

染料木素与 β -葡萄糖苷酶相互作用的研究

张耀东*, 高裙裙, 郁彩虹

(陕西省生命分析化学重点实验室, 陕西师范大学化学与材料科学学院, 陕西 西安 710062)

摘要: 本文研究了染料木素与 β -葡萄糖苷酶的相互作用。采用荧光光谱法研究了染料木素与 β -葡萄糖苷酶的结合反应, 二者的相互作用使 β -葡萄糖苷酶发生内源荧光猝灭, 属于静态猝灭机制。通过计算得到染料木素与 β -葡萄糖苷酶在 17、27 和 37 °C 下的结合常数分别为 3.69×10^4 、 3.06×10^4 和 $2.36 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。同步荧光研究了染料木素对 β -葡萄糖苷酶结构的影响, 染料木素可使 β -葡萄糖苷酶的构象发生变化、色氨酸残基所处微环境的疏水性降低。染料木素对酶活性的抑制试验结果表明其对酶的活性具有明显的抑制作用, 双分子结合速率常数为 $1.2 \times 10^3 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 。结合 AutoDock 4.2 分子对接软件模拟研究了二者的键合模式和键合机制, 表明氢键和疏水作用对染料木素与 β -葡萄糖苷酶的结合起重要作用, 同时还存在静电作用。

关键词: β -葡萄糖苷酶; 染料木素; 荧光光谱法; 分子对接

中图分类号: O657.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 06-0677-06

The interaction between genistein and β -glucosidase

ZHANG Yao-dong*, GAO Qun-qun, YU Cai-hong

(Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science of Shaanxi Province, School of Chemistry and Materials Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract: The interaction between genistein and β -glucosidase was studied using fluorescence quenching method and synchronous fluorimetry. The binding reaction was simultaneously studied by the AutoDock 4.2 molecular docking model. Data from fluorescence spectroscopy indicated that these interactions resulted in the endogenous fluorescence quenching of β -glucosidase, which belongs to a static quenching mechanism. The calculated binding constants were 3.69×10^4 , 3.06×10^4 and $2.36 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ at 17, 27 and 37 °C, respectively. The evidences from synchronous fluorescence showed the effect of genistein on the microenvironment around β -glucosidase in aqueous solution. The inhibition test showed that the activity of β -glucosidase could be inhibited by genistein. The determined bimolecular rate constant (k_i) was $1.2 \times 10^3 (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Molecular docking was performed to reveal the possible binding mode or mechanism and suggested that genistein could bind strongly to β -glucosidase. The results revealed that genistein tended to bind with β -glucosidase mainly by hydrogen bond and hydrophobic interaction as well as electrostatic forces.

Key words: β -glucosidase; genistein; fluorescence spectrum; molecular docking

酶是药物发挥药效的重要靶分子, 探讨具有药理活性的天然产物与酶的相互作用及作用机制, 对

于了解药物发挥药效的作用机制, 揭示药物药效的实质内涵具有重要意义。 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, EC3.2.1.21), 又称 β -D-葡萄糖苷葡萄糖水解酶, 它可以水解结合于末端非还原性的 β -D-葡萄糖苷键, 同时释放出 β -D-葡萄糖和相应的配基。它参与生物体的糖代谢, 对维持生物体正常生理功能起着重要作用。它与许多因代谢紊乱而引起的疾病, 如戈谢病

收稿日期: 2010-12-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30600494); 中央高校科研基本业务费资助项目 (GK200902010).

*通讯作者 Tel: 86-29-85303825, Fax: 86-29-85308774,
E-mail: ydzhang@snnu.edu.cn

(Gaucher disease)、癌症、病毒感染等有着密切的联系^[1, 2]。人们试图寻找合适的抑制剂来调节和控制 β -葡萄糖苷酶的活性, 以期对这类代谢疾病给以预防和治疗^[3, 4]。

黄酮类化合物是一类在植物中分布广泛的天然产物, 具有多种生物活性, 黄酮类化合物的药理作用广泛, 且每一种药理作用都有多种机制参与, 其中黄酮类化合物作为酶抑制剂是一种重要的作用机制^[5]。染料木素 (genistein) 是一种具有多种生物活性的黄酮类化合物 (图 1), 化学命名为 5, 7, 4'-三羟基异黄酮, 具有很高的药用价值^[6]。吴清华等^[7]用荧光法研究了染料木素与人血清白蛋白的相互作用。

本研究用荧光光谱法研究了染料木素与 β -葡萄糖苷酶的结合反应, 测定了结合常数与结合力类型, 并研究了染料木素对 β -葡萄糖苷酶活性的抑制作用, 也采用计算机模拟技术研究了 β -葡萄糖苷酶与染料木素、竞争性抑制剂 1-azafagomine^[8] (图 1) 之间的分子对接, 从分子水平探讨了染料木素与 β -葡萄糖苷酶的相互作用。

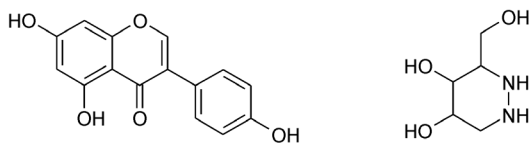


Figure 1 Chemical structures of genistein (left) and 1-azafagomine (right)

材料与方法

仪器 Cary Eclipse 型荧光分光光度计 (美国瓦里安公司), 微量进样器 (Eppendorf Research), pH 数显酸度计 (赛多利斯科学仪器有限公司)。

样品与试剂 杏仁 β -葡萄糖苷酶购自 Sigma 公司, 用 pH 5.0 的 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸缓冲溶液配制, 其储备液 (2×10⁻⁵ mol·L⁻¹) 4 °C 保存于暗处。染料木素购自中国药品生物制品检定所, 储备液 (1×10⁻² mol·L⁻¹) 用无水乙醇配制。乙醇、醋酸钠、冰醋酸购自西安化学试剂厂。实验所用试剂均为分析纯; 实验用水均为超纯水。

荧光滴定实验 样品荧光测定在 Cary Eclipse 型荧光分光光度计上进行。移取 500 μ L 2×10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 β -葡萄糖苷酶溶液于 700 μ L 石英比色皿中, 以微量进样器逐次加入不同体积不同浓度的染料木素溶液 (累计体积小于 10 μ L), 每加入一次, 反应 5 min, 药物的最终浓度范围为 2×10⁻⁶~8×10⁻⁵ mol·L⁻¹, 在激发波长为 290 nm 时, 测定不同温度下体系的荧光强

度, 取 344 nm 处的实验数据用于结合常数等的计算。

同步荧光实验 固定 β -葡萄糖苷酶的浓度为 2.0×10⁻⁶ mol·L⁻¹, 逐渐增加染料木素溶液 (累计体积小于 10 μ L), 使得染料木素的最终浓度为 1.0×10⁻⁵~7.0×10⁻⁵ mol·L⁻¹, 以 $\Delta\lambda = 15$ nm 及 $\Delta\lambda = 60$ nm 分别扫描同步荧光光谱。

双分子结合的速率常数 温度为 37 °C 条件下, 在 pH 5.0 的 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸缓冲液中, β -葡萄糖苷酶催化底物对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷 (5 mmol·L⁻¹) 水解, 生成对硝基苯酚, 通过在 405 nm 下的吸光度变化测定 β -葡萄糖苷酶的活性。参照 Aldridge 的方法^[9], 测定染料木素与 β -葡萄糖苷酶结合的速率常数 (k_i)。将 β -葡萄糖苷酶与 10 倍以上浓度的染料木素分别作用一定时间, 分别测定 β -葡萄糖苷酶的初始酶活性和残留酶活性。染料木素与 β -葡萄糖苷酶作用的抑制曲线为线性, 反应为假一级动力学反应, 符合方程:

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -k_i [I]t \quad (1)$$

其中 t 代表染料木素与 β -葡萄糖苷酶的作用时间, $[I]$ 为染料木素浓度, $[E_0]$ 为初始酶活, $[E]$ 为染料木素与酶作用后的酶活。根据曲线 $\ln[E]/[E_0] \sim t$ 的斜率计算二者结合的速率常数 (k_i):

$$k_i = -\frac{m}{[I]} \quad [(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}] \quad (2)$$

其中 m 为抑制曲线的斜率。

分子对接研究 玉米 β -葡萄糖苷酶的晶体结构取自蛋白质数据库 (www.rcsb.org, PDB: 1E1E)。染料木素和 1-azafagomine 的初始结构由分子模拟软件包 Sybyl 7.3 生成, 再用 tripos 力场和 Gasteiger-marsili 电荷优化分子的几何结构^[10]。用 AutoDock 4.2 软件对 β -葡萄糖苷酶与染料木素、1-azafagomine 进行分子对接。应用拉马克 (LGA) 遗传算法来计算与蛋白质结合的药物的可能构象。在对接过程中, 最多考虑了化合物的 10 个构象, 取结合自由能最低的构象用来做进一步的分析^[11]。

结果与讨论

1 荧光猝灭光谱

在酶与抑制剂相互作用的研究方法中, 由于荧光光谱法能提供包括激发光谱、发射光谱以及荧光强度、量子产率、荧光寿命、荧光偏振等许多物理参数, 这些参数能从不同角度反映分子的成键和结构情况, 还可提供蛋白质分子中荧光生色基团所处微环境的信息。因此, 为了进一步研究染料木素与 β -葡萄糖苷

酶的键合情况, 采用荧光光谱法进行了实验研究。

图 2 是在固定量的 β -葡萄糖苷酶溶液中加入不同量的染料木素后的荧光光谱图。在实验范围内, 随着染料木素浓度的增加, β -葡萄糖苷酶的荧光光谱最大发射波长在 344 nm 处无明显变化, 而荧光强度随抑制剂浓度的增加而不断降低, 这说明 β -葡萄糖苷酶与染料木素发生了相互作用, 从而对 β -葡萄糖苷酶的荧光产生了猝灭作用。

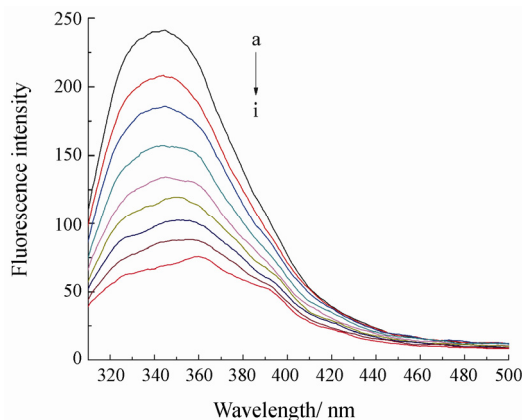


Figure 2 Emission spectra of β -glucosidase in presence of various concentrations of genistein. $T = 300\text{ K}$, $\lambda_{\text{ex}} = 290\text{ nm}$, $C(\beta\text{-glucosidase}) = 2 \times 10^{-6}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $C_{\text{a-i}}(\text{genistein}) = 0.0, 0.2, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 \times (10^{-5}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1})$

2 染料木素与 β -葡萄糖苷酶荧光猝灭机制

为了研究染料木素对 β -葡萄糖苷酶荧光的猝灭机制, 研究了不同温度下 β -葡萄糖苷酶的荧光强度随染料木素浓度的变化情况。按动态猝灭的 Stern-Volmer 方程^[12]处理:

$$F_0/F = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + k_{\text{sv}}[Q] \quad (3)$$

式中: F_0 和 F 分别为无和有猝灭剂 (染料木素) 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 (猝灭过程速率常数); τ_0 为无猝灭剂时荧光基团的荧光寿命; k_{sv} 为荧光猝灭常数; $[Q]$ 为猝灭剂的浓度。对于生物大分子, τ_0 的平均值为 $1 \times 10^{-8}\text{ s}$ 左右^[13]。

以 F_0/F 对染料木素浓度 $[Q]$ 作 Stern-Volmer 图, 如图 3 所示。计算求得作用温度为 300 K 时 k_{sv} 为 $0.88 \times 10^5\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ 和 k_q 为 $0.88 \times 10^{13}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。染料木素对 β -葡萄糖苷酶的猝灭过程速率常数 k_q 远大于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭速率常数 $2.0 \times 10^{10}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ^[14]。由此可确定, 染料木素对 β -葡萄糖苷酶的猝灭是由于形成了复合物而引起的静态猝灭。

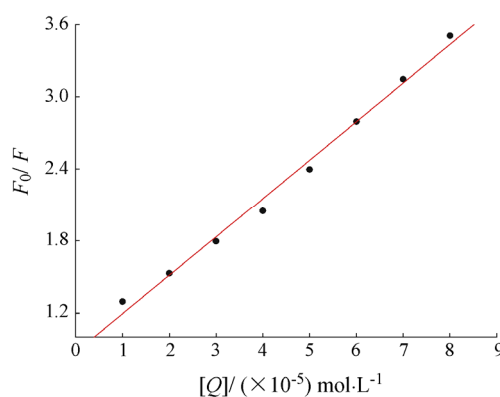


Figure 3 Stern-Volmer plot for the fluorescence quenching of β -glucosidase by genistein

3 染料木素与 β -葡萄糖苷酶间相互作用力的类型

为了研究二者之间的相互作用力类型, 将染料木素对 β -葡萄糖苷酶荧光猝灭的实验数据代入修正的 Stern-Volmer 方程^[15]

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{f_A} + \frac{1}{f_A K_A [Q]} \quad (4)$$

式中, K_A 为 Stern-Volmer 猝灭常数, f_A 为猝灭剂对初始荧光可接近百分数。以 $F_0/(F_0 - F)$ 对 $1/[Q]$ 作图 (图 4), 根据所得的直线斜率 $(f_A K_A)^{-1}$ 和截距 $(f_A)^{-1}$ 求出 K_A 的值 (表 1)。由于 K_A 具有较大的数值, 故染料木素和 β -葡萄糖苷酶之间存在较强的相互作用。此外, K_A 还随温度的升高而降低。如图 4 所示。按照 Aldridge^[9]的方法, 测定染料木素与 β -葡萄糖苷酶反应的双分子结合速率常数 (k_i), 如图 5 所示, 在 37 °C 的条件下, k_i 为 $1.2 \times 10^3 (\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 。染料木素对 β -葡萄糖苷酶的活性有明显的抑制作用。

小分子与生物大分子主要通过疏水作用力、静电作用力、氢键和范德华作用力相互结合。药物与蛋白质相互作用过程中的焓变 ΔH^0 、熵变 ΔS^0 是判断作用

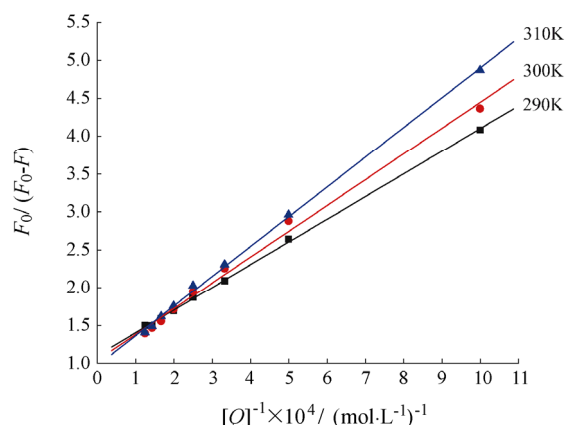
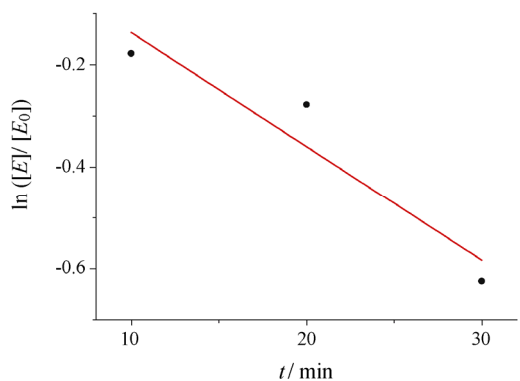


Figure 4 Stern-Volmer plots for the fluorescence quenching of β -glucosidase by genistein at three different temperatures

Table 1 Modified Stern-Volmer association constants K_A and relative thermodynamic parameters on interaction between genistein and β -glucosidase

T/K	$K_A/L \cdot mol^{-1}$	ΔH^0 /kJ·mol ⁻¹	ΔG^0 /kJ·mol ⁻¹	ΔS^0 /J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
290	3.69×10^4		-25.40	
300	3.06×10^4	-16.88	-25.69	29.37
310	2.36×10^4		-25.98	

**Figure 5** Plot of $\ln([E]/[E_0]) - t$

类型的主要依据。当温度变化不大时, ΔH^0 可看作常数, ΔH^0 和 ΔS^0 可通过 Van't Hoff 方程求得:

$$\ln K_A = -\Delta H^0/RT + \Delta S^0/R \quad (5)$$

再由下式计算出反应的自由能变 ΔG^0 :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (6)$$

式 (5) 中, K_A 具有与之前式 (4) 中相同的意义; R 为气体常数。所求得的热力学参数 ΔG^0 、 ΔH^0 和 ΔS^0 的值见表 1。 $\Delta G^0 < 0$ 表明染料木素与 β -葡萄糖苷酶的相互作用为一自发过程。许多文献^[16, 17]研究了热力学参数的符号、大小与作用力类型的关系, 从而可以判断有机小分子与蛋白质之间的主要作用力类型。从热力学的角度来考虑, 正 ΔS^0 通常认为疏水相互作用, 而且, 水溶液中离子间的静电作用一般以正 ΔS^0 与负 ΔH^0 为标志, 相反对于范德华力, ΔS^0 与 ΔH^0 均为负值。负焓在静电作用中可能起一定作用, 但在真正的静电作用中焓变非常小, 几乎等于零^[18]。由于蛋白质结构复杂, 对于一个实际体系, 小分子配体和蛋白质之间往往同时存在几种作用力^[19]。在染料木素与 β -葡萄糖苷酶的相互作用中, ΔS^0 为正值、 ΔH^0 为负值说明疏水作用和氢键都存在, 同时还存在静电作用。

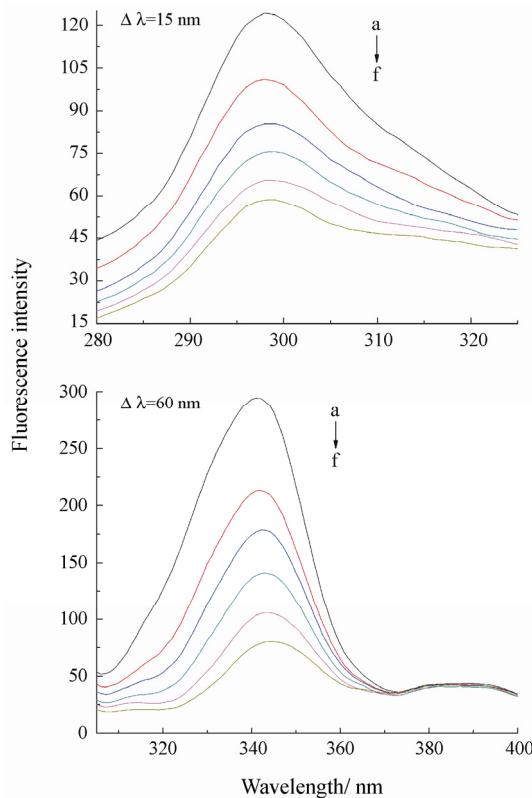
此外, $\Delta H^0 < 0$ 表示染料木素和 β -葡萄糖苷酶的相互作用为一放热过程, 即温度升高不利于二者的相互作用, 从荧光猝灭的角度来说, 温度升高使猝灭作用减弱。这一结论与图 4 中所示结果相一致, 即随着温度的升高猝灭常数减小, 荧光猝灭的程度减弱,

与温度对静态猝灭的关系一致^[20]。

4 同步荧光

由于同步荧光光谱图可以提供发色团附近分子微环境的信息, 常被用来描述荧光探针和蛋白质之间的相互作用。Miller^[21]研究发现, 在蛋白质的同步荧光光谱中, $\Delta\lambda = 15$ nm 时表现出酪氨酸残基的荧光光谱, $\Delta\lambda = 60$ nm 时则表现出色氨酸残基的荧光光谱。

固定 β -葡萄糖苷酶浓度, 逐渐增大染料木素的浓度, 分别记录 $\Delta\lambda = 15$ nm 和 $\Delta\lambda = 60$ nm 时的同步荧光光谱 (图 6)。发现酪氨酸残基的荧光强度明显减小, 但最大发射波长保持不变; 色氨酸残基的荧光强度明显下降并且其最大荧光发射峰从 341 nm 轻微红移到 346 nm。这一结果表明, 染料木素的加入使 β -葡萄糖苷酶的构象发生了变化, 色氨酸残基所处微环境的疏水性降低。

**Figure 6** Synchronous fluorescence spectra of β -glucosidase (2.0×10^{-6} mol·L⁻¹) with $\Delta\lambda = 15$ nm and $\Delta\lambda = 60$ nm in the absence and presence of increasing amount of genistein (1×10^{-5} mol·L⁻¹): (a) 0; (b) 1.0; (c) 2.0; (d) 3.0; (e) 5.0; (f) 7.0; $T = 300$ K

5 染料木素与 β -葡萄糖苷酶的分子对接

为了明确染料木素在 β -葡萄糖苷酶上的结合位置和成键情况, 以对实验结果进行验证和解释, 选用了玉米 β -葡萄糖苷酶进行分子对接的研究。Czjzek 等^[22]对玉米 β -葡萄糖苷酶与抑制剂结合后的晶体结

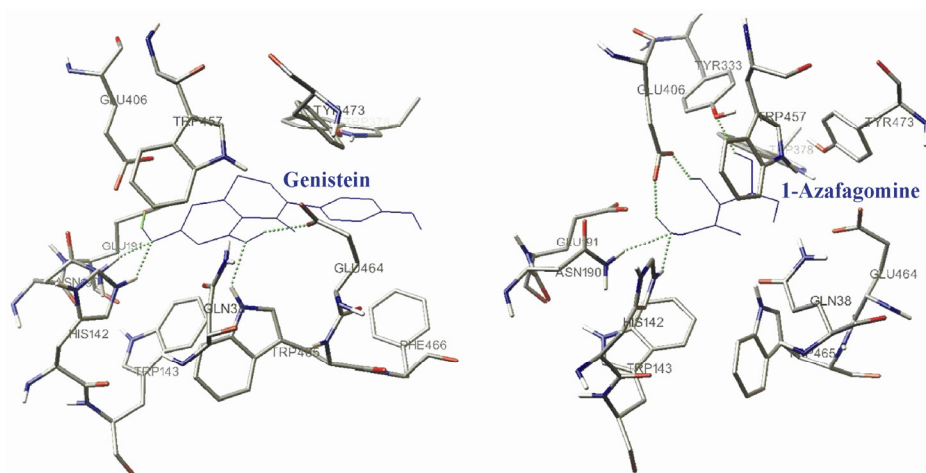


Figure 7 Molecular docking of genistein (left) and 1-azafagomine (right) with β -glucosidase

构进行了解析,并确定了酶的活性中心。本文选取了玉米 β -葡萄糖苷酶晶体结构为模板,采用 AutoDock 4.2 对接软件研究了染料木素、1-azafagomine 与 β -葡萄糖苷酶的结合模式,对接图见图 7, AutoDock 4.2 软件显示配体-受体的相互作用模式,周围棍棒模型表示 β -葡萄糖苷酶活性位点氨基酸残基,中间线状模型分别是染料木素和 1-azafagomine,虚线表示配体-酶复合物中可能的氢键相互作用。

对接结果表明,同 β -glucosidase 的竞争性抑制剂 1-azafagomine 一样,染料木素也位于 β -glucosidase 的疏水口袋中^[3],但疏水口袋的口径相对较小。1-azafagomine 结构中的 3-CH₂OH、4-OH 中的羟基氢分别与 Glu406 残基形成氢键,5-OH 的羟基氢与 Tyr333 残基形成氢键,3-CH₂OH 的羟基氢与 Asn190、His142 残基形成氢键。染料木素中 4-OH 中的羟基氢与 Glu464 残基形成氢键,4-OH 上的羟基氧与 Trp465 残基形成氢键,5-OH 上的羟基氧与 His142、Asn190 残基形成氢键,5-OH 上的羟基氢与 Glu191 残基形成氢键。通过分子对接法计算出的吉布斯自由能值 ΔG (298 K) 为 $-7.07 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,与实验数据 ($\Delta G = -25.69 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 300 K) 存在差距。尽管由计算机方法与实验方法得到的 ΔG 值有差距,但均说明结合反应是自发进行的。造成数值相差较大的可能原因是:① 酶分子具有柔性活性中心,而半柔性分子对接方式本身的局限性造成了这种差异^[9];② 分子对接和实验用的 β -葡萄糖苷酶来源不同,由于实验用的杏仁 β -葡萄糖苷酶晶体结构尚未解析,在进行分子对接时,采用了已知晶体结构的玉米 β -葡萄糖苷酶进行对接^[22];③ 酶在两种体系中的存在形式不同,由于分子模拟所用的 β -葡萄糖苷酶是从蛋白质数据库得到的晶体

结构模型^[22],而文中所用的 β -葡萄糖苷酶是溶液体系。另外,前面关于热力学参数方面的实验数据已经得出染料木素与 β -葡萄糖苷酶的主要作用力为疏水作用和氢键作用,同时还存在静电作用。从分子模拟图可以看出,染料木素分子位于 β -葡萄糖苷酶的疏水腔内,证实了疏水作用的存在,且染料木素的羟基分别与不同的氨基酸残基形成了 5 个氢键。由此得出结论:二者的键合模式不是单一的作用形式,而是分子间多种弱相互作用力共同作用的结果。

6 小结

本文利用荧光光谱法结合分子模拟技术研究了染料木素和 β -葡萄糖苷酶的相互作用。荧光光谱法研究表明染料木素对 β -葡萄糖苷酶的荧光猝灭属于静态猝灭。染料木素和 β -葡萄糖苷酶之间同时存在几种作用力,即氢键和疏水作用都存在,同时还存在静电作用。染料木素对 β -葡萄糖苷酶催化水解对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷的反应具有明显的抑制作用,测定了双分子结合的速率常数。分子模拟图揭示了染料木素在 β -葡萄糖苷酶上的结合部位,从分子水平了解了染料木素与 β -葡萄糖苷酶的键合反应及作用机制。

References

- [1] Lei K, Ninomiya H, Suzuki M, et al. Enzyme enhancement activity of *N*-octyl-beta-valienamine on beta-glucosidase mutants associated with Gaucher disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772: 587-596.
- [2] Grace ME, Graves PN, Smith FI, et al. Analyses of catalytic activity and inhibitor binding of human acid beta-glucosidase by site-directed mutagenesis. Identification of residues critical

- to catalysis and evidence for causality of two Ashkenazi Jewish Gaucher disease type 1 mutations [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265: 6827–6835.
- [3] Gloster TM, Macdonald JM, Tarling CA, et al. Structural, thermodynamic, and kinetic analyses of tetrahydrooxazine-derived inhibitors bound to beta-glucosidases [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 49236–49242.
- [4] Radin NS. Treatment of Gaucher disease with an enzyme inhibitor [J]. *Glycoconj J*, 1996, 13: 153–157.
- [5] Peng ZG, Xu LJ, Ye WC, et al. Effective components against HIV-1 replicative enzymes isolated from plants [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 235–240.
- [6] Lee DS, Lee SH. Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor [J]. *FEBS Lett*, 2001, 501: 84–86.
- [7] Wu QH, Wang C, Zhang ZH, et al. Study on the interaction of genistein and human serum albumin by spectroscopic method [J]. *Spectrosc Spectral Anal (光谱学与光谱分析)*, 2009, 29: 1060–1063.
- [8] Lohse A, Hardlei T, Jensen A, et al. Investigation of the slow inhibition of almond beta-glucosidase and yeast isomaltase by 1-azasugar inhibitors: evidence for the ‘direct binding’ mode [J]. *Biochem J*, 2000, 349: 211–215.
- [9] Aldridge WN. Some properties of specific acetylcholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues [J]. *Biochem J*, 1950, 46: 451–456.
- [10] Gasteiger J, Marsili M. Interactive partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges [J]. *Tetrahedron*, 1980, 36: 3219–3228.
- [11] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility [J]. *J Comput Chem*, 2009, 30: 2785–2791.
- [12] Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Press, 2006: 278.
- [13] Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules [J]. *Biochemistry*, 1973, 12: 4161–4170.
- [14] Eftink MR, Ghiron CA. Fluorescence quenching studies with proteins [J]. *Anal Biochem*, 1981, 114: 199–227.
- [15] Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Press, 2006: 289.
- [16] Ross PD, Subramanian S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability [J]. *Biochemistry*, 1981, 20: 3096–3102.
- [17] Nishijo J, Morita N. Binding parameters of theophylline and aminophylline to bovine serum albumin [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33: 2522–2524.
- [18] Tian J, Liu J, Xie J, et al. Binding of wogonin to human serum albumin: a common binding site of wogonin in subdomain IIA [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2004, 74: 39–45.
- [19] He WY, Sun ZF, Yao XJ, et al. The characterization on the site of vindoline binding to human serum albumin [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 608–614.
- [20] Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy [M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Press, 2006: 280.
- [21] Miller JN. Recent advances in molecular luminescence analysis [J]. *Proc Anal Div Chem Soc*, 1979, 16: 203–208.
- [22] Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, et al. Crystal structure of a monocotyledon (maize ZMGlu1) β -glucosidase and a model of its complex with *p*-nitrophenyl β -D-thioglucoside [J]. *Biochem J*, 2001, 354: 37–46.