基于光谱法研究异细交链孢菌酮酸半抗原-抗体的相互作用

王雅丽，王锋，王弘，杨金易，徐振林，沈玉栋，肖治理，雷红涛，孙远明
（华南农业大学食品学院，广东省食品质量与安全重点实验室，广东广州 510642）

摘要：本文采用紫外可见光谱(UV-Vis)、荧光光谱和圆二色谱（CD）技术研究了异细交链孢菌酮酸单克隆抗体(McAb)与其半抗原(IteAH)之间的相互作用并用 ELISA 方法对荧光结果进行了验证。结果表明，ITeAH 对 McAb 有荧光猝灭作用，淬灭机理主要为静态猝灭且遵循非辐射能量转移理论。在 298、310、318 K 3 个温度下，ITeAH 与 McAb 的结合常数分别为 1.9×10^6、1.6×10^6、1.4×10^6 L/moL，结合位点数 n≈1，结合距离 r 为 3.35 nm，经 ELISA 测得的结合常数与荧光分析的结果较一致。由结合作用过程的热力学参数可知，两者之间以静电引力为主要作用力，不同 pH 下，由 ELISA 结果可推测其影响了 ITeAH 与抗体结合。同步荧光光谱显示 ITeAH 的加入并未使抗体的酪氨酸和色氨酸残基附近的微环境发生明显改变，两者的结合位点更倾向于酪氨酸残基，圆二色谱分析发现 ITeAH 与 McAb 相互作用后，抗体的二级结构发生明显变化。

关键词：异细交链孢菌酮酸；单克隆抗体；紫外可见光谱；荧光光谱；圆二色谱

文章篇号：1673-9078(2015)5-25-30 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.5.005

Spectroscopic Studies of Interaction between Hapten and Monoclonal Antibody (McAb) against Iso-tenuazonic Acid

WANG Ya-li, WANG Feng, WANG Hong, YANG Jin-yi, XU Zhen-lin, SHEN Yu-dong, XIAO Zhi-li, LEI Hong-tao, SUN Yuan-ming

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, Food College of South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The interaction between iso-tenuazonic acid (ITeAH) hapten and monoclonal antibody (McAb) against ITeAH was studied by ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy, fluorescence spectroscopy, and circular dichroism (CD). Fluorescence results were verified using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results suggested that fluorescence intensity of McAb was quenched by ITeAH, while the quenching mechanism was based on static quenching and nonradioactive energy-transfer theory. The binding constants (Ka) at 298, 310, and 318 K were calculated as 1.9×10^6, 1.6×10^6, and 1.4×10^6 L/moL, respectively, consistent with the values determined by ELISA. The binding point (n) number was about 1, while the average binding distance (r) was 3.35 nm. Furthermore, thermodynamic parameters evaluated during the binding process showed that the binding force between ITeAH and McAb constituted of mainly electrostatic attraction, which affected the extent of binding between ITeAH and McAb, when studied under different pH conditions by using ELISA. The synchronous fluorescence spectra indicated that the addition of ITeAH did not change the microenvironment of tyrosine and tryptophan residues in the McAb, and that the binding site for ITeAH was more inclined to tyrosine residues. CD analysis showed significant changes in the secondary structure of McAb after interaction with ITeAH.

Key words: iso-tenuazonic acid; monoclonal antibody; ultraviolet absorption spectroscopy; fluorescence spectroscopy; circular dichroism

收稿日期：2014-08-21

基金项目：国家自然科学基金(30871755；31271866)；国家科技支撑计划(2012BAD31B0302)；广州市科技计划项目(2013J4100053；2013J2200080；2014J4100185)；广东省自然科学基金项目（S2012010010323）

作者简介：王雅丽（1987-），女，硕士研究生，主要从事食品质量与安全方向的研究

通讯作者：王弘（1973-），女，教授，博士生导师，主要从事食品安全与营养等方面研究；肖治理（1978-），女，副教授，硕士生导师，主要从事食品安全与营养等方面研究

异细交链孢菌酮酸（Iso-Tenuazonic Acid，ITeA）作为链格孢菌分泌的二级代谢产物，是一种较为常见的真菌毒素，在农作物、蔬菜、水果、婴儿食品中常被检出，对人类健康及食品安全具有潜在威胁[1~2]，需要加强对其的检测与监督。

以抗原抗体相互识别为基础的免疫快速检测方法是近年来食品安全检测研究领域的热点。有关真菌毒素如黄曲霉毒素、赭曲霉毒素等的免疫检测研究也多见报道[3~4]。免疫检测中抗原抗体的结合受到各种因素的干扰，越来越多的研究表明抗体与抗原间的相互作用对于免疫分析方法的改进具有重要价值。Hinterdorfer 等人[5]研究白蛋白抗体与抗原的相互作用，据此对蛋白质的固定方法进行改进，不仅使抗原与抗体的空间自由度增大，并且能良好的区分两者特异性和非特异性作用。雷红涛等人[6]利用荧光光谱法研究了碱性橙分别与抗体和 BSA 相互作用的差异，从光谱学角度证明抗体的特异性识别，进而建立了污染物免疫分析方法[7]。

我们前期制备出抗异细交链孢菌酮酸衍生物 IteAH（图 1）的单克隆抗体，并建立了基于衍生物检测 ITeA 的免疫学方法。在本文中，我们以异细交链孢菌酮酸单克隆抗体为材料，利用紫外可见光谱、荧光猝灭光谱研究了其与半抗原相互作用的猝灭方式及其反应的热力学参数，初步分析半抗原物质与抗体作用力类型，计算半抗原与抗体的结合常数、结合位点数以及结合距离；借助同步荧光光谱、圆二色谱研究了抗体与半抗原作用后的二级结构变化，为进一步优化反应体系，使抗体保持最好的结合能力，建立特异性、重复性、可靠性都较好 ITeA 免疫分析方法提供理论基础。

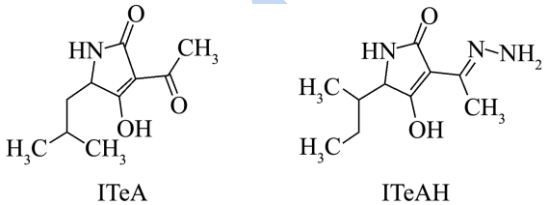


图 1 ITeA 及其衍生物 ITeAH

Fig.1 Structures of ITeA and its derivative, ITeAH

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂

异细交链孢菌酮酸半抗原，ITeAH，本实验室合成；异细交链孢菌酮酸单克隆抗体，本实验室自制；三羟甲基氨基甲烷，Tris，广州威佳科技有限公司；HCl，北京飞美斯分析科技有限公司；NaCl，广州精科化玻仪器公司。

1.1.2 仪器设备

U-3010 紫外可见分光光度计，日本 Hiachi 公司；荧光稳态近红外光谱仪，QM-4CW，美国 FTI 公司；圆二色谱仪，chriascan，美国 Applied Photophysics Ltd

1.2 实验方法

1.2.1 紫外扫描光谱

用 pH 7.40 Tris-HCl 缓冲液分别配制浓度为 4.20×10^{-3} mol/L 药物浓缩液和 2.25×10^{-6} mol/L 抗体稀释液，取 1 mL 抗体溶液加入到石英比色皿中，用微量滴定法每次滴入 1 μL 的药物浓缩液，使体系中的药物浓度以 4.20×10^{-6} 递增，选择吸光值（Abs）模式，以 120 nm/min 的速度扫描 200~500 nm 范围内的紫外吸收图谱，取样间隔 1 nm，狭缝宽度 2 nm，PMT 自动电压，光程 10 mm。滴加 7 次，将每个浓度的图谱与 0 药物浓度的图谱作差即可得到相应的紫外差谱。

1.2.2 荧光猝灭光谱

用 pH 7.40 Tris-HCl 缓冲液配制浓度为 1.0×10^{-7} mol/L 的抗体溶液，取 1 mL 抗体溶液加入到石英比色皿中，每次以微量滴加用 Tris-HCl 缓冲液定容的 1.05×10^{-5} mol/L 的药物浓缩液 1 μL，使比色皿中的药物浓度以 1.0×10^{-8} 依次递增。选择激发波长 280 nm，扫描记录 300~500 nm 波长范围内的发射光谱，激发和发射狭缝均为 5 nm，发射滤光片为 320 nm，扫描速度为 50 nm/min，在 298、310、318 K 不同温度下分别微量滴加 9 次进行荧光测定获得相应的荧光猝灭光谱图。实验过程中用电子循环水浴控制样品温度。

1.2.3 同步荧光光谱

用 pH 7.40 Tris-HCl 缓冲液配制浓度为 2.0×10^{-6} mol/L 的抗体溶液，取 1 mL 抗体溶液加入到石英比色皿中，每次以微量滴加用 Tris-HCl 缓冲液定容的 1.05×10^{-3} mol/L 的药物浓缩液 1 μL，使比色皿中的药物浓度以 1.05×10^{-6} 依次递增。变化波长为 15 nm 和 60 nm，激发和发射狭缝均为 5 nm，在 298 K 的温度下以 50 nm/min 的速度扫描 260~400 nm 的荧光发射光谱。实验过程中用电子循环水浴控制样品温度，微量滴加 7 次进行荧光测定。

1.2.4 圆二色谱

将抗体用用 pH 7.40 Tris-HCl 缓冲液配制浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 的稀释液，抗体和药物以 1:3、1:9、1:18、1:27 的物质的量之比在室温下（298 K）加入 0.1cm 的石英比色皿中，用 Chriascan 圆二色谱仪（150 W Xe）以 1 nm 的步长扫描（0.5 nm 的分辨率），记录 200~250

nm 波段范围内抗体加药前后的 CD 谱图。

2 结果与讨论

2.1 抗体与半抗原的相互作用的紫外光谱

紫外光谱法通常用来分析小分子与蛋白质是否发生相互作用[8]。由图 2 可以看出，加入 ITeAH 药物后，混合物的吸收峰形相比混合前 ITeAH 和抗体的吸收峰形，两者的特征峰位均发生变化，随着药物浓度的增大，抗体与药物结合的比例增大，峰位红移，混合物吸收峰的强度有规律的增大，表明药物与抗体相互作用过程中可能形成紧密结合的复合物，使得紫外吸收强度增强。

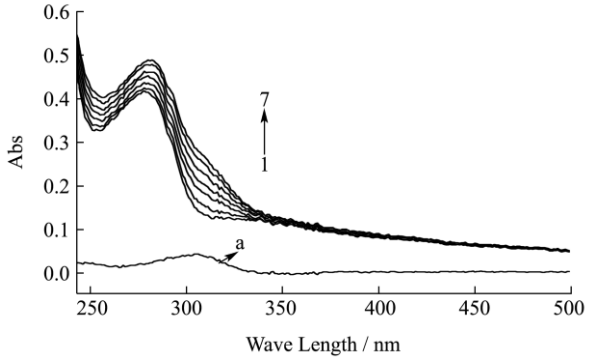


图 2 不同浓度的 ITeAH 与抗体结合后的紫外差谱图

Fig.2 Differential ultraviolet spectra of McAb in the presence of different concentrations of ITeAH

Note: a: absorption spectrum of ITeAH c(ITeAH) = 4.20 × 10^{-6} mol/L, 1 to 7: absorption spectrum of McAb-ITeAH mixture, c(McAb) = 2.25 × 10^{-6} mol/L, c(ITeAH) = 0, 4.20, 8.40, 12.60, 16.80, 21.0, and 25.20 ×10^{-6} mol/L (Tris-HCl 7.40).

2.2 抗体与抗原相互作用机理

分别扫描 298、310、318 K 下 McAb 与 ITeAH 相互作用的荧光光谱图获得相关的荧光猝灭数据，按照 Stern-Volmer 方程[9]作 Stern-Volmer 曲线（图 3）求得 K_{sv}、K_q (表 1)：

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

注: F_0 和 F 分别表示生物大分子加入淬灭剂前后的荧光强度; K_{sv} 是 Stern-Volmer 猝灭常数; [Q]为猝灭剂 ITeAH 的浓度; K_q 为双分子猝灭速率常数，τ_0 为无猝灭剂时荧光分子的平均寿命，一般生物大分子的荧光寿命 τ_0 大约为 10^{-8} s[10]。

随着温度的升高，直线的斜率逐渐降低，即猝灭常数随着温度的升高而减小，且不同温度下的双分子猝灭速率常数 K_q，均远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大猝灭常数 2.0×10^{10} L/(mol s)[11]（表 1），表明半抗原 ITeAH 与抗体的相互作用形成了不产生荧光的配合物，且随着温度的升高，配合物稳定性下降，符合静态淬灭的特征[12]。

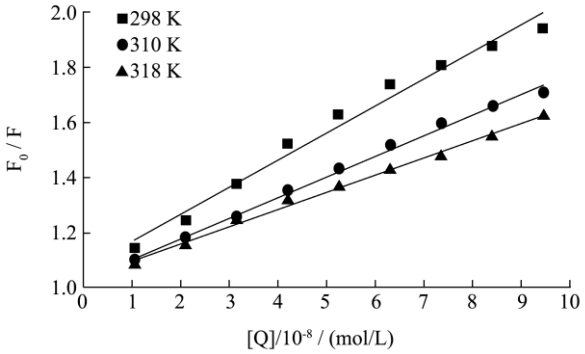


图 3 不同温度下的 ITeAH-McAb 体系的 Stern-Volmer 曲线

Fig.3 Stern-Volmer plots of the ITeAH- McAb system at different temperatures

表 1 不同温度下 ITeAH 与 McAb 相互作用的 Stern-Volmer 猝灭常数

Table 1 Quenching constants and bimolecular quenching constants for the interactions between ITeAH and McAb at different temperatures

T/K	K_{sv}/(L/moL)	K_q/[L/(moL S)]	R^2	RSD[b]
298	9792000	9.79×10^{14}	0.97	0.05
310	7468000	7.47×10^{14}	0.99	0.15
318	6241000	6.24×10^{14}	0.99	0.17

2.3 结合常数和结合位点数的确定

理论上讲抗体与药物的的结合价为 2，但在实际作用过程中药物与抗体之间因存在空间位阻其实际结合价会小于理论值。以 lg[(F_0-F)/F]对 lg[Q]作图，结合截距和斜率计算出结合常数(K_a)和结合位点数(n)[13]。表 2 中结果显示，不同温度下 ITeAH 与抗体结合位点数 n≈1，表明两者之间只形成了一个结合位点。同时，我们也发现升高温度使 ITeAH 与 McAb 的结合常数减小，其亲和力降低，引起抗原-抗体复合物稳定性的下降。由此可知，在建立免疫分析方法时，在一定范围内温度的升高将不利于 ITeAH 与抗体的相互作用。此外，同时采用 ELISA 方法（图 4）测得的结合常数为 1.2×10^6 L/moL，这与荧光分析所获得的结果比较一致。

表 2 不同温度下 ITeAH 与 McAb 相互作用的结合参数

Table 2 Binding parameters of the interaction between ITeAH and McAb at different temperatures

T/K	K_a/(L/moL)	n	R^2	RSD[b]
298	1908271	0.89	0.99	0.02
310	1592135	0.90	0.99	0.01
318	1403298	0.91	0.99	0.01

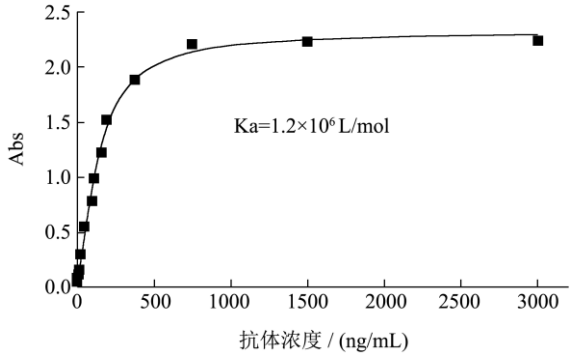


图 4 ELISA 法测定抗体的结合常数

Fig.4 Determination of Ka for ITeAH- McAb by ELISA

2.4 抗原-抗体结合反应的热力学性质及作用力

表 3 不同温度下 ITeAH 与 McAb 相互作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between ITeAH and McAb at different temperatures

T/K	ΔH /(kJ/mol)	ΔG /(kJ/mol)	ΔS /[J/(moL·K)]	R^2
298		-35.83		
310	-12.06	-36.79	79.78	0.99
318		-37.43		

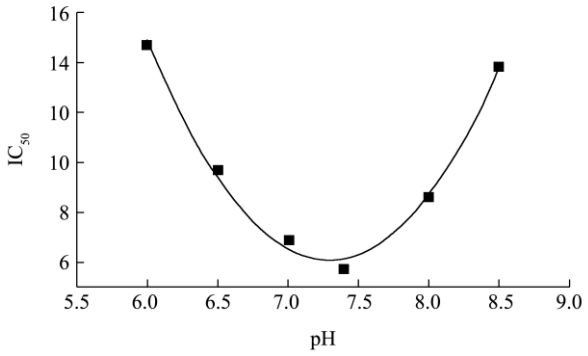


图 5 ELISA 分析中不同 pH 对 ITeAH-McAb 结合的影响

Fig.5 Influence of pH on ITeAH-McAb binding by ELISA

蛋白质与药物小分子相互作用过程中，常常存在静电引力、氢键、范德华力以及疏水作用力等[14~15]。利用 Van’t Hoff 方程[16]计算出反应的焓变(ΔH)、熵变(ΔS)和吉布斯自由能变(ΔG)。由表 3 中数据可知，ITeAH 与 McAb 相互作用过程中，ΔG<0，说明该抗原与抗体间的反应能自发进行，且为ΔH<0 的放热反应，温度升高则抑制反应正向进行，与亲和力常数随着温度的升高而降低相一致，因ΔS>0，根据热力学参数与作用力类型关系[17]可判定抗原与抗体的结合过程中主要以静电作用力为主。我们采用 ELISA 方法研究了不同 pH 对 ITeAH 与抗体结合的影响，IC_{50} 越高，抗原与抗体的结合越弱，如图 5 所示，偏低或偏高的 pH 下，抗原和抗体的特异性结合均受到影响，由此可推测静电作用在抗原和抗体的结合中起到了一定的作用。

2.5 抗原-抗体的作用距离

同一浓度的 ITeAH 的紫外吸收光谱和对应抗体的荧光光谱重叠部分如图 6 所示，采用矩形分割法[6]求出两光谱区域的积分值 $J=6.71\times10^{-14}$ cm^3·L/moL，算出 R_0=3.50 nm，根据实验结果，求得 E=0.48，进而求出 r=3.55 nm。由结果可以看出，半抗原 ITeAH 与抗体之间的作用距离 r<7 nm，$0.5R_0<r<1.5R_0$ 因此两者相互作用遵循 Föster[18]提出的非辐射能量转移理论。

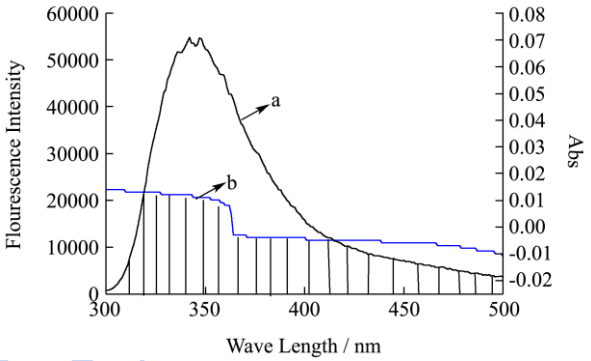


图 6 抗体荧光发射光谱与药物 ITeAH 紫外吸收光谱的重叠图

Fig.6 Overlapping plot of the fluorescence emission spectrum of McAb

Note: (a) (λex = 280 nm) and ultraviolet absorption spectrum of ITeAH (b), c(McAb) = 1 × 10^{-7} mol/L, c(ITeAH) = 1 × 10^{-7} mol/L, T = 310 K (Tris-HCl 7.40).

2.6 同步荧光光谱考察抗体构象变化

基于Δλ=15 和 60 nm 的同步荧光光谱如图 7 所示，随着半抗原 ITeAH 浓度的增大，当Δλ=15 nm 时，处于 318 nm 的酪氨酸的残基的最大发射峰并没有发生改变；当Δλ=60 nm 时，色氨酸残基的最大发射波长处于 348 nm 处基本未发生变化，这表明两者反应后，抗体酪氨酸和色氨酸残基附近的微环境未发生明显改变。但是随着 ITeAH 的浓度增大，酪氨酸和色氨酸残基的荧光强度均有所减弱，且酪氨酸残基的荧光猝灭程度比色氨酸残基更显著，说明抗原 ITeAH 与抗体的相互作用的结合位点更倾向酪氨酸残基。

2.7 圆二色谱法表征抗体二级结构的变化

在室温下测定 ITeAH 与 McAb 在不同比例下结合反应的 CD 谱图（图 8）。研究发现，在 222 和 208 nm 处表现出两个负的 Cotton 效应，同时在 216 nm 处有一

最大的负吸收谱带，这表明抗体的二级结构中存在 α-螺旋和 β-折叠特征[19~20]。

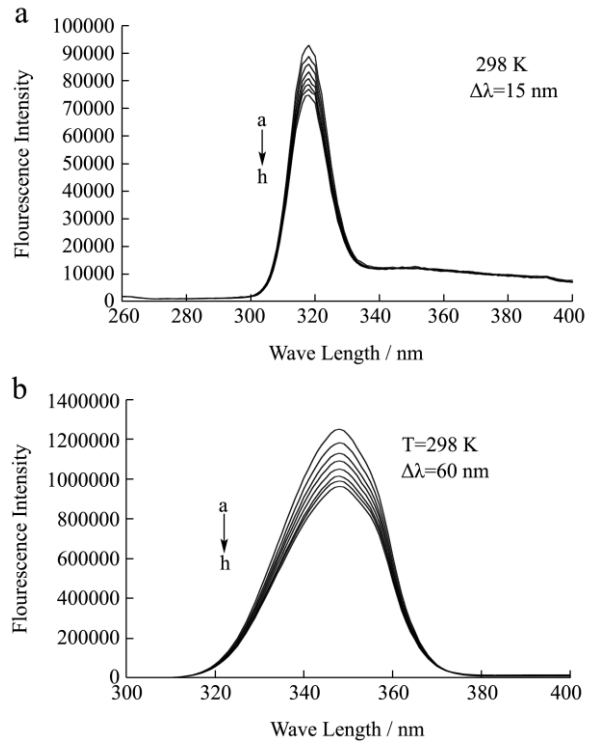


图 7 ITeAH 与 McAb 相互作用后的同步荧光光谱

Fig.7 Synchronous fluorescence spectra after the interaction between ITeAH and McAb

Note: (a) at Δ λ = 15 nm; (b) at Δ λ = 60 nm; c(McAb) = 2 × 10^{-6} mol/L, from a to h c(ITeAH) = 0, 1.05, 2.10, 3.15, 4.20, 5.25, 6.30, 7.35 ×10^{-6} mol/L (Tris-HCl 7.40).

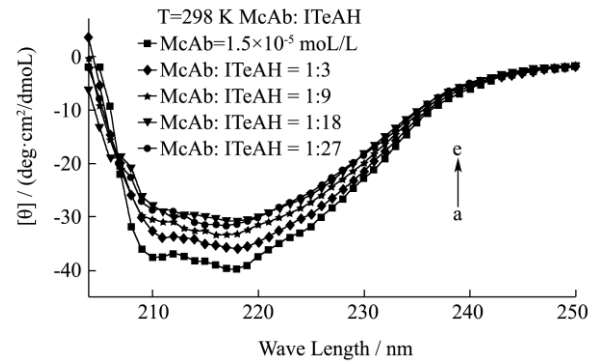


图 8 McAb 与 ITeAH 作用的圆二色谱图

Fig.8 CD spectra of the interaction between McAb and ITeAH

Note: c (McAb) = 1.5 × 10^{-5} mol/L from a to e [McAb]: [ITeAH] = 1:0, 1:3, 1:9, 1:18, 1:27 (T = 298 K, Tris-HCl 7.40).

ITeAH 与 McAb 作用后，当抗体与抗原的摩尔比例为 1:27 时，两者的结合达到饱和，各二级结构百分比不在变化（表 4），这解释了在建立 ELISA 方法中通常需要优化抗体与抗原稀释倍数以提高方法的灵敏度。此外，α-螺旋含量由 14.8%降到 13.9%，表明 α-螺旋结构有所伸展，可以认为是两者的静电作用力使维系其螺旋结构稳定的氢键取向发生改变，β-折叠含量由 32.9%升高到 34.4%，β-转角由 21.6%升高到 21.9%，无规则卷曲由 30.7%降到 29.8%，无规则卷曲结构的含量减小使得抗体蛋白的有序性逐渐增加，这可能是由于抗原的浓度增加，与抗体蛋白之间的空间位阻增大，使得抗体的空间构象朝着有序的趋势变化。蛋白二级结构的改变是造成内源荧光猝灭的直接原因。也有文献报道圆二色谱对二级结构的预测只反映了局域序列片段的结构倾向性，所以对于确定蛋白的二级结构只能起一定的参考作用[21]。

表 4 McAb 游离状态及与 ITeAH 结合状态的二级结构变化

Table 4 Changes in the secondary structures of free and ITeAH-bound McAb

体系	α-螺旋	β-折叠/%		β-转角	无规则
[McAb]:[ITeAH]	/%	反平行	平行	/%	卷曲/%
1:0	14.8	17.0	15.9	21.6	30.7
1:3	14.4	17.4	16.2	21.7	30.3
1:9	14.2	17.6	16.4	21.8	30
1:18	13.9	17.8	16.6	21.9	29.8
1:27	13.9	17.8	16.6	21.9	29.8

3 结论

紫外-可见光谱和荧光光谱均显示 ITeAH 和抗体发生相互作用，荧光猝灭机制主要是静态猝灭，药物与抗体的结合位点数 n≈1，结合距离 r 为 3.35 nm，两者之间的相互作用力主要是静电引力，且药物 ITeAH 能够引起抗体构像趋于有序性。本文中两者相互作用以静电作用力为主只是一个综合的结果，一些常见的作用力如氢键、范德华力、疏水作用等也可能起着作用。这些结论有助于初步了解抗原抗体相互作用的机制，从而为建立稳定性好，灵敏度高的免疫检测方法奠定基础。

参考文献

[1] Qiang S, Dong Y F, An C F, et al. Biological control of weeds using the metabolites of alternaria alternata [P]. US 2008/0280761 A1, 2008

[2] Asam S, Lichtenegger M, Muzik K, et al. Development of analytical methods for the determination of tenuazonic acid analogues in food commodities [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1289: 27-36

[3] Rahimi E, Shakerian A. Ochratoxin a in dried figs, raisings, apricots, dates on iranian retail market [J]. Health, 2013, 5(12): 2077-2080

[4] Liu B H, Hsu Y T, Lu C C, et al. Detecting aflatoxin b1 in

foods and feeds by using sensitive rapid enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip [J]. Food Control, 2013, 30(1): 184-189

[5] Hinterdorfer P, Baumgartner W, Gruber H J, et al. Detection and localization of individual antibody-antigen recognition events by atomic force microscopy [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996, 93(8): 3477-3481

[6] 雷红涛,唐秋实,黄文凯,等.碱性橙与蛋白间的特异性与非特异性作用荧光光谱比较[J].分析化学,2012,40(8):1231-1235
LEI Hong-tao, TANG Qiu-shi, HUANG Wen-kai, et al. Fluorescence spectra study on specific and non-specific interactions between chrysoidine and proteins [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(8): 1231-1235

[7] Lei H T, Liu J, Song L J, et al. Development of a highly sensitive and specific immunoassay for determining chrysoidine, a banned dye, in soybean milk film [J]. Molecules, 2011, 16: 7043-7057

[8] 李锐,代本才,赵永德,等.光谱法在分子间非共价相互作用中的应用及进展[J].光谱学与光谱分析,2009,29(1):240-243
LI Rui, DAI Bei-cai, ZHAO Yong-de, et al. Application and Development of Spectroscopy Methodologies in the Study on Non-Covalent Interactions [J]. Spectrosopy and Spectral Analysis, 2009, 29(1): 240-243

[9] Kasai S, Horie T, Mizuma T, et al. Fluorescence Energy Transfer Study of the Relationship between the Lone Tryptophan Residue and Drug Binding Sites in Human Serum Albumin[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1987, 76(5): 387-392

[10] Lakowiez J R, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. a probe for structural fluctuations in macromolecules [J]. Bioehemistry, 1973, 12: 4161-4170

[11] 王勇,李林玺,赵东保,等.5,7-二羟基-4'-甲氧基二氢黄酮与牛血清白蛋白的相互作用研究[J].化学学报,2007,64(13): 136-139
WANG Yong, LI Lin-xi, ZHAO Dong-bao, et al. Studies on the interaction between 5,7-dihydroxy-4'-methoxy-flavanone and bovine serum albumin [J]. Acta Chim. Sinica, 2006, 64(13): 1361-1366

[12] 王鹏.生物大分子和药物小分子相互作用及分子模拟研究[D].河南师范大学硕士论文,2012
WANG Peng. Research of the interaction between small molecular drugs and biological macromolecular by spectroscopic and molecular docking methods [D]. Master Dissertation, Henan Normal University, Xinxiang, 2012

[13] Jiang M, Xie M X, Zheng D, et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin [J]. Journal of Molecular Structure, 2004, 692: 71-80

[14] Barik A, Mishra B, Kunwar A. Interaction of curcumin with human serum albumin: thermodynamic properties, fluorescence energy transfer and denaturation effects [J]. Chemical Physics Letters, 2007, 436: 239-243

[15] Hu Y J, Liu Y, Zhao R M, et al. Interaction of colchicine with human serum albumin investigated by spectroscopic methods [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37: 122-126

[16] Wu X H, Liu J J, Wang Q, et al. Spectroscopic and molecular modeling evidence of clozapine binding to hhuman serum albumin at subdomain IIA [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 79: 1202-1209

[17] Ross P D, Subraman S. Thermodynamic of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. Biochemistry, 1981, 20(10): 3096-3102

[18] Förster T, Sinanoglu O. Modern quantum chemistry [M]. New York : Academic Press, 1996

[19] Hu Y J, Liu Y, Shen X S, et al. Studies on the interaction between l-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin [J]. Journal of Molecular Structure, 2005, 738: 143-147

[20] Purecell M, Neault J F, Malonga H, et al. Interactions of atrazine and 2,4-D with human serum albumin studied by gel and capillary electrophoresis, and FTIR spectroscopy [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology Acta, 2001, 1548: 129-138

[21] 宋占军,姜厚理,公衍道,等.牛胰多肽(BPP)二级结构的红外光谱和圆二色谱分析[J].生物化学杂志,1995,11(6): 717-720
SONG Zhan-jun, JING Hou-li, et al. Secondary structure of bovine pancreatic polypeptide as studied by FT-IR and CD methods [J].Chinese Biochemical Journal, 1995, 11(6): 717-720