

# 多光谱法和分子对接模拟法研究黄腐植酸和牛血清白蛋白的相互作用

王晓霞<sup>1,3\*</sup>, 吴昊<sup>1</sup>, 聂智华<sup>2</sup>, 马力通<sup>1,3\*</sup>, 崔金龙<sup>1</sup>, 赛华征<sup>1</sup>, 成建国<sup>1</sup>

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
3. 生物煤化工综合利用内蒙古自治区工程研究中心, 内蒙古 包头 014010

**摘要** 在模拟生理环境中,使用荧光光谱法、紫外光谱法、圆二色谱法、同步荧光光谱法、三维荧光光谱法与分子对接模拟法研究黄腐植酸和牛血清白蛋白(BSA)之间相互作用。在荧光光谱法研究中,经 Stern-Volmer 方程计算得到 298, 303 和 308 K 温度下的动态荧光猝灭速率常数  $K_q$  和猝灭常数,证明 BSA 与黄腐植酸(FA)相互作用的猝灭过程为静态猝灭;同时根据计算得出的结合位点数  $n$  都在 1 附近,FA 与 BSA 体系相互作用比为 1:1;利用静态猝灭双对数方程计算三个温度下的热力学参数,焓变  $\Delta H < 0$ ,熵变  $\Delta S < 0$ ,得出结论,FA 与 BSA 之间的主要作用力为氢键和范德华力; $\Delta G < 0$ ,说明作用过程为自发过程。采用 Förster's 偶极-偶极非辐射能量转移理论,计算出结合距离  $r = 6.340$  nm,表明 BSA 与 FA 之间存在非辐射能量转移。分子对接模拟结果表明 FA 与 BSA 残基的结合作用力具有氢键和范德华力,同时二者之间还存在疏水作用力,多种力共同作用使 FA 与 BSA 能够稳定结合。通过对 FA 与 BSA 相互作用的紫外-可见吸收光谱分析,发现 BSA 最大吸收峰发生了较为明显的红移,表明 FA 使 BSA 的二级结构发生改变。通过研究 FA 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱,得到 FA 使 BSA 中的色氨酸(Trp)残基周围的微环境极性增强,疏水性减弱,亲水性增强,使 BSA 的蛋白质构象发生了一定程度的改变。通过研究 FA 与 BSA 相互作用的三维荧光光谱,峰 1(peak 1)与峰 2(peak 2)的最大发射波长峰都发生了红移,证明 FA 与 BSA 发生了相互作用,FA 使 BSA 周围环境的极性增大,疏水性减小,亲水性增加,BSA 蛋白质构象发生变化。最后采用圆二色谱法进行分析,利用软件计算出该实验相互作用体系下  $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -Helix)减少 2.3%、 $\beta$ -折叠( $\beta$ -sheet)增加 7.7%、 $\beta$ -转角( $\beta$ -Turn)增加 0.6%和无规则结构(Random coil)含量减少 1.2%, $\beta$ -折叠( $\beta$ -sheet)含量增加最为明显,强有力地说明了 FA 使 BSA 结构发生了改变。

**关键词** 牛血清白蛋白;黄腐植酸;多光谱法;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(2021)09-2904-07

## 引言

黄腐植酸(fulvic acid, FA)为腐植酸中的一种,其结构中含有较多的活性基团,具有水溶性好,分子量小等特点,是一种良好的免疫佐剂<sup>[1]</sup>。近年来,在医药等领域表现突出,如 Winkler John<sup>[2]</sup>等研究黄腐植酸对于慢性疾病和糖尿病的疗效;Jayasooriya Rajapaksha Gedara Prasad Tharanga<sup>[3]</sup>等研究黄腐植酸可能具有刺激免疫调节作用,诱导癌细

胞死亡等功效。血清白蛋白是人和动物的血浆中最丰富的蛋白质,作为血液缓冲剂、维持血浆渗透压和运载药物小分子,生物体内承担重要作用。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)与人血清白蛋白在结构上类似,BSA 更容易获得也更为廉价,这些特点使得 BSA 常用来做研究小分子与蛋白质相互作用的理想模型。FA 分子结构中的含有多个具有活性的酚羟基和羧基,可以与药物载体血清白蛋白结构中的活性基团相互作用。本研究能为 FA 类新药物的开发及未来对于研究 FA 药物对人体的作用提供一定的数据参考。同时通

**收稿日期:** 2020-11-17, **修订日期:** 2021-03-04

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(21766025),教育部“春晖计划”合作科研项目(2018042),内蒙古自治区科技计划项目(2020GG0158),内蒙古自然科学基金项目(2019LH02005),内蒙古自治区人才开发基金项目,内蒙古科技大学大学生创新基金项目,中国科学院“西部之光”人才培养引进计划“西部青年学者”项目(2019年度)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副教授 e-mail: wxx572369@163.com

\* 通讯作者 e-mail: wxx572369@163.com; mlt0916@126.com

过本实验 FA 与 BSA 相互作用的探究也对 FA 的性能和其对蛋白质结构功能的影响具有重要理论价值。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

仪器: 荧光分光光度计 (LS-55, 美国 PerkinElmer 公司); 紫外-可见近红外分光光度计 (CARY 5000, AGILENT TECHNOLOGIES 有限公司); 圆二色谱仪 (Chirascan plus, 英国应用光物理公司)。试剂: FA (纯度  $\geq 98\%$ ) (合肥巴斯夫生物科技有限公司); BSA (纯度  $\geq 98\%$ ) (上海金穗科技有限公司); 三羟甲基氨基甲烷 (tris hydroxymethyl aminomethane, Tris, 分析纯) (天津市光复精细化工研究所)。

### 1.2 溶液配制

分别配制 pH 7.40, 浓度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 Tris-HCl 缓冲溶液、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaCl 溶液、 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 BSA 储备液。准确移取 BSA 储备液后加入浓度为  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 溶液 20 mL, 用 pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲溶液定容至 100 mL, 得到浓度为  $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的牛血清白蛋白溶液; 配制浓度为  $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的黄腐植酸溶液: 用天平准确称取黄腐植酸药品粉末 0.049 3 g, 充分溶解后定容至 100 mL, 得到浓度为  $1.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的黄腐植酸溶液。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 测定不同温度下 FA-BSA 的荧光光谱

取 9 支 10 mL 比色管, 分别移取适量 BSA 和 FA, 得到试管内 BSA 浓度为  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , FA 浓度从低到高依次为  $(0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2 \text{ 和 } 4.8) \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 摇匀后静置 20 min 后放入恒温水浴箱, 将温度分别设置为 298, 303 和 308 K, 在不同温度下加热 20 min 后取出, 使用荧光光度计进行测量。设置荧光激发波长 280 nm, 狭缝宽度均为 10 nm, 扫描速度  $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 发射波长 290~550 nm, 记录相对应的荧光值。

#### 1.3.2 测定 FA-BSA 的同步荧光光谱

取 9 支 10 mL 比色管, 分别移取适量 BSA 和 FA, 得到比色管内 BSA 浓度为  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , FA 浓度从低到高依次为  $(0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2 \text{ 和 } 4.8) \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 震荡摇匀后待测。在荧光光度计同步荧光激发波长 280 nm, 狭缝宽度均为 9 nm, 扫描速度  $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下, 分别扫描测定  $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$  和  $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$  下体系的同步荧光光谱。

#### 1.3.3 测定 FA-BSA 三维荧光光谱

选用两支 10 mL 比色管, 分别移取适量 BSA 和 FA, 得到两支试管内溶液浓度为: BSA 为  $2.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , FA 为  $3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。震荡摇匀后待测。在三维荧光激发波长 200 nm, 狭缝宽度 7.0 nm 条件下, 设置发射波长 200~500 nm, 扫描速度为  $1500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 分别测量 40 组发射波长间隔为 5 nm 的三维荧光光谱。

#### 1.3.4 测定 FA-BSA 的紫外-可见光吸收光谱

分别移取适量 BSA 和 FA 至比色管, 定容后试管内 BSA

浓度为  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , FA 浓度从低到高依次为  $(0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2 \text{ 和 } 4.8) \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 震荡摇匀后待测。用紫外分光光度计扫描紫外-可见吸收光谱, 扫描波长 190~450 nm, 波长间隔 1 nm 的条件下测量紫外-可见吸收光谱。

#### 1.3.5 测定 FA-BSA 结合距离

取 3 支 10 mL 比色管, 分别移取适量 BSA 和 FA, 得到三个试管溶液浓度为: BSA 为  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; FA 为  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; BSA 为  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , FA 为  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。震荡摇匀后静置待测。在荧光光谱仪激发波长 280 nm, 狭缝宽度 8.0 nm 条件下, 扫描波长范围为 290~550 nm, 设置扫描速度  $500 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 测量并得到 FA 和 FA-BSA 的荧光光谱。在紫外分光光度计扫描波长 190~450 nm, 参数波长间隔 1 nm 的条件下, 测量并得到 FA 的紫外-可见吸收光谱。

#### 1.3.6 测定 FA-BSA 圆二色谱

取 2 支 10 mL 比色管, 分别移取适量 BSA 和 FA, 得到溶液浓度为: BSA 浓度为  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; BSA 浓度为  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , FA 浓度为  $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。圆二色谱仪扫描波长范围为 180~260 nm, 狭缝宽度 8.0 nm, 时间 0.5 s, 用 Tris-HCl 作为参比, 记录 BSA 与 FA-BSA 体系的圆二色谱。

#### 1.3.7 分子对接模拟

使用 ChemDraw Professional 15.1 软件绘制 FA 的分子结构式, 选取蛋白质数据库 RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/bdb/home/home.do>) 中 BSA 晶体结构, 使用分子对接软件 Accelrys Discovery Studio 3.5 进行分子对接模拟。

## 2 结果与讨论

### 2.1 FA 与 BSA 作用的荧光猝灭光谱

由于 BSA 分子含有酪氨酸 (Tyr)、色氨酸 (Trp)、苯丙氨酸 (Phe) 等氨基酸残基能使得 BSA 分子具有强烈的内源性荧光, FA 溶液加入 BSA 溶液后, 出现荧光猝灭现象。图 1 (a, b, c) 是在温度分别为 298, 303 和 308 K 下, BSA 与不同浓度的 FA 溶液所产生的荧光强度变化情况。由图 1 分析对比可知, 激发波长 280 nm, BSA 最大发射波长为 346 nm, 随着 FA 溶液浓度增加, BSA 荧光强度呈规律下降, 发射峰的位置与峰型却没有明显改变, 因此可得出 FA 对 BSA 产生荧光猝灭作用, 两者发生相互作用。

### 2.2 FA 与 BSA 相互作用的荧光猝灭类型

荧光猝灭过程分为动态和静态猝灭, 动态猝灭是猝灭剂 FA 与荧光激发态分子 BSA 之间相互碰撞, 使得荧光强度降低, 不会影响到 BSA 的构象; 荧光猝灭过程中静态猝灭则是基态下荧光分子与猝灭分子形成不发光的基态配合物, 使得荧光减弱, 蛋白质分子结构发生改变<sup>[4]</sup>。实验采用 Stern-Volmer 方程<sup>[5]</sup>进行处理来判断猝灭类型

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

式(1)中, FA 溶液作为猝灭剂,  $F_0$  为不加入 FA 溶液时体系

的荧光强度;  $F$  为加入 FA 溶液后体系的荧光强度;  $[Q]$  为实验测量最终 FA 溶液的浓度,  $K_{sv}$  为动态猝灭常数,  $K_q$  为动态荧光猝灭速率常数;  $\tau_0$  为当猝灭剂 FA 不存在时, 荧光分子的平均荧光寿命, 通常取值  $10^{-8}$  s。以  $[Q]$  为横轴,  $F_0/F$  为纵轴, 作 298, 303 和 308 K 温度下该体系的 Stern-Volmer 曲线, 并拟合得到方程与相关系数, 见表 1。

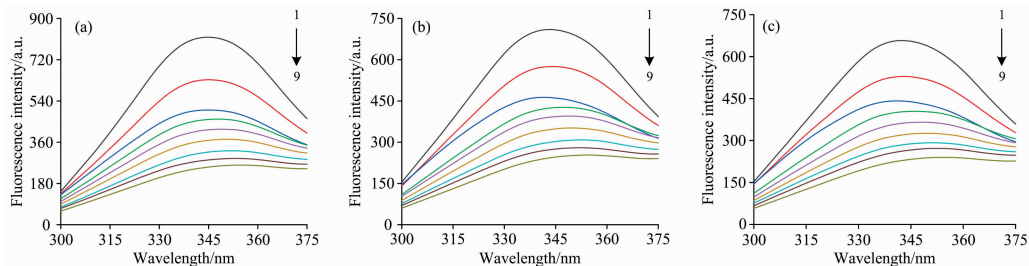


图 1 不同温度下 BSA-FA 体系相互作用的荧光发射光谱图

(a): 298 K; (b): 303 K; (c): 308 K;  $c_{(BSA)} = 5 \times 10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup>;

$c_{(FA)} (1-9): (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8) \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup>; pH 7.40

Fig. 1 Fluorescence emission spectra of BSA-FA interaction system under different temperature

(a): 298 K; (b): 303 K; (c): 308 K;  $c_{(BSA)} = 5 \times 10^{-7}$  mol · L<sup>-1</sup>;

$c_{(FA)} (1-9): (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8) \times 10^{-4}$  mol · L<sup>-1</sup>; pH 7.40

表 1 Stern-Volmer 线性方程以及相关系数

Table 1 Stern-Volmer linear equations and correlation coefficients

T/ K	Stern-Volmer 线性方程	相关系数 $r$	$K_{sv}/$ (L · mol <sup>-1</sup> )	$K_q/$ (L · mol <sup>-1</sup> · s <sup>-1</sup> )	$K_A/$ (L · mol <sup>-1</sup> )	结合位 点数 $n$	$K_A/$ (L · mol <sup>-1</sup> )
298	$y = 4.008x + 0.9576$	0.9969	$4.008 \times 10^4$	$4.008 \times 10^{12}$	$4.710 \times 10^3$	1.033	$4.710 \times 10^3$
303	$y = 3.653x + 0.9501$	0.9955	$3.653 \times 10^4$	$3.653 \times 10^{12}$	$4.382 \times 10^3$	1.037	$4.382 \times 10^3$
308	$y = 3.181x + 0.9688$	0.9969	$3.181 \times 10^4$	$3.181 \times 10^{12}$	$3.532 \times 10^3$	1.025	$3.532 \times 10^3$

### 2.3 FA 与 BSA 相互作用的结合常数与结合位点数

已证明 FA 与 BSA 相互作用的荧光猝灭类型为静态猝灭, 则静态猝灭双对数公式<sup>[7]</sup>适用于该反应体系

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

式(2)中,  $K_A$  为 FA 和 BSA 的结合常数;  $n$  为 FA 与 BSA 的结合位点数;  $F_0$  为不加入 FA 溶液时体系的荧光强度;  $F$  为加入 FA 溶液后体系的荧光强度。以  $\lg[(F_0 - F)/F]$  的值作为纵坐标, 以  $\lg[Q]$  的值作为横坐标作图, 其直线斜率即为结合位点数  $n$ , 结合常数  $K_A$  为直线截距的负对数值, 见表 1。从表 1 可知, 三个温度下结合常数  $K_A$  都较大, 结合位点数在 1 附近, 证明 FA 与 BSA 结合力较强, 且该体系相互作用所形成的复合物为 1:1 型。同时, 结合常数数值随着温度的上升而减小,  $K_A(298 \text{ K}) > K_A(303 \text{ K}) > K_A(308 \text{ K})$ , 与猝灭常数随温度变化规律一致, 进一步证明了 FA 与 BSA 体系猝灭类型为静态猝灭。

### 2.4 FA 与 BSA 相互作用的热力学参数和主要作用力

药物小分子与蛋白质相互之间通过不同的作用力相互作用形成配合物, 相互作用力的表现形式主要有氢键、疏水作用力、静电引力和范德华力。通过 Van't Hoff 公式<sup>[8]</sup> 计算得到反应体系的熵变  $\Delta S$  与焓变  $\Delta H$ , Van't Hoff 公式与反应的吉布斯自由能公式如式(3)一式(5)

$$\ln K_A = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (3)$$

由表 1 可知, 在 298, 303 和 308 K 下计算得到  $K_q$  值均远大于最大扩散碰撞猝灭速率常数  $2.0 \times 10^{10}$  L · mol<sup>-1</sup> · s<sup>[6]</sup>。证明 FA 主要通过静态猝灭来降低 BSA 的荧光强度, 且猝灭常数在 298, 303 和 308 K 下的数值随着温度升高而降低, 进而更表明 FA 与 BSA 作用为静态猝灭。

$$\ln(K_2/K_1) = \Delta H(1/T_1 - 1/T_2)/R \quad (4)$$

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

式(3)一式(5)中,  $\Delta G$  反应的吉布斯自由能;  $K_A$  是结合常数;  $R$  为摩尔气体常数(取  $R = 8.314$  J · mol<sup>-1</sup> · K);  $T$  为试验温度。根据式(3)一式(5)求得  $\Delta H = -33.48$  kJ · mol<sup>-1</sup>,  $\Delta S = -40.78$  J · mol<sup>-1</sup> · K 和  $\Delta G = -20.95$  kJ · mol<sup>-1</sup> (298 K),  $-21.12$  kJ · mol<sup>-1</sup> (303 K),  $-20.92$  kJ · mol<sup>-1</sup> (308 K)。根据 Ross<sup>[9]</sup> 理论可知, FA 与 BSA 体系的热力学参数  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$  表明体系中两者之间的作用力为氢键和范德华力;  $\Delta G < 0$  表明反应为自发反应, 同时本反应为放热反应 ( $\Delta H < 0$ )。

### 2.5 FA 与 BSA 体系结合距离的计算

按照 Förster 偶极-偶极非辐射能量转移机理<sup>[10-11]</sup>, 该体系满足以下关系式

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6/(R_{60} + r^6) \quad (6)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} (k^2 \varphi n^{-4} J) \quad (7)$$

$$J = \sum F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \sum F_D(\lambda) \Delta\lambda \quad (8)$$

式(6)一式(8)中:  $F$  为在 BSA 与 FA 体系中 FA 与 BSA 浓度为 1:1 时 BSA 的荧光强度,  $F_0$  为只有蛋白质 BSA 时测得的荧光强度,  $r$  为 BSA 与 FA 之间的结合距离;  $R_0$  为  $E = 50\%$  时的临界距离;  $k^2$  为偶极空间取向因子, 取平均值 2/3;  $n$  为介质的折射指数, 取水和有机物的平均值 1.336;  $\varphi$  为

BSA 的荧光量子产率, 取色氨酸(Trp)残基量子产率  $\varphi = 0.15$ ;  $J$  为 BSA 的荧光发射光谱与 FA 紫外吸收光谱间的光谱重叠积分;  $F_D(\lambda)$  为 BSA 在波长  $\lambda$  处的荧光强度;  $\epsilon_A(\lambda)$  为受体 FA 在波长  $\lambda$  处的摩尔吸光系数。

BSA 的荧光光谱曲线与 FA 的紫外吸收光谱曲线的重叠图见图 2, 图 2 重叠部分说明 FA 与 BSA 之间存在非辐射能量转移。根据式(6)一式(8)计算得到重叠积分  $J = 2.021 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $E = 18.30\%$ ,  $R_0 = 4.79 \text{ nm}$ ,  $r = 6.340 \text{ nm}$ 。结果表明, FA 与 BSA 相互作用的结合距离  $r < 7 \text{ nm}$ , 同时  $0.5 R_0 < r < 1.5 R_0$ , 证明 FA 与 BSA 之间存在非

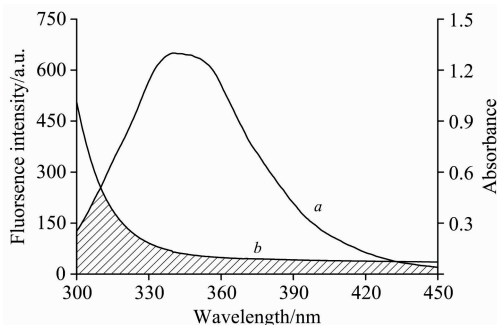


图 2 BSA 的荧光发射光谱(a)与 FA 的紫外吸收光谱(b)的重叠图

Fig. 2 Overlapping of the fluorescence emission spectra (a) of BSA and with the absorption spectra (b) of FA

$$c_{(\text{BSA})} = c_{(\text{FA})} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

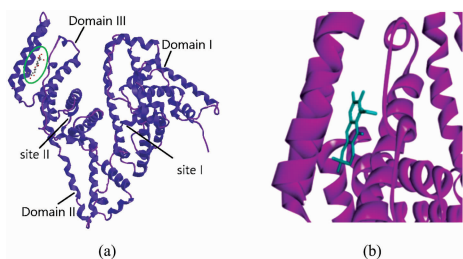


图 3 FA-BSA 分子对接结果

(a): FA-BSA 分子对接模拟图; (b): FA-BSA 分子对接模拟飘带图; (c): FA-BSA 的氨基酸残基的 2D、3D 示意图

Fig. 3 The molecular docking result of FA with BSA

(a): Molecular docking simulation of FA and BSA; (b): Streamer shape molecular docking model diagram of FA and BSA; (c): 2D and 3D schematic diagram of amion residues of FA and BSA

## 2.7 FA 对 BSA 二级结构的影响

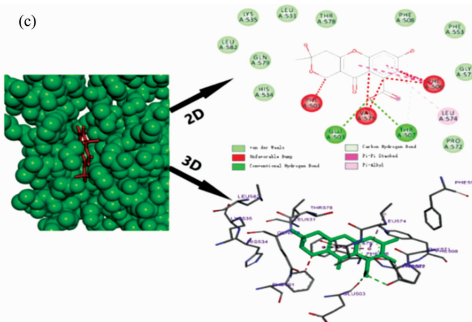
### 2.7.1 FA 与 BSA 相互作用的紫外-可见吸收光谱

用紫外光谱可以探索 FA 对 BSA 的结构改变, 模拟生理条件下, 分别测定 BSA 和 FA 与 BSA 体系的紫外-可见吸收光谱, 见图 4。由图 4 可知, 体系的紫外吸收峰在 280 nm 左右出现, 随 FA 浓度的不断增大, 最大吸收峰红移了 3 nm, 分析认为由于 FA 与 BSA 碱基对发生了电子堆积, FA 的空轨道与碱基的电子轨道发生耦合, 发生了跃迁, 吸收光波的能量减小<sup>[12-13]</sup>, 使 BSA 周围微环境极性增大, 疏水性减小, 亲水性增大, 证明 FA 使 BSA 的二级结构发生了改变。

辐射能量转移。

### 2.6 FA 与 BSA 分子对接模拟

分子对接技术可以更清晰地了解 BSA 分子的二级结构改变和 FA 与 BSA 相互作用体系中的作用力类型。利用分子对接模拟软件绘制出 FA 与 BSA 相互作用体系的分子对接模拟图, 如图 3 所示。图 3(a)和(b)中, BSA 立体结构呈现心型且 FA 分子位于 BSA 的活性中心, FA 与 BSA 结合位点靠近 BSA 亚结构域 III B(Subdomain III B)site II 点。为进一步观察 FA 与 BSA 相互作用的微环境, 列出 FA 结合位点附近对结合作用影响较为明显的氨基酸残基, 见图 3(c)。图 3(c)中, FA 与 BSA 的氨基酸残基之间存在范德华力(Van der waals)的有: HIS534, GLN579, LEU582, LYS535, LEU531, THR578, PHE508, PHE553, GLY571 和 PRO572。FA 与 GLU503 和 THR507 氨基酸残基之间为氢键作用力(Conventional Hydrogen Bond), FA 与 GLU503 氢键键长为 5.45 Å, FA 与 THR507 氢键键长为 3.19 Å。FA 与 BSA 中 PHE501, VAL575 和 PHE506 氨基酸残基之间存在不利于碰撞作用力(Unfavorable Bump), FA 与 PHE501 键长为 4.69 Å, FA 与 VAL575 不利于碰撞键长为 3.64 Å, FA 与 PHE506 键长为 5.34 Å。FA 与 BSA 中 PHE506 和 LEU574 残基存在疏水作用力(以 Pi-alkyl 与 Pi-Pi Stacked 形式存在), FA 与 PHE506 键长为 4.60 Å, FA 与 LEU574 疏水作用力键长为 6.26 Å。上述结果证明了 FA 与 BSA 相互作用使二者可稳定结合, 表明了 BSA 二级结构微环境的变化。



### 2.7.2 FA 与 BSA 相互作用的同步荧光光谱分析

同步荧光光谱可以明确反映出蛋白质氨基酸残基周围微环境的变化, 对体系进行了同步荧光光谱测定, 见图 5。由图 5 可知, 在 BSA 的浓度保持不变的情况下, 随着 FA 浓度梯度的升高, 图 5(a)中  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$  下对应表征的酪氨酸(Tyr)残基同步荧光光谱的最大发射波长基本维持不变, 峰型无明显变化, 荧光强度猝灭程度较弱; 而图 5(b)中  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$  下对应表征的色氨酸(Trp)残基同步荧光光谱的最大发射波长红移了 3 nm, 且荧光猝灭程度较强, 这说明 FA 使 BSA 中的色氨酸(Trp)残基周围的微环境极性增强, 疏水性

减弱, 亲水性增强, 使得 BSA 的构象发生了一定程度的改变, 证明 FA 作用在 BSA 的色氨酸(Trp)残基上, 使 BSA 的二级结构发生改变。

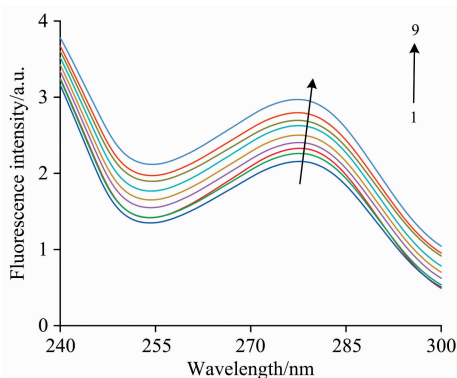


图 4 FA-BSA 作用体系的紫外吸收光谱图

$c(\text{BSA}) = 5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{FA})$  (1—9): (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8)  $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$

Fig. 4 UV-Visible absorption spectroscopy of FA-BSA interaction system

$c(\text{BSA}) = 5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{FA})$  (1—9): (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8)  $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$

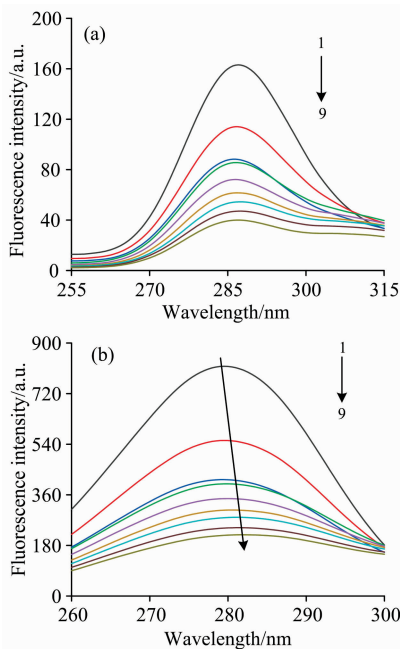


图 5 FA-BSA 作用体系的同步荧光光谱图

$c(\text{BSA}) = 5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{FA})$  (1—9): (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8)  $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$ ; (a):  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ , (b):  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

Fig. 5 Synchronous fluorescence spectrogram of FA-BSA interaction system

$c(\text{BSA}) = 5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $c(\text{FA})$  (1—9): (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8)  $\times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$ ; (a):  $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$ , (b):  $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$

### 2.7.3 FA 与 BSA 相互作用的三维荧光光谱分析

为进一步研究 FA 与 BSA 的结合对 BSA 产生结构及在

微环境的影响, 对体系进行三维荧光光谱测定, 见图 6、图 7。由图 6、图 7 可知, 峰 1 (peak 1) 与峰 2 (peak 2) 的荧光强度都发生了较大程度的降低, 且两峰都在最大发射波长处出现了红移现象, 峰 1 (peak 1) 最大发射波长峰红移了 1 nm, 峰 2 (peak 2) 最大发射波长峰红移了 4 nm, 证明 FA 与 BSA 发生了相互作用, FA 使 BSA 周围环境的极性增大, 疏水性减弱, 亲水性增强, 使 BSA 的蛋白质构象发生变化。图 6(a, b)、图 7(a, b) 中, 呈现“山脊”形状的峰 a (peak a)、峰 b (peak b) 称为瑞利散射峰 ( $\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ ); 呈现“驼峰”形状的峰 1、峰 2 为典型的荧光峰 ( $2\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$ ), 其中峰 1 表征酪氨酸 (Tyr) 和色氨酸 (Trp) 残基, 峰 2 涉及多肽骨架结构, 表征 BSA 的二级结构<sup>[14-15]</sup>。当 BSA 溶液未加入 FA 时, 两峰的特征参数 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ , F) 分别为 peak 1 (280/343, 271.8), peak 2 (225/340, 664.3), 峰 1 与峰 2 的荧光强度比为 1 : 2.44; 当加入 FA 溶液后, FA 与 BSA 相互作用体系的两荧光峰特征参数 ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ , F) 为 peak 1 (280/344, 220.5), peak 2 (225/344, 503.9), 峰 1 与峰 2 的荧光强度比为 1 : 2.28。从峰 1 和峰 2 的荧光强度进行分析, 加入 FA 溶液后, BSA 的瑞利散射峰 peak a 和 peak b 和荧光峰的强度都发生明显下降, 表明 BSA 与 FA 发生相互作用后, BSA 的分子表面被破坏, 蛋白质分子更加分散, 即发生解聚作用, 进而使蛋白质粒径减小, 荧光强度减弱, 进一步证明 FA 使 BSA 的二级结构发生了改变。

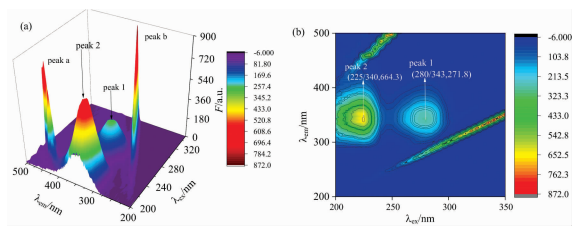


图 6 BSA 溶液的三维荧光光谱图 (a) 和等高线图 (b)

$c(\text{BSA}) = 2.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$

Fig. 6 Three-dimensional fluorescence spectrum and contour map of BSA

$c(\text{BSA}) = 2.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$

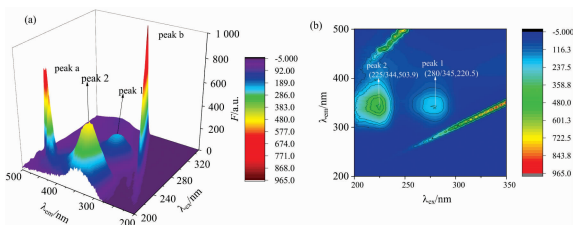


图 7 FA-BSA 溶液的三维荧光光谱图 (a) 和等高线图 (b)

$c(\text{BSA}) = 2.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

$c(\text{FA}) = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$

Fig. 7 Three-dimensional fluorescence spectrum and contour map of FA-BSA

$c(\text{BSA}) = 2.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

$c(\text{FA}) = 3.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 7.40;  $T = 298 \text{ K}$

### 2.7.4 FA 与 BSA 相互作用的圆二色光谱分析

为进一步研究 FA 对 BSA 构象的影响, 扫描并记录 BSA

与 FA 浓度比 1 : 0 和 1 : 4 体系的圆二色谱图, 见图 8。从图 8 可得 BSA 在 208 nm 处和 224 nm 处出现两个负峰, 负峰代表 BSA 中  $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -Helix)结构的特征峰。将圆二色谱值导入 CDNN setup v2.1 软件, 软件自动计算得出 BSA 与 FA-BSA 相互作用体系特征二级结构的含量值。在 BSA 与 FA 浓度比 1 : 0 和 1 : 4 体系中,  $\alpha$ -螺旋占比由 22.25% 降至 19.9%,  $\beta$ -折叠占比由 25.8% 增至 33.55%,  $\beta$ -转角占比由

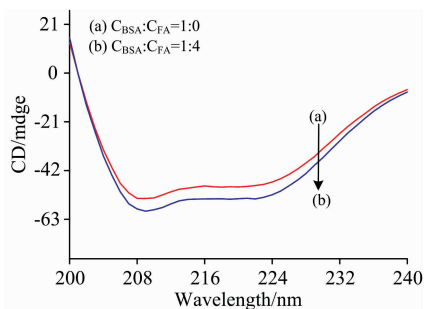


图 8 BSA 和 FA-BSA 体系的圆二色谱图

(a):  $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b):  $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{FA}} = 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T = 298 \text{ K}$ ;  $\text{pH} 7.40$

Fig. 8 The circular dichroism spectra of BSA and FA-BSA interaction system

(a):  $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; (b):  $c_{\text{BSA}} = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{FA}} = 4.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $T = 298 \text{ K}$ ;  $\text{pH} 7.40$

17.85% 增至 18.45%, 无规则结构占比由 34.8% 降至 33.6%。二级结构含量值的变化表明, FA 与 BSA 发生了相互作用, FA 改变了 BSA 周围的微环境, 使 BSA 的二级结构发生了变化。

### 3 结 论

采用荧光光谱法、紫外光谱法、圆二色谱法、三维荧光光谱法、同步荧光光谱法与分子对接模拟法研究黄腐植酸与牛血清白蛋白相互作用的反应机理。荧光光谱表明 FA 与 BSA 相互作用猝灭过程为静态猝灭。根据 Ross 理论计算热力学参数与 FA-BSA 作用力类型得出, FA 和 BSA 之间的主要作用力为氢键和范德华力, 作用过程自发放热。通过 Förster's 共振能量转移理论计算得出 BSA 与 FA 结合距离为 6.340 nm, 表明 FA 与 BSA 之间发生非辐射能量转移。分子对接模拟结果表明 FA 与 BSA 之间结合作用力除了氢键、疏水作用力和范德华力, 两者之间还存在不利于碰撞的作用力。紫外一可见吸收光谱, 同步荧光光谱, 三维荧光光谱和圆二色谱都表明 FA 使 BSA 二级结构发生改变, FA 使 BSA 中的色氨酸(Trp)残基周围的微环境极性增强, 减弱其疏水性, 增强其亲水性。这些结果阐明了在分子水平上黄腐植酸对于血清白蛋白的作用机理, 对未来深入研究黄腐植酸在体内的作用和黄腐植酸在医药用途上的研究和开发, 具有重要的参考价值与实际意义。

### References

- [1] WANG Xiao-xia, NIE Zhi-hua, MA Li-tong, et al(王晓霞, 聂智华, 马力通, 等). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2019, 40(9): 1840.
- [2] Winkler J, Ghosh S. J. Diabetes. Res., 2018, 5: 303.
- [3] Jayasooriya R G P T, Dilshara M G, Kang C H, et al. Int. Immunopharmacol., 2016, 36: 241.
- [4] Shalaeva Y V, Morozova J E, Shumatbaeva A M, et al. J. Mol. Liq., 2019, 286: 1.
- [5] Rezaeinab M, Benvidi A, Gharaghani S, et al. J. Electroanal. Chem., 2019, 845: 48.
- [6] Fernandez-Sainz J, Pacheco-Linan P J, Granadino-Roldan J M, et al. J. Photochem. Photobiol. B, 2017, 172: 77.
- [7] WANG Xiao-xia, YU Yang-yang, MA Li-tong, et al(王晓霞, 于洋洋, 马力通, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2020, 40(8): 2518.
- [8] Mohseni-Shahri F S, Moeinpour F, Nosrati M. Int. J. Biol. Macromol., 2018, 115: 273.
- [9] Gan N, Sun Q M, Tang P X, et al. Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc., 2019, (206): 126.
- [10] AN Peng-jiao, YU Nan-nan, SUN Rui-sheng(安鹏皎, 于楠楠, 孙睿声). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报), 2017, 38(8): 1354.
- [11] Toprak M, Arik M. Lumin., 2015, 29(7): 805.
- [12] Xu X Y, Du Z Y, Wu W H, et al. Anal. Bioanal. Chem., 2017, 409: 5327.
- [13] Li X G, Ni T J, Li P H. J. Biol. Phys., 2016, 42(3): 415.
- [14] Manjanath P, Amar D, Sharanappa N, et al. J. Mol. Recognit., 2017, 30: 2567.
- [15] Mallika P, Deepti S, Navneet S, et al. J. Mol. Struct., 2018, 1166: 183.

# Study on the Interaction Between Fulvic Acid and Bovine Serum Albumin by Multispectral and Molecular Docking

WANG Xiao-xia<sup>1,3\*</sup>, WU Hao<sup>1</sup>, NIE Zhi-hua<sup>2</sup>, MA Li-tong<sup>1,3\*</sup>, CUI Jin-long<sup>1</sup>, SAI Hua-zheng<sup>1</sup>, CHENG Jian-guo<sup>1</sup>

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

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

3. Inner Mongolia Engineering Research Center of Comprehensive Utilization of Bio-coal Chemical Industry, Baotou 014010, China

**Abstract** In this paper, the interaction between fulvic acid (FA) and bovine serum albumin (BSA) was studied by fluorescence spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, circular dichroism, synchronous fluorescence spectroscopy, three-dimensional fluorescence spectroscopy and molecular docking simulation in the simulated physiological environment. In the fluorescence spectroscopy study, the dynamic fluorescence quenching rate constant  $K_q$  and quenching constant at 298, 303 and 308 K are calculated by the Stern-Volmer equation, which proves that the quenching process of the interaction between BSA and FA is static quenching. At the same time, according to the calculated binding sites  $n$ , the interaction ratio between FA and BSA is 1 : 1. The thermodynamic parameters at three temperatures are calculated by static quenching double logarithm equation, enthalpy change  $\Delta H < 0$ , entropy change  $\Delta S < 0$ , it is concluded that the main interaction force between FA and BSA is hydrogen bond and van der Waals force,  $\Delta G < 0$ , indicating that the interaction process is spontaneous. Based on Förster's dipole-dipole non-radiative energy transfer theory, the binding distance rang 6.340 nm is calculated, indicating a non-radiative energy transfer between BSA and FA. The molecular docking simulation results show that the binding force between FA and BSA residues is hydrogen bond and van der Waals force, and there is a hydrophobic force between them. The interaction of multiple forces makes FA and BSA combine stably. Through the UV-Vis absorption spectrum analysis of the interaction between FA and BSA, it is found that the maximum absorption peak of BSA has an obvious red-shift, indicating that FA changes the secondary structure of BSA. By studying the synchronous fluorescence spectrum of the interaction between FA and BSA, it was found that FA enhanced the polarity of the microenvironment around the tryptophan (Trp) residue in BSA, weakened its hydrophobicity and enhanced its hydrophilicity, which changed the protein conformation of BSA to a certain extent. Through the study of the three-dimensional fluorescence spectrum of the interaction between FA and BSA, the maximum emission wavelengths of peak 1 (peak 1) and peak 2 (peak 2) were red-shifted, which proved that FA interacted with BSA. FA increased the polarity of the environment around BSA, decreased its hydrophobicity, increased its hydrophilicity, and changed the protein conformation of BSA. Finally, circular dichroism was used for analysis, and the software was used to calculate that under the experimental interaction system,  $\alpha$ -helix ( $\alpha$ -Helix) decreased by 2.3%,  $\beta$ -sheet increased by 7.7%,  $\beta$ -Turn increased by 0.6%, and irregular structure (Random coil) content decreased by 1.2%. The content of  $\beta$ -sheet increased most obviously, which strongly indicated that FA changed the structure of BSA.

**Keywords** Bovine serum albumin; Fulvic acid; Multi-Spectroscopy; Molecular docking

(Received Nov. 17, 2020; accepted Mar. 4, 2021)

\* Corresponding authors