

스펙트르분광법에 의한 아드리아미친과 소혈청알부민의 호상작용에 대한 연구

박영철, 림복남

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

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

아드리아미친(Adriamycin: ADR)은 림상에서 광범하게 리용되는 안트라키논류 항종양 항생소로서 백혈병, 유선암 및 각종 악성종양치료에서 높은 효과를 나타내고있다.[1] 혈청 알부민은 혈장속에 가장 많이 들어있는 단백질로서 많은 내원 및 외원화합물들과 결합할 수 있다. 혈청알부민과 항종양약물분자의 호상작용에 대한 연구는 체내에서 약물의 저장과 수송과정을 리해하는데 의의가 있는 문제로서 현재 세계적으로 광범히 연구[2-5]되고 있는 문제의 하나이다.

우리는 형광스펙트르법과 자외선흡수스펙트르법을 결합하여 서로 다른 산성조건하에서 ADR와 소혈청알부민(BSA)의 호상작용을 연구함으로써 반응의 결합상수, 결합부위수를 확정하였다.

기구, 시약 및 방법

시약 및 기구 ADR, BSA(《Sigma》), DTT(《Sigma》), Tris, 염산, 염화나트륨과 이수소린산나트륨, 일수소린산나트륨은 모두 분석순시약을 리용하였으며 실험용물로는 2차 무이온수를 리용하였다.

기구로는 분광광도계 《TU-1800PC》, 형광분광광도계 《LS-55》, pH미터 《420A》를 리용하였다.

실험방법 0.15mol/L의 NaCl용액으로 pH 5.1의 린산완충액을 조제하고 pH가 각각 7.4, 8.4인 Tris-HCl완충액을 조제한 다음 이 완충액들을 리용하여 BSA용액, ADR용액을 조제하였다.

자외선흡수스펙트르측정 BSA용액, ADR용액, 량적비가 1 : 1인 ADR-BSA결합물용액의 자외선흡수스펙트르를 각각 측정하였다.

형광스펙트르측정 1.0×10^{-6} mol/L의 BSA용액 3mL를 취하여 석영큐베트에 넣고 여기에 농도가 2.0×10^{-4} mol/L인 ADR용액을 미량주사기로 서서히 주입하면서 300-500nm 범위의 형광스펙트르를 측정하였다. (측정조건: 25°C, 러기과장 $\lambda_{ex} = 277$ nm)

ADR의 첨가체적은 실험점농도계산에 의하여 확정(루적되는 적정제의 총체적은 100 μ L 보다 작게)하였다.

결과 및 고찰

BSA와 ADR결합반응의 형광스펙트르변화 러기과장이 277nm일 때 ADR는 300—500nm의 범위내에서 형광이 없으며 BSA는 분자안에 있는 트립토판과 티로진잔기에 의한 내원형광을 산생시킨다. BSA의 량을 고정시키고 거기에 각이한 농도의 ADR용액을 적정첨가하였을 때 ADR의 농도가 증가하는데 따라 BSA의 내원형광이 규칙적으로 작아지는(떨어지는) 현상이 일어났다.(그림 1)

그림 1에서 보는바와 같이 ADR의 농도가 증가함에 따라 BSA의 형광세기는 점차적으로 작아지지만 봉우리위치는 변하지 않았다. 한편 ADR는 이 파장범위에서 형광을 주지 않는다. 이것은 BSA와 ADR사이에 호상작용이 있다는것을 말해주고있다.

BSA와 ADR결합반응의 형광소거과정의 확정 형광소거과정은 단백질과 소거제와의 호상작용을 밝히는데서 매우 중요한 역할을 한다.[2]

BSA와 ADR혼합물의 자외선흡수스펙트르를 측정한 결과는 그림 2와 같다.

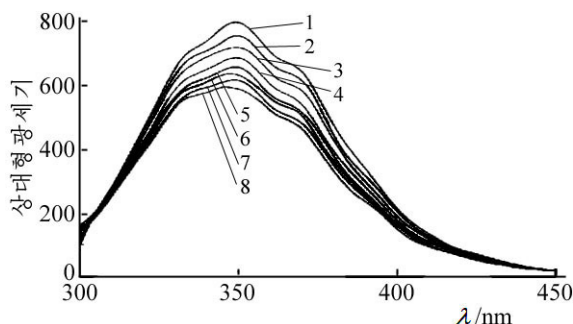


그림 1. BSA의 형광스펙트르에 대한 ADR의 영향

BSA의 농도 10^{-6} mol/L; $\lambda_{ex}=277$ nm, pH 7.4, 1—8은 ADR의 농도가 각각 0, $0.4 \cdot 10^{-6}$, $0.8 \cdot 10^{-6}$, $1.2 \cdot 10^{-6}$, $1.6 \cdot 10^{-6}$, $2.0 \cdot 10^{-6}$, $2.4 \cdot 10^{-6}$, $2.8 \cdot 10^{-6}$ mol/L일 때

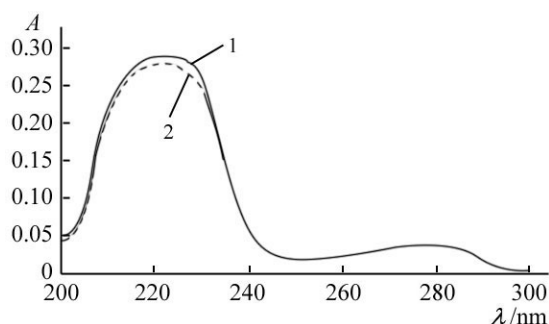


그림 2. BSA의 자외선흡수스펙트르에 대한 ADR의 영향

1—BSA의 흡수스펙트르, 2—BSA-ADR결합물과 ADR흡수스펙트르사이의 차, BSA의 농도 $1.0 \cdot 10^{-6}$ mol/L, ADR의 농도 $1.0 \cdot 10^{-6}$ mol/L

그림 2에서 보는바와 같이 220nm에서 최대흡수봉우리가 나타나는데 이 봉우리세기는 ADR를 첨가할 때 낮아진다. 이것은 BSA와 ADR분자들이 기저상태에서 호상작용하여 배위화합물을 형성하였으며 이로부터 BSA에서 자외선흡수스펙트르의 변화가 일어났다는것을 보여준다.

동적상태소거는 형광분자의 러기상태에만 영향을 줄뿐이며 형광물질의 흡수스펙트르를 변화시키지 못한다.[3] 그러므로 BSA에 대한 ADR의 형광소거물립새는 정적상태소거라고 확정할수 있다.

BSA와 ADR결합반응의 결합상수, 결합수결정 형광소거는 일반적으로 동적상태소거와 정적상태소거로 나눈다.

동적상태소거는 러기상태에서 소거제와 형광물질분자사이에 일어나는 호상작용과정인데 이 과정은 Stern-Volmer방정식에 따른다.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

여기서 F_0 , F 는 소거제를 첨가하지 않았을 때와 첨가하였을 때의 형광물질의 형광세기, K_q 는 소거과정에서 두 분자의 속도상수, τ_0 은 형광분자의 평균수명, $[Q]$ 는 소거제의 농도, K_{SV} 는 Stern-Volmer결합상수이다.

소거제와 형광물질분자가 기저상태에서 빛을 내지 않는 배위화합물을 형성할 때 형광물질의 형광세기가 내려가는 과정을 정적상태소거라고 한다.

약물분자와 단백질분자사이의 호상작용은 보통 부위결합모형을 리용하여 서술하는데 가령 단백질분자(P)위에 서로 같으면서도 독립적인 약물분자(Q)의 결합부위가 n 개 있다고 가정하고 단백질의 총농도는 $[P_t]$, 약물의 총농도는 $[Q_t]$, 단백질과 약물의 유리농도는 각각 $[P]$ 와 $[Q]$, 생성물은 Q_nP , 그 농도를 $[Q_nP]$ 라고 하면 단백질과 결합한 약물의 당량수는 $n[Q_nP]$ 로 된다.

결합상수를 K 라고 하면 Scat Chard방정식[3]에 따라

$$\frac{n[Q_nP]}{[Q]} = K \cdot n[P_t] - K \cdot n[Q_nP] \quad (2)$$

여기서 $[P] = [P_t] - [Q_nP]$, $[Q] = [Q_t] - n[Q_nP]$ 이므로 식 (2)로부터 결합상수 K 를 구하면[3]

$$K = \frac{n[Q_nP]}{[Q]n[P]} = \frac{[Q_nP]}{[Q][P]} \quad (3)$$

선정한 발광과장에서 반응계의 형광이 단백질분자에 의해서만 산생된다고 하면 $F_0/F = [P_t]/[P]$ 라고 할수 있다.

이에 근거하여 식을 유도하면

$$\frac{[Q_nP]}{[P]} = \frac{\{[P_t] - [P]\}}{[P]} = \frac{F_0 - F}{F} \quad (4)$$

$$[Q] = [Q_t] - n[Q_nP] = [Q_t] - n\{[P_t] - [P]\} = [Q_t] - n[P_t](1 - F/F_0) \quad (5)$$

식 (3)–(5)를 합하면

$$\frac{F_0}{F} = K[Q_t] \frac{F_0}{F_0 - F} - nK[P_t] \quad (6)$$

$[P_t]$ 를 일정하게 하고 $[Q_t]$ 를 변화시킬 때 이 식에 근거하여 결합반응의 결합상수와 결합부위수를 구할수 있다.

BSA에 대한 ADR의 형광소거과정이 정적소거과정이므로 측정한 때 형광스펙트르를 349nm에서의 상대형광세기에 따라 $c_{ADR} \frac{F_0}{(F_0 - F)}$ 에 대한 $\frac{F_0}{F}$ 의 선형검량선을 작성하여

표. ADR와 BSA의 결합상수, 결합부위수, 대응하는 직선의 상관결수

pH	$K/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1})$	n	R
5.1	5.758×10^4	0.997	0.997 7
7.4	8.251×10^4	0.963	0.990 6
8.4	2.220×10^5	1.002	0.996 2

약산성, 중성, 약알카리성조건에서 ADR와 BSA가 형성하는 복합물의 결합상수, 결합부위수, 대응하는 직선상관결수를 구하였다.(표)

표에서 보는바와 같이 ADR와 BSA가 작용할 때 결합수는 1개이며 pH값이 오르는데 따라 결합상수는 높아진다는것을 알수 있다.

맺 는 말

항종양항생소 아드리아미친(ADR)과 소혈청알부민(BSA)이 결합할 때 일어나는 두 물질의 형광소거과정은 정적상태소거라고 확정할수 있다.

ADR와 BSA가 결합할 때 결합부위는 1개이며 pH값이 오르는데 따라 결합상수는 높아지게 된다.

참 고 문 헌

- [1] R. C. Young et al.; J. Med., 305, 139, 1981.
- [2] S. M. Cutts et al.; Nucleic Acids Res., 23, 2450, 1995.
- [3] Y. Liang et al.; Thermochim. Acta, 351, 2, 2000.
- [4] H. Wen Ying et al.; Acta Chimica Sinica, 66, 21, 2365, 2008.
- [5] L. Lei et al.; Chinese J. App. Chem., 25, 1, 106, 2008.

주체103(2014)년 6월 5일 원고접수

Study on the Interaction between Adriamycin and Bovin Serum Albumin by Spectrometry

Pak Yong Chol, Rim Pok Nam

The binding reaction between adriamycin (ADR) and bovine serum albumin(BSA) was investigated by absorption spectrometry: quenching of BSA by ADR is a result of the formation of ADR-BSA complex. The equilibrium constant K and the number of binding sites n were measured at different pH by fluorescence quenching method.

Kew words: adriamycin, BSA