

Zn(II) 与人血清白蛋白或牛血清白蛋白的结合平衡研究*

Binding Equilibrium of Zn(II) to Human Serum Albumin and Bovine Serum Albumin

涂楚桥 孙红莲 曾建强 梁宏

Tu Chuqiao Sun Honglian Zeng Jianqiang Liang Hong

(广西师范大学化学化工系 桂林市育才路 3号 541004)

(Dept. of Chemistry and Chemical Engineering,

Guangxi Normal University, 3 Yucailu, Guilin, Guangxi, 541004, China)

摘要 用平衡透析法研究了生理条件 (pH值 7.43) 下 Zn(II) 与人血清白蛋白 (HSA) 或牛血清白蛋白 (BSA) 的相互作用。结果表明, HSA对 Zn(II) 有 1.1个强结合部位和 9.0个弱结合部位, 结合常数分别为 1.04×10^5 及 1.67×10^3 ; BSA对 Zn(II) 有 1.2个强结合部位和约 9.7个弱结合部位, 结合常数分别为 8.2×10^4 及 1.9×10^3 。Zn(II)-HSA和 Zn(II)-BSA的 Hill系数分别为 0.87 0.84, 表明 Zn(II) 与 HSA或 BSA的结合均只产生较小的负协同效应。

关键词 锌 (II) 血清白蛋白 平衡透析 协同效应

中图分类号 O 614.241; Q 512.1

Abstract The binding of Zn(II) to human serum albumin(HSA) and bovine serum albumin (BSA) at physiological (pH7.43) were studied by the method of equilibrium dialysis. The results showed that there were 1.1 strong binding sites and 9.0 weak binding sites of Zn(II) in HSA, Their stability constants were 1.04×10^5 and 1.67×10^3 , respectively. In BSA there were 1.2 strong binding sites and 9.7 weak binding sites of Zn(II). Their stability constants were 8.2×10^4 and 1.9×10^3 , respectively. The Hill coefficients which are 0.87 for Zn(II)-HSA, 0.84 for Zn(II)-BSA demonstrate that the binding of HSA and BSA with Zn(II) just produce a little negative cooperativity.

Key words zinc(II), serum albumin, equilibrium dialysis, cooperative effect

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。因此有关 Zn(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) 相互作用的研究较多。但由于采用的研究方法及实验条件不同, 所得结果如结合部位数及稳定常数等也有较大的差异^[1-4]。本文用平衡透析法研究了生理条件 (pH值 7.43) 下 Zn(II) 与 HSA或 BSA的相互作用, 通过 Scatchard 图讨论了 HSA 或 BSA 中 Zn(II) 的结合部位的类型、数目及稳定常数, 并首次运用 Hill图定量分析了 Zn(II) 与 HSA或 BSA结合所产生的协同效应。

1 实验

HSA和 BSA均为电泳纯, ZnCl₂, NaCl和 HCl 均为分析纯, 缓冲剂三羟甲基氨基甲烷 (tris) 为生化

试剂, 用前均未经进一步纯化。所有溶液都用去离子水配制, 均含 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 以保持相同的离子强度, 并用 $0.10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ tris-HCl 缓冲剂以保持 pH值 = 7.43 ± 0.02 。ZnCl₂ 溶液的浓度用 EDTA 标定, HSA和 BSA溶液用前新鲜配制, 浓度均用光度法^[5]在 Hitachi UV-3400型紫外-可见分光光度计上测定。

透析袋购自华美生物工程公司, 用前经常规处理。HSA和 BSA的浓度均为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, ZnCl₂ 溶液的浓度在 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内变化, 约取 20个值。每个点最少平行做 2次。在 $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 下透析 24 h, 达平衡后自由锌离子的浓度用 WFX-1F₂ 型原子吸收分光光度计测定。

2 结果与讨论

2.1 Zn(II) 与 HSA和 BSA的结合部位数和稳定常数

图 1为 HSA或 BSA结合 Zn(II) 的饱和曲线图。图中横坐标代表透析达平衡后自由锌离子的浓度

1999-02-01收稿。

* 国家自然科学基金、广西十百千人才基金和广西高校自然科学基金资助项目。

$[Zn^{2+}]$, 纵坐标为生成函数 r , 它通常又被称为平均结合数, 表示每个白蛋白分子结合 $Zn(II)$ 的个数, 定义为:

$r =$ 白蛋白结合的 $Zn(II)$ 的摩尔数 / 白蛋白的总摩尔数, (1)

从图 1 可看出, 在相同条件下, 与 HSA 相比, BSA 结合 $Zn(II)$ 的数量较多。

为了确定 HSA 或 BSA 结合 $Zn(II)$ 的部位数和稳定常数, 我们用 Scatchard 方法作图 (见图 2), 其数学关系为:

$$r/[Zn^{2+}] = n/K_d - r/K_d, \quad (2)$$

式中 n 为 HSA 或 BSA 结合 $Zn(II)$ 的部位数, K_d 为 HSA- $Zn(II)$ 或 BSA- $Zn(II)$ 配位物的解离常数。以 $r/[Zn^{2+}]$ 对 r 作图, 可得结合部位数和结合常数。

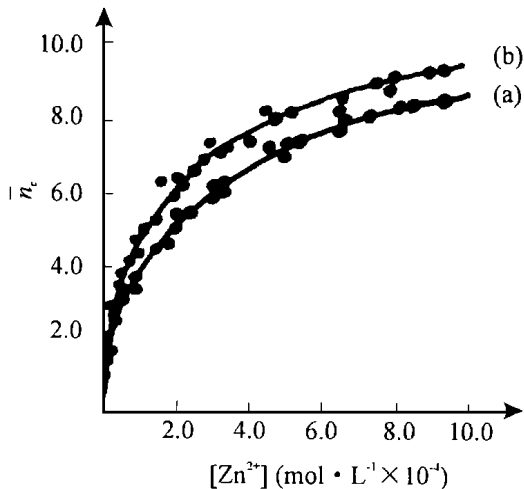


图 1 r 对 $[Zn^{2+}]$ 图

Fig. 1 The correlation of r - $[Zn^{2+}]$

(a) HSA; (b) BSA; HSA 和 BSA 的浓度均为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (a) $Zn(II)$ -HSA; (b) $Zn(II)$ -BSA; The concentration of HSA or BSA is $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

从图 2 可知, HSA 对 $Zn(II)$ 有两类结合部位, 包括 1.1 个强结合部位和 9.0 个弱结合部位, 结合常数分别为 1.0×10^5 和 1.67×10^3 ; BSA 对 $Zn(II)$ 也有两类结合部位: 1.2 个强结合部位和 9.7 个弱结合部位, 结合常数分别为 8.2×10^4 和 1.9×10^3 。

2.2 HSA 和 BSA 中 $Zn(II)$ 的配体情况分析

我们的结果表明, HSA 或 BSA 对 $Zn(II)$ 均只有 1 个强结合部位, 这个结果与诸多文献^[1-3]的结果是一致的。本文的实验条件与文献 [1-3] 相似, 但所得 $K_{HSA-Zn(II)}$ 和 $K_{BSA-Zn(II)}$ 值只与文献 [1] 中报道的稳定常数值相仿, 而与文献 [2, 3] 的结果相差较大。这可能是由于文献 [2] 对白蛋白进行了脱辅基处理, 降低了白蛋白分子的聚合程度, 使 $Zn(II)$ 更易与白蛋白结合, 因而其所得稳定常数数量级达到了 10^6 ; 而文献 [3] 除了使用脱辅蛋白外, 还使用 $Zn(II)$ -His 的螯合物代替 $ZnCl_2$, 使 Zn^{2+} 离子的水解程度降低,

并减少了 Zn^{2+} 离子与白蛋白分子中 $Zn(II)$ 的非特异结合部位结合的可能性, 从而使 $Zn(II)$ 与 HSA 或 BSA 结合的稳定常数数量级达到了 10^7 。

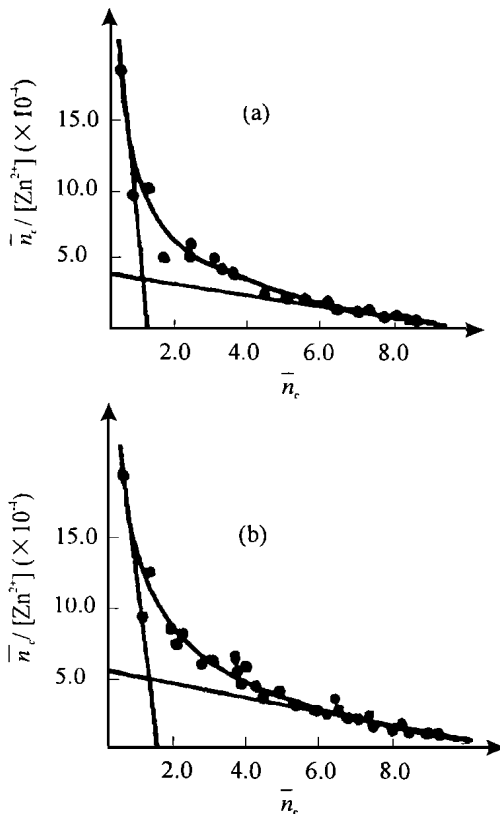


图 2 (a) HSA, (b) BSA 与 $Zn(II)$ 结合的 Scatchard 图

Fig. 2 The Scatchard plot of (a) $Zn(II)$ -HSA, (b) $Zn(II)$ -BSA

Zn^{2+} 离子虽然较小, 但静电荷却为 2, 表明它是一个较硬的强路易斯酸。在生物体系中 $Zn(II)$ 主要是与 N, O 等原子配位的^[6]。本文所得 $Zn(II)$ 血清白蛋白体系的稳定常数值较 Meyer 等^[7]的四咪唑基锌 ($ZnIm_4$) 模型化合物的稳定常数值大 1~2 个数量级, 但这并不能说明在 HSA 或 BSA 中 $Zn(II)$ 不是与 N 原子配位的, 因为在与相同原子配位时, 当金属离子处于大分子或小分子环境中, 其稳定常数值相差 2~3 个数量级是很正常的。周永洽等^[8]的荧光 EXAFS 实验表明, HSA 和 BSA 中锌离子中心的配位情况与 $ZnIm_4$ 基本是一致的, 这一结果更证实了我们 $Zn(II)$ 在 HSA 和 BSA 中的主要配位原子是氮原子的推测。文献 [9] 报道 HSA 和 BSA 分子中的咪唑基分别有 16 和 17 个, 而我们测得 HSA 和 BSA 分子中 $Zn(II)$ 的结合部位分别有 10 和 11 个。这可能是由于某些结合位包含不止一个咪唑基, 或者某些咪唑基包埋在分子内部或位阻大而不利于与 $Zn(II)$ 配位, 因而表现出结合部位数小于分子中的咪唑基数。至于 $Zn(II)$ 在白蛋白分子中的具体结合情况, 尚有

待于进一步的探讨。

2.3 Zn(II) 与 HSA或 BSA结合的协同性分析

通过 Hill图可以判断具有多个结合部位的分子中各结合部位之间的协同性^[10]。Hill方程为:

$$\log Y / (1 - Y) = h \log [Zn^{2+}] - \log K, \quad (3)$$

式(3)中 Y 称为饱和度,表示 HSA 或 BSA 被 Zn(II) 饱和的程度; $Y = n h_{\text{总}}$, n 是平均结合数,由实验得到, $n_{\text{总}}$ 是白蛋白结合 Zn(II) 的总数,根据 Scatchard 图,对 HSA,取 $n_{\text{总}} = 10$,对 BSA,取 $n_{\text{总}} = 11$ 。Hill图一般为“S”形曲线, Hill系数 h 是曲线各部分的斜率, h 是不同结合部位之间协同性的测量, h 愈高,则正协同性愈强, h_{max} 取曲线的最大斜率值,在上限 $h_{\text{max}} = n_{\text{总}}$ 。若 $h = 1$,无协同性; $h > 1$,有正协同性; $h < 1$,有负协同性。从图 3可知,对 Zn-HSA

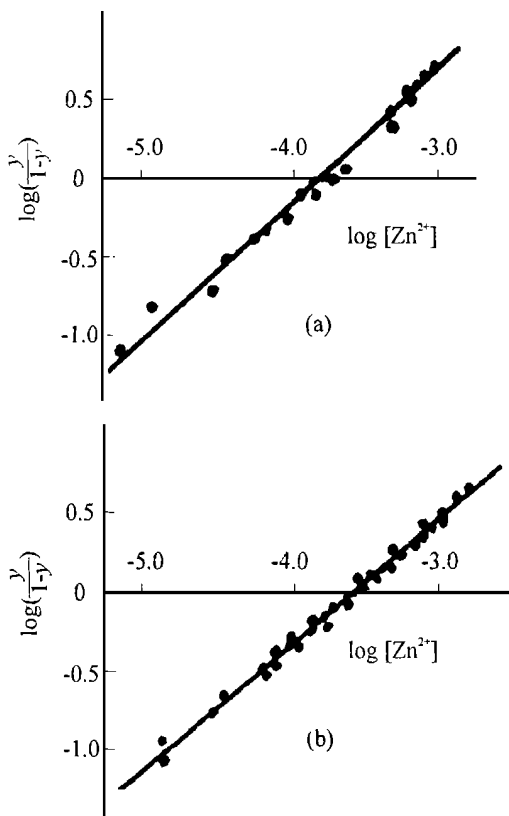


图 3 (a) HSA, (b) BSA 结合 Zn(II) 的 Hill 图

Fig. 3 The Hill plot of (a) Zn(II)-HSA, (b) Zn(II)-BSA

(II) 体系, $h_{\text{max}} = 0.87$; Zn-BSA(II) 体系, $h_{\text{max}} = 0.84$, 表明 Zn(II) 与 HSA 或 BSA 的结合均产生了较小的负协同效应。这可能是由于前面结合的 Zn(II) 使白蛋白发生了变构效应,在一定程度上阻碍了随后 Zn(II) 的结合。

参考文献

- 1 Zhou Y Q, Wang Y W, Hu X Y et al. Equilibrium dialysis of metal-serum albumin I. successive stability constants of Zn(II)-serum albumin and the Zn²⁺-induced cross-linking self-association. *Biophys Chem*, 1994, 51, 81.
- 2 Masuoka J, Hegenauer J, Van Dyke B R et al. Intrinsic stoichiometric equilibrium constants for the binding of Zinc(II) and Copper(II) to the high affinity site of serum albumin. *J Biol Chem*, 1993, 268, 21533.
- 3 Goumakos W, Laussac J-P, Sarkar B et al. Binding of cadmium(II) and zinc(II) to human and dog serum albumins. An equilibrium dialysis and ¹¹³Cd-NMR study. *Biochem Cell Biol*, 1991, 69, 809.
- 4 Rao M S N, Lal, H. Metal-protein interactions in buffer solns. Interaction of Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ ions with native and modified bovine serum albumins. *J Am Chem Soc*, 1958a, 80, 3222.
- 5 李舒婷, 查丹明, 张宏志等. Cu(II) 与 HSA 或 BSA 结合的研究. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 1998, 16, 43.
- 6 Greenwood N N, Earnshaw A. 元素化学. 下册. 王曾军, 张庆芳, 林蕴和等译校. 北京: 高等教育出版社, 1996. 444.
- 7 Meyer H W. Thermodynamic proton-, cadmium-, and zinc-binding constants of serum albumin determined by zone electrophoresis. *J Biol Chem*, 1960, 235, 3337.
- 8 周永洽, 张喜全, 贺进田等. 金属-血清白蛋白的结构研究(XIII)-HSA 和 BSA 中锌离子中心的荧光 EXAFS 研究. *高等学校化学学报*, 1997, 18, 851.
- 9 Putnam F W. The plasma protein structure, functions and genetic control. 2nd ed. New York: Academic Press, 1975.
- 10 Fersht A. 酶的结构和作用机制. 杜锦珠, 茹炳根, 卫新成译校. 北京: 北京大学出版社, 1991. 292.

(责任编辑: 蒋汉明)