

牛血清白蛋白与两种金属配合物的作用研究

刘海萍 王兴明* 戴亚堂 宋绵新

(西南科技大学材料科学与工程学院应用化学研究所, 绵阳 621010)

关键词: UV-Vis 光谱法; 甲基百里酚蓝-Zn(II)-配合物; 牛血清白蛋白; 茜素红 S-Al(III)-配合物

中图分类号: O614.1.241; O614.1.31

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)09-1422-05

Interaction of Bovine Serum Albumin with Twain Metal Complexes

LIU Hai-Ping WANG Xing-Ming* DAI Ya-Tang SONG Mian-Xin

(Institute of Applied Chemistry, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010)

Abstract: The interaction of Methylthymol Blue(MTB)-Zinc(II) compound and Alizarin Red S(ARS)-Aluminum(III) compound with Bovine serum albumin (BSA) was investigated by UV-Vis spectrophotometric method in acidic buffer solution. MTB-Zn(II)-BSA was a blue color compound, which possesses maximum absorption at 613 nm with 172 nm, 174 nm and 18 nm of red shift compared to the MTB, MTB-BSA and MTB-Zn(II) complexes respectively. Dual wavelength substantial amount ratio method, balance dialysis substantial amount ratio method and unity wavelength substantial amount ratio method were compared. The following results were obtained: the apparent molar absorptivity of MTB-Zn(II) with BSA was $\varepsilon=2.20\times10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Conditional proportion were defined, $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}:n_{\text{BSA}}=2:2:1$; condition combination constant, $K=2.07\times10^{10}$. Combination proportion were defined, $n_{\text{ARS}}:n_{\text{Al(III)}}:n_{\text{BSA}}=6:4:1$. Condition equilibrium constant of reaction of ARS-Al(III) with BSA was $K=8.80\times10^8$. The apparent molar absorptivity of $\varepsilon=2.65\times10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. It is suggested that combination between BSA and MTB-Zn(III) is due to coordination force. That combination between BSA and ARS-Al(III) is due to the coordination bond and electrostatic force.

Key words: UV-Vis spectroscopy; methylthymol blue-zinc(II) complex; bovine serum albumin; alizarin red S-aluminum(III) complex

锌是最重要的生命元素之一,它在体内的输送和代谢与血清白蛋白密切相关。因此 Zn(II)与牛血清白蛋白(BSA)相互作用的研究是有其生物学意义的。Zn²⁺离子虽然较小,但静电荷却为 2,表明它是一个较软的路易斯酸,在生物体系中 Zn(II)主要与 N、S 和 O 等原子配位。

生物分子之间的相互作用在生物化学、临床医学和化学生物学等领域具有重要意义^[1-3],研究的方

法多种多样,利用小分子及其配合物作为光谱探针与生物大分子作用^[4-7]以其简捷、灵敏等优点而被广泛应用。

不同的蛋白质由于结构不同而具有不同的生物功能,甲基百里酚蓝(MTB)和茜素红 S(ARS)则是小分子有机物质。本研究发现,牛血清白蛋白(BSA)在一定的酸性条件下可以与 MTB-Zn(II)配合物和 ARS-Al(III)配合物结合,生成三元配合物,致使吸收光谱发

收稿日期:2005-03-28。收修改稿日期:2005-05-23。

国家自然科学基金资助项目(No.40072020)和四川省教育厅自然科学基金重点资助项目(No.2000-A56)。

*通讯联系人。E-mail: xmwang_xkd@163.com

第一作者: 刘海萍,女,26岁,硕士研究生;研究方向:生物无机和生物有机制备、分析及机理。

生变化。因此,应用双波长物质的量比法和平衡透析物质的量比法,获得了 BSA 与 MTB-Zn(II)配合物以及 ARS-Al(III)配合物相互作用的结合力、表观摩尔吸光系数、结合数和条件平衡常数等有关数据及信息。同时对 BSA 与 MTB-Zn(II)配合物以及 ARS-Al(III)配合物的作用机理进行了一定的探讨。这些研究对进一步探索和认识生物大分子 BSA 的性质、结构、行为、形态、作用机理等具有参考价值,也为生命科学中的相关研究提供一定的科学研究基础及理论根据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

UV-210 型紫外可见光谱仪(日本岛津),UV-210PCS 紫外可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司),pHS-2C 型酸度计(成都方舟科技开发公司),牛血清白蛋白(BSA,上海伯奥生物科技有限公司,分析纯),甲基百里酚蓝(MTB,上海试剂三厂,分析纯),硫酸锌(成都化学试剂厂,分析纯),茜素红 S (ARS,天津丽晶化工厂,分析纯),硫酸铝(上海兴塔化工厂,分析纯),Britton-Robinson (B-R) 系列缓冲溶液(配制方法:准确吸取 2.71 mL 85%的正磷酸,2.36 mL 冰乙酸,并称取 2.4700 g 硼酸,用水定容至 1 000 mL,用 $0.20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调节 pH 值)。

1.2 实验方法

在一系列 10 mL 比色管中,分别加入一定量的 MTB、ARS、Zn(II)、Al(III)、BSA 溶液(5 种溶液均分别用系列 B-R 缓冲溶液配制),以相应 B-R 缓冲溶液定容,摇匀,放置 5 min,以试剂空白为参比,扫描吸收光谱。

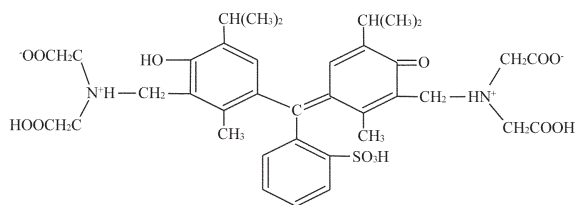
在一系列 10 mL 比色管中,分别加入一定的量 MTB、ARS、Zn(II)、Al(III)、BSA 溶液(5 种溶液均用相应的 B-R 缓冲溶液配制),以 pH 值 4.25 或 pH 值 4.28 的 B-R 缓冲溶液定容,摇匀,放置 5 min,应用单波长物质的量比法、双波长物质的量比法、平衡透析物质的量比法等方法,以试剂空白为参比,扫描吸收光谱或测定吸光度。

2 结果与讨论

2.1 吸收光谱和作用机理

研究 MTB (结构如图式 1)、MTB-Zn(II)、MTB-BSA、MTB-Zn(II)-BSA 在 pH 值为 2.00~6.50 的系列 B-R 缓冲溶液中的吸收光谱(图略),发现随着 pH 值

的升高,MTB-Zn(II)-BSA 溶液的最大吸收峰发生红移,由 439 nm 移到 613 nm 处。与只有 MTB、MTB-Zn(II)、MTB-BSA 的吸收光谱相比,MTB-Zn(II)-BSA 在 pH=4.00~4.50 范围内出现了新吸收峰。这说明随着溶液酸度的逐渐减小,BSA 与 MTB-Zn(II)相互作用逐渐形成了三元配合物,溶液的颜色由黄色逐渐变成蓝色,蓝色又逐渐加深。在 pH=4.00~4.50 时,与 MTB、MTB-Zn(II)、MTB-BSA 相比均发生了不同程度的红移。因此,后续实验选择 pH=4.25 的 B-R 缓冲溶液作为研究介质。pH=4.25 的 B-R 缓冲溶液中 MTB 的最大吸收峰为 441 nm,MTB-BSA 的最大吸收峰为 439 nm,MTB-Zn(II)的一个吸收峰为 595 nm,MTB-Zn(II)-BSA 的最大吸收峰为 613 nm。MTB-Zn(II)-BSA 的吸光值比 MTB-Zn(II)有较大增加,灵敏度明显提高,可用于 BSA 的定量测定(如图 1)。由于 MTB-Zn(II)-BSA 与 MTB 和 MTB-BSA 相比在 613 nm 出现了一个新吸收峰,同时在 613 nm 处 MTB-BSA 和 MTB-Zn(II)吸收曲线的最大吸光度之和小于 MTB-Zn(II)-BSA 吸收曲线的最大吸光度,因此,可以



图式 1 MTB 结构示意图

Scheme 1 Structure of MTB

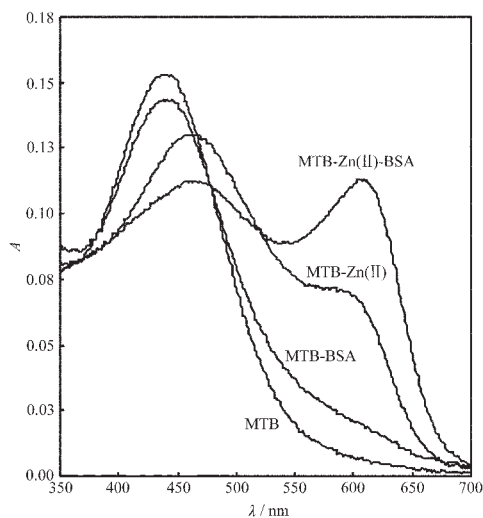


图 1 吸收光谱

Fig.1 Absorption spectra (pH=4.25)

$$C_{\text{MTB}}=14.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$C_{\text{BSA}}=30.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$C_{\text{Zn(II)}}=0.198 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

认为吸收曲线 MTB-Zn(II)-BSA 所相应的体系有 MTB-Zn(II)-BSA 三元配合物形成。

MTB-Zn(II)配合物与 BSA 形成三元配合物的原因主要是在 pH 值为 4.25 条件下, MTB 主要以 H_4L^{2-} 的形式与 Zn(II)形成 MTB-Zn(II)配合物, 这主要表现为吸收峰的红移(如图 1)。而 BSA 分子中的精氨酸残基的胍基和脯氨酸残基的吡咯基等质子化带正电荷, 与 MTB-Zn(II)中带负电荷的羧基作用。这种作用是通过静电引力而产生的相互作用, 其次则是 BSA 分子与 MTB-Zn(II)配合物两者的疏水基团间的相互吸引作用, 使两者接近的程度更大, 从而导致静电引力的进一步增强, 但这种作用在此处较弱, 这主要表现为吸收峰稍有所降低(如图 1)。同时, 在 pH=4.25 时蛋白质的构象呈伸展状态, BSA 分子中的组氨酸残基的咪唑基、半胱氨酸残基的巯基对锌离子有较强的配位作用, 这是 MTB-Zn(II)-BSA 三元配合物的吸收峰明显增强和新吸收峰形成的重要原因。因此认为 MTB-Zn(II)与 BSA 之间的相互作用力主要是配位键。

研究三元体系 ARS-Al(III)-BSA 时, 发现在 pH=4.28 的 B-R 缓冲溶液中, ARS-Al(III)-BSA 的最大吸收波长为 510 nm, 而 ARS 为 428 nm, ARS-BSA 为 435 nm, ARS-Al(III)为 436 nm。因此可以认为相应三元体系中有 ARS-Al(III)-BSA 三元配合物形成并可用于 BSA 的定量测定, ARS-Al(III)配合物与 BSA 之间的作用力主要为配位键和电荷力。

2.2 单波长物质的量比法测定

2.2.1 测定 MTB 与 BSA 的结合比

固定 MTB-Zn(II)溶液的浓度(维持 $n_{MTB}:n_{Zn(II)}=1:2$, 根据实验, 此条件下 MTB 已被 Zn(II)全部结合形成配合物, 可认为无游离的 MTB 存在), 改变 BSA 溶液的浓度, 在 613 nm 处, 以试剂空白作参比测定吸光度, 结果如图 2。即在 MTB-Zn(II)-BSA 三元配合物中 MTB 与 BSA 的结合比约为 2:1。

与此类似, 可以求出在 ARS-Al(III)-BSA 三元配合物中 ARS 与 BSA 的结合比约为 6:1。

2.2.2 测定 MTB 与 Zn(II)的结合比

固定 MTB-BSA 溶液的浓度($n_{MTB}:n_{BSA}=4:3$, 根据实验, 此条件下 MTB 已被 BSA 全部结合, 可认为无游离的 MTB 存在), 改变 Zn(II)溶液的浓度, 在 613 nm 处, 以试剂空白作参比测定吸光度, 结果如图 3。即在 MTB-Zn(II)-BSA 三元配合物中 MTB 与 Zn(II)的结合比约为 1:1。

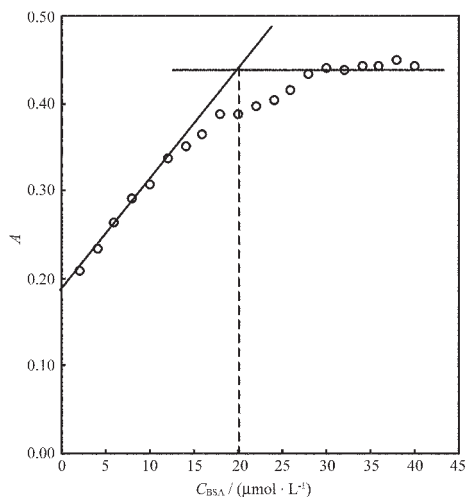


图 2 单波长物质的量比法

Fig.2 Unity wavelength substantial amount ratio method (pH=4.25)

$$C_{MTB}=40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$C_{Zn(II)}=80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

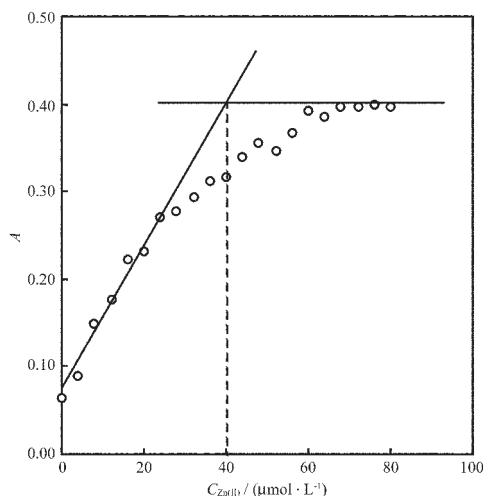


图 3 单波长物质的量比法

Fig.3 Unity wavelength substantial amount ratio method (pH=4.25)

$$C_{MTB}=40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$C_{BSA}=30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

与此类似, 可以求出在 ARS-Al(III)-BSA 三元配合物中 ARS 与 Al(III)的结合比约为 3:2。

因此, MTB-Zn(II)-BSA 三元配合物的结合比为 $n_{MTB}:n_{Zn(II)}:n_{BSA} \approx 2:2:1$ 。同时, 根据 Beer 定律, MTB-Zn(II)-BSA 在溶液中的吸光度可表达为 $A=\epsilon_c b C_c$ 。式中 ϵ_c 代表 MTB-Zn(II)-BSA 的摩尔吸光系数, C_c 代表 MTB-Zn(II)-BSA 的浓度, 即结合形成此三元配合物的 BSA 的浓度, b 代表比色皿的厚度。因此, 根据图 2 计算求得 MTB-Zn(II)-BSA 的表观摩尔吸光系数

$\varepsilon_c=2.20\times10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

同理可求出 ARS-Al(III)-BSA 三元配合物的结合比为 $n_{\text{ARS}}:n_{\text{Al(III)}}:n_{\text{BSA}}\approx 6:4:1$,ARS-Al(III)-BSA 的表观摩尔吸光系数 $\varepsilon_c=2.65\times10^4\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

2.3 双波长物质的量比法测定

2.3.1 双波长的确定

固定 BSA 的浓度,逐渐增加 MTB-Zn(II)配合物的浓度,并维持 $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}$ 为 1:2,测定各溶液在 500~650 nm 间吸收光谱。因 $n_{\text{MTB}}/n_{\text{Zn(II)}}$ 为定值,且 MTB 已全部被 Zn(II)结合形成二元配合物,因此加入的 BSA 只能和这种二元配合物结合形成三元配合物,如图 4。随着 MTB-Zn(II)配合物浓度减少(图 4 中曲线由 6~1),BSA 逐渐过量较大,而 BSA 和 Zn(II)在此可见光区无吸收,此时的吸收光谱是三元配合物的吸收光谱,它们的吸收峰高虽有变化,但形状基本保持不变,其等吸收双波长趋于恒定(图 4 中曲线 3~1),实验所选择出的等吸收双波长为 $\lambda_1=578.0\text{ nm}$ 和 $\lambda_2=630.2\text{ nm}$ (表 1)。

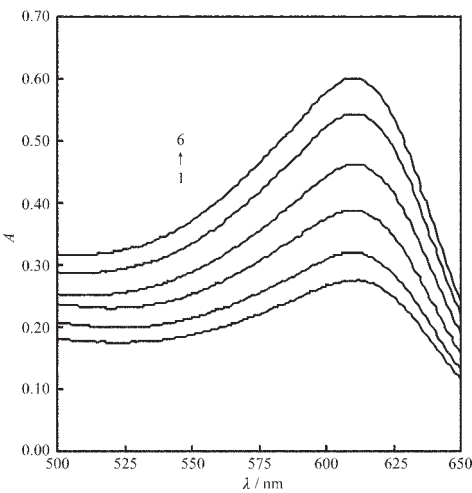


图 4 MTB-Zn(II)-BSA 的吸收光谱

Fig.4 Absorption Spectra of MTB-Zn(II)-BSA (pH=4.25)
 $C_{\text{BSA}}=15\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
 $C_{\text{MTB}}(1\sim6)=16.5, 19.5, 22.5, 25.5, 28.5, 31.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
 $C_{\text{Zn(II)}}(1\sim6)=33.0, 39.0, 45.0, 51.0, 57.0, 63.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

表 1 等吸收波长

Table 1 Isoabsorption wavelength

Curve No. in Fig.4	λ_1/nm	A_1	λ_2/nm	A_2
1	578.0	0.226	630.2	0.226
2	578.0	0.259	630.2	0.259
3	578.0	0.314	630.2	0.314
4	578.0	0.366	630.2	0.378
5	578.0	0.430	630.2	0.443
6	578.0	0.478	630.2	0.487

2.3.2 双波长物质的量比法原理

当 BSA 与过量的 MTB-Zn(II)二元配合物反应时,体系吸光度可以用下式表示:

$$A=\varepsilon_cC_cb+\varepsilon_LC_Lb$$

式中: C_c 为溶液中 MTB-Zn(II)-BSA 配合物浓度, ε_c 为配合物摩尔吸光系数; C_L 为溶液中游离 MTB-Zn(II)配合物浓度, ε_L 为该配合物摩尔吸光系数; b 为比色皿厚度(1 cm)。

如在 MTB-Zn(II)-BSA 配合物等吸收双波长处测定体系吸光度 A_1 和 A_2 ,则:

$$A_1=\varepsilon_{c1}C_c+\varepsilon_{L1}C_L$$

$$A_2=\varepsilon_{c2}C_c+\varepsilon_{L2}C_L$$

$$\Delta A=A_1-A_2=(\varepsilon_{c1}-\varepsilon_{c2})C_c+(\varepsilon_{L1}-\varepsilon_{L2})C_L$$

因为,在配合物等吸收双波长处:

$$A_{c1}=A_{c2}$$

所以
$$\varepsilon_{c1}=\varepsilon_{c2}$$

于是
$$\Delta A=(\varepsilon_{L1}-\varepsilon_{L2})C_L$$

此关系式说明 ΔA 只与溶液中游离的 MTB-Zn(II)配合物浓度有关。作出 ΔA 与 C_L 的等吸收双波长工作曲线,就可以直接求出溶液中游离 MTB-Zn(II)配合物的浓度 C_L 。

根据上述讨论,固定 BSA 溶液的浓度,改变 MTB-Zn(II)溶液的浓度(维持 $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}=1:2$,根据实验,此条件下 MTB 已被 Zn(II)全部结合形成配合物,可

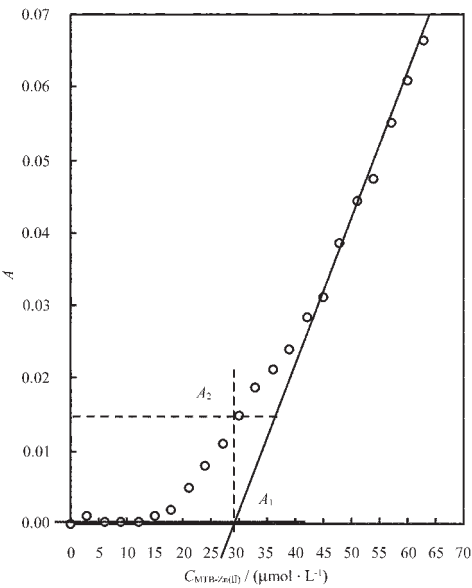


图 5 双波长物质的量比法

Fig.5 Dual wavelength substantial amount ratio method (pH=4.25)
 $C_{\text{BSA}}=15.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
 $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}=1:2$

认为无游离的 MTB 存在), 设计配制 MTB-Zn(II) 与 BSA 相比为限量和过量的一系列溶液, 测定此系列溶液在等吸收双波长处的吸光度, 作出 $\Delta A \sim C_{L0}$ (或 $\Delta A \sim V_{L0}$) 图, C_{L0} 为溶液中 MTB-Zn(II) 配合物的初始浓度。求出 2 条直线交点 A_1 处横坐标浓度 C_{L0} , 从而可计算 MTB-Zn(II) 与 BSA 的结合比。同时, 根据图中 A_2 点的吸光度和 MTB-Zn(II) 的等吸收双波长工作曲线, 可求出 MTB-Zn(II) 与 BSA 结合的条件平衡常数 K 。如图 5, 求出的 MTB-Zn(II) 与 BSA 作用的结合比为 $n=2:1$, 即 $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}:n_{\text{BSA}}=2:2:1$, 二者作用的条件平衡常数为 $K=2.07 \times 10^{10}$ 。

应用类似的方法, 可以获得 ARS-Al(III)-BSA 的等吸收双波长为 $\lambda_1=472 \text{ nm}$ 和 $\lambda_2=550 \text{ nm}$, 并求得结合比 $n_{\text{ARS}}:n_{\text{Al(III)}}:n_{\text{BSA}}=6:4:1$ 。

2.4 平衡透析物质的量比法测定

固定 BSA 溶液的浓度, 改变 MTB-Zn(II) 配合物溶液的浓度 (维持 $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}$ 为 1:2), 并各取 10 mL 加入透析袋中并封闭, 置于盛有 50 mL B-R 缓冲溶液的磨口瓶中透析 72 h。以试剂空白为参比, 测定透析袋外溶液在 595 nm 处的吸光度, 绘制 $A \sim C_{L0}$ (或

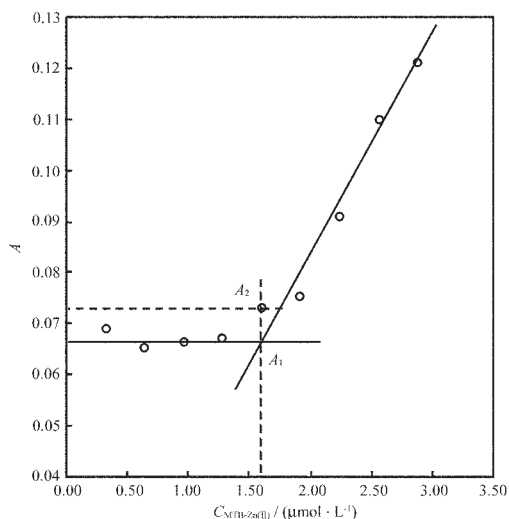


图 6 平衡透析物质的量比法

Fig.6 Balance dialysis substantial amount ratio method (pH=4.25)
 $C_{\text{BSA}}=0.80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
 $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}=1:2$

$A \sim V_{L0}$) 图, 如图 6。从图 6 可知, 在 MTB-Zn(II) 配合物的浓度很低时, 吸光度变化很小, 此时 MTB-Zn(II) 配合物被 BSA 结合完全。随着 MTB-Zn(II) 配合物浓度的增大, 吸光度增大, 即透析袋外 MTB-Zn(II) 配合物的浓度增大, MTB-Zn(II) 配合物被 BSA 结合完全。求出 2 条直线交点 A_1 处横坐标浓度 C_{L0} , 从而可计算 MTB-Zn(II) 与 BSA 的结合比。根据图中 A_2 点的吸光度和 MTB-Zn(II) 的单波长工作曲线, 可求出 MTB-Zn(II) 与 BSA 结合的条件平衡常数。如图 6, 求出的 MTB-Zn(II) 与 BSA 作用的结合比为 $n=2:1$, 即 $n_{\text{MTB}}:n_{\text{Zn(II)}}:n_{\text{BSA}}=2:2:1$, 二者相互作用的条件平衡常数为 $K=2.12 \times 10^{10}$ 。

同样应用平衡透析物质的量比法可获得 $n_{\text{ARS}}:n_{\text{Al(III)}}:n_{\text{BSA}}=6:4:1$, ARS-Al(III) 与 BSA 作用的条件平衡常数为 $K=8.80 \times 10^8$ 。

综上所述, 通过单波长物质的量比法、双波长物质的量比法和平衡透析物质的量比法, 对 MTB-Zn(II)-BSA 三元配合物和 ARS-Al(III)-BSA 三元配合物的形成机理进行探讨, 获得了 MTB-Zn(II) 配合物与 BSA 相互作用以及 ARS-Al(III) 配合物与 BSA 相互作用的结合比、条件平衡常数和作用力等数据和信息。这对于研究生物大分子与探针小分子之间的作用有重要参考价值。

参考文献:

- [1] Congdon R W, Muth G W. *Biochem.*, **1993**, **213**:407~413
- [2] Pesavento M, Profumo A. *Talant.*, **1991**, **38**:1099~1106
- [3] Bradford M M. *Anal Biochem.*, **1976**, **72**:248~254
- [4] Racusen D. *Anal Biochem.*, **1973**, **52**:96~101
- [5] Yutaka S, Atsuko K, Hideki O. *Chem Pharm Bul.*, **1986**, **34**:746~750
- [6] WANG Xing-Ming(王兴明), DONG Fa-Qin(董发勤), DING Li-Sheng(丁立生), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2004**, **20**(8):920~924
- [7] CAI Tie-Jun(蔡铁军), PENG Zhen-Shan(彭振山), DENG Qian(邓 谦), et al. *Wuji Huaxue Xuebao(Chinese J. Inorg. Chem.)*, **2004**, **20**(6):731~733