

## 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用

梁鑫富, 董庆亮

### Spectroscopic Method Combined with Molecular Docking Technique to Study the Interaction of Limonin with Bovine Serum Albumin

LIANG Xinfu and DONG Qingliang

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023100285>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

光谱法与计算机辅助研究  $\alpha$ -西柏三烯二醇与牛血清白蛋白的相互作用

Multispectroscopic and Computational Study of the Interaction between  $\alpha$ -Cembrenediol and Bovine Serum Albumin

食品工业科技. 2024, 45(11): 1-10 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080128>

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

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

食品工业科技. 2022, 43(2): 42-49 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040093>

荧光光谱法研究链格孢霉毒素TeA与血清白蛋白的互作机理

Interaction Mechanism between *Alternaria* mycotoxins TeA and Serum Albumin by Fluorescence Spectroscopy

食品工业科技. 2022, 43(8): 288-295 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080011>

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 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.009>

大叶冬青皂苷与牛血清蛋白的相互作用研究

Study on the Interaction between the Saponins of *Ilex latifolia* Thunb and Bovine Serum Albumin

食品工业科技. 2021, 42(19): 8-14 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019080180>

基于荧光及紫外光谱法对虾青素与乳清蛋白相互作用的研究

Interaction between Astaxanthin and Whey Protein Based on Fluorescence and Ultraviolet Spectroscopy

食品工业科技. 2022, 43(2): 126-134 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021040126>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

梁鑫富, 董庆亮. 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(21): 37-44.  
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100285

LIANG Xinfu, DONG Qingliang. Spectroscopic Method Combined with Molecular Docking Technique to Study the Interaction of Limonin with Bovine Serum Albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(21): 37-44. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100285

· 研究与探讨 ·

# 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用

梁鑫富<sup>1,2,3</sup>, 董庆亮<sup>2,3,\*</sup>

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530000;

2. 北部湾大学食品工程学院, 广西钦州 535000;

3. 广西高校北部湾海产品高值化利用与预制食品重点实验室, 广西钦州 535000)

**摘要:** 为研究柠檬苦素 (Limonin, LM) 与牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 相互作用, 本文采用紫外光谱法、荧光光谱法及分子对接技术研究 LM 与 BSA 的相互作用机制。结果表明: LM 能有效淬灭 BSA 的内源荧光, 其淬灭类型为静态淬灭; 两者发生相互作用可形成 1 个结合位点, 分子间作用力主要为氢键和范德华力, 该相互作用过程为自发反应; 紫外光谱及同步荧光光谱表明, LM 与 BSA 发生相互作用后, 可以增加 BSA 上酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp) 残基微环境的疏水性; 通过竞争位点实验及分子对接, 发现 LM 与 BSA 的结合位点在 site I 附近, LM 可以与 BSA 上的 Trp-213 形成氢键, 与 Tyr-340/451 等残基之间存在范德华力。

**关键词:** 柠檬苦素, 牛血清白蛋白, 相互作用, 荧光光谱, 分子对接

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)21-0037-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023100285

本文网刊:



## Spectroscopic Method Combined with Molecular Docking Technique to Study the Interaction of Limonin with Bovine Serum Albumin

LIANG Xinfu<sup>1,2,3</sup>, DONG Qingliang<sup>2,3,\*</sup>

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, China;

2. Food Engineering College, Beibu Gulf University, Qinzhou 535000, China;

3. Guangxi College and University Key Laboratory of High-value Utilization of Seafood and Prepared Food in Beibu Gulf, Qinzhou 535000, China)

**Abstract:** In order to study the interaction between limonin (LM) and bovine serum albumin (BSA), in this paper, the interaction mechanism between LM and BSA was explored by ultraviolet (UV) spectroscopy, fluorescence spectroscopy and molecular docking technology. The results showed that LM could significantly quench the endogenous fluorescence of BSA, displaying a static quenching type. In addition, LM formed a binding site with BSA by hydrogen bonding and van der Waals forces, demonstrating a spontaneous interaction mechanism. Meanwhile, UV spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy showed that the interaction between LM and BSA could increase the hydrophobicity of tyrosine (Tyr) and tryptophan (Trp) residue microenvironment on BSA. Through competition site experiments and molecular docking, it was found that the binding site between LM and BSA was near site I, and LM could form hydrogen bonds with Trp-213 on BSA, and there were van der Waals forces between LM and Tyr-340/451 residues.

**Key words:** limonin; bovine serum albumin; interaction; fluorescence spectrum; molecular docking

收稿日期: 2023-11-03

基金项目: 广西科技厅科技基地和人才专项 (桂科 AD20159019); 北部湾大学高层次人才科研启动经费项目 (2019KYQD10)。

作者简介: 梁鑫富 (1997-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 天然活性成分开发及应用, E-mail: 1093398615@qq.com。

\* 通信作者: 董庆亮 (1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 天然活性成分开发及应用, E-mail: dq180@163.com。

柠檬苦素(Limonin, LM)亦被称为黄柏内酯或吴茱萸内酯,是主要存在于芸香科(Rutaceae)及楝科(Meliaceae Juss.)等植物中的四环三萜类化合物,同时也是植物中重要的次生代谢产物之一。LM 结构中含有 4,4,8-三甲基-17-呋喃基甾体特征骨架,其中 C-3、C-4、C-7、C-16 和 C-17 上连有含氧的官能团, C-14 和 C-15 位上均有氧桥环<sup>[1]</sup>,其结构如图 1 所示。大量动物临床研究表明,LM 具有多种生理活性功能,如抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗肥胖、镇痛消炎、抗焦虑、镇静及改善睡眠等<sup>[2]</sup>,但是 LM 水溶性较差并且其结构易受环境因素影响发生不同程度的降解<sup>[3]</sup>,大大限制了 LM 的进一步应用和开发。目前关于 LM 的研究主要集中在生理活性研究上,但是其在人体内如何转运及其与相关载体蛋白的相互作用的研究较少。

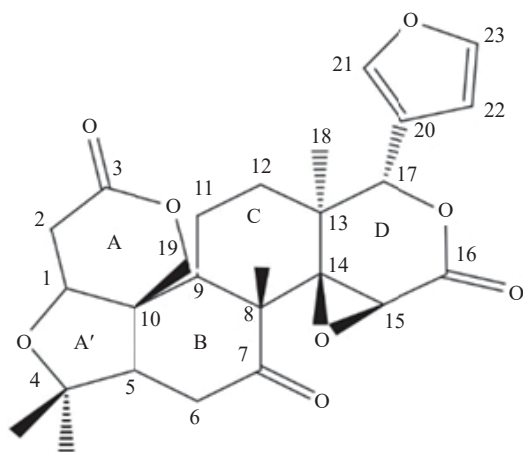


图 1 柠檬苦素的结构  
Fig.1 Structure of limonin

人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)是血液中的多功能转运蛋白,能可逆结合小分子物质并将其运送到人体需要的各个部位<sup>[4]</sup>,是人体重要的转载体蛋白之一。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)在序列和构象上与 HSA 具有高度同源性和相似性,且来源丰富、获取成本低、溶解性好,因此被广泛应用于小分子物质与血清蛋白的研究中<sup>[4-5]</sup>。BSA 由 3 个同源结构域(I~III)构成,每个结构域包含 2 个结构亚域 A 和 B,其中结构亚域 II A 和 III A 的疏水空腔中有结合位点 Sudlow's sites I 和 II<sup>[6]</sup>。紫外光谱法和荧光光谱法是研究蛋白与小分子物质相互作用的重要手段,而随着计算机模拟技术的高速发展,分子对接技术也逐步被应用在蛋白与小分子相互作用机制的研究中。因此,本实验应用紫外光谱法、荧光光谱法以及分子对接技术来研究 LM 与 BSA 之间的相互作用机制,有助于了解 LM 在人体内如何转运、分布及消除等情况,同时还能构建 LM 的蛋白递送载体研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

BSA(纯度≥98%,低脂肪酸)、华法林(纯度≥

98%) 上海麦克林生化科技股份有限公司;LM(纯度≥98%)、布洛芬(纯度≥98%) 上海源叶生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 均为 AR,上海麦克林生化科技股份有限公司。

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 郑州长城科工贸有限公司;HH-4 数显恒温水浴锅 常州普天仪器制造有限公司;Evolution 201 型紫外-可见分光光度计、Lumina 型荧光分光光度计 美国赛默飞世尔公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 溶液配制** 将 BSA 溶于 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH7.4)中,配成浓度为  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 的 BSA 储备液;将 LM 溶于 DMSO 中,配制成浓度为  $1 \times 10^{-3}$  mol/L 的 LM 储备液,置于棕色玻璃瓶中;用 PBS 缓冲液配制浓度为  $5 \times 10^{-4}$  mol/L 的华法林和布洛芬储备液;储备液均是当天配当天用。

**1.2.2 紫外光谱测定** 参考李琳等<sup>[7]</sup>研究方法,并稍加改进。准确吸取 3 mL PBS 缓冲液和 1 mL BSA 储备液置于 5 mL 棕色玻璃瓶中,然后加入 LM 储备液,再用 PBS 缓冲液补足至 5 mL 并混合均匀,最终混合液中 BSA 浓度均为  $2 \times 10^{-6}$  mol/L, LM 的浓度分别为  $0$ 、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $8 \times 10^{-5}$ 、 $12 \times 10^{-5}$ 、 $16 \times 10^{-5}$ 、 $20 \times 10^{-5}$  mol/L,将混合液置于 298 K 水浴锅中反应 30 min,使用紫外-可见分光光度计进行紫外光谱扫描,扫描范围为 200~400 nm,波长间隔为 1 nm。

**1.2.3 荧光光谱测定** 样品制备与 1.2.2 一致,将混合液置于 298、304、310 K 水浴锅中反应 30 min。荧光分光光度计的参数设置如下:激发波长为 280 nm, PMT 电压为 500 V,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm,扫描范围为 300~450 nm。

**1.2.4 判断荧光淬灭类型** 荧光淬灭过程可分为静态淬灭和动态淬灭等,其中静态淬灭是指淬灭剂与蛋白之间形成不发光的基态配合物,使其荧光强度减弱,蛋白分子结构会发生改变,当温度升高时,复合物稳定性减弱,淬灭常数就会下降;而动态淬灭是指淬灭剂与蛋白之间相互碰撞,使其荧光强度减弱,蛋白分子结构不会发生改变,若温度上调,碰撞数目的有效离子增加,增强电子转移,淬灭常数就会升高。为了确定 LM 对 BSA 的荧光淬灭类型,可以通过 Stern-Volmer 方程<sup>[8]</sup>公式(1)计算淬灭常数的变化,以判断其淬灭类型。

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{式 (1)}$$

式中:  $F_0$  和  $F$  分别为无 LM 和有 LM 存在时 BSA 的荧光强度;  $K_q$  为淬灭速率常数( $L/(\text{mol} \cdot \text{s})$ );  $\tau_0$  为荧光寿命,在没有淬灭剂的情况下,BSA 的荧光寿命值为  $10^{-8}$  s;  $[Q]$  为 LM 的浓度(mol/L);  $K_{sv}$  为淬灭常数( $L/\text{mol}$ )。



1.2.5 结合常数及结合位点计算 采用双对数方程公式(2)计算 LM 和 BSA 相互作用的结合常数  $K_a$  (L/mol)和结合位点数<sup>[9]</sup>。

$$\lg\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \lg K_a + n \lg [Q] \quad \text{式 (2)}$$

1.2.6 热力学性质和作用力判断 研究表明,小分子与蛋白发生相互作用的主要作用力包括氢键、静电相互作用力、范德华相互作用力和疏水相互作用等,可根据 Van't Hoff 方程(3)和热力学公式(4)计算 LM 与 BSA 相互作用的热力学性质及相互作用力类型<sup>[10]</sup>。

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{式 (3)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{式 (4)}$$

式中:  $\Delta H$  为焓变 (kJ/mol);  $\Delta S$  为熵变 (J/(mol·K));  $\Delta G$  为吉布斯自由能(kJ/mol);  $T$  为温度 (K);  $R$  为理想气体常数, 8.314 J/(mol·K)。

1.2.7 同步荧光测定 样品制备与 1.2.2 一致,然后将混合液置于 298 K 水浴锅中反应 30 min, 荧光分光光度计的参数设置如下: PMT 电压均为 500 V, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 激发波长与发射波长差 ( $\Delta\lambda$ ) 为 15 nm 时, 扫描范围为 250~350 nm; 激发波长与发射波长差为 60 nm 时, 扫描为 300~400 nm。

1.2.8 竞争结合位点实验 a.样品制备与 1.2.2 一致,然后将混合液置于 298 K 水浴锅中反应 30 min, 荧光分光光度计的参数设置如下: 激发波长为 295 nm, PMT 电压为 500 V, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm, 扫描范围为 300~450 nm<sup>[11-12]</sup>。b.取 1 mL BSA 储备液置于 5 mL 棕色玻璃瓶中, 先加入 20  $\mu$ L 华法林/布洛芬储备液进行反应; 后续操作和 1.2.2 一致, 按照测定内源荧光光谱的参数测定该体系的内源荧光光谱并利用公式(2)计算该体系中的  $K_a$  值<sup>[13-14]</sup>。

1.2.9 分子对接 LM 与 BSA 的分子对接用 Autodock 4.2 软件进行。LM 的三维结构从 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取, 其结构优化按 Autodock 软件默认要求进行并保存成 PDBQT 文件。BSA 晶体结构从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取, 其 ID 为: 4F5S, 先使用 PyMol 软件对 BSA 晶体结构进行去除杂分子和水分子, 然后再使用 Autodock 4.2 软件对 BSA 进行加氢原子、计算电荷、设置原子类型并保存成 PDBQT 文件。在 Autodock 4.2 软件的 Grid 版块进行预测整个蛋白中的活性位点; 设置对接时, 将 BSA 选为刚性, LM 为柔性, 通过 Genetic Algorithm Parameters 算法进行分子对接; 对接结束后, 选择结合自由能最低的构象, 使用 PyMol 软件对蛋白与受体的相互作用力分析<sup>[15]</sup>。

### 1.3 数据处理

利用数据处理软件 Origin 2021 和 Excel 2016 进行数据统计及图表绘制; 分子对接结果可视化用

PyMol 软件和 Discovery Studio 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外光谱分析

BSA 分子构象的改变导致其微环境的变化, 而导致紫外吸收光谱的变化, 包括吸收光谱中的红移或蓝移<sup>[16]</sup>。BSA 在紫外吸收光谱中主要表现为两个特征吸收峰, 其中 208 nm 附近的强烈特征吸收峰反映 BSA 的肽链骨架信息, 而 278 nm 附近的特征吸收峰是由 BSA 的酪氨酸 (Tyrosine, Tyr) 和色氨酸 (Tryptophan, Trp) 等残基的苯环  $\pi \rightarrow \pi^*$  跃迁产生<sup>[17]</sup>。LM 在紫外吸收光谱上, 仅在 200 nm 附近有末端吸收峰, 而最大吸收波长出现在 210 nm 附近, 常将 210 nm 作为检测波长, 采用高效液相色谱法对 LM 进行定量分析等<sup>[18-19]</sup>。不同浓度 LM 与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱结果如图 2 所示, 随着 LM 浓度的不断增加, BSA 的特征吸收峰强度逐渐增加, 表明 LM 与 BSA 发生了相互作用; 而 BSA 特征吸收峰发生红移 (208-213 nm, 278-280 nm), 可能是疏水性的 LM 与 BSA 发生相互作用后, 诱导 BSA 构象发生变化, BSA 上 Tyr 残基和 Trp 残基周围微环境极性下降, 疏水性增强所导致<sup>[20]</sup>。研究表明, 动态猝灭不引起蛋白质吸收峰波长改变, 而静态猝灭则会导致吸收峰波长改变<sup>[4,21]</sup>, 因此, 初步判断 LM 对 BSA 的猝灭过程为静态猝灭。

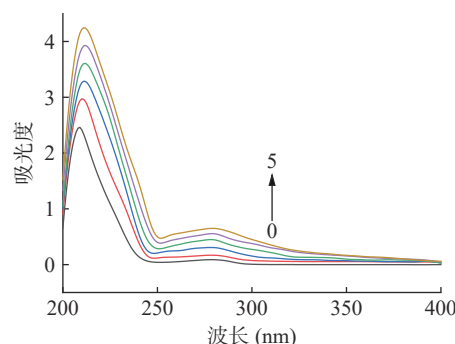


图 2 LM 与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱  
Fig.2 UV absorption spectra of the interaction between LM and BSA

注: 0~5 分别代表 LM 浓度为 0、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $8 \times 10^{-5}$ 、 $12 \times 10^{-5}$ 、 $16 \times 10^{-5}$ 、 $20 \times 10^{-5}$  mol/L, 图 3~图 5 同。

### 2.2 荧光光谱分析

荧光光谱技术已经被广泛应用于蛋白-小分子配体之间相互作用的研究中, 而 BSA 分子中的内源性荧光大部分来自 Trp 和 Tyr 等<sup>[22]</sup>。298、304、310 K 时, 不同浓度的 LM 与 BSA 相互作用的内源荧光光谱如图 3 所示, BSA 在 342 nm 处有强烈的荧光发射峰, 随着 LM 浓度的不断增加, BSA 的荧光强度逐渐降低并且出现蓝移 (342-337 nm), 这表明 LM 与 BSA 发生相互作用可使 BSA 的内源荧光发生猝灭, 并且导致 BSA 的构象发生改变, 荧光团周围微环境的极性降低, 疏水性增强, 这与前面紫外光谱结果一致; 含有三萜类物质的大叶冬青提取物<sup>[23]</sup> 以及苦丁

茶冬青提取物<sup>[24]</sup>在与 BSA 相互作用研究中也发生了相似的内源荧光光谱变化。此外,不同温度下添加同一浓度的 LM 对 BSA 的淬灭率也不同,当固定 LM 添加浓度为  $8 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  时,298 K 下的淬灭率为 44%、304 K 下的淬灭率为 34%、310 K 下的淬灭率为 27%,表明环境温度升高不利于 LM 与 BSA 的结合。

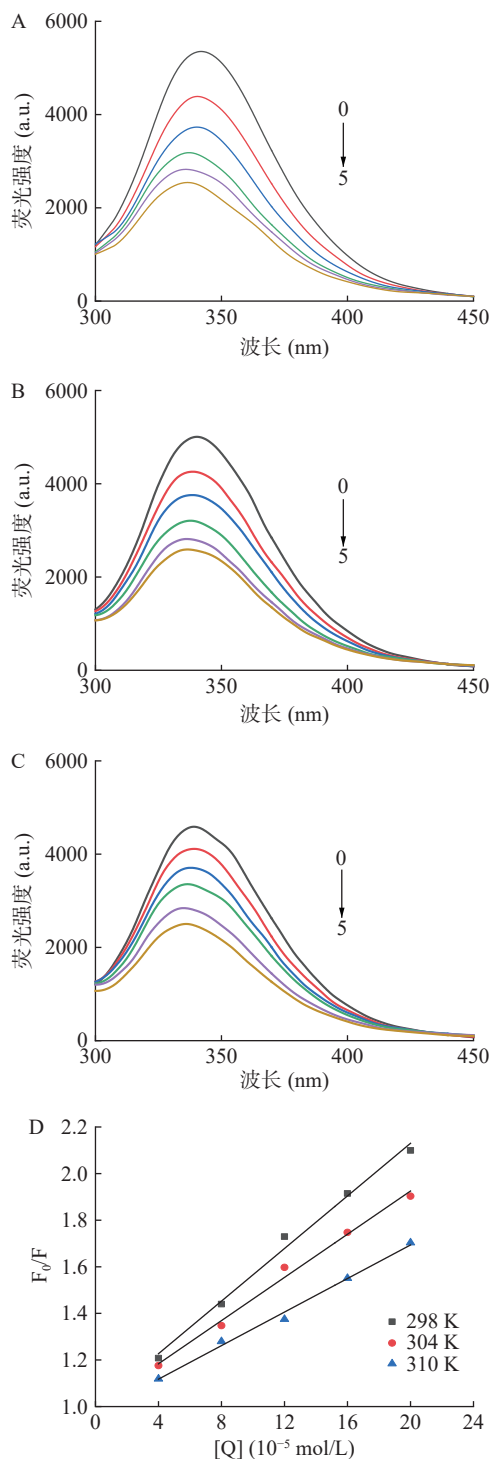


图3 不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的荧光光谱(A, 298 K; B, 304 K; C, 310 K)及其 Stern-Volmer 曲线(D)

Fig.3 Fluorescence spectra of the interaction between LM and BSA at different temperatures (A, 298 K; B, 304 K; C, 310 K) and their Stern-Volmer curves (D)

2.2.1 荧光淬灭类型分析 不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 曲线如图 3D 所示,所有曲线均呈线性,即淬灭剂 LM 的加入可促使 BSA 的荧光强度均匀淬灭,据此可初步判断淬灭剂 LM 与 BSA 之间只存在一种结合类型<sup>[25]</sup>。不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的淬灭速率常数及淬灭常数如表 1 所示,不同温度下的  $K_q$  均大于各类剂对生物大分子最大扩散控制的碰撞淬灭速率常数  $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ <sup>[26]</sup>,并且随着温度的升高, $K_{sv}$  逐渐降低,表明 LM 与 BSA 之间的淬灭过程为静态淬灭,即淬灭剂 LM 与大分子 BSA 形成了稳定的复合物。

表 1 不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的淬灭速率常数及淬灭常数

Table 1 Quenching rate constants and quenching constants of the interaction between LM and BSA at different temperatures

T(K)	$K_q(10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_{sv}(10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$R^2$
298	5.652	5.652	0.9918
304	4.622	4.622	0.9915
310	3.420	3.420	0.9901

2.2.2 结合常数及结合位点计算 研究表明,当  $K_a$  的范围在  $10^5 \sim 10^7 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  时,表明小分子物质与蛋白之间存在较强的结合力;当  $K_a$  的范围在  $10^2 \sim 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  时,表明小分子物质与蛋白之间存在低到中等的结合力<sup>[27]</sup>。由表 2 可知,不同温度下 LM 与 BSA 的  $K_a$  均在  $10^3 \sim 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$  之间,表明 LM 与 BSA 之间存在中等的结合力。随着温度升高, $K_a$  随之降低,表明 LM 与 BSA 之间的稳定性受温度控制,再次证实 LM 与 BSA 之间的淬灭过程为静态淬灭。而不同温度下,LM 与 BSA 的  $n$  值均等于 1,表明两者之间有一个结合位点,即 LM 与 BSA 相互作用形成的复合物为 1:1 型。此外,结合位点  $n$  值随着温度的上升而下降,表明在结合过程中温度的影响非常重要<sup>[28]</sup>,这与前面温度升高不利于 LM 对 BSA 荧光淬灭的结果一致。

表 2 不同温度下 LM 与 BSA 的结合常数及结合位点

Table 2 Binding constants and binding sites of LM and BSA at different temperatures

T(K)	$K_a(10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$n$	$R^2$
298	9.007	1.053	0.9944
304	6.823	1.039	0.9948
310	5.739	1.004	0.9894

2.2.3 热力学性质分析和作用力类型 研究表明,可以根据吉布斯自由能  $\Delta G$ 、焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$  的大小判断小分子与蛋白的结合过程及小分子与蛋白之间的主要作用力,当  $\Delta G$  小于零时,表明该结合过程是自发的;当  $\Delta H$  和  $\Delta S$  均大于零时,主要作用力表现为疏水相互作用,当  $\Delta H$  和  $\Delta S$  均小于零时,主要作用力表现为氢键或范德华力等<sup>[29]</sup>。由表 3 可知,LM 与 BSA 之间的  $\Delta G$  均小于零,并且  $\Delta H$  和  $\Delta S$  也均小于零,表明 LM 与 BSA 之间的结合是自发的,结合过

程为放热反应,范德华力和氢键作用是结合过程中的主要作用力。

表 3 不同温度下 LM 与 BSA 相互作用的热力学参数  
Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between LM and BSA at different temperatures

T(K)	$\Delta H(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$	$\Delta S(\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1})$	$\Delta G(\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})$
298	-28.94	-21.62	-22.49
304			-22.36
310			-22.23

2.2.4 同步荧光光谱分析 同步荧光光谱可以更清晰地反映小分子结合对蛋白质氨基酸残基微环境的影响,其中  $\Delta\lambda=15\text{ nm}$  和  $\Delta\lambda=60\text{ nm}$  时,分别表示 Tyr 和 Trp 残基的特征信息<sup>[30]</sup>。由图 4 可知,BSA 中的 Tyr 和 Trp 残基分别在 302、343 nm 处有最大特征吸收峰,随着 LM 的加入,BSA 上的 Tyr 和 Trp 残基荧光均发生淬灭,并且最大特征吸收峰都发生轻微蓝移,表明 LM 的加入可导致 BSA 上的 Tyr 和 Trp 残基周围微环境的极性下降,疏水性上升,和前面紫外光谱、内源荧光光谱结论一致。此外,随着 LM 浓度的升高,Trp 残基荧光淬灭效率远比 Tyr 残基荧光淬灭效率大,初步判断 LM 导致 BSA 发生荧光淬灭的主要原因可能是 Trp 残基的荧光发生了淬灭。

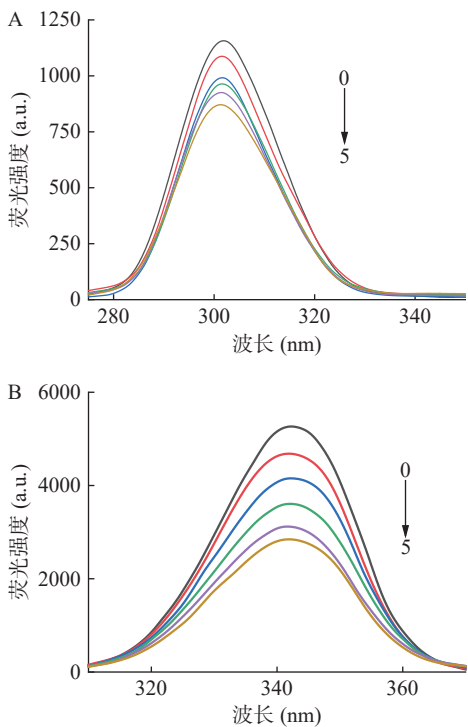


图 4 LM 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱  
Fig.4 Synchronous fluorescence spectrum of the interaction between LM and BSA  
注: A 代表  $\Delta\lambda=15\text{ nm}$ , B 代表  $\Delta\lambda=60\text{ nm}$ 。

2.3 竞争位点试验分析

研究表明,BSA 的结合位点 sites I 中含有 Trp 残基和 Tyr 残基,而结合位点 sites II 中只含有 Tyr 残基<sup>[6,11-12]</sup>,当激发波长为 280 nm 时,BSA 中的 Trp

和 Tyr 残基均被激发,而在激发波长为 295 nm 时,仅有 Trp 残基被激发,因此可利用这一特性,比较不同激发波长下 LM 对 BSA 的内源荧光光谱,进而初步判断 LM 与 BSA 的结合位点。由图 5(A)可知,当激发波长为 295 nm 时,随着 LM 浓度的升高,BSA 的荧光强度逐渐降低,并且出现蓝移,和前面同步荧光光谱结论一致。由图 5(B)可知,LM 导致 BSA 发生荧光淬灭,主要是 LM 导致 BSA 中的 Trp 残基发生淬灭,并且初步判断 LM 与 BSA 相互作用的结合位点在 sites I 附近。

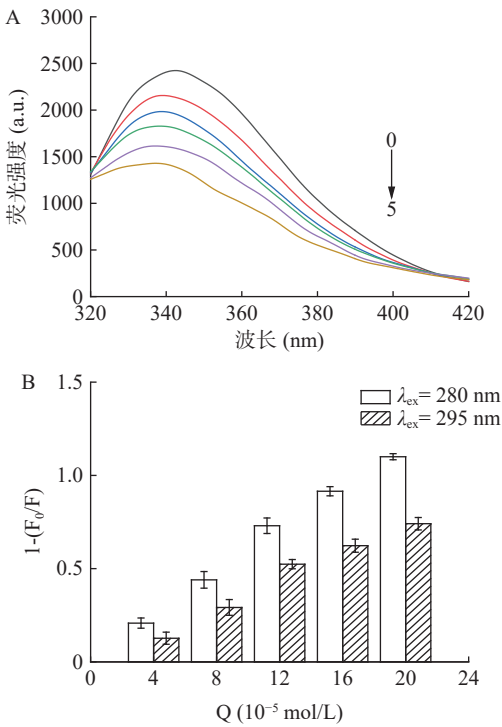


图 5 激发波长为 295 nm 下 LM 与 BSA 相互作用荧光光谱 (A) 及不同激发波长下 LM 对 BSA 的淬灭率情况(B)  
Fig.5 Fluorescence spectra of the interaction between LM and BSA at an excitation wavelength of 295 nm (A) and the quenching rate of LM on BSA at different excitation wavelengths (B)

为了进一步验证 LM 与 BSA 的结合位点在 sites I 附近,选用荧光探针华法林和布洛芬进行验证,其中华法林可以与结合位点 sites I 特异性结合,布洛芬可与结合位点 sites II 特异性结合<sup>[31-32]</sup>。由表 4 可知,加入荧光探针华法林后,该体系的  $K_a$  为  $6.173\times10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,而加入荧光探针布洛芬后,该体系的  $K_a$  为  $9.013\times10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,表明荧光探针华法林对 LM 与 BSA 的相互作用产生较大影响,即 LM

表 4 荧光探针对结合体系结合常数的影响

荧光探针	$K_a(10^3\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$R^2$
空白	9.007	0.9944
华法林	6.173	0.9883
布洛芬	9.013	0.9906



与 BSA 的结合位点在 sites I 附近。

## 2.4 分子对接结果分析

分子对接技术可以弥补光谱法的不足,能更直观、充分地认识小分子与大分子间的结合特性<sup>[33]</sup>。研究表明,分子对接结果的结合能量越低,大分子与小分子之间的结合越紧密<sup>[34]</sup>,分子对接结果显示 LM 与 BSA 的最低结合能量为-5.36 kJ/mol,表明 LM 可以与 BSA 紧密结合。运用 PyMol 软件及 Discovery Studio 软件对最低结合能下的分子对接结果进行可视化,由图 6 可知,LM 上的呋喃环与 BSA 上的 Trp-213 形成了一个常规氢键;LM 在 C-7

上的含氧官能团及在 C-19 上的氢原子与 BSA 上的 Lys-294、Glu-443 形成了两个较弱的碳氢键;LM 与 BSA 上的 Arg-194、Lys-221 和 Tyr-340/451 等 9 个残基之间存在范德华力,表明范德华力和氢键参与了 LM 与 BSA 的相互作用,这与前面热力学分析结果一致。此外,还发现 LM 能与 BSA 上的 Arg-217、Val-342、Pro-446、Cys-447 及 Asp-450 等残基之间形成 Alkyl 键、Pi-Alkyl 键、Pi-Anion 键等。其中 Trp-213、Tyr-340/451 等残基位于 BSA 的结构亚域 II A 中,即分子对接结果再次证明 LM 与 BSA 的结合位点位于 sites I 附近。

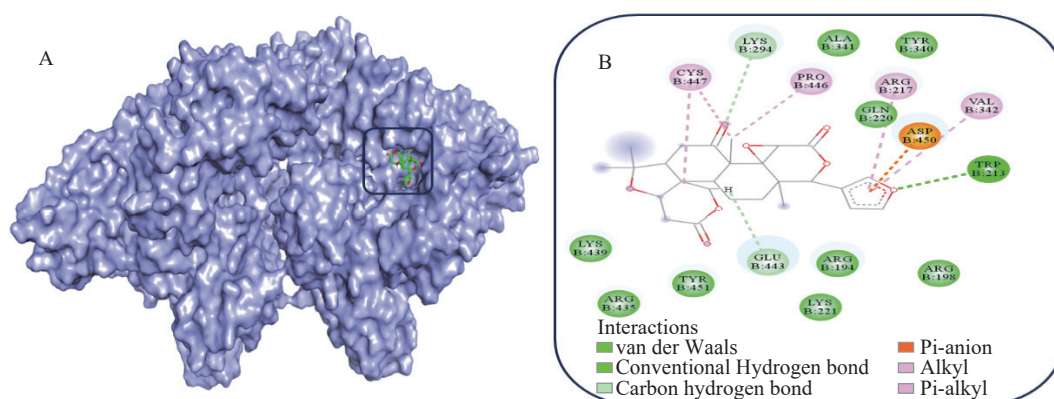


图 6 LM 与 BSA 结合位点(A)及结合位点 2D 相互作用(B)

Fig.6 Binding site (A) and its 2D interaction (B) between LM and BSA

## 3 结论

本文采用了紫外光谱法、荧光光谱法及分子对接技术研究了 LM 与 BSA 的相互作用。紫外光谱结果表明,LM 与 BSA 发生相互作用后,BSA 在紫外光谱上的特征吸收峰发生了红移(208-213 nm, 278-280 nm)。荧光光谱结果表明,LM 导致 BSA 发生荧光淬灭,淬灭类型为静态淬灭,而 LM 与 BSA 发生相互作用是自发反应过程,该过程的主要作用力是范德华力和氢键,并且两者只有一个结合位点。同步荧光光谱结果表明,LM 与 BSA 发生相互作用后,增加了 BSA 中 Tyr 和 Trp 残基微环境的疏水性,并且 Trp 的荧光淬灭效率大于 Tyr 的荧光淬灭效率。竞争位点实验及分子对接结果表明,LM 与 BSA 的结合位点在 site I 附近,LM 可以与 BSA 上的 Trp-213 形成氢键,与 Tyr-340/451 等残基之间存在范德华力,在分子水平上揭示了 LM 与 BSA 的相互作用。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 参考文献

[1] 晏敏,周宇,贺肖寒,等.柑橘籽中柠檬苦素及类似物的生物活性研究进展[J].食品与发酵工业,2018,44(2):290-296.

[YAN M, ZHOU Y, HE X H, et al. Research progress on the biological activity of limonin and its analogues in citrus seeds[J]. Food and Fermentation Industry, 2018, 44(2): 290-296.]

[2] 李韶静,汤建华.木果楝属柠檬苦素类似物及其生物活性的研究进展[J].中草药,2022,53(10):3178-3194. [LI S J, TANG J H. Research progress on limonin analogues of the genus Melia and their biological activities[J]. Chinese Herbal Medicine, 2022, 53(10): 3178-3194.]

[3] 罗喜荣,任荣,钱志瑶,等.HPLC 法测定柠檬苦素的平衡溶解度和表观油水分配系数[J].药物分析杂志,2013,33(10):1711-1714. [LUO X R, REN R, QIAN Z Y, et al. HPLC determination of equilibrium solubility and apparent oil/water partition coefficient of limonin[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(10): 1711-1714.]

[4] 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. [LÜ Y F, LIANG Q Q, GUO Y Q, et al. Molecular docking and spectroscopic studies on the interaction mechanism between protocatechualdehyde and ferulic acid with bovine serum albumin[J]. Food Science, 2021, 42(14): 24-31.]

[5] GELAMO E L, SILVA C H T P, IMASATO H, et al. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1594(1): 84-99.

[6] MARUYAMA T, LIN C C, YAMASAKI K, et al. Binding of suprofen to human serum albumin. Role of the suprofen carboxyl group[J]. Biochem Pharmacol, 1993, 45(5): 1017-1026.

[7] 李琳,蔡鸣,李冰,等.杂环胺与牛血清白蛋白的相互作用研

- 究[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2020, 48(11): 123–130.
- [ LI L, WU M, LI B, et al. Interaction studies between heterocyclic amines and bovine serum albumin[J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2020, 48(11): 123–130. ]
- [ 8 ] KUMARI M, MAURYA J K, TASLEEM M, et al. Probing HSA-ionic liquid interactions by spectroscopic and molecular docking methods[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2014, 138: 27–35.
- [ 9 ] ZHANG Z, YANG M, YI J, et al. Comprehensive insights into the interactions of two emerging bromophenolic DBPs with human serum albumin by multispectroscopy and molecular docking[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(1): 563–572.
- [ 10 ] LI T, HU P, DAI T, et al. Comparing the binding interaction between beta-lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi-spectroscopy analysis and molecular docking[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2018, 201: 197–206.
- [ 11 ] 王会镇, 赵雨, 姚小军, 等. 1-(4-甲氧基苯基)-3-(2-噻吩基)-2-丙烯酮与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 化学试剂, 2021, 43(11): 1569–1574. [ WANG H Z, ZHAO Y, YAO X J, et al. Interaction of 1-(4-methoxyphenyl)-3-(2-thienyl)-2-propenone with bovine serum albumin[J]. *Chemical Reagents*, 2021, 43(11): 1569–1574. ]
- [ 12 ] 吴明火, 李尚春, 王丽梅, 等. 邻苯二甲酸二环己酯与牛血清白蛋白相互作用研究[J]. 分析科学学报, 2022, 38(3): 321–326. [ WU M H, LI S C, WANG L M, et al. Study on the interaction between dicyclohexyl phthalate and bovine serum albumin[J]. *Journal of Analytical Science*, 2022, 38(3): 321–326. ]
- [ 13 ] RAHMAN N, KHALIL N. Characterization of sulfasalazine-bovine serum albumin and human serum albumin interaction by spectroscopic and theoretical approach[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 300: 122865.
- [ 14 ] ABUBAKAR M, KANDANDAPANI S, MOHAMED S B, et al. Shedding light on the molecular interaction between the Hepatitis B virus inhibitor, clevudine, and human serum albumin: Thermodynamic, spectroscopic, microscopic, and *in silico* analyses[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2022, 368: 120737.
- [ 15 ] 吕艳芳, 张紫卿, 梁倩倩, 等. 光谱法和分子对接研究高儿茶酚与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 中国食品学报, 2022, 22(12): 72–81. [ LÜ Y F, ZHANG Z Q, LIANG Q Q, et al. Spectroscopy and molecular docking to study the interaction of catechols with bovine serum albumin[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(12): 72–81. ]
- [ 16 ] HU Y, LIU Y, ZHAO R, et al. Spectroscopic studies on the interaction between methylene blue and bovine serum albumin[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, 179(3): 324–329.
- [ 17 ] POLET H, STEINHARDT J. Binding-induced alterations in ultraviolet absorption of native serum albumin[J]. *Biochemistry (Easton)*, 1968, 7(4): 1348–1356.
- [ 18 ] 李阳, 安琪, 宋悦, 等. HPLC 法测定不同产地柑橘第一次生理落果中活性成分的含量[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 364–371. [ LI Y, AN Q, SONG Y, et al. HPLC was used to determine the content of active ingredients in the first physiological fruit drop of citrus from different origins[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(19): 364–371. ]
- [ 19 ] 孟鹏, 郑宝东. 超高效液相色谱法快速并同时检测金柑中柠檬苦素和诺米林[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 177–181. [ MENG P, ZHENG B D. Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was used for the rapid and simultaneous detection of limonin and nomiline in kumquats[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2013, 13(2): 177–181. ]
- [ 20 ] 顾佳丽, 王思宇, 杨丹, 等. 光谱法研究甲苯达唑与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析科学学报, 2020, 36(6): 857–862. [ GU J L, WANG S Y, YANG D, et al. The interaction between mebendazole and bovine serum albumin was studied by spectroscopy[J]. *Journal of Analytical Science*, 2020, 36(6): 857–862. ]
- [ 21 ] LIU B, XUE C, WANG J, et al. Study on the competitive reaction between bovine serum albumin and neomycin with ponceau S as fluorescence probe[J]. *Journal of Luminescence*, 2010, 130(11): 1999–2003.
- [ 22 ] GU J, LIU H, HUANG X, et al. Investigation of the separate and simultaneous bindings of warfarin and fenofibrate to bovine serum albumin[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 236: 123978.
- [ 23 ] 焦安妮, 于敏, 关玥, 等. 大叶冬青皂苷与牛血清蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 8–14. [ JIAO A N, YU M, GUANG Y, et al. Study on the interaction between saponins from *Ilex magnolia* and bovine serum proteins[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(19): 8–14. ]
- [ 24 ] 胡夏恬, 倪帅帅, 焦安妮, 等. 苦丁皂苷 L、苦丁皂苷 N 与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2020, 41(9): 55–60. [ HU X T, NI S S, JIAO A N, et al. Study on the interaction between kudingsaponin L, kudingsaponin N and bovine serum albumin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(9): 55–60. ]
- [ 25 ] 韩忠保, 吴雨杭, 米媛媛, 等. 荧光光谱法结合分子对接研究人血清白蛋白对齐墩果酸与熊果酸的异构体识别作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(7): 2190–2195. [ HAN Z B, WU Y H, MI Y Y, et al. Fluorescence spectroscopy combined with molecular docking study on the recognition of isomers of oleanolic acid and ursolic acid by human serum albumin[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2019, 39(7): 2190–2195. ]
- [ 26 ] WARE W R. Oxygen quenching of fluorescence in solution: A n experimental study of the diffusion process[J]. *Journal of Physical Chemistry (1952)*, 1962, 66(3): 455–458.
- [ 27 ] 杨雯雁, 马秀兰, 张宇. 荧光光谱法结合分子对接研究邻苯二甲酸单环己酯与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析实验室, 2023, 42(9): 1236–1241. [ YANG Y W, MA X L, ZHANG Y. Fluorescence spectroscopy combined with molecular docking study on the interaction between monocyclohexyl phthalate and bovine serum albumin[J]. *Analysis Laboratory*, 2023, 42(9): 1236–1241. ]
- [ 28 ] HU Y, OUYANG Y, DAI C, et al. Site-selective binding of human serum albumin by palmatine: Spectroscopic approach[J]. *Biomacromolecules*, 2010, 11(1): 106–112.
- [ 29 ] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: Forces contributing to stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096–3102.
- [ 30 ] AZIMI O, EMAMI Z, SALARI H, et al. Probing the interaction of human serum albumin with norfloxacin in the presence of high-frequency electromagnetic fields: Fluorescence spectroscopy and circular dichroism investigations[J]. *Molecules*, 2011, 16(12):



9792-9818.

[31] 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.

[ZHAO X H, XIA C F, ZHOU Z W, et al. Effect of anthocyanins on the spectral characteristics and conformation of bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(7): 57-62.]

[32] 刘晓娟, 邓培渊, 范春丽, 等. 环氧虫啉与人血清白蛋白的相互作用[J]. 农药学学报, 2024, 26(1): 160-167. [LIU X J, DENG P Y, FAN C L, et al. Studies of the interaction between cycloxaprid

and human serum albumin[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(1): 160-167.]

[33] WANG T, WANG N, YU Y, et al. Study of soybean protein isolate-tannic acid non-covalent complexes by multi-spectroscopic analysis, molecular docking, and interfacial adsorption kinetics[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 137: 108330.

[34] HU Y, XU S, ZHU X, et al. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2009, 74(2): 526-531.