

毛细管区带电泳法测定 4 种抗 HIV-1 活性的化合物与牛血清白蛋白的结合常数

丁 里¹, 张新祥¹, 常文保¹, 林 伟², 杨 铭²

(1. 北京大学化学学院, 北京 100871; 2. 北京大学医学部 天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100083)

摘要 :采用毛细管区带电泳紫外检测方法,在 pH 8.0、浓度 50 mmol/L 的磷酸盐缓冲溶液及运行电压 15 kV 的条件下,测定了 4 种新合成的具有抗 HIV-1 活性的化合物(IG₃, iso-C₃, C₃, MC₃)与牛血清白蛋白(BSA)相互作用的结合常数。在缓冲溶液中加入不同浓度的 BSA,通过测定化合物迁移时间的变化,计算得到了上述 4 种化合物与 BSA 的结合常数分别为 1.07×10^4 , 1.34×10^4 , 8.51×10^3 和 9.45×10^3 L/mol。该方法简单、快捷,可用于研究结合比为 1:1 的小分子与生物大分子的相互作用。

关键词 :毛细管区带电泳;结合常数;抗 HIV-1 活性化合物;牛血清白蛋白;相互作用

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2004)06-0624-03

Determination of the Binding Constants of Four Anti-HIV-1 Active Compounds with Bovine Serum Albumin by Capillary Zone Electrophoresis

DING Li¹, ZHANG Xin-Xiang¹, CHANG Wenbao¹, LIN Wei², YANG Ming²

(1. College of Chemistry, Peking University, Beijing 100871, China; 2. National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract :The binding constants (K_b) of four novel anti-HIV-1 active compounds with bovine serum albumin (BSA) were determined by capillary zone electrophoresis (CZE) with UV detection under condition of phosphate buffer (pH 8.0, 50 mmol/L) at 15 kV running voltage. These molecules were synthesized by computer-simulated design with the property of inhibiting the binding of HIV-1 Tat protein to *trans*-activation response region (TAR) RNA required for HIV-1 transcription and blocking the HIV replication cycle. The results showed that with the addition of different concentrations of BSA into the buffer solution, the binding constants of four active compounds (IG₃, iso-C₃, C₃, MC₃) with BSA could be measured by the change of migration time. The experimental values of K_b were 1.07×10^4 , 1.34×10^4 , 8.51×10^3 and 9.45×10^3 L/mol, respectively. It is an easy and simple method to estimate the interaction of small molecules with biomacromolecules with 1:1 molar binding ratio.

Key words : capillary zone electrophoresis; binding constant; anti-HIV-1 active compounds; bovine serum albumin; interaction

生物分子间的非共价特异性相互作用广泛地存在于自然界中,而相应的结合常数 K_b 是结合研究中最重要参数,对揭示生物化学作用机理、药物研究具有重要意义。毛细管电泳(CE)作为一种新型分离技术,已广泛应用于包括蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸、蛋白质-药物、蛋白质-碳水化合物、酶-底物、抗原-抗体等各种亲和体系的分离和分析^[1,2]。

与传统的测定结合常数的电位法、平衡透析法、光度法、高效液相色谱法等^[3-6]相比,CE用于分子间相互作用的研究具有以下优点:分析速度快,分离效率高,样品用量少(nmol级),对受体的纯度要求不高,可在溶液中进行,可保持生物分子相互作用所需要的生理条件,更接近体内的结合行为,有多种模式可供选择,适用于各种亲和体系等^[2,7,8]。

收稿日期 2004-01-08

作者简介:丁 里,女,博士研究生。

通讯联系人:张新祥,男,教授,博士生导师, Tel (010)62754680, E-mail zxx@pku.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 20075003 和 30370323)。

药物与生物大分子之间相互作用的研究一直是生命科学领域重要的研究主题,其中结合位点和结合常数能为小分子在人体内的运输和代谢过程提供重要的信息^[3,5,9]。药物与蛋白质的相互作用对药物在体内的分布、清除、活性、毒性等都有重要的影响^[10,11]。在早期的药物研究中,对药物与血清白蛋白的结合进行表征具有非常重要的意义。已有人采用CE法研究和测定药物与血清白蛋白的相互作用及结合常数^[1-4,7,12-16]。本文作者基于近期阐明的艾滋病病毒(HIV)基因表达调控的分子生物学机制^[17,18],选择了HIV Tat(*trans*-activator of transcription)蛋白与HIV TAR(*trans*-activation response region)核糖核酸(RNA)的结合激活病毒转录这样一个关键环节,以HIV TAR RNA为新的靶标,基于计算机辅助模拟设计,合成了两类新型HIV抑制剂——异喹啉类生物碱IG₃、iso-C₃和β-咪唑啉类生物碱C₃、MC₃。前期的研究表明,上述4种化合物均可与TAR RNA发生特异性结合,有效地抑制病毒转录的激活^[19]。本文采用毛细管区带电泳,通过测定在不同浓度牛血清白蛋白(BSA)的缓冲溶液条件下化合物迁移时间的变化,得到了4种抗HIV-1活性化合物与BSA相互作用的结合常数,对活性化合物进一步的药理研究具有重要意义。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

4种抗HIV-1活性化合物均由北京大学医学部天然药物与仿生药物国家重点实验室提供。IG₃(M_r = 271)为3位取代的胍基-丙基-甲酰胺基异喹啉; iso-C₃(M_r = 229)为3位取代的丙氨基-甲酰胺基异喹啉; C₃(M_r = 268)为3位取代的丙氨基-甲酰胺基-β-咪唑啉; MC₃(M_r = 282)为3位取代的丙氨基-甲酰胺基-β-甲基咪唑啉。BSA(M_r = 66 000)购自Sigma(St. Louis, MO, USA)。其他均为市售分析纯试剂,水为二次去离子水。Beckman P/ACE 5000毛细管电泳仪,紫外检测器;未涂渍石英毛细管50 μm i. d. × 57 cm(有效长度50 cm,河北永年光纤厂)。

1.2 实验条件及操作

以50 mmol/L磷酸盐溶液(pH 8.0)为运行缓冲溶液,使用前经0.22 μm微孔滤膜过滤;活性化合物储备液由中性磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 7.4, 灭菌)配制,实验前用运行缓冲溶液稀释IG₃、iso-C₃、C₃和MC₃浓度分别为0.37、0.46、0.56和0.44 mmol/L;将二甲基亚砜(DMSO)作为中性标记物,其在样品中的浓度为0.1%(体积分数);将BSA溶于运行缓冲溶液中,配制成0.005、0.010、0.015、

0.020、0.025、0.030、0.035 mmol/L的系列浓度。

温度20.0℃,操作电压15 kV;检测波长214 nm;进样压力3.4 kPa;进样时间10 s;每次运行前,将毛细管先用0.2 mol/L NaOH溶液冲洗2 min,再用去离子水冲洗1 min,用运行缓冲溶液冲洗2 min,然后进样。每份样品均平行分析3次。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的优化

考虑到本实验研究的是具有抗HIV-1活性的化合物在生理条件下(pH 6.0~8.0)与BSA的相互作用,因此选择了磷酸盐缓冲溶液,分别考察其pH值和浓度对化合物分离情况的影响。综合考虑电渗流、电荷和离子强度等因素的影响,最终选择pH 8.0、浓度为50 mmol/L的磷酸盐缓冲体系。另外还考察了不同电压下化合物的分离情况。综合考虑分离度和热效应的影响,选择操作电压为15 kV。

2.2 抗HIV-1活性的化合物与BSA的相互作用

2.2.1 定性分析

以IG₃和iso-C₃为例,在所选择的pH条件下,由于它们的结构相似,因此其电泳性质相近,在缓冲溶液中无BSA存在时二者几乎完全重叠(见图1-a)。而加入BSA后,它们的分离情况得到明显改善。随着BSA浓度的增加,其迁移时间均逐渐延长,说明它们与BSA发生了相互作用,同时IG₃和iso-C₃迁移时间的差别也逐渐增大(见图1-b, c, d),显然这种差别是由于它们与BSA的结合能力不同所致。C₃和MC₃的情况与IG₃和iso-C₃相同。

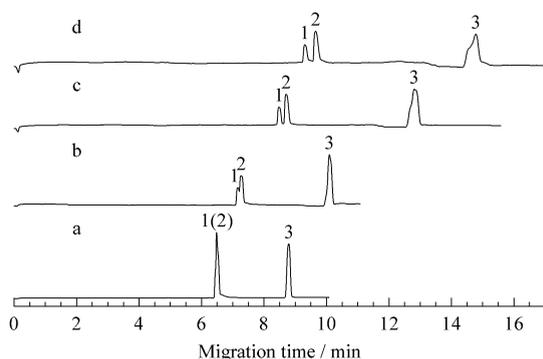


图1 IG₃和iso-C₃的毛细管电泳图

Fig. 1 Electropherograms of IG₃ and iso-C₃

The concentrations of BSA in buffer solution: a. 0; b. 0.010 mmol/L; c. 0.020 mmol/L; d. 0.030 mmol/L.

Peaks: 1. iso-C₃; 2. IG₃; 3. dimethylsulfoxide (DMSO).

2.2.2 定量分析

为了简化计算,建立了一种简单模型,即假设化合物与蛋白质的结合比为1:1。将蛋白质加入缓冲溶液中,化合物进样后在毛细管区带中与蛋白质发

生相互作用 ,快速达到以下平衡 :



$$K_b = [MP] / ([M][P]) \quad (2)$$

其中 K_b 为化合物与蛋白质的结合常数 $[M]$ 和 $[P]$ 分别为平衡体系中游离化合物 M 和游离蛋白质 P 的浓度 $[MP]$ 为化合物与蛋白质结合得到的复合物的浓度。

Yang 等^[20]依据色谱原理推导出 :

$$k = (\varphi \cdot [M]_s / [M]_{m0}) \cdot (1 + K_b[P]) \quad (3)$$

其中 k 为保留因子 φ 为相比 (V_s/V_m) s 和 m 分别代表固相和液相。 k 可通过实验数据计算得到 :

$$k = (t - t_0) / t_0 \quad (4)$$

其中 t 和 t_0 分别为化合物和中性标记物的保留时间。根据方程 (3) 作 $k-[P]$ 图 ,得直线的斜率为 a ,截距为 b ,计算得 :

$$K_b = a/b \quad (5)$$

本实验以 DMSO 为中性标记物 ,测定了在不同 BSA 浓度的缓冲溶液条件下 4 种化合物的迁移时间 ,其相对标准偏差 (RSD) 为 0.03% ~ 1.1% ,重现性良好 ,说明该方法准确、可靠。根据方程 (4) 进行数据处理 ,作 $k-[BSA]$ 图 ,分别得到 4 种化合物与 BSA 相互作用的线性关系 (见图 2) 。应用方程 (5) 计算出相应的结合常数 ,计算结果见表 1。

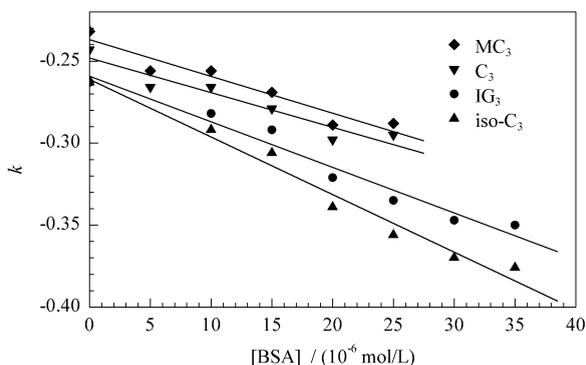


图 2 k 与 BSA 浓度的线性关系图

Fig.2 Relationships between k with the concentration of BSA

表 1 4 种抗 HIV-1 活性化合物与 BSA 相互作用的结合常数

Table 1 Binding constants of four anti-HIV-1 active compounds with BSA

Compound	$a/10^3$	b	r^2	$K_b/(10^3 \text{ L/mol})$
IG ₃	-2.78	-0.259	0.963	10.7
iso-C ₃	-3.50	-0.261	0.976	13.4
C ₃	-2.11	-0.248	0.913	8.51
MC ₃	-2.24	-0.237	0.925	9.45

实验表明 ,上述 4 种化合物与 BSA 均发生了一定程度的相互作用 ,并且由于它们结构的相似性 ,使得其与 BSA 的结合常数都在 $10^3 \sim 10^4 \text{ L/mol}$ 数量级。由表 1 中可看出 4 条回归直线的线性相关系数 r^2 均大于 0.9 ,说明本实验所作的化合物与 BSA

的结合比为 1:1 以及化合物的保留行为与色谱方法中相似的假设是合理的 ,采用的计算方法适用于结合比为 1:1 的快速平衡体系。若体系在分析时间内不能达到平衡 ,测定结果的重现性将会降低 ,故此法不适于达到平衡慢或者相互作用很弱的体系。

3 结论

本文利用毛细管区带电泳法 ,通过测定分析物的迁移时间 ,计算得到了 4 种新合成的具有抗 HIV 活性的化合物与 BSA 的结合常数均为 $10^3 \sim 10^4 \text{ L/mol}$ 数量级 ,在对活性化合物进行进一步的药理研究方面具有重要意义。该方法简单、快捷 ,准确性和重现性均良好 ,在研究小分子与生物大分子的弱相互作用方面具有广阔的应用前景。

参考文献 :

- [1] Busch M H A , Boelens H F M , Kraak J C , Poppe H. J Chromatogr A , 1997 , 775 : 313
- [2] Tanaka Y , Terabe S. J Chromatogr B , 2002 , 768 : 81
- [3] Jia Z J , Ramstad T , Zhong M. J Pharm Biomed Anal , 2002 , 30 : 405
- [4] Zhao Yanfang , Fu Chonggang , Liu Ailin. Chinese Journal of Chromatography (赵艳芳 , 傅崇岗 , 刘爱林. 色谱) , 2003 , 21(2) : 126
- [5] Örnskov E , Linusson A , Folestad S. J Pharm Biomed Anal , 2003 , 33 : 379
- [6] Wang Qinggang , Luo Guoan , Yang Shubiao. Chemical Journal of Chinese Universities (王清刚 , 罗国安 , 杨树标. 高等学校化学学报) , 1999 , 20(10) : 1551
- [7] Wang Qinggang , Luo Guoan. Chinese Journal of Analytical Chemistry (王清刚 , 罗国安. 分析化学) , 1997 , 25(11) : 1348
- [8] Ding Yongsheng , Zhu Xiaofeng , Lin Bingcheng. Chinese Journal of Chromatography (丁永生 , 朱晓峰 , 林炳承. 色谱) , 1999 , 17(2) : 138
- [9] Zhang W B , Zhang L H , Ping G C , Zhang Y K , Kettrup A. J Chromatogr B , 2002 , 768 : 211
- [10] Hage D S , Tweed S A. J Chromatogr B , 1997 , 699 : 499
- [11] Hideyuki K. Anal Chim Acta , 1999 , 383 : 61
- [12] Busch M H A , Garels L B , Boelens H F M , Kraak J C , Poppe H. J Chromatogr A , 1997 , 777 : 311
- [13] Heintz J , Hernandez M , Gomez F A. J Chromatogr A , 1999 , 840 : 261
- [14] Guo Baoyuan , Xia Zhining , Chen Guohua , Yin Yongguang , Xu Hongmei. Chinese Journal of Chromatography (郭宝元 , 夏之宁 , 陈国华 , 阴永光 , 徐红梅. 色谱) , 2003 , 21(4) : 367
- [15] Ding Yongsheng , Zhu Xiaofeng , Lin Bingcheng. Chinese Journal of Chromatography (丁永生 , 朱晓峰 , 林炳承. 色谱) , 1999 , 17(1) : 58
- [16] Østergaard J , Schou C , Larsen C , Heegaard N H H. Electrophoresis , 2002 , 23 : 2842
- [17] Hamy F , Gelus N , Zeller M , Lazdins J L , Bailly C , Klimkait T. Chem Biol , 2000 , 7 : 669
- [18] Terreur R , Pairet S , Cabrol-Bass D , Patino N , Condom R J. Mol Graphics Modell , 2001 , 19 : 579
- [19] Yu X L , Lin W , Li J Y , Yang M. Bioorg Med Chem Lett , 2004 , 14(12) : 3127
- [20] Yang Y , Liu X X , Zhang X X , Korenaga T. Anal Sci , 2001 , 17 : 345