

·研究简报·

聚酰胺-胺型树枝状化合物与细胞色素 C 的结合作用*

陈丽蓉² 钟站¹ 贾欣茹^{1**} 秦洋¹ 廖清² 李明谦¹

(¹ 北京大学化学与分子工程学院 北京 100871) (² 北京大学技术物理系 北京 100080)

危岩

(美国 Drexel 大学化学系 费城 PA19104)

关键词 树枝状化合物, 细胞色素 C, 分子识别

制备具有分子识别功能的材料,特别是设计合成某种分子,使其能够识别蛋白质表面,并干扰或促进蛋白质的特定生理功能,是生物有机化学中一个尚待解决的重要问题,也是揭开蛋白质分子识别与相互作用机理的重要问题.人们对生物大分子——蛋白质分子之间的识别和相互作用进行了广泛的研究,总结出了一些规律.(1)蛋白质复合物中最直接相互作用的残基数目共为 27~44 个,相对与总的残基数来说很少,但是对分子间的识别和稳定作用却起决定性作用;(2)蛋白质复合物的接触面积为 6~10 nm²,既需要比较大的接触面积,复合物才比较稳定;(3)蛋白质分子间作用力包括氢键、静电力、残基堆叠等;(4)蛋白质分子间形成较稳定的复合物要求分子骨架有一定的柔顺性,从而可以形成有利于相互作用的构象,同时又需要一定的刚性,使稳定构象能够保持^[1].

聚酰胺-胺型树枝状化合物(PAMAM)结构规整,分子尺寸在纳米范围,末端官能团多,可反应性强.其 3 代或 4 代分子已形成椭球或近圆球形状,表面积已达到或超过 6 nm².这类化合物分子量可以调节,通过修饰可连接具有识别蛋白质分子作用的特殊残基,而且 PAMAM 树枝状化合物的结构、组成与蛋白质接近,因此,有利于制备分子识别材料.本文合成了该类树枝状化合物,对其进行了修饰,使其末端为羧基负离子.并对它和蛋白质大分子-细胞色素 C(CC)之间的识别和相互作用进行了初步的研究和探讨.

1 G0.5、1.5、2.5、3.5 代外端基为羧基的 PAMAM 树枝状化合物(G0.5C、G1.5C、G2.5C、G3.5C)的合成

按照文献[2,3]的方法合成 PAMAM 树状分子.其过程是以乙二胺为核,在甲醇中与丙烯酸甲酯进行 Michael 加成.得到产物(半代)经提纯后,再与大大过量的乙二胺进行酯胺解反应,得到具有端氨基(整代)的产物.重复此操作,得到不同半、整代树状化合物.用 400 兆核磁测定了 PAMAM 的氢谱及碳谱.¹H-NMR 谱图(以 DMSO-d₆ 为溶剂)可见在 $\delta = 2.05 \sim 2.10$ 、 $2.19 \sim 2.21$ 、 $2.42 \sim 2.47$ 、 $2.50 \sim 2.56$ 、 $2.62 \sim 2.64$ 、 $3.0 \sim 3.2$ 、 $7.87 \sim 7.89$ 出现 7 组峰.¹³C-NMR 谱图(DMSO-d₆ 为溶剂)在 $\delta = 21.041$ 、 33.316 、 36.942 、 $39.064 \sim 39.899$ 、 41.368 、 48.556 、 $49.678 \sim 49.900$ 、 52.181 、 $171.320 \sim 171.544$ 有峰出现.其结果与文献值[2,3]相符.

将 G0.5、1.5、2.5 或 3.5 代的 PAMAM 树枝状化合物溶于甲醇中,加入与其外端酯基等摩尔的氢氧化钠,于 40℃ 反应 3 h,旋转蒸发除去甲醇,得到白色粉末状固体,所得到的树枝状化合物的结构如反应式(1)所示^[4].

2 PAMAM 树枝状化合物对抗坏血酸还原 Fe³⁺-细胞色素 C 反应的干扰实验^[5]

用 pH=7.4 的磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲溶液分别配制细胞色素 C、树枝状化合物和抗坏血酸 3 种溶液,先将细胞色素 C 溶液与树枝状化合物溶液混合,再加入抗坏血酸溶液,混合均匀,

* 2001-01-17 收稿,2001-02-12 修稿;国家自然科学基金资助课题(基金号 59973001);** 通讯联系人

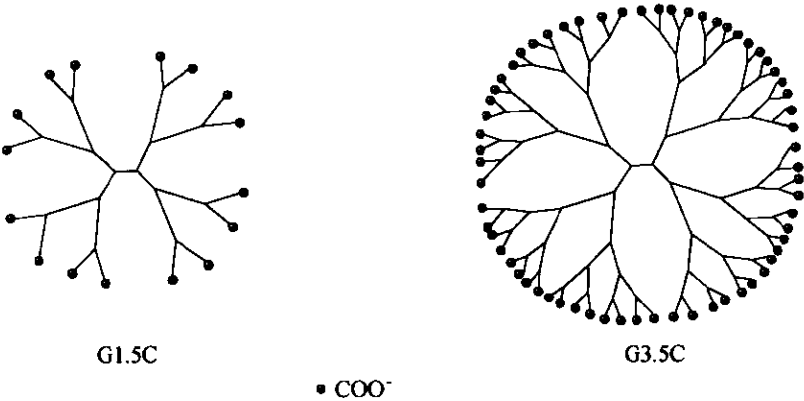
用紫外可见分光光度计监测 549 nm 处紫外吸收随时间的变化,并与反应体系中无 PAMAM 树枝状化合物时的情况进行比较.

3 结果

Fe^{III}-细胞色素 C 可以迅速的被抗坏血酸还原为 Fe^{II}-细胞色素 C,从而在 549 nm 处出现明显的吸收峰(如图 1).

由于离子强度对干扰实验有很大影响,我们

对不同缓冲溶液浓度下的还原反应速率进行了研究(图 2),其中 CC 的浓度为 3.14×10^{-6} mol/L,树枝状化合物浓度为 3.14×10^{-5} mol/L,抗坏血酸的浓度为 6.28×10^{-4} mol/L.由图 2 可见,整个还原反应的速率随缓冲溶液的浓度加大而迅速下降,当缓冲溶液的浓度达到 150 mmol/L 以上时反应速率趋于恒定,说明离子强度对这个反应有很大的影响.



Scheme 1 G1.5C and G3.5C PAMAM dendrimers

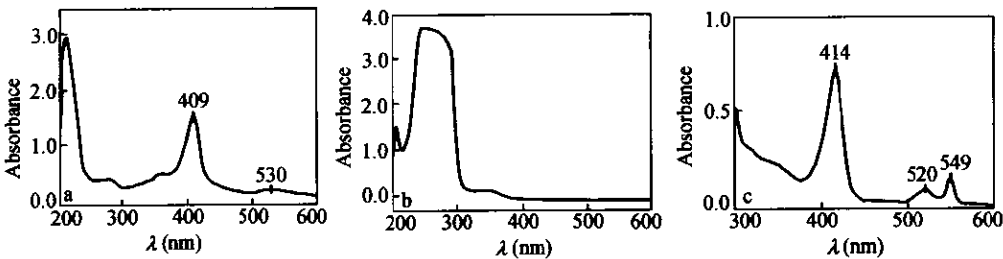


Fig. 1 The UV spectra of (a) Fe^{III}-cytochrome C, (b) ascorbate and (c) Fe^{III}-cytochrome C mixed with ascorbate for 15 min.

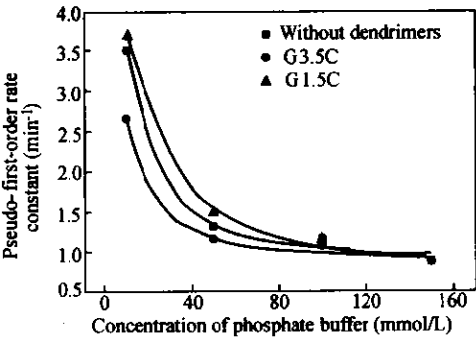


Fig. 2 The pseudo-first order rate constant of the reduction of Fe^{III}-cytochrome C in different phosphate buffer concentrations

根据以上实验的结果,在 10 mmol/L 的磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的缓冲溶液体系中,反应速率

常数最大且不同条件下差别最明显,故此我们选择使用 10 mmol/L 的磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的缓冲溶液体系. PAMAM 树枝状化合物对抗坏血酸还原 Fe^{III}-细胞色素 C 反应的干扰实验中,由于抗坏血酸是大大过量的,所以反应可以认为是准一级动力学反应. 在 10 mol/L 的磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的缓冲溶液体系中,反应体系中无 PAMAM 树枝状化合物和向反应体系中加入 G0.5C, G1.5C, G2.5C, G3.5C 后的 549 nm 处吸光度随时间变化如图 2 所示. 各反应体系的各组分浓度和准一级反应速率常数如表 1 所示.

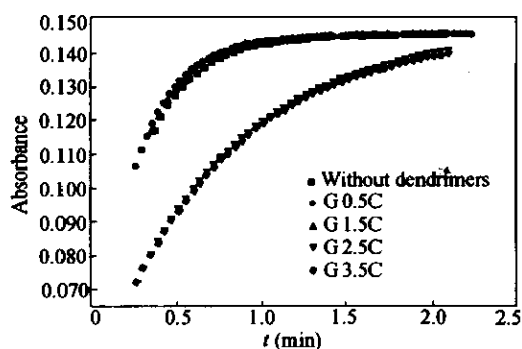
Table 1 The concentration of respect composition and pseudo-first order rate constants in the kinetics of reduction of Fe^{III} -cytochrome C

	Blank	G0.5C	G1.5C	G2.5C	G3.5C
Number of dendrimer peripheral functional groups	N/A	4	16	32	64
CC(mol/L) ^a	6.28×10^{-6}	6.28×10^{-6}	6.28×10^{-6}	6.28×10^{-6}	6.28×10^{-6}
Ascorbic acid(mol/L)	6.28×10^{-4}	6.28×10^{-4}	6.28×10^{-4}	6.28×10^{-4}	6.28×10^{-4}
Dendrimer(mol/L)	0	6.28×10^{-5}	6.28×10^{-5}	6.28×10^{-5}	6.28×10^{-5}
Rate constant(min^{-1})	3.48 ± 0.03	3.87 ± 0.05	3.68 ± 0.05	1.40 ± 0.03	1.32 ± 0.03

^a CC: Cytochrome C

由图 3 和表 1 可见,当反应体系中加入 G2.5C 和 G3.5C 后反应速率明显下降,这主要是因为 pH = 7.4 的条件下树枝状化合物表面带负电荷的羧基与细胞色素 C 表面带正电荷的精氨酸残基相互作用,有可能形成复合物,从而导致反应速率下降^[5].与 G0.5C, G1.5C 树枝状化合物相比, G2.5C, G3.5C 的半径要大得多,末端的羧基数目也多得多,因此可以覆盖更大的细胞色素 C (CC) 外表面,并同时与 CC 表面的五个赖氨酸残基^[6]中的数个相互作用,从而更加有效的干扰 CC- Fe^{III} 的还原反应.当认为复合物中 CC 与树枝状化合物分子之比为 1:1 时,由此计算得到 G2.5C, G3.5C 与 CC 的结合常数分别为 2.4×10^4 , 2.6×10^4 .实验证明 G0.5C, G1.5C 不能使 CC 的还原反应速率下降,但使之轻微上升的现象是很有趣的,相关的研究工作正在进行中.

综上所述, PAMAMC 与蛋白质大分子 CC 有相互作用.在 Fe^{III} -细胞色素 C 还原反应体系中加入

Fig. 3 Kinetics of reduction of Fe^{III} -cytochrome C at 549 nm

入 PAMAMC 可引起反应速率的变化.较高代数 PAMAMC (G2.5C, 3.5C) 使反应速率明显下降.反应速率与离子强度有密切关系.还原反应速率开始随缓冲溶液浓度加大而下降,当缓冲溶液浓度达到 150 mmol/L 时趋于恒定.相关的一系列研究正在进行之中.

REFERENCES

- Janin J, Chothia C. J. Biol Chem, 1990, 265(36): 16027 ~ 16030
- Tomalia D A, Naylor A M, Goddard III W A. Angew Chem Int Ed Engl, 1990, 29: 138 ~ 175
- Wang J F, Jia X R. J Polym Sci, Part A: Polymer Chemistry, 2000, 38: 4147 ~ 4153
- Wang J F, Jia X R. Chem Comm, 2000, 6: 511 ~ 512
- Hamuro Y, Hamilton A D. Angew Chem Int Ed Engl, 1997, 36: 2680 ~ 2683
- Pelletier H, Kraut J. Science, 1992, 258: 1748 ~ 1755

THE CONJUGATION OF POLY(AMINOAMINE) DENDRIMERS (PAMAM) AND CYTOCHROME C

CHEN Lirong², ZHONG Hong¹, JIA Xinru¹, QIN Yang¹, LIAO Qing², LI Mingqian¹

(¹ College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871)

(² Department of Physical Technology, Peking University, Beijing 100080)

WEI Yen

(Department of Chemistry, Drexel University, Philadelphia PA19104)

Abstract The methyl-ester-terminated G1.5, 2.5 and 3.5 poly(amidoamine) dendrimers (PAMAM) are hydrolyzed by using NaOH to obtain external carboxylate groups with them (PAMAMC). These dendrimers show interaction with cytochrome C in some extent. For example, the reduction rate of Fe^{III}-cytochrome C to Fe^{II}-cytochrome C by ascorbic acid was clearly slowed down because of the interaction between cytochrome C and PAMAM dendrimers. The reaction happened only between Fe^{III}-cytochrome C and ascorbic acid, it showed a pseudo-first order constant of 3.48 min⁻¹. When PAMAMC (G2.5 or 3.5) dendrimers were added in the reaction system, the pseudo-first order constant dropped to 1.40 or 1.32 min⁻¹. The association constant of 1:1 cytochrome C-G2.5C is 2.4×10^4 and the association constant of 1:1 cytochrome C-G3.5C is 2.6×10^4 .

Key words Dendritic polymer, Cytochrome C, Molecular recognition