

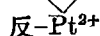
McGhee 和 von Hippel 模型的改进及其在反铂-多核苷酸作用体系中的应用

董艳红 邵伟平 唐雯霞* 戴安邦

(南京大学配位化学研究所, 南京, 210008)

用条件概率原理推导了处理小分子与大分子格子中 n 个残基结合, 并且覆盖 $n+1$ 个 ($n \geq 2$) 连续格子残基这一类型键合体系的方程式, 并在反铂-polyN 体系中作了应用. 测得了结合常数、每个铂配合物所键合的核苷酸残基数以及交叉结合和非交叉结合的比值.

McGhee 和 von Hippel 把生物大分子视为一维均匀格子, 把大分子中的残基看成格子中直线排列的重复单元, 用条件概率的方法推导出可处理和计算配基(金属、金属配合物或蛋白质等)与格子中 n 个残基结合, 并且覆盖 $n+1$ 个连续格子残基作用体系的结合常数、配基结合的残基数以及协同系数^[1]. 但是实际体系远为复杂, 例如反-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (简称反铂)与 DNA、polyN(多核苷酸)结合, 往往形成 1, 3-交联(—N₁—N₂—N₃—)^[2-4], 亦即每个配基与格子中 n



个残基结合, 且覆盖 $n+1$ ($n \geq 2$) 的连续的格子残基, 此时 McGhee-von Hippel 模型已不再适用, 需要作改进. 本文用条件概率原理推导了可用于这一类结合体系的方程式, 并在反铂-poly N 体系中作了应用, 测得了结合常数、 n 值以及交叉和非交叉结合的比值.

实 验

多核苷酸钾盐(polyC、polyG)为 Sigma 公司产品, 分子量大于 100,000. 反铂按文献[5]方法合成, H, N, Pt 元素分析结果符合理论值. 20 号透析管为 Union Carbide 公司产品, 使用前经 5% 的 NaHCO₃ 处理, 并用二次蒸馏水洗涤, 凉干备用.

玻璃器皿洗净后, 置于 120°C 烘箱中烘 4h. 所有溶液均有用二次蒸馏水配制, 缓冲液 A: 含 0.1 mol·dm⁻³ NaClO₄ pH 7.0 的 0.01 mol·dm⁻³ 磷酸盐缓冲液. 缓冲液 B: 含 0.1 mol·dm⁻³ NaClO₄ pH 5.0 的 0.01 mol·dm⁻³ 磷酸盐缓冲液.

一定量的反铂溶于缓冲液 A 或 B 中, 制得浓度为 1×10⁻⁴ mol·dm⁻³ pH 7.0 或 5.0 的反铂备用液. 备用液使用前用 0.45 μ 微孔滤膜过滤.

用 0.45 μ 微孔滤膜过滤后的缓冲液 A 或 B 制得 pH 7.0 或 5.0 的浓度为 1.00×10⁻⁴ mol·dm⁻³ 的 poly N 溶液(poly N 的浓度以每 dm³ 体积中所含核苷酸残基的摩尔数来表示).

取 5 mL poly N 溶液于透析袋内对 50 mL 反铂溶液透析. 初始[反铂]/[polyN]摩尔比值在 0.03—1.0 范围内. 在避光 37°C 下透析, 用岛津 UV-240 紫外可见分光光度计监测反应

1990 年 5 月 29 日收到, 修改稿于 1991 年 2 月 1 日收到.

平衡终点。反应平衡后,用日立 180-80 型原子吸收分光光度计采用无火焰法测定透析管内外 P_i 的浓度。

理 论 处 理

首先,仍将格子看成是由 N 个相同重复单元(氨基酸或核苷酸残基)直线排列而成,每个配基与格子中 n 个残基结合,但覆盖 $n+1$ ($n \geq 2$) 个连续的格子残基。配基与格子结合有非交叉和交叉结合两种方式(图 1)。设在已结合的配基中,交叉结合的配基所占的分数为 $2c$ 。因此,当 B 个配基结合在格子上时,交叉结合的配基数为 $2cB$,剩下的配基 $[B(1-2c)]$ 在格子上是以非交叉方式结合的。

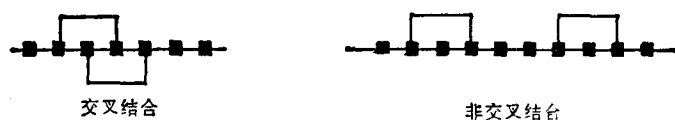
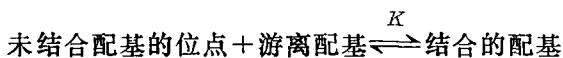


图 1 配基与格子结合的两种方式

配基与格子残基结合形成结合配基,反应达平衡时,以下式表示:



$$[\text{结合的配基}]/[\text{游离配基}] = K[\text{未结合配基的位点}]$$

上式两边被格子残基的摩尔浓度除,得:

$$\{\text{每个格子残基中结合的配基平均数}\}/L = K\{\text{每个格子残基中未结合配基的位点平均数}\}$$

若设 B 为每个格子残基中结合配基的平均数, s 为每个格子残基中未结合配基的位点平均数,则上式即为:

$$B/L = K \cdot s \quad (1)$$

其中 $B = v \cdot N$ (v 为键合密度,表示每摩尔格子残基所结合配基的摩尔数)。 L, v 可由实验测定。因此,求出每个格子中游离配基结合位置的平均数 s 的表达式即可求得键合方程式。

s 的表达式可以由以下步骤求得:

(1) 用 ρ_g 表示含有 g 个游离格子残基长度的间隙出现的几率。 $f b_1$ 表示给定的自由格子残基(即一个 f 残基紧右侧出现键合残基左端即 b_1)的几率,其它几率的表示方法类似图 2。由于 f 残基的右侧只可能出现 f 或 b_1 二种类型残基,因而

$$(ff) + (f b_1) = 1 \quad (2)$$

同样:

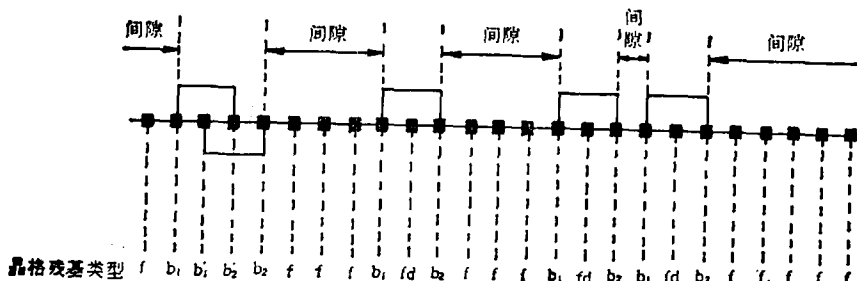


图 2 $n=2$ 的配基与格子残基结合时存在的格子残基类型

$$(b_n f) + (b_n b_1) = 1 \quad (3)$$

从而可得:

$$\rho_g = (b_n f) (ff)^{g-1} (f b_1) \quad (4)$$

(2) 在含 g 个残基长的间隙中, 未结合配基的位点数为 $g-n$ ($g \geq n+1$) (图 3)

因此, 每个间隙中未结合配基的位点平均数为:

$$\bar{s} = \sum_{g=n+1}^N (g-n) \rho_g \quad (5)$$

(3) B 个配基结合在格子上时, 存在 $B(1-\sigma)+1$ 个间隙, 所以

$$s = [B(1-\sigma) + 1] \bar{s} \quad (6)$$

因此, 若能找出 ρ_g 与 n, v, σ 之间的关系, 写出以 n, v, σ 表示的 ρ_g 的表达式, s 的表达式也就迎刃而解了。

B 个配基结合在格子上时, 结合的残基数为 $B \cdot n$, 结合率为 $Bn/N = nv$. 间隙中自由格子 (f) 出现的几率为 $1-nv-(1-2\sigma)v$. 可与 f 相邻的 b_n 残基出现的几率为 $(1-\sigma)v$. 因此

$$[1-nv-(1-2\sigma)v] (ff) + (1-\sigma)v (b_n f) = 1-nv-(1-2\sigma)v \quad (7)$$

为简单起见, 不考虑结合配基间的相互作用, 则

$$(b_n f) = (ff) \quad (8)$$

结合 (2)、(3)、(7)、(8), 得:

$$(ff) = (b_n f) = \frac{1-nv-(1-2\sigma)v}{1-v(n-\sigma)} \quad (9)$$

$$(f b_1) = (b_n b_1) = \frac{(1-\sigma)v}{1-(n-\sigma)v} \quad (10)$$

代入式 (4), 得:

$$\rho_g = \left[\frac{1-nv-(1-2\sigma)v}{1-(n-\sigma)v} \right]^g \left[\frac{(1-\sigma)v}{1-(n-\sigma)v} \right] \quad (11)$$

结合式 (11)、(15)、(16), 得:

$$S = N [1-(n-\sigma)v] \left[\frac{1-nv-(1-2\sigma)v}{1-(n-\sigma)v} \right]^{n+1} \quad (12)$$

将式 (12) 代入式 (1), 得键合方程式:

$$\frac{v}{L} = K [1-(n-\sigma)v] \left[\frac{1-nv-(1-2\sigma)v}{1-(n-\sigma)v} \right]^{n+1} \quad (13)$$

结 果 和 讨 论

当 $\sigma=0$, 即无交叉结合发生时, 式 (13) 简并为

$$\frac{v}{L} = K (1-nv) \left[\frac{1-(n+1)v}{1-nv} \right]^{n+1} \quad (14)$$

此式中 $n+1$ 相当于 McGhee & von Hippel 公式中的 n (为区别起见, 记为 n'), 用 n' 代入式 (14), 即得 McGhee & von Hippel 公式. 用 v/L 对 v 作图, v/L 轴上的截距为 K , v 轴上的截距为 $1/(1-2\sigma+n)$. 用实验测得作用体系的 L, v 后, 可用最小二乘法将它们对式 (13) 拟合, 即可求得结合常数 K 、配基结合部位大小 (n) 以及交叉结合配基所占的百分数 2σ .

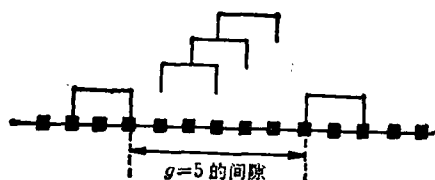


图 3 含 5 个格子残基的间隙中
($g=5$) $n=2$ 配基的结合位置数
[$g-n=3$] 的示意图

图 4a, b, c 是在 pH=7 和 5 的条件下, 反铂-poly G 和反铂-poly C 的平衡透析数据对改进的 McGhee & von Hippel 模型拟合结果. 图中实线为理论值. 拟合所得 K 、 n 、 $2c$ 值列于表 1. 由图可见用改进的 McGhee & von Hippel 模型能较好地拟合反铂-poly N 体系的实验数据. 在所研究体系中, 反铂和 poly N 的相间一个核苷酸的二个核苷酸结合, 并且覆盖连续三个核苷酸残基. 与 van der Veer 等用 NMR 及酶解法研究反铂-d(GpNpG) 和反铂-d(ApGpGpOpT) 作用的 1, 3 位结合的实验结果一致^[3,4]. 反铂-poly N 的结合常数 $\lg K = 5-4$ 之间, 和顺铂的相应值接近^[3]. 三个体系的反铂与 poly G 交叉结合结合率为 88% 以上, 对 poly C 交叉结合率达 100%, 这可能是由于反铂与 poly N 形成 1, 3 交联后引起骨架扭角的变化, 使中间一个碱基从原来碱基堆积中移出, 从而更易成为另一个反铂的进攻对象有关.

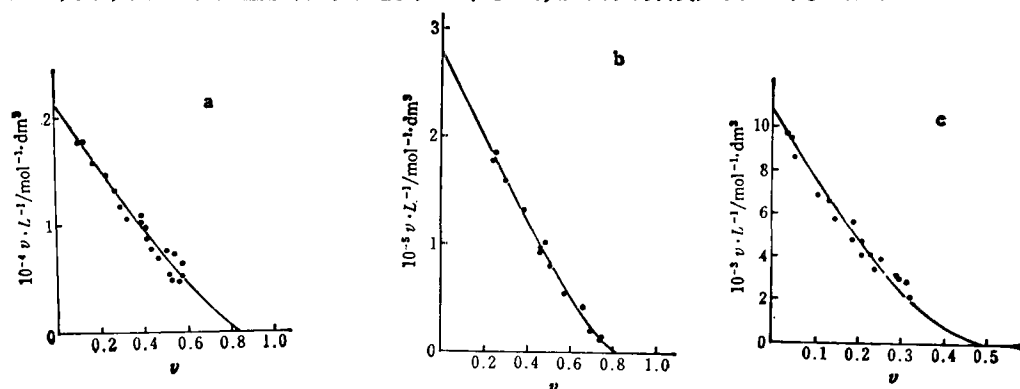


图 4 反铂-poly N 的拟合曲线

(a) 反铂-poly G (pH 7); (b) 反铂-poly G (pH 5); (c) 反铂-poly C (pH 7)

表 1 反铂与 poly N 相互作用结果

poly N	pH	$\log K$	n	$2c$	F^*
G	5	5.2	2	0.88	0.0029
G	7	4.0	2	0.98	0.0058
C	7	4.0	2	1.00	0.0061

$$F^* = \frac{\sum (Y_{\text{ex}} - Y_{\text{fit}})^2}{\sum Y_{\text{ex}}^2} = \frac{v}{L}$$

上述结果表明, 改进的 McGhee & von Hippel 模型对配基和格子的 n 个残基结合而覆盖 $n+1$ 个残基体系的适用性.

参 考 文 献

- [1] McGhee, J. D.; von Hippel, P. H., *J. Mol. Biol.*, **1974**, *86*, 469.
- [2] Sherman, S. E.; Lippard, S. J., *Chem. Rev.*, **1987**, *87*, 1153.
- [3] van der Veer, J. L.; Ligtoet, G. J.; van den Elst, H.; Reedijk, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 3860.
- [4] Gibson, D.; Lippard, J., *Inorg. Chem.*, **1987**, *26*, 2275.
- [5] Kleiberg, J., "Inorganic Syntheses", Vol. VII, McGraw-Hill Book Company, Inc. New York, **1963**.
- [6] 董艳红, 博士论文, 南京大学, 南京, **1989**.

Modified McGhee and von Hippel Model and Its Application in the System of the Interaction of Transplatin with Polynucleotide

Dong, Yan-Hong Shao, Wei-Ping Tang, Wen-Xia* Dai, An-Bang

(Coordination Chemistry Institute, Nanjing University, Nanjing, 210008)

Abstract

The equation describing small molecule binding to the n lattice residues and covering $n+1$ consecutive lattice residues ($n \geq 2$) has been derived by using simple conditional probabilities, and has been applied to the systems of the interaction of *trans*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] with polynucleotides. The binding constants and the binding site size of *trans*-Pt to polyG, polyA and polyC at pH=5 and 7, and the ratio of overlap-cross linking to nonoverlap-cross linking formed between *trans*-Pt and polyN have been obtained.