

## 2 种天然抗氧化剂与鲢鱼肌球蛋白的相互作用

黄 渊<sup>1</sup>, 岳世阳<sup>1</sup>, 熊善柏<sup>1,2</sup>, 杜红英<sup>1,2,\*</sup>

(1. 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北 武汉 430070;

2. 国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心(武汉), 湖北 武汉 430070)

**摘 要:** 研究2 种天然抗氧化剂表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)、白藜芦醇(resveratrol, RE)与鲢鱼肌球蛋白之间的相互作用。采用荧光光谱与圆二色谱技术分别探究EGCG、RE与鲢鱼肌球蛋白分子间相互作用的结合情况及其对肌球蛋白微观结构的影响。荧光光谱结果表明: EGCG、RE与鲢鱼肌球蛋白之间发生相互作用均会导致肌球蛋白荧光猝灭现象的发生, 且荧光猝灭方式都为静态猝灭。通过热力学数据分析得出EGCG、RE与肌球蛋白分子结合的主要作用力是氢键和范德华力; 并利用Stern-Volmer方程处理数据得到EGCG、RE与肌球蛋白在不同温度条件下的结合常数和结合位点数。圆二色谱及表面疏水性结果表明, EGCG、RE诱导了肌球蛋白结构的变化, EGCG使肌球蛋白 $\alpha$ -螺旋相对含量增加, 表面疏水性降低; 而RE对肌球蛋白二级结构无明显作用, 但会使其表面疏水性增加。

**关键词:** 肌球蛋白; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 白藜芦醇; 光谱技术; 相互作用

### Interaction between Two Natural Antioxidants and Silver Carp Myosin

HUANG Yuan<sup>1</sup>, YUE Shiyang<sup>1</sup>, XIONG Shanbai<sup>1,2</sup>, DU Hongying<sup>1,2,\*</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. National R&D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing (Wuhan), Wuhan 430070, China)

**Abstract:** In this investigation, the interaction between two natural antioxidants epigallocatechin gallate (EGCG), resveratrol (RE) and silver carp myosin was studied. The changes in the intermolecular interaction and microstructure of myosin were evaluated by fluorescence and circular dichroism spectroscopy. The results showed that the interaction of silver carp myosin with EGCG or RE led to fluorescence quenching of silver carp myosin in a static quenching mode. Thermodynamic analysis showed that the main driving forces for EGCG and RE binding to myosin molecules were hydrogen bonding and van der Waals force. The Stern-Volmer equation was used to obtain the binding constants and the number of binding sites at different temperatures. Circular dichroism (CD) spectroscopy and surface hydrophobicity analysis showed that EGCG and RE induced changes in myosin structure; EGCG increased the content of  $\alpha$ -helix and decreased the surface hydrophobicity, while RE had no effect on the secondary structures of myosin and increased the surface hydrophobicity.

**Keywords:** myosin; epigallocatechin gallate; resveratrol; spectroscopy; interaction

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171221-263

中图分类号: TS254.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 04-0014-07

引文格式:

黄渊, 岳世阳, 熊善柏, 等. 2 种天然抗氧化剂与鲢鱼肌球蛋白的相互作用[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 14-20.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171221-263. <http://www.spkx.net.cn>

HUANG Yuan, YUE Shiyang, XIONG Shanbai, et al. Interaction between two natural antioxidants and silver carp myosin[J]. Food Science, 2019, 40(4): 14-20. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171221-263.

<http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-12-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31772047)

第一作者简介: 黄渊 (1992—) (ORCID: 0000-0002-9877-4578), 男, 硕士, 研究方向为水产品加工与贮藏。

E-mail: qwer1123706970@163.com

\*通信作者简介: 杜红英 (1978—) (ORCID: 0000-0001-6229-2713), 女, 副教授, 博士, 研究方向为水产品加工、贮藏及生物大分子互作。E-mail: hydu@mail.hzau.edu.cn

我国是淡水鱼类产品生产大国,2016年全国淡水产品总产量3 411.11万 t,其中鱼类产量2 986.65万 t,占全年淡水产品总量的87.56%<sup>[1]</sup>。但是由于鱼类产品水分和蛋白质含量高,且自身携带较多的细菌,在贮藏、运输和销售过程中,容易失去其原有鲜味,造成腐败变质。目前鱼类的保鲜主要是冷藏为主,辅以添加防腐剂或抗氧化剂,但一些合成的防腐剂或抗氧化剂存在一定的致癌风险<sup>[2]</sup>,不符合现在的生产消费要求,所以加大开发健康天然的防腐剂或抗氧化剂成为鱼类保鲜的研究重点。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)(图1A)是从中国绿茶中提取的一种成分,是绿茶儿茶素中含量最高的组分,约占绿茶儿茶素的50%~80%,绿茶所表现的很多生物活性主要来源于EGCG<sup>[3]</sup>。李鹏等<sup>[4]</sup>通过测定不同浓度EGCG处理的罗非鱼片新鲜度的变化,证明EGCG可有效提高冷藏期间罗非鱼片的品质,延长其货架期,且0.2%的EGCG对罗非鱼片的保鲜效果更佳。由于EGCG易氧化,影响其保鲜效果,所以骆晓波<sup>[5]</sup>以纳米脂质体为载体,制成EGCG纳米脂质体并研究其稳定性以及对鳕鱼的保鲜效果,证明EGCG纳米脂质体在维持pH值的稳定,防止鱼肉氧化、腐败变质,维持感官性状,抑制细菌的生长等方面都表现出优势,且无毒副作用,适合于鱼肉的保鲜。

白藜芦醇(resveratrol, RE)(图1B),化学名称为3,4,5-三羟基二苯乙烯,是含有芪类结构的酚化合物,主要存在于葡萄、虎杖、花生、桑椹等植物中,尤其在种皮中含量较高<sup>[6]</sup>。有研究表明,RE对月季切花有一定的保鲜作用<sup>[7]</sup>,有效调节切花水分平衡,减轻细胞质膜透性,降低膜脂过氧化水平,从而延缓切花衰老进程,延长瓶插寿命;RE处理对砵山酥梨有较好的保鲜效果<sup>[8]</sup>,可抑制共轭三烯的含量、增加细胞的膜透性、降低 $\alpha$ -法尼烯的峰值,显著抑制和延缓梨果实在贮藏期和货架期黑皮病的发生。将RE应用于植物以及植物制品保鲜中的研究国内外均有报导<sup>[8-9]</sup>,但关于RE对鱼类保鲜效果及其与肌球蛋白作用的研究鲜见报道。因此,本实验拟就其与肌球蛋白相互作用方面进行研究。

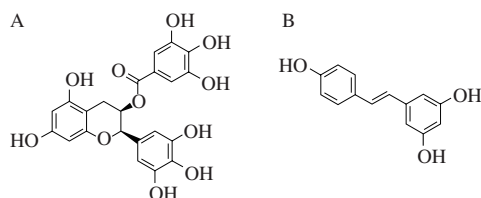


图1 EGCG (A)、RE (B) 结构式

Fig. 1 Chemical structures of EGCG (A) and RE (B)

蛋白质为肌肉组织的主要组成部分,其降解、聚合和变性都会导致蛋白质功能的丧失,从而直接决定鱼

类肌肉质量的好坏以及鱼类腐败变质<sup>[10]</sup>。其中肌球蛋白是各类肌细胞中含量最多的结构蛋白和收缩蛋白,是构成肌肉肌原纤维粗丝的基本组成蛋白,是横纹肌细胞表达最丰富的蛋白,约占其总蛋白库的25%<sup>[11]</sup>。本实验以EGCG、RE和肌球蛋白为原料,运用荧光光谱、圆二色谱研究EGCG、RE与肌球蛋白的相互作用,由荧光猝灭现象和Forster非辐射能量转移理论求得EGCG、RE与肌球蛋白的结合常数和结合位点数,从热力学参数推出二者之间的作用力类型,并探讨EGCG、RE对肌球蛋白构象的影响,以期EGCG、RE在鱼类保鲜应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

鲢鱼(体质量2~3 kg) 市购; EGCG、RE(均为色谱纯,纯度 $\geq 98\%$ ) 上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯,实验用水均为二次去离子水。

### 1.2 仪器与设备

F-4500型荧光分光光度计 日本日立公司; AE-240双量程电子分析天平 瑞士Mettler-Toledo公司; J-1500型圆二色谱仪 日本分光株式会社; TB-85恒温水浴装置 日本岛津公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 提取肌球蛋白

参考Park等<sup>[12]</sup>的方法,并略作修改。尸僵前的鲢鱼背脊肉用食品调理机破碎,向破碎后的肌肉中加入10倍体积的溶液A(0.1 mol/L KCl、0.02% NaN<sub>3</sub>、20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5)。并用高速分散均质机于9 000 r/min条件下均质1 min,均质液于4℃条件下放置15 min,5 000 r/min离心5 min,沉淀于5倍体积溶液B(0.45 mol/L KCl、5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、0.2 mol/L 醋酸镁、1 mmol/L 乙二醇-双-(2-氨基乙基)四乙酸、20 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8)中溶解,同时加入ATP-Na<sub>2</sub>使肌球蛋白与肌动蛋白解离,鱼肉肌球蛋白的提取需加ATP-Na<sub>2</sub>至终浓度为5 mmol/L,于4℃条件下放置1 h后4℃、10 000 r/min离心10 min,上清液用10倍体积1 mmol/L KHCO<sub>3</sub>溶液稀释,于4℃条件下放置1 h,然后4℃、12 000 r/min离心10 min;沉淀重新用2.5倍体积溶液C(0.5 mol/L KCl、5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇、20 mmol/L Tris-HCl缓冲液, pH 7.5)溶解,于4℃条件下放置10 min,再用2.5倍体积的1 mmol/L KHCO<sub>3</sub>溶液稀释并加MgCl<sub>2</sub>至终浓度为10 mmol/L,于4℃条件下放置过夜,然后10 000 r/min离心10 min;沉淀物用0.5倍体积溶液D溶解(0.6 mol/L NaCl、20 mmol/L Tris-HCl缓冲液,

pH 7.5), 即为肌球蛋白溶液。采用福林-酚法<sup>[13]</sup>测定蛋白浓度。

### 1.3.2 荧光光谱测定

分别移取一定量的EGCG和RE乙醇溶液于10 mL具塞比色管中, 再加入1 mg/mL肌球蛋白溶液1.0 mL, 用0.6 mol/L NaCl (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 缓冲溶液稀释, 多酚浓度<sup>[14]</sup>分别为0、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $2 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$  mol/L, 在实验温度条件下恒温1 h。以280 nm为激发波长, 狭缝宽5 nm, 扫描300~450 nm波长范围内的荧光光谱。设置波长差( $\Delta\lambda$ )分别为15、60 nm, 狭缝宽均为5 nm, 扫描速率240 nm/min, 扫描260~380 nm范围内的同步荧光光谱<sup>[15]</sup>。

### 1.3.3 圆二色谱测定

试剂处理方式同1.3.2节, 设置波长扫描范围190~250 nm, 扫描速率50 nm/min, 分辨0.1 nm, 响应时间1 s, 石英比色池光径1 mm,  $N_2$ 流量4 L/min<sup>[16]</sup>。

### 1.3.4 表面疏水性测定

采用8-苯氨基-1-萘磺酸(1-anilino naphthalene-8-sulfonic acid, ANS) 荧光探针法测量蛋白质表面疏水性<sup>[17]</sup>。将已知蛋白分别稀释为0、0.05、0.1、0.15、0.2 mg/mL, 同时加入多酚, 使EGCG和RE浓度均分别为0、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $2 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$  mol/L。每4 mL溶液加入20  $\mu$ L  $8 \times 10^{-3}$  mol/L ANS-0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 7.4)。反应10 min后测其荧光强度。设置狭缝宽度5 nm, 激发波长390 nm, 发射波长479 nm。表面疏水性以荧光值-蛋白浓度曲线的斜率来表示。

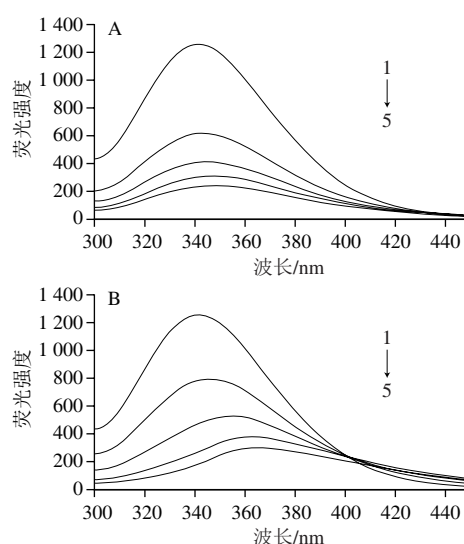
### 1.4 数据处理

采用SAS 9.2软件进行数据分析, 运用Origin 9.0软件进行图形绘制及线性拟合。

## 2 结果与分析

### 2.1 荧光猝灭光谱

肌球蛋白分子中因含有在激发波长为280 nm条件下能发射荧光的色氨酸、酪氨酸等氨基酸残基而具有内源性荧光, 其中色氨酸残基是主要的荧光贡献基团<sup>[18]</sup>。当激发波长为280 nm时, 由图2A可知, 肌球蛋白在波长341 nm处具有强荧光发射峰, 且随着EGCG浓度的增加, 肌球蛋白的内源性荧光强度有规律地降低, 表明EGCG可以大幅度猝灭肌球蛋白内源性荧光, 这说明EGCG、肌球蛋白发生了相互作用; 由图2B可知, 随着RE浓度的增加, 肌球蛋白内源性荧光也呈现出大幅度有规律的降低, 且伴随着明显的荧光发射峰红移现象(从341 nm到365 nm), 说明RE与肌球蛋白发生了相互作用, 使其发色团微环境空间构象发生变化, 即色氨酸残基所处环境极性增强, 疏水性减弱。



1~5.浓度分别为0、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $2 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$  mol/L。

图2 EGCG (A) 和RE (B) 对肌球蛋白的猝灭作用

Fig. 2 Fluorescence quenching spectra of myosin with EGCG (A) and RE (B)

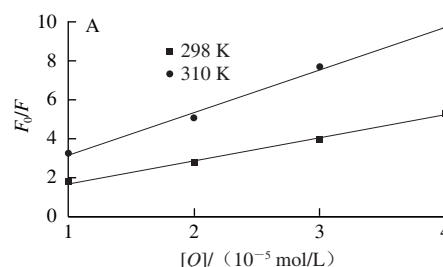
### 2.2 荧光猝灭机理

溶液中荧光的猝灭, 指的是具备内源性荧光物质分子与溶剂分子之间所发生的导致荧光强度下降的物理或化学的作用过程。荧光物质分子同猝灭剂相互作用方式的差异产生了不同的猝灭方式, 例如动态猝灭、静态猝灭等形式。动态猝灭, 是指猝灭剂与处于激发态的荧光物质分子之间发生相互作用而引起的一种猝灭过程; 静态猝灭, 是指猝灭剂与处于基态的荧光物质分子发生相互作用所引起的一种猝灭过程<sup>[19]</sup>。其中, 动态猝灭过程符合Stern-Volmer方程<sup>[20]</sup>, 如方程(1)所示:

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

式中:  $F_0$ 为未加入猝灭剂时的荧光强度;  $F$ 为加入猝灭剂后的荧光强度;  $K_q$ 为双分子猝灭过程速率常数/( $L/(mol \cdot s)$ );  $K_{sv}$ 为Stern-Volmer动态猝灭常数/( $L/mol$ );  $[Q]$ 为猝灭剂的浓度/( $mol/L$ );  $\tau_0$ 为猝灭剂不存在条件下生物大分子的平均荧光寿命(约为 $10^{-8}$  s)。

为确定EGCG、RE与肌球蛋白相互作用的猝灭机理, 先用Stern-Volmer方程处理数据<sup>[21]</sup>, 分别得到不同温度条件下EGCG、RE与肌球蛋白荧光猝灭的Stern-Volmer方程, 如图3所示。



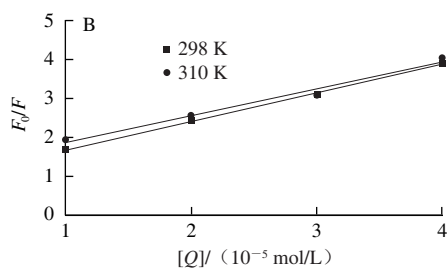


图3 不同温度条件下EGCG (A) 和RE (B) 对肌球蛋白荧光猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 3 Stern-Volmer plots for fluorescence quenching of EGCG (A)-myosin and RE (B)-myosin systems at different temperatures

表1 不同温度条件下EGCG和RE与肌球蛋白分别相互作用的 Stern-Volmer 猝灭常数  $K_{sv}$

Table 1 Stern-Volmer quenching constants for EGCG-myosin and RE-myosin systems at different temperatures

多酚	温度/K	线性回归方程	$K_{sv}/(L/mol)$	$K_d/(L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1})$	相关系数 $r$
EGCG	298	$F_0/F = 0.5394 + 1.175 \times 10^5 [Q]$	$1.175 \times 10^5$	$1.175 \times 10^{13}$	0.9975
	310	$F_0/F = 0.9183 + 2.205 \times 10^5 [Q]$	$2.205 \times 10^5$	$2.205 \times 10^{13}$	0.9983
RE	298	$F_0/F = 0.939 + 7.308 \times 10^4 [Q]$	$7.308 \times 10^4$	$7.308 \times 10^{12}$	0.9991
	310	$F_0/F = 1.181 + 6.824 \times 10^4 [Q]$	$6.824 \times 10^4$	$6.824 \times 10^{12}$	0.9927

对图3进行数学计算可求得EGCG和RE与肌球蛋白相互作用的  $K_{sv}$  和  $K_d$ ，如表1所示。由图3A可知，EGCG与肌球蛋白的Stern-Volmer猝灭曲线中的  $F_0/F$  和  $[Q]$  之间存在线性相关性，且斜率随着温度的升高而增加，说明EGCG与肌球蛋白之间发生了动态猝灭现象，同时不同温度曲线条件下的  $K_d$  值均大于最大动态猝灭速率  $2.0 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)$ ，说明EGCG与肌球蛋白的相互作用过程中也存在静态猝灭的发生，所以EGCG与肌球蛋白的相互作用过程既有动态猝灭也有静态猝灭<sup>[22]</sup>。由图3B可以看出，RE与肌球蛋白的Stern-Volmer猝灭曲线中的  $F_0/F$  和  $[Q]$  之间也存在线性相关性，但是斜率是随着温度的升高而降低，且不同温度条件下  $K_d$  值也都大于最大动态猝灭速率  $2.0 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)$ ，结合其荧光光谱图出现红移现象，说明RE与肌球蛋白的相互作用过程不存在动态猝灭而是形成复合物的静态猝灭<sup>[23]</sup>。

### 2.3 结合常数和结合位点数

在静态猝灭过程中，荧光物质与猝灭剂分子之间的结合常数可以通过静态猝灭公式 (2)<sup>[24]</sup> 计算：

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K_a + n \lg [Q] \quad (2)$$

式中： $F_0$  为未加入猝灭剂时的荧光强度； $F$  为加入猝灭剂后的荧光强度； $K_a$  为结合常数  $(L/mol)$ ； $[Q]$  为配合物的浓度  $(mol/L)$ ； $n$  为结合位点数。

得到  $\lg[(F_0 - F)/F]$  与  $\lg[Q]$  的关系和相关方程，如图4所示。图4中拟合曲线的斜率代表多酚与肌球蛋白的

结合位点数  $n$  值；拟合曲线的截距代表化合物与肌球蛋白的结合常数  $K_a$  值。

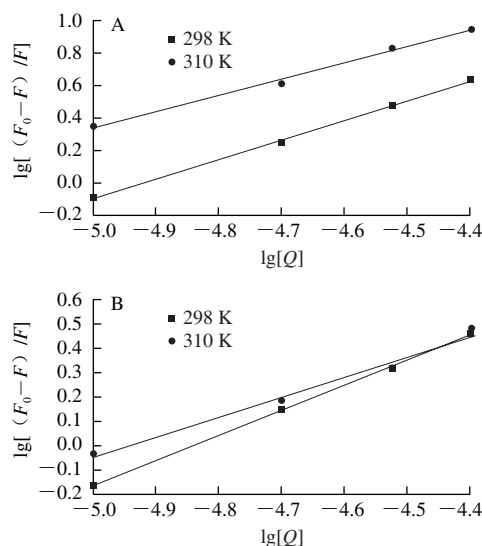


图4 不同温度条件下EGCG (A) 和RE (B) 与肌球蛋白的  $\lg[(F_0 - F)/F]$  与  $\lg[Q]$  的关系图

Fig. 4 Plot of  $\lg[(F_0 - F)/F]$  versus  $\lg[Q]$  for EGCG (A)-myosin and RE (B)-myosin systems at different temperatures

对图4进行观察可得EGCG、RE与肌球蛋白反应的结合常数和结合位点数，如表2所示。EGCG和RE与肌球蛋白相互作用的结合常数、结合位点数都随着温度上升而降低，表现出明显的静态猝灭，并且多酚与肌球蛋白的结合位点数均接近1，表明多酚与肌球蛋白的之间结合力很好。

表2 不同温度条件下EGCG和RE分别与肌球蛋白结合的相关常数和方程

Table 2 Linear regression equations and correlation coefficients for EGCG-myosin and RE-myosin interactions at different temperatures

多酚	温度/K	线性回归方程	$K_d/(L/mol)$	$n$	相关系数 $r$
EGCG	298	$\lg[(F_0 - F)/F] = 5.922 + 1.204 \lg[Q]$	$8.362 \times 10^5$	1.204	0.9993
	310	$\lg[(F_0 - F)/F] = 5.314 + 0.995 \lg[Q]$	$2.060 \times 10^5$	0.9951	0.9979
RE	298	$\lg[(F_0 - F)/F] = 4.983 + 1.030 \lg[Q]$	$9.621 \times 10^4$	1.030	0.9996
	310	$\lg[(F_0 - F)/F] = 4.098 + 0.829 \lg[Q]$	$1.253 \times 10^4$	0.8295	0.9932

### 2.4 多酚与肌球蛋白之间作用力类型

有机小分子和蛋白质之间的作用力主要有疏水作用力、氢键、范德华力和静电引力等。不同小分子与蛋白质结合力类型不同。Ross等<sup>[25]</sup>根据大量的实验结果，总结出根据反应前后热力学焓变  $\Delta H$  和熵变  $\Delta S$  的相对大小，判断药物与蛋白质之间的主要作用力类型的规律。 $\Delta H$  大于0、 $\Delta S$  大于0为疏水作用力； $\Delta S$  小于0、 $\Delta H$  小于0为氢键和范德华力； $\Delta H$  小于0、 $\Delta S$  大于0为静电引力。在温度变化不大时，反应的焓变  $\Delta H$  可以看作一个常数，由结合常数  $K_a$ ，按公式 (3) 求出反应的自由能变 ( $\Delta G$ )，然后根据公式 (4)、(5) 分别求出  $\Delta H$ 、 $\Delta S$ ，如表3所示。



$$\Delta G = RT \ln K \quad (3)$$

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \frac{\Delta H}{R} \quad (4)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (5)$$

表3 EGCG、RE与肌球蛋白结合的热力学参数

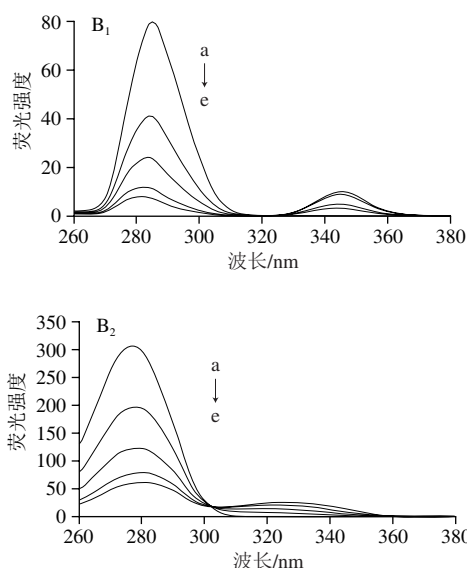
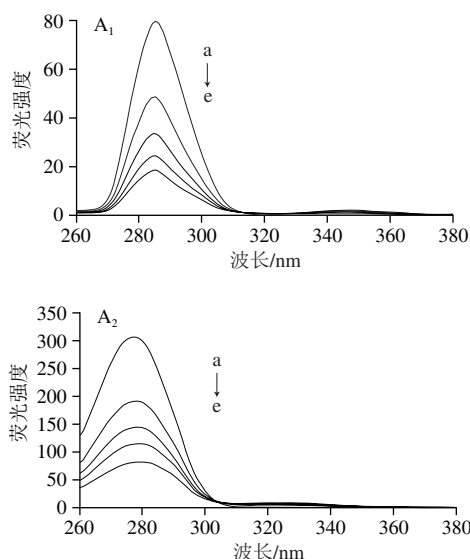
Table 3 Thermodynamic parameters of EGCG-myosin and RE-myosin interactions

多酚	温度/K	$\Delta H/$ (kJ/mol)	$\Delta S/$ (J/ mol · K)	$\Delta G/$ (kJ/mol)
EGCG	298	-89.66	-187.51	-33.79
	310	-	-	-31.54
RE	298	-130.47	-342.42	-28.43
	310	-	-	-24.32

由表3可知, EGCG与肌球蛋白作用过程中的 $\Delta H$ 小于0、 $\Delta S$ 小于0, 说明EGCG与肌球蛋白之间的主要作用为氢键和范德华力。而 $\Delta G$ 小于0, 表明EGCG与肌球蛋白的结合为自发过程。同样, RE与肌球蛋白作用过程中的 $\Delta H$ 小于0、 $\Delta S$ 小于0, 表明了RE与肌球蛋白之间的主要作用力也为氢键和范德华力。而 $\Delta G$ 小于0, 表明RE与肌球蛋白的结合也为自发过程。

## 2.5 同步荧光光谱

同步荧光光谱因其图谱简单、谱带窄、能够减少光谱重叠等优点, 是用来研究小分子与蛋白质相互作用对蛋白质发色团分子微环境构象改变的好方法<sup>[26]</sup>。当设置 $\Delta\lambda$ 为15 nm时, 只显示酪氨酸残基的荧光特征光谱, 当设置 $\Delta\lambda$ 为60 nm时, 只显示色氨酸残基的荧光特征光谱<sup>[27]</sup>。因此由最大发射波长的改变可判断蛋白质酪氨酸残基和色氨酸残基微环境的极性变化, 当最大吸收波长蓝移时, 说明多酚的加入使环境疏水性增加, 当最大吸收波长红移时, 说明环境疏水性减小, 蛋白分子趋向于伸展<sup>[28]</sup>。



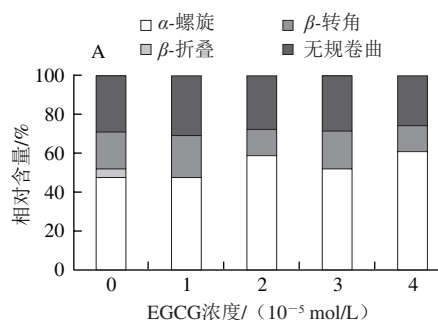
1.  $\Delta\lambda=15$  nm; 2.  $\Delta\lambda=60$  nm; a~e.浓度分别为0、 $1 \times 10^{-5}$ 、 $2 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$  mol/L。

图5 EGCG (A) 和RE (B) 与肌球蛋白相互作用的同步荧光光谱  
Fig. 5 Synchronous fluorescence spectra of EGCG (A)-myosin and RE (B)-myosin systems

从图5A可以看出, 当 $\Delta\lambda$ 为15 nm时, 随着EGCG浓度的增加, 酪氨酸残基的荧光强度明显下降, 但最大吸收波长没有变化, 当 $\Delta\lambda$ 为60 nm时, 随着EGCG浓度的增加, 色氨酸残基的荧光强度也明显下降, 且伴有轻微红移, 说明EGCG与肌球蛋白相互作用均会导致酪氨酸残基和色氨酸残基的荧光猝灭, 并且色氨酸残基的荧光贡献比酪氨酸多, 这与激发波长的设置以及色氨酸和酪氨酸的相对含量有关<sup>[29]</sup>, 而且EGCG影响了色氨酸残基的微环境, 使该区域极性增加, 疏水性降低<sup>[28]</sup>。

从图5B可以看出, 当 $\Delta\lambda$ 为15 nm时, 随着RE的加入, 酪氨酸残基的荧光强度明显下降, 且伴有明显蓝移, 说明RE改变了酪氨酸残基的微环境, 使该区域极性减小, 疏水性增大; 当 $\Delta\lambda$ 为60 nm时, 随着RE的加入, 色氨酸残基的荧光强度也明显下降, 且伴有轻微红移, 说明RE也改变了肌球蛋白色氨酸残基的微环境, 使该区域极性增大, 疏水性降低。

## 2.6 圆二色谱测定结果



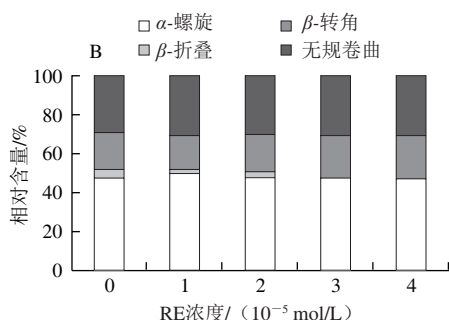


图6 EGCG (A)、RE (B) 与肌球蛋白相互作用的圆二色谱图  
Fig. 6 CD spectra of EGCG (A)-myosin and RE (B)-myosin systems

从图6可以看出,随着EGCG浓度上升,肌球蛋白 $\alpha$ -螺旋相对含量整体呈上升趋势, $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角、无规卷曲都呈现下降趋势,说明EGCG与肌球蛋白作用使肌球蛋白二级结构发生变化,肽链收缩;而随着RE浓度上升,肌球蛋白 $\alpha$ -螺旋、无规卷曲含量基本不变,仅 $\beta$ -转角、 $\beta$ -折叠含量产生少许变化,说明RE对肌球蛋白二级结构无明显影响。

## 2.7 表面疏水性测定结果

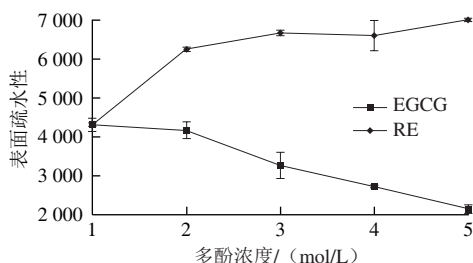


图7 EGCG、RE对肌球蛋白表面疏水性影响  
Fig. 7 Effects of EGCG and RE on surface hydrophobicity of myosin

蛋白质作为具有复杂空间结构的生物大分子,其构象的变化必然会影响到其表面氨基酸的分布、密度以及疏水空穴的数量,而使表面疏水性发生变化<sup>[30]</sup>。为进一步说明EGCG、RE对肌球蛋白理化性质的影响,考察EGCG、RE对肌球蛋白表面疏水性的影响情况。从图7可看出,随着EGCG浓度上升,肌球蛋白表面疏水性呈下降趋势,这与同步荧光数据得出的EGCG使色氨酸残基微环境疏水性减少和圆二色谱数据得出的EGCG使 $\alpha$ -螺旋增加的结果相匹配;随着RE浓度上升,肌球蛋白表面疏水性呈上升趋势,也与同步荧光数据有一定的相关性<sup>[31]</sup>。

## 3 结论

EGCG、RE对肌球蛋白的内源荧光都具有较强猝灭作用,这种猝灭主要为静态猝灭。求得EGCG、RE与肌球蛋白的结合常数、结合位点和热力学参数,且热力学数据( $\Delta H < 0$ 、 $\Delta S < 0$ 、 $\Delta G < 0$ )表明它们主要靠氢键和

范德华力结合并且是自发过程;同时用同步荧光光谱、圆二色谱和表面疏水性测定探讨EGCG、RE对肌球蛋白构象的影响,结果表明EGCG会引起肌球蛋白二级结构变化, $\alpha$ -螺旋相对含量增加,降低肌球蛋白表面疏水性,RE对肌球蛋白二级结构无明显影响,使其表面疏水性增加。

## 参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 中国渔业年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2017: 21-36.
- [2] 王楚文, 柳云龙, 唐文静, 等. 生物保鲜剂对鱼类保鲜的应用现状及其展望[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(16): 387-389. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2015.16.133.
- [3] 陈义, 汪小钢, 宛晓春, 等. 没食子儿茶素没食子酸酯制备新工艺的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 364-368. DOI:10.3969/j.issn.1672-352X.2007.03.012.
- [4] 李鹏, 陈莉萍, 黄琴, 等. EGCG对冷藏罗非鱼鱼片的保鲜[J]. 食品科技, 2014, 39(8): 118-122. DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2014.08.027.
- [5] 骆晓波. 表没食子儿茶素没食子酸酯纳米脂质体的制备及其对鲑鱼保鲜效果的研究[D]. 杭州: 中国计量学院, 2015: 26-32.
- [6] 李先宽, 李赫宇, 李帅, 等. 白藜芦醇研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(14): 2568-2578. DOI:10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.030.
- [7] 聂磊, 叶敏仪, 林静慧, 等. 白藜芦醇和硝酸钠对月季切花的保鲜效应[J]. 广州城市职业学院学报, 2009, 3(1): 44-50. DOI:10.3969/j.issn.1674-0408.2009.01.010.
- [8] 金宏, 惠伟, 牛瑞雪, 等. 白藜芦醇对砒石酥梨的保鲜效应[J]. 淮北师范大学学报(自然科学版), 2014, 35(1): 51-55. DOI:10.3969/j.issn.2095-0691.2014.01.013.
- [9] LAI L J, CHIU J M, CHIOU R Y Y. Fresh preservation of alfalfa sprouts and mushroom slices by soaking with thymol and resveratrol solutions[J]. Food Science & Nutrition, 2017, 5(3): 776-783. DOI:10.1002/fsn3.458.
- [10] 李强. 草鱼冷藏过程中肌肉蛋白质的组成和理化特性变化研究[D]. 长沙: 长沙理工大学, 2013: 11-21.
- [11] 朱道立, 陈佩林, 王康乐, 等. 骨骼肌肌球蛋白II的研究进展[J]. 生物学教学, 2010, 35(11): 8-10. DOI:10.3969/j.issn.1004-7549.2010.11.004.
- [12] PARK J A E W, LANIER T C. Scanning calorimetric behavior of tilapia myosin and actin due to processing of muscle and protein purification[J]. Journal of Food Science, 1989, 54(1): 49-51. DOI:10.1111/j.1365-2621.1989.tb08564.x.
- [13] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [14] 汪金林. 茶多酚对冷藏养殖大黄鱼品质影响的研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013: 33-44.
- [15] YE J, FAN F, XU X, et al. Interactions of black and green tea polyphenols with whole milk[J]. Food Research International, 2013, 53(1): 449-455. DOI:10.1016/j.foodres.2013.05.033.
- [16] TAHA M, QUENTAL M V, CORREIA I, et al. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids[J]. Process Biochemistry, 2015, 50(7): 1158-1166. DOI:10.1016/j.procbio.2015.03.020.
- [17] RU L, LIU Q, XIONG S, et al. Effects of high intensity ultrasound on structural and physicochemical properties of myosin from silver carp[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 37: 150-157. DOI:10.1016/j.ultsonch.2016.12.039.

- [18] YAN X, LIU B, CHONG B, et al. Interaction of cefpiramide sodium with bovine hemoglobin and effect of the coexistent metal ion on the protein-drug association[J]. Journal of Luminescence, 2013, 142: 155-162. DOI:10.1016/j.jlumin.2013.04.009.
- [19] 王婧. 多酚类化合物与牛血清蛋白相互作用的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2013: 5-10.
- [20] BEVINGTON P R, ROBINSON D K, BLAIR J M, et al. Data reduction and error analysis for the physical sciences[J]. Computers in Physics, 1993, 7(4): 415-416. DOI:10.1063/1.4823194.
- [21] MANDAL P, BARDHAN M, GANGULY T. A detailed spectroscopic study on the interaction of Rhodamine 6G with human hemoglobin[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2010, 99(2): 78-86. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2010.02.009.
- [22] LI J, WANG S. Application of molecular modelling and spectroscopic approaches for investigating the binding of tanshinone IIA to human serum albumin[J]. The Journal of Chemical Thermodynamics, 2013, 58: 206-210. DOI:10.1016/j.jct.2012.11.009.
- [23] 张淼, 王道营, 张牧烱, 等. 一磷酸腺苷与肌动球蛋白相互作用的荧光光谱研究[J]. 食品科学, 2016, 37(17): 32-37. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201617006.
- [24] 林海彬, 郑琳, 林玉琴, 等. 邻菲罗啉和氨三乙酸钴配合物与牛血清白蛋白相互作用的荧光分析[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(8): 1818-1825. DOI:10.7503/cjcu20130098.
- [25] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3096-3102. DOI:10.1021/bi00514a017.
- [26] KLAJNERT B, BRYSEWSKA M. Fluorescence studies on PAMAM dendrimers interactions with bovine serum albumin[J]. Bioelectrochemistry, 2002, 55(1): 33-35. DOI:10.1016/S1567-5394(01)00170-0.
- [27] AZIMI O, EMAMI Z, SALARI H, et al. Probing the interaction of human serum albumin with norfloxacin in the presence of high-frequency electromagnetic fields: fluorescence spectroscopy and circular dichroism investigations[J]. Molecules, 2011, 16(12): 9792-9818. DOI:10.3390/molecules16129792.
- [28] CHAMANI J, TAFRISHI N, MOMEN-HERAVI M. Characterization of the interaction between human lactoferrin and lomefloxacin at physiological condition: multi-spectroscopic and modeling description[J]. Journal of Luminescence, 2010, 130(7): 1160-1168. DOI:10.1016/j.jlumin.2010.02.014.
- [29] 尹燕霞, 向本琼, 佟丽. 荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(2): 33-36; 40. DOI:10.3969/j.issn.1002-4956.2010.02.011.
- [30] 余晶梅. 荧光探针法和疏水相互作用层析法分析蛋白表面疏水性[D]. 杭州: 浙江大学, 2014: 28-37.
- [31] 王辰, 江连洲, 魏冬旭, 等. 不同品种大豆分离蛋白结构与表面疏水性的关系[J]. 食品科学, 2012, 33(9): 54-57.