

# 蛋白质分子间相互作用影响土大黄苷-蛋白质组相互作用的研究

郭明<sup>1,2\*</sup>, 王燕<sup>2</sup>, 徐兴涛<sup>3</sup>

(浙江农林大学 1. 理学院, 2. 工程学院, 浙江 临安 311300; 3. 塔里木大学生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

**摘要:** 荧光光谱结合全反射傅立叶红外光谱研究土大黄苷 (rhaponticin, RT) 与混合蛋白质组 [BSA (bovine serum albumin)-BLF (bovine lactoferrin)] 的相互作用, 分析其相互作用的影响因子。荧光光谱实验表明, 药物 RT 猝灭混合蛋白质组的荧光强度, 蛋白质组的最大发射波长明显红移, 表明 RT 与蛋白质组之间存在着相互作用, 该相互作用受蛋白质组中单组分蛋白质分子间相互作用及不同组分蛋白质分子间相互作用的影响。本工作建议用总体微环境因子 ( $I_{OM}$ ) 来定量表达影响 RT-混合蛋白质组之间相互作用的溶液微环境因素。全反射傅立叶红外光谱法实验表明, 药物 RT 与混合蛋白质组的相互作用过程中, 蛋白质组中各组分蛋白质分子二级构象均发生了变化, 分子结构不同, 构象变化程度差异明显。蛋白质组中单组分蛋白质分子间的相互作用影响蛋白质分子二级构象变化, 浓度与比例不同, 相互作用不同, 影响分子构象变化程度不同。荧光光谱与红外光谱结果基本一致, 可为研究 RT 与 BSA-BLF 蛋白质组相互作用提供探讨性参考。

**关键词:** 土大黄苷; 牛血清白蛋白; 牛乳铁蛋白; 总体微环境影响因子; 二级构象

中图分类号: R914

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 02-0271-08

## The interaction between BLF and BSA and impact in interaction of RT-BSA-BLF system

GUO Ming<sup>1,2\*</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>, XU Xing-tao<sup>3</sup>

(1. School of Science, 2. School of Engineering, Zhejiang Agricultural & Forestry University, Lin'an 311300, China; 3. School of Life Science, Tarim University, Alaer 843300, China)

**Abstract:** The binding of rhaponticin to bovine serum albumin (BSA)-bovine lactoferrin (BLF) and the factors that affect BSA-BLF interaction have been studied by fluorescence spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy. In the fluorescence experiment, RT quenched the fluorescence intensity of mixed proteome and the maximum emission wavelength of BSA, BLF and BSA-BLF proteins system. RT caused obvious red-shift fluorescence for an interaction between RT and proteome. The interaction between RT and proteome was impacted by single-component protein molecular interactions and the interaction between RT-BSA and RT-BLF, the microenvironment of solutions were the factors impacting the interactions between RT and proteome, which impacted quantitative expression of the general environment micro environmental factors. In the Fourier transform infrared spectroscopy, the secondary conformation of protein molecules of single component in the protein group were changed, and the difference of the molecules' structure was responsible for the differences in the molecular conformation changes. The molecules' interaction in the single-component protein affected secondary conformation of the proteins' molecule. The proteins' concentration ratio and the interaction were different in degree of molecular conformational change. These data demonstrates an example

收稿日期: 2016-06-15; 修回日期: 2016-08-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20877072); 浙江省自然科学基金资助项目 (LY14E030016).

\*通讯作者 Tel: 86-571-63740852, E-mail: guoming@zafu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0580

of combination of fluorescence spectrum experiment with Fourier transform infrared spectroscopy in the study of protein structure.

**Key words:** rhaponticin; bovine serum albumin; bovine lactoferrin; overall microenvironmental influence factor; secondary conformation

目前,组学是药学、生物学等领域的研究重点,而相互作用是组学研究热点。蛋白质组间的相互作用是研究药物与蛋白质组相互作用的前提。药物与单一蛋白质分子的相互作用研究已有诸多报道<sup>[1,2]</sup>,但是,药物的体液(血液)输运过程不只涉及一种蛋白分子,故药物与单一蛋白质分子的相互作用仅是最简单的模型。人体血液中的高丰度血清蛋白质种类达15000种以上,从全蛋白质组与药物相互作用来探究药理作用需要考虑太多因素,难以获得合理数据,因此研究蛋白质组之间的相互作用及蛋白质组与药物分子之间的相互作用是研究全蛋白质组与药物相互作用的必由之路。

考察蛋白质组与药物相互作用能获得真实的药理学机制,药物输运过程涉及混合蛋白质组,混合蛋白体系的浓度、分布和空间构象无疑对载运药物分子起着关键作用<sup>[3]</sup>。因此,研究药物与蛋白质分子结合作用机制首先要研究混合蛋白体系的浓度、分布和药物分子空间构象等情况。当前,药物与蛋白质组相互作用的研究鲜有文献报道,土大黄苷(rhaponticin, RT)分子式为 $C_{21}H_{24}O_9$ (化学名为3-羟基-5-[(1'E)-2''-(3'-羟基-4'-甲氧基苯基)乙烯基]苯基- $\beta$ -D-葡萄糖苷),为二苯乙烯衍生物。RT是广泛存在于蓼科植物叶中的中药活性成分,分子结构清楚且表征谱特征明显,具有相应的前期研究基础<sup>[4]</sup>。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)或牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, BLF)与药物的相互作用已有文献<sup>[5,6]</sup>报道,蛋白质分子间的相互作用研究已有大量成果<sup>[7,8]</sup>,故开展RT与BSA-BLF混合蛋白质组的相互作用研究具有理论依据。本工作分析了BSA-BLF混合蛋白质组之间的相互作用影响RT与BSA-BLF混合蛋白质组的相互作用,对研究药物分子与混合蛋白质组体系的相互作用及建立相应的理论模型具有重要意义<sup>[9]</sup>。

## 材料与方法

**材料** 土大黄苷(rhaponticin, RT,  $\geq 99\%$ , 南京泽郎医药科技有限公司);牛乳铁蛋白(bovine lactoferrin, BLF,  $\geq 98\%$ , 上海华美生物工程公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA,  $\geq 98\%$ , 上海华美生物工程公司);三羟甲基氨基甲烷(Tris, GR,

上海华美生物工程公司);其他试剂为分析纯试剂,实验用水为亚沸蒸馏去离子水。配制为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.4),用此缓冲液配制 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BSA/BLF及 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  RT 贮备液,另外,再用此缓冲液分别配制1、3、5、7、9和 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BSA/BLF体系作为对照,并配制0.1、0.3、0.5、0.7、0.9和 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的RT溶液。配制 $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}$ 浓度比分别为1/9、3/7、5/5、7/3和9/1,总浓度为 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BSA-BLF混合蛋白质组溶液体系。红外光谱实验所用的BSA、BLF和BSA-BLF体系的总浓度均为 $0.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**仪器** F-7000型荧光光度计(日本Hitachi公司);IR Prestige-21傅立叶变换红外光谱仪(日本Shimadzu公司),衰减全反射附件(ATR)。

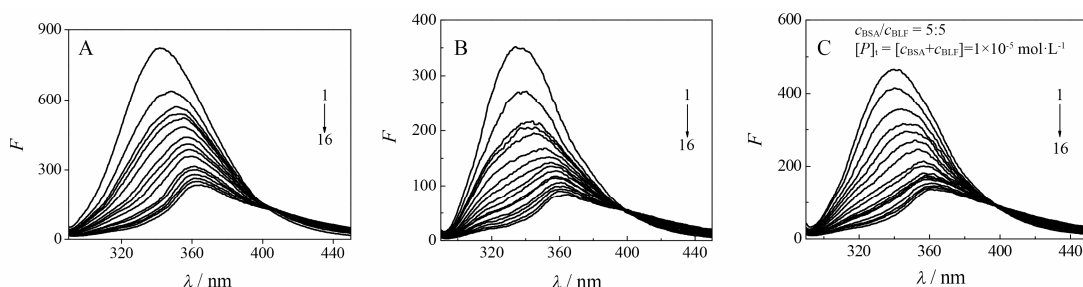
**RT与BSA-BLF蛋白质组的相互作用** 移取BSA/BLF/BSA-BLF溶液2.5 mL于1 cm比色皿,逐次加入 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  RT溶液进行荧光滴定,RT的量分别为10、10、5、15、20、20和20  $\mu\text{L}$ ,移取1、3、5、7、9和 $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  BSA/BLF溶液于1 cm比色皿,以及分别移取 $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}$ 浓度比分别为1/9、3/7、5/5、7/3和9/1,总浓度为 $0.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的BSA-BLF混合蛋白质组溶液于1 cm比色皿,逐次加入0.1、0.3、0.5、0.7、0.9和 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的RT溶液进行荧光滴定,Tris-HCl缓冲溶液做荧光空白校正,发射与激发狭缝宽度均为2.5 nm,波长扫速 $240 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ ,固定激发波长282 nm,室温下绘制250~500 nm发射光谱。

**BSA、BLF、BSA-BLF与RT的相互作用对蛋白质二级结构的影响** 分别将加入RT前后的BSA、BLF和不同浓度比BSA-BLF的混合蛋白质组溶液及缓冲液均匀地铺满ATR的ZnSe晶片, $4 \text{ cm}^{-1}$ 分辨率下,扫描60次,收集加入RT前后的不同蛋白质溶液体系扣除缓冲溶液吸收后的红外光谱,所得图谱进行二阶求导和去卷积处理后,分析蛋白质二级结构变化。

## 结果与讨论

### 1 药物RT与蛋白质组(BSA-BLF)的相互作用

图1为单蛋白质分子(BLF、BSA)、混合蛋白质组(BSA-BLF)与药物(RT)的相互作用荧光谱。



**Figure 1** The fluorescence emission spectra of bovine serum albumin (BSA, A), bovine lactoferrin (BLF, B) and BLF-BSA system (C) in the absence and presence of rhaponticin (RT).  $\lambda_{\text{ex}}=282 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=250\text{--}500 \text{ nm}$ .  $c_{\text{BSA}}=c_{\text{BLF}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BSA-BLF}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{RT}} (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$ , 1 to 16: 0, 0.40, 0.80, 1.00, 1.20, 1.60, 2.04, 2.48, 2.88, 3.32, 4.20, 4.60, 5.04, 5.48, 5.92, 6.36

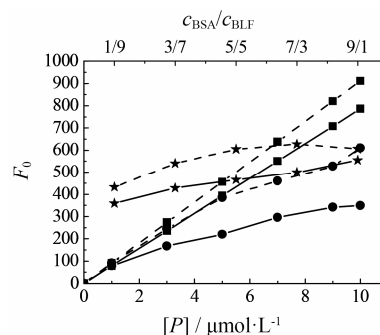
从图 1 可知, BSA、BLF 及 BSA-BLF 蛋白质组在 341、336 和 339 nm 有很强的荧光发射峰, 随着 RT 浓度增加, BSA、BLF 及 BSA-BLF 蛋白质组的荧光均被有规律地猝灭, 表现出浓度依赖型的荧光猝灭现象, 说明 RT 分别与 BSA、BLF 及 BSA-BLF 蛋白质组发生了相互作用。RT 与 BSA、BLF 及 BSA-BLF 蛋白质组相互作用的荧光最大发射峰位置明显红移, 说明 RT 与 BSA、BLF 及 BSA-BLF 蛋白质组相互作用中, 均使 BSA、BLF 及 BSA-BLF 分子结构中部分微区所处的化学环境发生改变。

在 RT-蛋白质组相互作用体系中, 根据荧光强度线性加和性原理, BSA-BLF-RT 体系的理论  $F$  值 (荧光强度) 应为相应 RT 与 BSA、BLF 蛋白质分子单独相互作用的  $F$  值之和。例如  $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=5/5$  的 BSA-BLF ( $c=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与 RT 相互作用后的理论  $F$  值, 应为 RT 分别与单独的 BSA ( $c=5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、BLF ( $c=5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相互作用的  $F$  值之和。通过比较 BSA-BLF-RT 体系的理论  $F$  值与实际  $F$  值大小, 可以说明 RT-BSA-BLF 体系中, BSA 与 BLF 相互作用对荧光效应的影响。图 1C 为 RT 与 BSA-BLF ( $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=5/5$ ) 的相互作用荧光谱, 其余比例的 BSA-BLF 与 RT 相互作用的荧光谱类似, 没有一一列出。分析可知, BSA-BLF 体系 ( $c=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与 RT 相互作用后的实际  $F$  值不等于其理论  $F$  值, 说明其  $F$  值无加和性, 不遵循线性加和性原理, 说明 RT 与蛋白质组相互作用受 BLF-BSA、BSA-BSA 及 BLF-BLF 之间的相互作用等因素的影响。

荧光法研究药物与单一蛋白相互作用时, 根据实验数据可采用不同理论方程拟合获得合理的药物-蛋白质相互参数<sup>[11,12]</sup>。本实验是关于药物与蛋白质组的相互作用研究, 不同于药物与单一蛋白相互作用体系, 目前尚没有成熟的药物与蛋白质组相互作用的猝灭机制方程, 将在后续研究中探索。

## 2 蛋白质组 (BSA-BLF) 中单蛋白质分子间的相互作用分析

蛋白质组的测量  $F$  值通常受体系中蛋白质分子间 (环境因素) 相互作用的影响<sup>[10]</sup>, 为阐明 BSA-BLF 与 RT 相互作用中单蛋白质分子间的相互作用, 进一步简化复杂相互作用体系, 直观观察蛋白质分子微环境变化对蛋白质分子  $F$  值的影响。首先考虑同种蛋白之间的相互作用, 用 RT 加入前蛋白分子的  $F_0$  值对蛋白质浓度  $[P]$  作图, 通过 BSA/BLF 浓度变化探索同种蛋白质分子间的相互作用, 进一步考虑不同种蛋白质分子间的相互作用, 以混合蛋白质组为对象, 考察 BSA-BLF 中 BSA 与 BLF 的相互作用。同样用蛋白质组的  $F_0$  值对蛋白组的浓度比  $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}$  作图, 结果见图 2。



**Figure 2** The theoretical and reality fluorescence intensity of different concentrations of BSA (■), BLF (●) and BSA-BLF (★) system in the absence of RT. The  $c_{\text{BSA}}$  and  $c_{\text{BLF}}$  range from 1–10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively; the total concentration of BSA-BLF is 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (broken lines stand for the theoretical fluorescence intensity without overall microenvironmental influence)

从图 2 可知, 在一定浓度范围, 蛋白质分子的  $F$  值与其浓度并不呈简单的线性关系, 说明蛋白的  $F$  值随着浓度变化受其所处微环境的影响。深入分析, 可能为蛋白质分子自身相互作用。随着 BSA、BLF 浓度的上升, BSA/BLF 分子通过氢键或者静电力等

聚集在一起甚至形成团聚体导致其  $F$  值比理论  $F$  值偏低。观察发现 BSA 的  $F$  值随浓度变化的趋势曲线远比 BLF 更加接近理想状态下的理论值, 说明 BLF 的荧光效应更易受微环境影响, 在其浓度上升时, BLF 由于更加“柔性”, BLF 分子很可能聚集在一起, 其相应的  $F$  值比理想状态下的  $F$  值低很多, 造成实际  $F$  值偏离理论值较远。相对来说, BSA 随着其浓度的上升, 其  $F$  值会比理论值偏低, BSA 由于更加“刚性”, 但偏离较小, 在高浓度时不易聚合在一起。BSA-BLF 体系实际的  $F$  值比理论加和值偏小, 原因是由于蛋白质分子自身的相互作用及 BSA 和 BLF 之间的相互作用, 导致实际的  $F$  值比理论加和值偏小。观察图 2 发现, 蛋白分子  $F$  值的真实值 (图中实线部分) 偏离理想状态下的理论值 (图中虚线部分) 越远, 说明蛋白质受微环境影响程度越大, 即蛋白分子自身相互作用越大。为了量化阐述微环境对蛋白质浓度变化时荧光效应的影响, 本文提出一个参数——总体微环境影响因子 (overall microenvironmental influence factor,  $I_{OM}$ )。

$$I_{OM} = (J_T - J_M) / J_T \quad (1)$$

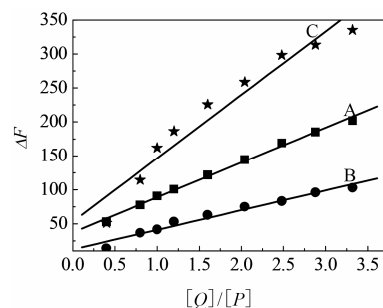
式 1 中  $J_T$  是图 2 蛋白荧光曲线理想状态下理论  $F$  值的积分,  $J_M$  是蛋白荧光曲线实际状态下测量实际  $F$  值的积分。通过计算, BSA 的  $I_{OM}=0.2517$ , BLF 的  $I_{OM}=0.4481$ 。BSA-BLF 的  $I_{OM}=0.1927$ 。

$I_{OM}(\text{BSA-BLF}) < I_{OM}(\text{BSA}) < I_{OM}(\text{BLF})$  的结果与图 2 的表象分析和实验数据一致。BSA-BLF 的  $I_{OM}$  比 BSA、BLF 的  $I_{OM}$  偏小, 说明 BSA-BLF 受微环境影响程度比 BSA、BLF 小。BSA-BLF 体系中, 由于 BSA-BLF、BSA-BSA、BLF-BLF 复杂相互作用, 使其受微环境影响较 BSA、BLF 偏小。说明同种、不同种蛋白之间相互作用受微环境的影响是不同的, 而且还受蛋白质分子自身相互作用的影响。

### 3 RT 与 BSA-BLF 相互作用中单蛋白质分子间的相互作用分析

蛋白质组溶液中, 同种、不同种蛋白质分子间的相互作用对 RT 与混合蛋白质组的相互作用均有影响。在一定浓度 RT, 分析组成蛋白质混合物体系中单组分蛋白质分子间的相互作用及不同组分蛋白质分子间的相互作用, 测定相应蛋白浓度和其相应浓度的  $F$  值, 分析 BSA/BLF/BSA-BLF 与 RT 相互作用体系的微环境变化。图 3 为 RT 浓度  $[Q]$  与蛋白浓度  $[P]$  的比值与荧光下降值  $\Delta F$  ( $\Delta F = F_0 - F$ ) 的关系图。

从图 3 可知,  $[Q]/[P]$  小于 3.5 时, RT 能够成正比



**Figure 3** The plot of BSA/BLF/BSA-BLF protein fluorescence reduction ( $\Delta F$ ) vs  $[Q]/[P]$  (A:  $c_{\text{BSA}} = 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; B:  $c_{\text{BLF}} = 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; C:  $[P]_t = c_{\text{BSA}} + c_{\text{BLF}} = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}} = 1$ )

地猝灭 BSA/BLF/BSA-BLF 的荧光强度 (其他浓度的 BSA、BLF 和其他浓度比的 BSA-BLF 荧光下降值  $\Delta F$  与  $[Q]/[P]$  关系图没有一一列于图 3), RT 浓度  $[Q]$  与 BSA/BLF/BSA-BLF 浓度  $[P]$  的比值与 BSA/BLF/BSA-BLF 荧光下降值  $\Delta F$  ( $\Delta F = F_0 - F$ ) 呈现良好的线性关系。图 3 的斜率 (slope,  $S$ ) 的化学意义是当 RT 浓度等于蛋白浓度 ( $[Q]/[P]=1$ ,  $[Q]/[P] \leq 3.5$ ) 时, RT 分子对蛋白自身荧光的平均猝灭值。可见,  $S$  能够反映 RT 分子在一定浓度范围内与 BSA/BLF/BSA-BLF 体系的相互作用程度。BSA/BLF/BSA-BLF 体系的  $S$  值分别列于表 1。

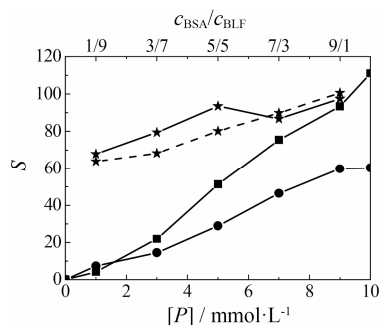
**Table 1** The average fluorescence reduction ( $\Delta F$ ) of per RT molecule acting on the per BSA/BLF/BSA-BLF fluorescence emitter

RT-BSA/BLF/BSA-BLF solution system/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Slope	$R$
1 BSA-RT	4.07	0.985 6
3 BSA-RT	21.84	0.990 7
5 BSA-RT	51.33	0.997 8
7 BSA-RT	75.40	0.994 4
9 BSA-RT	93.33	0.989 0
10 BSA-RT	111.06	0.990 3
1 BLF-RT	7.30	0.999 9
3 BLF-RT	14.43	0.997 2
5 BLF-RT	28.84	0.985 5
7 BLF-RT	46.39	0.976 6
9 BLF-RT	59.74	0.973 9
10 BLF-RT	60.28	0.967 6
1 BSA-BLF ( $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=1:9$ )-RT	67.81	0.967 9
1 BSA-BLF ( $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=3:7$ )-RT	79.41	0.992 2
1 BSA-BLF ( $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=5:5$ )-RT	93.49	0.971 1
1 BSA-BLF ( $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=7:3$ )-RT	86.71	0.988 7
1 BSA-BLF ( $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=9:1$ )-RT	97.45	0.985 9

进一步分析 RT 在一定浓度范围 ( $[Q]/[P] \leq 3.5$ ) 与 BSA/BLF/BSA-BLF 体系的相互作用程度, 对 BSA/BLF/BSA-BLF-RT 相互作用体系的  $S$  值与蛋白的浓

度 $[P]$ 作图, 得到图 4。

图 4 结合表 1 可见, 单一蛋白质 BSA/BLF-RT 作用体系, 蛋白质浓度越高, 单位浓度 RT 对单一蛋白质的荧光猝灭程度越大。BSA-RT 随着 BSA 浓度增大, 单位浓度 RT 对单位浓度 BSA 的平均荧光猝灭值呈大致直线上升关系。相比而言, BLF-RT 随 BLF 浓度增大, 单位浓度 RT 对单位浓度 BLF 的平均荧光猝灭值不像 BSA 那样呈比例增大, 而是随 BLF 浓度升高, 曲线趋于平缓。说明 BLF 相对于 BSA 而言更易受到微环境影响, BLF 更加“柔性”, 在浓度上升时其更易聚集而造成实际荧光值偏离理论值较远, 同时 RT 在 BLF 高浓度时不易插入其内部, 所以单位浓度 RT 对单位浓度 BLF 的平均荧光猝灭值在 BLF 高浓度时没有随着 BLF 浓度升高而显著增大; 相对来说, BSA 则更加“刚性”, 高浓度时也不易团聚在一起, 因此随着 BSA 浓度上升, RT 依然能够比较容易作用于 BSA 分子。



**Figure 4** The trend curve of the slope of the RT-BSA (■)/BLF (●)/BSA-BLF (★) system's average fluorescence reduction ( $\Delta F$ ). The  $c_{\text{BSA}}$  and  $c_{\text{BLF}}$  range from 1 to 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , and the total concentration of BSA-BLF is 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 4 中虚线部分表示的理论 BSA-BLF 的  $S$  值是通过图 4 中对相应的蛋白各组分  $S$  值的加和值。例如, BSA-BLF ( $c_{\text{BSA}}/c_{\text{BLF}}=1:9$ ,  $c_{\text{total}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 体系-RT 相互作用的理论  $S$  值是  $S_{\text{BSA-RT}}$  ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 与

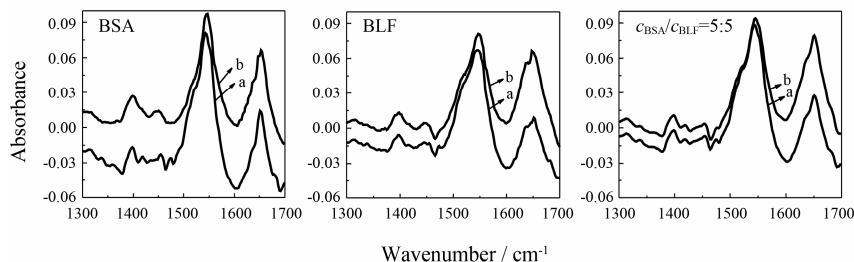
$S_{\text{BLF-RT}}$  ( $9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 之和。图 4 结合表 1 可见, 对于 BSA-BLF 体系 (浓度比为 1:9、3:7 和 5:5 三组实验), 实际  $S$  值比理论  $S$  值高; 其余两组实际  $S$  值比理论  $S$  值低。说明 RT-BSA-BLF 体系中, BSA 对高浓度下聚集在一起的 BLF 能起到“解聚”作用, BSA 与 BLF 相互作用影响 BLF 与 BLF 的相互作用, 使 BLF 能够在溶液环境中更加分散, 从而有利于 RT 对 BLF 的荧光猝灭作用, 使 RT 对 BLF 分子的实际单位平均荧光下降值有所增加, 因此随着混合蛋白质组体系中 BLF 浓度比例增大, 实际单位平均荧光下降值  $S_{\text{实际}}$  比理论值  $S_{\text{理论}}$  高。相比而言, BSA 在高浓度时也有轻微的聚合作用, 但是 BLF 对高浓度下聚集在一起的 BSA 分子不具有像 BSA 同样的“解聚”作用。因此, 随着混合蛋白体系中 BSA 浓度比例的增多, 其理论值  $S_{\text{理论}}$  比实际值  $S_{\text{实际}}$  略微大一些。

以上实验数据表明 RT 与蛋白质组之间存在着相互作用, 该相互作用受蛋白质组中同种蛋白质分子之间的相互作用及不同种蛋白质分子之间的相互作用的影响。混合蛋白质组中蛋白质分子结构不同, 溶液微环境影响 RT-混合蛋白质组之间相互作用存在差异。

#### 4 RT 对 BSA-BLF 蛋白质组体系二级构象的影响

为阐述 RT 与 BSA-BLF 的相互作用机制, 利用傅立叶变换红外光谱进一步分析 RT 作用于 BSA-BLF 时对蛋白质分子二级构象变化的影响<sup>[11]</sup>。分析 RT 与 BSA、BLF 和 BSA-BLF 相互作用的 FT-IR 谱 (其他混合比例蛋白质组的 IR 谱类似, 没有一一列出), 见图 5。

蛋白质分子的红外光谱能够反映“酰胺带”的峰值, 这些峰值能够反映出蛋白质分子肽链结构的变化<sup>[12]</sup>, 通过傅立叶变换红外光谱可以定量确定蛋白质的二级结构含量变化。目前, 对蛋白质二级结构红外图谱归属研究比较成熟的是酰胺 I 带 ( $1600\sim 1700 \text{cm}^{-1}$ ) 和酰胺 II 带 ( $1500\sim 1600 \text{cm}^{-1}$ )<sup>[13]</sup>。酰胺 I 带



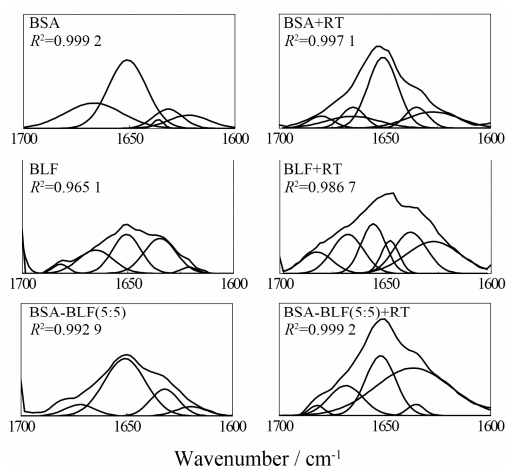
**Figure 5** The FT-IR spectra and difference spectra of BSA/BLF/BSA-BLF in absence and presence of RT. (a) FT-IR spectra of apo protein(s); (b) FT-IR difference spectra [(protein(s) + RT solution) - (RT solution)] in buffer solution in the region of 1 300-1 700  $\text{cm}^{-1}$ . (the total concentration of protein or proteome 0.9  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the  $c_{\text{RT}}=0.9 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

的红外光谱的峰位 (约在  $1651\text{ cm}^{-1}$ ) 主要反应蛋白质分子内肽链上 C=O 与 NH 所组成氢键的伸缩运动。酰胺 II 带红外光谱的峰位 (约在  $1543\text{ cm}^{-1}$ ) 主要反映蛋白质分子内部肽链上 C-N 键的伸缩和 N-H 键的弯曲运动<sup>[1]</sup>。本实验蛋白质体系酰胺 I 带和酰胺 II 带的峰位列于表 2。

从图 5 和表 2 可知, RT 的加入使 BSA 酰胺 I 带的峰位从  $1651.04$  移动到  $1652.97\text{ cm}^{-1}$ , BLF 从  $1651.04$  移动到  $1647.19\text{ cm}^{-1}$ , 说明 RT 与 BSA 和 BLF 分子中的 C=O 基团发生相互作用。RT 的加入并没有改变混合蛋白质组体系酰胺 I 带的峰值, 说明在 BSA-BLF 体系中, 由于 BSA 与 BLF 的相互作用以及 BSA-BSA 与 BLF-BLF 的相互作用等影响, 使 RT 不再与其分子内部的 C=O 基团作用。BLF 分子酰胺 II 带的峰位和 BSA-BLF (1:9) 的峰位相同, BSA 分子酰胺 II 带的峰位和其余几组 BSA-BLF 体系的峰位一致, 这是因为 BSA 能够破坏团聚在一起的 BLF 分子, 使 BLF 在溶液中更加分散, 而 RT 会优先对 BSA 酰胺 II 带发生影响, 从而导致 BSA 酰胺 II 带的峰位和其余几组 BSA-BLF 体系的峰位一致。除了 BSA-BLF (1:9) 之外的混合蛋白质组体系在加入 RT 后, 酰胺 II 带的峰值均发生了改变且变化程度一致, 这说明 RT 与蛋白质组分子内部的 C-N 键和 N-H 键均发生了作用, RT 对 BSA 分子内部 C-N 键和 N-H 键的影响大于 BLF 分子。总之, RT 的加入使蛋白质组体系分子内部的部分微区结构发生了改变。RT 与混合蛋白质组的相互作用过程中, 蛋白质组中各蛋白质分子的微区构象均发生了变化, 分子结构不同, 分子微区构象变化程度差异明显。

通过分析全反射傅立叶变换红外光谱的酰胺 I 带峰位, 能够详细了解蛋白质分子在药物分子作用前后二级构象的变化<sup>[13, 14]</sup>。酰胺 I 带对蛋白质分子二级结构变化的反应比酰胺 II 带更加敏感, 因而通过研究酰胺 I 带得出蛋白质分子二级结构的变化实

用性更大, 应用也更广泛。将得到的红外光谱用二阶导数、去卷积技术进行处理, 把原来酰胺 I 带中未能分辨的峰进一步分解为多个子峰, 并指出各个子峰的峰位置, 再通过曲线拟合方法, 定量分析 BSA 分子中二级结构的各个组分。目前蛋白质酰胺 I 带 ( $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ) 谱峰归属已经比较成熟<sup>[14, 15]</sup>:  $1610\sim 1640\text{ cm}^{-1}$  为  $\beta$ -折叠;  $1650\sim 1658\text{ cm}^{-1}$  为  $\alpha$ -螺旋;  $1658\sim 1695\text{ cm}^{-1}$  为  $\beta$ -转角。图 6 和表 3 分别是应用二阶导数、去卷积谱方法对不同的药物-蛋白质 (组) 体系进行典型曲线拟合获得的拟合图和蛋白质 (组) 体系的二级结构组分表, 其中其他比例混合蛋白组的曲线拟合图与图 6 类似, 没有一一列出。



**Figure 6** The curve-fit amide I region with secondary structure determination of free BSA/BLF/BSA-BLF and RT-BSA/BLF/BSA-BLF system in buffer in the region of  $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ . The total concentration of BSA/BLF/BSA-BLF =  $0.9\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  and the concentration of RT =  $0.9\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

从图 6 和表 3 可以获得在加入 RT 前后 BSA/BLF 蛋白体系的二级构象的信息。对于 BSA 分子, 加入 RT 后 (加入的 RT 分子与蛋白质的浓度相等), BSA 的二级结构中  $\beta$ -折叠含量从 22.82% 升高到 27.88%,  $\beta$ -转角含量从 27.54% 升高到 28.76%, 而  $\alpha$ -螺旋含量

**Table 2** The peak positions of protein(s) in amide I and amide II regions

Protein(s) system	C-N stretch coupled with N-H bending mode peak position of protein(s)/ $\text{cm}^{-1}$		C=O stretch peak position of protein(s)/ $\text{cm}^{-1}$	
	Without RT	With RT	Without RT	With RT
BSA	1543.03	1546.89	1651.04	1652.97
BLF	1544.96	1546.89	1651.04	1647.19
BSA-BLF (1:9)-RT	1544.96	1544.96	1651.04	1651.04
BSA-BLF (3:7)-RT	1543.03	1544.96	1651.04	1651.04
BSA-BLF (5:5)-RT	1543.03	1544.96	1651.04	1651.04
BSA-BLF (7:3)-RT	1543.03	1544.96	1651.04	1651.04
BSA-BLF (9:1)-RT	1543.03	1544.96	1651.04	1651.04

**Table 3** The effect of RT on the assignments of the secondary structure of BSA/BLF/BSA-BLF system before and after the treatment of RT

Protein(s) system	Secondary structure composition of protein(s)/%		
	$\beta$ -Sheet	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Turn
BSA	22.82	49.63	27.54
BSA-RT	27.88	43.36	28.76
BLF	21.61	19.56	58.83
BLF-RT	45.34	8.60	46.05
BSA-BLF (1 : 9)	24.28	42.02	33.70
BSA-BLF (1 : 9)-RT	24.06	35.78	40.16
BSA-BLF (3 : 7)	18.32	43.38	38.30
BSA-BLF (3 : 7)-RT	31.01	33.82	35.17
BSA-BLF (5 : 5)	20.45	45.99	33.56
BSA-BLF (5 : 5)-RT	55.86	26.78	17.36
BSA-BLF (7 : 3)	22.77	47.68	29.55
BSA-BLF (7 : 3)-RT	30.21	30.90	38.89
BSA-BLF (9 : 1)	26.35	50.03	23.61
BSA-BLF (9 : 1)-RT	24.96	40.28	34.75

从 49.63% 下降到 43.36%。对于 BLF, RT 的加入使 BLF 二级结构中  $\beta$ -折叠含量上升,  $\beta$ -转角和  $\alpha$ -螺旋含量均有所降低, 且 BLF 的  $\alpha$ -螺旋含量从 19.56 下降到 8.60%。对于 BSA 和 BLF 分子, RT 的加入均能使其分子二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量降低, 说明 BSA 和 BLF 分子的刚性结构减少, 分子整体的肽链结构较加入 RT 之前更加松散, 并且 RT 对 BLF 的影响更为显著, 也就是说 RT 对 BLF 的“舒展”能力更强, 结论也与荧光实验结论一致。

从图 6 和表 3 可以获得 RT 作用于 BSA-BLF 体系前后混合蛋白体系二级结构的变化。观察发现, BSA-BLF (1 : 9) 体系中虽然 BLF 所占比例大, 但此蛋白混合的二级结构组成和 BSA 的二级结构相近, 与 BLF 的二级结构差别较大。分析认为是 BSA 的红外吸收信号比 BLF 要强且 BSA 在混合蛋白溶液体系中更加分散, 因此, 尽管在 BSA-BLF (1 : 9) 体系中 BSA 的占比很小, 分散在溶液体系中的 BSA 对红外吸收光谱起主要的贡献作用。通常, 蛋白质分子的  $\alpha$ -螺旋结构对蛋白质的整体构象起支撑作用, 一般把  $\alpha$ -螺旋含量当作一个重要指标进行研究<sup>[15]</sup>。RT 的加入均使 BSA-BLF 体系中  $\alpha$ -螺旋含量降低, 说明 RT 能够使混合蛋白体系内部肽链更加舒展, 混合蛋白体系整体刚性下降。在混合蛋白体系 BSA-BLF (1 : 9) 到 BSA-BLF (9 : 1), 加入 RT 后,  $\alpha$ -螺旋含量的降低值分别为 4.24%、9.56%、19.21%、16.78% 和 9.75%。当 BSA 在 BSA-BLF 体系比重较低 (1 : 9、3 : 7) 时, BLF 主要以团聚体形式存在而 BSA 主要在

溶液中呈分布状态, 所以 RT 更容易作用于 BSA 分子。随着 BSA 含量的升高, BSA 会对部分团聚 BLF 分子起到解聚作用, 使 RT 同时作用于 BSA 和 BLF, 这是 RT 使 BSA-BLF (5 : 5) 体系二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量下降最多的主要原因。然而, 随着 BSA-BLF 体系中 BSA 含量的继续增加, RT 主要作用于 BSA, 这就导致随着 BSA 与 BLF 分子在混合蛋白体系中浓度比的增加 (7 : 3、9 : 1),  $\alpha$ -螺旋含量下降值没有 BSA-BLF (5 : 5) 的  $\alpha$ -螺旋含量下降值显著。说明在 RT 与混合蛋白质组的相互作用过程中, 蛋白质组中单组分蛋白质分子间的相互作用影响蛋白质分子二级构象变化, 浓度比不同, 相互作用不同, 从而导致影响分子构象变化程度也不同。

## 结论

本工作采用光谱技术探索蛋白质分子间相互作用对药物 (RT)-蛋白质组相互作用的影响, 除了通过荧光光谱和全反射傅立叶红外变换光谱方法进行测量外, 还做了一定的理论探索工作, 初步建立了研究蛋白质组 (BSA-BLF 体系) 与药物 (RT) 相互作用的新方法。为了量化阐述蛋白质分子间相互作用 (即蛋白分子的微环境发生改变) 对药物-蛋白质组相互作用的影响, 通过测量荧光效应的变化规律, 提出了一个参数  $I_{OM}$ , 以  $I_{OM}$  综合衡量微环境变化对药物-蛋白质组相互作用的影响, 取得了较好的结果。 $I_{OM}$  能侧面反应蛋白在溶液环境下自身构象的刚性及柔性性质。其次建立了单蛋白质分子-RT 体系与 BSA-BLF 混合蛋白质组-RT 相互作用的荧光对比模型, 为阐释混合蛋白质组体系与 RT 相互作用的荧光机制打下基础。另外, 采用全反射傅立叶红外变换谱具体分析 RT 对 BSA/BLF/BSA-BLF 混合蛋白组体系二级结构的变化, 进一步证实了荧光实验的推论并深入讨论了 RT 与 BSA-BLF 体系相互作用的机制。本工作以 BSA 与 BLF 两组分简单混合蛋白质体系模拟蛋白质组, 开展混合蛋白质组与药物的相互作用, 获得的结果具有初步的探索意义, 将为真实多组分蛋白质组与药物的相互作用研究提供创新思路和实验方法, 本文有关结果可为蛋白质组与药物相互作用的深入研究提供有益参考。

## References

- [1] Guo M, Fan WX, Hu RH. The molecular mechanism of spectroscopy combined with molecular simulation and

- characterization of DNA rhaponticin and serum albumin [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 06: 1075–1082.
- [2] Zhao Q. Study on Small Molecular Docking Technology Based on Protein Interaction (基于分子对接技术的小分子-蛋白质相互作用研究) [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.
- [3] Wu SS, Yuan WB, Wang HY, et al. Synthesis, crystal structure and interaction with DNA and HSA of (*N,N'*-dibenzylethane-1,2-diamine) transition metal complexes [J]. *J Inorg Biochem*, 2008, 102: 2026–2034.
- [4] Xu Y, Guo ZJ, Tan L. Advances in the research on rhaponticin [J]. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学杂志), 2009, 26: 549–552.
- [5] Guo M, Lü WJ, Li MH, et al. Study on the binding interaction between carnitine optical isomer and bovine serum albumin [J]. *Eur J Med Chem*, 2008, 43: 2140–2148.
- [6] Guo M, Zhang LY, Lü WJ, et al. Analysis of the spectroscopic characteristics on the binding interaction between tosylloxacin and bovine lactoferrin [J]. *J Lumin*, 2011, 131: 768–775.
- [7] Hu ZJ. Analysis strategy of protein-protein interaction networks [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 939: 141–181.
- [8] Guo R, Liu QZ. Recent advances in the techniques of protein-protein interaction study [J]. *J Tianjin Med Univ* (天津医科大学学报), 2015, 21: 542–544.
- [9] Schächter V. Protein-interaction networks: from experiments to analysis [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7: S48–S54.
- [10] Van de Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: a critical discussion of a popular methodology [J]. *J Mol Struct*, 2011, 998: 144–150.
- [11] Guo M, Zou JW, Yi PG, et al. Binding interaction of gatifloxacin with bovine serum albumin [J]. *Anal Sci*, 2004, 20: 465–470.
- [12] Jefferson ER, Walsh TP, Barton GJ. Biological units and their effect upon the properties and prediction of protein-protein interactions [J]. *J Mol Biol*, 2006, 364: 1118–1129.
- [13] Ragusa S, Cambria MT, Pierfederici F, et al. Structure-activity relationship on fungal laccase from *Rigidoporus lignosus*: a Fourier-transform infrared spectroscopic study [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1601: 155–162.
- [14] Bummer PM. An FTIR study of the structure of human serum albumin adsorbed to polysulfone [J]. *Int J Pharm*, 1996, 132: 143–151.
- [15] Brauner JW, Flach CR, Mendisohn R. A quantitative reconstruction of amide I contour in the IR spectra of globular protein: from structure to spectrum [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 100–109.