



尿素诱导牛血红蛋白变性的微量热和平衡 渗析研究

李向荣^{①②}, 陈得军^①, 杨海艳^①, 卢雁^{①*}

① 河南师范大学化学与环境科学学院, 新乡 453007

② 新乡医学院基础医学院化学教研室, 新乡 453003

*通讯作者: E-mail: yanlu2001@sohu.com

收稿日期: 2010-04-28; 接受日期: 2010-06-17

摘要 应用恒温微量热技术和平衡渗析技术, 对尿素与牛血红蛋白在 30 °C 水溶液中的结合作用及造成牛血红蛋白变性的过程进行了研究, 得到了尿素在牛血红蛋白上的平均结合数、二者之间的结合焓及每摩尔尿素与牛血红蛋白结合的焓效应, 并根据简单结合模型, 计算了它们之间的结合常数、结合自由能. 对实验结果的热力学分析表明, 尿素是通过直接和间接的两种作用造成牛血红蛋白变性的, 它们之间的相互作用分为三个阶段: 尿素浓度达到 4 mol L⁻¹ 之前为第一阶段, 主要产生的是尿素与牛血红蛋白的直接结合作用, 在弱酸性条件下这种作用较强; 尿素浓度为 4 mol L⁻¹ 到 6 mol L⁻¹ 之间为第二阶段, 主要通过尿素与溶剂水的作用造成牛血红蛋白周围水结构的变化, 在尿素浓度达到 6 mol L⁻¹ 时两种作用的叠加造成牛血红蛋白结构的破坏, 暴露出原来处于结构内部的基团; 尿素浓度超过 6 mol L⁻¹ 之后为第三阶段, 尿素分子继续与暴露出来的基团进行结合. 牛血红蛋白次级结构的维系具有协作性, 其结构的破坏不是渐进的, 而是一次性全部打开, 结构破坏产生的热效应并不太大.

关键词

牛血红蛋白
恒温微量热
平衡渗析
尿素
变性

1 引言

在生物体中, 蛋白质是极为重要的生命物质, 在生命的运动和发展中起着关键作用. 蛋白质的生理功能是与它的结构(包括二级结构、三级结构、四级结构等)密切相关的. 只有当蛋白质处于自然折叠状态时, 它们才具有生物活性, 而受某种因素或者相互作用的影响, 使它们自然折叠结构遭到破坏, 它们的生理活性就要改变或者丧失, 这就是蛋白质的变性. 1931年, 我国著名生物化学家吴宪教授就提出了蛋白质变性的理论^[1]. 20世纪60年代, 一些学者开展了尿素和盐酸胍作为变性剂对蛋白质造成变性的机理研究^[2], 但到目前为止这仍是一个具有争议的问题.

主要有以下三种观点: (1) 盐酸胍和尿素分子直接与蛋白质的官能团结合; (2) 通过改变水的结构从而间接引起蛋白质疏水基团周围水的氢键结构变化; (3) 以上两种因素同时起作用. Watlauffer等^[2]通过实验研究认为应该排除第一种机理的可能性, 而 Vanzi等^[3]利用随机网络模型 RNM (Random Network Model) 对变性机理进行了模拟, 并对与水合作用相关的热容值进行了计算, 认为第二种机理不足以造成蛋白质的变性, Zou等^[4]在 25 °C 用量热法研究尿素诱导蛋白质变性时, 认为可能是第三种机理.

利用热力学方法, 进行蛋白质体系的研究, 是十分有效的. 微量热技术所得的热效应只与体系的始终态有关, 所以对研究像蛋白质这样的复杂体系有

独特的优势^[5]. 平衡渗析法可以直接测得小分子在蛋白质上的结合数, 并可得到结合位点数、结合平衡常数、作用力情况等^[6-8].

血红蛋白是动物体内最重要的蛋白质之一, 具有运输 O₂ 和 CO₂、调节血液 pH 的功能^[9], 许多的临床疾病(如: 白血病、贫血病、心脏病等)均与血红蛋白有密切的关系^[10]. 从结构上看, 血红蛋白是由两个相同的 α 亚基和两个相同的 β 亚基组成的四聚体, 其亚基结构为 $\alpha_2\beta_2$, 每一个亚基均含有一个亚铁血红素辅基^[11]. α 链由 141 个氨基酸组成, β 链由 146 个氨基酸组成, 在血红蛋白分子上有 4 个结合氧分子的位置^[12]. 牛血红蛋白 90% 的氨基酸序列与人血红蛋白相同, 但与人血红蛋白相比, 牛血红蛋白因为结合氧气分子时放热少, 较低的温度下就可以释放氧气, 因此是更好的氧气输送工具^[13]. 作为能可逆的输送和储存氧气的重要功能蛋白, 牛血红蛋白结合其他分子后其结构和功能的变化, 已经成为目前研究的焦点^[12, 14-16]. 鉴于蛋白质变性的重要性和目前对其机理的争议, 我们拟采用微量热和平衡渗析技术, 对尿素造成牛血红蛋白变性的过程及机理开展研究.

2 实验部分

2.1 试剂和仪器

牛血红蛋白 (BHb) 购于美国 Sigma 公司, 分子量为 64500. 尿素 (CH₄N₂O) 购于天津科密欧化学试剂开发中心, 为分析纯. 其他试剂均为分析纯. 所用的主要仪器为: 微量量热计 (C-80 型, 法国 SETARAM 公司生产); 密度计 (DMA60/602 型, 奥地利 Anton Parr 公司生产); 精密酸度计 (PHS-2C 型, 上海大普仪器有限公司生产); 自制平衡渗析仪^[17, 18].

2.2 实验研究

2.2.1 量热实验

分别用邻苯二甲酸氢钾-氢氧化钠、磷酸二氢钾-磷酸氢二钠、硼酸-氢氧化钠三种缓冲溶液作为溶剂配制尿素溶液, 其浓度 $C_{U,0}$ 从 1.0 到 8.0 mol L⁻¹. 以 0.1 mol L⁻¹ 的盐酸或氢氧化钠溶液, 将尿素溶液的 pH 调制为 5.21、6.70 和 8.03 三种系列, 并利用密度计测定各个尿素溶液的密度 $\rho_{U,0}$. 利用相同的缓冲溶液作为溶剂, 配制浓度为 $C_B = 1.10 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ 的牛

血红蛋白溶液, 并测定其密度. 由于牛血红蛋白溶液容易变质, 放置时间不宜过长, 因此在实验中随配随用.

分别取 0.5 mL 牛血红蛋白溶液和 5 mL 尿素溶液, 置于 C-80 微量量热计(最低热功率测量指标为 1 μ W)反转混合池的两个池内, 并准确称量各自的质量. 将装好样品的反转池置于设定为 30 °C 的量热计内, 待热平衡后测定它们的混合焓. 此混合焓包含有牛血红蛋白与尿素的结合焓、牛血红蛋白溶液的稀释焓和尿素溶液的稀释焓. 我们用相同的方式和溶液用量, 测定尿素溶液与作为溶剂的缓冲溶液的稀释焓, 将其从混合焓中减去, 而牛血红蛋白与缓冲溶液的稀释焓经测定是很小的, 可以忽略. 由此我们得到牛血红蛋白与尿素的结合焓. 在进行实验测定之前, 利用量热计所配的 EJ₂ 焦耳效应池对 C-80 量热计进行校正, 所测热效应的偏差为 $\pm 0.5\%$ ^[19].

2.2.2 平衡渗析实验

三种 pH 值尿素溶液的制备与量热实验一致. 并制作出各种尿素浓度对密度的标准工作曲线. 利用所配制的尿素溶液作为溶剂配制牛血红蛋白溶液, 其浓度为 $C_B = 1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, 在 30 °C 恒温水浴中放置 2 h 后测定其密度 ρ_B .

分别将牛血红蛋白溶液和尿素溶液注入渗析装置的池 1 和池 2 内, 并称量它们各自的质量 m_B 和 m_U , 然后在连接渗透压平衡装置后, 将渗析装置固定在 30 ± 0.2 °C 的恒温水浴中. 随着渗透压的变化不断调节平衡装置, 直到渗透压不再变化后一个小时, 迅速将渗析装置取出并抽出池 2 内的尿素溶液, 测定其密度, 通过标准工作曲线得到渗析平衡后的尿素浓度 C_U .

3 结果与讨论

由实验所得到的每摩尔牛血红蛋白与尿素的结合焓, 如表 1 所示.

从理论上分析, 在尿素溶液较稀而未造成蛋白质结构变化时, 此焓效应就是尿素与蛋白质的结合焓, 而当尿素浓度较大造成蛋白质结构变化(即蛋白质变性)时, 则此焓效应中还包括蛋白质结构变化的热效应. 由于蛋白质本身是复杂的, 它与尿素间的结合作用也是复杂的. 为了简化起见, 对此结合作用我们采用简单结合模型, 即认为蛋白质的每个结合位

表1 牛血红蛋白与尿素的结合焓 ΔH_m (kJ mol⁻¹)

c (mol L ⁻¹)	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
ΔH_m (pH 5.21)	-121	-215	-288	-450	-622	-685	-867	-1085
ΔH_m (pH 6.70)	-129	-222	-321	-392	-480	-497	-660	-914
ΔH_m (pH 8.03)	-110	-199	-281	-340	-415	-493	-666	-905

点只能结合一个尿素分子, 它们对尿素的结合是相互独立的, 结合的强度也是一样的. 令蛋白质的结合位点为 A, 尿素分子为 U, 则结合的反应为:



此结合反应的平衡常数为:

$$K_A = \frac{C_{AU}}{C_A C_U} \quad (2)$$

式中 C_{AU} 和 C_A 为单位体积内蛋白质已结合和未结合尿素分子的结合位点的数目, 相当于浓度的概念. C_U 为尿素分子的浓度. 令 ΔH_m 为每摩尔蛋白质与尿素产生的结合焓, ΔH_A 为每摩尔结合位点与尿素的结合焓, n 为蛋白质分子具有的对尿素分子的结合位点数, 则它们之间的关系为:

$$\Delta H_m = n\Delta H_A \times K_A \frac{C_U}{1 + K_A C_U} \quad (3)$$

此式可转化为下式:

$$\frac{\Delta H_m}{C_U} = n\Delta H_A K_A - K_A \Delta H_m \quad (4)$$

因此, 可将实验得到的 $\Delta H_m / C_U$ 对 ΔH_m 作图, 从所得线性关系得到 K_A 和 $n\Delta H_A$. 这里 C_U 应该是尿素的实际浓度, 如果用初始浓度来代替则会出现一些误差, 但考虑到所配制的尿素浓度比牛血红蛋白的浓度大的多, 同时利用简单结合模型本身也有误差, 作为粗略的计算, 我们以尿素的初始浓度近似代替其实际浓度. 根据热力学关系, 蛋白质的结合位点与尿素的摩尔结合自由能为:

$$\Delta G_{m,A}^\circ = -RT \ln K_A \quad (5)$$

我们把尿素浓度较小时的结合焓按照 4 式作图, 从所得直线的斜率和截距得到牛血红蛋白的结合位点与尿素结合的 K_A 和 $n\Delta H_A$, 再由 5 式算得二者的摩尔结合自由能 $\Delta G_{m,A}^\circ$, 这些数据如表 2 所示.

虽然表 2 中的数据是粗略计算所得出的, 与实际情况可能有差别, 但我们仍能据此得出一些有意义

表2 牛血红蛋白和尿素结合的 $n\Delta H_A$ 、 K_A 和 $\Delta G_{m,A}^\circ$

	$n\Delta H_A$ (kJ mol ⁻¹)	K_A	$\Delta G_{m,A}^\circ$ (kJ mol ⁻¹)
pH 5.21	-1059	0.127	5.19
pH 6.70	-1498	0.091	6.04
pH 8.03	-1300	0.091	6.03

的结论. 由表 2 数据可知, 在 pH 6.70 和 pH 8.03 条件下牛血红蛋白与尿素结合的热力学数据差不多, 与这两个 pH 的 K_A 值相比, pH 5.21 时的 K_A 最大, 说明在弱酸性条件下它们易于结合. 同时看到不同 pH 下的 $n\Delta H_A$ 数值不同, 说明牛血红蛋白的结合位点与尿素分子的结合焓受溶液 pH 值的影响. 而三种 pH 下的 $\Delta G_{m,A}^\circ$ 均为正值仅说明在标准条件下, 结合不能自发进行. 我们的实验是在尿素浓度很大, 而蛋白质浓度很小的条件下进行的, 此时的结合是自发的.

把表 1 中牛血红蛋白与尿素结合的热焓对尿素的浓度作图, 得到图 1. 从图 1 可以看出在三种 pH 下, 牛血红蛋白与尿素结合产生的焓效应随尿素浓度的变化关系呈现三个阶段, 这和牛血清蛋白与尿素及盐酸胍的量热实验结果是一致的^[20, 21]. 如果仍像以前一样单独分析量热实验的结果, 我们会得出如下的结论. 尿素浓度在 4 mol L⁻¹ 以下为第一阶段, 此阶段牛血红蛋白的结构还未发生变化, 是以自然态存在. 尿素浓度在 4 到 6 mol L⁻¹ 之间为第二阶段, 此阶段牛血红蛋白结构受到尿素分子的强烈作用发生松动并逐渐打开, 而此阶段热效应的平台期是由于蛋白质结构打开的吸热效应抵消了尿素分子结合的放热效应所致. 尿素浓度在 6 mol L⁻¹ 以上为第三阶段, 此阶段牛血红蛋白的结构已完全打开, 是以变状态存在. 把从第一和第三阶段数据向中间线性外推到变性中点(对于此体系是尿素浓度为 5 mol L⁻¹) 时的热效应之差认为是蛋白质的变性焓, 得出的变性焓有较大的数值^[20, 21]. 仅从量热实验得到这样的结论是正常的, 但由于实验单一, 可能得出片面的结果.

为了更全面地开展研究, 我们同时进行了平衡渗析的实验, 对尿素分子的结合数进行求取, 从更多

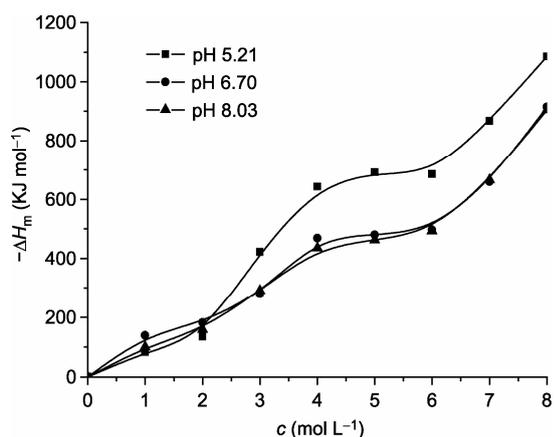


图1 牛血红蛋白与尿素的结合焓随尿素浓度的变化关系

的角度去分析牛血红蛋白的变性机理. 在平衡透析的实验中, 平衡前后尿素浓度的变化是由于尿素与蛋白质的结合所造成的. 根据实验的设计, 尿素在蛋白分子上的平均结合数 ν 可由下式计算:

$$\nu = \frac{(C_{U,0} - C_U) \times (m_B / \rho_B + m_U / \rho_{U,0})}{(m_B / \rho_B) \times C_B} \quad (6)$$

式中 $C_{U,0}$ 为尿素溶液的初始浓度, C_U 为透析平衡后尿素溶液的浓度, m_B 为牛血红蛋白溶液的质量, ρ_B 为牛血红蛋白溶液的密度, m_U 为尿素溶液的质量, $\rho_{U,0}$ 为尿素溶液的密度, C_B 为牛血红蛋白溶液的浓度.

表3给出根据实验数据得到的三种pH值下不同 C_U 时的 ν 值, ν 的值随 C_U 的增大而变大, 这可由平衡关系的质量作用定律来解释. 把表3中尿素的平均结合数对尿素的浓度作图, 得到图2. 从图2我们可以看出, 牛血红蛋白与尿素的平均结合数随尿素浓度的变化关系和图1中焓效应与尿素浓度的关系是非常相似的, 也明显呈现三个阶段. 当尿素浓度从 4 mol L^{-1}

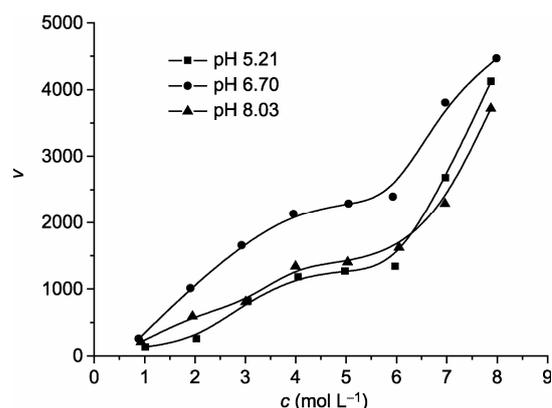


图2 牛血红蛋白与尿素的平均结合数随尿素浓度的变化关系

增加到 6 mol L^{-1} , 尿素分子的结合数仅有很少量的增加, 这应该是尿素浓度增加导致结合平衡移动的结果, 而不是结合位点数增加的结果, 这表明蛋白质的次级结构还没有被打开. 而当尿素浓度大于 6 mol L^{-1} 后, 尿素分子的结合数明显增加, 说明蛋白质结构已经打开, 暴露出更多的结合位点. 由于尿素浓度在 6 mol L^{-1} 以后, 其结合数随其浓度的变化斜率非常大, 并且没有梯次变化的现象, 这很可能表明蛋白质的次级结构是一次性打开的. 如果蛋白质结构是逐渐打开的, 尿素的结合数与其浓度的变化斜率应该较小, 且随蛋白质结构的每次打开而出现梯次变化现象. 蛋白质次级结构的一次性打开说明牛血红蛋白次级结构的维系具有协作性, 一旦有部分结构解体, 其他结构也就随之解体了.

如果把表1中的 ΔH_m 除以 ν , 就得到每摩尔结合位点与尿素的结合焓 ΔH_A , 也可以说是每摩尔尿素与蛋白质的结合焓, 其数值也给出在表3中. 从表3可以看到, 当尿素浓度低时, 结合数较少, 而 ΔH_A 的

表3 牛血红蛋白和尿素结合的平均结合数 ν 和每摩尔尿素与蛋白质的结合焓 ΔH_A

pH 5.21			pH 6.70			pH 8.03		
$C_{\text{urea}} (\text{mol L}^{-1})$	ν	$\Delta H_A (\text{kJ mol}^{-1})$	$C_{\text{urea}} (\text{mol L}^{-1})$	ν	$\Delta H_A (\text{kJ mol}^{-1})$	$C_{\text{urea}} (\text{mol L}^{-1})$	ν	$\Delta H_A (\text{kJ mol}^{-1})$
1.0198	133	-0.9098	0.8911	255	-0.5059	0.9381	208	-0.5288
2.0397	255	-0.8431	1.9418	1013	-0.2191	1.9708	590	-0.3373
3.0814	819	-0.3516	2.9838	1655	-0.1939	3.0348	806	-0.3486
4.0893	1180	-0.3814	4.0252	2133	-0.1838	4.0395	1340	-0.2537
5.0227	1265	-0.4917	5.1204	2286	-0.2099	5.0756	1404	-0.2956
6.0157	1340	-0.5112	6.0042	2392	-0.2078	6.1082	1622	-0.3039
7.0673	2679	-0.3236	7.0944	3803	-0.1735	7.0360	2287	-0.2912
8.0039	4122	-0.2632	8.1303	4469	-0.2045	8.0000	3716	-0.2435

绝对值却有较大的数值,随着尿素浓度的增加,结合数逐渐变大,而 ΔH_A 的绝对值逐渐变小,从表3中还可以看出,尿素浓度从 3 mol L^{-1} 到 8 mol L^{-1} 之间, ΔH_A 是近似恒定的.这实际反映出在结合数少时,尿素与极性较强的结合位点结合,以后结合的尿素分子则主要以疏水相互作用与蛋白质结合^[22].同时还反映出蛋白质次级结构打开的热效应相对于尿素与蛋白质结合的热效应是很小的,否则就会造成 ΔH_A 的变化.这是因为两个原因,其一是维系蛋白质次级结构的主要是氢键、配位键和其他一些弱相互作用,在结构打开时这些键遭到破坏所产生的热效应并不十分大;其二是马上就会有溶剂水分子与断键部位产生相互作用,两个过程的热效应是相互抵消的.从表3还可以看到,在pH 5.21时 ΔH_A 具有较大的负值,这说明在弱酸性条件下尿素与牛血红蛋白结合的程度更大,这与前面得出的在此酸度下二者结合的平衡常数具有最大值是一致的.

我们的实验结果证实了在引言中所提到的尿素诱导蛋白质变性的第三种机理,即尿素造成蛋白质变性的原因是由直接作用和间接作用两部分组成的.在尿素浓度达到 4 mol L^{-1} 之前,尿素主要是直接与牛血红蛋白的表面进行结合.而在尿素浓度达到 4 mol L^{-1} 之后,其结合数不再增加,主要通过溶剂水的作用间接造成蛋白质疏水基团周围水的氢键结

构的变化.当尿素浓度达到 6 mol L^{-1} 时,两种作用的叠加造成蛋白质次级结构的破坏.

4 结论

通过对牛血红蛋白和尿素的水溶液体系的量热和平衡渗析实验,获取了牛血红蛋白与尿素相互作用的焓效应和尿素结合数随溶液pH值和尿素浓度的变化规律.通过对实验结果的热力学分析,深入研究了牛血红蛋白与尿素之间的结合作用和尿素造成牛血红蛋白变性的机理.结果显示,尿素是通过直接和间接的两种作用造成牛血红蛋白变性的,他们之间的相互作用分为三个阶段:尿素浓度达到 4 mol L^{-1} 之前为第一阶段,主要产生的是尿素与牛血红蛋白的直接结合作用,在弱酸性条件下这种作用较强;尿素浓度为 4 mol L^{-1} 到 6 mol L^{-1} 之间为第二阶段,主要通过尿素与溶剂水的作用造成牛血红蛋白周围水结构的变化,在尿素浓度达到 6 mol L^{-1} 时两种作用的叠加造成牛血红蛋白结构的破坏,暴露出原来处于结构内部的基团;尿素浓度超过 6 mol L^{-1} 之后为第三阶段,尿素分子继续与暴露出来的基团进行结合.牛血红蛋白次级结构的维系具有协作性,其结构的破坏不是渐进的,而是一次性全部打开,结构破坏产生的热效应并不太大.

致谢 本工作得到国家自然科学基金(20673034)资助,特此致谢.

参考文献

- 1 Wu H. Studies on denaturation of protein. XIII. A theory of denaturation. *Chin J Physiol*, 1931, 5: 321—344
- 2 Watlafer DB, Malik SK, Stoller L, Coffin RL. Nonpolar group participation in the denaturation of proteins by urea and guanidinium salts, Model compound studies. *J Am Chem Soc*, 1964, 86: 508—514
- 3 Vanzi F, Madan B, Sharp K. Effect of protein denaturants urea and guanidinium on water structure: A structural and thermodynamics study. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 10748—10753
- 4 Zou Q, Habermann-Rottinghaus SM, Murphy KP. Urea effects on protein stability: hydrogen bonding and the hydrophobic effect. *Proteins: Struct Funct Genet*, 1998, 31: 107—115
- 5 Privalov PL, Khechinashvili NN. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J Mol Biol*, 1974, 86: 665—684
- 6 Lin ZJ, Musiano D, Abbot A, Shum L. *In vitro* plasma protein binding determination of flunarizine using equilibrium dialysis and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37: 757—762
- 7 Dasgupta A, Veras E. Effectiveness of activated charcoal and equilibrium dialysis in removing Asian, American, Siberian and Indian ginseng from human serum. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 367: 144—149
- 8 黄瑾, 袁余洲, 梁宏. 荧光光谱法及平衡渗析研究磷钨杂多酸与 HAS 或 BSA 的结合平衡. *中国科学 B 辑: 化学*, 2001, 31: 530—535

- 9 Scheller FW, Bistolas N, Liu S, Janchen M, Katterle M, Wollenberger U. Thirty years of haemoglobin electrochemistry. *Adv Colloid Interface*, 2005, 116: 111—120
- 10 Ban XY, Zhu ZW, Li NQ, Chen JG. Electrochemical studies of rutin interacting with hemoglobin and determination of hemoglobin. *Talanta*, 2001, 54: 591—596
- 11 Scarff CA, Patel VJ, Thalassinos K, Scrivens JH. Probing hemoglobin structure by means of traveling-wave ion mobility mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20: 625—631
- 12 Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC, Liu SX, Zhou QH, Fei ZH, Liu ZT. Studies of the interaction between paraquat and bovine hemoglobin. *Int J Biol Macromol*, 2007, 41: 243—250
- 13 Carlucci F, Miraldi F, Barretta A, Marullo AGM, Marinello E, Tabucchi A. Preservation of myocardial energy status by bovine hemoglobin solutions during ischemia. *Biomed Pharmacother*, 2002, 56: 247—253
- 14 Wu Y, Mao H, Zhao B, Shen J. The interaction of clenbuterol hydrochloride with bovine hemoglobin using spectroscopic techniques and molecular modeling methods. *Spectroscopy*, 2009, 23: 271—279
- 15 Myshkin AE, Khromova VS. A new insight into mercerized hemoglobin aggregation mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1749: 1—6
- 16 Wang YQ, Zhang HM, Zhou QH. Studies on the interaction of caffeine with bovine hemoglobin. *Eur J Med Chem*, 2009, 44: 2100—2105
- 17 Lu Y, Chen DJ, Wang GK, Yan CL. Study on the interactions of bovine serum albumin in aqueous $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solution by osmotic pressure measurements. *J Chem Eng Data*, 2009, 54: 1975—1980
- 18 陈得军, 卢雁, 谢冠群, 张锁江, 卢锦梭. 渗透压法对牛血清蛋白在 NaCl 水溶液中相互作用的研究. *化学研究与应用*, 2004, 16: 327—332
- 19 Lu Y, Wang XF, Su GJ, Lu JS. Calorimetric and volumetric studies of the interactions of formamide with alkan-1-ol in water at 298.15K. *Thermochimica Acta*, 2003, 406: 233—239
- 20 Chilom G, Chilom O, Telea C, Visan T. A calorimetric study of bovine serum albumin interaction with urea. *Rev Roumaine Chim*, 2000, 45: 989—993
- 21 李向荣, 郭伟, 卢雁. 牛血清蛋白在盐酸胍和尿素体系中变性的微量热研究. *化学学报*, 2008, 66: 515—519
- 22 Bordbar AK, Moosavi-Movahedi AA, Amini MK. A microcalorimetry and binding study on interaction of dodecyl trimethylammonium bromide with wigeon hemoglobin. *Thermochimica Acta*, 2003, 400: 95—100

Denaturation study of bovine hemoglobin induced by the urea by microcalorimetry and equilibrium dialysis

LI XiangRong^{1,2}, CHEN DeJun¹, YANG HaiYan¹ & LU Yan¹

1 College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

2 Department of Chemistry, School of Basic Medicine, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, China

Abstract: The interaction between urea and bovine hemoglobin (BHb) in aqueous solution as well as the denaturation process of BHb were studied by using isothermal microcalorimetry method and equilibrium dialysis technique at 30 °C and three pHs. The average binding numbers, the values of binding enthalpy of urea to BHb and the values of enthalpy per mole of urea were obtained. The simple binding model was employed to obtain the binding constant and the binding free energies. The results which were obtained by thermodynamic analysis indicated that the denaturation of BHb induced by urea is through direct and indirect effects, the interaction between urea and BHb is divided into three stages: the first stage is at the urea concentration below 4 mol L⁻¹. In this stage, the direct interaction between urea and BHb is the main interaction, while the direct interaction is stronger under acidulous condition. The second stage is in the urea concentrations from 4 mol L⁻¹ to 6 mol L⁻¹. In this stage, the structure of the water around the BHb is changed by the interaction of urea and solvent water. When the urea concentration reaches 6mol L⁻¹, the two interactions together cause the structural damage of the BHb and expose the groups which are in the inner structure of BHb. The third stage is at the urea concentrations higher than 6 mol L⁻¹. In this stage, urea molecules combine with the exposed groups. The destruction of the structure of BHb is not a gradual process, but rather a completely destruction at once and the thermal effect resulting from the structural damage is not too much.

Keywords: bovine hemoglobin, isothermal microcalorimetry, equilibrium dialysis, urea, denaturation