

光谱法和分子对接研究高儿茶酚与牛血清白蛋白的相互作用

吕艳芳¹, 张紫卿¹, 梁倩倩¹, 李 莹¹, 刘欣欣², 李学鹏^{1*}

¹渤海大学食品科学与工程学院 辽宁锦州 121013

²上海交通大学农业与生物学院 上海 200240

摘要 对高儿茶酚与牛血清白蛋白(BSA)相互作用进行研究,结果表明:高儿茶酚能猝灭 BSA 的荧光;与 BSA 主要通过疏水键自发形成具有弱荧光的大分子复合物,且高儿茶酚在 BSA 上至少存在一个结合位点;在 298,310 K 和 320 K 时,高儿茶酚与 BSA 的结合常数 K_a 分别为 5.908×10^2 , 5.424×10^4 , 1.535×10^6 L/mol。推测高儿茶酚对 BSA 的猝灭是以动态猝灭为主,也有静态猝灭过程。冷场发射扫描电镜观察发现,添加 $2 \mu\text{mol/L}$ 的高儿茶酚,可以促进蛋白质的溶解,使其分布更加均匀;当高儿茶酚浓度高于 $2 \mu\text{mol/L}$ 时,使蛋白质发生聚集。分子对接分析发现,高儿茶酚主要通过疏水键、氢键和范德华力稳定地结合在 BSA 亚结构域 II A 的疏水口袋中(site I)。

关键词 高儿茶酚;牛血清白蛋白;荧光光谱;扫描电镜;分子对接

文章编号 1009-7848(2022)12-0072-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.008

高儿茶酚(Homocatechol),又称 3,4-二羟基甲苯,化学式为 $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$,是一种芳香族衍生物,槲皮素代谢的产物,可通过还原木质素衍生的香草醛,然后脱甲基来制备^[1-2],结构见图 1。其用途大致可分为 3 类:第 1 类,可作为中间体制造苹果型香料、农药、染料等^[3];第 2 类,可用于杀菌防腐^[3];第 3 类,可用于医药领域制备具有医药活性的化合物,并且该物质在抗氧化方面有良好的应用^[4-5]。Applová 等^[6]在研究中发现高儿茶酚能有效抑制血小板聚集,甚至比临床上使用的抗血小板药物阿

司匹林疗效更好。Hsiao 等^[7]通过小鼠实验发现高儿茶酚能够缩短热阵痛时间,刺激多种神经营养素,促进皮肤神经再生。Fukuhara 等^[8]通过给大鼠侧脑室静脉注射高儿茶酚,发现能够预防大鼠的慢性疼痛并产生抗抑郁作用。刘春丽等^[9]和肖卓炳等^[10]通过研究荔枝果肉和猕猴桃变软与其多酚氧化酶的关系时,发现在多种底物中,高儿茶酚与其多酚氧化酶能较好地结合。

蛋白质是生物体最重要的大分子之一,是一切生命活动的物质基础。若小分子参与生物代谢或者可以改变生物大分子的某种理化性质,则研究二者间的相互作用,揭示其作用机理很有意义。牛血清白蛋白(BSA)分子质量为 66.4 ku,是一种球状心形蛋白^[11-12]。因其与人血清白蛋白是同源蛋白^[13-14],故可广泛用于蛋白质与小分子互作的研究。姚惠芳等^[15]、孙艳辉等^[16]运用光谱法研究芦斯越橘花青素和绿原酸与 BSA 的互作,结果发现,芦斯越橘花青素主要依靠静电作用力,绿原酸主要依靠疏水作用力与 BSA 发生作用,其猝灭类型均为静态猝灭。

本文从热力学角度研究高儿茶酚与 BSA 的结合作用。研究二者结合后 BSA 的三维结构和微观形态的变化。利用分子对接技术分析二者的结合位点,旨在为高儿茶酚的应用提供参考。

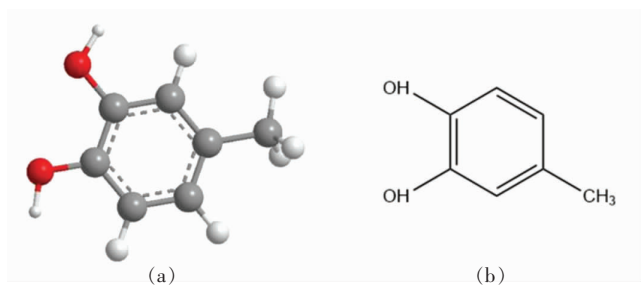


图 1 高儿茶酚的 3D(a)和 2D(b)结构图

Fig.1 3D (a) and 2D(b) structures of homocatechol

收稿日期: 2021-12-13

基金项目: 辽宁省食品安全重点实验室开放课题(LNKLFS 202104);辽宁省兴辽英才计划项目(XLYC1807133)

第一作者: 吕艳芳,女,博士,副教授

通信作者: 李学鹏 E-mail: xuepengli8234@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BSA ($\geq 98\%$), 北京中生瑞泰科技有限公司; 高儿茶酚 ($\geq 99\%$), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 磷酸氢二钠、磷酸二氢钾 (分析纯), 上海国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外-可见分光光度计 (UV2550), 日本岛津; 荧光分光光度计 (970CRT), 上海棱光公司; 冷场发射扫描电镜 (S-4800), 日本日立公司; 电热恒温水浴锅 (DK8D), 上海一恒科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 紫外光谱法测定高儿茶酚与 BSA 的相互作用 在 7 支试管中分别加入 2.5 mg/mL BSA 溶液 0.5 mL, 接着加入 2×10^3 $\mu\text{mol/L}$ 高儿茶酚溶液 (0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mL), 最后用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 定容 5 mL, 使 BSA 终质量浓度为 0.25 mg/mL, 高儿茶酚的终浓度分别为 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 120 $\mu\text{mol/L}$ 。混匀后于 298 K 下静置 10 min。紫外光谱扫描范围 200~600 nm。

1.3.2 荧光光谱法测定高儿茶酚与 BSA 的相互作用 取 24 支试管, 分为 3 组, 每组 8 支。按 1.3.1 节的方法配制溶液, 使 BSA 终质量浓度为 0.25 mg/mL, 高儿茶酚的终浓度分别为 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 $\mu\text{mol/L}$ 和 140 $\mu\text{mol/L}$ 。将混合后的 3 组样品分别置 298, 310 K 和 320 K 恒温水浴中 10 min。荧光检测条件: 激发波长 281 nm, 扫描范围 280~450 nm, 狭缝宽度均为 5 nm。

1.3.3 荧光猝灭与热力学计算公式 在 1.3.2 节基础上, 通过 Stern-Volmer 方程 (1) 对荧光数据进行计算, 分析其猝灭类型^[17]。通过公式 (2) 计算其结合常数 K_a 和结合位点数 n ^[18]。根据方程 (3)、(4) 计算高儿茶酚与 BSA 互作的热力学参数^[19]。

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

$$\lg \left[\frac{F_0 - F}{F} \right] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

$$\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \frac{1}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \Delta H \quad (3)$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H - T \Delta S \quad (4)$$

式中: F_0 和 F ——加入高儿茶酚前、后 BSA 的荧光强度; K_{sv} ——动态猝灭常数; K_q ——猝灭速率常数; τ_0 ——猝灭剂不存在时生物大分子的平均寿命 (10^{-8} s); K_{a1} 和 K_{a2} ——分别为 T_1 、 T_2 温度下的结合常数; R ——气体常数 (8.314×10^{-3} kJ/mol)^[20]。

1.3.4 同步荧光法测定高儿茶酚与 BSA 的相互作用 方法同 1.3.1 节。荧光光谱扫描条件: 激发波长 281 nm, 扫描范围 200~400 nm, $\Delta\lambda$ 分别为 15 nm 和 60 nm, 狭缝宽度均为 1 nm。

1.3.5 高儿茶酚对 BSA 形态的影响 在 3 支试管中分别加入 0.25 mg/mL BSA 溶液 0.5 mL, 接着加入 2×10^2 $\mu\text{mol/L}$ 高儿茶酚溶液 (0, 0.05, 0.10 mL), 用去离子水定容 5 mL, 使 BSA 终质量浓度为 0.025 mg/mL, 高儿茶酚的终浓度分别为 0, 2, 4 $\mu\text{mol/L}$ 。混合溶液于 298 K 下静置 10 min, 在培养皿中放入导电硅片, 吸取 10 μL 样品溶液平铺在硅片上, 放入 35 $^\circ\text{C}$ 烘箱中直至样品完全干燥。将样品粘贴在样品台上, 喷金后扫描电镜观察。

1.3.6 分子对接研究高儿茶酚与 BSA 的结合 BSA 的晶体结构 (ID: 4F5S) 从 PDB 数据库中获得, 利用 PyMol 软件对晶体结构进行前处理。配体高儿茶酚的 2D 结构由 Chem Draw 软件绘制, 通过 Chem3D 软件对其优化, 将能量优化后的配体保存为 PDB 格式文件, 然后利用 Auto Dock-vina 软件进行分子对接, 最后用 Discovery Studio (简称 DS)、PyMol 软件作图, 查看对接结果。

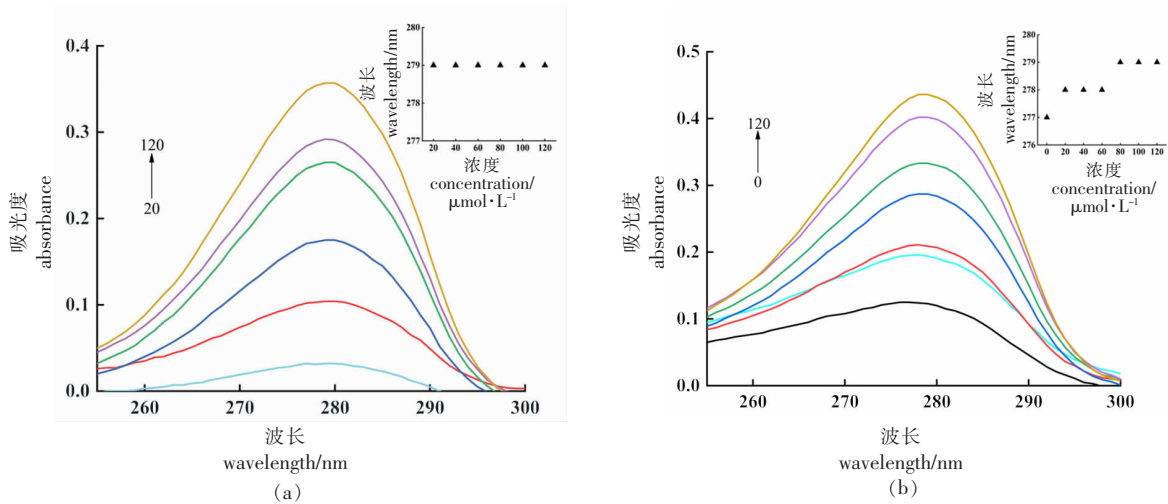
2 结果与分析

2.1 高儿茶酚与 BSA 相互作用的紫外吸收光谱分析

从图 2a 可以看出高儿茶酚的最大吸收波长 (λ_{max}) 在 279 nm 处, 随着高儿茶酚浓度的增加, 它的吸光值由 0.032 增至 0.357, 而其吸收波长没有发生改变。从图 2b 可以看出, 当不添加高儿茶酚时, BSA 在 277 nm 处有一个由 BSA 的色氨酸 (Trp) 与酪氨酸 (Tyr) 残基的芳杂环 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起的吸收峰^[21]。加入高儿茶酚后, 当其浓度为 20~80 $\mu\text{mol/L}$ 时, BSA 的吸光值由 0.125 增至 0.333, 且波长从 277 nm 红移至 279 nm, 说明高儿茶酚与 BSA 形成了复合物, 在这个过程中 BSA 结构内部的 Trp 与 Tyr 残基暴露在蛋白质结构表面, 使

BSA 的疏水性增强,空间构象发生改变^[22-23]。当高儿茶酚浓度超过 80 $\mu\text{mol/L}$ 时,BSA 的吸光值增

加,其波长仍保持不变,说明二者结合较好,复合物的结构趋于稳定,二者之间发生相互作用^[24]。



注:0~120:高儿茶酚浓度分别为0,20,40,60,80,100,120 $\mu\text{mol/L}$; $C_{\text{BSA}}=0.25 \text{ mg/mL}$ 。

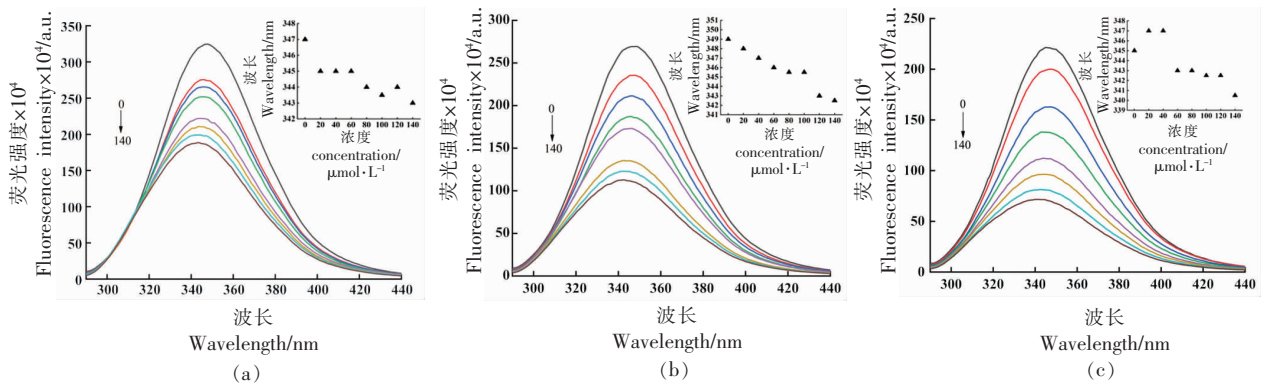
图2 不同浓度的高儿茶酚(a)及与BSA相互作用的紫外吸收光谱

Fig.2 Ultraviolet absorption spectra of different concentrations of homocatechol(a) and the interaction between homocatechol and BSA (b)

2.2 高儿茶酚与BSA相互作用的热力学分析

2.2.1 高儿茶酚与BSA相互作用的荧光光谱分析 通常蛋白质的荧光是由色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸残基(Phe)引起的^[25]。由图3可知,当BSA质量浓度为0.25 mg/mL时,3种温度下,不添加高儿茶酚的BSA分别在347,349 nm和345 nm处有一个强荧光发射峰。添加高儿茶酚后,3个温度下BSA的荧光强度随高儿茶酚浓度

的增加均呈下降趋势。当温度为298 K和310 K时,最大发射波长出现蓝移的现象;温度为320 K时,最大发射波长先红移后蓝移,这说明高儿茶酚与BSA发生了相互作用^[26],且BSA的峰形和强度没有发生明显变化,表明高儿茶酚的加入没有破坏发色团^[27],仅使蛋白质周围的微环境发生改变,内源荧光发生猝灭,蛋白质的疏水性增强。



注:0~140:高儿茶酚浓度分别为0,20,40,60,80,100,120,140 $\mu\text{mol/L}$; $C_{\text{BSA}}=0.25 \text{ mg/mL}$ 。

图3 298(a)、310(b)和320 K(c)时不同浓度的高儿茶酚与BSA相互作用的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of the interaction between BSA and homocatechol of different concentrations at 298(a), 310 K(b) and 320 K(c)

2.2.2 高儿茶酚对 BSA 的猝灭类型的判定 动态猝灭的猝灭常数(K_{sv})随着温度的上升而增大,静态猝灭反之^[28-30]。3 个温度下, $[Q]$ 与 F_0/F 拟合出来的曲线线性关系良好(图 4)。由表 1 可知,随着温度的升高, K_{sv} 由 4.80×10^3 L/mol 增至 1.663×10^4 L/mol,推测高儿茶酚对 BSA 的荧光猝灭过程是动态猝灭;又因其 K_q 值由 0.480×10^{12} L/(mol·s)增至 1.663×10^{12} L/(mol·s),大于各类猝灭剂对生物大分子的最大碰撞猝灭速率常数阈值 (2.0×10^{10} L/(mol·s))^[31]。这表明二者在结合的过程中也存在静态猝灭。

2.2.3 高儿茶酚与 BSA 作用的结合位点与结合常数 在 2.2.2 节分析中发现,二者结合过程中存在静态猝灭。根据公式(2),以 $\lg[(F_0-F)/F]$ 为纵坐标, $\lg[Q]$ 为横坐标绘制双对数图(图 5),对它们的结合方式进行分析。由表 2 可知,随着温度的升高,高儿茶酚与 BSA 之间的 K_a 值不断增大,尤其是当温度为 320 K 时, K_a 达到 1.535×10^6 L/mol,远

大于 5.908×10^2 L/mol,说明高儿茶酚能与 BSA 形成复合物,且温度升高显著提高了复合物的稳定性,进一步证明高儿茶酚对 BSA 的猝灭以动态猝灭为主^[32-33]。在 298,310 K 和 320 K 时,结合位点数分别为 0.763,1.197 和 1.518 接近于 1,说明二者之间至少存在 1 个结合位点。从数值上看,结合位点数有增大的趋势,均未超过 2,推测随着温度的升高,二者的结合位点可能会超过一个^[34]。综上所述,高儿茶酚对 BSA 的猝灭可能是以动态猝灭为主,也有静态猝灭的过程。

2.2.4 高儿茶酚与 BSA 的热力学参数和作用力类型 由表 3 可知,3 个温度下的吉布斯自由能(ΔG)均为负数,表明高儿茶酚与 BSA 之间的结合反应是自发进行的;熵变(ΔS)和焓变值(ΔH)分别为 $1\ 002.567$ J/(mol·K)和 282.779 kJ/mol,均大于 0,说明二者在结合过程中熵增明显,属于吸热反应,且温度升高有助于增加复合物的稳定性,疏水作用力是该反应的主要驱动力^[35-37]。这与杨荣荣等^[38]

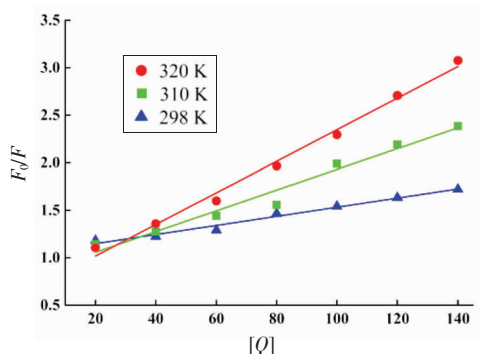


图 4 298, 310 K 和 320 K 时高儿茶酚和 BSA 相互作用的 Stern-Volmer 拟合图

Fig.4 Sterne-Volmer plot of the interaction between homocatechol and BSA at 298, 310 K and 320 K

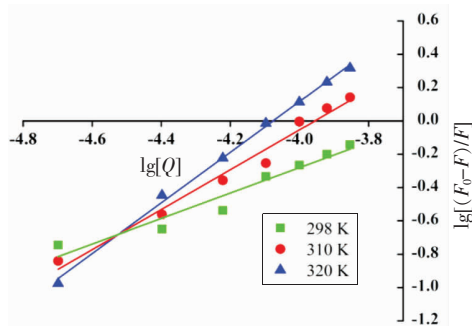


图 5 298, 310 K 和 320 K 时高儿茶酚与 BSA 相互作用的双对数图

Fig.5 Double logarithmic plot of the interaction between homocatechol and BSA at 298, 310 K and 320 K

表 1 不同温度条件下高儿茶酚与 BSA 相互作用的猝灭常数

Table 1 Stern-Volmer quenching constants of the interaction between homocatechol and BSA at different temperatures

成分	温度/K	$K_{sv} \times 10^4 /$ L·mol ⁻¹	$K_q \times 10^{12} /$ L·mol ⁻¹ ·s ⁻¹	R^2
高儿茶酚	298	0.480	0.480	0.9812
	310	1.091	1.091	0.9709
	320	1.663	1.663	0.9921

表 2 298, 310 K 和 320 K 高儿茶酚和 BSA 相互作用的结合常数与结合位点数

Table 2 Binding constants and number of binding sites of interaction between homocatechol and BSA at 298, 310 K and 320 K

成分	温度/K	$K_a /$ L·mol ⁻¹	n	R^2
高儿茶酚	298	5.908×10^2	0.763	0.9432
	310	5.424×10^4	1.197	0.9794
	320	1.535×10^6	1.518	0.9973

表3 高儿茶酚和BSA相互作用的热力学参数

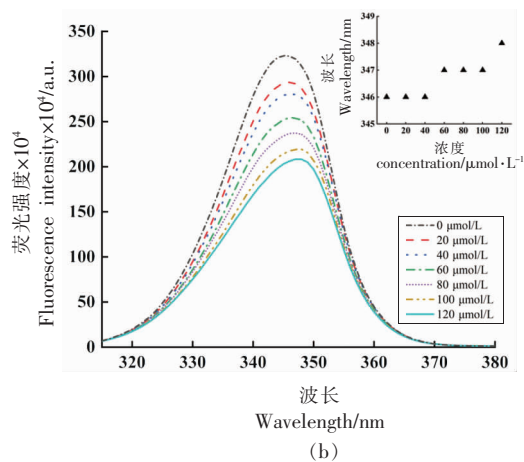
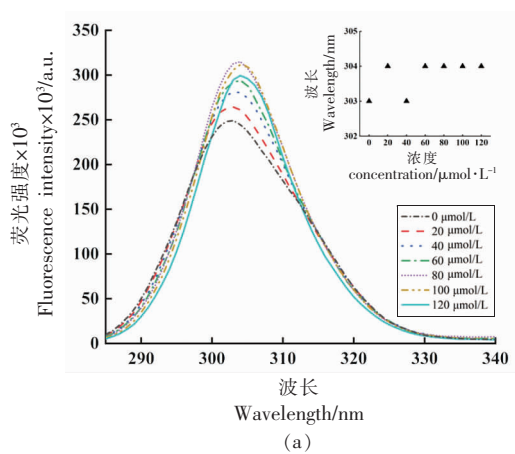
Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between homocatechol and BSA

多酚	温度/K	$\Delta G/$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\Delta S/$ $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$	$\Delta H/$ $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
	298	-15.810		
高儿茶酚	310	-28.096	1 002.567	282.779
	320	-37.896		

研究的槲皮素与BSA结合的作用力类型,俞波等^[39]研究酒石酸美托洛尔与BSA的相互作用力类型相同。

2.3 高儿茶酚与BSA相互作用的同步荧光光谱分析

同步荧光光谱中 $\Delta\lambda$ 为15 nm和60 nm时,分

图6 高儿茶酚与BSA相互作用的同步荧光光谱: $\Delta\lambda=15$ nm(a); $\Delta\lambda=60$ nm(b)Fig.6 Synchronous fluorescence spectra of the interaction between homocatechol and BSA: $\Delta\lambda=15$ nm(a) and $\Delta\lambda=60$ nm(b)

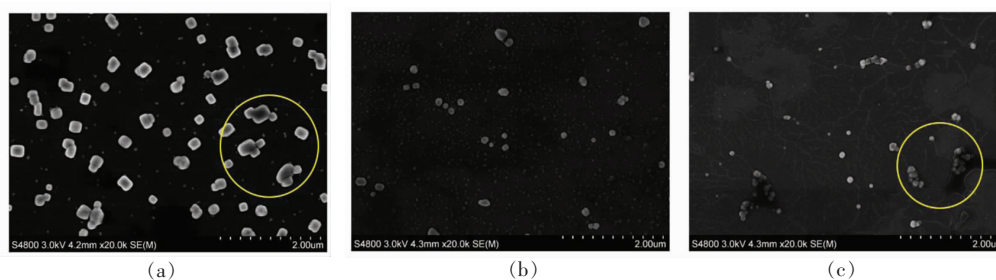
2.4 BSA与高儿茶酚相互作用前、后微观形态变化

从图7a可以看出不添加高儿茶酚时,BSA呈近似正方体,分布均匀,存在蛋白颗粒聚集现象。图7b(2 $\mu\text{mol/L}$)与图7a比较,添加高儿茶酚后,BSA的聚集现象减少了,说明高儿茶酚的加入,促进了BSA在溶液中的溶解,因此图7b中蛋白质颗粒比较分散。当高儿茶酚浓度继续增加时,蛋白质颗粒开始聚集,如图7c(4 $\mu\text{mol/L}$)所示。从这个结果推测,高儿茶酚浓度在一定范围,可能会促进蛋白质的溶解;当高儿茶酚浓度高于2 $\mu\text{mol/L}$ 时,使蛋白质发生聚集。

别反映蛋白质中酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基的光谱特征,它们的最大荧光发射波长与周围环境的极性有关^[40]。从图6a、6b可以看出,当不加入高儿茶酚时,BSA的Tyr和Trp残基的最大发射波长分别在303 nm和346 nm处;随着加入的高儿茶酚浓度的增大,Tyr与Trp残基的荧光峰分别红移了1 nm和3 nm;Tyr残基的荧光强度出现先增加后下降的趋势;Trp残基的荧光强度则呈现出下降趋势,其峰形均无明显变化,这表明高儿茶酚的加入不仅引起Tyr与Trp残基周围的微环境发生改变,还会降低其疏水性,使肽键的伸展程度有所增加。由2.2.3节可知,高儿茶酚与BSA之间至少存在一个结合位点,从Tyr与Trp残基荧光峰的红移程度来看,推测出高儿茶酚结合在BSA的Trp残基附近。

2.5 高儿茶酚与BSA相互作用的分子对接分析

分子对接结果表明,结合能量越低,大分子与小分子之间结合越紧密^[41]。根据表4可知,第3种模型的结合能为-5.0 kcal/mol,有4个疏水键和2个氢键,表明高儿茶酚与BSA能够紧密结合。王晓霞等^[42]研究了盐酸四环素与BSA相互作用,其结合位点在亚结构域IIA(site I)。另外,小分子与BSA的结合位点通常存在于亚结构域IIA和IIIA的子域中,即位点site I与site II^[43]。由图8a可知,高儿茶酚结合在BSA亚结构域IIA的疏水腔中(位点site I);从图8b、8c可以看出,高儿茶酚与



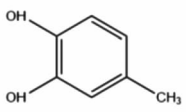
注:A-C 高儿茶酚浓度分别为 0,2,4 $\mu\text{mol/L}$; $C_{\text{BSA}}=0.025 \text{ mg/mL}$ 。

图 7 高儿茶酚与 BSA 相互作用的扫描电镜图 ($\times 20.0 \text{ K}$)

Fig.7 Scanning electronic microscopy images of interaction between homocatechol and BSA($\times 20.0 \text{ K}$)

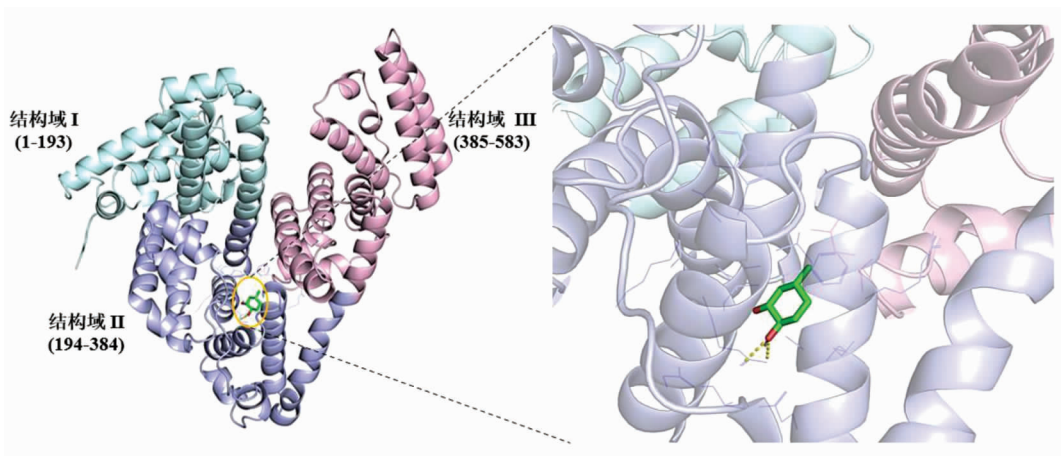
表 4 高儿茶酚和 BSA 相互作用主要对接结果

Table 4 Main docking results of interaction between homocatechol and BSA

对接物(高儿茶酚)	模型 序号	结合能/ $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	疏水键 数目	氢键 数目
	1	-5.1	4	0
	2	-5.1	3	0
	3	-5.0	4	2
	4	-4.9	3	1
	5	-4.8	5	1
	6	-4.7	4	1
	7	-4.7	3	1
	8	-4.7	4	2
	9	-4.7	4	1

BSA 结合后,形成的化学键主要是疏水键,这一结论与热力学实验结论一致。高儿茶酚通过疏水相

互作用与 BSA 中的 Ala209、Ala212、Leu346 和 Leu480 结合,键长分别为 4.20、5.28、4.27 \AA 和 5.32 \AA 。从图 8c 还可看出,高儿茶酚与 BSA 结合的过程中还形成两个常规氢键($\text{O}\cdots\text{H}-\text{X}$),一个是 Lys350 的羧基氧与高儿茶酚羟基的氢形成的,键长为 4.41 \AA ;另一个是与 Glu353 羧基氧形成的,键长为 5.06 \AA ,这些氢键在维持蛋白质结构中起重要的作用。以范德华力结合作用的氨基酸残基有 Val481、Leu330、Ala349、Arg208、Leu326,虽然范德华力是一种较弱的作用力,但是对维持复合物空间结构的稳定性起到支持作用。高儿茶酚被氨基酸残基形成的疏水口袋包围着,结合在 Trp213 附近(图 8c),通过疏水作用力与 BSA 相结合形成复合物,进一步说明高儿茶酚能够猝灭 BSA 的内源荧光,该结果与荧光光谱试验结论相同。



(a)相互作用 3D 图

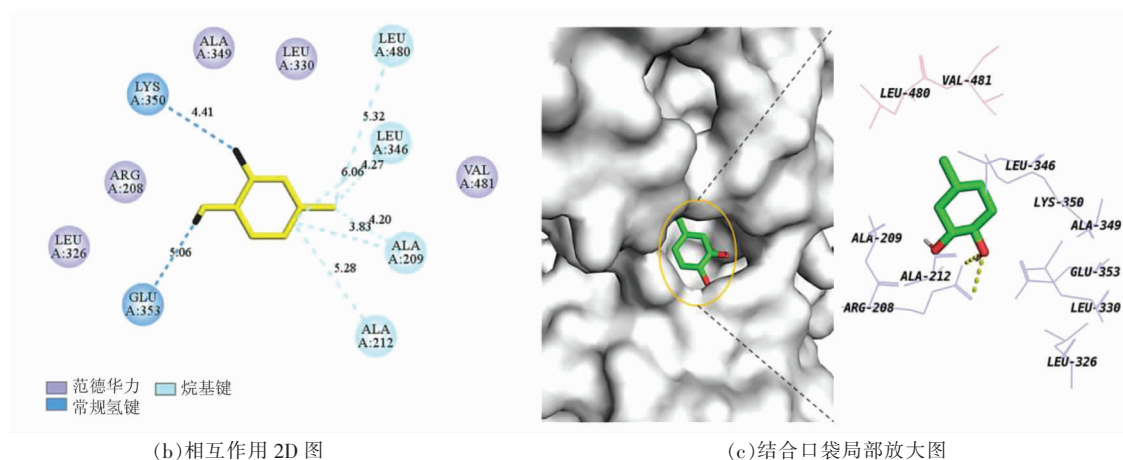


图8 高儿茶酚与BSA相互作用的分子对接图

Fig.8 Molecular docking diagram of interaction between homocatechol and BSA

3 结论

本研究发现,高儿茶酚对BSA的猝灭过程是以动态猝灭为主,也存在静态猝灭。根据热力学参数计算得出, ΔS 、 ΔH 为正值, ΔG 为负值,推测高儿茶酚与BSA形成的复合物主要以疏水作用力来维持稳定,二者结合过程是自发进行的。结合位点数 n 接近于1,且随着温度的升高不断增大,这说明高儿茶酚在BSA上至少存在一个结合位点。2 $\mu\text{mol/L}$ 的高儿茶酚能够促进蛋白的溶解,而当高儿茶酚浓度高于2 $\mu\text{mol/L}$ 时,部分蛋白又重新发生聚集。从分子对接结果看,高儿茶酚在BSA的疏水性口袋结构内部存在一个结合位(site I),距离Trp213很近。结合光谱试验结果,加入高儿茶酚改变了BSA的Tyr和Trp残基周围的微环境,最终猝灭Tyr和Trp残基的内源荧光。

参 考 文 献

- [1] OKTAYOGLU S G, COSKUN E, ERCIN M E, et al. 4-Methylcatechol prevents streptozotocin-induced acute kidney injury through modulating NGF/TrkA and ROS-related Akt/GSK3 β / β -catenin pathways[J]. International Immunopharmacology, 2018, 64: 52–59.
- [2] HU X F, PANG Y Y, MU H L, et al. Synthesis and gas separation performances of intrinsically microporous polyimides based on 4-methylcatechol-derived monomers[J]. Journal of Membrane Science, 2020, 620(12): 118825.
- [3] 祝岱植. 4-甲基儿茶酚及没食子酸十八酯合成工艺的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2015.
ZHU D Z. The study of synthetic technology of 4-methyl catechol and Octadecyl gallate[D]. Changsha: Hunan Normal University, 2015.
- [4] 胡正良. 对甲基儿茶酚二乙酸二甲酯的合成研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
HU Z L. New method on preparing P-methylcatechol dimethylacetate[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2002.
- [5] LI G L, Zhang H D, FATIMA S, et al. Oxidation of 4-methylcatechol: implications for the oxidation of catecholamines[J]. Biochemistry, 2007, 46(23): 6978–6983.
- [6] APPLOVÁ L, KARLÍČKOVÁ J, WARNCKE P, et al. 4-methylcatechol, a flavonoid metabolite with potent antiplatelet effects[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2019, 63(20): 1–11.
- [7] HSIAO T H, FU Y S, HO W Y, et al. Promotion of thermal analgesia and neuropeptidergic skin reinnervation by 4-methylcatechol in resiniferatoxin-induced neuropathy[J]. Kaohsiung Journal of Medical Sciences, 2013, 29(8): 405–411.
- [8] FUKUHARA K, ISHIKAWA K, YASUDA S, et al. Intracerebroventricular 4-methylcatechol (4-MC) ameliorates chronic pain associated with depression-like behavior via induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2012, 32(6): 971–977.

- [9] 刘春丽, 杨跃寰, 陈欲云. 荔枝果肉多酚氧化酶酶学性质研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2): 646-648.
LIU C L, YANG Y H, CHEN L Y. Study on enzymatic characteristics of polyphenol oxidase (PPO) in litchipulp[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(2): 646-648.
- [10] 肖卓炳, 陈上, 麻明友, 等. 猕猴桃软变及其多酚酶特性与动力学研究[J]. 吉首大学学报, 2000, 21(2): 6-8.
XIAO Z B, CHEN S MA M Y, Study on soften of chinese goosebeery characteristic and dynamics of polyphenolic oxidase [J]. Journal of Jishou University, 2000, 21(2): 6-8.
- [11] 陈琳琳. 小分子与血清白蛋白相互作用的研究[D]. 淮北: 淮北师范大学, 2012.
CHEN L L. Investigation on interaction of small molecules substances with serum albumin[D]. Huaibei: Huaibei Normal University, 2012.
- [12] WANG Q, HUANG C R, JIANG M, et al. Binding interaction of atorvastatin with bovine serum albumin: Spectroscopic methods and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2016, 156: 155-163.
- [13] JAHANBAN -ESFAHLAN A, PANAHI -AZAR V, SAJEDI S. Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking [J]. Food Chemistry, 2016, 202: 426-431.
- [14] LOU Y Y, ZHOU K L, SHI J H, et al. Characterizing the binding interaction of fungicide boscalid with bovine serum albumin (BSA); A spectroscopic study in combination with molecular docking approach[J]. Journal of Photochemistry & Photobiology B Biology, 2017, 173: 589-597
- [15] 姚惠芳, 景浩. 笃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 H F, JING H. Spectroscopic analysis of interaction between bovine serum albumin and anthocyanin[J]. Food Science, 2013, 34(23): 6-10.
- [16] 孙艳辉, 魏亚玲, 吴霖生, 等. 光谱法研究绿原酸和牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品工业科技, 2010, 31(4): 129-131.
SUN Y H, WEI Y L, WU L S, et al. Study on the interaction of chlorogenic acid and bovine serum album in by spectrum[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(4): 129-131.
- [17] 赵刚, 顾佳丽, 励建荣. 胭脂红与牛血清白蛋白相互作用的光谱学研究[J]. 中国食品学报, 2017, 17(5): 270-275.
ZHAO G, GU J L, LI J R. Spectroscopic analysis on the interaction of ponceau 4R and bovine serum albumin[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(5): 270-275.
- [18] 张蕊, 吴超仪, 刘宇, 等. 分子对接和荧光光谱法研究麦角甾醇与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 食品科学, 2015, 36(23): 38-42.
ZHANG R, WU C Y, LIU Y, et al. Studies on the interaction of ergosterol with bovine serum albumin (BSA) by fluorescence spectroscopy and molecular docking[J]. Food Science, 2015, 36(23): 38-42.
- [19] 俞波, 兰秀凤, 张林, 等. 法莫替丁与牛血清蛋白相互作用的光谱研究[J]. 激光与光电子学进展, 2018, 55(4): 1-7.
YU B, LAN X F, ZHANG L, et al. Spectroscopic study on Interaction of Famotidine with Bovine Serum Albumin[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2018, 55(4): 1-7.
- [20] 李庆舒, 程琳, 邓红, 等. 三种多酚与牛血清蛋白相互作用的初步研究[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 180-187.
LI Q S, CHENG L, DENG H, et al. Study of interactions between three polyphenols and bovine serum albumin[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 180-187.
- [21] WANG Z, CHEN J, WANG S, et al. Characterizing the interaction between oridonin and bovine serum albumin by a hybrid spectroscopic approach [J]. Journal of Luminescence, 2013, 134: 863-869.
- [22] 陈凤英, 金振国, 杨林, 等. 紫外吸收光谱法和电化学法研究原儿茶醛与牛血清蛋白的相互作用及共存金属离子的影响[J]. 分析实验室, 2019, 38(11): 1289-1294.
CHEN F Y, JIN Z G, YANG L, et al. Interaction of protocatechuic aldehyde with bovine serum albumin and the effect of coexisting metal ions by ultra violet-visible spectroscopy and electrochemistry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2019, 38(11): 1289-1294.
- [23] 吕艳芳, 梁倩倩, 郭雨晴, 等. 分子对接和光谱法研究原儿茶醛和阿魏酸与牛血清白蛋白的互作机理[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 24-31.

- LÜ Y F, LIANG Q Q, GUO Y Q, et al. Studies on the interactions of protocatechuic aldehyde and ferulic acid with bovine serum albumin by molecular docking and spectroscopy[J]. Food Science, 2021, 42(14): 24-31.
- [24] 朱莉, 马越, 赵晓燕, 等. 紫玉米苞叶花色苷与牛血清白蛋白相互作用研究简[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(12): 13-16.
- ZHU L, MA Y, ZHAO X Y, et al. Study on the interaction between purple corn bract anthocyanins and bovine serum albumin[J]. Food Research and Development, 2017, 38(12): 13-16.
- [25] SHAHABADI N, MAGHSUDI M, KIANI Z, et al. Multi spectroscopic studies on the interaction of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive with bovine serum albumin[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 124: 1063-1068.
- [26] 刘昭清, 万众, 江政, 等. 罗非昔布与牛血清白蛋白之间相互作用的研究[J]. 分析科学学报, 2020, 36(3): 421-426.
- LIU Z Q, WAN Z, JIANG Z, et al. Study on the interaction between rofecoxib and bovine serum albumin[J]. Journal of Analytical Science, 2020, 36(3): 421-426.
- [27] 张怀斌, 马丽英, 荣先国. 灯盏花素与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 化学研究, 2012, 23(2): 13-16.
- ZHANG H B, MA L Y, RONG X G. Interaction between breviscapine and bovine serum albumin studied by fluorescence spectrometry[J]. Chemical Research, 2012, 23(2): 13-16.
- [28] GE Y S, JIN C, SONG Z, et al. Multi-spectroscopic analysis and molecular modeling on the interaction of curcumin and its derivatives with human serum albumin: A comparative study[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 124: 265-276.
- [29] LOU Y Y, ZHOU K L, PAN D Q, et al. Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of clonazepam with bovine serum albumin (BSA) [J]. Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 2017, 167: 158-167.
- [30] 吴克刚, 周华丽, 柴向华, 等. 光谱法研究芳樟醇与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 现代食品科技, 2015, 31(12): 141-148.
- WU K G, ZHOU H L, CHAI X H, et al. Multi-spectroscopic studies of the interaction of linalool with bovine serum albumin[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(12): 141-148.
- [31] 曹团武, 黄文兵, 时建伟, 等. 光谱法和分子对接研究哈巴俄苷与牛血清白蛋白的相互作用机制[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 993-1000.
- CAO T W, HUANG W B, SHI J W, et al. Binding interaction of harpagoside and bovine serum albumin: spectroscopic methodologies and molecular docking[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(5): 993-1000.
- [32] TIAN F F, LI J H, JIANG F L, et al. The adsorption of an anticancer hydrazone by protein: An unusual static quenching mechanism[J]. RSC Advances, 2011, 2(2): 501-513.
- [33] 焦安妮, 于敏, 关玥, 等. 大叶冬青皂苷与牛血清白蛋白的相互作用研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(19): 8-14.
- JIAO A N, YU M, GUAN Y, et al. Study on the interaction between the saponins of *Il-ex latifolia* Thunb and bovine serum albumin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(19): 8-14.
- [34] DAS S, BORA N, ROHMAN M A, et al. Molecular recognition of bio-active flavonoids quercetin and rutin by bovine hemoglobin; an overview of the binding mechanism, thermodynamics and structural aspects through multi-spectroscopic and molecular dynamics simulation studies [J]. Physical chemistry chemical physics: PCCP, 2018, 20(33): 1-43.
- [35] 徐香玉, 孙祥军, 刘敏, 等. 氧化苦参碱与牛血清白蛋白相互作用的热力学研究[J]. 化学学报, 2009, 67(18): 2155-2158.
- XU X Y, SUN X J, LIU M, et al. Thermodynamic study on interaction of oxymatrine with bovine serum albumin[J]. Acta Chimica Sinica, 2009, 67(18): 2155-2158.
- [36] 吴汉东, 史雪岩, 李永丹. 荧光光谱法研究辛硫磷与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 分析实验室, 2009, 28(3): 15-18.
- WU H D, SHI X Y, LI Y D. Study of interaction between phoxim and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(3): 15-18.
- [37] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to

- stability[J]. *Biochemistry*, 1981, 20(11): 3096–3102.
- [38] 杨荣荣, 朱靖博, 寇自农, 等. 光谱法与分子对接研究槲皮素与牛血清白蛋白的结合特性[J]. *食品科技*, 2014, 39(7): 93–98.
- YANG R R, ZHU J B, KOU Z N, et al. Interaction characteristics of quercetin and BSA using spectroscopic and molecular docking[J]. *Food Science and Technology*, 2014, 39(7): 93–98.
- [39] 俞波, 兰秀风, 陈奇. 酒石酸美托洛尔与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究[J]. *西安文理学院学报(自然科学版)*, 2018, 21(1): 81–85.
- YU B, LAN X F, CHEN Q. Spectroscopic research on the interaction between metoprolol tartrate and bovine serum protein[J]. *Journal of Xi'an University (Natural Science Edition)*, 2018, 21(1): 81–85.
- [40] HU Y Y, XU S Q, ZHU X S, et al. Study on the interaction between methyl violet and bovine serum albumin by spectral analyses[J]. *Spectrochimica Acta Part A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 74(2): 526–531.
- [41] 赵诗雨, 笔雪艳, 杨炳友, 等. 基于 HDAC3/8 分子
- 交互技术的类叶牡丹抗类风湿性关节炎有效部位活性成分分析[J]. *中草药*, 2020, 51(8): 2117–2124.
- ZHAO S Y, BI X Y, YANG B Y, et al. Analysis of active components of *Caulophyllum robustum* against rheumatoid arthritis based on HDAC3/8 molecular interaction technology [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2020, 51(8): 2117–2124.
- [42] 王晓霞, 聂智华, 李松波, 等. 多光谱法与分子对接法研究盐酸四环素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(8): 2468–2476.
- WANG X X, NIE Z H, LI S B, et al. Study on the interaction between chlortetracycline hydrochloride and pepsin by multispectral and molecular docking[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, 38(8): 2468–2476.
- [43] 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 H L. Study on the interaction between small-molecular drugs and bovine serum albumin [D]. Changchun: Jilin University, 2013.

Studies on the Interaction between Homocatechol and Bovine Serum Albumin Using Spectroscopic and Molecular Docking

Lü Yanfang¹, Zhang Ziqing¹, Liang Qianqian¹, Li Ying¹, Liu Xinxin², Li Xuepeng^{1*}
(¹College of Food Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning
²School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240)

Abstract The interaction between homocatechol and bovine serum albumin (BSA) was studied. The results showed that homocatechol could quench the fluorescence of BSA. A macromolecular complex with weak fluorescence was spontaneously formed with BSA mainly through hydrophobic bond, and at least one binding site of homocatechol on BSA at 298, 310 K and 320 K. The binding constants of homocatechol to BSA were 5.908×10^2 , 5.424×10^4 , 1.535×10^6 L/mol. It is speculated that the quenching of BSA by homocatechol was mainly dynamic quenching, and there is also a static quenching process. The cold field emission scanning electron microscopy showed that 2 $\mu\text{mol/L}$ homocatechol could promote the dissolution of protein and made its distribution more uniform. When the concentration of homocatechol was 2 $\mu\text{mol/L}$, the protein would aggregate. Molecular docking analysis showed that homocatechol was stably bound to the hydrophobic pocket of BSA Subdomain IIA (site I) mainly through hydrophobic bond, hydrogen bond and van der Waals force.

Keywords homocatechol; bovine serum albumin; fluorescence spectrum; scanning electronic microscope; molecular docking