

光谱法研究 3H 吲哚季铵盐探针分子与牛血清蛋白的相互作用

徐同宽, 沈兴海*, 高宏成

北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

摘要 合成了一种新型的荧光探针分子 2-(对-十二烷基氨基)苯基-3,3-二甲基-5-乙酯基-3H-吲哚基-甲基-二十六烷基碘化铵, 并运用荧光光谱探讨它与牛血清蛋白的作用。结果表明, 探针分子与牛血清蛋白(BSA)的结合作用可使 3H 吲哚的荧光强度增强, 而对蛋白质却具有猝灭性质, 其结合常数和结合位点数分别为 $K_b = 1.995 \times 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $n = 1.12$ 。

关键词 取代 3H 吲哚季铵盐; 合成; 牛血清蛋白; 荧光光谱

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2005)06-0857-04

引言

取代 3H 吲哚季铵盐化合物是一种新型的荧光探针分子。它对所处微环境的变化具有很高的灵敏性, 是一类很好的用于研究微环境变化的探针分子^[1,2]。

在生物体系中, 蛋白质是必不可少的生命物质, 有关血清蛋白与各种荧光探针之间相互作用的研究是目前生命科学、化学和临床医学中共同关注的课题^[3,4]。人们分别研究了 1-苯胺基萘-8-磺酸(ANS)^[5]、5-N, N'-二甲胺基萘-1-磺酰氯(Dansyl-Cl)^[6]、11-[(5-二甲胺基萘基-1-磺酰基) 胺基] 十一酸(DAUDA)^[7]、曙红 B 和曙红 Y^[8]、考马斯亮蓝^[9]、Tb()^[10]、溴甲酚紫^[11]等荧光探针与牛血清蛋白的作用。同时

还有人研究了表面活性剂十二烷基磺酸钠^[12-14]、十六烷基三甲基氯化铵^[12]、聚乙二醇非离子表面活性剂^[14]等与牛血清蛋白的作用。一般认为, 阳离子和阴离子表面活性剂能改变蛋白质的结构, 起变性剂的作用, 而非离子表面活性剂则不能。本文合成了一种新型的取代 3H 吲哚季铵盐化合物, 即 2-(对-十二烷基氨基)苯基-3,3-二甲基-5-乙酯基-3H 吲哚基-甲基-二十六烷基碘化铵(见图 1 化合物 6), 并通过红外、核磁、质谱和元素分析进行了鉴定与表征。因为此化合物是一个连有荧光探针分子的季铵盐, 此类化合物与蛋白质的作用研究文献报道还很少, 我们利用光谱法初步研究了该化合物与牛血清蛋白在人体生理条件下的相互作用和猝灭性质, 测定了其结合常数和结合位点数。

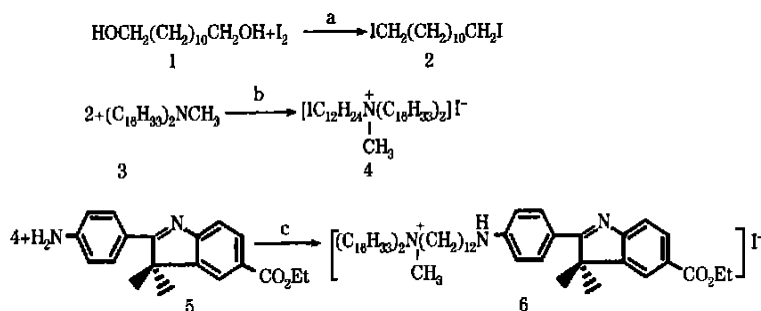


Fig. 1 Synthesis of substituted 3H indole quaternary ammonium salt

a, P_2O_5 , H_3PO_4 ; b, CH_3CN ; c, HMPA

收稿日期: 2003-10-28, 修订日期: 2004-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(90206020, 29901001)资助项目

作者简介: 徐同宽, 1969年生, 北京大学化学与分子工程学院博士研究生 * 通讯联系人

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

吗啉、异丁醛、对甲苯磺酸、三乙胺、对硝基苯胍 (ACROS)、三氯化钛、对硝基苯甲酰氯、碘化钾、1,12-月桂二醇 (Aldrich) 均为分析纯试剂; 双十六烷基甲基叔胺 (江苏飞翔化工厂), 化学纯; 牛血清蛋白 (北京双旋微生物培养基制品厂), 电泳纯。

Bruker Vector22 傅里叶变换红外 (FTIR); Varian (300 MHz) 核磁共振仪; Bruker Proflex 型质谱仪; Flash EA 1112 型元素分析仪; Hitachi F-4500 型荧光光度计。

1.2 2-(对-十二烷基氨基) 苯基-3,3-二甲基-5-乙酯基-3H-咪唑基-甲基-二-十六烷基碘化铵的合成

合成路线如图 1 所示, 其初步结果见文献 [15], 合成步骤如下:

(1) 在装有自动搅拌装置、温度计和回流冷凝管的 150 mL 三口瓶中, 加入 5 g 二碘代十二烷烃, 溶解在 50 mL 乙腈和丙酮 (体积比 9:1) 的混合溶剂中, 在氮气保护和 40 °C 下滴加双十六烷基叔胺 3 g (溶解在 20 mL 乙腈中), 滴加完毕后, 加热回流反应 18 h, 冷却后, 旋干溶剂, 用二氯甲烷/甲醇的混合溶剂 (体积比 10:1) 进行柱色谱硅胶柱分离, 所得产品再用丙酮重结晶, 得白色固体 4.5 g。白色晶体, *m. p.* (59 ~ 62) °C, 3.5 g (79.7%)。IR (KBr) : 3 451, 2 917, 2 849, 1 470, 1 165, 717 cm^{-1} 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 0.881 (*t*, 6H, $-\text{CH}_3$), 1.240 ~ 2 (m, 76H, $-\text{CH}_2-$), 3.194 (*t*, 2H, ICH_2-), 3.316 (*s*, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.461 (*t*, 6H, $-\text{CH}_2\text{N}$), ppm. MS *m/z*: 774 ($\text{M}^+ - 1 + 1$)。

(2) 在装有自动搅拌装置、温度计和回流冷凝管的 50 mL 三口瓶中, 加入 1 g 3H-咪唑化合物, 溶解在 10 mL 六甲基磷酸三胺 (HMPA) 中, 再加入 0.7 g 碳酸氢钠, 在氮气保护下搅拌 10 min 后, 滴加 2 g 季铵盐化合物 (溶解在 10 mL HMPA 中), 加热到 80 °C 反应 24 h, 冷却后, 减压蒸馏除去溶剂, 再用 1 500 mL 石油醚与 100 mL 乙酸乙酯混合溶剂溶解, 用 20 × 100 mL 蒸馏水萃取, 用二氯甲烷/甲醇的混合溶剂 (体积比 10:1) 进行柱色谱硅胶柱分离, 所得产品再用丙酮重结晶, 得 1.1 g 黄色固体。*m. p.* (39 ~ 42) °C, 0.56 g (46.3%)。IR (KBr) : 3 462, 2 919, 2 851, 1 711, 1 605, 1 467, 1 232, 1 167, 720 cm^{-1} 。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) : 0.877 (*t*, 9H, $-\text{CH}_3$), 1.252 ~ 2 (m, 82H, $-\text{CH}_2-$), 3.212 ~ 3.449 (m, 12H, $-\text{CH}_2\text{N}$), 4.351 (*q*, 2H, $-\text{OCH}_2-$), 6.687 (*d*, 2H, *ph-H*), 7.782 (*d*, 1H, *ph-H*), 8.051 (*m*, 3H, *ph-H*), 8.359 (*s*, 1H, *ph-H*), ppm. MS *m/z*: 955 ($\text{M}^+ - 1 + 1$)。Elemental analysis ($\text{C}_{64}\text{H}_{112}\text{N}_3\text{O}_2\text{I} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$): Found, C 69.25, H 10.86, N 3.53; Cal.: C 69.31, H 10.38, N 3.79。

1.3 实验方法

配制化合物 6 的甲醇储备液备用。配制 0.5 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (pH 7.4) 和 0.9% 的生理盐水。测定方法: 在 5 mL 容量瓶中依次加入咪唑探针分子、0.5 mL 缓冲溶液、

BSA 溶液, 再用生理盐水定容, 测定。

2 结果与讨论

2.1 BSA 对 3H-咪唑季铵盐荧光的影响

在 3H-咪唑季铵盐溶液中加入 BSA 会使其荧光增强, 但其最大峰位移和峰形没有明显变化 (如图 2 所示)。从图 3 可以看出, 最初加入 BSA 荧光增强非常明显, 后来逐渐趋于平缓。

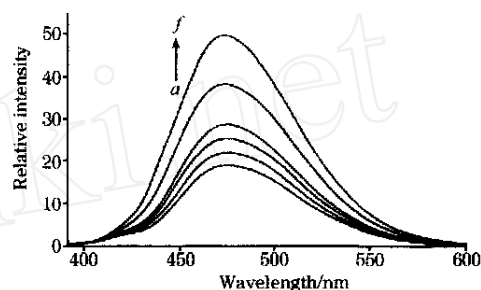


Fig. 2 Fluorescence spectra of compound 6 ($2 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) in the presence of BSA a, 0; b, $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; c, $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; d, $3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; e, $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; f, $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $E_x = 365 \text{ nm}$

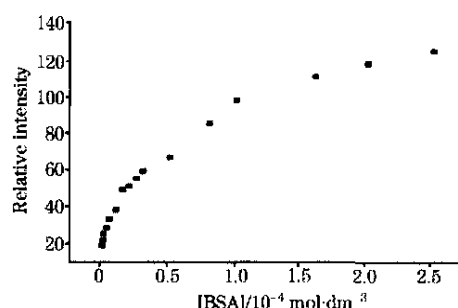


Fig. 3 Plot of the relative fluorescence intensity of compound 6 vs [BSA]. $E_x = 365 \text{ nm}$, $E_m = 475 \text{ nm}$

2.2 取代 3H-咪唑季铵盐对牛血清蛋白的猝灭作用

在牛血清蛋白溶液中加入取代 3H-咪唑季铵盐, 其荧光强度会逐渐降低, 从图 4 中可以看出, 其最大峰位红移, 说明色氨酸的极性变小, 蛋白质的构象发生了改变, 趋向于更加疏水。

牛血清蛋白由于色氨酸、酪氨酸的存在使其具有内源荧光。随着加入 3H-咪唑季铵盐浓度的增加, 白蛋白的内源荧光有规律地降低, 说明 3H-咪唑季铵盐对牛血清蛋白具有猝灭作用 (如图 4 所示)。

外加分子与荧光体分子相互作用引起荧光强度降低的现象称为荧光猝灭, 分为动态和静态猝灭。Stern Volmer 方程:

$$F_0/F = 1 + K_v [\text{In}] \quad (1)$$

其中 F_0 , F 为没加荧光猝灭分子和加入荧光猝灭分子时 343

nm 荧光峰的强度, K_{sv} 为猝灭常数, $[In]$ 为吡啶季铵盐浓度。以 F_0/F 对 $[In]$ 作图可得直线 (见图 5), 由斜率可得 K_{sv} 为 $5.16 \times 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 。

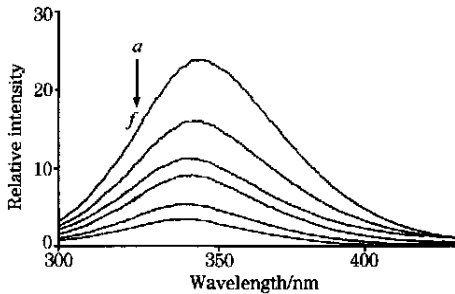


Fig. 4 Fluorescence spectra of BSA ($1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) in the presence of compound 6: a, 0; b, $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; c, $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; d, $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; e, $6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; f, $8 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $E_x = 280 \text{ nm}$

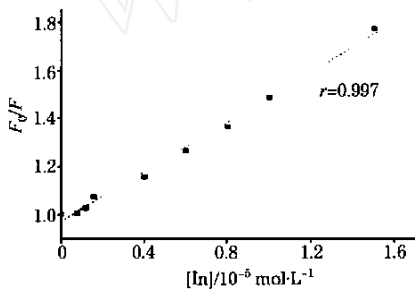


Fig. 5 Stern Volmer plot of F_0/F vs $[In]$

为验证其猝灭类型, 将此过程按动态过程处理, 则

$$K_{sv} = k_q \tau_0 \quad (2)$$

其中, k_q 为双分子猝灭过程速率常数, τ_0 为猝灭体不存在时荧光分子平均寿命。由于生物大分子荧光寿命约为 $10^{-8} \text{ s}^{[16]}$, 所以由方程 (2) 可得 k_q 为 $5.16 \times 10^{12} \text{ dm}^3 \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}$ 。而各类猝灭剂对生物分子的最大碰撞猝灭过程速率常数为 $2.0 \times 10^{10} \text{ dm}^3 \cdot (\text{mol} \cdot \text{s})^{-1}^{[16]}$, 所以反证以上猝灭为静态猝灭。

2.3 结合数和结合常数

对于静态猝灭过程, 荧光强度与猝灭剂的关系可由荧光分子与猝灭剂分子之间的结合常数表达式推导求出^[3]。设生物大分子 BSA 和 3H 吡啶季铵盐 In 有 n 个相同且独立的结合位点, 则两者间的猝灭反应可表示为



其相应的结合常数 K_a 为:

$$K_a = \frac{[In_nBSA]}{[In]^n [BSA]} \quad (4)$$

式中 $[BSA]$ 为游离荧光体浓度, $[In_nBSA]$ 是配合物浓度, 若荧光体总浓度为 $[BSA]_0$, 则 $[BSA]_0 = [In_nBSA] + [BSA]$, 代入 (4) 式得:

$$K_a = \frac{[BSA]_0 - [BSA]}{[In]^n [BSA]} \quad (5)$$

在静态猝灭中, 荧光体系的荧光强度 F 与其游离浓度成正比 (所生成的配合物是非荧光性的)

$$\frac{[BSA]}{[BSA]_0} = \frac{F}{F_0} \quad (6)$$

由 (5) 和 (6), 可得

$$\lg \frac{(F_0 - F)}{F} = \lg K_a + n \lg [In] \quad (7)$$

当加入的 3H 吡啶季铵盐足够多时, 加入的 3H 吡啶季铵盐远远大于结合的 3H 吡啶季铵盐, 即 $[In]_0 \gg [In_nBSA]$ 时, 近似地用 $[In]_0$ 来代替 $[In]$ (见图 6)。对其中线性部分拟合, 求得 3H 吡啶季铵盐与白蛋白分子的结合常数 K_a 及结合位点数 n $K_a = 1.995 \times 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, $n = 1.12$ 。由于低浓度不满足 $[In]_0 \gg [In_nBSA]$, 所以偏离直线较大。

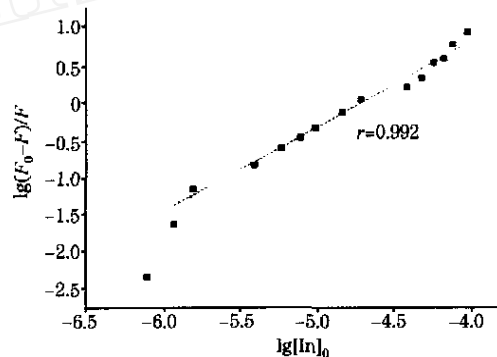


Fig. 6 Plot of $\lg(F_0 - F)/F$ vs $\lg [In]_0$

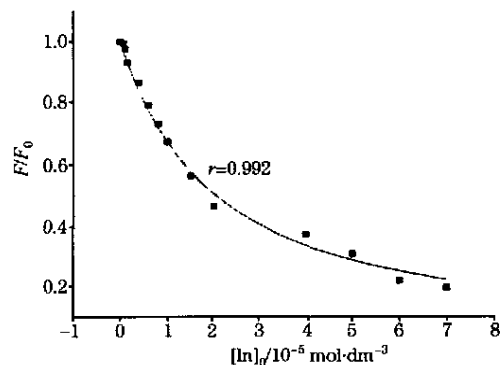


Fig. 7 Langmuir plot of F/F_0 vs $[In]_0$

对 3H 吡啶季铵盐分子与牛血清蛋白的作用过程, 用 Langmuir 吸附等温式处理, 则覆盖率为

$$\begin{aligned} &= \frac{k_1 [In]_0}{k_{-1} + k_1 [In]_0} = \frac{K [In]_0}{1 + K [In]_0} \end{aligned} \quad (8)$$

式中 k_1 , k_{-1} , K 分别为吸附、解吸速率常数和吸附平衡常数。覆盖率为被结合的蛋白分子占总蛋白的比率, 即

$$= \frac{[BSA]_0 - [BSA]}{[BSA]_0} = \frac{F_0 - F}{F_0} \quad (9)$$

由公式(8)和(9)可推得

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K[\text{In}]_0} \quad (10)$$

根据公式(10)拟合数据(见图7),得到吸附常数 $K = 4.84 \times 10^4 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ 。此值与 K_a 有一定偏差,可能是由于所用的模

型不同所致。

关于 3H 吡啶以及其他几种吡啶季铵盐与蛋白质的作用正在研究之中,希望通过这些研究,能够得到更多关于此类连有季铵盐的荧光探针分子与蛋白质作用的信息。

参 考 文 献

- [1] LI Jian, SHEN Xinghai, GAO Hongcheng. *Chemical Physics Letters*, 2001, 342: 529.
- [2] LI Jian, SHEN Xing-hai, GAO Hong-cheng, YE Jian-ping(李 健, 沈兴海, 高宏成, 叶建平). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(4): 508.
- [3] Gao Qiu'e, Ding Zhongtao, Fang Ruibin, et al. *Analyst*, 2001, 126: 1444.
- [4] YI Ping-gui, LIU Jun-feng, SHANG Zhi-cai, YU Qing-sen(易平贵, 刘俊峰, 商志才, 俞庆森). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(6): 826.
- [5] Avdulov N, Chochina J, Daragan V, et al. *Biochem.*, 1996, 35: 340.
- [6] Wilton D. *Biochem. J.*, 1990, 270: 163.
- [7] Takeda K, Yoshida I, Yamamoto K. *J. Protein Chem.*, 1991, 10: 17.
- [8] Waheed A, Rao K, Gupta P. *Anal. Biochem.*, 2000, 287: 73.
- [9] Silber M, Davitt B. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2000, 30: 209.
- [10] Jin Y, Li W, Wang Q. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, 177: 474.
- [11] Nakamaru Y, Sato C. *Biochem. Biophys. Acta*, 2000, 1480: 321.
- [12] Celamó E, Silva C, Imasato H, et al. *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1594: 84.
- [13] Deep S, Ahluwalia J. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2001, 3: 4583.
- [14] Vasilescu M, Angelescu D. *Langmuir*, 1999, 15: 2635.
- [15] XU Tong-kuan, SHEN Xing-hai, GAO Hong-cheng(徐同宽, 沈兴海, 高宏成). *Chinese Chemical Letters*, pressed.
- [16] ZHANG Hai-rong, GUO Si-yuan, LI Lin, CAI Miao-yan, JIN Wei-jun, et al(张海容, 郭祀远, 李 琳, 蔡妙颜, 晋卫军, 等). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2001, 21(6): 829.

Synthesis of Substituted 3H Indole Quaternary Ammonium Salt and Study on Its Interaction with Bovine Serum Albumin by Fluorescence

XU Tong-kuan, SHEN Xing-hai*, GAO Hong-cheng

College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

Abstract A substituted 3H-indole quaternary ammonium molecule was designed and synthesized using hexamethylphosphoramide (HMPA) as a solvent. The products were purified and characterized by IR, $^1\text{H-NMR}$, MS and elemental analysis. The binding reaction of this compound with bovine serum albumin (BSA) in aqueous solution was studied using fluorescence. Their binding constant is $K_a = 1.995 \times 10^5 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ and the binding site number is $n = 1.12$. It is confirmed that the combination is a single static quenching process.

Keywords Substituted 3H-indole quaternary ammonium molecule; Synthesis; BSA; Fluorescence

(Received Oct. 28, 2003; accepted Jan. 8, 2004)

*Corresponding author