

# 考马斯亮蓝 G-250 与牛血清白蛋白的相互作用研究

王永刚<sup>1</sup>, 王世伟<sup>1</sup>, 李云春<sup>1</sup>, 冷非凡<sup>1</sup>, 马建忠<sup>1</sup>, 王晓力<sup>2</sup>, 庄岩<sup>1</sup>

(1. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

(2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050)

**摘要:** 利用紫外-可见光谱、傅里叶变换红外光谱、圆二色谱和分子建模技术研究了考马斯亮蓝 G-250 与牛血清白蛋白 (BSA) 的相互作用。紫外-可见光谱测定结果表明, 随 BSA 的浓度的增加, 以 1:1 形成复合物, 在不同温度条件下, 结合形成常数分别为  $5.03 \times 10^4$ 、 $3.04 \times 10^4$ 、 $2.84 \times 10^4$  和  $1.99 \times 10^4$  L/mol, 随温度升高而减小, 整个反应过程是焓、熵联合驱动自发进行, 热力学焓变 ( $\Delta H$ ) 和熵变 ( $\Delta S$ ) 分别为 -45.3229 kJ/mol 和 -139.1847 J/(K mol), 说明分子间作用力以氢键和范德华力为主; 采用傅里叶红外技术研究了作用前后 BSA 中  $\alpha$ -螺旋特征酰胺带 (I 和 II) 的变化, 结果表明酰胺带 I 由  $1650 \text{ cm}^{-1}$  移动到  $1710 \text{ cm}^{-1}$ , 酰胺带 II 从  $1544 \text{ cm}^{-1}$  移动到  $1573 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\alpha$ -螺旋结构降低; 圆二色谱测定结果和分子对接技术进一步验证了 BSA 结构的变化,  $\alpha$ -螺旋含量由 42.15% 下降至 1.27%。

**关键词:** 牛血清白蛋白; 考马斯亮蓝 G-250; 光谱法; 圆二色谱; 分子建模技术; 相互作用

文章编号: 1673-9078(2016)1-89-94

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.1.014

## Interaction of Coomassie Brilliant Blue G-250 with Bovine Serum Albumin

WANG Yong-gang<sup>1</sup>, WANG Shi-wei<sup>1</sup>, LI Yun-chun<sup>1</sup>, LENG Fei-fan<sup>1</sup>, MA Jian-zhong<sup>1</sup>, WANG Xiao-li<sup>2</sup>, ZHUANG Yan<sup>1</sup>

(1. Lanzhou University of Technology, School of Life Science and Engineering, Lanzhou 730050, China)

(2. Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science of CAAS, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** The interaction of Coomassie brilliant blue G-250 (CBBG-250) with bovine serum albumin (BSA) was investigated by the methods of ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), circular dichroism (CD), and molecular modeling technique. The UV-Vis results showed that BSA could interact with CBBG-250 to form a CBBG-BSA complex in a molar ratio of 1:1 with increasing BSA concentrations. At different temperatures, the apparent binding constant ( $K_a$ ) values were  $5.03 \times 10^4$  (298 K),  $3.04 \times 10^4$  (303 K),  $2.84 \times 10^4$  (308 K), and  $1.99 \times 10^4$  L/mol (313 K), respectively, which decreased with increasing temperatures. The whole process was enthalpically and entropically driven, and the enthalpy ( $\Delta H$ ) and entropy changes ( $\Delta S$ ) were 45.32 kJ/mol and 139.18 J/(mol K), respectively, indicating that the hydrogen bonds and Van der Waals forces played a dominant role in the molecular interaction. FT-IR was used to study the changes in characteristic amide bands (I and II) of  $\alpha$ -helix in BSA before and after the interaction. The results showed that amide band I shifted from  $1650 \text{ cm}^{-1}$  to  $1710 \text{ cm}^{-1}$ , amide band II shifted from  $1573 \text{ cm}^{-1}$  to  $1544 \text{ cm}^{-1}$ , and the  $\alpha$ -helical structure content was reduced. CD measurements and molecular docking technique further verified the changes in BSA structure and the content of  $\alpha$ -helical structure decreased from 42.15% to 1.27%.

**Key words:** bovine serum albumin; Coomassie brilliant blue G-250; spectrometric method; circular dichroism; molecular modeling technique; interaction

1976年 Bradford 首次报道 CBBG-250 与牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, 简称 BSA) 可以发生

收稿日期: 2015-01-28

基金项目: 农业行业科研专项 (201203042); 国家自然科学基金资助项目 (31060041, 51366009); 甘肃省自然科学基金 (1212RJYA008, 1212RJYA034); 兰州理工大学“红柳青年教师培养计划” (Q201207)

作者简介: 王永刚, 讲师, 研究方向: 微生物基因工程

通讯作者: 马建忠, 研究员, 研究方向: 植物基因工程

络合反应形成蛋白质—考马斯亮蓝蓝色复合物溶液, 引起考马斯亮蓝 G250 乙醇磷酸溶液特征吸收波长 465 nm 红移, 于 595 nm 处产生新的最大吸收峰, 即复合物的特征吸收峰, 更为重要的是, Bradford 发现该复合物特征吸收峰大小与 BSA 浓度在一定范围内呈线性梯度关系, 因此被作为蛋白质定性鉴别和定量分析的主要方法之一<sup>[1]</sup>。由于该法具有灵敏度高、特异性强、操作简单及干扰因素少等优点, 被广泛应用

于生化分析中。目前关于 CBBG-250 与生物大分子蛋白质的研究主要集中在变色反应机理<sup>[3-6]</sup>和定量方法改进<sup>[7-13]</sup>两方面,其中研究较多的有高通量和痕量蛋白检测方法的优化、不同样品来源蛋白质检测方法条件的优化,而 CBBG-250 与蛋白质分子相互作用机理研究甚少,有研究认为蛋白质与 CBBG 溶液反应的灵敏度和准确度取决于蛋白质中芳香族氨基酸残基和碱性氨基酸的含量,尤其是精氨酸。在前期的研究中作者发现 CBBG-250 响应牛血清白蛋白、牛血红蛋白、胃蛋白酶等不同蛋白质的光吸收值有显著差异<sup>[7]</sup>。由此,作者认为 CBBG-250 与蛋白质的反应存在组成和结构差异性,也可能在相互作用力的方式上存在差异。

光谱法和色谱法是研究小分子化合物和蛋白质相互作用的主要技术手段<sup>[14-20]</sup>,包括紫外-可见光谱、荧光光谱、红外光谱和圆二色谱等。本研究采用了紫外-可见光谱法测定了 CBBG-250 与 BSA 之间的结合常数、热力学参数等,辅以傅里叶变红外光谱和圆二色谱法研究了两者反应前后 BSA 官能团结构的变化,进一步揭示了 CBBG-250 与 BSA 两者间可能存在的相互作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器:紫外-可见分光光度计(Cary 50,美国 Varian 公司);荧光光度计(RF-5301PC,日本岛津公司);红外-拉曼分光光度计(FT-IR-850,美国 Nicole 公司);圆二色谱仪(Jasco-20c,日本岛津公司);移液枪(BR704180,德国 Brand 公司);电子天平(AB104-N,梅特勒)。

试剂:无水乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,2012年06月05日,分析纯 AR),85%磷酸(天津市百世化工有限公司,XK13-011-00007,2002年02月16日,分析纯);牛血清白蛋白(Roche, No.B0040),考马斯亮蓝 G-250(Solarbio, Ultra Pure Grade, No.C8420)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 溶液配制

1.0 mg/mL BSA 溶液的配制:准确称取100 mg BSA,超纯水溶解并定容至100 mL;

5.0 mg/100 mL CBBG-250溶液的配制:准确称取 5.0 mg CBBG-250溶于5 mL 95%乙醇充分溶解,再向其中加入10 mL 85%磷酸,超纯水定容至100 mL。

#### 1.2.2 紫外-可见分光光度法分析

在 298 K、303 K、308 K、313 K 条件下,对已知浓度的 BSA 和不同浓度 CBBG-250 溶液的结合作用进行 200~800 nm 的紫外可见吸收光谱,探究最大吸收峰,并在最大吸收峰测定光吸收值,绘制相应的热力学曲线。

#### 1.2.3 傅里叶变换红外光谱分析

分别取少许 0.5 mg/mL BSA、10.0 mg/100 mL CBBG-250 溶液及两者的反应液涂膜,于室温下间隔 4 cm<sup>-1</sup>测定 4000~400 cm<sup>-1</sup>波数范围内的官能团结构。

#### 1.2.4 圆二色谱分析

准确移取 5 mL CBBG-250 溶液于 10 mL 比色管中,加入 BSA 标准溶液 1.0 mL,以超纯水定容,反应 10 min。使用 1 mm 石英池,于室温下测定 200-280 nm 范围内 BSA 与 CBBG-250 发生相互作用前后的 CD 谱,分析 BSA 中  $\alpha$ -螺旋结构含量的变化,计算公式为: $\alpha = [(-[\theta]_{208} - 4000) / (33000 - 4000)] \times 100\%$ <sup>[17]</sup>。

#### 1.2.5 分子对接建模技术分析

用 Discovery Studio 软件建立考马斯亮蓝 G-250 的结构模型,采用分子对接软件 Autodock vina 1.1.2 分析 BSA 蛋白质的活性区域,并分析两者间的结合位点和作用力类型。从分子水平阐述考马斯亮蓝 G250 (图 1)和牛血清白蛋白 BSA (PDB ID: 4F5S)的作用机制。除了特别说明,软件分析中所有的参数都使用默认值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 CBBG-250 与 BSA 相互作用的紫外-可见光谱

#### 2.1.1 CBBG-250 对 BSA 的紫外-可见光谱

分别在 298 K、303 K、308 K、313 K 条件下,对已知浓度的 CBBG-250 溶液和不同浓度 BSA 溶液的结合作用进行 200~800 nm 的紫外-可见吸收光谱。结果如图 1,从图中可以看出在不添加 BSA 溶液的条件下,温度对 CBBG-250 溶液稳定性的影响非常下,CBBG-250 溶液在 465 nm 和 646 nm 处有特征吸收峰,而随着逐渐添加 BSA 溶液,CBBG-250 溶液吸收峰发生变化,结果如图 2 所示,从图中对比可以看出 CBBG-250 与 BSA 结合物特征吸收峰为 595 nm,随着 BSA 浓度的增加,光吸收值逐渐增加,呈梯度增加,因此被作为蛋白质定量的主要分析手段之一,此外对比各图可以发现在同等条件下,温度在 313 K 时,BSA 与 CBBG-250 反应的光吸收值增加幅度减缓,直至不变,由此推测,温度对两者之间的结合存在一定的影

响。

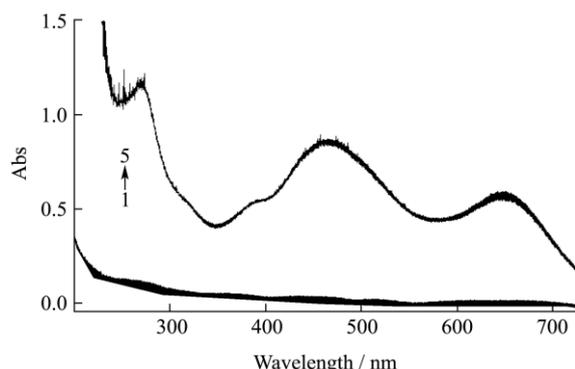


图1 不同温度下 CBBG-250 溶液的紫外-可见光谱图

Fig.1 UV-Vis spectra of CBBG-250 solution at different temperatures

注: CBBG-250 浓度为 0.05 mg/mL; 1→5 温度为 298 K、303 K、308 K、313 K。

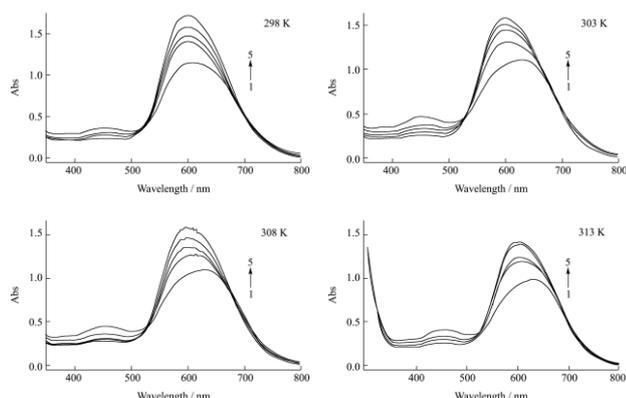


图2 不同温度下 BSA 和 CBBG-250 相互作用的紫外-可见光谱图

Fig.2 UV-Vis spectra of CBBG-250 with different concentrations of BSA

注: CBBG-250 浓度为 0.05 mg/mL; 1→5 BSA 的浓度依次为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL。

### 2.1.2 表观结合常数 $K_a$ 和 CBBG-250 与 BSA 的作用力类型

在作者的前期研究中<sup>[7]</sup>, 利用荧光光谱法研究获得 CGGB-250 与 BSA 是以 1:1 的分子结合模式相互作用的结论, 为了进一步验证两者间的作用力类型, 进

表 1 CBBG-250 与 BSA 反应的热力学参数

Table 1 Thermodynamic parameters of the BSA-CBBG-250 reaction process

T/K	$K/(\text{mol/L})^{-1}$	$r$	$\Delta G/(\text{kJ/mol})$	$\Delta H/(\text{kJ/mol})$	$\Delta S/[\text{J}/(\text{K mol})]$
298	$5.03 \times 10^4$	0.99578	-4.0021		
303	$3.04 \times 10^4$	0.99649	-2.7984	-45.3229	-139.1847
308	$2.84 \times 10^4$	0.99029	-2.6726		
313	$1.99 \times 10^4$	0.9983	-1.7963		

本工作分别研究了 298 K、303 K、308 K、313 K 下的 BSA 与 CBBG-250 相互作用的紫外-可见光谱, 测定波长为 595 nm。利用不同温度下的实验结果,

进一步采用紫外可见分光光度法进行了确证。在反应体系中 CGGB-250 与 BSA 的反应式为:  $\text{CBBG-250} + \text{BSA} = \text{BSA-CBBG-250}$ , 则:

$$K = \frac{[\text{BSA-CBBG-250}]}{[\text{CBBG-250}][\text{BSA}]} \quad (1)$$

由式 (1) 得,

$$[\text{BSA}]_0 = [\text{BSA}] + [\text{BSA-CBBG-250}] = [\text{BSA}] + K[\text{BSA}][\text{CBBG-250}] \quad (2)$$

$$[\text{CBBG-250}]_0 = [\text{CBBG-250}] + [\text{BSA-CBBG-250}] = [\text{CBBG-250}] + K[\text{BSA}][\text{CBBG-250}] \quad (3)$$

式中,  $[\text{BSA}]_0$  和  $[\text{CBBG-250}]_0$  分别为 BSA 和 CBBG-250 的起始浓度。

假设  $[\text{BSA}]_0 \geq [\text{CBBG-250}]_0$ , 可得  $[\text{BSA}] \approx [\text{BSA}]_0$ , 由式 (3) 得,

$$[\text{CBBG-250}] = \frac{[\text{CBBG-250}]_0}{(1 + K[\text{BSA}]_0)} \quad (4)$$

由于  $[\text{BSA}]_0 \geq [\text{CBBG-250}]_0$ , 加之反应后溶液吸光度  $A$  与  $[\text{BSA-CBBG-250}]$  成正比, 符合朗伯利尔定律, 即:  $A = \epsilon[\text{BSA-CBBG-250}]L$  (5)

式中,  $\epsilon$  为摩尔吸光系数,  $L$  为吸光池厚度。当  $L=1$  时, 将式 (1) 代入式 (5) 得

$$A = \epsilon K [\text{BSA}] [\text{CBBG-250}] \quad (6)$$

将式 (4) 代入式 (6),

$$A = \epsilon K \left\{ \frac{[\text{CBBG-250}]_0}{(1 + K[\text{BSA}]_0)} \right\} [\text{BSA}]_0 \quad (7)$$

因为  $[\text{BSA}] \approx [\text{BSA}]_0$ , 式 (7) 可整理为:

$$\frac{[\text{CBBG-250}]_0}{A} = \frac{1}{\epsilon K} \left( \frac{1}{[\text{BSA}]_0} + \frac{1}{\epsilon} \right) \quad (8)$$

式 (8) 可简化为,

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{\epsilon K} \left( \frac{1}{[\text{BSA}]_0} + \frac{1}{\epsilon} \right) \quad (9)$$

根据  $1/A$  和  $1/[\text{BSA}]_0$  作图, 由图中的斜率及截距, 即可求得表观结合常数  $K_a$  和  $\epsilon$  值, 同时因为  $\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$ , 得到  $\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R$ , 以  $\ln K$  对  $1/T$  作图, 通过斜率和截距可以计算出  $\Delta H$  和  $\Delta S$ 。

以  $1/A$  对  $1/[\text{BSA}]_0$  作图, 得到不同温度下的关系曲线及相关系数  $r$ , 结果见图 3。从图中可以看出不同温度下的曲线均呈良好线性关系, 相关系数分别为

0.99578、0.99649、0.99029 和 0.9983, 表明结果有一定的可靠性。随着 BSA 浓度的增大结合物的吸光度也增大; 而随着温度的升高, 结合物的吸光度则明显降低, 斜率降低, 由斜率和截距分别计算得到不同温度下的结合形成常数  $K$ , 见表 1。由表 1 可知  $K$  值随着温度的增加而减小, 说明温度的变化对 CBBG-250 与 BSA 作用的影响较大; 以  $\ln K$  对  $1/T$  作图, 结果见图 4, 通过计算得知  $\Delta G < 0$  且随着温度的增加而逐渐增大, 由此得出在不同温度, 不同浓度 BSA 下, BSA 和 CBBG-250 的反应是自发过程, 并且该过程逐渐趋近于稳定,  $\Delta H < 0$  说明该反应是放热过程。根据反应前后热力学焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$  的相对大小判断生物大分子与小分子结合力性质的热力学规律<sup>[15-17]</sup>,  $\Delta S < 0$ ,  $\Delta H < 0$  体现氢键和范德华力作用力, 得出 BSA 和 CBBG-250 的反应过程中有氢键和范德华力作用力参与。

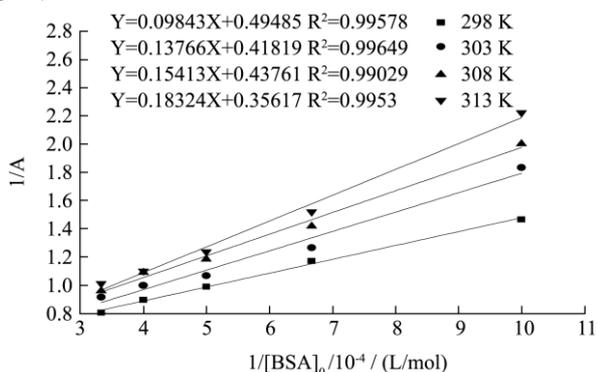


图 3 不同温度下  $1/[BSA]_0$  与  $1/A$  的关系曲线

Fig.3 Curves of  $1/[BSA]_0$  and  $1/A$  at different temperatures

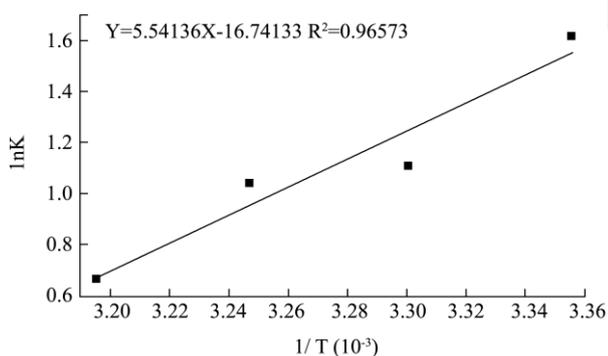


图 4 不同温度  $1/T$  与  $\ln K$  的关系曲线

Fig.4 Curves of  $1/T$  and  $\ln K$  at different temperatures

## 2.2 傅里叶红外光谱法

为了进一步研究 CBBG-250 与 BSA 在反应过程中 BSA 二级结构的变化, 对反应前后各体系成分进行了傅里叶红外光谱研究, 结果如图 5, 从图中可以看出, 加入 CBBG-250 后, BSA 的峰形没有明显变化, 但是蛋白质在红外区的特征吸收带, 酰胺 I 带

( $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ) 和酰胺 II 带 ( $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ ) 的峰位发生了蓝移, 酰胺带 II 从  $1544\text{ cm}^{-1}$  移动到  $1573\text{ cm}^{-1}$ , 酰胺带 I 由  $1650\text{ cm}^{-1}$  分裂成  $1710\text{ cm}^{-1}$ , 即 BSA 中的  $\alpha$ -螺旋 (特征带  $1650\sim 1658\text{ cm}^{-1}$ ) 和  $\beta$ -折叠 (特征带  $1620\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ ,  $1675\text{ cm}^{-1}$ ) 结构发生了变化<sup>[19]</sup>,  $\alpha$ -螺旋结构降低, 即在反应过程中 CBBG-250 引起 BSA 肽链上氨基、羧基氢键的重新排列。氢键作为维系蛋白质双螺旋结构的主要作用力, 一旦发生变化, 蛋白质的构象也会随之而变。CBBG-250 分子的磺氨基、氨基、苯环羟基不但可以与蛋白质侧链上的氨基、羟基以及羧基发生反应, 或形成氢键, 也可以与蛋白质肽键结构形成氢键, 从而改变  $-C=O$ 、 $C-N$  键的伸缩振动, 引起  $-NH$  平面弯曲, 造成酰胺带峰位的改变, 氢键改变, 使蛋白质二级结构发生变化。

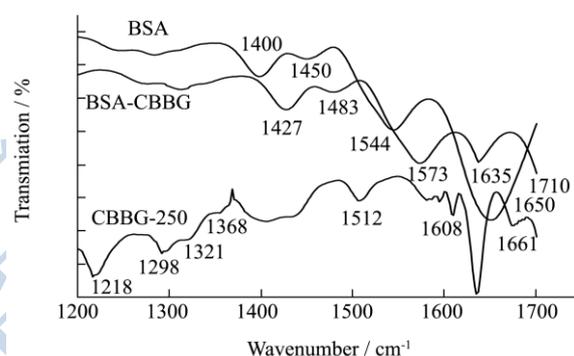


图 5 CBBG-250 与 BSA 作用的 FT-IR 谱图

Fig.5 FT-IR spectra of the interaction between BSA and CBBG-250

## 2.3 圆二色谱法

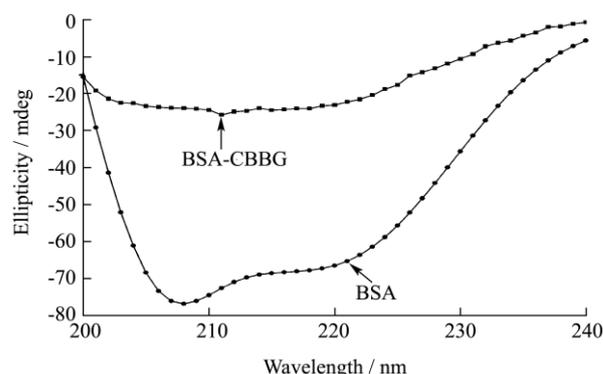


图 6 CBBG-250 与 BSA 相互作用的圆二色谱图

Fig.6 CD spectra of the CBBG-250-BSA system

注:  $c(\text{CBBG-250}) = 0.05\text{ mg/mL}$ ,  $T = 303\text{ K}$ ,  $c(\text{BSA}) = 0.1\text{ mg/mL}$ 。

远紫外区是蛋白质肽键的吸收峰范围, 主要反映蛋白质主链构象, BSA 典型结构特征是  $\alpha$ -螺旋在 212, 223 nm 两处有负 cotton 效应,  $\beta$ -折叠在 215 nm 左右有负槽, 无规卷曲则在 220 nm 处出现正峰<sup>[17]</sup>。从图 6

中可以看出, 实验中 BSA 中  $\alpha$ -螺旋在 209 nm 和 222 nm 左右出现负 cotton 效应, BSA 与 CBBG-250 结合后, CD 谱的形状没有明显改变, 峰位也没有明显移动, 计算得到 BSA 的  $\alpha$ -螺旋含量从 42.15% 降至 1.27%, 大部分变为  $\beta$ -折叠。由此说明 CBBG-250 与 BSA 结合后, BSA 的二级结构发生了变化, 原因可能是 CBBG-250 通过疏水作用力及氢键与组成  $\alpha$ -螺旋的氨基酸残基相互作用, 破坏了  $\alpha$ -螺旋的结构, 从而导致 BSA 中  $\alpha$ -螺旋含量下降。

## 2.4 分子对接分析

表 2 CBBG-250 和 BSA 的分子对接结果

Table 2 Molecular docking of CBBG-250 to BSA

构象	Affinity/(kcal/mol)
1	-8.1
2	-8.0
3	-7.6
4	-7.5
5	-7.3
6	-7.1
7	-7.0
8	-6.9
8	-6.8

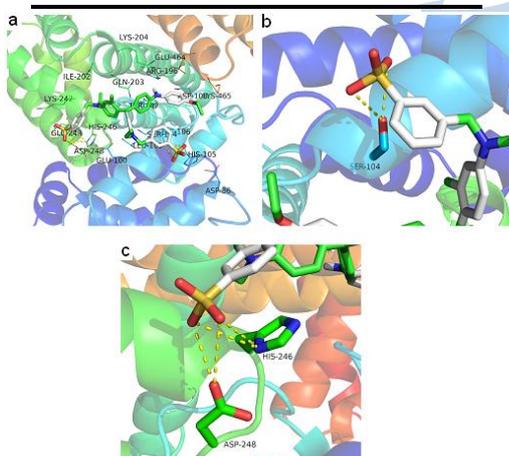


图 7 CBBG-250 和 BSA 的分子对接结果

Fig.7 Molecular docking of CBBG-250 to BSA

采用分子对接软件 Autodock vina 1.1.2 进一步研究 CBBG-250 和牛血清白蛋白 BSA (PDB ID: 4F5S) 的作用机制, 得出 BSA 活性口袋坐标为: center\_x=4.616, center\_y=23.3, center\_z=78.812, size\_x=47, size\_y=47, size\_z=47。分别将 CBBG-250 对接至 BSA 的活性口袋中, 共生成 9 种构象, 如表 2。我们挑选亲和力 affinity 最高的构象 1 进行研究, 显示结果见图 7。由图 7a 可以看出, CBBG-250 分子中的二苯基胺结构可以与 BSA 中氨基酸残基 GLN203、

LYS204、ARG196、GLU464、ASP108、LYS465、LYS106 和 TRP147 发生强烈的范德华力作用。CBBG-250 分子中一侧的苯基磺酸基伸向碱性氨基酸 HIS105, 发生静电相互作用, 同时与氨基酸残基 SER104 形成双重氢键作用, 如图 7b。另一侧的苯基磺酸基结构与碱性氨基酸 LYS242 和 HIS246 形成静电相互作用。更重要的是, 其磺酸基结构可以与氨基酸残基 HIS246 和 ASP248 形成四重氢键作用, 如图 7c。可能正是由于这样一种稳定的作用模式, 使得化合物 CBBG-250 可以与 BSA 形成稳定的复合物。

## 3 结论

3.1 利用紫外-可见光谱法研究了 CBBG-250 与 BSA 的相互作用机制。结果表明, 在温度为 298 K、303 K、308 K 和 313 K 下结合形成常数分别为  $5.03 \times 10^4$ 、 $3.04 \times 10^4$ 、 $2.84 \times 10^4$  和  $1.99 \times 10^4$  L/mol, 随温度升高而减小, 整个反应过程是焓、熵联合驱动自发进行, 热力学焓变 ( $\Delta H$ ) 和熵变 ( $\Delta S$ ) 分别为  $-45.3229$  kJ/mol 和  $-139.1847$  J/(K mol), 说明分子间作用力以氢键和范德华力为主。

3.2 此外, 傅里叶红外光谱法和圆二色谱法对 BSA 的构象研究结果表明, BSA 特征谱带酰胺 I 带 ( $1600 \sim 1700$   $\text{cm}^{-1}$ ) 和酰胺 II 带 ( $1600 \sim 1500$   $\text{cm}^{-1}$ ) 的峰位发生了蓝移, 酰胺带 II 从  $1544$   $\text{cm}^{-1}$  移动到  $1573$   $\text{cm}^{-1}$ , 酰胺带 I 由  $1650$   $\text{cm}^{-1}$  分裂成  $1710$   $\text{cm}^{-1}$ , 即 BSA 中的  $\alpha$ -螺旋 (特征带  $1650 \sim 1658$   $\text{cm}^{-1}$ ) 和  $\beta$ -折叠 (特征带  $1620 \sim 1640$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $1675$   $\text{cm}^{-1}$ ) 结构发生了变化,  $\alpha$ -螺旋结构降低。圆二色谱的定量计算结果表明, CBBG-250 与 BSA 的相互作用引起了  $\alpha$ -螺旋含量的降低。从分子对接分析的结果来看, 范德华力和氢键作用共同组成主要结合作用力, 进一步证实了光谱法的研究结果。因此, CBBG-250 与 BSA 发生相互作用会对 BSA 的二级结构产生一定影响, 两者的相互作用主要以氢键和范德华力为主。

## 参考文献

- [1] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 72, 248-254
- [2] Macart M, Gerbaut L. An improvement of the Coomassie Blue dye binding method allowing an equal sensitivity to various proteins: application to cerebrospinal fluid [J]. Clinica Chimica Acta, 1982, 122(1): 93-101
- [3] 曹稳根, 赵海泉, 焦庆才. 考马斯亮蓝与牛血清白蛋白相互

- 作用机理的研究(英文)[J].激光生物学报,2008,17(1):32-37  
CAO Wen-geng, ZHAO Hai-quan, JIAO Qing-cai. Mechanism of the interaction between coomassie brilliant blue and bovine serum albumin [J]. Acta Laser Biology Sinica, 2008, 17(1): 32-37
- [4] 曹稳根,焦庆才,刘茜,等.考马斯亮蓝显色剂变色反应机理的研究[J].化学学报,2002,60(9):1656-1661  
CAO Wen-gen, JIAO Qing-cai, LIU Xi, et al. Study on the mechanism of color changes of coomassie brilliant blue G-250 [J]. Acta Chimica Sinica, 2002, 60(9): 1656-1661
- [5] 郭敏亮,姜涌明.考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[J].生物化学与生物物理进展,1996,23(6):558-561  
GUO Min-liang, JIANG Yong-ming. Progress in biochemistry and biophysics [J]. 1996, 23(6): 558-561
- [6] Compton S J, Jones C G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay [J]. Analytical Biochemistry, 1985, 151(2): 369-374
- [7] 王永刚,马建忠,马雪青,等.响应面法优化考马斯亮蓝 G-250 溶液的配制[J].药物生物技术,2013,(1):57-62  
WANG Yong-gang, MA Jian-zhong, MA Xue-qing, et al. Pharmaceutical Biotechnology [J]. 2013, (001): 57-62
- [8] CHEN Zhan-guang, LIU Guo-li, CHEN Mei-hong, et al. Determination of nanograms of protein based on decreased resonance light scattering of zwitterionic Gemini surfactant [J]. Analytical Biochemistry, 2009, 384(2): 337-342
- [9] Schaffner W, Weissmann C. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution [J]. Analytical Biochemistry, 1973, 56(2): 502-514
- [10] Spector T. Refinement of Coomassie blue method of protein quantitation: a simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein [J]. Analytical Biochemistry, 1978, 86(1): 142-146
- [11] Duhamel R C, Meezan E, Brendel K. The addition of SDS to the Bradford dye-binding protein assay, a modification with increased sensitivity to collagen [J]. Journal of Biochemical And Biophysical Methods, 1981, 5(2): 67-74
- [12] Löffler B M, Kunze H. Refinement of the Coomassie brilliant blue G assay for quantitative protein determination [J]. Analytical Biochemistry, 1989, 177(1): 100-102
- [13] López J M, Imperial S, Valderrama R, et al. An improved Bradford protein assay for collagen proteins [J]. Clinica Chimica Acta, 1993, 220(1): 91-100
- [14] 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,(1):240-243  
LI Rui, DAI Ben-cai, ZHAO Yong-de, et al. Application and development of spectroscopy methodologies in the study on non-covalent interactions [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(1): 240-243
- [15] 何梅,夏之宁,阴永光,等.紫外光谱研究中药大黄有效成分与牛血清白蛋白的相互作用[J].中国现代应用药学杂志,2004,21(6):429-433  
HE Mei, XIA Zhi-ning, YIN Yong-guang, et al. Research on interactions between effective multicomponents of Radix et Rhizoma Rhei with bovine serum albumin by ultraviolet-visible spectra analysis [J]. Chin. JMAP, 2004, 21(6): 429-433
- [16] 姚虹,魏太保,徐维霞,等.β-环糊精与二苯硫脲,二苯脲包结作用的紫外光谱研究[J].光谱学与光谱分析, 2006, 26(9): 1664-1667  
YAO Hong, WEI Tai-bao, XU Wei-xia, et al. UV spectroscopic characterization of the inclusion interaction of β-cyclodextrin and sym-diphenyl-thiourea and sym-diphenyl- urea [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2006, 26(9): 1664-1667
- [17] Li Jin-hua, Ren Cui-ling, Zhang Ya-heng, et al. Human serum albumin interaction with honokiol studied using optical spectroscopy and molecular modeling methods [J]. Journal of Molecular Structure, 2008, 881: 90-96
- [18] Lu Yan, Wang Gong-ke, Lu Xiu-min, et al. Molecular mechanism of interaction between norfloxacin and trypsin studied by molecular spectroscopy and modeling [J]. Spectrochimica Acta Part A 75,2010: 261-266
- [19] Jianghong Tang, Feng Luan, Xing guo Chen. Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FT-IR, and molecular modeling [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14, 2006: 3210-3217
- [20] Lloyd J B F. Synchronized excitation of fluorescence emission spectra [J]. Nature, 1971, 231(20): 64-65