

单铽血清转铁蛋白与单铽伴清蛋白铽(III)脱除的 荧光动力学比较^①

白海静 崔文平^a 杨斌盛^②
(山西大学分子科学研究所 太原市 030006)
^a(太原铁路机械学校 太原市 030006)

摘要 在 $0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ *N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸(Hepes), pH 7.4, 室温条件下, 用荧光法研究酒石酸脱除单铽转铁蛋白中铽(III)的动力学、各种阴离子对单铽血清转铁蛋白脱除的影响及伴清蛋白阴离子结合部位。结果表明: 单铽血清转铁蛋白与单铽伴清蛋白的 Tb(III) 脱除在衰减趋势、曲线拟合及表观速率常数与脱除剂浓度的关系上表现出明显差异, 伴清蛋白的脱除动力学更为复杂莫测。

关键词 单铽转铁蛋白, 荧光光谱, 动力学, 阴离子。

中图分类号: O657.32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2006)06-1274-04

1 引言

转铁蛋白(Tf)是一分子量约为 80KDa 的单肽链糖蛋白, 它于维持生命体中铁的含量以及铁的新陈代谢起着重要作用^[1]。根据 Tf 来源不同, 可将其分为: 血清转铁蛋白(Serum Transferrin)、伴清蛋白(Ovotransferrin)、乳铁蛋白(Lactoferrin)、黑素转铁蛋白(Melanotransferrin) 四大类。其中, 血清转铁蛋白主要从事铁的运输, 而伴清蛋白兼具转运及储存功能^[2]。

在探求转铁蛋白生理功能的过程中, 跟踪铽(III)脱除机理一直是人们进行研究的主要途径。已知, 稀土元素与转铁蛋白具有稳定的结合能力^[3], 假设转铁蛋白是稀土元素在生命体内代谢的主要载体, 则转铁蛋白稀土脱除动力学的研究同样可为探究不同转铁蛋白与稀土离子的结合差异及稀土离子进入细胞的后续生物效应提供有力工具。与铁(III)和转铁蛋白的结合相类似, 铽(III)与脱铁转铁蛋白结合的配合物形式亦有三种, 分别为: N 端单铽转铁蛋白, C 端单铽转铁蛋白及双铽转铁蛋白^[4]。本文选择酒石酸为脱除剂, 固定体系酸度及温度, 用荧光法比较研究酒石酸脱除血清转铁蛋白与单铽伴清蛋白中铽(III)的动力学差异, 并观察各种阴离子对不同单铽血清转铁蛋白脱除的影响, 考察伴清蛋白阴离子结合部位。

2 实验部分

2.1 材料

次氨基三乙酸(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($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa}$), 柠檬酸钠(CIT), 2-羟乙基乙二胺三乙酸(HEDTA), 亚氨基二乙酸(IDA), $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, NaClO_4 , NaCl , NaBr , Na_2SO_4 , $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 均为分析纯; 人血清脱铁转

① 山西省自然科学基金资助课题(No. 20031017)

② 联系人, 电话: (0351) 7016358; E-mail: yangbs@sxu.edu.cn

作者简介: 白海静(1977—), 女, 山西省晋城市人, 从事生物无机方面的研究。

收稿日期: 2006-10-11; 接受日期: 2006-10-26

铁蛋白(apoTf), 鸡脱铁伴清蛋白(apoOTf) 为美国 Sigma 公司产品; Tb₄O₇ 为湖南稀土研究所产品, 纯度为 99.9%。

HP8453UV-Vis 吸收光谱仪(德国惠普公司), Model 850 荧光仪(日本 Hitachi 公司), PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂); 芬兰 Finnpiptette 加样器。

2.2 方法

铽(III) 储备液的制备及转铁蛋白的纯化如前文所述^[5]。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 5min, 如纯化 apoTf 一样进行超滤, 以除去 NTA, 制得 Fe_cTf^[6]。将 Tb(III) 与 Fe_cTf 按 0.8:1 混合。Tb_cTf 的制备: Tb(III) 与纯化后的 apoTf 以 0.7:1 摩尔比混合。Tb_NOTf 的制备: Tb(III) 与纯化后的 apoOTf 以 0.8:1 摩尔比混合。Tb_cOTf 的制备: 新配制的 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 溶液按 1:1 与纯化后的 apoOTf 混合制得 Fe_NOTf, Tb(III) 与 Fe_NOTf 以 0.8:1 混合。apoTf, apoOTf 及 Fe_cTf 的浓度通过紫外光谱法测定^[7]。

动力学数据采集 通过监测 Tb(III) 549nm 处荧光强度随时间的变化采集动力学数据。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:

$$F_t = (F_0 - F_\infty) \exp(-k_{obs}t) + F_\infty \quad (1)$$

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

实验中所有器皿均用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HNO₃ 浸泡, 蒸馏水冲洗干净后使用。所有实验均在 pH7.4, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hepes, 室温条件下操作。

3 结果与分析

3.1 脱除剂的选择

Tb(III) 与脱铁转铁蛋白的结合, 在 549nm 处会产生⁵D₄→⁷F₅ 跃迁荧光光谱, 该光谱峰相对强度较大, 且对配位环境的立体化学敏感, 是 Tb(III) 的特征光谱。当在铽转铁蛋白配合物中加入适当的竞争剂时, 不计游离 Tb(III) 和无芳环小分子铽配合物对 549nm 处荧光强度的贡献, 随铽转铁蛋白中 Tb(III) 的丢失, 549nm 处荧光强度会逐渐降低直至谱带消失。因此, 549nm 处荧光强度可准确表征铽转铁蛋白的浓度(图 1)。

以各种阴离子 (HEDTA、EDTA、CIT、IDA、NTA、P₂O₄²⁻、C₄H₄O₆²⁻、SO₄²⁻) 作脱除剂, 观察 Tb(III)-转铁蛋白配合物 549nm 处荧光峰随脱除剂含量增加的变化。C₄H₄O₆²⁻ 与生命体系具有的苹果酸结构类似, 且脱除能力适中, 非常宜于动力学监测, 因此选用 C₄H₄O₆²⁻ 作为本实验的脱除剂。

3.2 单铽转铁蛋白中铽() 的脱除动力学

在 Tb_cTf 及 Tb_NTf 的 Tb(III) 脱除过程中脱除曲线均能以单指数方程(1) 拟合^[8], 其中 Tb_cTf 的 Tb(III) 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(3) 式拟合; 而 Tb_NTf 中 Tb(III) 的脱除呈一次途径。

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

$$k_{obs} = k[L] \quad (3)$$

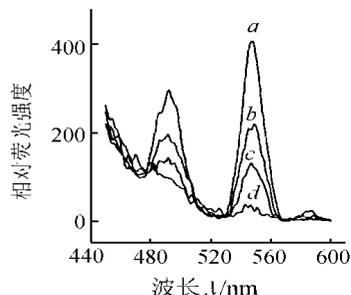


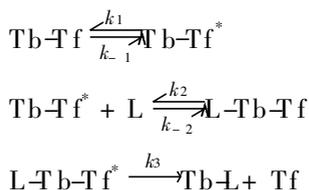
图 1 柠檬酸脱除 Tb_NTf 中 Tb(III) 的荧光光谱
a→d 柠檬酸浓度依次增加。

与单铽血清转铁蛋白相同,单铽伴清蛋白 Tb(III) 脱除反应中的脱除剂均为过量,以使得反应假一级,以(1)式拟合表观速率常数。实验结果显示 Tb_NOTf 的 Tb(III) 脱除曲线不能简单以单指数方程(1)拟合; Tb_COTf 则有良好的拟合结果,但其表观速率常数却随脱除剂浓度的增加递减,最终达到某一固定值(图 2)。至此可知,单铽伴清蛋白与单铽血清转铁蛋白在 Tb(III) 脱除中表现出明显差异,伴清蛋白的脱除动力学更为复杂莫测。

已知伴清蛋白在生物体内发挥双重功能——转运及储存,有文献表明伴清蛋白 N 端是其转运功能的主要承担者,而 C 端则是其储存功能的主要承担者^[9], Tb_COTf 中 Fe(III) 已占据伴清蛋白的 N 端, Tb(III) 于承担储存功能端 C 端的占据可能正是其脱除呈现特异性的症结所在;至于 Tb_NOTf 则怀疑 Tb(III) 在伴清蛋白两位点间发生了转移,致使其脱除曲线表现出一个快过程和一个相对慢的过程。

4 结 论

单铽血清转铁蛋白铽(III) 脱除的饱和途径,机理描述如下^[8]:



单铽伴清蛋白 Tb(III) 脱除动力学较单铽血清转铁蛋白复杂的多, Tb_NOTf 的 Tb(III) 脱除曲线不能简单以单指数方程拟合,怀疑 Tb(III) 在伴清蛋白两位点间发生了转移,致使其脱除曲线为一个快过程和一个相对慢的过程; Tb_COTf 则有良好的拟合结果,但其表观速率常数却随脱除剂浓度的增加递减,最终达到某一固定值,推测 Tb(III) 于伴清蛋白承担储存功能端 C 端的占据是其脱除呈现特异性的症结所在。

参考文献

- [1] Baker E N, Rumball S V, Anderson B F. Transferrin: Insight into Structure and Function from Studies on Lactoferrin[J]. *TIBS*, 1987, **12**: 350.
- [2] Baker E N. Structure and Reactivity of Transferrins[J]. *Adv. Inorg. Chem.*, 1994, **11**: 389.
- [3] 张爱萍, 杨斌盛. 整合剂对铽(III)-转铁蛋白配合物的影响[J]. *高等学校化学学报*, 1999, **20**(7): 1106.
- [4] Zak O, Tam B, MacGillivray R T A *et al.* A Kinetically Active Site in the C-Lobe of Human Transferrin[J]. *Biochemistry*, 1997, **36**(36): 11036.
- [5] 杨斌盛, Harris W R. 铽(III) 与人血清脱铁转铁蛋白结合的紫外差光谱研究[J]. *化学学报*, 1999, **57**(5): 503.
- [6] Harris W R, Yang B S, Abdollahi S *et al.* Steric Restrictions on the Binding of Large Metal Ions to Serum Transferrin[J]. *J. Inorg Biochem.*, 1999, **76**(3-4): 231.
- [7] 杨斌盛, Harris W R. 铽(III) 与人血清脱铁转铁蛋白结合的荧光光谱研究[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15**(3): 462.
- [8] 白海静, 刘文, 杨斌盛. 酒石酸脱除单铽转铁蛋白铽(III) 的荧光动力学研究[J]. *化学学报*, 2002, **60**(7): 1253.
- [9] Dewar J C, Mikami B, Hirose M *et al.* Structural Evidence for a pH sensitive Dilycine Trigger in the Hen Ovitransferrin N-Lobe: Implications for Transferring Iron Release[J]. *Biochemistry*, 1993, **32**(45): 11963.

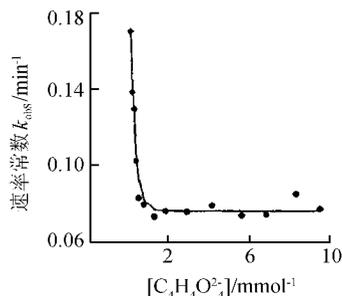


图 2 酒石酸脱除 Tb_COTf 中 Tb(III) 的速率常数随酒石酸浓度的变化曲线

The Comparison of Terbium(III) Removal from Monoterbium Serum Transferrins and Monoterbium Ovotransferrins by Fluorescence Spectra

BAI Hai-Jing CUI Wen-Ping^a YANG Bin-Sheng

(Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, P. R. China)

^a(Taiyuan Railway Machine School, Taiyuan 030006, P. R. China)

Abstract In $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ *N*-(2-hydroxyethyl)-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (Hepes) at room temperature and pH 7.4, the removal behavior of Tb(III) from monoterbium-ovotransferrins by tartaric acid was studied by fluorescence spectra. The Tb(III) removal pathway is the complex with saturation and first order for TbOTf, while it is a simple first order pathway for TbNTf. The removal curves of Tb(III) from TbNTf are difficult in the curve-fitting by simple mono-exponential equation. Although the removal curves of Tb(III) from TbOTf have a good fitness, k_{obs} descends to a certain point with the increase of the concentration of removal ligand.

Key words Monoterbium Transferrins, Fluorescence Spectra, Kinetics, Anions.

廉价光谱分析资料讯息

1. 《光电光谱分析》,周开亿主编,4册,16开,1236页,《光谱实验室》编辑部增刊,每套55元。
2. 《光谱实验室》2004年1—6期,16开,1248页,每套75元。
3. 《数理统计在化学、光谱分析中的应用》,纳利莫夫著,余生等译,《光谱实验室》编辑部编,16开,396页,每册10元。
4. 《邮票上的光谱学和化学史》,周开亿等编,《科学出版社》出版,16开,158页,每册10元。
5. 《空心阴极放电及其应用》,周开亿主编,《真空科学与技术》杂志社出版,32开,798页,上下册,每套10元。
6. 《邮票上的化学、光学和光谱学史》,周开亿主编,《光谱实验室》2006年第1期彩色抽印本(收藏本),16开,64页,每册30元。

以上各书售价中均含普通印刷品邮费。

联系地址:北京市81信箱66分箱 光谱实验室编辑部联络处 刘建林,
邮编:100095