

MCR-ALS 结合分子对接研究隐色孔雀石绿与 BSA 的作用过程

张秋兰^{1,2}, 谢立昕³, 杨林慧³, 度 浔², 倪永年^{1,2*}

1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047

2. 南昌大学化学系, 江西 南昌 330031

3. 南昌大学药学院, 江西 南昌 330031

摘要 孔雀石绿(LMG)在治理鱼卵中霉菌和杀灭鱼体寄生虫等方面的效果显著,广泛应用于水产运输和养殖。孔雀石绿进入动物机体后,通过生物转化代谢为脂溶性的隐色孔雀石绿(LMG),LMG的毒性超过MG;LMG能快速在组织中蓄积,具有致癌、致畸、致突变等毒副作用。白蛋白可与多种内源和外源化合物结合,是血浆中含量最丰富的载体蛋白,也是药物发挥作用的重要载体和靶标。模拟 pH 7.4 的生理条件,通过荧光光谱和圆二色谱法(CD)采集两种不同滴加方式的 LMG 与牛血清白蛋白(BSA)动态作用过程中的多维数据,并应用化学计量学多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)对多维波谱数据进行解析和描述,从重叠严重的光谱数据中同时得到作用体系的定量和定性信息。从解析得到的浓度趋势图中,说明体系在 LMG : BSA = 2 : 1 时达到动态平衡,并可确认复合物 LMG₂-BSA 的生成;解析得到的与所测量的 BSA 荧光和 CD 图符合,印证由 MCR-ALS 获得的浓度趋势图的可靠性和正确性;通常由重叠光谱中无法辨别的 LMG₂-BSA 复合物荧光光谱和 CD 谱图也可由数学解析获得,进一步印证了复合物的存在。原子力显微镜(AFM)测量结果表明 BSA 与 LMG 结合后,BSA 的形貌发生改变,表面粗糙度(RMS)由(1.24 ± 0.28) nm 增至(13.47 ± 0.53) nm;同时由 CD 实验结果可知 LMG 与 BSA 作用达到平衡时,α-螺旋结构的含量从 46.5% 降低到 42.3%,推测是 BSA 所处微环境和构象发生变化所致。荧光探针实验发现经典 site I 标记物华法林加入后,LMG-BSA 的猝灭常数由 2.65 × 10⁶ L · mol⁻¹ 降低为 1.88 × 10⁶ L · mol⁻¹,但加入 site II 标记物布洛芬后,LMG-BSA 的猝灭常数变化不明显,由此推断 LMG 可能结合在蛋白质的亚域 II A,即 site I 位。分子对接证实 BSA 的 I 位有足够的空间容纳 LMG,且 LMG 与 BSA 之间的主要作用是疏水作用力。该研究从分子水平了解 LMG 与生物大分子的作用机制,并为 LMG 的毒副作用研究提供重要的信息。

关键词 光谱法;多元曲线分辨-交替最小二乘法;分子对接;隐色孔雀石绿;牛血清白蛋白;作用过程

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2019)03-0851-06

引言

孔雀石绿(MG)是有毒的三苯甲烷类化学物质,属杀真菌、细菌、寄生虫药物,在鱼组织内主要以代谢物隐色孔雀石绿(LMG)形式存在,长期食用含 LMG 的鱼类可致癌^[1]。美国、加拿大、日本等国家及欧盟都将其列为水产养殖违禁药物^[2]。由于目前没有廉价有效的替代物,孔雀石绿在水产养殖中的使用仍频繁发生,现今的报道着重于提高 MG 和 LMG 检测限和灵敏度^[3-5]。血清白蛋白(SA)是血浆中含量

最丰富的的载体蛋白,外源物与 SA 的结合作用及亲和力大小也影响到其在动物体内的分散、转运、储存、代谢、清除以及毒副作用等^[6]。因此,研究 LMG 与 SA 的作用对理解药物的作用机制具有重要意义^[7]。Zeng 等^[8]已用荧光光谱法和共振光散射研究 LMG 与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用。本文的研究重点为:(1)采用原子力显微镜(AFM)和圆二色谱(CD)研究 LMG 对 BSA 构象的改变;(2)通过多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)来揭示 LMG 与 BSA 作用的动力学和热力学过程随时间和反应物浓度的变化情况;(3)通过分子对接更直观地认识 LMG 与 BSA 的作用历程。

收稿日期:2017-12-27,修订日期:2018-04-25

基金项目:国家自然科学基金项目(21665017)和南昌大学食品科学与技术国家重点实验室基金项目(SKLF-KF-201606 和 SKLF-ZZA-201612)资助

作者简介:张秋兰,女,1979年生,南昌大学化学学院副教授 e-mail: qlzhang@ncu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: ynni@ncu.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

隐色孔雀石绿(Sigma-Aldrich Chemical Co, $\geq 98\%$)储备液:以乙腈配成 $5.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液;牛血清白蛋白(BSA, 国药集团化学试剂有限公司)用二次水配制成 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液;称取华法林(6.61 mg)和布洛芬(4.13 mg)(上海医药集团有限公司),二次水溶解并定容至 50 mL,得到 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液。PE LS-55 荧光分光光度计,1.0 cm 比色皿,激发狭缝 10 nm 和发射狭缝 5 nm,扫描速度 $1200 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$;圆二色谱仪(法国, Bio-Logic 公司, 0.1 cm 比色皿,测量参数为:持续氮气流的条件,狭缝 1 nm,扫描速率 $1 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$,扫描 3 次取平均值,响应时间 0.25 s)和 AJ-III 原子力显微镜(上海爱建纳米公司)。

1.2 步骤

荧光实验:在比色皿中依次加入 3.0 mL 的 Tris-HCl (pH 7.4)缓冲溶液^[9],实验过程中忽略体积效应,放置 5min 达平衡,在 298 K 下测其荧光光谱。实验 1:先固定 BSA 的浓度 $1.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,然后加入不同量的 LMG,使其分别为 0, 2.00, 4.00, ..., $16.00 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,浓度间隔 $2.00 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验 2:分别固定 [BSA]:[华法林]=1 和 [BSA]:[布洛芬]=1, $c_{\text{BSA}} = 1.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,加入不同浓度的 LMG, 0, 2.00, 4.00, ..., $16.00 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,浓度间隔 $2.00 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

AFM 实验 3:取 6.0 mL 前一天配置的 BSA($c_{\text{BSA}} = 6.67 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 LMG-BSA([LMG]:[BSA]=2)样品滴在新鲜剥离的 $1.2 \text{ cm} \times 1.2 \text{ cm}$ 的云母片上,室温下放置 24 h 干燥后,在敲击模式下扫描。

1.3 扩展矩阵数据的构建

实验 4(荧光法, $D_{\text{F}}^{\text{BSA}}$):BSA 的浓度为 $1.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,依次加入 LMG 的浓度为 $0 \sim 4.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,间距 $2.00 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;实验 5(圆二色谱法, $D_{\text{CD}}^{\text{BSA}}$):BSA 的浓度为 $1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,依次加入 LMG 的浓度为 $0 \sim 4.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,浓度间隔 $2.00 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;实验 6(荧光法, $D_{\text{F}}^{\text{LMG}}$):LMG 的浓度为 $6.67 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,依次加入不同浓度的 BSA 为 $0 \sim 6.67 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,浓度间隔 $3.33 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;实验 7(圆二色谱法, $D_{\text{CD}}^{\text{LMG}}$):LMG 的浓度为 $6.67 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,依次加入 BSA 的浓度为 $0 \sim 6.67 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,浓度间隔 $3.33 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上荧光光谱和圆二色谱数据采集范围为 250~450.5 nm(间距 0.5 nm, 402 数据点)和 190~250 nm(间距 1.00 nm, 61 数据点)。

1.4 化学计量学方法:多元曲线分辨-交替最小二乘法(MCR-ALS)

Tauler 等提出经典 MCR-ALS 法,但由该法处理数据所得到的体系信息量较简单,随后 Tauler 等对其进行了改进—解析扩展矩阵(多维数据解析的优势在于可获得唯一的分解结果,即可分辨出体系中有意义组分的相对浓度和光谱趋势

图^[10])。本工作通过两种测量技术结合不同溶液滴加方式得到四个波谱数据矩阵(见 1.3),在行和列的方向将 $D_{\text{F}}^{\text{BSA}}$ (实验 4)和 $D_{\text{CD}}^{\text{BSA}}$ (实验 5)和 $D_{\text{F}}^{\text{LMG}}$ (实验 6)和 $D_{\text{CD}}^{\text{LMG}}$ (实验 7)这四个矩阵组成一扩展多维矩阵,再用 MCR-ALS 法解析。

$$\begin{bmatrix} D_{\text{F}}^{\text{BSA}} & D_{\text{CD}}^{\text{BSA}} \\ D_{\text{F}}^{\text{LMG}} & D_{\text{CD}}^{\text{LMG}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} C^{\text{BSA}} \\ C^{\text{LMG}} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} S_{\text{F}}^{\text{T}} & S_{\text{CD}}^{\text{T}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} E_{\text{F}} & E_{\text{CD}} \end{bmatrix} \quad (1)$$

式(11)中 $\begin{bmatrix} D_{\text{F}}^{\text{BSA}} & D_{\text{CD}}^{\text{BSA}} \\ D_{\text{F}}^{\text{LMG}} & D_{\text{CD}}^{\text{LMG}} \end{bmatrix}$ 表示荧光和 CD 两种测量技术得到的扩展矩阵,公式右 $\begin{bmatrix} C^{\text{BSA}} \\ C^{\text{LMG}} \end{bmatrix}$ 表示解析获得的不同滴加方式的浓度趋势图, $\begin{bmatrix} S_{\text{F}}^{\text{T}} & S_{\text{CD}}^{\text{T}} \end{bmatrix}$ 为纯物质的光谱图^[11]。

1.5 分子对接

LMG 的结构使用 ChemBio 3D Ultra 14.0 得到,并利用 MMFF94 分子力场进行优化。BSA 的结构来自 RSCB 数据库(编号:1 ADC)。使用软件 AutoDock4 中的遗传算法程序(Lamarckian, 参数为默认设置)对 LMG 和 BSA 进行对接,并采用 LigPlus⁺对最低的构象进行分析。

2 结果与讨论

2.1 MCR-ALS 解析

BSA 内源荧光主要来自于色氨酸^[9]。固定 BSA 浓度不断加入 LMG 时,BSA 在 360 nm 处的荧光峰逐渐减弱且红移,在达到 [LMG]:[BSA]=2:1 后[曲线 11, 图 1(a)],荧光峰变化不明显,但在 390 nm 处出现一新的发射峰,且 375 nm 处发现等发射点,表明体系处于动态平衡并可能生成复合物。固定 LMG 不断加入 BSA 的荧光光谱如图 1(c)所示,LMG 在 280 nm 激发下并不产生荧光峰[曲线 1, 图 1(c)],加入 BSA 后在 360 nm 处出现 BSA 的发射峰,BSA 的浓度逐渐增加后,峰强度和峰宽都有比例的增加。在蛋白质的二级结构中, α -螺旋两个负的特征肩峰谱带出现在 208 和 222 nm 处;在 216 nm 处的负谱带是 α -折叠的特征曲线^[12]。由图 1(b)可知,随着 LMG 的加入,BSA 的 CD 谱带变化较小且无规则交迭在一起;而固定 LMG[图 1(d)]不断加入 BSA,在 208 和 222 nm 处的两个负特征肩峰均逐渐增大。从单个重叠严重且信号覆盖的图谱[图 1(a)—(d)]中,难以直观得到更多有效信息。

将图 1 中的 4 个图谱数据组成一扩展矩阵 $\begin{bmatrix} D_{\text{F}}^{\text{BSA}} & D_{\text{CD}}^{\text{BSA}} \\ D_{\text{F}}^{\text{LMG}} & D_{\text{CD}}^{\text{LMG}} \end{bmatrix}$,先用渐进因子分析法(EFA)^[13]确定体系的因字数($N=3$)和初始迭代浓度矩阵,再通过更迭代获得预计的纯物质光谱矩阵,最后通过最小二乘法求出估算的浓度矩阵,其运算值用在下一轮迭代直至收敛。由解析所得的两种浓度趋势图(C^{LMG} 和 C^{BSA})可知:固定 BSA,不断加入 LMG,复合物 LMG-BSA 的浓度随着 LMG 的加入而快速增加,达到 $r_{\text{LMG} \cdot \text{BSA}} = 2.2$ 时,体系趋于平衡[图 2(a)];而固定 LMG,不断加入 BSA,当 BSA:LMG=0.5 时,LMG-BSA 复合物的浓度改变并不显著[图 2(b)]。综合考虑两种滴加方式的浓度变化趋势,佐证体系在 LMG:BSA=2:1 时到达动态平衡,并证实生成 LMG₂-BSA 复合物。由 MCR-ALS 解

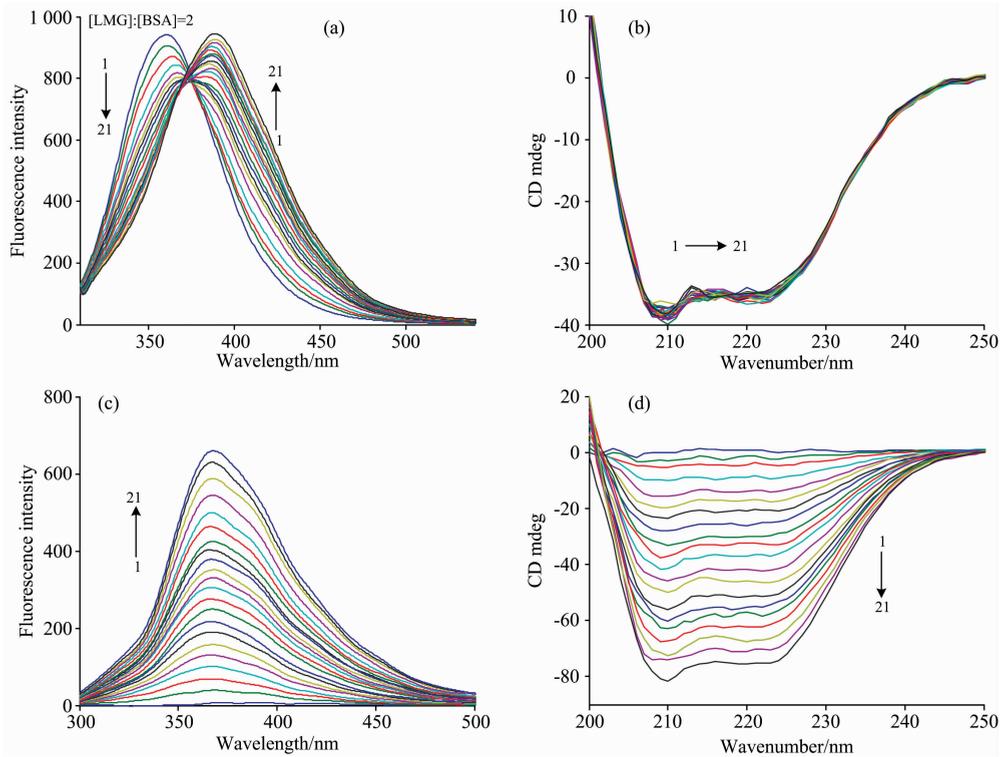


图 1 不同实验条件下得到的 LMG 与 BSA 作用的荧光光谱和 CD 图

(a): 荧光光谱(D_F^{BS}); (b): CD 谱(D_C^{BS}); (c): 荧光光谱(D_F^M); (d): CD 谱(D_C^M)

Fig. 1 Spectra obtained from different experiments (see section 1.3)

(a): Fluorescence spectra(D_F^{BS}); (b): CD spectra(D_C^{BS}); (c): Fluorescence spectra(D_F^M); (d): CD spectra(D_C^M)

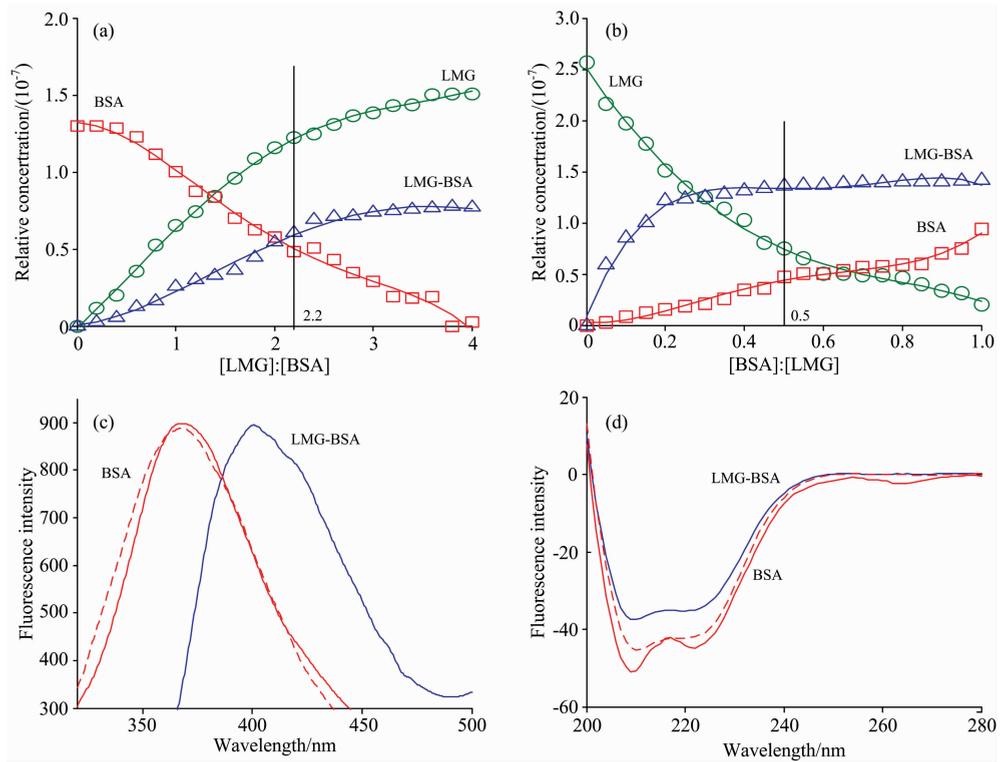


图 2 MCR-ALS 解析得到的 LMG 与 BSA 作用体系的浓度趋势图(a,b)和荧光光谱、CD 图(c,d)

Fig. 2 Recovered concentration profiles for experiments 4 and 5 (a) and experiments 6 and 7 (b);

Recovered fluorescence spectra (c) and CD spectra (d)

析的荧光和 CD 图[图 2(c)和(d)]可知,解析得到的(虚线)和通过实验所测的 BSA 的荧光和 CD 图(实线)较好的符合,印证由 MCR-ALS 所得到的浓度趋势图的可靠性和正确性。而由层叠光谱中不能辨别的 LMG-BSA 复合物荧光光谱和 CD 图[图 2(c)和(d),蓝色的实线]第一次通过解析获得,由此证实了复合物的存在。

2.2 AFM 和 CD 研究 LMG 对 BSA 构象的影响

通过 AFM 即可观察生物大分子的形貌,也能够持续监测生化反应的动力学过程^[14]。在本工作中,BSA 与 LMG 结

合后,其厚度和分子直径都相应增大,表面粗糙度(RMS)由 (1.24 ± 0.28) nm 增至 (13.47 ± 0.53) nm[图 3(a)和(b)]。选择 CD 实验 5 的第 1 和 11 条(两者处于平衡状态, $[LMG]:[BSA]=2$)曲线[图 3(c)], α -螺旋在 208 和 222 nm 处两个负的特征峰谱带都有所减弱(根据公式^[15]计算, α -螺旋含量由 46.5%减小为 42.3%),CD 与 AFM 结果基本一致,LMG 与 BSA 结合后使蛋白部分伸展,BSA 所处微环境和构象发生变化^[16]。

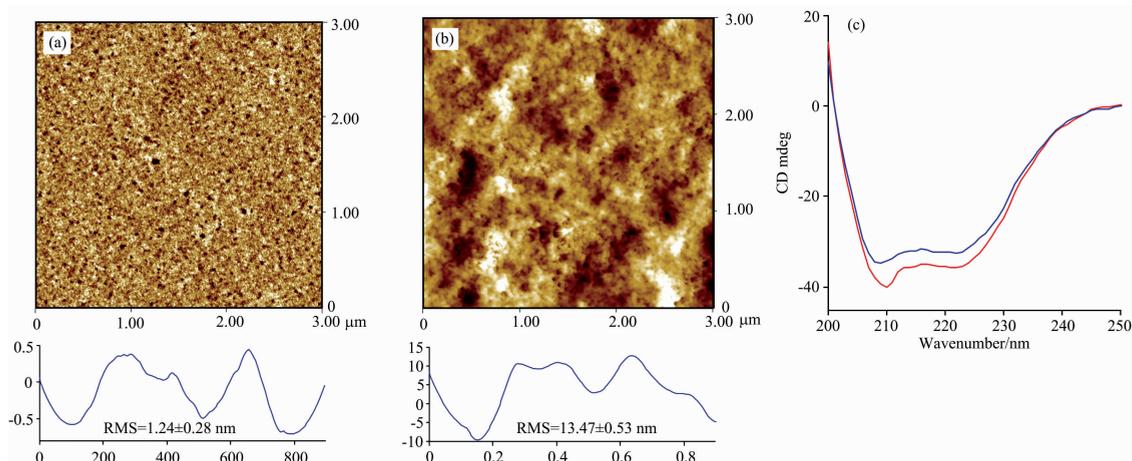


图 3 BSA 与 LMG 相互作用的 AFM 图(a,b)和 CD 图(c)

Fig. 3 AFM spectra of BSA before (a), after (b) binding with LMG and CD spectra (c), $c_{BSA} = 6.67 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{LMG} = 1.33 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[LMG]:[BSA]=2$; CD spectra of LMG interaction with BSA (c), red line: $[BSA] = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; blue line: $c_{BSA} = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{LMG} = 2.00 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $[LMG]:[BSA]=2$

2.3 探针实验确认 LMG 在 BSA 上的结合位点

加入 site I 标记物(华法林)时[图 4(a)], LMG-BSA 的猝灭常数由 $2.65 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 减少为 $1.88 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 而 site II 标记物(布洛芬)加入后[图 4(b)], LMG-

BSA 的猝灭常数为 $2.79 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 变化不明显[图 4(c)], 因而推测 LMG 作用在 BSA 上的亚域 II A, 即 site I^[15]。

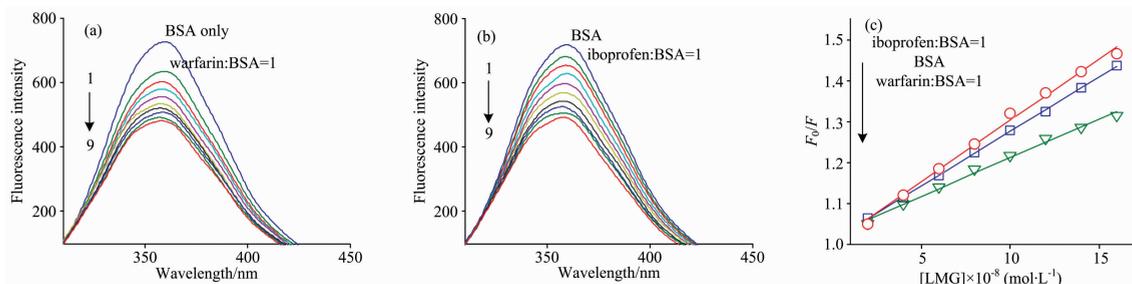


图 4 在华法林和布洛芬存在下, LMG 与 BSA 作用的荧光光谱图(a,b)和 Stern-Volmer 图(c)

Fig. 4 (a,b): Influence of selected site markers on the fluorescence of LMG bound to BSA and (c) the stern-volmer plots, (a): $c_{BSA} = c_{warfarin} = 1.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): $c_{BSA} = c_{ibuprofen} = 1.00 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{LMG} = 0, 2.00, 4.00, \dots, 16.00 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (c): The Stern-Volmer plots for the LMG-BSA system in the absence and presence of site markers

2.4 分子对接

利用 Autodock 4.2 对 LMG 与 BSA 形成的非共价复合物进行了研究(图 5), BSA 的 I 位有足够的空间容纳 LMG, 通过 LigPlus⁺ 软件分析得知 LMG 与 BSA 之间主要为疏水作用, LMG 与 Ala 209, Ala 212, Trp 213, Leu 197, Leu

480, Leu 346 和 Val 481 等七种疏水氨基酸作用^[17]。

3 结论

利用荧光光谱法、CD 法、AFM 和分子对接研究 LMG 与

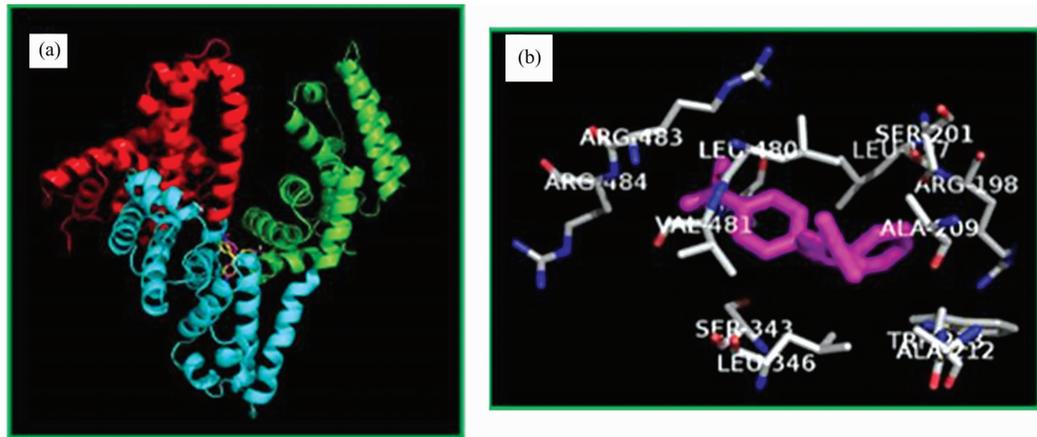


图 5 (a) LMG 与 BSA 的分子对接图; (b) LMG 与 BSA 的疏水作用力

Fig. 5 (a) Molecular docking of LMG and BSA; (b) The hydrophobic bond interaction between LMG and BSA

BSA 的相互作用。AFM 和 CD 实验表明 LMG 的存在不仅改变了 BSA 所处的微环境并使 BSA 的构象发生变化。应用 MCR-ALS 解析拓展的荧光和 CD 光谱矩阵, 由重叠光谱中可同时获得定量(各因子数的浓度变化趋势)和定性(不能单独用化学或物理方法分离的多组份和中间体的检测)信息, 进一步认识 LMG 与 BSA 在作用过程中的动态变化过程和

达到平衡时各组分的状态。而分子对接更直观的表明 LMG 结合在 BSA 的 site I 位且主要作用力为疏水作用。通过本研究探讨具有毒副作用的 LMG 与蛋白质的作用过程, 在分子水平认识和揭示 LMG 分子在机体内的运输、代谢过程和毒理机制具有重要意义。

References

- [1] Yang J, Lin Z Z, Zhong H P, et al. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2017, 252: 561.
- [2] Zhang Y Y, Yu W S, Pei L, et al. *Food Chemistry*, 2015, 169: 80.
- [3] Wei S C, Fan S, Lien C W, et al. *Analytical Chimica Acta*, 2018, 1003: 42.
- [4] Xu K X, Guo M H, Huang Y P, et al. *Talanta*, 2018, 180: 383.
- [5] Shalaby A R, Eman W H, Anwar M M. *Food Chemistry*, 2017, 226: 8.
- [6] Wang Q, Huang C R, Jiang M, et al. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2016, 156: 155.
- [7] Jahanban-Esfahlan A, Panahi-Azar V. *Food Chemistry*, 2016, 202: 426.
- [8] Zeng X D, Zhu L, Zhang F S, et al. *Journal of Luminescence*, 2013, 138: 44.
- [9] Shen G F, Liu T T, Wang Q, et al. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 2015, 153: 380.
- [10] Ortiz-Villanueva E, Benavente F, Pina B, et al. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 978: 10.
- [11] Ahmadi G, Tauler R, Abdollahi H. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2015, 142: 143.
- [12] Hu T Y, Liu Y. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 107: 325.
- [13] Kumar K. *Journal of Fluorescence*, 2017, 27(6): 1957.
- [14] Acuna S M, Bastias J M, Toledo P G. *Plus One*, 2017, 12: e0173910.
- [15] Shi J H, Pan D Q, Jiang M, et al. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology*, 2016, 164: 103.
- [16] Zhang G W, Wang L, Pan J H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 2721.
- [17] Sun Q M, Yang H Q, Tang P X, et al. *Food Chemistry*, 2018, 243: 74.

Studies on the Interaction between Leucomalachite Green with Bovine Serum Albumin by MCR-ALS and Molecular Docking

ZHANG Qiu-lan^{1,2}, XIE Li-xin³, YANG Lin-hui³, TUO Xun², NI Yong-nian^{1,2*}

1. The State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

2. Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China

3. College of Pharmacy, Nanchang University, Nanchang 330031, China

Abstract Leucomalachite Green (LMG) is a major metabolite of malachite green (MG). It has a long residence period in edible fish tissues. At present, the use of MG has been banned in some countries for its increased risk of carcinogenesis, mutagenesis and other adverse effects to human health. However, MG is still widely used in aquaculture, aquatic transport and storage for its low price. The interaction between LMG and bovine serum albumin (BSA) under simulative physiological conditions was investigated by spectroscopy. Two spectroscopic approaches (fluorescence and circular dichroism) and two different experiments were used for monitoring the biological dynamic process. Qualitative and quantitative information was obtained with the resolution of the data matrices by chemometrics method - multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS). Atomic force microscope (AFM) was executed in order to verdict the particle morphology and dimensions of the LMG-BSA conjugates. The root mean square (RMS) roughness of the individual BSA molecule was found to be (1.24 ± 0.28) nm. The BSA molecule particle was observed to be looser on the mica substrate upon interaction with LMG. The RMS was changed to be (13.47 ± 0.53) nm for the LMG-BSA interaction. The calculated result of circular dichroism (CD) spectra revealed that the α -helical content for the LMG-BSA complex was 42.5%, which has a slight decrease compared with the free BSA (46.3%). The results of AFM and CD spectra showed that the binding of LMG to BSA induced micro-environmental and conformational changes of BSA molecules. In order to identify the LMG-binding site on BSA, site marker competitive experiments were carried out, using drugs which were specifically bound to site I (warfarin) and site II (ibuprofen) on BSA. The binding constant of the system with warfarin ($1.88 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) was almost 70% of that without warfarin ($2.65 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$), while the constants of the systems with and without ibuprofen had only a small difference, indicating that LMG was bound to site I of BSA. The molecular docking gave more intuitive understanding of the binding of LMG and BSA. It was recognized that LMG binds within the sub-domain II A pocket in domain II of BSA. These values showed that hydrophobic forces were the main interactions in the binding of LMG to BSA and the stabilization of the complex. It can be expected that the study will have great significance in helping to further clarify the metabolism and distribution of LMG in vivo and the mechanism of toxicological effects and pharmacokinetics from molecular level.

Keywords Spectroscopy; MCR-ALS; Molecular docking; Leucomalachite green; Bovine serum albumin; Interaction

(Received Dec. 27, 2017; accepted Apr. 25, 2018)

* Corresponding author