

## 金属硫蛋白加质子常数及与Cd(II)络合常数测定

段震文 王文清\* 陈向阳 王祥云

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

茹炳根 褚德莹 林育

(北京大学生物系)

(北京大学化学系)

**摘要** 用 pH 计和 Cd 离子选择电极测定了金属硫蛋白的加质子常数及其与 Cd(II) 的络合常数, 用改进的简化络合模型处理实验结果, 得到了去金属硫蛋白 (apo MT) 中 6 类不同的加质子基团的数目及其加质子常数。对 Cd(II) 滴定数据的计算表明, MT 中两个结构域—— $\alpha$  和  $\beta$  对 Cd(II) 的络合常数相差约 1000 倍。从热力学定量描述了 MT 中两个结构域结合金属离子选择优先顺序。

**关键词:** 金属硫蛋白 加质子常数 Cd(II) 络合常数

金属硫蛋白(MT)是一类低分子量(哺乳动物中 MT 分子量为 6500)和高金属结合量的蛋白质。它含有 61 个氨基酸残基, 其中有 20 个半胱氨酸残基, 因此它对金属有极强的亲和力。Winge 等<sup>[1]</sup>报导, 至少有 18 种金属离子与其结合, 一类是  $M_7$ -MT, 即每个 MT 能分别结合 7 个金属离子, 其中有 Bi(III), Cd(II), Co(II), Hg(II), In(III), Ni(II), Pb(II), Sb(III) 和 Zn(II); 另一类是  $M_{12}$ -MT, 即每个 MT 分别结合 12 个金属离子, 如 Ag(I), Au(I) 和 Cu(I); 它也能结合其他金属如 Os(III), Pd(II), Pt(IV), Re(V), Rh(III) 和 Tl(III), 但化学计量组成尚不清楚。

金属硫蛋白在原子能方面的主要功能表现在: 1. 由于 MT 中含有丰富的半胱氨酸, 是一种很好的自由基清除剂, 因此 MT 及其基因具有抗电离辐射、抗自由基的作用。MT 在生物体内半衰期比半胱氨酸长, 作为抗辐射药物比半胱氨酸优越得多。在辐射治疗癌症时, 对正常组织起保护作用。2. 它可以作为海洋生物被放射性金属元素污染的指标及监测参数。3. 通过金属硫蛋白基因在微生物中的克隆、表达, 可用于放射性废水中有毒金属元素的去污和浓集。

我们研究目的在于定量测定 MT 与各种金属离子的络合常数, 以比较其对金属离子的去污能力。由于 Vasak 和 Kagi<sup>[2]</sup>曾用光谱滴定方法估算了 MT 与 Cd(II) 的络合常数, 本文应用 Avdeef 等人<sup>[3]</sup>的实验方法, 采用王祥云改进的简化的加质子和络合反应模型的数学处理方法和程序设计, 求得了 MT 的各类加质子常数和与 Cd(II) 的络合常数, 并比较了 MT 中两个

结构域  $\alpha$  和  $\beta$  对 Cd(II) 的络合能力。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

电位仪、联合 pH 电极、Cd 离子选择电极及其参比电极均为美国 Orient 公司产品；微量滴定管、超级恒温槽为国内产品，恒温滴定杯为自己设计。硝酸镉、氢氧化钠均为分析纯。

### 1.2 实验方法

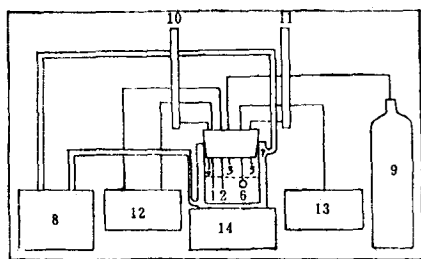


图 1 测定 MT 与 Cd(II) 络合常数的电位滴定装置

Fig.1 Schematic diagram of potentiometric titration for the determination of coordination constants for MT and Cd

- (1) Cd ion-selective electrode,
- (2) Reference electrode,
- (3) Introducing tube for  $N_2$ ,
- (4) Introducing tube for NaOH solution,
- (5) Introducing tube for  $Cd(NO_3)_2$  solution,
- (6) Combined pH electrode,
- (7) Thermostatic cup,
- (8) Thermostatic bath,
- (9)  $N_2$  bottle,
- (10) NaOH microtitration tube
- (11)  $Cd(NO_3)_2$  microtitration tube,
- (12)(13) Electric potential meter

(1) 在通氮手套箱中制备 apo MT, 移取 8.40ml 到 20ml 的恒温滴定杯中, 加入 0.17ml 浓度为  $5.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $NaNO_3$  溶液, 维持体系离子强度为  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 插入联合 pH 电极、NaOH 滴定管和通氮管, 恒温  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , 在充氮和搅拌条件下, 加入  $0.0558 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 溶液, 并记录 pH 值和加入 NaOH 的体积。(2) 在相同条件下, 在恒温杯中加装 Cd 离子选择电极、参比电极和  $Cd(NO_3)_2$  溶液导管, 将上述两电极联接在另一台 Orient 电位仪。(3) 先将 apo MT 溶液调至所需 pH, 然后滴加  $0.012 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $HNO_3$ 、 $0.0197 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $Cd(NO_3)_2$  溶液。每次滴加  $Cd^{2+}$  溶液后, 由于络合反应释放质子导致 pH 下降, 这时小心滴入 NaOH, 将 pH 调回原值, 并记录  $Cd^{2+}$  电极电位和加入  $Cd(NO_3)_2$  溶液及 NaOH 溶液体积。实验装置见图 1。

## 2 数据处理

设体系中 apo MT 总浓度  $c_p$ , 氢离子总浓度  $c_H$ , 自由质子浓度  $[H]$ , 则每一个 apo MT 中平均结合的质子数  $\bar{n}_{H, \text{exp}}$

$$\bar{n}_{H, \text{exp}} = \frac{c_H - [H]}{c_p} \quad (1)$$

式(1)中,  $c_H$ 、 $c_p$  为已知,  $[H]$  由 pH 计测定, 故  $\bar{n}_{H, \text{exp}}$  可由实验求得。 $\bar{n}_{H, \text{exp}}$  下标 exp 表示实验值。

根据逐级络合平衡理论, 平均络合数可表示为

$$\bar{n}_{H, \text{cal}} = \frac{k_1[H] + 2k_1k_2[H]^2 + \dots + nk_1k_2 \dots k_n[H]^n}{1 + k_1[H] + k_1k_2[H]^2 + \dots + k_1k_2 \dots k_n[H]^n} \quad (2)$$

式(2)中  $k_1, k_2, \dots, k_n$  分别为各级加质子平衡常数。 $\bar{n}_{H, \text{cal}}$  下标 cal 表示计算值。

$$c_{pH_1} = k_1 c_p [H]$$

$$c_{\text{PH}_2} = k_1 k_2 c_p [\text{H}]^2$$

$$c_{\text{PH}_n} = k_1 k_2 \dots k_n c_p [\text{H}]^n$$

在蛋白质分子中, 各种加质子基团很多, (2) 式中的  $n$  值一般很大, 直接求解出各个参数非常困难, 因此有必要使用一种简化的模型, 以便于计算。假设某一类质子结合位点有  $m$  个, 它们每个位点结合质子能力相同, 平衡常数以  $k_0$  表示。又假设前一个质子的结合对剩下的结合位点无影响, 且每个位点在分子中是可区分的。根据统计原理, 当第一个质子上去时, 有  $m$  个可能的结合位置, 平衡常数  $k_1 = mk_0$ ; 第二个质子再上去时, 它有  $m(m-1)/2!$  个可能的结合位点, 平衡常数  $k_2 = (m-1)k_0/2$ , 依次类推, 第  $i$  个质子的络合常数为

$$k_i = k_0 \frac{m-i+1}{i} \quad (3)$$

将式(3)代入式(2)中, 则

$$\bar{n}_{\text{H,cal}} = \frac{\sum_{i=1}^m i \left\{ \prod_{j=1}^i \frac{m-j+1}{j} \right\} (k_0)^i [\text{H}]^i}{1 + \sum_{i=1}^m \left\{ \prod_{j=1}^i \frac{m-j+1}{j} \right\} (k_0)^i [\text{H}]^i} \quad (4)$$

应用二项式定理, 上式变成

$$\bar{n}_{\text{H,cal}} = \frac{mk_0[\text{H}]}{1+k_0[\text{H}]} \quad (5)$$

在推导式(5)时, 曾假定前一个质子的结合对后续结合的质子没有影响, 这一假设显然与实际不符, 因为当分子结合了一个质子后, 至少会改变它的净电荷数。为考虑到分子中的静电效应, 我们在(5)式中加入一个与电荷有关的校正因子  $\exp(-2\psi)$ , 即

$$\bar{n}_{\text{H,cal}} = \frac{mk_0[\text{H}]\exp(-2\psi)}{1+k_0[\text{H}]\exp(-2\psi)} \quad (6)$$

式中  $\psi = Wz_{\text{H}}z_p$ ,  $z_{\text{H}}$  为质子电荷数,  $z_p = \bar{n}_{\text{H}} - n_0$  为蛋白质的净电荷,  $n_0$  为等电点时分子结合的质子数。  $W = 1/8\pi\epsilon_0 r RT = \text{常数}$ ,  $r$  为蛋白质的分子半径。由于 MT 是由两个巯基金属簇组成, 分子呈哑铃状,  $r$  值乃取其长轴和短轴的平均值为  $23 \text{ \AA}$  [4]

如果分子有  $q$  类结合位点, 则将(6)式对  $q$  求和

$$\bar{n}_{\text{H,cal}} = \sum_q \frac{m_q k_{0q,H} [\text{H}]\exp(-2\psi)}{1+k_{0q,H} [\text{H}]\exp(-2\psi)} \quad (7)$$

根据兔子肝脏 MT-2 的氨基酸序列, 可将其质子结合位点分为 6 类, 因而(7)式的取值范围为 1 至 6。

由(1)和(7)两式, 建立目标函数

$$S = \sum_j (\bar{n}_{\text{H,cal}} - \bar{n}_{\text{H,exp}})^2 w_j \quad (8)$$

式中  $j$  为实验点个数,  $w_j$  为权值。对目标函数进行最小二乘法拟合, 便可求出(7)式中各参数的最佳值  $m_q$  和  $k_{0q}$  ( $q=1, 2, \dots, 6$ )。

在固定 pH 条件下, MT 络合 Cd(II) 的平衡常数计算方法与此类似, 即

$$\bar{n}_{\text{Cd,exp}} = \frac{c_{\text{Cd}} - [\text{Cd}]}{c_p} \quad (9)$$

$$\bar{n}_{H,cal} = \sum_r \frac{m_r k_{Or,Cd} [Cd] \exp(-2\psi)}{1 + k_{Or,Cd} [Cd] \exp(-2\psi)} \quad (10)$$

式中  $c_{Cd}$  为体系中 Cd 的总浓度,  $[Cd]$  是自由 Cd(II) 浓度。

$r$  为 MT 中对 Cd(II) 等同结合位点分类数, 根据 MT 与金属结合的已知特点, 结合位点分为两类, 一类表示  $\alpha$  结构域, 一类表示  $\beta$  结构域。同样以下式进行最小二乘法拟合, 可求得  $k_{O\alpha,Cd}$  和  $k_{O\beta,Cd}$ 。

$$s = \sum_r (\bar{n}_{Cd,cal} - \bar{n}_{Cd,exp})^2 w_r \quad (11)$$

### 3 结果讨论

#### 3.1 apo MT 的加质子基团及其加质子常数

apo MT 的 pH 滴定实验数据, 共进行了 74 组, 按式(8)拟合, 得出  $m_{q,H}$  和  $\log k_{Oq,H}$  值。

表1 apo MT 加质子常数最小二乘法拟合值

Table 1 Simulating value of the protonation constant of apo-MT

$m_{1,H} = 1.041 \pm 0.142$	$\log k_{O1,H} = 4.574 \pm 0.509$
$m_{2,H} = 3.784 \pm 0.226$	$\log k_{O2,H} = 7.084 \pm 0.161$
$m_{3,H} = 0.951 \pm 0.123$	$\log k_{O3,H} = 5.434 \pm 0.580$
$m_{4,H} = 6.020 \pm 1.041$	$\log k_{O4,H} = 8.772 \pm 0.266$
$m_{5,H} = 17.200 \pm 1.126$	$\log k_{O5,H} = 9.116 \pm 0.050$
$m_{6,H} = 0.774 \pm 0.217$	$\log k_{O6,H} = 7.841 \pm 1.171$

从  $m_{q,H}$  和  $\log k_{Oq,H}$  数据分析, 其中  $m_{5,H} = 17, \log k_{O5,H} = 9.116$ , 可联想到 MT 分子中 20 个半胱氨酸上的巯基。在半胱氨酸中, 巯基的离解常数  $pK = 8.33$  [5], 在蛋白分子中巯基的酸性变弱, 文[2]中估算的  $pK$  为 8.9, 这与 9.116 值相近;  $m_{1,H}, \log k_{O1,H}$  代表肽链中唯一的一个  $\alpha$ -羧基;  $m_{2,H}, \log k_{O2,H}$  代表 3 个天冬氨酸和一个谷氨酸的侧链羧基;  $m_{4,H}, \log k_{O4,H}$  代表 7 个赖氨酸侧链上的  $\epsilon$ -氨基。当然, 以上指认仅仅是一种推测, 况且  $m_{3,H}, \log k_{O3,H}$  和  $m_{6,H}, \log k_{O6,H}$  尚未能指认它们代表哪一种加质子基团, 但是这个结果至少可提供这样一个信息, 即在 apo MT 中存在着几类平衡常数不同的加质子基团。

将 pH 分别对  $\bar{n}_{H,cal}$  和  $\bar{n}_{H,exp}$  作图 2, 计算结果与实验值基本吻合, 说明加质子模型有相当的合理性。在 pH 为 3 时, apo MT 可离解质子数为 30, 即它以  $(MTH_{30})^{+10}$  形式存在, pH 为 7 时, 其形式为  $(MTH_{26})^{+6}$ , 到 pH 11 时, 全部质子解离, 与文(3)结果相似。

#### 3.2 apo MT 与 Cd(II) 的络合常数

在 pH 4.56 条件下, 以自由  $[Cd^{2+}]$  对  $\bar{n}_{Cd,exp}$  作图 3,

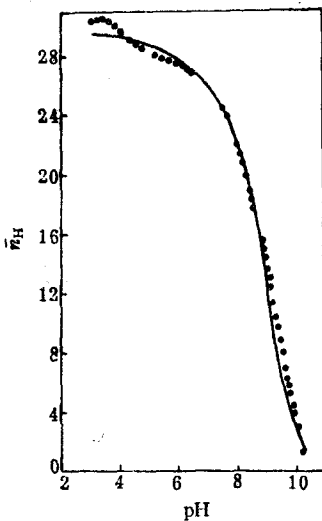


图 2  $\bar{n}_{H,exp}$  和  $\bar{n}_{H,cal}$  与 pH 关系

Fig. 2  $\bar{n}_{H,exp}$  and  $\bar{n}_{H,cal}$  vs pH value  
dot line  $\bar{n}_{H,exp}$  vs pH,  
solid line  $\bar{n}_{H,cal}$  vs pH

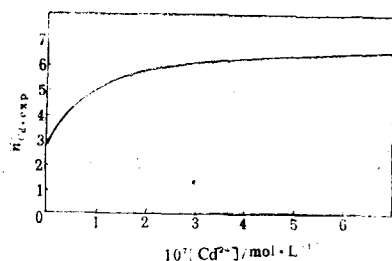


图3  $\bar{n}_{Cd,exp}$  与自由  $[Cd^{2+}]$  关系

Fig.3  $\bar{n}_{Cd,exp}$  vs free Cd ion concentration at pH 4.56

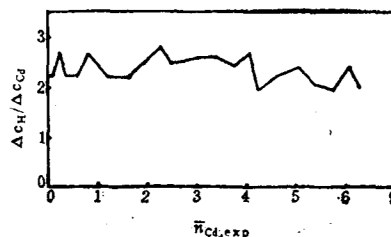


图4  $\Delta c_H/\Delta c_{Cd}$  与  $\bar{n}_{Cd,exp}$  关系 (pH 4.56)

Fig.4  $\Delta c_H/\Delta c_{Cd}$  vs  $\bar{n}_{Cd,exp}$  at pH 4.56

开始时,  $\bar{n}_{Cd,exp}$  随  $[Cd^{2+}]$  增加而迅速增加, 平均络合数  $\bar{n}_{Cd} > 3$  以后增长缓慢, 最后趋近  $\bar{n}_{Cd}$  为 7 的渐近线, 表明 MT 上结合 Cd 的最大数目为 7。

以 MT 的两个结构域模型对 (11) 式进行拟合, 得到络合 4 个 Cd(II) 的  $\alpha$ -结构域对镉的络合常数  $k_{\alpha, Cd}$  为  $4.89 \times 10^9$ , 而结合 3 个 Cd(II) 的  $\beta$ -结构域的  $k_{\beta, Cd}$  为  $6.73 \times 10^6$ 。  $k_{\alpha, Cd}$  比  $k_{\beta, Cd}$  大三个数量级。所以进入 MT 中的 Cd(II) 首先结合在  $\alpha$ -结构域上, 然后再进入  $\beta$ -结构域, 这与酶切实验结果一致<sup>[3]</sup>。由上可算出 MT 络合 7 个 Cd 的累积平衡常数  $\log \beta = 59.24$ 。

将  $(\Delta c_H/\Delta c_{Cd})$  对  $\bar{n}_{Cd,exp}$  作图 4。表明在 pH 4.56 条件下, apo MT 每结合一个 Cd 所放出质子数在 2 到 3 之间, 平均值为 2.5。

#### 参 考 文 献

- 1 Nielson K B, Atkin C L, Winge D R. *The Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260 (9):5342
- 2 Vařák M, Kägi J H R. *Spectroscopic Properties of Metallothionein*, New York and Basel: Marcel Dekker Inc. 1983. 261
- 3 Avdeef A, Zelazowski A J, Carvey J S. *Inorg. Chem.*, 1985, 24:1928
- 4 Kägi J H R, Kojima, Y. *Experientia Supplementum*, Vol. 52, *Metallothionein I*, Basel: Birkhauser Verlag 1987, 25-61
- 5 陶慰孙. 蛋白质分子基础, 北京: 人民教育出版社, 1981.11
- 6 段震文. 金属硫蛋白结构与性质研究: [博士论文]. 北京: 北京大学技术物理系, 1990

## DETERMINATION OF APO-METALLOTHIONEIN'S PROTONATION CONSTANTS AND COMPLEXING CONSTANTS WITH CADMIUM ION

Duan Zhenwen Wang Wenqing\* Chen Xiangyang Wang Xiangyun  
(Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871)

Ru Binggen

(Department of Biology, Peking University)

Chu Deying Lin Yu

(Department of Chemistry, Peking University)

#### ABSTRACT

Metallothionein (MT) is a protein of molecular weight about 6000 Dalton ob-

tained from liver of rat, rabbit and silver carp in our laboratory. Mammal's MT consists of 61 amino acid residues including 20 cysteine residues which has high affinity to metal and it appears to coordinate metals in two distinct configurations. Ions of at least eighteen different metals were associated with the protein. Most metals exhibited saturation binding at 7 mol eq forming  $M_7$ -MT. These included Bi(III), Cd(II), Co(II), Hg(II), In(III), Ni(II), Pb(II), Sb(III), and Zn(II). Other metals including Os(III), Pd(II), Pt(IV), Re(V), Rh(III) and Tl(III) give a positive indication of binding but their stoichiometries remained unclear. Ag(I) and Cu(I) bound in clusters as  $M_{12}$ -MT.

In this paper, rabbit liver MT which combined with 5 Cd(II) and 2 Zn(II) ion per protein was obtained by gel filtration and ion exchange after homogenization, centrifugation and deposition with ethanol from rabbits received cadmium chloride by subcutaneous injection. In  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  perchloric acid medium, the metal ions released from MT and apo-MT were obtained by gel filtration on a Sephadex G-25 column, the titration with sodium hydroxide and cadmium nitrate solution were carried out by combined pH electrode and cadmium ion selective electrode under nitrogen at 298 K.

According to the sequences of amino acid from rabbit liver MT-2, the binding sites were divided into six types. By using a simplified complexing model, six types of protonation group and two types of metal complexing region ( $\alpha$ - and  $\beta$ - domain) were obtained. The results were listed as follows.

$m_{1,H} = 1.041 \pm 0.142$	$\log k_{01,H} = 4.574 \pm 0.309$
$m_{2,H} = 3.784 \pm 0.226$	$\log k_{02,H} = 7.084 \pm 0.161$
$m_{3,H} = 0.851 \pm 0.123$	$\log k_{03,H} = 5.434 \pm 0.580$
$m_{4,H} = 6.020 \pm 1.041$	$\log k_{04,H} = 8.772 \pm 0.266$
$m_{5,H} = 17.200 \pm 1.126$	$\log k_{05,H} = 9.116 \pm 0.050$
$m_{6,H} = 0.774 \pm 0.217$	$\log k_{06,H} = 7.841 \pm 1.171$

Here  $m$  is the values of protonation binding point and  $k$  is the protonation equilibrium constant. The results show that the complexing ability of the  $\alpha$ -domain is 1000 times stronger than that of the  $\beta$ -domain.

$$\log k_{\alpha, \text{Cd}} = 9.689 \quad \text{and} \quad \log k_{\beta, \text{Cd}} = 6.828$$

It presents a quantitative description of the preferential order of the metal ions toward binding to the two domains, which is in consistent with the results of proteolysis by subtilisin and spectrum titration.

**Keywords:** Metallothionein, Protonation constants, Complexing constants of Cd(II) ion