

# 光谱法研究芳樟醇与牛血清白蛋白的相互作用

吴克刚, 周华丽, 柴向华, 魏浩, 黄洁虹, 黄素

(广东工业大学轻工化工学院食品科学与工程系, 广东广州 510006)

**摘要:** 采用荧光光谱、紫外-可见吸收光谱、傅里叶变换红外光谱和拉曼光谱法, 研究模拟生理条件下芳樟醇与牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用机制及芳樟醇对 BSA 构象的影响。实验表明, 芳樟醇可以有规律地猝灭 BSA 内源荧光, 猝灭机制主要为形成芳樟醇-BSA 复合物的静态猝灭。通过计算得出二者在不同温度下的结合常数和结合位点数。根据热力学参数判断芳樟醇与 BSA 之间的相互作用是一个吉布斯自由能降低的自发过程, 主要作用力是氢键和范德华力, 同时由 Forster's 非辐射能量转移理论求得其结合距离。紫外-可见吸收光谱、同步荧光光谱、傅里叶变换红外光谱和拉曼光谱研究表明芳樟醇与 BSA 相互作用后使 BSA 构象发生改变, 减少了 BSA 中  $\alpha$ -螺旋的含量, 增加了 BSA 中色氨酸、酪氨酸残基微环境的疏水性。

**关键词:** 芳樟醇; 牛血清蛋白; 光谱法; 相互作用

文章编号: 1673-9078(2015)12-141-148

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.021

## Multi-spectroscopic Studies of the Interaction of Linalool with Bovine Serum Albumin

WU Ke-gang, ZHOU Hua-li, CHAI Xiang-hua, WEI Hao, HUANG Jie-hong, HUANG Su

(Department of Food Science and Engineering, Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The mechanisms of the interaction between linalool and bovine serum albumin (BSA) and the effect of linalool on the BSA conformation under simulated physiological conditions were investigated by fluorescence, ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption, Fourier transform infrared (FT-IR) and Raman spectroscopies. The obtained results indicate that linalool can quench the intrinsic fluorescence of BSA regularly, and that the mechanism underlying was the static quenching via the formation of BSA-linalool complexes. The binding constants and the numbers of binding sites at different temperatures were calculated. According to the thermodynamic parameters, the interaction between linalool and BSA is a spontaneous process with a decrease in the Gibbs free energy value. The main forces in this process are hydrogen bonding and van der Waals forces. The binding distance between linalool and BSA was calculated according to the Forster's theory of non-radioactive energy transfer. Furthermore, the UV-Vis, synchronous fluorescence, FT-IR and Raman spectra demonstrated that the conformation of BSA changes after its interaction with linalool, which includes a decrease in  $\alpha$ -helical content and a more hydrophobic microenvironment of tryptophan and tyrosine residues.

**Key words:** linalool; bovine serum albumin; spectroscopy; interaction

芳樟醇, 别名沉香醇、里那醇、胡荽醇等, 分子式为  $C_{10}H_{18}O$ , 为无色液体, 属于链状含氧单萜衍生物的烯醇类物质, 是植物挥发油的主要成分, 主要分布于高等植物的分泌组织中, 如腺体、油室和树脂道等, 在我国芳樟醇含量较多的植物除了芳樟外, 还有五脉百里香、薰衣草、白兰、甜牛至、小叶苦丁茶等, 是医药、化妆品等行业的重要原料, 主要用作香料或合成中间体, 近年来研究发现, 芳樟醇具有多种生物

收稿日期: 2015-02-09

基金项目: 广东省教育部产学研结合重大项目(2012A090300010); 广州市科技计划项目(2014Y2-00107)

作者简介: 吴克刚(1969-), 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 食品化学

活性, 包括消炎抗菌<sup>[1]</sup>、镇静抗焦虑、驱避杀虫及用作高效低毒的抗白血病药物等<sup>[2]</sup>, 具有重要的研究和应用价值。各种药物进入血液循环后需要通过血浆的存储和运输, 才能到达靶细胞而发挥药理学功能, 而血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白, 它能与许多内源和外源性物质结合而在血浆中储存、运输物质, 因此, 研究药物与血清白蛋白的作用机制, 有助于从分子水平上理解药物在体内的运输和分布情况, 为设计更有效的药物提供理论指导和有价值的信息, 牛血清白蛋白(BSA)和人血清白蛋白(HSA)是同源蛋白, 两者结构具有 76% 的相似度, BSA 和 HSA 的氨基酸序列高度相似, 并且不同氨基酸之间是保守性替

代, 而 BSA 更廉价易得, 因此, 可研究药物与 BSA 的相互作用情况, 作为与 HSA 相互作用情况的参考<sup>[3]</sup>。目前, 国内外已有大量学者研究药物与 BSA 的相互作用, 周瑞等<sup>[4]</sup>运用紫外-可见光谱以及荧光光谱法研究了花青素与 BSA 的相互作用, 实验结果表明: 花青素对 BSA 的荧光猝灭类型为静态猝灭, 且它们之间的相互作用力是氢键和范德华力。然而关于芳樟醇与 BSA 相互作用的研究尚未见报道。本文运用荧光光谱法、紫外-可见吸收光谱法、傅里叶变换红外光谱法、拉曼光谱法, 详细研究了模拟生理条件下, 芳樟醇与 BSA 相互作用的光谱特征, 为最终阐明芳樟醇的抗菌、抗白血病等药理学机制提供相关分子相互作用信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

牛血清白蛋白(组分 V, 98%, 阿拉丁 Aladdin, 分子量 68000 u); 芳樟醇(Linalool, 98%, 阿拉丁 Aladdin, 分子量 154.24); 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, 国药集团化学试剂有限公司); Tris-HCl(含 0.1 mol/L NaCl)缓冲溶液: 浓度为 0.05 mol/L、pH 7.4; 其它试剂均为分析纯; 实验用水均为二次蒸馏水。

### 1.2 仪器与设备

F-7000 型荧光分光光度计(日本 Hitach 公司); PE LS 45 荧光分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司); UV 2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津公司); Nicolet 6700 研究型红外光谱仪(美国 Thermofisher 公司); LabRAM HR 800 激光紫外拉曼光谱仪(法国 HORIBA Jobin Yvon 公司); PHS-3C 型 pH 计(上海精密科学仪器有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 溶液配制

牛血清白蛋白溶液: 用 0.05 mol/L pH 7.40 的 Tris-HCl 缓冲液(含 0.10 mol/L NaCl)配成  $3.00 \times 10^{-3}$  mol/L 的储备液, 保存于 4 °C 冰箱备用, 使用时根据需以 Tris-HCl 稀释至所需浓度; 芳樟醇溶液: 用丙二醇配成  $7.50 \times 10^{-1}$  mol/L 的芳樟醇-丙二醇溶液, 使用时根据需以 Tris-HCl 稀释至所需浓度。

#### 1.3.2 紫外-可见吸收光谱测定

室温下, 以相应试剂空白为参比, 测定反应前后牛血清白蛋白和芳樟醇的紫外-可见吸收图谱, 扫描区

间: 200~320 nm, 相互作用时间: 10 min。

#### 1.3.3 荧光光谱测定

在一系列 10 mL 比色管中, 依次加入固定浓度的 BSA 溶液, 再分别加入不同浓度的芳樟醇溶液, 摇匀分别在 298、304 和 310 K 水浴箱中恒温 10 min, 在 290~450 nm 范围内扫描荧光光谱, 仪器参数如下: 激发波长为 280 nm, 激发和发射狭缝均为 10 nm, 扫描速度为 240 nm/min, 而在同步荧光光谱实验中, 激发和发射波长的差值固定为 15 nm 和 60 nm。

#### 1.3.4 傅里叶变换红外光谱和拉曼光谱测定

室温下采用美国 Thermofisher Nicolet 6700 研究型红外光谱仪测定傅里叶变换红外光谱, 测量时使用单次衰减全反射(ATR)附件配锗晶体, 分辨率为  $4 \text{ cm}^{-1}$ , 扫描范围为  $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ , 参考陈玉静的方法<sup>[5]</sup>, 利用双背景样品合成一厚度可变的背景来消除水吸收峰的干扰。拉曼光谱的测定采用 Jobin Yvon 公司的显微拉曼光谱系统, 样品置于石英比色皿中, 使用液氮冷却 CCD 检测器, 实验所用激发光源为 He-Ne 激光器提供的 785 nm 激发线, 显微镜使用 10 倍镜头, 扫描 40 S, 扫描范围为  $300 \sim 2000 \text{ cm}^{-1}$ , 累积扫描三次。分别测定 BSA、BSA-芳樟醇、Tris-HCl 和 Tris-HCl-芳樟醇溶液的红外和拉曼光谱, BSA、BSA-芳樟醇分别扣除 Tris-HCl 和 Tris-HCl-芳樟醇溶液本底, 得到 BSA 与芳樟醇反应前后的红外、拉曼光谱图, 并运用 Peakfit 软件处理分析。

#### 1.3.5 数据分析

本文运用 PeakFit v4.12、OMNIC 8.0、Origin Pro 8 等软件处理实验数据, 获得模拟生理环境下芳樟醇与 BSA 相互作用的紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、傅里叶变换红外光谱和拉曼光谱特征, 并由谱图变化来分析两者相互作用机制。

## 2 结果与分析

### 2.1 芳樟醇与牛血清白蛋白相互作用的荧光猝灭研究

#### 2.1.1 芳樟醇与牛血清白蛋白相互作用的荧光猝灭光谱

BSA 中由于色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的存在而具有内源荧光<sup>[6]</sup>。由图 1 可知, 随着芳樟醇浓度的增加, BSA 的荧光强度有规律地降低, 最大发射波长出现了明显蓝移现象, 表明芳樟醇能够与 BSA 发生相互作用而猝灭 BSA 的荧光并使其构象发生改变。

#### 2.1.2 芳樟醇与牛血清白蛋白相互作用的荧光

猝灭类型

荧光猝灭类型通常可分为动态猝灭和静态猝灭，可以依据体系对温度的变化趋势来判断动态和静态猝灭，动态猝灭常数随着温度的增大而增大，而静态猝灭常数随着温度的增大而减小。假设芳樟醇对 BSA 的荧光猝灭为动态猝灭，则该猝灭服从 Stern-Volmer 方程：

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

式中  $F_0$  和  $F$  分别代表荧光物质与猝灭剂作用前后的荧光发射峰强度， $K_q$  为动态猝灭速率常数，各类荧光猝灭剂对生物大分子的最大动态猝灭速率常数均为  $2.0 \times 10^{10}$  L/(mol s)， $\tau_0$  为猝灭剂不存在时荧光分子的平均寿命，生物大分子的荧光平均寿命为  $10^{-8}$  s。[Q] 为猝灭剂浓度， $K_{sv}$  为动态猝灭常数<sup>[7]</sup>。

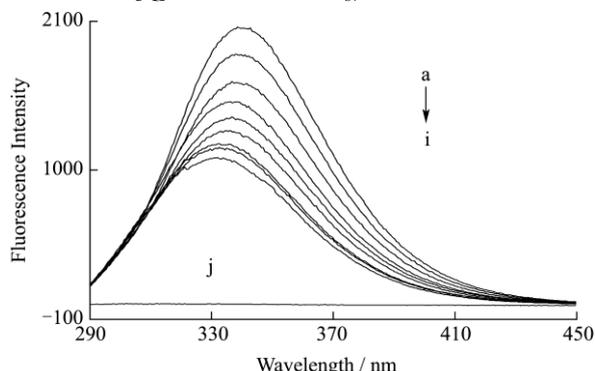


图 1 芳樟醇与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱

Fig.1 Fluorescence spectra of the interaction between linalool and BSA

Note: (a-i): BSA,  $7.50 \times 10^{-7}$  mol/L; 0.00, 0.82, 2.42, 3.95, 5.41, 6.82, 8.17, 9.47, 10.71 ( $\times 10^{-4}$  mol/L) of linalool (j):  $10.71 \times 10^{-4}$  mol/L linalool only.

以  $F_0/F$  对 [Q] 作图 2，结果显示 Stern-Volmer 曲线呈现良好的线性关系(298、304、310K 的相关系数  $R^a$  分别为 0.9934、0.9900、0.9918)，但  $K_{sv}$  随着温度升高而减小，且由表 1 得  $K_q$  值都大于最大动态猝灭常数，这表明芳樟醇对 BSA 猝灭机理为静态猝灭。

此外，使用修正的 Stern-Volmer 方程<sup>[3]</sup>进一步分析猝灭机理：

表 1 不同温度下芳樟醇与 BSA 相互作用的动态猝灭常数  $K_{sv}$ 、动态猝灭速率常数  $K_q$ 、有效猝灭常数  $K_a$ 、结合常数  $K$ 、结合位点数  $n$

Table 1 Dynamic quenching constants ( $K_{sv}$ ), dynamic quenching rate constants ( $K_q$ ), effective quenching constants ( $K_a$ ), binding constants ( $K$ ), and the number of binding sites ( $n$ ) of linalool-BSA at different temperatures

T/K	$K_{sv}/(10^2 \text{ L/mol})$	$K_q/[10^{10} \text{ L/(mol s)}]$	$R^a$	$K_q/(10^2 \text{ L/mol})$	$R^b$	$K/(10^2 \text{ L/mol})$	$n$	$R^c$
298	$7.89 \pm 0.02$	$7.89 \pm 0.02$	0.9934	$23.43 \pm 0.03$	0.9933	$12.27 \pm 0.02$	$0.82 \pm 0.04$	0.9983
304	$6.13 \pm 0.04$	$6.13 \pm 0.04$	0.9900	$11.78 \pm 0.06$	0.9963	$8.05 \pm 0.01$	$0.89 \pm 0.03$	0.9901
310	$5.69 \pm 0.06$	$5.69 \pm 0.06$	0.9918	$5.14 \pm 0.08$	0.9965	$5.29 \pm 0.07$	$1.01 \pm 0.06$	0.9916

Note:  $R^a$  is the correlation coefficient for the  $K_{sv}$  values;  $R^b$  is the correlation coefficient for the  $K_a$  values;  $R^c$  is the correlation coefficient for the  $K$  values.

2.1.3 芳樟醇与牛血清白蛋白相互作用的结合常数与结合位点数

$$F_0/\Delta F = F_0/(F_0 - F) = 1/f_a K_a [Q] + 1/f_a \quad (2)$$

其中， $F_0$  和  $F$  分别是荧光物质与猝灭剂作用前后的荧光发射峰强度， $\Delta F$  是  $F_0$  和  $F$  的荧光强度差， $K_a$  是荧光基团的有效猝灭常数，[Q] 是猝灭剂浓度， $f_a$  是荧光分数。

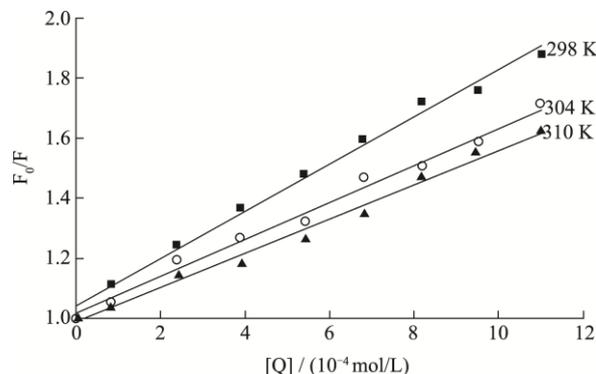


图 2 不同温度下芳樟醇与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 图

Fig.2 Stern-Volmer plots of BSA interaction with linalool at different temperatures

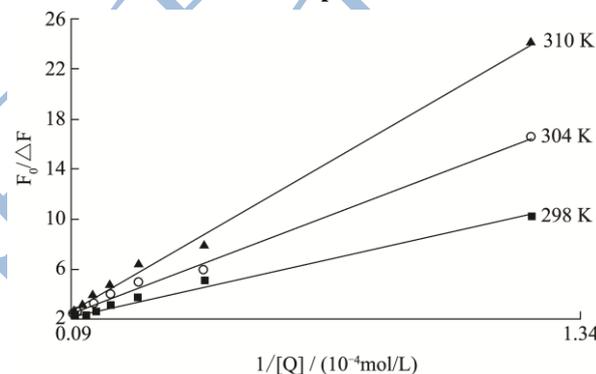


图 3 不同温度下芳樟醇与 BSA 相互作用的修正 Stern-Volmer 图

Fig.3 Modified Stern-Volmer plots of BSA interaction with linalool at different temperatures

以  $F_0/\Delta F$  对  $1/[Q]$  作图，得到的曲线线性相关性良好（相关系数  $R^b$  分别为 0.9933、0.9963、0.9965），相关参数如表 1 所示。随着温度的升高， $K_a$  有下降趋势，这与  $K_{sv}$  对温度的依赖性相符，进一步表明芳樟醇对 BSA 荧光猝灭是静态猝灭。

对于静态猝灭而言, 设生物大分子有  $n$  个相同且独立的结合位置, 则可应用下面的公式获得结合常数  $K$  和结合位点数  $n$ <sup>[8]</sup>:

$$\lg[(F_0-F)/F]=\lg K+n\lg [Q] \quad (3)$$

式中,  $F_0$  和  $F$  分别是荧光物质与猝灭剂作用前后的荧光发射峰强度,  $K$  为结合常数(L/mol),  $n$  为结合位点数,  $[Q]$  为芳樟醇的浓度/(mol/L)。

按上述公式分别作不同温度下  $\lg[(F_0-F)/F]$  对  $\lg [Q]$  的双对数拟合曲线, 如图 4 所示, 根据方程的截距、斜率求得相应的  $K$  和  $n$ , 列于表 1, 所得数据显示, 结合位点数  $n$  大约为 1, 表明每个 BSA 分子能够结合一个芳樟醇分子, 随着温度的增加, 结合常数  $K$  减小, 进一步验证了芳樟醇对 BSA 的静态猝灭。

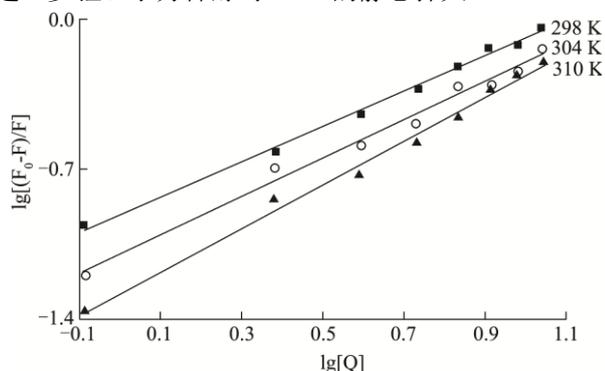


图 4 芳樟醇与 BSA 在不同温度下反应的双对数曲线图

Fig.4 Double-log plots of BSA interaction with linalool at different temperatures

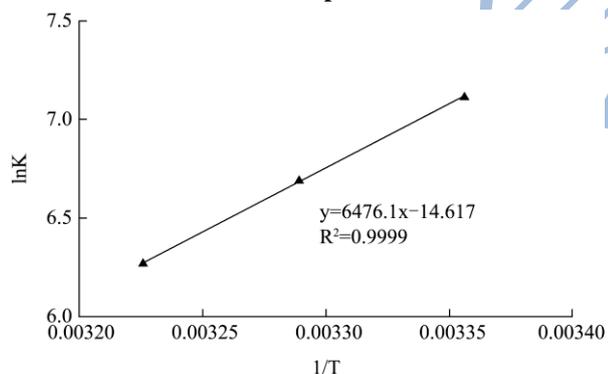


图 5 芳樟醇与 BSA 相互作用的 Van't Hoff 图

Fig.5 Van't Hoff plot for the interaction between BSA and linalool

### 2.1.4 芳樟醇与牛血清白蛋白相互作用的结合模式

小分子与生物大分子的作用力主要包括: 疏水作用力、静电引力、氢键和范德华力, 生物大分子和小分子结合性质的热力学规律: 当  $\Delta S > 0$ ,  $\Delta H > 0$  为典型的疏水作用力;  $\Delta S < 0$ ,  $\Delta H < 0$  为氢键和范德华力; 当  $\Delta S > 0$ ,  $\Delta H < 0$  时, 主要存在静电相互作用<sup>[9]</sup>。因此, 通过计算热力学参数可以研究芳樟醇与 BSA 相互作

用的结合模式, 当温度变化不大时, 焓变值( $\Delta H$ )可以认为是常数, 然后依据式(4)以  $\ln K$  对  $1/T$  作图 5, 由斜率和截距可求得焓变值( $\Delta H$ )、熵变值( $\Delta S$ ), 再依据式(5)获得自由能变化( $\Delta G$ ):

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (4)$$

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

式中,  $K$  是相应温度条件下的结合常数,  $R$  是气体常数,  $T$  是绝对温度, 根据不同温度下的结合常数获得的芳樟醇与 BSA 相互作用热力学函数值。

由表 2 得,  $\Delta G < 0$ , 表明芳樟醇与 BSA 的相互作用是自发过程,  $\Delta H < 0$ ,  $\Delta S < 0$ , 表明两者的作用力以氢键和范德华力为主。

表 2 不同温度下芳樟醇与 BSA 相互作用的热力学参数

Table 2 Relative thermodynamic parameters of the linalool-BSA interaction at different temperatures

T/K	$\Delta H$ /(kJ/mol)	$\Delta S$ /(J/(mol K))	$\Delta G$ /(kJ mol)	$R^d$
298			-17.64±0.03	
304	-53.85±0.23	-121.50±0.16	-16.91±0.03	0.9999
310			-16.19±0.03	

Note:  $R^d$  is the correlation coefficient for the  $\Delta H$  and  $\Delta S$  values.

### 2.1.5 芳樟醇与牛血清白蛋白相互作用的结合距离

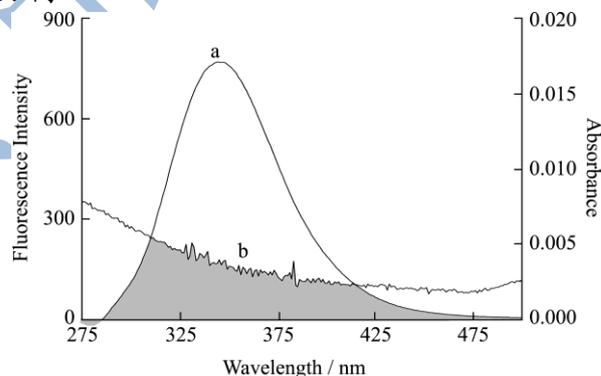


图 6 BSA 的荧光发射光谱 (a) 与芳樟醇的吸收光谱 (b) 重叠图

Fig.6 Overlap of BSA fluorescence emission spectrum (a) with the linalool absorption spectrum (b)

注:  $C(\text{BSA})=C(\text{linalool})=7.50 \times 10^{-7}$  mol/L,  $\lambda_{\text{ex}}=280$  nm, 298K, PH=7.4。

根据 Forster's 非辐射能量转移理论, 当供能体的荧光发射光谱与受能体的吸收光谱有足够的重叠且供能体与受能体的最大距离不超过 7 nm 时, 将发生非辐射能量转移, 导致荧光猝灭<sup>[10]</sup>。根据 Forster's 理论, 可以根据以下等式计算能量转移效率  $E$ :

$$E = 1 - F/F_0 = R_0^6 / (R_0^6 + r_0^6) \quad (6)$$

式中:  $F_0$  和  $F$  分别是 BSA 和芳樟醇-BSA(浓度比 1:1)的荧光发射峰强度;  $R_0$  为能量转移效率  $E=50\%$  时的临界距离/nm;  $r_0$  是供体偶极中心与受体偶极中心之间的距离/nm, 其中:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^4 \Phi J \quad (7)$$

式中:  $K^2$  为偶极空间取向因子(取供体蛋白质-受体小分子各向随机分布的平均值  $K^2=2/3$ );  $N$  为介质的折射指数(取水和有机物的平均值  $N=1.336$ );  $\Phi$  为供体 BSA 的荧光量子产率(取 0.15);  $J$  为供体 BSA 荧光光谱与受体芳樟醇吸收光谱的重叠积分, 其表达式为:

$$J = \int F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda / \int F(\lambda) \Delta\lambda \quad (8)$$

图 6 表明, BSA 与芳樟醇的量比为 1:1 时, BSA 的发射光谱与芳樟醇的吸收光谱有一定的重叠, 因此芳樟醇与 BSA 之间可能发生非辐射能量转移, 根据公式可以求得芳樟醇与 BSA 的重叠积分  $J=7.40 \times 10^{-15} \text{cm}^3/\text{mol}$ ,  $R_0=2.42 \text{nm}$ ,  $E=0.09$ 。可得芳樟醇和 BSA 之间的结合距离  $r_0=3.57 \text{nm}$ 。由于  $r_0 < 7 \text{nm}$ , 且  $0.5 R_0 < r_0 < 1.5 R_0$ , 因此可以推断芳樟醇和 BSA 之间存在有 Forster's 偶极-偶极非辐射能量转移。

## 2.2 芳樟醇对牛血清白蛋白构象影响研究

### 2.2.1 紫外-可见吸收光谱法研究

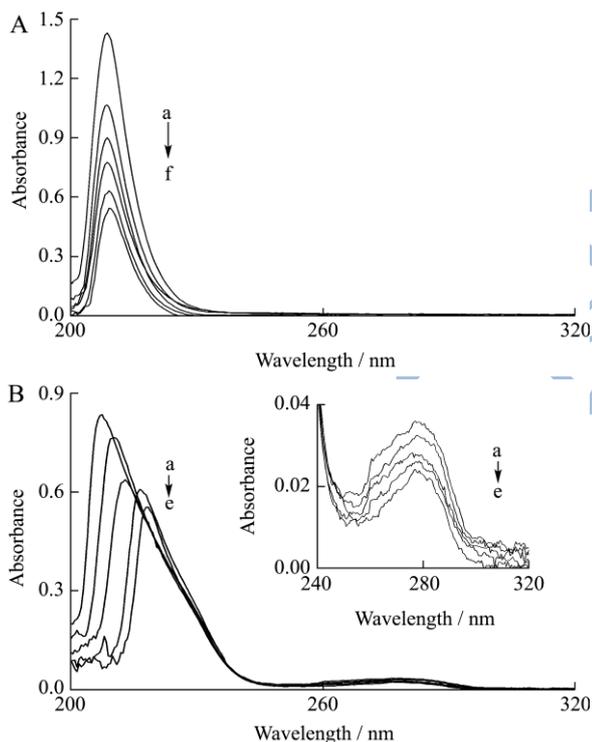


图 7 加入 BSA 前后芳樟醇的紫外光谱(A)及加入芳樟醇前后 BSA 的紫外光谱(B)

Fig.7 Absorption spectra of linalool (A)/BSA(B) without and with BSA/linalool at 298 K, pH = 7.4

Note: A: (a-f): linalool,  $4.00 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ ; 0.00, 2.40, 3.60, 4.80, 6.00, 7.20 ( $\times 10^{-7} \text{mol/L}$ ) of BSA; B: (a-e): BSA,  $6.40 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ ; 0.00, 4.16, 8.32, 20.80, 29.10 ( $\times 10^{-4} \text{mol/L}$ ) of linalool (inset) The UV Spectra of the BSA-linalool system in the wavelength range of 240~320 nm.

紫外-可见吸收光谱法可用于研究蛋白质构象变化及复合物形成。由实验结果可知, BSA 有两个紫外特征吸收峰, 分别在 207.50 nm 和 277.00 nm 处, 其中 207.50 nm 处的吸收峰主要由肽键上得 C=O 的  $\pi-\pi^*$  跃迁引起, 与 BSA 的  $\alpha$ -螺旋含量有关, 而 277.00 nm 处的吸收峰主要由 BSA 分子中的色氨酸和酪氨酸残基的芳杂环的  $\pi-\pi^*$  跃迁引起, 荧光猝灭类型主要包括动态猝灭和静态猝灭, 其中动态猝灭不改变荧光物质的吸收光谱, 而静态猝灭往往会导致荧光物质吸收光谱的改变<sup>[11]</sup>。如图 7(A), 随着 BSA 浓度的增加, 芳樟醇的吸收峰强度有规律地降低, 图 7(B), 随着芳樟醇浓度的增加, BSA 在 207.50 nm 处的吸收峰强度明显降低并伴有显著红移(从 207.50 nm 到 218.00 nm), 说明芳樟醇使 BSA 主链构象发生变化, 即螺旋结构变松散, 而在 277.0 nm 处的吸收峰强度也降低, 说明芳樟醇的加入使 BSA 得生色团疏水结构变紧密, 使其所处微环境疏水性增加。总之, 紫外光谱说明芳樟醇与 BSA 发生了相互作用, 诱导 BSA 构象发生改变, 减少了 BSA 中  $\alpha$ -螺旋的含量, 增加了 BSA 中色氨酸、酪氨酸残基微环境的疏水性。此外, 从 BSA 在芳樟醇作用下的紫外吸收光谱的变化进一步证实芳樟醇对 BSA 的荧光猝灭类型以静态猝灭为主, 与荧光猝灭研究结果相符。

### 2.2.2 同步荧光光谱法研究

同步荧光光谱具有简化光谱、窄化谱带和减少光谱重叠等优点, 可以通过蛋白质固定波长的同步荧光光谱的变化来判断蛋白质的构象变化, 芳香氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的极性有关, 通过最大发射波长的改变可以判断 BSA 中芳香氨基酸残基所处微环境的变化<sup>[11]</sup>。根据 Miller 提出的理论,  $\Delta\lambda=15 \text{nm}$  和  $\Delta\lambda=60 \text{nm}$  的同步荧光光谱分别显示蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的光谱性质<sup>[11]</sup>。由图 8 可见, 随着芳樟醇浓度的逐渐增大, 色氨酸残基的荧光强度明显降低, 且最大荧光发射波长蓝移(由 276.5 nm 至 274.5 nm), 而酪氨酸残基的荧光强度却随着芳樟醇浓度的增大而增大, 最大发射波长也发生蓝移(288.5 nm 至 287.5 nm)。结果表明芳樟醇与 BSA 作用后导致色氨酸和酪氨酸残基所处微环境疏水性增加, 亲水性降低, 引起 BSA 构象发生改变, 并且芳樟醇猝灭 BSA 荧光主要是色氨酸残基的贡献。

### 2.2.3 傅里叶变换红外光谱法、拉曼光谱法研究

通过红外、拉曼光谱来进一步考察蛋白质构象变化。反映蛋白质二级结构最重要的红外特征吸收带和拉曼谱段分别是酰胺 I 带( $1700\sim 1600 \text{cm}^{-1}$ )、酰胺 II 带

(1600~1500 cm<sup>-1</sup>)<sup>[11]</sup>和酰胺 I 带、酰胺III带(1330~1220 cm<sup>-1</sup>)<sup>[12]</sup>。其中酰胺 I 带对于研究蛋白质二级结构最有价值。由图 9(A)可知, 芳樟醇的加入引起 BSA 的酰胺 I 带峰从 1652 cm<sup>-1</sup>红移到 1654 cm<sup>-1</sup>, 而酰胺 II 带峰从 1548 cm<sup>-1</sup>蓝移到 1546 cm<sup>-1</sup>, 而如图 9(B)所示, 与芳樟醇作用前后, BSA 的拉曼谱图的峰强和峰位也相应发生变化, 红外和拉曼光谱的变化说明芳樟醇与 BSA 发生相互作用, 引起 BSA 构象变化。

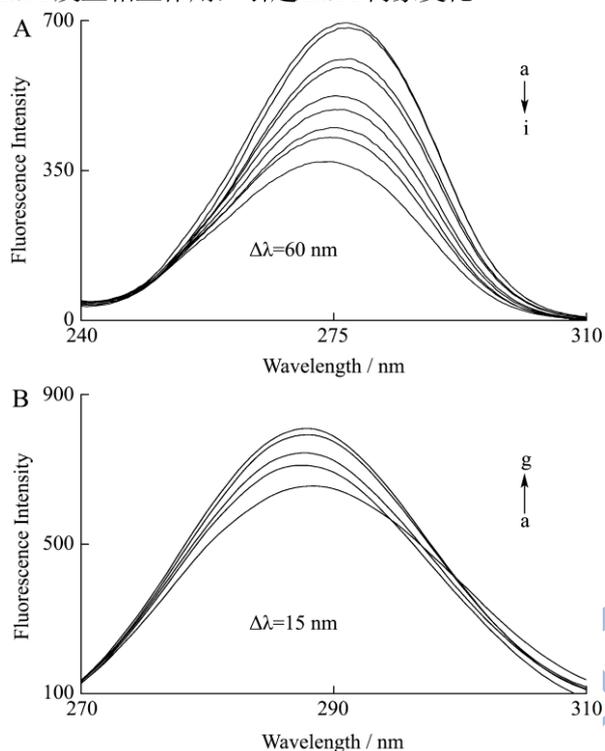


图 8 牛血清白蛋白与芳樟醇相互作用的同步荧光光谱

Fig.8 Synchronous fluorescence spectra of linalool-BSA interaction

Note: A: (a-i): BSA, 7.50×10<sup>-7</sup> mol/L; 0.00、0.82、2.42、3.95、5.41、6.82、8.17、9.47、10.71 (×10<sup>-4</sup>mol/L) of linalool; B: (a-e): BSA, 2.50×10<sup>-6</sup>mol/L; 0.00、1.25、2.49、4.97、7.43 (×10<sup>-3</sup>mol/L) of linalool.

为进一步定量表征 BSA 二级结构变化, 采用 Byler<sup>[13]</sup>的方法, 取酰胺 I 带特征红外谱图、酰胺 I 带及侧链氨基酸残基的特征拉曼谱图, 用 PeakFit v4.12

软件分析, 先校正基线然后用 Gaussian 去卷积, 再用二阶导数拟合, 多次拟合使残差最小, 以子峰面积计算二级结构的比率。各子峰与二级结构对应的关系为: 1640~1610 cm<sup>-1</sup>为β-折叠, 1650~1640 cm<sup>-1</sup>为无规则卷曲, 1660~1650 cm<sup>-1</sup>为α-螺旋, 1680~1660 cm<sup>-1</sup>为β-转角, 1700~1680 cm<sup>-1</sup>为反平行β-折叠<sup>[11]</sup>。蛋白质的二级结构中, α-螺旋结构表现蛋白质分子的致密性, 而其它结构如β-折叠、转角、无规则卷曲等反映了蛋白质分子的松散性<sup>[12]</sup>。

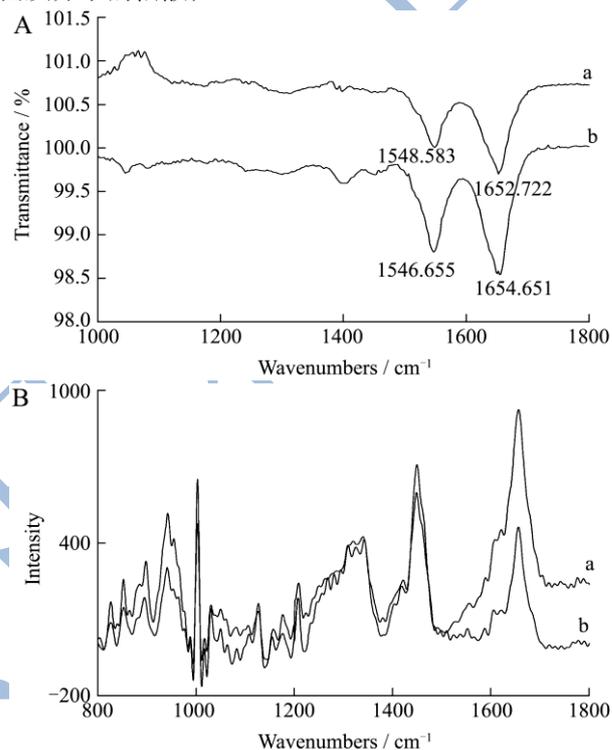


图 9 加入芳樟醇前后 BSA 的傅里叶变换红外光谱图 (A) 和拉曼谱图 (B)

Fig.9 FT-IR spectra (A) and Raman spectra (B) of BSA without (a) and with (b) linalool at 298 K, pH = 7.4

Note: A: C(BSA)=7.40×10<sup>-4</sup>mol/L, C(linalool)=3.80×10<sup>-3</sup>mol/L ; B: C(BSA)=2.50×10<sup>-4</sup> mol/L, C(linalool)=1.10×10<sup>-3</sup>mol/L.

表 3 BSA 和 BSA-linalool 的酰胺 I 带傅里叶变换红外光谱和拉曼光谱曲线拟合结果

Table 3 Curve fitting results of IR amide I and Raman amide I of BSA and BSA-linalool

光谱类型	体系	Wavenumbers/cm <sup>-1</sup>	指认	含量/%
IR	BSA	1656	α-螺旋	36.17±0.03
		1619、1631、1643、1669、1682	其它二级结构	63.83±0.03
	BSA-linalool	1658	α-螺旋	33.89±0.21
		1618、1632、1645、1673、1684	其它二级结构	66.11±0.21
Raman	BSA	1653	α-螺旋	33.39±0.03
		1621、1639、1663、1677、1692	其它二级结构	66.61±0.03
	BSA-linalool	1653	α-螺旋	31.85±0.04
		1622、1641、1661、1672、1685	其它二级结构	68.15±0.04

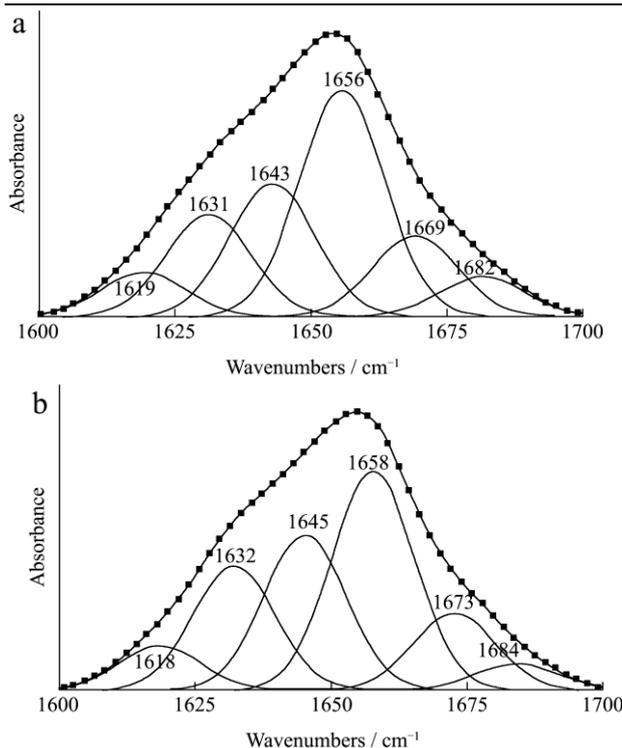


图 10 BSA 和 BSA-linalool 的酰胺 I 带傅里叶变换红外曲线拟合图

Fig.10 IR curve-fitting of amide I of free BSA (a) and linalool-BSA system (b)

注: 虚线为实验数据图, 实线为拟合数据图, 下同。

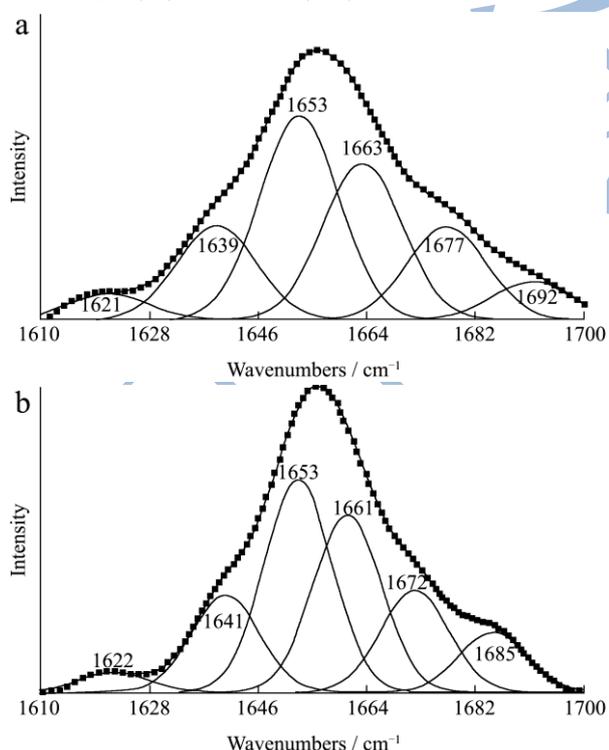


图 11 BSA 和 BSA-linalool 的酰胺 I 带拉曼曲线拟合图

Fig.11 Raman curve-fitting of amide I of free BSA (a) and linalool-BSA system (b)

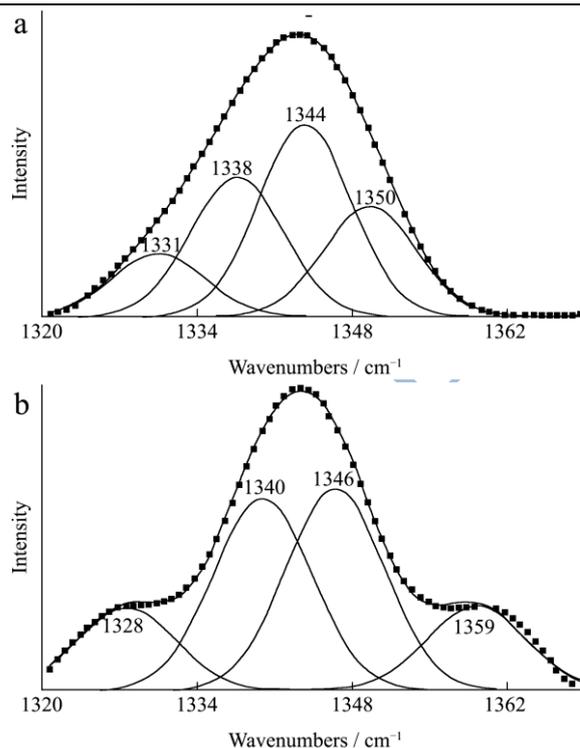


图 12 BSA (a) 和 BSA-linalool (b) 色氨酸残基的拉曼曲线拟合图

Fig.12 Raman curve-fitting of Trp residue of free BSA (a) and linalool-BSA system (b)

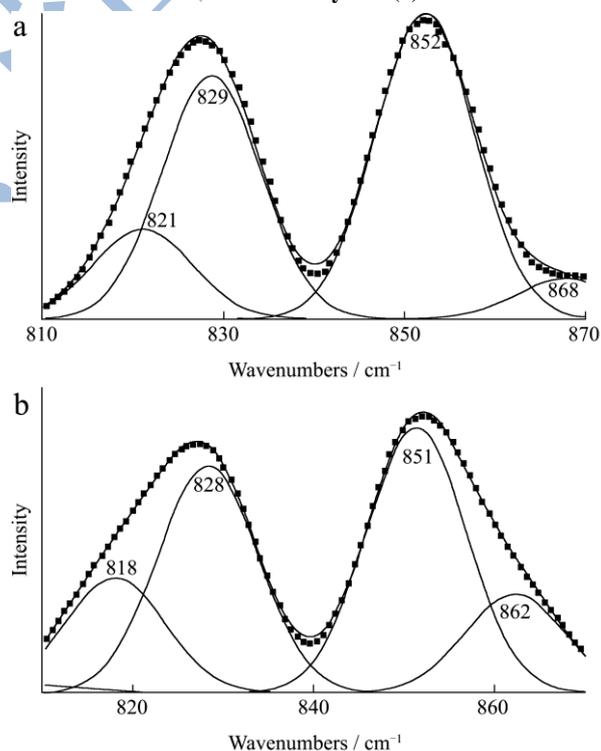


图 13 BSA (a) 和 BSA-linalool (b) 酪氨酸残基的拉曼曲线拟合图

Fig.13 Raman curve-fitting of Tyr residue of free BSA (a) and linalool-BSA system (b)

对酰胺 I 带的红外、拉曼谱图拟合 (图 10、图 11), 分峰进行指认并计算, 结果见表 3, 加入芳樟醇

后,  $\alpha$ -螺旋结构含量降低, 而其它二级结构的总含量升高, 表明芳樟醇使 BSA 肽链伸展, 构象发生变化, 这与紫外图谱所得结果一致。

### 3 结论

本文采用多种光谱法研究了芳樟醇与 BSA 的相互作用机制。研究表明, 二者存在相互作用, 芳樟醇对 BSA 内源荧光的猝灭机制为形成芳樟醇-BSA 复合物的静态猝灭。范德华力和氢键是结合反应的主要驱动力。紫外-可见吸收光谱、同步荧光、红外、拉曼光谱表明芳樟醇-BSA 相互作用会引起蛋白质构象变化, 使 BSA 分子  $\alpha$ -螺旋含量降低, 色氨酸、酪氨酸残基的微环境疏水性增加, 亲水性减小, 且芳樟醇与 BSA 的结合位点更接近于色氨酸残基。这些结论有助于从分子水平上了解芳樟醇的体内转运与代谢、对蛋白质构象影响, 为设计更有效的芳樟醇药物提供理论基础。

### 参考文献

- [1] 吴克刚, 赵三娥, 柴向华, 等. 植物精油对铜绿假单胞菌抗菌作用的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(12): 2830-2833  
WU Ke-gang, ZHAO San-e, CHAI Xiang-hua, et al. Antibacterial effect of plant essential oils against pseudomonas aeruginosa [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(12): 2830-2833
- [2] 胡小刚, 陈剑鸿, 夏培元, 等. 芳樟醇 R-和 S-对映异构单体的体外抗菌活性研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(19): 2077-2080  
HU Xiao-gang, CHEN Jian-hong, XIA Pei-yuan, et al. In vitro anti-bacterial activities of R- and S-linalool [J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2013, 35(19): 2077-2080
- [3] 徐洪亮. 小分子药物与牛血清白蛋白相互作用研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013  
XU Hong-liang. Study on the interaction between small-molecular drugs and bovine serum albumin [D]. Changchun: Jilin University, 2013
- [4] 周瑞, 董学艳, 景浩. 不同溶液中牛血清白蛋白与花青素相互作用特征及抗氧化性[J]. 食品科学, 2013, 34(15): 11-16  
ZHOU Rui, DONG Xue-yan, JING Hao. Characterization of bovine serum albumin/anthocyanin interaction and antioxidant activity in different solutions [J]. Food Science, 2013, 34(15): 11-16
- [5] 陈玉静. 红外杂化单光束谱的概念、性质及其在扣除水汽和其它干扰组分吸收峰方面的应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2013  
CHEN Yu-jing. Concept and properties of infrared hybrid single-beam spectrum and its application for eliminating water vapor bands and other background interferences [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [6] Nahid Shahabadi, Maryam Maghsudi, Zahra Kiani, et al. Multispectroscopic Studies on the interaction of 2-tert-butylhydro-quinone (TNHQ), a food additive, with bovine serum albumin [J]. Food Chemistry, 2011, 124: 1063-1068
- [7] Wei Du, Teng Teng, Chen-Chen Zhou, et al. Spectroscopic Studies on the Interaction of Bovine Serum Albumin with Ginkgolic Acid: Binding Characteristics and Structural Analysis [J]. Journal of Luminescence, 2012, 132: 1207-1214
- [8] Nahid Shahabadi, Maryam Maghsudi, Shohre Rouhani. Study on the Interaction of Food Colourant Quinoline Yellow with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic Techniques [J]. Food Chemistry, 2012, 135: 1836-1841
- [9] Nahid Shahabadi, Soraya Moradi Fili. Molecular Modeling and Multispectroscopic Studies of the Interaction of Mesalamine with Bovine Serum Albumin [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 118: 422-429
- [10] 姚惠芳, 景浩. 芎斯越橘花青素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 6-10  
YAO Hui-fang, JING Hao. Spectroscopic Analysis of Interaction between Bovine Serum Albumin and Anthocyanin [J]. Food Science, 2013, 34(23): 6-10
- [11] Guowen Zhang, Yadi Ma, Lin Wang, et al. Multispectroscopic Studies on the Interaction of Maltol, a Food Additive, with Bovine Serum Albumin [J]. Food Chemistry, 2012, 133: 264-270
- [12] 孙璐. 基于拉曼光谱技术的南美白对虾蛋白变温特性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2013  
SUN Lu. The Study on Protein Variable Temperature Characteristics of Litopenaeus Vannamei Based on Raman Spectra Technique [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2013
- [13] D M Byler, J N Brouillette, H Susi. Quantitative Studies of Protein Structure by FTIR Spectra Deconvolution and Curve-fitting [J]. Spectroscopy, 1986, 3: 29-32
- [14] Xialian Peng, Di Yao, Yingming Pan, et al. Study on the Structural Changes of Bovine Serum Albumin with Effects on Polydatin Binding by a Multitechnique Approach [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 81: 209-214

现代食品科技