

Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的结合平衡研究

沈星灿 边贺东 涂楚桥 张宏志 梁 宏*

(广西师范大学生物无机化学研究所·化学化工系, 桂林 541004)

周永洽 申泮文

(南开大学化学系, 天津 300071)

用平衡透析法研究了生理 pH (7.43) 及 pH (5.0) 条件下 Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的结合平衡。Scatchard 图分析表明, 生理 pH 条件下, Ni(II) 在 HSA 或 BSA 中均有 2 个强结合部位, 而在 pH (5.0) 条件下, 只有 1 个强结合部位。Hill 图分析表明 Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的结合均产生较强的正协同效应。通过不同 pH 对 Ni(II) 与 HSA 或 BSA 结合的影响及 Ni(II) 与 Cu(II) 和 Ca(II) 的竞争结合的结果, 推测了两个强结合部位可能的结合位点和配位原子。竞争结果还表明 Cu(II) 对 Ni(II) 的结合有明显拮抗作用。Ca(II) 对 Ni(II) 的结合影响很小。

关键词: Ni(II)-血清白蛋白 平衡透析 协同效应 配位分析

分类号: O614.813 Q512.1

镍是生物体生长发育所必需的微量元素之一。研究镍与血清白蛋白的相互作用对深入理解镍的生理机理有重要的意义。我们^[1~5]曾用平衡透析法和紫外光谱法研究了生理 pH 条件下 Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的结合, 发现 Ni(II) 与人血清白蛋白(Human Serum Albumin, 简称HSA) 或牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, 简称BSA) 的结合, 有一系列的新奇效应, 如减色效应和变构效应等; 观察 LMCT 谱带表明: 其金属中心结构在低浓度时, 为五配位 Ni(II) N₄O 四方锥结构, 高浓度时为四配位的 Ni(II) N₄ 平面四方平面构型。本文用平衡透析法进一步研究了生理 pH 条件下及 pH (5.0) 条件下 Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的结合情况, 运用 Scatchard 方法分析了 Ni(II) 在 HSA 或 BSA 中结合部位类型及数目; 通过 Ni(II) 与 Cu(II)、Ca(II) 等竞争结合 HSA 或 BSA 的研究, 推测 N- 端三肽段可能是 Ni(II) 和 Cu(II) 在 HSA 或 BSA 上共同的强结合部位。首次用平衡透析法证明 pH 的改变会影响到 Ni(II) 在 HSA 或 BSA 中的强结合部位数目, 由此推测 Ni(II) 的另一个强结合部位是极易受酸度影响的-His⁸-Ala⁹-Arg¹⁰- 段。

1 实验部分

1.1 材料、试剂和方法

HSA 和 BSA 均购自北京华美生物工程公司, 电泳纯, 保鲜邮寄, 用前未经进一步纯化; NiCl₂·6H₂O、NaCl、HCl、HAc 和 NaAc 均用分析纯; 三羟甲基氨基甲烷(tris) 为生化试剂。所有溶液都用去离子水配制, 均含 0.10 mol·dm⁻³ NaCl, 并用 0.10 mol·dm⁻³ tris-HCl 缓冲剂以保持相同的离子强度和 pH= 7.43(±0.02) (指明在其它 pH 值时除外)。NiCl₂ 的浓度均用 EDTA 标定。HSA 和 BSA 溶液用前新鲜配制, 浓度均用光度法在 Hitachi UV-3400 型紫外-可见分光光度计

收稿日期: 1999-06-01。收修改稿日期: 1999-09-27。

国家自然科学基金(No. 29961001) 和广西百千万人才基金和广西高校自然科学基金资助项目。

* 通讯联系人。

第一作者: 沈星灿, 女, 25 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生物无机化学。

上测定^[6], 均为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 。透析袋购自美国联合碳化物公司, 用前经常规处理。透析时间为 48h, 透析温度为 $20(\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。对于每个白蛋白浓度, NiCl_2 的浓度均约取 20 个值, 在 $10^{-5} \sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 范围内变化, 每个点至少平行做 2 次。透析达平衡后未被 HSA 或 BSA 结合的 $\text{Ni}(\text{II})$ 的总浓度用 WFX-IF2 型原子吸收分光光度计测定。

1.2 pH 5.0 条件下 $\text{Ni}(\text{II})$ 与 HSA 或 BSA 的结合

本实验中所有溶液均含 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaCl}$ 并用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HAc-NaAc}$ 缓冲剂以保持相同的离子强度和 $\text{pH} = 5.0(\pm 0.02)$ 。HSA 或 BSA 的浓度均为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, 其余同 1.1。

1.3 $\text{Ni}(\text{II})$ 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 、 $\text{Ca}(\text{II})$ 等竞争结合 HSA 或 BSA

以 $\text{Ni}(\text{II})$ 、 $\text{Cu}(\text{II})$ 竞争结合 HSA 或 BSA 为例。在一系列 $\text{Ni}(\text{II})$ 溶液中均加入相同足量的 $\text{Cu}(\text{II})$, 然后进行透析, 达平衡后测定未被结合的 $\text{Ni}(\text{II})$ 的浓度, 其余同 1.1。 $\text{Ni}(\text{II})$ 与 $\text{Ca}(\text{II})$ 竞争结合 HSA 或 BSA 的实验类推。

2 结果与讨论

2.1 $\text{Ni}(\text{II})$ 在 HSA 或 BSA 中结合部位的类型及数目

我们用 Scatchard 方法作图^[7]。数学关系为:

$$\frac{n_c}{[\text{Ni}^{2+}]} = \frac{n}{k_d} - \frac{n_c}{k_d}$$

式中 n_c 称为平均结合数, 表示每个白蛋白分子结合 $\text{Ni}(\text{II})$ 的个数。 $[\text{Ni}^{2+}]$ 为未被结合 $\text{Ni}(\text{II})$ 的浓度, n 为 HSA 或 BSA 结合 $\text{Ni}(\text{II})$ 的部位数, k_d 为 $\text{Ni}(\text{II})$ -白蛋白配合物的解离常数。用 $n_c/[\text{Ni}^{2+}]$ 对 n_c 作图, 得图 1 ($\text{Ni}(\text{II})$ -BSA 的图略)。图 1 表明在生理 pH 下 $\text{Ni}(\text{II})$ 在 HSA 和 BSA 中均有 2 个强结合部位。我们用非线性最小二乘法拟合 Bjerrum 函数^[8]得出 n_c , 及 2 个强结合

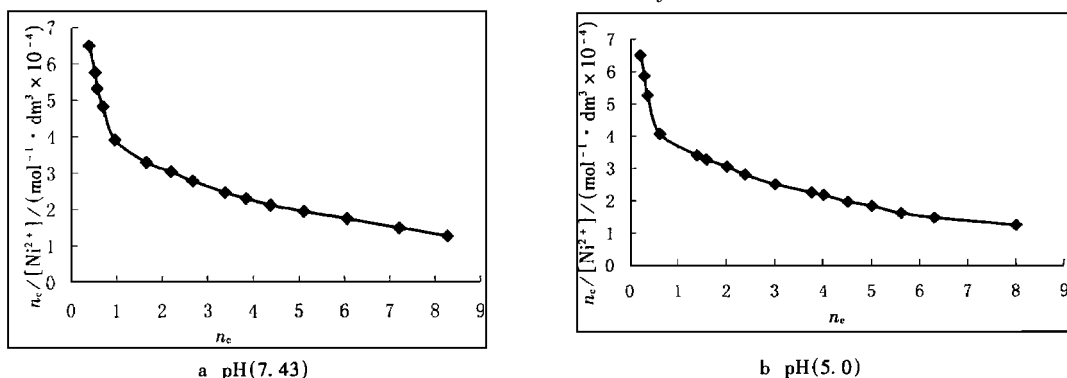


图 1 $\text{Ni}(\text{II})$ -HSA 体系的 scatchard 图

Fig. 1 scatchard plots in $\text{Ni}(\text{II})$ -HSA systems

部位的结合常数, 分别为 6.6×10^4 、 $6.3 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$, 这与我们以前研究的结果^[1,2] 基本一致。而在 $\text{pH}(5.0)$ 下时, 发现 $\text{Ni}(\text{II})$ 在 HSA 和 BSA 中均只有 1 个强结合部位, 其结合常数为 $5.6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3$ 。

2.2 $\text{Ni}(\text{II})$ 与 HSA 或 BSA 结合的协同效应

通过 Hill 图可以定量分析具有多个结合部位的分子中各结合部位之间的协同性^[8]。Hill 方程为:

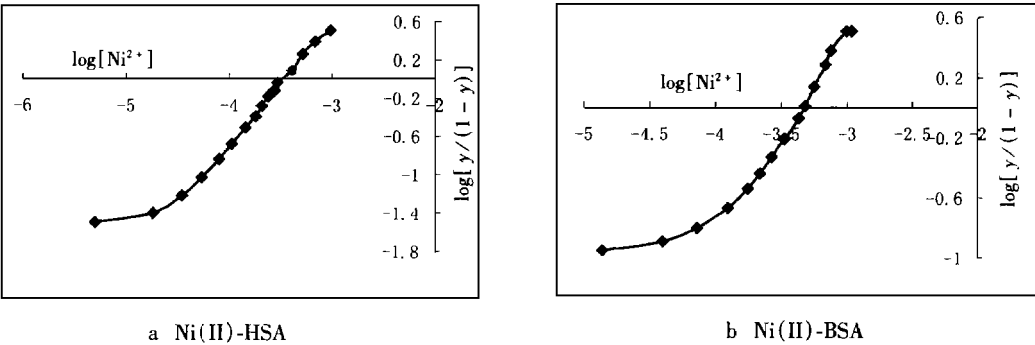


图 2 Hill 图

Fig. 2 Hill plot

$$\log \left(\frac{y}{1-y} \right) = h \log [Ni^{2+}] - \log K$$

式中 y 为 HSA 或 BSA 结合 Ni(II) 的饱和分数, $y = n/n_{总}$, $n_{总}$ 为白蛋白结合 Ni(II) 的总数。按图 1 结果, 对 HSA 和 BSA 取 $n_{总} = 16$ 。Hill 图一般为—“S”形曲线, Hill 系数 h 是曲线各部分的斜率, 它是各结合部位之间协同性的测量。 h 愈大, 则正协同性愈强, h_{max} 取曲线的最大斜率值在上限。若 $h = 1$, 无协同性; $h > 1$, 有正协同性; $h < 1$, 有负协同性。图 2 是生理 pH 条件下, Ni(II) -HSA 和 Ni(II) -BSA 体系的 Hill 图。曲线分析表明, 随着 Ni(II) 浓度的增加, h 也渐增。对 Ni(II) -HSA 体系, $h_{max} = 1.6$, Ni(II) -BSA 体系, $h_{max} = 1.5$, 表明两体系都存在较强的正协同效应。pH(5. 0) (图略) 条件下也有相同的结论。

2.3 Ni(II) 在 HSA 或 BSA 中强结合部位的位置和(或) 配体分析

图 3 是在有足量 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 离子存在时 Ni(II) -HSA 体系的饱和曲线图 Ni(II) -BSA。表 1 列出了在足量的 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 离子存在时 Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的结合情况。

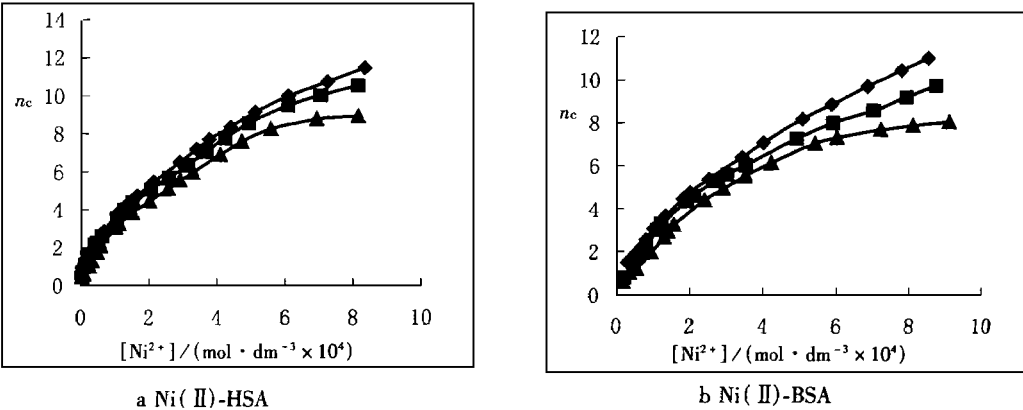


图 3 n_c vs $[Ni^{2+}]$ 图

Fig. 3 n_c vs $[Ni^{2+}]$ curves with sufficient Cu^{2+} , Ca^{2+} ions in systems

◆: Ni(II) ■: Ni(II) + Ca(II) ▲: Ni(II) + Cu(II)

从表 1 结果可见, 当足量 Cu^{2+} 离子存在时, Ni(II) 在 HSA 或 BSA 中的强结合部位均减少了一个, 表明 Ni(II) 和 Cu(II) 在 HSA 或 BSA 中可能存在一个共同的强结合部位。根据 Irving-Williams 次序, 当 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 离子与相同的配体形成配合物时, Cu^{2+} 离子的结合力强于

表 1 足量的 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 离子存在时 $\text{Ni}(\text{II})$ 与 HSA 或 BSA 的结合情况
Table 1 Ni^{2+} Ion Binding to BSA with Sufficient Cu^{2+} , Ca^{2+} Ions

system	Ni^{2+} + HSA	Ni^{2+} + HSA (+ Cu^{2+})	Ni^{2+} + HSA (+ Ca^{2+})	Ni^{2+} + BSA	Ni^{2+} + BSA (+ Cu^{2+})	Ni^{2+} + BSA (+ Ca^{2+})
strong binding sites of $\text{Ni}(\text{II})$	2	1	2	2	1	2
binding constant K	6.60×10^4	4.21×10^4	4.95×10^4	6.32×10^4	3.99×10^4	4.82×10^4

Ni^{2+} ; 本文和文献^[7]的实验结果也表明 $\text{Cu}(\text{II})$ 与 HSA 或 BSA 的结合能力大于 $\text{Ni}(\text{II})$ 。因此, 若这两种金属离子在 HSA 或 BSA 中存在一个共同的强结合部位, 当足量的 Cu^{2+} 离子存在时, 它可以逐渐并最终取代 $\text{Ni}(\text{II})$ 。一般认为^[7,9], $\text{Cu}(\text{II})$ 在 HSA 或 BSA 中只有一个强结合部位, 它位于白蛋白分子的 N- 端三肽段上, 因此可认为白蛋白分子中的 N- 端三肽段就是 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 离子的共同强结合部位。 Ni^{2+} 是一种交界的 Lewis 酸, 趋于和 N、O 配位, 一般形成四方锥或平面四方结构, 这基本能满足 N- 端三肽段的配位要求, 我们通过紫外光谱观察的结果表明^[4]: $\text{Ni}(\text{II})$ 的第一个强结合部位最可能在 N- 端三肽段之内, 涉及 Asp^1 的 αNH_3 , His^3 咪唑基 N 及两个去质子肽氨, Asp^1 中的羧基上的氧也可能参于 $\text{Ni}(\text{II})$ 的配位, 采取四方锥形的结构。这与我们的竞争结合的结果是一致的。从图 3 看, Cu^{2+} 离子的存在使 HSA 或 BSA 结合 Ni^{2+} 离子的数目明显减少, 表明 $\text{Cu}(\text{II})$ 对 $\text{Ni}(\text{II})$ 的结合有明显的拮抗作用, 这也说明在 HSA 和 BSA 中 $\text{Ni}(\text{II})$ 与 $\text{Cu}(\text{II})$ 类似, 可能主要与 N 原子配位。

$\text{Ni}(\text{II})$ 与 Ca^{2+} 竞争的结果表明, $\text{Ni}(\text{II})$ 在 HSA 或 BSA 分子中的强结合部位不减少, 饱和曲线变化也很小, 表明 Ca^{2+} 离子的存在对 $\text{Ni}(\text{II})$ 的结合影响不大。Sadler^[9]认为 $\text{Ca}(\text{II})$ 的配位原子主要为氧, 因此可以推断在 HSA 或 BSA 中氧原子不是 $\text{Ni}(\text{II})$ 的主要配位原子。

2.4 pH 变化对 $\text{Ni}(\text{II})$ 结合 HSA 或 BSA 的影响

图 4 是 $\text{Ni}(\text{II})$ -HSA 和 $\text{Ni}(\text{II})$ -BSA 体系在生理 pH (7.43) 及 pH (5.0) 条件下平衡透析后的饱和曲线图。

从图 4 上可看出, 在相同的金属浓度条件下, HSA 或 BSA 结合 $\text{Ni}(\text{II})$ 数目均在生理 pH 条件下比 pH (5.0) 条件下要多。从结合常数看, 在生理 pH 下的 K 值均大于 pH (5.0) 下相应的 K 值, 可推测是由于酸度增加, 有利于质子对羧基的竞争, 使羧基上的氧趋于不能跟 $\text{Ni}(\text{II})$ 配位, 致使结合的稳定常数下降。比较这两种 pH 条件下的结合常数, 发现 $\text{Ni}(\text{II})$ -HSA 体系比 $\text{Ni}(\text{II})$ -BSA 体系要大, 这可能与 BSA 在该部位的 Thr^2 代替了 HSA 中的 Ala^2 , 具有更大的空间位阻, 不利于 $\text{Ni}(\text{II})$ 的结合。该结果也说明了 $\text{Ni}(\text{II})$ 在 HSA 或 BSA 中的一个强结合部位位于 N- 端三肽段之内这一推论是合理的。

Carter 等^[10]通过 HSA 晶体结构分析认为, N- 端三肽段极可能位于 I A 亚区的 h_1 螺旋上, 并处于蛋白质表面。鉴于 $\text{Ni}(\text{II})$ 结合 HSA 或 BSA 产生的别构效应^[1], 我们曾推测这 2 个金属中心相差不远, 从图 3 的曲线分析表明, 对 $\text{Ni}(\text{II})$ -HSA 体系和 $\text{Ni}(\text{II})$ -BSA 体系, h_{max} 值都较

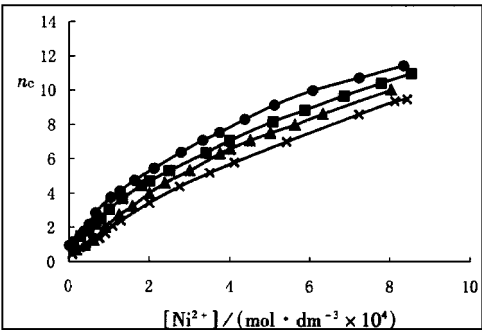


图 4 n_c vs $[\text{Ni}^{2+}]$ 图
Fig. 4 n_c vs $[\text{Ni}^{2+}]$ curves. The concentrations of HSA or BSA are $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
pH (7.43): ● $\text{Ni}(\text{II})$ -HSA ■ $\text{Ni}(\text{II})$ -BSA
pH (5.0): ▲ $\text{Ni}(\text{II})$ -HSA × $\text{Ni}(\text{II})$ -BSA

大,表明 N- 端 Ni(II) 中心形成后, Ni(II) 作为别构效应子,对白蛋白分子施加直接或间接静电作用,诱导 HSA 或 BSA 发生 T-R 态转变,很可能使相对疏水的谷作一次“绞链式的运动”,变得更为开放和亲水,有利于 h_1 邻近的 h_2 或 h_3 上的肽段结合 Ni(II),形成第二个结合中心,产生了较强的正协同效应。我们的研究表明生理 pH 条件下, HSA 和 BSA 对 Ni(II) 均有 2 个强结合部位。发现当 pH(5. 0) 时, Ni(II) 的强结合部位只剩下 1 个,这进一步证实了我们紫外光谱得出的结果^[4,5]。说明第二个强结合部位 Ni(II) 中心的形成受质子的影响,结合我们紫外光谱观察^[2],推测参加该中心配位的是碱性的氨基酸,且位于 N- 三肽段的附近,可能是 -His⁸-Ala⁹-Arg¹⁰,其中 His, Arg 均为碱性的氨基酸,Ala 为中性的氨基酸,酸度增加使该部位具有较多的正电荷而不能与 Ni(II) 配位。

我们^[1]曾研究了 HSA 和 BSA 浓度在 2.0×10^{-4} 、 3.0×10^{-4} 、 4.0×10^{-4} mol · dm⁻³ 时与 Ni 的结合,其结果与 1.0×10^{-4} mol · dm⁻³ 浓度时是一致的。Ni(II) 与 HSA 或 BSA 的结合受 pH 的影响,并能作为别构效应子,使 HSA 和 BSA 发生别构反应,形成 2 个强结合中心,有关的生理意义还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] HU XuYing(胡绪英), SONG ZhongRong(宋仲容), SHU XianDong(苏宪东) et al *Zhongguo Kexue (Chinese Sci.)*, **1997**, **27**(2), 75.
- [2] ZHOU YongQia(周永治), TAI JunZhe(太俊哲), LIANG Hong(梁宏) et al *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao (Chem. J.Chinese Univ.)*, **1996**, **9**, 1331.
- [3] LIANG Hong(梁宏), OU YANG Di(欧阳砥), HU XuYing(胡绪英) et al *Huaxue Xuebao (Acta Chimica Sinica)*, **1998**, **56**, 662.
- [4] ZHOU YongQia(周永治), LIANG Hong(梁宏), HAO YunQing(郝韵琴) et al *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **1992**, **8**(4), 382.
- [5] LIANG Hong(梁宏), LU O JirXin(罗锦新), BI XianShu(闭献树) et al *Guangxi Shifang Daxue Xuebao (J. Guangxi Normal University)*, **1993**, **11**(1), 41.
- [6] De Gruyter, W. et al *Concis Encyclopedia of Biochemistry*, Berlin, **1983**.
- [7] LI ShuTing(李舒婷), CHA DangMing(查丹明), ZHANG HongZhi(张宏志) et al *Guangxi Shifang Daxue Xuebao (J. Guangxi Normal University)*, **1998**, **16**(3), 43.
- [8] LIANG Hong(梁宏), XING BenGang(邢本刚), WANG XirJian(王修建) et al *Kexue Tongbao (Sci. Bull.)*, **1997**, **42**(22), 2395.
- [9] Fersht A., Translated by DU JinZhu(杜锦珠), RU BingGeng(茹柄根), WEI XinCheng(卫新成) *The Structural and Mechanism of Action of Enzyme (酶的结构和作用机制)*, Beijing: Beijing University Press, **1991**, p292.
- [10] Sadler P. J., Viles J. H. *Inorg. Chem.*, **1996**, **35**, 4490.
- [11] He X. M., Carter D. C. *Atomic Structure and Chemistry of Human Serum Albumin*, Nature Press: London, **1992**, **358**(6383), 209.

Binding Equilibrium Study between Ni(II) and HSA or BSA

SHEN Xir-Can BIAN He-Dong TU Chu-Qiao ZHANG Hong-Zhi LIANG Hong

(Institute of Bioinorganic Chemistry • Department of Chemistry and Chemical Engineering,

Guangxi Normal University, Guilin 541004)

ZHOU Yong-Qia SHEN Pan-Wen

(Nankai University Department of Chemistry, Tianjing 300071)

The binding of Ni(II) to human serum albumin(HSA) or bovine serum albumin (BSA) has been studied by equilibrium dialysis at physiological pH (7.43) and pH(5.0). The Scatchard analysis indicates that there exists 2 strong binding sites of Ni(II) in both HSA and BSA at physiological pH (7.43), but only 1 strong binding site in both systems at pH(5.0). The analyses of Hill plot indicate that there exists strong positive cooperative effect in these systems. The N-terminal are probably the together strong binding locations of Ni(II) and Cu(II), which suggested through competition between Ni(II) and Cu^{2+} 、 Ca^{2+} ions. It also suggested that N atoms are the main coordinated atoms. Cu^{2+} ions induced an antagonism effect on Ni(II)-HSA and Ni(II)-BSA systems, and Ca^{2+} ions have litter effect on Ni(II) binding to HSA or BSA.

Keywords: Ni(II)-serum albumin equilibrium dialysis cooperative effect
coordination analysis