

第八次作业

1.请简述如何利用透析平衡原理测定生物大分子与小分子之间的亲和常数（可以结合具体例子说明）。

问题分析：（理论模型的推导）设半透膜内部盛有浓度为 $[P]_0$ 的生物大分子溶液，容器盛有浓度为 $[L]_0$ 的小分子溶液，将半透膜放入容器中，搅拌至溶液平衡，此时半透膜内外游离的小分子浓度可认为近似相等，均为 $[L]$ ，而半透膜内游离的生物大分子浓度为 $[P]$ 。接下来我们做如下假设：（1）无论生物大分子结合了多少个配体，其结合的平衡常数大致相等，即对于分子 P, PL, PL_2, \dots, PL_n ，均满足 $k = \frac{[PL_i]}{[PL_{i-1}][L]} (i = 1, 2, \dots, n)$ ；（2）生物大分子的结合位点是等价的，即对于分子 $(PL_i)_1, (PL_i)_2, \dots, (PL_i)_l$ ，它们是等价的，可以统一写作 PL_i ，且满足 $[PL_i] = \sum_{j=1}^l [(PL_i)_j]$ 。根据这两个假设，我们有 $[PL_i] = C_n^i [P][L]^i k^i$ ，因此

$$[P]_0 = \sum_{i=0}^n [PL_i] = \sum_{i=0}^n C_n^i [P][L]^i k^i = [P](1 + k[L])^n$$

$$[L]_0 = [L] + \sum_{i=1}^n i[PL_i] = [L] + \sum_{i=1}^n i C_n^i [P][L]^i k^i = [L] + \sum_{i=1}^n n C_{n-1}^{i-1} [P][L]^i k^i = [L] + nk[P][L](1 + k[L])^{n-1}$$

$$\bar{v} = \frac{[L]_{\text{binding}}}{[P]_{\text{total}}} = \frac{[L]_0 - [L]}{[P]_0} = \frac{nk[P][L](1 + k[L])^{n-1}}{[P](1 + k[L])^n} = \frac{nk[L]}{1 + k[L]}$$

将推导出的平均结合数公式变形，得 $\frac{1}{\bar{v}} = \frac{1}{nk[L]} + \frac{1}{n}$ （双倒数法），或 $\frac{\bar{v}}{[L]} = nk - \bar{v}k$ （Scatchard法），或 $\lg \frac{\bar{v}}{n - \bar{v}} = \lg k[L]$ （Hill法）

（具体的实验步骤）以测定小檗碱与人血清白蛋白的结合常数为例，首先配置一系列浓度梯度的小檗碱溶液，用紫外光谱仪测定其在吸收峰波长处的吸光度，并绘制工作曲线（标准曲线），接着，另配置一系列浓度梯度的小檗碱溶液，然后取与浓度梯度个数相同的半透膜，装入相同浓度的人血清白蛋白溶液，封袋，分别放入不同浓度的小檗碱溶液中，恒温培养一段时间，（待半透膜内外浓度平衡后）取出半透膜，再取出一定量透析液，稀释后测定其吸光度，并换算成透析液中小檗碱的浓度，最后用上面的理论模型拟合，得小檗碱与人血清白蛋白的结合常数。

Reference

- [1] Li, R.; Chen, L.; Jiang, T.; Xu, C. *Biotech. Bull.* **2010**, 6, 80.
李瑞光, 陈历俊, 姜铁民, 徐晨. 生物技术通报. **2010**, 6, 80.
- [2] Yang, H.; Wang, G.; Chen, D.; Lu, X.; Lu, Y. *J. Henan Norm. Univ. (Nat. Sci.)* **2008**, 36(4), 93.
杨海艳, 王公轲, 陈得军, 卢秀敏, 卢雁. 河南师范大学学报(自然科学版). **2008**, 36(4), 93.
- [3] Ye, Z.; Liu, Y.; Zhu, L. *Guangdong Chem. Ind.* **2009**, 36(1), 73.
叶志钧, 刘英菊, 朱丽. 广东化工. **2009**, 36(1), 73.