

牛血清白蛋白与金霉素结合反应的机制研究*

易平贵^{a**}, 俞庆森^b, 商志才^b, 郭明^b

(a. 湖南科技大学化工学院, 湘潭 411201; b. 浙江大学化学系, 杭州 310027)

摘要: 以光谱技术与微量热技术相结合的方法研究水溶液中金霉素与牛血清白蛋白分子间结合作用的热力学性质。荧光猝灭法测得该反应的结合常数 $K = 2.09 \times 10^5 \text{ L/mol}$, 结合位点数 $n = 1.75$, 微量法测得反应的焓变 $\Delta_r H_m = -17.50 \text{ kJ/mol}$; 依据 Forster 非辐射能量转移机制, 得到授体-受体间的结合距离 ($r_1 = 1.67 \text{ nm}$, $r_2 = 1.46 \text{ nm}$) 和能量转移效率 ($E_1 = 0.41$, $E_2 = 0.66$)。金霉素与牛血清白蛋白分子间有较强的结合作用, 且结合力以疏水作用为主。

关键词: 牛血清白蛋白; 金霉素; 微量热; 荧光光谱

中图分类号: O657 文献标识码: A

Study on the Interaction between Chlortetracycline and Bovine Serum Albumin*

Yi Pinggui^{a**}, Yu Qingsen^b, Shang Zhicai^b, Guo Ming^b

(a. School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201;

b. Department of Chemistry, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The reaction mechanism and the thermodynamic characteristics between an antibiotics drug (chlortetracycline, CTC) and bovine serum albumin (BSA) were investigated by the fluorescence spectra and flow microcalorimetry in a Tris-HCl buffer solution (pH = 7.0, made isotonic with sodium chloride) at 25°C. It was manifested that CTC had a powerful ability to quench the intrinsic fluorescence of BSA mainly via a static quenching but CTC itself had no emission fluorescence for the 300 ~ 500 nm range in wavelength. A equation which could be used to determine the binding parameters of small molecule ligand binding to bio-macromolecule had been presented based on the site binding model and fluorescence quenching. Furthermore, the apparent binding constant K was found to be $1.20 \times 10^5 \text{ L/mol}$ and the binding sites n to be 1.75 through the equation, and the thermodynamic parameters were determined to be the molar change of enthalpy $\Delta_r H_m = -17.50 \text{ kJ/mol}$, the molar change of Gibbs function $\Delta_r G_m = -30.37 \text{ kJ/mol}$ and the molar change of entropy $\Delta_r S_m = 43.17 \text{ J/mol K}$ by the K value and flow microcalorimetry for the reaction. It may be suggested that the interaction between chlortetracycline and BSA is strong and the main binding force is hydrophobic interaction according to the thermodynamic parameters. By using a spectra overlap integral between the absorption spectrum of chlortetracycline and the emission spectrum of BSA, the distances ($r_1 = 1.67 \text{ nm}$, $r_2 = 1.46 \text{ nm}$) of Trp-212 residue to the binding sites of drug were estimated and the transfer efficiency ($E_1 = 0.41$, $E_2 = 0.66$) between chlortetracycline and BSA was also obtained from the theory of

* Project supported by National Natural Science Foundation of China (20173050) and Natural Science Foundation of Hunan Province (01JJY3009). ** Corresponding author. E-mail: yipg@xtpu.org.cn, yipinggui@sohu.com

forster non-radiation energy transfer theory. From these distances, the region and binding sites of drug in BSA can be determined and an allosteric domain model of CTC-BSA complex was postulated from the above results.

Key words Bovine serum albumin, Chlortetracycline, Fluorescence spectra, Microcalorimetry

1 引言

在分子水平上深入研究蛋白质等大分子与小分子药物的相互作用,不仅有助于阐明生物大分子与小分子配体相互作用的化学本质,同时也能为药物的设计与开发及药理研究提供有价值的信息.这是当今生命科学、化学和临床医学等研究中所共同关注和感兴趣的课题^[1,2].而在研究手段上,荧光技术与微量热技术都是重要的工具之一^[3,4].我们曾研究了丝裂霉素 C、喹诺酮抗菌素等药物与血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)结合作用的热力学性质及机制^[5-7],本工作是研究金霉素(Chlortetracycline, CTC)这一四环素族类抗菌素与牛血清白蛋白的结合反应的特征.

2 实验

2.1 试剂与仪器

金霉素(标准品)、BSA(含量大于99%)均购自上海华美生物工程公司,Tris、盐酸、氯化钠等均为分析纯试剂,实验用水系亚沸蒸馏去离子水. CTC和BSA均以 0.05 mol/dm^3 、 $\text{pH} = 7.0$ 的Tris-HCl(内含 $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ NaCl}$ 以维持离子强度)缓冲溶液配成一定浓度的溶液.

Hitachi-M850 荧光分光光度计; Shimadzu UV-260 型分光光度计; LKB-2277 精密微量流动热量计,恒温精度 $\pm 5.0 \times 10^{-4} \text{ K}$,量热精度 $1.0 \times 10^{-7} \text{ W}$.

2.2 实验方法

光谱测定:移取 2.5 mL BSA 溶液于 1 cm 的石英比色皿中,用微量注射器逐次加入 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$ 的CTC溶液进行荧光滴定(滴定剂累加体积小于 $200 \mu\text{L}$),荧光发射与激发狭缝宽度均为 10 nm ,扫描速度 120 nm/min ,固定激发波长 280 nm ,室温下绘制 $300 \sim 500 \text{ nm}$ 的发射光谱,记录 343 nm 处的荧光强度,测定与蛋白质物质的量之比为 $1:1$ 的环丙沙星溶液的电子吸收光谱.

微量热测定:采用流动混合量热方式,以缓冲溶液确定基线,将已知浓度的BSA和CTC溶液以相同流速泵入LKB-2277混合流动池中,读取系统达到稳定后的热功率,同时测定相同条件下环丙沙

星及BSA的稀释效应,热量计标定采用电能标定法,实际流速用重量法测定,所有实验温度均为 25°C .

3 结果与讨论

3.1 CTC对BSA的荧光猝灭效应

图1示出了CTC对BSA荧光的影响.可以看出,随着CTC浓度的增加,BSA的荧光被有规律地猝灭,荧光的最大发射峰位置未发生明显的位移.

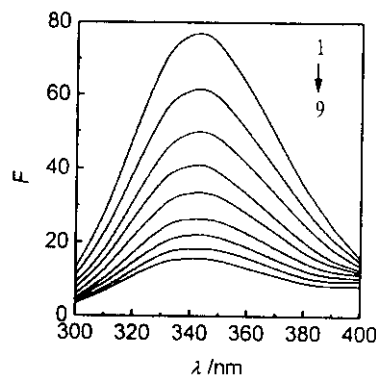


图1 CTC对BSA荧光强度的影响

Fig.1 Effect of the chlortetracycline on the fluorescence spectrum of BSA
[BSA]: $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 7.0$,
 $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, [CTC]: 10^{-5} mol/L , 1~9:
0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2

进一步按 Stern-Volmer 方程^[8]处理上述体系:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [D_i] \\ = 1 + K_{SV} [D_i] \quad (1)$$

式中, F 和 F_0 分别为加入和不加入药物时BSA溶液的荧光强度; K_q 为双分子猝灭过程速率常数; K_{SV} 为动态猝灭常数; τ_0 为猝灭剂不存在时荧光体分子平均寿命(生物大分子的 τ_0 约为 10^{-8} s ^[9]); $[D_i]$ 为猝灭剂的浓度.以 $\lambda_{\text{em}} = 343 \text{ nm}$ 处BSA的相对荧光强度按式(1)作动态猝灭处理,可求得CTC对BSA猝灭的 $K_{SV} = 1.35 \times 10^5 \text{ L/mol}$ 故

$$K_q = K_{SV} / \tau_0 = 1.35 \times 10^{13} \text{ L/mol s}$$

由于各类猝灭剂对生物大分子的最大扩散碰撞猝灭常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ L/mol s}$ ^[9],显然,CTC对BSA荧

光的猝灭过程速率常数 K_q 远大于这一值,可见其猝灭过程应为形成化合物所引起的静态猝灭,而不是由于动态碰撞引起的动态猝灭。

3.2 结合常数及结合位点数

位点结合模型常用来解释药物与蛋白质等生物大分子间的作用^[10]。按此模型有:

$$\nu = \frac{nK[D]}{1 + K[D]} \quad (2)$$

式中, ν 为平均每摩尔大分子已结合药物小分子的物质的量; K 为结合常数; n 为结合位点数,即一个大分子可结合小分子的数目; $[D]$ 为溶液中药物的游离浓度。式(2)可写成如下的直线形式:

$$\nu/[D] = -K\nu + Kn \quad (3)$$

若在所考虑的波长范围内,体系的荧光仅为 BSA 所产生,则有:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{[P]}{[P_i]} \quad (4)$$

据 ν 的定义,应有:

$$\begin{aligned} \nu &= \frac{[D_i] - [D]}{[P_i]} \\ &= n \frac{[P_i] - [P]}{[P_i]} \\ &= n \frac{F_0 - F}{F_0} \end{aligned} \quad (5)$$

(4)、(5)两式中 $[D_i]$ 和 $[P_i]$ 分别为体系中药物与 BSA 的总浓度。结合式(5)与式(3)可以得到:

$$\frac{F_0}{F} = K[D_i] \frac{F_0}{F_0 - F} - nK[P_i] \quad (6)$$

固定 $[P_i]$, 改变 $[D_i]$, 按式(6)以 $\frac{F_0}{F}$ 对 $[D_i] \frac{F_0}{F_0 - F}$ 作图可得一直线, 由该直线的斜率和截距即可确定结合常数 K 和结合位点数 n 。

根据图 1 的实验数据, 以 λ_{\max} (343 nm) 处的荧光强度按式(6)处理得图 2 的直线, 其相关系数 $R = 0.9998$, 由该直线的斜率和截距可以求得, 金霉素与 BSA 作用的结合常数 $K_A = 2.09 \times 10^5$ L/mol, 结合位点数 $n = 1.75$ 。可见金霉素与 BSA 之间可产生结合作用, 且可形成两个结合位点。

3.3 CTC 与 BSA 结合反应的热力学性质

对于一个已达平衡的混合流动反应体系, 其热功率 Q_{mix} 为:

$$Q_{\text{mix}} = Q_b + Q_{\text{dil}, P} + Q_{\text{dil}, D} \quad (7)$$

在此, $Q_{\text{dil}, P}$ 、 $Q_{\text{dil}, D}$ 分别为生物大分子 P 和药物 D 的

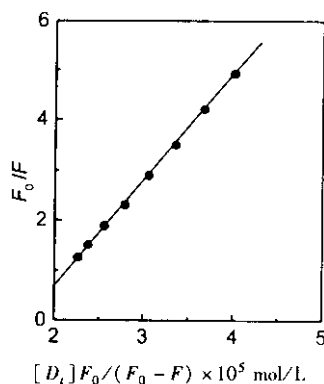


图 2 F_0/F_0 与 $[D_i]F_0/(F_0 - F)$ 关系图

Fig. 2 Plot of F_0/F_0 versus $[D_i]F_0/(F_0 - F)$

BSA]: 1.0×10^{-5} mol/L, pH = 7.0, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm

稀释热效应; Q_b 则为二者的结合热效应。设药物的摩尔键合焓为 $\Delta H_{m,D}$, 即 1 mol 药物分子完全被生物大分子结合时的焓变, 药物溶液和生物大分子溶液的流速分别为 f_D 和 f_P , 则有:

$$Q_b = 0.5 \Delta H_{m,D} (f_D + f_P) \times [A - (A^2 - 4n[P_i][D_i])^{1/2}] \quad (8)$$

其中

$$A = 1/K_A + n[P_i] + [D_i] \quad (9)$$

$$[P_i] = \frac{f_P[P_i]_0}{f_D + f_P}, [D_i] = \frac{f_D[D_i]_0}{f_D + f_P} \quad (10)$$

这里 $[P_i]_0$ 和 $[D_i]_0$ 分别为溶液进入热量计混合池前生物大分子 P 和药物 D 的浓度。反应的表现摩尔热力学函数变化则按以下诸式计算:

$$\Delta_r H_m = n \Delta H_{m,D} \quad (11)$$

$$\Delta_r G_m = -RT \ln K_A \quad (12)$$

$$\Delta_r S_m = \frac{\Delta_r H_m - \Delta_r G_m}{T} \quad (13)$$

采用混合流动方式, 选取 30 μW 的测量量程, 在相同实验条件下分别测定 CTC 溶液与 BSA 溶液的混合热效应、相应浓度下 CTC 及 BSA 的稀释热效应, 读取流动体系达到稳定态时的热功率, 并按式(7)确定 Q_b , 取两次实验平均值, 将其结果绘于图 3。按式(8)并结合荧光法测得的 K_A 值, 可求得图 3 中两组实验 CTC 结合 BSA 的摩尔键合焓 $\Delta H_{m,D}$ (kJ/mol) 分别为: -8.96 ± 0.27 、 -8.53 ± 0.12 , 取平均值得 $\Delta H_{m,D} = -8.75$ kJ/mol。可以看出, 在不同的溶液流速下, 反应的 $\Delta H_{m,D}$ 值基本相等, 表明结合反应达到了平衡。进一步可求得 CTC 与 BSA 反应的表现热力学函数变化为:

$$\begin{aligned} \Delta_r H_m &= n \Delta H_{m,D} = -17.50 \text{ kJ/mol}, \\ \Delta_r G_m &= -RT \ln K_A = -30.37 \text{ kJ/mol}, \\ \Delta_r S_m &= 43.17 \text{ J/mol K} \end{aligned}$$

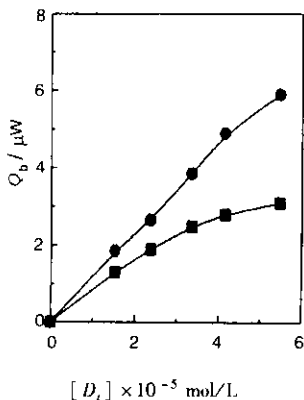


图 3 CTC 与 BSA 结合反应的量热曲线

Fig. 3 Calorimetric curve of CTC combined with BSA

● $f_D = f_P = 42.92 \mu\text{L/L}$ [P_1] = $43.50 \mu\text{mol/L}$

■ $f_D = f_P = 34.30 \mu\text{L/L}$ [P_1] = $21.75 \mu\text{mol/L}$

3.4 CTC 结合部位与 BSA 中色氨酸残基的距离

假定药物分子与血清白蛋白为顺序结合,则按照 Förster 非辐射能量转移机理可以求出结合位置与蛋白质分子中荧光发射残基的距离. 据此理论, 荧光发射体与荧光猝灭体之间的能量转移效率 E 和两者之间的距离 r 及临界能量转移距离 R_0 相关^[11]:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (14)$$

这里 R_0 是 $E = 50\%$ 时的临界距离:

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 N^4 \Phi J \quad (15)$$

式中, K^2 为偶极空间取向因子; N 为介质的折射指数; Φ 为授体的光量子效率; J 为授体(蛋白)荧光发射光谱与受体(药物)吸收光谱间的光谱重叠积分:

$$J = \frac{\int_0^\infty F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F(\lambda) d\lambda} \quad (16)$$

其中, $F(\lambda)$ 荧光授体在波长 λ 处的荧光强度; $\varepsilon(\lambda)$ 则为受体在波长 λ 处的摩尔吸收系数. 能量转移效率 E 可按式确定:

$$E = 1 - \frac{F}{F_0} \quad (17)$$

图 4 为 BSA 的荧光光谱与相同浓度的 CTC 吸收光谱之重叠图. 由图 4 中光谱重叠部分并结合

(16) 式, 可以求得相应的重叠积分 $J = 9.78 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \text{ L/mol}$. BSA 有两个色氨酸残基, 分别位于第 134 位和 212 位, 而 BSA 的荧光 ($\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 335 \text{ nm}$) 主要来自于 212 位的色氨酸残基^[12]. 在上述实验条件下, 参照文献 [13], 取色氨酸残基量子效率 $\Phi = 0.118$, N 取水和有机物的平均值 1.336, 取向因子取受体-受体各向随机分布的平均值 $2/3$, 由式 (15) 可求得临界距离 $R_0 = 2.44 \text{ nm}$, 由式 (14) 及图 1 求得 1 摩尔 BSA 结合 1、2 摩尔 CTC 时对应的能量转移效率 $E_1 = 0.410$, $E_2 = 0.665$, 进而由 R_0 、 E 按式 (14) 求出两结合部位 CTC 与 BSA 分子中某一色氨酸残基距离 $r_1 = 2.59 \text{ nm}$, $r_2 = 2.18 \text{ nm}$.

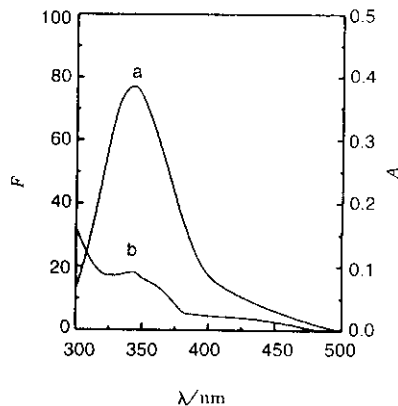


图 4 (a)BSA 的荧光光谱与 (b)CTC 的吸收光谱的重叠图

Fig. 4 Overlap of the fluorescence emission spectrum of BSA (a) with the absorption spectrum of CTC (b)

[BSA] = [CTC] = $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$

3.5 CTC 与 BSA 分子的结合机制

BSA 的空间结构由三个结构域组成, 每个结构域由两个亚结构域以槽口相对的方式形成圆形结构, 几乎所有的疏水性氨基酸残基都分布于圆筒的内部构成三个疏水腔^[14]. 从所测得的结合距离看, 两个被结合的 CTC 分子进入了 BSA 的疏水腔并与色氨酸残基保持相应的距离, 复合物的结构模型如图 5 所示. 另一方面, 作用过程的 $\Delta_r H_m$ 较小, 且有 $\Delta_r H_m < 0$, $\Delta_r G_m < 0$, $\Delta_r S_m > 0$, 这一热力学结果也表明 CTC 主要是通过疏水作用与 BSA 发生结合反应的^[15].

参 考 文 献

[1] Erland J F D. *Anal. Biochem.*, 1999, **267**: 366
 [2] Mauricio W S, Guilherme L I. *J. Phys. Chem.*, 1998,

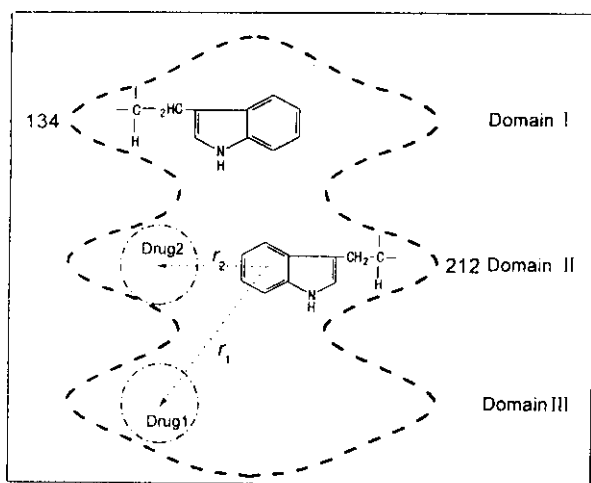


图5 CTC-BSA复合物的结构模型

Fig.5 Structure model of the complex of CTC-BSA

102 :4678

[3] Si Minzhen (司民真), Wu Rongguo (武荣国), Zhang Pengxiang (张鹏翔). *Chin. J. Chem. Phys.* (化学物理学报), 2002 , **15** : 346

[4] Aki H , Goto M , Yamamoto M. *Thermochimica Acta* , 1995 , **251** : 379

[5] Yi Pinggui (易平贵), Yu Qingsen (俞庆森), Shang Zhicai (商志才). *Acta Pharmaceutica Sinica* (药学学报), 2000 , **35** : 774

[6] Yi Pinggui (易平贵), Yu Qingsen (俞庆森), Shang Zhicai (商志才). *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 2000 , **58** : 1649

[7] Shang Zhicai (商志才), Yi Pinggui (易平贵), Yu Qingsen (俞庆森). *Acta Phys. -Chim. Sin.* (物理化学学报), 2001 , **17** : 48

[8] Chen Guozhen (陈国珍), Huang Xianzhi (黄贤智), Xu Jingou (许金钩等), *et al.* *Fluorescence Analytical Method* (2nd Ed.) (荧光分析法 (第二版)), Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1990. 502

[9] Ma Chunqi (马春琪), Li Kean (李克安), Zhao Fenglin (赵凤林). *Acta Chimica Sinica* (化学学报), 1999 , **57** : 389

[10] Abert W C , Gregory W M , Allan G S. *Anal. Biochem.* , 1993 , **213** : 407

[11] Yang Manman (杨曼曼), Yang Pin (杨频), Xi Xiaoli (席小莉). *Chin. Sci. Bull.* (科学通报), 1997 , **42** : 1276

[12] Yang P , Yang M M , Yang BS. *Chin. J. Chem.* , 1996 , **14** : 109

[13] Ulrich K H. *Pharmacol. Rev.* , 1981 , **33** : 17

[14] Charies E B , Hudson B S. *J. Biol. Chem.* , 1979 , **254** : 391

[15] Ppilip D R , Subramanian S. *Biochemistry* , 1981 , **20** : 96