

镉(Ⅱ)与牛血清白蛋白的相互作用 及pH、钙(Ⅱ)、锌(Ⅱ)和表面活性剂的影响

王 夔 陈宝卫* 李永昌

(北京医学院药理学系)

聂松青

(北京医学院基础医学系)

王祥云 吴永慧

(北京大学技术物理系)

本文用恢复电位法、荧光分光光度法及粘度法研究了镉(Ⅱ)与牛血清白蛋白(BSA)的配位平衡和pH的影响。结果表明BSA有两类镉结合部位(2个强结合和10个弱结合部位)。Cd—BSA配位反应受pH影响,在近中性pH范围Cd(Ⅱ)与BSA结合未接近饱和时,以CURFIT程序对结合曲线拟合发现,每摩尔BSA平均结合Cd(Ⅱ)摩尔数的对数值与游离镉浓度的对数间成线性关系,进一步用Marguardt法处理得到Cd(Ⅱ)与BSA结合平衡方程式: $\bar{N} = K[\text{Cd}^{2+}]^m$, K 和 m 均为pH函数。构象研究表明 H^+ 和Cd(Ⅱ)的结合都能引起BSA构象改变。用凝胶色谱法测定了Zn(Ⅱ)、Ca(Ⅱ)、吐温—80和十二烷基硫酸钠(SDS)对Cd—BSA结合的影响。Zn(Ⅱ)可以竞争Cd(Ⅱ)在BSA上结合部位使Cd(Ⅱ)活动化。SDS能够有效抑制Cd(Ⅱ)与BSA结合,这种作用可能与SDS引起BSA构象改变有关。

关键词: 镉 牛血清白蛋白 表面活性剂

研究镉与血清白蛋白的相互作用对了解镉的中毒和解毒有重要意义。Tanford曾用极谱法研究了镉与牛血清白蛋白的反应,并指出pH对镉的结合有影响⁽¹⁾。Verma等⁽²⁾的平衡透析法研究表明在pH7,牛血清白蛋白(BSA)有3.5个镉结合部位,表观结合常数为 1.00×10^5 , Cu(Ⅱ)和Zn(Ⅱ)可使BSA结合镉能力下降。Martins等⁽³⁾的¹¹³Cd—NMR研究则提示2个强结合镉部位,其中一个可能是Cu(Ⅱ)、Zn(Ⅱ)、Cd(Ⅱ)共有的,而Cu(Ⅱ)和Zn(Ⅱ)结合能力大于Cd(Ⅱ)。作者之一⁽⁴⁾用电位法研究在一定pH(6.94)下Cd(Ⅱ)与BSA反应,证明有两类结合部位,第一类部位数为1.5,表观结合常数为 4.67×10^5 ,

本文于1983年11月28日收到

中国科学院科学基金资助课题

*本文作为陈宝卫硕士研究生论文的一部分

第二类部位数为10.4, 表观结合常数为 3.58×10^8 。本文在上述工作基础上测定了在不同pH下BSA—Cd(Ⅱ)相互作用以及Ca(Ⅱ)、Zn(Ⅱ)和表面活性剂的影响。

材料与 方法

1. 试剂

牛血清白蛋白(BSA), 电泳纯。硝酸镉、氯化镉、氯化锌及氯化钙、三羟甲基甲烷(tris)及十二烷基硫酸钠(SDS)均为分析纯, 吐温—80为药用品。各金属盐溶液均用EDTA配位法标定。tris—HNO₃缓冲液是用去离子水配制成0.05M tris和0.1M硝酸钾溶液, 并用1:1硝酸调至不同pH。tris—HAc及tris—HCl缓冲液同上法配制, 用0.1M NaCl维持离子强度, 3N盐酸或醋酸调pH。氢氧化钾标准液用中和法标定。所有溶液均用去离子水配制。

2. 仪器

pHS—2型酸度计, UJ25型高电势直流电位差计, MPF—4型荧光分光光度计, RHEOTEST—Ⅱ型旋转粘度计, FT—603井型 γ 闪烁探头和FH—408自动定标器, 721分光光度计。

3. 实验方法

(1) 用pH电位滴定法测定tris的解离常数及其镉配合物的稳定常数。为校正因tris与Cd(Ⅱ)配位对Cd—BSA结合常数的影响, 按Rossotti法^[5]测定了25°C, 0.1M KNO₃离子强度下的tris解离常数pK_a和Cd—tris配合物稳定常数 $\log \beta$ 。

(2) 用恢复电位法研究镉(Ⅱ)与BSA的配位平衡。在 $25.0 \pm 0.5^\circ \text{C}$ 、通氮、电磁搅拌下, 在25ml tris—HNO₃缓冲液中加入一定体积Cd(NO₃)₂溶液($9.854 \times 10^{-3} \text{M}$), 以pCd—1型镉离子选择电极和双液接饱和甘汞电极为电极系统测定游离镉离子浓度。加入 $2 \text{ml } 1.00 \times 10^{-4} \text{M}$ BSA溶液, 达到平衡后, 用微量注射器或微量滴定管加入Cd(NO₃)₂溶液至恢复原来镉离子浓度。在每一pH下, 改变Cd(NO₃)₂溶液加入量, 重复上述测量, 从而得到在不同pH下, 结合镉量与镉离子浓度的关系。

(3) 用凝胶色谱法研究镉与BSA的相互作用。在pH7.4和用0.1M NaCl维持离子强度条件下进行。用Sephadex—G25凝胶装柱, 柱床体积约25ml, 柱温 $25.0 \pm 0.5^\circ \text{C}$ 。用pH7.4tris—HCl缓冲液淋洗至平衡, 用葡聚糖兰测空白体积V₀, 流速为30ml/hr。

测镉离子与BSA的结合时, 将30mg BSA溶于2ml含¹¹⁵CdCl₂的氯化镉溶液($4.461 \times 10^{-4} \text{M}$, pH7.4)中, 用pH7.4tris—HCl缓冲液稀释至4ml, 搅拌, 20分钟后, 取2ml上柱, 以tris—HCl缓冲液淋洗。测定每份流出的 γ 放射性计数, 并用Lowry法测定蛋白质含量^[6]。

为测定Ca(Ⅱ)和Zn(Ⅱ) Cd(Ⅱ)与BSA结合的影响, 同上操作, 但分别另加不同量的ZnCl₂ ($1.148 \times 10^{-3} \text{M}$, pH7.4)或CaCl₂ ($1.100 \times 10^{-3} \text{M}$, pH7.4)。

为比较锌与镉在BSA分子上的结合能力以及结合方式的异同, 还用凝胶色谱法研究了镉离子对BSA结合锌(Ⅱ)的影响。将30mg BSA溶于2ml含⁶⁶ZnCl₂的氯化锌溶液(1.148

$\times 10^{-8} \text{M}$, pH7.4) 或含 $^{65}\text{ZnCl}_2$ 的氯化锌、氯化镉混合液 ($\text{ZnCl}_2 1.148 \times 10^{-8} \text{M}$, $\text{CdCl}_2 0.991 \times 10^{-8} \text{M}$, pH7.4) 中。取1ml上柱。其余同前。

为测定表面活性剂对镉(II)与BSA结合的影响, 在30mg BSA溶于2ml ^{115}Cd 标记的氯化镉溶液 ($5.000 \times 10^{-4} \text{M}$, pH7.4) 中, 另加入不同量的十二烷基硫酸钠(SDS)或吐温-80溶液(pH7.4)。其余操作同前。

(4) 用荧光分光光度法研究镉(II)与BSA的结合。为测定镉(II)与BSA结合时的荧光光谱变化及pH影响并与锌比较, 用MPF-4荧光分光光度计测定不同pH的BSA和加入不同量 CdCl_2 或 ZnCl_2 后的荧光发射光谱。

为研究表面活性剂对Cd-BSA结合的影响, 测定pH7.4(0.05M tris-HCl), 离子强度 $I=0.1$ (NaCl)条件下BSA、BSA-Cd荧光发射光谱随SDS和吐温-80浓度的变化。激发波长287nm。

(5) 用粘度法研究pH对BSA构象的影响。用旋转粘度计测定0.2%的BSA加Cd(II)溶液在37°C不同pH下的粘度。缓冲液tris-HAc, 以0.1MNaCl维持离子强度。

实验结果及数据处理

1. 用恢复电位法数据计算BSA结合镉量和条件结合常数

为考查tris与Cd(II)配位的影响, 由pH电位滴定数据, 以形成函数法, 计算得Cd-ttris 1:1配合物稳定常数 $\log \beta = 2.36$ (0.1MKNO₃), tris解离常数 $\text{p}K_a = 8.14$ (0.1MKNO₃), 文献值分别为 $\log \beta = 2.22$, $\text{p}K_a = 8.31$ (0.5M KNO₃)^[7]。

在tris溶液中加入少量硝酸镉时, 由于tris的总浓度 T_B 远大于镉的总浓度 T_{Cd} , 而Cd-ttris配合物很不稳定, 故可将与镉配合的tris忽略不计, 则由 T_B 按式(1)计算未质子化的tris浓度[B],

$$[B] = \frac{T_B K_a}{K_a + [H^+]} \quad (1)$$

再由所得[B]按式(2)计算未配合的镉离子浓度,

$$[Cd^{2+}] = \frac{T_{Cd}}{1 + \beta[B]} \quad (2)$$

加入BSA后, 镉离子浓度降低。为使 $[Cd^{2+}]$ 恢复原来数值, 加入的镉的总浓度 T'_{Cd} 应符合式(3)关系,

$$T'_{Cd} = [Cd^{2+}] + \beta[Cd^{2+}][B]' + q[Cd_qP] \quad (3)$$

式中 $[B]'$ 为此时未质子化的tris浓度, 但因 T_B 很大, 可忽略[B]与 $[B]'$ 的差别, 所以式(3)写成,

$$T'_{Cd} = [Cd^{2+}] + \beta[Cd^{2+}][B] + q[Cd_qP] \quad (3')$$

式中 q 为每摩尔BSA上结合镉数, $[Cd_qP]$ 为Cd-BSA浓度。整理并将式(2)代入(3')得,

$$q[Cd_qP] = T'_{Cd} - T_{Cd} \quad (4)$$

因此在给定条件下, 平均每摩尔BSA结合Cd(II)数可按式计算:

$$\bar{N} = \frac{T'_{Cd} - T_{Cd}}{T_P} \quad (5)$$

T_P 为BSA总浓度。

在每一pH下, 改变不同的 T_{Cd} , 按上法测得恢复不同 $[Cd^{2+}]$ 所需的 T'_{Cd} , 从而算出每一条件下的 \bar{N} , 结果见表 1。其中 $[Cd^{2+}]$ 是通过式 (1)、(2) 校正的游离镉浓度。

表 1 不同 pH 下牛血清白蛋白结合镉量(25°C, $I=0.1$)
Table 1 Average Amount of Cd Bound to BSA under Different pH

pH 5.28		pH 6.34		pH 6.90		pH 7.28		pH 7.92	
$[Cd^{2+}]_M$	\bar{N}								
6.72×10^{-6}	0.284	6.68×10^{-6}	0.386	4.85×10^{-6}	1.05	3.30×10^{-6}	1.45	1.28×10^{-6}	1.53
1.16×10^{-5}	0.216	1.00×10^{-5}	0.641	7.27×10^{-6}	1.41	4.95×10^{-6}	1.52	2.22×10^{-6}	1.64
1.55×10^{-5}	0.421	1.33×10^{-5}	0.693	9.70×10^{-6}	1.55	6.60×10^{-6}	1.69	2.96×10^{-6}	1.79
2.32×10^{-5}	0.519	2.00×10^{-5}	0.899	1.45×10^{-5}	1.75	9.89×10^{-6}	2.09	4.45×10^{-6}	1.81
3.09×10^{-5}	0.689	2.67×10^{-5}	1.09	1.94×10^{-5}	2.05	1.32×10^{-5}	2.36	5.92×10^{-6}	2.10
3.86×10^{-5}	0.784	3.33×10^{-5}	1.30	2.42×10^{-5}	2.26	1.64×10^{-5}	2.50	7.42×10^{-6}	2.21
7.70×10^{-5}	0.926	6.63×10^{-5}	2.04	4.82×10^{-5}	2.99	3.28×10^{-5}	3.46	1.47×10^{-5}	2.94
1.15×10^{-4}	1.43	9.91×10^{-5}	2.57	7.20×10^{-5}	4.00	4.90×10^{-5}	4.05	2.20×10^{-5}	3.47
1.53×10^{-4}	1.81	1.32×10^{-4}	3.05	1.19×10^{-4}	4.61	8.10×10^{-5}	5.61	2.92×10^{-5}	4.01
2.27×10^{-4}	2.02	1.96×10^{-4}	4.15	1.42×10^{-4}	5.99	9.68×10^{-5}	6.14	4.35×10^{-5}	4.61
3.01×10^{-4}	2.79	2.59×10^{-4}	5.22	9.56×10^{-5}	4.54	1.28×10^{-4}	6.29	5.77×10^{-5}	6.10
		3.21×10^{-4}	5.42	1.88×10^{-4}	6.32	1.59×10^{-4}	6.34	7.14×10^{-5}	6.23

根据表 1 数值, 用 Scatchard 作图法可得不同 pH 下的 $\bar{N}/[Cd^{2+}] \sim \bar{N}$ 曲线。由图 1 可见, 在 pH 6.6, BSA 中存在两类 Cd(II) 结合部位, 其他 pH 结果相同。按两段直线的斜率与在 \bar{N} 轴上的截距, 可得在不同 pH 下两类结合部位的条件结合常数 K_1 、 K_2 和各自的结合部位数 n_1 、 n_2 (见表 2)。

表 2 Cd-BSA 条件结合常数(25°C, $I=0.1$)
Table 2 Conditional Binding Constants of Cd-BSA

pH	n_1	K_1	n_2	K_2
5.28	1.80	1.80×10^4	9.90	1.03×10^3
6.34	1.80	5.00×10^4	9.90	2.36×10^3
6.90	1.90	5.00×10^3	9.90	6.58×10^3
7.28	1.90	1.17×10^3	9.90	1.04×10^3
7.92	1.90	8.00×10^3	9.90	1.67×10^3

把不同 pH 下 \bar{N} 对 $\log Cd$ 作图, 得一组曲线 (见图 2)。这组曲线表现在 Cd(II) 的结合尚未饱和时, 在不同 pH 下, \bar{N} 和游离镉浓度的关系。用曲线拟合法⁽⁸⁾得近中性 pH 范围内 Cd-BSA 结合曲线方程,

$$\bar{N} = Ae^{BX} \quad (6)$$

或 $\log \bar{N} = \log A + B'X \quad (7)$

实际上将 $\log \bar{N}$ 对 $\log [Cd]$ 作图确有线性关系, 表 3 表明 (6) 式中的 X 即 $[Cd]$ 。可由这些线性方程计算不同条件下的 \bar{N} 值, 计算结果相对于实验值的平均误差为 $\pm 5\%$ 。

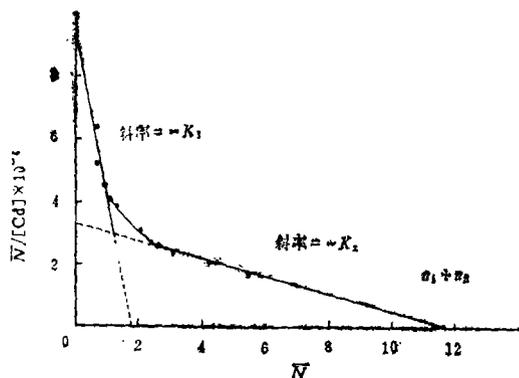


图1 Cd-BSA结合的Scahchard图(pH6.9)
Fig.1 Scatchard diagram of Cd-BSA binding(pH 6.9)

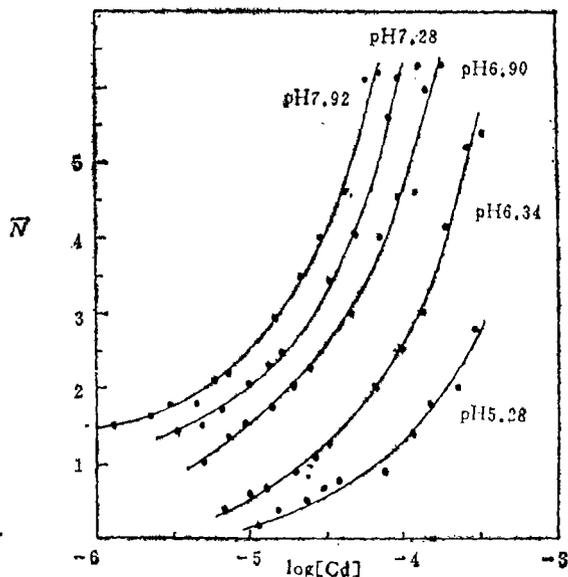


图2 Cd-BSA结合等温线
Fig. 2 Cd-BSA binding isotherms
0.05M tris-HNO₃, 0.1M KNO₃

表 3 表示 Cd-BSA 结合的线性方程
Table 3 Linear Equations for Cd-BSA Binding(25°C, I=0.1)

pH	线性方程 linear equation	线性相关系数 linear correlation coefficient
7.92	$\log \bar{N} = 2.221 + 0.358 \log \text{Cd}$	0.9658
7.28	$\log \bar{N} = 2.465 + 0.428 \log \text{Cd}$	0.9914
6.90	$\log \bar{N} = 2.518 + 0.467 \log \text{Cd}$	0.9937
6.34	$\log \bar{N} = 3.067 + 0.662 \log \text{Cd}$	0.9939
5.28	$\log \bar{N} = 2.520 + 0.598 \log \text{Cd}$	0.9940

2. 用凝胶色谱法研究Cd-BSA结合及影响因素

Cd-BSA 洗脱曲线(图3)中放射性计数峰与蛋白质峰一致, 后一峰为未与BSA结合的其他形式存在的镉(II), 由峰面积计算BSA结合Cd(II)的百分数(%[Cd-BSA])。

在Cd+BSA体系中加入Zn(II)和Ca(II)后可使BSA结合Cd(II)百分数下降, 并且随Zn(II)浓度的增加 %[Cd-BSA] 愈来愈小(如图4), 有利于Cd(II)的活动化, 但钙(II)的加入对Cd-BSA结合影响不显著。

用⁶⁵Zn示踪凝胶色谱法测定了在Zn(II)与BSA体系中的 %[Zn-BSA] 为 17.4%; 有CdCl₂存在时为 16.4%。这一结果表明在 Zn:Cd = 1:1 时, 金属离子间对BSA的竞争, Zn(II)能使66%的与蛋白质结合的Cd(II)活动化, 而Cd(II)的作用只能使5%的与蛋白质结合的Zn(II)活动化。

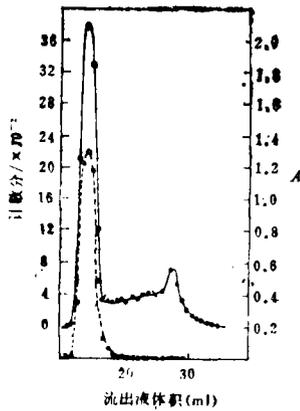


图3 Cd-BSA体系的凝胶色谱
Fig. 3 Chromatograph of Cd-BSA system

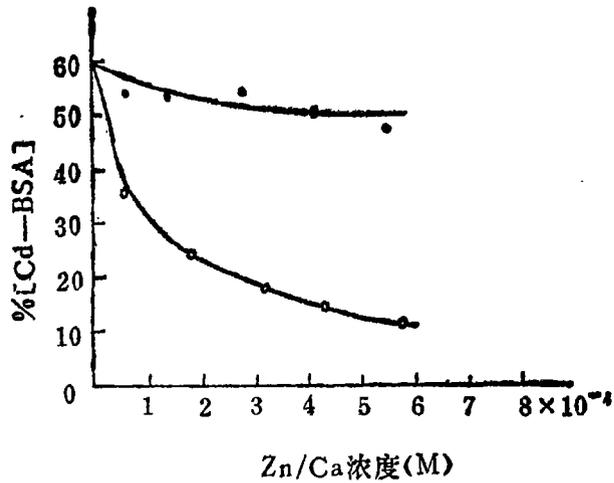


图4 Zn²⁺及Ca²⁺对 Cd-BSA结合的影响
Fig. 4 Influence of Zn²⁺(o) and Ca(·) on Cd-BSA binding BSA 1.15×10⁻⁴M, CdCl₂ 2.23×10⁻⁴M, buffer solution 0.05M tris-HCl(pH7.4), 0.1M NaCl

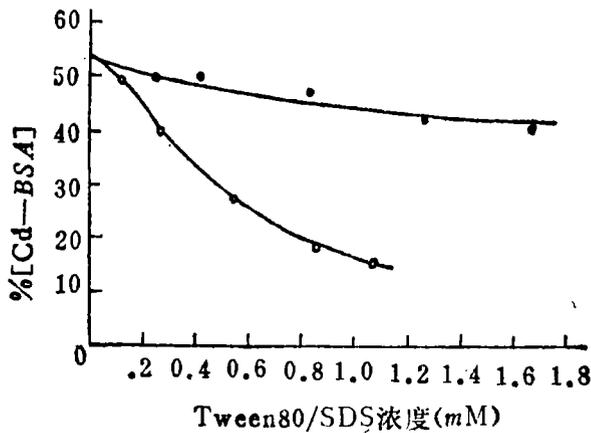


图5 吐温80和SCS对Cd-BSA结合的影响
Fig.5 Influence of Tween 80(·)and SDS(o) on Cd-BSA binding BSA 1.15×10⁻⁴ M, CdCl₂ 2.50×10⁻⁴ M, buffer solution 0.05M tris-HCl (pH7.4), 0.1M NaCl

凝胶色谱法研究结果说明, 表面活性剂有降低 Cd-BSA 的结合作用, 从图5可见SDS的作用远大于吐温——80。

3. BSA 和 Cd-BSA的荧光发射光谱

图6表明BSA荧光强度随pH增加而加强, 发射峰位略有红移(由344nm到346nm)。另外, 镉与BSA结合导致荧光增强, 并使峰位红移(由344nm到348nm), 在低pH时镉的增强作用较小, 随pH增加, 这种影响逐渐变大。而且 F/F^0 与 $[Cd^{2+}]$ 间有线性关系(见图7)。

与Cd(II)相似, Zn(II)也有增强BSA荧光作用, 但当Zn/BSA比(\bar{v})>2时, Zn(II)浓度变化不再影响荧光强度(图7)。

表面活性剂与BSA的相互作用使后者构象发生变化, 表现为荧光强度和峰位的改变。SDS和吐温-80虽都使BSA的荧光发射光谱峰位兰移, 荧光淬灭, 但影响方式不同。SDS/BSA不大时只使荧光减弱, SDS/BSA>6时, 峰位由344nm移到325nm, 显示BSA可能有两种构象共存。而吐温-80浓度的增加使峰位缓慢兰移。另外, 在吐温-80存在下, 加Cd(II)不改变峰位但使荧光强度增加(图8)。在SDS存在下, 加入Cd(II)不再影响BSA的荧光

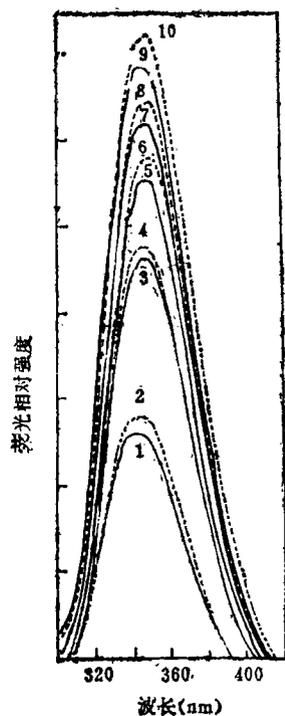


图6 BSA(—)和Cd-BSA(---)的
荧光发射光谱

Fig. 6 Fluorescence emission spectra
of BSA(—) and Cd-BSA(---).

exciting wavelength: 307nm.

BSA: 3.09 μM , Cd(NO₃)₂: 2.468 μM

1,2:pH 4.48

3,4:pH 5.56

5,6:pH 6.30

7,8:pH 7.30

9,10:pH 8.04

强度(图9)。当SDS/BSA < 6时,
随SDS浓度增加, F/F^0 急剧下降,到
SDS/BSA > 6后,变化很小。

4. BSA溶液的流体性质测定

由图10可见Cd-BSA溶液的粘
度在BSA等电点附近最小。而由BSA
和Cd-BSA溶液(pH7.98)的流
变曲线(图11)可见BSA溶液的切变速
度D与切应力 τ 之间不成线性关系,
因此BSA溶液为非牛顿流体,而BSA
与Cd(II)的结合使表观粘度增加。

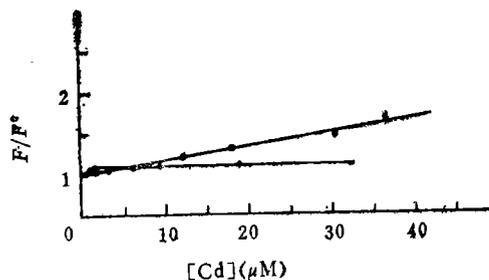


图7 镉及锌对BSA荧光发射光谱的影响(346nm)

Zn: 激发波长: 289nm; BSA 156 μM

pH 7.40(tris-HCl)

Cd: 激发波长: 2283nm; BSA 3.05 μM .

pH 7.40(tris-HNO₃)

Fig. 7 Influence of Cd and Zn on fluorescence emission
spectra of BSA (346nm)

Zn: exciting wavelength 289nm, BSA: 1.56 μM ,
pH 7.40(tris-HCl)

Cd: exciting wavelength: 283nm, BSA: 3.05 μM ,
pH 7.40(tris-HNO₃)

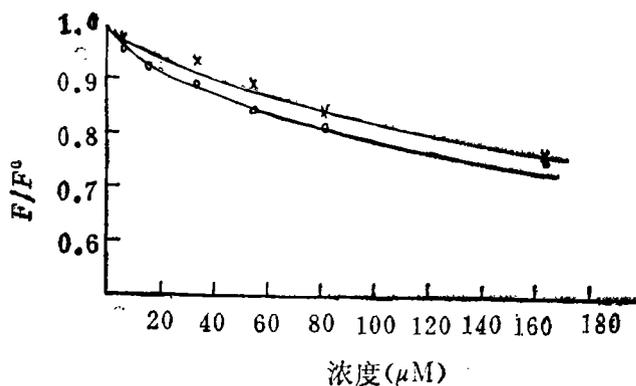


图8 荧光强度随吐温-80浓度的变化

Fig. 8 Variation of fluorescence intensity
with concentration of Tween-80.

BSA: 3.05 μM , CdCl₂: 6.419 μM buffer
solution: tris-HCl(pH 7.40) 0.1M NaCl

* Tween 80 + BSA + Cd

o Tween 80 + BSA

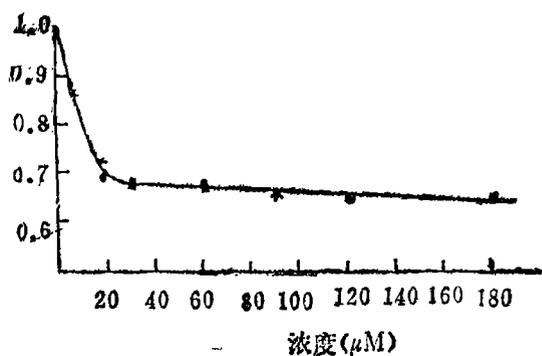


图9 荧光强度随SDS浓度的变化
Fig.9 Variation of fluorescence intensity with concentration of SDS.

BSA: 3.07 μM CdCl₂: 7.419 μM, buffer solution: tris-HCl (pH 7.40), 0.1M NaCl
SDS+BSA+Cd
○ SDS+BSA

图10 pH对Cd-BSA溶液粘度的影响
Fig.10 Influence of pH on viscosity of Cd-BSA solutions 0.2% BSA, 3.219×10⁻⁴M CdCl₂, 0.1M NaCl pH buffer solution: tris-HAc

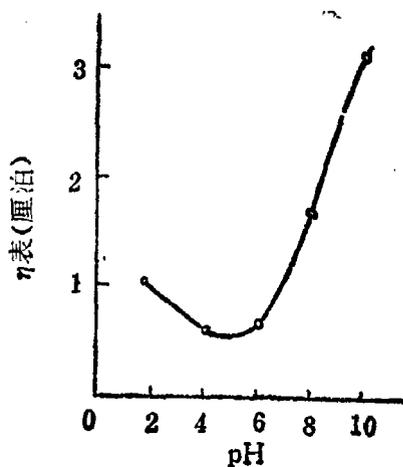
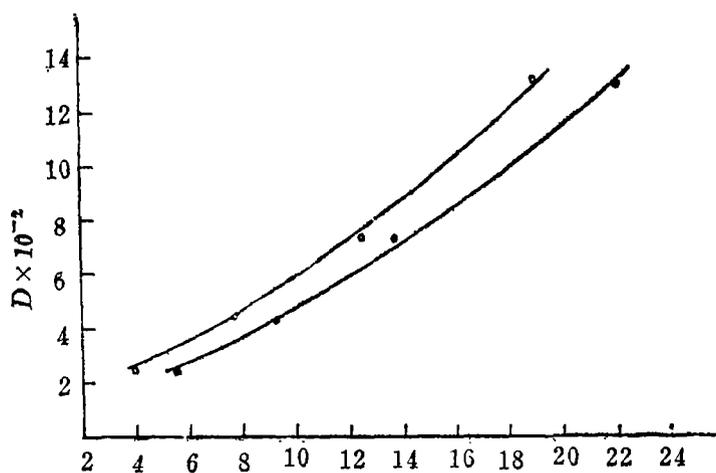


图11 BSA(○)和Cd-BSA(◐)的流变曲线
Fig.11 Rheologic curves of BSA (○) and Cd-BSA(◐) solutions. 0.2% BSA, 0.001207M CdCl₂, pH 7.98 (tris-HAc), 0.1M NaCl

讨 论

1. Cd(II) 在 BSA 上结合部位的估计

本工作在 5 个不同 pH 值及接近体液的离子强度条件下测定了 BSA 与 Cd(II) 的结合部位数和结合常数。结果表明, 在测定的 pH 范围内, BSA 至少有两类结合 Cd(II) 部位, 强

结合部位数为2, 弱结合部位数为10, 最大结合Cd(II)部位数为12, 而表现结合常数分别在 $10^4 \sim 10^6$ 和 $10^3 \sim 10^4$ 范围变动。其结果与王祥云等人在pH6.94下测定的结合部位数及Martins^{11,13}Cd—NMR的研究结果一致。Waldmann—Meyer测得Cd(II)在BSA上结合部位数为17($K_1 = 1.3 \times 10^8$, pH5.95)⁽⁹⁾, Verma等报告BSA有3.5个Cd(II)结合部位($K_1 = 1 \times 10^5$, pH7, 37°C)。他们都只得到一类Cd(II)在BSA上的结合部位, 我们认为这可能是实验中金属离子浓度不够低造成的。

按照Martins等的研究, 在两个强结合部位中有一个是Cu(II)、Zn(II)、Cd(II)共同的, 而且Zn(II)和Cu(II)对这一部位的亲和能大于Cd(II), 根据Cu(II)、Zn(II)在BSA上结合部位推测^(10,11), Cd(II)可能与BSA的N端Asp—Thr—His成配。弱结合部位中可能包含有咪唑基, 根据之一是 $\bar{N} \sim \text{pH}$ 曲线(图12)在pH6—7间有一突跃, 与His的 $\log K_2 = 6.02$ 很接近, 可以认为在这一pH范围, His咪唑基容易去质子有利于配位。

2. pH对Cd—BSA结合的影响

实验结果表明pH下降使BSA结合镉量降低, 与Tanford所得结论一致。如前所述, 在一定pH下, 当[Cd]在小于 3×10^{-4} M范围内变化时, $\log \bar{N}$ 与 $\log [\text{Cd}]$ 间成线性关系。pH的改变使直线方程的斜率和截距改变。用Marguardt法以pH为变量对上述斜率和截距进行非线性拟合, 可得一适用于近中性pH范围(pH5—8)表示Cd—BSA结合的平衡方程式:

$$\bar{N} = K[\text{Cd}^{2+}]^m \quad (9)$$

这里, K 和 m 是pH的函数:

$$K = 0.763 \times \exp[0.759(\text{pH})^3 - 15.66(\text{pH})^2 + 106(\text{pH}) - 228.9]$$

$$m = [0.2399(\text{pH})^3 - 4.885(\text{pH})^2 + 32.51(\text{pH}) - 69.41]/2.303。$$

由式(9)计算的 \bar{N} 值相对于实验值的平均误差为 $\pm 8\%$ 。在估计不同条件下大分子与金属离子相互作用程度方面, 运用这种计算模型是有用的, 而且可以纳入有大分子参与的多金属多配体体系的计算机模型, 计算体液中物种分配。

3. H⁺和Cd(II)结合与BSA构象关系

pH对BSA结合Cd(II)影响可能有两个原因, 一是质子与金属直接竞争结合部位, 二是质子与BSA结合改变构象, 通过远程变构作用改变BSA结合Cd(II)能力。

在pH4.48~8.04范围内, pH增加使BSA和Cd—BSA的T_p荧光激发峰(344~346nm)

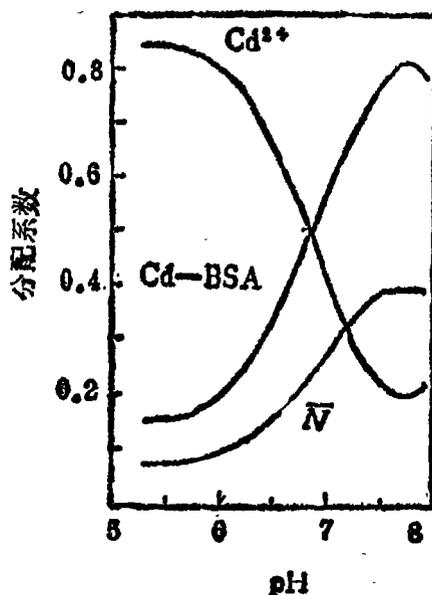


图12 Cd—BSA体系中Cd物种分配图
Fig. 12 Distribution diagram of Cd species in Cd—BSA system
Cd: 2×10^{-5} M, BSA: 8×10^{-6} m

增强并逐渐红移。可以认为pH增加时,使Trp残基微环境改变,亲水性增强。Harmsen根据BSA在pH6~9范围内发生构象转移并引起咪唑基解离常数改变,认为His残基被包在盐桥中^[13]。Margaret等^[14]认为在pH由7到9变化时经历N→B构象转移,此时在N构象中被掩蔽的His侧链暴露。在N构象中有十个His侧链被掩蔽,而在B构象中暴露。本工作的荧光相对强度与pH的关系显示在pH5~6有较大变化。另外粘度~pH曲线则在pH5附近有一最低点,相当于等电点。在等电点转变的出现表明构象变化,这可由静电作用解释。在pH5~6附近最低即可解释为此时BSA处于紧构象形式,这时配位部位难以达到,同时紧构象的荧光强度较弱。

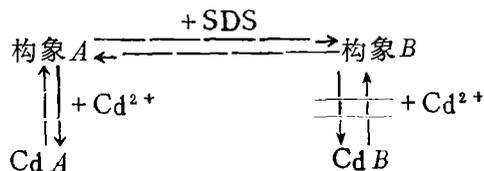
Cd(II)的结合使BSA荧光增强,使BSA溶液的粘度增加。二者都提示,Cd(II)与BSA的结合也会引起BSA构象变化,由于H⁺结合使荧光淬灭而Cd(II)结合使荧光增强,认为Cd(II)与pH引起的构象变化可能不同。质子的结合单纯由电荷改变起作用,而Cd(II)的结合还通过配位结合起作用。这种配位可能使BSA的 α -螺旋程度降低,还可能使Trp的极性增强。Cd(II)、Zn(II)的结合使BSA荧光发射光谱强度增加,提示他们的结合部位与BSA两个Trp残基比较接近。

4. Zn(II) Ca(II) 对Cd—BSA结合的影响

值得注意的是,Zn(II)对Cd—BSA结合影响显著,而Cd(II)对Zn—BSA结合影响极小。Zn(II)与Cd(II)之间的相互影响可以是直接竞争同一部位,也可以是经过结合后影响构象。Zn(II)也能使BSA荧光强度增强,但当 $\nu > 2$ 时 F/F° 就不再改变,而Cd(II)在 $\nu < 12$ 时使 F/F° 一直增加。这些现象说明Zn(II)与Cd(II)有共同的强结合部位,对这些部位来说,Zn(II)的结合能力大于Cd(II),因此可以看出当Zn(II)与BSA结合时,Cd(II)几乎不能与Zn(II)竞争。当Cd(II)与BSA结合时,Zn(II)的加入可以通过直接竞争取代强结合的Cd(II),使Cd(II)活动化。Ca(II)对Cd—BSA结合影响不显著。

5. 表面活性剂对Cd—BSA结合的影响

已知表面活性剂与BSA结合可引起构象变化,而构象变化可影响BSA与金属的结合^[15,16]。研究表明SDS使BSA结合Cd(II)量大大降低,SDS又能使BSA荧光发射光谱峰位兰移,强度减弱。因此可以认为SDS使BSA构象改变从而改变BSA结合Cd(II)的能力。实验表明随SDS增加荧光发射光谱出现一等发射点,提示SDS存在下至少有两种构象状态,可能Cd(II)只与其中一种结合:



吐温-80与SDS不同,因为它非离子型表面活性剂,与BSA结合方式不同,峰位及强度随吐温浓度变化而逐渐变化。另外,在吐温-80存在下,Cd(II)仍使BSA的荧光增强,而在SDS存在下,Cd(II)对荧光不再产生影响。把这一现象与前述凝胶色谱结果联系起来看,进一步说明SDS使构象A变成一种难以与Cd(II)结合的构象B。构象B可能包含这样的特征:当SDS以静电和疏水方式与BSA结合时,封闭了一些Cd(II)的结合部位,肽

链的 Trp-134 和 Trp-212 与这些结合部位有关。吐温-80 虽能影响 Trp 的环境,但对 Cd (II) 结合部位干扰不大。

综上所述,阴离子型表面活性剂 SDS 可以通过改变构象有效地抑制 Cd-BSA 间的结合。非离子型表面活性剂吐温-80 不能达到有效抑制 Cd-BSA 间结合的目的。

致谢 北京大学技术物理系刘元方教授及北京医学院基础医学系林克椿教授给予本工作帮助与支持,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Tanford, C., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 211 (1952).
- [2] Verma, M.P., *Biol. Trace Element Res.*, **4**, 35 (1982).
- [3] Martins, E.O., DraKerberg, T., *Inorg. Chim. Acta*, **67**, 71 (1982).
- [4] 王祥云, 吴永慧, 刘元方, 北京大学学报, **5**, 22 (1984).
- [5] Rossotti, H., *The Study of Ionic Equilibria*, Longman, London (1978) P, 72.
- [6] 蒋传葵, 金承德, 吴仁龙, 陶宗晋, 工具酶的活力测定, 上海科技出版社 (1982) 152页。
- [7] Hanlon, D.P., Watt, D.S., Westhead, E.W., *Anal. Biochem. Chem.*, **16**, 225 (1966).
- [8] Spain, D., *BASIC Microcomputer Models in Biology*, Addison-Wesley, Reading (1982).
- [9] Waldmann-Meyer, H., *J. Biol. Chem.*, **235**, 3337 (1960).
- [10] Peters Jr., T., Blumenstock, F.A., *J. Biol. Chem.*, **242**, 1574 (1967).
- [11] Kragh-Hansen, U., *Pharm. Rev.*, **33**, 17 (1981).
- [12] D.W. 琼斯, 生物聚合物波谱学导论, 科学出版社 (1983) 234页。
- [13] Harmsen, B.J.M., De Bruin, S.H., Janssen, L.H.M., De Miranda, J.F.R., Van Os G.A.J., *Biochem.*, **10**, 3217 (1971).
- [14] Suzukida, M., Le, H.P., Shahid, F., Mcpherson, R.A., Birnbaum, E.R., Darnall, D.W., *Biochem.*, **22**, 2415 (1983).
- [15] Steinhardt, J., Krijn, J., Leidy, J.G., *Biochem.*, **10**, 4005 (1971).
- [16] Steinhardt, J., Leidy, J.G., Mooney, J.P., *Biochem.*, **11**, 1809 (1972).

INTERACTION BETWEEN CADMIUM (II) AND BOVINE SERUM ALBUMIN AND INFLUENCES OF pH, CALCIUM(II), ZINC(II) AND SURFACTANTS

Wang Kui Chen Baowei Li Rongchang

(Department of Pharmacy, Beijing Medical College)

Nie Sungching

(Department of Basic Medical Sciences, Beijing Medical College)

Wang Xiangyun Wu Yunhui

(Department of Technical Physics, Beijing University)

The binding of cadmium ion to BSA and the pH effect were studied by means of potential-restoration, fluorescence and viscosity studies. The results show that there may be two kinds of binding sites to cadmium (two strong and ten weak). The binding of cadmium is significantly affected by variation of pH. In nearly neutral media, if Cd binding is not saturated, there is linear relation between the logarithm of number of moles of Cd bound per mole of BSA and the logarithm of free Cd ion concentration. Further treatment gives an equation $\bar{N} = K[\text{Cd}^{2+}]^m$, with which the Cd-binding equilibrium may be estimated. In this equation, K and m are all functions of pH. The experimental results give information of the conformational changes induced by the binding of proton or Cd(II). By means of gel chromatographic studies, the influences of Zn(II), Ca(II), Tween-80 and SDS were studied. The effective competition of Zn(II) may mobilize the BSA bound Cd(II). SDS inhibits the Cd-BSA binding. These actions may be relevant with conformation conversion.

Keywords cadmium bovine serum albumin surfactant