

## 2,6-吡啶二甲酰肼 2-羟基萘甲醛肟-Cu(II)-CopC 三元配合物的光谱研究

任小林 宋 珍 杨斌盛\*

(山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

**摘要:** 以 2,6-吡啶二甲酸为原料, 经酰化、酯化、胺解、亲和加成合成 2,6-吡啶二甲酰肼-2-羟基萘甲醛肟(L1)。用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、荧光寿命方法研究了酸碱对 L1 互变异构的影响及 L1、Cu(II)、铜运输蛋白(copper trafficking protein, apoCopC)三者的相互结合。结果表明, 在 pH=7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲条件下, L1 可分别与 Cu(II)、apoCopC 结合形成 1:1 的配合物, 条件结合常数分别为 3.32×10<sup>6</sup> mol<sup>-1</sup>·L 和 4.01×10<sup>5</sup> mol<sup>-1</sup>·L; 而 Cu(II)-L1 与 apoCopC 结合形成 1:1 复合物的条件结合常数为 8.09×10<sup>5</sup> mol<sup>-1</sup>·L。荧光共振能量转移、分子对接模拟表明, L1 结合在 apoCopC 的 N 端, 光谱滴定证实 L1、Cu(II)、apoCopC 可形成以 Cu(II)为中心的三元配合物。

**关键词:** 2,6-吡啶二甲酰肼 2-羟基萘甲醛肟; Cu(II); 铜运输蛋白; 配合物; 光谱

中图分类号: O614.121; O614.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2015)09-1811-09

DOI: 10.11862/CJIC.2015.244

## Spectral Studies on Complex of 2,6-Pyridine Diformylhydrazine 2-Hydroxynaphthene Carboxylic Hydrazone-Cu(II)-CopC

REN Xiao-Lin SONG Zhen YANG Bin-Sheng\*

(Institute of Molecular Science, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering  
of Education Ministry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract:** 2,6-Pyridine diformylhydrazine 2-hydroxynaphthene carboxylic hydrazone (L1) was synthesized by acylation, esterification and aminolysis reaction. The effect of pH value on isomerization of L1 and the binding among L1, Cu(II) and copper trafficking protein, apoCopC, were studied by using UV-Vis absorption, fluorescence spectra and fluorescence lifetime measurement. The results show that the binding constant is 3.32×10<sup>6</sup> mol<sup>-1</sup>·L for Cu(II)-L1, 4.01×10<sup>5</sup> mol<sup>-1</sup>·L for L1-apoCopC, separately, in pH value of 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl. Meanwhile, the binding constant between Cu(II)-L1 and apoCopC is 8.09×10<sup>5</sup> mol<sup>-1</sup>·L. The average distance between the bound L1 and Trp83 of apoCopC from fluorescence resonance energy transfer was determined and the binding site of L1 in apoCopC, which locates at N-terminal, was shown by an automated public domain software package ArgusLab 4.0.1. The formation of a ternary complex, L1-Cu(II)-CopC, is confirmed by the titration of Cu(II) to L1-apoCopC in pH value of 7.4 and 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl.

**Key words:** 2,6-pyridine diformylhydrazine 2-hydroxynaphthene carboxylic hydrazone; copper(II); copper trafficking protein; complex; spectra

收稿日期: 2015-05-25。收修改稿日期: 2015-07-17。

国家自然科学基金(No.20771068, 20901048)和高等学校博士学科点专项科研基金(No.20131401110011)资助项目。

\*通讯联系人。E-mail: yanghs@sxu.edu.cn, Tel: 0351-7016358

CopC 蛋白是革兰氏阴性菌 (*Pseudomonas syringae*) 抗铜操纵子 *cop* 所编码的 4 个蛋白 (CopA、CopB、CopC、CopD) 之一<sup>[1-2]</sup>, 其溶液结构呈现由“loop”相连  $\beta$  折叠疏水桶状结构, 相距大约 3 nm 的 2 个金属离子结合位点位于疏水桶的两端, 其中位于蛋白 C 端的 Met 残基(40, 43, 46, 51)中的 2 或 3 个及 His48 与 Cu(I) 配位, 而位于蛋白 N 端的 His1、Asp89、Glu27 和 His91 与 Cu(II) 配位<sup>[3-5]</sup>。Cu(I)-CopC 的氧化或 Cu(II)-CopC 的还原能使得铜离子从一个位点迁移到另一个位点<sup>[1-2]</sup>, 即 CopC 在铜离子调控中起着重要的作用。研究有机小分子对 CopC 结合铜的影响、探讨 CopC 铜调控的分子机理具有重要意义<sup>[6]</sup>。

本工作基于溶液中 2,6-吡啶二甲酰肼 2-羟基萘甲醛肟(L1)分别与 Cu(II)、apoCopC 的结合性质, 研究了 L1-Cu(II)-apoCopC 三元配合物的形成。

## 1 实验部分

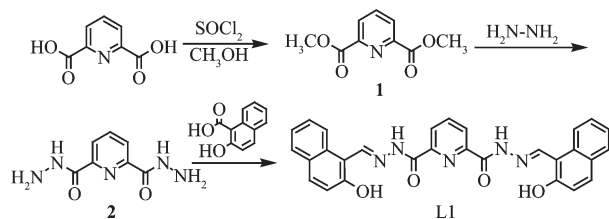
### 1.1 试剂和仪器

2,6-吡啶二甲酸, 99%, aladdin 产品; 2-羟基-1-萘甲醛, 99%, 北京百灵威; 二氯亚砷、无水甲醇, 分析纯, 天津市化学试剂三厂; 水合肼, 分析纯, 天津市天大化工实验厂; 乙二胺四乙酸(EDTA)为沈阳试剂四厂产品; 三羟甲基氨基甲烷(Tris)为上海化学试剂厂产品, 其它试剂均为分析纯。

Varian-Cray Eclipse 荧光光谱仪; Edinburgh Analytical Instrument type nF-900 荧光寿命仪; Cary 50 Bio UV-Visible 吸收光谱仪; 德国产 VarioEL III 型元素分析仪; Shimadzu-FTIR-8400S 红外光谱仪; Bruker DRX-300 MHz 核磁共振仪; Eppendorf 移液枪。

### 1.2 实验方法

配体 L1 的合成: 使用 2,6-吡啶二甲酸、2-羟基-1-萘甲醛、 $\text{SOCl}_2$ 、水合肼(80%)为原料, 按照文献方法<sup>[7]</sup>由图示 1 所示路线合成 2,6-吡啶二甲酰肼 2-羟基



图示 1 配体的合成路线

Scheme 1 Synthetic route of L1

基萘甲醛肟。

取 2,6-吡啶二甲酸 3.34 g 和  $\text{SOCl}_2$  11 mL 置于圆底烧瓶中, 加热回流 2 h, 冷却后在冰水浴搅拌条件下缓慢滴加甲醇并继续加热 1 h。静置、冷却、洗涤得白色 2,6-吡啶二甲酸二甲酯沉淀。将 3.90 g 2,6-吡啶二甲酸二甲酯用无水甲醇 30 mL 溶于圆底烧瓶中, 加入 6 mL 水合肼(80%), 加热回流片刻, 静置、冷却、过滤、洗涤得到白色 2,6-吡啶二甲酰肼固体。干燥后测得其熔程为 123~124  $^{\circ}\text{C}$ 。称取 0.20 g 2,6-吡啶二甲酰肼加入到 100 mL 圆底烧瓶中, 再加入约 20 mL 水, 加热至体系全部溶解。加入适量 2-羟基-1-萘甲醛乙醇溶液, 加热回流 2 h, 冷却, 过滤、洗涤并收集生成的黄色 2,6-吡啶二甲酰肼 2-羟基萘甲醛肟固体。熔点  $>300^{\circ}\text{C}$ 。

元素分析实测(理论)值(%)为: C, 69.15(69.18); H, 4.22(4.20); N, 4.22(4.20)。 $^1\text{H}$  NMR (DMSO):  $\delta$  为 12.50(s, 2H, -OH), 12.50(s, 2H, -NH), 9.80(s, 2H, -CH=N), 8.51~7.65(m, 6H, 萘环), 7.46~7.24(m, 3H, 吡啶环)。IR(KBr 压片):  $\nu$  为 3462(O-H $\cdots$ O), 3229(NH), 1682  $\text{cm}^{-1}$ (C=O)。

apoCopC 的制备按照文献[5]方法, 通过吸收光谱测定其在 278 nm 处的吸光度值计算其浓度。

### 1.3 光谱测定

紫外-可见吸收光谱在 Cary 50 Bio UV-Vis 吸收光谱仪上测定, 室温条件下用 1 cm 吸收池测量。荧光光谱在 Cary Varian Eclipse 荧光分光光度计上测量, 激发和发射狭缝均为 5 nm。实验过程通过循环水浴控制温度, 所有测定均恒定在 25  $^{\circ}\text{C}$ 。

荧光寿命的测定在 Edinburgh Analytical Instrument type nF-900 荧光仪上进行, 用时间关联单光子计数法测定。激发光源为 EPLED-280, 用 Ludox HS-30 硅溶胶散射液为仪器响应(IR), 根据(1)式由其最大荧光发射波长处的荧光衰减曲线非线性拟合得出样品的荧光寿命值。

$$I(t) = A + \sum B_i \exp(-t/\tau_i) \quad (1)$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 配体 L1 的性质

#### 2.1.1 酸度对 L1 光谱性质的影响

图 1 是 L1 在不同 pH 值条件下的紫外-可见吸收光谱(A)和荧光光谱(B)。可见, 当  $\text{pH} < 9.0$  时 L1 的最大吸收峰位于 375 nm 附近, 随着 pH 值的增大, L1 在 375 nm 处的最大吸收峰逐渐减小, 同时在

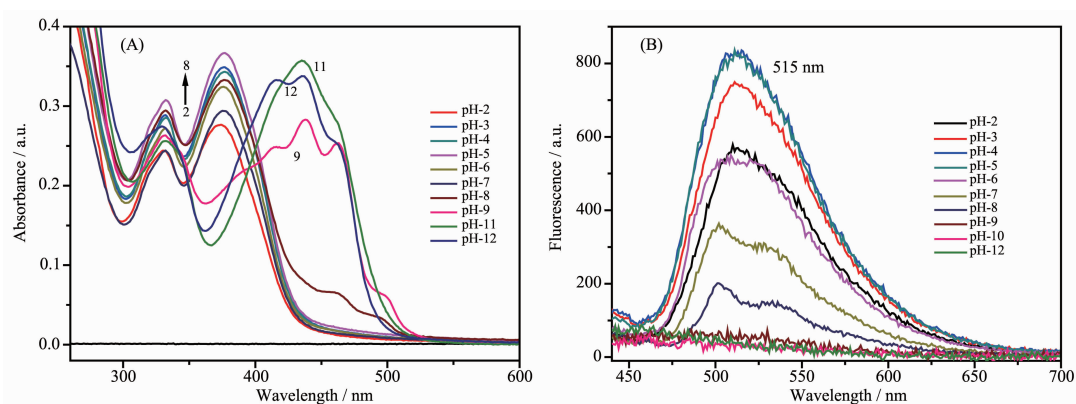


图1 不同 pH 值溶液中 L1 的紫外-可见吸收光谱(A)和荧光光谱(B)

Fig.1 UV-Vis absorption (A) and fluorescence spectra (B) of L1 in solutions with different pH values

 $C_{L1}$  was  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=400 \text{ nm}$ ,  $20^\circ\text{C}$ 

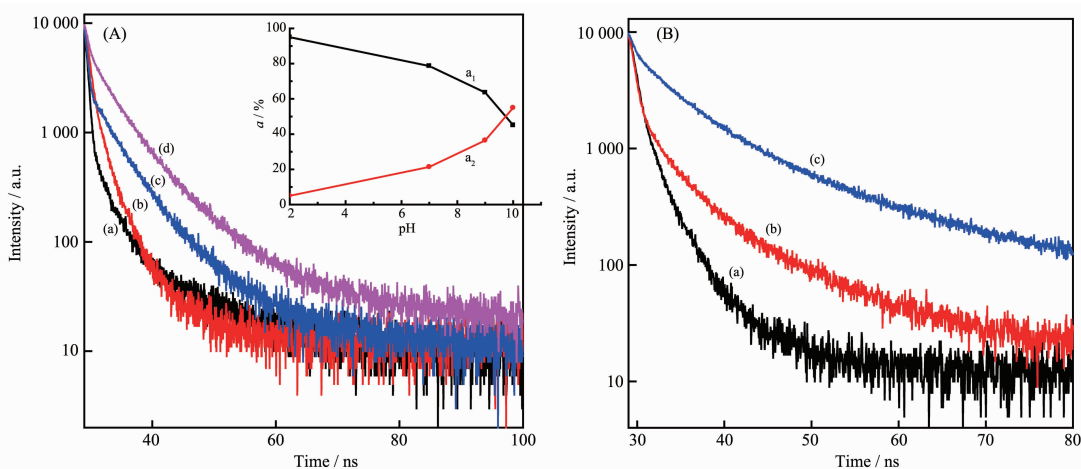
430 nm 附近出现新的吸收峰,即 L1 的最大吸收峰由 375 nm(pH=7.4)红移为约 430 nm(pH=11.0),且在 400 nm 处出现等吸收点;与酸度对 L1 紫外-可见吸收光谱的影响不同,其激发波长为 400 nm 时的荧光光谱(图 1B) 最大峰位于 515 nm 处,随着 pH 值的增加,最大发射峰位没有明显的变化,仅有荧光强度的减弱,直至完全被猝灭(pH>9.0)。

图 2A 为 L1 在不同 pH 值条件下 515 nm 处荧光随时间衰减的变化曲线。由图 2A 可见,随着溶液 pH 值的增加,515 nm 处荧光衰减变慢,即荧光寿命变长。按照(1)式非线性拟合不同 pH 值时的衰减曲线,均表现为双指数衰减,即短寿命、长寿命发光体荧光衰减的叠加。

表 1 列出 L1 在不同 pH 值时短寿命、长寿命发

光体的拟合参数。其中短寿命发光体荧光衰减的贡献随着 pH 值的增加而减少,而长寿命发光体荧光衰减的贡献随着 pH 值的增加而增加(见图 2A 插图),在 pH=9.3 时短、长寿命发光体各有约 50%。短寿命发光体的  $\tau_1$  平均值为  $(2.02 \pm 1.30) \text{ ns}$ ,长寿命发光体的  $\tau_2$  平均值为  $(7.83 \pm 0.97) \text{ ns}$ 。

酰肼由于有酸性的  $\alpha\text{-H}$ ,不同的 pH 值会影响质子转移,形成酮式和烯醇式<sup>[8]</sup>。碱性增加,会夺去酮式的  $\alpha\text{-H}$ ,然后负电荷离域到酮的双键,形成烯醇式。因此,溶液的酸碱性对酰肼化合物的构型有一定的影响,改变酰肼的两种异构体在溶液中的分布平衡(图示 2)。碱性溶液可稳定酰肼的烯醇式构型。由图 1A 可见,当 pH<9.0 时,L1 主要为酮式构型;当 pH>9.0 时,L1 主要以烯醇式构型存在。由图 2A 可



(A) pH value: 2.0 (a), 7.0 (b), 9.0 (c), 10.0 (d); Inset: plot of  $a_1$  against pH values; (B) Solvent:  $\text{H}_2\text{O}$  (a), DMSO (b),  $\text{C}_6\text{H}_{12}$  (c); Concentration of L1 was  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=515 \text{ nm}$ ,  $20^\circ\text{C}$

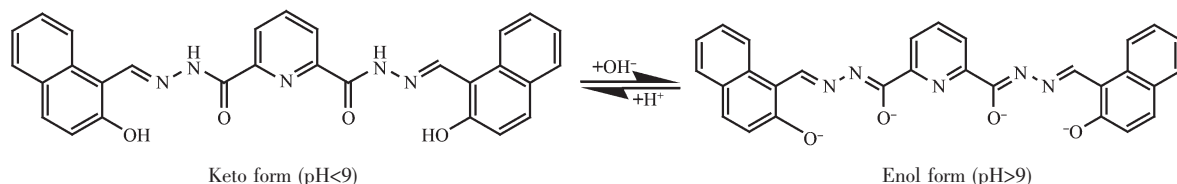
图2 不同 pH 值(A)、溶剂(B)时 L1 荧光(515 nm)衰减曲线

Fig.2 Fluorescence decays of L1 in different pH values (A) and solvents (B)

表 1 L1 在不同 pH 值和不同溶剂中的荧光寿命参数

Table 1 Time resolved fluorescence decay parameters of L1 at different pH values and in different solvents

|          | Condition                      | $a_1 / \%$ | $\tau_1 / \text{ns}$ | $a_2 / \%$ | $\tau_2 / \text{ns}$ |
|----------|--------------------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|
| pH value | 2.0                            | 95.01      | $0.47 \pm 0.02$      | 4.99       | $7.95 \pm 0.17$      |
|          | 7.0                            | 78.67      | $1.07 \pm 0.03$      | 21.33      | $7.53 \pm 0.09$      |
|          | 9.0                            | 63.57      | $3.73 \pm 0.07$      | 36.43      | $8.62 \pm 0.30$      |
|          | 10.0                           | 45.11      | $2.79 \pm 0.06$      | 54.89      | $7.23 \pm 0.09$      |
| Solvent  | H <sub>2</sub> O               | 78.67      | $1.07 \pm 0.03$      | 21.33      | $3.53 \pm 0.09$      |
|          | DMSO                           | 55.94      | $2.48 \pm 0.12$      | 44.06      | $8.70 \pm 0.40$      |
|          | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> | 47.04      | $4.44 \pm 0.13$      | 52.96      | $13.79 \pm 0.40$     |
| L1-CopC* | H <sub>2</sub> O/7.4           | 25.82      | $2.73 \pm 0.08$      | 74.18      | $11.53 \pm 0.17$     |

\*pH=7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲条件下测定

图示 2 2,6-吡啶二甲酰肼 2-羟基萘甲醛肟的两种异构体形式

Scheme 2 Isomer forms of L1

见,酮式构型 L1 的荧光寿命为( $2.02 \pm 1.30$ ) ns,烯醇式构型 L1 的荧光寿命为( $7.83 \pm 0.97$ ) ns。

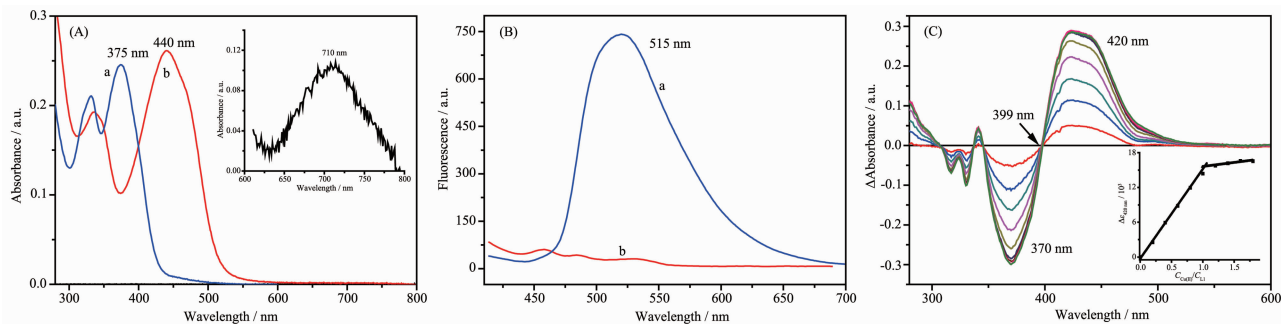
### 2.1.2 溶剂对 L1 光谱性质的影响

随着溶剂极性的增大,L1 紫外-可见吸收光谱、荧光发射光谱都有一定的红移和强度增加,如 DMF 为溶剂时紫外最大吸收峰为 370 nm,最大荧光峰为 510 nm,而 H<sub>2</sub>O 为溶剂时紫外最大吸收峰红移为 375 nm,最大荧光峰红移为 515 nm。溶剂极性对 L1 的荧光寿命也有显著的影响。图 2B 为 L1 在 3 种不同溶剂时 515 nm 处荧光强度随时间衰减的变化曲线。可见,随着溶剂极性的减小(H<sub>2</sub>O,DMSO,C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>),

L1 在 515 nm 处荧光强度随时间衰减明显变慢。按照按照(1)式非线性拟合所得衰减参数列于表 1。表明水溶液中 L1 主要为酮式构型。

### 2.1.3 L1 与 Cu(II)的结合

无论 L1 为酮式或烯醇式构型,均可与 Cu(II)结合形成配合物。在 pH=7.4、50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液中,L1 及加入等量 Cu(II)后的紫外-可见光谱、荧光光谱分别如图 3A 和图 3B 所示。由图 3A 可见,Cu(II)与 L1 的结合使其紫外-可见最大吸收峰由 375 nm 红移为 430 nm,400 nm 处出现等吸收点,同时 在 710 nm 处(图 3A 插图)出现 Cu(II)的 *d-d* 跃迁吸收



(A) UV-Vis absorption spectra of L1 (a) and complex of Cu(II)-L1 (b), inset: Absorption spectrum of Cu(II)-L1 from 600 nm to 800 nm,  $C_{\text{Cu(II)-L1}}$  was 1 mmol·L<sup>-1</sup>; (B) Fluorescence spectra of L1 (a) and complex of Cu(II)-L1 (b),  $\lambda_{\text{ex}}=400$  nm; (C) UV-Vis absorption difference spectra produced from the addition of Cu(II) to L1, inset: Titration curve produced from Fig.3C

图 3 L1 和 Cu(II)-L1 的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱及 Cu(II)滴定 L1 的紫外差光谱

Fig.3 UV-Vis and fluorescence spectra of L1 and complex of Cu(II)-L1 and UV-Vis difference spectra produced from the addition of Cu(II) to L1 in pH value of 7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 20 °C;  $C_{\text{L1}}$  was 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$



峰。与图 1A 对比可见,在  $\text{pH}=7.4$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液中,加入等量 Cu(II)后的紫外-可见吸收光谱类似于 L1 在  $\text{pH}$  值为 11.0 时的吸收光谱,即 Cu(II)使 L1 由酮式转化为烯醇式构型。水合 Cu(II)的最大吸收峰出现在  $900 \text{ nm}$  处<sup>[9]</sup>,在 L1 存在下 Cu(II)的  $d-d$  跃迁吸收峰红移为  $710 \text{ nm}$ 。表明 L1 与 Cu(II)的结合改变了 Cu(II)的配位场。与紫外-可见吸收光谱一致,加入等量 Cu(II)后使 L1 在  $515 \text{ nm}$  处的荧光完全淬灭(图 3B)也证明 Cu(II)可与 L1 结合形成稳定的配合物。

图 3C 是在  $\text{pH}=7.4$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲条件下,以 L1 为空白逐渐滴加 Cu(II)所测得的紫外-可见吸收差光谱。可见,随着 Cu(II)的滴加在  $375 \text{ nm}$  附近出现负峰、 $430 \text{ nm}$  附近出现正峰并逐渐增强、 $400 \text{ nm}$  处出现等吸收点。当滴加的 Cu(II)达到一定量后,差光谱不再随着 Cu(II)的滴加而变化。将  $420 \text{ nm}$  处的表观摩尔吸光度对  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{L1}}$  作图如图 3C 插图。可见,随着  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{L1}}$  的增加, $420 \text{ nm}$  处的表观摩尔吸光度线性地增加并在  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{L1}}=1.0$  附近出现明显的拐点。表明 Cu(II)与 L1 结合形成 1:1 配合物,配合物 Cu(II)-L1 的条件稳定常数为  $K$  ( $\text{Cu(II)-L1}$ )= $(3.32 \pm 0.11) \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ 。

## 2.2 配体 L1 及配合物 Cu(II)-L1 与 apoCpC 的结合

### 2.2.1 L1 与 apoCpC 的结合

图 4A 是在  $\text{pH}=7.4$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲

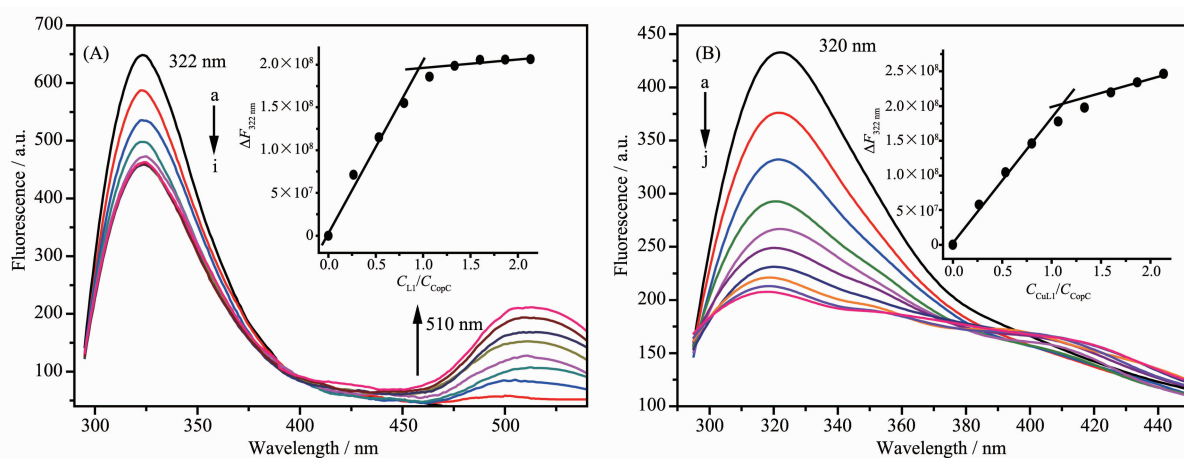
条件下,用 L1 滴定 apoCpC 所测得的荧光光谱。可见,apoCpC 在  $320 \text{ nm}$  处出现最大荧光峰,随着 L1 的滴加  $320 \text{ nm}$  处的荧光强度逐渐减小、 $510 \text{ nm}$  处 L1 的荧光强度逐渐增大。将  $320 \text{ nm}$  处的荧光淬灭  $\Delta F(F_0-F)$  对  $C_{\text{L1}}/C_{\text{CpC}}$  作图如图 4A 插图。即在  $C_{\text{L1}}/C_{\text{CpC}} < 1.0$  范围,  $\Delta F$  随着  $C_{\text{L1}}/C_{\text{CpC}}$  的增加而线性增加;当  $C_{\text{L1}}/C_{\text{CpC}} > 1.0$  时,  $\Delta F$  不再随着  $C_{\text{L1}}/C_{\text{CpC}}$  的增加而变化。表明在  $\text{pH}=7.4$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲条件下 L1 可与 apoCpC 结合形成 1:1 的复合物。复合物的形成使 apoCpC 在  $320 \text{ nm}$  处的荧光淬灭近 30%, L1 的最大荧光峰紫移  $5 \text{ nm}$ , 强度比在  $\text{pH}=7.4$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲液中的强度有所降低,即与 apoCpC 结合后的 L1 环境的极性有所降低。

apoCpC 存在下 L1 的荧光寿命列于表 1。可见,apoCpC 使 L1 长寿命发光体对衰减的贡献增大, L1 环境的疏水性增加。

根据文献方法<sup>[10]</sup>,按照(2)式将  $\lg[(F_0-F)/(F-F_\infty)]$  对  $\lg C_{\text{L1}}$  作图,由直线的斜率可得结合位点数约为 1.0,由直线的截距可得 L1 与 apoCpC 结合的条件稳定常数。不同温度下 L1 与 apoCpC 结合的条件稳定常数列于表 2 中。

$$\lg[(F_0-F)/(F-F_\infty)] = \lg K + n \lg C_{\text{L1}} \quad (2)$$

其中  $K$  为 L1 与 apoCpC 结合的条件稳定常数,  $n$  为 apoCpC 的 L1 结合位点数,  $F_0$  为没有 L1 时的荧光强度,  $F$  为滴加 L1 后的荧光强度,  $F_\infty$  为 L1 最大淬



$\lambda_{\text{ex}}$  was  $280 \text{ nm}$  and excite slit width was  $5 \text{ nm}$ . Concentration of L1 or Cu(II)-L1, from a to i, was  $0, 0.26, 0.52, 0.77, 1.01, 1.25, 1.48, 1.71, 1.93 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively; (A) Emission slit width was  $10 \text{ nm}$ , Inset: Plot of  $\Delta F(F_0-F)$  at  $320 \text{ nm}$  against  $C_{\text{L1}}/C_{\text{CpC}}$ ; (B) Emission slit width was  $5 \text{ nm}$ , Inset: Plot of  $\Delta F(F_0-F)$  at  $320 \text{ nm}$  against  $C_{\text{L1}}/C_{\text{CpC}}$ .

图 4 L1(A)及Cu(II)-L1(B)分别滴定 apoCpC 的荧光光谱

Fig.4 Fluorescence spectra produced from the addition of L1 (A) and Cu(II)-L1(B) to apoCpC ( $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in  $\text{pH}=7.4$ ,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $20^\circ \text{C}$

表 2 L1-apoCopC 及 L1-Cu(II)-CopC 表观结合常数和热力学参数

Table 2 Thermodynamic parameter and apparent binding constants of L1-apoCopC or L1-Cu(II)-CopC

|                   | $T / K$ | $K / (\text{mol}^{-1} \cdot \text{L})$ | $\Delta G / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta H / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$ | $\Delta S / (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$ |
|-------------------|---------|----------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| L1-apoCopC        | 289     | $5.31 \times 10^5$                     | -31.64                                         | -22.13                                         | 32.82                                                              |
|                   | 293     | $4.55 \times 10^5$                     | -31.70                                         |                                                |                                                                    |
|                   | 298     | $4.01 \times 10^5$                     | -31.93                                         |                                                |                                                                    |
| L1-Cu(II)-apoCopC | 289     | $9.37 \times 10^5$                     | -33.00                                         | -11.83                                         | 73.36                                                              |
|                   | 293     | $8.97 \times 10^5$                     | -33.36                                         |                                                |                                                                    |
|                   | 298     | $8.09 \times 10^5$                     | -33.67                                         |                                                |                                                                    |

灭时 apoCopC 的荧光强度。

按照 Vant-Hoff 方程:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad (3)$$

其中  $\Delta G$  为 L1 与 apoCopC 反应的吉布斯自由能,  $\Delta S$  为反应熵变,  $\Delta H$  为焓变。将  $\Delta G$  对  $T$  作图, 由直线的斜率和截距可得 L1 与 apoCopC 反应的  $\Delta H$  和  $\Delta S$  (见表 2)。由于  $\Delta H < 0$  且  $\Delta H$  值较小,  $\Delta S > 0$ , 可以得出, L1 与 apoCopC 之间的作用主要为疏水和氢键作用<sup>[11]</sup>。

### 2.2.2 Cu(II)-L1 与 apoCopC 的结合

在相同实验条件下用 Cu(II)-L1 滴定 apoCopC 所测得的荧光光谱如图 4B 所示。可见, 随着 Cu(II)-L1 的滴加 apoCopC 在 320 nm 处的荧光强度逐渐减小。将 320 nm 处的荧光淬灭  $\Delta F(F_0 - F)$  对  $C_{\text{Cu(II)-L1}}/C_{\text{apoCopC}}$  作图如图 4B 插图。即在  $C_{\text{Cu(II)-L1}}/C_{\text{apoCopC}} < 1.0$  范围,  $\Delta F$  随着  $C_{\text{Cu(II)-L1}}/C_{\text{apoCopC}}$  的增加而线性增加; 当  $C_{\text{Cu(II)-L1}}/C_{\text{apoCopC}} > 1.0$  时,  $\Delta F$  随着  $C_{\text{Cu(II)-L1}}/C_{\text{apoCopC}}$  的增加而增加变缓。表明在 pH=7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲条件下 Cu(II)-L1 也可与 apoCopC 结合形成 1:1 的复合物, 即三元配合物。配合物的形成使 apoCopC 在 320 nm 处的荧光淬灭约 48%。按照 L1 滴定 apoCopC 类似的方法, 根据(2)式处理 3 个不同温度下 Cu(II)-L1 的荧光淬灭数据, 可得 Cu(II)-L1 在 apoCopC 中的结合位点数  $n$  也为 1.0, 条件结合常数一并列于表 2 中。由表 2 数据可见, 相同条件下 Cu(II)-L1 与 apoCopC 结合形成的配合物条件结合常数约是 L1-apoCopC 复合物条件结合常数的 2 倍。尽管热力学参数  $\Delta H < 0$  且  $\Delta S > 0$ , 结合驱动力仍主要为疏水和氢键作用, 但  $\Delta H$  (L1-Cu(II)-apoCopC) 是 L1-apoCopC 的 1/2, 而  $\Delta S$  (L1-Cu(II)-apoCopC) 是 L1-apoCopC 的 2 倍多。表明 L1 和 Cu(II)-L1 分别与 apoCopC 结合时其作用力有一定的差异。

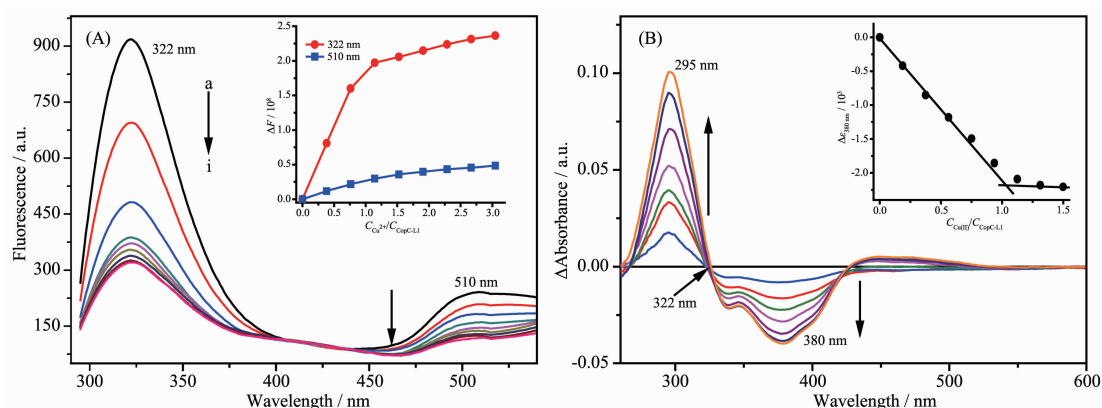
在生理条件下 apoCopC 与 Cu(II) 结合的条件常数约为  $(1.80 \pm 0.58) \times 10^{13} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ , Cu(II) 的结合使蛋白

质的荧光淬灭约 67%<sup>[12]</sup>, 而 L1 与 Cu(II) 结合的条件结合常数仅为  $(3.32 \pm 0.11) \times 10^6 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$ , Cu(II)-L1 几乎不发荧光。作为 Cu(II) 的配体, apoCopC 可与 L1 有效竞争 Cu(II), 即 apoCopC 与 Cu(II)-L1 中的 Cu(II) 结合并出现游离 L1, 使 L1 在 510 nm 处的荧光恢复。由图 4B 可见, 滴加 Cu(II)-L1 时 L1 的荧光几乎没有变化。表明溶液中 Cu(II) 既与 apoCopC 结合, 又与 L1 结合。

### 2.3 L1-Cu(II)-CopC 三元配合物

图 5A 是 pH=7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲条件下 Cu(II) 滴定 L1-apoCopC 的荧光光谱。可见, 在 320 nm 和 510 nm 处分别出现 apoCopC 和 L1 的荧光峰。随着 Cu(II) 的滴加, 320 nm 和 510 nm 处的荧光均逐渐被淬灭, 即 Cu(II) 同时与 apoCopC 和 L1 结合。将 apoCopC 在 320 nm 处的摩尔荧光淬灭对  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{apoCopC-L1}}$  作图如图 5A 插图, 可见在  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{apoCopC-L1}} < 1.0$  范围内, 荧光淬灭随着  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{apoCopC-L1}}$  的增加而线性增加, 当  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{apoCopC-L1}} > 1.0$  时, 荧光淬灭随着  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{apoCopC-L1}}$  增加的变化趋缓, 即 Cu(II) 与 apoCopC-L1 中的 apoCopC 结合形成 1:1 配合物, 并使蛋白质的荧光淬灭近 43%, 小于二元体系中 Cu(II) 对 apoCopC 的荧光淬灭 (67%)<sup>[12]</sup>; L1 在 510 nm 处的摩尔荧光淬灭对  $C_{\text{Cu(II)}}/C_{\text{apoCopC-L1}}$  作图也示于图 5A 插图中, 可见 Cu(II) 与 L1 的结合使 L1 的荧光部分淬灭 (约 40%), 小于二元体系中 Cu(II) 对 L1 的荧光淬灭 (图 3B)。表明三元配合物是以 Cu(II) 为中心离子形成的。

图 5B 是 pH=7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲条件下 Cu(II) 滴定高浓度 L1-apoCopC 的紫外-可见吸收差光谱。可见 Cu(II) 的滴加导致 380 nm 附近出现负峰、425 nm 附近出现正峰并逐渐增强、412 nm 处出现等吸收点。与图 3C 对比可见, apoCopC 的存在使 Cu(II) 与 L1 结合的紫外-可见吸收差光谱明显不同: 等吸收点红移约 10 nm, 380 nm 附近负峰强度远大于 425 nm 附近正峰强度。当滴加的 Cu(II) 的达



$\lambda_{ex}$  was 280 nm, (A)  $C_{L1-CpC}=2.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_{Cu(II)}$  from a to i was 0, 1.05, 2.08, 3.08, 4.05, 5.00, 5.93, 6.83, 7.71  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively; Inset: Titration curves at 322 nm and 510 nm; (B)  $C_{L1-CpC}=20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $C_{Cu(II)}$  was 0, 3.7, 7.3, 10.8, 14.3, 17.6, 20.9, 24.1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively; Inset: Plot of  $\Delta\epsilon$  at 380 nm against  $C_{Cu(II)}/C_{L1-apoCpC}$

图5 Cu(II)滴定 L1-CpC(1:1)的荧光光谱(A)和紫外-可见吸收差光谱(B)

Fig.5 Fluorescence (A) and UV-Vis difference spectra (B) of Cu(II) titration to L1-CpC (1:1) in pH=7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 20 °C

到一定量后,差光谱不再随着  $\text{Cu}^{2+}$  的滴加而变化。将 380 nm 处的吸光度对  $C_{Cu(II)}/C_{L1-apoCpC}$  作图如图 5B 插图。可见,随着  $C_{Cu(II)}/C_{L1-apoCpC}$  的增加,380 nm 处的吸光度在  $C_{Cu(II)}/C_{L1-apoCpC}=1.0$  附近出现明显的拐点。与荧光实验一致,表明 Cu(II)为三元配合物的中心。

## 2.4 L1 在 apoCpC 的结合位点

### 2.4.1 荧光共振能量转移

apoCpC 在 320 nm 处的荧光源于唯一的 Trp83 残基,按照 Förster 无辐射共振能量转移 (FRET) 理论,给体(Trp83)与受体(apoCpC 结合的 L1)的距离  $r$  和临界能量转移距离  $R_0$  间有(4)式所示关系。

$$E=1-\frac{F}{F_0}=\frac{R_0^6}{R_0^6+r^6} \quad (4)$$

其中  $E$  为能量转移效率,  $F_0$  为 apoCpC 在 320 nm 处的荧光强度,  $F$  为 L1-apoCpC 的荧光强度,  $R_0$  为临界能量转移距离,如(5)式所示。

$$R_0^6=8.78 \times 10^{-25} \kappa^2 n^4 \varphi_{\text{Trp}} J \quad (5)$$

其中  $\kappa^2$  为取向因子,  $\varphi_{\text{Trp}}$  为给体(Trp83)的量子产率,  $n$  为介质的折射指数,  $J$  为(6)式所示的光谱重叠积分。

$$J=\frac{\int F(\bar{\nu})\epsilon(\bar{\nu})\bar{\nu}^{-4} d\bar{\nu}}{\int F(\bar{\nu})d\bar{\nu}} \quad (6)$$

其中  $F(\bar{\nu})$  为波数  $\bar{\nu}$  处给体的荧光强度,  $\epsilon(\bar{\nu})$  为受体的摩尔吸光系数。

图 6 是 apoCpC 的荧光光谱(a)和受体 L1 的紫

外可见吸收光谱(b)间的重叠,将其按照(6)式在 300~500 nm 范围计算的光谱重叠积分为  $1.61 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。根据(5)式及  $\kappa^2$ 、 $\varphi_{\text{Trp}}$ 、 $n$  的取值<sup>[6,13]</sup>,可得  $R_0$  为 1.65 nm。由(4)式及能量转移效率  $E=0.32$ ,得出 L1 的偶极中心与 apoCpC 中色氨酸残基偶极中心之间的距离  $r$  为 1.86 nm,即  $0.5R_0 \leq r \leq 1.5R_0$ 。说明 apoCpC 中色氨酸残基向结合 L1 间的无辐射能量转移使蛋白质 320 nm 处的荧光被淬灭。

类似地由 Cu(II)-L1 的吸收光谱与 apoCpC 在 300~500 nm 范围内的荧光光谱的重叠及(6)式可得配合物与 apoCpC 的光谱重叠积分  $J$  为  $2.11 \times 10^{-15} \text{ cm}^3 \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ,而  $R_0$  为 1.72 nm,能量转移效率  $E$  为

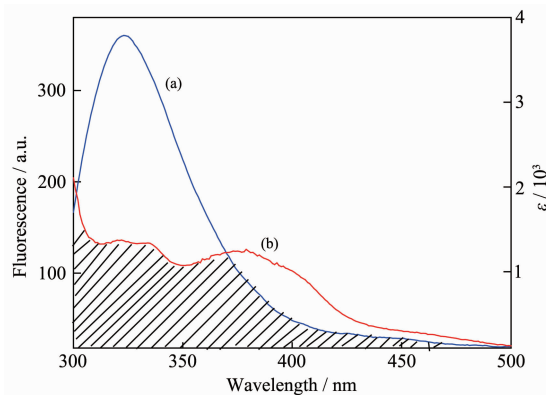


图6 apoCpC 的荧光光谱(a)和 L1 的紫外可见吸收光谱(b)

Fig.6 Overlap between the fluorescence spectrum(a) of apoCpC and UV-Vis absorption spectrum(b) of L1 at pH=7.4, 50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl



0.39, 配合物偶极中心与 apoCopC 中色氨酸残基偶极中心之间的距离  $r$  为 1.85 nm, 即  $0.5R_0 \leq r \leq 1.5R_0$ 。配合物对 apoCopC 荧光的淬灭仍源于无辐射能量转移,  $r$  值也没有明显的变化。

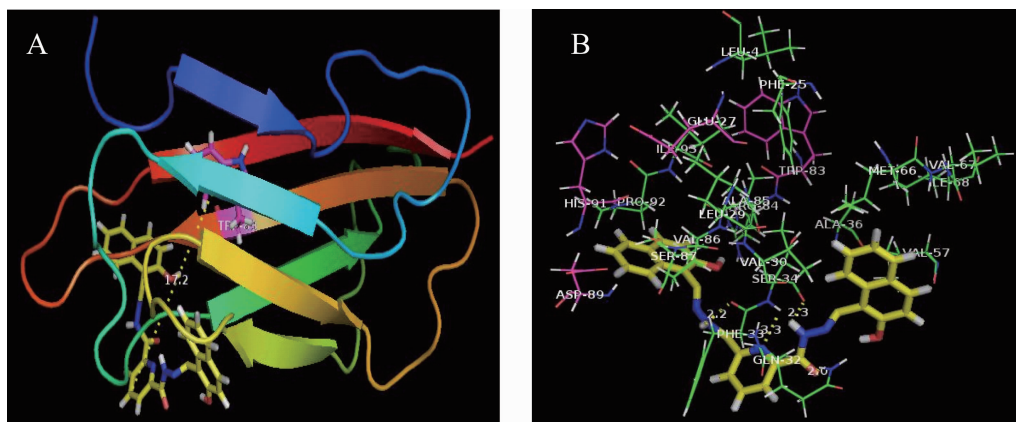
apoCopC 的 Trp83 位于蛋白质疏水桶中部, 与 N 端 Cu(II)结合位点相距约 1 nm, 与 C 端 Cu(I)结合位点相距约 2 nm<sup>[2-3]</sup>。由 Cu(II)滴定 L1-apoCopC 时同时与 L1、apoCopC 结合及所测得的  $r$  值可推断 L1 的结合位点位于蛋白质的 N 端。

#### 2.4.2 分子模拟分析

采用分子自动对接软件 ArgusLab 4.0.1 对 apoCopC 的 L1 结合位点及作用模式进行模拟。模拟中选用 apoCopC 的已知结构(PDB 码: 1M42)<sup>[1]</sup>, 通过全局搜索得出最低能量  $-8.18 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  的构象为对接模拟结果, 采用 PyMOL 软件可视化如图 7 所示。由图 7A 可见, L1 结合在 apoCopC 的 N 端, 由于与

蛋白质的结合使其分子的平面性遭到破坏。若仍将吡啶环看做分子的偶极中心, 则 83 位色氨酸残基偶极中心与 L1 偶极中心之间的距离  $r$  约为 1.72 nm, 与用 FRET 方法所测结果(1.85 nm)相近。

图 7B 是 apoCopC 的 L1 结合位点处的一些氨基酸残基。可见, apoCopC 直接参与 Cu(II)配位的 His91, Asp89 和 Glu27 残基处于 L1 结合位点附近, 有利于 Cu(II)为中心离子的三元配合物的形成。L1 的 -NH 与 Ser34 的 -OH 间形成中强氢键 ( $\text{N} \cdots \text{O}$ , 0.23 nm), 同时吡啶环上的 N 与 Ser34 的肽键氮形成弱氢键 ( $\text{N} \cdots \text{N}$ , 0.33 nm); 而 Phe33 的肽键氧与 L1 的另一 -NH 间形成中强氢键 ( $\text{O} \cdots \text{H} \cdots \text{N}$ , 0.22 nm), Glu32 的 -NH 与 L1 的羰基形成中强氢键 ( $\text{O} \cdots \text{H} \cdots \text{N}$ , 0.20 nm)。此外, 结合位点处有许多疏水性氨基酸残基 Val30, Phe33, Val57, Val67, Ala36 及 Pro92 等。



A: Cartoon ribbon model structure of apoCopC (PDB 1M42) showing the distance (yellow dash line) between Trp83 (purple) and L1 (yellow);

B: Formed hydrogen bonds between the amino acids (Gln32, Phe33 and Ser34) in apoCopC and L1 were shown as yellow dash line

图 7 L1 与 apoCopC 作用的分子模拟图

Fig.7 Molecular docking for the interaction between L1 and apoCopC

综上所述, 在  $\text{pH}=7.4$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲条件下, L1、Cu(II)和 apoCopC 可形成 L1-Cu(II)-apoCopC 三元配合物, L1 与 apoCopC 的结合导致 Cu(II)-CopC 配合物的一些性质 (如 Cu(II)配位数、Cu(II)与蛋白质的结合能力、结合 Cu(II)的还原性等)改变。与 L1 不同, 尽管水杨醛半卡巴腓(HSSC, Salicylaldehyde semicarbazone) 也可与 Cu(II)结合形成稳定配合物, 但由于其结合位点位于蛋白质的 C 端, HSSC 与 apoCopC 结合后并不影响 apoCopC 的 Cu(II)结合性质, 只有 apoCopC 的 Cu(II)结合位点完全饱和后才与 HSSC 结合<sup>[6]</sup>。因此, 使用 L1 为 apoCopC 的 N 端 Cu(II)结合位点扰动分子、HSSC 为 C 端 Cu(I)结合位

点扰动分子有利于 CopC 铜调控机理的深入研究。

### 3 结论

在合成、表征 2,6-吡啶二甲酰肼-2-羟基萘甲酰肼(L1)的基础上, 利用紫外-可见吸收光谱、荧光光谱、荧光寿命测定、分子对接等方法研究了溶液中 L1 的互变异构、与 Cu(II)及 apoCopC 的结合形成二元配合物的性质。通过 Cu(II)-L1 对 apoCopC 的荧光滴定及 Cu(II)对 L1-apoCopC 的紫外-可见吸收光谱、荧光光谱滴定证实: 在  $\text{pH}=7.4$ 、 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl 缓冲条件下, L1、Cu(II)、apoCopC 可形成以 Cu(II)为中心的三元配合物。



## 参考文献:

- [1] Arnesano F, Banci L, Bertini I, et al. *Structure*, **2002**,**10**: 1337-1347
- [2] Arnesano F, Banci L, Bertini I, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**,**100**:3814-3819
- [3] Zhang L, Koay M, Maher M J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**,**128**:5834-5850
- [4] Song Z, Ming J, Yang B. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2014**,**19**:359-374
- [5] Song Z, Zheng X, Yang B. *Protein Sci.*, **2013**,**22**:1519-1530
- [6] Song Z, Wang J, Yang B. *Spectrochim. Acta A*, **2014**,**118**: 454-460
- [7] Zhao Y, Zhang B. *New J. Chem.*, **2006**,**30**:1207-1213
- [8] Wang J L, Zhao Y Q, Yang B S. *Inorg. Chim. Acta*, **2013**, **409**:484-496
- [9] WANG Cai-Rong(王彩荣), WANG Jing-Lin(王璟琳), LIU Bing(刘斌), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2013**,**29**:283-288
- [10] AN Ming(安鸣), XU Cai-Hong(许彩虹), MENG Jing-Yan(孟晶岩), et al. *J. Shanxi. Univ.: Nat. Sci. Ed.*(山西大学学报:自然科学版), **2015**,**8**:120-124
- [11] Wang Z J, Ren L X, Zhao Y Q, et al. *Spectrochim. Acta A*, **2008**,**70**:892-897
- [12] Pang E G, Zhao Y Q, Yang B S. *Chin. Sci. Bull.*, **2005**, **50**:2302-2305
- [13] Zheng X Y, Pang E G, Li H Q, et al. *Chin. Sci. Bull.*, **2007**,**52**:743-747