

全甲基及其多胺修饰环糊精与牛血清白蛋白的相互作用

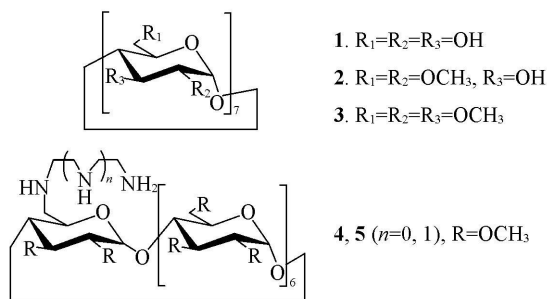
康澍, 陈湧, 史育, 马玉红, 刘育
(南开大学化学系, 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071)

摘要 制备了两个多胺修饰全甲基化环糊精, 即单-[6(乙二胺)-6脱氧]-七-(2,3,6三甲氧基)- β -环糊精(4)和单-[6(二乙烯三胺)-6脱氧]-七-(2,3,6三甲氧基)- β -环糊精(5), 并采用荧光和紫外-可见光谱方法测定了全甲基化环糊精及其多胺修饰衍生物在磷酸缓冲溶液中(25 °C, pH=7.2)与牛血清白蛋白形成化学计量比为8:1的超分子配合物的稳定常数。结果表明, 全甲基化环糊精对牛血清白蛋白具有强于天然环糊精和部分甲基化环糊精的分子键合能力, 而经过多胺修饰的全甲基化环糊精衍生物则显示了更强的键合能力, 这些强的键合能力源于疏水作用、静电作用和氢键作用的协同效应。

关键词 全甲基化环糊精衍生物; 光谱滴定; 牛血清白蛋白; 超分子化学

中图分类号 O621.3 文献标识码 A 文章编号 0251-0790(2007)03-0458-04

在生物体系中, 蛋白质等大分子的彼此相互作用或与其它分子相互作用形成超分子结构, 并表达出各种功能, 这种相互作用一般是对大分子上各支链的分子识别。大多数蛋白质具有疏水残基(如烷基、芳香基, 以及 NH_3^+ 和 $-\text{COO}^-$ 等离子基团)和亲水残基(如 $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ 等), 可以作为与其它分子键合的位点, 其相互作用力主要有静电作用、疏水作用和范德华力等。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)是一种比较易得的蛋白质, 常被用作模型蛋白质与小分子的作用研究, 从而阐释蛋白质的结构和键合机理。另一方面, 环糊精具有良好的水溶性和低毒性, 并能够选择性地与疏水分子形成包结配合物, 所以被广泛应用于仿生化合物和酶模型研究中^[1-4]。近年来的研究大多集中于环糊精及其衍生物对氨基酸、寡肽和多肽的识别^[2-8], 而关于环糊精对蛋白质的识别则研究得较少^[9-11]。因此深入考察环糊精与蛋白质之间的相互作用, 不但有助于深入理解生物体系中常见的“多位置、多模式”的协同键合行为, 还可以得到对蛋白质具有强键合能力和高选择性的功能环糊精衍生物, 并用于蛋白质分离试剂、蛋白质载体及人工酶等。因此, 本文选择了5种环糊精主体(Scheme 1), 采用荧光和紫外-可见光谱手段研究了其在 pH=7.2 时与 BSA 的相互作用。



Scheme 1 Structures of hosts

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Varian Mercury VX300核磁共振仪; Perkin-Elmer 2400C元素分析仪; Shimadzu UV-2401PC紫外-可见光谱仪, 石英样品池(光程 10 mm), 并附有 Shimadzu TB-85 Thermo Bath 超级恒温水浴, 实验温度控制在 $(25.0 \pm 0.1)^\circ\text{C}$; JASCO FP-750荧光光谱仪, 石英样品池(10 mm \times 10 mm \times 40 mm), 温度由超级

收稿日期: 2006-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 90306009, 20402008, 20421202, 20572052)资助。

联系人简介: 刘育(1954年出生), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事主-客体化学和超分子化学研究。

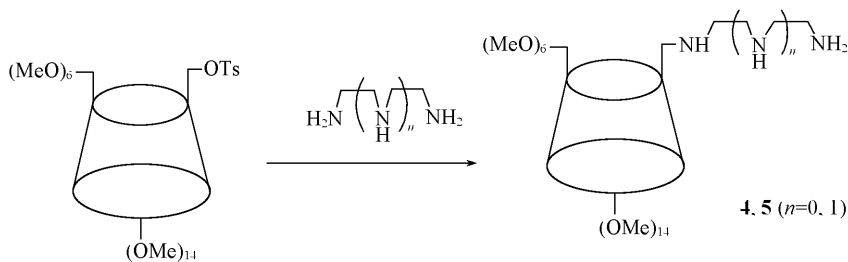
E-mail: yuliu@nankai.edu.cn

恒温水浴控制在 $(25.0 \pm 0.1) ^\circ\text{C}$.

β -环糊精为市售分析纯产品, 用蒸馏水重结晶 2 次, 真空干燥后使用. 七(2,6-二甲氧基)- β -环糊精(2)和七(2,3,6-三甲氧基)- β -环糊精(3)按文献[12]方法合成. BSA 购于中国医学科学院血液 & 血液病研究所, 未经纯化直接使用. 其它试剂均经纯化后使用. 光谱滴定所用溶剂均为 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液 ($\text{pH}=7.2$), 用去离子水配制.

1.2 单[6(乙二胺)-6脱氧]-七(2,3,6三甲氧基)- β -环糊精(4)的合成

将单-(6-O-对甲基苯磺酰基)-七(2,3,6三甲氧基)- β -环糊精 (500 mg 0.32 mmol)^[13] 在过量乙二胺 (3.2 mmol) 存在下于 $70 \sim 80 ^\circ\text{C}$ 反应 7 h (用 N_2 气保护), 将反应液冷却至室温, 减压除去过量的乙二胺. 向残余物中加入一定量的水, 用乙酸乙酯萃取, 收集乙酸乙酯层, 加入无水硫酸镁, 干燥, 过滤, 旋干滤液得到纯品, 产率 74%. 元素分析 $\text{C}_{64}\text{H}_{116}\text{N}_2\text{O}_{34}$ 计算值(%): C 52.74 H 8.02 N 1.92 实测值(%): C 52.27 H 7.75 N 2.01. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz), δ 5.32~4.94(m, 7H), 3.88~3.17(m, 102H), 其中 3.65(s, 21H, 3-OCH₃), 3.51(s, 21H, 2-OCH₃), 3.39(s, 18H, 6-OCH₃), 2.95~2.66(m, 4H). ESI-MS m/z : 1457.09 [M^+]. 反应式如下:



1.3 单[6(二乙烯三胺)-6脱氧]-七(2,3,6三甲氧基)- β -环糊精(5)的合成

合成方法同上. 由单-(6-O-对甲基苯磺酰基)-七(2,3,6三甲氧基)- β -环糊精与过量的二乙烯三胺反应得到, 产率 69%. 元素分析 $\text{C}_{66}\text{H}_{121}\text{N}_3\text{O}_{34}$ 计算值(%): C 52.82 H 7.72 N 2.17 实测值(%): C 52.41 H 7.91 N 2.33. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz), δ 5.59~4.89(m, 7H), 3.88~3.17(m, 102H), 其中 3.65(s, 21H, 3-OCH₃), 3.51(s, 21H, 2-OCH₃), 3.39(s, 18H, 6-OCH₃), 2.99~2.66(m, 8H). ESI-MS $m/z=1500.86$ [M^+].

2 结果与讨论

2.1 光谱分析

BSA 是一个单链载体蛋白, 含 585 个氨基酸残基, 其中有 2 个色氨酸残基 (Trp135 和 Trp214). 在大多数情况下, 蛋白质主要显示色氨酸残基的荧光. 可以认为, BSA 的荧光变化直接反映了色氨酸残基周围环境的变化. 我们利用色氨酸残基的荧光变化考察环糊精对 BSA 的作用. 自由 BSA 在 283 nm 波长激发下的发射峰在 347 nm 左右. 固定 BSA 的浓度, 不同主体环糊精的加入均引起 BSA 的荧光发射峰强度的下降, 并且荧光发射峰发生轻微红移. 图 1 是 BSA 与主体 3 作用的荧光光谱变化. 为了定量研究分子识别过程中主-客体间的包结配位行为, 用 UV-Vis 光谱滴定法测定了主-客体间的配位稳定常数 (K_s). 在实验中, BSA 在 280 nm 左右具有最大吸收, 固定客体 BSA 的浓度 ($1.14 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), 连续改变主体的浓度 ($0 \sim 3.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$), 观测在主体存在下 BSA 的吸光度变化. 由典型的紫外光谱变化 (图 2) 可看出, BSA 的紫外吸

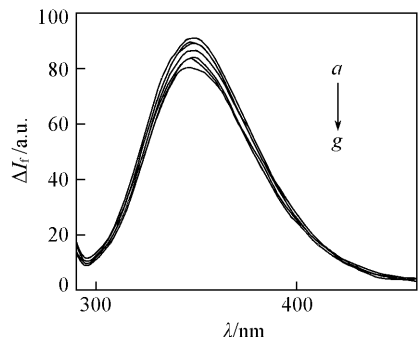


Fig 1 Fluorescence spectral changes of BSA upon addition of host 3 in phosphate buffer solution ($\text{pH}=7.2$) at $25 ^\circ\text{C}$

$c(\text{Host})$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): a 0 b 6.48×10^{-6} ; c 3.24×10^{-5} ; d 6.48×10^{-5} ; e 9.72×10^{-5} ; f 1.62×10^{-4} ; g 2.27×10^{-4} . $c(\text{BSA})$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 3.0×10^{-6} .

收随着主体 3、4 和 5 的逐渐加入而不断增强,且最大吸收峰蓝移,表明 BSA 的生色基团与主体环糊精发生了作用^[14]。而加入主体 1 和 2 时,BSA 的紫外光谱无明显变化,表明天然环糊精和部分全甲基化环糊精对 BSA 的作用极弱,图 2 概括了这几种主体与 BSA 配位作用能力的差异。

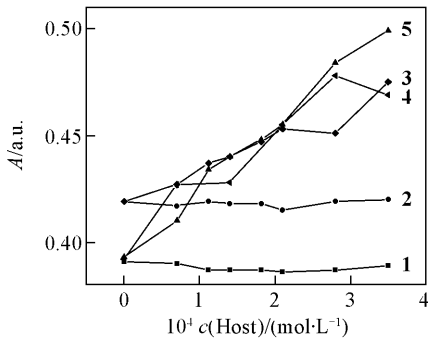


Fig 2 UV-Vis spectra changes of BSA (1.14×10^{-5} mol/L) in the presence of hosts 1-5 in phosphate solution (pH = 7.2) at 25 °C

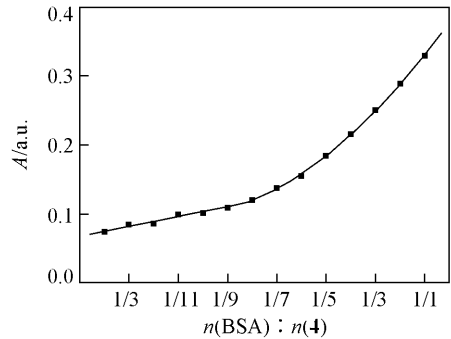
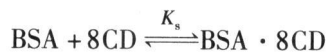


Fig 3 Stoichiometric ratio for the complexation of BSA with host 4 in pH = 7.2 buffer solution at 25 °C

2.2 包结配位计量比的确定

文献[11]报道多胺单修饰的 β -环糊精能与 BSA 形成化学计量比为 4:1 的包结配合物。我们通过摩尔比法^[15]确定了全甲基化环糊精衍生物与 BSA 作用的化学计量比。测量时固定 BSA 的浓度,连续改变主体环糊精(CD)的浓度,测定波长 278 nm 处的吸光度变化,以吸光度对溶液中配合物两组分间的摩尔比作图得到两条相交的曲线,其中交点在 X 轴上对应的摩尔比即为配合物组分的化学计量比。图 3 显示了 4 BSA 的化学计量比为 8:1,即 8 个主体环糊精与 BSA 形成了一个包结配合物。

通过摩尔比法确定了主体 3~5 对 BSA 均具有 1:8 的包结配位比,则主客体间的包结配位作用可表示为



配位稳定常数可表示为

$$K_s = \frac{[\text{BSA} \cdot 8\text{CD}]}{([\text{BSA}]_0 - [\text{BSA} \cdot 8\text{CD}]) \cdot ([\text{CD}]_0 - 8[\text{BSA} \cdot 8\text{CD}])}$$

BSA 配位前后,紫外-可见吸收强度可以分别表示为

$$A_0 = \epsilon_0 [\text{BSA}]_0 l$$

$$A = \epsilon_0 ([\text{BSA}]_0 - [\text{BSA} \cdot 8\text{CD}]) l + \epsilon_{\text{BSA} \cdot 8\text{CD}} [\text{BSA} \cdot 8\text{CD}] l = \epsilon_0 [\text{BSA}]_0 l + (\epsilon_{\text{BSA} \cdot 8\text{CD}} - \epsilon_0) [\text{BSA} \cdot 8\text{CD}] l$$

$$\Delta A = A - A_0 = (\epsilon_{\text{BSA} \cdot 8\text{CD}} - \epsilon_0) \cdot [\text{BSA} \cdot 8\text{CD}] l = \Delta \epsilon [\text{BSA} \cdot 8\text{CD}] l$$

变形为

$$[\text{BSA} \cdot 8\text{CD}] = \Delta A / \Delta \epsilon$$

则

$$[\text{BSA}] [\text{CD}]^8 \Delta A = 1 / (K_s \cdot \Delta \epsilon) + [\text{CD}]^7 ([\text{CD}] + 8^2 [\text{BSA}]) \Delta \epsilon$$

以 $[\text{BSA}] [\text{CD}]^8 \Delta A$ 对 $[\text{CD}]^7 ([\text{CD}] + 8^2 [\text{BSA}])$ 作图,由直线的斜率和截距分别得到配合物的稳定常数 K_s 和 BSA 配位前后的摩尔吸光系数差 $\Delta \epsilon$ 。图 4 显示了主体与 BSA 所形成超分子体系的线性拟合结果。假定每个环糊精空腔与生色基团的作用是相等的,则每个环糊精与 BSA 作用的表观键合常数为 $K_{\text{APP}} = K_s^{1/8}$ 。通过计算可得主体 3、4、5 键合 BSA 的表观键合常数分别为 4206、4465 和 6280 $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

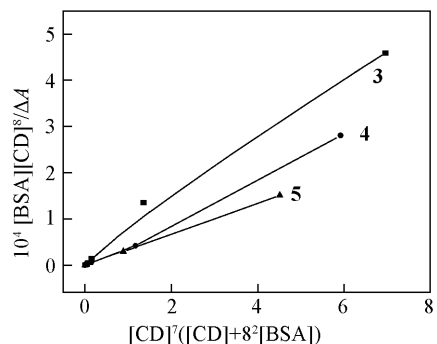


Fig 4 Plot of $[\text{BSA}] [\text{CD}]^8 \Delta A$ vs $[\text{CD}]^7 \cdot ([\text{CD}] + 8^2 [\text{BSA}])$ for the supramolecular systems formed by BSA and hosts 3-5 in pH = 7.2 buffer solution at 25 °C

2.3 键合能力

从光谱滴定结果可看出,天然环糊精和部分甲基化环糊精与 BSA 几乎无作用,而全甲基化环糊精则具有较强的键合能力.可能的原因是,引入大量甲基破坏了环糊精原有的氢键网络,使得其空腔更加疏水,导致全甲基化环糊精空腔与 BSA 上的生色基分子之间的疏水作用加强.由单个环糊精主体与 BSA 形成配合物的表观键合常数可看出,主体 3~5 与 BSA 作用能力顺序为 5>4>3 可能的原因是,在 $\text{pH}=7.2$ 时,主体环糊精侧链上的氨基质子化成为带正电荷的 $-\text{NH}_2^+$,而 BSA 上有较多的一 COO^- ,因此主-客体之间的静电作用和氢键作用导致主体 5 和 4 与 BSA 的键合能力大于没有氨基修饰的环糊精 3.随主体侧链上氨基数目的增加,主-客体配位能力也显著增强,这可归因于侧链上更多氨基引起的静电作用和氢键作用,最终导致主体 5 与 BSA 形成最稳定的配合物 [$K_{\text{APP}(5\text{BSA})}$ $K_{\text{APP}(4\text{BSA})}$ = 1.5].结果表明,由于静电、氢键和疏水的协同作用,全甲基化环糊精及其衍生物对 BSA 的键合能力明显高于天然环糊精和部分全甲基化环糊精,而随着侧链氨基的增加,键合能力显著增强.

参 考 文 献

- [1] Bender M. L., Kon iyan a M. . Cyclodextrin Chemistry[M], Berlin Springer 1978
- [2] Sæ jli J. Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes[M], Budapest Akad emiai Ki ad o 1982
- [3] Sæ jli J., Osa T. . Cyclodextrins, Comprehensive Supramolecul ar Chem istry Vol 3[M], Pergamon Oxford 1996
- [4] Handa A. . Large Ring M olecules[M], Chichester Wiley & Sons 1996 407-432
- [5] Ugawa T., Nishikawa S. . J Phys Chem. A [J], 2001 105 4248-4251
- [6] Liu Y., You C. C., Zhang H. Y., et al. Eur J Org Chem. [J], 2003 5 1415-1422
- [7] Liu Y., Yang Y. W., Chen Y., et al. Bioorg Med Chem. [J], 2005 13 963-971
- [8] Liu Y., Yang Y. W., Song Y., et al. Chem. Bio Chem. [J], 2004 5 868-871
- [9] Schneider H. J., Hacket F., Rudiger V. . Chem. Rev. [J], 1998 98 1755-1786
- [10] Dotsikas Y., Loukas Y. L. . J Pharm. Biomed [J], 2002 29 487-494
- [11] Gao H., Wang Y. N., Fan Y. G., et al. Bioorg & Med Chem. [J], 2006 14 131-137
- [12] Boger J., Corcoran R. J., Lehn J M. . Helv Chim. Acta [J], 1978 61: 2190-2218
- [13] Lai X. H., Ng S. C. . Tetrahedron Lett [J], 2004 45: 4469-4472
- [14] Liu Y., Han B H., Zhang H. Y. . Curr Org Chem. [J], 2004 8 35-46
- [15] Chriswell C. D., Schilt A. A. . Anal Chem. [J], 1975 47: 1623-1629

Synthesis of Oligo(ethylenediam ino) Modified Pem ethylated β -cyclo dextrins and Their Interactions with Bovine Serum Album in

KANG Shu CHEN Yong SHI Jun MA Yi Hong LIU Yu *

(State Key Laboratory of Elemental Organic Chemistry, Department of Chemistry,

Nankai University Tianjin 300071, China)

Abstract Two oligo(ethylenediam ino) mono-modified pem ethylated β -cyclodextrins were prepared and the complex stability constants for the 8:1 complexation of some pem ethylated β -cyclo dextrin derivatives with bovine serum album in were determined by fluorescence and UV-Vis spectroscopy at 25 $^{\circ}\text{C}$ in phosphate buffer solution ($\text{pH}=7.2$). The results indicate that the pem ethylated β -cyclo dextrin shows obviously enhanced binding ability as compared with native β -cyclodextrin and 2,6-methylated β -cyclodextrin and the oligo(ethylenediam ino) modified pem ethylated β -cyclodextrin derivatives show much stronger binding abilities. The enhanced binding ability can be derived from the cooperative effect of hydrophobic, electrostatic and hydrogen bonding interactions.

Keywords Pem ethylated β -cyclo dextrin derivative; Spectral titration; Bovine serum album in (BSA); Supramolecul ar chemistry

(Ed: H. J. Z)