

酒石酸脱除单铈转铁蛋白中铈() 的荧光动力学研究

白海静 刘 文 杨斌盛^{* *}

(山西大学分子科学研究所 太原 030006)

摘要 0.01 mol/L Hepes, pH 7.4, 室温条件下, 以酒石酸为脱除剂, 监测铈() 与脱铁转铁蛋白结合的两端配合物 C 端单铈转铁蛋白和 N 端单铈转铁蛋白随酒石酸浓度变化的脱除动力学, 根据其动力学行为, 我们推测存在两种平行的脱除途径: 一次途径和饱和途径, 其中 C 端单铈转铁蛋白的铈() 脱除呈现饱和与一次相结合途径, N 端单铈转铁蛋白为简单的一次途径. NaCl 的加入可促进两种单铈转铁蛋白铈() 的脱除, 且 C 端单铈转铁蛋白较 N 端单铈转铁蛋白更易受 NaCl 的影响.

关键词 人血清转铁蛋白, 铈() 离子, 荧光光谱, 动力学, 盐影响

Fluorescence Studies on the Kinetics of Terbium() Removal from Monoterbium Transferrins by Tartaric Acid

BAI, Hai-Jing LIU, Wen YANG, Bir-Sheng^{*}

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006)

Abstract The rates at which terbium() ion is removed from the two metal binding sites of human serum transferrin by tartaric acid have been evaluated. Solutions are buffered at pH 7.4 by 0.01 mol/L *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (Hepes) and maintained at room temperature. According to their kinetic behaviors, it is proposed that there are two parallel removal pathways. One is saturation pathway, the other is first-order pathway. The results show that terbium() ion removal is through both pathways for the C-terminal site, while through simple first-order pathway for the N-terminal site. The addition of sodium chloride to the buffer accelerates terbium() ion removal from both forms of monoterbium transferrin, and the C-terminal monoterbium transferrin is more easily affected by sodium chloride.

Key words human serum transferrin, terbium ion, fluorescence spectra, kinetics, salt effect

人血清转铁蛋白(Tf)是血液中铁()的主要运输工具,亦是细菌的天然抑制剂^[1]. 每个人血清蛋白分子通过完成 100 个与铁()的结合—传递—释放给细胞的循环来实现其功能^[2]. Tf 中被认为具有基因相似性的 N, C 两叶片均含有可与铁()结合的位点, 每一位点中的两个酪氨酸, 一个组氨酸, 一个天冬氨酸残基及靠近精氨酸的伴阴离子(CO₃²⁻ 或 HCO₃⁻)共同构成铁()的配位环境^[3]. 在探求人血

清转铁蛋白生理功能的过程中, 跟踪铁()脱除机理一直是人们进行研究的主要途径. 在金属转铁蛋白的金属脱除过程中, 其动力学至少受以下五种因素影响: (1) 脱除位点(N 端或 C 端); (2) 支持液离子组成; (3) pH 值; (4) 脱除剂; (5) 转铁蛋白与其受体的结合^[2].

稀土元素具有特殊的电子结构, 在许多领域有着广泛的应用, 随着稀土的不断开发, 稀土进入生命

* E-mail: yangbs@sxu.edu.cn

Received December 20, 2001; revised March 7, 2002; accepted March 25, 2002.

国家自然科学基金(No. 20071022)资助项目.

体的途径和机会大大增加. 研究发现, 稀土离子与转铁蛋白的结合非常稳定, 血清中的稀土离子 20 % 以上以转铁蛋白配合物的形式存在^[4], 因此研究稀土离子与血清转铁蛋白作用具有重要意义. 与铁(Ⅲ)和 Tf 的结合相类似, 稀土离子与脱铁转铁蛋白(apoTf)结合的配合物形式亦有三种, 以铽(Ⅲ)为例, 分别为: N 端单铽转铁蛋白(Tb_NTf), C 端单铽转铁蛋白(Tb_CTf)及双铽转铁蛋白(Tb_CTfTb_N)^[5]. 本文选择酒石酸为脱除剂, 用荧光法研究酒石酸脱除单铽转铁蛋白 Tb_NTf 和 Tb_CTf 中铽(Ⅲ)的动力学, 并观察 NaCl 对脱除的影响.

1 实验部分

1.1 药品

氨三乙酸(NTA), 乙二胺四乙酸(EDTA), *N*-2-羟乙基哌嗪-*N*-2-乙磺酸(Hepes), 酒石酸钾钠(C₄H₄O₆KNa), 柠檬酸钠(CIT), NaClO₄, NaCl 均为分析纯, Tb₄O₇ 为湖南稀土研究所产品, 纯度为 99.9 %.

人血清脱铁转铁蛋白为 Sigma 产品, 纯化方法如文献所述^[6].

铽(Ⅲ)储备液的制备: Tb₄O₇ 于浓盐酸中加热溶解后, 以二甲酚橙为指示剂, 在 pH 5.5 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中, 用 EDTA 标定其浓度.

Tb_CTf 的制备: Tb³⁺ 与纯化后的 apoTf 以 0.7 : 1 摩尔比混合, 放置 30 min 以上, 以保证结合稳定且只结合在 C 端.

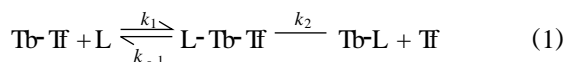
Tb_NTf 的制备: 将新配制的 Fe(NTA)₂ 溶液按 1 : 1 摩尔比加入到纯化后的 apoTf 中并在室温下搅拌 5 min, 如纯化 apoTf 一样进行超滤, 以除去 NTA^[6], 制得 Fe_CTf, 将 Tb³⁺ 与 Fe_CTf 按 0.8 : 1 混合, 放置 30 min 以上, 以保证结合稳定.

apoTf 及 Fe_CTf 的浓度通过紫外光谱法测定^[7].

实验中所有器皿均用 1 mol/L HNO₃ 浸泡, 蒸馏水冲洗干净后使用.

1.2 实验方法与原理

假设酒石酸与单铽转铁蛋白之间存在以下反应, 反应中涉及一个三元配合物^[8]:



L 表示脱除剂, 当 [L] >> [Tb-Tf] 时, 可得:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 [\text{L}]}{1 + k_1 [\text{L}]} \quad (2)$$

其中, $k = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}$, $k = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2}$. 可见, 当脱除剂浓度足够大时, k_{obs} 达到饱和, 不随 [L] 变化而变化.

铽(Ⅲ)与脱铁转铁蛋白的结合, 在 549 nm 处会产生 ⁵D₄ - ⁷F₅ 跃迁荧光光谱, 该光谱相对强度较大, 且对配位环境的立体化学敏感, 是铽(Ⅲ)的特征光谱. 当在铽转铁蛋白中加入适当的竞争配合剂时, 不计游离铽(Ⅲ)和无芳环小分子铽(Ⅲ)配合物对 549 nm 处荧光强度的贡献, 随铽转铁蛋白中铽(Ⅲ)的丢失, 549 nm 处荧光强度会逐渐降低直至谱带消失, 因此, 549 nm 处荧光强度可准确表征铽转铁蛋白的浓度(见图 1). 而在紫外差光谱中, 铽(Ⅲ)与转铁蛋白结合影响 ⁴F_{3/2} 跃迁, 由其引起的 245 nm 光谱峰由于不仅会受到铽(Ⅲ)结合影响, 也会受到阴离子结合影响(阴离子与脱铁转铁蛋白结合会在 245 nm 产生负的吸收峰^[9]), 所以用它表示铽转铁蛋白的浓度会产生一定的误差. 柠檬酸脱除铽转铁蛋白中铽(Ⅲ)的紫外差光谱如图 2.

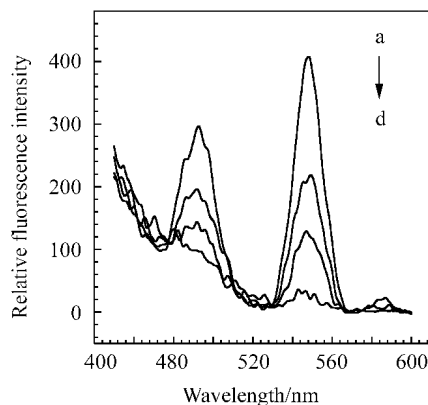


图 1 柠檬酸脱除 Tb_NTf 中铽(Ⅲ)的荧光光谱

Figure 1 Fluorescence spectra produced by the addition of CIT (1.0489 × 10⁻⁴ mol/L) to Tb_NTf (2.1350 × 10⁻⁶ mol/L)

α: 285 nm; V(CIT)/μL: a, 0; b, 50; c, 120; d, 400

本文用 Model 850 荧光仪监测铽(Ⅲ)由人血清转铁蛋白两个结合部位脱除的荧光动力学, 所有脱除反应中的脱除剂均为过量, 以使得反应为假一级. 速率常数的拟合采用单指数方程:

$$F_t = (F_0 - F_\infty) \exp(-k_{\text{obs}} \cdot t) + F_\infty \quad (3)$$

其中 F_0 , F_∞ , F_t 分别为零时刻, 无穷时刻及任一中间时刻 549 nm 处的荧光强度, k_{obs} 为某一脱除剂浓度下所进行反应的一次速率常数.

实验中所有数据均在 0.01 mol/L Hepes, pH 7.4, 室温下收集.

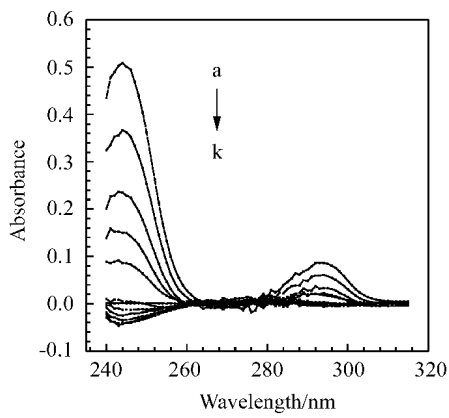


图2 柠檬酸脱除 Tb_CTf 中铈()的紫外差光谱

Figure 2 Difference UV spectra produced by the addition of CIT (1.4684×10^{-4} mol/L) to Tb_CTf (2.005×10^{-5} mol/L) V(CIT)/ μ L: a, 0; b, 10; c, 20; d, 30; e, 40; f, 55; g, 70; h, 85; i, 100; j, 120; k, 140

2 结果

2.1 Tb_CTf 中铈()的脱除

将在一系列酒石酸浓度下获得的假一级速率常数对酒石酸浓度作图 3,图 3 中 k_{obs} 并非随酒石酸浓度增加呈现饱和状态,相反,在拐点之后,有明显的一次线性特征,为提高拟合效果,介入新参数 k''' , (2)式变为:

$$k_{obs} = \frac{k [L]}{1 + k [L]} + k'''[L] \tag{4}$$

图 3 中给出了双参数(k , k')和三参数(k , k' , k''')的拟合结果.显然,在加入一次线性参数后的三参数

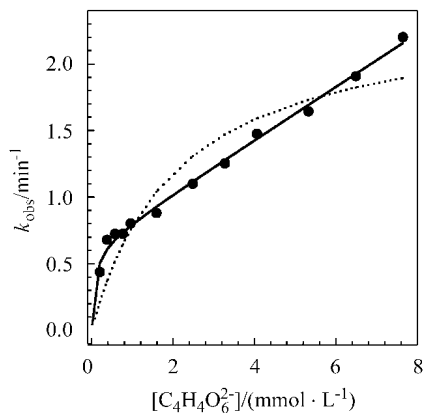


图3 酒石酸脱除 Tb_CTf 中铈()的速率常数随酒石酸浓度的变化曲线(图中实线表示三参数拟合曲线,虚线表示双参数拟合曲线)

Figure 3 Both saturation and first-order kinetic behavior for Tb() removal from Tb_CTf

拟合更为贴切.为此,可以认为在铈转铁蛋白的铈()脱除过程中,存在两种平行途径.其一是饱和途径,可用(2)式拟合速率常数对脱除剂浓度的曲线;其二为一次途径,用

$$k_{obs} = k'''[L] \tag{5}$$

拟合. k , k' , k''' 三参数中, k 表征同饱和途径的接近程度, k''' 表征一次途径的速率常数.另外,可定义 $k_{max} = k / k'$ 表征由饱和途径脱除的最大速率常数. Tb_CTf 铈()脱除的 k_{max} , k , k''' 列于 Table 1 中.

表1 Tb_CTf 与 Tb_NTf 铈()脱除过程中各参数比较

Table 1 Comparison for k_{max} , k , k''' between Tb_CTf and Tb_NTf

	k_{max}/min^{-1}	$k/(\text{mmol}^{-1} \text{L})$	$k'''/(\text{mmol}^{-1} \text{L} \cdot \text{min}^{-1})$
Tb _C Tf	0.6399	13.03	0.1992
Tb _N Tf	0.5530	0	0.2621

2.2 Tb_NTf 中铈()的脱除

与 Tb_CTf 相比, Tb_NTf 中铈()的脱除呈一次途径,如图 4 所示, k_{max} , k , k''' 值列于 Table 1 中.

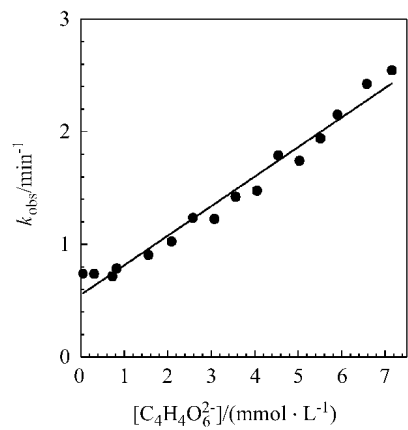


图4 酒石酸脱除 Tb_NTf 中铈()的速率常数随酒石酸浓度的变化曲线

Figure 4 Apparent first-order kinetic behavior for Tb() removal from Tb_NTf

2.3 NaCl 对单铈转铁蛋白铈()脱除的影响

固定脱除剂浓度,加入脱除剂前在 0.01 mol/L Hepes 缓冲液加入不同浓度的 Cl^- 离子并使得其反应完全,观测脱除速率常数的变化,结果如图 5 所示,随缓冲液中 Cl^- 离子浓度升高, k_{obs} 增大.可见, Cl^- 离子的加入可促进单铈蛋白中铈()的脱除,由于 Tb_CTf 较 Tb_NTf 有更大的斜率,因此其更易受盐的影响.

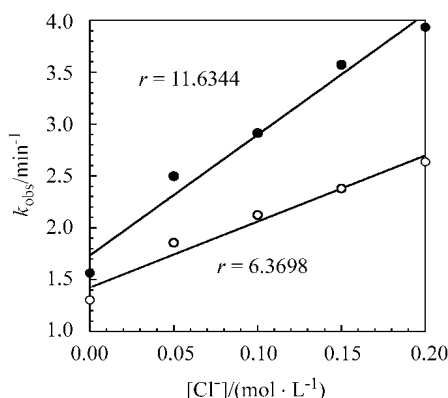


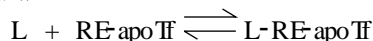
图5 Cl^- 对 $\text{Tb}_\text{C}\text{Tf}$ 和 $\text{Tb}_\text{N}\text{Tf}$ 脱除速率常数的影响 (r 为直线斜率)

Figure 5 Effect of Cl^- on the rates of $\text{Tb}(\text{III})$ removal from both forms of monoterbium transferrin

— $\text{Tb}_\text{C}\text{Tf}$; — $\text{Tb}_\text{N}\text{Tf}$

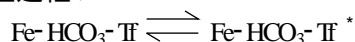
3 讨论

本文所选脱除剂酒石酸,从其结构来看,可以作为伴阴离子^[10],杨斌盛等^[8]研究发现,具有伴阴离子功能的螯合剂与铽转铁蛋白配合物可按缔合机理发生以下反应:

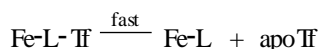
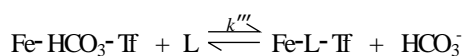


其中 L 可能置换了 $\text{RE} \cdot \text{apoTf}$ 配合物中的伴阴离子 CO_3^{2-} 和配位水,当 $\text{RE} \cdot \text{L}$ 的配合能力足够大时, $\text{L} \cdot \text{RE} \cdot \text{apoTf}$ 解离出 $\text{RE} \cdot \text{L}$ 和 apoTf . 由于转铁蛋白两端的相似性,我们在原理部分采用同一缔合机理描述两种单铽转铁蛋白的脱除反应.

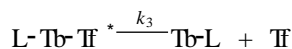
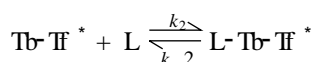
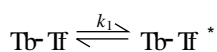
在转铁蛋白的铁脱除机理研究中, Harris 提供了两种脱除机理^[11~15],一种是饱和机理,源于饱和脱除途径,其中存在一个构象变化,即蛋白由关闭到开放的速控过程:



* 表示蛋白开放的状态. 一种为一次机理,源于一次途径:



但其一次机理必须支持这样的事实——螯合剂可以直接进攻蛋白关闭下的铁离子^[12],这显然有些牵强. 本文采用了与其相同的推理过程,得到两种相同的脱除途径,对于饱和途径,我们赞同 Harris 的解释,将铽(III)脱除的饱和机理描述如下:



当 $[\text{L}] \gg [\text{Tb} \cdot \text{Tf}]$ 时,可得:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 k_2 k_3 [\text{L}]}{k_{-1} (k_{-2} + k_3) + k_2 k_3 [\text{L}]}$$

饱和状态时, $k_{\text{obs}} = k_1$. 因此,当 $[\text{L}]$ 过大时,第一步成为速控步,速率常数成为一次常数. 但一次途径目前尚未找到合适的机理来阐述, k''' 的引入只能得到数据统计上的支持.

Marques 最初提出 KISAB (Kinetically Significant Anion Binding Site) 概念,指出在蛋白中存在一些非伴阴离子结合部位,它们可以直接影响蛋白的动力学行为. KISAB 应该是一些正电荷的蛋白残基,如 Arg, Lys 或 His 等,但现今 KISAB 位置仍不明^[16,17], 目前为探寻其位置的一些相关工作(如点突变)正在进展中^[2,18]. 针对 KISAB 位点, Marques 也提出了相应的脱除机理,但其对于解释饱和途径有很大的困难^[12]. 本文中,在相同实验条件下,增加缓冲液中 Cl^- 离子浓度,单铽转铁蛋白脱除速率常数也随之增大,可以认为 Cl^- 离子结合在 KISAB 位点,通过构象变化或改变电荷或改变配位水对铽(III)的作用使得动力学行为发生改变;另外单铽转铁蛋白 549 nm 的荧光强度随缓冲液中 Cl^- 离子浓度的增加而减弱(图 6),显而易见 Cl^- 离子的加入抑制了铽(III)与 apoTf 的结合,由于 KISAB 位置的不确定,我们无法推测 Cl^- 离子的结合部位是否与铽离子的结合部位相同,需要进一步的实验.

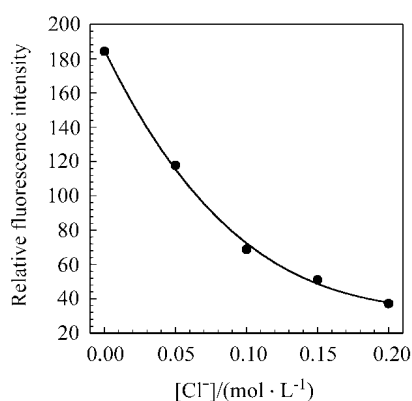


图6 $\text{Tb}_\text{N}\text{Tf}$ 相对荧光强度随 Cl^- 离子浓度的变化曲线

Figure 6 Descent curve for relative fluorescence intensity of $\text{Tb}_\text{N}\text{Tf}$ as a function of Cl^- concentration

附录

文中(2)式的推导:

当加入的酒石酸总浓度远大于人血清转铁蛋白

总浓度 $[L] \gg [Tb-Fe]_0$ 时,可应用稳态条件于 $L-Tb-Fe$,则有:

$$k_1[Tb-Fe][L] = (k_{-1} + k_2)[L-Tb-Fe] \quad (A1)$$

$$[Tb-Fe] = [Tb-Fe]_0 - [L-Tb-Fe] - [Tb-L] \quad (A2)$$

$$k_1[Tb-Fe]_0[L] - k_1[L-Tb-Fe][L] -$$

$$k_1[Tb-L][L] = (k_{-1} + k_2)[L-Tb-Fe]$$

$$[L-Tb-Fe] = \frac{k_1[Tb-Fe]_0[L] - k_1[Tb-L][L]}{k_1[L] + k_{-1} + k_2} \quad (A3)$$

$$\frac{d[Tb-L]}{dt} = k_2[L-Tb-Fe]$$

$$\frac{d[Tb-L]}{dt} - k_2 \frac{k_1[Tb-Fe]_0[L] - k_1[Tb-L][L]}{k_1[L] + k_{-1} + k_2} = 0$$

$$\frac{d[Tb-L]}{dt} + \frac{k_1 k_2 [L][Tb-L]}{k_1[L] + k_{-1} + k_2} - \frac{k_1 k_2 [Tb-Fe]_0 [L]}{k_1[L] + k_{-1} + k_2} = 0 \quad (A4)$$

$$\text{令 } \frac{k_1 k_2 [L]}{k_1[L] + k_{-1} + k_2} \quad (A5)$$

$$\text{则有: } \frac{d[Tb-L]}{dt} + [Tb-L] - [Tb-Fe]_0 = 0 \quad (A6)$$

解微分方程得:

$$Ae^{-t} = -[Tb-L] + [Tb-Fe]_0$$

当 $t=0$ 时, $[Tb-L]=0$, $A = [Tb-Fe]_0$, 所以

$$[Tb-L] = -[Tb-Fe]_0 e^{-t} + [Tb-Fe]_0 \quad (A7)$$

将(A2)式代入(A7)式得:

$$[Tb-Fe] + [L-Tb-Fe] = [Tb-Fe]_0 e^{-t} \quad (A8)$$

由于铽()与脱铁转铁蛋白的结合使铽()荧光大大加强,设零时($t=0$)所测得的铽() 549 nm 荧光强度 F_0 正比于 $[Tb-Fe]_0$,任一时间 t 的铽() 549 nm 荧光强度 F_t 正比于 $[Tb-Fe]$ 和 $[L-Tb-Fe]$ 的和,反应完全时的 549 nm 荧光强度为 F , 则式(A8)可改写为:

$$F_t - F = (F_0 - F) e^{-t} \quad (A9)$$

将(A9)式与正文中的(3)式对比,由式(A5)得:

$$k_{obs} = \frac{k_1 k_2 [L]}{k_1[L] + k_{-1} + k_2} \quad (A10)$$

(A10)式可改写为:

$$k_{obs} = \frac{k [L]}{k [L] + 1} \quad (A11)$$

由(A11)式可见,当 $[L]$ 足够大时, k_{obs} 将不随 $[L]$ 的变化而变化,即出现饱和行为。

References

- 1 Baker, E. N. *Adv. Inorg. Chem.* **1994**, 11, 389.
- 2 Zak, O.; Tam, B.; MacGillivray, R. T. A.; Aisen, P. *Biochemistry* **1997**, 36, 11036.
- 3 EL Hage Chahine, J. M.; Fain, D. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 223, 581.
- 4 Zhang, A.-P.; Yang, B.-S. *Chem. J. Chin. Univ.* **1999**, 20, 1106 (in Chinese).
(张爱萍, 杨斌盛, 高等学校化学学报, **1999**, 20, 1106.)
- 5 Yang, B.-S.; Harris, W. R. *Chin. J. Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 15, 462 (in Chinese).
(杨斌盛, Harris, W. R., 中国生物化学与分子生物学报, **1999**, 15, 462.)
- 6 Harris, W. R. *Inorg. Chem.* **1986**, 25, 2041.
- 7 Harris, W. R.; Yang, B.-S.; Abdollahi, S.; Hamada, Y. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, 76, 231.
- 8 Yang, B.-S.; Harris, W. R. *Acta Chim. Sinica* **1999**, 57, 503 (in Chinese).
(杨斌盛, Harris, W. R., 化学学报, **1999**, 57, 503.)
- 9 Harris, W. R.; Nessel-Tollefson, D.; Stenback, J. Z.; Mohamed-Hani, N. *J. Inorg. Biochem.* **1990**, 38, 175.
- 10 Schlabach, M. R.; Bates, G. W. *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 2182.
- 11 Kretchmar, S. A.; Raymond, K. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6212.
- 12 Harris, W. R.; Bali, P. K.; Crowley, M. M. *Inorg. Chem.* **1992**, 31, 2700.
- 13 Bali, P. K.; Harris, W. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4457.
- 14 Harris, W. R.; Bali, P. K. *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 2687.
- 15 Harris, W. R.; Bao, G. *Polyhedron* **1997**, 16, 1069.
- 16 Marques, H. M.; Watson, D. L.; Egan, T. J. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 3758.
- 17 Marques, H. M.; Watson, T.; Egan, T. J. *J. Inorg. Biochem.* **1995**, 57, 11.
- 18 MacGillivray, R. T. A.; Bewley, M. C.; Smith, C. A.; He, Q.-Y.; Mason, A. B.; Woodworth, R. C.; Baker, E. N. *Biochemistry* **2000**, 39, 1211.