

光谱法联合分子对接研究邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白的相互作用

付 晨^{1,2} 黄 群^{1,2}

(1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵州 贵阳 550025;

2. 贵州省生态食品创制工程研究中心, 贵州 贵阳 550025)

摘要: [目的] 运用多光谱分析和分子对接技术探究邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 与卵白蛋白 (OVA) 的相互作用机理。[方法] 利用 Stern-Volmer 方程, 研究 DEP 对 OVA 的荧光猝灭机理及两者之间的结合常数与结合位点数, 并通过热力学参数确定二者相互作用的主要作用力类型, 根据 Förster 非辐射能量转移理论, 得出二者之间的能量转移效率和结合距离。利用分子对接考察了 DEP 与 OVA 之间的相互作用力。[结果] DEP 可静态猝灭 OVA 内源荧光。25~45 °C 时, 结合常数 (K) 由 2.631×10^8 L/mol 降至 1.072×10^8 L/mol, DEP 与 OVA 之间有 1~2 个主要结合位点。热力学分析表明, 二者通过静电作用自发结合。荧光共振能量转移参数 ($J=1.316 \times 10^{-13}$ cm³·L/mol, $R_0=3.665$ nm, $E=0.735$, $r=3.091$ nm) 证实其强结合。紫外—可见光谱分析表明, DEP 与 OVA 结合形成基态复合物。分子对接模拟显示, DEP 与 OVA 通过氢键、范德华力及疏水作用结合, 形成的复合物结构稳定。[结论] DEP 可静态猝灭 OVA 内源荧光, 二者通过静电作用自发形成 1~2 个结合位点的稳定基态复合物, 结合距离为 3.091 nm, 能量转移效率为 0.735。复合物结构稳定性主要由氢键、范德华力及疏水作用维持。

关键词: 荧光光谱; 紫外吸收光谱; 邻苯二甲酸二乙酯; 卵白蛋白; 相互作用; 分子对接

Investigation of the interaction between diethyl phthalate and ovalbumin via spectroscopic techniques and molecular docking

FU Chen^{1,2} HUANG Qun^{1,2}

(1. School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Guizhou Province Engineering Research Center of Health Food Innovative Manufacturing, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: [Objective] To explore the interaction mechanism between diethyl phthalate (DEP) and ovalbumin (OVA) using multispectral analysis and molecular docking techniques. [Methods] The Stern-Volmer equation is applied to study the fluorescence quenching mechanism of OVA by DEP, as well as to determine the binding constants and the number of binding sites between them. Thermodynamic parameters are used to identify the primary types of interaction forces. Based on Förster's non-radiative energy transfer theory, the energy transfer efficiency and binding distance between DEP and OVA are calculated. Molecular docking simulations are used to investigate the interaction forces between DEP and OVA. [Results] DEP can statically quench the intrinsic fluorescence of OVA. At temperatures ranging from 25 to 45 °C, the binding constant (K) decreases from 2.631×10^8 L/mol to 1.072×10^8 L/mol, with 1~2 major binding sites identified between DEP and OVA. Thermodynamic analysis suggests that the interaction occurs spontaneously through electrostatic forces. Fluorescence resonance energy transfer parameters ($J=1.316 \times 10^{-13}$ cm³·L/mol, $R_0=3.665$ nm, $E=0.735$, $r=3.091$ nm) confirms the strong binding. UV-Vis spectroscopy shows that DEP and OVA form a ground-state complex. Molecular docking simulations demonstrate

基金项目: 国家自然科学基金地区基金 (编号: 32260597); 贵州省自然科学基金重点项目 (编号: KY [2022] 重点 036)

通信作者: 黄群 (1977—), 男, 贵州医科大学教授, 博士。E-mail: huangqunlaoshi@126.com

收稿日期: 2025-02-23 **改回日期:** 2025-05-30

引用格式: 付晨, 黄群. 光谱法联合分子对接研究邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白的相互作用[J]. 食品与机械, 2025, 41(7): 1-8.

Citation: FU Chen, HUANG Qun. Investigation of the interaction between diethyl phthalate and ovalbumin via spectroscopic techniques and molecular docking[J]. Food & Machinery, 2025, 41(7): 1-8.

that DEP binds to OVA through hydrogen bonds, van der Waals forces, and hydrophobic interactions, resulting in a stable complex structure. [Conclusion] DEP can statically quench the intrinsic fluorescence of OVA. The two molecules spontaneously form a stable ground-state complex with 1~2 binding sites, a binding distance of 3.091 nm, and an energy transfer efficiency of 0.735. The stability of the complex structure is primarily maintained by hydrogen bonds, van der Waals forces, and hydrophobic interactions.

Keywords: fluorescence spectroscopy; ultraviolet absorption spectrum; diethyl phthalate; ovalbumin; interaction; molecular docking

邻苯二甲酸酯类化合物(PAEs),又称酞酸酯,是一类脂溶性塑化剂。这类化合物可通过物理作用与聚氯乙烯(PVC)等聚合物结合,并易受温度、使用时间和pH值等环境因素影响而释放^[1]。其中,邻苯二甲酸二乙酯(DEP)是一种典型的PAEs化合物^[2],其分子结构特征为苯环1,2位上的2个乙酯基团($-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)对称分布。这种结构虽然赋予了DEP良好的塑化性能,但也导致其容易从塑料制品中迁移至环境介质,并通过食物链在生物体内富集。研究表明,DEP不仅会造成环境污染^[3],还会对人体神经系统产生毒性作用,甚至具有一定潜在致癌风险^[4]。

近年来,关于PAEs检测及其与生物系统的相互作用机制研究取得了重要进展。Cheng等^[5]采用多光谱方法结合分子对接研究了羧酸酯酶(PS06828)与邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的相互作用;Guan等^[6]利用多光谱技术和分子对接技术研究了PAEs对CAT酶活性的影响及相互作用机制。这些研究为深入理解PAEs的生物效应奠定了基础。蛋白质作为生命功能的主要载体,探索其与小分子物质的相互作用具有重要的研究意义。特别是在食品安全、药物运输和生物模拟等领域,蛋白质—小分子复合物具有广泛的应用价值^[7]。

卵白蛋白(OVA)是蛋清中的主要蛋白质组分,由385个氨基酸组成,其中疏水性氨基酸占比超过50%^[8-9]。由于其独特的两亲性和高消化吸收率,OVA不仅具有重要的营养价值,还被认为是潜在的生物活性物质载体^[10]。研究表明,小分子与蛋白质相互作用既能提高小分子活性物质的生物利用度^[11],又能改善蛋白质的功能特性并降低其致敏性^[12]。因此,为更全面阐明小分子的转运和代谢过程、揭示蛋白质与生物活性小分子之间的相互作用机制,多角度探究蛋白质与药物相互作用具有重要的理论和应用价值^[13]。

研究拟采用多光谱分析技术结合分子对接方法,系统研究DEP与OVA的相互作用机制、热力学参数以及结合位点特征,以期阐明蛋清中塑化剂的结合形式,为解决鸡蛋塑化剂污染问题提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

OVA:纯度80%,西格玛奥德里奇(上海)贸易有限

公司;

DEP:纯度99.67%,上海毕得医药科技有限公司;

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、无水乙醇:分析纯,天津市致远化学试剂有限公司;

氯化钠:分析纯,天津市丰川科技有限公司;

三(羟甲基)氨基甲烷:超纯级,北京索莱宝科技有限公司;

试验用水为超纯水。

1.1.2 主要仪器与设备

荧光分光光度计:F97Pro型,上海棱光技术有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-1700SPC型,上海美析仪器有限公司;

数显式电热恒温水浴锅:XMTD-204型,上海跃进医疗器械有限公司;

超声波清洗器:KQ-500DE型,昆山美美超声仪器有限公司;

分析天平:FA2004B型,上海天美天平仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制

(1) 卵白蛋白储备液:用pH 8.4的Tris-HCl缓冲液(缓冲液中含0.01 mol/L NaCl)配制为 1.0×10^{-5} mol/L的溶液,于2~4℃冰箱冷藏保存。

(2) 邻苯二甲酸二乙酯乙醇储备液:用无水乙醇配成 1.0×10^{-3} mol/L的溶液,并在避光环境中贮藏。

1.2.2 测定不同温度下DEP-OVA的荧光光谱 将一定量的DEP乙醇储备液按顺序加入到3组10 mL具塞比色管中,每组9支,待乙醇完全挥发后,按顺序加入一定量的OVA储备液,用pH为7.4的缓冲液稀释溶液,并定容至刻度线,使得比色管内OVA的浓度为 1.6×10^{-7} mol/L,DEP浓度依次调整为0, 1.0×10^{-6} , 2.0×10^{-6} , 3.0×10^{-6} , 4.0×10^{-6} , 5.0×10^{-6} , 6.0×10^{-6} , 7.0×10^{-6} , 8.0×10^{-6} mol/L,超声5 min后,分别在25, 35, 45℃下恒温水浴2 h,然后固定激发波长,扫描试样的荧光光谱^[14]。激发波长为280 nm,激发和发射双缝部分的总宽度分别为10, 5 nm。扫描速率为1 000 nm/min,扫描间距为1 nm,扫描范围300~500 nm。

1.2.3 测定不同pH下DEP-OVA的荧光光谱 将一定量的DEP乙醇储备液按顺序加入到3组10 mL具塞比色管

中,每组9支,待乙醇完全挥发后,按顺序加入一定量的OVA储备液,分别用pH值为5.8,7.4,8.5的缓冲液稀释溶液,并定容至刻度线,使得比色管内OVA的浓度为 1.6×10^{-7} mol/L,DEP浓度依次调整为 $0, 1.0 \times 10^{-6}, 2.0 \times 10^{-6}, 3.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6}, 5.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 7.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}$ mol/L,超声5 min后,在35℃下恒温水浴2 h,然后固定激发波长为280 nm,扫描范围300~500 nm^[15]。

1.2.4 测定DEP-OVA的结合距离 取3支10 mL具塞比色管,第1支加入一定量的OVA,用pH值为7.4的缓冲液稀释溶液,并定容至刻度线,使得比色管内OVA的浓度为 1.6×10^{-7} mol/L,第2支加入一定量的DEP乙醇储备液,待乙醇完全挥发后,用pH值为7.4的缓冲液稀释溶液,并定容至刻度线,使得比色管内DEP的浓度为 1.6×10^{-7} mol/L,第3支分别加入一定量DEP与OVA,用pH值为7.4的缓冲液稀释溶液,并定容至刻度线,使得比色管内DEP、OVA的浓度均为 1.6×10^{-7} mol/L;3支比色管分别超声5 min混匀后,室温静置2 h,第1支和第3支比色管固定激发波长280 nm,在300~500 nm范围内扫描试样的荧光光谱。第2支比色管在300~500 nm范围内扫描试样的紫外—可见吸收光谱^[16]。

利用Förster偶极—偶极非辐射能量转移理论^[17],按式(1)~式(3)计算DEP与OVA之间的能量转移效率 E 及结合距离 r 。

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

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} k^2 n^{-4} \varphi J, \quad (2)$$

$$J = [\sum F(\lambda) \epsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda] / [\sum F(\lambda) \Delta\lambda], \quad (3)$$

式中:

E ——能量转移效率;

F_0, F ——DEP添加前后OVA的荧光强度;

R_0 ——Förster临界距离, nm;

r ——结合距离, nm;

k^2 ——偶极空间取向因子;

n ——介质折射指数;

φ ——OVA色氨酸残基荧光量子产率;

J ——荧光体的发射光谱和受体的紫外—可见吸收光谱间的重叠积分, $\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$;

$F(\lambda)$ ——OVA在波长 λ 处的荧光强度;

$\epsilon(\lambda)$ ——DEP在波长 λ 处的摩尔消光系数, $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 。

1.2.5 测定DEP-OVA的紫外—可见吸收光谱 将一定量的DEP乙醇储备液按顺序加入到9支10 mL具塞比色管中,待乙醇完全挥发后,按顺序加入一定量的OVA储备液,用pH值为7.4的缓冲液稀释溶液,并定容至刻度线,使得比色管内OVA的浓度为 1.6×10^{-7} mol/L,DEP浓度依次为 $0, 1.0 \times 10^{-6}, 2.0 \times 10^{-6}, 3.0 \times 10^{-6}, 4.0 \times 10^{-6},$

$5.0 \times 10^{-6}, 6.0 \times 10^{-6}, 7.0 \times 10^{-6}, 8.0 \times 10^{-6}$ mol/L,超声5 min后,室温静置2 h,在250~300 nm范围内扫描试样的紫外—可见吸收光谱^[18]。

1.2.6 分子对接 使用RCSB蛋白质数据库(PDB ID: 1UHG)确定了OVA的三维结构,而DEP(CID:6781)的三维结构则通过PubChem数据库获得。OVA与配体(DEP)之间的相互作用使用Auto Dock 4.2软件(美国加利福尼亚州圣迭戈)进行对接,并基于最小化对接能量的原则,通过遗传算法优化其构象。受体OVA与配体之间的立体和平面相互作用则通过Pymol软件(美国加利福尼亚州圣卡洛斯)进行分析^[19-20]。

1.2.7 统计分析 每个试验设计3次平行,结果以平均值±标准差表示。使用IBM SPSS Statistics 27($P < 0.05$)进行单因素方差分析,使用Origin 2021软件对试验数据进行处理分析并作图。

2 结果与讨论

2.1 DEP对OVA内源性荧光猝灭的影响

OVA中酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)和苯丙氨酸(Phe)的芳香族氨基酸具有内源性荧光,小分子在与它们相互作用的过程中可以猝灭其荧光强度,导致蛋白质的构象和微环境发生变化^[21]。OVA单链中有3个色氨酸残基和10个酪氨酸残基。当OVA and DEP相互作用时,这些残基可用作内部荧光自由基,提供关于构象变化的信息^[22]。如图1所示,在35℃、pH 7.4的条件下测定DEP与OVA相互作用的荧光猝灭光谱,随着DEP浓度的增加,OVA的内源性荧光强度逐渐减弱,荧光峰伴有轻微的蓝移。然而,峰形并未显著改变,表明OVA发色团的微环境发生了变化,且DEP与OVA发生了相互作用^[23]。

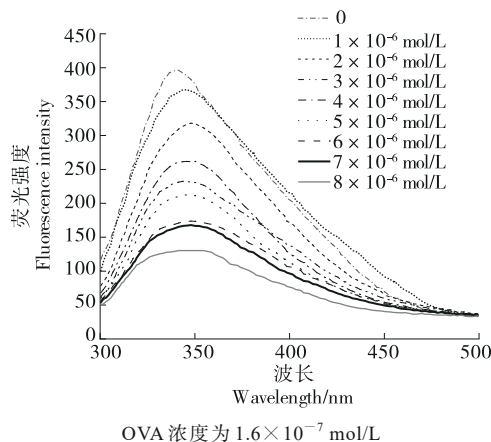


图1 不同浓度邻苯二甲酸二乙酯作用下卵白蛋白的荧光光谱

Figure 1 Fluorescence spectrum of ovalbumin treated with diethyl phthalate at different concentrations.

2.2 温度对 DEP-OVA 荧光强度的影响

小分子与蛋白质间发生相互作用的猝灭类型分为动态猝灭和静态猝灭^[24]。其中,动态猝灭是由于激发态荧光分子与猝灭剂分子相互扩散和碰撞而引起的荧光强度降低的一种表现形式,而静态猝灭是由于荧光团与猝灭剂分子结合形成无荧光复合物,从而引起荧光体荧光强度减弱的一种表现形式^[25]。

假定 DEP 和 OVA 的猝灭是动态猝灭,则两者的关系符合 Stern-Volmer 方程^[26]:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q], \quad (4)$$

式中:

F_0, F ——DEP 添加前后 OVA 的荧光强度;

K_q ——该猝灭体系的速率常数, $L/(mol \cdot s)$;

τ_0 ——不使用猝灭剂时荧光体的荧光寿命,对于生物大分子 $\tau_0 = 10^{-8} s$;

$[Q]$ ——猝灭剂浓度, mol/L ;

K_{sv} ——Stern-Volmer 猝灭常数, L/mol 。

当 DEP 与 OVA 的猝灭类型为静态猝灭时,两者的关系符合 Lineweaver-Bruk 双倒数方程^[27]:

$$\lg[(F_0 - F)/F] = \lg K + n \lg [Q], \quad (5)$$

式中:

F_0, F ——DEP 添加前后 OVA 的荧光强度;

$[Q]$ ——猝灭剂浓度, mol/L ;

K ——结合常数, L/mol ;

n ——结合位点数。

假定 DEP 与 OVA 的猝灭类型为动态猝灭,那么按照式(4),以不同温度下的 F_0/F 对 $[Q]$ 作图,由线性斜率求出 DEP 对 OVA 的猝灭速率常数(表 1)。结果表明:DEP 与 OVA 反应的 K_{sv} 均随着温度的上升而下降,且 K_q 值都远大于各类猝灭剂对生物大分子在动态猝灭中的最大扩散碰撞猝灭常数 $2 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)$ 。由此可以推断,DEP 对 OVA 的猝灭并非分子碰撞而导致的动态猝灭,而是由于 DEP 和 OVA 二者之间相互作用产生了新的复合物所导致的静态猝灭。

在 pH 7.4 条件下,分别测定了不同温度(25, 35, 45 °C)下 OVA 的荧光光谱,并绘制了不同温度下的 Stern-

表 1 不同温度下邻苯二甲酸二乙酯对卵白蛋白的猝灭常数

Table 1 Quenching constants of diethyl phthalate on ovalbumin at different temperatures

温度/°C	K_{sv} 值/($10^4 L \cdot mol^{-1}$)	K_q 值/($10^{12} L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$)
25	4.137	4.137
35	3.205	3.205
45	2.365	2.365

Volmer 曲线,如图 2 所示。根据式(4),可以从表 1 中获得 3 种不同温度条件下的 K_{sv} 和 K_q 值。从图 2 和表 1 可以看出,在 3 个温度下, F_0/F 和 $[Q]$ 之间存在着良好的线性关系。随着温度的升高,3 条直线的斜率逐渐减小。根据表 1 的分析可以得出, K_{sv} 和 K_q 值与温度呈负相关。 K_q 值约为 $10^{12} L/(mol \cdot s)$,远高于各种猝灭剂对单体聚合物的最大碰撞反应速率常数 $[2 \times 10^{10} L/(mol \cdot s)]$ ^[28]。这些结果表明,DEP-OVA 复合物是通过静态猝灭而非因碰撞引起的动态猝灭形成的。

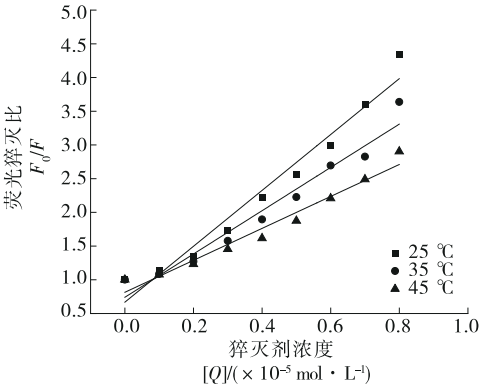


图 2 不同温度下邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白作用的 Stern-Volmer 曲线

Figure 2 Stern-Volmer curves of interaction between diethyl phthalate and ovalbumin at different temperatures

2.3 pH 对 DEP-OVA 荧光强度的影响

分别测定了不同 pH(5.8, 7.4, 8.4)下 OVA 的荧光光谱,并绘制了不同 pH 下的 Stern-Volmer 曲线。由图 3 可知, pH 5.8 时 DEP 的直线斜率最大, pH 7.4, 8.4 时差异较

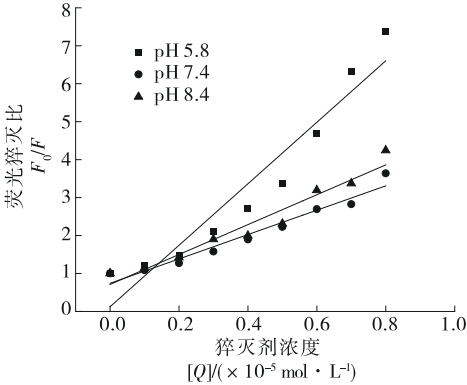


图 3 不同 pH 下邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白作用的 Stern-Volmer 曲线

Figure 3 Stern-Volmer curves of interaction between diethyl phthalate and ovalbumin at different pH values

小。在酸性条件下,卵白蛋白的净电荷变为正电性(质子化氨基增多),导致其三维结构发生部分解折叠或构象松弛,暴露出更多的疏水区域或结合位点(如疏水口袋或芳香残基),这种构象变化可能增强 DEP 的相互作用^[29]。由此可得,DEP 与 OVA 在酸性条件下更易结合。

2.4 DEP 与 OVA 结合常数及结合位点数

由温度及 pH 对 DEP-OVA 荧光强度的影响结果可以得出,DEP 与 OVA 的猝灭机制是静态猝灭,可以用式(5)来表示。

利用 $\lg[(F_0-F)/F]$ 在不同温度下对 $\lg[Q]$ 进行绘图(图4),由线性截距和斜率可得 DEP 与 OVA 作用的结合常数 K 和结合位点数 n (表2)。

由图4可知,在温度为 25, 35, 45 °C 的条件下,DEP 与 OVA 的结合常数分别为 2.631×10^8 , 1.725×10^8 , 1.072×10^8 L/mol; 结合位点分别为 1.552, 1.538, 1.523, 表明 DEP 与 OVA 之间有 1~2 个主要结合位点。试验结果显示,随着温度的增加,DEP 与 OVA 的结合常数降低,表明 DEP

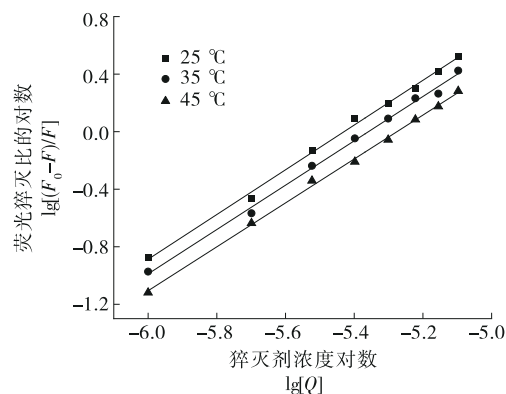


图4 不同温度下的 $\lg[(F_0-F)/F]$ 对 $\lg[Q]$ 的曲线
Figure 4 $\lg[(F_0-F)/F]$ versus $\lg[Q]$ curves at different temperatures

与 OVA 相互作用形成了复合物,这进一步说明,DEP 与 OVA 的猝灭是静态的。此外,DEP 与 OVA 的结合常数 K 的数量级为 10^8 ,表明二者的结合作用是非常强烈的。

表2 不同温度下邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白作用的结合常数与结合位点数

Table 2 Binding constants and number of binding sites of diethyl phthalate and ovalbumin at different temperatures

温度/°C	方程	R^2	$K/(10^8 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n
25	$\lg[(F_0-F)/F] = 8.420 + 1.552 \lg[Q]$	0.997	2.631	1.552
35	$\lg[(F_0-F)/F] = 8.237 + 1.538 \lg[Q]$	0.996	1.725	1.538
45	$\lg[(F_0-F)/F] = 8.030 + 1.523 \lg[Q]$	0.998	1.072	1.523

2.5 DEP-OVA 作用力类型的确定

蛋白质与配体之间的主要结合强度包括氢键、范德华力、疏水力和静电作用力^[30],当反应温度没有明显改变时,焓变(ΔH)可以被视为一个恒量,是一个常数。基于 Ross 等^[31]对生物大分子与小分子反应的热力学原理进行归纳:熵变(ΔS) >0 ,DEP 与 OVA 的作用类型可能是疏水和静电作用力; $\Delta S < 0$,DEP 与 OVA 的作用类型可能为氢键和范德华力; $\Delta H > 0$ 且 $\Delta S > 0$,DEP 与 OVA 的作用类型为典型的疏水作用力; $\Delta H < 0$ 且 $\Delta S < 0$,DEP 与 OVA 的作用类型为氢键和范德华力; $\Delta H \approx 0$ 或较小且 $\Delta S > 0$,DEP 与 OVA 的作用类型为典型的静电作用力。反应的 ΔH 和 ΔS 可以由式(6)和式(7)所描述的 van't Hoff 方程^[32]求得。

$$\ln K = -(1/T)(\Delta H/R) + (\Delta S/R), \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (7)$$

式中:

K ——结合常数, L/mol;

R ——大气常数, J/(mol·K);

ΔH ——焓变, J/mol;

ΔS ——熵变, J/(mol·K);

T ——温度, K;

ΔG ——吉布斯自由能变, J/mol。

以 $\ln K$ 对 $1/T$ 作图,用直线斜率、直线截距分别求出 ΔH 、 ΔS 。如表3所示,DEP 和 OVA 之间的相互作用过程中 $\Delta H < 0$, 而 $\Delta S > 0$, 说明 DEP 与 OVA 结合的作用力主要为疏水和静电作用力,但不能排除氢键作用力的存在。此外, $\Delta G < 0$ 且随温度的升高而降低,表明结合是一个自发的吉布斯自由能降低的过程^[33]。

2.6 DEP-OVA 结合距离的计算

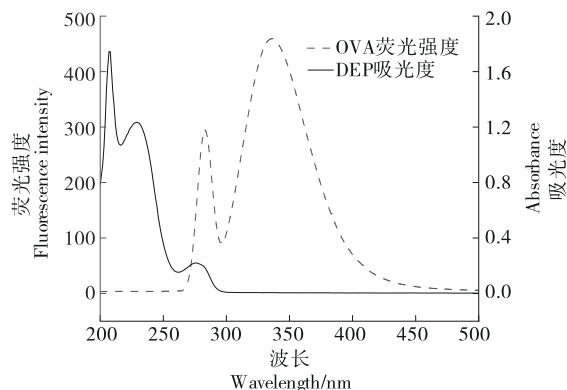
利用 DEP 紫外吸收光谱与 OVA 的荧光光谱,得到重叠曲线(图5),由式(3)求出两光谱重叠区域的重叠积分

表3 不同温度下邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白作用的热力学参数

Table 3 Thermodynamic parameters of the interaction between diethyl phthalate and ovalbumin at different temperatures

温度/°C	$\Delta H/$ (kJ·mol ⁻¹)	$\Delta S/$ (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	$\Delta G/$ (kJ·mol ⁻¹)
25	-406.428	145.246	-4 037.566
35	-406.428	145.246	-5 490.021
45	-406.428	145.246	-6 942.476

$J=1.316 \times 10^{-13} \text{ cm}^3 \cdot \text{L/mol}$, 代入式(2)求出临界距离 $R_0=3.665 \text{ nm}$, 再由式(1)求出能量转移效率 $E=0.735$, DEP 与 OVA 的结合距离 $r=3.091 \text{ nm}$ 。 $r < 7 \text{ nm}$, $0.5R_0 < r < 1.5R_0$, 结果表明: DEP 与 OVA 之间的猝灭过程与非辐射能量转移原理相一致。



OVA、DEP 浓度均为 $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

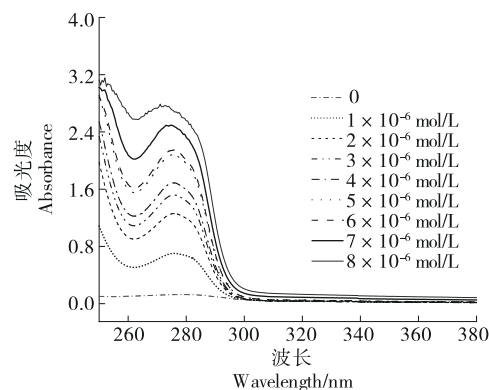
图 5 OVA 的荧光光谱和 DEP 的紫外吸收光谱重叠图
Figure 5 Overlap of fluorescence spectrum of OVA and UV absorption spectrum of DEP

2.7 DEP-OVA 紫外吸收光谱

图 6 展示了 OVA 和 DEP-OVA 复合物的紫外一可见吸收光谱, 在 278 nm 处, 所有光谱呈现芳香氨基酸的不同吸收峰, 这归因于色氨酸和酪氨酸的存在^[34]。加入 DEP 后, OVA 的吸光度逐渐升高, 并有轻微的蓝移。吸光度的增加是由于 DEP 与 OVA 之间的相互作用主要发生在芳香氨基酸残基附近^[35]。芳香氨基酸残基微环境对水分子的亲和力较低导致了蓝移。这种增色效应和蓝移现象表明 DEP 与 OVA 之间存在相互作用, 并形成了基态复合物。

2.8 分子对接

为了探索 DEP 与 OVA 在分子水平上的相互作用, 通过 AutoDock 4.2 进行了分子对接。随后, 从对接结果中



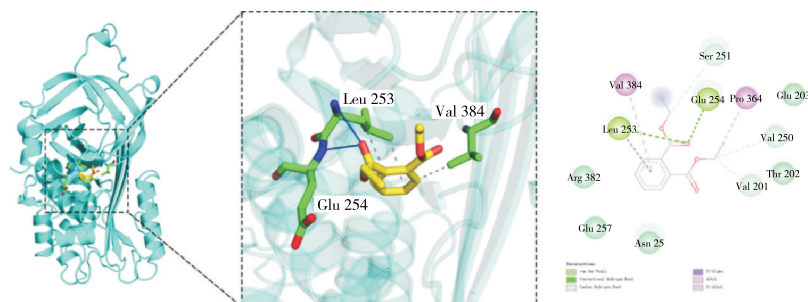
OVA 浓度为 $1.6 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

图 6 邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白作用的紫外吸收光谱
Figure 6 UV absorption spectrum of the interaction between diethyl phthalate and ovalbumin

选择了最优结果, 如图 7(a)所示。结合二维图[图 7(c)]和三维图[图 7(b)], 发现 DEP 被 12 个残基包围, 形成了蛋白质的结合口袋。DMP 嵌入了 OVA (Leu253、Glu254、Val384) 的疏水氨基酸位点, 这些位点隐藏在蛋白质内部, 形成了一个疏水腔。Val201、Val250、Ser251、Leu253 和 Glu254 与 DEP 形成了氢键相互作用。Val384 和 Pro364 与 DEP 形成了疏水相互作用。此外, Asn25、Val201、Thr202、Glu203、Val250、Ser251、Leu253、Glu254、Glu257 和 Arg382 通过范德华力与 DEP 相互作用。通过这些不同的作用力, DEP 和 OVA 进一步形成了稳定的复合物。研究表明, 除氢键相互作用外, 疏水相互作用对维持 DEP-OVA 复合物的稳定性同样具有重要贡献。这一发现与 DEP-OVA 复合物作用力类型的测定结果相吻合。需要指出的是, 氢键本质上属于一类具有方向性的特殊静电相互作用^[36]。这表明蛋白质和小分子的结合通常是多种力量共同作用的结果, 与 2.5 的结论一致。

3 结论

邻苯二甲酸二乙酯和卵白蛋白基于非共价键结合生成复合物, 致使蛋白质固有荧光发生猝灭, 这一现象与静



(a) DEP 和 OVA 的最佳构象 (b) DEP 和 OVA 结合位点的三维图 (c) DEP 和 OVA 相互作用残基的二维图

图 7 DEP 与 OVA 分子对接的结果

Figure 7 Results of molecular docking between DEP and OVA

态猝灭机理相一致。随着温度升高,猝灭水平逐渐下降。根据热力学参数,邻苯二甲酸二乙酯和卵白蛋白的结合满足了吉布斯自由能降低的自发过程。紫外—可见吸收光谱分析揭示了邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白的相互作用,并表明邻苯二甲酸二乙酯对卵白蛋白的猝灭类型为静态猝灭。通过分子对接模拟发现,邻苯二甲酸二乙酯和卵白蛋白通过氢键、范德华力和疏水相互作用形成复合物,邻苯二甲酸二乙酯—卵白蛋白复合物的结构稳定。

该研究证实了静态猝灭在邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白复合物体系中的主导作用,并通过分子对接明确了结合力的具体类型。然而,邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白复合物的体内生物学效应尚未探究,邻苯二甲酸二乙酯是否影响卵白蛋白的免疫原性或消化吸收特性仍需进一步验证。此外,试验仅考察了单一蛋白质体系,未来可拓展至细胞模型及动物模型等,以评估邻苯二甲酸二乙酯在实际生理条件下的行为,探究邻苯二甲酸二乙酯与卵白蛋白的相互作用对生物体的潜在影响,同时可借助计算生物学方法预测更多污染物—蛋白质的相互作用模式,为解决塑化剂污染提供理论依据。

参考文献

- [1] 兰旭凯. 邻苯二甲酸酯和微塑料对厚壳贻贝生殖毒性的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2024: 4-5.
LAN X K. Study on the toxicity of phthalic acid ester and microplastics to *Mytilus coruscus*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2024: 4-5.
- [2] MONDAL S, BASU S, GHOSH S, et al. Diethyl phthalate, a plasticizer, induces adipocyte inflammation and apoptosis in mice after long-term dietary administration[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2024, 38(1): e23561.
- [3] MEI Y F, YANG W T, PENG S C, et al. Contamination levels and ecological risk assessment of phthalate esters (PAEs) in the aquatic environment of Chaohu Lake[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2024, 31(33): 45 553-45 563.
- [4] DU H, HU R W, ZHAO H M, et al. Mechanistic insight into esterase-catalyzed hydrolysis of phthalate esters (PAEs) based on integrated multi-spectroscopic analyses and docking simulation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 408: 124901.
- [5] CHENG J L, DU H, ZHOU M S, et al. Substrate-enzyme interactions and catalytic mechanism in a novel family VI esterase with dibutyl phthalate-hydrolyzing activity[J]. *Environment International*, 2023, 178: 108054.
- [6] GUAN R, WANG Y Y, LIU H B, et al. Investigation on the interaction between catalase and typical phthalates with different side chain lengths[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2025, 336: 126031.
- [7] CEN C N, CHEN J, WANG W Q, et al. Exploring the interaction mechanism of dietary protein ovalbumin and folic acid: a combination research of molecular simulation technology and multispectroscopy[J]. *Food Chemistry*, 2022, 385: 132536.
- [8] FU X Z, BELWAL T, HE Y H, et al. Interaction and binding mechanism of cyanidin-3-O-glucoside to ovalbumin in varying pH conditions: a spectroscopic and molecular docking study[J]. *Food Chemistry*, 2020, 320: 126616.
- [9] LIU Y J, MA L Y, ZHANG Q, et al. Construction of fatty acid-ovalbumin binary complexes to improve the water dispersibility, thermal/digestive stability and bioaccessibility of lutein: a comparative study of different fatty acids[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 273: 133010.
- [10] LIU T T, ZHAO Y, WU N, et al. Egg white protein-based delivery system for bioactive substances: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(3): 617-637.
- [11] NUDRAT S, GIRI P, NONGBRI D L, et al. Analysis of the binding mechanism of bioactive coumarins with ovalbumin: further investigation into the inhibitory effects toward protein fibrillation[J]. *ACS Food Science & Technology*, 2023, 3(5): 866-880.
- [12] CHEN Q, DONG L Z, LI Y, et al. Research advance of non-thermal processing technologies on ovalbumin properties: the gelation, foaming, emulsification, allergenicity, immunoregulation and its delivery system application[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(20): 7 045-7 066.
- [13] 梁鑫富, 董庆亮. 光谱法结合分子对接技术研究柠檬苦素与牛血清白蛋白的相互作用[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(21): 37-44.
LIANG X F, DONG Q L. Spectroscopic method combined with molecular docking technique to study the interaction of limonin with bovine serum albumin[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(21): 37-44.
- [14] ZHANG Q Z, HUANG Z J, WANG Y, et al. Chinese bayberry (*Myrica rubra*) phenolics mitigated protein glycoxidation and formation of advanced glycation end-products: a mechanistic investigation[J]. *Food Chemistry*, 2021, 361: 130102.
- [15] LEITE MILIÃO G, DE SOUZA SOARES L, BALBINO D F, et al. pH influence on the mechanisms of interaction between chitosan and ovalbumin: a multi-spectroscopic approach[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 123: 107137.
- [16] HABIBI N, CHRISTAU S, OCHYL L J, et al. Engineered ovalbumin nanoparticles for cancer immunotherapy[J]. *Advanced Therapeutics*, 2020, 3(10): 2000100.
- [17] 马兰, 吴雨婷, 周俊敏, 等. 多光谱法结合分子模拟探究邻苯二甲酸酯对胃蛋白酶的作用机理[J]. *分析试验室*, 2024, 43(10): 1 377-1 384.
MA L, WU Y T, ZHOU J Q, et al. Evaluation of the binding

- mechanisms of phthalates to pepsin based on multi-spectral analysis combined with computer simulation [J]. Chinese Journal of Analytical Laboratory, 2024, 43(10): 1 377-1 384.
- [18] ZHANG Q X, CHEN Y Y, LIU W Y, et al. Effects of tweens on the structure, interfacial characteristics, and emulsifying and foaming properties of ovalbumin[J]. Food Research International, 2025, 203: 115824.
- [19] ZHANG P, HUANG X Y, FU C, et al. Binding mechanism of *Monascus* pigment and ovalbumin: spectral analysis, molecular docking and molecular dynamics simulation[J]. Food Science of Animal Products, 2023, 1(4): 9240038.
- [20] MA Y Y, ZHANG D D, LIU M Q, et al. Identification of antioxidant peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin and their mechanism of action by molecular docking[J]. Foods, 2022, 11(17): 2 576.
- [21] CHENG W W, MA J L, WANG S J, et al. Interaction mechanism between resveratrol and ovalbumin based on fluorescence spectroscopy and molecular dynamic simulation [J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146: 111455.
- [22] CHEN L, ZHU M, HU X, et al. Exploring the binding mechanism of ferulic acid and ovalbumin: insights from spectroscopy, molecular docking and dynamics simulation[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(9): 3 835-3 846.
- [23] KAFFASH M, TOLOU-SHIKHZADEH-YAZDI S, SOLEIMANI S, et al. Spectroscopy and molecular simulation on the interaction of Nano-Kaempferol prepared by oil-in-water with two carrier proteins: an investigation of protein-protein interaction[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2024, 309: 123815.
- [24] SAMUEL H S, NWEKW-MARAIZU U, ETIM E E. Understanding intermolecular and intramolecular hydrogen bonds: spectroscopic and computational approaches[J]. Journal of Chemical Reviews, 2023, 5(4): 439-465.
- [25] GUO J Y, GAN C F, CHENG B, et al. Exploration of binding mechanism of apigenin to pepsin: spectroscopic analysis, molecular docking, enzyme activity and antioxidant assays[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2023, 290: 122281.
- [26] EFTINK M R, GHIRON C A. Fluorescence quenching studies with proteins[J]. Analytical Biochemistry, 1981, 114(2): 199-227.
- [27] 杨彩英. 热诱导卵白蛋白与白藜芦醇的作用机理及其复合物的致敏性评价[D]. 南昌: 南昌大学, 2024: 16.
- YANG C Y. Interaction mechanism of heat-stressed ovalbumin with resveratrol and the allergenicity evaluation of the complex [D]. Nanchang: Nanchang University, 2024: 16.
- [28] YU X, CAI X H, LI S, et al. Studies on the interactions of theaflavin-3, 3'-digallate with bovine serum albumin: multi-spectroscopic analysis and molecular docking[J]. Food Chemistry, 2022, 366: 130422.
- [29] XIE H J, LI H, LIU L, et al. How the ovalbumin modulates the conformation of zein through protein-protein interactions[J]. Food Hydrocolloids, 2025, 159: 110696.
- [30] CHEN F P, ZHOU L K, ZHOU B J, et al. Elucidation on the interaction between transferrin and ascorbic acid: a study based on spectroscopic analysis, molecular docking technology, and antioxidant evaluation[J]. Journal of Molecular Liquids, 2022, 360: 119413.
- [31] ROSS P D, SUBRAMANIAN S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability[J]. Biochemistry, 1981, 20(11): 3 096-3 102.
- [32] 侯小伟, 张澍檀, 严雪伟, 等. 液液萃取—气相色谱—质谱法测定水中邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 河南化工, 2025, 42(4): 57-59.
- HOU X W, ZHANG S T, YAN X W, et al. Determination of phthalates in water by liquid extraction gas chromatography mass spectrometry[J]. Henan Chemical Industry, 2025, 42(4): 57-59.
- [33] LYNDEN S, HAZARIKA U, ATHUL P, et al. A comprehensive *in vitro* exploration into the interaction mechanism of coumarin derivatives with bovine hemoglobin: spectroscopic and computational methods[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2023, 436: 114425.
- [34] ZHANG Y Y, LU Y C, YANG Y, et al. Comparison of non-covalent binding interactions between three whey proteins and chlorogenic acid: spectroscopic analysis and molecular docking [J]. Food Bioscience, 2021, 41: 101035.
- [35] GAO Y, ZHOU Y, ZHOU X J, et al. Theoretical and observed mechanisms of diesel exhaust particles in promoting asthma [J]. Chinese Medical Journal, 2023, 136(19): 2 374-2 376.
- [36] LIU Y J, CAI Y X, YING D Y, et al. Ovalbumin as a carrier to significantly enhance the aqueous solubility and photostability of curcumin: interaction and binding mechanism study[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116: 893-900.