

Pb²⁺ - 牛血清白蛋白复合体系中 蛋白质二级结构的研究

张 丽, 秦德志, 杨维春, 刘巧茹, 王 莉

(平顶山学院 化学化工学院, 河南 平顶山 467000)

摘 要: 采用紫外光谱、红外光谱和圆二色谱法研究了 Pb²⁺ 与牛血清白蛋白 (BSA) 之间的相互作用和蛋白质微观结构的变化。紫外光谱表明, Pb²⁺ 与 BSA 肽链上的 C = O 存在相互作用, 并使蛋白质疏水结构的微环境发生变化; 红外光谱研究表明, Pb²⁺ 与 BSA 结合位点可能为 -OH 和 -NH 基团, 利用二阶导、退卷积和谱线拟合技术对蛋白质红外谱图的酰胺 I 带进行处理推测蛋白质二级结构的变化, 结果表明蛋白质 α 螺旋和 β 折叠二级结构含量降低, β 转角二级结构含量增加; 圆二色谱 (CD) 也表明 Pb²⁺ 与 BSA 的结合使蛋白质的构象发生了改变。

关键词: Pb²⁺; 牛血清白蛋白 (BSA); 紫外光谱; 红外光谱; 圆二色谱; 蛋白质; 二级结构

中图分类号: O657.3 O629.73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2010)07-0721-05

doi 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.07.015

Study on the Secondary Structure of Protein in Solution Containing Pb²⁺ and Bovine Serum Albumin

ZHANG Li, QIN De-zhi, YANG Wei-chun, LIU Qiao-ru, WANG Li

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Pingdingshan University, Pingdingshan 467000, China)

Abstract The interaction between Pb²⁺ and bovine serum albumin (BSA) has been studied by using ultra-visible spectrum, Fourier transform infrared (FT-IR) spectrum and circular dichroism (CD) spectrum. Results from UV-Vis spectra indicated that Pb²⁺ reacted with C = O group of peptide chains of BSA and resulted in the change of micro-environment of Trp and Tyr residues hydrophobic. The spectra and data of FT-IR indicated that Pb²⁺ could interact with -OH and -NH groups. The secondary structure contents of BSA, including α -helix, β -sheet, β -turn and random coil were calculated based on the analysis of amide I band of FT-IR by second derivative, Fourier self-deconvolution (FSD) and curve-fitting method. Results showed that the contents of α -helix and β -sheet were decreased while that of β -turn was increased, whereas the content of random coil varied scarcely, which was consistent with the results obtained from CD spectra. Therefore, the reaction between Pb ions and BSA could result in the change of BSA conformation by losing its bioactivity, and finally lead to the pathological change in organism.

Key words Pb²⁺; BSA; UV-Vis; FT-IR; circular dichroism (CD); protein; secondary structure

铅在自然界中的分布极为广泛, 有着很多工业用途。随着工业化程度提高, 大气、饮用水、土壤和生物圈中均含有微量的铅及其化合物; 铅是全球范围内最具危害性的重金属元素之一, 严重影响人类的生存环境。铅在生物体内的作用机制研究得到了广泛关注, 许多研究表明, 铅离子不是生物体的必需元素, 但可与生物体内的蛋白质、酶、氨基酸和核酸等生物分子的官能团相互作用, 干扰其正常的生理功能^[1-4]。蛋白质是生物体中重要的生物大分子, 其中血清白蛋白是血液中的主要蛋白, 起输送金属离子和其它内源及外源性物质的作用^[5]。因此, 研究铅离子与蛋白质之间的相互作用对理解重金属离子的毒性机理具有非常重要的意义。

本文选用与人血清白蛋白 (HSA) 相似的牛血清白蛋白 (BSA) 与铅离子相互作用。通过考察 Pb²⁺-

收稿日期: 2010-04-12 修回日期: 2010-05-18

基金项目: 平顶山学院高层次人才基金资助项目 (2008008)

第一作者: 张 丽 (1979-), 女, 河南南阳人, 讲师, 硕士, Tel: 0375-2657615, E-mail: lizhangpl@163.com

BSA 复合体系的紫外可见光谱 (UV-Vis) 和傅立叶变换红外光谱 (FT-IR), 研究了铅离子与 BSA 官能团的结合情况。另外, 利用二阶导、傅立叶自退卷积和谱线拟合技术对蛋白质红外光谱的酰胺 I 带进行了处理, 初步得出复合体系中蛋白质二级结构的变化情况。圆二色谱 (CD) 对蛋白质构象变化非常灵敏, 通过 SELON 和 CONTN 计算程序包对反应体系的圆二色谱图进行了拟合和定量计算, 进一步确定了蛋白质微观结构的变化情况, 在分子水平上研究了铅离子与蛋白质的作用机理。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白 (国药集团), 生化试剂, 平均相对分子质量为 67 000; 三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris, 国药集团), 生化试剂, 相对分子质量为 121.14。其余试剂均为国产分析纯。UV-2550 紫外可见分光光度计 (日本 Shimadzu 公司); TENSOR-37 型傅立叶变换红外光谱仪 (德国 Bruker 公司); JASCO-J-810 型圆二色谱仪 (日本 Jasco 公司)。

1.2 实验方法与表征

配制 100 mL $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液, 平行取 6 份 10 mL 的 BSA 溶液加入到 6 个圆底烧瓶中。分别向 6 个烧瓶中加入不同浓度的 10 mL 硝酸铅溶液, 使金属离子和蛋白质的物质的量之比分别为 0.5、1、5、10、50、100。将上述混合溶液在常温下搅拌 3 h, 放置 3 d 备用, 6 个反应体系分别编号为 Sys. 1~6。实验用水均为自制二次去离子水, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 缓冲溶液控制 pH 值为 7.4。

紫外可见光谱采用相同浓度的金属离子溶液为参比, 分别测定 6 个反应体系的紫外可见光谱, 测定范围为 200~400 nm; 扫描速率为中速; 采样间隔 0.2 nm; 狭缝宽度 2 nm。

FT-IR 分析: 取少量反应溶液加入表面皿中, 在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 下干燥成膜, 并在真空干燥箱中干燥 2 d, 采用 KBr 压片测定其红外光谱。扫描范围 $4\,000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} 。对反应体系红外谱图的酰胺 I 带采用二阶导、傅立叶自退卷积和谱线拟合技术处理以推测蛋白质二级结构的变化^[6-8]。

圆二色谱的扫描范围 190~250 nm, 石英样品光程为 0.1 cm, 数据为 3 次扫描平均值。CD 谱强度以平均残基摩尔椭圆度 $[\theta]$ (单位 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) 表示, BSA 残基数为 582。采用 CD Pro 程序包 SELON 和 CONTN 处理 CD 谱数据, 计算蛋白质二级结构含量^[9]。测试前先用苯蒸汽和 d-10 樟脑硫酸进行波长和旋光度校正。

2 结果与讨论

2.1 Pb^{2+} - BSA 反应体系的 UV-Vis 光谱分析

纯 BSA 和 Pb^{2+} -BSA 反应体系 (Sys. 1~6) 的 UV-Vis 光谱见图 1。由图可见, 纯 BSA 和 6 个反应体系均有两个吸收带: 肽键在小于 250 nm 的远紫外区有较大的吸收, 主要由肽键的 $\text{C}=\text{O}$ 基团的 $n-\pi^*$ 跃迁引起, 该吸收带与蛋白质二级结构中的 α 螺旋含量有关; 277 nm 附近的吸收带为肽链上苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸残基的芳香环 $\pi-\pi^*$ 跃迁引起。

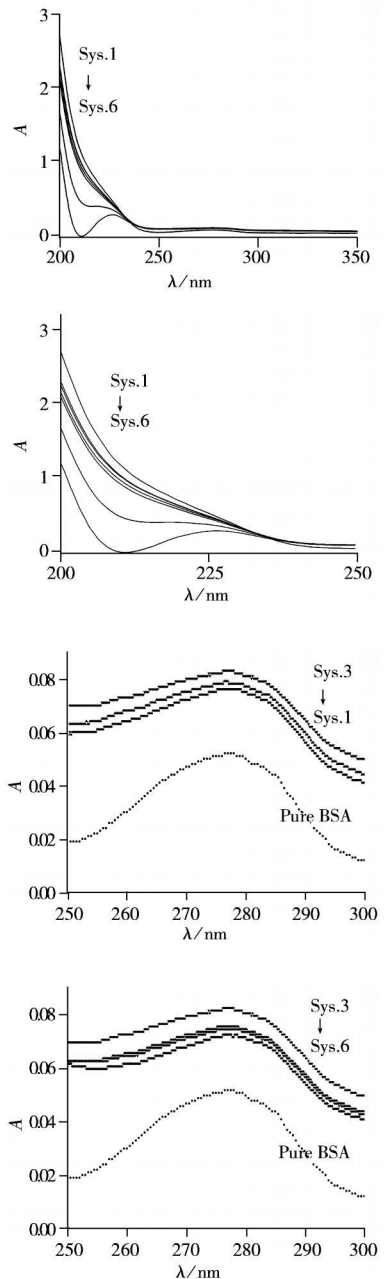


图 1 纯 BSA 和 Pb^{2+} -BSA 反应体系的紫外可见光谱图
Fig. 1 UV-Vis spectra of pure BSA and Pb^{2+} -BSA systems with various molar ratios
 $n(\text{Pb}^{2+}) : n(\text{BSA})$ (Sys. 1-6):
0.5 1 5 10 50 100

从肽键的 $C = O$ 吸收带观察(图 1B)可知: 与纯 BSA 相比, 反应体系从 Sys. 1 到 Sys. 6(Pb^{2+} 浓度逐渐增大)的吸收强度逐渐降低, 且发生红移(Sys 5 和 Sys. 6 特别明显); 可以推测蛋白质二级结构发生变化, 吸收带红移表明 α 螺旋含量降低^[10], 出现了蛋白质肽链伸展的现象。纯 BSA 和 Pb^{2+} -BSA 反应体系在 277 nm 的吸收带位置几乎没有发生变化, 但吸收强度有差异, 从纯 BSA 到 Sys. 1~3 反应体系, 峰值逐渐增大(图 1C); 而 Sys. 3~6 峰值趋向减小(图 1D)。这说明铅离子对蛋白质 3 种疏水侧基的微环境有明显影响, Sys. 1~3 体系 Pb^{2+} 使酪氨酸和色氨酸残基的芳香环疏水基团裸露, 吸收峰增强; Sys. 3~6 体系 Pb^{2+} 又使蛋白质的疏水基团包埋, 吸收峰减弱。这些现象显示出临界效应, 铅离子的临界浓度约为 $2.5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 Pb^{2+} -BSA 反应体系的红外光谱分析

Pb^{2+} -BSA 反应体系的红外光谱见图 2 纯 BSA 及 Sys. 1~6 主要吸收带的频率数据列于表 1。在纯 BSA 的红外光谱图中, 3 422、3 075、1 653、1 541 cm^{-1} 的吸收带分别归属为 $-OH$ 伸缩振动、酰胺 A'、酰胺 I 带和酰胺 II 带^[11]。与纯 BSA 相比, Sys. 1~6 的羟基吸收峰分别向高波数移动了 -1、13、14、12、24、26 cm^{-1} , 酰胺 A' 吸收峰向低波数移动了 3、5、5、10、8、19 cm^{-1} , 可以推测 Pb^{2+} 与 BSA 的 $-OH$ 和 $-NH$ 官能团存在相互作用, 且随着 Pb^{2+} 浓度逐渐增大, 这种作用逐渐增强。

蛋白质在红外区有明显的特征吸收带, 其中酰胺 I 带和 II 带为强吸收带, 酰胺 III 带为弱吸收带, 这些吸收带与蛋白质二级结构的含量存在密切关系。许多研究表明^[6-8], 傅立叶变换红外光谱实验技术是研究蛋白质二级结构变化的有力手段。蛋白质的酰胺 I 带被认为是 $C = O$ 伸缩振动、 $N-H$ 弯曲振动和 $C-N$ 伸缩振动的偶合, 酰胺 II 带为 $N-H$ 弯曲振动及 $C-N$ 伸缩振动的偶合。与纯蛋白质相比, Pb^{2+} -BSA 反应体系的酰胺 I 带和酰胺 II 带吸收峰位置没有发生明显变化, 本文主要采用二阶导、去卷积和谱线拟合技术对纯 BSA 和反应体系红外光谱的酰胺 I 带进行处理, 推测蛋白质二级结构的变化。具体方法为: 对差减后红外图谱(1 800~2 200 cm^{-1} 为一条直线)的酰胺 I 带进行平滑、基线校正、傅立叶自退卷积和二阶导, 确定子峰位置和峰宽, 进行曲线拟合实现分峰, 再对各子峰的面积进行积分。其中 1 646~1 661 cm^{-1} 为 α 螺旋; 1 615~1 637 cm^{-1} 和 1 682~1 698 cm^{-1} 为 β 折叠; 1 661~1 681 cm^{-1} 为 β 转角; 1 637~1 645 cm^{-1} 为无规卷曲结构^[12]。对各子峰积分面积叠加即得蛋白质 4 种二级结构的含量^[13-15], 计算结果列于表 2。结果表明, 与纯 BSA 相比, Pb^{2+} -BSA 反应体系的 α 螺旋结构由 48.3% 逐渐降

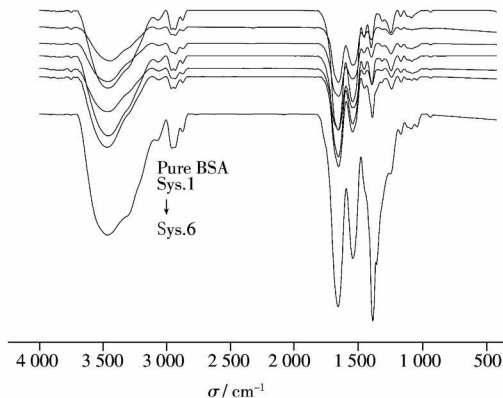


图 2 纯 BSA 和 Pb^{2+} -BSA 反应体系的红外光谱图
Fig 2 Infrared spectra of pure BSA and Pb^{2+} -BSA systems with various mole ratios
 $n(Pb^{2+}) : n(BSA)$ (Sys 1-6): 0.5, 1, 5, 10, 50, 100

表 1 纯 BSA 与 Pb^{2+} -BSA 反应体系的红外频率分布
Table 1 IR peaks of BSA and Pb^{2+} -BSA systems

System	$-OH$	Amide A'	Amide I	Amide II
	σ / cm^{-1}	σ / cm^{-1}	σ / cm^{-1}	σ / cm^{-1}
Pure BSA	3 422	3 075	1 653	1 541
Sys 1	3 421	3 072	1 653	1 542
Sys 2	3 435	3 070	1 654	1 541
Sys 3	3 436	3 070	1 653	1 541
Sys 4	3 434	3 065	1 654	1 541
Sys 5	3 446	3 067	1 653	1 541
Sys 6	3 448	3 056	1 654	1 541

表 2 纯 BSA 和 Pb^{2+} -BSA 反应体系中蛋白质二级结构的含量
Table 2 Percentage of the secondary structures of pure BSA and Pb^{2+} -BSA systems

System	α -Helix (%)	β -Sheet (%)	β -Turn (%)	Random (%)
Pure BSA	48.3 (51.2)	14.6 (13.9)	19.8 (17.3)	17.3 (17.6)
Sys 1	46.7	14.4	22.3	16.6
Sys 2	46.1 (47.9)	14.6 (12.8)	22.5 (22.1)	16.8 (17.2)
Sys 3	41.7	14.5	26.7	17.1
Sys 4	41.0 (44.3)	13.8 (12.1)	27.9 (27.0)	17.3 (16.6)
Sys 5	38.9	13.8	30.4	16.9
Sys 6	40.2	11.7	31.3	16.8

* the data in brackets were obtained from CD spectra

至 40.2%， β 折叠结构由 14.6% 逐渐降至 11.7%， β 转角结构由 19.8% 逐渐增至 31.3%，这 3 种蛋白质二级结构含量变化较大；无规卷曲含量基本不变。部分 α 螺旋和 β 折叠结构转化为 β 转角结构，并随着铅离子浓度增大，这种趋势亦有增强。铅离子导致蛋白质的微观结构发生变化，为其在生物体内的毒性机理研究提供了理论依据。

2.3 Pb^{2+} -BSA 反应体系的 CD 分析

圆二色谱是研究浓度较小的蛋白质及酶溶液中分子构象的一种快速、简单、准确的方法。蛋白质、多肽和酶不同的二级结构产生的圆二色谱谱带位置和强度不同，例如， α 螺旋结构在靠近 192 nm 有一正的谱带，208 和 222 nm 处有负的特征肩峰； β 折叠结构的 CD 谱在 216 nm 会出现 1 个负吸收带，185~200 nm 有正的谱带； β 转角结构在 206 nm 附近有正的 CD 谱^[16]。因此，蛋白质的圆二色谱谱图可以反映蛋白质微观结构的变化。进一步采用 SELCON 和 CONTIN 计算拟合方法对 190~250 nm 的 CD 谱进行处理，定量计算蛋白质二级结构的含量。纯 BSA 和 Pb^{2+} -BSA 反应体系的 CD 图和拟合计算结果分别见图 3 和表 2。从图中可以看出，BSA 与铅离子结合后，192 nm 的正吸收峰明显下降，而 208 nm 和 222 nm 的负峰上升，断定蛋白质中 α 螺旋二级结构的含量下降。表 2 中的数据也显示，Sys. 2 和 Sys. 4 的 α 螺旋含量分别降低了 3.3% 和 6.9%； β 折叠含量分别降低了 1.1% 和 1.8%； β 转角结构含量则增加了 4.8% 和 9.7%；与红外数据基本吻合。

铅离子与 BSA 作用后，蛋白质二级结构中 α 螺旋含量降幅最多，认为铅离子与 α 螺旋作用后，氢键被破坏导致肽链趋于松散而重组形成 β 折叠结构。从紫外可见图谱分析来看，二级结构的改变会导致蛋白质疏水腔中氨基酸残基的微环境发生变化，该结论已通过荧光猝灭的方法得到较多的研究^[17-18]。

3 结 论

根据紫外光谱 (UV)、红外光谱 (IR) 和圆二色谱 (CD) 对 Pb^{2+} -BSA 复合体系的测试，得到了铅离子与蛋白质的作用方式，结合位点及受影响的官能团，得出以下结论： Pb^{2+} 与 BSA 之间的结合位点可能包括 C=O、-OH 和 -NH 等基团，并扰动 BSA 芳香族氨基酸残基所处的微环境，引起三级结构的变化；红外光谱酰胺 I 带曲线拟合和 CD 图谱的解析表明 Pb^{2+} 使 BSA 的 4 种二级结构含量发生变化，主要是 α 螺旋和 β 折叠结构转变为 β 转角结构，构象的改变会抑制蛋白质的活性。本文从分子水平上研究了铅离子与蛋白质之间的化学作用，并揭示了其毒性的深层次原因，有助于了解重金属离子和生物大分子作用机理及其生理生化和毒性效应。

参考文献:

- [1] 魏欣, 茹炳根. 二价铅离子与金属硫蛋白相互作用的研究 [J]. 中国生物化学与分子生物学学报, 1999, 15(2): 289-295.
- [2] 陆宝仪, 李红. Pb^{2+} 与 $Co(phen)_3^{3+}$ 及 DNA 间的相互作用及其分析测定的研究 [J]. 分析测试学报, 2006, 25(1): 94-97.
- [3] 洪法水, 王雪峰, 苏国兴, 潘新法, 沈颂东. 重金属离子对牛胰核糖核酸酶的作用机理 [J]. 光谱学与光谱分析, 2002, 22(4): 651-654.
- [4] 洪法水, 王雪峰, 吴康, 沈颂东, 苏国兴, 潘新法. 重金属离子对猪胰 α -淀粉酶活性影响的作用机理研究 [J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(12): 1979-1983.
- [5] GELAMO E L, SILVA C, MASATO H, TABAK M. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumin with ionic surfactants: spectroscopy and modeling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1594(1): 84-99.
- [6] 谢孟峡, 刘媛. 红外光谱酰胺 III 带用于蛋白质二级结构的测定研究 [J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 226-231.
- [7] 童义平, 李伟, 林燕文, 傅立叶红外光谱研究血清白蛋白构象 [J]. 光谱学与光谱分析, 1999, 19(5): 704-706.

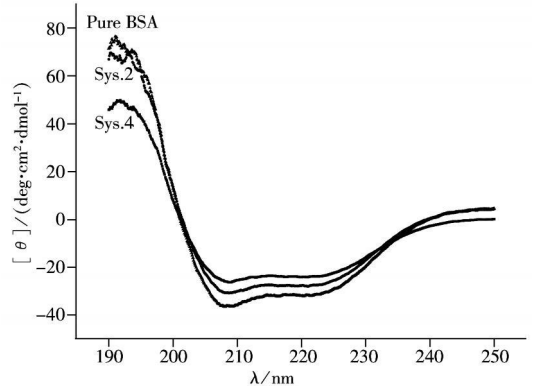


图 3 纯 BSA 和 Pb^{2+} -BSA 反应体系的圆二色谱图
Fig. 3 CD spectra of pure BSA and Pb^{2+} -BSA systems

- [8] 邢本刚, 梁宏. FT-IR 在蛋白质二级结构研究中的应用进展 [J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 1997, 15 (3): 45-49
- [9] 沈星灿, 梁宏, 何锡文, 王新省. 圆二色谱分析蛋白质构象的方法及研究进展 [J]. 分析化学, 2004, 32 (3): 388-394
- [10] SHAH ID F, GOMEZ J E, BRNBAUM E R. The lanthanide induced N - F transition and acid expansion of serum albumin [J]. J Biol Chem, 1982, 257 (10): 5618-5622
- [11] JACKSON M, HARRIS P, CHAFMAN D. Fourier transform infrared spectroscopic studies of calcium-binding proteins [J]. Biochemistry, 1991, 30 (40): 9681-9687
- [12] SABA R I, RUYSSCHAERT J M, HERCHUCLZ A, GOORMAGHTIGH E. Fourier transform infrared spectroscopy study of the secondary and tertiary structure of the reconstituted Na^+ / Ca^{2+} exchanger 70-kDa polypeptide [J]. J Biol Chem, 1999, 274 (22): 15510-15518
- [13] SUREWICZ W K, MANTSCH H H. New insight into protein secondary structure from resolution-exchanged infrared spectra [J]. Biochim Biophys Acta, 1988, 952 (2): 115-130
- [14] BYLER D M, SUSU H. Examination of the secondary structure of protein by deconvolved FTIR spectra [J]. Biopolymers, 1986, 25 (3): 469-487
- [15] YANG P W, MANTSCH H H, ARRONDO J L, SAINT-GIRONS I, GUILLOU Y, COHEN G N, BARZU O. Fourier transform infrared investigation of the escherichia coli melibionine aporepressor [J]. Biochemistry, 1987, 26 (10): 2706-2711
- [16] BRAHMS S, BRAHM J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism [J]. J Mol Biol, 1980, 138 (2): 149-178
- [17] 周秋红, 王彦卿, 张红梅, 张根成, 费正皓, 刘总堂. 吡虫啉与牛血红蛋白相互作用的光谱研究 [J]. 分析测试学报, 2007, 26 (3): 368-372
- [18] 董念, 曹淑红, 陈晓青, 蒋新宇. 不同取代羟基黄酮类化合物与血清白蛋白的相互作用分析 [J]. 分析测试学报, 2009, 28 (1): 49-54

(上接第 720 页)

- [10] GRABAR K C, FREEMAN R G, HOMMER M B, NARAN M J. Preparation and characterization of Au colloid monolayers [J]. Anal Chem, 1995, 67 (4): 735-743
- [11] 张英, 袁若, 柴雅琴, 卓颖, 傅英姿. 纳米金修饰玻碳电极测定对苯二酚 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2006, 31 (1): 86-90
- [12] 曲祥金, 张波, 艾仕云, 李金焕, 朱鲁生. 纳米金/丝素复合膜修饰电极制备及对对苯二酚的电催化作用 [J]. 分析化学, 2007, 35 (3): 386-389
- [13] 郑瑜, 林祥钦. 基于胆碱修饰层为基底的纳米金固定过氧化物酶修饰电极的研究 [J]. 分析化学, 2008, 36 (3): 604-608
- [14] 郑华, 胡劲波, 李启隆. 柔红霉素修饰的纳米金电极的制备及其对 DNA 检测 [J]. 化学学报, 2006, 64 (8): 806-810
- [15] 赵英曲, 罗红群, 李念兵. 对巯基苯硼酸/纳米金修饰玻碳电极用于葡萄糖的识别 [J]. 分析测试学报, 2009, 28 (3): 301-305
- [16] 周忠亮, 郭秀锐, 鲁理平, 康天放, 程水源, 李珊曼. DNA-纳米金修饰玻碳电极用于水中甲醛的测定 [J]. 分析测试学报, 2009, 28 (6): 697-700
- [17] MOREMANS M, DANEELS G, DEMEY J. Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes [J]. Anal Biochem, 1985, 145 (2): 315-321