

# 小分子物质与蛋白质相互作用研究方法的 现状与进展

唐江宏, 连宁, 张国华, 赵德建

(江苏技术师范学院 化学与环境工程学院, 江苏 常州 213001)

**摘要:** 小分子与蛋白质相互作用的研究是化学生物学的重要研究内容。蛋白质能与许多内源性和外源性小分子物质结合形成超分子复合物。通过实验方法可以获得蛋白质与小分子配体作用的结合常数、结合位点数、结合位置、作用力类型以及在客体小分子作用下蛋白质结构与功能的变化等信息。简述紫外可见光谱、荧光光谱法、傅立叶变换红外光谱和分子模拟法及其他分析方法在小分子与蛋白质相互作用方面的应用和研究进展。

**关键词:** 蛋白质; 小分子; 相互作用; 方法综述

中图分类号: O629.73

文献标识码: A

文章编号: 1374-8522(2010)12-0001-07

## 0 引言

蛋白质能与内源物质,如胆红素、脂肪酸、维生素和激素等结合,也能与许多外源物质,如药物、染料、表面活性剂、离子和量子点等配体作用。这些物质与蛋白质结合生成超分子复合物之后,体系的光谱、电化学等性质发生改变,从而提供蛋白质浓度或结构方面的信息。小分子与蛋白质相互作用的研究是化学生物学的重要内容,能为生命科学、化学及临床药理学提供丰富的信息。常用的研究方法包括紫外—可见吸收光谱、荧光光谱法、圆二色谱法、傅里叶变换红外光谱法、平衡透析法、液相色谱法、电化学方法、X-晶体衍射等,随着实验技术的日臻完善,质谱、核磁共振、毛细管电泳、激光拉曼散射等方法的应用也日益增多。此外,计算机对接技术的分子模拟也是近年来发展较快的一门新型学科,可以在分子水平上研究客体分子与蛋白质相互作用的信息。利用这些方法可以获得关于蛋白质与小分子配体作用的结合常数、结合位点数、结合位置、作用力类型以及在客体小分子作用下蛋白质结构与功能的变化等信息。本文重点阐述紫外可见光谱、荧光光谱法、傅立叶变换红外光谱和分子模拟法在小分子与蛋白质相互作用方面的应用和研究进展。

## 1 紫外—可见吸收光谱法

在组成蛋白质常见的20种 $\alpha$ -氨基酸中只有芳香族氨基酸如色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)和含硫氨基酸在230~310 nm波长范围内有吸收,其紫外吸收,主要来源于这些氨基酸的侧链基团(Trp的吲哚基、Tyr的酚基、Phe的苯基)对光的吸收,此外肽键对光也有强烈吸收。在蛋白质的紫外吸收光谱中,280 nm处的峰是酪氨酸、色氨酸残基中共轭双键的吸收峰,苯丙氨酸的吸收峰出现在257 nm波长附近,210 nm处的峰是肽键的强吸收峰<sup>[1]</sup>。一般来说,氨基酸残基的微环境由蛋白质分子的构象决定,构象改变,微环境改变,生色基团的紫外吸收光谱随之发生改变。若小分子配体与生物大分子结合前后的吸

收光谱有一定差异时,说明蛋白质的构象发生了变化<sup>[2]</sup>。王亚俐等<sup>[3]</sup>利用光谱法研究了苯甲酸钠与牛血清蛋白(BSA)的体外相互作用。苯甲酸钠的加入使得 BSA 紫外吸收光谱中 210 nm 处的峰值逐渐降低,峰位红移,这可能是苯甲酸钠使 BSA 主链构象发生变化,螺旋结构变松散。魏晓芳等<sup>[4]</sup>利用紫外光谱研究了 pH 2.3~11.3 的范围内 BSA 分子中芳香氨基酸残基微环境的变化,结果显示,碱诱导蛋白质分子空间构象充分伸展,将更多的疏水性氨基酸残基暴露于溶剂中。借助于吸收光谱也可辅助判断小分子对蛋白质荧光的猝灭机理<sup>[5]</sup>。利用紫外可见吸收光度法能够计算小分子与蛋白质作用的结合常数和结合位点数。刘媛等<sup>[6]</sup>应用分光光度法的原理,假定三七皂甙的有效成分与 BSA 的结合产物在测定的波长没有吸收的情况下,推导出用吸光度表示的 Lineweaver-Burk 双倒数方程,利用作图的方法求出了三七总皂甙的两个有效成分与 BSA 的结合常数。魏永巨等<sup>[7]</sup>应用溶液平衡的处理方法,用吸光度表示溶液中组分的浓度,导出了与 Scatchard 方程完全相同的表达形式。

## 2 荧光光谱法

研究小分子配体与蛋白质的相互作用,荧光光谱法是应用最广泛的一种方法<sup>[8,9]</sup>。该方法能够提供较多的荧光参数如激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等,这些参数从各个角度反映了分子的成键和结构情况以及发光特性。通过对这些参数的测定,不但可以做一般的定量分析<sup>[10]</sup>,而且还可以推断蛋白质分子在各种环境中的构象变化<sup>[11]</sup>,从而进一步阐明蛋白质结构与功能的关系,也可获得蛋白质与小分子作用的结合常数、结合位点数、结合位置、作用力类型等有用的信息<sup>[12,13]</sup>。

蛋白质的内源荧光主要来源于色氨酸(Try)、酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)残基。由于这三种残基的侧链生色基团不同而有不同的荧光光谱,其最大发射波长分别是 348、303 和 282 nm。由于苯丙氨酸的量子产率很低,酪氨酸被电离或者接近氨基、羧基时其荧光几乎全部猝灭<sup>[14]</sup>。因此,通常利用 Try 的荧光来研究蛋白质分子的构象以及与小分子的相互作用。研究表明激发波长为 280 nm 时,蛋白质的荧光来自于色氨酸和酪氨酸二者的贡献,但主要是色氨酸的贡献,激发波长为 295 nm 时,蛋白质的荧光完全来源于色氨酸<sup>[15]</sup>,由于 295 nm 不是最大激发波长,在此情况下蛋白质的荧光强度相对较弱<sup>[16,17]</sup>。利用荧光光谱研究小分子物质与蛋白质相互作用主要采用以下方法。

### 2.1 荧光猝灭法

测定蛋白质分子的内源荧光被小分子猝灭的程度。荧光猝灭的机理大体上可分为静态猝灭和动态猝灭。无论何种猝灭,荧光分子与猝灭剂之间的猝灭效率都遵循 Stern-Volmer 方程<sup>[18]</sup>:  $F_0/F = 1 + K_Q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$ , 式中,  $F_0$  与  $F$  分别为猝灭剂加入前和加入后荧光分子的相对强度,  $[Q]$  为猝灭剂浓度,  $K_Q$  为双分子猝灭过程的速率常数,  $\tau_0$  为没有猝灭剂存在下荧光分子的平均荧光寿命(对大多数的生物分子  $\tau_0$  约为 10~8 s),  $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 猝灭常数,可表示成双分子猝灭速率常数与单分子衰变速率常数的比率。猝灭常数的大小反映了猝灭剂对荧光分子的接触程度和反应速度。根据上述公式,以猝灭数据  $F_0/F$  对猝灭剂浓度  $[Q]$  作图,得一斜率为  $K_{sv}$  (猝灭常数),纵轴截距为 1 的直线,对于静态猝灭来说,反应的猝灭常数就是反应的结合常数<sup>[18]</sup>。

值得注意的是, Stern-Volmer 图在下列情况下为一直线, (1) 无论动态还是静态应是单一的过程; (2) 对于静态猝灭,猝灭剂与荧光分子结合应存在单一的结合位点,即荧光分子与猝灭剂形成 1:1 的复合物<sup>[19]</sup>。否则, Stern-Volmer 图会发生偏离。造成 Stern-Volmer 图偏向 Y 轴的原因主要是有以下两方面:一是动态和静态两种猝灭机理同时发生<sup>[20]</sup>,二是猝灭机理仅为静态时,小分子与生物大分子的结合位点大于 1 时<sup>[21]</sup>;当猝灭剂是极性 or 带电荷的化合物,猝灭剂分子不易渗透到蛋白质内部的疏水腔<sup>[22]</sup>,此时的结合位点数小于 1, Stern-Volmer 曲线将偏向 X 轴<sup>[23]</sup>。

此外,应用 Lineweaver-Burk 双倒数方程<sup>[24]</sup>, Scatchard 方程<sup>[25,26]</sup>, 及其他方法<sup>[27,28]</sup>可以得出蛋白质与小分子配体的结合常数以及结合位点数。

### 2.2 荧光增强法

荧光增强(敏化)效应主要源于给体-受体间的偶极-偶极作用所产生的能量转移。能量转移为内源发色基团(给体)的荧光被猝灭和外源发色基团(受体)荧光被敏化的现象。当一个分子的发射光谱和另一分子的吸收光谱相重叠时,通过分子间偶极-偶极作用使能量从给体转移到受体,这种能量传递也叫做共振。通过观测能量转移现象,可以得到很多蛋白质分子的结构信息,特别是可以应用于溶液中分子的微区结构分析<sup>[29]</sup>。这种方法的优点就是光谱干扰较小,可以避免荧光猝灭中自吸收效应以及内滤效应的干扰,所得光谱不需校正。处理荧光敏化效应的主要方法有两种。一种是常用的较早提出的 Scatchard 方程<sup>[25]</sup>,另一种是杨频等提出荧光加强效应的新理论公式<sup>[30]</sup>。

### 2.3 同步荧光光谱

同步荧光光谱是荧光光谱法的一种,利用同步荧光可以了解小分子对蛋白质构象的影响。该技术通过选择合适的波长差可将普通荧光光谱上相互重叠的荧光峰分开。而 Miller<sup>[31]</sup>研究发现,由  $\Delta\lambda = 15\text{ nm}$  所作出的同步荧光光谱只显示酪氨酸残基的光谱特性;而由  $\Delta\lambda = 60\text{ nm}$  的同步荧光光谱仅表现色氨酸残基的荧光。因氨基酸残基的最大吸收波长与其所处环境的极性有关,故而由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化。Brustein 等<sup>[32]</sup>认为色氨酸的最大荧光发射峰位对环境很敏感,所处环境的疏水性逐渐降低,其最大发射波长红移。当  $\lambda_{\text{max}}$  位于  $330\sim 332\text{ nm}$  时,表明色氨酸残基处在疏水性介质中,即被埋藏在疏水腔中; $\lambda_{\text{max}}$  位于  $342\text{ nm}$ ,部分处在疏水性介质中; $\lambda_{\text{max}}$  位于  $350\sim 352\text{ nm}$ ,色氨酸残基完全暴露于水相中,即疏水腔瓦解,蛋白质的结构松弛。所以色氨酸的最大荧光发射波长红移时,其所处环境的疏水性逐渐降低,说明蛋白质的构象发生了变化。通常以色氨酸残基的同步荧光光谱,作为定性的判断蛋白质构象的变化的依据。文献<sup>[33-35]</sup>对 HSA 色氨酸残基的同步荧光光谱作了研究,结果发现配体浓度增大,最大波长红移,说明蛋白质的构象发生了改变。

### 2.4 荧光偏振

偏振是荧光体按照偏振激发方向的光取向的结果。在偏振光激发下,荧光体所发射的荧光是偏振光。这种偏振和荧光体的吸光对偏振激发的取向、光选择性及激发矩与发射矩是否共线有关。因此,荧光偏振的测量揭示了荧光体吸收光子和随后发射光子的平均角移。许多因素可使荧光偏振消偏,在粘度小的溶剂(如水)中,当激发光位于荧光体主吸收带且没有发生分子间能量转移损失时,其偏振度与荧光体的转动速度有关。转动速度快,荧光偏振小,反之,转动速度慢,荧光偏振大。

蛋白质分子的内源荧光团的寿命通常比较短,通常利用外源荧光团来检测荧光偏振<sup>[36]</sup>。当外源荧光体小分子与蛋白质结合时,其转动受阻,导致小分子转动速度变慢,荧光偏振会随之变大。如果利用蛋白质的荧光来检测偏振时,小分子或金属离子与蛋白质作用后,蛋白质的偏振度降低,说明离子与蛋白质相互作用发生了结合反应<sup>[37]</sup>。

利用荧光偏振还可研究:(1)蛋白质的聚合与解离,当蛋白质自缔合时,由于大分子尺寸增加,迁移率减小,荧光偏振增加。(2)蛋白质从螺旋到无规卷曲的研究,若荧光探针物质结合到蛋白质上,在蛋白质伸展时,由于刚性增大,偏振变小。(3)间接测量荧光寿命,荧光寿命在蛋白质荧光研究中是一重要的参数,它在分子之间相互作用的动力学方面,可给出许多重要的信息。另外,利用荧光偏振还可得到一些通常由圆二色谱(CD)和 UV 所得不到的有关蛋白质柔性微区的信息<sup>[38]</sup>。

## 3 傅立叶变换红外光谱(FT-IR)法

在蛋白质结构分析的常用方法中,红外光谱有其突出的优点,它适用于不同状态、不同浓度及不同环境中蛋白质和多肽的测定。目前已成为研究蛋白质二级结构变化的有力手段之一<sup>[39,40]</sup>。

蛋白质二级结构的酰胺带在红外光谱图谱上表现为特征性的吸收峰。酰氨 I 带( $1\,700\sim 1\,600\text{ cm}^{-1}$ )主要是氨基酸残基的  $\text{-C=O}$  伸缩振动吸收,对其二级结构的变化非常敏感,但  $\text{H}_2\text{O}$  在  $1\,640\text{ cm}^{-1}$  附近的吸收对其准确定量造成一定的影响,目前可以采用吹扫、差减及氘代等方法消除水的干扰<sup>[41]</sup>;酰氨 II 带( $1\,600\sim 1\,500\text{ cm}^{-1}$ )包含了  $\text{C-N}$  的伸缩振动和  $\text{N-H}$  的变形振动,也是反映蛋白质结构的一个重要谱带,由于酰氨 II 带较弱,对二级结构变化的敏感程度次于酰氨 I 带;酰氨 III 带( $1\,325\sim 1\,225\text{ cm}^{-1}$ )也能直观反映出蛋白

质二级结构的变化,但其吸收较弱,由于  $\text{H}_2\text{O}$  在此吸收带没有吸收峰,解决了严重的水汽干扰问题。其中最常用于二级结构分析的是酰胺 III 带<sup>[39]</sup>,谢孟峡<sup>[6,42]</sup>等应用酰胺 III 带进行蛋白质二级结构的测定研究。以上这些典型的蛋白质特征吸收带都为  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规卷曲等二级结构振动峰的加和带。由于蛋白质含有多种不同的二级结构,它们对应的振动吸收峰重叠在一起,形成宽峰,而各子峰固有的宽度大于仪器分辨率,所以利用普通光谱技术难以直接将各二级结构的子峰分开。傅立叶变换红外光谱利用二阶导数、去卷积技术可以把原来酰胺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,再通过曲线拟合的方法,可以定量地分析蛋白质分子中二级结构的各个组分。酰胺 I 带的谱峰归属目前相对比较成熟, $1610\text{ cm}^{-1}\sim 1640\text{ cm}^{-1}$  为  $\beta$ -折叠结构;无规卷曲常出现在  $1640\text{ cm}^{-1}\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  范围; $1650\text{ cm}^{-1}\sim 1658\text{ cm}^{-1}$  为  $\alpha$ -螺旋结构; $1660\text{ cm}^{-1}\sim 1695\text{ cm}^{-1}$  为  $\beta$ -转角<sup>[43,44]</sup>。Byler 和 Susi 就用二阶导数和去卷积方法对 19 个蛋白质中的 38 个子峰进行了系统的分析,给出了红外光谱中各构象成分特征酰胺 I 带位置与二级结构的关系。随后利用去卷积曲线拟合法得出若干蛋白质二级结构的含量,并与 X 射线衍射法的结果作了比较,证实二者十分吻合<sup>[44]</sup>。小分子与蛋白质起用之后引起的蛋白质二级结构的变化定量分析,通常应用的是差减法来进行计算的<sup>[8,10]</sup>。

## 4 分子模拟的研究和应用

由于计算机技术及各种软件的开发,应用于研究给体-受体即小分子-蛋白的相互作用的分子模拟技术(分子对接),也越来越受到研究者的广泛关注。由于蛋白质晶体结构研究的发展,已经探明了许多蛋白质三维结构。而当受体的三维结构已知时,可以根据形状互补、空间互补、性质互补的原则将配体放置在受体的活性部位,使之形成有利于相互作用的配体-受体复合物,即为所谓的分子模拟<sup>[45]</sup>。分子模拟可预测蛋白质的三维结构,蛋白质-蛋白质,蛋白质-DNA 等生物大分子相互作用复合物的结构,小分子-生物大分子复合物的结构及相互作用的亲和性<sup>[46]</sup>。

根据条件和目的的不同分子对接可分为实时图形对接和自动对接。实时图形对接往往以已有小分子-蛋白质复合物的晶体结构为基础,借助图形工作软件来完成。对接分子模型化软件都具有实时图形对接功能,如 SYBYL, Insight II, QUANTA 等。利用实时图形对接时有以下几个步骤:首先读取复合物晶体结构,定义小分子配体结合腔,所定义的结合腔通常包括配体分子  $8\text{Å}$  范围内的氨基酸残基;然后给蛋白质原子加上必需的氢原子并计算电荷,以复合物中的配体分子为模板叠合待对接的分子;之后删除复合物的配体分子,初始化对接过程;对复合物结构进行分子力学或分子动力学优化,得到小分子-蛋白质复合物的结构。而自动对接即在没有人工干预的情况下实现小分子配体和蛋白质的对接,首先根据蛋白质三维结构(晶体结构, NMR 结构或同源蛋白模建的结构),构建小分子配体的结合口袋;然后将小分子对接到蛋白质结合口袋中,优化小分子的结合构象,获得复合物的结构。虽然受体结构为药物-蛋白相互作用提供了很形象具体的信息,但是分子对接方法需要考虑的因素很多,除了配体与受体活性部位之间的形状互补性,还要考虑静电相互作用、氢键相互作用、疏水作用、溶剂效应、配体与受体的协调运动等这些能影响结合的重要因素。其中特别是水分子所扮演的角色非常微妙,目前的方法还难以考虑<sup>[47]</sup>。在目前的理论背景和计算条件下,还不能全面考虑上述因素,因此尽管不断有新的分子对接程序出现,但分子对接方法还未达到令人满意的实用化阶段。

F. Zsila 利用分子模拟对接程序研究了姜黄色素与 HSA 的相互作用<sup>[48]</sup>,由对接结果可知姜黄色素可以与 HSA 的亚微区 IIA 结合,碱性氨基酸如 Lys-199、Arg-218 与在药物分子中心的羰基形成氢键,同时姜黄色素的酚盐羟基与氨基酸残基 Ser-287、Arg-257、Lys-286 形成分子间氢键,而在脂肪族氨基酸残基与姜黄色素之间则存在疏水作用。由此可见,药物与蛋白质相互作用不仅仅是一种模式,而是多种作用力共存,使蛋白质与药物形成的配合物更加稳定。A. A. Bhattacharya 等<sup>[49]</sup>则研究了麻醉剂氯烷与 HSA 的相互作用,发现氯烷在 HSA 上存在 8 个不同的键合位。

## 5 其他研究方法

在小分子物质与蛋白质相互作用的研究方法中,除上述介绍的一些光谱方法外,还有其他一些常用方法,如平衡透析法、高效液相色谱法、毛细管电泳、电化学等方法,此外,质谱、核磁共振、激光拉曼散射等方法的应用也日益增多。

平衡透析是利用半透膜的选择性在溶液里分离大分子和小分子的一种分离技术,已有很多报道<sup>[50,51]</sup>利用平衡透析法结合其他方法研究药物与蛋白质的相互作用。但该方法存在平衡时间长、游离小分子通过透析膜受到阻碍、小分子在透析膜上的吸附以及 Donnan 效应(由于蛋白和药物均带电荷,使得膜两侧的游离药物浓度不相等)等缺点。高效液相色谱和高效毛细管电泳是近年发展起来的能同时测定药物与蛋白质结合平衡体系中游离药物浓度和总药物浓度的高效前沿分析方法。随着实验技术的日臻完善,毛细管电泳的不同方法如亲和毛细管电泳<sup>[52,53]</sup>、毛细管亲和凝胶电泳<sup>[54]</sup>等也越来越多地应用于蛋白与小分子的作用研究。

具有电化学活性的小分子与蛋白质作用后,小分子的特征氧化还原峰电流会发生变化,同时峰电位也有所移动。电化学分析法作为其他方法的有益补充,能够获得其他方法得不得的信息<sup>[55]</sup>。此外,可以测定蛋白质和药物分子所形成复合物的分子量以及体系的扩散系数和粒径分布信息的激光散射法<sup>[56]</sup>;通过化学位移、偶合常数、核极化效应(Overhauser 效应)以及同位素交换等确定蛋白质或多肽二级结构的核磁共振光谱<sup>[57]</sup>;通过药物小分子对蛋白质大分子在传感器中不同性质的响应,研究二者相互作用的表面等离子体共振传感器<sup>[58]</sup>、石英晶体共振传感器<sup>[59]</sup>等技术和方法也已应用于研究药物与蛋白质的相互作用。随着科学的进一步发展,还会有一些新的技术和方法应用到该研究领域。

## 参考文献:

- [1] 曹书霞,赵玉芬.分子吸收光谱在生物体大分子研究中的应用[J].光谱学与光谱分析,2004,24(10):1197-1201.
- [2] 陶慰孙,李惟,姜涌明.蛋白质分子基础[M].2版.北京:高等教育出版社,1995.
- [3] 王亚俐,王海芳.光谱法研究苯甲酸钠与牛血清白蛋白的作用[J].北京大学学报,2002,38(2):159-163.
- [4] 魏晓芳,丁西明,刘会洲. pH 诱导牛血清白蛋白芳香氨基酸残基微环境变化的光谱分[J].光谱学与光谱分析,2000,20(4):556-559.
- [5] Bi S Y, Song D Q, Kan Y H, et al. Spectroscopic characterization of effective components anthraquinones in Chinese medicinal herbs binding with serum albumins[J]. Spectrochim. Acta Part A, 2005,62:203-212.
- [6] 刘媛,谢孟峡,康娟.三七总皂甙对牛血清白蛋白溶液构象的影响[J].化学学报,2003,61(8):1305-1310.
- [7] 魏永巨,李克安,童沈阳.血清白蛋白与偶氮肿 III 结合反应的研究[J].高等学校化学学报,1996,17(4):550-552.
- [8] Tang J H, Lian N, He X H, et al. Investigation of the interaction between sophoricoside and human serum albumin by optical spectroscopy and molecular modeling methods[J]. J. Mol. Struct., 2008, 889: 408-414.
- [9] Kathiravan A, Chandramohan M, Renganathan R, et al. Spectroscopic studies on the interaction between phycocyanin and bovine serum albumin[J].J. Mol. Struct., 2009,919: 210-214.
- [10] Tang J H, Lian N. Simple and Sensitive Spectrofluorometric Method for the Determination of Protein Using an Europium-thenoyl-trifluoroacetone Probe[J]. Anal. Sci., 2009, 25:1237-1242.
- [11] Zhang Q L, Ni Y N, Kokot S. Molecular spectroscopic studies on the interaction between Ractopamine and bovine serum albumin[J]. J. Pharmaceut. Biomed., 2010,52: 280-288.
- [12] Mandeville J S, Froehlich E, Tajmir-Riahi H.A.. Study of curcumin and genistein interactions with human serum albumin [J]. J. Pharmaceut. Biomed., 2009, 49: 468-474.
- [13] Ni Y N, Huang C F, Kokot S. Simultaneous determination of iron and aluminium by differential kinetic spectrophotometric method and chemometrics[J]. Anal. Chim. Acta, 2007, 599: 209-218.
- [14] 陶慰孙,李惟,姜涌明,等.蛋白质分子基础[M].北京:人民教育出版社,1982.
- [15] Sulkowska A, R 6 wnicka J, Bojko B, et al. Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin [J].J. Mol. Struct, 2003,651-653:133-140.

- [16] Jiang M, Xie M X, Zheng D, et al. Spectroscopic studies on the interaction of cinnamic acid and its hydroxyl derivatives with human serum albumin [J]. *J. Mol. Struct.* 2004, 692:71–80.
- [17] Liu Y, Xie M X, Jiang M, et al. Spectroscopic investigation of the interaction between human serum albumin and three organic acids [J]. *Spectrochim. Acta A*, 2005, 61: 2245–2251.
- [18] Lakowicz J R, Principles of Fluorescence Spectroscopy [M]. 2ed. New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 1999.
- [19] Bhattacharyya M, Chaudhuri U, Poddar R K. Evidence for cooperative binding of chlorpromazine with hemoglobin: equilibrium dialysis, fluorescence quenching and oxygen release study [J]. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 1990, 167: 1146–1153.
- [20] 许金钩, 王尊本. 荧光分析法 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2006.
- [21] Tang J H, Qi S D, Chen X G. Spectroscopic studies of the interaction of anti-coagulant rodenticide diphacinone with human serum albumin [J]. *J. Mol. Struct.*, 2005, 779: 87–95.
- [22] Epps D E, Raub T J, K é zdy F J, et al. Wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin [J]. *Anal. Biochem.*, 1995, 227: 342–350.
- [23] Tang J H, Luan F, Chen X G. Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumin: Fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modeling [J]. *Bioorgan. Med. Chem.*, 2006, 14: 3210–3217.
- [24] He L L, Wang X, Liu B, et al. Interaction Between Ranitidine Hydrochloride and Bovine Serum Albumin in Aqueous Solution [J]. *J. Solution. Chem.*, 2010, 39: 654–664.
- [25] Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions [J]. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1949, 51: 660–672.
- [26] Bertucci C, Domenici E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance [J]. *Curr. Med. Chem.*, 2002, 9: 1463–1481.
- [27] Zolghadri S, Saboury A A, Golestani A, et al. Interaction between silver nanoparticle and bovine hemoglobin at different temperatures [J]. *J. Nanopart. Res.*, 2009, 11: 1751–1758.
- [28] Paramaguru G, Kathiravan A, Selvaraj S, et al. Interaction of anthraquinone dyes with lysozyme: Evidences from spectroscopic and docking studies [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2010, 175: 985–991.
- [29] 马贵斌, 杨频. 能量转移技术及其在溶液分子的微区结构分析中的应用 [J]. *化学通报*, 1993, 54(3): 29–32.
- [30] 杨频, 高飞. 生物无机化学原理 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [31] Miller J N. Recent advances in molecular luminescence analysis [J]. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* 1979, 16: 203–208.
- [32] Brustein E A, Vedenkina N S, Irkova M N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules [J]. *Photochem. Photobiol.* 1973, 18: 263–279.
- [33] He W Y, Li Y, Tian J N, et al. Spectroscopic studies on binding of shikonin to human serum albumin [J]. *J. Photoch. Photobio. A*, 2005, 174: 53–61.
- [34] He W Y, Li Y, Liu J Q, et al. Specific Interaction of Chalcone-Protein: Cardamonin Binding Site II on the Human Serum Albumin Molecule [J]. *Biopolymers*, 2005, 79: 48–57.
- [35] Zhong W Y, Wang Y C, Yu J S, et al. The Interaction of Human Serum Albumin with a Novel Antidiabetic Agent-SU-118 [J]. *J. Pharm. Sci.*, 2004, 93: 1039–1046.
- [36] Hazra P, Chakrabarty D, Chakraborty A, et al. Probing protein-surfactant interaction by steady state and time-resolved fluorescence spectroscopy [J]. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2004, 314: 543–549.
- [37] Johnson D K. A fluorescence polarization immunoassay for cadmium (II) [J]. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 399: 161–172.
- [38] Arbelaez L F, Jensen P E, Shanbhag V P, et al. Probing different conformational states of pregnancy-zone protein. Fluorescence studies utilizing the binding of 4,4'-bis(8-anilino-1-naphthalenesulphonate) [J]. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 218: 651–656.
- [39] Wang T, Xiang B R, Li Y, et al. Studies on the binding of a carditonic agent to human serum albumin by two-dimensional correlation fluorescence spectroscopy and molecular modeling [J]. *J. Mol. Struct.*, 2009, 921: 188–198.
- [40] Zhang Y H, Dong L J, Li J Z, et al. Studies on the interaction of gallic acid with human serum albumin in membrane mimetic environments [J]. *Talanta*, 2008, 76: 246–253.
- [41] Ni F F, Deoliveira D B, Trumble W R, et al. Secondary structure estimation of proteins using the amide III region of Fourier transform infrared spectroscopy: application to analyze calcium-binding-induced structural changes in calsequestrin [J]. *Appl. Spectrosc.*, 1994, 48: 1432–1441.
- [42] 谢孟峡, 刘媛. 红外光谱酰胺 III 带用于蛋白质二级结构的测定研究 [J]. *高等学校化学学*, 2003, 24 (2): 226–231.
- [43] 吴瑾光. 傅里叶变换光谱分析 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1993.
- [44] Byler D M, Brouillette J N, Sus H. Quantitative studies of protein structure by FT-IR spectra deconvolution and curve-fitting [J].

- Spectroscopy, 1986,1(3): 29–32.
- [45] 何文英,胡之德,姚小军,等. 比较研究山姜素和豆蔻明与人- $\gamma$  球蛋白的相互作用 [J].化学学报,2010,68(7):679–688.
- [46] 阎隆飞,孙之荣. 蛋白质分子结构[M].北京:清华大学出版社,1999.
- [47] 周家驹,王亭. 药物设计中的分子模型化方法[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [48] Zsila F, Zsolt B, Miklos S. Molecular basis of the cotton effects induced by the binding of curcumin to human serum albumin [J]. Tetrahedron-asymmetry, 2003, 14:2433–2444.
- [49] Ananyo A B, Stephen C, Nicholas P F. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin [J]. J. Biol. Chem., 2000, 275(49): 38731–38738.
- [50] Villamor J P, Zaton A M L. Data plotting of warfarin binding to human serum albumin [J]. J. Biochem. Bioph. Meth., 2001,48:33–41.
- [51] Toshiaki S, Keishi Y, Tomoko S, et al. Interaction mechanism between indoxyl sulfate, a typical uremic toxin bound to site II, and ligands bound to site I of human serum albumin [J]. Pharm. Res., 2001,18: 520–524.
- [52] Ding Y S, Lin B C, Hu C W. Binding studies of porphyrins to human serum albumin using affinity capillary electrophoresis [J]. Electrophoresis, 2001,22: 2210–2216.
- [53] Zhang W B, Zhang LH, Ping G C, et al. Study on the multiple sites binding of human serum albumin and porphyrin by affinity capillary electrophoresis [J]. J. of Chromatogr. B, 2002,768:211–214.
- [54] Chu Y H, Chen J K, Whitesides G M. Affinity electrophoresis in multisectional polyacrylamide slab gels is a useful and convenient technique for measuring binding constants of aryl sulfonamides to bovine carbonic anhydrase B [J]. Anal. Chem., 1993,65: 1314–1322.
- [55] Wu Y H, Ji X B, Hu S S. Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin [J]. Bioelectrochemistry, 2004,64: 91–97.
- [56] 王卫平,唐江宏,彭旭红,等. 激光散射法研究蛋白质与氨比西林钠盐的相互作用 [J].中国科学 B, 2006,36 (1):71–75.
- [57] 胡红雨,鲁子贤. 核磁共振法研究蛋白质和多肽的结构和功能 [J]. 化学通报, 1995,56 (7): 14–22.
- [58] Rich R L, Day Y S N, Morton T A, et al. High-Resolution and High-Throughput Protocols for Measuring Drug/Human Serum Albumin Interactions Using Biacore [J]. Anal. Biochem., 2001,296:197–207.
- [59] Pavey K D, Lyle E L, Olliff C J, Paul F. A quartz crystal resonant sensor (QCRS) study of HSA drug interactions [J]. Analyst, 2001, 126: 426–428.

## Current Status and Progress in Research Methods for Interaction of Small Molecules Substances with Proteins

TANG Jiang-hong, LIAN Ning, ZHANG Guo-hua, ZHAO De-jian

(School of Chemistry and Environmental Engineering, Jiangsu Teachers University of Technology,  
Changzhou 213001, China)

**Abstract:** The interactions between small molecule and proteins have been important for chemistry biology investigation. Proteins can form compounds with many exogenous and endogenous. Using experiment methods, the binding constants, the numbers of binding site, the binding region and the interaction force can be calculated in the interaction of small molecule and proteins, and the secondary structure compositions of protein and their guest molecules complexes were estimated by qualitative and quantitative analysis. This paper simply reviewed the progress and applications of UV visible spectroscopy, fluorescence spectra, Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy, molecular modeling and other analytical methods in the interactions between small molecule and proteins.

**Key words:** proteins; small molecule; interaction; method review

责任编辑 张志钊