

金属元素组与血清白蛋白的竞争结合反应性能研究

郭 明* 黄凤琴 李铭慧 刘 敏

(浙江农林大学化学系, 临安 311300)

摘要: 利用亲和毛细管电泳(Affinity capillary electrophoresis, ACE)法研究金属元素组和血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)的竞争结合反应性能。基于位点结合模型, 构建双金属组 $[Zn^{2+}, Cu^{2+}]$ 与血清白蛋白结合反应模型, 建立多元金属组与生物大分子竞争结合的理论方程, 测定结合参数并解析动力学机制。结果表明, 金属元素组 $[Zn^{2+}, Cu^{2+}]$ 与 BSA 发生竞争结合反应形成配合物 Zn^{2+} -BSA 和 Cu^{2+} -BSA。依据有效淌度变化, 通过建立的理论方程非线性拟合竞争结合反应的平均表观结合常数 $K_{Zn^{2+}-BSA} = 4.01 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $K_{Cu^{2+}-BSA} = 7.75 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。结合反应均为快平衡反应, Cu^{2+} 对 Zn^{2+} 离子的结合作用有明显拮抗作用。分析 ACE 谱显示配合物的峰高与配体结合能力大小、配合物稳定性之间存在量效关系。

关键词: 金属元素组; 表观结合常数; 配合物; 量效关系

中图分类号: O614.121; O614.24+1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2014)07-1549-10

DOI: 10.11862/CJIC.2014.238

Study on Competing Reaction of Metallogroup Binding with Serum Albumin

GUO Ming* HUANG Feng-Qin LI Ming-Hui LIU Min

(Department of Chemistry, Zhejiang Agricultural & Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

Abstract: The performance of competing binding reactions between metallogroup and bovine serum albumin was investigated using affinity capillary electrophoresis(ACE) method. Based on the site binding model, a model about the interaction between $[Zn^{2+}, Cu^{2+}]$ as the ligand and BSA as the receptor was established, a theoretical equation of competing binding reaction between multimetal-ions and macromolecule has been suggested, the binding parameters and dynamic mechanism were also measured and analyzed. The result show that, the competitive combined reactions of metallogroup $[Zn^{2+}, Cu^{2+}]$ with BSA were reacted to form compounds Zn^{2+} -BSA and Cu^{2+} -BSA. Based on the changes of the effective mobility, the mean apparent competition binding constant was determined through established theoretical equation by using non-linear fitting method, and the average apparent binding constant $K_{Zn^{2+}-BSA} = 4.01 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, $K_{Cu^{2+}-BSA} = 7.75 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. The binding reactions of Zn^{2+}/Cu^{2+} -BSA are fast equilibrium reactions, and that Cu^{2+} had antagonism effect on Zn^{2+} . Dosage-dependent effect also exists among the peak height of compounds with the ligand strength of binding reactions and stability of compounds.

Key words: metallogroup; apparent binding constant; complex compound; dosage-dependent effect

收稿日期: 2013-11-24。收修改稿日期: 2014-03-30。

国家自然科学基金资助项目(No.20877072), 浙江科技厅公益资助项目(No.2012C37055)。

*通讯联系人。E-mail: guoming@zafu.edu.cn

0 引言

生物无机化学是无机化学、生物化学、医学等多学科的交叉领域,其研究对象是生物体内金属元素与生物大分子的配位结合反应以及生成的金属离子-生物大分子配合物的结构-性质-生物活性之间的关系与内在反应机理^[1-2]。其中,金属离子与蛋白质分子的结合反应及其配合物结构、性能的解析是生物无机化学的热点研究内容。

金属离子与蛋白质分子的相互作用已有大量研究^[3-10],但主要是单一金属元素与蛋白质结合作用或单一金属元素与蛋白质组相互结合作用的研究,而金属元素组与蛋白质结合反应的相关文献报道甚少,该领域的研究方法及相关理论亟待完善。当前,金属组学的研究成果应用于生物无机化学领域是极具活力的课题,金属元素组与蛋白质结合反应的研究是金属组学在生物无机化学研究领域的应用,故开展金属元素组与蛋白质的结合反应性能研究具有重要的现实意义。当前,研究金属离子与蛋白质结合反应性能与配合物结构、性能的方法已陆续见诸文献报道,如:平衡透析法、荧光光谱法^[11]、圆二色谱法^[12]、核磁共振法、紫外吸收法等^[13]。因溶液中金属元素组与蛋白质相互作用体系是混合体系,且该体系处于动态变化过程中,故上述方法很难对金属元素组进行有效分离。而色谱方法中的亲和毛细管电泳法能克服已有方法的不足,能较好地将混合体系中的不同组分区分开,同时具有高分辨率、高灵敏度、样品用量少等特点。将 ACE 法用于研究金属元素组与蛋白质结合反应,可将不同组分从混合体系中分离,从而得出结合反应的相应参数和配合物的结构参数等,此是具有广泛应用前景的研究。

人体生命活动有关的必须微量金属元素有 18 种,这些金属元素在人体内含量微少,却是生命体功能分子的重要组成部分,对人体正常生理功能的发挥不可或缺^[14-15]。人体从体外摄入的金属元素进入体内必须通过蛋白质的输运过程,血清白蛋白是人血浆中含量最丰富的蛋白质,是储存和转运众多内源性和外源性物质的重要载体,进入体内的所有金属元素,必然要与血清白蛋白发生结合反应,即体内金属元素与血清白蛋白的真实结合反应为金属元素组与蛋白质的结合反应。但目前的技术手段及理论方法无法应对全金属组与蛋白质的结合反应研究,简化全金属组为多元金属组与蛋白质结合反应是必由

之路。本文以锌和铜典型必需微量元素为代表,开展金属组与蛋白质结合反应的简化模型研究。牛血清白蛋白(BSA)与人血清白蛋白的结构和氨基酸序列高度相似,且价廉易得,为蛋白质相互作用研究等领域的模版分子^[16],通过 ACE 法,开展 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 与 BSA 的竞争结合反应,进而解析结合反应的动力学机制,此是具有重要意义的研究,有关工作可为深入研究金属组与蛋白质结合反应奠定前期基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE™ MDQ 毛细管电泳仪 (Beckman-Coulter 公司);未涂层熔融石英毛细管柱(60.2 cm×50 μm I. D.,有效长度 50 cm);ZD-2 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);电子分析天平(十万分之一,德国 Sartorius 公司);1810D 自动双重纯水蒸馏器 (美国 Millipore 公司)。

牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA, purity $\geq 96\%$, Sigma 公司);*N*-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)均购置于上海华美生物工程公司;氯化铜 (AR, CuCl_2)、氯化锌(AR, ZnCl_2)、氢氧化钠(AR, NaOH)均购置于中国医药集团上海化学试剂公司。其它试剂均为分析纯,实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

1.2.1 ACE 方法运行缓冲液及样品溶液的配制

分别配制 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris 溶液与 $0.125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tricine 溶液;定量混合配制 pH=7.75 的 Tris-Tricine 缓冲液。Tris-Tricine 缓冲液定量配制各不同浓度的 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 溶液,均用 $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 混合纤维素酯微孔过滤并脱气 5 min,待用。

Tris-Tricine 缓冲液配制 $10 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BSA 溶液,加入适量过滤脱气后的 0.5% DMF(用于检测电渗流和迁移时间的重现性)混匀,待用。移取 $10 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 溶液与 BSA 溶液等浓度等体积混匀配制 Zn^{2+} +BSA 混合溶液,待用;移取 $10 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 溶液与 BSA 溶液等浓度等体积混匀配制 Cu^{2+} +BSA 混合溶液,待用;移取 $10 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 溶液与 Cu^{2+} 溶液等浓度等体积混匀配制(Zn^{2+} + Cu^{2+})混合溶液,待用。

1.2.2 单金属缓冲液中 BSA 有效淌度的测定

单金属离子缓冲液中 BSA 有效淌度的测定程

序:2.07 kPa 压力进样,3 s 进样时间,214 nm 检测波长,25 kV 分离电压,25 °C 柱温。实验操作程序:用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH、二次水及空白缓冲液分别冲洗 3 min,样品 BSA 进样,分别采用不同浓度的 Zn²⁺、Cu²⁺ 溶液作为运行缓冲液冲洗 5 min,测定实验 12 次以上(背景缓冲液是 Zn²⁺或 Cu²⁺溶液,进样样品为 BSA 溶液,测定体系表示为:BSA [+Zn²⁺]、BSA [+Cu²⁺]),分别获得不同浓度 Zn²⁺、Cu²⁺ 溶液下的电泳谱图,并求得不同浓度 Zn²⁺、Cu²⁺ 溶液下 BSA 的平均有效淌度(因 ACE 法重复性有限,吸收值取重复性合理的 6 次结果取平均值)。

1.2.3 含 Cu²⁺、Zn²⁺缓冲液中 Zn²⁺-BSA、Cu²⁺-BSA 有效淌度的测定

在 Cu²⁺、Zn²⁺溶液作为运行缓冲液条件下,分别以 Zn²⁺+BSA、Cu²⁺+BSA 混合物为样品进样,体系中 Zn²⁺-BSA、Cu²⁺-BSA 有效淌度的测定程序(背景缓冲液是 Cu²⁺或 Zn²⁺溶液,进样样品分别为 Zn²⁺+BSA、Cu²⁺+BSA 溶液,测定体系表示为:Zn²⁺+BSA[+Cu²⁺]、Cu²⁺+BSA[+Zn²⁺]):实验前用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH、二次

水及空白缓冲液分别冲洗 3 min,分别采用不同浓度的 Zn²⁺、Cu²⁺溶液作为运行缓冲液冲洗 5 min,其他测试程序同 1.2.2,分别测定 12 次以上,获得相应的电泳谱图并求得不同 Cu²⁺、Zn²⁺浓度缓冲液中 Zn²⁺-BSA、Cu²⁺-BSA 的平均有效淌度(取重复性合理的 6 次结果取平均值)。

1.2.4 含(Zn²⁺+Cu²⁺)缓冲液中 BSA 有效淌度的测定

在 (Zn²⁺+Cu²⁺) 溶液作为运行缓冲液条件下,以 BSA 溶液为样品进样,体系中 Zn²⁺-BSA、Cu²⁺-BSA 有效淌度的测定程序(背景缓冲液是 Zn²⁺溶液和 Cu²⁺溶液的混合液,进样样品为 BSA 溶液,测定体系表示为:BSA[+(Zn²⁺+Cu²⁺)]):实验前用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH、二次水及空白缓冲液分别冲洗 3 min,采用不同浓度(Zn²⁺+Cu²⁺)溶液作为运行缓冲液冲洗 5 min;其他测试程序同 1.2.2,分别测定 12 次以上,求不同浓度(Zn²⁺+Cu²⁺)缓冲液中 BSA 的平均有效淌度(取重复性合理的 6 次结果取平均值)。不同实验体系有效淌度的测定过程及符号表示归纳如表 1 所示。

表 1 不同实验体系有效淌度的测定过程及表示符号

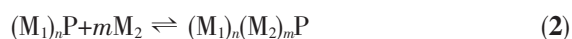
Table 1 Treatment process and representation symbol of experimental system to determination of effective mobility

No.	Injection sample	Running buffer	Solution system	The notation of experimental system
1	BSA solution	Zn ²⁺ solution	Measuring the effective mobility of BSA in the single metal ion buffer	BSA[+Zn ²⁺]
2	BSA solution	Cu ²⁺ solution	Measuring the effective mobility of BSA in the single metal ion buffer	BSA[+Cu ²⁺]
3	Zn ²⁺ +BSA solution	Cu ²⁺ solution	Measuring the effective mobility of Zn ²⁺ -BSA in the Cu ²⁺ buffer	Cu ²⁺ +BSA[+Zn ²⁺]
4	Cu ²⁺ +BSA solution	Zn ²⁺ solution	Measuring the effective mobility of Cu ²⁺ -BSA in the Zn ²⁺ buffer	Zn ²⁺ +BSA[+Cu ²⁺]
5	BSA solution	Zn ²⁺ +Cu ²⁺ mixed solution	Measuring the effective mobility of BSA in the (Zn ²⁺ +Cu ²⁺) buffer	BSA[+(Zn ²⁺ +Cu ²⁺)]

2 结果与讨论

2.1 Cu²⁺和 Zn²⁺与 BSA 结合反应模型及理论方程

针对双金属组(配体 M₁、M₂)与蛋白质(受体 P)之间的相互作用体系,合理假设该体系的金属离子组 M₁、M₂ 与蛋白质分子间均有结合反应且是有差别的,即 M₁、M₂ 与 P 的竞争结合反应是连续反应,则可以用以下结合反应模型描述各物质间结合反应:



对形成的配合物(M₁)_nP,其表观结合常数表达式如下:

$$K_1 = \frac{c_{(M_1)_n P}}{c_{M_1}^n c_P} \quad (3)$$

对形成的配合物(M₁)_n(M₂)_mP,其表观结合常数表达式如下:

$$K_2 = \frac{c_{(M_1)_n (M_2)_m P}}{c_{(M_1)_n P} c_{M_2}^m} \quad (4)$$

当 n=1 时,方程式(3)可表示为:

$$K_1 = \frac{c_{M_1P}}{c_{M_1}c_P} \quad (5)$$

当 $n=m=1$ 时, 方程式(4) 可表示为:

$$K_2 = \frac{c_{M_1M_2P}}{c_{M_1P}c_{M_2}} \quad (6)$$

c_{M_1P} 、 $c_{M_1M_2P}$ 分别表示配合物 M_1P 、 M_1M_2P 的浓度, c_{M_1} 、 c_{M_2} 、 c_P 分别表示配体 M_1 、 M_2 和受体 P 的游离浓度, 当改变缓冲液中受体 P 的浓度, 混合物的电泳淌度发生变化, 得到如下公式^[17]:

$$\mu_{M_1-P-M_2} = \frac{c_{M_1}}{c_{M_1}+c_{M_1P}+c_{M_1M_2P}}\mu_{M_1} + \frac{c_{M_1P}}{c_{M_1}+c_{M_1P}+c_{M_1M_2P}}\mu_{M_1P} + \frac{c_{M_1M_2P}}{c_{M_1}+c_{M_1P}+c_{M_1M_2P}}\mu_{M_1M_2P} \quad (7)$$

μ_{M_1} 、 μ_{M_1P} 、 $\mu_{M_1M_2P}$ 分别表示金属离子 M_1 、配合物 M_1P 、配合物 M_1M_2P 单独存在时的电泳淌度, $\mu_{M_1-P-M_2}$ 表示金属离子因受体 P 影响后的电泳淌度。因金属离子组与蛋白质大分子结合的体系十分复杂, 为简便计算, 本文简化了结合反应模型, 取金属离子组 (Zn^{2+} 、 Cu^{2+}) 与 BSA 竞争结合的简化模式 ($m=n=1$), 虽然与反映复杂体系的实验事实有差别, 但代表了金属离子组 (Zn^{2+} 、 Cu^{2+}) 与 BSA 竞争结合的典型情况, 能够得出金属离子组与蛋白质大分子竞争结合常数等相关信息。

在 ACE 方法中, 一般不能准确获得迁移区带中游离态 M 的浓度 c_{M_1} , 在配体 M 的合理范围内 (通常配体 M 的浓度高于受体 P 浓度的 10~100 倍^[18-19]) 可设定 c_{M_1} 等于运行缓冲液中配体 M 的浓度 c_M , 进而由受体 P 的 μ 值和 c_M 估算结合常数 K_b 。

将式(5)、(6)代入式(7), 整理得:

$$\mu_{M_1-P-M_2} = \frac{\mu_{M_1} + K_1 c_P \mu_{M_1P} + K_1 K_2 c_P^2 \mu_{M_1M_2P}}{1 + K_1 c_P + K_1 K_2 c_P^2} \quad (8)$$

从式(8)可知, 不同浓度的 M (即 c_M) 对应不同的 μ_M 值。从电泳谱图上读取相应的迁移时间, 根据迁移时间计算有效淌度, 公式如下:

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{eof}} = \frac{L_d L_t}{V} \left(\frac{1}{t} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} \right) \quad (9)$$

方程式(9)中, μ_{eff} 是受体 P 的有效淌度, μ_{app} 是其表观淌度, μ_{eof} 是电渗流淌度, t 是从电泳谱图中直接测得的受体 P 的迁移时间, t_{eof} 是 DMF 的迁移时间, V 是毛细管两端的外加电压, L_t 是毛细管总长, L_d 是

从进样端到检测窗口的有效长度。

为扣除电渗流的影响, 引入 DMF 作为参比, 并将淌度用迁移时间的形式表示, 结合式(8)、式(9)进一步推导可得式(10):

$$\frac{1}{t_{M_1-P-M_2}} - \frac{1}{t_{\text{eof}}} = \frac{(1/t_{M_1} - 1/t_{\text{eof}}) + K_1 c_P X + K_1 K_2 c_P^2 Y}{1 + K_1 c_P + K_1 K_2 c_P^2} \quad (10)$$

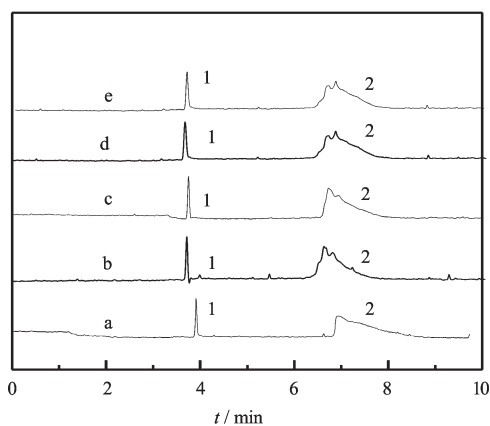
其中, t_{eof} 、 t_{M_1} 、 $t_{M_1-P-M_2}$ 分别表示参比离子、金属离子、配合物的表观迁移时间, X 、 Y 分别表示配合物 M_1P 、 M_1M_2P 相对于参比离子的表观迁移时间。

由式(9)计算出 μ_{eff} , 并把其作为式(8)中的 μ (游离受体 P 的有效淌度或受体 P 的平均有效淌度), 然后对 c_M 进行非线性拟合求 K_b (Bowser 等^[20]强调通过对 ACE 方法测得的数据进行非线性拟合, 特别在 c_M 浓度合理范围内, 计算结合常数能够降低误差)。

2.2 ACE 法测定 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 与 BSA 结合反应

按 1.2.2、1.2.3、1.2.4 实验, 测得 BSA 在不同缓冲液中电泳谱图, 结果如图 1 所示。

从图 1 可见, pH=7.59 条件下, 中性内标物 DMF 的迁移时间基本不变, 缓冲液的形式改变和浓度改变不能显著影响 DMF 的迁移行为, 这说明 DMF 与 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 之间没有明显的相互作用, 溶液的粘度、离子强度等对体系无明显影响。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 无吸收峰, BSA (pI=4.7) 在 pH=7.59 缓冲液中带负电荷, 根据毛细管电泳 (CE) 中不同电荷物质出峰时间先后顺序可

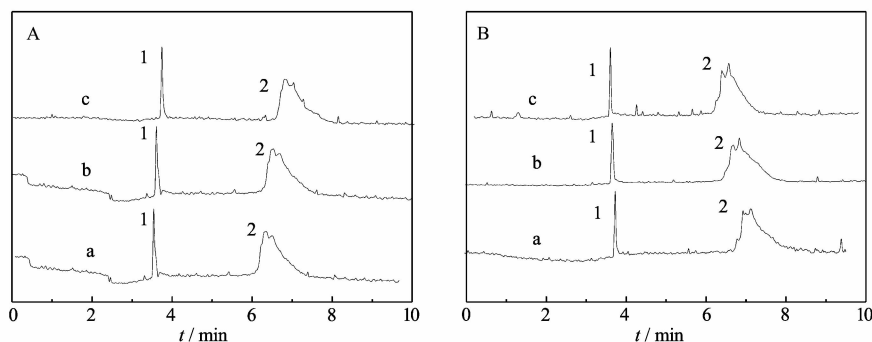


$c_{BSA}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; a. BSA [+ Zn^{2+}]; b. BSA [+ Cu^{2+}]; c. Zn^{2+} +BSA[+ Cu^{2+}]; d. Cu^{2+} +BSA[+ Zn^{2+}]; e. BSA[+(Zn^{2+} + Cu^{2+})]. Peaks: 1. DMF; 2. BSA or Zn^{2+} -BSA or Cu^{2+} -BSA

图 1 BSA 及 DMF 在不同体系下的电泳图

Fig.1 Electropherograms of BSA and DMF under different systems

知 BSA 在 DMF 之后被检测,这与图中峰出现先后顺序一致。需要说明的是,血液正常 pH 值为 7.35~7.45,本实验选择 pH=7.75 作为缓冲液较血液正常 pH 值高,此是考虑到仅在血液 pH 值条件下,ACE 分离效果可能达不到要求,但如果偏离血液的 pH 值条件太远,则实验结果失去了生理意义,综合考虑并实验分析,选择 pH=7.75 作为缓冲液的 pH 值。



(A) $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ (B) $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$. (A-a) $c_{\text{Cu}^{2+}}=c_{\text{Zn}^{2+}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (A-b) $c_{\text{Cu}^{2+}}=c_{\text{Zn}^{2+}}=60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (A-c) $c_{\text{Cu}^{2+}}=c_{\text{Zn}^{2+}}=0.20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B-a) $c_{\text{Zn}^{2+}}=c_{\text{Cu}^{2+}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B-b) $c_{\text{Zn}^{2+}}=c_{\text{Cu}^{2+}}=60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (B-c) $c_{\text{Zn}^{2+}}=c_{\text{Cu}^{2+}}=0.20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Peaks: 1. DMF; 2. BSA, Zn^{2+} -BSA or Cu^{2+} -BSA

图 2 BSA 及 DMF 在 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 、 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系中电泳图

Fig.2 Electropherograms of BSA and DMF under different systems of $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$, $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$

图 2 表明, $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 与 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系中 BSA 在 DMF 之后被检测到, 这与图 1 所示 BSA 组分峰出峰顺序一致。图 2-A 表明, 随着缓冲液中 Cu^{2+} 浓度增大, 各峰的迁移时间均延长, 表明峰 2 代表的物质所带电荷的量减少。同时, 与图 1 比较, 图 2-A 中峰 2 的迁移时间缩短, 表明峰 2 代表的物质所带电荷的量较 $\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系、 $\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 体系均增大; 同时 BSA 峰的肩部出现两个小峰, 因为 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 无吸收峰, 推断是 Zn^{2+} -BSA 峰或 Cu^{2+} -BSA 峰, 且峰 2 中前一个小峰逐渐高于后一个小峰, 推断为缓冲液中的 Cu^{2+} 结合了混合物 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}$ 中部分结合位点。另外图 2-A 峰 2 中峰高的那个峰可能是结合能力较强的金属离子与蛋白质分子结合形成的峰。

图 2-B 表明, 随着缓冲液中 Zn^{2+} 浓度增大, 各峰的迁移时间均缩短, 表明峰 2 代表的物质所带电荷的量增加。同时, 与图 1 比较, 图 2-B 中峰 2 的迁移时间增加, 表明峰 2 代表的物质所带电荷的量较 $\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系、 $\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 体系均有减小。同时 BSA 峰的肩部出现两个小峰, 同样推断是 Zn^{2+} -BSA 峰或 Cu^{2+} -BSA 峰, 且峰 2 中后一个小峰逐渐高于前一个

2.3 BSA 有效淌度的测定

2.3.1 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 、 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系中的有效淌度

实验测定 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 、 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系中 Cu^{2+} 与混合物 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}$ 相互作用后的有效淌度和 Zn^{2+} 与混合物 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}$ 相互作用后的有效淌度, 在不同浓度缓冲液中电泳谱图结果见图 2。

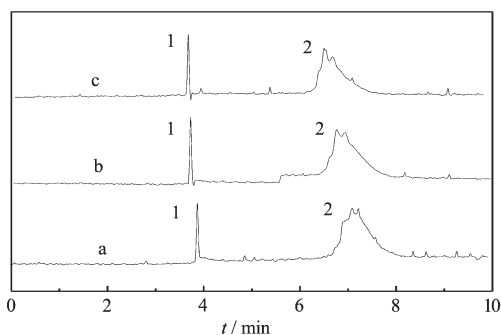
小峰, 推断可能是缓冲液中的 Zn^{2+} 结合了混合物 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}$ 中部分位点。图 2-B 峰 2 中峰高的那个峰可能是结合能力较强的金属离子与蛋白质分子结合形成的峰。

2.3.2 $\text{BSA}[\text{+}(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$ 体系中有有效淌度的测定

测定 $\text{BSA}[\text{+}(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$ 体系中 $(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})$ 与 BSA 相互作用后的有效淌度, 相应 ACE 谱见图 3。

图 3 表明, 随着缓冲液中 $(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})$ 浓度增大, 各峰的迁移时间均缩短, 表明峰 2 代表的物质所带电荷的量增加。同时, 与图 1 比较, 图 3 中峰 2 的迁移时间增加, 表明峰 2 代表的物质所带电荷的量较 $\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系、 $\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 体系均有减小。同时 BSA 峰的肩部出现 2 个小峰, 推断是 Zn^{2+} -BSA 峰或 Cu^{2+} -BSA 峰, 且峰 2 中左边的小峰逐渐高于右边的小峰, 推断可能是其中某种金属离子的结合能力大于另外一种, 结合能力大的金属蛋白配合物峰在前, 且峰较高。根据式(9)计算不同体系中 Zn^{2+} -BSA 和 Cu^{2+} -BSA 的平均有效淌度, 结果列于表 2、表 3 及表 4。

由表 2 可见, 在 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 体系中, Zn^{2+} -BSA 的有效淌度分别从 $-4.535\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 变化至 $-6.399\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, Cu^{2+} -BSA 的有效淌度分



(a) $c_{\text{Zn}^{2+}}=c_{\text{Cu}^{2+}}=10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) $c_{\text{Zn}^{2+}}=c_{\text{Cu}^{2+}}=60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (c) $c_{\text{Zn}^{2+}}=c_{\text{Cu}^{2+}}=0.20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Peaks: 1. DMF; 2. BSA, Zn^{2+} -BSA or Cu^{2+} -BSA

图 3 BSA 及 DMF 在 $\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$ 体系中电泳图

Fig.3 Electropherograms of BSA and DMF under the systems of $\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$

别从 $-4.976\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 变化至 $-6.468\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; 由表 3 可见, 在 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+})]$ 体系中, Cu^{2+} -BSA 的有效淌度分别从 $-6.172\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 变化至 $-4.625\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, Zn^{2+} -BSA 的有效淌

度分别从 $-6.591\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 变化至 $-4.985\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$; 由表 4 可见, 在 $\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$ 体系中, Zn^{2+} -BSA 的有效淌度分别从 $-5.366\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 变化至 $-4.675\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, Cu^{2+} -BSA 的有效淌度分别从 $-5.960\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 变化至 $-5.291\times 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。这表明 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 与 BSA 之间确实发生了结合反应, 且它们之间的相互作用逐渐增强。

以 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 $\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+}$ 浓度为横坐标, μ_{eff} 为纵坐标作图, 按公式(8)非线性拟合, 分别得到 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Cu}^{2+})]$ 、 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+})]$ 、 $\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$ 3 种体系中 Cu^{2+} -BSA 与 Zn^{2+} -BSA 的结合曲线(图 4), 计算的结合参数结果列于表 5。

从图 4 可见, 实验数据点接近拟合曲线。图 4 结合表 2 表明, 随着运行缓冲液中 Cu^{2+} 浓度的增大, $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Cu}^{2+})]$ 体系中 Zn^{2+} -BSA 和 Cu^{2+} -BSA 的平均有效淌度随之减小, Zn^{2+} -BSA 和 Cu^{2+} -BSA 峰的迁移时间均延长。这是因为随着 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Cu}^{2+})]$ 体系中 Cu^{2+} 浓度的增大, Zn^{2+} -BSA 和 Cu^{2+} -BSA 所带电荷

表 2 Zn^{2+} -BSA 和 Cu^{2+} -BSA 在 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Cu}^{2+})]$ 中的有效淌度

Table 2 Effective mobility of Zn^{2+} -BSA and Cu^{2+} -BSA under the system of $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Cu}^{2+})]$

Sample	$c_{\text{Cu}^{2+}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Effective mobility of Zn^{2+} -BSA $\mu_{\text{eff}} / (\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	Standard deviation / $(\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	RSD / % ($n=6$)	Effective mobility of Cu^{2+} -BSA $\mu_{\text{eff}} / (\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	Standard deviation / $(\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	RSD / % ($n=6$)
$\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}$	0	-4.535×10^{-5}	9.523×10^{-7}	2.1	-4.976×10^{-5}	1.144×10^{-6}	2.3
	10	-4.672×10^{-5}	1.075×10^{-6}	2.3	-5.250×10^{-5}	1.102×10^{-6}	2.1
	20	-4.838×10^{-5}	9.191×10^{-7}	1.9	-5.332×10^{-5}	9.598×10^{-7}	1.8
	30	-5.073×10^{-5}	1.015×10^{-6}	2.0	-5.514×10^{-5}	1.213×10^{-6}	2.2
	60	-5.848×10^{-5}	1.112×10^{-6}	1.8	-6.180×10^{-5}	1.112×10^{-6}	1.9
	100	-6.123×10^{-5}	1.401×10^{-6}	2.2	-6.366×10^{-5}	1.299×10^{-6}	2.1
	200	-6.399×10^{-5}	1.343×10^{-6}	2.1	-6.468×10^{-5}	1.294×10^{-6}	2.0

表 3 Zn^{2+} -BSA 和 Cu^{2+} -BSA 在 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+})]$ 中的有效淌度

Table 3 Effective mobility of Zn^{2+} -BSA and Cu^{2+} -BSA under the system of $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[(\text{Zn}^{2+})]$

Sample	$c_{\text{Zn}^{2+}} / (\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Effective mobility of Cu^{2+} -BSA $\mu_{\text{eff}} / (\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	Standard deviation / $(\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	RSD / % ($n=6$)	Effective mobility of Zn^{2+} -BSA $\mu_{\text{eff}} / (\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	Standard deviation / $(\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	RSD / % ($n=6$)
$\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}$	0	-6.172×10^{-5}	1.358×10^{-6}	2.2	-6.591×10^{-5}	1.384×10^{-6}	2.1
	10	-5.690×10^{-5}	1.081×10^{-6}	1.9	-6.057×10^{-5}	1.272×10^{-6}	2.1
	20	-5.421×10^{-5}	1.030×10^{-6}	1.9	-5.621×10^{-5}	1.012×10^{-6}	1.8
	30	-5.379×10^{-5}	1.076×10^{-6}	2.0	-5.401×10^{-5}	1.188×10^{-6}	2.2
	60	-4.934×10^{-5}	8.881×10^{-9}	1.8	-5.234×10^{-5}	8.897×10^{-7}	1.7
	100	-4.736×10^{-5}	9.945×10^{-9}	2.1	-5.073×10^{-5}	1.015×10^{-6}	2.0
	200	-4.625×10^{-5}	9.713×10^{-9}	2.1	-4.985×10^{-5}	9.971×10^{-7}	2.0

表 4 Zn²⁺-BSA 和 Cu²⁺-BSA 在 BSA[+(Zn²⁺+Cu²⁺)]体系中的有效淌度Table 4 Effective mobility of Zn²⁺-BSA and Cu²⁺-BSA under the system of BSA[+(Zn²⁺+Cu²⁺)]

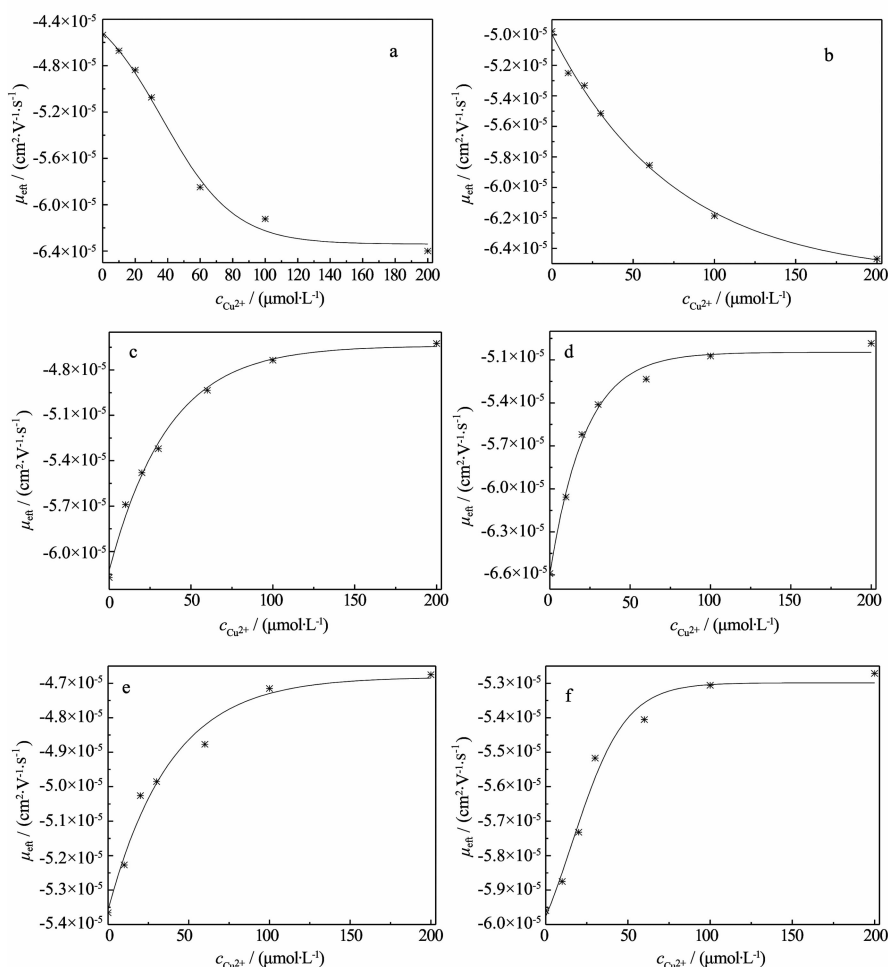
Sample	$c_{\text{Cu}^{2+}+\text{Cu}^{2+}} /$ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Effective mobility of Zn ²⁺ -BSA $\mu_{\text{eff}} /$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Standard deviation / ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	RSD / % ($n=6$)	Effective mobility of Cu ²⁺ -BSA $\mu_{\text{eff}} /$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Standard deviation / ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	RSD / % ($n=6$)
BSA	0	-5.366×10^{-5}	1.181×10^{-6}	2.2	-5.960×10^{-5}	1.252×10^{-6}	2.1
	10	-5.227×10^{-5}	9.931×10^{-9}	1.9	-5.875×10^{-5}	1.234×10^{-6}	2.1
	20	-5.026×10^{-5}	9.549×10^{-9}	1.9	-5.732×10^{-5}	1.032×10^{-6}	1.8
	30	-4.985×10^{-5}	9.970×10^{-9}	2.0	-5.517×10^{-5}	1.214×10^{-6}	2.2
	60	-4.877×10^{-5}	8.778×10^{-9}	1.8	-5.405×10^{-5}	9.188×10^{-7}	1.7
	100	-4.715×10^{-5}	9.902×10^{-9}	2.1	-5.306×10^{-5}	1.061×10^{-6}	2.0
	200	-4.675×10^{-5}	9.818×10^{-9}	2.1	-5.291×10^{-5}	1.058×10^{-6}	2.0

表 5 Zn²⁺、Cu²⁺与 BSA 相互作用的非线性拟合结果Table 5 Results of non-linear curve fitting about the interactions between Zn²⁺, Cu²⁺ and BSA

Sample	System of effective mobility	Apparent binding constant $K_b /$ ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$)	Average apparent Binding constant K_b	Effective mobility of free sample $\mu_{\text{eff}} /$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Effective mobility of combinations $\mu_{\text{eff}} /$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	Correlation coefficient r	Sum squared error
Zn ²⁺ +BSA[+Cu ²⁺]	Zn ²⁺ -BSA	3.76×10^4	$K_{\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}}$	-4.399×10^{-5}	-6.399×10^{-5}	0.9923	2.300×10^{-4}
	Cu ²⁺ -BSA	7.86×10^4	$=4.01 \times 10^4$	-4.969×10^{-5}	-6.673×10^{-5}	0.9930	2.356×10^{-4}
Cu ²⁺ +BSA[Zn ²⁺]	Zn ²⁺ -BSA	3.37×10^4	$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	-6.593×10^{-5}	-4.982×10^{-5}	0.9943	1.658×10^{-4}
	Cu ²⁺ -BSA	7.17×10^4	$K_{\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}}$	-6.175×10^{-5}	-4.610×10^{-5}	0.9901	2.233×10^{-4}
BSA[+(Zn ²⁺ +Cu ²⁺)]	Zn ²⁺ -BSA	4.91×10^4	$=7.75 \times 10^4$	-5.367×10^{-5}	-4.674×10^{-5}	0.9930	2.397×10^{-4}
	Cu ²⁺ -BSA	8.23×10^4	$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	-5.964×10^{-5}	-5.284×10^{-5}	0.9974	1.233×10^{-4}

的量较在 BSA[+Zn²⁺]、BSA[+Cu²⁺]体系中增多的缘故。拟合实验数据得出 Zn²⁺+BSA[+Cu²⁺]体系中的结合常数 $K_{\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}} = 3.76 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $K_{\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}} = 7.86 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。图 4 结合表 3 表明,随着运行缓冲液中 Zn²⁺浓度的增大,Cu²⁺+BSA [+ Zn²⁺] 体系中的 Zn²⁺-BSA 和 Cu²⁺-BSA 的平均有效淌度随之增大,Zn²⁺-BSA 和 Cu²⁺-BSA 峰的迁移时间均缩短。这是因为随着 Cu²⁺+BSA[+Zn²⁺]体系中 Zn²⁺浓度的增大,Zn²⁺-BSA 和 Cu²⁺-BSA 所带电荷的量较在 BSA[+Zn²⁺]、BSA[+Cu²⁺]体系中减小的缘故。拟合实验数据得出 Cu²⁺+BSA[+Zn²⁺]体系中的结合常数 $K_{\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}} = 3.37 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $K_{\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}} = 7.17 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$;图 4 结合表 4 表明,随着运行缓冲液中(Zn²⁺+Cu²⁺)浓度的增大,BSA[+(Zn²⁺+Cu²⁺)]体系中 Zn²⁺-BSA 和 Cu²⁺-BSA 的平均有效淌度随之增大,Zn²⁺-BSA 和 Cu²⁺-BSA 峰的迁移时间均缩短。这是因为随着 BSA[+(Zn²⁺+Cu²⁺)]体系中(Zn²⁺+Cu²⁺)浓度的增大,Zn²⁺-BSA 和 Cu²⁺-BSA 所带电荷的量较在 BSA[+Zn²⁺]、BSA[+Cu²⁺]体系中减小的缘故。拟合实验数据

得出 BSA[+(Zn²⁺+Cu²⁺)]体系中结合常数 $K_{\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}} = 4.91 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $K_{\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}} = 8.23 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。测定有效淌度变化的实验数据也证实了 Zn²⁺、Cu²⁺与 BSA 之间发生了竞争结合反应。由实验数据根据式(8)非线性拟合得到在上述 3 种不同体系中配合物 Zn²⁺-BSA, Cu²⁺-BSA 的平均表观结合常数 K_b 分别为 $4.01 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、 $7.75 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ (文献中 BSA 分别在 Zn²⁺、Cu²⁺离子缓冲液下进行毛细管电泳实验, $K_{\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}} = 8.2 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$; $K_{\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}} = 8.73 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ [21-22]),本实验结果与之基本符合,说明本方法可行、结果可信),根据表观结合常数 K_b ,我们发现金属组条件下,Zn²⁺-BSA, Cu²⁺-BSA 之间发生的结合反应均为快平衡反应(根据 K_b 值,可将结合体系分为快平衡 (K_b 数量级为 $10^4 \sim 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)和慢平衡(K_b 数量级为 $10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$)体系[23],其中快平衡的一个特点是游离蛋白质分子和结合物将难以分开,它们混合成一个条带迁移,在电泳谱图上表现为一个宽峰)。当分析物分子在高压电场作用下通过毛细管发生电泳迁移时,它的电泳



(a) Zn^{2+} -BSA binding curve($\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$); (b) Cu^{2+} -BSA binding curve($\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$); (c) Cu^{2+} -BSA binding curve($\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$); (d) Zn^{2+} -BSA binding curve($\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$); (e) Zn^{2+} -BSA binding curve($\text{BSA}[\text{+}(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$); (f) Cu^{2+} -BSA binding curve($\text{BSA}[\text{+}(\text{Zn}^{2+}+\text{Cu}^{2+})]$)

图 4 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 与 BSA 的非线性拟合分析曲线

Fig.4 Nonlinear fitting curve of affinity interaction between zinc ion or copper ion and BSA

淌度 μ 由两个主要因素决定^[24]: (1) 分析物分子所处环境中的其他化学物质; (2) 分析物分子的荷/质比。当蛋白质分子与质量相对小的带电配体发生相互作用时, 结合物的电泳淌度发生变化主要是因为分析物所处环境中化学物质变化和其电荷发生了变化, 而因为其质量发生变化导致电泳淌度的改变可以忽略不计。分析图 1、图 2 及图 3 可见, $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ 离子与 BSA 结合后的电泳谱图峰在肩峰处出现一高一低 2 个小峰, 说明 $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ 离子与同一配体(BSA)结合形成配合物时, 结合反应有差异性(顺序结合), 根据表 5 的平均结合常数结果, 可以判断 Cu^{2+} 离子与 BSA 的结合能力大于 Zn^{2+} 与 BSA 的结合能力, Cu^{2+} 离子与 BSA 结合形成配合物的稳定性大于 Zn^{2+} 离子与

BSA 结合形成的配合物。表 2、表 3 及表 4 中不同体系的 Cu^{2+} -BSA/ Zn^{2+} -BSA 表观结合常数整理成表 6。

分析表 6 数据表明, 随着 Zn^{2+} 离子增多, Cu^{2+} -BSA 的表观结合常数均减小, 但在 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 体系中减小程度较在 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系中减小程度大。同样, 随着 Cu^{2+} 离子增多, Cu^{2+} -BSA 的表观结合常数也减小, 但在 $\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$ 体系中减小程度较在 $\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$ 体系中减小程度大, 由此推得 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 在 BSA 中可能存在一个共同的强结合位点, 当 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 离子与相同的配体形成配合物时, Cu^{2+} 离子的结合能力强于 Zn^{2+} 离子, 因此若这两种金属离子在 BSA 中存在一个共同的强结合部位, 即足量的 Cu^{2+} 离子存在时, 它可能逐渐取代 Zn^{2+} 离

表 6 $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 离子在 $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ 离子存在时与 BSA 结合的结果Table 6 Results of $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ions binding with BSA under the solution condition of $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ ions

System	$\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}$	$\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$	$\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$	$\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}$	$\text{Zn}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Cu}^{2+}]$	$\text{Cu}^{2+}+\text{BSA}[\text{+Zn}^{2+}]$
$\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}/\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ apparent binding constant $K_b / (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	8.23×10^4	7.86×10^4	7.17×10^4	4.91×10^4	3.76×10^4	3.37×10^4

子。一般认为, Cu^{2+} 离子在 BSA 中只有一个强结合部位, 它位于白蛋白分子中的 N-端三肽段上, 因此可以推断 BSA 分子中的 N-端三肽段为 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 离子的共同强结合部位, 该分析结果也表明 Cu^{2+} 对 Zn^{2+} 离子的结合有明显的拮抗作用, 这也说明在 BSA 中 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 离子类似, 主要是 N-原子配位^[9]。

2.4 双金属组-蛋白质竞争结合反应机制引起电泳淌度变化的其他因素

2.4.1 缓冲溶液中影响因素

在该实验中, 影响结合常数的因素包括荷/质比、运行缓冲液中所含有的化学物质、运行缓冲液的 pH 值、溶液的粘度、离子强度等。本实验首先使 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和牛血清白蛋白在同一缓冲液条件下运行; 其次使 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度低于空白缓冲液的浓度, 并使 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度在 $0\sim 10 K_b$ 范围左右^[25]。根据实验求得的 K_b 值, 计算最佳 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度范围为 $0\sim 4.01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0\sim 7.75 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而实验中 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度范围在该浓度范围内, 添加 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度对运行缓冲液的粘度、离子强度基本无变化, 引起 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ 、 $\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}$ 三元体系中 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ 、 $\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}$ 的有效淌度变化是 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 与 BSA 之间竞争结合反应的结果。

3.3.2 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ – Cu^{2+} 三元体系中金属间相互作用

在上述 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ – Cu^{2+} 三元混合体系中, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 同时存在体系中, 因 BSA 分子中的金属离子结合位点有限, 其中 Cu^{2+} 离子会降低 Zn^{2+} 离子结合, 即 Cu^{2+} 离子对 Zn^{2+} 离子的结合有明显的拮抗作用。推而广之, 当 M_1 和 M_2 金属离子配体与同一蛋白质受体结合时, 若 M_1 与该受体的结合能力大于 M_2 , 同时这两种金属离子在蛋白质受体上存在一个共同的强结合部位, 当足量的 M_1 离子存在时, 它可以逐渐取代 M_2 离子, 说明 M_1 对 M_2 离子的结合有明显的拮抗作用。

4 结 论

本文采用 ACE 法研究金属元素组 [Zn^{2+} 和 Cu^{2+}] 与血清白蛋白的竞争结合反应, 并建立金属组与蛋白质大分子发生结合反应的结合常数方程。通过

ACE 法将配合物 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ 、 $\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}$ 分离开来, 即在电泳谱图上 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ 峰、 $\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}$ 峰得以分开, 获得了配合物 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ 、 $\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}$ 的平均结合常数及 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 与蛋白质大分子的结合能力大小。 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 与 BSA 的结合能力大小不同, 且在 BSA 上的结合位点有限, 则进一步得到 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 与 BSA 的结合反应不是同步结合反应, 而是顺序结合反应, 这与理论方程建构时的合理假设符合。配合物 $\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}$ 、 $\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}$ 的平均结合常数 $K_{\text{Cu}^{2+}\text{-BSA}}=7.75\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, $K_{\text{Zn}^{2+}\text{-BSA}}=4.01\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$, 推断 Cu^{2+} 与 BSA 的结合能力比 Zn^{2+} 大。通过本文有关实验结果, 也可以推知, 若 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 结合 BSA 的能力无差别, 则结合后的组分难以用 ACE 法分离, 无法得出其结合反应性能参数等。因此当不同金属元素组与不同蛋白质分子发生结合反应时, 只要各金属离子与蛋白质大分子的结合能力存在差异, 且结合反应是顺序结合反应, 同时应用 ACE 法能将各配合物组分离, 就可以借鉴本文的方法和相应方程研究结合反应及配合物性能参数。毛细管电泳仪是一种快速、有效的分离手段, 但不能确定组分的构成, 质谱可以弥补这一欠缺, 如果将毛细管电泳仪与质谱联接起来, 理论上电泳分离后的实验组分直接进入质谱进行结构分析, 能够较准确地得出结合物的结构信息以及金属离子组 [Zn^{2+} , Cu^{2+}] 与 BSA 竞争结合的金属种类与个数, 这些需要在后续工作中作进一步的探索工作。

参考文献:

- [1] GUO Zi-Jian(郭子建), SUN Wei-Yin(孙为银). *Bioinorganic Chemistry*(生物无机化学). Beijing: Science Press, **2006**.
- [2] SUN Wei-Yin(孙为银). *Coordination Chemistry*. 2nd Ed. (配位化学, 2 版), Beijing: Chemical Industry Press, **2010**.
- [3] Lucia B, Lvano B, Fiorenza C, et al. *Biochemistry*, **2003**, **42** (32):9543-9553
- [4] Peng C, Chuan H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, **126**(3):728-729
- [5] Ueda E K M, Gout P W. *J. Chromatogr. A*, **2003**, **988**(1):1-23
- [6] Binolfi B, Rasia R M, Bertoncini C W, et al. *J. Am. Chem.*

- Soc., **2006**, **128**(30):9893-9901
- [7] Song D, Tian Y, Zhou Y, et al. *Spectrochim. Acta, Part A*, **2005**, **61**(4):629-636
- [8] Xiao J, Shi J, Cao H, et al. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, **45**(4):609-615
- [9] SHEN Xin-Can(沈星灿), BIAN He-Dong(边贺东), ZHOU Yong-Qia(周永洽), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2000**, **16**(1):73-78
- [10] CHEN Dai-Wu(陈代武), XIE Qin-Ji(谢青季), JIANG Xue-Qin(蒋雪琴), et al. *Acta Phys.-Chim. Sin.*(物理化学学报), **2008**, **24**(3):379-387
- [11] Zhang Y Z, Zhou B, Liu Y X, et al. *J. Fluoresc.*, **2008**, **18**(1): 109-118
- [12] Anwasha B, Kaushik B, Pradeep K S. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2008**, **90**(1):33-40
- [13] CHEN Nian-You(陈年友), CHENG Shui-Ming(程水明), ZHAO Sheng-Fang(赵胜芳), et al. *Chinese J. Org. Chem.*(有机化学), **2010**, **30**(11):1677-1681
- [14] Agay D, Anderson R A, Sandre C, et al. *Burns*, **2005**, **31**(3): 366-371
- [15] Watt F, Rajendran R, Ren M Q, et al. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B*, **2006**, **249**(1/2):646-652
- [16] Uirich K H. *Pharm. Rev.*, **1981**, **33**(1):17-53
- [17] LIU Yong(刘勇), XIA Zhi-Ning(夏之宁), LI Hui(李晖). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2005**, **33**(12):1733-1736
- [18] Rundlett K L, Armstrong D W. *J. Chromatogr. A*, **1996**, **721**(1):173-186
- [19] Rundlett K L, Armstrong D W. *Electrophoresis*, **2001**, **22**(7): 1419-1427
- [20] Bowser M T, Chen D D Y. *J. Phys. Chem. A*, **1999**, **103**(1): 197-202
- [21] TU Chu-Qiao(涂楚桥), SUN Hong-Lian(孙红莲), ZENG Jian-Qiang(曾建强), et al. *Guangxi Sciences*(广西科学), **1999**, **6**(4):278-280
- [22] YUAN Dong(袁东), SHEN Zhong-Lan(申中兰), ZHU Wen-Cai(朱文彩), et al. *J. Qilu Normal University*(齐鲁师范学院学报), **2011**, **26**(3):29-32
- [23] YAO Zhi(姚之). *Thesis for the Master Degree of Tianjing University*(天津大学硕士论文), **2007**.
- [24] Heegaard N H H, Nissen M H, Chen D D Y. *Electrophoresis*, **2002**, **23**(6):815-822
- [25] ZHAO Yang-Feng(赵艳芳), FU Chong-Gang(傅崇岗), LIU Ai-Lin(刘爱林). *Chinese J. Chromatogr.*(色谱), **2003**, **21**(2): 126-130