

基于光谱和分子模拟研究半乳甘露聚糖和人血清白蛋白的相互作用

王靖蕊, 彭佳敏, 代成, 李雁, 解新安

Study on the Interaction Mechanism between Galactomannan and Human Serum Albumin by Spectroscopy and Molecular Docking

WANG Jingrui, PENG Jiamin, DAI Cheng, LI Yan, and XIE Xin'an

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040093>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

光谱法研究高良姜素与人血清白蛋白的相互作用

Spectroscopic analysis of interaction between galangin and human serum albumin

食品工业科技. 2017(18): 65-68

花青素对牛血清白蛋白的光谱特性及构象的影响

Effects of Anthocyanins on Spectral Properties and Conformation of Bovine Serum Albumin

食品工业科技. 2021, 42(7): 57-62

苦丁皂苷L、苦丁皂苷N与牛血清白蛋白的相互作用研究

Study on the Interaction between Kudinoside L, Kudinoside N and Bovine Serum Albumin

食品工业科技. 2020, 41(9): 55-60

不同处理条件对马铃薯糖蛋白Patatin构象的影响研究

Effect of different treatment conditions on the conformation changes of Patatin

食品工业科技. 2017(17): 80-83

基于体外药效学结合网络药理学和分子对接对人参-桑椹改善骨质疏松的机制研究

Mechanism of Ginseng-Mulberry Treating Osteoporosis Based on Pharmacodynamics *in Vitro* Combined with Network Pharmacology and Molecular Docking

食品工业科技. 2021, 42(20): 1-13

表儿茶素在模拟生理条件下对人血清蛋白糖基化反应的影响

Effect of epicatechin on glycation reaction of human serum albumin in physiological conditions

食品工业科技. 2017(24): 65-68



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王靖蕊, 彭佳敏, 代成, 等. 基于光谱和分子模拟研究半乳甘露聚糖和血清白蛋白的相互作用 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(2): 42–49. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040093

WANG Jingrui, PENG Jiamin, DAI Cheng, et al. Study on the Interaction Mechanism between Galactomannan and Human Serum Albumin by Spectroscopy and Molecular Docking[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(2): 42–49. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040093

基于光谱和分子模拟研究半乳甘露聚糖和血清白蛋白的相互作用

王靖蕊, 彭佳敏, 代成, 李雁*, 解新安
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要:目的: 研究半乳甘露聚糖对人血清白蛋白 (HSA) 光谱特性的影响及它们相互作用的机理。方法: 本文利用光谱法判断半乳甘露聚糖和 HSA 的猝灭方式、结合位点数、结合作用力类型以及二级结构的变化, 采用分子对接模拟技术得到结合作用力类型和长度, 进一步研究半乳甘露聚糖和 HSA 相互作用的机制。结果: 在半乳甘露聚糖的作用下, HSA 内源荧光被有规律的猝灭, 猝灭过程是自发进行的, 机制为静态猝灭, 结合位点数约为 1, 并且 HSA 的二级结构中 α -螺旋含量减少了 7.7%。分子对接结果表明, 半乳甘露聚糖通过氢键和范德华力在 HSA 的亚结构域 IIB 中相互作用。结论: 半乳甘露聚糖与 HSA 有较强的结合能力, 并且结合是自发进行的。

关键词: 半乳甘露聚糖, 人血清白蛋白, 荧光光谱, 圆二色光谱, 分子对接

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)02-0042-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021040093

本文网刊:



Study on the Interaction Mechanism between Galactomannan and Human Serum Albumin by Spectroscopy and Molecular Docking

WANG Jingrui, PENG Jiamin, DAI Cheng, LI Yan*, XIE Xin'an

(College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Objective: To study the effect of galactomannan on the spectral characteristics of human serum albumin (HSA) and the mechanism of their interaction. Methods: Multispectroscopic analyses were used to determine the quenching method, number of binding sites, type of binding force, and changes in secondary structure between galactomannan and HSA. The type and length of binding force were obtained by molecular docking simulation, which further proved that the mechanism of interaction between galactomannan and HSA. Results: Under the action of galactomannan, the endogenous fluorescence of HSA was regularly quenched. The quenching process was spontaneous. The mechanism was static quenching. The number of binding sites was about 1, and the α -helix of HSA was reduced by 7.7%. The results of molecular docking showed that galactomannan interacted in HSA subdomain IIB through hydrogen bonds and van der Waals forces. Conclusions: The interaction between galactomannan and HSA was strong, and the binding was spontaneous.

Key words: galactomannans; human serum albumin; fluorescence spectrometry; circular dichroism spectroscopy; molecular docking

半乳甘露聚糖($C_{18}H_{32}O_{16}$, Galactomannan)是一种由 D-甘露糖和 D-半乳糖单体组成的多糖^[1], 主要来源于种子的胚乳(例如豆科)或微生物^[2]。有研究表明半乳甘露聚糖具有抗肿瘤^[3] 和对机体免疫功能产生影响的免疫调节活性^[4], 对参与人体先天性和获

得性免疫的重要免疫细胞具有调节作用^[5]。它还可以与细胞表面的特定受体结合以激活各种细胞内信号转导途径, 促进细胞因子或抗体的产生, 从而调节人体的免疫功能^[6]。作为一种功能性多糖, 由于其特殊的抗肿瘤性和免疫调节功能, 使得其受到越来越多

收稿日期: 2021-04-12

基金项目: 广州市科技计划项目 (201510010099)。

作者简介: 王靖蕊 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 774095662@qq.com。

* 通信作者: 李雁 (1963-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: yanli@scau.edu.cn。

研究学者的关注^[7]。

人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是一条由 585 个氨基酸残基构成的多肽链^[8],分子量约为 66 kDa^[9],其形状类似于心型^[10]。HSA 共有 3 个同源结构域^[11],分别为 Domain I (1-195)、Domain II (196-383)、Domain III (384-585)^[12-13]。每个结构域可以进一步分为两个亚结构域(IA, IB, IIA, IIB, IIIA 和 IIIB),其中的亚域以槽口相对的方式形成圆筒状结构^[14],几乎所有的疏水性氨基酸残基都包埋在圆筒腔内,形成疏水腔^[15]。HSA 在各种外源和内源性化合物的转运和递送,以及物质的排泄中起着重要作用^[16],是人体内最合适的转运蛋白^[17]。研究半乳甘露聚糖与 HSA 结合,不仅有利于了解半乳甘露聚糖在人体的吸收、运输、分布和代谢^[18],阐明它们相互作用的机制,而且对于探索功能性多糖的性质具有重要意义。

为了进一步研究半乳甘露聚糖与 HSA 作用机理,本文采用紫外-可见光吸收法(Ultraviolet-visible absorption spectroscopy, UV-Vis)、荧光光谱法(Fluorescence spectrometry, RF)、圆二色光谱法(Circular dichroism spectroscopy, CD)和分子对接法(Molecular docking),探索半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的机理。其中,紫外-可见光吸收法灵敏度和选择性较好,且设备使用简便,易于操作,它被广泛地用于蛋白质的定性及定量分析^[19]。通过分析蛋白质与分子结合前后,蛋白质的紫外可见光吸收光谱中吸光值的变化,能判断它们之间是否存在相互作用^[20]。在研究蛋白质与分子的相互作用过程中,荧光光谱可以测定荧光强度、发射光谱等^[21],得到如荧光的发射峰的特征、结合常数、猝灭常数和作用力类型等信息,从而分析结合前后蛋白质结构和蛋白质周围环境的变化等^[22-23]。圆二色光谱对于蛋白质的二级结构很敏感,是研究蛋白质构象及其变化较为有效的方法,能够测定和分析相互作用过程中所引起的构象变化并对其进行定量分析,是研究蛋白质构型及其分子间相互作用的重要光谱手段之一^[24-25]。分子对接是一种利用计算机技术和理论相结合而产生的新方法,通过计算机程序模拟分子间的结合过程,能更观地呈现出分子与蛋白质相互作用的过程和结果^[26-27]。本实验通过分析光谱所得参数,计算得到结合常数和猝灭常数等信息。利用三种光谱实验的结论,结合分子对接技术进行分析比较,使它们的结论相互验证和补充,从而达到实验和理论共同验证半乳甘露聚糖和 HSA 相互作用的目的。进一步阐明半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的机理,为半乳甘露聚糖在医学和食品化学的发展提供可靠的科学依据,并为半乳甘露聚糖在食品领域的广泛应用提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

磷酸盐缓冲液颗粒(PBS)(分析纯)、人血清白蛋

白(纯度>95%) 北京索莱宝科技有限公司;氢氧化钠 分析纯,广东光华科技股份有限公司;半乳甘露聚糖 纯度>95%,上海源叶生物科技有限公司;实验用水 均为超纯水。

FA1004N 分析天平 上海拓西电子科技有限公司;HJ-6B 数显恒温磁力搅拌器 常州市万合仪器制造有限公司;HH-2 数显恒温水浴锅 常州澳华仪器有限公司;UV-1750 紫外可见分光光度计、RF-6000 荧光分光光度计 日本岛津公司;Chriascan 数字式圆二色光谱仪 英国应用光物理公司;pHS-3C pH 计 上海雷磁仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 HSA 溶液:将 HSA 溶于 PBS 缓冲溶液中,配制成浓度 7.0×10^{-6} mol/L 的 HSA 储备液,保存于 4 ℃ 冰箱保存在暗处备用;半乳甘露聚糖溶液:用超纯水配制,浓度分别为 0.5、4.0、8.0、10.0、20.0、34.0、52.0、 76.0×10^{-6} mol/L。然后按照 1:1 的比例混合 HSA 溶液与半乳甘露聚糖溶液,室温下静置 0.5 h 后使用,所有溶液现配现用^[28-29]。

1.2.2 紫外可见吸收光谱 取 3 组试管每组 9 支,精密量取 3 mL 浓度为 7.0×10^{-6} mol/L 的 HSA 溶液置于其中,再向其中依次加入等比的半乳甘露聚糖溶液,浓度分别为 0、0.5、4.0、8.0、10.0、20.0、34.0、 52.0×10^{-6} mol/L,最后一组只含有半乳甘露聚糖浓度为 76.0×10^{-6} mol/L,充分混匀后,在室温下静置 0.5 h。以相同条件下的空白试剂(PBS 缓冲溶液)为参比,放在 1 cm 石英吸收池内,在 200~400 nm 区间内,单色器狭缝宽度设置为 1 nm,在室温下使用紫外分光光度计进行光谱扫描^[30]。以上操作重复三次,取其平均值。

1.2.3 荧光光谱 取 3 组试管每组 9 支,分别加入 7.0×10^{-6} mol/L 的 HSA 溶液和等比的半乳甘露聚糖溶液,浓度分别为 0、0.5、4.0、8.0、10.0、20.0、34.0、 52.0×10^{-6} mol/L,最后一组只含有浓度为 76.0×10^{-6} mol/L 半乳甘露聚糖。充分混匀后,将第一组混合溶液于 20 ℃ 静置 0.5 h,第二组于 25 ℃ 恒温水浴 0.5 h,第三组于 30 ℃ 恒温水浴 0.5 h,第四组于 37 ℃ 恒温水浴 0.5 h,使用荧光光度计进行光谱扫描。荧光光谱参数设置激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=280$ nm,石英比色皿 1 cm,激发与发射狭缝宽度均为 5 nm,发射光谱记录在 290~500 nm 之间,以相同条件下的空白试剂(PBS 缓冲溶液)作为对照^[31-32]。以上操作重复三次,取其平均值。并对数据进行内滤荧光效应的校正,使用校正后的数据作图。

1.2.4 圆二色光谱 用 pH7.40 的磷酸盐缓冲溶液配制浓度为 7.0×10^{-6} mol/L 的 HSA 溶液,依次向溶液中加入等量的半乳甘露聚糖溶液,浓度分别为 0、0.5、4.0、8.0、10.0、20.0、34.0、52.0、 76.0×10^{-6} mol/L,充分混匀后,在室温下静置 0.5 h,使用圆二色光谱仪

进行光谱扫描。圆二色光谱参数设置为,扫描速率 100 nm/min,样品池的光径为 0.2 cm,响应时间 0.5 s,分辨率 0.1 nm,累积次数 3 次,扫描的波长范围为 190~260 nm^[33-34]。以上操作重复三次,取其平均值。

1.2.5 分子对接 使用软件 Discovery Studio 2016 (DS)进行分子对接模拟,首先从 Brookhaven 蛋白质数据库(RCSB)下载 HSA 的晶体结构文件(ID: 1H9Z);再从 PubChem 下载半乳甘露聚糖的 3D 晶体结构文件(CID: 439336)。对 HSA 进行预处理,除去所有水分子,添加氢原子,再计算电荷。利用 ChemBio3D Ultra 12.0 软件对半乳甘露聚糖的分子结构进行优化,使其处于能量最低、构象最优的状态。使用 DS 中的 CDOCKER 模块进行分子对接,半乳甘露聚糖作为配体,HSA 作为受体,选择整个蛋白作为潜在的结合位点,使用盲对接方法。根据所得 -CDOCKER_INTERACTION_ENERGY 值判定最优构象。

1.3 数据处理

本文运用软件 Excel 和 Origin 2018 计算光谱实验数据及画图,获得半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的猝灭机理、结合常数、猝灭常数及热力学参数。使用软件 CDPro 分析圆二色光谱数据,得到相互作用前后 HSA 二级结构的变化。

2 结果与分析

2.1 紫外可见吸收光谱分析

紫外可见吸收光谱法是一种简单有效的技术,可以判断配体-蛋白质之间是否有新的复合物形成,还可以检测配体-蛋白质复合物结合而引起的蛋白质结构变化,因此它可以用于研究配体与蛋白质的相互作用^[35]。半乳甘露聚糖和 HSA 的 UV-Vis 光谱如图 1 所示。在实验条件下,半乳甘露聚糖几乎没有 UV 吸收,而 HSA 在 227 和 278 nm 处具有很强的吸收率。半乳甘露聚糖添加后,HSA 的吸光度明显

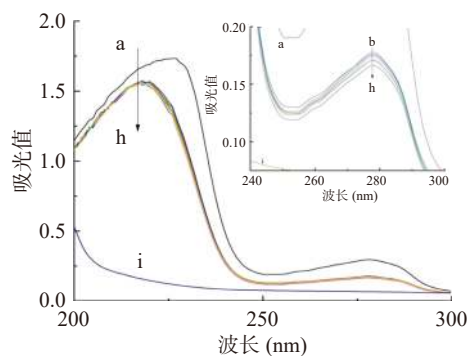


图 1 HSA 和半乳甘露聚糖相互作用的 UV-Vis 光谱图

Fig.1 UV-Vis spectrum of the interaction between HSA and galactomannan

注: HSA(a-h)的浓度为 7.0×10^{-6} mol/L; 半乳甘露聚糖的浓度(a-i)分别为 0、0.5、4.0、8.0、10.0、20.0、34.0、52.0、 76.0×10^{-6} mol/L; 图 2、图 5 同; 小图为 240~300 nm 的局部放大图。

下降,半乳甘露聚糖-HSA 吸收光谱发生蓝移。可以合理地解释,在 227 nm 处的峰对应于蛋白质中肽键的吸收,观察到的蓝移表示与半乳甘露聚糖相互作用后 HSA 二级结构含量的变化,复合结构产生的减色效果,使吸收强度减弱^[36]。HSA 在 278 nm 处显示的吸收带,主要是由 HSA 固有芳香族氨基酸残基——色氨酸残基(Trp)、酪氨酸残基(Tyr)和苯丙氨酸残基(Phe)的芳香 π 系统中的 π - π^* 电子跃迁,这与陈蓉蓉^[37]的研究结果相一致。

2.2 荧光光谱分析

HSA 具有三种固有的荧光团,包括 Trp、Tyr 和 Phe 残基。HSA 的固有荧光主要由 Trp 残基贡献,因为 Phe 残基的量子产率非常低。当 Tyr 离子被氨基、羧基或 Trp 接近或离子化时,Tyr 的荧光几乎被猝灭^[38]。由于 HSA 的固有荧光对微环境非常敏感,所以当 HSA 的局部环境稍有变化时,其固有荧光将显著降低。如蛋白质的构象转变,生物分子的结合以及变性等都是造成荧光强度下降的原因^[39]。

四种温度下,HSA 的荧光发射光谱如图 2 所示,HSA 的最大发射波长为 328 nm,半乳甘露聚糖的加入引起荧光发射光谱的巨大变化,随着半乳甘露聚糖加入的浓度增大,导致 HSA 内源荧光的猝灭,荧光强度呈现出有规律的下降。半乳甘露聚糖导致 HSA 固有荧光的猝灭,但没有改变 HSA 的最大值和峰的形状。根据张丽娇^[40]的研究,该结果表明半乳甘露聚糖可以与 HSA 结合,从而猝灭蛋白质的固有荧光。

用于研究荧光猝灭的一种经典模型名为斯特恩-沃尔默(Stern-Volmer)方程(1),可分析配体对蛋白质荧光的猝灭机理,以计算出配体与蛋白质的猝灭常数、猝灭速率常数、结合常数及结合点数^[41]。利用(1)方程和推导公式(2)计算双分子猝灭速率常数 K_q 和猝灭常数 K_{SV} ,判断半乳甘露聚糖对 HSA 的荧光猝灭类型;采用双对数方程(3)计算半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的结合常数 K_a 和结合位点数 n 。计算公式如下:

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

$$k_q \tau_0 = K_{SV} \quad \text{式 (2)}$$

式中: F_0 是不存在猝灭剂时的稳态荧光强度; F 是存在猝灭剂时的稳态荧光强度; K_{SV} 是斯特恩-沃尔默猝灭常数; $[Q]$ 是猝灭剂的浓度; k_q 是双分子猝灭速率常数; τ_0 是不存在猝灭剂的荧光寿命,此处为不含半乳甘露聚糖的 HSA 的荧光寿命,约为 10^{-8} s^[42]。

计算结果如图 3 和表 1,随着半乳甘露聚糖的加入,HSA 荧光强度显著降低,吸收光谱有了明显的变化,并且其最大发射波长发生微小蓝移,表明半乳甘露聚糖对 HSA 的内源荧光有明显的猝灭作用,也说明半乳甘露聚糖与 HSA 发生了相互作用使其构象发生改变^[43]。结合 Yadzi 等^[44]的研究,随着温度的升高,猝灭常数 K_{SV} 减小,表明半乳甘露聚糖与 HSA

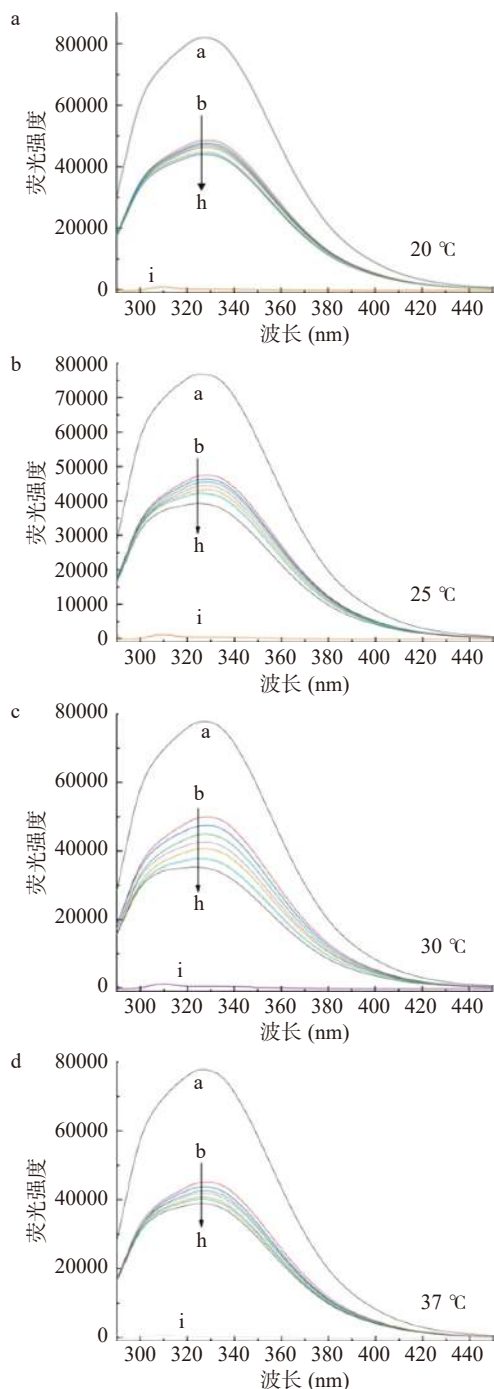


图2 四种不同温度下 HSA 和半乳甘露聚糖相互作用的荧光光谱图

Fig.2 RF spectrum of the interaction between HSA and galactomannan at 4 different temperature

的荧光猝灭类型属于静态猝灭。而且从表 1 可以看出, K_q 大于最大扩散碰撞猝灭常数($2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), 这也能表明静态猝灭作用占主导地位。

使用改良的 Stern-Volmer 双对数回归方程(3)来计算半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的结合常数(K_a)和结合位点数(n)。计算公式如下:

$$\lg \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (3)$$

式中: K_a 为结合常数; n 为结合位点数。

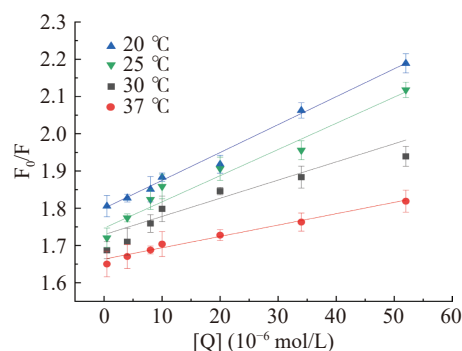


图3 四种不同温度下 HSA 和半乳甘露聚糖相互作用的斯特恩沃尔默图

Fig.3 Stern-Volmer plots for the quenching of HSA by galactomannan at 4 different temperatures

表 1 HSA 与半乳甘露聚糖在四种不同温度下相互作用的猝灭常数 K_{SV} 、猝灭速率常数 K_q

Table 1 Quenching constants K_{SV} , and biomolecular quenching rate constant (K_q) for the interaction of HSA with galactomannan at 4 different temperatures

温度(°C)	$K_{SV} \times 10^3 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q \times 10^{11} (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R^2
20	7.491 ± 0.063	7.491 ± 0.063	0.9905
25	7.032 ± 0.012	7.032 ± 0.012	0.9594
30	4.889 ± 0.024	4.889 ± 0.024	0.9089
37	3.056 ± 0.003	3.056 ± 0.003	0.9829

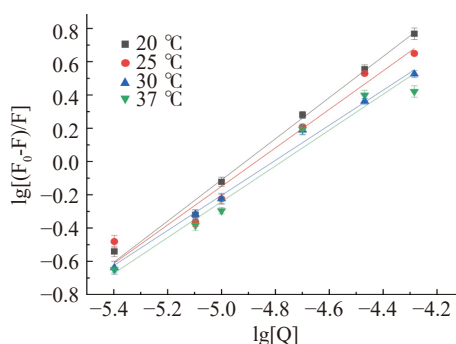


图4 四种不同温度下 HSA 和半乳甘露聚糖相互作用的双对数图

Fig.4 Double logarithmic plot of the interaction between HSA and galactomannan at 4 different temperatures

四种温度下半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的双对数结果见图 4。半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的 K_a 和结合位点数 n 见表 2。由图 4 和表 2 可知, 随着温度的升高, 半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的 K_a 值虽然从 1.069×10^6 减小到 $1.191 \times 10^5 \text{ L/mol}$, 但它们均达到 10^4 数量级, 这说明半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的荧光猝灭类型均以静态猝灭为主, 动态猝灭可以忽略不计^[45], 也能进一步说明半乳甘露聚糖与 HSA 能形成稳定的复合物, 这与 Afrin^[46] 所得结论一致。从表 2 可知, 不同温度条件下, 半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的结合位点数 n 均接近 1, 说明它们的结合比例约为 1:1^[47]。

然后使用热力学方程(4)和(5)分别计算半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的热力学参数(自由能变

表 2 HSA 与半乳甘露聚糖在四种不同温度下相互作用的结合常数 K_a 、结合位点数 n

Table 2 Binding constants K_a and binding sites n for the interaction of HSA with galactomannan at four different temperatures

温度(℃)	$K_a \times 10^5 (\text{L/mol})$	n	R^2
20	10.690 ± 0.013	1.237 ± 0.061	0.9906
25	3.133 ± 0.067	1.158 ± 0.069	0.9679
30	1.301 ± 0.039	1.054 ± 0.043	0.9931
37	1.191 ± 0.051	1.077 ± 0.047	0.9692

ΔG , 焓变 ΔH 和熵变 ΔS)。计算公式如下:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a \quad (5)$$

式中: T 为热力学温度(K); K_a 为不同温度下相应的结合常数; R 是热力学常数, 其值为 $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$; ΔG 是自由能变; ΔH 是焓变; ΔS 是熵变^[46-47]。

通过热力学方程(4)和(5)计算半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的热力学参数 ΔH 、 ΔS 和 ΔG 见表 3。由表 3 可知, 不同温度条件下(293.15、298.15、303.15 和 310.15 K), 半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用过程中的 ΔG 分别为 -33.027、-31.922、-30.816 和 -29.269 kJ/mol, 均小于 0, 则说明半乳甘露聚糖与 HSA 的结合过程是自发进行的。根据 Eftink 等^[48-50]研究可知, 当 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$ 时, 主要作用力为氢键和范德华力; 当 $\Delta H < 0$ 或 $\Delta H \approx 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为静电作用力; 当 $\Delta H > 0$, $\Delta S > 0$ 时, 主要作用力为疏水相互作用。半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用的 ΔS 和 ΔH 值分别为 $-221.061 \text{ J/mol} \cdot \text{K}^{-1}$ 和 -97.831 kJ/mol , 均小于 0, 这说明半乳甘露聚糖与 HSA 相互作用过程中的主要作用力为氢键和范德华力。

表 3 HSA 与半乳甘露聚糖在四种不同温度下相互作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between HSA and galactomannan at 4 different temperatures

温度(K)	$\Delta H (\text{kJ/mol})$	$\Delta S (\text{J/mol} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G (\text{kJ/mol})$
293.15			-33.027
298.15	-97.831	-221.061	-31.922
303.15			-30.816
310.15			-29.269

2.3 圆二色光谱分析

圆二色光谱是一种敏感的技术, 通常用于表征蛋白质的定量结构, 特别是用于二级结构的测定, 以监测 HSA 和 HSA-半乳甘露聚糖复合物的二级结构的构象变化和改变^[51]。HSA 的 CD 光谱的主要特征是在约 208 和 222 nm 处有两个负带和在 193 nm 处有正带, 这是 α -螺旋结构的典型特征^[52]。从图 5 可以看出, CD 光谱的峰值随着半乳甘露聚糖的添加而变化, 表明 HSA 的二级结构发生了明显变化。通过软件 CD Pro 计算半乳甘露聚糖添加前后 HSA 二

结构含量的变化, 发现游离的 HSA 包含约 54.4% 的 α -螺旋, 18.8% 的 β -折叠, 14.0% 的 β -转角和 13.3% 的无规卷曲。而与 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 的半乳甘露聚糖相互作用后, β -折叠、 β -转角和无规卷曲含量分别增加到 21.4%、15.4% 和 16.8%, 而 α -螺旋减少到 46.7%。然而, CD 谱图中的形状或峰位置没有变化, 这表明和半乳甘露聚糖结合后 HSA 的基本结构得以保持。HSA 的部分排列导致了 α -螺旋的减少, 这表明半乳甘露聚糖和 HSA 的结合改变了蛋白质的二级结构并降低了 α -螺旋的稳定性^[53]。这与很多研究结果相一致^[54-56], HSA 的二级结构被破坏, α -螺旋的含量减少, 无规卷曲的含量增加, 这主要是由于多糖和蛋白质的结合导致蛋白质解开并转变成无规卷曲。

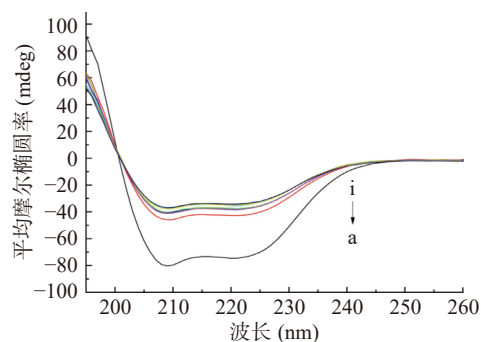


图 5 HSA 和半乳甘露聚糖相互作用的 CD 光谱图
Fig.5 Circular dichroism spectra of the interaction between HSA and galactomannan

2.4 分子对接分析

在图 6 中, 分子对接结果表明半乳甘露聚糖结

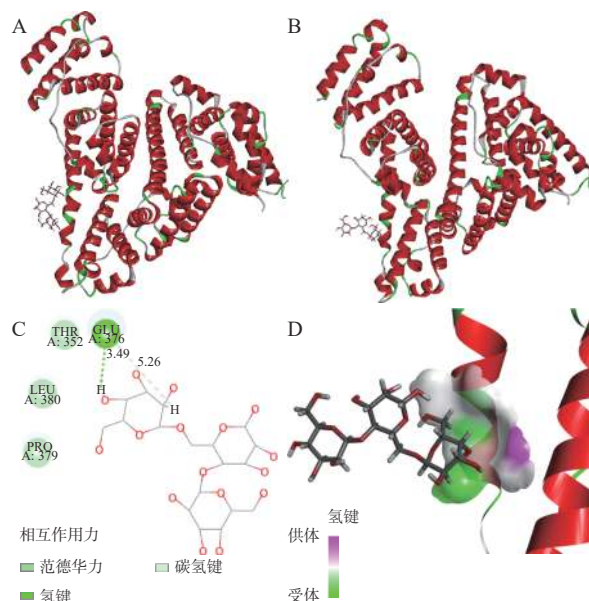


图 6 HSA 和半乳甘露聚糖相互作用的分子对接图

Fig.6 Molecular docking diagram of the interaction between HSA and galactomannan

注: A: 相互作用前 3D 构象图; B: 相互作用后 3D 构象图; C: 相互作用 2D 示意图; D: 相互作用 3D 示意图。

合在 HSA 的亚结构域 IIB 的结合口袋内。根据 CDOCKER 协议, 给出最高能量得分(-CDOCKER_INTERACTION_ENERGY)的姿势被认为是最稳定的构象, 半乳甘露聚糖与 HSA 的最大-CDOCKER_INTERACTION_ENERGY 为 13.3549 kcal/mol。

输出的 3D 和 2D 示意图(图 6)清楚地表明, 半乳甘露聚糖已插入 HSA 的活性位点并与氨基酸残基相互作用, 它与氨基酸残基 Pro 379、Leu 380、Thr 352 和 Glu 376 相互作用, 这是半乳甘露聚糖与 HSA 之间的相互作用位点。在半乳甘露聚糖和 Glu 376 氨基酸残基之间发现了氢键和范德华力, 其长度为 3.49Å和 5.26Å, 表明 HSA-半乳甘露聚糖主要通过氢键和范德华力(表 4)相互作用形成新的稳定配合物。通过图 6A~6B, 比较结合前后的结构, 可以推断半乳甘露聚糖和 HSA 的构象在相互作用后都发生了不同程度的变化。蛋白质结构的变化与 2.2 中讨论的热力学参数分析一致。结合 Ermakova 等^[57]、Chugh 等^[58]的研究以及对接结果的分析, 可以得出结论, 半乳甘露聚糖和 HSA 的相互作用发生在 HSA 亚结构域 IIB 内, 主要结合作用力为氢键和范德华力。

表 4 参与 HSA 与半乳甘露聚糖分子对接的氨基酸残基以及作用力类型

Table 4 Types of molecular docking force and amino acid residue between HSA and galactomannan

氨基酸残基	氢键	疏水相互作用	范德华力
Glu 376	1	0	1

3 结论

本文利用光谱法和分子对接技术, 研究了半乳甘露聚糖与 HSA 的结合机理及 HSA 构象的变化。结果表明: 半乳甘露聚糖的加入会导致 HSA 的特征吸收峰强度和吸光度发生改变, 还伴随着蓝移。半乳甘露聚糖会导致 HSA 的内源荧光发生静态猝灭, 结合比例约为 1:1, 其结合常数远大于 10⁴ 数量级, 说明半乳甘露聚糖能与 HSA 较好的相互作用。半乳甘露聚糖添加后, HSA 的 α-螺旋减少, 半乳甘露聚糖和 HSA 的结合改变了蛋白质的二级结构并降低了 α-螺旋的稳定性。分子对接进一步验证了光谱实验的结果, 并发现半乳甘露聚糖与 HSA 的最佳结合位点在亚结构域 IIB, 主要结合作用力为氢键和范德华力, 以及参与相互作用的氨基酸残基, 使相互作用的过程和结果可视化。本研究为深入理解半乳甘露聚糖在体内的相互作用机理和运输储藏过程奠定了基础, 为半乳甘露聚糖在食品化学的发展提供了科学依据和参考价值。

参考文献

[1] SITTIKIYOTHIN W, TORRES D, GONÇALVES M P. Modelling the rheological behaviour of galactomannan aqueous solutions[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 59(3): 339–350.

[2] LOSER Ú, ITURRIAGA L, RIBOTTA P D, et al. Combined systems of starch and *Gleditsia triacanthos* galactomannans: Thermal and gelling properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106378.

[3] LIU L, LI M, YU M, et al. Natural polysaccharides exhibit anti-tumor activity by targeting gut microbiota[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 743–751.

[4] SINDHU R K, GOYAL A, DAS J, et al. Immunomodulatory potential of polysaccharides derived from plants and microbes: A narrative review[J]. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2021, 2: 100044.

[5] BEUTLER B. Innate immunity: An overview[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(12): 845–859.

[6] PANTOSTI A, TZIANABOS A O, ONDERDONK A B, et al. Immunochemical characterization of two surface polysaccharides of *Bacteroides fragilis*[J]. *Infection and Immunity*, 1991, 59(6): 2075.

[7] SHI L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 92: 37–48.

[8] ZHANG G, MA Y. Mechanistic and conformational studies on the interaction of food dye amaranth with human serum albumin by multispectroscopic methods[J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(2): 442–449.

[9] CIEPLAK M, SZWABINSKA K, SOSNOWSKA M, et al. Selective electrochemical sensing of human serum albumin by semi-covalent molecular imprinting[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 74: 960–966.

[10] PENG X, WANG X, QI W, et al. Affinity of rosmarinic acid to human serum albumin and its effect on protein conformation stability[J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 178–187.

[11] 肖建波. 多酚类化合物与血清白蛋白相互作用的结构—结合力关系、理论模型和应用研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2009.

[12] XIAO J B. Structure-affinity relationship, theory model and application of interaction between polyphenols and serum albumin[D]. Changsha: Central South University, 2009.]

[13] MANJUSHREE M, REVANASIDDAPPA H D. Evaluation of binding mode between anticancer drug etoposide and human serum albumin by numerous spectrometric techniques and molecular docking[J]. *Chemical Physics*, 2020, 530: 110593.

[14] LIU T, LIU M, GUO Q, et al. Investigation of binary and ternary systems of human serum albumin with oxyresveratrol/piceatannol and/or mitoxantrone by multipectroscopy, molecular docking and cytotoxicity evaluation[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 311: 113364.

[15] MUSA K A, NING T, MOHAMAD S B, et al. Intermolecular recognition between pyrimethamine, an antimalarial drug and human serum albumin: Spectroscopic and docking study[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 311: 113270.

[16] NERUSU A, VAIKUNTAPU P R, CHINTHAPALLI D K, et al. Truncated domains of human serum albumin improves the binding efficiency of uremic toxins: A surface plasmon resonance and computational approach[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 155: 1216–1225.

- [16] LI J, REN C, ZHANG Y, et al. Human serum albumin interaction with honokiol studied using optical spectroscopy and molecular modeling methods[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2008, 881(1): 90–96.
- [17] KHAN I M, SHAKYA S, AKHTAR R, et al. Exploring interaction dynamics of designed organic cocrystal charge transfer complex of 2-hydroxypyridine and oxalic acid with human serum albumin: Single crystal, spectrophotometric, theoretical and antimicrobial studies[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2020, 100: 103872.
- [18] JALALVAND A R, GHOBADI S, AKBARI V, et al. Mathematical modeling of interactions of cabergoline with human serum albumin for biosensing of human serum albumin[J]. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2019, 25: 100297.
- [19] BOURASSA P, DUBEAU S, MAHARVI G M, et al. Binding of antitumor tamoxifen and its metabolites 4-hydroxytamoxifen and endoxifen to human serum albumin[J]. *Biochimie*, 2011, 93(7): 1089–1101.
- [20] DING F, LIU W, ZHANG L, et al. Sulfometuron-methyl binding to human serum albumin: Evidence that sulfometuron-methyl binds at the sudlow's site I[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2010, 968(1): 59–66.
- [21] KIM H S, HAGE D S. Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 816(1): 57–66.
- [22] KALANUR S S, SEETHARAMAPPA J, KALALBANDI V K A. Characterization of interaction and the effect of carbamazepine on the structure of human serum albumin[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53(3): 660–666.
- [23] BOURASSA P, HASNI I, TAJMIR RIAHI H A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins[J]. *Food Chemistry*, 2011, 129(3): 1148–1155.
- [24] SARZEHI S, CHAMANI J. Investigation on the interaction between tamoxifen and human holo-transferrin: Determination of the binding mechanism by fluorescence quenching, resonance light scattering and circular dichroism methods[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(4): 558–569.
- [25] MATEI I, HILLEBRAND M. Interaction of kaempferol with human serum albumin: A fluorescence and circular dichroism study[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 51(3): 768–773.
- [26] TAYYAB S, SAM S E, KABIR M Z, et al. Molecular interaction study of an anticancer drug, ponatinib with human serum albumin using spectroscopic and molecular docking methods[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 214: 199–206.
- [27] MOHAMMADZADEH AGHDASH H, AKBARI N, ESAZADEH K, et al. Molecular and technical aspects on the interaction of serum albumin with multifunctional food preservatives[J]. *Food Chemistry*, 2019, 293: 491–498.
- [28] 申炳俊, 柳婷婷. 光谱法和分子对接技术研究胡桃醌与人血清白蛋白的相互作用[J]. *分析化学*, 2020, 48(10): 1383–1391.
- [29] 李楠, 曾观娣, 孙正华, 等. 光谱法结合分子对接研究普罗帕酮与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *分析试验室*, 2020, 39(10): 1148–1154.
- [30] 赵旭红, 夏彩芬, 周紫薇, 等. 花青素对牛血清白蛋白的光谱特性及构象的影响[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(7): 57–62.
- [31] 袁兰兰, 李金贵, 李芳. 分子对接技术与光谱法分析薯蓣皂苷和人血清白蛋白的相互作用[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(10): 93–99.
- [32] 吕艳芳, 梁倩倩, 郭雨晴, 等. 分子对接和光谱法研究原儿茶醛和阿魏酸与牛血清白蛋白的互作机理[J]. *食品科学*, 2021, 42(14): 24–31.
- [33] 何文妮, 陈开意, 邵波. 对氨基苯甲酸与牛血清白蛋白相互作用的荧光分析[J]. *河南化工*, 2020, 37(9): 23–28.
- [34] 张保林, 王文清, 袁荣尧. 蒽醌及黄酮类化合物与牛血清白蛋白结合的反应研究[J]. *化学学报*, 1994(12): 1208–1212.
- [35] 王王, 甘宁, 孙青, 等. 研究原儿茶醛与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *Acta Chimica Sinica*, 1994(12): 1208–1212.
- [36] 豆焕敬. 分子光谱法研究血红蛋白和小分子的相互作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2014.
- [37] 陈蓉蓉. 光谱法研究四种青蒿素类抗疟药与人血清白蛋白的相互作用[D]. 广州: 暨南大学, 2013.
- [38] CHAVES O A, FERNANDES T V A, De MELOS J L R, et al. Elucidation of the interaction between human serum albumin(HSA) and 3, 4-methylenedioxyde-6-iodo-benzaldehyde-technology[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2020, 48(10): 1383–1391.

- thiosemicarbazone, a potential drug for leishmania amazonensis: Multiple spectroscopic and dynamics simulation approach[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 310: 113117.
- [39] ZHU G, WANG Y, XI L, et al. Spectroscopy and molecular docking studies on the binding of propyl gallate to human serum albumin[J]. *Journal of Luminescence*, 2015, 159: 188–196.
- [40] 张丽娇. 光谱法和分子对接技术研究 FTO 蛋白与小分子的相互作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2017. [ZHANG L J. Studying on the interaction of FTO protein with small molecules by spectroscopy and molecular docking[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.]
- [41] GEHLEN M H. The centenary of the stern-volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the sv quenching map[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2020, 42: 100338.
- [42] CIOTTA E, PROSPITO P, PIZZOFERRATO R. Positive curvature in stern-volmer plot described by a generalized model for static quenching[J]. *Journal of Luminescence*, 2019, 206: 518–522.
- [43] TAYEH N, RUNGASSAMY T, ALBANI J R. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 50(2): 107–116.
- [44] MEMARPOOR YAZDI M, MAHAKI H. Probing the interaction of human serum albumin with vitamin B₂ (riboflavin) and L-arginine (L-arg) using multi-spectroscopic, molecular modeling and zeta potential techniques[J]. *Journal of Luminescence*, 2013, 136: 150–159.
- [45] WANG Q, SUN Q, MA X, et al. Probing the binding interaction of human serum albumin with three bioactive constituents of *Eriobotrya japonica* leaves: Spectroscopic and molecular modeling approaches[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, 148: 268–276.
- [46] AFRIN S, RIYAZUDEEN, RABBANI G, et al. Spectroscopic and calorimetric studies of interaction of methimazole with human serum albumin[J]. *Journal of Luminescence*, 2014, 151: 219–223.
- [47] PARVEEN I, KHAN P, ALI S, et al. Synthesis, molecular docking and inhibition studies of novel 3-n-aryl substituted-2-heteroarylchromones targeting microtubule affinity regulating kinase 4 inhibitors[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 159: 166–177.
- [48] EFTINK M R, GHIRON C A. Fluorescence quenching studies with proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 1981, 114(2): 199–227.
- [49] DING F, LIU W, ZHANG X, et al. Fluorescence and circular dichroism studies of conjugates between metsulfuron-methyl and human serum albumin[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 76(2): 441–448.
- [50] BI S, DING L, TIAN Y, et al. Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2004, 703(1): 37–45.
- [51] KOLAWOLE A O, KOLAWOLE A N, OLOFINSAN K A, et al. Kolaflavanone of kolaviron selectively binds to subdomain 1b of human serum albumin: Spectroscopic and molecular docking evidences[J]. *Computational Toxicology*, 2020, 13: 100118.
- [52] LI J, ZHANG Y, HU L, et al. Binding of carbendazim to bovine serum albumin: Insights from experimental and molecular modeling studies[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2017, 1139: 303–307.
- [53] ISHTIKHAR M, RABBANI G, KHAN R H. Interaction of 5-fluoro-5'-deoxyuridine with human serum albumin under physiological and non-physiological condition: A biophysical investigation[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 123: 469–477.
- [54] SHAHABADI N, MAGHSUDI M, ROUHANI S. Study on the interaction of food colourant quinoline yellow with bovine serum albumin by spectroscopic techniques[J]. *Food Chemistry*, 2012, 135(3): 1836–1841.
- [55] XIAO D, ZHANG L, WANG Q, et al. Investigations of the interactions of peimine and peiminine with human serum albumin by spectroscopic methods and docking studies[J]. *Journal of Luminescence*, 2014, 146: 218–225.
- [56] DING F, ZHANG L, DIAO J, et al. Human serum albumin stability and toxicity of anthraquinone dye alizarin complexone: An albumin-dye model[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 79: 238–246.
- [57] ERMAKOVA E A, DANILOVA A G, KHAIRUTDINOV B I. Interaction of ceftriaxone and rutin with human serum albumin. Waterlogsy-NMR and molecular docking study[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1203: 127444.
- [58] CHUGH H, KUMAR P, TOMAR V, et al. Interaction of noscapine with human serum albumin(HSA): A spectroscopic and molecular modelling approach[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2019, 372: 168–176.