

金属—血清白蛋白的结构研究 VI. 等电点附近 HSA 和 BSA 中 Cu(II) 和 Ni(II) 金属中心的结构

周永洽* 梁 宏 郝韵琴 申泮文

(南开大学化学系, 天津 300071)

本文用紫外光谱研究了等电点附近 HSA 或 BSA 与 Cu(II) 或 Ni(II) 金属中心的结构。结果表明: 在 pH 4.0~5.3 时, Cu(II)—HSA 配合物在低浓度时独具五配位的四方锥构型, 高浓度时 ($> 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) 为四配位的四方平面构型, Cu(II)—BSA、Ni(II)—BSA 在上述 pH 范围内均只存在四方平面构型。Cu(II)、Ni(II) 结合位置与生理 pH 下的相同, 均在白蛋白的 N 端三肽段上, 与 Asp¹ 的 $\alpha\text{-NH}_2$ 、His³ 的咪唑基 N 及两个去质子肽氮配位, Cu(II) 在 HSA 中的第五结合基团为 Asp¹ 的羧基。本文还对上述 pH 效应进行了讨论。

关键词: 铜(II)—血清白蛋白 镍(II)—血清白蛋白 构型 光学电负性
pH 效应

前 言

我们曾用类似于本文的方法研究了生理 pH 下 Cu(II)、Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的相互作用, 推断 1:1 Cu(II)—HSA、Cu(II)—BSA、Ni(II)—BSA 的金属中心构型均随浓度变化^(1,2)。它们在低浓度下均是五配位的, 有图 1(b) 的四方锥构型; 浓度较高时 (约大于 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) 均转化为如图 1(a) 的四方平面构型。

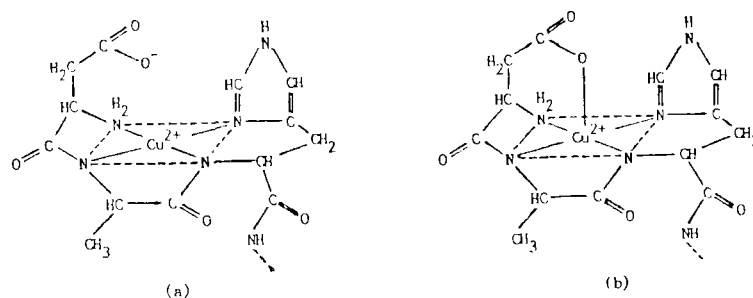


图1 Cu(II)—HSA 配合物的两种可能结构

Fig.1 Two possible structures of Cu(II)—HSA complexes

为进一步研究有关的结构变化, 本文研究了 HSA 和 BSA 在等电点 (分别为 pH 5.2 和 5.3) 附近 Cu(II)、Ni(II) 金属中心的结构。发现在 pH 4.0~5.3 时, 除 Cu(II)—HSA 在低于 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 浓度下以五配位的四方锥构型存在外, 各体系均以四方平面结构存在。本文

本文于1991年3月13日收到。

* 通讯联系人。

讨论了这种酸度效应。

实 验

HSA、BSA 含量均约为 95%，分别购自天津生化制品厂和北京华美生物工程公司，用前未经进一步纯化。新鲜配制的 HSA 和 BSA 溶液的浓度用光度法标定⁽³⁾。NaCl、CuCl₂、NiCl₂、盐酸、NaOH、EDTA 均为分析纯。CuCl₂、NiCl₂ 溶液浓度用 EDTA 标定，所有溶液均用去离子水配制，且均含 $0.10\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}\text{NaCl}$ 以维持相同的离子强度。所有溶液中均不加缓冲剂，pH 用稀盐酸和 NaOH 调控。用上述溶液在测定 UV 光谱前混合成不同浓度 1:1 摩尔比的 Cu(II)—HSA、Cu(II)—BSA、Ni(II)—BSA 试样溶液，用同浓度的 HSA 或 BSA 作参比。

测量 pH 用 pH5—2C 型精密酸度计，紫外光谱用 UV—240 型电子吸收光谱仪，室温下记谱。

结 果 与 讨 论

一. UV 光谱描述

在 pH5.3，Cu(II)—HSA 浓度低于 $4.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 时有两个吸收峰，见图 2(a)的谱线 1，250nm 处的峰随浓度增大由强逐渐变弱，明显由大致在 250nm 和 253nm 的两个峰叠加而成。290nm 附近的峰随浓度增大逐渐增强，当 Cu(II)—HSA 的浓度增大到 $4.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 时，只在 295nm 处保留一个强的锐峰，见图 2(b)。随着 pH 降低，上述吸收峰均逐渐减弱，当 pH 接近 4.0 时，290nm 附近的峰消失，只剩下 250nm 附近的峰，见图 2(a)的谱线 2。250nm 附近峰的位置几乎不随浓度变化，290nm 附近的峰则随浓度增大稍有红移。

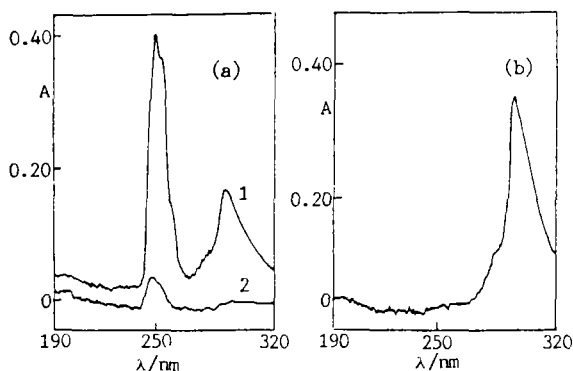


图 2 Cu(II)—HSA 的 UV 光谱

Fig.2 UV spectra of Cu(II)—HSA complexes:

(a) $1.8 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, line 1: pH5.3;

line 2: pH4.0;

(b) $4.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH5.3

在 pH5.3 时，Cu(II)—BSA 和 Ni(II)—BSA 在 $5.0 \times 10^{-5}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \sim 2.5 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 浓度范围内分别只在 296~297nm 处和 292nm 处出现一个峰，250nm 附近均不显示吸收，见图 3(a)。

二. 金属中心结构研究

在 pH4.0~5.3 附近浓度低于 $4.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 时，Cu(II)—HSA 存在三个吸收峰，浓度高于 $4.0 \times 10^{-4}\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 时，只在 295nm 处保留一个吸收峰。Cu(II)—BSA、Ni(II)—BSA 都只有一个吸收峰。

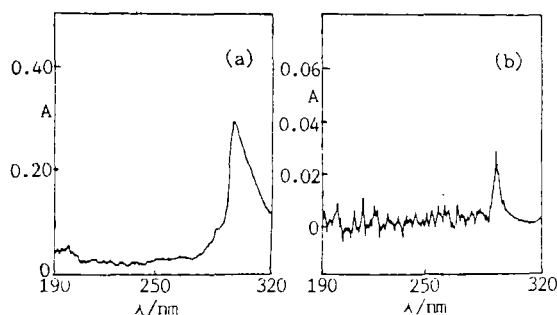
由常见分子轨道能级图推断, d^8 或 d^9 组态的 Ni(II) 或 Cu(II) 取四方平面构型时, 都只有一个允许的 LMCT 跃迁 $e_g(N) \rightarrow b_{1g}^*(3d)$ 。取四方锥构型时, 允许的 LMCT 跃迁有 3 个^{〔1〕}: $a_1(0) \rightarrow a_1^*(3d)$ (1) $e(N) \rightarrow a_1^*(3d)$ (2) $a_1(N) \rightarrow a_1^*(3d)$ (3)

图 3 UV 光谱

Fig.3 UV spectra:

(a) Cu(II)-BSA $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH5.3;

(b) Ni(II)-BSA $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH5.3



因此, 只要假定在上述 pH 范围内, Cu(II)-HSA 在 $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 附近由较低浓度时的四方锥构型转化为较高浓度时的四方平面构型, 而 Cu(II)-BSA, Ni(II)-BSA 均为四方平面构型即可满意地解释上述光谱。

我们曾经论证^{〔1〕}, 跃迁(1)的电子主要来自羧基 COO^- 氧^{〔4〕}, 跃迁(2)的电子主要来自 $\alpha\text{-NH}_2$ ^{〔5,6〕}, 跃迁(3)的电子主要来自去质子肽氮, 分别对应于图 2(a)中的 250、253 和 291 nm 处的峰。

上述归属和谱带的位置完全符合电荷转移谱带跃迁能 $E(\text{LMCT})$ 的计算公式^{〔1,2,7〕}。

对 Cu(II)-HSA, Cu(II)-BSA: $E(\text{LMCT}, \text{cm}^{-1}) = 30000[\chi(\text{L}) - \chi(\text{M})] + \Delta\text{OE}$

对 Ni(II)-BSA: $E(\text{LMCT}, \text{cm}^{-1}) = 30000[\chi(\text{L}) - \chi(\text{M})] + \Delta\text{OE} - \frac{4}{3}D$

式中 $\chi(\text{L})$ 和 $\chi(\text{M})$ 分别是配体和金属原子上给予体和接受体轨道的光学电负性, $\chi(\text{M})$ 通常是对一组(个)非键轨道定义, ΔOE 是这组(个)轨道与跃迁到轨道的间隔, $-\frac{4}{3}D$ 是 Ni(II) 在跃迁前后自旋成对能的变化^{〔8〕}。其中 ΔOE 可近似由能量最高中心离子谱带决定, Cu(II) 可取 19048 cm^{-1} ^{〔9〕}, Ni(II) 取 24096 cm^{-1} ^{〔2〕}。自旋成对能参数 D 可近似取 $7B = 7000 \text{ cm}^{-1}$, B 是 Racah 参数。由表 1 的数据可见, 在弱酸性条件下有关轨道的光学电负性均与生理 pH 下的接近或相同。

表 1 光学电负性 (括号内为跃迁能 / cm^{-1})

Table 1 Optical Electronegativities

(Transition Energy is in Brackets / cm^{-1})

	M(II)	R-NH ₂	R-COO ⁻	deprotonated peptide nitrogens
Cu(II)-HSA	2.52*	3.20(39526) 3.20*	3.23(40322) 3.22*	3.03(34246) 3.03*
Cu(II)-BSA	2.51**			3.00(33670)
Ni(II)-BSA	2.35**			3.00(34246)

* quoted from ref.[1]; ** quoted from ref.[2]

三. pH 效应

与生理 pH 下的结果^[1,2]比较, 在等离子点附近, 除 Cu(II)—HSA 外, 已只能以四配位的四方平面构型存在, Asp¹ 羧基已不能参与配位, 表明酸度增大能促使五配位向四配位转化。

这显然是由于酸度增大有利于质子对羧基的竞争, 使羧基趋向于不能跟金属离子配位。但是 Cu(II)—HSA 中羧基的 pK_a 应跟另三个体系中的基本相同, 而能够独具五配位的四方锥构型, 表明 pH 不是唯一起作用的因素。这可能与 Cu(II) 远比 Ni(II) 更常取五配位的四方锥构型有关, 而 Cu(II)—HSA 与 Cu(II)—BSA 的差异则可能与 HSA 中的 ALa² 比 BSA 中的 Thr² 对轴向配位是一种小得多的空间位阻有关。

我们曾猜测^[1], 配位数随浓度增高而变小可能是由于高浓度不利于有配位潜力的某个基团取得要求的空间取向, 最终导致它不能参与配位。文献报道^[3], 在生理 pH 下 HSA 和 BSA 均以 N 构象存在, 而在我们研究的弱酸条件下, 它们都已发生向 F 构象 (部分酸膨胀构象) 的转变。可能正是这种转变, 使白蛋白的三级结构变得较松散, 消减了浓度增大对基团空间取向的限制, 从而使 Cu(II)—HSA 反而在更高浓度下才发生从五配位向四配位的转变, 同时, 使这一体系在等离子点附近独具五配位构型。这是 pH 效应的另一方面, 即通过白蛋白的膨胀, 使允许存在的构型能在更高浓度或更低的 pH 下得以保持。

在生理 pH 下, 跃迁(1)和(3)均随浓度增大显著红移^[1,2], 而在本文的条件下, 除 Cu(II)—HSA 的跃迁(3)外, 所有谱带基本上都有固定不变的位置。电荷转移谱带的上述红移符合我们提出的经验公式^[10], 而这一公式据以提出的配位模型是: 在浓度增大时, 配位原子间的距离受到压缩, 使跃迁能变小。本文中除 Cu(II)—HSA 外, 谱带位置基本不变表明它们没有受到这种压缩, 这与上述发生部分酸膨胀的推断是一致的。五配位 Cu(II)—HSA 跃迁(3)的红移也符合上述经验公式, 图 4 是 $\ln C$ 对跃迁能 E/cm^{-1} 点绘的结果, C 是体系的浓度, 实验点都落在一条直线上。谱带红移间接支持了这一体系独具较拥挤的五配位结构的推断。

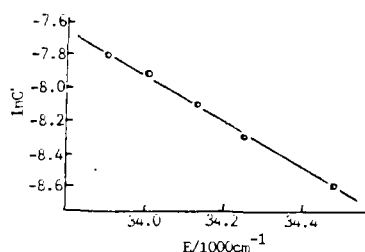


图4 pH5.3时, Cu(II)—HSA 的
 $\ln C$ vs E 关系

Fig.4 Correlation of $\ln C$ vs E of
Cu(II)—HSA at pH 5.3

参 考 文 献

- [1] Shen Panwen, Zhou Yongqia, Wang Sheyi, Che Yunxia, *Inorg. Chem. Acta*, **169**, 161 (1990).
[2] 周永洽、胡绪英、车云霞、申泮文, 化学学报, **49**, 59 (1991).
[3] de Gruyter, W., *Concise Encyclopedia of Biochemistry*, Berlin, (1983).
[4] Kennedy, B.P., Lever, A.B.P., *J. Amer. Chem. Soc.*, **95**, 6907 (1973).
[5] Admundsen, A.R., Whelan, J., Bosnich, B., *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 6730 (1977).
[6] Phan, C.V., Tosi, L., Carnier, A., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **37**, 2385 (1975).
[7] Lever, A.B.P., *Inorganic Electronic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 2nd ed., P.218 (1984).
[8] Jorgensen, C.K., *Orbitals in Atoms and Molecules*, Academic Press, London, P.80 (1962).
[9] Kruck, T.P.A., Law, S., Sarkar, B., *Can. J. Chem.*, **54**, 1300 (1976).
[10] 李玲颖、周永洽、邸平, 化学学报, **44**, 960 (1986).

STRUCTURAL STUDIES ON METAL-SERUM ALBUMIN

VI. STRUCTURE OF THE Cu(II) AND Ni(II) METAL CENTER IN
HSA AND BSA NEARBY THE ISOIONIC POINT

Zhou Yongqia Liang Hong Hao Yunqin Shen Panwen

(Department of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071)

In this paper, the structure of the Cu(II) or Ni(II) metal center in HSA or BSA nearby the isoionic point have been studied by ultraviolet spectroscopy. The results show in pH 4.0–5.3 range, the configuration of Cu(II)–HSA complexes is uniquely the pentacoordinated square–pyramidal at concentrations lower than $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. But at concentrations greater than $4.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, it takes the tetracoordinated square–plannar form. In above pH range, the configuration of Cu(II)–BSA, Ni(II)–BSA are only the tetracoordinated square–plannar. The binding sites of Cu(II), Ni(II) are same as those at physiological pH, they are all located at the N-terminal sequence of HSA or BSA, and coordinated with $-\text{NH}_2$, imidazolyl and two peptide nitrogens. In Cu(II)–HSA, the fifth binding group is COO^- of Asp¹. Above pH effect has also been discussed.

Keywords: Cu(II)–serum albumin Ni(II)–serum albumin configuration
 optical electronegativity pH effect