

# 光谱法及分子模拟分析大豆皂苷 II 与牛血清白蛋白的相互作用

光翠娥<sup>1,2</sup>, 桑尚源<sup>1</sup>, 干建平<sup>2</sup>, 林芳<sup>1</sup>, 李志刚<sup>1</sup>

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 黄冈师范学院 经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室/大别山特色资源开发湖北省协同创新中心, 湖北 黄冈 438000)

**摘要:** 采用内源荧光光谱、圆二色光谱以及分子模拟表征了大豆皂苷 II 与牛血清白蛋白(BSA)之间的相互作用。内源荧光光谱显示,大豆皂苷 II 使 BSA 最大发射波长略微蓝移且出现荧光猝灭,色氨酸残基的微环境疏水性增加,蛋白质分子构象发生改变;大豆皂苷 II 也使 BSA 的圆二色光谱负椭圆率下降,肽链伸展,改变了 BSA 的二级结构。计算机模拟分子对接显示了两者的稳定结合,大豆皂苷 II 的阿拉伯糖基及鼠李糖基与 BSA 形成氢键作用,参与其中的重要氨基酸有 Asp108、Asp111、Arg144 和 Arg458,皂苷的三萜烯部分则伸进由 15 个氨基酸残基构成的疏水腔中形成疏水相互作用。

**关键词:** 大豆皂苷 II;牛血清白蛋白;荧光光谱;圆二色光谱;分子模拟

**中图分类号:** R 285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)01-0015-05

## Molecular Interaction between Soyasaponin II and Bovine Serum Albumin Determined by Spectrometric and Molecular Modeling Methods

GUANG Cuie<sup>1,2</sup>, SANG Shangyuan<sup>1</sup>, GANG Jianping<sup>2</sup>, LIN Fang<sup>1</sup>, LI Zhigang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization & Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, Huanggang Normal University, Huanggang 438000, China)

**Abstract:** Intrinsic fluorescence spectrometry, circular dichroism spectrometry and molecular modeling methods were used to investigate the interaction between soyasaponin II and bovine serum albumin (BSA). Results showed that the adding of soyasaponin II caused the fluorescence quenching and a decrease of the maximum emission wavelength, leading to the increase of hydrophobicity around tryptophan and the change of tertiary structure of BSA. The binding of soyasaponin II also reduced the negative ellipticity of circular dichroism spectra, unfolded the peptide chain and changed

收稿日期: 2015-11-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201289);经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室和大别山特色资源开发湖北省协同创新中心联合开放基金项目(2017AW01)。

作者简介: 光翠娥(1976—),女,湖北仙桃人,工学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品营养与功能因子研究。

E-mail: guang1226@hotmail.com

引用本文: 光翠娥, 桑尚源, 干建平, 等. 光谱法及分子模拟分析大豆皂苷 II 与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(01): 15-19.

the secondary structure of BSA. Molecular docking revealed a good binding of soyasaponin II to BSA, with arabinopyranosyl and rhamnopyranosyl parts of the sugar chain forming hydrogen bonds with Asp108, Asp111, Arg144 and Arg458, and the aglycone moiety interacting with 15 amino acids by hydrophobic interaction.

**Keywords:** soyasaponin II, bovine serum albumin, fluorescence spectrometry, circular dichroism spectrometry, molecular modeling

大豆皂苷 II 是一种五环三萜类齐墩果酸型单糖链皂苷, 由非极性三萜苷元 B 的 C-3 羟基和极性三聚糖分子环状半缩醛上的羟基失水缩合而成, 见图 1。大豆皂苷 II 是豆制品中皂苷的主要存在形式之一, 已被发现具有促甲状腺分泌(保护肝脏)、抑制肾素活性(降低血压)、抗 HSV-1 疱疹病毒以及增强免疫原性(免疫佐剂)的功能<sup>[1]</sup>。

牛血清白蛋白(BSA)由 582 个氨基酸组成, 其中包含两个色氨酸(Trp134 和 Trp212)和 16 个酪氨酸残基, 因此具有荧光活性。BSA 的三维结构类似于球状, 由 3 个相似的结构域 I、II 和 III 组成, 每一个结构域又由 A 和 B 两个亚结构域组成。BSA 的亚结构域以槽口相对的方式形成圆筒状结构, 疏水性氨基酸大多包埋于圆筒内部, 构成疏水腔<sup>[2]</sup>。

BSA 是哺乳动物血浆中的主要载体蛋白, 具有储存和转运外源性小分子的重要功能。生理活性物质吸收进入体内后, 由血清白蛋白通过各种生理膜运输到各组织器官, 两者之间结合率与结合能力的不同, 会影响到活性物质的作用强度和作用时间<sup>[2]</sup>。实验选用与人血清白蛋白结构相似、价格便宜、更易提纯的 BSA, 通过荧光光谱、圆二色光谱及分子模拟等研究活性小分子和 BSA 相互作用, 为大豆皂苷 II 的生物利用提供理论基础。

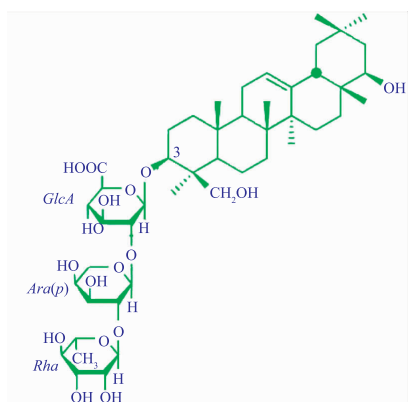


图 1 大豆皂苷 II 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of soyasaponin II

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大豆皂苷 II (纯度 91.7%): 美国 ChromaDex 公司产品; BSA: Sigma 公司产品; 三羟甲基氨基甲烷(Tris): 国药集团试剂公司产品。Tris-HCl 缓冲液: 500 mL 的 0.1 mol/L Tris 溶液中加入约 420 mL 的 0.1 mol/L 的盐酸, 调节 pH 至 7.4, 精确加入 5.8 g 氯化钠, 定容至 1 000 mL, 4℃ 保存待用。

FLUORMAX-4 荧光光谱仪: 美国 HORIBA 公司产品; MOS-450 AF-CD 圆二色光谱仪: 法国 Bio-Logic 公司产品; 软件 Discover Studio (DS) 2.5、LigPlot+ 分析软件: 美国 Accelrys 软件公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 BSA 的内源荧光光谱检测** 用 Tris 缓冲液配制 BSA 与大豆皂苷 II 不同比例的混合液。BSA 的最终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ , 大豆皂苷 II 的终浓度分别为 0、0.5、1、2、4  $\mu\text{mol/L}$ , 混合静置 30 min。分别吸取 200  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 和样品注入 2 mm 比色皿中测定荧光光谱。室温下 (20  $^{\circ}\text{C}$ ), 以 295 nm 为激发波长, 狭缝为 5 nm, 在 300~450 nm 波长范围内扫描 BSA 样品的发射光得到内源荧光光谱图, 重复扫描 3 次取平均值。空白为 Tris-HCl 缓冲溶液, 荧光强度值为扣除空白后的相对值。

**1.2.2 BSA 的远紫外圆二色光谱检测** 分别吸取 200  $\mu\text{L}$  Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 和样品注入 2 mm 比色皿中测定圆二色光谱, 每次测量扣除 Tris-HCl 缓冲溶液的背景干扰。室温下 (20  $^{\circ}\text{C}$ ) 光谱测定条件是 200~250 nm 波长范围扫描, 扫描速度为 20 nm/min, 响应时间为 2 s。

**1.2.3 分子模拟** 在蛋白质数据库 (PDB) 中获取 BSA 晶体的三维结构模型数据文件 (登录号为 3v03), 使用 DS2.5 软件删除其中的配体小分子和水分子, 补入缺失的氢原子, 得到 BSA 晶体的完整三维结构。大豆皂苷 II 的立体结构数据文件从网站

www.chemical-book.com 中搜索下载,采用 PRODRG 网站 (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg>) 对大豆皂苷 II 的立体结构进行加电荷和构象优化等预处理。以 BSA 的 Trp213 残基为中心,半径为  $13 \times 10^{-8}$  cm 的球体范围为对接区域,使用 DS 软件中的 Libdock 模块进行刚性分子对接。对接程序参数设置如下:Docking Tolerance,0.25;Numbers of Hotspots,100;Docking Preference,High Quality;Conformation Method,FAST;Parallel Processing,False。从大豆皂苷 II 构象集中选取打分函数 LibDockscore 得分最高者,将其对接复合物的文件导入 Ligplot+软件中,得到蛋白与皂苷分子间相互作用网,进一步分析得到氢键和疏水相互作用位点<sup>[3]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度大豆皂苷 II 对 BSA 稳态内源荧光光谱的影响

BSA 有两个色氨酸残基,一个 Trp213 在疏水腔内部,另一个 Trp134 在亚结构域 IB 表面<sup>[4]</sup>。以 295 nm 为激发波长,BSA 的内源荧光基团色氨酸产生发射荧光。蛋白质与小分子作用,色氨酸对微环境的变化敏感而使荧光光谱发生改变。在稳态内源荧光光谱图 2 中,单纯 BSA 在 334 nm 出现最大吸收峰,随着大豆皂苷 II 的添加,最大发射波长略微蓝移至 333 nm;在 BSA 与大豆皂苷 II 比例为 1:1、1:2 和 1:4 时,峰型不变,但出现荧光猝灭,BSA 荧光光谱特征峰的相对强度为 98%、98%和 97%。因此,大豆皂苷 II 与 BSA 发生弱相互作用,使色氨酸残基的微环境的疏水性增加,蛋白质分子构象发生改变,形成了发射弱的荧光复合物。

### 2.2 不同浓度大豆皂苷 II 对 BSA 圆二色光谱的影响

蛋白质生色团的光活性中心对平面圆偏振光中的左、右圆偏振光的吸收不同,造成透射后偏振光矢量的振幅差,圆偏振光变成椭圆偏振光,即为圆二色性,不同波长对应的椭圆率称为圆二色光谱,小于 250 nm 的远紫外区圆二色光谱反映蛋白质肽键的圆二色性<sup>[5]</sup>。在圆二色光谱图 3 中,靠近 209 nm 和 221 nm 处出现的两个负肩峰为单纯 BSA 分子  $\alpha$  螺旋结构的特征峰,吸收峰的强度可以反映蛋白  $\alpha$  螺旋的变化。随着大豆皂苷 II (特别是 4 倍的皂苷) 的加入,BSA 的圆二色光谱的负椭圆率下降,原 209 nm 处的负峰移向高波数并且振幅减

弱,说明皂苷的疏水作用引起微构象的变化,使肽链伸展,改变了 BSA 的二级结构。

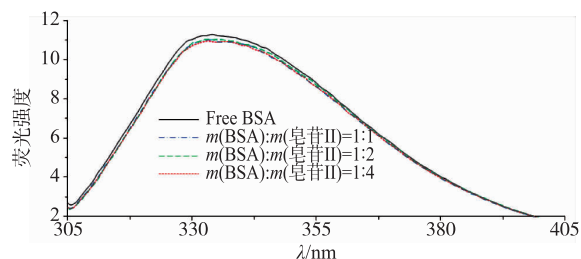


图 2 不同浓度大豆皂苷 II 对 BSA 内源荧光光谱的影响  
Fig. 2 Fluorescence spectra of BSA with different concentrations of soyasaponin II

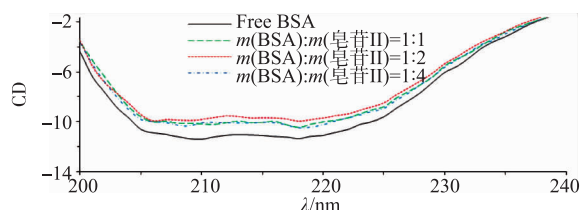


图 3 大豆皂苷 II-BSA 混合溶液的远紫外圆二色光谱图  
Fig. 3 Far-UV CD spectra of the soyasaponin-BSA solutions

### 2.3 大豆皂苷 II 与 BSA 相互作用的分子对接

DS 工作站中 Libdock 模块的对接吻合度打分函数 LibDockscore 是对几何形状、化学环境以及能量的综合评价参数,也是根据配体与受体对接时的对接模式、亲和力和相对能量值等进行综合打分。LibDockscore 大于 100 表示配体与受体能较好地结合,其值越大则表明对接产生的复合物构象越稳定,Poses 是与配体受体蛋白对接时所得配体的构象数<sup>[3]</sup>。当大豆皂苷 II 与 BSA 对接时,所得立体构象总数 Poses 为 97,LibDockscore 最高分为 188.485,表明两者可较好地稳定结合,所得复合物构象稳定。选取 LibDockscore 评分最高的构象,制作分子对接三维图。图 4 中,绿色为色氨酸残基,透明球中的线型模型分子为大豆皂苷 II 的最优对接构象,由此可知皂苷处于“心型”BSA 的疏水腔内。

### 2.4 大豆皂苷 II 和 BSA 间的氢键和疏水相互作用

运用 Ligplot+软件,得到最佳复合物分子间相互作用二维图,并通过 HBPLUS 程序计算氢键和疏水作用<sup>[6]</sup>。根据图 5,表 1 总结了稳定的氢键作用,由此可知,BSA 中的 4 个氨基酸 Asp108、Asp111、Arg144 及 Arg458 与大豆皂苷 II 形成了 6 个氢键,其中 Arg144 与 O46 形成的氢键最短。同样地,从二



维图 5 可知,BSA 中的 15 氨基酸 Ser109、Pro110、His145、Pro146、Leu189、Thr190、Ala193、Gln424、Ser428、Lys431、Val432、Arg435、Tyr451、Leu454 及 Ile455 参与了与大豆皂苷 II 的疏水作用。

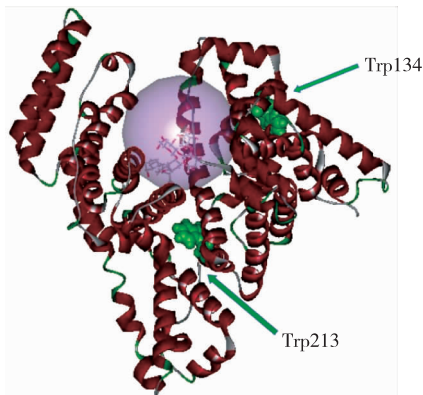
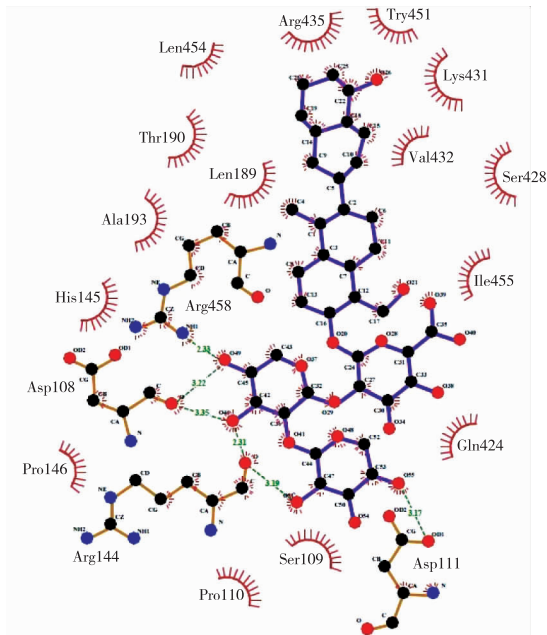


图 4 大豆皂苷 II 与 BSA 的对接三维图  
Fig. 4 Molecular docking 3D-diagram of soyasaponin II and BSA



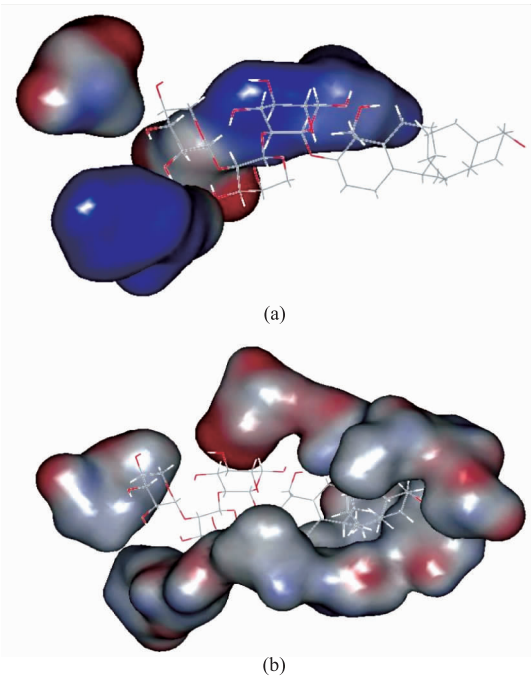
注:实心圆代表原子;红色为氧原子,黑色为碳原子,蓝色为氮原子。原子间的实线代表化学键;黄色为氨基酸残基的化学键,紫色为配体化学键。带标签的氨基酸代表 BSA 中与大豆皂苷 II 相互作用的残基;红色并带有辐射状短线弧线的为参与疏水作用的残基,其它为参与氢键的残基,绿色虚线代表氢键作用。

图 5 大豆皂苷 II 和 BSA 分子间相互作用的二维图  
Fig. 5 2D-diagram of the molecular interaction between soyasaponin II and BSA  
根据以上相互作用的分析,使用 DS 工作站得

到氢键和疏水相互作用的三维图。图 6(a)中,大豆皂苷 II 的三糖基链中第二个阿拉伯糖基、第三个鼠李糖基与 BSA 氨基酸残基有氢键作用。图 6(b)中,参与疏水作用的氨基酸在 BSA 内部组成一个疏水性腔体(即代表静电中性点白色部分),大豆皂苷 II 的疏水性配基齐墩果烷伸进 BSA 的这个疏水腔内,两者产生了疏水相互作用。

表 1 大豆皂苷 II 与 BSA 分子间氢键作用  
Table 1 Hydrogen bond interaction between soyasaponin II and BSA

| 氢键序号 | 配体原子 | 受体原子       | 键长/ $\times 10^{-8}$ cm |
|------|------|------------|-------------------------|
| 1    | O49  | Arg458-NH1 | 2.33                    |
| 2    | O49  | Asp108-O   | 3.22                    |
| 3    | O46  | Asp108-O   | 3.35                    |
| 4    | O46  | Arg144-O   | 2.31                    |
| 5    | O51  | Arg144-O   | 3.19                    |
| 6    | O53  | Asp111-OD1 | 3.17                    |



注:线型模型为大豆皂苷 II (灰线为 C,白线为 H,红线为 O);泊松-玻尔兹曼模型为 BSA 中参与氢键(a)和疏水(b)作用的氨基酸残基(红色区域表示静电势负的部分,蓝色表示静电势正的部分,白色表示静电中性的部分)。  
图 6 大豆皂苷 II 与 BSA 分子间氢键和疏水作用三维图  
Fig. 6 3D diagrams of hydrogen bond and hydrophobic interactions between soyasaponin II and BSA

### 3 结 语

通过内源荧光光谱、圆二色光谱和分子建模方法研究了大豆皂苷Ⅱ与BSA之间的相互作用。BSA的内源荧光光谱表明蛋白与大豆皂苷Ⅱ作用后其立体构象发生变化,圆二色光谱显示大豆皂苷Ⅱ还对BSA的二级结构产生影响。计算机模拟分子对接

表明大豆皂苷Ⅱ与BSA的结合稳定性较好,大豆皂苷Ⅱ的三糖基链中阿拉伯糖基和鼠李糖基部分与BSA形成氢键作用,参与其中的重要氨基酸有Asp108、Asp111、Arg144和Arg458残基,皂苷的配基三萜烯部分与BSA的15个氨基酸残基形成疏水相互作用。这些研究阐明了大豆皂苷Ⅱ与BSA的结合特点,为进一步开发大豆皂苷提供了参考依据。

### 参考文献:

- [1] GUANG Cuie, CHEN Jie, SANG Shangyuan, et al. Biological functionality of soyasaponins and soyasapogenols [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2014, 62(33): 8247-8255.
- [2] 唐金艳. 光谱法研究三种药物与BSA的相互作用[D]. 黄石:湖北师范学院, 2011.
- [3] ZHANG Hailing, GUANG Cuie, JIANG Bo, et al. Molecular docking of soyasaponin I and its analogues with renin and the analysis of binding energy[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(10): 1056-1062. (in Chinese)
- [4] MAJOREK K A, POREBSKI P J, DAYAL A, et al. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins[J]. **Molecular Immunology**, 2012, 52(3-4): 174-182.
- [5] SHEN Xingcan, LIANG Hong, HE Xiwen, et al. Recent trends and spectroscopic methods for analysis of the protein conformation with circular dichroism[J]. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, 2004, 32(3): 388-394. (in Chinese)
- [6] LASKOWSKI R A, SWINDELLS M B. LigPlot+: Multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery [J]. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2011, 51(10): 2778-2786.

## 会 议 消 息

会议名称(中文): 第四届农业和生物科学国际学术会议

会议名称(英文): 2018 International Conference on Applied Biochemistry and Biotechnology (ABB 2018)

所属学科: 生物技术与生物工程, 农林基础

开始日期: 2018-06-26

结束日期: 2018-06-29

所在城市: 浙江省 杭州市

主办单位: 渤海大学

联系电话: +86-17362961533

E-MAIL: abs@absconf.org

会议网站: <http://www.absconf.org/index.html>

会议背景介绍: The 4th International conference on Agricultural and Biological Sciences will be held from June 26th to 29th, 2018 in Hangzhou, Zhejiang Province, China. International Conference on Agricultural and Biological Sciences is convened annually to gather related experts and scholars to exchange their innovative ideas and experiences in the field of Agricultural and Biological Sciences. ABS 2015, ABS 2016 and ABS 2017 were held successfully with the kindly support from participants of more than 35 countries.

Hangzhou, the capital of Zhejiang Province, is known as Heaven on Earth with its stunning natural beauty and rich cultural heritage. It was described by Marco Polo as the finest and most splendid city in the world, and listed in the Top 52 places to go in 2016 by The New York Times.

On Behalf of the organizing committee, we cordially invite all of you to participate in ABS 2018!