

光谱法和分子对接研究红斑红曲胺与牛血清白蛋白相互作用

黄朝波³, 徐 晗³, 杨明冠³, 李贞景^{1,3}, 杨 华^{1,3}, 王昌禄^{1,2,3}, 周庆礼^{1,2,3*}

1. 省部共建食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457
2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457
3. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457

摘 要 近年来,随着对红曲色素的深入研究,其越来越多的功能活性被发现,但其某些致毒作用也使红曲色素的安全性受到了质疑。因此,阐明红曲色素在人体中与大分子的相互作用对深入研究其转运代谢及毒副作用具有重要作用。光谱法是研究溶液中分子与蛋白质相互作用的一种有效方法,其具有灵敏度高、选择性强、用样量少、方法简单等优点,在研究中得到越来越广泛的应用。为探究红曲色素在体内的转运机制和血液中与转运蛋白的相互作用,本研究首次用红斑红曲胺(Rubropunctamine, Rub)作为红曲色素的典型代表与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)相互作用。利用内源荧光光谱、同步荧光光谱探究不同浓度的 Rub 对 BSA 的荧光猝灭作用,采用 Stern-Volmer 方程、Lineweaver-Burk 函数和 Van't-Hoff 方程对不同温度下 BSA 与 Rub 作用后在 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ (280.0 nm/340.0 nm) ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ 表示荧光的激发波长和发射波长)的内源荧光强度值确定二者作用类型、结合位点数及相互作用机理,进一步利用圆二色谱定量测定了 Rub 的结合对 BSA 二级结构影响,最后运用软件 Discovery Studio2.5 对 Rub 与 BSA 的相互结合进行分子对接模拟。结果显示:(1) Rub 对 BSA 具有较强的内源荧光猝灭效果,在 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ (280.0 nm/340.0 nm) 的荧光强度下降 306.1, 发射波长由 338.6 nm 蓝移到 331.8 nm, 同步荧光显示荧光猝灭主要发生在色氨酸残基上。(2) Stern-Volmer 方程计算得到动态猝灭速率常数 K_q 为 $2.335 \times 10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, 远大于此类型允许的最大扩散碰撞常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, 判定该猝灭是单纯的静态猝灭过程。利用 Lineweaver-Burk 函数计算得到静态猝灭速率常数 K_q 随温度升高而减小, 即该复合物在温度升高时变得不稳定。(3) 利用等式 $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_0 + n \lg c_Q$ 得到两者结合常数可达 $10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 以上, 结合位点数近似为 1, 且随着温度增加表观结合常数变小。(4) 不同温度下 Van't-Hoff 方程计算得到 ΔH , ΔS , ΔG 都小于 0, 则该相互作用能自发进行且氢键和范德华力是其主要的相互作用力。(5) 圆二色谱测得 BSA 与 Rub 结合后二级结构中 α -螺旋含量由 29.4% 降至 20.2%; β -折叠由 39.9% 上升到 50.7%; β -转角由 6.5% 下降到 3.5%; 无规则卷曲由 24.2% 上升到 25.6%。(6) 分子对接发现 Rub 结合点位于 BSA 中由 Arg458, Asp108, Glu424 和 Ser428 等氨基酸形成的口袋内, 与 Arg458 有范德华力作用, 与 Arg144 形成分子内氢键, 影响到 Trp213 微环境。

关键词 荧光光谱; 同步荧光; 圆二色谱; 分子对接; 红斑红曲胺; 牛血清白蛋白

中图分类号: TS201.6 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)10-3102-07

引 言

红曲色素主要是 6 种色素混合而成^[1](表 1), 有红斑红曲胺(Rubropunctamine)、红曲玉红胺(Monascrubramine)、红斑红曲素(Rubropunctatin)、红曲玉红素(Monascorubrin)、安卡红曲黄素(Ankaflavin)、红曲素(Monascin)^[2]。

已有的研究表明,红曲色素具有多种生理活性。Alberto Mazza^[3], Tshongo^[4] 和 Derosa^[5] 等研究都有发现红曲米能明显降低血清总胆固醇(TC), 低密度脂蛋白胆固醇(LD-LC), 甘油三酯(TG)和葡萄糖值。Kurokawa 等^[6] 研究发现红曲色素能消除活性氧物质, 使癌细胞内促氧化剂/抗氧化剂不平衡而死亡。但红曲色素潜在的毒性限制了其在食品行业的进一步应用。如有报道称 Rubropunctatin 和 Monascoru-

收稿日期: 2018-09-13, 修订日期: 2019-02-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271950) 及农业部农产品贮藏保鲜实验室开放基金项目(KF2018008)资助

作者简介: 黄朝波, 1994 年生, 天津科技大学食品工程与生物技术学院研究生 e-mail: huangchaobo94@163.com

* 通讯联系人 e-mail: zhouqingli777@163.com

brin 对鸡胚胎具有毒性和致畸作用^[7]。FDA 以缺乏对其功效,安全性和标准化制备方法的保证的原因于 2007 年和 2013 年向消费者发出警告,禁止服用红曲米产品^[8]。Couturier^[9] 研究发现使用红曲提取物能造成肝脏实质的坏死性破坏,乳糖蛋白基质崩溃,胆汁淤积和胆管损伤等副作用。因此,深入研究红曲色素在体内与生物大分子的相互作用对进一步探究红曲色素的转运及致毒机理具有重要意义。

表 1 红曲色素六种主要成分

Table 1 The six main composition of monascus pigments

名称	相对分子量	分子式
Rubropunctamine(红斑红曲胺)	353	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄
Monascorubramine(红曲玉红胺)	382	C ₂₃ H ₂₇ NO ₄
Rubropunctatin(红斑红曲素)	354	C ₂₁ H ₂₂ O ₅
Monascorubrin(红曲玉红素)	382	C ₂₃ H ₂₆ O ₅
Monascin(红曲素)	358	C ₂₁ H ₂₆ O ₅
Ankaflavin(安卡红曲黄素)	386	C ₂₃ H ₃₀ O ₅

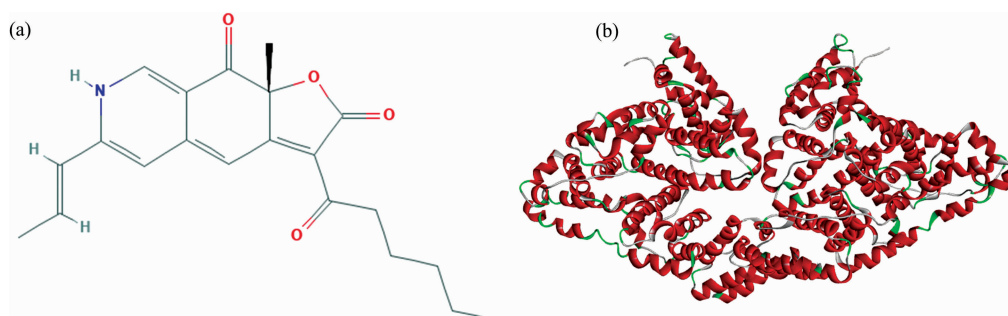


图 1 Rub(a)和 BSA(b)的结构式

Fig. 1 Molecular structure of Rub (a) and BSA (b)

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-7100 荧光光度计 (Hitachi, Japan); 圆二色谱 Spectrometer J-810 (Jasco, Japan); XMTD-204 数显恒温水浴锅 (天津欧诺仪器仪表有限公司); T1000 电子天平 (美国双杰(兄弟)集团有限公司); 牛血清白蛋白 (sigma, V900933); Rubropunctamine (Nova Chemistry, NVIP11864); 磷酸氢二钠 (索莱宝, D9790); 磷酸二氢钠 (索莱宝, S5830); 氯化钠 (索莱宝, S8210); 无水乙醇 (天津市科密欧化学试剂有限公司, 64-17-5); 实验用超纯水。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制

PBS(储备液 0.2 mol · L⁻¹, pH 7.4, 使用时稀释成 0.01 mol · L⁻¹)、BSA 溶液(储备液 1 mg · L⁻¹, 使用时稀释成 0.1 mg · mL⁻¹)、Rub 溶液(25 mg · L⁻¹): 取 2.5 mg 的 Rub 充分溶解于 2 mL 95%乙醇, 用超纯水定容到 100 mL。

1.2.2 荧光光谱分析

精确移取 BSA 溶液(0.1 mg · mL⁻¹) 1 mL 于 10 mL 比

色管中, 将 Rub 溶液依次取 40, 80, 120 和 160 μL 于 10 mL 比色管中, 用 PBS(0.01 mol · L⁻¹)定容到 10 mL, 分别在 303, 308 和 313 K 温度下避光水浴反应 20 min, 立即进行荧光测量。

测定条件:
三维荧光: 激发波长(λ_{EX}) 200~300 nm, 发射波长(λ_{EM}) 300~400 nm, 激发和发射狭缝宽度 5 nm, 间隔 5 nm, 扫描速度 30 000 nm · min⁻¹, 电压 500 V。
内源荧光: 激发波长(λ_{EX}) 280 nm, 发射波长(λ_{EM}) 300~500 nm, 激发和发射狭缝宽度 5 nm, 扫描速度 1 200 nm · min⁻¹, 电压 500 V。
同步荧光: 固定发射波长与激发波长差值为 15 和 60 nm 研究同步荧光, 激发波长(λ_{EX}) 200~500 nm, 激发与发射狭缝宽度 5 nm, 扫描速度 1 200 nm · min⁻¹, 电压 500 V。

色管中, 将 Rub 溶液依次取 40, 80, 120 和 160 μL 于 10 mL 比色管中, 用 PBS(0.01 mol · L⁻¹)定容到 10 mL, 分别在 303, 308 和 313 K 温度下避光水浴反应 20 min, 立即进行荧光测量。

测定条件:

三维荧光: 激发波长(λ_{EX}) 200~300 nm, 发射波长(λ_{EM}) 300~400 nm, 激发和发射狭缝宽度 5 nm, 间隔 5 nm, 扫描速度 30 000 nm · min⁻¹, 电压 500 V。

内源荧光: 激发波长(λ_{EX}) 280 nm, 发射波长(λ_{EM}) 300~500 nm, 激发和发射狭缝宽度 5 nm, 扫描速度 1 200 nm · min⁻¹, 电压 500 V。

同步荧光: 固定发射波长与激发波长差值为 15 和 60 nm 研究同步荧光, 激发波长(λ_{EX}) 200~500 nm, 激发与发射狭缝宽度 5 nm, 扫描速度 1 200 nm · min⁻¹, 电压 500 V。

1.2.2 圆二色谱

测定条件为: 圆形比色皿 0.1 cm 吸收池, 扫描范围 190~260 nm, 步幅 1 nm, 扫描速度 200 nm · min⁻¹, 氮气吹扫, 恒温 25 °C。

1.2.3 分子对接

BSA 三维结构来自于 RCSB PDB 数据库, PDB ID:

4F5S, Rub 三维结构来自 pub Chem 数据库, pub CID: 6452444, 利用 Open Babel GUI 对 Rub 做优化处理。使用 Discovery Studio2.5 工具中 LibDock 模块进行分子对接。首先对受体 BSA 进行相关优化(去水, 加氢, 加力场和电荷), 通过软件识别活性中心发现 BSA 中有 22 个潜在结合位点。选择评分最高的位点进行定义, 修改半径为 10, 其他选择默认值。对接后产生 91 种对接构像, 选择评分最好的作为对接结果分析。

2 结果与讨论

2.1 Rub 与 BSA 相互作用荧光光谱

2.1.1 Rub 与 BSA 相互作用的三维荧光光谱

BSA 和 BSA-Rub 体系的三维荧光结果如图 2 所示。由图知, (a) 和 (b) 都有两个典型的特征峰在 Peak1 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$

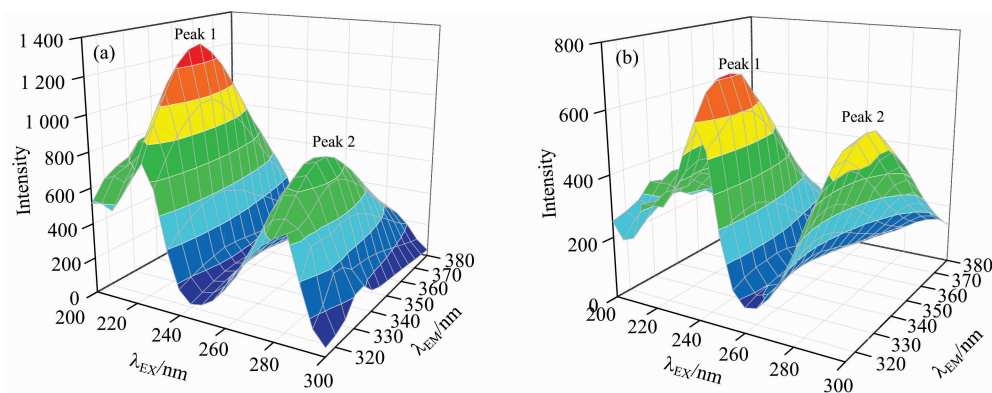


图 2 BSA 与 BSA-Rub 三维荧光光谱

Fig. 2 3-D fluorescence spectra of BSA and BSA-Rub

$c_{BSA} = 0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, the concentration Rub:

(a): $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): $11.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $T = 303 \text{ K}$

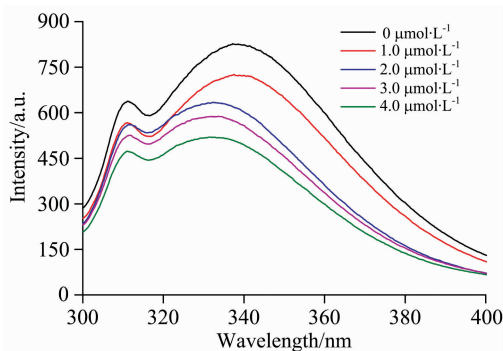


图 3 BSA 与不同浓度 Rub 相互作用内源荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence emission spectra of BSA with different concentration of Rub

$c_{BSA} = 0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\lambda_{EX} = 280 \text{ nm}$, $T = 303 \text{ K}$

2.1.2 Rub 与 BSA 相互作用的内源荧光和同步荧光光谱

由图 3 可知, BSA 在 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}$ (280.0 nm/340.0 nm) 时具有强烈的特征荧光。BSA 内源荧光主要来源于苯丙氨酸, 酪氨酸, 色氨酸。由于存在能量传递, 内源荧光中以色氨酸

(225.0 nm/340.0 nm), Peak2 (280.0 nm/340.0 nm)。其中 Peak1 是 BSA 多肽-骨架结构的荧光特征峰, Peak2 是内源荧光特征峰。图 2 (a) 的 Peak1 ($\lambda_{EX}/\lambda_{EM}/\text{Intensity}$) (225.0/340.0/1262.1) 和 Peak 2 (280.0/340.0/775.4), 图 2 (b) 的 Peak1 (225.0/330.1/634.5) 和 Peak2 (280.0/330.2/555.2), 可知当加入 Rub 后较空白组 Peak1 发射波长蓝移 9.9 nm, 荧光强度降低了 627.6。Peak2 的发射波长蓝移了 9.8 nm, 荧光强度减弱了 220.2。已知 BSA 空间结构由三个线性排列的不同结构的结构域(I—III)组成, 每个结构域由两个亚结构域(A 和 B)组成, 几乎所有的疏水氨基酸残基都存在这两个亚结构域中。实验结果显示 Rub 猝灭了 BSA 的荧光, 说明 Rub 的结合后让 BSA 空间结构发生了改变。发射波长蓝移表明, Rub 与 BSA 相互作用改变了荧光基团微环境的极性, 从而导致 BSA 体系极性变小。

(Trp) 产生的荧光为主。设定激发波长在 280.0 nm, 发射波长 300.0~400.0 nm, 梯度增加 Rub 浓度并进行荧光光谱波长扫描。结果如图 3 所示, 随着 Rub 浓度的增加, BSA 的荧光强度降低从 826.0 到 519.9, 发射峰蓝移了 6.8 nm (338.6~331.8 nm), 峰型没有明显变化。Rub 在浓溶液时有荧光性质, 但其发射峰位于 460 nm 附近, 所以在此处不会对 BSA 发射波长造成影响。结果表明, Rub 和 BSA 的相互作用可强烈地猝灭 BSA 内源的荧光。

同步荧光(图 4)能在不同 $\Delta\lambda$ (发射波长减去激发波长, $\lambda_{EM} - \lambda_{EX}$) 值将酪氨酸 (Trp) 和色氨酸 (Tyr) 残基特征荧光峰分辨出来, 常用来研究小分子对蛋白质中发色团氨基酸残基微环境的影响。当 $\Delta\lambda$ 固定在 15 和 60 nm 时, 同步荧光谱能分别给出了酪氨酸和色氨酸残基的荧光特征信息, 从而能够分析 Rub 与 BSA 的结合位置^[13]。 $\Delta\lambda = 15$ 和 60 nm 的同步荧光光谱如图 4(a) 和 (b) 所示。随着 Rub 浓度增加, 当 $\Delta\lambda = 15$ nm 时, 代表酪氨酸残基荧光强度 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}/\text{Intensity}$ (286.0 nm/301.0 nm/226.2) 到 (286.2 nm/301.2 nm/171.9) 出现较弱减少但发射波长未出现明显移动。 $\Delta\lambda = 60$ nm 时, 色氨酸残基的荧光强度随 Rub 浓度变化为 $\lambda_{EX}/\lambda_{EM}/\text{Intensity}$ (279.2

nm/339.2/845.1) 到 (277.6/337.6/504.7), 发射波长由 339.2 nm 蓝移到 337.8 nm, 荧光强度由 845.1 减少到 504.7, 推断色氨酸所处的环境发生改变。由此知 Rub 对 BSA 荧光猝灭主要原因是相互作用后导致色氨酸荧光猝灭, 这是因为 Rub 与 BSA 相互作用主要发生在色氨酸附近导致其所处环境发生改变, 使其极性变小, 影响了荧光强度。

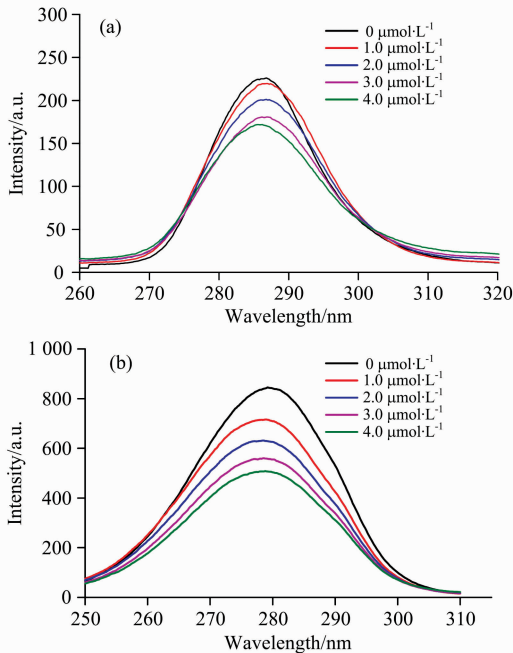


图 4 BSA 与不同浓度 Rub 相互作用同步荧光光谱
 Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of BSA with different concentration of Rub
 $c_{BSA} = 0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, (a): $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$;
 (b): $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$, $T = 303 \text{ K}$

2.2 荧光猝灭机理

2.2.1 动态猝灭常数(K_q)的计算

为了判断 BSA-Rub 体系荧光猝灭类型和猝灭常数 K_q , 研究了梯度温度下 BSA 和 Rub 的反应体系。动态荧光猝灭遵循 Stern-Volmer 方程^[14] $F_0/F = 1 + K_{SV} c_Q = 1 + K_q \tau_0 c_Q$, 式中: F_0 与 F 分别表示 Rub 加入前后的 BSA 内源荧光强度; K_{SV} 为动态猝灭常数; K_q 表示动态猝灭速率常数; τ_0 为

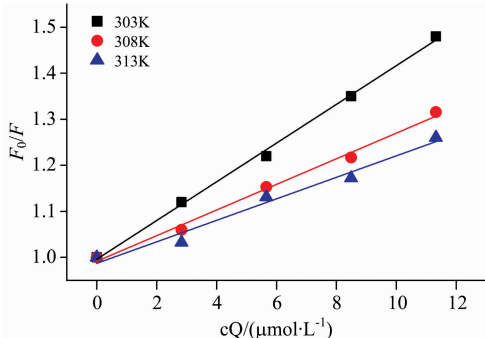


图 5 不同温度下 BSA 与 Rub 相互作用 Stern-Volmer 曲线
 Fig. 5 Stern-Volmer curves of fluorescence quenching of BSA by Rub at different temperatures

生物大分子的荧光寿命, 一般为 10^{-8} s , c_Q 为 Rub 的浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。按 Stern-Volmer 方程, 以 $(F_0/F) - c_Q$ 作出 Stern-Volmer 曲线见图 5, 动态猝灭相关参数见表 2。

表 2 动态猝灭相关参数

Table 2 Dynamic quenching equation parameters

T/K	$K_{SV}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/[\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}]$	R^2
303	4.205×10^4	4.205×10^{12}	0.996 95
308	2.784×10^4	2.784×10^{12}	0.991 69
313	2.335×10^4	2.335×10^{12}	0.990 25

从表 2 可以看出, 在 3 种温度条件下 (R^2 均 > 0.99), 随着温度的升高 (303~313 K), 斜率值 K_{SV} 减小, 从 $4.205 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 降低到 $2.335 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, K_q 值分别为 $4.205 \times 10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ (303 K); $2.784 \times 10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ (308 K); $2.335 \times 10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ (313 K), 其中最小 K_q 值远大于猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ ^[15], 且该数值随温度升高而降低, 故此判断 Rub 对 BSA 荧光猝灭不属于动态猝灭过程, 应该是属于单纯静态猝灭过程, 即 BSA 与 Rub 形成稳定基态复合物从而导致 BSA 荧光光谱的变化。

2.2.2 静态猝灭常数(K_{LB})的计算

静态猝灭可用 Lineweaver-Burk 函数 $1/(F_0 - F) = 1/F_0 + 1/(K_{LB} F_0 c_Q)$ 验证, 式中: F_0 为 BSA 本身的内源荧光强度; F 为添加不同浓度 Rub 后 BSA 的荧光强度; K_{LB} 为静态猝灭常数, $K_{LB} = K_q \tau_0$; K_q 表示静态猝灭速率常数; τ_0 为生物大分子的荧光寿命, 一般为 10^{-8} s ; c_Q 为猝灭剂 Rub 浓度 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。以 $1/(F_0 - F) \sim 1/c_Q$ 作图得到不同温度条件下 Lineweaver-Burk 双倒数函数曲线 (图 6), 相关参数见表 3。

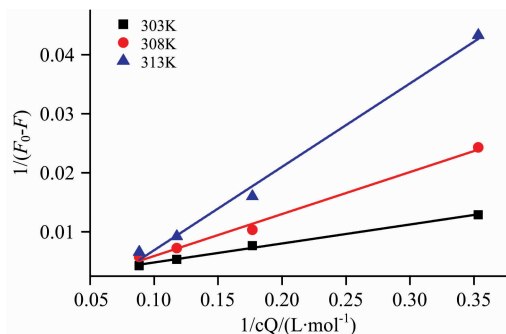


图 6 不同温度下 BSA 与 Rub 相互作用的 Lineweaver-Burk 函数
 Fig. 6 Lineweaver-Burk curves of fluorescence quenching of BSA by Rub at different temperatures

表 3 静态猝灭相关参数

Table 3 Static quenching equation parameters

T/K	$K_{LB}/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q/[\text{L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}]$	R^2
303	4.28×10^4	4.28×10^{12}	0.993 43
308	1.93×10^4	1.93×10^{12}	0.988 69
313	9.6×10^3	9.6×10^{11}	0.990 80

从图 6 和表 3 看出, 所有直线 R^2 均大于 0.98, 线性拟合较好。Rub 对 BSA 的荧光猝灭符合静态猝灭方程, 随着温度升高斜率变大, 即 K_q 减小, K_q 从 $4.28 \times 10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ 减小到 $9.6 \times 10^{11} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ 。说明 BSA 与 Rub 形成的复合物在温度升高时变得不稳定, 符合静态猝灭的变化趋势。

2.2.3 结合位点 n 和表观结合常数 K_0 的计算

如果小分子 Rub 与生物大分子 BSA 发生静态猝灭相互作用, 则 BSA 中存在独立的结合位点。表观结合常数 K_0 和结合位点 n 可以利用等式 $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_0 + n \lg c_Q$ 计算^[16]。式中: F_0 和 F 分别为未加入和加入猝灭剂后荧光物质的荧光强度; K_0 为猝灭反应的表观结合常数; n 为结合位点数; c_Q 为 Rub 的浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以 $\lg[(F_0 - F)/F]$ 对 $\lg c_Q$ 作图结果如图 7 所示。两者间呈线性相关, 得出线性方程的斜率和截距来计算不同温度下 BSA 与 Rub 的表观结合常数 K_0 和结合位点数 n , 结果见表 4。

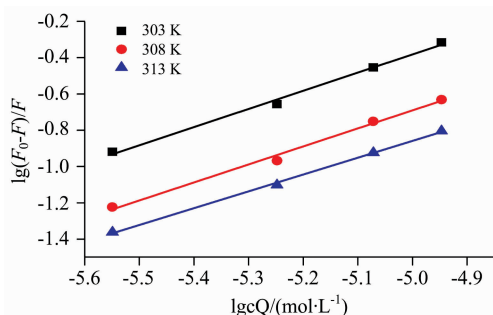


图 7 不同温度下 BSA 与 Rub 相互作用的 $\lg[(F_0 - F)/F] - \lg c_Q$ 图

Fig. 7 $\lg[(F_0 - F)/F]$ vs $\lg c_Q$ graph describing the interaction of BSA by Rub at different temperatures

表 4 结合常数和结合位点数

Table 4 Binding constants and binding sites

T/K	$K_0/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R^2
303	4.1×10^4	0.999 79	0.992 62
308	1.83×10^4	0.991 29	0.990 60
313	0.58×10^4	0.925 47	0.997 99

从表 4 中可以看出两者结合常数可达 $10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 以上, 属于较强的结合。结合位点数近似为 1, 即一分子 BSA 有一个 Rub 结合位点。随着温度增加表观结合常数变小, 则是因为 Rub 对 BSA 是静态猝灭作用, 二者形成的复合物结合稳定性受温度影响较大。

2.2.4 BSA 与 Rub 之间的作用机理

小分子和蛋白质之间结合作用力包括静电作用、氢键作用、范德华力、疏水作用等。根据 Van't Hoff 方程^[17] $\Delta G = RT \ln K$, $\ln K_2/\ln K_1 = [1/T_1 - 1/T_2] \Delta H/R$, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ^[18] 计算 Rub 与 BSA 之间的热力学参数可以来确定二者之间的作用力类型。当 ΔS 和 ΔH 都为正时, 为疏水作用力; 当 ΔH 约为 0, ΔS 大于 0 时为静电作用力; ΔS 和 ΔH 都小

于 0 时为氢键和范德华力^[19]。不同温度下 Rub 与 BSA 体系的相关热力学参数如表 5。由表 5 知, $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 说明氢键和范德华力是该结合体系主要的相互作用力; 而且在不同温度下自由能 ΔG 都小于 0, 所以该反应能够自发进行的。

表 5 BSA 与 Rub 相互作用的热力学参数

Table 5 Thermodynamic parameters of the interaction between BSA and Rub

T/K	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/[\text{J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}]$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
303	-154.206	-420.62	-26.757
308		-419.06	-25.133
313		-420.62	-22.551

2.3 圆二色谱法

运用 CD 光谱研究了 BSA 与 Rub 相互作用对 BSA 主链构象影响, 在 190~250 nm 范围的 CD 谱如图 8, 随着 Rub 与 BSA 反应, CD 谱整体形状没有明显变化, 其中代表 α -螺旋特征负峰波长^[20]由 214 nm 移动至 217 nm。通过采用数据库处理得到 BSA 二级结构中 α -螺旋含量由 29.4% 降至 20.2%; β -折叠由 39.9% 上升到 50.7%; β -转角由 6.5% 下降到 3.5%; 无规则卷曲由 24.2% 上升到 25.6%。总的来说主要改变是 α -螺旋到 β -转角的转变。可能是 Rub 与 BSA 中 α -螺旋结构中的氨基酸发生氢键缔合等作用, 引起 BSA 空间变化, α -螺旋数量下降^[21]。

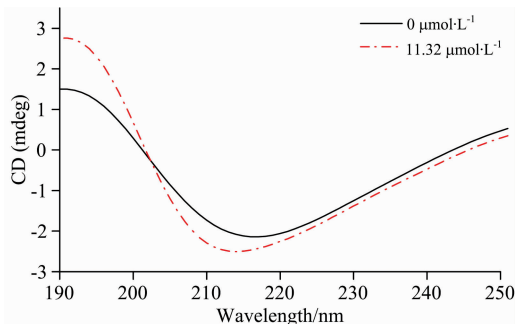


图 8 BSA 与 BSA-Rub 体系的 CD 图

Fig. 8 CD spectra of BSA and BSA-Rub system

2.4 分子对接结果分析

Rub 与 BSA 结合构型用 Discovery Studio 2.5 做分子模拟结果如图 9 所示。结合图 A 分析, 在得分最高的结果中, 结合后 Rub 位于由 Arg458, Asp108, Glu424 和 Ser428 等氨基酸形成的口袋中。Rub 伸进 BSA 的这个疏水腔内, 两者产生了疏水相互作用。在图 B 中 Rub 与 BSA 主要依靠氢键与范德华力结合(紫色为氢键作用, 蓝色为范德华力作用), 这与热力学计算结果一致。在这个口袋中 Rub 与 Arg458 有范德华力作用, 与 Arg144 形成氢键作用, 距离 Trp213 较近, 影响到其微环境, 导致了其荧光性质猝灭。图 9(c)和(d)中虚线为氢键, 从图中可以发现其氢键作用主要为分子内氢键。

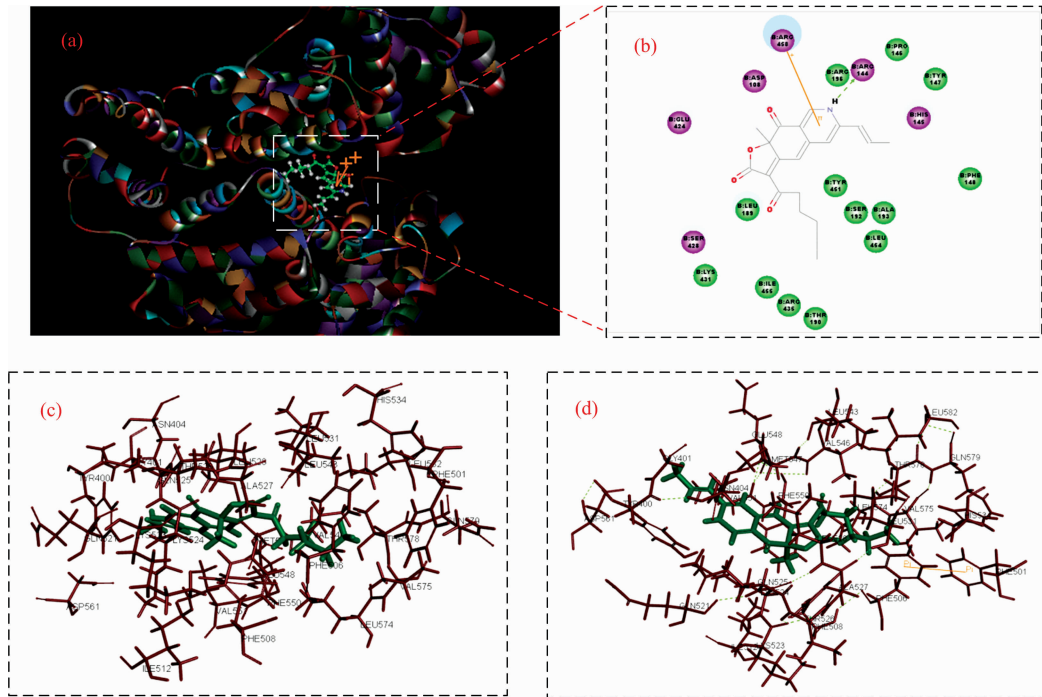


图 9 Rub 与 BSA 分子对接图

(a): 对接最优的结构图; (b): 相互作用 2D 图; (c), (d): 残基相互作用

Fig. 9 Molecular docking of Rubropunctamine and BSA

(a): Optimal docking structure; (b): Interactive 2D map; (c), (d): Residue interaction

3 结 论

利用多种光谱技术研究了 Rub-BSA 的相互作用机理。三维荧光发现其对 BSA 有明显的荧光猝灭作用。通过同步荧光发现色氨酸光强度由 845.1 减少到 504.7, 发射波长由 339.2 nm 蓝移到 337.8 nm, 酪氨酸未见明显变化。进一步运用相关的数学计算得到 Rub 对 BSA 猝灭类型为静态猝灭, 二者通过形成稳态复合物导致了 BSA 荧光值变化, 两者静态结合常数 K_0 可达 $10^3 (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$ 以上, 结合位点数 n 近似为 1, 属于较强的结合。经过热力学相关计算不同温度下

的 ΔG 都小于 0, 则反应能自发进行, 且 $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 则二者作用力的类型为范德华力与氢键。推测 Rub 与 BSA 的结合位置可能位 BSA 疏水口袋内且更靠近色氨酸, 二者通过次级键相互作用后改变了色氨酸的微环境, 运用圆二色谱表明 Rub 与 BSA 结合后降低了蛋白的 α 螺旋数量验证了此结论。最后运用计算机进行分子对接发现 Rub 主要依靠氢键与范德华力结合于由 Arg458, Asp108, Glu424 和 Ser428 等氨基酸形成的口袋中, 距离 Trp213 较近。Rub 作为红曲色素的一种代表色素, 在本研究详细地阐明了 Rub 与 BSA 的相互作用机理, 这对进一步天然红曲色素在体内转运分布及其代谢过程 and 安全性评估奠定基础。

References

- [1] Singh N, Goel G, Singh N, et al. Food Bioscience, 2015, 11: 17.
- [2] Panesar R, Kaur S, Panesar P S. Current Opinion in Food Science, 2015, 1(1): 70.
- [3] Alberto M, Salvatore L, Laura S, et al. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 105: 992.
- [4] Tshongo C M, Ahn S A, Rousseau M F, et al. Complementary Therapies in Medicine, 2017, 35: 140.
- [5] Derosa G, Catena G, Raddino R, et al. Phytomedicine, 2018, 42.
- [6] Kurokawa H, Ito H, Matsui H. Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition, 2017, 61(3): 189.
- [7] Patakova P Monascus. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(2): 169.
- [8] Dujovne C A. American Journal of Medicine, 2017, 130(10): 1148.
- [9] Couturier F J, Colemont L J, Fierens H, et al. Clinics & Research in Hepatology & Gastroenterology, 2016, 40(4): e38.
- [10] Rudra S, Dasmandal S, Patra C, et al. Journal of Molecular Structure, 2018, 1167.
- [11] Sengupta P, Sardar P S, Roy P, et al. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2018, 183: 101.
- [12] WANG Yong-gang, YANG Guang-rui, MA Xue-qing, et al(王永刚, 杨光瑞, 马雪青, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学

与光谱分析), 2017, 37(8): 2474.

- [13] Gowda J I, Nandibewoor S T. J. Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2014, 124(8): 397.
- [14] Iovescu A, Băran A, Stîngă G, et al. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2015, 153: 198.
- [15] Ma L, Maragos C M, Zhang Y. Mycotoxin Research, 2017, 34(6): 1.
- [16] Kaur A, Khan I A, Banipal P K, et al. Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2017, 191: 259.
- [17] Chaturvedi S K, Ahmad E, Khan J M, et al. Molecular Biosystems, 2015, 11(1): 307.
- [18] Bhogale A, Patel N, Mariam J, et al. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2014, 113(13): 276.
- [19] Chi Z, Tan S, Tan X, et al. Environmental Science & Pollution Research, 2018, (1): 1.
- [20] Gospodarczyk W, Szutkowski K, Kozak M. Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(29): 8652.
- [21] Bolattin M B, Nandibewoor S T, Chimatadar S A. Journal of Molecular Recognition, 2016, 29(7): 308.

The Interaction between Rubropunctamine and Bovine Serum Albumin Using Spectrometry and Molecular Docking

HUANG Chao-bo³, XU Han³, YANG Ming-guan³, LI Zhen-jing^{1,3}, YANG Hua^{1,3}, WANG Chang-lu^{1,2,3}, ZHOU Qing-li^{1,2,3*}

1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin 300457, China
2. Ministry of Education Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China
3. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract In recent years, more and more functional activities have been discovered with the in-depth study of the monascus pigment, but some toxic effects of the monascus pigment have raised questions about its safety. Therefore, it is important to elucidate the interaction between monascus pigments and macromolecules in human body for further study of their transport, metabolism and toxic side effects. Spectroscopy is an effective method to study the interaction of small molecules with proteins in solution. It has been widely used in research for its high sensitivity, strong selectivity, low sample size, and simple method. In this study, rubropunctamine(Rub) was taken as the typical representative of monascus pigment to research the interaction of Monascus pigments with macromolecules bovine serum albumin(BSA). The fluorescence quenching effect of different concentrations of Rub on BSA was investigated by endogenous fluorescence spectroscopy and synchronous fluorescence spectroscopy. Then Stern-Volmer equation, the Lineweaver-Burk function and the Van't-Hoff equation were used to determine the type of action, the number of binding sites and the interaction mechanism of BSA and Rub. The effect of Rub on the BSA secondary structure was quantitatively determined by circular dichroism spectrum. Finally, using the computer to perform the molecular docking simulation on the interaction of Rub and BSA. The results show: (1) Rub has a strong fluorescence quenching effect on BSA, and endogenous fluorescence spectrum shows that endogenous fluorescence decreases by 306.1 and emission wavelength shifts by 6.8 nm. Synchronous fluorescence shows that fluorescence quenching mainly occurs on tryptophan residues. (2) The dynamic quenching rate constant K_q calculated by the Stern-Volmer equation is $2.335 \times 10^{12} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{S})^{-1}$, which is much larger than the maximum diffusion collision constant allowed: $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{S})^{-1}$, and the annihilation is a pure static quenching process. (3) The binding constants reach above $10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ which is calculated by the equation $\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_0 + n \lg c_Q$, and the number of binding sites is approximately 1. The apparent binding constant becomes smaller with increasing temperature. (4) Under different temperature, ΔH , ΔS and ΔG are less than zero, so the interaction can occur spontaneously and hydrogen bonding and van der Waals force are the main interaction forces. (5) the α -helical content in the secondary structure of BSA combined with Rub decreased from 29.4% to 20.2%; The β -fold increased from 39.9% to 50.7%; β -rotation decreased from 6.5% to 3.5%; The random coil increased from 24.2% to 25.6%. (6) Rub is located in the pocket formed by Arg458, Asp108, Glu424, Ser428 and other amino acids in BSA, and it has Van Der Waals force with Arg458 and hydrogen bond interaction with Arg144 which affects Trp213 microenvironment.

Keywords Fluorescence spectroscopy; Synchronous fluorescence; Circular dichroism; Molecular docking; Rubropunctamine; Bovine serum albumin

* Corresponding author

(Received Sep. 13, 2018; accepted Feb. 4, 2019)