

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2018.01.012

荧光素酶与金丝桃素-镁离子配合物的相互作用

丁 怡, 李晓婷, 周 林, 周家宏

(南京师范大学化学与材料科学学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 采用紫外-可见光谱法、荧光光谱法、圆二色谱法等研究了荧光素酶(Luc)与金丝桃素-镁离子配合物(Hyp-Mg²⁺)的相互作用,包括结合位点、结合常数、结合力强弱、生物大分子构象变化等因素的影响.紫外-可见光谱表明,Hyp-Mg²⁺与荧光素酶发生反应且改变了荧光素酶的分子结构.荧光数据表明Hyp-Mg²⁺与荧光素酶通过生成非荧光复合物的静态猝灭而有效地猝灭了荧光素酶的荧光.对荧光光谱数据处理得到298 K下Hyp-Mg²⁺与荧光素酶的结合常数为3.13×10⁵ L/mol. CD光谱表明,Hyp-Mg²⁺可改变荧光素酶的分子构象.

[关键词] 金丝桃素, 荧光素酶, 紫外-可见光谱, 荧光光谱, 圆二色谱

[中图分类号] O657.39 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2018)01-0061-07

Interaction of Luciferase and Hyp-Mg²⁺

Ding Yi, Li Xiaoting, Zhou Lin, Zhou Jiahong

(School of Chemistry and Materials Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: The interaction between luciferase(Luc) and Hyp-Mg²⁺ complex was studied by UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy and circular dichroism(CD) spectroscopy. The UV-Vis studies present that Hyp-Mg²⁺ can interact with Luc and disturb the structure of Luc. Fluorescence spectroscopy revealed that the binding constant of Luc with Hyp-Mg²⁺ complex at 298 K is 3.13×10⁵ L/mol and Hyp-Mg²⁺ can quench the fluorescence of Luc through the static quenching mechanism. CD spectra indicate Hyp-Mg²⁺ can change the molecular conformation of Luc.

Key words: Hypericin, Luciferase, UV-Vis, fluorescence spectroscopy, CD spectroscopy

金丝桃素(Hypericin)是贯叶金丝桃(Hypericum perforatum L.)中最具有生物活性的物质,具有抗病毒、抗肿瘤、抗抑郁等作用^[1-2].近年来,随着人们对金丝桃素生物活性的深入研究,金丝桃素成为当前药物研究的热点课题之一.其中,金丝桃素以其显著的光动力机制引起了人们极大的关注.金丝桃素在光动力治疗(PDT)中具有重要的作用,是最有效的光敏剂之一^[3].实验和临床结果表明,金丝桃素具有很高的T₁量子产率,较低的暗毒性和有效的¹O₂产率.进一步研究证明光照条件下金丝桃素吸收光子,然后激发产生活性氧物种 ROS,ROS会使细胞的细胞膜、线粒体、溶酶体等发生不可逆的氧化反应,导致细胞凋亡或坏死,从而杀死肿瘤细胞^[4-6].但由于其主要吸收绿橙光,对组织的穿透能力有限,而自身的最大吸收峰在595 nm附近,所以通过制备金丝桃素与镁离子的配合物(Hyp-Mg²⁺),可提高金丝桃素的水溶性和在光疗窗口的吸收.荧光素酶(luciferase)是一类能够产生生物荧光的酶,在临床医学及生物技术的分析领域具有广泛的应用.本实验选用的荧光素酶源于北美萤火虫(P. Pyralis),含有约550个氨基酸,分子量约为62 kD^[7-8].本文制备了Hyp-Mg²⁺并通过光谱手段对荧光素酶与Hyp-Mg²⁺的相互作用进行研究,得出了荧光素酶与Hyp-Mg²⁺反应的结合常数、结合位点等参数,阐明了荧光素酶与Hyp-Mg²⁺之间的相互作用机制,探讨了构建通过荧光素和荧光素酶相互作用产生的自发光来激发光疗药物的给药体系的可行性.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金丝桃素(Hyp)购自 Aladdin,纯度为99%,使用前用二甲基亚砜(DMSO)配制成2.7 mmol/L的母液

收稿日期:2017-09-09.

基金项目:国家自然科学基金(21571105)、江苏省科技厅面上项目(BK20161554).

通讯联系人:周家宏,博士,教授,研究方向:化学生物学与药物化学. E-mail:zhoujiahong@njnu.edu.cn

避光保存. $MgCl_2$ 购自上海凌峰化学试剂有限公司,使用前用去离子水配制成 2.7 mmol/L 的母液保存. 荧光素酶购自 Sigma 公司,用 $pH=7.0$ 的磷酸盐缓冲溶液配制成 $1.0\times 10^{-6}\text{ mol/L}$ 的荧光素酶储备液. 其它试剂均为分析纯,实验用水为超纯去离子水.

1.2 实验方法

1.2.1 Hyp- Mg^{2+} 的制备

将 $100\ \mu\text{L}$ Hyp 加入到 10 mL 搅拌着的 Tris-HCl 缓冲溶液 ($pH=7.10$),然后将 $MgCl_2$ 溶液加入到上述体系并搅拌 30 min 得到 Hyp- Mg^{2+} .

1.2.2 紫外-可见吸收光谱法

在 1 cm 二面通光的石英比色皿中加入 $3\text{ mL } 1.0\times 10^{-6}\text{ mol/L}$ 的荧光素酶溶液,用移液枪加入相同体积的 Hyp- Mg^{2+} 溶液,作用完全后依次测定体系的紫外-可见吸收光谱.

1.2.3 荧光光谱法

在 1 cm 四面通光的石英比色皿中加入 $3\text{ mL } 1.0\times 10^{-6}\text{ mol/L}$ 的荧光素酶溶液,用移液枪加入相同体积的 Hyp- Mg^{2+} 溶液,作用完全后依次测定体系的荧光光谱.

1.2.4 圆二色谱

固定比色皿中荧光素酶的浓度为 $1.0\times 10^{-7}\text{ mol/L}$ 并加入 Hyp- Mg^{2+} . 反应完全后进行扫描. 设置光谱带宽 1 nm ,分辨率 0.5 nm ,响应时间 1 s ,扫描波段为 $190\text{ nm}\sim 260\text{ nm}$.

1.2.5 时间分辨荧光光谱

采用的脉冲光源为 LED 钠灯激光器. 数据用 IBHDAS6 荧光衰减分析软件去卷积积分处理后拟合为合适的指数函数模式.

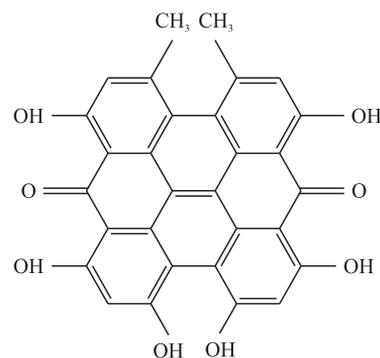


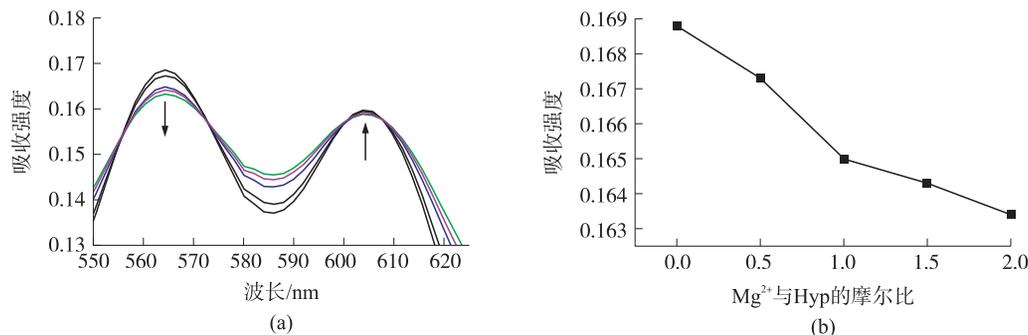
图 1 金丝桃素的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of Hypericin

2 结果与讨论

2.1 Hyp- Mg^{2+} 的组成与结构

使用紫外-可见光谱法研究 Hyp 与 Mg^{2+} 配位后结构和性质的变化. 如图 2(a) 所示, Hyp 在 $pH=7.10$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液中有两个吸收峰,分别在 564 nm 和 604 nm 处. 与 Mg^{2+} 配位后, Hyp 的两个吸收峰均逐渐变宽,说明 Hyp- Mg^{2+} 比 Hyp 具有更好的光捕获能力. 为了确定配合物的组成,将 564 nm 处吸收峰强度的改变对 Mg^{2+} 与 Hyp 摩尔比作图,如图 2(b) 所示. 从图中可以看出, Hyp 与 Mg^{2+} 配位后在 1.0 处有拐点,说明 Hyp 与 Mg^{2+} 的配位比为 $1:1$.



[Hyp] = $2.7\times 10^{-5}\text{ mol/L}$; [Mg^{2+}] = $0, 1.35\times 10^{-5}, 2.70\times 10^{-5}, 4.05\times 10^{-5}, 5.40\times 10^{-5}\text{ mol/L}$; $pH=7.10, T=298\text{ K}$

图 2 (a) Hyp 溶液中加入 Mg^{2+} 的 UV-Vis 光谱检测; (b) Hyp- Mg^{2+} 的摩尔曲线图

Fig. 2 (a) Absorption spectra change of Hyp by the addition of Mg^{2+} ; (b) the molar ratio of Mg^{2+} in (a)

2.2 紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱法是研究药物小分子与生物大分子相互作用的一种最简便的方法之一^[9]. 蛋白质与药物小分子结合后,蛋白质的特征吸收峰会出现红移或蓝移的现象,可根据峰形和峰位的变化来判断

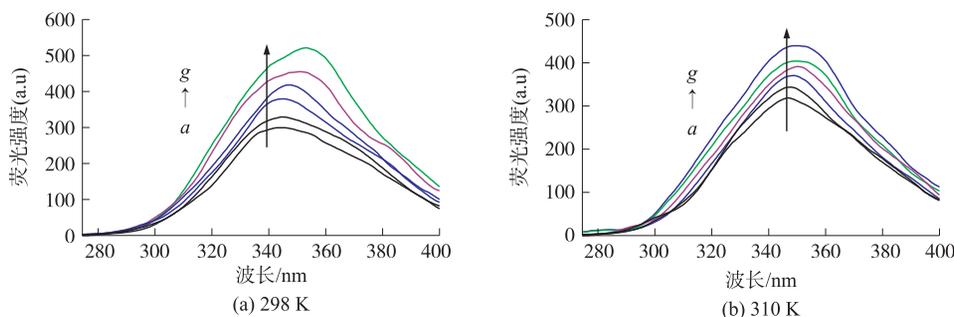
二者发生反应的情况. 如图 3 所示,在 240 nm ~ 320 nm 的光谱范围内,荧光素酶的最大吸收峰位于 276 nm 处. 随着药物浓度的增加,荧光素酶位于 276 nm 的吸收峰强度不断增大且发生红移,表明 Hyp-Mg²⁺ 与荧光素酶发生相互作用且使荧光素酶的分子构象发生变化.

2.3 荧光猝灭机制研究

2.3.1 稳态荧光分析

荧光光谱法是研究蛋白质与药物大分子间相互作用的重要手段之一. 蛋白质分子的内源荧光主要来自苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)和色氨酸(Trp)残基. 苯丙氨酸的量子产量低,酪氨酸易被相邻的氨基、羧基或色氨酸猝灭,所以

可利用色氨酸的荧光强度变化来研究药物与蛋白质间的相互作用^[10]. 此外,我们可以根据不同环境中药物小分子对蛋白质荧光的猝灭变化得到反应的结合常数、结合位点及相互作用力类型等信息. 图 4 为不同温度条件(298 K 和 310 K)下荧光素酶与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的荧光发射光谱. 由图可知,激发波长为 283 nm 时,荧光素酶的特征发射峰在 348 nm 处. 随着药物浓度的增大,348 nm 处的荧光发射峰不断增强且发生红移,说明 Hyp-Mg²⁺ 与荧光素酶发生相互作用且改变了荧光素酶的分子构象.



[Luc] = 1 × 10⁻⁶ mol/L; [Hyp-Mg²⁺] / (a-g) = 0, 1 × 10⁻⁶ mol/L, 2 × 10⁻⁶ mol/L, 3 × 10⁻⁶ mol/L, 4 × 10⁻⁶ mol/L, 5 × 10⁻⁶ mol/L, 6 × 10⁻⁶ mol/L; λ_{ex} = 283 nm, pH = 7.0

图 4 Luc 与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的荧光发射光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of Luc and Hyp-Mg²⁺

2.3.2 荧光猝灭机制

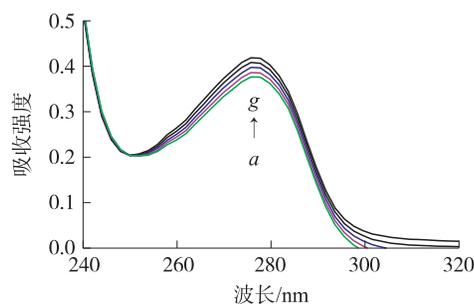
荧光猝灭分为静态猝灭和动态猝灭等不同类型. 静态猝灭是猝灭剂分子与荧光物质分子之间形成了新的非荧光复合物. 动态猝灭是猝灭剂分子与荧光分子的激发态分子之间相互碰撞而导致的荧光猝灭. 温度升高,扩散系数增大,双分子猝灭过程的速率常数 K_q 增大,猝灭常数 K_{sv} 增大,有利于发生动态猝灭,静态猝灭反之. 猝灭过程遵循 stern-volmer 方程^[9,11]:

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

式中, F_0 和 F 分别为猝灭剂加入前后荧光物质的荧光强度, K_{sv} 为猝灭常数, $[Q]$ 为猝灭剂的浓度, K_q 为双分子猝灭过程的速率常数,猝灭剂不存在时荧光分子的平均寿命 τ_0 为 10⁻⁸. 上述方程说明, F_0/F 与猝灭剂的浓度 $[Q]$ 呈线性关系,所得直线的斜率即为 K_{sv} ,并且能进一步求得 K_q . 图 5 为 Hyp-Mg²⁺ 对荧光素酶猝灭的 stern-volmer 曲线. 由图可知,猝灭常数 K_{sv} 随温度的升高而减小,根据低温有利于静态猝灭可知, Hyp-Mg²⁺ 对荧光素酶的猝灭过程为静态猝灭. 此外,由方程斜率求得 Hyp-Mg²⁺ 对荧光素酶猝灭的速率常数 K_q (见表 1),远大于各类猝灭剂对生物大分子猝灭的速率常数,说明生成了无荧光的复合物,证明以上猝灭属于非荧光复合物生成的静态猝灭.

2.3.3 结合常数(K_b)与结合位点数(n)

假设生物大分子中有 n 个等同且互不干扰的结合位点,则可推出下式^[12-15]:



[Luc] = 1 × 10⁻⁶ mol/L; [Hyp-Mg²⁺] / (a-g) = 0, 1/3 × 10⁻⁶ mol/L, 2/3 × 10⁻⁶ mol/L, 1 × 10⁻⁶ mol/L, 4/3 × 10⁻⁶ mol/L, 5/3 × 10⁻⁶ mol/L, 2 × 10⁻⁶ mol/L; pH = 7.0, T = 298 K

图 3 Luc 与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的紫外-可见吸收光谱

Fig. 3 UV-Vis absorption spectra of Luc and Hyp-Mg²⁺

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_b + n \log[Q]. \quad (2)$$

图 6 为不同温度下,以 $\log[(F_0 - F)/F]$ 对 $\log[Q]$ 的线性拟合曲线,曲线线性关系良好,由图可求得结合常数 K_b 和结合位点数 n . 计算结果见表 1.

表 1 不同温度下 Luc 与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的猝灭常数和结合参数

Table 1 The values of quenching constant and binding parameters of Luc and Hyp-Mg²⁺

温度/K	$K_{sv}/(10^5 \text{ L/mol})$	$K_q/(10^{13} \text{ L/mol})$	$K_b/(10^5 \text{ L/mol})$	n
298	1.65	1.65	3.13	1.2
310	1.02	1.02	4.20	0.96

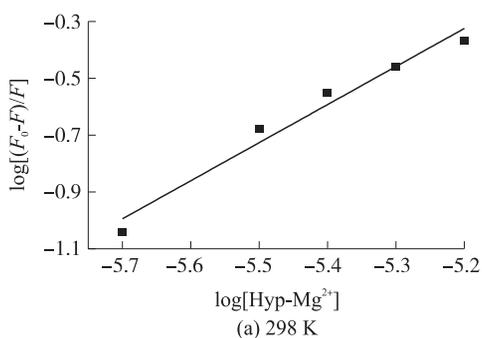


图 6 Hyp-Mg²⁺ 猝灭 Luc 的 $\log[(F_0 - F)/F]$ 对 $\log[Q]$ 的线性拟合曲线

Fig. 6 The relation between $\log[(F_0 - F)/F]$ and $1/\log[Q]$

2.3.4 热力学参数及相互作用力

药物小分子与生物大分子间的作用力类型有氢键、静电作用力、范德华力和疏水作用力等,可以根据反应前后热力学参数焓变 ΔH 和熵变 ΔS 的相对大小,判断药物小分子与生物大分子间的主要作用力类型^[16-18]. Nemethy 总结了热力学参数与作用力类型之间的一般规律: $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 时,主要是疏水作用力; $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 时,主要是氢键和范德华力; $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 时,主要是静电作用力. 温度变化不大时, ΔH 可看做一个常数. 其中,反应的自由能变 ΔG ,焓变 ΔH ,熵变 ΔS 均可由以下热力学方程求得^[9,11]:

$$\ln K_b = -(\Delta H/RT) + \Delta(S/R), \quad (3)$$

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

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

根据式(3)~式(5)可求得各热力学参数(见表 2). 从表中可以看出 $\Delta H < 0, \Delta S > 0$,说明二者之间的作用力主要是静电作用力.

2.4 同步荧光

同步荧光技术是在同时扫描激发和发射波长的情况下测绘的荧光光谱图. 当激发波长和发射波长的间距 $\Delta\lambda = 20 \text{ nm}$ 时,扫描所得的同步荧光光谱为蛋白质分子中酪氨酸的特征荧光峰,而 $\Delta\lambda = 80 \text{ nm}$ 时则为蛋白质分子中色氨酸的特征荧光峰^[19]. 为了进一步验证 Hyp-Mg²⁺ 的加入对荧光素酶酪氨酸和色氨酸的影响情况,固定荧光素酶的浓度,不断加入不同量的 Hyp-Mg²⁺,分别测量各体系的同步荧光光谱. 图 7 为荧光素酶分子中酪氨酸和色氨酸的同步荧光光谱图. 实验结果表明,加入 Hyp-Mg²⁺ 后,酪氨酸和色氨酸的荧光峰不断增强,说明 Hyp-Mg²⁺ 与荧光素酶的酪氨酸和色氨酸均发生反应. 此外,从图中可直观地看到,酪氨酸在 348 nm 处的特征发射峰发生明显红移,而色氨酸的峰形变化很小,表明 Hyp-Mg²⁺ 更易与荧光素酶的酪氨酸发生反应且改变了酪氨酸的分子构象.

2.5 时间分辨荧光光谱

时间分辨荧光光谱是区分静态猝灭与动态猝灭最准确的方法之一. 时间分辨荧光光谱是指激发光脉

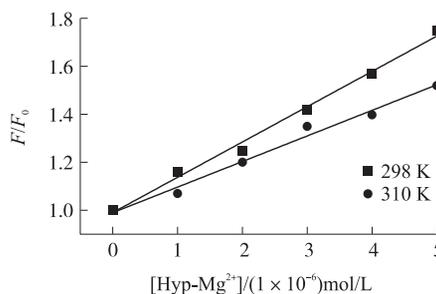


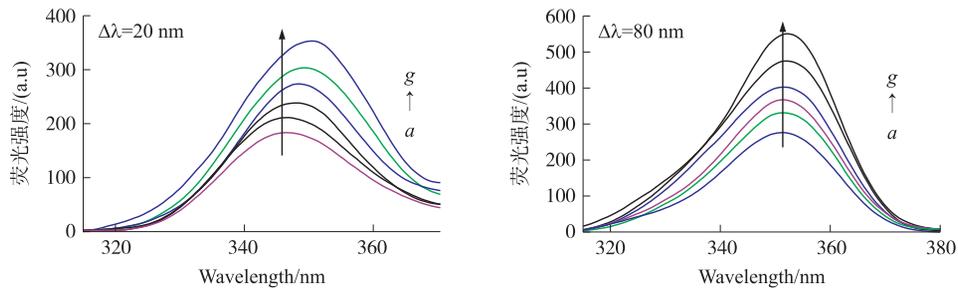
图 5 在不同温度下 Hyp-Mg²⁺ 对 Luc 猝灭的 Stern-Volmer 曲线

Fig. 5 The Stern-Volmer curves of Hyp-Mg²⁺ and Luc at different temperature

表 2 Luc 与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameters for interaction of Luc and Hyp-Mg²⁺

温度/K	$\Delta G/(kJ/mol)$	$\Delta H/(kJ/mol)$	$\Delta S/(J/(mol \cdot K))$
298	-19.9	-20.30	133
310	-21.5		



[Luc] = 1×10^{-6} mol/L; [Hyp-Mg²⁺] / (a-g) = 0, 1×10^{-6} mol/L, 2×10^{-6} mol/L, 3×10^{-6} mol/L, 4×10^{-6} mol/L, 5×10^{-6} mol/L, 6×10^{-6} mol/L; pH = 7.0, T = 298 K

图 7 Luc 与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的同步荧光光谱

Fig. 7 Synchronous fluorescence spectra of Luc and Hyp-Mg²⁺

冲截止后相对于激发光脉冲的不同延迟时刻所测得的荧光发射,反映了激发态电子的运动过程. 荧光寿命是指分子在单线激发态的平均停留时间,基于荧光寿命的测定可用来研究激发态的分子内或分子间的相互作用^[20-22]. 在磷酸盐缓冲溶液 (pH = 7.0) 中,激发波长为 283 nm 时,荧光素酶的时间分辨荧光衰减曲线如图 8 所示. 荧光素酶的荧光猝灭数据符合以下方程^[9,20]:

$$I(t) = \sum_{i=1}^3 \alpha_i \exp(-t/\tau_i), \quad (6)$$

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^3 f_i \tau_i, \quad (7)$$

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_{i=1}^3 \alpha_i \tau_i}. \quad (8)$$

从表 3 我们可以看到,荧光素酶的平均荧光寿命为 1.86 ns,向溶液中加入 Hyp-Mg²⁺后,体系的平均荧光寿命基本没有变化,表明荧光素酶与 Hyp-Mg²⁺的相互作用为静态猝灭过程. 以上实验结果与稳态荧光光谱实验结果一致.

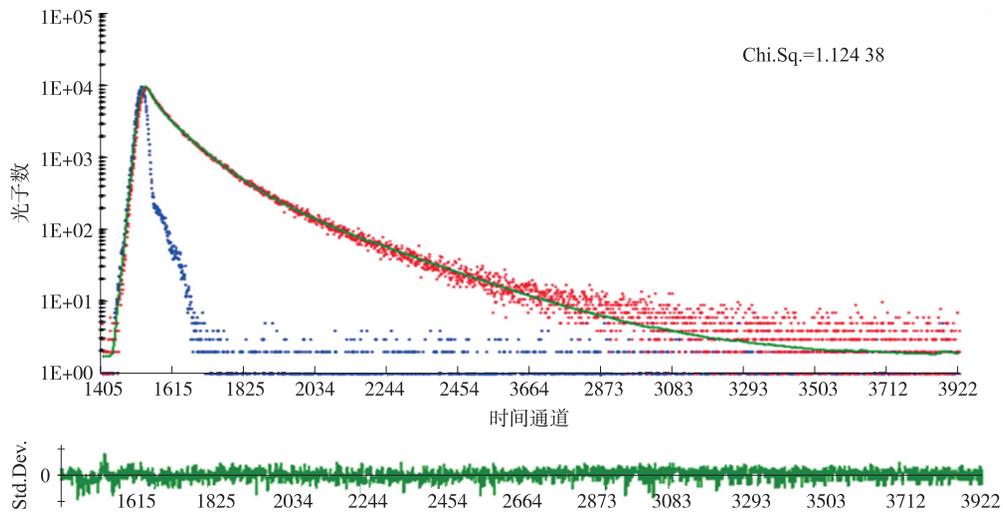


图 8 Luc 的时间分辨荧光衰减曲线

Fig. 8 Fluorescence profiles of pure Luc

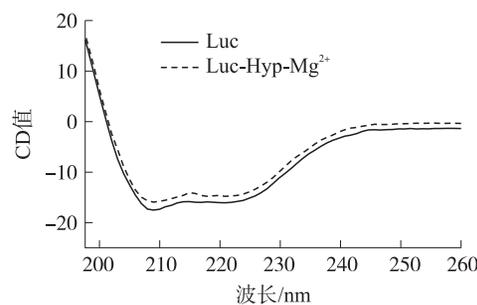
表 3 Luc 和 Luc-drug 复合体系的荧光寿命拟合值

Table 3 Fluorescence lifetimes of Luc and Luc-drug adducts

试样	C _{Drugs} / (μmol/L)	f ₁	f ₂	f ₃	τ ₁ / ns	τ ₂ / ns	τ ₃ / ns	⟨τ⟩ / ns
Luc	0.00	0.78	0.19	0.03	0.37	1.51	4.07	1.86
Luc-drug	5.00	0.16	0.81	0.02	1.74	0.45	3.54	1.78
Luc-drug	10.00	0.15	0.82	0.02	1.72	0.45	4.28	1.82

2.6 圆二色谱

圆二色谱(CD)是研究蛋白质构象、折叠的一种简单快捷的方法^[23-24]. 荧光素酶与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的 CD 曲线如图 9 所示. 从图中可以看到,在 190 nm 到 260 nm 的 CD 谱范围内,荧光素酶的 α -螺旋结构在 209 nm 和 222 nm 处出现两个负的特征峰. 209 nm 的负峰对应于 α -螺旋结构肽键的 $\pi-\pi^*$ 电子转移,215 nm 的负峰对应于 β -折叠,222 nm 的负峰对应于 α -螺旋和无规则卷曲的 $\pi-\pi^*$ 电子转移. 加入 Hyp-Mg²⁺ 后,209 nm 和 220 nm 的特征峰强度均有所降低,而 215 nm 的峰强度升高,并且 209 nm 和 222 nm 的负峰均向 209 nm~222 nm 的中间位置移动. 以上现象表明 Hyp-Mg²⁺ 的加入使荧光素酶的 α -螺旋结构部分转变为 β -折叠、 β -转角和无规律卷曲. 然而荧光素酶的峰型基本不变,表明 α -螺旋仍然占主导地位.



[Luc] = 1 × 10⁻⁷ mol/L; [Hyp-Mg²⁺] = 0.8 μmol/L; pH = 7.0, T = 298 K

图 9 Luc 与 Hyp-Mg²⁺ 相互作用的圆二色谱

Fig. 9 CD spectra of Luc and Hyp-Mg²⁺

表 4 CDNN 软件处理后得到的 Luc 二级结构各组分的含量变化

Table 4 Secondary structure of Luc from CD data using CDNN program

试样	C _{Drug} /(μmol/L)	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
Luc	0	45.2	14.8	15.0	25.1
Luc-Drug	0.8	44.1	15.1	15.2	27.0

3 结论

本文采用了紫外-可见光谱法、荧光光谱法、圆二色谱法等考察了荧光素酶与 Hyp-Mg²⁺ 的相互作用. 实验结果表明:Hyp-Mg²⁺ 与荧光素酶发生相互作用后,荧光素酶分子中 α -螺旋的含量减少,部分转变为 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲结构,但 α -螺旋仍占主导地位. 稳态荧光和时间分辨荧光表明,Hyp-Mg²⁺ 对荧光素酶的猝灭过程为生成非荧光复合物的静态猝灭. 上述结论显示荧光素酶与 Hyp-Mg²⁺ 两者之间虽然存在明显的相互作用,但该作用对荧光素酶的构象影响并不显著,预示荧光素酶的生物活性没有受到根本性的改变,即保留与荧光素作用后的发光性能. 这表明通过构建生物发光体系和光疗药物的共载给药体系,利用荧光素和荧光素酶相互作用产生的自发光来激发光疗药物,在临床治疗过程中无需外加激光光源的科研思路是可行的.

[参考文献]

[1] AGOSTINIS P, VANTIEGHEM A, MERLEVEDE W, et al. Hypericin in cancer treatment; more light on the way [J]. The international journal of biochemistry and cell biology, 2002, 34(3): 221-241.

[2] DURÁN N, SONG P S. Hypericin and its photodynamic action [J]. Photochemistry and photobiology, 1986, 43(6): 677-680.

[3] JONIOVA J, REBIČ M, STREJČKOVÁ A, et al. Formation of large hypericin aggregates in giant unilamellar vesicles—experiments and modeling [J]. Biophysical journal, 2017, 112(5): 966-975.

[4] CHEN E, CHEN X, YUAN X, et al. One-pot method to prepare a theranostic nanosystem with magnetic resonance imaging function and anticancer activity through multiple mechanisms [J]. Dalton Trans, 2017, 46(16): 5 151-5 158.

[5] TANAKA T, MATONO S, NAGANO T, et al. Photodynamic therapy for large superficial squamous cell carcinoma of the esophagus [J]. Gastrointestinal endoscopy, 2011, 73(1): 1-6.

[6] THEODOSSIOU T A, TSIOURVAS D, HOTHERSALL J S. Hypericin hydroquinone: potential as a red-far red photosensitizer [J]. Photochemistry and photobiology, 2010, 86(1): 18-22.

[7] ANDREU N, ZELMER A, SAMPSON S L, et al. Rapid in vivo assessment of drug efficacy against mycobacterium tuberculosis using an improved firefly luciferase [J]. J antimicrob chemother, 2013, 68(9): 2 118-2 127.

- [8] EBRAHIMI M, HOSSEINKHANI S, HEYDARI A, et al. Improvement of thermostability and activity of firefly luciferase through [TMG][Ac] ionic liquid mediator[J]. *Appl biochem biotechnol*, 2012, 168(3):604–615.
- [9] XIAO M, YUAN X, XIE W, et al. Comparison of 9-hydroxy-artemisinin with artemisinin; interaction with bovine hemoglobin[J]. *Journal of luminescence*, 2015, 160:188–194.
- [10] SEO P Y, POLOVKA M, LETICIA M A A, et al. Fluorescence studies by quenching and protein unfolding on the interaction of bioactive compounds in water extracts of Kiwi fruit cultivars with human serum albumin[J]. *Journal of luminescence*, 2015, 160:71–77.
- [11] XIAO M, HAN L, ZHOU L, et al. Comparison and investigation of bovine hemoglobin binding to dihydroartemisinin and 9-hydroxy-dihydroartemisinin; spectroscopic characterization[J]. *Spectrochim Acta a Mol Biomol Spectrosc*, 2014, 125:120–125.
- [12] MAKARSKA B M, BOROWSKI P. Fluorescence quenching behaviour of uric acid interacting with water-soluble cationic porphyrin[J]. *Journal of luminescence*, 2015, 160:110–118.
- [13] CHEN D, XIE J, WU Q, et al. Interaction and sonodynamic damage activity of acridine red (AD-R) to bovine serum albumin (BSA) [J]. *Journal of luminescence*, 2015, 160:245–253.
- [14] ROY D, DUTTA S, MAITY S S, et al. Spectroscopic and docking studies of the binding of two stereoisomeric antioxidant catechins to serum albumins[J]. *Journal of luminescence*, 2012, 132(6):1 364–1 375.
- [15] CHAKRABORTY S, CHAUDHURI S, PAHARI B, et al. A critical study on the interactions of hesperitin with human hemoglobin; fluorescence spectroscopic and molecular modeling approach[J]. *J Lumin*, 2012, 132(6):1 522–1 528.
- [16] SUBRAMANYAM R, GOUD M, SUDHAMALLA B, et al. Novel binding studies of human serum albumin with trans-feruloyl maslinic acid[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2009, 95(2):81–88.
- [17] CAI H H, YANG P H, CAI J Y. Binding of artemisinin to holotransferrin; Electrochemical and spectroscopic characterization[J]. *Journal of electroanalytical chemistry*, 2008, 619–620:59–64.
- [18] WANG C X, YAN F F, ZHANG Y X, et al. Spectroscopic investigation of the interaction between rifabutin and bovine serum albumin[J]. *Journal of photochemistry and photobiology a:chemistry*, 2007, 192(1):23–28.
- [19] TANG J, ZHOU L, WANG W, et al. A new dual fluorescent probe preparation and its biodiagnose function in vitro[J]. *Journal of luminescence*, 2012, 132(6):1 325–1 328.
- [20] MA F, HUANG H Y, ZHOU L, et al. Study on the conformation changes of Lysozyme induced by Hypocrellin A; the mechanism investigation[J]. *Spectrochim Acta a Mol Biomol Spectrosc*, 2012, 97:1 159–1 165.
- [21] DEEPA H R, THIPPERUDRAPPA J, SURESH K H M. A study on fluorescence quenching of LD-425 by aromatic amines in 1,4-dioxane-acetonitrile mixtures[J]. *Journal of luminescence*, 2012, 132(6):1 382–1 388.
- [22] ZHOU J, WU X, GU X, et al. Spectroscopic studies on the interaction of Hypocrellin A and hemoglobin[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2009, 72(1):151–155.
- [23] SARZEHI S, CHAMANI J. Investigation on the interaction between tamoxifen and human holo-transferrin; determination of the binding mechanism by fluorescence quenching, resonance light scattering and circular dichroism methods[J]. *Int J Biol Macromol*, 2010, 47(4):558–569.
- [24] SUBRAMANYAM R, GOLLAPUDI A, BONIGALA P, et al. Betulinic acid binding to human serum albumin; a study of protein conformation and binding affinity[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2009, 94(1):8–12.

[责任编辑:顾晓天]