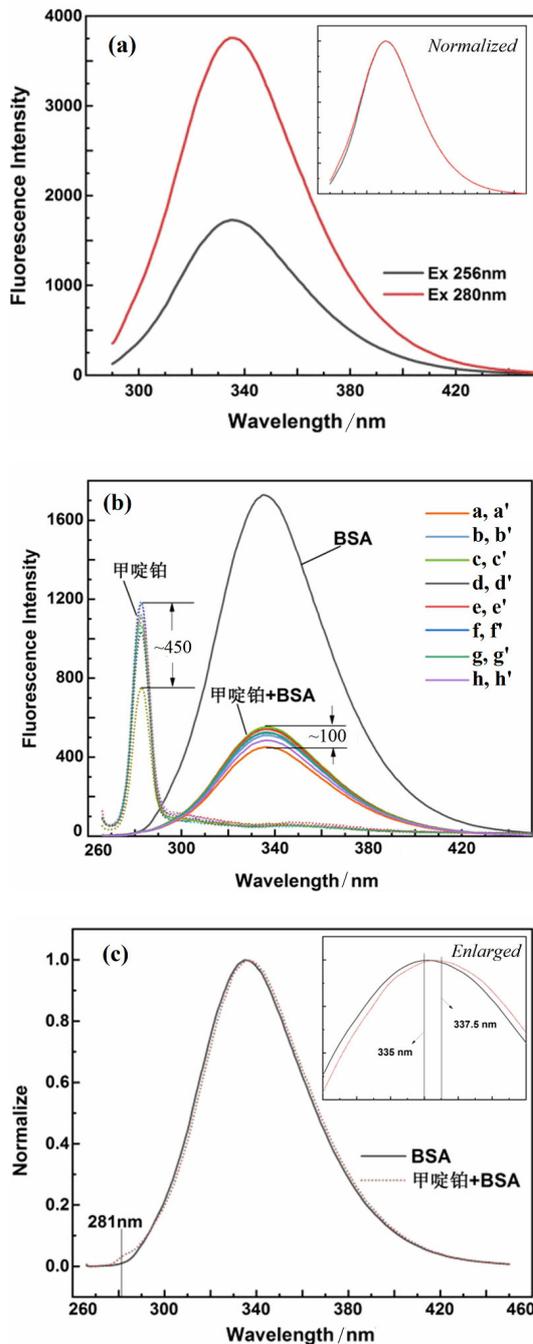
## 2 结果与讨论

### 2.1 稳态荧光光谱特征

图 1 为甲哌铂与 BSA 混合液的不同测试条件下的荧光光谱图。

一般荧光光谱的测试采用最大吸收波长作为荧光的激发波长, BSA 的最大吸收峰在 278 nm, 一般采用 280 nm 作为激发波长。受荧光寿命仪器激发波长实验条件的限制, 选择 256 nm 作为激发波长。为此对不同激发波长下的荧光强度进行对比测定, 图 1(a)是浓度为 0.16 mg/mL 的 BSA 溶液在 256 nm 和 280 nm 激发下的荧光光谱, 内插图 2 为 2 个激发波长下的荧光光谱归一化处理后的结果。由图 1(a)可以看出, BSA 在 256 nm 和 280 nm 激发下的荧光光谱基本一致, 发射峰最大处都在 335 nm, 表明采用 256 nm 激发波长是可行的。

图 1(b)是在 256 nm 波长激发下, BSA 溶液(0.16 mg/mL)、甲哌铂稀释液系列、甲哌铂与 BSA 混合



(a). 256 nm 和 280 nm 激发下荧光光谱比较(Comparison of fluorescence spectra excited at 256 and 280 nm); (b). 荧光淬灭(Fluorescence quenching); (c). 荧光发射最大红移(Maximum red shift of fluorescence emission)

图 1 荧光光谱

Fig.1 The fluorescence spectra

液系列的荧光光谱。由图 1(b)可以看出，在甲啶铂的荧光发射峰 283 nm 处。甲啶铂稀释液系列(a~h)浓度变化范围 800，而荧光强度为 750~1200，变化范围约 450，荧光强度与甲啶铂浓度变化无规律性关系。加入甲啶铂后，BSA 的荧光发生淬灭，荧光

强度从大约 1700 降低到 400 左右，猝灭程度与甲啶铂浓度同样无规律性的关系。混合液系列(a'~h')中甲啶铂的浓度是甲啶铂稀释液系列(a~h)中的 1/5，荧光强度波动范围约为 100，也约为荧光强度变化范围的 1/5。由此推测，不同浓度的甲啶铂与 BSA 混合液的荧光强度波动是甲啶铂自身造成的。据此推测甲啶铂对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭。根据图 1(b)，在 256 nm 波长激发下，甲啶铂在 300~400 nm 处的荧光发射强度很小，因此在后续测定中，当测量波长为 335 nm 时，不考虑甲啶铂自身的荧光衰减情况。在甲啶铂和 BSA 的混合液中，当甲啶铂的浓度为 0.001 mmol/L 时，BSA 荧光发射峰发生最大红移，从 335 nm 红移到 337.5 nm，红移了 2.5 nm，如图 1(c)所示。推测甲啶铂对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭。

### 2.2 时间分辨荧光技术测定荧光寿命

BSA 分子中含有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)以及苯丙氨酸(Phe)等氨基酸残基，能发射较强的内源荧光<sup>[16-17]</sup>。甲啶铂对 BSA 产生了荧光猝灭，要判断甲啶铂对 BSA 荧光猝灭是静态猝灭还是动态猝灭，需要知道荧光猝灭随温度的变化关系<sup>[18]</sup>、吸收光谱<sup>[19]</sup>或荧光寿命<sup>[20]</sup>等相关信息。

为了进一步探讨甲啶铂对 BSA 的荧光猝灭机理，以测量 Tris-HCl 缓冲溶液的衰减曲线作为仪器响应曲线(Prompt)，测量常温下 BSA 溶液(0.16 mg/mL)、甲啶铂(0.005 mmol/L)-BSA(0.16 mg/mL)混合液的时间分辨荧光。激发波长为 256 nm，测量波长为 335 nm，由仪器自带的 DAS6 荧光衰减曲线分析软件完成荧光寿命计算。通过调整拟合方程、拟合范围等参数，得到拟合指数( $\chi^2$ )接近于 1 的荧光寿命拟合结果，测定和计算的结果如图 2 所示。

由荧光衰减曲线(图 2(a))可见，在 335 nm 测量，加入甲啶铂后的 BSA 溶液的荧光衰减曲线与单一 BSA 溶液的荧光衰减曲线几乎完全重叠。说明加入甲啶铂后，BSA 的组分在常温条件下不会发生变化。通过单指数拟合(图 2(b))得到荧光寿命值，BSA 溶液的荧光寿命为 5.47 ns，加入甲啶铂后的 BSA 溶液变为 5.87 ns，2 种荧光寿命的比率接近于 1。加入甲啶铂后的 BSA 溶液荧光寿命的微小变化符合猝灭的静态性质<sup>[21]</sup>。因此推测，甲啶铂对 BSA 的荧光猝灭为静态猝灭，这与稳态荧光光谱结果一致。据文献[21-22]数据，Trp 荧光寿命为 6 ns，与 BSA 的荧光寿命比较接近。由此可以判断，BSA 中的荧光主要是由 Trp 残基产生。

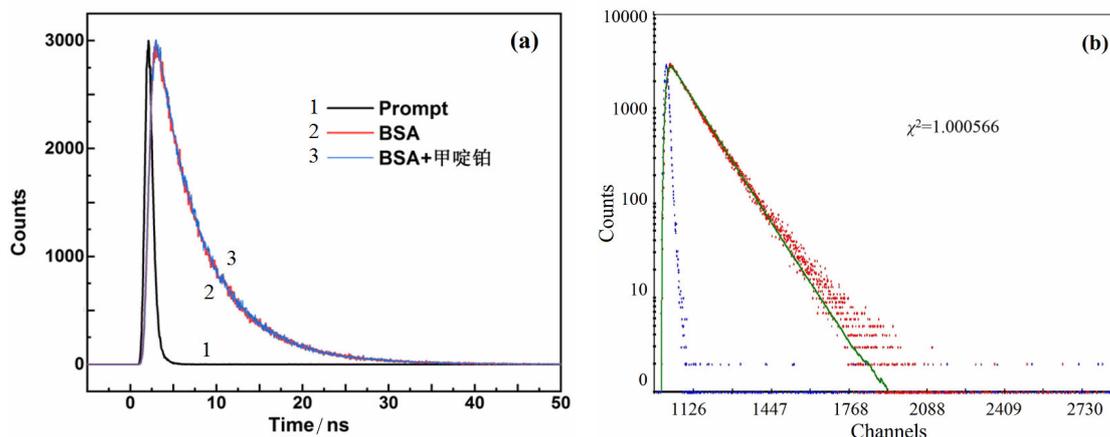


图 2 测量波长为 335 nm 的荧光衰减曲线(a)和单指数拟合曲线(b)

Fig.2 Fluorescence attenuation curve (a) and single exponential fitting curve (b) probed at 335 nm

将甲脞铂与 BSA 混合液的荧光强度衰减曲线通过双指数拟合, 拟合方程为:

$$I(t) = B_1 e^{-t/\tau_1} + B_2 e^{-t/\tau_2} \quad (2)$$

这里的  $B_1$  和  $B_2$  分别是第  $i$  个寿命的衰减幅度,  $\tau_1$  和  $\tau_2$  分别是第  $i$  个拟合的寿命,  $t$  为时间。经过双指数拟合后计算得到的不同浓度的甲脞铂与 BSA 混合液的荧光寿命参数, 如表 1 所列。

表 1 BSA(12.12 mmol/L)与甲脞铂混合液的拟合参数及荧光寿命(测定波长 335 nm)

Tab.1 Fitting parameters and fluorescence life of BSA (12.12 mmol/L) mixed with picoplatin (measured at 335 nm)

甲脞铂浓度/ (mmol/L)	$B_1$	$B_2$	$\tau_1$ /ns	$\tau_2$ /ns	$\chi^2$
0	0.0149	0.0447	2.444	6.300	1.0055
0.0001	0.0160	0.0448	2.715	6.392	0.9989
0.0005	0.0162	0.0458	2.395	6.265	1.0049
0.003	0.0186	0.0425	2.983	6.530	1.0011
0.005	0.0164	0.0441	2.807	6.375	1.0042
0.007	0.0157	0.0453	2.594	6.364	1.0002
0.009	0.0157	0.0462	2.446	6.296	1.0035
0.020	0.0163	0.0455	2.499	6.372	1.0009
0.080	0.0149	0.0465	2.396	6.350	1.0029

由表 1 可知, BSA 溶液有 2 个荧光寿命( $\tau_1$  和  $\tau_2$ ), 说明体系中含有 2 种发荧光的物质。当加入甲脞铂后,  $\tau_1$  随浓度的变化在 2.5 ns 附近小幅度浮动, 而  $\tau_2$  在 6.3 ns 附近小幅度浮动。BSA 分子中含有 2 个 Trp 残基<sup>[23]</sup>, 分别位于第 212 和 134 位, 其中一个(134 位)被包埋在 BSA 分子内部, 另一个(212 位)则暴露在 BSA 分子表面。加入甲脞铂后 BSA 外部的 Trp

残基受到影响, 荧光寿命( $\tau_1$ )会大大降低; 而内部的 Trp 残基被 BSA 分子保护, 基本不与猝灭剂接触, 荧光寿命( $\tau_2$ )几乎不发生变化。这一结论与文献[23]所述 BSA 主要是由第 212 位 Trp 残基发出荧光的结论一致。这一结果表明甲脞铂与 BSA 的结合位置极有可能为第 212 位 Trp 残基。

由图 1(c)可知, 加入甲脞铂后的 BSA 溶液在 281 nm 左右处有一细小的发射峰, 可用于测量时间分辨荧光。甲脞铂在 283 nm 处有最大荧光发射峰, 因此测量时要考虑甲脞铂自身的荧光衰减情况。在 281 nm 波长测定了甲脞铂溶液(0.005 mmol/L)、BSA 溶液(0.16 mg/mL)、甲脞铂(0.005 mmol/L)-BSA(0.16 mg/mL)混合液的时间分辨荧光, 进行双指数拟合, 拟合结果列于表 2, 拟合图如图 3 所示。

表 2 BSA(12.12 mmol/L)与甲脞铂混合液的拟合参数及荧光寿命(测定波长 281 nm)

Tab.2 Fitting parameters and fluorescence life of BSA (12.12 mmol/L) mixed with picoplatin (measured at 281 nm)

甲脞铂浓度/ (mmol/L)	$B_1$	$B_2$	$\tau_1$ /ns	$\tau_2$ /ns	$\chi^2$
0	0.1101	0.0149	0.591	4.375	1.0045
0.0001	0.2688	0.0062	0.236	4.227	1.0001
0.0005	0.2824	0.0067	0.219	4.182	0.9976
0.003	0.2215	0.0084	0.283	4.184	1.0025
0.005	0.2356	0.0081	0.268	4.207	1.0009
0.007	0.2256	0.0082	0.278	4.162	1.0022
0.009	0.2332	0.0078	0.267	4.204	1.0038
0.020	0.2227	0.0078	0.281	4.248	1.0031
0.080	0.2277	0.0075	0.272	4.280	1.0035

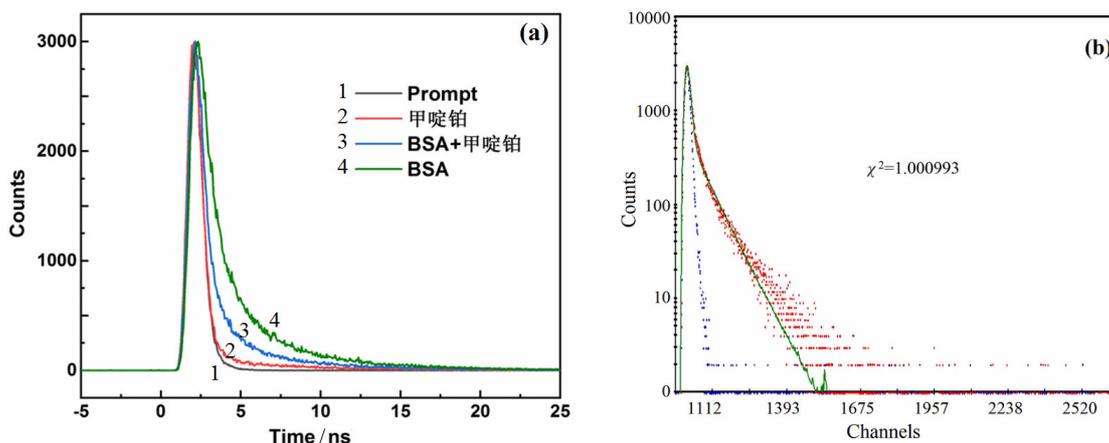


图 3 测量波长 281 nm 的荧光衰减曲线(a)和双指数拟合曲线(b)

Fig.3 Fluorescence attenuation curve (a) and double exponential fitting curve (b) probed at 281 nm

由表 2 可知,加入甲脒铂的 BSA 溶液有 2 个荧光寿命,分别为  $\tau_1 \approx 0.26$  ns,  $\tau_2 \approx 4.2$  ns。 $\tau_1$  小于仪器激发光源的激发脉冲(1 ns),没有实际意义而不需讨论;只需分析加入单一 BSA 的荧光寿命( $\tau_2 \approx 4.4$  ns),以及加入甲脒铂的 BSA 的荧光寿命( $\tau_2 \approx 4.2$  ns)。根据文献[24]数据, Phe 的最大荧光发射峰在 281 nm, 荧光寿命为 4.67 ns,与单一 BSA 的  $\tau_2$  ( $\approx 4.4$  ns)十分接近;加入甲脒铂的 BSA 的荧光寿命  $\tau_2 = 4.2$  ns, 小于 Phe 的 4.67 ns,且小于甲脒铂的寿命  $\tau_2$ 。推测甲脒铂与 BSA 中的 Phe 残基可能发生了相互作用。

### 3 结论

1) 采用稳态荧光光谱测定,当加入甲脒铂后,BSA 荧光发射峰从 335 nm 最大红移到 337.5 nm。伴随着荧光强度的猝灭,荧光猝灭程度的波动与甲脒铂自身的荧光波动有关,推测甲脒铂对 BSA 的猝灭为静态猝灭。

2) 采用时间分辨荧光光谱测定,用单指数拟合方法得到对应的荧光寿命,加入甲脒铂后的 BSA 溶液荧光寿命的微小变化符合猝灭的静态性质。

3) 加入甲脒铂后,在 335 nm 测量,采用双指数拟合法得到 BSA 的 2 个荧光寿命分别为 2.5 和 6.3 ns,分别对应 BSA 在第 212 位和第 134 位的 Trp 残基;由于荧光寿命明显缩短,可以判断甲脒铂与 212 位的 Trp 残基发生作用。在 281 nm 测量计算得到的荧光寿命数值表明,加入甲脒铂后,BSA 中 Phe 的荧光寿命减小。表明 BSA 中第 212 位 Trp 残基是甲脒铂的靶向目标,BSA 中的 Phe 残基也可能与甲脒铂发生作用。

### 参考文献:

- [1] DOUILLARD J Y, SCHILLER J. ZD0473 combined with other chemotherapeutic agents for the treatment of solid malignancies[J]. *European journal of cancer*, 2002, 38(S8): 25-31.
- [2] GORE M E, ATKINSON R J, THOMAS H, et al. Results of ZD0473 in platinum-pretreated ovarian cancer: Analysis according to platinum free interval[J]. *European journal of cancer*, 2002, 38(S8): 2416-2420.
- [3] TREAT J, SCHILLER J, QUOIX E, et al. ZD0473 treatment in lung cancer: an overview of the clinical trial results[J]. *European journal of cancer*, 2002, 38(S8): 13-18.
- [4] 普绍平, 丛艳伟, 王庆琨, 等. 甲脒铂的合成、表征、理化性质与晶体结构[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19(17): 1605-1608.  
PU S P, CONG Y W, WANG Q K, et al. The synthesis, characterization, physical and chemical properties, and crystal structures of picoplatin[J]. *China journal of new drugs*, 2010, 19(17): 1605-1608.
- [5] 余邦良, 马亚平, 刘全忠, 等. 铂类抗癌药物研究进展[J]. *海南大学学报*, 2005, 23(1): 72-80.  
YU B L, MA Y P, LIU Q Z, et al. Advances in research on platinum anticancer drugs[J]. *Journal of Hainan University*, 2005, 23(1): 72-80.
- [6] 陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等. 荧光分析法[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1990: 201-212.  
CHEN G Z, HUANG X Z, ZHENG Z X, et al. *Fluorescence analysis*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1990: 201-212.

- [7] 杨曼曼, 杨频, 张立伟. 荧光法研究咖啡酸类药物与白蛋白的作用[J]. 科学通报, 1994, 39(1): 31-35.  
YANG M M, YANG P, ZHANG L W. Fluorescence studies the effects of coffee acid drugs and albumin[J]. Science bulletin, 1994, 39 (1): 31-35.
- [8] 易平贵, 商志才, 俞庆森, 等. 丝裂霉素 C 与牛血清白蛋白结合作用的研究[J]. 化学学报, 2000, 58(12): 1649.  
YI P G, SHANG Z C, YU Q S, et al. Study of the binding effect of fission C and bovine serum albumin[J]. Journal of chemistry, 2000, 58(12): 1649.
- [9] 卢继新, 张贵珠, 赵鹏, 等. 阿霉素与血清白蛋白的作用及共存离子对反应影响的研究[J]. 化学学报, 1997, 55(9): 915-920.  
LU J X, ZHANG G Z, ZHAO P, et al. Study on the role of amycin and serum albumin and the effects of coexistence ions on reactions[J]. Journal of chemistry, 1997, 55(9): 915-920.
- [10] SUŁKOWSKA A, ROWNICKA J, BOJKO B, et al. Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin[J]. Journal of molecular structure, 2003, 651(2):133-140.
- [11] SEETHARAMAPPA J, KAMAT B P. Spectroscopic studies on the mode of interaction of an anticancer drug with bovine serum albumin[J]. Chemical & pharmaceutical bulletin, 2004, 52(9): 1053-1057.
- [12] 邱瑾, 邵爽, 游金宗. 荧光法研究奥沙利铂与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析测试学报, 2017(1): 51-54.  
QIU J, SHAO S, YU J Z. Fluorescent method to study the interaction between Osali platinum and bovine serum albumin[J]. Journal of analytical testing, 2017(1): 51-54.
- [13] 易平贵, 俞庆森, 商志才, 等. 氧氟沙星与牛血清白蛋白相互作用机制[J]. 药理学, 2000, 35(10): 774-777.  
YI P G, YU Q S, SHANG Z C, et al. Oxyfluosastar and bovine serum albumin interaction mechanism[J]. Pharmacology journal, 2000, 35(10): 774-777.
- [14] 丁志群, 王金霞, 赵红霞, 等. 基于三维荧光光谱技术的食用油快速分析研究[J]. 光子学报, 2015, 44(3): 125.  
DING Z Q, WANG J X, ZHAO H X, et al. Rapid analysis of edible oil based on 3D fluorescence spectroscopy technology[J]. Photonic journal, 2015, 44(3): 125.
- [15] 兰秀凤, 顾春峰, 于银山, 等. 牛奶水溶液的偏振三维荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(12): 3281-3284.  
LAN X F, GU C F, YU Y S, et al. 3D fluorescence spectroscopy study of milk aqueous solution[J]. Spectroscopy and spectral analysis, 2012, 32(12): 3281-3284.
- [16] 陆从文, 兰秀凤, 张林, 等. 依巴斯汀与牛血清蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 光子学报, 2015, 44(10): 76-81.  
LU C W, LAN X F, ZHANG L, et al. Alustin's fluorescent spectroscopy study of the interaction of bovine serum proteins[J]. Acta photonic sinica, 2015, 44(10): 76-81.
- [17] 王守业, 徐小龙, 刘清亮, 等. 荧光光谱在蛋白质分子构象研究中的应用[J]. 化学进展, 2001, 13(4): 257-260.  
WANG S Y, XU X L, LIU Q L, et al. Application of fluorescence spectroscopy in the study of protein molecular conformation[J]. Chemical progress, 2001, 13(4): 257-260.
- [18] HU Y J, LIU Y, ZHANG L X, et al. Studies of interaction between colchicine and bovine serum albumin by fluorescence quenching method[J]. Journal of molecular structure, 2005, 750: 174-178.
- [19] 陈玉菡. 纳米银溶胶与蛋白质相互作用机制的研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2014.  
CHEN Y H. Study on the mechanism of interaction between nano silver sol and protein[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2014.
- [20] MANIVEL A, ANANDAN S. Spectral interaction between silica coated silver nanoparticles and serum albumins[J]. Colloids & surfaces A( Physicochemical & engineering aspects), 2012, 395: 38-45.
- [21] GHOSH K, RATHHI S, ARORA D. Fluorescence spectral studies on interaction of fluorescent probes with Bovine Serum Albumin (BSA)[J]. Journal of luminescence, 2016, 175: 135-140.
- [22] RICCHELLI F. Principles of fluorescence spectroscopy [M]. Plenum Press, 1999.
- [23] WANG G, GENG M L. Unfolding of apomyoglobin studied with two-dimensional correlations of tryptophan, 8-anilino-1-naphthalenesulfonate, and pyrene fluorescence[J]. Journal of molecular structure, 2006, 799: 177-187.
- [24] 郑泉, 叶满萍, 李裔. Pd(II)与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 中国计量学院学报, 2015, 26(1): 60-64.  
ZHENG X, YE M P, LI Y. Study of the fluorescence spectroscopy of Pd(II) interaction with bovine serum albumin[J]. Journal of China University of Metrology, 2015, 26(1): 60-64.