

文章编号: 1000-2367(2008)04-0093-05

平衡透析法用于有机小分子和蛋白质相互作用研究进展

杨海艳, 王公轲, 陈得军, 卢秀敏, 卢雁

(河南师范大学 化学与环境科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 生物大分子是近年来生命科学研究的热点和难点之一, 有关蛋白质的各类研究也是人们比较感兴趣的课题. 平衡透析法是定量研究蛋白质与有机小分子相互作用的经典方法. 通过平衡透析法的研究我们可以讨论蛋白质与有机小分子的结合数目、结合平衡常数及作用力情况等. 近年来, 国内外学者在此方面做了大量的工作, 提出了各种各样的结合模型. 本文就此方面的研究进行综述.

关键词: 蛋白质; 有机小分子; 相互作用; 平衡透析

中图分类号: O658.9

文献标识码: A

有机小分子与蛋白质相互作用一直是生命科学中引人关注的问题, 此方面已有大量的文献[1-2]报道, 但有机小分子与蛋白质的作用机理和平衡规律尚在研究之中. 为了定量的研究有机小分子与蛋白质的相互作用, 人们提出了各种各样的结合模型^[1], 如 Scatchard 模型、专一性结合和非专一性结合模型、相分配模型等. 很早以前, 人们对蛋白质与有机小分子的作用就进行了大量研究. 从化学角度看, 可分为结构研究与反应平衡研究两个方面; 从研究手段上看, 有紫外可见光谱法、荧光光谱法、平衡透析法、核磁共振法、电位滴定法、红外光谱法以及圆二色谱法等. 本文就近几十年来用平衡透析法研究蛋白质与有机小分子结合的研究现状和发展方向进行综述.

1 平衡透析法

平衡透析法是研究小分子与生物大分子结合平衡的经典方法. 透析的动力是扩散压, 扩散压是由横跨膜两边的浓度梯度形成的. 透析的速度与膜的厚度、透析的小分子溶质在膜两边的浓度梯度及透析温度有关. 测定蛋白质结合小分子物质的最大结合位点数的实验方法有几种, 如双波长法、摩尔比法等, 但本质上是相同的. 不论采取何种方法, 必须求出未与蛋白质结合的小分子(即游离小分子)的量, 才能求出结合位点数及结合常数. 因此, 能否准确得到游离小分子的量是衡量一个方法结果准确性的关键. 在诸多实验方法中, 平衡透析法虽然操作复杂且费时, 但因它可以直接得到游离小分子的浓度, 从而被认为是较准确的方法.

2 结合模型的研究

2.1 Scatchard 模型

Scatchard 在研究 Cl^- 与人血清白蛋白(HSA)作用时所确立的数学模型被称为 Scatchard 方法^[3], 成为处理生物大分子和小分子作用的常用方法. 该模型的基本假设是: 对于一种配体, 假设蛋白质上每个结合部位都一样(即结合体和每个结合部位作用的自由能相等), 并且这些结合部位与配体的作用是相互独立的, 不存在相互作用. 由此推导出的 Scatchard 方程为:

$$n/[L] = KN - Kn, \quad (1)$$

其中 n 是每一分子蛋白质上结合的配体数, $[L]$ 是溶液中游离的配体浓度, K 为结合常数, N 为最大结合部

收稿日期: 2007-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(20673034); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20060476001)

作者简介: 卢雁(1953-), 男, 河南舞阳人, 河南师范大学教授, 博士生导师, 主要从事生物热力学方面的研究.

位数,以 n 对 $n/[L]$ 作图,就可以得到最大结合部位数 N 和结合常数 K . Congdon^[4] 在研究 CBBG-250 与蛋白质的作用时,对 Scatchard 方程进行了修正,推导出两个方程:

$$1/[L] = KN/n - K, \quad (2)$$

$$1/[L] = (1/KN)(1/[L]) + 1/N. \quad (3)$$

如果引入 Hill 参数 $n/(n-1)$, 则推导出的修正方程为:

$$(n-1)/n = -(1/NK)(1/[L]) + (N-1)/N. \quad (4)$$

Congdon 认为,当蛋白质与染料浓度之比较大时,此时只有蛋白质上的强结合位点与染料作用.用不同的方程对数据进行处理,所得结果不同.用方程(3)和(4)所得结果相近,且所得 K 、 N 值都大于方程(2)所得结果.当结合位点在 1~2 时,方程(4)能得到准确的结果;当结合位点大于 4~5 后,所得结果不准确,方程(2)则无此限制.

2.2 专一性和非专一性模型

Taira^[5] 等指出,在白蛋白和配体之间存在专一性结合和非专一性结合两种作用.专一性结合遵循 Scatchard 模型,其特点是最大结合数小;非专一性结合就好像是在水相和有机相中的分配,特点是低亲和性,不存在最大结合数.两种结合之间不存在协同作用,因而平均结合数是这两种结合数的加和.

$$n = n_s + n_{ns}, \quad (5)$$

其中 n_s 表示专一性结合数, $n_s = NK_s[L]/(1 + K_s[L])$; n_{ns} 表示非专一性结合数, $n_{ns} = K_{ns}[L]$ 这一模型被称为“专一性结合和非专一性结合模型(简称 S-NS 模型)”.

Taira 等用 Scatchard 模型和专一性与非专一性模型分别处理了华法令(一种药物)和水杨酸与白蛋白结合的数据,认为两种模型的处理方法所得结果是一致的,两种结合模型的强结合部位的结合数大致相同,结合常数也很相近.但是,两种方法所得的弱结合作用的结合常数有一定的差异,但不十分显著.

2.3 相分配模型

Plsavento^[6] 抛开了 Scatchard 模型的假设,提出了相分配模型.他认为牛血清白蛋白(BSA)对阴离子染料的吸收光谱和质子化常数的影响类似于表面活性剂胶束的作用,没有明显的专一性结合点.由此 Plsavento 提出假设:血清白蛋白可以被认为是一个不同于水的微相,配体在微相和水相中分配,其分配常数 $K_d = n/C_F$, 即 n/C_F 为一恒定值.以这个模型为基础,Plsavento 研究了 T-azo-R(1-四唑基偶氮-2-萘酚-3,6-二磺酸)与牛血清白蛋白的作用,得到了满意的结果.

3 蛋白质与有机小分子相互作用的研究进展

蛋白质与有机小分子相互作用的研究主要集中在以下两个方面:(1)有机小分子与蛋白质的作用位点、相互作用力类型和有机小分子结合形态;(2)有机小分子与蛋白质的作用模型及结合参数(结合个数、结合常数).用平衡透析法并结合分光光度法等其它方法来研究结合模型,可定量地讨论有机小分子与蛋白质的相互作用.

3.1 蛋白质与染料、表面活性剂的相互作用研究

1946 年,Scatchard^[7-9] 等就开始了蛋白质水溶液渗透平衡的实验研究,通过研究蛋白质溶液的渗透压来测定蛋白质的分子量.Klotz^[10,11] 等也进行了相关研究,1946 年通过研究吸收光谱的变化来分析蛋白质对有机离子的束缚,但吸收光谱法只适用于束缚低浓度的有机离子,对于高浓度有机离子的束缚不适用,而平衡透析法就克服了这些缺点.平衡透析不仅适用于高浓度有机离子,还适用高 pH 下的碱性环境.1947 年,Klotz 等^[12] 又研究了电荷和 pH 对蛋白质束缚有机离子的影响.通过比较蛋白质对偶氮磺酰嘧啶(三价)、二价磺酸盐、一价磺酸盐染料的束缚,发现染料所带电荷越高,束缚染料的个数越少.这说明在逐级束缚的离子之间存在静电斥力,斥力越大,束缚的个数越少.而在研究 pH 对束缚的影响时发现,蛋白质对偶氮磺酰嘧啶的作用,在 pH 低于 9.0 时,偶氮磺酰嘧啶的相对吸收峰几乎不变.这说明在 pH 低于 9.0 时,蛋白质对偶氮磺酰嘧啶的束缚不受 pH 的影响,而这种染料不能用于研究高于 pH=9.0 的情况,在 pH 高于 9.0 时,这种染料的酚羟基将发生电离,电离所引起的变化远远大于加入蛋白质所引起的变化.为了研究高 pH

对束缚的影响, 选择了甲基橙, 因为甲基橙没有酚羟基, 不发生电离. 实验发现, 当 $\text{pH} = 5 \sim 13$ 时, 染料的相对吸收峰也没有明显的变化, 这种现象可能是在 pH 高于 4.5 时, 没有取代基失去或得到 H^+ 所引起的.

Kragh-Hansen^[13] 通过平衡透析法详细地研究了静电力在有机小分子酚红和血清白蛋白之间所起的作用. 发现在蛋白质总体上带正电时, 二价的酚红比一价的酚红更易于与血清白蛋白结合; 在蛋白质总体上带负电时, 一价的酚红比二价的酚红更易于与血清白蛋白结合; 无论对于一价的酚红还是二价的酚红, 随着溶液 pH 值的增加, 结合常数都将降低, 可能是由于静电力相斥的缘故. 在蛋白质的等电点以下增大 pH 值, 酚红与人血清白蛋白结合数量将增加^[14]. 这是由于随着 pH 值的增高, 酚红将由负一价向负二价转变, 二价酚红所占比例增加, 与 BSA 的结合量也就增加. 可见, 利用静电力与蛋白质上的碱性基团相结合是有机小分子与蛋白质相互作用的一种方式. 在许多情况下, 有机小分子与蛋白质的作用不仅是某一种力的单独作用, 而是多种力协同作用的结果, 这些包括: 静电引力^[13, 14]、疏水作用力^[15]、范德华力^[16]等.

M. N. Jones 和 P. Manley^[17] 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下, 用平衡透析法测定了溶菌酶对同系列的烷基硫酸盐的束缚, 束缚等温线表明表面活性剂的浓度是形成蛋白质—表面活性剂聚合物的主要因素. 利用束缚等温线, 依据下式^[18]可以得到束缚能 Π , 从而进一步计算出摩尔的吉布斯自由能 ΔG_v .

$$\Pi = RT \int_0^v v d \ln [S], \tag{6}$$

其中 Π 是 Wyman 束缚能, R 是气体常数, T 是绝对温度, v 是平均每摩尔蛋白质分子束缚的配体个数, $[S]$ 是束缚平衡后自由态配体的浓度. Julia Cordoba 等^[19] 用这种方法研究了 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6.4$, 离子强度为 0.132 mol/L 时环状蛋白质对辛基配糖物的束缚.

在早期, 偶氮类阴离子染料就被用于蛋白质的测定, 如甲基橙^[20] 和 HABA[2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid]^[21]. 但是, 这些染料与蛋白质的作用机理并没有系统的报道过. 1996 年, 李娜, 李克安^[22] 等研究了溶液基本条件如酸度和离子强度等对偶氮胂(III)—牛血清白蛋白分子复合物形成的影响. 对比了平衡透析法、双波长法、摩尔比法测定牛血清白蛋白与偶氮胂(III)在 $\text{pH} = 2.0$ 时的最大结合数, 3 种方法的实验结果(如附表)都表明存在两类结合.

附表 实验方法与结合参数的对比

实验方法	第一类结合的最大结合数	第一类结合常数	第二类结合的最大结合数	第二类结合常数
平衡透析法	30.1	1.1×10^6	105	3.2×10^4
双波长法	36.5	8.4×10^5	106	8.2×10^4
摩尔比法	39	1.0×10^6	107	4.5×10^4

以上 3 种方法都可以用来测定最大结合数及结合常数. 平衡透析法虽然操作复杂且费时, 但因可以直接得到游离小分子的浓度, 被认为是最准确的方法; 双波长法原理简单, 如果确定了合适的波长, 也可以直接得到游离小分子的浓度, 也是比较准确的方法; 摩尔比法直接简单的获得最大结合数, 但准确性不如前两者.

欧俊宏和俞英^[23] 在碱性条件下研究了酸性铬兰 K(ACBK)与 BSA 结合的光度性质, 探讨了碱性条件下蛋白质与染料相互作用的机理. 结果表明: 在 $\text{pH} = 9.91$ 的条件下蛋白质能使 ACBK 吸光度降低且吸收光谱蓝移, 平衡透析法结合分光光度法的研究结果符合 Pesavento 提出的相分配模型, 此外还推导出有机小分子在蛋白质微相和水相中的分配比 D 的计算公式, 并讨论了 ACBK 在两相中的分配情况.

3.2 蛋白质与药物的相互作用研究

研究药物与蛋白质分子的相互作用对于阐明药物在人体内的传输及药理作用是非常重要的. 近年来, 随着平衡透析法的不断成熟, 该法也深入到了此方面的研究. 1997 年, Petersen C. E. 等^[24] 利用平衡透析和色氨酸—214 荧光淬灭研究了 HSA 对甲状腺素及类似物的束缚. 通过比较由平衡透析得到的数据(HSA 对所有甲状腺素的束缚)和由荧光淬灭得到的数据(甲状腺素束缚在 2A 子域结合位点), 结果表明, 专一性突变结合在 2A 子域影响了甲状腺素的一个高结合位点, 然而高能、低结合束缚成分不受影响. Pablo Taboada 等^[25] 用平衡透析法和微量量热法研究了 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时 HSA 与青霉素(penicillin, nafcillin, cloxacillin, dicloxacillin, and flucoxacillin)在 $\text{pH} = 7.4$ 时相互作用的热力学参数. 人血清白蛋白对这类药物的束缚有很大的非专一性, 当自由态的药物浓度接近能够形成聚集物的临界浓度时, 每个 HSA 分子最多能够束缚 1 200 (di-

cloxacillin)到 3 000(nafcillin)个药物分子。Nafcillin 和 cloxacillin 这两种药物的等温束缚的最大值可能与接近临界浓度的单体药物的最大活度有关,这些药物与蛋白质相互作用的热力学参数的数量级类似于阴离子表面活性剂与球状蛋白质的相互作用,这种结果与药物分子在蛋白质上聚集成胶束状结构相一致。2001 年,黄发德等^[26]在 $\text{pH} = 4.47$ 的缓冲溶液中,用分光光度法和平衡透析法研究钙羧酸指示剂(CCA)与牛血清白蛋白(BSA)的结合反应。结果发现,CCA 与 BSA 主要以分子间的疏水作用结合,该结合反应符合 Pesavento 提出的相分配模型,CCA 对 BSA 的相互作用类似于阳离子表面活性剂的作用。黄瑾等^[27]改进了这方面的研究,采用紫外光谱法、荧光光谱法并结合平衡透析法研究了磷钨杂多酸与 HSA 和 BSA 的结合平衡。观测到当 $\text{pH} = 7.43$ 时磷钨杂多酸使 HSA 和 BSA 的紫外吸收峰加强,并使 HSA 和 BSA 的特征荧光峰猝灭。Scatchard 曲线分析表明,磷钨酸在 HSA 和 BSA 中均有一个强结合部位。通过非线性最小二乘法拟合 Bjerrum 方程,得出磷钨酸-HSA 和磷钨酸-BSA 体系的逐级稳定常数。2003 年,周秋云,俞英^[28]用平衡透析法和分光光度法研究了 2-(8-羟基喹啉-5-磺酸-7-偶氮)-1,8-二羟基-3,6-萘二磺酸与 BSA 在酸性溶液中的结合反应,认为 8Q5SAC 与 BSA 之间的结合力是以静电引力为主,并探讨了其结合模型。在 298 K 下,测得这一反应的最大结合数为 35~40,结合常数为 $6.1 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。还研究了溶液基本条件如酸度和离子强度等对 8Q5SAC 与 BSA 分子复合物形成的影响,在 $\text{pH} = 3.34$ 条件下,标准工作曲线的线性范围为 $0.21 \sim 46.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。谢宝刚等^[29]把平衡透析法和紫外吸收示差光谱、稳态和动态荧光光谱法结合起来研究了生理条件下 ZnPcS_2P_2 (二磺基二邻苯二甲酰亚胺基酞菁锌,是一种具有光动力活性的两亲性抗癌光敏剂)与 BSA 之间的相互作用并得到了较为理想的结果。基于 Hill 位点模型,应用改进的蛋白内源荧光猝灭法求得 ZnPcS_2P_2 与 BSA 形成复合物的结合参数,结果与平衡透析法基本一致。

由此可见,平衡透析法可以定量的研究有机小分子与蛋白质的相互作用。随着生命科学研究领域的拓展和研究层次的深入,平衡透析法结合光谱技术和量热技术变得日益重要,这方面的研究必将得到更深入和广泛的开展。

4 结 语

从国内外的研究成果来看,平衡透析法是定量研究蛋白质与有机小分子相互作用的经典方法。通过平衡透析法可以讨论蛋白质与有机小分子的结合位点数、结合平衡常数、作用力情况等。但是,仅利用平衡透析法研究蛋白质与有机小分子的相互作用,并不能说明它们之间的具体结合部位、相互作用后蛋白质的结构变化及相互作用时的能量变化等问题。要想解决这些问题,就需要结合光谱技术和热力学方法等。把平衡透析法和各种光谱技术及量热技术相结合,从微观角度和宏观角度全方位的对蛋白质与有机小分子的相互作用进行研究,用多个参数同时表征作用过程,用多种实验手段对比分析实验结果必将取得更好的研究成果。

参 考 文 献

- [1] 朱 铿,李 娜,李克安,等.蛋白质与有机小分子反应机理的研究[J].化学试剂,1999,21(1):17-21.
- [2] 杨 睿,刘绍璞.某些分子光谱分析法测定蛋白质的进展[J].分析化学,2001,29(2):232-241.
- [3] Scatchard G, Scheinberg I H, Armstrong S H. Physical chemistry of protein solutions, IV. The combination of human serum albumin with chloride ion[J]. J Am Chem Soc, 1950, 72: 535.
- [4] Congdon R W, Much G W, Splittgerber A G. The binding interaction of Coomassie blue with proteins[J]. Anal Biochim, 1993, 213: 407.
- [5] Taira Z, Terada H. Specific and non-specific ligand binding to serum albumin[J]. Biochem Pharmacol, 1985, 34: 1999-2005.
- [6] Plesavento M, Profumo A. Interaction of Serum Albumin with A Sulphonated Azo Dye in Acidic Solution[J]. Talanta, 1991, 38: 1099-1106.
- [7] Scatchard G. Physical chemistry of protein solutions. I. Derivation of the equations for the osmotic pressure[J]. J Am Chem Soc, 1946, 68(11): 2315-2319.
- [8] Scatchard G, Batchelader A C, Brown A. Preparation and properties of serum and plasma proteins. VI. Osmotic equilibria in solutions of serum albumin and sodium chloride[J]. J Am Chem Soc, 1946, 68(11): 2320-2329.
- [9] Scatchard G, Batchelader A C, Brown A, et al. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. VII. Osmotic Equilibria in Concentrated Solutions of Serum Albumin[J]. J Am Chem Soc, 1946, 68(12): 2610-2612.
- [10] Klotz I M, Walker F M, Pivan R B. The binding of organic ions by proteins[J]. J Am Chem Soc, 1946, 68(8): 1486-1490.

- [11] Klotz I. M. Spectrophotometric Investigations of the Interactions of Proteins with Organic Anions[J] . J Am Chem Soc 1946, 68; 2299.
- [12] Klotz I M, Walker F M. The Binding of Organic Ions by Proteins. Charge and pH Effects[J] . J Am Chem Soc 1947, 69; 1609—1612.
- [13] Kragh-Hansen U, Moller J V. Protein binding of small molecules. IV. Relation between binding of phenolsulphthalein dyes and other ligands with a high affinity for human serum albumin[J] . Biochim Biophys Acta 1974, 336; 30.
- [14] Kragh-Hansen U, Moller J V. Protein binding of small molecules. I. Effect of pH and inorganic salts on the combination of phenol red with proteins[J] . Biochim Biophys Acta 1973, 295; 438.
- [15] Jonas A, Weber G. Presence of arginine residues at the strong, hydrophobic anion binding sites of bovine serum albumin[J] . Biochemistry, 1971, 10; 1335.
- [16] Compton S J, Jones C G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay[J] . Anal Biochem, 1985, 151; 369.
- [17] Jones M N, Manley P. Binding of *n*-alkyl sulphates to lysozyme in aqueous solution [J] . J Chem Soc, Faraday Trans. 1979, 75; 1736.
- [18] Jones M N, Chapman D. Micelles. Monolayers and Biomembranes[M] . New York; Wiley-Liss, 1995.
- [19] Cordoba J, Reboiras M D, Jones M N. Interaction of *n*-octyl-β-D-glucopyranoside with globular proteins in aqueous solution[J] . International Journal of Biological Macromolecules 1988, 10 (5); 270—276.
- [20] Bracken J S, Klotz I M. A simple method for the rapid detection of serum albumin[J] . American Journal of Clinical Pathology, 1953, 23; 1055—1058.
- [21] Porter E G, Waters W J. A rapid micro method for measuring the reserve albumin binding capacity in serum from newborn infants with hyperbilirubinemia[J] . J Lab Clin Med, 1966, 67; 660—668.
- [22] 李娜, 李克安, 童沈阳. 偶氮胂 III 与牛血清白蛋白作用的分光光度研究[J] . 分析化学, 1996, 24(1); 10—14.
- [23] 欧俊宏, 俞英. 碱性条件下蛋白质与酸性铬兰 K 相互作用的研究[J] . 海南大学学报(自然科学版), 2003, 21(2); 121—125.
- [24] Petersen C E, Ha C E, Harohalli K, et al. Mutagenesis studies of thyroxine binding to human serum albumin define an important structural characteristic of subdomain 2A[J] . Biochemistry, 1997, 36; 7012—7017.
- [25] Pablo Taboada, Victor Mosquera, Juan M. Ruso, Felix Sarmiento. Interaction between penicillins and human serum albumin: A thermodynamic study of micellar-like clusters on a protein[J] . Langmuir, 2000, 16; 934—938.
- [26] 黄发德, 俞英, 蒋雄. 钙羧酸指示剂与牛血清白蛋白作用的研究[J] . 华南师范大学学报(自然科学版), 2001, 1; 88—92.
- [27] 黄瑾, 袁余洲, 梁宏. 紫外光谱法、荧光光谱法及平衡透析研究磷钨杂多酸与 HSA 或 BSA 的结合平衡[J] . 中国科学, 2001, 31(6); 530—535.
- [28] 周秋云, 俞英. 2-(8-羟基喹啉-5-磺酸-7-偶氮)-1, 8-二羟基-3, 6-萘二磺酸与牛血清白蛋白(BSA)的相互作用[J] . 分析化学研究简报, 2003, 31(8); 976—980.
- [29] 谢宝刚, 黄剑动, 薛金萍, 等. 两性性酞菁锌与牛血清白蛋白结合的研究[J] . 分析化学研究报告, 2003, 31(10); 1159—1163.

Research Development of Interactions of Proteins and Organic Small Molecules by Equilibrium Dialysis

YANG Hai-yan, WANG Gong-Ke, CHEN De-jun, LU Xiu-min, LU Yan

(College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The study of biological macromolecules has been one of the popular and difficult research area in life science in recent years. The studies relating to protein interest so many scientific workers. Equilibrium dialysis is a classical method in studying on the interactions of proteins with organic small molecules. The binding sites, combination constants and the type of forces for the interactions between proteins and organic small molecules can be discussed by the method of equilibrium dialysis. In recent years, much work has been done by domestic and overseas scholars and various binding models have been put forward. This paper is a general review of the studies on the interactions of proteins with organic small molecules in the field.

Key words: protein; organic small molecule; interaction; equilibrium-dialysis