

### 3-[二(羧甲基)氨基甲基]-1,2-二羟基蒽醌与蛋白质作用的研究

迟燕华\* 庄稼 董发勤 耿伟

(西南工学院材料科学与工程系 绵阳 621002)

李克安 童沈阳

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871)

**摘要** 在 pH4.1 的缓冲溶液中, 研究 3-[二(羧甲基)氨基甲基]-1,2-二羟基蒽醌 (AFB) 与牛血清蛋白 (BSA) 结合反应, 相互生成紫色的配合物. 采用 UV 光谱法, 测得此配合物的最大吸收峰值为 510nm, 与试剂本身相比较红移 90nm. 表观摩尔吸光系数  $\epsilon = 1.2474 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ , 最大结合数  $n = 7$ , 表观结合常数  $K_C = 3.85 \times 10^6$ . 研究发现, AFB 与 BSA 之间主要是以分子之间的静电引力结合, 认为该反应符合 Scatchard 模型. 离子强度对结合反应有显著的影响.

**关键词** 3-[二(羧甲基)氨基甲基]-1,2-二羟基蒽醌 (AFB), 牛血清蛋白 (BSA), UV 光谱法

### The Study on the Reaction between 3-[Di(carboxymethyl)aminomethyl]-1,2-Dihydroxyanthraquinone and Bovine Serum Albumin

CHI Yan-Hua\* ZHUANG Jia DONG Fa-Qing GEN Wei

(Department of Chemistry, Southwest Institute of Technology, Mianyang, 621002)

LI Ke-An TONG Sheng-Yang

(Department of Chemistry, Peking University, Beijing, 100871)

**Abstract** The interaction of 3-[di(carboxymethyl)aminomethyl]-1,2-dihydroxyanthraquinone (AFB) and bovine serum albumin (BSA) was investigated by spectrophotometric method in acidic solution (pH4.1). When BSA was added into AFB solution, a purple color was observed, which indicated formation of the AFB-BSA complex. The maximum absorption of the complex was obtained at 510nm, with the apparent molar absorptivity of  $\epsilon = 1.2474 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ . Two conditional constants were defined: the maximum binding number  $n = 7$  and apparent binding constant  $K_C = 3.85 \times 10^6$ . It is suggested that the electrostatic force is the main binding force. The Scatchard model is appropriate in the treatment of data obtained here. It is found that sodium chloride concentration of the solution has significant effect on the sensitivity of AFB-BSA complex.

**Keywords** 3-[di(carboxymethyl)aminomethyl]-1,2-dihydroxyanthraquinone, bovine serum albumin, UV-spectrophotometric method

\* E-mail: jzhuang@swit.edu.cn

收稿日期: 1999-01-12, 修回日期: 1999-05-29, 定稿日期: 1999-07-13, 国家自然科学基金(49502025)资助课题

(Received January 12, 1999. Revised May 29, 1999. Accepted July 13, 1999)

在生物体中,蛋白质是必不可少的生命物质.有关蛋白质的各类研究,是目前生命科学、化学和临床医学研究中共同感兴趣的课题<sup>[1-6]</sup>.

AFB 作为光谱探针用于蛋白质的反应与研究,目前还未见报道.实验中发现,在微酸性的环境下,AFB 可与蛋白质相互作用结合.这种作用表现在 UV 光谱的波谱变化及波峰的红移,据此,可进一步研究 AFB 与蛋白质结合的形式、结合力、结合部位、结合数、结合平衡常数等等一系列的反应机理.从而由分子水平的角度认识蛋白质分子与小分子之间相互作用的机理,为生命科学研究提供有用的信息和数据.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

UV-265 分光光度计(Shimadzu),724 型分光光度计(上海光学仪器厂),PHS-25A 型数字酸度计(上海分析仪器厂).

AFB(分析纯,北京化工厂) $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (准确称取 AFB,加入少量丙酮,溶解后用水稀至刻度).BSA(生化试剂,上海丽珠东风生物技术有限公司) $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,准确称取 BSA,用水溶解稀至刻度. Britton-Robinson(B-R)缓冲溶液.其余试剂均为分析纯,水用蒸馏水.

### 1.2 方法

(1) 在一系列 25mL 的容量瓶中,各加入 5.0mL AFB,BSA 和 B-R 缓冲溶液,以水定容,摇匀,放置 5min,以水为参比,在 520nm 处采用 1cm 的玻璃比色皿测定其吸光度.

(2) 在一系列 25mL 的容量瓶中,分别加入 5.0mL AFB 和 B-R 缓冲溶液,加入一定浓度的 NaCl 溶液,再加入不同体积的 BSA,以水定容,摇匀.其余同方法(1).

## 2 结果与讨论

### 2.1 吸收光谱

AFB 在 pH4.1 的 B-R 缓冲溶液中为黄色,其吸收峰为 420nm.当加入 BSA 后,溶液由黄色变为红色,其吸收峰为 510nm,比试剂本身红移 90nm,结果见图 1.这表明 AFB 与 BSA 结合,生成复合物,并具有良好的对比度.在复合物吸收峰波长处,吸光度与 BSA 的含量呈线性关系.

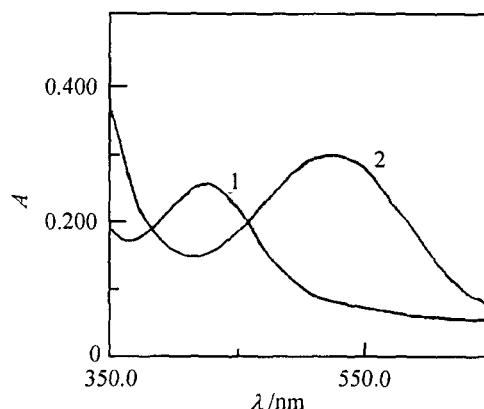


图 1 AFB 和 AFB-BSA 的吸收光谱

$c_{\text{AFB}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BSA}} = 1.176 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  
B-R 缓冲溶液 pH4.16. 1—AFB, 2—AFB-BSA.

### 2.2 适合反应条件的确定

2.2.1 pH对反应体系的影响 实验表明,在 pH 2.6~3.86 范围内,其吸光度呈上升,pH3.86~4.35 吸光度达最高值并平稳.pH4.35~6.07 范围内,吸光度呈下降趋势.实验选 pH4.10 左右的 B-R 缓冲溶液作为反应条件.

2.2.2 反应温度及时间对反应体系的影响 在 pH4.10 的 B-R 缓冲体系中,研究了温度、时间对 AFB-BSA 复合物的影响.实验表明该反应体系有以下特点:(1)反应速度快.向 AFB 溶液中加入 HAS,立即生成红色的配合物,3min 以内吸光度达到最大并稳定.(2)反应体系稳定.在 4h 内其吸光度值变化不大,测定相对误差小于 5%.(3)该反应体系对温度的适应性强.从 10℃到 35℃,其温度的变化  $\Delta T$  为 25℃,表明其不受实验室温度条件的限制.

### 2.3 反应机理

AFB 具有的平衡常数: $pK_1 = 2.57$ ,  $pK_2 = 5.53$ ,  $pK_3 = 10.35$ ,  $pK_4 = 12.19$  等.当固定 AFB 的浓度,改变 B-R 缓冲溶液的 pH 值,随着溶液的 pH 值升高,最大吸收峰由 420nm 逐渐红移,当 pH 为 2.61~4.35 时,  $\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$ , pH 为 4.35~4.70 时,  $\lambda_{\text{max}} = 440 \text{ nm}$ ; pH 为 5.08~5.72 时,  $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ ,见图 2a.这个光谱对应 AFB 的质子离解.

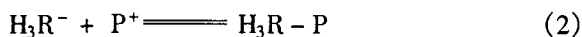
为了简便起见,上述可表示为:



该反应研究的 pH 条件为 4.10,对应上述的第一步离解.

在 pH4.10 的 B-R 缓冲溶液中,蛋白质已质子化<sup>[7]</sup>,并且分子呈伸展状态.BSA 在此状态下由于肽链上连接的赖氨酸、精氨酸等氨基酸残基质子化而带正电荷.AFB 在此条件下解离带负电荷,由此,

BSA 与 AFB 可由静电引力而结合, 表现如下(为简便省略电荷号):



式中  $\text{P}^+$  代表蛋白质(BSA),  $\text{H}_3\text{R}^-$  代表离解的 AFB,  $\text{H}_3\text{R} - \text{P}$  表示与蛋白质结合的 AFB.

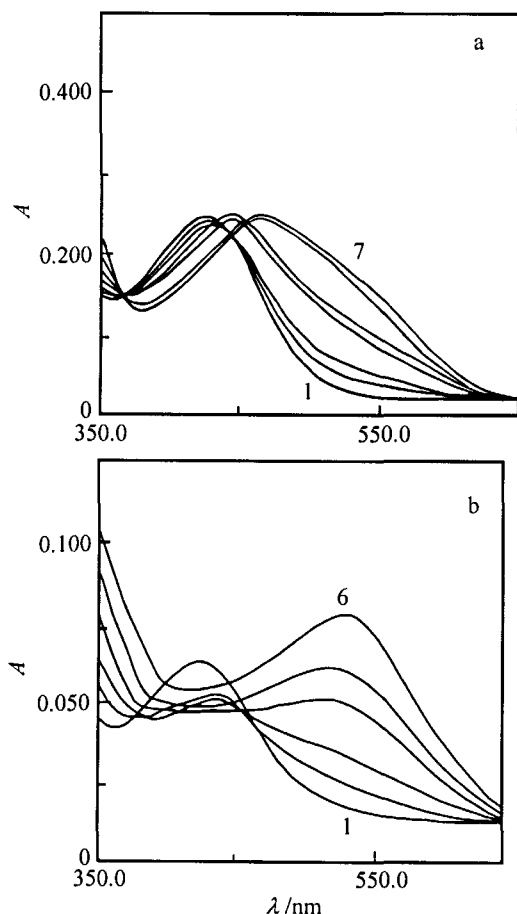


图 2 吸收光谱图

(a) AFB 在不同 pH 值的 B-R 缓冲溶液中的吸收光谱  
 $c_{\text{AFB}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 值 1 ~ 7: 2.61, 3.26, 3.86, 4.35, 4.70, 5.08, 5.72  
 (b) AFB-BSA 吸收光谱  
 $c_{\text{AFB}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BSA}} (1 \sim 6) = 0.00, 1.471, 2.941, 5.882, 8.824, 11.764 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 4.16

当固定 AFB 的浓度和溶液的 pH 值, 改变 BSA 的浓度, 获得实验结果见图 2b. 随着 BSA 浓度的增高, 420nm 处的波峰下降, 510nm 处的波峰升高, 即 AFB-BSA 结合物的浓度增高. 比较图 2a 与 2b 的光谱图, 表明 AFB-BSA 配合物的谱图完全不同于 AFB 的质子离解谱图, 进一步说明两者的结合实质.

#### 2.4 最大结合数的测定

研究采用摩尔比法测定最大结合数<sup>[8]</sup>, 当曲线斜率发生变化, 两直线交点处, 为 AFB 最大结合 BSA 的数目, 实验结果见图 3, 交点所对应的横坐标

BSA 的浓度, 已知 AFB 的浓度  $n = [\text{AFB}]/[\text{BSA}] = 7$ .

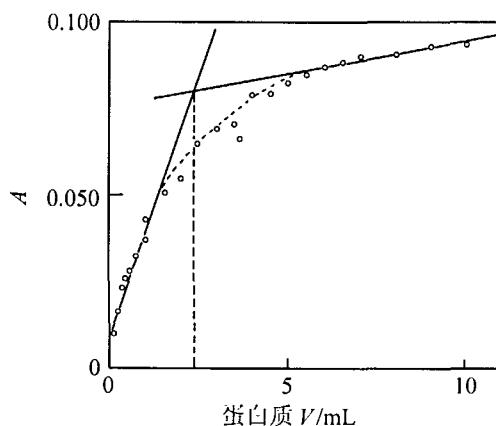


图 3 AFB-BSA 摩尔比测定

$c_{\text{AFB}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BSA}} = 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ , pH 4.16

#### 2.5 结合模式与结合常数

对于小分子探针与生物大分子之间的结合反应模式, 按照 Pesavento<sup>[3]</sup>的方法, 在足够高的蛋白质浓度条件下, 吸光度达到一个稳定的值, 表明全部的探针都与蛋白质结合. 由此, 可计算出 AFB 参与结合的和游离的浓度, 从而求出两者结合的实际数. 分别由  $R'$  和  $R$  代表结合的和游离的 AFB 浓度,  $c_R$  代表 AFB 的总浓度, 可由如下的关系式计算:

$$R' = \frac{A - \epsilon_R c_R}{\epsilon_{R'} - \epsilon_R} \quad (3)$$

这里,  $A$  代表在某一固定浓度下的吸光度,  $\epsilon_{R'}$  代表与蛋白质结合的 AFB 的摩尔吸光系数 ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).  $\epsilon_R$  代表游离的 AFB (未与蛋白质结合) 摩尔吸光系数 ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$ ), 它们均可在实验中获得.

Congdon 等<sup>[2]</sup>认为, 假定在生物大分子 P 上有  $n$  个结合部位, 并且, 这些结合部位对于配体 R 的结合程度是相同的. 而且, 在结合部位之间、结合配体之间无相互作用, 任何一个空结合部位对 R 的结合程度也不随其它部位是否结合了 R 而改变. 符合这些假设条件的大分子, 其结合部位为等同的、独立的一类结合部位, 故可推出方程:

$$n = NKR(1 + KR) \quad (4)$$

$$n = R'/P_T = (c_R - R)/P_T \quad (5)$$

式中  $n$  表示每分子蛋白质结合 AFB 的平均分子数目,  $N$  代表蛋白质上结合能力强的部位,  $K$  代表条件结合常数.

若求  $N, K$ , 则必需先求得  $n, R, R'$  可由式(3)求出. 式中  $P_T$  为溶液中蛋白质的总浓度.

Pesavento<sup>[3]</sup>等认为, 蛋白质与小分子探针之间

的作用更象是小分子在 BSA 和水中的分配,把 BSA 看成是不同于水的一个分散微相,则有以下式:

$$R(\text{水}) = R'(\text{蛋白质})$$

$$K = a_x' / a_x = n\gamma_x' / R\gamma_x \quad (6)$$

式中  $a_x'$ ,  $a_x$ ,  $\gamma_x'$ ,  $\gamma_x$  分别代表小分子在水中及与蛋白质结合的活度和活度系数在浓度很稀的情况下(例如实验中的浓度)可认为活度系数为 1,则式(6)可写作:

$$K_c = n/R \quad (7)$$

$K_c$  是条件结合常数,它是衡量在一定条件,小分子与蛋白质的结合能力根据以上公式推论,分别以不同的  $P_T$ ,对一系列实验数据进行计算处理<sup>[8]</sup>,求出  $R, R'n$  及  $n/R$ ,  $n$  是随 BSA 的浓度增高而下降的.  $n/R$  值在 BSA 浓度  $0.1 \sim 4.1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内变化不大. 当 BSA 浓度  $> 4.7 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $n/R$  的值显著增大. 将所获得的数据以  $n$  值为横坐标,  $n/R$  为纵坐标,绘制获得 Scatchard 图,见图 4. 图中两直线交点延长至横坐标处为  $n = 6.8$ ,这与摩尔比法求得的结合数非常接近,可认为基本一致. 图中交点线延至纵坐标交点处为结合常数  $K_c = 3.85 \times 10^6$ . 由此认为,该反应基本符合 Scatchard 模型<sup>[9]</sup>.

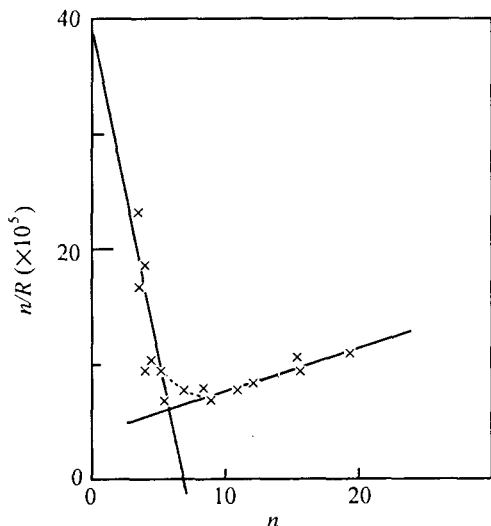


图 4 AFB-BSA 的 Scatchard 模型图

$c_{\text{AFB}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BSA}} = 0.1176, 0.2353, 0.3530, 0.4710, 0.5882, 0.8235, 0.1176, 1.765, 2.353, 2.941, 3.529, 4.118, 4.706, 5.529, 5.882 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH4.16

## 2.6 表观摩尔系数

依据 Beer 定律, AFB-BSA 在溶液中的吸光度可以表达为(1cm 的比色皿)  $A = c_p \epsilon_p$ , 式中  $\epsilon_p$  代表 AFB-BSA 的摩尔吸光系数,  $c_p$  代表 BSA 的浓度. 计算求得表观摩尔吸光系数  $\epsilon_p = 1.2474 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

## 2.7 离子强度对反应体系的影响

在一系列不同浓度的 NaCl 体系中,制作 BSA 标准系列,随着体系中 NaCl 浓度的增加,BSA-AFB 的吸光度下降,实验结果见图 5. 这说明离子强度对 BSA-AFB 的结合是有影响的. 这种影响的引起是因为离子电荷对 BSA 与 AFB 之间具有电荷的竞争和屏蔽作用所致.

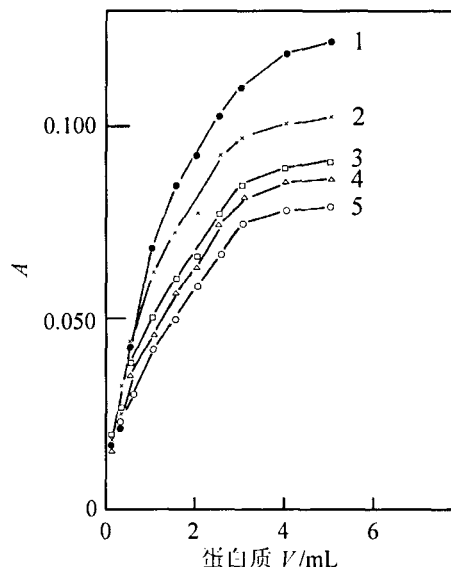


图 5 离子强度对 AFB-BSA 体系的影响

$c_{\text{AFB}} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $c_{\text{BSA}} = 1.764 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  pH4.16,

1— $\omega(\text{NaCl}) = 0.00\%$ , 2— $\omega(\text{NaCl}) = 0.01\%$ ,

3— $\omega(\text{NaCl}) = 0.03\%$ , 4— $\omega(\text{NaCl}) = 0.05\%$ , 5— $\omega(\text{NaCl}) = 0.1\%$

综上所述, AFB 与 BSA 在一定的条件下,通过分子间静电引力结合生成红色配合物致使 UV 光谱红移 90nm,其对比性很好. 通过实验测得该配合物表观稳定结合常数、摩尔吸光系数及摩尔结合数;首次发现, AFB 作为生物大分子的光谱探针具有良好的灵敏度、稳定性及实用价值和研究前景.

## References

- 1 E. Andrew, E. N. Barry, *Clinical Chemistry*, **1978**, 24, 80.
- 2 R. W. Congdon, C. W. Muth, *Anal. Biochem.*, **1993**, 213, 407.
- 3 M. Pesavento, A. Profumo, *Talanta*, **1991**, 38, 1099.
- 4 Zenei Taira, Hiroshi Terada, *Biochem. Pharmacol.*, **1985**, 34, 1999.
- 5 CHI Yan-Hua, LI Na, ZHUANG Jia, LI Ke-An, TONG Shen-Yang, *Chem. J. Chin. Univ.*, **1998**, 19, 879 (in Chinese).
- 6 W. W. You, R. P. Hangland, *Anal. Biochem.*, **1997**, 244, 277.
- 7 C. Tanford, S. A. Swanson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 6414.
- 8 ZHUANG Jia, CHI Yan-Hua, LI Ke-An, LI Na, TONG Shen-Yang, *Acta Chimica Sinica*, **1998**, 56, 827 (in Chinese).
- 9 G. Scatchard, I. H. Scheinberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 535.