钴(Ⅱ)与金属硫蛋白的反应

岳 晟 仲维清 张保林** 唐雯霆*

(南京大学配位化学国家重点实验室,南京 210093)

研究了 Co(II)和金属硫蛋白反应的动力学,发现反应分三段进行,由此得到了不同条件下各段对应的 假一级反应速率常数。假设金属硫蛋白中每个金属结合 20/7 个 SH 基团,用盐酸滴定 Co₅Th(thioncin) 和 Co₇Th,根据它们的紫外光谱特征波长处吸收值降至 50%时的 pH,分别又得到它们的表观平均稳定常 数。并且第一次发现当金属硫蛋白中钻逐步增加时,紫外吸收不断增强,但结合 5 个 Co 时即已达到最 大,而不是 7 个 Co.最后根据这些结果,对 Co(II)与金属硫蛋白反应的机理进行了讨论。

关键词: 金屋硫蛋白 动力学 钴 机理 表观平均稳定常数 紫外光谱

前 言

金属硫蛋白(MT)是一种低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白,在锌、钢等的代谢以 及重金属离子解毒过程中起着重要的作用⁽¹⁾。近几年来,通过晶体 X 射线衍射结构分析和蛋 白溶液的 NMR 研究发现原 Cd,ZnTh(thioncin)分子包含 M₄S₁₁和 M₃S₉两个金属--硫簇,从而 分成两个结构域构^(2,3)。由于钴与锌具有相似的配位性质,但又有独特的光谱以及磁性质, 因此,目前钴已经成为许多锌结合蛋白可靠而且便利的分子探针⁽⁴⁾,但是关于 Co(II)与 MT 反应的报道还很少。1981 年 Vasak 和 Kagi 通过对 Co(II)结合 MT 的 EPR、吸收光谱和磁化 率的研究第一次证明了 Co-S 金属簇的存在⁽⁵⁾。最近 Bertini 等通过¹H NMR 谱研究了 Co-S 簇在 α , β 两个结构域中的形成机理^(6,7)。本文研究了 Co(II) 与兔肝 Zn₂Th 反应动 力学,并且通过盐酸滴定的方法测得了 Co₅Th 和 Co₂Th 的表观平均稳定常数。根据这些数据 讨论了 Co(II) 与 MT 反应的机理.

实 验

所有的溶液实验前都经过真空脱气,实验均在氮气氛中进行。

一.金属硫蛋白的制备

% F Zn₇Th-2 按照 Kimura⁽⁸⁾和 Kagi⁽⁹⁾文中的方法从注射氯化锌的成年雄家% F 脏中提取分离得到.将 MT-2 溶于 pH 为 2 的盐酸中, 再经 Sephadex G-25 柱(Whatman)脱盐, 得到脱金属 MT(apoMT). 根据 220nm 处的紫外吸收值测得蛋白溶液 (pH 为 2)的浓度

收稿目期: 1994-11-22. 国家自然科学基金资助项目。

**现在北京免疫试剂中心。 第一作者: 岳晟, 男, 24 岁, 硕士研究生。研究方向: 金属硫蛋白的生理功能和结构研究。

^{*} 通讯联系人。

(ε=48200mol⁻¹•1•cm⁻¹⁽¹⁰⁾), 金属的浓度则由等离子发射光谱(ICP)测得, 吸收光谱在 Shimazu UV-3100 上测得。

二. 结合动力学

在 0.01mol·l⁻¹ pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液体系中, 恒温 298K, 用微量注射器将 10山的 0.01mol·l⁻¹Co(Π)溶液与密封于比色皿中的 2.5ml Zn₂Th-2 分别按 12:1、24:1 的摩尔比 迅速混合,同时记录吸收光谱的变化,或改变温度条件或用 apoMT 分别重复以上过程, 三, 逐级结合与表观平均稳定常数的测定

按各自比例将 apoMT 与新配制的 CoCl,水溶液混合、用 0.013mol・l⁻¹ 的 Tris 碱溶液将 混合液 pH 调至 7.4, 分别得到绿色的 CoTh、Co.Th、……Co.Th 溶液、测定它们的紫外光 谱, 将制得的 Co,Th 和 Co,Th 分別用 YM-1 膜(Amicon)超滤脱盐, 然后在室温下用 0.2mol·1⁻¹ HCl 滴定,每次平衡 5min 后测定吸收光谱及对应的 pH 值(Ag/AgCl 玻璃电 极, Orion), 首至吸收光谱不再改变为止。

果与讨论 结

Co(II)与 apoMT 反应的饱和产物为 Co₇Th, 它们逐级结合过程中的光谱变化示于图 1a,b 中,波长低于 500nm 的吸收(图 la) 是配体-金属电荷转移(LMCT)峰,而波长高于 500nm 的吸收(图 1b)则是 Co(Ⅱ)离子的 d-d 电子跃迁峰⁽⁵⁾。随着 Co(Ⅱ)含量的增加,整个光谱中 MT 的吸收都随之增加,直至含有 5 个钴时达到最大。从 5 个钴增加到 6 个钴时,吸收值突然 大幅减少,而钴由 6 个增加到 7 个时,吸收又有所增强,但仍低于 Co.MT. Pountney 等亦在 Co(II)与 apoMT 的逐级结合过程的 MCD 和 EPR 谱中观察到了同样的变化趋势⁽¹¹⁾, 而在 吸收光谱中这还是第一次观测到。影响电子吸收光谱吸收强度的因素很多也很复杂。这里主 要有两个: (1) Co-S 键的个数随着结合 Co(Ⅱ)的增多而增加,吸收值必然也增加; (2) 对于 单个 Co-S 来说,从理论上表示谱带强度意义较大的参数是积分强度 f ,通常表示为



 $f = (4.315 \times 10^{-9}) \int \varepsilon d\nabla$



Fig.1 Changes of absorption spectra in the step combination of Co(11) with apoMT Co: apoMT: a. 1.0, b. 2.0, c. 3.0, d. 4.0, c. 5.0, f. 6.0, g. 7.0. Concentration of apoMT is 6.11 $\times 10^{-6}$ mol $\cdot 1^{-1}$. 0.05 mol $\cdot 1^{-1}$ Tris-HCl solution, buffer at pH7.4, 288K.

ε 为摩尔吸光系数, ν 是以波数表示的频率,对于完全许可的跃迁 f=1⁽¹²⁾,随着结合 Co(II)的增加,原子的个数、分子的对称性同时发生了变化,影响了基态和激发态的电子波函数的 对称性,因此 Co_sTh 的跃迁的许可程度与 Co₆Th 的大不相同.综合以上原因, Co₅Th 的吸收 强度最大.

MT结合金属是有选择性的。Bertini 等 NMR 研究的结果表明,前三个 Co 原子并不是随 机与半胱氨酸的巯基结合,而是两个占据α结构域而另一个占据β结构域。第四个金属结合 在α结构域形成了一个有强烈偶合作用的 Co,簇,第五个金属完成了四金属簇,最后两个用 来完成β结构域三金属簇^(6,7)。Pountney 也发现 MT 结合前三个 Co (Π)时,Co (Π)之 间没有磁偶合作用,即没有协同效应,和Bertini的结果完全一致⁽¹¹⁾。这样,从每分子 MT 含4个钴开始,分子中出现了桥联形式配位的 Co-S-Co 键,键强度要低于 Co-S 键,因此低 钴含量时观察到的 LMCT 吸收将向长波方向移动,295nm 处的峰谷、315nm 处的峰顶和 370nm 处的肩峰分别红移到了 305、325 和 400nm,低于 305nm 的区域为一宽带峰,因此变 化不明显, d-d 电子跃迁吸收受此影响不大,690nm 和 741nm 的峰只是相对强弱发生了变 化。

由于 Co(II)离子大大过量,Co(II)与 Zn,Th-2 反应的动力学方程可表示为 (13):

d[CoZn₆Th]/dt+•••••+d[Co₆ZnTh]/dt+d[Co₇Th]/dt = k[Zn₇Th] (2) 假定中间及最终产物的摩尔消光系数都相同⁽⁸⁾,则可用吸收值来表示上式:

$\mathrm{d}A / \mathrm{d}t = k(A_{\infty} - A)$	•	(3)
(3)式 A 从 Ao 到 A, t 从 0 到 t 积分得:		
$-\ln[(A-A_{\infty})/(A_0-A_{\infty})] = kt$		(4)

其中 Ao 和 Ao分别是开始和平衡时在 270nm 处的吸收值。

表 1 不同浓度 Co(11)与 MT 反应的假一级反应速率常数

Table 1 Pscudo-First Order Rate Constants of Reaction of Varied Concentration Co(II) with MT

C₀(∏):MT	$k_1 \times 10^3 \; (min^{-1})$	$k_2 \times 10^3 (\min^{-1})$	$k_3 \times 10^3 (min^{-1})$
12:1	67.2	7.31	0.52
24:1	85.3	9.35	1.25

0.01mol • 1	phosphate solution, buffer at pH 7.4, 298K

用最小二乘法线性拟合程序(Golgden Software Co.)按(4)式拟合可知反应分三段进行,每段的假一级反应速率常数列于表1中. 在初始阶段(反应时间小于4分钟),270nm 处的吸收增加得非常快,而第二阶段(从4到15分钟),吸收值的增加明显减慢,到了第三阶段(从15分钟到平衡止),增加趋势已不明显.从(2)式可看出 k 与 Co(Ⅱ)的浓度有关,当 Co(Ⅱ):MT 增加时(表1及图2),各段反应的速率常数都明显增加,可表示为:

 $k = \alpha k_o C_{\rm Co(II)}$

k。为一常数,α的值每段不同,等于 0.6~1.0.

(5)



图2 Co(II)与Zn,Th 的反应动力学

Fig.2 Kinetics of reaction of Co(II) with Zn₇Th

Ratio of Co(11) with Zn₂Th arc shown in Figure. 0.01mol $\cdot 1^{-1}$ phosphate solution,

buffer at pH 7.4. Concentration of Zn_7Th is 1.0×10^{-5} mol $\cdot 1^{-1}$, 298K

当温度升高时,除了在 333K 下的 k_1 ,每段反应的速率常数都增加(表 2),平衡时间亦相应 缩短.根据 Arrchnius 方程、第二、三段反应的平均表观活化能(r=0.99)分别为 $E_{a2}(10.34kJ \cdot mol^{-1})$ 和 $E_{a3}(36.49kJ \cdot mol^{-1})$,可见活化能是升高的。

表 2 不同温度下 Co(11)与 MT 反应假一级反应速率常数

Talbe 2 Pscudo-First Order Rate Constants of Reaction of Co(II) with MT at Different Temperaure 0.01mol \cdot 1⁻¹ phosphate solution, buffer at pH 7.4, Co : MT = 12 : 1

temperature(K)	$k_1 \times 10^3 (\min^{-1})$	$k_2 \times 10^3 (\min^{-1})$	$k_3 \times 10^3 (min^{-1})$.
277	91.0	2.30	0.43
298	91.0	7.31	0.52
310	133.0	8.80	1.15
333	75.0	11.3	2.51

Co(Π)与 apoMT 反应的速度要远远快于与 Zn₇Th 反应的速度,在十秒钟内即可达到平衡, 从半衰期 t_{1/2} 可知速率常数约为 10min⁻¹.

Co(II) 置換 Zn,Th 中 Zn 的反应机理目前还不清楚. 原兔 MT 包含 61 个氨基酸, 肽链较 短以致不能完全包埋金属簇核⁽¹³⁾, 金属簇很容易为溶剂及配体分子所接近和进攻, 所以 Co(II) 置換 MT 中 Zn 的反应可以忽略扩散作用的影响,认为反应当 Co(II) 一加入 Zn,Th 溶 液就已经开始。虽然 MT 具有很高的热稳定性,但其动力学上却很不稳定,反应一开始,由 于静电作用,Co(II)的进攻就形成了 Co···S-Zn 键,使 Zn-S 金属簇稳定性下降,由于 Zn-S 的 LMCT 特征吸收在 220nm⁽¹⁴⁾,而 Co-S 的吸收却在大于 250nm 的区域,因此监测的 270nm 处吸收急剧上升。再加上 Co(II) 与 apoMT 反应的速度比之与 Zn,Th 要快得多,如果 不考虑溶剂等其他原因,决速步骤是 Zn-S 键的解离,因此温度的升高可加快反应的速度。与 Cd(II)和 Zn,Th 反应不同(在儿分钟内即可达到平衡),Co(II)与 Zn,Th 的反应平衡需要 24 小时。

日卷

盐酸滴定 Co₇Th 的反应可表示为(省略电荷): CoTh+nH ⇒ H_nTh+Co(Ⅱ) 表观平衡常数可表示为⁽¹⁵⁾:

 $K_{app} = [H_n Th][Co(\Pi)] / [CoTh][H]^n = K_{SH}^n / K_{CoTh} = (A_{max} - A)^2 / ((A - A_{res})c[H]^n)$ (7) 每分子的 MT 中有 20 个巯基,因而每个金属平均结合了 20 / 7 个巯基,每个巯基可结合一个 H⁴,简单的就可认为每个金属被 n (为 20 / 7) 个 H⁴取代 ⁽¹⁵⁾, K_{SH} 为 H⁴与巯基的结合常 数,为 10^{8.9 (16)}, K_{CoTh} 为表观平均稳定常数, A_{max} 和 A_{res} 分别是 Co₇Th 和 apoMT 在 690nm 的吸收值,从图 3 得 $A_{res} = 0.066$, $A_{max} = 0.15$, 消光系数 $\varepsilon = 2936 \text{mol}^{-1} \cdot 1 \cdot \text{cm}^{-1}$. 50%吸收值 处的 pH 为 4.09,代人(7)式可得 $K_{CoTh} = 3.69 \times 10^{18}$. 320nm 处吸收值及其他数据处理得的表观 平均稳定常数 与 690nm 处的完全一致。同样对于 Co₅Th, $A_{res} = 0.033$, $A_{max} = 0.065$, pH_{1/2}=4.86、690nm 处的 $\varepsilon = 4026 \text{mol}^{-1} \cdot 1 \cdot \text{cm}^{-1}$. Co₅Th 的表观平均稳定常数为 1.0× 10¹⁶. Co₅Th 比 Co₇Th 少一个金属簇,前者的表观平均稳定常数就比 Co₇Th 的约小 30 倍,可见 金属簇的形成可以大大增加 MT 的热力学稳定性,又由于表观平均稳定常数表示的是 MT 中所 有的 Co-S 稳定常数的平均值,说明结合 Co(Π)时, α 和 β 结构域的稳定性是不同的. Zn₇Th 的表观平均稳定常数为 2.6×10^{16 (17)}, 而 Co₇Th 的则是它的 100 倍,因此 Co(Π)可以作为一个 可行且便利的探针来研究 Zn₇Th 的性质。



- 图 3 盐酸滴定 Co, Th 的吸收光谱图
- Fig.3 Absorption spectra of Co₇Th titrated by HCl
 Concentration of Co₇Th is 5.88 × 10⁻⁵mol 1⁻¹. The absorption changes following the addition of acid are shown in the right corner. The solvent is water, 288K
 - 参考文献
- [1] Wcbb, M., Experimentia suppl., 52, 109(1987).
- [2] Vasak, M., Biochem., 24, 740-747(1985).
- [3] Robbins, A. H. ct al, J. Biol. Chem., 221, 1269-1293(1991).
- [4] Vallee, B. L., Holmquist, B., Method for Determining Metal Ions Environments in Proteins, Darnall, D. W., Wilkins, R. G. eds., Elseure / North Holland, New York, p.27-74(1980).
- [5] Vasak, M., Kagi, J. H. R., Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78(11), 6709-6714(1981).

(6)

- [6] Bertini, I. et al, J. Am. Chem. Soc., 111, 7296-7300(1989).
- [7] Bertini, I. et al, Eur. J. Biochem., 211, 235-240(1993).
- [8] Kimura, M. et al, Metallothionein, Kagi, J. H. R., Nordberg, M. eds., Birkhauser, Basel, p.163-168(1979).
- [9] Kagi, J. H. R. ct al, J. Biol. Chem., 249, 3537-3542(1974).
- [10] Vasak, M., Kagi, J. H. R., Methods Ions in Biological System, Sigel, H. eds., Marcel Dekker, New York, 15, p.273(1983).
- [11] Pounteny, D. L., Vasak, M., Eur. J. Biochem., 209, 335-341(1992).
- [12] Barrow, G. M., Introduction to Molecular Spectroscopy, McGraw-Hil, New York, p.80-81(1962).
- [13] Vasak, M. J. Am. Chem. Soc., 102, 3953(1980).
- [14] Vasak, M., Biochem., 20, 2852(1981).
- [15] Kagi, J. H. R., Vallee, B. L., J. Biol. Chem., 236(9), 2435-2442(1961).
- [16] Pertering, D. H., Biochem. Pharamacol., 23, 567(1974).
- [17] Kagi, J. H. R., Vallee, B. L., J. Biol. Chem., 236(9), 435(1960).

REACTION OF Co(]]) WITH METALLOTHIONEIN

Yuc Sheng Zhong Weiqing Zhang Baolin Tang Wenxia (State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093)

The properties of reaction of Co(II) with rabbit liver MT have been investigated. The reaction is characterized by triphasic kinetics and the corresponding pseudo-first order rate constants are determined under different conditions. Assuming each metal binding to 20/7 SH groups, average stability constants of Co_7Th and Co_5Th are obtained from hydrogen ions concentration required for 50% loss of the spectra absorbance. Interestingly, it was found that the absorption intensities of Co-thiolate adduct, formed by adding Co to apoMT for varied ratio of Co(II) to MT, reach a maxium after 5 mol equivalent Co(II) rather than 7 cobalt. All the above data give an deep insight into the mechanism of the reaction between cobalt and MT.

Keywords: metallothionein kinetica cobalt mechanism apparent average stability constant UV-vis spectra