

## 아드리아미진과 소혈청알부민의 결합방식에 대한 연구

박영철, 림복남

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《과학리론과 생산실천을 밀접히 결합시키는것은 과학연구사업의 성과를 보장하고 기술혁명수행을 다그치기 위한 기본요구입니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 492페이지)

혈청알부민과 약물분자의 호상작용에 대한 연구는 체내에서 약물의 저장과 수송과정을 이해하는데서 중요한 문제로서 현재 세계적으로 광범히 연구되고있다.

우리는 이미 형광스펙트럼법과 자외선흡수스펙트럼법으로 아드리아미진(ADR)과 소혈청알부민(BSA)의 호상작용을 연구하여 결합복합체의 형광물질새를 밝히고 반응의 결합상수, 결합부위수를 확정하였다.[1]

여기서는 에네르기이행리론에 근거하여 ADR와 BSA(약물-단백질)사이의 결합거리를 계산하고 ADR-BSA결합물의 결합방식에 대하여 논의하였다.

### 재료 및 방법

기구로는 《TU-1800PC》형분광광도계(베이징보정기구유한공사), 《LS-55》형형광분광광도계(《Perkin Elmer》), 《420A》형pH계(《Orion》)를 리용하였다.

시약으로는 ADR(절강해문제약공장), BSA(《Sigma》), DTT(《Sigma》), Tris, 염산, 염화나트륨과 2수소린산나트륨, 1수소린산나트륨은 모두 분석순시약을 리용하였으며 실험용수로는 2차이온수를 리용하였다.

0.15mol/L의 NaCl수용액으로 pH 5.1의 린산완충액을 만들고 pH가 각각 7.4, 8.4인 Tris-HCl 완충액을 조제한 다음 이 완충액들을 리용하여 BSA용액, ADR용액을 만들었다.

자외선흡수스펙트럼측정 BSA용액, ADR용액, 량적비가 1 : 1인 ADR-BSA결합물용액의 자외선흡수스펙트럼을 《TU-1800PC》형분광광도계로 각각 측정하였다.

형광스펙트럼측정  $1.0 \cdot 10^{-6}$  mol/L의 BSA용액 3mL를 석영큐베트에 넣고 여기에 농도가  $2.0 \cdot 10^{-4}$  mol/L인 ADR용액을 미량주사기로 서서히 주입하면서 《LS-55》형형광분광광도계로 300~500nm범위의 형광스펙트럼을 측정하였다.(측정조건: 25°C, 러기파장  $\lambda_{ex} = 277\text{nm}$ )

ADR의 첨가체적은 실험점농도계산에 의하여 확정(루적되는 적정체의 총체적은 100 $\mu$ L보다 작게)하였다.

### 결과 및 논의

#### 1) ADR와 BSA사이의 결합거리

Förster의 에네르기이행리론에 기초하여 약물과 단백질이 결합할 때 결합위치와 단백질분자안의 형광발색단사이의 거리  $r$ 는 다음과 같이 표시된다.[2]

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (1)$$

여기서  $E$ 는 주개와 받을체사이의 에네르기이행효율,  $R_0$ 은 이행효율이 50%일 때의 림제거리인데 다음과 같이 표시된다.[2]

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} K^2 n^{-4} \Phi J \quad (2)$$

여기서  $K^2$ 은 쌍극자의 공간배치인자,  $n$ 은 매질의 굴절지수,  $\Phi$ 는 주개의 형광량자효율,  $J$ 는 주개의 형광스펙트럼과 받개의 자외선흡수스펙트럼의 스펙트럼중첩적분인데 아래와 같이 표시할수 있다.[2]

$$J = [\sum F(\lambda) \varepsilon(\lambda) \lambda^4 \Delta\lambda] / [\sum F(\lambda) \Delta\lambda] \quad (3)$$

여기서  $F(\lambda)$ 는 파장  $\lambda$ 에서 주개의 형광세기,  $\varepsilon(\lambda)$ 는 파장  $\lambda$ 에서 받개의 몰흡수계수이며 에네르기이행효율  $E$ 는 아래의 식으로 구할수 있다.[2]

$$E = 1 - F / F_0 \quad (4)$$

그림 1은 ADR의 자외선흡수스펙트럼과 BSA의 형광스펙트럼의 중첩도를 보여준다. 그림 1에서 스펙트럼중첩부분(빋선친 부분)을 매우 작은 직4각형들로 분할하고 식 (3)에 따라 적분하여  $J = 1.99 \times 10^{-24} \text{ cm}^3 \text{ L/mol}$ 을 얻었다.

선행연구[2]에 의하면 실험조건에서 공간배치인자는 약물-단백질의 각이한 방향으로 우연분포되는 평균값  $K^2=2/3$ , 굴절지수는 물과 유기물의 평균값  $n=1.336$  0, BSA속의 트립토판잔기의 량자효율은  $\Phi=0.118$ 이다.

이 량들을 식 (2)에 대입하여  $R_0=2.75\text{nm}$ 를 얻었으며 형광결과[1]와 식 (4)를 결합하여 에네르기이행효율  $E=0.12$ 를 계산하였다.

또한  $E$ ,  $R_0$ 으로부터 식 (1)에 의하여  $r=3.83\text{nm}$ 를 계산하였다.

실험조건 ( $\lambda_{\text{ex}}=277\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=349\text{nm}$ ,  $25^\circ\text{C}$ )에서 BSA의 형광은 주로 212번째의 트립토판잔기로부터 산생되는데 이 잔기는 BSA의 소수성부분안에 자리잡고있으며 앞에서 계산한  $r$ 값은 결합부위와 이 잔기사이의 거리이다.

ADR는 지용성차이로 하여 소수성공간에 들어가는것이 비교적 어렵기때문에 결합위치는 이 트립토판잔기와 일정한 정도로 떨어져있는것이다.

## 2) ADR와 BSA결합방식에 대한 논의

단백질의 동시러기형광스펙트럼에서  $\Delta\lambda=15\text{nm}$ 인 때에 티로진잔기의 형광이 나타나게 되며  $\Delta\lambda=60\text{nm}$ 일 때에는 트립토판잔기의 형광이 나타나게 된다.[3]

아미노산잔기의 최대형광파장은 그것이 놓여있는 환경의 소수성과 관련되어있으므로 형광파장을 변화시켜보면 단백질구조에서의 변화상태를 판단할수 있다.

BSA의 공간구조는 3개의 구조영역으로 이루어져있는데 매 구조영역들은 2개의 아구조영역들이 서로 흡을 마주대고있는 방식으로 원통형구조를 형성하고있으며 거의 모든 소수성아미노산잔기들이 원통내부에 매몰되어있으면서 소수성공간을 이루고있다.

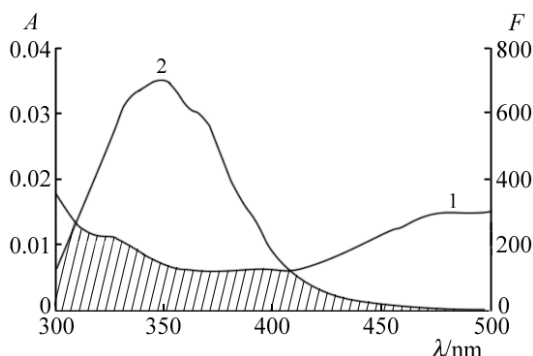


그림 1. ADR의 자외선흡수스펙트럼(1)과 BSA의 형광스펙트럼(2)의 중첩도

$$c_{\text{ADR}} = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}, \quad c_{\text{BSA}} = 1.0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$\lambda_{\text{ex}} = 277 \text{ nm}$$

BSA의 농도를 고정하고 ADR의 농도를 점차적으로 높이면서  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 와  $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 일 때 동시러기형광스펙트르를 측정하였다.(그림 2)

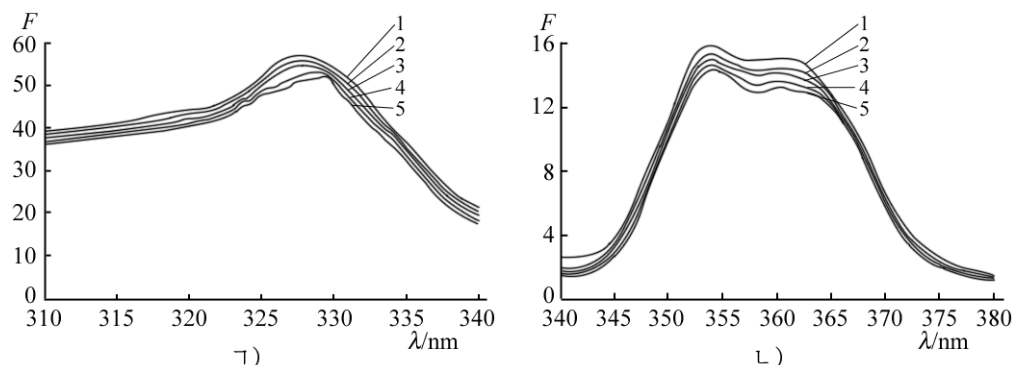


그림 2. ADR의 농도에 따르는 BSA의 동시러기형광스펙트르의 변화

γ)  $\Delta\lambda = 60\text{nm}$ 인 경우, λ)  $\Delta\lambda = 15\text{nm}$ 인 경우; BSA의 농도  $1.0 \cdot 10^{-6}\text{mol/L}$ , pH 7.4, 1-5는 ADR의 농도가 각각  $(1.0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6) \cdot 10^{-6}\text{mol/L}$ 일 때

그림 2의 λ)에서 보는바와 같이 티로진잔기의 최대형광파장은 변함없이 유지되고있지만 트립토판잔기의 최대형광파장은 적색변위(그림 2의 γ))되었다는것을 알게 되었다. 이것은 ADR의 주입으로 BSA의 구조에서 변화가 일어났으며 트립토판잔기가 놓여있는 환경의 소수성이 낮아지고 BSA내부의 소수성구조가 붕괴되어 펩티드사슬의 늘어짐정도가 높아졌다는것을 말해준다.

ADR분자는 2개의 부분구조령역, 즉 넓적한 안트라키논기원의 4환구조와 1개의 아민당고리구조로 이루어져있다.(그림 3) 안트라센고리의 공진계로 인하여 이 분자는 가시광선

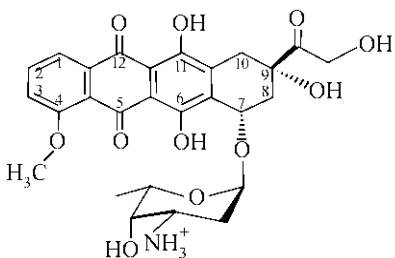


그림 3. ADR의 분자구조

령역에서 비교적 큰 빛흡수를 가지는데 최대흡수파장  $\lambda_{\text{최}} = 480\text{nm}$ 이다. 이 분자는 또한 빛을 받으면 형광을 낼 수 있다. ( $\lambda_{\text{최}} = 480\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{형}} = 555\text{nm}$ )

선행연구[4]에 의하면 ADR는 철과 화합물을 형성할 때 3개의 ADR분자에 있는 11-C, 12-C위치의 산소원자들이 6환고리를 형성하여 1개의  $\text{Fe}^{3+}$ 과 배위결합하게 된다. 이때 ADR의 안트라센고리부분의 공진계가 영향을 받는것으로 하여 ADR- $\text{Fe}^{3+}$ 화합물의 흡수스펙트르를 보면 480nm에

서의 흡수봉우리가 낮아지게 된다.

ADR가 DNA와 비공유결합을 형성할 때 안트라센고리부분이 DNA분자의 염기쌍사이에 삽입되고 DNA염기쌍 및 린산골격과 여러개의 수소결합을 형성하기때문에 ADR분자는 480nm에서 흡수봉우리가 낮아지면서 적색변위를 일으키게 되며 동시에 ADR의 형광세기는 현저히 약해지게 된다.

그러나 우리가 흡수스펙트르를 리용하여 ADR와 BSA의 결합작용을 연구한데 의하면 480nm에서의 흡수봉우리는 ADR와 BSA의 결합으로 인하여 결코 낮아지지 않았으며 ADR자체의 형광세기( $\lambda_{\text{최}} = 480\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{형}} = 555\text{nm}$ )도 결합작용의 영향을 받지 않았다. 이러한 결과는 ADR가 BSA와 결합한 후에 안트라센고리의 공진계는 영향을 받지 않았다는것을 보여주고있다.

결합반응계의 ADR를 아민당부분을 제거한 ADR로 치환시켜 진행한 실험에서 흡수스

펙트르결과는 아민당이 제거된 ADR는 220nm에서 BSA의 흡수봉우리세기를 약하게 한다는 것을 보여주었다.[5] 그리고 pH 7.4일 때 아민당이 제거된 ADR와 BSA호상작용의 형광스펙트르는 349nm에서의 상대형광세기가  $c_{\text{ADR}}$  와  $F_0/(F_0 - F)$  에서 선형관계에 있으며 이로부터 계산된 아민당이 제거된 ADR와 BSA결합반응의 결합상수는  $7.822 \times 10^3 \text{L/mol}$ 이었다. 이 결합상수값은 우리가 이미 결정[1]한 ADR와 BSA반응의 결합상수( $8.251 \times 10^4 \text{L/mol}$ , pH 7.4)에 비해보면 매우 작으며 이로부터 아민당이 제거된 ADR와 BSA결합작용은 ADR와 BSA결합보다 훨씬 약하다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과들은 ADR와 BSA의 결합에서 아민당기가 중요한 작용을 하고있다는 것을 말해주고있다.

연구결과들로부터 ADR와 BSA사이의 작용력은 소수성작용력이 기본이며 아민당기는 친수성원자단으로서 수소결합이나 정전기끌힘 등의 방식으로 BSA분자와 서로 결합될 경향성이 높는데 이러한 결합은 ADR의 소수성부분과 BSA분자사이에 소수성작용을 일으키는 데 도움을 줄것이라고 예측할 수 있다.

## 맺 는 말

1) 에네르기이행리론에 근거하여 ADR-BSA(약물-단백질)사이의 결합거리는  $r=3.83\text{nm}$ 로 계산되었다.

2) ADR-BSA(약물-단백질)사이의 결합은 소수성작용력에 의한 결합으로 예측할 수 있다.

## 참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 60, 10, 110, 주체103(2014).
- [2] P. Yang et al.; An Introduction Bioinorganic Chemistry, Xi'an Communications University Press, 152, 1991.
- [3] X. Z. Feng et al.; Chin. J. Anal. Chem., 26, 154, 1998.
- [4] J. J. Zhang et al.; Acta Biophys. Sinica, 15, 19, 1999.
- [5] W. Hen Ying et al.; J. Anal. Sci., 28, 4, 475, 2012.

주체104(2015)년 2월 5일 원고접수

## Binding Mode between Adriamycin and Bovine Serum Albumin

*Pak Yong Chol, Rim Pok Nam*

The binding distance  $r$  and transfer efficiency  $E$  between adriamycin (ADR) and bovine serum albumin (BSA) were obtained according to theory of Förster energy transfer. The effect of ADR on the conformation of BSA was also analyzed using synchronous fluorescence spectroscopy. The binding mode between ADR and BSA was discussed.

Key words: adriamycin, BSA, binding mode