

# 荧光法测定 $Ce^{3+}$ 与 tRNA 的结合常数<sup>\*</sup>

孟建新<sup>1)</sup> 周建英<sup>1)</sup> 涂华民<sup>2)</sup> 龚孟濂<sup>2)</sup> 杨燕生<sup>2)</sup>

(1) 中山大学超快速激光光谱学国家重点实验室, 广州 510275; 2) 中山大学化学系)

**摘要** 与其它稀土离子的自身荧光相比, 稀土  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光要强得多, 并且在很宽的浓度范围内与其浓度成很好的正比关系, 因此可以用来确定  $Ce^{3+}$  离子的浓度. tRNA 非常强烈地猝灭  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光. 采用荧光滴定的方法研究了  $Ce^{3+}$ -tRNA 体系, 并用 Scatchard 方法测量了  $Ce^{3+}$  离子和 tRNA 的结合数和结合常数, 结果发现: tRNA 中有 2 组  $Ce^{3+}$  结合位置, 其结合常数分别为约  $10^8$  mol/L 和  $10^6$  mol/L. 向体系中加入精胺可使结合数和结合常数稍微降低.

**关键词**  $Ce^{3+}$  离子, tRNA, 荧光, Scatchard 方法

**分类号** O 614. 33. 622

转移核糖核酸 (tRNA) 是一种重要的核酸分子, 在生物体蛋白质的生物合成中起着关键性的作用. 在所有的天然 tRNA 中都发现  $Mg^{2+}$  离子和精胺的存在, 对稳定 tRNA 的高级结构及完成 tRNA 的生理功能来说这种存在是必需的<sup>[1]</sup>. 已经发现镧系离子 ( $Ln^{3+}$ ) 可以取代 tRNA 中的  $Mg^{2+}$  离子, 取代后不仅 tRNA 的结构不会明显变化, tRNA 的功能也可以部分保持<sup>[2]</sup>. 因此, 研究  $Ln^{3+}$  离子与 tRNA 的相互作用不仅有助于弄清  $Mg^{2+}$  离子在 tRNA 生理过程中的作用, 而且对回答稀土农用的安全性问题也有重要的意义.

尽管稀土  $Tb^{3+}$  和  $Eu^{3+}$  离子发光探针在蛋白质的结构研究中取得了很大的成功, 但仅对少数几种 tRNA 进行了研究<sup>[3,4]</sup>. 这是由于 tRNA 分子对  $Tb^{3+}$  或  $Eu^{3+}$  的荧光敏化作用很弱, 因此只对含有某些非常见碱基的 tRNA, 如含有  $s^4U$  碱基的 *E. Coli* tRNA, 含有 Y 碱基的酵母 tRNA<sup>Phe</sup> 等进行过稀土发光探针的研究, 而大量未含非常见碱基的 tRNA 无法用这种方法进行分析. 本文描述了一种用  $Ce^{3+}$  离子的荧光测定稀土离子和生物分子结合常数的新方法, 可广泛应用于包括各种 tRNA 在内的大量的生物分子, 并用这种方法研究了  $Ce^{3+}$  离子和 tRNA 的相互作用.

## 1 样品测定

酵母 tRNA<sup>Phe</sup> 和混合酵母 tRNA 及精胺均为商品试剂. 商品 tRNA 中均含有  $Mg^{2+}$  离子, 这些  $Mg^{2+}$  离子在实验中对测定结果有影响, 因此使用文献 [5] 的方法对 tRNA 进行

\* 国家自然科学基金 (29705004) 和国家教委跨世纪优秀人才基金资助项目

收稿日期: 1997-09-25 孟建新, 男, 30 岁, 博士后

脱镁处理,以除去其中的  $Mg^{3+}$  离子.使用分光光度法测定 0.01 mol/L NaOH 溶液中的 tRNA 在 260 nm 处的吸收值,按 0.001 mol/L 的 tRNA 的吸收值为 8.3 来确定 tRNA 的浓度<sup>[5]</sup>.分别用盐酸 (AR) 溶解  $CeO_2$  ( $w=99.99\%$ ) 和  $La_2O_3$  ( $w=99.95\%$ ) 得到  $CeCl_3$  和  $LaCl_3$  的溶液,并用 EDTA 滴定法确定稀土离子的浓度.

体系中稀土离子的存在会加速 tRNA 的多核苷酸链的断裂,同时这种断裂对溶液的 pH 很敏感,在 pH 为 6.0 时的裂解速度比 pH 为 7.0 时的要小得多<sup>[6]</sup>.所以在实验中采用的缓冲溶液为含有 0.02 mol/L 六次甲基四胺-HCl 0.025 mol/L NaCl 的 pH 为 6.0 的缓冲溶液.

荧光滴定用岛津 RF-5000 荧光分光光度计进行.滴定前所有的储液均用 pH 6.0 的缓冲溶液稀释到所需浓度,并准确调节 pH 为 6.0.滴定时首先在石英比色皿中加入 2 mL 的 tRNA 溶液,然后用微量移液器依次加入所需的精胺和  $LnCl_3$  溶液.每个样品点测定前样品溶液均摇匀 1 min,静置 5 min,然后再测定荧光强度 ( $F$ ).

## 2 实验原理

Scatchard 方法<sup>[7]</sup>作为一种有效的方法已广泛应用于金属离子和生物分子相互作用的研究中.它不仅适用于生物分子中只有 1 个或 1 组金属离子结合位置的情况,也适用于生物分子中有多个金属离子结合位置的情况,尤其可以比较好地分析生物分子中的多个金属离子结合位置间有协同作用的体系.因此在金属离子与 tRNA 的相互作用研究中大量地应用这种方法.

采用 Scatchard 方法测定  $Ce^{3+}$  和 tRNA 的结合数和结合常数,需要确定滴定过程中 2 个 Scatchard 坐标的变化.如果定义滴定过程中未与 tRNA 结合的  $Ce^{3+}$  水合离子的浓度为  $c$ ,则 2 个 Scatchard 坐标分别为:每个 tRNA 结合的  $Ce^{3+}$  离子的个数  $\nu$  以及  $\nu$  与  $c$  的比值 ( $\nu/c$ ).对于普遍的情况,生物分子中可能有  $i$  组不同的金属离子结合位置,这时  $\nu$  和  $\nu/c$  与金属离子的结合数和结合常数之间有如下关系

$$\nu = \sum_i \frac{N_i K_i^T c^i}{1 + K_i^T c^i} \quad \nu/c = \sum_i \frac{N_i K_i^T c^{i-1}}{1 + K_i^T c^i}$$

其中,  $N_i$ ,  $K_i$  分别为第  $i$  组结合位置的结合数和结合常数,  $T$  表示第  $i$  组结合位置的各个位置之间协同性的参数.对非协同的结合位置,  $T=1$ .对金属离子和 tRNA 结合的情况,通常用 1 组协同结合位置和 1 组非协同结合位置可以比较好地处理,这时的 Scatchard 坐标为

$$\nu = \frac{N_1 K_1^T c^T}{1 + K_1^T c^T} + \frac{N_2 K_2 c}{1 + K_2 c} \quad \nu/c = \frac{N_1 K_1^T c^{T-1}}{1 + K_1^T c^T} + \frac{N_2 K_2}{1 + K_2 c}$$

根据实验所得的  $\nu$  和  $\nu/c$  数据作图,再用一定的方法对曲线进行拟合可得到协同结合位置的结合参数  $N_1$ ,  $K_1$ ,  $T$  和非协同结合位置的参数  $N_2$ ,  $K_2$  的值.详细的处理过程可参考文献 [8].

## 3 结果与讨论

### 3.1 $Ce^{3+}$ 离子的荧光

$Ce^{3+}$  离子的荧光受 pH 的影响十分明显.在酸性溶液 ( $pH < 6.0$ ) 中,  $Ce^{3+}$  离子的最大荧光激发峰在 254.8 nm,最大荧光发射峰位于 355 nm,但在碱性溶液中,在 230 nm 处出现另外 1 个激发峰,同时体系总的  $F$  下降很多.图 1 示出了  $0.5 \times 10^{-6}$  mol/L  $CeCl_3$  溶液在 pH 6.0 的缓冲溶液中的激发和发射光谱.在  $Ce^{3+}$  离子的浓度  $[c(Ce^{3+})]$  为  $10^{-6} \sim 10^{-5}$  mol/L

的范围内,  $Ce^{3+}$  在 355 nm 处的  $F(254.8 \text{ nm 激发})$  与其有很好的正比关系, 因此, 可以用  $Ce^{3+}$  水合离子在此处的  $F$  来确定  $c(Ce^{3+})$ 。此外, 还进行了用精胺滴定  $Ce^{3+}$  溶液的实验, 结果表明精胺的加入对  $Ce^{3+}$  离子的荧光没有影响。

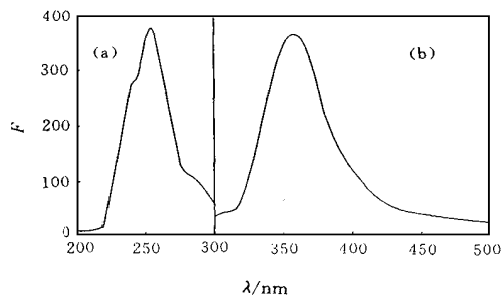


图 1  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光光谱

Fig. 1 Fluorescence spectrum of  $Ce^{3+}$  aqua ion

(a) 激发光谱 ( $\lambda_{em} = 355 \text{ nm}$ );

(b) 发射光谱 ( $\lambda_{ex} = 254.8 \text{ nm}$ )

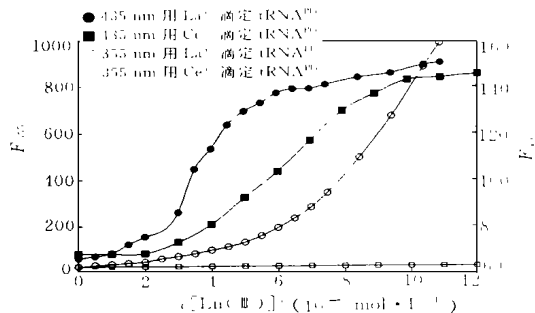


图 2 用  $Ln^{3+}$  滴定  $tRNA^{Phe}$  时的  $F_{355}$  和  $F_{435}$  变化 ( $\lambda_{ex} = 254.8 \text{ nm}$ )

Fig. 2 Change of  $F_{355}$  and  $F_{435}$  when titration  $tRNA^{Phe}$  with  $Ln^{3+}$

### 3.2 $Ln^{3+}$ -tRNA 体系的荧光

Horrocks 等人<sup>[8]</sup>发现尽管  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光被 EDTA 猝灭, 但不会被具有类似结构的 EDTP 或 DTPP 猝灭。由于很多生物分子都与 EDTP 和 DTPP 一样含有磷酸根基团, 因此他们尝试将  $Ce^{3+}$  离子发展为一种新的稀土离子发光探针, 但结果发现磷酸、核苷酸及 DNA 都猝灭  $Ce^{3+}$  离子的荧光, 因此放弃了这方面的努力。虽然通过实验证实  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光同样会被酵母混合 tRNA 或酵母  $tRNA^{Phe}$  所猝灭, 但只要体系中没有其他因素干扰溶液中  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光, 则这种荧光猝灭现象仍有可能做为 tRNA- $Ce^{3+}$  体系的探针。

对于  $Ce^{3+}$ -tRNA 体系来讲, 由于 tRNA 有自身荧光, 这种自身荧光对体系总的荧光有一定的贡献, 从而对  $Ce^{3+}$  水合离子  $F$  的确定产生影响。如混合酵母 tRNA 的最强荧光激发和发射峰分别位于 277 nm 和 345 nm, 与  $Ce^{3+}$  水合离子的相应谱峰非常接近。而酵母  $tRNA^{Phe}$  中由于强荧光的 Y 碱基的存在, 其最大激发和发射峰分别位于 246 nm 和 435 nm, 与  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光谱峰也有一定程度的重叠。为了考察稀土离子的加入对 tRNA 自身荧光的影响, 首先通过将不具有任何荧光, 而配位性质和  $Ce^{3+}$  十分相近的  $La^{3+}$  离子加入到 tRNA 溶液中, 证实  $La^{3+}$  对 tRNA 在 355 nm 处的自身荧光没有影响, 从而间接说明了在  $Ce^{3+}$ -tRNA 体系中  $Ce^{3+}$  与 tRNA 的配位作用将不会影响体系在 355 nm 处的荧光变化, 也就是说: 在  $Ce^{3+}$ -tRNA 体系中 355 nm 处的荧光增强完全是由于体系中  $Ce^{3+}$  水合离子浓度的增加所致, 从而可以用  $F$  的增加来确定体系中的  $c(Ce^{3+})$ 。但用  $La^{3+}$  滴定酵母  $tRNA^{Phe}$  的结果 (图 2) 表明,  $La^{3+}$  的加入使酵母  $tRNA^{Phe}$  在 435 nm 处的荧光增强, 滴定曲线呈“S”形状。这与用  $Ce^{3+}$  滴定酵母  $tRNA^{Phe}$  时 435 nm 处的荧光 (图 2) 变化趋势是相似的。但在  $Ce^{3+}$  水合离子的荧光峰位置 355 nm, 用  $La^{3+}$  滴定酵母  $tRNA^{Phe}$  时荧光强度不变化 (图 2)。这表明, 尽管  $Ce^{3+}$  将明显影响酵母  $tRNA^{Phe}$  的荧光, 但不会对  $Ce^{3+}$  水合离子的  $F$  的确定产生影响, 从而可以用体系 355 nm 处的  $F_{355}$  变化来确定  $Ce^{3+}$ -tRNA<sup>Phe</sup> 体系中  $c(Ce^{3+})$ 。

### 3.3 $Ce^{3+}$ 与 tRNA 的结合常数

表 1 列出了不同条件下用  $Ce^{3+}$  滴定 tRNA 过程中  $F_{355}$  的变化. 根据同一 tRNA 浓度及  $Ce^{3+}$  大大过量的条件下的数据确定了试验条件下  $c(Ce^{3+})$  与  $F$  的对应关系. 并进而用  $Ce^{3+}$  水合离子的  $F$  确定了滴定过程中未结合的  $c(Ce^{3+})$ , 然后从下式得到  $\nu$  和  $\nu/c$  坐标的值

$$\nu = (c_s - c) / c(\text{tRNA}) \quad \nu/c = [c_s / (c - 1)] / c(\text{tRNA})$$

其中,  $c_s$  为每一滴定点加入的  $Ce^{3+}$  离子的总浓度,  $c(\text{tRNA})$  为滴定开始时加入的 tRNA 的浓度. 这个浓度在整个滴定过程中是近似不变的. 再采用 Scatchard 方法求得了  $Ce^{3+}$  和酵母混合 tRNA 及酵母 tRNA<sup>Phe</sup> 的  $K$ , 结果如表 2

表 1 用  $Ce^{3+}$  滴定 tRNA 过程中  $F_{355}$  变化

Tab. 1 Change of  $F_{355}$  when tRNA<sup>Phe</sup> was titrated with  $Ce^{3+}$

$c/(10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	10	12	14	16	18	20	22
酵母混合 tRNA	3.66	7.94	14.0	22.9	35.8	52.3	73.2	97.3	157	232	324	435	565	712	873
酵母 tRNA <sup>Phe</sup>	6.65	10.2	14.0	19.2	28.0	43.2	64.8	90.9	153	233	331	450	589	743	911
酵母 tRNA <sup>Phe</sup> + 精胺	3.30	8.17	15.4	26.0	40.5	58.9	81.1	107	171	251	351	470	609	764	932

表 2  $Ce^{3+}$  与 tRNA 结合常数和结合数测量结果

Tab. 2 Binding number and binding constants of  $Ce^{3+}$  with tRNA from Scatchard plot

样品	$n_1 + n_2$	$n_1$	$\frac{K_1}{(10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})}$	T	$n_2$	$\frac{K_2}{(10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})}$
酵母混合 tRNA	17.9	4.1	11	1.2	13.8	4.2
酵母 tRNA <sup>Phe</sup>	17.1	4.1	10	2.5	13.0	4.5
酵母 tRNA <sup>Phe</sup> + 精胺	17.0	4.1	10	-	12.9	4.3

从表 2 的数据可知,  $Ce^{3+}$  与 tRNA 总的  $N$  约为 17, 其中协同结合位置 4 个,  $K$  比非协同结合位置大得多. 在已知的含  $Mg^{2+}$  的 tRNA<sup>Phe</sup> 单晶中, 每个 tRNA 分子与 4 个  $Mg^{2+}$  离子结合, 与测得的协同结合位置的数目相同, 这表明溶液中稀土  $Ce^{3+}$  离子和  $Mg^{2+}$  离子有相同的强结合位置. 而对非协同结合位置来讲, 其结合常数与稀土与多核苷酸的结合常数在 1 个数量级, 表明这些结合位置位于 tRNA 的多核苷酸链上.

### 3.4 精胺对 $Ce^{3+}$ 酵母 tRNA<sup>Phe</sup> 结合的影响

精胺是在所有天然 tRNA 都存在的 1 种分子, 对稳定 tRNA 的结构有重要作用, 为了考察精胺对稀土离子与 tRNA 分子结合的影响, 测定了精胺存在下  $Ce^{3+}$  酵母 tRNA<sup>Phe</sup> 体系  $K$  的变化, 所得荧光滴定结果列于表 1, 用 Scatchard 方法处理得到的  $N$  和  $K$  列于表 2.

在精胺存在的条件下,  $Ce^{3+}$  酵母 tRNA<sup>Phe</sup> 体系与无精胺的体系相比, 强-弱结合位置的  $N$  和  $K$  都变化不大, 仅仅略有降低, 表明精胺与 tRNA 的结合与  $Ce^{3+}$  离子相比很弱, 不足以对  $Ce^{3+}$  离子和 tRNA 的结合产生明显的影响. 但精胺的加入使  $Ce^{3+}$  离子几个强结合位置之间的协同作用消失, 而这种协同作用是滴定过程中 tRNA<sup>Phe</sup> 的结构从没有固定的三级结构向形成天然的三级结构的一种表现, 因此, 尽管精胺的加入对  $Ce^{3+}$  离子与 tRNA 的结合影响较小, 但在没有金属离子存在的情况下, 对 tRNA<sup>Phe</sup> 形成其天然的三级结构有明显的促进作用.

## 参 考 文 献

- 1 Teeter M M, Quigley G J, Rich A. Advances in inorganic biochemistry. In: Eichhom G L, Marzilli L G, eds. Metal ions in genetic information transfer. Amsterdam: Elsevier Science, 1981. 233
- 2 Kayne M S, Cohn M. Cation requirements of isoleucyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun, 1972, 16: 1285
- 3 Pavlick D, Formoso C. Lanthanide fluorescence studies of transfer RNA<sup>Met</sup> conformation. Biochemistry, 1978, 17: 1537
- 4 Kearns D R, Bolton P H, Pullman B. Biomolecular structure and function. New York: Academic Press, 1978. 493
- 5 Kayne M S, Cohn M. Enhancement of terbium (III) and europium (III) fluorescence in complexes with *Escherichia coli* tRNA. Biochemistry, 1974, 13: 4159
- 6 Ciesiolka J, Marañic T, Krzyzosiak W. Probing the environment of lanthanide binding sites in yeast tRNA<sup>Phe</sup> by specific metal-ion-promoted cleavages. Eur J Biochem, 1989, 182: 445
- 7 Scatchard G, Coleman J S, Shen A L. Physical chemistry of protein solutions VIII the binding of some small anions to serum Albumin. J Am Chem Soc, 1957, 79: 12
- 8 Frey S T, Horrocks W D Jr. Complexation, luminescence, and energy transfer of  $Ce^{3+}$  with a series of multidentate amino phosphonic acids in aqueous solution. Inorg Chem, 1991, 30: 1073

## Determination of Association Constants between $Ce^{3+}$ and tRNA by Fluorometry

Meng Jianxin\*    Zhou Jianying    Tu Huamin    Gong Menglian    Yang Yansheng

**Abstract** Fluorescence of  $Ce^{3+}$  aqua ion is shown to be much more intense than that of other rare earth ions, and the fluorescence intensity is in good proportional to its concentration which may be changed in rather wide range. The properties of  $Ce^{3+}$  aqua ion may be employed to determine its concentration. As tRNA strongly quench fluorescence of  $Ce^{3+}$ , fluorescence titration was applied to  $Ce^{3+}$ -tRNA systems, from which the binding number and association constants of the system were deduced with Scatchard plot. It was found that there are two classes of  $Ce^{3+}$  binding site in tRNA with the association constant of  $10^8$  mol/L and  $10^6$  mol/L, respectively, and the binding number and association constants were slightly reduced by addition of spermine.

**Keywords**  $Ce^{3+}$  ions, tRNA, fluorescence, Scatchard plot

\* State Key Laboratory of Ultrafast Laser Spectroscopy, Zhongshan University, Guangzhou 510275,