

## 稀土离子(III)与牛血清白蛋白的相互作用

张保林\*      王文清

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

在 pH 6.30、37℃ 条件下, 用离心超过滤法测定了 11 种稀土离子(III)与牛血清白蛋白(BSA)的专一性结合常数  $K_s$  和非专一性结合常数  $K_{ns}$ , 并通过 CD、UV、IR 和荧光光谱研究了 Tb(III)和 Eu(III)与 BSA 作用的机理。结果表明,  $K_s$  和  $K_{ns}$  分别与稀土离子(III)和二元、一元羧酸形成配合物的稳定常数随稀土系列原子序数的变化规律相一致。结合部位分布在 BSA 的亲水性表面, 参与配位的基团只有谷氨酸、天冬氨酸残基侧链中的  $\beta$ 、 $\gamma$ -COO<sup>-</sup> 和肽键中的 C=O 基团。根据 BSA 的氨基酸序列, 对结合部位进行了归属, 其中非专一性结合位分布于 BSA 分子表面的单一 COO<sup>-</sup> 位置, 而专一性结合位可能分别处于 56-57(Asp-Glu)、170-171(Glu-Asp)、362-363(Asp-Asp)和 560-561 (Asp-Asp)四个位置。

关键词:      稀土离子(III)      牛血清白蛋白      结合机理

血清白蛋白是血液中一种重要的运输蛋白, 关于 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等金属离子与血清白蛋白的结合已有许多报道<sup>(1)</sup>。但是稀土离子(III)与血清白蛋白相互作用的研究却很少。已经知道, 稀土元素具有许多重要的生理活性, 稀土微肥在农业上的应用使得稀土日益广泛地进入到人们生活的领域。所以, 深入研究它们与血清白蛋白结合的热力学及分子机理, 对于阐明稀土离子的体内代谢, 同时对全面阐明血清白蛋白结合各类金属的规律都具有重要意义。本文用离心超过滤法测定了 11 种稀土离子(III)与牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA) 的结合常数, 并通过多种光谱技术对结合的机理进行了研究。

## 实 验 部 分

### 一. 试剂和仪器

牛血清白蛋白(Sigma 公司), 各种稀土氧化物(99.9%, 上海跃龙化工厂), 其他试剂均为分析纯; Centrisart I 离心式超滤管(cut off 20,000, 德国 Sartorius 公司), Jasco J-500 自动记录分光偏振仪(日本分光工业株式会社), Model-850 荧光光谱仪(岛津), Nicolet 7199B 红外光谱仪(美国), UV-240 紫外-可见分光光度计(岛津)。

### 二. 实验方法

首先用稀 HNO<sub>3</sub> 将稀土氧化物加热溶解, 用 EDTA 溶液标定浓度。取 BSA 分子量 66,000, 直接称重配制溶液。所有实验在 0.05 mol/l, pH 6.30 的 HCl-六次甲基四胺缓冲溶液中进行, 用 0.1 mol/l KCl 维持离子强度。分别向 1.00ml 5.0 × 10<sup>-5</sup> mol/l BSA 中加入 0—1.00ml 1 × 10<sup>-3</sup> mol/l RE<sup>3+</sup>溶液, 加同一缓冲液至总体积 2.00ml, 37 ± 0.5℃ 反应 5h 至结合平衡后进行超过滤。以二甲酚橙作显色剂, 用分光光度法测定平衡液中未结合的 RE<sup>3+</sup>的浓度, 求出与 BSA 结合的量。用一定浓度的 Tb<sup>3+</sup>、Eu<sup>3+</sup>作滴定剂, 测定滴定 BSA 溶液过程的 CD、UV 和荧光光谱。测红外光谱时, 按摩尔比 10:1 向 1.0 × 10<sup>-3</sup> mol/l 的 BSA

本文于1992年7月10日收到。

\* 联系人。现在南京大学配位化学研究所读博士后。

水溶液中加入 0.01 mol/l  $\text{Eu}^{3+}$  水溶液, 用 NaOH 调 pH 至 6.30, 室温作用 1h, 冷冻干燥。将所得 Eu-BSA 固体粉末于 37℃ 烘干数小时后保存于  $\text{P}_2\text{O}_5$  真空干燥器中至恒重, KBr 压片测 IR 谱。

## 结 果 与 讨 论

### 一. 希土离子(III)与 BSA 的结合常数和结合部位数目

根据 pH 6.30, 37℃ 下测得的 La 等 11 种希土离子(III)与 BSA 的结合数据, 按 Taira 方程<sup>(2)</sup> 处理, 得到专一性结合常数  $K_s$  和非专一性结合常数  $K_{ns}$  (图 1) 以及专一性结合部位数目  $n_s$ 。从图 1 看出,  $K_s$ 、 $K_{ns}$  分别和相应希土离子(III)与二元、一元羧酸形成配合物的稳定常数<sup>(3)</sup> 的大小变化规律相当,  $\lg K_s$  随希土系列原子序数  $Z_{RE}$  的变化存在明显的“四分组效应”, 而  $\lg K_{ns} \sim Z_{RE}$  的关系和希土-乙酸配合物稳定常数随  $Z_{RE}$  的变化规律极其相似。用 Taira 方程求得的轻、重希土与 BSA 的专一性结合部位数目略有差异, 从 La-Gd,  $n_s = 4.0$ ; Tb-Lu,  $n_s = 3.0$ 。

### 二. 圆二色谱(CD)和红外光谱(IR)

BSA 水溶液的 CD 谱, 在 300~180nm 之间只有一个很强的负吸收带, 最大吸收波长位于 241nm。用  $\text{Eu}^{3+}$  滴定 BSA 的过程中, CD 谱几乎没有变化(图 2)。表明结合过程不影响 BSA 分子的空间构象, 进而提示  $\text{RE}^{3+}$  只结合在 BSA 分子的表面。

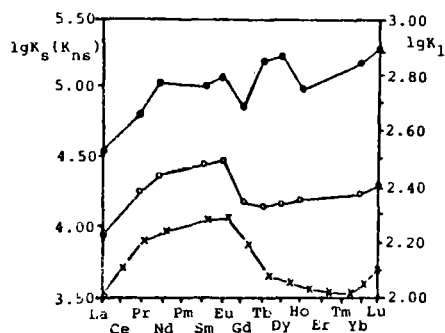


图 1 希土离子(III)与牛血清白蛋白的结合常数

Fig.1 Relation of binding constants with the atomic number of rare earths (37℃, pH6.30). ● specific binding constant  $\lg K_s$ ; ○ non-specific binding constant  $\lg K_{ns}$ ; ※ stability constant  $\lg K_1$  of lanthanide acetic complexes

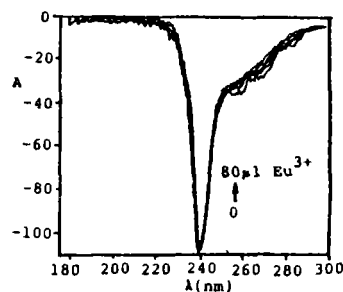


图 2  $\text{Eu}(\text{III})$  滴定 BSA 过程中的圆二色谱

Fig.2 Circular dichroism spectra of BSA solution titrated by  $\text{Eu}(\text{III})$  (10, 20, 40, 80  $\mu\text{l}$  0.01 mol/l  $\text{Eu}(\text{III})$  added to 2.5ml  $1.5 \times 10^{-4}$  mol/l BSA, respectively, pH6.30, 25℃)

BSA 的 IR 谱在  $1653.5\text{cm}^{-1}$  (酰胺 I 带) 和  $1531.5\text{cm}^{-1}$  (酰胺 II 带) 有很强吸收峰, I 带主要为 C=O 伸展振动, II 带主要为 N-H 弯曲振动<sup>(4)</sup>。  $1397.2\text{cm}^{-1}$  和  $1451.0\text{cm}^{-1}$  的吸收分别对应于  $\text{COO}^-$  对称伸展振动( $\nu_{\text{COO}}^s$ ) 和反对称伸展振动( $\nu_{\text{COO}}^{as}$ ) (也含有  $\delta_{\text{CH}_2}$  峰的叠加)<sup>(5)</sup>。与  $\text{Eu}^{3+}$  结合以后, 酰胺 I、II 带基本没有变化, 而后面两个峰的峰位及吸收强度都明显改变, Eu-BSA 在这一区域的峰位分别为  $1402.6\text{cm}^{-1}$  和  $1448.9\text{cm}^{-1}$ , 和纯蛋白样品相比,  $\nu_{\text{COO}}^s$  向高波数移

动, 而  $\nu_{\text{COO}^-}^{\text{as}}$  则向低波数移动, 吸收强度之比比纯蛋白样品减小。这一结果表明,  $\text{Eu}^{3+}$  与 BSA 分子中的 N-H 和 C=O 基团的作用很弱, 而  $\text{COO}^-$  强烈地以  $\text{C}=\text{O} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$  形式配位。

根据稀土-氨基酸配合物的研究结果, N、S 原子不参与配位,  $\text{COO}^-$  强烈地与稀土配位, 且配合物中结合有  $\text{H}_2\text{O}$  [6, 7]。因此, 可以认为在白蛋白分子中也只有 O 原子参与配位 ( $\text{COO}^-$  和 C=O 基团), 氨基、咪唑基、巯基均不参与配位。

### 三. 紫外(UV)吸收光谱

BSA 的 UV 谱特征为 220nm 和 280nm 两处强吸收峰。结合  $\text{Eu}^{3+}$  以后, 在 230nm 附近出现一肩峰。随  $\text{Eu}^{3+}$  浓度增加, 峰位红移且吸收增强。以相同浓度的 BSA 溶液作参比, 测得不同浓度的 Eu-BSA (1:1) 溶液的 UV 吸收谱(图 3), 更清楚地显示出 230nm 附近的不对称吸收峰。

已知 Cu-BSA 配合物的差示 UV 谱中有 230nm、250nm 和 280nm 三处吸收峰, 分别归属为  $\delta(0) \rightarrow \delta^*(3d)$ ,  $\delta(\alpha\text{-NH}_2) \rightarrow \delta^*(3d)$  和去质子肽氮 [8]。而 Eu-BSA 对 BSA 的差示紫外谱只有 230nm 一个吸收峰, 表明只有 O 原子参与了  $\text{Eu}^{3+}$  的配位, 而  $\alpha\text{-NH}_2$  中的 N 及去质子肽氮均不参与配位, 和上述红外光谱结果一致。

谱带位置与配合物浓度的关系服从经验公式 [8]:

$$\ln C = \ln C_{\infty} - \Delta E / bRT$$

其中  $C$  为 Eu-BSA 配合物的浓度,  $\Delta E$  为电子跃迁能,  $R$  为气体常数,  $T$  是绝对温度,  $C_{\infty}$  和  $b$  为经验常数。根据图 3 数据, 由  $\ln C \sim \Delta E$  作图(图 4), 得到两段斜率不同的直线, 转折点对应的 Eu-BSA 的浓度为  $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ 。小于该浓度时,  $\Delta E_1 = 1.11 \text{ cm}^{-1}$ , 高于该浓度时,  $\Delta E_2 = 0.80 \text{ cm}^{-1}$ , 表明在不同浓度范围,  $\text{Eu}^{3+}$  与 BSA 形成的配合物的结构存在差异。

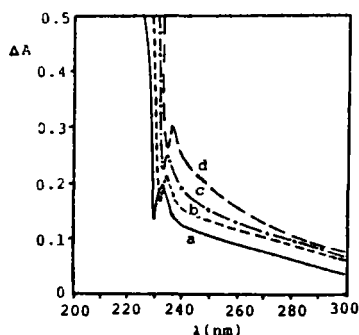


图 3 Eu-BSA 配合物与 BSA 的差示紫外吸收光谱

Fig.3 Differential UV absorption spectra of Eu-BSA complex (1:1) with the same concentration BSA as a reference (pH6.30, 25°C).

- a.  $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; b.  $4.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ;  
c.  $8.0 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ ; d.  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$

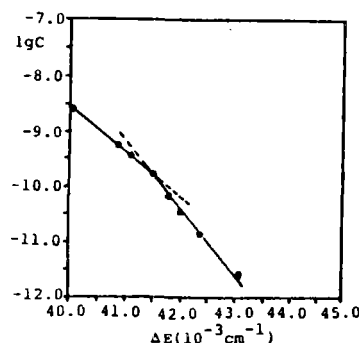


图 4 Eu-BSA 配合物的电子跃迁能与浓度的关系

Fig. 4 Relation of  $\ln C$  with  $\Delta E$

$C$ : molar concentration of Eu-BSA complex;  $\Delta E$ : energy of ligand to metal charge transfer

## 四. 荧光光谱

以 280nm 激发, BSA 在 348nm 可产生很强的荧光。当加入  $\text{Tb}^{3+}$  或  $\text{Eu}^{3+}$  后, 发现 BSA 荧光被猝灭, 同时  $\text{Tb}^{3+}$  或  $\text{Eu}^{3+}$  的荧光被敏化, 在 585nm 出现一个很强的荧光发射峰, 相应的荧光强度随与 BSA 结合的  $\text{Tb}^{3+}$  或  $\text{Eu}^{3+}$  量的增加而增强, 表明 BSA 的发荧光基团向结合的希土离子(III)发生了能量转移。根据 348nm 处的相对荧光强度( $F_0/F$ )对相应的  $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$  的浓度作图(图 5), 可以看出猝灭效应在  $[\text{Tb}^{3+}]/[\text{BSA}]=3.0$ ,  $[\text{Eu}^{3+}]/[\text{BSA}]=4.0$  时出现明显的拐点, 而且当浓度比大于 22.0 时, BSA 荧光不再发生变化(因加入  $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$  的体积很小, 可忽略稀释效应)。这一结果表明,  $\text{RE}^{3+}$  在 BSA 分子中存在两类结合部位, 其中首先结合的专一性结合部位对  $\text{Tb}^{3+}$  和  $\text{Eu}^{3+}$  分别为 3.0 和 4.0, 和上述超滤法结果完全一致。

图 6 示出了相同浓度的 Eu-BSA 浓度在不同 pH 下测得的 585nm 处的荧光强度  $F_{585}$ , 看出  $F_{585}$  随 pH 的变化呈“S”型, 表明  $\text{Eu}^{3+}$  与 BSA 的结合过程受质子影响。按文献[9]的处理方法对曲线进行拟合, 得到 BSA 分子中参与  $\text{Eu}^{3+}$  配位的基团的质子解离常数  $\text{p}K=4.60$ , 对应于蛋白质多肽链中天冬氨酸、谷氨酸残基侧链中的  $\beta$ 、 $\gamma$ - $\text{COO}^-$  [10]。

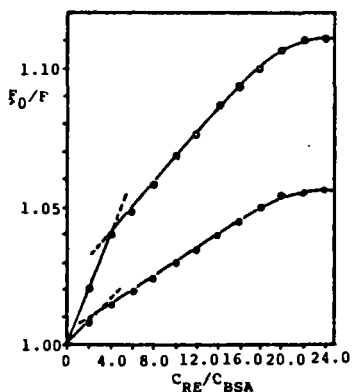


图 5 希土离子(III)对 BSA 荧光的猝灭效应

Fig.5 Quenching effect of rare earths on BSA fluorescence

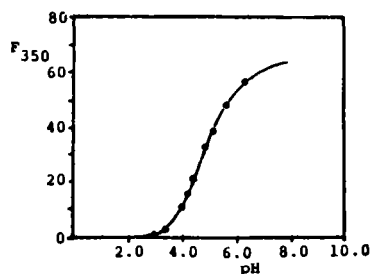


图 6 pH 对 Eu-BSA 配合物荧光的影响

Fig.6 pH dependence of the relative fluorescence intensity of Eu-BSA complex at emission wavelength 585nm ( $\lambda_{ex}=280\text{nm}$ )

准确确定结合部位在 BSA 分子中的位置是十分困难的, 但根据本文的实验结果可以进行一些合理的推测。可以肯定, BSA 分子中参与  $\text{RE}^{3+}$  配位的主要为  $\text{COO}^-$ , 测得的专一性结合常数  $\lg K_s$  介于 4.5~5.5 之间, 和二元羧酸—希土配合物的稳定常数<sup>(3)</sup>相当, 说明专一性结合部位可能处在 BSA 分子中相邻氨基酸残基都是酸性氨基酸的部位。在 BSA 的一级结构中, 谷氨酸(Glu)和天冬氨酸(Asp)两个连续出现在肽链中的位置有多处。但处于  $\alpha$ -螺旋链上相邻位置的 Glu 和 Asp 侧链  $\text{COO}^-$  在空间上不能满足同时配位的要求。在二硫键附近,  $\alpha$ -螺旋被破坏, 呈现易变的结构。有趣地发现, 处在这些拐角处的 Glu-Asp, Asp-Asp 正好有 4 对, 距 N 端序号分别为 56-57(Asp-Asp)、170-171(Glu-Asp)、362-363(Asp-Asp)和 560-561(Asp-Asp)。镧系元素的离子半径存在收缩效应, 但测得的  $n_s$  从 La-Gd 为 4.0, Tb-Lu 为 3.0, 表明大分子配体在与金属离子形成配合物时存在着空间适应性。非专一性结合常数  $\lg K_{ns}$  与希土-乙酸配合物稳定常数随希土系列原子序数的变化规律一致, 表明非专

一性结合部位主要由 BSA 分子中大量存在的单个  $\text{COO}^-$  构成, 但  $K_{ns}$  略大于相应乙酸配合物的稳定常数, 推测肽键中的  $\text{C}=\text{O}$  基团也与稀土离子(Ⅲ)发生了配位。

### 参 考 文 献

- (1) Kragh-Hansen, U., *Pharmacol. Rev.*, **33**, 17(1981).
- (2) Taira, Z., Terada, H., *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 1999(1985).
- (3) 武汉大学化学系, 稀土元素分析化学 (上), 科学出版社, 北京, 59-61(1981).
- (4) Susi, H. et al., *Biachim. Biophys. Methods*, **9**, 193(1984).
- (5) 杨景文、张极震, 生物物理学报, **6**, 453(1990).
- (6) 傅楚瑾、曹锦荣、王则民, 上海师范大学学报, **18**, 30(1989).
- (7) 孙元洪、武登国、张树功, 应用化学, **6**, 32(1989).
- (8) Shen Panwen, Zhou Yongqia et al., *Inorg. Chim. Acta*, **169**, 161(1990).
- (9) 杨斌盛、杨 频, 生物化学与生物学报, **20**, 499(1990).
- (10) 王 夔等, 生物无机化学, 清华大学出版社, 北京, 8(1988).

## INTERACTION OF RARE EARTHS WITH BOVINE SERUM ALBUMIN

Zhang Baolin

Wang Wenqing

(Technical Physics Department of Peking University, Beijing, 100871)

The binding constants of 11 tripositive lanthanide ions to bovine serum albumin(BSA) were determined at 37°C in 50 mmol/l, pH6.30 hexamethylenetetramine buffer by the centrifugal ultrafiltration technique. It was found that the dependence of the specific binding constants( $K_s$ ) on the atomic number of lanthanide ions( $Z_{RE}$ ) exhibits "tetrad effect", across the series. However, the variation of non-specific binding constant( $K_{ns}$ ) with  $Z_{RE}$  was following the pattern of the acetic-lanthanide complexes. The mechanism of the binding process was studied using CD, UV, IR and fluorescence spectroscopies. The results show that rare earths are bound to the hydrophilic surface of albumin, no considerable conformational variation of the protein after binding lanthanides, and the binding site consists of one or more carboxyl side chains whereas there is no other groups involved in such as SH and  $\text{NH}_2$ . On the basis of the primary structure of BSA, it was pospulated that the four specific binding sites located on the positions of 56-57(Asp-Asp), 170-171(Glu-Asp), 362-363(Asp-Asp) and 560-561(Asp-Asp) residues, respectively, while only the separational single Asp or Glu side chain is attributed to the non-specific binding sites.

**Keywords:** rare earth    bovine serum albumin    binding    mechanism