

การศึกษาลักษณะเฉพาะของโปรตีนที่จับกับตะกั่วในซีรัมของมนุษย์



นางสาว สุพิชชา มังคะลี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-434-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

116908326

CHARACTERIZATION OF LEAD-BINDING PROTEIN
IN HUMAN SERUM

Miss Suphitcha Mangkalee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree in Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-434-9



ผู้พิมพ์ : มังคะลี : การศึกษาลักษณะเฉพาะของโปรตีนที่จับกับตะกั่วในซีรัมของมนุษย์
(CHARACTERIZATION OF LEAD-BINDING PROTEIN IN HUMAN SERUM)

อ.ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สุรินทร์, 93 หน้า. ISBN 974-584-434-9

ตะกั่วเป็นโลหะชนิดหนึ่งที่ถึงแม้จะให้ประโยชน์อย่างมากแก่มนุษย์แล้ว ยังสามารถก่อให้เกิดพิษแก่ร่างกาย อาจทำให้เกิดภาวะโลหิตจางและอื่น ๆ อีก กลไกทางชีวเคมีในการเกิดพิษของตะกั่วจึงเป็นที่น่าสนใจ การศึกษาเกี่ยวกับการขนส่งตะกั่ว การจับกับโมเลกุลขนส่ง และการกำจัดตะกั่วจากซีรัม อาจนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกัน และ/หรือรักษาโรคพิษตะกั่วได้

การทดลองนี้แสดงว่า ตะกั่วสามารถเข้าสู่เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ได้อย่างรวดเร็วภายใน 8 นาที คงเหลือตะกั่วอีกจำนวนหนึ่งไว้ในซีรัม แต่ในสภาวะที่ปราศจากซีรัม ตะกั่วเข้าไปในเม็ดเลือดแดงเพียง 30% ของสภาวะที่มีซีรัมเท่านั้น แสดงว่าในซีรัมมีปัจจัยบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งตะกั่ว นอกจากนี้ยังพบว่าตะกั่วสามารถลดปริมาณเหล็กที่จับกับโปรตีน ในขณะที่ปริมาณตะกั่วในโปรตีนเพิ่มขึ้น แสดงว่า ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการขนส่งเหล็กนั้นอาจจะเป็นทรานส์เฟอร์ริน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ขนส่งเหล็กในซีรัม ผลจาก Sephadex G-200 Column Chromatography และ Polyacrylamide Gel Electrophoresis pH 8.3 แสดงว่าโปรตีนที่จับกับตะกั่ว นั้นอาจจะเป็นทรานส์เฟอร์ริน งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาอัตราส่วนของ Pb : Fe บนทรานส์เฟอร์ริน แต่ยังไม่สามารถจะสรุปได้แน่นอนเนื่องจากว่าปริมาณตะกั่วที่ใช้ในการทดลองนั้นน้อยเกินไป ผลจาก Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis แสดงว่าตะกั่วและเหล็กสามารถเคลื่อนย้ายแถบโปรตีนของทรานส์เฟอร์รินไปได้เหมือนกัน อาจเนื่องจากโลหะทั้งสองจับกับทรานส์เฟอร์รินด้วยวิธีเดียวกัน Chelator บางตัวสามารถกำจัดตะกั่วออกจากโมเลกุลของโปรตีนได้ เช่น CaNa_2EDTA Dimercaprol และ D-penicillamine ซึ่งสามารถลดปริมาณตะกั่วที่จับกับทรานส์เฟอร์รินในซีรัมได้ประมาณ 88, 96 และ 100% ตามลำดับ

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2536

ลายมือชื่อนิสิต *กัญญา สุรินทร์*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *สุกัญญา สุรินทร์*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C325926 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: LEAD-BINDING PROTEIN / HUMAN SERUM

SUPHITCHA MANGKALEE ; CHARACTERIZATION OF LEAD-BINDING PROTEIN IN HUMAN SERUM. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUGANYA SOONTAROS, Ph.D. 93 PP. ISBN 974-584-434-9

Although lead is one of the most useful metals, it is also toxic for human. It may cause anemia and other serious symptoms. Biochemical mechanisms in lead poisoning is of interest. The studies about lead transportation, its binding and elimination may be utilized for prevention and treatment of Pb-poisoning.

It is shown in this study with in vitro experiment that lead is taken up rapidly by human blood cells, reaches saturation within 8 min, leaving lead residues in the serum fraction. Furthermore, in the absence of plasma, blood cells take up lead but only 30% of that in the presence. This suggests the involvement of some factor(s) in serum in lead transportation. Lead is further observed to decrease the concentration of protein-bound iron in human serum, upon its attachment indicating that one of the factors involves in lead transportation may be transferrin, iron carrier protein. By Sephadex G-200 Column Chromatography with its molecular weight and Polyacrylamide Gel Electrophoresis pH 8.3, the lead-binding protein is confirmed to be transferrin. The stoichiometric study of Pb : Fe on transferrin molecule is also study, but the result obtained is not yet conclusive due to too low the concentration of Pb utilized. Pb and Fe can shift band of transferrin in Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the same fashion suggesting their similar binding. Pb can be removed from transferrin molecule by some chelators, CaNa₂EDTA, Dimercaprol and D-penicillamine, which reduce Pb bound about 88, 96 and 100%, respectively.

ภาควิชา.....ชีวเคมี
สาขาวิชา.....ชีวเคมี
ปีการศึกษา.....2536

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor, Dr. Suganya Soontaros for her kindness, encouragement, understanding and valuable suggestion throughout my study.

I am especially indebted to Dr. Tipaporn Limpaseni and Dr. Kovit Pattanapanyasat for serving as thesis committee, helpful discussions, interpretation and also for valuable suggestions about the data in this study.

I wish to acknowledge the Thai Red Cross Society, Solaya Sooksa-Art and Sasitorn Chotisasitorn for Whole blood in this research and my appreciation is also expressed to Dr. Orapan Metadilogkul (M.D.), Institute of Occupational and environmental medicine at Rajvitee Hospital, for patient blood and some chelators in this study.

I am very grateful to Sopa Chirawongaram and Utai Tiyawisutsri from Scientific and Technological Research equipment Centre for valuable suggestions about F-AAS and ICPS.

My thank is extended to all staff members and students of the Biochemistry and Biotechnology Department for their help sincerity and friendship, especially to Suwanna Cowawintaweewat, Uraivan Rutchtorn and Saravut Vattanasiritrakul.

Finally, I am most grateful to my parents, my brother and Pee Lek for their love, understanding and encouragement.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF TABLES.....	xiv
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	
1.1 Lead Sources, Absorption and excretion.....	1
1.2 Clinical Manifestation of Lead Poisoning	
1.2.1 Acute Exposure.....	3
1.2.2 Chronic Exposure.....	4
1.3 Lead Toxicity on Heme Synthesis and Blood Lead Concentration.....	4
1.4 Iron Absorption and Transportation.....	9
1.5 Possible Route of Lead Transportation.....	11
II MATERIALS AND METHODS	
2.1 MATERIALS	
2.1.1 Biological Materials.....	15
2.1.2 Chemicals	
2.1.2.1 Ferrozine Method.....	16

2.1.2.2	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer (F-AAS) and Inductively Coupled Plasma Spectrometer (ICPS).....	16
2.1.2.3	Chromatography.....	16
2.1.2.4	Discontinuous Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Disc-PAGE) and Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis (IEF-PAGE).....	17
2.1.2.5	Determination of Protein.....	17
2.1.2.6	Other Chemicals.....	17
2.1.3	Instruments.....	18
2.2	METHODS	
2.2.1	Determination of Metal Concentration	
2.2.1.1	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer (F-AAS).....	19
2.2.1.2	Inductively Coupled Plasma Spectrometer (ICPS).....	21
2.2.1.3	Iron Determination with Ferrozine method.....	23
2.2.2	Gel Filtration Chromatography	
2.2.2.1	Sephadex G-25 Column.....	24
2.2.2.2	Sephadex G-200 Column.....	25
2.2.3	Discontinuous Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Disc-PAGE).....	25

	Page
2.2.4 Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis (IEF-PAGE).....	29
2.2.5 Determination of Proteins	
2.2.5.1 Absorbance at 280nm (A_{280}).....	31
2.2.5.2 Lowry Assay.....	31
 III RESULTS	
3.1 Methods for Metal Determination	
3.1.1 Ferrozine Method (for Fe Determination)....	34
3.1.2 Inductively Coupled Plasma Spectrometer (ICPS).....	34
3.1.3 Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer (F-AAS).....	42
3.2 Distribution of Pb in Whole Blood.....	48
3.3 Lead-binding Proteins.....	51
3.4 Characterization of Pb-binding Proteins in Serum	
3.4.1 Sephadex G-200 Column Chromatography.....	52
3.4.2 Molecular Weight Determination of Pb-binding Protein.....	59
3.4.3 Polyacrylamide Gel Electrophoresis.....	62
3.5 Binding of Pb on Standard transferrin (Tf)	
3.5.1 Sephadex G-25 Column Chromatography.....	67
3.5.2 Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis (IEF-PAGE).....	69
3.6 Effect of Some Chelators on Protein-bound Pb.....	71

	Page
IV DISCUSSION	
4.1 Method for Metal Determination.....	73
4.2 Distribution of Lead in Whole Blood.....	78
4.3 Characterization of Pb-binding Protein in Human Serum.....	80
4.4 Binding of Pb on Standard Tf.....	82
4.5 Reduction of Tf-bound Pb with Some Chelators.....	84
SUMMARY.....	86
REFERENCES.....	87
BIOGRAPHY.....	93

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1 Biosynthesis of heme.....	5
2 The absorption of iron into the cell and its transport through the mucosal cell.....	10
3 Iron transport and metabolism.....	11
4 Effect of buffers on Fe determination by Ferrozine method.....	35
5 Specificity of Ferrozine method on Fe determination.....	36
6 Standard Fe ($\mu\text{g}/\text{l}$) graph showing the relation between Pb concentrations and their emission values determined by ICPS.....	38
7 Standard Pb ($\mu\text{g}/\text{l}$) graph showing the relation between Pb concentrations and their emission values determined by ICPS.....	39
8 Effect of buffers and serum of Pb determination by F-AAS.....	43
9 Standard curve of Fe, determined by F-AAS.....	45
10 Spectral interference of Fe on Pb determination by F-AAS.....	46
11 Spectral interference of Pb on Fe determination by F-AAS.....	47
12 Pb uptake by blood cells.....	49

Figure	Page
13 Effect of blood plasma on Pb uptake by blood cells.....	50
14 Sephadex G-200 column chromatography of Pb-treated serum.....	56
15 Sephadex G-200 column chromatography of Pb-treated serum.....	57
16 Sephadex G-200 column chromatography of normal human serum.....	58
17 Sephadex G-200 column chromatography of patient serum.....	60
18 Molecular weight calibration graph for the determination of molecular weight on Sephadex G-200 gel filtration chromatography.....	61
19 Protein patterns of Disc-PAGE of Pb-treated serum (1,800 $\mu\text{g}/\text{l}$) eluted from Sephadex G-200 column.....	63
20 Protein pattern of Disc-PAGE of Pb-treated serum eluted from Sephadex G-200 column.....	64
21 Protein pattern of Disc-PAGE of normal serum eluted from Sephadex G-200 column.....	65

Figure		Page
22	Protein pattern of Disc-PAGE of patient serum eluted from Sephadex G-200 column.....	66
23	Effect of Pb and Fe on IEF-pattern of Tf.....	70
24	L'vov concept.....	75
25	Major components and layout of ICPS.....	77
26	The binding of Fe to Tf molecule.....	83

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Lowest observed effect levels for induced health effects.....	7
2	Carrier in blood plasma.....	13
3	Effect of Pb on the concentration of protein bound iron at various pH's.....	37
4	Spectral interference of ICPS on metal determination.....	41
5	The relationship between Pb binding and Fe released from serum protein(s) determined by F-AAS.....	53
6	The relationship between Pb binding and Fe releasing on protein(s) in serum determined by ICPS.....	54
7	The binding of Pb on Tf.....	68
8	Efeect of some chelators on protein-bound Pb.....	72

ABBREVIATION

A	Absorbance
δ-ALAD	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
δ-ALAS	Delta-aminolevulinic acid synthetase
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degree celcius
em	Emission
F-AAS	Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer
Fe	Iron
g	Gram
hr	Hour
ICPS	Inductively Coupled Plasma Spectrometer
IEF-PAGE	Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoreis
l	Litre
M	Molar
μM	Micromolar
μg	Microgram
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ms	Millisecend

M.W.	Molecular weight
ND-PAGE	Nondenaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis
nm	Nanometer
no.	Number
Pb	Lead
%	Percentage
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamine
Tf	Tranferrin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane