

钙调素与重金属 Pb^{2+} 结合反应的 方波极谱与循环伏安法研究

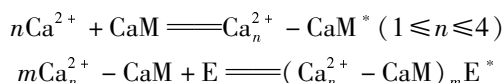
刘德龙¹, 吴彦环¹, 郭慧芳², 白娟², 孙大业²
(1. 河北师范大学化学学院, 2. 生命科学学院, 石家庄 050016)

摘要 采用方波极谱法研究了重金属 Pb^{2+} 与钙调素 (CaM) 的结合反应, 直接检测到 Pb^{2+} -CaM 配合物的存在, 并进一步利用循环伏安法研究了 Pb^{2+} -CaM 的电极反应. 在 $pH = 6.5$ 时, 用方波极谱法在 Pb^{2+} -CaM 体系中检测出 2 个还原峰, 峰电位分别为 $-0.44 \sim -0.47$ V 和 $-0.73 \sim -0.77$ V, 说明在 Pb^{2+} -CaM 体系中铅有 2 种存在形式, $-0.44 \sim -0.47$ V 的还原峰对应于游离态 Pb^{2+} , 电位更负的还原峰对应于配合物 [Pb^{2+} -CaM]. 2 个还原峰的峰电流均随着 $c_{Pb^{2+}}/c_{CaM}$ 比值增大而增大; 至 $c_{Pb^{2+}}/c_{CaM} \geq 10$ 后, 配合物 [Pb^{2+} -CaM] 的峰电流基本不再变化, 而游离态 Pb^{2+} 的峰电流则继续增大. 利用极谱滴定曲线的拐点可判断出 Pb^{2+} 在 CaM 中有 10 个结合位点. 进一步的测量结果表明, 循环伏安曲线出现游离态 Pb^{2+} 的氧化峰和还原峰, 而络合态的 [Pb^{2+} -CaM] 只有其还原峰, 反向电压扫描时不出现阳极波, 即没有相对应的氧化峰出现.

关键词 钙调素; 重金属离子 Pb^{2+} ; 结合位点; 方波极谱法; 循环伏安法

中图分类号 O657.14 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)11-2154-05

钙调素 (CaM) 是普遍存在于动植物体中的胞内钙受体蛋白, 它以 Ca^{2+} 依赖的形式调节 30 余种酶的活性及几十种细胞的生理过程^[1,2]. CaM 作为一种 Ca^{2+} 受体, 其活性受 Ca^{2+} 调控, 即 CaM 不论以何种方式发挥作用, 首先必须与 Ca^{2+} 结合形成活化态的 Ca^{2+} -CaM 复合体, 然后再与靶酶结合将其活化. 其过程可表达为



其中, * 表示 CaM 的活性构象, n 代表 CaM 活化所需结合的 Ca^{2+} 数, m 代表活化酶所需的 CaM 分子数, E 代表钙调素的靶酶. 尽管 Ca^{2+} -CaM 系统在细胞信号转导中发挥重要作用, 但近年来环境污染物 Cd^{2+} , Hg^{2+} 和 Pb^{2+} 等不断地侵入生物体内, CaM 有可能与这些金属离子结合, 尤其在静息细胞中. 研究发现, 广泛存在于生物体内的 CaM 与 Ca^{2+} 的结合并非专一, 许多二价与三价的金属离子, 凡离子半径与 Ca^{2+} 相似的 [离子半径为 (0.1 ± 0.02) nm] 均可在一定程度上取代 Ca^{2+} 而与 CaM 结合活化靶酶 MLCK 及 PDE 等, 并影响 CaM 的功能, 基于此, 出现了重金属通过 CaM 介导的中毒机制假说^[3-6].

基于重金属 Pb^{2+} 具有高灵敏度方波极谱的特点, 本文利用方波极谱法研究 Pb^{2+} 与 CaM 直接结合反应, 在 Pb^{2+} 和 CaM 混合物体系中直接检测到 Pb^{2+} -CaM 配合物; 并利用循环伏安法研究了 Pb^{2+} -CaM 体系在静止汞电极上的电极反应过程. 这为 Pb^{2+} 通过 CaM 介导的中毒机制提供了直接证据. 本法可将研究体系的 CaM 浓度下降至生物体内真实浓度范围, 从而更具生物学意义.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI-660B 型电化学工作站 (上海辰华仪器公司), 高纯氮气发生器 (天津市天分仪器厂), Glison 微量移液器 (法国 Glison 公司), 铂电极和甘汞电极 (上海雷磁仪器厂), Orion868 酸度计 (美国 Orion

收稿日期: 2009-05-31.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 20475013) 资助.

联系人简介: 刘德龙, 男, 博士, 教授, 主要从事生物分析化学与化学生物学方面研究. E-mail: delongliu9012@sina.com

公司), 可控生长汞电极(美国 BAS 公司).

苯琼脂糖水层析柱(Phenyl-sepharose 4B, 美国 Sigma 公司), Chelex-100(美国 Sigma 公司). KNO_3 , $Pb(NO_3)_2$ 和六次甲基四胺均为分析纯, 北京化工厂. 配制溶液均用石英亚沸二次蒸馏水, 所用玻璃器皿均用 1:1(体积比) HNO_3 水溶液浸泡 24 h, 并用重蒸馏水冲洗, 以除去杂质离子.

1.2 拟南芥 CaM 的纯化

从工程菌中制备并纯化拟南芥 CaM. 首先构建表达载体, 将拟南芥 CaM(II) 基因转移到大肠杆菌中, 然后再通过扩培大肠杆菌, 使拟南芥 CaM 基因在大肠杆菌中得到表达, 最后收集并破碎菌体, 将溶液在 90 °C 加热 3 min, 离心后上清液经过苯琼脂糖水层析纯化. 所制备的 CaM 经 SDS 电泳银染色为一条带, CaM 浓度以牛脑 CaM 为标准蛋白的 Bradford 法进行校正^[7]. 全部缓冲溶液及 CaM 均经过 Chelex-100 脱钙处理.

1.3 Pb^{2+} 方波极谱

在一系列 10 mL 小烧杯中, 加入 1.00 mL 浓度为 0.5 mol/L, pH = 6.5 的六次甲基四胺缓冲溶液和 1.00 mL 0.5 mol/L 的 KNO_3 惰性电解质, 加水至 5.00 mL, 用微量移液器加入不同浓度的 Pb^{2+} 标准溶液, 通氮除氧 10 min 后, 测量不同浓度 Pb^{2+} 的方波极谱及峰电流值 i_p .

1.4 Pb^{2+} 与 CaM 的结合

在 10 mL 小烧杯中, 加入 1.00 mL 0.5 mol/L 的 KNO_3 , 1.00 mL 0.5 mol/L 的 pH = 6.5 的六次甲基四胺和一定量的 CaM, 加水至 5.00 mL. 将溶液通氮除氧 10 min, 用微量移液器加入不同浓度的 Pb^{2+} 标准溶液, 每次均搅拌通氮气 10 min, 使溶液中 Pb^{2+} 与 CaM 充分反应. 测量方波极谱波和峰电位值, 根据实验数据以 i_p 为纵坐标, 以 $c_{Pb^{2+}}/c_{CaM}$ 为横坐标作图, 得到滴定曲线.

1.5 循环伏安法测定 CaM 与 Pb^{2+} 体系的电极反应

在 10 mL 小烧杯中, 依次加入 1.00 mL 0.5 mol/L 的 KNO_3 , 1.00 mL 0.5 mol/L 的 pH = 6.5 的六次甲基四胺以及一定量的 CaM 和 Pb^{2+} , 加水至 5.00 mL, 将溶液通氮除氧 10 min 后, 测定循环伏安图.

2 结果与讨论

2.1 Pb^{2+} 的方波极谱

不同浓度 Pb^{2+} 的方波极谱如图 1 所示. Pb^{2+} 还原峰位置为 -0.4 V 左右, i_p 与 Pb^{2+} 浓度呈良好的线性关系, 在此体系中即使 Pb^{2+} 浓度低至 2×10^{-7} mol/L 时亦可灵敏地检测出峰值. 因此用本法可以方便地检出复杂体系中的 Pb^{2+} .

2.2 Pb^{2+} 与 CaM 结合反应的方波极谱及结合位点数测定

1.0×10^{-6} mol/L 的 CaM 底液的方波极谱, 结果表明在 -300 ~ -1000 mV 范围内为一个平滑曲线(图略), 即无干扰峰存在. 在 1.0×10^{-6} mol/L CaM 溶液中, 加入不同量的 Pb^{2+} 溶液, 通氮除氧 10 min 后扫描方波极谱. 图 2(A) 为加入 Pb^{2+} 浓度为 1.0×10^{-6} , 2.0×10^{-6} , 3.0×10^{-6} , 4.0×10^{-6} , 5.0×10^{-6} , 6.0×10^{-6} , 7.0×10^{-6} , 8.0×10^{-6} , 9.0×10^{-6} 及 10.0×10^{-6} mol/L 时 Pb^{2+} -CaM 的方波极谱图.

由图 2(A) 可以看到, 有 2 个还原峰对应于溶液中的 2 种还原组分. 前一个还原峰在 -0.44 ~ -0.47 V 范围内, 与游离态 Pb^{2+} 的还原峰位置相接近, 所以前一个峰为 Pb^{2+} 的方波还原峰; 因为 CaM 本身在 -0.3 ~ -1.0 V 范围内无还原峰存在, 而加入 Pb^{2+} 后在 -0.73 ~ -0.77 V 范围出现了还原峰, 此峰又非 Pb^{2+} 离子本身的还原峰, 因此后一个峰应为 Pb^{2+} 与 CaM 形成配合物的极谱还原

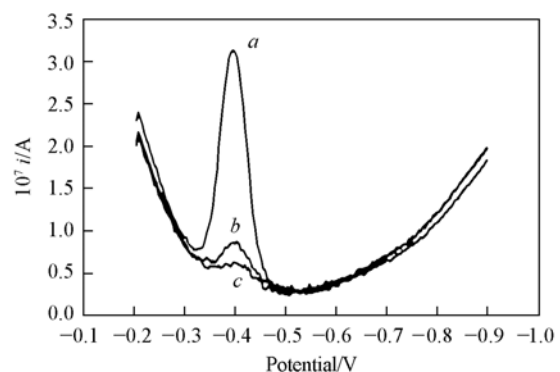


Fig. 1 Square wave polarographic curves of Pb^{2+}
 $c_{Pb^{2+}}/(mol \cdot L^{-1})$: a. 5.0×10^{-7} ;
 b. 1.0×10^{-6} ; c. 5.0×10^{-6} .

峰, 即 2 个还原峰分别对应于游离态 Pb^{2+} 和配合物 $[\text{Pb}^{2+}-\text{CaM}]$, 这就说明每次加入的 Pb^{2+} , 一部分以游离态 Pb^{2+} 存在, 而另一部分与 CaM 形成配合物以络合态存在。

另外, 从图 2(A) 还可以发现, 随着加入 Pb^{2+} 总浓度的增大, 2 个还原峰均上升, 表明游离态 Pb^{2+} 和配合物 $[\text{Pb}^{2+}-\text{CaM}]$ 的浓度都增大; 当 Pb^{2+} 与 CaM 的浓度比值 $c_{\text{Pb}^{2+}}/c_{\text{CaM}} \geq 10$ 时, 配合物 $[\text{Pb}^{2+}-\text{CaM}]$ 的峰电流基本不再变化, 而游离态 Pb^{2+} 峰电流则继续成比例增大[图 2(B)]。

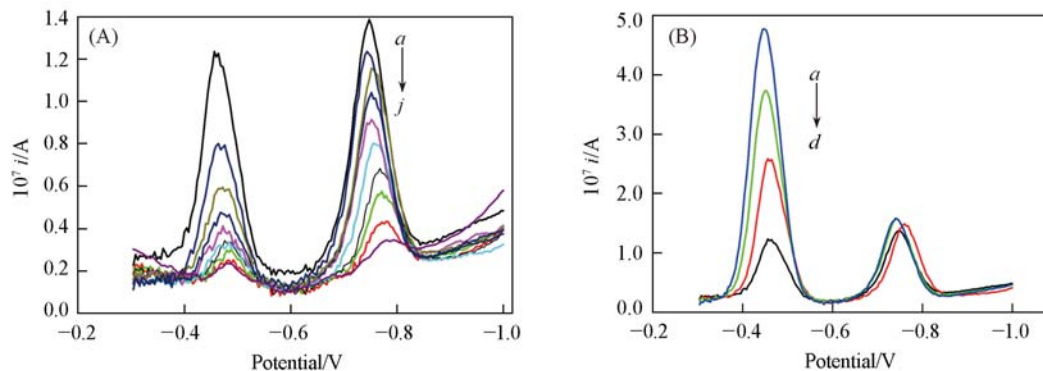


Fig. 2 Square wave polarographic curves of $\text{Pb}^{2+}-\text{CaM}$

(A) $c_{\text{Pb}^{2+}}/c_{\text{CaM}}$: a. 10.0, b. 9.0, c. 8.0, d. 7.0, e. 6.0, f. 5.0, g. 4.0, h. 3.0, i. 2.0, j. 1.0;

(B) $c_{\text{Pb}^{2+}}/c_{\text{CaM}}$: a. 10.0, b. 12.0, c. 14.0, d. 16.0. $[\text{CaM}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.

分别以 Pb^{2+} 的还原峰电流及配合物 $[\text{Pb}^{2+}-\text{CaM}]$ 的还原峰电流 i_p 为纵坐标, 以 $c_{\text{Pb}^{2+}}/c_{\text{CaM}}$ 为横坐标作图, 得滴定曲线(图 3)。

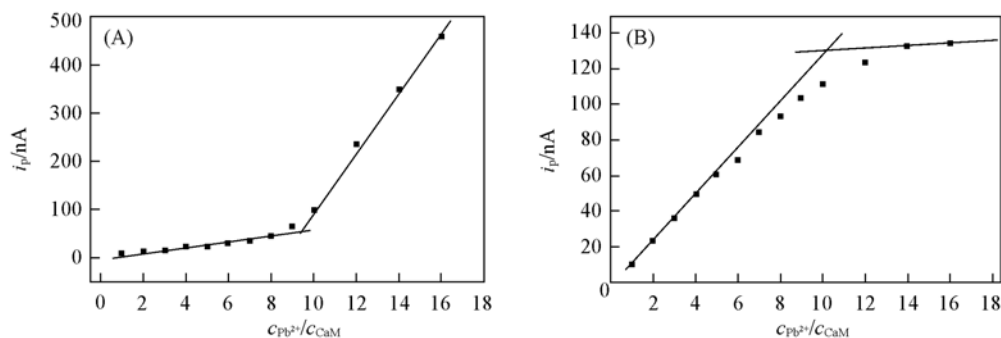
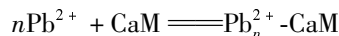


Fig. 3 Polarographic titration curves of free Pb^{2+} (A) and complex $[\text{Pb}^{2+}-\text{CaM}]$ (B) in $\text{Pb}^{2+}-\text{CaM}$ system

$[\text{CaM}] = 1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.

由图 3(A) 可知, 在加入 1 ~ 10 倍量的 Pb^{2+} 时, Pb^{2+} 还原峰电流数值增加幅度很小, 继续滴定则 Pb^{2+} 还原峰电流数值迅速增大, 2 条直线的交点为 10. 而图 3(B) 的情况与图 3(A) 恰好相反, 即在加入 1 ~ 10 倍量的 Pb^{2+} 时, 配合物峰电流数值增加幅度较大, 而后的滴定则还原峰电流数值基本不变, 2 条直线的交点亦为 10. 这些特点可用如下的反应机理来说明。

设 Pb^{2+} 与 CaM 的结合反应为



式中, n 代表实验条件下 CaM 可结合的 Pb^{2+} 数. $c_{\text{Pb}^{2+}}$ 和 c_{CaM} 代表溶液中 Pb^{2+} 和 CaM 的总浓度, $[\text{Pb}^{2+}]$ 和 $[\text{CaM}]$ 分别代表 Pb^{2+} 与 CaM 的游离浓度. 根据物料平衡, 有:

$$c_{\text{Pb}^{2+}} = n[\text{Pb}_n^{2+}-\text{CaM}] + [\text{Pb}^{2+}]$$

$$c_{\text{CaM}} = [\text{CaM}] + [\text{Pb}_n^{2+}-\text{CaM}]$$

假设实验中保持 CaM 浓度不变(即 c_{CaM} 为常数), 并且 Pb^{2+} 与 CaM 结合很稳定. 当向 CaM 溶液中加入不同浓度的 Pb^{2+} 时, 若 $c_{\text{Pb}^{2+}} \leq nc_{\text{CaM}}$, 则加入的 Pb^{2+} 一部分以游离态存在, 另一部分与 CaM 结合处于结合态. 由于 $i_{\text{Pb}^{2+}} = k[\text{Pb}^{2+}]$, $i_{\text{Pb}_n^{2+}-\text{CaM}} = k'[\text{Pb}_n^{2+}-\text{CaM}]$ (k, k' 分别代表自由 Pb^{2+} 和络合态 $\text{Pb}_n^{2+}-\text{CaM}$ 的灵敏度系数), 故可分别测出 Pb^{2+} 和 $\text{Pb}_n^{2+}-\text{CaM}$ 的还原峰电流值. 随着 Pb^{2+} 的加入, CaM 的金属结合

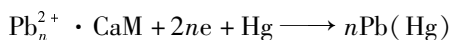
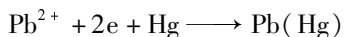
位点全部被 Pb^{2+} 饱和, 因此 $[Pb_n^{2+}-CaM]$ 基本为一常数, 随后再加入的 Pb^{2+} 全部以游离态存在, $i_{Pb^{2+}}$ 与过量 Pb^{2+} 浓度成正比, 根据 2 条 i_p 直线的交点可判断出 n 值。

利用极谱滴定曲线的拐点可判断出 Pb^{2+} 在 CaM 中有 10 个结合位点. 这与文献[8,9]使用微量热法及 NMR 等方法测得的数据基本一致, 但文献[8,9]的实验体系中 CaM 浓度一般为 100 ~ 1000 $\mu\text{mol/L}$. 而本法可将研究体系的 CaM 浓度下降至生物体内真实浓度范围, 即 10^{-6} mol/L 量级, 因而实验结果更具生物学实际意义。

2.3 循环伏安法研究 CaM 与 Pb^{2+} 体系的电极反应过程

在浓度为 1.0×10^{-6} mol/L 的 CaM 溶液中, 加入 5.0×10^{-4} mol/L Pb^{2+} 溶液 110 μL , 测定循环伏安曲线. 图 4 为扫描速率为 100 mV/s 时 Pb^{2+} -CaM 体系的循环伏安图。

图 4 中, 上部的曲线代表正向扫描时的阴极反应曲线, 而下部的曲线对应于反扫的氧化曲线, 阴极反应曲线中出现 2 个还原峰, 峰电位为 -0.48 和 -0.78 V 左右, 分别对应于游离态 Pb^{2+} 和络合态 $[Pb_n^{2+}-CaM]$ 的还原峰, 由于络合态 $[Pb_n^{2+}-CaM]$ 中的 Pb^{2+} 不易还原, 故其还原峰更负. 二者的电极反应表示如下:



而氧化曲线中只出现一个 -0.47 V 左右的氧化峰, 对应于还原反应生成的 $Pb(Hg)$ 的氧化反应, 由于游离态 Pb^{2+} 和络合态 $[Pb_n^{2+}-CaM]$ 的还原反应都只生成 $Pb(Hg)$, 故氧化峰只有一个, 这就是不出现对应于络合态 $[Pb_n^{2+}-CaM]$ 氧化峰的缘故. 另外, 图 4 中 $Pb(Hg)$ 的氧化峰高度也确实大于 Pb^{2+} 还原峰的高度。

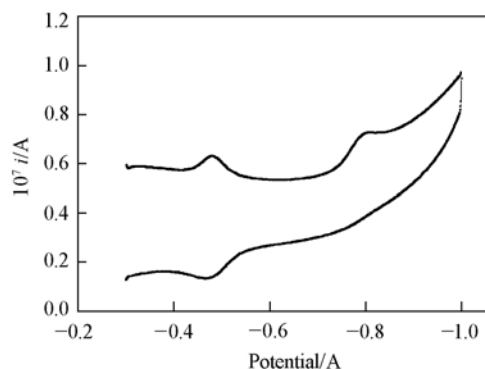


Fig. 4 Cyclic voltammograms of the Pb^{2+} -CaM system

$c_{Pb^{2+}}/c_{CaM} = 11.0$, $[CaM] = 1.0 \times 10^{-6}$ mol/L.

Scan rate: 100 mV/s.

3 结 论

基于 Pb^{2+} 具有高灵敏度的方波极谱的特点, 利用方波极谱法研究了重金属 Pb^{2+} 与 CaM 的结合反应. 在 Pb^{2+} 和 CaM 混合物体系中直接检测到 Pb^{2+} -CaM 配合物. 利用极谱滴定曲线的拐点可判断出 Pb^{2+} 在 CaM 中有 10 个结合位点. 这是一种高灵敏度且相当直观的研究 Pb^{2+} 与 CaM 结合位点数的方法。

测量结果表明, 循环伏安出现游离态 Pb^{2+} 氧化峰和还原峰, 而络合态的 $[Pb^{2+}-CaM]$ 只有其还原峰, 反向电压扫描时不出现阳极波, 即没有相对应的氧化峰出现. 这为 Pb^{2+} 通过 CaM 介导的中毒机制提供了直接证据。

参 考 文 献

- [1] SUN Da-Ye(孙大业), GUO Yan-Lin(郭艳林), MA Li-Geng(马力耕), *et al.*. Cellular Signal Transduction, 3rd Ed. (细胞信号转导, 第三版)[M], Beijing: Science Press, 2001: 104—114
- [2] Vogel H. J.. Biochem. Cell Biol. [J], 1994, **72**: 357—376
- [3] Chao S. H., Suzuki Y., Zysk J. R., *et al.*. Mol. Pharmacol. [J], 1984, **26**(1): 75—82
- [4] Sandhir R., Gill K. D.. Biochem. Mol. Biol. Int. [J], 1994, **33**(4): 729—742
- [5] Chao S. H., Bu C. H., Cheuny W. Y.. Arch Toxicol. [J], 1995, **69**(3): 197—203
- [6] Ouyang H., Vogel H. J.. BioMetal. [J], 1998, **11**: 213—222
- [7] LIU De-Long(刘德龙), SUN Da-Ye(孙大业), YANG Yan-Sheng(杨燕生), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities (高等学校化学学报)[J], 2000, **21**(6): 860—864
- [8] Cox J. A.. Biochem. J. [J], 1988, **249**: 621—629
- [9] Milos M., Comte M., Schaer J. J., *et al.*. J. Inorg. Biochem. [J], 1989, **36**(1): 11—25

Direct Binding of Reaction Pb^{2+} to Calmodulin by Square Wave Polarography and Cyclic Voltammetry

LIU De-Long^{1*}, WU Yan-Huan¹, GUO Hui-Fang², BAI Juan², SUN Da-Ye²

(1. College of Chemistry, 2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract Calmodulin(CaM) is a highly conserved Ca^{2+} binding protein ubiquitously found in animals and plants, which is involved in a large variety of cellular functions. The presence of many other metal ions in the physiological and nonphysiological environment such as heavy metal ions suggests that CaM might be binding other metal ions than Ca^{2+} , which might influence CaM's function. It is important to investigate the general metal ion binding properties of CaM. Based on high sensitivity of square wave polarographic signal of Pb^{2+} , the direct binding reaction of Pb^{2+} to CaM was studied by square wave polarography(SWP). The complexing specie, Pb^{2+} -CaM, was detected for the first time by SWP in the Pb^{2+} -CaM system, and electrochemical reaction characterization was done by cyclic voltammetry. Two reduction peaks were detected in SWP polarograms obtained at different concentration ratios of Pb^{2+} to CaM at pH = 6.5, indicating that two electroactive species of Pb^{2+} exist, the reduction peak potentials of two species are in the range of -0.44 — -0.47 V and -0.73 — -0.77 V *vs.* SCE, respectively. The peak with a maximum at *ca.* -0.44 — -0.47 V is corresponding to the reduction of free Pb^{2+} under our experimental conditions and the peak with a maximum at *ca.* -0.73 — -0.77 V, clearly more negative than that for the reduction of free Pb^{2+} , allows us to interpret it as due to the reduction of Pb^{2+} complexed by CaM. Moreover, prior to the addition 10 times of Pb^{2+} , two peak currents increase gradually with the increasing of the Pb^{2+} concentration. At higher metal ion concentration (10—16 times), the peak currents of free Pb^{2+} increased linearly with a higher value of the slope, while the peak currents of the complexing specie, Pb^{2+} -CaM, reached maximal and constant. The polarographic titration curves of the two species show that there are ten binding sites in CaM at pH = 6.5. Furthermore, the reduction species of Pb^{2+} -CaM system was confirmed by cyclic voltammetry with Controlled Growth Mercury Electrode(CGME). One couple of the free Pb^{2+} redox waves were observed clearly in the cyclic voltammogram, and only the reduction peak of the complexing specie of Pb^{2+} -CaM system was detected. The results obtained in the paper show a direct evidence for the mechanism of the toxicity of Pb^{2+} by CaM mediating.

Keywords Calmodulin; Heavy metal ion Pb^{2+} ; Binding site; Square wave polarography; Cyclic voltammetry
(Ed. : F, G)