

光谱法与计算机辅助研究 α -西柏三烯二醇与牛血清白蛋白的相互作用

苏贤坤, 孙振春, 杨慧, 赵常友, 赵天明, 马超, 朱国飞

Multispectroscopic and Computational Study of the Interaction between α -Cembrenediol and Bovine Serum Albumin

SU Xiankun, SUN Zhenchun, YANG Hui, ZHAO Changyou, ZHAO Tianming, MA Chao, and ZHU Guofei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023080128>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

光谱法研究高良姜素与人血清白蛋白的相互作用

Spectroscopic analysis of interaction between galangin and human serum albumin

食品工业科技. 2017(18): 65-68 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.18.013>

大叶冬青皂苷与牛血清蛋白的相互作用研究

Study on the Interaction between the Saponins of *Ilex latifolia* Thunb and Bovine Serum Albumin

食品工业科技. 2021, 42(19): 8-14 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019080180>

苦丁皂苷L、苦丁皂苷N与牛血清白蛋白的相互作用研究

Study on the Interaction between Kudinoside L, Kudinoside N and Bovine Serum Albumin

食品工业科技. 2020, 41(9): 55-60 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.09.009>

花青素对牛血清白蛋白的光谱特性及构象的影响

Effects of Anthocyanins on Spectral Properties and Conformation of Bovine Serum Albumin

食品工业科技. 2021, 42(7): 57-62 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060126>

热变性牛血清白蛋白对三种活性物质的复合和保护作用

Effect of Heat-denatured Bovine Serum Albumin on Complexation and Protection of α -tocopherol, Resveratrol and (-)-epigallocatechin-3-gallate

食品工业科技. 2019, 40(15): 59-65 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.15.010>

超声波辅助泡沫分离回收溶液中牛血清白蛋白的性质研究

Recovery of Bovine Serum Albumin from Its Aqueous Solution by Ultrasonic Assisted Foam Separation

食品工业科技. 2021, 42(6): 67-72,87 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020010050>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 特邀主编专栏—人工智能在食品工业中的应用 (客座主编: 闵巍庆、郭志明、朱金林) ·

客座主编寄语: 人工智能犹如蒸汽时代的蒸汽机、电气时代的发电机和信息时代的计算机, 成为新一轮产业变革的核心驱动力, 正在推动众多传统产业的智能化转型与产品的智能化升级, 并加速科学研究范式的转换, 引发人工智能驱动的科学革命。另一方面, 我国食品领域发展迅速, 食品产业位居全球第一, 但我国食品科技和工业领域面临引领性基础研究少、食品技术领跑比例小、智能装备自主创新能力低等问题。以深度学习为代表的人工智能技术 (包括机器学习、计算机视觉、自然语言处理、多模态学习、机器人技术等) 和不断发展的食品数字化的紧密结合开始向食品领域渗透, 正逐步应用于食品工业的不同方面, 包括食品复杂组分分析、食品安全智能检测、食品加工过程监控与预测、食品精准营养设计与智能化评估、食品生产智能管控、食品装备智能制造、食品合成生物学等, 为推动我国食品工业的发展提供了前所未有的机遇。

苏贤坤, 孙振春, 杨慧, 等. 光谱法与计算机辅助研究 α -西柏三烯二醇与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(11): 1-10. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080128

SU Xiankun, SUN Zhenchun, YANG Hui, et al. Multispectroscopic and Computational Study of the Interaction between α -Cembrenediol and Bovine Serum Albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(11): 1-10. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080128

光谱法与计算机辅助研究 α -西柏三烯二醇与牛血清白蛋白的相互作用

苏贤坤¹, 孙振春¹, 杨慧¹, 赵常友², 赵天明², 马超², 朱国飞^{2*}

(1. 贵州省烟草科学研究院, 贵州贵阳 550081;

2. 贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵州贵阳 550003)

摘要: α -西柏三烯二醇具有抗菌、抗肿瘤和神经保护等广泛生物活性, 研究其与牛血清白蛋白 (BSA) 相互作用, 有助于了解 α -西柏三烯二醇在体内的转运、分布以及消除等信息。本研究通过紫外吸收光谱、荧光光谱、圆二色谱、分子对接模拟、分子动力学模拟等方法, 在分子水平上研究了 BSA 与 α -西柏三烯二醇在体外生理条件下的相互作用。结果表明, BSA 与 α -西柏三烯二醇发生了明显相互作用, 且在 293、303 和 310 K 三个温度条件下, 荧光淬灭常数 K_{SV} 值和结合常数 K_b 值随着温度升高逐渐降低, α -西柏三烯二醇与 BSA 通过静态猝灭机制发生相互作用, 三个不同温度下两者结合位点数 $n \approx 1$, 在 BSA 上只存在一个 α -西柏三烯二醇的特异性结合位点; BSA 与 α -西柏三烯二醇的结合是自发进行的 ($\Delta G < 0$), 氢键和范德华力为主要驱动力 ($\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$); 在 Sudlow 位点 I 处 α -西柏三烯二醇与 BSA 发生结合; BSA 与 α -西柏三烯二醇结合导致其构象也会发生改变。本研究结果提供了 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的基本信息, 这将有助于进一步了解 α -西柏三烯二醇的药代动力学特性。

关键词: α -西柏三烯二醇, 牛血清白蛋白, 相互作用, 荧光光谱, 分子对接

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)11-0001-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023080128

本文网刊:



Multispectroscopic and Computational Study of the Interaction between α -Cembrenediol and Bovine Serum Albumin

SU Xiankun¹, SUN Zhenchun¹, YANG Hui¹, ZHAO Changyou², ZHAO Tianming², MA Chao², ZHU Guofei^{2*}

(1. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China;

2. School of Food and Drug Manufacturing Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China)

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 中国烟草总公司贵州省公司科技项目 (2021XM25); 贵州省科技计划项目 (黔科合平台人才 [2020]4102 号)。

作者简介: 苏贤坤 (1979-), 男, 副研究员, 研究方向: 烟草栽培与多用途开发方向, E-mail: 65613687@qq.com。

* 通信作者: 朱国飞 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食药同源产品开发, E-mail: zhuguofei@git.edu.cn。

Abstract: α -Cembrenediol displays a diverse array of biological activities, encompassing antibacterial, antitumor, and neuroprotective effects. To comprehensively understand the *in vivo* transport, distribution, and elimination mechanisms associated with α -cembrenediol, its interaction with bovine serum albumin (BSA) was investigated. In this study, the interaction between α -cembrenediol and BSA was explored using various techniques, including UV absorption, steady-state fluorescence, circular dichroism spectrum, molecular docking, and molecular dynamics simulation. The results showed that there was a clear interaction between BSA and α -cembrenediol. Specifically, the K_{SV} and K_b decreased with increasing temperature at 293, 303, and 310 K, indicating that α -cembrenediol interacted with BSA through a static quenching mechanism. Furthermore, the number of binding sites was approximately 1 at the three temperatures, suggesting the presence of a single specific binding site for α -cembrenediol on BSA. Moreover, the binding process occurred spontaneously ($\Delta G < 0$), primarily driven by hydrogen bonds and van der Waals forces ($\Delta H < 0$ and $\Delta S < 0$). α -Cembrenediol bound to the Sudlow site I of BSA. Binding of BSA to α -cembrenediol also caused its conformation to change. This study provides essential insights into the interaction between α -cembrenediol and BSA, contributing to a better understanding of the pharmacokinetic properties of the compound.

Key words: α -cembrenediol; bovine serum albumin; interaction; fluorescence spectroscopy; molecular docking

α -西柏三烯二醇 (α -2,7,11-cembratriene-4,6-diol, α -cembrenediol) 是一种属于西柏烷型大环二萜类的天然化合物, 它广泛存在于烟草、松属、大戟属等植物以及海洋生物中, 其中在烟草中的含量最高^[1-2]。研究发现, α -西柏三烯二醇具有抗肿瘤、抗菌和神经保护等多种生物活性。1985年, α -西柏三烯二醇首次被确认为抗肿瘤剂, 并发现其能够抑制小鼠皮肤肿瘤的生长^[3]。在体外实验中发现, α -西柏三烯二醇是一类新型 c-Met 抑制剂, 可以降低不同乳腺癌细胞系中活化的 VEGFR2 水平, 并且在小鼠体内减小 MDA-MB-231 肿瘤的大小^[4-5]。 α -西柏三烯二醇还可以通过 p53-PUMA、PI3K-Akt 和 IL-1-NF- κ B-IAP 通路促进 HepG2 细胞的凋亡, 抑制细胞增殖^[6-7]。在抗菌方面, α -西柏三烯二醇表现出广谱抗微生物特性, 研究表明 α -西柏三烯二醇能够抑制金黄色葡萄球菌、巴氏芽孢杆菌等多种细菌以及白念珠菌等真菌的生长^[8-10]。在神经保护方面, α -西柏三烯二醇通过与尼古丁乙酰胆碱受体发生相互作用, 从而对有机磷中毒、脑缺血和帕金森病具有神经保护作用^[11-12]。此外, α -西柏三烯二醇还具有较好的毒理安全性^[13]。因此, α -西柏三烯二醇在食品、保健品和生物医药等领域具有较高的开发价值。

然而, 目前关于它在机体内药物代谢相关的吸收、转运和释放等方面的认识仍然有限。血清白蛋白(SA)是一种在血液中具有重要转运功能的蛋白质。它能够与许多药物分子结合, 并通过血浆将其运送到目标受体位点产生药效。同时, 血清白蛋白还能与许多内源性和外源性化合物结合, 发挥重要的储存和转运作用^[14-15]。因此, 研究血清白蛋白与 α -西柏三烯二醇之间的相互作用, 有助于进一步增进对 α -西柏三烯二醇在体内运输和分布情况的理解, 这对于揭示 α -西柏三烯二醇的生理活性机制具有重要的意义。

牛血清白蛋白(BSA)是在体外研究药物与血清蛋白相互作用时常用的模式蛋白。本研究采用荧光光谱、紫外光谱、圆二色谱等多种光谱学技术, 模拟

生理条件下的实验环境, 同时, 结合分子动力学和分子对接等计算机模拟技术, 详细研究 α -西柏三烯二醇与 BSA 的结合过程, 探究了两者之间的重要结合参数, 如结合常数、热力学参数等, 并观察 BSA 构象在结合前后的变化, 以期进一步阐明 α -西柏三烯二醇在血液中的结合与运输情况, 为其在食品、保健品、新药组分等领域的设计和开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛血清白蛋白 纯度 $\geq 98\%$, 北京索莱宝科技有限公司; α -西柏三烯二醇 纯度 $\geq 97.5\%$, 云南西力生物技术股份有限公司; 华法林钠(纯度 $\geq 98\%$)、布洛芬(纯度 $\geq 98\%$)、甲醇(分析纯) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; PBS 磷酸盐缓冲液 0.01 mol/L, pH7.4, 上海源叶生物科技有限公司。

Hitachi-F4600 荧光光谱仪、UH5300 紫外分光光度计 日本日立公司; Jasco J-815 圆二色谱仪 日本分光株式会社; T440 塔式服务器 美国戴尔股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品准备 使用 PBS 缓冲液制备浓度为 3 μ mol/L 的牛血清白蛋白(BSA)溶液(pH7.4, 甲醇含量 1%); 用甲醇溶解 α -西柏三烯二醇, 并用 PBS 缓冲液稀释, 配制浓度为 3.0 mmol/L 的 α -西柏三烯二醇溶液(甲醇含量 5%); 分别用 PBS 缓冲液配制浓度为 3.0 mmol/L 的华法林钠和布洛芬溶液。

1.2.2 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的紫外光谱分析 在室温下, 向比色杯中加入 1 mL 牛血清白蛋白溶液, 并进行紫外吸收光谱检测, 波长扫描范围为 200~500 nm^[16]。检测结束后, 逐次向比色杯中加入 1 μ L α -西柏三烯二醇溶液(使药物作用浓度分别为 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 μ mol/L, 后同), 每次加入药品后, 反应平衡 5 min 后分别检测, 以相应浓度的 α -西柏三烯二醇做参比溶液。

1.2.3 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的内源荧光

光谱分析 向石英比色杯中加入 3 mL BSA 溶液,用荧光光谱仪检测其荧光光谱^[17]。检测结束后,逐次向比色杯中加入 3 μ L α -西柏三烯二醇溶液,每次加入药品后,反应平衡 5 min,然后分别检测反应体系的荧光光谱。在实验中,激发电压设置为 400 V,激发狭缝和发射狭缝设置为 5 nm。发射光谱激发波长 λ_{ex} 分别设置为 278 和 295 nm,扫描波长范围为 300~400 nm,分别在 293、303 和 310 K 三个温度下进行检测。

根据 278 nm 激发内源光谱结果,采用 Stern-Volmer 方程计算猝灭常数:

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

式中, F_0 和 F 分别表示 BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇反应体系的荧光强度。 K_q 、 τ_0 、 $[Q]$ 和 K_{sv} , 分别代表猝灭速率常数、荧光寿命(生物大分子在激发态的 τ_0 值为 10^{-8} s)、 α -西柏三烯二醇摩尔浓度和 Stern-Volmer 猝灭常数^[18]。

采用 Lineweaver-Burk 双对数方程探究结合常数(K_b)和结合点位数(n):

$$\log \frac{(F_0 - F)}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad \text{式 (2)}$$

式中, F_0 和 F 分别是 BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇反应体系的荧光强度, $[Q]$ 为 α -西柏三烯二醇的浓度^[18]。

采用 Van't Hoff 方程探究热力学参数:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{式 (3)}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{式 (4)}$$

式中, ΔH 为焓, ΔS 为熵, ΔG 为吉布斯自由能, K_b 为结合常数, R 为热力学常数, T 为热力学温度^[19]。

1.2.4 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的同步荧光光谱和三维荧光光谱分析 样品处理同内源荧光光谱。同步荧光光谱波长扫描范围为 250~350 nm, 在 310 K 条件下, 分别检测 $\Delta\lambda$ ($\Delta\lambda$ =激发光波长-发射光波长) 为 15 和 60 nm 时的光谱数据。三维荧光光谱实验发射光波长范围设置为 200~500 nm, 激发光波长范围设置为 200~350 nm, 扫描速度为 12000 nm/min, 检测温度为 310 K。

1.2.5 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的圆二色谱分析 在室温条件下, 使用 1 mm 光程的石英比色杯记录了远紫外圆二色谱。BSA 样品浓度 3 μ mol/L, α -西柏三烯二醇处理终浓度分别为 0、3、9 和 15 μ mol/L。实验中, 固定扫描波长在 200~250 nm, 数据间隔为 1 nm, 激发光和发射光狭缝都设定为 1 nm, 并将扫描速度调整为 50 nm/min。采用 CDNN 2.1 去卷积软件进行数据分析估算 BSA 反应体系的二级结构^[20]。

1.2.6 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的荧光探针

取代实验 α -西柏三烯二醇与 BSA 混合反应 5 min 后(终浓度 $C_{\alpha\text{-西柏三烯二醇}}=C_{\text{BSA}}=3 \mu\text{mol/L}$), 用微量进样器向反应体系依次加入荧光探针布洛芬溶液, 使混合溶液中布洛芬的终浓度从 0 逐渐升高到 30 $\mu\text{mol/L}$, 每次混匀静置 5 min 后开始进行检测。检测参数同内源荧光光谱, 激发波长为 278 nm, 温度为 299 K。同种方法, 以法华林为探针, 重复以上实验。

采用 Sudlow 探针取代计算方法计算取代情况:

$$P_{(\text{Probe displacement})} = \frac{F_2}{F_1} \quad \text{式 (5)}$$

式中, $P_{(\text{Probe displacement})}$ 代表取代情况, F_1 为不加布洛芬(法华林)时反应体系的荧光强度, F_2 为加入不同浓度布洛芬(法华林)后反应体系的荧光强度。

1.2.7 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的分子对接

模拟实验 BSA 晶体结构从 RSCB 数据库下载 (PDB_ID: 4F5S), α -西柏三烯二醇的三维结构从 PubChem 网站中下载 (PubChem_ID: 6438508)。使用 AutoDock Vina 程序执行分子对接^[21], 根据对接结果, 选择结合能量低和构象合理的对接结果进行下一步结合模式分析和分子动力学模拟。

1.2.8 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的分子动力学

模拟实验 运用 GROMACS 4.6.5 软件, 对 BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇体系进行分子动力学模拟^[22]。使用 GROMACS 4.6.5 自带的程序 pdb2gmx 产生 BSA 的拓扑结构文件, 使用 AmberTools15 自带的程序 antechamber 和 tleap 产生 α -西柏三烯二醇小分子拓扑文件, 采用 GAFF (general amber force field) 力场, 对反应体系进行 20 ns 的分子动力学模拟分析。

1.3 数据处理

所有光谱实验均设置 3 组重复, 并扣除背景光谱信号, 实验结果以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。采用 SAS 8.0 软件对数据进行统计方差分析, 采用 Duncan 程序进行差异显著性分析 ($P<0.05$, 差异显著), 采用 Origin 2018 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱

根据紫外光谱显示(图 1), BSA 在波长 230 nm 处出现强吸收峰, 这是 BSA 骨架结构(α -螺旋)的典型特征, 同时, 在 280 nm 附近也有一个较弱的吸收峰, 这是由芳香族氨基酸(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)引起的^[23]。如图 1A 所示, 随着 α -西柏三烯二醇浓度的增加, BSA 与 α -西柏三烯二醇反应体系在 280 nm 处的吸收值呈规律性增加, 并伴随轻微的蓝移现象, 暗示 α -西柏三烯二醇与 BSA 发生了相互作用, 导致 BSA 芳香族残基周围的微环境由于络合作用而发生了改变^[24]。如图 1B 所示, BSA- α -西柏三烯二醇反应体系(d)的吸收光谱明显不同于游离 BSA (b)和 α -西柏三烯二醇(a)的光谱总和(c), 这进一步

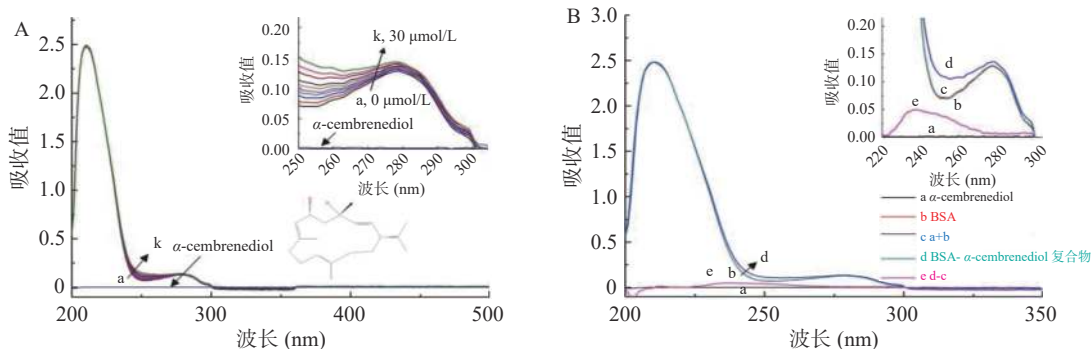


图 1 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱

Fig.1 UV absorption spectrum of the interaction between α -cembrene-2 and BSA

注: 图 A 中曲线 a~k 代表 α -西柏三烯二醇作用浓度分别为 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 $\mu\text{mol/L}$; 图 B 中曲线 a 为游离 α -西柏三烯二醇, 曲线 b 为游离 BSA, 曲线 c 为曲线 a 与 b 之和, 曲线 d 为 BSA- α -西柏三烯二醇的反应体系(1:1), 曲线 e 为曲线 d 与 c 的差值。

证实了静态配合物的形成。

2.2 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的荧光光谱

荧光光谱是研究受体-配体相互作用的常用方法, 因其便捷性、高效性和灵敏性而被广泛应用。基于荧光光谱的结果, 可以进一步确定受体和配体分子的结合模式和类型。当激发光 $\lambda_{\text{ex}}=278$ 和 295 nm 时, 分别能特异性地反映 BSA 中色氨酸残基和酪氨酸残基荧光信号^[17]。根据图 2A 的结果, 当 $\lambda_{\text{ex}}=278$ nm 时, 在 340 nm 附近出现 BSA 的强荧光发射峰, 随着 α -西柏三烯二醇的加入和浓度的升高, BSA 的荧光强度呈线性降低, 并且最大发射峰的位置蓝移, 从 340 nm 移动到了 336 nm, 表明 α -西柏三烯二醇与 BSA 发生了相互作用, 导致色氨酸残基的疏水性增加, 进而引起色氨酸残基荧光信号发生猝灭。由图 2B 可知, 当 $\lambda_{\text{ex}}=295$ nm 时, 实验现象与

$\lambda_{\text{ex}}=278$ nm 时类似, 随着 α -西柏三烯二醇的加入和浓度的升高, BSA 的荧光强度也呈线性降低, 最大发射峰的位置蓝移, 从 342 nm 移动到了 338 nm, 同样证明了 α -西柏三烯二醇与 BSA 发生了相互作用, 导致氨基酸残基微环境发生改变, 荧光信号发生猝灭。综上, 这些结果表明, α -西柏三烯二醇与 BSA 之间存在着较强的相互作用。

荧光猝灭的机制通常被分类为动态猝灭、静态猝灭或二者的组合。荧光猝灭常数是确定分子之间动态和静态猝灭的关键数据。对于静态猝灭, 猝灭常数随着温度升高而减小, 而对于动态猝灭, 随着温度升高, 分子碰撞加速, 导致动态猝灭速率更快, 猝灭常数增加。为了阐明 α -西柏三烯二醇与 BSA 之间的复合物形成, 采用 Stern-Volmer 方程(公式 1)来研究其猝灭常数, 如图 2C 和表 1 所示, 随着温度的升高,

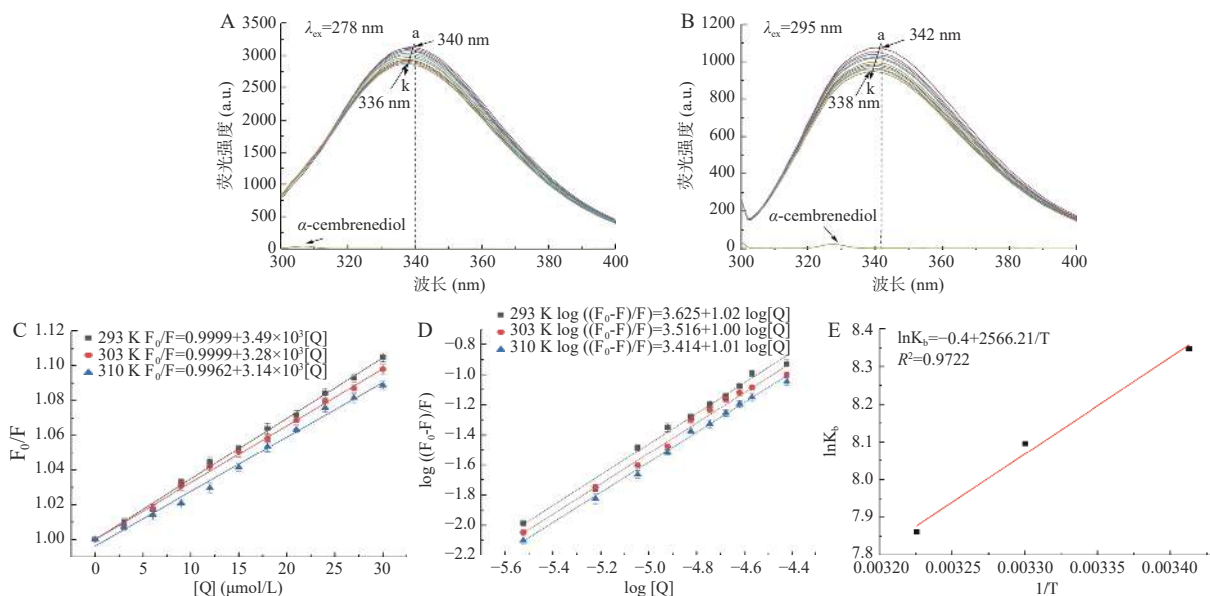


图 2 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用荧光猝灭机制

Fig.2 The fluorescence quenching mechanism of α -cembrene-2 on BSA

注: 图 A 和 B 分别代表激发光为 278 nm 和 295 nm; 曲线 a~k 代表 α -西柏三烯二醇作用浓度分别为 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 $\mu\text{mol/L}$; BSA 的浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 。图 C、D、E 分别为不同温度下 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 图、Lineweaver-Burk 双对数图和 Van't Hoff 图。

α -西柏三烯二醇与 BSA 的猝灭常数(K_{SV})呈现逐渐降低的趋势,这符合荧光静态猝灭的典型特征^[21],且在 293、303 和 310 K 温度条件下, K_q 值分别为 3.49×10^{11} 、 3.28×10^{11} 和 $3.14 \times 10^{11} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$,远高于最大扩散碰撞猝灭速率常数($2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$),进一步暗示 α -西柏三烯二醇对 BSA 的荧光猝灭机制属于静态猝灭。

表 1 不同温度下 α -西柏三烯二醇与 BSA 的 Stern-Volmer 方程及猝灭常数

Table 1 Stern-volmer equation and quenching constants of α -cembrenediol and BSA at different temperatures

T(K)	Stern-Volmer equation	$K_{SV}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	$K_q(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	R^2
293	$F_0/F=0.9999+3.49 \times 10^3[Q]$	3.49×10^3	3.49×10^{11}	0.9974
303	$F_0/F=0.9999+3.28 \times 10^3[Q]$	3.28×10^3	3.28×10^{11}	0.9979
310	$F_0/F=0.9962+3.14 \times 10^3[Q]$	3.14×10^3	3.14×10^{11}	0.9914

为了计算 BSA 与 α -西柏三烯二醇的结合常数(K_b)和结合点位点(n),采用了 Lineweaver-Burk 双对数方程(公式 2)。如图 2D 和表 2 所示,在 310 K 温度条件下, α -西柏三烯二醇与 BSA 的结合常数(K_b)为 $2.59 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,随着温度降低到 303 K 和 293 K,结合常数(K_b)分别升高到 3.28×10^3 和 $4.22 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$,这表明温度降低会增强 α -西柏三烯二醇与 BSA 的结合程度,进一步证实两者之间的结合是静态结合^[21]。此外,在这三个温度条件下, α -西柏三烯二醇与 BSA 结合点位点(n)均约等于 1,这意味着 α -西柏三烯二醇在 BSA 结构上只有一个独立的结合位点。

在热力学过程中,焓(ΔH)、熵(ΔS)和吉布斯自由能变化(ΔG)常被用于判断配体和蛋白质之间的结合模式和主要作用力。当 $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ 时,意味着疏水相互作用起主要作用,当 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$ 时,静电力更重要,当 $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ 时,表明范德华力或氢键是配体与大分子之间的主要相互作用力^[22]。为了确定 α -西柏三烯二醇与 BSA 之间的主要驱动力,采用 Van't Hoff 方程(公式 3 和 4)分别在 293、303 和 310 K 三种不同温度下测定了 BSA 与 α -西柏三烯二醇相互作用的热力学参数,实验结果如图 2E 和表 2 所示,BSA 与 α -西柏三烯二醇相互作用的 ΔG 均为负数,表明两者的结合是一个自发过程,同时 ΔH 和 ΔS 均小于 0,暗示范德华力或氢键是两者相

表 2 不同温度下 BSA 与 α -西柏三烯二醇的结合点位点、结合常数以及热力学参数

Table 2 Number of binding sites, binding constants and thermodynamic constants of α -cembrenediol with BSA at different temperatures

T(K)	$K_b(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R	ΔG ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔH ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)	ΔS ($\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)
293	4.22×10^3	1.02	0.9877	-20.36	-21.34	-3.33
303	3.28×10^3	1.00	0.9886	-20.33	-21.34	-3.33
310	2.59×10^3	1.01	0.9947	-20.30	-21.34	-3.33

互作用的主要驱动力。

2.3 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的同步荧光光谱

同步荧光光谱在 $\Delta\lambda=15$ 和 60 nm 时,分别特异性地反映蛋白质中酪氨酸和色氨酸的微环境改变^[24]。实验结果如图 3A 所示,在 $\Delta\lambda=15$ nm 时,随着 α -西柏三烯二醇浓度的增加,BSA 的荧光强度和最大发射峰位置没有发生明显变化,这表明, α -西柏三烯二醇与 BSA 的结合没有引起酪氨酸残基微环境发生明显变化。从图 3B($\Delta\lambda=60$ nm)可以看出,随着 α -西柏三烯二醇浓度的增加,BSA 的荧光强度明显降低,最大发射峰位置蓝移了 2 nm,这表明 BSA 色氨酸残基所处的微环境都发生变化,疏水性增强,极性减弱。

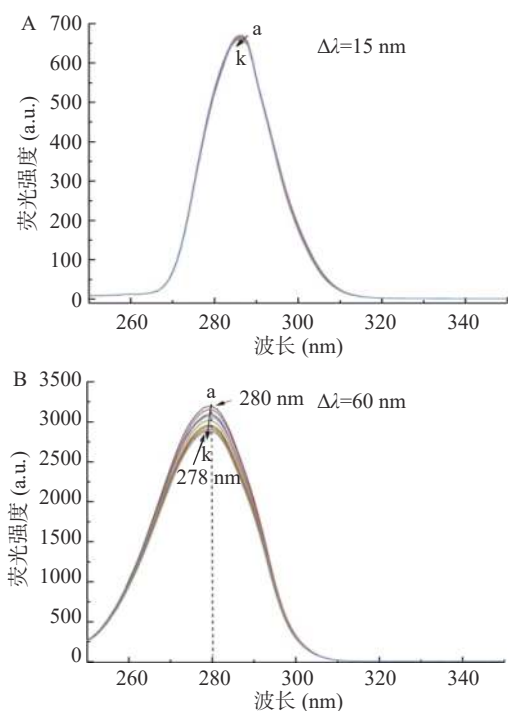
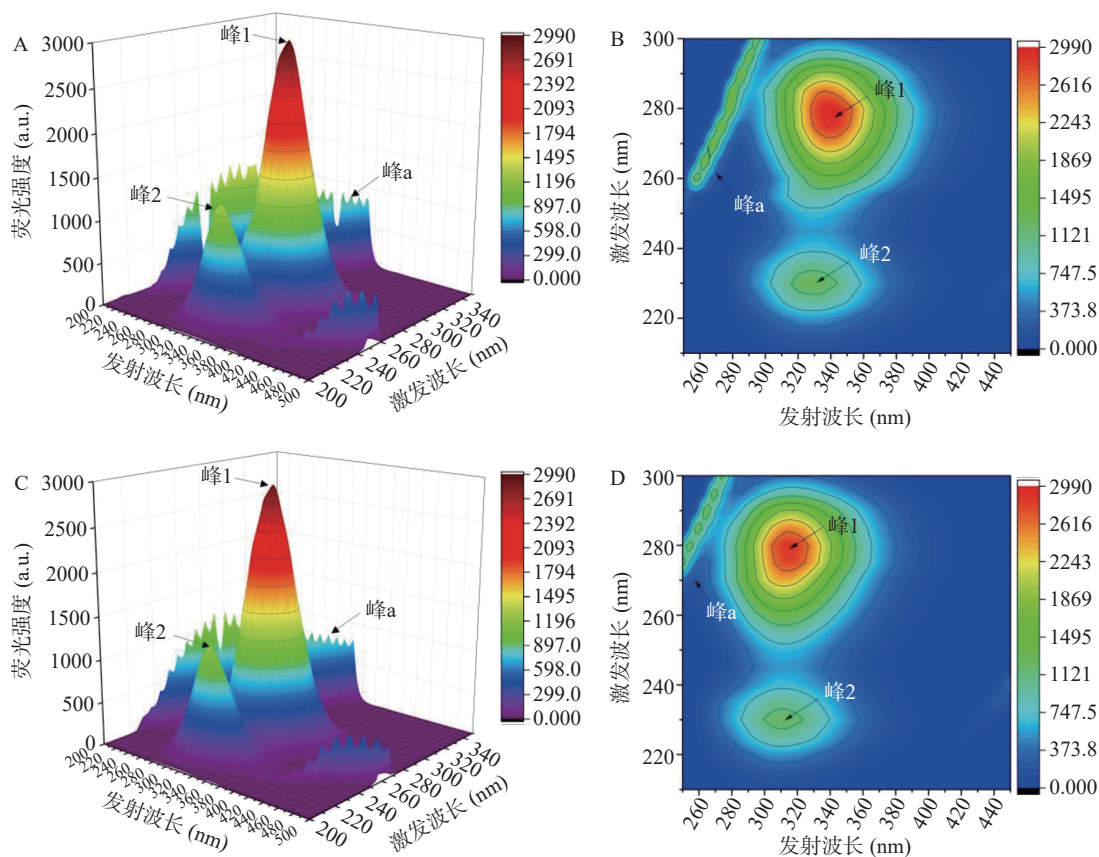


图 3 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的同步荧光光谱
Fig.3 Synchronous fluorescence spectra of the interaction between α -cembrenediol and BSA

注:图 A 和 B 分别代表 $\Delta\lambda=15$ nm 和 60 nm;曲线 a-k 代表 α -西柏三烯二醇作用浓度分别为 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 $\mu\text{mol/L}$;BSA 的浓度为 3 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.4 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的三维荧光光谱

三维荧光光谱可以更全面地展示酪氨酸和色氨酸这些发色团的荧光信息,从而更具特征性地反映蛋白质结构的变化^[25]。图 4 分别显示了单独的 BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的三维荧光等高线图和“鸟瞰”视图,描述性参数值列于表 3 中。峰 a 为瑞利散射峰($\lambda_{\text{ex}}=\lambda_{\text{em}}$),峰 1($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, $\lambda_{\text{em}}=340$ nm)特征性地反映 BSA 发色团的光谱行为,另一个强荧光峰 2($\lambda_{\text{ex}}=230$ nm, $\lambda_{\text{em}}=330$ nm)则特征性地反映 BSA 多肽骨架结构的荧光。与游离的 BSA 相比,加入 α -西柏三烯二醇后,BSA 峰 1 和峰 2 的荧光强度明显减弱,且与荧光光谱结果一致,峰的位置发生了

图4 α -西柏三烯二醇与BSA相互作用的三维荧光光谱Fig.4 Three-dimensional fluorescence spectra of the interaction between α -cembrenediol and BSA

注:图A和B分别代表单独BSA的三维荧光光谱等高线图和“鸟瞰”视图, $C_{\text{BSA}}=3\ \mu\text{mol/L}$;图C和D分别代表BSA- α -西柏三烯二醇复合物的三维荧光光谱等高线图和“鸟瞰”视图, $C_{\text{BSA}}=C_{\alpha\text{-西柏三烯二醇}}=3\ \mu\text{mol/L}$ 。

表3 α -西柏三烯二醇与BSA相互作用的三维荧光特性数据Table 3 Three-dimensional fluorescence characteristics data of the interaction between α -cembrenediol and BSA

系统	峰1($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)	斯托克斯频移($\Delta\lambda$)= $\lambda_{\text{em}}-\lambda_{\text{ex}}$	荧光强度	峰2($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$)	斯托克斯频移($\Delta\lambda$)= $\lambda_{\text{em}}-\lambda_{\text{ex}}$	荧光强度
BSA	280/340	60	2981	230/330	100	1313
BSA- α -西柏三烯二醇	280/315	35	2891	230/310	80	1262

不同程度的蓝移,表明BSA- α -西柏三烯二醇复合物的形成,使得BSA分子的微环境发生了明显的变化。

2.5 α -西柏三烯二醇与BSA相互作用的圆二色谱

圆二色谱是一种常用的确定蛋白质二级结构的方法,为了监测BSA的构象变化,采用Far-UV CD在远紫外区(200~250 nm)进行光谱检测。BSA的CD光谱在209和222 nm附近表现出两个强烈的负吸收带,这是由 α -螺旋结构的肽键中的 $n \rightarrow \pi^*$ 位移引起的^[18]。如图5A所示,在将 α -西柏三烯二醇加入到固定浓度的BSA溶液(3 $\mu\text{mol/L}$)之后,典型 α -螺旋结构的两个特征峰的强度逐渐降低,并且在209 nm附近产生明显的红移,这表明随着 α -西柏三烯二醇含量的增加,BSA分子的二级结构发生了变化,暗示它们之间存在相互作用。此外,BSA的二级结构的变化可能与疏水腔内芳香族残基周围的微环境扰动密切相关,这也进一步解释了BSA发生荧光猝灭的原因。经CDNN软件进行估算,如图5B所示,随着 α -西柏三烯二醇从0升高到15 $\mu\text{mol/L}$,BSA

的 α -螺旋结构占比由初始的57.4%下降到51.7%, β -折叠结构由7.2%增加到9.9%, β -转角结构由14.1%增加到16.5%,无规则卷曲结构的含量基本保持不变。

2.6 α -西柏三烯二醇与BSA相互作用的荧光探针取代实验

小分子配体主要结合在BSA的两个亚结构域上,例如法华林特异性地与BSA亚结构域IIA(Sudlow位点I)结合,而布洛芬则特异性地与BSA亚结构域IIIA(Sudlow位点I)结合^[26]。为了确定 α -西柏三烯二醇在BSA上的结合位置,选择法华林和布洛芬作为荧光探针,对 α -西柏三烯二醇是否被取代进行检测。根据式(5)进行计算,从图6A~C可以看出,荧光探针布洛芬对BSA和 α -西柏三烯二醇复合物的荧光性质影响较小,表明布洛芬不能干扰BSA和 α -西柏三烯二醇的结合。相反,当荧光探针法华林加入BSA- α -西柏三烯二醇反应体系时,荧光强度明显猝灭,且最大发射波长出现339至365 nm

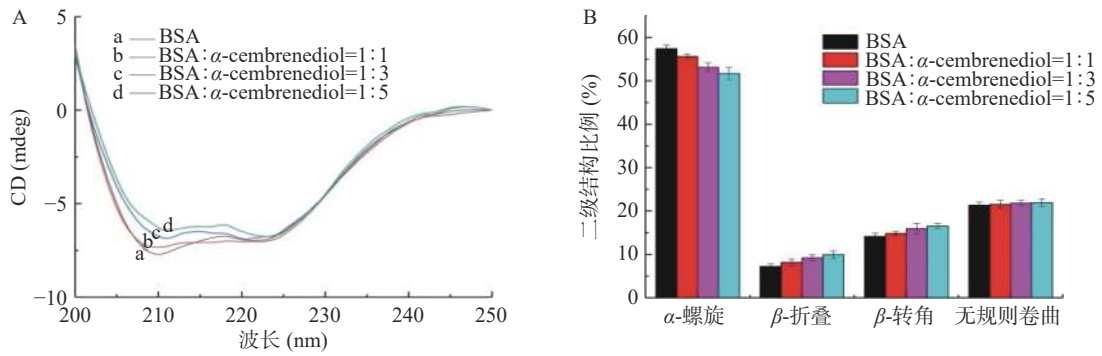


图 5 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的圆二色谱

Fig.5 Circular dichroism spectra of the interaction between α -cyclodextrin and BSA

注: 图 A 为 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的圆二色谱, 曲线 a、b、c 和 d 分别代表 α -西柏三烯二醇的浓度分别为 0、3、9 和 15 $\mu\text{mol/L}$, BSA 浓度均为 3 $\mu\text{mol/L}$; 图 B 为 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用后 BSA 二级结构比例变化。

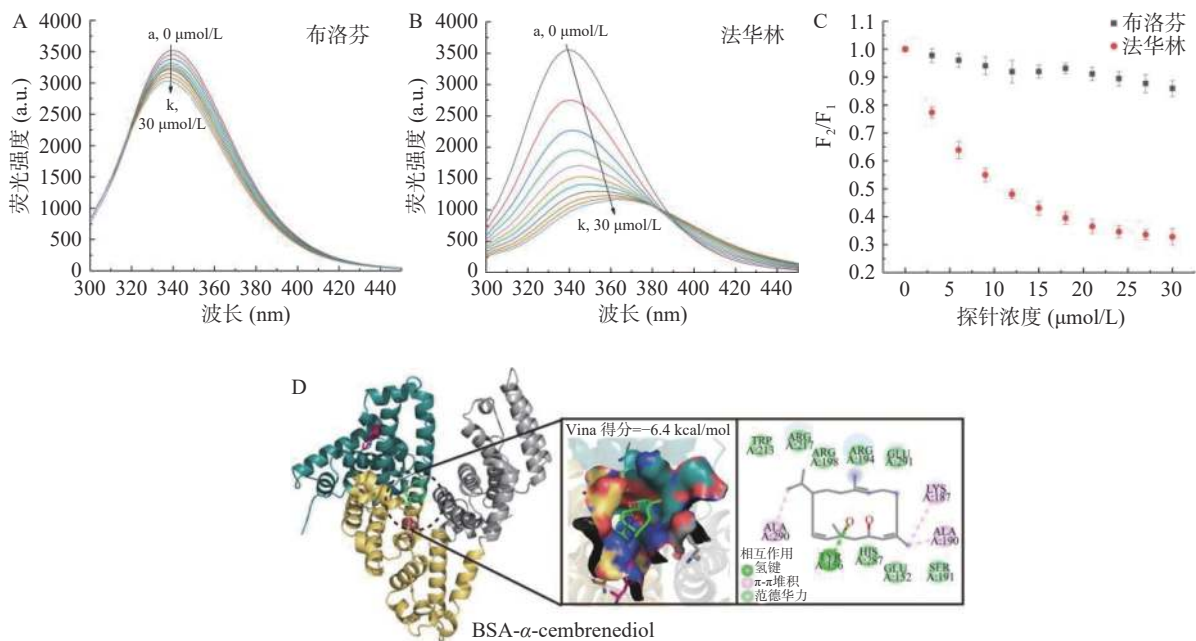


图 6 α -西柏三烯二醇与 BSA 结合的荧光探针取代和分子对接结果

Fig.6 Fluorescent probe replacement and molecular docking results of α -cyclodextrin binding with BSA

注: 图 A 和 B 分别代表荧光探针为布洛芬和法华林, 曲线 a-k 代表探针作用浓度分别为 0、3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 $\mu\text{mol/L}$, 激发波长为 278 nm; $C_{\alpha\text{-西柏三烯二醇}}=C_{\text{BSA}}=3 \mu\text{mol/L}$; 图 C 代表根据 Sudlow 公式计算的取代情况; 图 D 为 α -西柏三烯二醇与 BSA 分子对接结果。

的红移, 这表明了 BSA 和 α -西柏三烯二醇复合物明显受到法华林探针的影响, 这暗示在 BSA 上 α -西柏三烯二醇与法华林具有相同的结合位点, 即亚结构域 II A (Sudlow 位点 I)。

2.7 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的分子对接模拟

分子对接是一种用于分子相互作用分析的有效方法, 可以提供关于 α -西柏三烯二醇和 BSA 之间相互作用的更多信息。为了进一步了解 α -西柏三烯二醇在牛血清白蛋白位点 I 和 II 的结合方式, 在这两个位点上分别进行了分子对接模拟实验^[19]。实验结果显示, α -西柏三烯二醇与 BSA 结合在位点 I 和 II 上获得的最低结合能分别为 -6.4 和 -4.5 kcal/mol, 这表明 α -西柏三烯二醇对位点 I 的结合亲和力相对更高, 这与荧光探针取代实验结果一致。此外, 由荧

光光谱计算的结合能为 -21.34 kJ/mol (即 -5.10 kcal/mol), 这也与通过分子对接研究计算的结合能非常接近。由图 6D 可以看出, 在位点 I 处, α -西柏三烯二醇由 BSA 残基形成的“口袋”包围, 其中, 以亲水性的氨基酸为主, 主要有 Glu152、Tyr156、Lys187、Ser191、Arg194、Arg198、Trp213、Arg217、Glu291、His287 等, 疏水性的氨基酸有 Ala190、Ala290, 此外, α -西柏三烯二醇还与 Tyr156 形成了 H 键, 键距为 2.3 Å, 由此可见, 这些离子和极性残基通过氢键和范德华力相互作用, 在 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的稳定性中起主要作用, 这也与荧光光谱热力学计算得出的结论一致。且 Trp213 残基与 α -西柏三烯二醇产生了相互作用, 这也进一步解释了色氨酸的荧光会发生明显猝灭的原因。

2.8 α -西柏三烯二醇与 BSA 相互作用的分子动力学模拟

通过分子动力学模拟,可以更好地了解蛋白质和配体在生理状态下随时间变化的结合情况。通过 BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的 RMSD 图,在 20 ns 模拟时间尺度下评估 BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的刚性和稳定性^[27],如图 7A 所示,

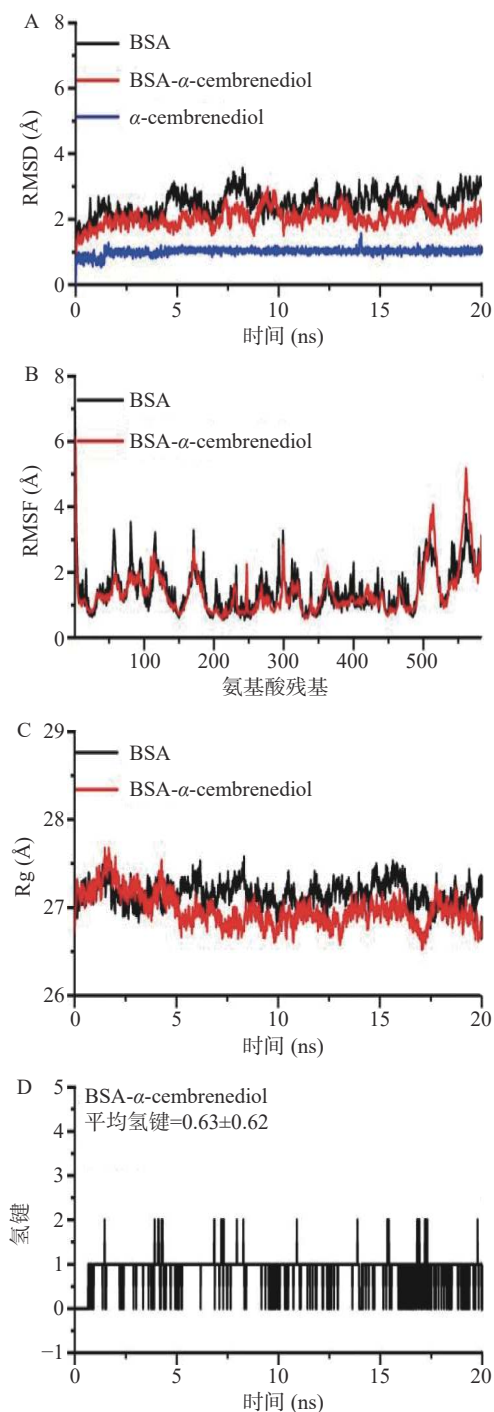


图 7 α -西柏三烯二醇与 BSA 分子相互作用的分子动力学模拟

Fig.7 Molecular dynamics simulation of the interaction between α -cembrenediol and BSA

注:图 A~C 分别表示 BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的 RMSD、RMSF 和 Rg 值;图 D 表示 α -西柏三烯二醇与 BSA 结合时氢键的变化。

0~5 ns 时,BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的 RMSD 值开始逐渐增加,在此之后,系统达到了平衡阶段,并围绕一个平均 RMSD 值振荡,直到模拟结束,这表明系统在整个模拟过程中是稳定的。值得注意的是,BSA- α -西柏三烯二醇复合物的 RMSD 值整体上明显小于单独 BSA,表明 α -西柏三烯二醇与 BSA 的结合使 BSA 二级构象发生改变,使其具有更高的刚性和稳定性。

均方根波动(RMSF)能够反映配体与蛋白受体结合的柔韧性^[28]。BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的 RMSF 值如图 7B 所示,与 BSA 相比,均方根波动曲线显示 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的波动更低,在位点 I 处的 Glu152、Tyr156、Lys187、Ser191、Arg194、Arg198、Trp213、Arg217、His28、Glu291 等残基的 RMSF 值明显低于单独 BSA,表明 α -西柏三烯二醇可以稳定地结合到这些关键残基上,进一步证实 α -西柏三烯二醇结合在 BSA 结合位点 I。

配体与蛋白受体结合的紧凑情况可以通过回旋半径(Rg)反映^[29]。从图 7C 可以看出, α -西柏三烯二醇结合到 BSA 后,Rg 值略有下降,表明 α -西柏三烯二醇结合 BSA 后导致 BSA 的构象变得更加紧凑,Rg 和 RMSD 结果与圆二色谱实验结果一致,即 α -西柏三烯二醇结合到 BSA 上导致蛋白质构象的改变, α 螺旋含量降低。

氢键是配体与蛋白受体结合的主要作用力之一^[30],图 7D 分析了 α -西柏三烯二醇与 BSA 结合时氢键的变化,实验结果表明,BSA- α -西柏三烯二醇反应体系的氢键平均值为 0.63,与对接模型 1 个氢键的结果十分接近,进一步证实氢键也是 α -西柏三烯二醇与 BSA 的主要作用力之一。

3 讨论与结论

本研究在模拟生理条件下,采用紫外光谱、荧光光谱、圆二色谱和计算机模拟技术,对 α -西柏三烯二醇与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用进行了深入探索。

紫外吸收光谱结果显示, α -西柏三烯二醇加入 BSA 溶液后,导致其吸收光谱发生明显变化,表明 α -西柏三烯二醇与 BSA 之间存在着强烈的相互作用,引起 BSA 芳香族残基周围的微环境发生了改变。内源荧光光谱结果进一步显示, α -西柏三烯二醇与 BSA 结合,会导致 BSA 色氨酸残基和酪氨酸残基微环境疏水性增加,极性降低,从而引起荧光信号发生猝灭。为了判断两者结合的猝灭机制,进行了猝灭常数的计算,发现随着温度升高,两者结合的猝灭常数逐渐降低,表明 α -西柏三烯二醇与 BSA 之间的荧光猝灭机制属于静态猝灭。为了评估两者之间的结合程度,进一步对其结合常数(K_b)和结合点位数(n)进行了计算,发现 α -西柏三烯二醇在 BSA 结构上只有一个独立的结合位点,且随着温度升高,BSA 与 α -西柏三烯二醇的结合常数(K_b)逐渐降低,进一步证实了

两者的结合方式为静态结合。为了判断两者静态结合的主要作用力,进行了热力学参数分析,发现范德华力以及氢键是两者相互作用的主要驱动力。

为了探究了 α -西柏三烯二醇与 BSA 结合后对 BSA 结构的影响,进行了同步荧光光谱、三维荧光光谱、圆二色谱等研究,同步荧光光谱结果显示, α -西柏三烯二醇与 BSA 发生相互作用,引起了 BSA 氨基酸残基的微环境发生改变,色氨酸残基疏水性增强,极性减弱;三维荧光光谱结果显示,两者的结合导致 BSA 多肽骨架结构发生了变化;圆二色谱结果进一步表明,两者的结合导致 BSA 分子的 α -螺旋结构占比降低, β -折叠结构和 β -转角结构的含量增加。为了明确 α -西柏三烯二醇在 BSA 上的具体结合位点,开展了荧光探针取代实验和分子对接模拟实验,荧光探针取代实验发现,布洛芬对 BSA 和 α -西柏三烯二醇复合物的荧光性质影响较小,而法华林探针加入后,荧光强度明显猝灭,最大发射波长红移,表明 BSA 和 α -西柏三烯二醇复合物受到法华林探针的影响,暗示在 BSA 上, α -西柏三烯二醇与法华林具有相同的结合位点,即亚结构域 II A(Sudlow 位点 I),分子对接模拟实验结果显示, α -西柏三烯二醇与 BSA 结合在位点 I 和 II 上的最低结合能分别为 -6.4 和 -4.5 kcal/mol,表明 α -西柏三烯二醇对位点 I 的结合亲和力相对更高,进一步证实, α -西柏三烯二醇结合在 BSA 的结合位点 I 上。

为了了解 α -西柏三烯二醇与 BSA 在生理状态下随时间变化的结合情况,开展了分子动力学模拟实验,结果显示,在模拟时间尺度下, BSA 和 BSA- α -西柏三烯二醇复合物的 RMSD 值(均方根偏离)逐渐增加并达到平衡状态,表明系统是稳定的。BSA- α -西柏三烯二醇复合物的 RMSD 值整体上小于单独的 BSA,表明 α -西柏三烯二醇的结合使 BSA 更具刚性和稳定性。此外,通过 RMSF 值(均方根波动)和 Rg 值(回旋半径)的分析,进一步证实了 α -西柏三烯二醇结合在 BSA 的结合位点 I 上。

本研究通过探究 α -西柏三烯二醇与 BSA 的结合过程,初步阐明了 BSA 与 α -西柏三烯二醇相互作用的基本信息,加深了对基于血清白蛋白的体内 α -西柏三烯二醇转运系统的认识,为促进 α -西柏三烯二醇在食品、保健品以及医药产品的设计和开发提供必要的理论基础。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] RODRIGUES I, MIGUEL M, MNIF W. A brief review on new naturally occurring cembranoid diterpene derivatives from the soft corals of the genera *Sarcophyton*, *Sinularia*, and *Lobophytum* since 2016[J]. *Molecules*, 2019, 24: 781–813.

[2] 鞠馥竹,张洪博,闫宁,等.烟草西柏三烯二醇含量的遗传分析[J].中国烟草科学,2021,42(1):1–6. [JU F Z, ZHANG H B, YAN N. Genetic analysis of cembratrien-diols content in tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2021, 42(1): 1–6.]

[3] SAITO Y, TAKIZAWA H, KONISHI S, et al. Identification of cembratriene-4, 6-diol as antitumor-promoting agent from cigarette smoke condensate[J]. *Carcinogenesis*, 1985, 6: 1189–1194.

[4] HAILAT M M, EBRAHIM H Y, MOHYELDIN M M, et al. The tobacco cembranoid (1S, 2E, 4S, 7E, 11E)-2, 7, 11-cembratriene-4, 6-diol as a novel angiogenesis inhibitory lead for the control of breast malignancies[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25: 3911–3921.

[5] EBRAHIM H Y, MOHYELDIN M M, HAILAT M M, et al. (1S, 2E, 4S, 7E, 11E)-2, 7, 11-Cembratriene-4, 6-diol semisynthetic analogs as novel c-Met inhibitors for the control of c-Met-dependent breast malignancies[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(22): 5748–5761.

[6] YUAN X L, MAO X X, DU Y M, et al. Anti-tumor activity of cembranoid-type diterpenes isolated from *Nicotiana tabacum* L[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(2): 45.

[7] 毛新新,侯小东,杜咏梅,等.烟草 α -西柏三烯二醇的分离及抑制 HepG2 细胞活性研究[J].中国烟草科学,2017,38(3):80–85. [MAO X X, HOU X D, DU Y M, et al. Isolation and anti-HepG2 activity study of α -cembratriene-diol from tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2017, 38(3): 80–85.]

[8] SHEN S M, LI W S, DING X, et al. Ximaoglucumins A-F, new cembranoids with anti-inflammatory activities from the South China sea soft coral *Sarcophyton glaucum*[J]. *Bioorg Med Chem*, 2021, 38: 11 639–11648.

[9] 刘雨露,张建会,付秋娟,等.烟草西柏三烯二醇稳定性及其抑菌活性研究[J].中国烟草科学,2020,41(6):82–87. [LIU Y L, ZHANG J H, FU Q J, et al. Study on the stability of tobacco cembratrien-diols and their antifungal activities[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2020, 41(6): 82–87.]

[10] PENG C C, HUANG C A, AHMED A F, et al. Anti-inflammatory cembranoids from a Formosa soft coral *Sarcophyton cherbonnieri*[J]. *Mar Drugs*, 2020, 18(11): 573–585.

[11] SABEVA N, PAGÁN O R, FERRER-ACOSTA Y, et al. *In vivo* evaluation of the acute systemic toxicity of (1S, 2E, 4R, 6R, 7E, 11E)-cembratriene-4, 6-diol (4R) in Sprague Dawley rats[J]. *Nutraceuticals (Basel)*, 2022, 2(2): 60–70.

[12] FERCHMIN P A, ANDINO M, REYES SALAMAN R, et al. 4R-cembranoid protects against diisopropylfluorophosphate-mediated neurodegeneration[J]. *Neurotoxicology*, 2014, 44: 80–90.

[13] 杨元鑫,阮建成,边腾飞,等.西柏三烯二醇分析、纯化及降解机理研究进展[J].高效化学工程学报,2022,1:1–8. [YANG Y X, RUAN J C, BIAN T F, et al. Research progress on analysis, purification and degradation mechanism of cembratriene-diols[J]. *Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities*, 2022, 1: 1–8.]

[14] SAHA D, RAY D, KUMAR S, et al. Interaction of a bovine serum albumin (BSA) protein with mixed anionic-cationic surfactants and the resultant structure[J]. *Soft Matter*, 2021, 17(29): 6972–6984.

[15] MADHUMITHA D, DHATHATHREYAN A. Interaction of myoglobin colloids with BSA in solution; Insights into complex formation and elastic compliance[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 105 (Pt1): 1259–1268.

- [16] ZKANG X, LI L, XU Z, et al. Investigation of the interaction of naringin palmitate with bovine serum albumin: Spectroscopic analysis and molecular docking[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59106.
- [17] DEZHAMPANAH H, MOUSAZADEH M P A. Multi technique investigation on interaction between 5-(2-thiazolylazo)-2, 4, 6-triaminopyrimidine and HSA and BSA[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2022, 40(18): 8143–8154.
- [18] SUDJARWO W A A, DOBLER M T, LIEBERZEIT P A. QCM-based assay designs for human serum albumin[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414(1): 731–741.
- [19] WANG X, ZHANG G, YU D, et al. The interaction of folate-modified *Bletilla striata* polysaccharide-based micelle with bovine serum albumin[J]. *Glycoconj J*, 2021, 38(5): 585–597.
- [20] DEZHAMPANAH H, MOHAMMADI A, MOUSAZADEH M P A. Investigation on intermolecular interaction of synthesized azo dyes with bovine serum albumin[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41(3): 970–981.
- [21] BAI J, MA X, SUN X. Investigation on the interaction of food colorant Sudan III with bovine serum albumin using spectroscopic and molecular docking methods[J]. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2020, 55(6): 669–676.
- [22] ABEDANZADEH S, KARAMI K, RAHIMI M, et al. Potent cyclometallated Pd(II) antitumor complexes bearing α -amino acids: Synthesis, structural characterization, DNA/BSA binding, cytotoxicity and molecular dynamics simulation[J]. *Dalton Trans*, 2020, 49(42): 14891–14907.
- [23] NEHRU S, VEERALAKSHMI S, KALAISELVAM S, et al. Protein binding and antioxidant studies of diimine based emissive surfactant-ruthenium(II) complexes[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, 39(5): 1535–1546.
- [24] PATEL R, MAURYA N, PARRAY M U D, et al. Esterase activity and conformational changes of bovine serum albumin toward interaction with mephedrone: Spectroscopic and computational studies[J]. *J Mol Recognit*, 2018, 31(11): e2734.
- [25] XI H, LI N, SHI Z, et al. A three-dimensional "turn-on" sensor array for simultaneous discrimination of multiple heavy metal ions based on bovine serum albumin hybridized fluorescent gold nanoclusters[J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1220: 340023.
- [26] VINOD S M, MURUGAN S S, KRISHNAN A, et al. Complexity of the role of various site-specific and selective Sudlow binding site drugs in the energetics and stability of the acridinedione dye-bovine serum albumin complex: A molecular docking approach[J]. *ACS Omega*, 2023, 8(6): 5634–5654.
- [27] AHMED M F, MOLLA M R, SAHA M, et al. Aggregation behavior of cetyltrimethylammonium bromide under the influence of bovine serum albumin in aqueous/electrolyte solutions at various temperatures and compositions: Conductivity and molecular dynamics study[J]. *RSC Adv*, 2019, 9(12): 6556–6567.
- [28] KHAN S, NAEEM A. Bovine serum albumin prevents human hemoglobin aggregation and retains its chaperone-like activity[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 28: 1–16.
- [29] LYU S, WANG W. Spectroscopic methodologies and computational simulation studies on the characterization of the interaction between human serum albumin and astragalins[J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, 39(8): 2959–2970.
- [30] ZHU G F, LYU S L, LIU Y, et al. Spectroscopic and computational studies on the binding interaction between gallic acid and Pin1[J]. *Luminescence*, 2021, 36: 2014–2021.