

多光谱法和分子对接模拟法研究美满霉素与牛血清白蛋白的相互作用

王晓霞^{1*}, 聂智华², 马力通¹, 崔金龙¹, 赛华征¹, 赵文渊¹

1. 内蒙古科技大学化学与化工学院, 内蒙古 包头 014010

2. 清华大学生命科学学院, 北京 100084

摘要 美满霉素(Minocycline, MC)是一种半合成四环素类广谱抗生素,具有较强的抗菌作用,MC经口服后迅速被吸收,与血清白蛋白结合率为76%~83%。研究牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)与MC之间的结合机理,有利于在分子层面探讨MC与BSA的相互作用机制,进一步了解MC与BSA的结构和功能关系,并为MC的药理毒性、药效的深入研究提供必要数据支持。在模拟生理条件和不同的温度条件下,采用荧光光谱、圆二色谱、紫外光谱和分子对接模拟技术研究MC和BSA之间的相互作用及机理。研究结果表明,MC对BSA的荧光有猝灭作用,且猝灭常数 K_{sv} 随温度升高而降低,说明MC与BSA的猝灭机理为静态猝灭。利用Stern-Volmer方程和静态猝灭双对数公式对荧光结果进行计算,结果表明MC与BSA之间的结合位点数 n 都接近于1。根据Van't Hoff热力学方程式在298, 303和308 K下求得热力学参数结果为焓变 $\Delta H = -34.14 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 熵变 $\Delta S = 32.55 \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$, 吉布斯自由能 $\Delta G = -43.84 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (298 K), $-43.88 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (303 K), $-44.17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (308 K), 证明二者之间的主要作用力为范德华力和氢键,其作用过程为自发、放热过程。通过MC与BSA的紫外可见吸收光谱分析,发现BSA的吸收峰位置有明显的红移,表明BSA的构象发生了变化。根据Förster's非辐射能量转移理论得到的MC和BSA的结合距离为 $r = 1.873 \text{ nm}$,表明在MC和BSA之间发生了非辐射能量转移。同步荧光光谱的实验结果表明,当MC和BSA相互作用时,BSA的构象发生了变化,结合位点位于色氨酸(Trp)残基上。此外,三维荧光光谱和圆二色谱分析都进一步表明MC与BSA相互作用时会使BSA的构象变化且BSA中的色氨酸(Trp)残基周围微环境极性减小,疏水性增强。通过MC与BSA作用前后圆二色谱二级结构的定量分析可知:BSA中 α -螺旋结构占比为31.75%,逐步加入MC后, α -螺旋结构占比依次变为47.10% ($c_{\text{BSA}} : c_{\text{TRO}} = 1 : 1$), 54.39% ($c_{\text{BSA}} : c_{\text{TRO}} = 1 : 5$),说明 α -螺旋结构含量占比,BSA的结构以 α -螺旋结构为主。分子对接模拟表明MC结合在BSA的site I(亚域IIA)位置,MC分子与BSA中的氨基酸残基以范德华力结合作用的有:PHE508, LYS535, HIS534, PHE501, GLN579, VAL546, MET547, LEU528, PHE508, 以氢键结合作用的有:LYS524和LEU531,产生超共轭效应的残基有:ALA527, VAL575, LEU531, PHE508,这些氨基酸与MC分子紧密结合,MC使BSA的二级结构发生改变。本实验获得的数据有助于了解MC和BSA的相互作用机制,同时也有助于了解MC在人体的储运过程中对BSA构象的影响。

关键词 美满霉素;牛血清白蛋白;荧光光谱;圆二色谱;分子对接模拟

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)05-1503-06

引言

美满霉素对革兰氏阳性菌、链球菌等均高度敏感。牛血清白蛋白是血液的主要成分,能结合和运输外源性与内源性物质,维持血液正常的渗透压,具有pH缓冲作用、载体作

用^[1-2]。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)与人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)的氨基酸序列具有高度同源性,成本较低,因此用BSA替代HSA研究药物在人体内的转运过程。

目前,光谱法被广泛应用于药物活性成分与血清白蛋白结合作用研究中。Samima Karina等^[3]利用光谱法研究甲氧

收稿日期: 2019-03-28, 修订日期: 2019-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(21766025), 内蒙古自然科学基金项目(2017MS(LH)0210), 内蒙古高等学校科学研究项目(NJZY17166), 内蒙古自然科学基金项目(2019LH02005)资助

作者简介: 王晓霞,女,1984年生,内蒙古科技大学化学与化工学院讲师 e-mail: wx572369@163.com * 通讯联系人

丙脯酸与牛血清白蛋白的相互作用; Leila Khalili 等^[4]用荧光光谱法研究了牛血清白蛋白与植物中提取的阿魏酮之间相互作用的机理。本工作在模拟生理条件下, 研究 BSA 和 MC 之间相互作用的机理, 利用荧光光谱法和紫外-可见吸收光谱法确定了 BSA 和 MC 的主要作用力和结合距离, 使用同步荧光光谱法、三维荧光光谱法和圆二色谱法观察了 MC 对 BSA 构象的影响, 通过分子对接模拟的方法预测了 MC 和 BSA 的作用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

荧光分光光度计 (LS-55, 美国 PerkinElmer 公司); 紫外分光光度计 (SPECORD50, 德国耶拿分析仪器股份公司); 圆二色光谱仪 (Jasco-715, 北京国嘉恒业科学仪器有限公司)。

三(羟甲基)氨基甲烷 [Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Tris, 天津市华东试剂厂]; 配置成 pH 7.40 的 Tris-HCL 缓冲液; 美满霉素 (Minocycline, MC, 中国食品药品检定研究院); $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准储备液; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA, 美国 sigma 公司) $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准液; 用含 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 的 Tris-HCL 缓冲液定容配制。

实验所用试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 方法

1.2.1 在不同的温度下 MC 与 BSA 的荧光光谱、同步荧光光谱测定、三维荧光光谱测定

溶液中 MC 的浓度为 (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别在 (298 \pm 0.1), (303 \pm 0.1) 和 (308 \pm 0.1) K 的恒温振荡器中振荡 20 min, 分别对不同温度下的溶液进行荧光发射光谱、同步荧光光谱扫描。荧光参数设置如下: 激发波长 280 nm, 扫描速度为 $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$, 狭缝宽度 9 nm, 记录波长范围在 290~550 nm 时的荧光发射光谱。在 $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ 和 $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ 条件下, 扫描同步荧光光谱。在激发波长为 200~500 nm, 发射波长 200~500 nm 范围内进行三维荧光扫描, 扫描速度 $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.2.2 MC 与 BSA 在不同温度下的紫外光谱测定

溶液中 MC 的浓度为 (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用二次蒸馏水作对照参比, 分别在 (298 \pm 0.1), (303 \pm 0.1) 和 (308 \pm 0.1) K 的恒温振荡器中振荡 20 min 后进行紫外测量, 吸收波长选择在 190~400 nm。

1.2.3 MC 与 BSA 圆二色谱测定

溶液中 BSA 样品浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, MC 浓度为 1.0×10^{-5} 和 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。扫描范围为 190~250 nm, 扫描时间为 0.5 s, 石英样品池的光程为 0.1 cm, 扫描速度为 $3.3 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$, 灵敏度为 $2 \text{ mdeg} \cdot \text{cm}^{-1}$, 分辨率为 0.1 nm, 测量时 MC 与 BSA 的浓度比为 1:0, 1:1, 5:1, 并且以 Tris-HCL 缓冲液作为参比, 所有数据经过 4 次扫描

取平均值。

1.2.4 分子对接模拟

BSA 晶体结构取自蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), 由 Chem3D Pro 14.0 软件得到 MC 的分子结构式, 利用软件 Pymol ver-Sion1.8.2.0. 进行分子对接模拟。

2 结果与讨论

2.1 MC 与 BSA 的荧光猝灭光谱及作用机制的确定

通常蛋白质分子可以吸收紫外光并发射荧光, 据此可定量检测蛋白质, 同时, 测量所产生的荧光强度可用于蛋白质相关作用的研究。图 1 为 298 K 温度下不同浓度的 MC 与一定浓度的 BSA 作用荧光发射光谱图, BSA 在激发波长 280 nm 处, 在发射波长 346 nm 处产生最大荧光发射峰。从图 1 中可以看到, 随着 MC 浓度的逐渐增加, BSA 的荧光强度呈规律性下降, 但发射峰的位置基本没有发生变化, 说明 MC 对 BSA 的荧光具有猝灭作用。

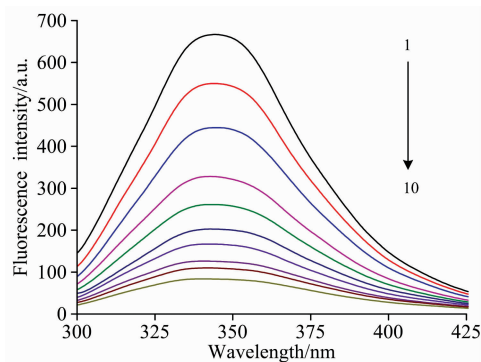


图 1 298 K 温度下 MC-BSA 体系相互作用的荧光光谱图

Fig. 1 Fluorescence spectra of MC-BSA interaction system under 298 K

$c_{\text{BSA}}=5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{MC}}(1-10)$: (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 7.40

采用 Stern-Volmer^[5] 方程式确定 MC 对 BSA 的猝灭作用机制, 方程描述为

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

式(1)中 F_0 为未加入猝灭剂 (MC) 时的荧光强度; F 为加入猝灭剂 (MC) 后的荧光强度; K_{SV} 为 Stern-Volmer 动态猝灭常数; Q 为猝灭剂 (MC) 的浓度; K_q 是双分子猝灭速率常数; 各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态荧光猝灭速率常数约为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$; τ_0 是猝灭剂不存在下生物大分子的平均寿命为 10^{-8} s ^[6]。

本实验研究 MC 在 298, 303 和 308 K 这 3 种温度下对 BSA 的荧光猝灭情况, 以 F_0/F 对 $[Q]$ 作图, 得到 Stern-Volmer 曲线, 计算结果见表 1。从表 1 可看出, 随着温度升高, MC-BSA 体系的荧光猝灭常数 K_{SV} 下降, 表明 MC 对 BSA 过程符合静态猝灭特征, K_q 值远远大于 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$, 进一步证明 MC 对 BSA 的荧光猝灭方式是静态猝灭。

表 1 Stern-Volmer 线性方程和相关系数以及结合常数 K_A 和结合位点数 n

Table 1 Stern-Volmer linear equations and correlation coefficients plus binding constants K_A and binding sites n

T/K	$K_{SV}/(L \cdot mol^{-1})$	$K_q/(L \cdot mol^{-1} \cdot s)$	相关系数 r	$K_A/(L \cdot mol^{-1})$	结合位点数 n
298	1.575×10^5	1.575×10^{13}	0.995 4	4.848×10^7	1.588
303	1.411×10^5	1.411×10^{13}	0.995 8	3.671×10^7	1.571
308	1.370×10^5	1.370×10^{13}	0.996 2	3.102×10^7	1.564

2.2 MC 与 BSA 作用的结合常数和结合位点数

由于 MC 对 BSA 的荧光猝灭方式为静态猝灭, 利用静态猝灭双对数公式^[7]计算结合常数和结合位点数

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_A + n \lg [Q] \quad (2)$$

式(2)中: K_A 为 MC 与 BSA 的结合常数, n 为 MC 与 BSA 的结合位点数。根据得到的直线斜率和截距可以得到不同温度下 MC 与 BSA 的结合位点数 n 和结合常数 K_A , 见表 1。由表 1 可见, 结合常数 K_A 值都在 10^7 数量级, 说明 MC 对 BSA 结合形成较稳定的复合物, 结合位点接近 1, 说明 MC 与 BSA 为 1:1 结合类型。

2.3 MC 与 BSA 的热力学参数与作用力类型的确定

根据 Van't Hoff 热力学方程式^[8]在 298, 303 和 308 K 下求得热力学参数结果为焓变 $\Delta H = -34.14 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 熵变 $\Delta S = -32.55 \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$, 吉布斯自由能 $\Delta G = -43.84 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (298 K), $-43.88 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (303 K), $-44.17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (308 K)。

根据 Ross^[9]等理论可知, $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, 可知 MC 与 BSA 之间在结合过程中, 氢键和范德华力为主要作用力; 且 $\Delta G < 0$, 说明该反应自发进行。

2.4 MC 与 BSA 之间的结合距离

如图 2 所示, MC 的紫外吸收光谱和 BSA 的荧光发射光谱之间存在一定程度的重叠, 根据 Förster's 非辐射能量转移理论公式^[10]

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (3)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (4)$$

$$J = \sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F(\lambda) \Delta\lambda \quad (5)$$

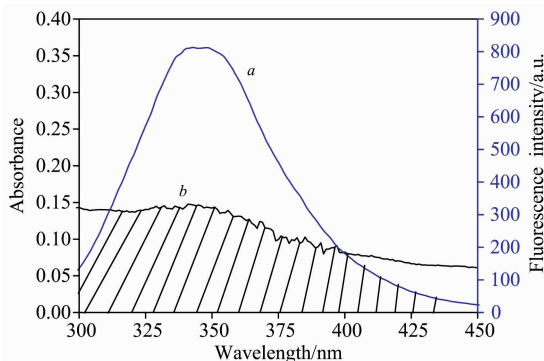


图 2 BSA 的荧光发射光谱 (a) 与 MC 的紫外吸收光谱 (b) 的重叠图

Fig. 2 The overlapping spectra of BSA fluorescence emission spectra (a) and UV absorption spectra (b) of MC

$c_{BSA} = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
 $c_{MC} = 6.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} 7.40$

计算得到 MC 与 BSA 的结合距离 r , 式(3)一式(5)中 J 为供体的发射光谱与受体的吸收光谱两者的重叠积分, $F(\lambda)$ 为 BSA 在波长为 λ 处的荧光强度, $\epsilon(\lambda)$ 为 MC 在波长为 λ 处的摩尔吸光系数, $\Delta\lambda$ 为激发波长与发射波长的差值; E 为能量转移效率, F_0 为 BSA 溶液不加猝灭剂的荧光强度, F 为加入猝灭剂后 BSA 的荧光强度, R_0 为临界能量转移距离, 即能量转移效率为 50% 的距离, r 为给体受体间的距离; K^2 为偶极空间的取向因子, 取给体与受体各向随机分布平均值 $2/3$, N 为介质折射指数, 一般水和有机物折射指数的平均值 1.336, Φ 为供体的荧光量子产率, 一般蛋白质中色氨酸的量子产率 0.118。

图 2 表明, 波长在 300~450 nm 范围内计算浓度比为 1:1 时 BSA 的荧光光谱和 MC 的紫外吸收光谱的重叠积分 J , $J = 1.942 \times 10^{-19} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 求得临界距离 $R_0 = 0.1123 \text{ nm}$, 能量转移效率 $E = 4.1\%$, 结合距离 $r = 1.873 \text{ nm}$ 。根据 Förster's 非辐射能量转移理论, 结合距离 $r < 7 \text{ nm}$, 说明 BSA 与 MC 之间能发生非辐射能量转移。

2.5 MC 对 BSA 二级结构的影响

2.5.1 MC 与 BSA 作用的紫外光谱分析

紫外光谱法操作方便、高灵敏度、得到结果快, 分析药物-蛋白体系的相互作用类型时, 可依据二者的特征吸收峰的吸光度变化及位移, 进一步推测药物-蛋白的猝灭类型及蛋白周围微环境变化信息。在 298 K 温度下, 测量在 BSA 中加入 MC 反应前后的紫外吸收光谱如图 3 所示。

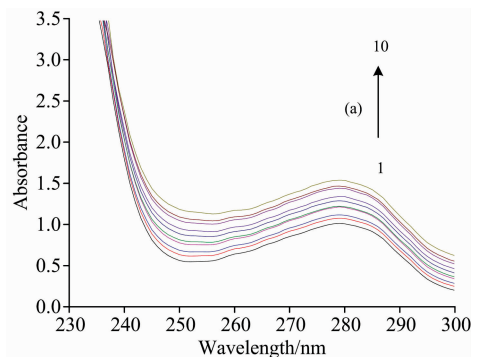


图 3 298 K 温度下 MC 与 BSA 的紫外光谱图

Fig. 3 Ultraviolet Spectra of MC and BSA at 298 K

$c_{BSA} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{MC}(1-10)$: (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 3 为 298 K 温度下 MC 与 BSA 紫外光谱, 随着 MC 浓度的增加, BSA 的最大吸收峰对应的吸光度明显增大, 最大吸收峰从 278 nm 处红移至 280 nm 处, 红移的原因是嵌入药物和蛋白质的碱基对 π 电子结合, 使能量降低, 导致 $\pi \rightarrow \pi^*$

跃迁能量降低^[11], 说明包围在 BSA 内部的色氨酸和酪氨酸残基的疏水性增加, MC 使 BSA 的二级结构发生了改变, 由于静态猝灭的吸收光谱会因为基态分子的改变而发生改变, 进一步证明两者作用为静态猝灭。

2.5.2 MC 与 BSA 作用的同步荧光光谱分析

同步荧光光谱法相比荧光光谱法进一步提升灵敏度和增加选择性, 具有简化光谱、减弱散射光、窄化光谱等优点。由图 4 可以看出, 当 BSA 浓度固定为 $5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 逐渐增加 MC 的浓度使两氨基酸的同步荧光光谱的荧光发射峰均出现猝灭, 图 4(a) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ 时, 峰形基本保持不变, 图 4(b) $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 荧光峰由 280 nm 蓝移到 278 nm , 说明 MC 可促进 BSA 中色氨酸 (Trp) 残基所处的微环境极性减小, 疏水性增加, 亲水性降低, 引起 BSA 构象发生改变。对比图 5(a) 与 (b), 色氨酸 (Trp) 残基对 BSA 荧光猝灭的贡献要高于酪氨酸 (Tyr) 残基, 因此 MC 主要结合在 BSA 中的色氨酸 (Trp) 残基上。

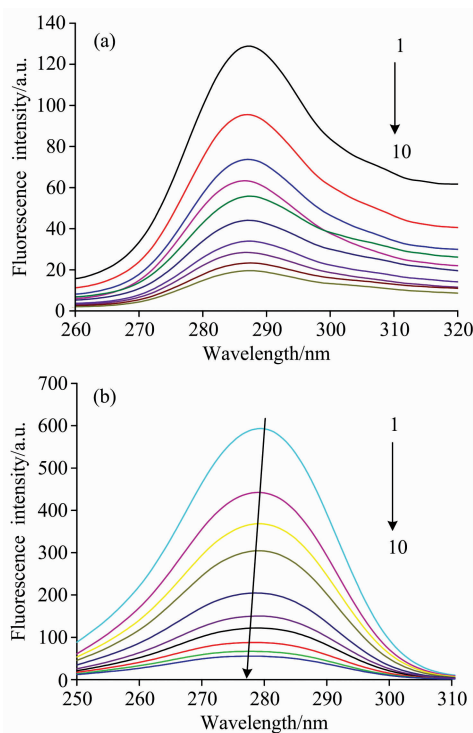


图 4 MC 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱图

Fig. 4 Synchronous fluorescence spectra of MC and BSA interactions

(a): $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$, (b): $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

$c_{\text{BSA}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $c_{\text{MC}}(1-10)$: (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5) $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} 7.40$

2.5.3 MC 与 BSA 三维荧光光谱分析

三维荧光的光谱数据相比二维荧光光谱, 具有更多的坐标点, 显示的信息更精准, 选择性更高。BSA 加入 MC 前后的三维荧光光谱图见图 5, 三维荧光参数见表 2, 由图 5 的三维荧光光谱中可以看到两种峰, 一种是“山脊”状的有序瑞利散射峰, 如峰 a, 峰 b ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$), 加入 MC 后, BSA 的荧光强度明显降低, 说明 MC 与 BSA 发生相互作用。另一种是类似

“驼峰”的典型荧光峰, 如峰 1, 峰 2 ($2\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$)。其中峰 1 的光谱特性主要表现为 Trp 和 Tyr 残基, 峰 2 主要涉及到荧光光谱行为多肽骨架结构, 其强度为与蛋白质二级结构相关^[12]。从表 2 中可以看出峰 1 的最大发射波长蓝移 4 nm, 这说明 MC 的加入引起 BSA 的 Trp 和 Tyr 残基周围微环境的变化, 使极性减小, 疏水性增加; 峰 2 的荧光强度降低, 且最大发射波长蓝移 3 nm, 说明 MC 与 BSA 发生相互作用并诱导 BSA 的微环境和构象均发生变化。

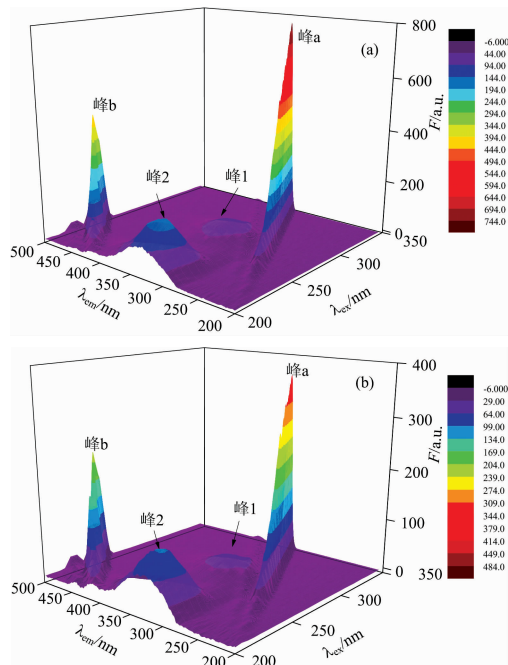


图 5 BSA 与 MC 相互作用前 (a) 后 (b) 的三维荧光光谱

Fig. 5 The three-dimensional fluorescence spectra of BSA and MC solution before (a) and after (b) reaction

(a): $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; (b): $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $c_{\text{MC}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$; $\text{pH} 7.40$

表 2 三维激发发射荧光光谱特征参数

Table 2 Three-dimensional fluorescence spectra characteristic parameters

组分	峰 1 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}, F$)	峰 2 ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}, F$)
BSA	280/334, 67.67	230/332, 169.50
BSA+MC	280/338, 37.71	230/335, 102.50

2.5.4 MC 与 BSA 圆二色谱分析

圆二色谱法 (CD) 是一种通过在特定波长区间处扫描蛋白体系、药物-蛋白体系, 获得 CD 谱图以分析蛋白质的二级结构变化情况的方法。由图 6 看出, BSA 分子的圆二色谱图 of 双负峰形, 分别位于 208 nm 和 222 nm 处, 这是 BSA 的 α -螺旋结构的特征峰, 且随着 MC 的加入, BSA 的摩尔椭圆率有所升高。圆二色谱的测量结果用平均摩尔椭圆率 (mean residue ellipticity, MRE) 表示。 α -螺旋结构的含量根据以下方程计算 MRE, 见式 (6) 和式 (7)^[13]

$$\text{MRE} = \theta_{\text{obs}} / 10(cNL) \quad (6)$$

$$\alpha\% = [(-[\text{MRE}]_{208} - 4000)/(33000 - 4000)] \times 100\% \quad (7)$$

式(6)和式(7)中, θ 为 CD 测量的摩尔椭圆率; c 为 BSA 的摩尔浓度, N 为 BSA 中氨基酸残基的个数, 即 583, L 为所用样品池的光程为 0.1 cm; 4000 为 β -折叠和无规卷曲构象

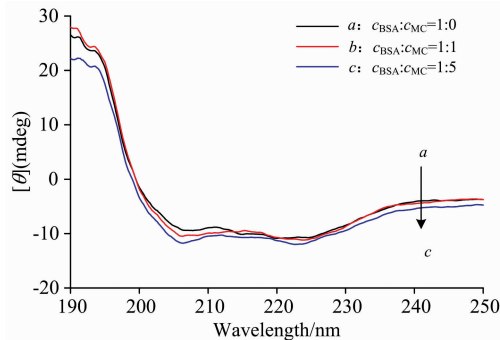


图 6 BSA 与 MC 相互作用的圆二色光谱图

Fig. 6 The circular dichroism spectra of BSA interacting with MC

$a: c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; b: c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, c_{\text{MC}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; c: c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}, c_{\text{MC}} = 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}; T = 298 \text{ K}; \text{pH} 7.40$

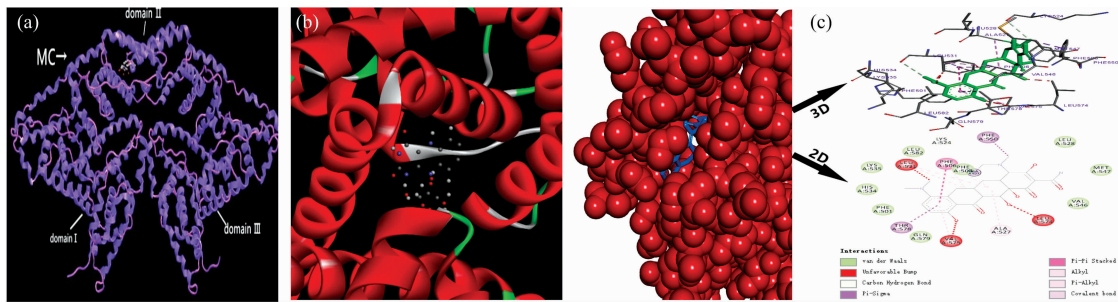


图 7 MC 与 BSA 结合的分子对接模拟图

(a): MC 与 BSA 的分子对接模拟图; (b): MC 与 BSA 飘带状模型对接图; (c): MC 与 BSA 的微环境示意 2D 和 3D 图

Fig. 7 Molecular docking simulation diagram of MC and BSA

(a): The molecular docking simulation of MC and BSA; (b): Streamer shape molecular docking model diagram of MC and BSA; (c): Micro environment 2D, 3D diagram of MC and BSA

3 结 论

研究表明 MC 与 BSA 的猝灭机理为静态猝灭, 并且生成稳定的配合物。根据热力学参数的计算结果可知, $\Delta H < 0$, $\Delta S < 0$, MC 与 BSA 之间的主要作用力类型为氢键和范德华力, $\Delta G < 0$, 说明该反应是自发进行的。MC 与 BSA 的结

References

- [1] Manjanath P, Amar D, Sharanappa N, Shivamurti C, et al. Journal of Molecular Recognit., 2017, 30: 2567.
- [2] Xu X, Du Z, Wu W, et al. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017, 409: 5327.
- [3] Samima K, Riyazuddeen. J. Chem. Thermodynamics, 2018, 126: 43.
- [4] Leila K, Gholamreza D. Journal of Luminescence, 2019, 211: 193.
- [5] Mallika P, Deepti S, Navneet S. Journal of Molecular Structure, 2017, 209(2): 183.
- [6] Gao X, Bi H, Jia J J, et al. Luminescence, 2017, 32: 640.

在 201 nm 的 MRE; 33 000 为 α -螺旋结构在 208 nm 处的 MRE。通过计算可知, 逐步加入 MC 后, BSA 中 α -螺旋结构含量由 31.75% 依次变为 47.10% ($c_{\text{BSA}} : c_{\text{MC}} = 1 : 1$), 54.39% ($c_{\text{BSA}} : c_{\text{MC}} = 1 : 5$), α -螺旋结构含量增加, 表明了 MC 使得 BSA 分子的肽链收缩、疏水性增加、亲水性降低, 且以 α -螺旋结构为主, 说明 MC 改变了 BSA 的二级结构。

2.6 分子对接模拟

分子对接模拟技术是一种通过计算机模拟软件将小分子结构与靶蛋白进行模拟对接, 以结构的匹配程度来输出药物-蛋白体系相互作用的最优结合形式及反应参数的方法。利用网页程序 Z-Dock 进行结合位点的选择和绑定残留的选择, 然后进行分子对接模拟见图 7。图 7(a)和(b)通过展示分子表面可以看出, MC 结合位点在 BSA 的亚域区域 II A (位点 site I, 即华法林位点) 的疏水腔内。分析 MC 与 BSA 结合的微环境 2D 和 3D 示意图 7(c), MC 分子与 BSA 中的氨基酸残基以范德华力结合作用的有: PHE508, LYS535, HIS534, PHE501, GLN579, VAL546, MET547, LEU528, PHE508, 以氢键结合作用的有: LYS524, LEU531, 产生超共轭效应的残基有: ALA527, VAL575, LEU531, PHE508, 可以看出各种作用力使 MC 与 BSA 紧密结合, 范德华力和氢键为两者的主要作用力, 与热力学判断结果一致。

合距离 $r = 1.873 \text{ nm}$, 表明二者存在非辐射能量转移。通过同步荧光光谱、三维荧光光谱、圆二色谱结果证明 MC 能够改变 BSA 的二级结构和微环境。分子对接模拟表明 MC 结合位点在 BSA 的区域 II A (位点 site I, 即华法林位点) 的疏水腔内, 引起了周围残基微环境疏水性的变化, 研究结果为 MC 的临床治疗、药效学以及药代动力学上提供了重要的理论依据。

- [7] Shama Y, Riyazuddeen, Gulam R. J. *Therm. Anal. Calorim.*, 2017, 127: 1445.
- [8] Anukul M, Maodul B, Amitk M, et al. *Process Biochemistry*, 2017, 27: 1235.
- [9] Manjanath P, Amar D, Sharanappa N, et al. *Molecular Recognition*, 2017, 30: 2567.
- [10] Samima K, Riyazuddeen. *Department of Chemistry*, 2018, 11: 43.
- [11] Arash H, Gholamreza D, Masoomeh S, et al. *Journal of Molecular Liquids*, 2017, 12(12): 459.
- [12] WANG Xiao-xia, NIE Zhi-hua, LI Song-bo, et al(王晓霞, 聂智华, 李松波, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2018, 38(8): 2468.
- [13] Prateek T, Monika T, Swati A, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 171: 246.

Study on the Interaction Between Minocycline and Bovine Serum Albumin by Multi Spectral Method and Molecular Docking Simulation

WANG Xiao-xia^{1*}, NIE Zhi-hua², MA Li-tong¹, CUI Jin-long¹, SAI Hua-zheng¹, ZHAO Wen-yuan¹

1. School of Chemistry and Chemical Engineering of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China

2. School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract Minocycline (MC) is a semisynthetic tetracycline broad-spectrum antibiotic with stronger antibacterial activity, which is absorbed rapidly after oral administration, and the binding rate to serum protein ranges from 76% to 83%. The study of the binding mechanism between Bovine serum albumin (BSA) and MC is helpful to explore the interaction mechanism between MC and BSA at the molecular level, to further understand the structure and functional relationship of BSA and MC, and to provide necessary data support for the further study of pharmacological toxicity and efficacy of MC. The interaction between MC and BSA has been investigated by fluorescence spectroscopy, circular dichroism, ultraviolet spectroscopy and molecular docking simulation at different temperature and simulated physiological conditions. The results show that MC quenches the fluorescence of BSA, and the quenching constant decreases with the increase of temperature. This indicates that the quenching mechanism of MC and BSA is static quenching. The fluorescence results were calculated using the Stern-Volmer equation and the static quenching double logarithmic formula, and the results showed that the number of binding sites n between MC and BSA is close to 1. According to Van't Hoff thermodynamic equation at 298, 303 and 308 K, the thermodynamic parameters were obtained as follows: enthalpy change $\Delta H = -34.14 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, entropy change $\Delta S = 32.55 \text{ J} \cdot (\text{mol} \cdot \text{K})^{-1}$, Gibbs free energy $\Delta G = -43.84 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (298 K), $-43.88 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (303 K), $-44.17 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (308 K), which proved that the main force between MC and BSA is the van der Waals and hydrogen bonding, and the process of its action is the spontaneous and exothermic process. Through the UV-visible absorption spectrum analysis of BSA and MC, the position of the absorption peak of BSA has a significant red shift, indicating that the conformation of BSA has changed. According to Förster's theory of non-radiative energy transfer, the binding distance r between MC and BSA is 1.873 nm, which indicates that non-radiative energy transfer occurs between MC and BSA. In addition, the experimental results of synchronous fluorescence spectroscopy showed that the conformation of BSA changed when MC interacted with BSA, and the binding site was on tryptophan (Trp) residues. The results also showed that the conformation of BSA changed by three-dimensional fluorescence spectroscopy and circular dichroism, and (Trp) the polarity of the surrounding environment decreased and hydrophobicity increased. Quantitative analysis of secondary structure of circular dichroism before and after the interaction of MC and BSA showed that the content of alpha-helix structure in BSA was 31.75%. After adding MC gradually, the content of α -helix structure changed to 47.10% ($C_{\text{BSA}} : C_{\text{TRO}} = 1 : 1$) and 54.39% ($C_{\text{BSA}} : C_{\text{TRO}} = 1 : 5$), indicating that the content of α -helix structure increased, and the structure of BSA was mainly α -helix structure. Molecular docking simulation showed that MC interacts into the site I (subdomain IIA) of BSA, it forms van der Waals interaction between MC and the amino acid residues PHE508, LYS535, HIS534, PHE501, GLN579, VAL546, MET547, LEU528, PHE508 of BSA, hydrogen bonds formed between MC and the amino acid residues LYS524 and LEU531, and super conjugation also formed between MC and the amino acid residues ALA527, VAL575, LEU531, PHE508. These amino acids bind closely with MC molecules, and MC changes the secondary structure of BSA. The data obtained in this experiment are helpful to understand the interaction mechanism between MC and BSA, as well as the effect of MC on BSA conformation during storage and transportation.

Keywords Minocycline; Bovine serum albumin; Fluorescence spectrum; CD spectroscopy; Molecular docking simulation

* Corresponding author