

山梨酸钾与蛋白质相互作用的 荧光和共振光散射光谱研究*

胡 勇¹, 扶 雄¹, 陈旭东², 杨连生¹, 章明秋²

(1. 华南理工大学轻工研究所, 广东 广州 510640;

2. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 用荧光光谱和共振散射光谱(RLS)对山梨酸钾(PSA)与牛血清蛋白(BSA)在溶液中的相互作用进行了研究, 探讨了PSA对BSA荧光和共振光散射猝灭的机理, 测定了该反应的表现结合常数及结合位点数。在288和293 K时的表现结合常数分别为 2.23×10^3 和 $2.74 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 其相应的结合位点数分别为1.02和0.99。利用热力学参数确定了分子间的作用力性质, 作用过程是自发的, 作用力主要是电子作用力。同步荧光光谱表明相互作用对蛋白质构象有一定的影响。基于Forster非辐射能量转移理论估算了山梨酸钾与蛋白质之间的结合距离。

关键词: 山梨酸钾; 牛血清白蛋白; 相互作用; 荧光光谱; 共振散射光谱

中图分类号: O644.1 文献标识码: A 文章编号: 0529-6579 (2009) 06-0073-07

Interaction between Potassium Sorbate and Bovine Serum Albumin Revealed by Fluorescence and Resonance Light Scattering Spectra

HU Yong¹, FU Xiong¹,

CHEN Xudong², YANG Liansheng¹, ZHANG Mingqiu²

(1. College of Light industry and Food Science, South China University of Technology,
Guangzhou 510640, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The interaction between potassium sorbate (PSA) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by fluorescence spectroscopy, resonance light-scattering (RLS) spectroscopy. The quenching mechanism was analyzed referring to PSA against the fluorescence and the resonance light scattering spectra of BSA. The apparent binding constants (K_A) between PSA and BSA were $2.23 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (288 K), and $2.74 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (293 K), respectively. The corresponding binding sites values (n) were 1.02 and 0.99. The changes of negative entropy change and enthalpy indicate that the interaction of PSA and BSA was driven mainly by electrostatic interactions. The binding process was a spontaneous process in which Gibbs free energy change was negative. The effect of PSA on the conformation of BSA was analyzed by synchronous fluorescence spectroscopy. Furthermore, the binding distance $r = 2.83 \text{ nm}$ between PSA and BSA was obtained based on the mechanism of Forster non-radiation energy transfer.
Key words: potassium sorbate; bovine serum albumin; interaction; fluorescence spectra; resonance light scattering spectra

* 收稿日期: 2009-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (50673104)

作者简介: 胡勇 (1977年生), 男, 博士生; 通讯作者: 扶雄; Email: lxfu@scut.edu.cn

在生物体内, 各类小分子(含中性分子和离子)物质的生物活性功能都是通过它们与生物大分子相互作用而展现的, 因此, 小分子与生物大分子相互作用是研究所有生命过程经常涉及的基本问题之一。小分子与生物大分子(核酸、蛋白质、多肽等)之间非共价键的相互作用研究已成为当前公认的化学理论与应用技术的前沿课题, 对其本质的研究, 有助于理解在生命科学、医学、药学领域中涉及到的分子之间的相互作用以及相互识别过程^[1]。

山梨酸钾是一种优良的食品添加剂, 已经被许多国家的医药管理部门允许在多种食品加工过程中使用^[2-3]。然而, 作为一种人工合成的化学试剂, 食品添加剂本身有着一些潜在的食用毒性。比如苯甲酸钠的毒性已被陆续报道^[4-5]。血清白蛋白是血液中含量最丰富的蛋白质之一, 在配体的传输与存贮方面起着重要的作用。血液中有许多内源物质可以与牛血清蛋白结合^[6]。特别地, 肝脏是外来物种如食品添加剂主要的新陈代谢场所, 因此研究山梨酸钾与牛血清蛋白之间的相互作用显得尤为重要。

荧光分析方法在生物分子识别和研究生物分子相互作用机理等方面有着广泛的应用^[7-8]。通过测量和分析荧光发射峰, 可以得到一些关于分子结构和发色团微观环境等重要信息。共振光散射(RLS)法是近年来新发展起来的分析方法, 已用于生物大分子的生化分析、纳米粒子和超分子的研究。由于共振散射强度与体系电子密度起伏(即体系结构不均匀性)有关, 因此通过共振散射强度可以表征聚合物体系的微观结构信息^[9-10]。目前共振散射技术主要应用于生物大分子的检测与分析, 而将之应用于生物大分子之间相互作用的研究则较为少见。研究生物大分子相互作用过程的共振光散射强度的变化规律与生物大分子结构之间的关系, 不仅对改进和发展检测生物大分子的方法有着巨大的促进作用, 而且也拓展了共振光散射光谱技术的应用领域和研究方向。

本文利用荧光光谱和共振光散射光谱研究了山梨酸钾与牛血清蛋白之间相互作用, 得到了一些关于山梨酸钾与牛血清蛋白相互作用之间表观结合常数、结合位点数、热力学参数、作用力、作用距离等重要信息。

1 实验部分

1.1 仪器及设备

RF-5301PC型荧光分光光度计(日本岛津公司); PHS-10A型精密pH计(上海雷磁仪器

厂); UV-3150紫外-可见分光光度计(日本JASCO公司); FC-204电子分析天平(上海天平仪器厂); 501型超级恒温器(上海实验仪器厂); 超声波分散仪(广州市新栋力超声电子设备有限公司)。

1.2 试剂与样品

山梨酸钾(PSA, 分析纯, 广州光华化学仪器公司), 用二次蒸馏水配制成 2.0×10^{-4} mol/L的储备液; 牛血清白蛋白(BSA, 分析纯, 上海伯奥生物科技有限公司), 用二次蒸馏水配制成1.0 mg/L的储备液; 缓冲溶液: 用0.2 mol/L磷酸氢二钠、0.1 mol/L的柠檬酸(均为分析纯)配制一定pH缓冲溶液。实验用水经检验无荧光杂质。所有的储备液都用冰箱保存在0~4℃环境中。

1.3 实验方法

在一系列10 mL比色管中依次加入溶液2.00 mL磷酸盐缓冲溶液、一定量的山梨酸钾储备液, 然后加入0.5 mL牛血清白蛋白储备液, 用去离子水定容为10.0 mL, 搅拌至混合均匀再用超声波分散仪超声5 min。待放置一段时间后用于测试。选择激发波长为285 nm, 用激发和发射通带均为3.0 nm的RF-5301PC荧光分光光度计测定一定温度时BSA及BSA在PSA作用下的荧光光谱。狭缝宽度分别为5.0 nm。固定激发和发射波长间隔($\Delta\lambda_1 = 15$ nm, $\Delta\lambda_2 = 60$ nm)记录同步荧光光谱。当固定激发和发射波长间隔为0 nm, 保持狭缝宽度均为3 nm时, 记录280~650 nm范围内的共振光散射光谱。

2 结果和讨论

2.1 荧光光谱

从图1(a)可以看出, 蛋白质的激发峰在287 nm附近, 当以285 nm激发时其特征荧光峰在343 nm左右。固定BSA浓度, 在激发波长285 nm条件下测得含不同浓度的PSA时体系的荧光光谱如图1(b)所示。可见, 随着PSA浓度的增加, 在实验范围内300~420 nm BSA的荧光逐步被猝灭荧光, 且有蓝移趋势。这说明山梨酸钾与BSA发生了相互作用, 这种作用可能引起BSA中荧光发色团的微环境及蛋白质分子构象行为的变化^[11]。

2.2 山梨酸钾与BSA的荧光猝灭方式

荧光猝灭可以有多种作用机理, 通常可分为动态猝灭和静态猝灭。动态猝灭主要是由扩散和碰撞引起, 而静态猝灭则主要是形成复合物^[12]。动态

和静态猝灭可以由他们对体系温度的变化趋势以及荧光寿命来判断。高温可以引起扩散的增大从而更多的碰撞使得动态猝灭常数增大。对于静态猝灭, 高温将会导致复合物的分解从而降低静态猝灭常数^[13]。

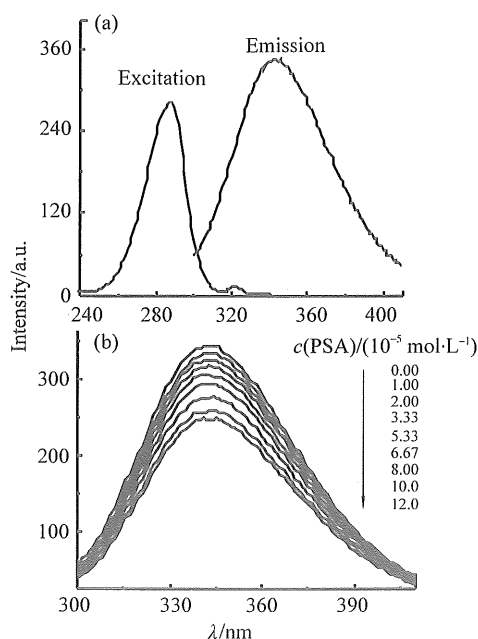


图1 (a) 牛血清白蛋白荧光激发谱和荧光光谱;
(b) PSA 对 BSA 荧光光谱的影响

Fig. 1 (a) Excitation spectrum and emission spectrum of BSA; (b) Effect of PSA concentration on the fluorescence of BSA

对于动态猝灭, 其作用机理可以用 Stern-Volmer^[13] 方程来表达

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

对于静态猝灭, 其作用机理可用 Lineweaver-Burk^[13] 方程来表达:

$$(F_0 - F)^{-1} = F_0^{-1} + K_{LB}^{-1} F_0^{-1} C_q^{-1} \quad (2)$$

式中, F_0 和 F 分别为无和有猝灭剂 (PSA) 存在时的荧光强度; K_q 为猝灭剂对生物大分子的荧光猝灭常数; K_{sv} 为动态猝灭常数, K_{LB} 为静态猝灭常数; τ_0 为无猝灭剂时荧光基团的荧光寿命; C_q 为猝灭剂的浓度。对于生物大分子, τ_0 的平均值为 10^{-8} s 左右。

图2显示了基于上述两者方法作图并进行线性拟合所得到的曲线图。由图2中直线的斜率和 τ_0 的值可算出在温度为 288 和 293 K 时的猝灭常数 K_{sv} 、静态猝灭结合常数 K_{LB} 以及双分子猝灭常数 k_q , 见表1。结果表明 Stern-Volmer 曲线呈现良好

的线性关系, 但随着温度升高 Stern-Volmer 曲线斜率明显降低, 这说明 PSA 对 BSA 荧光猝灭效应归于静态猝灭机制。所计算的 K_q 要远大于在动态猝灭中各类猝灭剂对生物大分子荧光寿命衰减速率的最大值 $2.0 \times 10^{10} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 则进一步说明此体系的猝灭过程不是因为分子扩散和碰撞所引起的动态猝灭, 而是分子之间结合形成化合物所引起的静态猝灭。从图 2b 还可以看出以 $(F_0 - F)^{-1}$ 对 $c(\text{PSA})^{-1}$ 拟合的 Lineweaver-Burk 方程, 不同温度下的线性相关系数 r 依次为 0.999, 0.997, 可见该双倒数方程亦呈现良好的线性关系, 即可再次确定为静态猝灭。

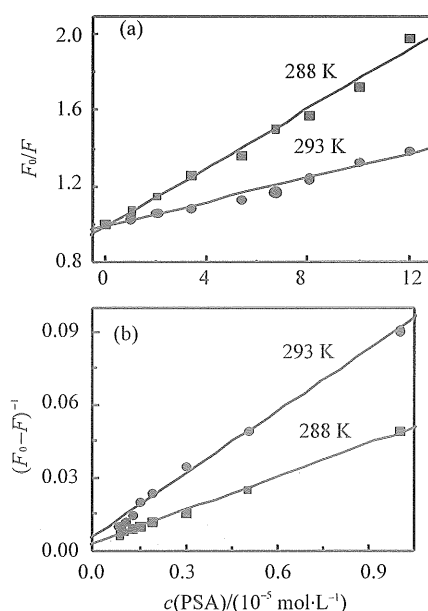


图2 基于荧光猝灭的 PSA 对 BSA 的 Stern-Volmer 曲线 (a) 和 Lineweaver-Burk 双倒数曲线 (b)

Fig. 2 The Stern-Volmer curves (a) and Lineweaver-Burk curves (b) of the reaction between PSA and BSA based on the fluorescence quenching
 $c(\text{BSA}): 1 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$; pH 7.4

表1 基于荧光猝灭所计算的猝灭常数

Table 1 The corresponding binding constants from the data of in Fig. 2

T K	K_{sv} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	K_q ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	K_{LB} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)
288	7.87×10^3	7.87×10^{11}	6.30×10^3
293	3.24×10^3	3.24×10^{11}	6.14×10^3

2.3 共振光散射光谱

图3为 PSA 对 BSA 共振光散射光谱的影响。由图3可知, 在蛋白质溶液中, 随着山梨酸钾浓度

的增加,蛋白质的共振光散射强度依次降低。根据 RLS 理论,散射强度与溶液中散射粒子的大小和溶液中相界面的形成有关^[14]。由于牛血清蛋白在溶液中较少出现聚集,因此,这较为明显的 RLS 信号主要与 BSA 在溶液中的粒径大小有关。可能是山梨酸钾在牛血清白蛋白表面结合后,破坏了白蛋白表面的保护水层,使原来较为分散的蛋白质更加分散,即所谓的解聚作用,引起蛋白质粒径减小,共振散射的截面积减小,导致共振散射强度下降^[15]。同时,新形成的 PSA/BSA 复合物可能破坏蛋白质的疏水框,使在水溶液中形成的疏水界面趋于分散,从而导致其共振光散射强度下降。

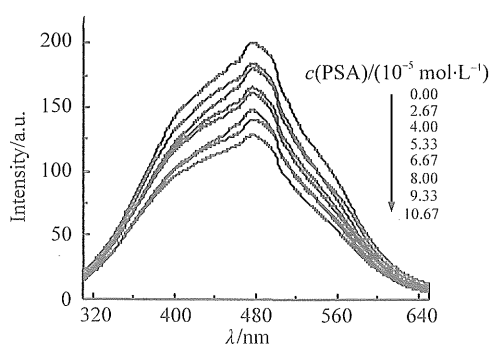


图 3 PSA 对 BSA 共振光散射光谱的影响

Fig. 3 Effect of PSA concentration on the resonance light scattering intensity of BSA

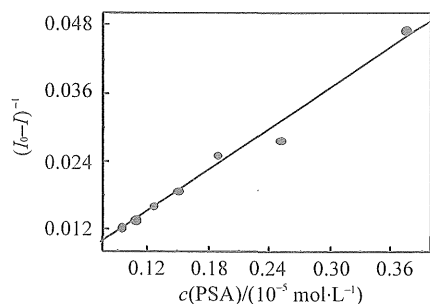


图 4 基于共振光散射猝灭的 PSA 对 BSA 的 Lineweaver-Burk 双倒数曲线

Fig. 4 The plot of $(I_0 - I)^{-1}$ vs $c(\text{PSA})^{-1}$ based on resonance light scattering

由上面分析可知,体系的 RLS 信号随着 PSA 的加入,其 RLS 强度出现有规律的猝灭,因此可应用 RLS 数据来解释 BSA 与 PSA 之间的相互作用机理。设 I_0 为无猝灭剂时 BSA 的散射光强度, I 为有猝灭剂时 BSA 的散射光强度,以最大散射峰 476 nm 处散射强度作 Lineweaver-Burk 曲线,见图 4。从图 4 可知以 $(I_0 - I)^{-1}$ 对 $c(\text{PSA})^{-1}$ 具有很好的

线性关系,并且由直线的斜率求出的 RLS 静态猝灭结合常数 K_{LB} 为 $7.53 \times 10^3 \text{ mol/L}$,这与基于荧光所求出静态猝灭结合常数在相同的数量级范围内。因此,荧光猝灭理论同样适合 PSA 对蛋白质共振光散射强度的猝灭。

2.4 结合常数和位点数的计算

小分子与蛋白质之间的相互作用一般采用位点结合模型来描述,荧光强度 (F)、猝灭剂浓度 (c_q) 与表观结合常数 (K_A) 及结合位点数 (n) 之间的关系^[16]

$$\lg(F_0 - F)/F = \lg K_A + n \lg c(\text{PSA}) \quad (3)$$

以 $\lg(F_0 - F)/F$ 对 $\lg c(\text{PSA})$ 作图,由直线斜率及截距可计算出在 288 及 293 K 时,PSA 与蛋白质的表观结合常数分别为 2.23×10^3 和 $2.74 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。其相应的结合位点数分别为 1.02 和 0.99。这表明在 PSA 与蛋白质之间存在强烈的相互作用,且山梨酸钾与 BSA 作用时具有 1 个独立的结合部位。其相关系数大于 0.99 表明两者之间的结合机理符合位点结合模型。从表 2 可知,其表面结合常数随温度的升高出现相应的下降,这可能是温度的升高导致了体系分子扩散程度的增加,从而降低了 PSA/BSA 复合物的稳定性。

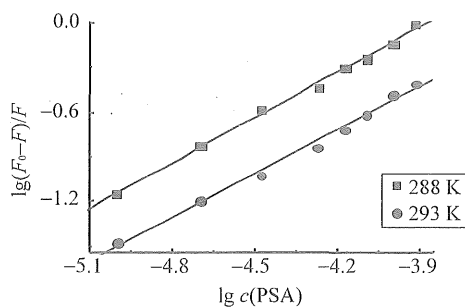


图 5 基于荧光猝灭的 PSA 对 BSA 的双对数曲线图

Fig. 5 The double-logarithm relation of $\lg(F_0 - F)/F$ vs $\lg c(\text{PSA})$

表 2 表观结合常数、结合位点数以及线性相关系数

Table 2 The apparent binding constants, binding numbers and correlation coefficients

T/K	$K_A/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	r
288	2.74×10^3	1.02	0.998
293	2.23×10^3	0.99	0.996

2.5 热力学分析和作用力分析

猝灭体和生物大分子的相互作用力主要有氢

键、范德华力、静电引力和疏水力几种类型^[17]：
(1) $\Delta H > 0$ 和 $\Delta S > 0$ ，主要是疏水作用；(2) $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S < 0$ ，主要是范德华力和氢键作用；(3) $\Delta H < 0$ 和 $\Delta S > 0$ ，则是电子作用力。在水溶液中，无论是生物大分子还是有机小分子都是溶剂化了的，水分子和其它共存离子对体系的自由度和最终结果也带来一定的影响。因此，对于一个实际体系，其宏观表现可能是这几种作用力同时作用和有关环境综合调控的结果。

当温度相差不大时，焓变可看作一常数，故由不同温度下的结合常数 K_A ，根据下列方程即可计算出自由能、反应焓变和熵变。

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (4)$$

$$\ln K_2/K_1 = \frac{\Delta H}{R} (1/T_1 - 1/T_2) \quad (5)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (6)$$

式中， R 为气体状态常数， T 是实验温度， K_1 和 K_2 是在不同温度下的结合常数。由上式所计算出来的热力学参数见表 3。从表 3 可以看出，体系的 $\Delta G < 0$ 说明反应过程是自发进行的； $\Delta H < 0$ ， $\Delta S > 0$ 则表明他们之间的结合力是电子作用力以及疏水作用力，其中电子作用力是主要的^[18]。

表 3 作用过程中相关热力学参数

Table 3 The corresponding thermodynamic parameters in interaction

T K	ΔH (kJ · mol ⁻¹)	ΔS (J · K ⁻¹)	ΔG (kJ · mol ⁻¹)
288	-3.45	60.76	-20.95
293	-3.45	60.76	-21.25

2.6 山梨酸钾与 BSA 之间的结合距离

从图 6 可以看出，BSA 的荧光光谱与 PSA 的紫外吸收光谱有着部分图谱重叠，这说明两者之间存在着能量传递过程。基于 Forster 理论，分子共振能量转移依赖于给体的荧光反射光谱和受体吸收光谱的重叠程度以及给体和受体之间的距离。这样可以利用下列公式计算两者之间的作用距离。根据能量转移理论，转移效率 (E)、供体与受体之间的结合距离 (r)、临界能量转移距离 (R_0) 及供能体的荧光发射光谱与受能体吸收光谱的重叠积分 (J) 之间的关系为^[17]

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (7)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad (8)$$

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) E(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (9)$$

其中， R_0 是能量转移效率为 50% 时的临界距离； K^2 为偶极空间取向因子，可取受体和供体各向随机分布的平均值 2/3； Φ 为供能体荧光量子产率，通常取蛋白质中色氨酸的量子产率 0.118； n 为介质折射指数，一般取水和有机物折射指数的平均值 1.336； $F(\lambda)$ 为荧光供体在波数为 λ 的荧光强度； $\varepsilon(\lambda)$ 为受体在波数为 λ 时的摩尔吸光系数，采用矩形分割法求出两光谱重叠区域的积分值 J ，即可由 (8) 式求出 R_0 值，(7) 式求出 E 值和 r 值。经计算，可求得 r 值为 2.83 nm。这说明两者之间的结合距离满足 $0.5R_0 < r < R_0$ ，可见两者之间有着很高的能量转移可能性^[19]，即两者之间的猝灭机理属于静态猝灭。

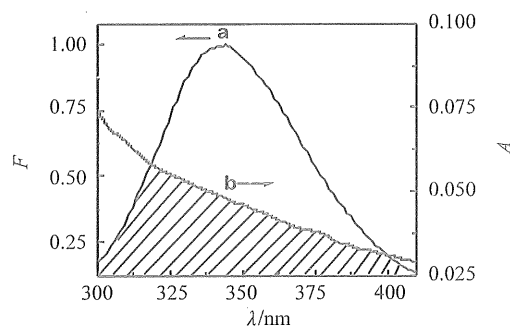


图 6 BSA 的荧光发射光谱 (a) 和 PSA 的收光谱 (b) 的重叠图

Fig. 6 The overlap of the UV absorption spectrum of PSA with the fluorescence emission spectrum of BSA: (a) the UV absorbance spectrum of PSA and (b) the fluorescence spectrum of BSA

2.7 山梨酸钾对 BSA 构象的影响

为了进一步证实 PSA 与 BSA 之间的相互作用过程以及带来的结构上的改变，考察了 PSA 对 BSA 同步荧光光谱的影响。氨基酸残基的最大发射波长与其所处环境的疏水性有关，因此由发射波长的改变可判断蛋白质构象的变化对于蛋白质的同步荧光光谱， $\Delta\lambda_1 = 15$ nm 只表现出酪氨酸残基的荧光， $\Delta\lambda_2 = 60$ nm 时只表现出色氨酸残基的荧光^[20]。图 7 为 PSA 对 BSA 同步荧光光谱的影响，可见酪氨酸残基的最大发射波长基本保持不变，而色氨酸残基的最大发射波长红移 (~ 3.0 nm)，这表明山梨酸钾的加入使 BSA 的构象发生变化，色氨酸残基所处环境的疏水性降低，BSA 内部的疏水结

构有所瓦解,肽链的伸展程度增加。

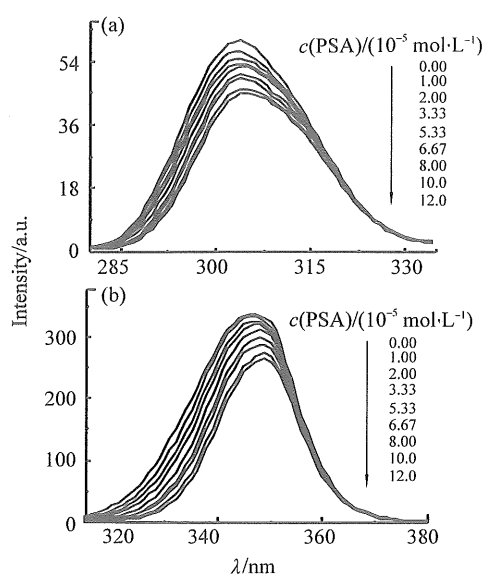


图 7 BSA 的同步荧光光谱图

Fig. 7 Synchronous fluorescence spectroscopy spectra; (a) $\Delta\lambda_1 = 15$ nm; (b) $\Delta\lambda_2 = 60$ nm

3 结 论

用荧光光谱和共振散射光谱探讨了山梨酸钾对牛血清白蛋白荧光和共振光散射猝灭的机理。研究表明,结果表明山梨酸钾与牛血清白蛋白之间的相互作用属于静态猝灭。山梨酸钾主要以电子作用力与牛血清白蛋白相结合。它们的结合服从位点结合模型,在在 288 和 293 K 时近似形成一个结合位点。同步荧光光谱表明山梨酸钾的加入降低了牛血清白蛋白内部色氨酸残基所处环境的疏水性。

参考文献:

- [1] OZDEMIR M, FLOROS J D. Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films [J]. J Food Engineering, 2001, 47:149 – 155.
- [2] ZACTITI E M, KIECKBUSCH T G. Potassium sorbate permeability in biodegradable alginate films: Effect of the antimicrobial agent concentration and crosslinking degree [J]. J Food Engineering, 2006, 77:462 – 467.
- [3] TSAY H J, WANG Y H, CHEN W L, et al. Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae [J]. Neurotoxicology and Teratology, 2007, 29:562 – 569.
- [4] KITANO K, FUKUKUWA T, OHTSUJI Y, et al. Mutagenicity and DNA-damaging activity caused by decomposed products of potassium sorbate reacting with ascorbic acid in the presence of Fe salt [J]. Food and Chemical

Toxicology, 2002, 40:1589 – 1594.

- [5] CASTELLETTO V, KRYSMANN M. Complex formation of bovine serum albumin with a poly(ethylene glycol) lipid conjugate [J]. Biomacromolecules, 2007, 8:2244 – 2249.
- [6] WANG Y L, WANG H F. Interaction of Bovine Serum Albumin with Benzoate [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 2002, 38(2):159 – 163. (in Chinese)
- [7] PASTUKHOV A V, LEVCHENKO L A, SADKOV A P. Spectroscopic study on binding of rutin to human serum albumin [J]. J Molecular Structure, 2007, 842:60 – 66.
- [8] ZHANG Y Z, DAI J, ZHANG X P, et al. Studies of the interaction between sudan I and bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. J Molecular Structure, 2008, 888:152 – 159.
- [9] PASTERNAK R F, COLLINGS P J. Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation [J]. Science, 1995, 269:935 – 939.
- [10] HUANG C Z, LIU Y, WANG Y H, et al. Resonance light scattering imaging detection of proteins with $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ -tetrakis (*p*-sulfophenyl) porphyrin [J]. Analytical Biochemistry, 2003, 321(2):236 – 243.
- [11] XIAO J B, CHEN J W, CAO H, et al. Study of the interaction between baicalin and bovine serum albumin by multi-spectroscopic method [J]. J Photoch Photobio (A), 2007, 191:222 – 227.
- [12] CHEN Xudong, WANG Xinbo, FAN Li, et al. Investigation on interaction between CdS nanocrystals and proteins [J]. Acta Chimica Sinica, 2005, 63(17):1600 – 1606.
- [13] 盛良全, 闫向阳, 徐华杰, 等. 烟碱与牛血清白蛋白相互作用的光谱研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(2):306 – 308.
SHENG L Q, YAN X Y, XU H J, et al. Study on the interaction between BSA and nicotine [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2007, 27(2):306 – 308.
- [14] HUANG C Z, LU W, LI Y F, et al. On the factors affecting the enhanced resonance light scattering signals of the interactions between proteins and multiply negatively charged chromophores using water blue as an example [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 556(2):469 – 475.
- [15] 李晓燕. 用荧光和共振光散射光谱研究甲硝唑与牛血清白蛋白的相互作用 [J]. 物理化学学报, 2007, 23(2):262 – 267.

(下转第 82 页)

程序直接法解出晶体结构, 数轮差值 Fourier 拟合确定非氢原子坐标, 对全部非氢原子坐标及各向异性参数进行全矩阵最小二乘法修正。氢原子位置按理论模型计算, 偏差因子为 $R_1 = 0.035\ 5$, $wR_2 = 0.096\ 3$ [$I > 2\theta(I)$] 和 $R_1 = 0.040\ 5$, $wR_2 = 0.102\ 2$ (所有数据)。差值电子密度最高和最低峰分别为 0.334×10^{-3} 和 -0.222×10^{-3} e/nm³。

参考文献:

- [1] ZHU F, CHEN X, YUAN Y H, et al. The chemical investigations of the mangrove plant *Avicennia marina* and its endophytes [J]. The Open Nat Prod J, 2009, 2: 24 - 32.
 - [2] 夏雪奎, 李庆, 邵长伦, 等. 南海红树林内生真菌 ZZF13 次级代谢产物的研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2009, 48(4): 133 - 136.
XIA X K, LI Q, SHAO C L, et al. The secondary metabolites of the mangrove endophytic fungus(ZZF13) from the South China Sea [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2009, 48(4): 133 - 136.
 - [3] PETTIT R K. Mixed fermentation for natural product drug discovery [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 83: 19 - 25.
 - [4] ZHU F, LIN Y C. Marinamide, a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea [J]. Chin Sci Bull, 2006, 51(12): 1426 - 1430.
 - [5] 唐冰, 朱汝华. 榄钱的性状及显微鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2006, 4(9): 1739.
TANG B, ZHU R H. Character and microscopic identification of the fruit of *Avicennia marina* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006, 4(9): 1739.
 - [6] MASAKI M, CHIGIRA Y, OHTA M. Total synthesis of racemic aspergillilic acid and neoaspergillilic acid [J]. J Org Chem, 1966, 31(12): 4143 - 4146.
 - [7] BENTLEY R. From *miso*, *saké* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid [J]. Nat Prod Rep, 2006, 23(6): 1046 - 1062.
-
- (上接第 78 页)
- LI X Y. Interaction of metronidazole with bovine serum albumin by using fluorescence and resonance light scattering spectra [J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 2007, 23(2): 262 - 267.
 - [16] 李改仙, 李建晴, 魏玉霞, 等. 四碘荧光素与牛血清白蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(8): 1277 - 1280.
LI G X, LI J Q, WEI Y X, et al. Study on the interaction of tetraiodofluorescein and bovine serum albumin by fluorimetry [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2005, 25(8): 1277 - 1280.
 - [17] 颜承农, 上官云凤, 童金强, 等. 双嘧达莫与牛血清白蛋白结合热力学特征的荧光光谱法研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2003, 23(3): 543 - 546.
Yan C N, SHANG G Y, TONG J Q, et al. Study on thermodynamics of binding reaction of dipyridamole with bovine serum albumin [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2003, 23(3): 543 - 546.
 - [18] SHAIKH S M T, SEETHARAMAPPA J, ASHOKA S, et al. A study of the interaction between bromopyrogallol red and bovine serum albumin by spectroscopic methods [J]. Journal of Molecular Structure, 2007, 73(2): 211 - 216.
 - [19] HOU H N, QI Z D, OU YANG Y W, et al. Studies on interaction between vitamin B12 and human serum albumin [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 47(1): 134 - 139.
 - [20] GHOSH S. Conformational study of papain in the presence of sodium dodecyl sulfate in aqueous medium Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005, 41(2): 209 - 216.