

O-丹磺酰基小檗胺与钙调蛋白的相互作用

张遂坡 刘 健 吴隽平 徐友涵

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

粉防己碱和小檗胺等一些双苄基异喹啉化合物是一类新型的钙调蛋白 (CaM) 拮抗剂。为了研究这些化合物同 CaM 的相互作用, 我们用化学修饰的方法将疏水性荧光探针丹磺酰基团接到小檗胺上生成 O-丹磺酰基小檗胺 (DB)。发现这种新的化合物不仅具有荧光特性, 而且也是一种较强的 CaM 拮抗剂。DB 抑制依赖 CaM 的红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的活性, 其 IC_{50} 值 (半抑制数) 为 $2.4 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。用荧光的方法证明 DB 同 CaM 的作用是依赖 Ca^{2+} 的, 而且每个 CaM 有两个 DB 的结合位点。

1. DB 对依赖 CaM 的红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活力的影响

Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活力的测定: 终反应体系中 $\text{NaCl } 0.1 \text{mol/L}$, $\text{MgCl}_2 2 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 乌本苷 $1 \times 10^{-4} \text{mol/L}$, Tris-顺丁烯二酸 $25 \times 10^{-3} \text{mol/L}$, 游离 $\text{Ca}^{2+} 36 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 膜蛋白浓度 $50 \times 10^{-6} \text{g/ml}$, CaM $2.4 \times 10^{-8} \text{mol/L}$, ATP 10^{-3}mol/L , $\text{pH} = 7.0$ 。反应总体积为 $2 \times 10^{-3} \text{L}$ 反应加入顺序如下: 反应体系 (不含 CaM, ATP) + 不同浓度 DB $\xrightarrow[37^\circ\text{C}]{\text{保温 10 分钟}}$ + CaM $\xrightarrow[37^\circ\text{C}]{\text{保温 10 分钟}}$ + ATP 启动反应。通过测不同反应时间磷的含量以测定 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 活力。

DB 在浓度大于 $0.3 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 时能抑制依赖 CaM 的红细胞膜 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase 的活性, 其 IC_{50} 值为 $2.4 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 。DB 拮抗 CaM 的活性比小檗胺 ($\text{IC}_{50} = 60 \times 10^{-6} \text{mol/L}$) 强 25 倍, 比常用的 TFP ($\text{IC}_{50} = 10^{-3} \times \text{mol/L}$) 强 4 倍。因此 DB 也是一种强的 CaM 拮抗剂。

2. CaM 对 DB 荧光光谱的影响

DB 中的丹磺酰基团是一种对环境敏感的

疏水荧光探针, 在水溶液中发射光谱峰值在 505nm 荧光量子产率很低。我们用 Shimadzu RF 54 测定 DB 荧光光谱及其强度值的变化, 反应在室温下进行。所有荧光实验均在标准缓冲液 (0.1mol/L KCl , $10^{-2} \text{mol/L MOPs}$, $\text{pH} = 7$) 和固定浓度的 EDTA 及 Ca^{2+} 下进行。在 EDTA 存在下, 加入 CaM 对 DB 的荧光光谱影响不大, 但在 Ca^{2+} 存在下, 加入 CaM 使 DB 的荧光强度增加 3 倍, 这说明 DB 同 CaM 的结合是依赖 Ca^{2+} 的, 而且 CaM 上的 DB 结合区域是疏水性的, 换句话说, CaM 结合 Ca^{2+} 后, 暴露出的疏水部分同 DB 结合。

3. DB 与 CaM 结合位点的研究

在 Ca^{2+} 存在下, 用 CaM 定量滴定于 DB 溶液中检测荧光强度变化。在此实验中激发波长和发射波长分别固定在 340nm 和 498nm, 相应的狭缝宽度为 5 和 10nm。溶液中含 DB $3 \times 10^{-6} \text{mol/L}$, 由于 DB 与 CaM 解离常数大约是几个 10^{-9} 摩尔, 可以认为滴定的 CaM 基本完全同 DB 结合。滴定曲线由两段不同斜率的直线组成, 折点出现在 CaM 与 DB 摩尔比为 0.5 处, 这说明在 Ca^{2+} 的存在下 CaM 有两个 DB 的专一性结合位点, 这个结果同 EBB 与 CaM 的结合是一致的^[1], CaM 除了有两个专一性结合 DB 的位点外, 还可以非专一性地同 DB 吸附结合, 但从斜率上看这种非专一性结合要比专一性结合弱五倍。

我们认为 DB 具有强的拮抗 CaM 的性能和发射荧光的特性, 为研究 CaM 的生理功能提供了一个有用的工具。

参 考 文 献

- [1] Xu Youhan and Zhang Suipo: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, 140, 461.

[本文于 1987 年 10 月 9 日收到]