

亲和毛细管电泳法测定牛血清白蛋白和加替沙星的结合常数

姚 之¹, 张浩波¹, 武 艺¹, 郭怀忠^{1, 2}

(1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072 ; 2. 河北大学药学院, 河北 保定 071002)

摘要 :利用亲和毛细管电泳法对牛血清白蛋白(BSA)与加替沙星(GT)间的结合反应及其相互作用做了初步探索 ,并应用淌度比(M)作为指标测定了两者的结合常数。以 20 mmol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液作为运行缓冲液 ,分别以 GT 和 BSA 作为添加剂 ,另一组分为进样样品 ,内标为二甲基甲酰胺 ,于 214 nm 波长下检测。两种测定条件下得到的结合常数分别为 4.4×10^4 L/mol 和 4.2×10^4 L/mol ,与传统的荧光淬灭法测得的结果基本一致。该方法具有简单、高效的优点。

关键词 :亲和毛细管电泳 ;牛血清白蛋白 ;加替沙星 ;结合常数

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2007)06-0930-04 栏目类别 :研究论文

Determination of the Binding Constant of Bovine Serum Albumin and Gatifloxacin Using Affinity Capillary Electrophoresis

YAO Zhi¹, ZHANG Haobo¹, WU Yi¹, GUO Huaizhong^{1, 2}

(1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China ;

2. College of Pharmaceutical Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China)

Abstract :The interaction between bovine serum albumin (BSA) and gatifloxacin (GT) was investigated using affinity capillary electrophoresis (ACE) method , mobility-shift method. The mobility ratio of the internal standard and the sample was used to calculate the binding constant K_b of bovine serum albumin and gatifloxacin. At first , 20 mmol/L , pH 7.4 sodium phosphate buffer solution (PBS) added with 0 – 1 000 μ mol/L GT as running buffer was used , BSA as the sample was used. K_b calculated from this experiment was 4.4×10^4 L/mol. Then 0 – 12.5 μ mol/L BSA was used as an additive to do the ACE experiment , the K_b obtained was 4.2×10^4 L/mol. The two values matched well with each other. In order to improve the shape of the peak and restrain the adsorption of BSA to the internal wall of the quartz column , in the second method , 0.25 mol/L Gly and 0.5 mmol/L ethylenediamine tetracetate (EDTA) were added to the running buffer , and 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution was used to rinse the column. Satisfactory effect was obtained. The K_b from fluorescence method was also calculated with a value of 2.7×10^4 L/mol. This work demonstrated that the determination of the binding constant by ACE is simple with high performance.

Key words : affinity capillary electrophoresis (ACE) ; bovine serum albumin (BSA) ; gatifloxacin ; binding constant

非共价分子间的相互作用广泛存在于自然界中 ,它们之间的结合常数(K_b)是结合研究中的一个重要参数。血液中的游离药物浓度可反映出药物在体内的分布、利用情况 ,而血清白蛋白是血浆中含量最丰富的载体蛋白^[1]。因此 ,测定血清白蛋白和药物间的结合常数对药物开发具有重要的理论和现实意义。

目前研究药物与血清白蛋白之间的结合常数的

常用方法有紫外光谱法、荧光光谱法、红外光谱法、电化学法、高效液相色谱法等^[2]。传统方法在测定过程中存在诸如耗时、样品用量大、操作不便等缺点。而上世纪 90 年代初兴起的毛细管电泳的一个重要分支——亲和毛细管电泳法^[3](affinity capillary electrophoresis ,ACE)以其消耗样品量少、分析过程快速灵敏、自动化程度高等优点 ,被越来越多

地应用在药物与血清白蛋白间的结合常数的研究中^[4]。ACE 测定药物-蛋白相互作用结合常数的方法有多种,其中应用较广的是淌度移动法(mobility-shift method)^[5]。它的基本原理为固定其中一种物质(被测组分 X 作为样品)的浓度,通过改变运行缓冲液中作为添加剂的另一种物质的浓度,使被测组分的淌度发生变化,由被测组分淌度的变化与添加剂浓度的变化之间的关系,利用 Scatchard 方程回归求解两者之间的结合常数。

加替沙星(gatifloxacin,GT)是一种含甲氧基的第四代喹诺酮类合成抗菌药物,具有抗菌谱广、体内稳定、口服吸收快、组织分布性广、毒性小、耐受性好和临床疗效高的特点^[4]。本文分别以牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)与 GT 为添加剂,测定了两者的结合常数,为其临床应用提供了参考,并且为以 ACE 为技术基础的药物筛选模型的建立打下了基础。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

P/ACE 2050 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司,配紫外检测器和 P/ACE Station 数据采集工作站);Mettler Toledo AL104 电子分析天平、Mettler Toledo 320-S pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);未涂层熔融石英毛细管柱(河北永年锐沓色谱器件有限公司)。

BSA(生化试剂,美国 Biosciences 公司);GT(原料药);去离子水;其他试剂均为分析纯。

1.2 以 GT 为添加剂测定 BSA 与 GT 之间的结合常数

1.2.1 运行缓冲液的配制

精密称取0.00 938 g GT 于 25 mL 量瓶中,加入 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)(PBS)定容,配制成 GT 浓度为1 000 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液。分别取 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 6.0 mL 储备液于 6 个 10 mL 量瓶中,加 PBS 定容,各自混匀,连同储备液均用 0.45 μm 尼龙滤头过滤,备用。

1.2.2 样品溶液的配制

称取 1.7 mg BSA,加入 0.5 mL PBS 溶解配制成 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 BSA 溶液,加入 20 μL 0.5% *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)作为中性内标,混匀,备用。

1.2.3 ACE 测定条件

分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、去离子水及运行缓冲液冲洗毛细管各 5 min;压力进样:137.8 kPa(20 psi) $\times$ 3 s;分离电压:10 kV;柱温:37 $^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下 BSA 的电泳图谱见图 1。

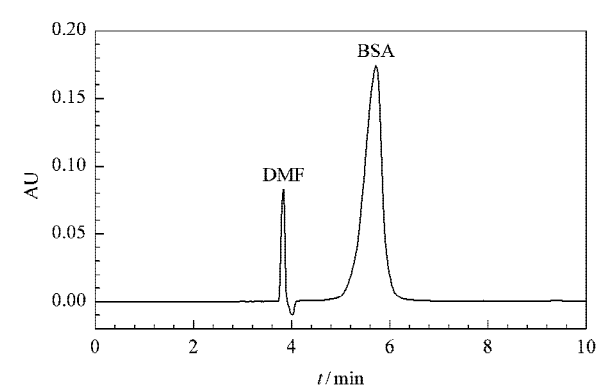


图 1 GT 为添加剂条件下 BSA 的电泳图谱
Fig. 1 ACE electropherogram of BSA with GT-additive

1.3 以 BSA 为添加剂测定 BSA 与 GT 之间的结合常数

1.3.1 运行缓冲液的配制

精密称取 0.041 2 g BSA、0.469 2 g 甘氨酸(Gly)及 3.65 mg 乙二胺四乙酸(EDTA)于 25 mL 量瓶中,加入 PBS 定容,配制成 BSA 浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ (含 0.25 mol/L Gly 和 0.5 mmol/L EDTA)的储备液。分别取 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 储备液于 6 个 10 mL 量瓶中,加 PBS 定容,各自混匀后用 0.45 μm 尼龙滤头过滤,备用。

1.3.2 样品溶液的配制

称取 7.5 mg GT,加入 25 mL PBS 溶解配制成 800 $\mu\text{mol/L}$ 的 GT 溶液。取出 1 mL GT 溶液,加入 20 μL 0.5% DMF,混匀即得。

1.3.3 ACE 测定条件

分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液、0.5% SDS 溶液、去离子水及运行缓冲液冲洗毛细管各 5 min;压力进样 137.8 kPa(20 psi) $\times$ 3 s;分离电压:10 kV;柱温:37 $^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下 GT 的电泳图谱见图 2。

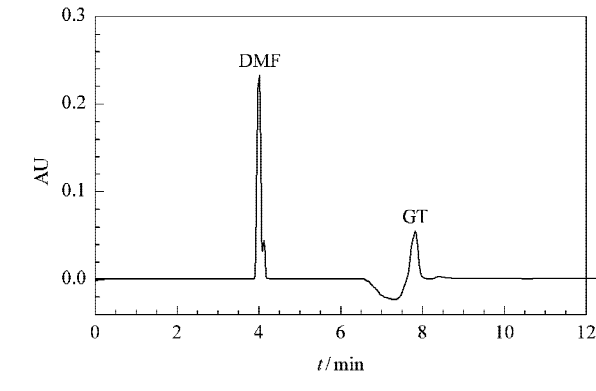


图 2 BSA 为添加剂条件下 GT 的电泳图谱
Fig. 2 ACE electropherogram of GT with BSA-additive

2 结果与讨论

2.1 数据处理与结果

当药物(D)和蛋白质(P)以 1:1 结合时,结合

反应及其 K_b 公式为：



$$K_b = [DP]/([D_f][P_f]) \tag{2}$$

式中 DP 为药物-蛋白结合物 $[DP]$ 、 $[D_f]$ 、 $[P_f]$ 分别表示溶液中结合物、游离药物和游离蛋白的浓度。

经过推导,可得到经典的 Scatchard 方程式^[6]：

$$1/\Delta\mu_D^P = 1/(K_b \cdot \Delta\mu_{\max}) \cdot (1/[D]) + 1/\Delta\mu_{\max} \tag{3}$$

式中 μ_D^P 是一定药物浓度 $[D]$ 下 P 的淌度, $\Delta\mu_D^P = \mu_D^P - \mu_P$, $\Delta\mu_{\max} = \mu_{DP} - \mu_P$, μ_P 是运行缓冲液中没有添加药物时 P 的淌度, μ_{DP} 是复合物 DP 的淌度。

由公式(3)可见,以不同药物浓度的系列缓冲液作为运行缓冲液,以蛋白作为样品进行毛细管电泳,分别测定不同 $[D]$ 下 P 的淌度,以 $1/\Delta\mu_D^P$ 对 $1/[D]$ 进行线性回归,以所得直线的截距与斜率之比即可得到 K_b 。

当缓冲溶液中 P 浓度不同时,缓冲溶液的粘度可能不同,这会影响 D 和 DP 的电泳淌度,对测定结果造成影响。在样品溶液中加入中性参比物,利用药物和中性参比物的淌度比^[5]代替 μ_D^P 进行计算,可以消除粘度的影响。则式(3)变为：

$$(\Delta M/\Delta M_{\max}) \cdot (1/[D]) = K_b - K_b(\Delta M/\Delta M_{\max}) \tag{4}$$

其中： $\Delta M = \mu_D^P/\mu_{e0} - \mu_P/\mu_{e0}$, $\Delta M_{\max} = \mu_{DP}/\mu_{e0} - \mu_P/\mu_{e0}$, μ_{e0} 为电渗淌度。

图3、图4为两种方法下 GT-BSA 相互作用的 Scatchard 回归直线,各项数据及数据处理结果见表1和表2。根据文献[4]报道,GT 与 BSA 以 1:1 配比结合,正好符合本实验测定结合常数的前提条件。由直线的截距/斜率计算得到的结合常数 K_b 分别为 $4.4 \times 10^4 \text{ L/mol}$ ($r = 0.913$) 和 $4.2 \times 10^4 \text{ L/mol}$ ($r = 0.989$),两值匹配良好,且与用经典荧光淬灭法测得结果 ($2.7 \times 10^4 \text{ L/mol}$) 基本一致。文献

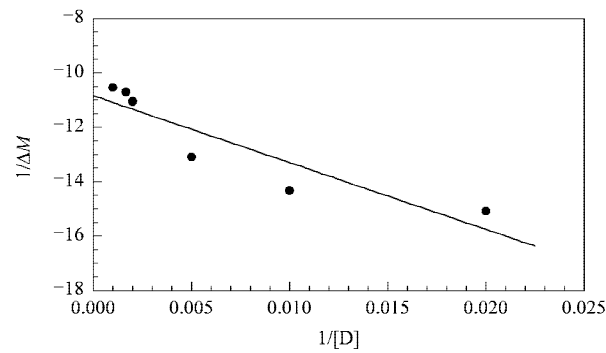


图3 药物为添加剂条件下的线性回归结果图
Fig. 3 Regression result under drug-additive condition

报道两者结合常数的测定结果有 $6.8 \times 10^4 \text{ L/mol}$ ^[7]、 $1.2 \times 10^4 \text{ L/mol}$ ^[4]等,它们在结合常数上的差别可能是由于溶液体系、测试手段及拟合方法等不同造成的。不同测定方法和条件控制等如何影响结果可靠性的问题尚需进一步探讨。

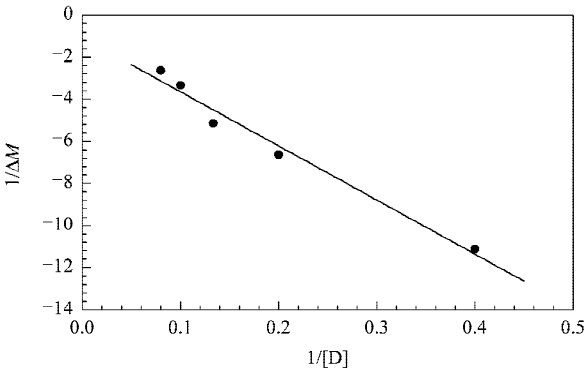


图4 蛋白为添加剂条件下的线性回归结果图
Fig. 4 Regression result under BSA-additive condition

表1 GT为添加剂的实验数据及处理
Table 1 Data of ACE binding experiments under GT-additive condition

$[D]/(\mu\text{mol/L})$	t_1/min	t_2/min	M	ΔM	$1/[D]$
0	4.173	5.593	1.7461		
50	4.213	6.197	1.6798	-0.0663	0.02
100	3.887	5.747	1.6764	-0.0698	0.01
200	3.833	5.723	1.6698	-0.0764	0.005
500	3.777	5.76	1.6557	-0.0904	0.002
600	3.827	5.863	1.6527	-0.0934	0.0017
1000	3.86	5.927	1.6512	-0.0948	0.001

t_1 : migration time of DMF; t_2 : migration time of BSA.

表2 蛋白为添加剂的实验数据及处理
Table 2 Data of ACE binding experiments under BSA-additive condition

$[D]/(\mu\text{mol/L})$	t_1/min	t_2/min	M	ΔM	$1/[D]$
0	2.387	3.37	1.7083		
2.5	2.97	4.803	1.6184	-0.0900	0.4
5	3.647	6.543	1.5574	-0.1509	0.2
7.5	4.04	7.863	1.5138	-0.1945	0.1333
10	5.18	12.703	1.4078	-0.3005	0.1
12.5	5.993	18.293	1.3276	-0.3807	0.08

t_1 : migration time of DMF; t_2 : migration time of GT.

2.2 讨论

(1)用于结合常数测定的 ACE 淌度移动法可分为用目标靶物质作添加剂的“ L_R ”法和用受体作添加剂的“ R_L ”法两种^[8],两者原理相同。从以上结果看,两种方法均可采用。采用价廉的组分作添加剂可降低分析费用。在药物-蛋白结合常数的测定中,由于毛细管壁在通常缓冲条件下都带负电,容易

与带正电的蛋白发生吸附,使峰展宽并拖尾,所以多数文献都采用将不同浓度药物加入缓冲液中的“ R_L ”法。

但是若要将 ACE 法应用于药物筛选模型上时,基本的操作思路为将不同浓度的目标靶蛋白加入运行缓冲液中,而多种待筛药物则作为混合样品溶液注入毛细管,通过一次 ACE 实验实现多种药物与蛋白结合作用的考察。由此可见,要采用 ACE 法进行药物筛选实验,首先必须对用蛋白作添加剂的“ L_R ”实验方法考察清楚。只有了解和掌握了单组分药物“ L_R ”法的实验情况,才能继续往混合药物实验方向深入。因此本实验分别考察了两种方式下的 ACE 实验。

(2)在以药物为添加剂的实验中,BSA 作为样品进入管内的量很少(nL 级),而它本身在 pH 7.4 的条件下带负电,与同样带负电的内管壁间的吸附作用相比,其与 GT 的作用要小得多,因此可以忽略它的吸附。但当以 BSA 作为添加剂时,管壁吸附作用就变得非常明显,在这样的情况下,通过改善实验条件抑制蛋白吸附就成为实验成功与否的关键。

本文采用文献中提到两种解决吸附问题的方法:一是在运行缓冲液中添加 Gly 和 EDTA。Gly 是两性离子,含有氨基,它可通过饱和毛细管内壁表面能与蛋白发生反应的活性位点来抑制毛细管内壁对

蛋白的吸附^[9],而且 Gly 在 214 nm 下没有紫外吸收,不会干扰实验,EDTA 的主要作用是免除可能存在的重金属对各种蛋白的变性作用^[10]。另一方法是在冲洗毛细管时增加用 0.5% SDS 溶液的冲洗过程,也能减少管壁吸附蛋白作用,稳定电渗流,并且可以改善峰形,提高结果重现性。

致谢:衷心感谢本校包建民教授对本文工作的指导。

参考文献:

- [1] Zhao L X, Li B X, Zhang Z J. Journal of Shaanxi Normal University: Natural Science Edition (赵利霞,李保新,章竹君. 陕西师范大学学报:自然科学版), 2002, 30(2): 73
- [2] El-Shafey A, Zhong H J, Jones G, Krull I S. Electrophoresis, 2002, 23: 945
- [3] Chu Y H, Avila L Z, Biebuyck H A, Whitesides G M. J Med Chem, 1992, 35: 2 915
- [4] Guo M, Yan J W, Yu Q S, Shang Z C, Lü J D. Acta Physico-Chimica Sinica (郭明,严建伟,俞庆森,商志才,吕建德. 物理化学学报), 2004, 20(2): 202
- [5] Shimura K, Kasai K. Anal Biochem, 1997, 251: 1
- [6] Bose S, Yang J, Hage D S. J Chromatogr B, 1997, 697: 77
- [7] Liu X H, Ye Y, Zeng Z Z. Chinese Journal of Chemistry, 2007, 25(2): 182
- [8] Chu Y H, Lees W J, Stassinopoulos A, Walsh C T. Biochemistry, 1994, 33: 10 616
- [9] Hu S, Dovichi N J. Anal Chem, 2002, 74(12): 2 833
- [10] Zhou D W, Wang H F, Li F M. Journal of China Pharmaceutical University (周大炜,王怀锋,李发美. 中国药科大学学报), 2005, 36(1): 36

书 讯

色谱技术丛书

气相色谱方法及应用(第二版)

汪正范等 编著

出版日期:2007年2月

页数:340页

定价:¥39.00元

本书主要介绍了色谱-质谱、色谱-傅里叶变换红外光谱、色谱-原子光谱和色谱-色谱联用技术。

书中首先简单地介绍了质谱、傅里叶变换红外光谱、原子光谱和核磁仪器的结构、工作原理,以及它们与色谱联用时对接口的一般要求。在色谱-质谱联用技术中,除了对已成为实验室中常用分析方法的气相色谱-质谱联用技术及近年来发展迅速、越来越受人们关注的液相色谱-质谱联用技术都作了较详细的介绍外,还对毛细管电泳-质谱联用技术也作了简要介绍。在色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术中,除了对已有商品仪器的气相色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术作了介绍,还对液相色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术,薄层色谱-傅里叶变换红外光谱联用技术也作了简单介绍。在色谱-原子光谱联用技术中分别介绍了气相色谱和液相色谱分别与原子吸收光谱和原子发射光谱联用的进展。在色谱-色谱联用技术中介绍了气相色谱-气相色谱、液相色谱-液相色谱、液相色谱-气相色谱及其他各种不同分离模式色谱联用技术。在介绍各种联用技术时都给出了一些应用实例。

本书可供从事色谱分析的人员及大中专院校相关专业师生学习参考。

化学工业出版社

购书热线:(010)64518888 64519686(传真)

地址:北京市东城区青年湖南街13号

电子邮件:goushu999@126.com

邮编:100011