การจับตะกั่วโดยเชรูโลพลาสมิน

นางสาว รสวันต์ ศรีวรวิทย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2539

ISBN 974-633-717-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 17061106

LEAD-BINDING BY CERULOPLASMIN

MISS ROSAWAN SRIVORAVIT

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree in Master of Science

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974-633-717-3

Thesis Title	Lead-binding by Ceruloplasmin
By	Miss Rosawan Srivoravit
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree.

Santi Thoongsuwan

..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

Tipaporn Limpaseni

..... Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

Suganya Soontaros

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

Kovit Pattanapanyasat

..... Member

(Associate Professor Kovit Pattanapanyasat, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

รสวันต์ ศรีวรวิทย์ : การจับตะกั่วโดยเซรูโลพลาสมิน
(LEAD-BINDING BY CERULOPLASMIN)
อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุกัญญา สุนทรส, 72 หน้า. ISBN 974-633-717-3

ในซีรัมของเลือดคนมีโปรตีนที่ขนส่งโลหะหลายชนิด จากรายงานของ สุพิชชา มังคะลี (1994) ทรานสเฟอรินซึ่งขนส่งเหล็กในซีรัมเป็นโปรตีนตัวหนึ่งที่จับกับตะกั่วได้ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความสามารถของเซรูโลพลาสมินซึ่งเป็นโปรตีนที่ขนส่งทองแดงในซีรัมในการจับกับตะกั่ว

เมื่อบ่ม lead acetate ที่ความเข้มข้น 1.8 mg/l กับซีรัมของคนและวิเคราะห์ปริมาณโลหะที่จับกับโปรตีนในซีรัมด้วยวิธี atomic absorption spectrophotometer พบว่าตะกั่วสามารถจับกับโปรตีนในซีรัมได้ 0.12 ppm และทำให้ปริมาณทองแดงบนโมเลกุลของโปรตีนลดลง นอกจากนี้ปริมาณตะกั่วที่เพิ่มขึ้นยังมีผลทำให้ oxidase activity ของโปรตีนในซีรัมลดลง ผลจาก Sephadex G-200 column chromatography และ polyacrylamide gel electrophoresis ของซีรัมของคนปกติและซีรัมของผู้ป่วยโรคพิษตะกั่ว แสดงว่าโปรตีนที่จับกับตะกั่วได้ชนิดหนึ่งคือ เซรูโลพลาสมินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีหน้าที่ขนส่งทองแดงในซีรัมของคน การศึกษาภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการจับโลหะของเซรูโลพลาสมิน พบว่าอยู่ที่ pH 6.0 การจับจะลดลง 3.16% เมื่อเก็บไว้ที่ 4°ซ เป็นเวลา 3 วัน ได้ศึกษายืนยันว่าเซรูโลพลาสมินจับตะกั่ว โดยใช้โปรตีนเซรูโลพลาสมินมาตรฐาน พบว่าตะกั่วที่เข้าจับกับโปรตีนเซรูโลพลาสมินสามารถทำให้ปริมาณทองแดง และ oxidase activity ของเซรูโลพลาสมินลดลงได้โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นกับความเข้มข้นของตะกั่วและมีลักษณะแปรตามกัน และยังพบอีกว่า 100 mg/ml $CaNa_2EDTA$, 100 mg/ml Dimercaprol และ 1,000 mg/ml Penicillamine สามารถกำจัดตะกั่วบนโปรตีนเซรูโลพลาสมินได้ถึง 89.1, 96.5 และ 99.0% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไม่สามารถจำแนกเซรูโลพลาสมินที่จับกับตะกั่ว กับเซรูโลพลาสมินที่กำจัดตะกั่วออกด้วย chelators ได้ด้วยวิธี isoelectric focusing ในช่วงกรด-ด่างระหว่าง 4.0-6.0

ภาควิชา เคมี ลายมือชื่อนิสิต รสวันต์ ศรีวรวิทย์
สาขาวิชา เคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2538 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C626015 : BIOCHEMISTRY
: MAJOR
KEY WORD: LEAD / CERULOPLASMIN / FERROXIDASE / LEAD BINDING PROTEIN

ROSAWAN SRIVORAVIT : LEAD-BINDING BY CERULOPLASMIN.
THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUGANYA SOONTAROS, Ph.D. 72 PP.
ISBN 974-633-717-3

Many metal-binding proteins have been reported in human serum, and Mangkalee (1994) reported transferrin, Tf, the iron transporting protein, could bind to Pb. It is the aim of this study to prove that ceruloplasmin (Cp, Cu-binding protein) could also serve as another Pb-carrier.

When human serum was incubated with 1.8 mg/l lead acetate and the protein-bound metal was quantitated with atomic absorption spectrophotometer, it was found that bound Pb increased by 0.12 ppm while Cu was released. The oxidase activity of serum decreased concomitantly with Pb binding. This suggested that ceruloplasmin, the physiological Cu transporting protein, was one of lead-binding factor(s) in human serum. The finding was confirmed with Sephadex G-200 column chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis of Pb-treated human serum. Optimum pH for metal-binding on ceruloplasmin was pH 6.0. The binding of Pb decreased by 3.16% when Cp was stored at $4^{o}C$ for 3 days. Confirmation with purified Cp showed that Pb binding, Cu released and the decrease of oxidase activity were concentration dependent and corresponded very well with each other. The metal-chelators namely, 100 mg/ml $CaNa_2EDTA$, 100 mg/ml Dimercaprol and 1,000 mg/ml Penicillamine could reduce the concentration of Pb bound on Cp molecules by 89.1, 96.5 and 99.0 %, respectively. However, the Pb-binding Cp and Pb-freed Cp (with metal-chelators) could not be fractionated with IEF-PAGE at pH 4.0-6.0.

ภาควิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่อนิสิต รสสุวัฒน์ ศรีวรวิทย์
สาขาวิชา ชีวเคมี	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2538	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deep gratitude and appreciation to my advisor, Dr. Suganya Soontaros for her encouragement, suggestions, discussion and helpful guidance 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 to Dr. Orapan Metadilogkul (M.D.), Institute of Occupational and environmental medicine at Rajvitee Hospital, for patient blood in this study.

I would like to thank to Sopa Chirawongaram and Somboon Rhianphumikarakit from Scientific and Technological Research equipment Centre for valuable suggestions about F-AAS.

I wish to extend my deepest gratitude to my parents, my sisters and Mr. Suthum Suwannapasri who always give me understanding, encouragement, warmest love and friendship.

Finally, I wish to express my sincere thanks to all teachers and friends in the Department of Biochemistry and Biotechnology for their help, encourage and friendship, especially to Mr. Klaewkla Kaewthai and Miss Alisa Vangnai.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

CONTENT.....vii

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF TABLES.....xiv

ABBREVIATIONS..... xv

CHAPTER

I INTRODUCTION

1 Lead Sources, Absorption and Excretion..... 2

2 Clinical Manifestations of Lead Poisoning

2.1 Acute Exposure..... 4

2.2 Chronic Poisoning..... 5

3 Blood Lead Concentration and Lead Toxicity on Heme Synthesis and Neuro System..... 5

3.1 Effect of lead on Heme synthesis..... 6

3.2 Effect of lead on Neuro system..... 8

4 Ceruloplasmin..... 10

II MATERIALS AND METHODS

MATERIALS

1 Biological Materials..... 14

2 Chemicals

2.1 Chromatography..... 15

2.2 Graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (F-AAS)..... 15

2.3 Ceruloplasmin determination..... 15

2.4 Discontinuous Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Disc-PAGE) and Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis (IEF-PAGE)..... 15

2.5 Protein determination..... 16

2.6 Other chemicals..... 16

3 Instruments..... 17

METHODS

1 Gel filtration chromatography

1.1 Sephadex G-25 column..... 18

1.2 Sephadex G-200 column..... 18

2 Graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (F-AAS)

2.1 Sample preparation..... 18

2.2 Spectrophotometer setting..... 19

3 Ceruloplasmin Determination

3.1 Reagents..... 20

3.2 Sample Preparation and Calculation..... 21

4 Discontinuous polyacrylamide gel eletrophoresis (Disc-PAGE)

4.1 Compositions and Stock Solutions..... 22

4.2 Preparation of Disc-PAGE..... 23

4.3 Sample Preparation..... 24

4.4 Electrophoresis Run..... 25

4.5 Protein Staining and Destaining..... 25

5 Isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis (IEF-PAGE)

5.1 Stock solutions..... 26

5.2 Preparation of IEF-PAGE..... 27

5.3 IEF Operation..... 28

5.4 Staining and Destaining..... 28

6 Determination of Proteins

6.1 Absorbance at 280 nm (A280)..... 29

6.2 Lowry Assay..... 29

7 Pb-binding assay..... 29

8 Purification of ceruloplasmin..... 30

III RESULTS

1 Sensitivity and Interference of Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer..... 31

2 Pb-binding Ability of Serum Proteins..... 34

3 Characterization of Pb-binding proteins

3.1 Sephadex G-200 column chromatography..... 39

3.2 Polyacrylamide Gel Electrophoresis..... 43

4 Conditions for Pb-Ceruloplasmin Binding

4.1 Effect of pH on Pb-Cp binding..... 45

4.2 Effect of storage Pb bound Cp..... 47

5 Binding Studies of Pb on Cp

5.1 Relationship between Pb binding and Oxidase Activity..... 49

5.2 Effect of some Chelators on The Metal-Cp Binding..... 52

IV DISCUSSION

1 Sensitivity and Interference of Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer..... 55

2 Pb-binding Ability of Serum Proteins

2.1 The Replacement of Pb to Cu..... 56

2.2 The Decrease of Oxidase Activity..... 57

3 Characterization of Pb-binding proteins..... 58

4 Condition for Pb-Ceruloplasmin Binding..... 59

5 Binding Studies of Pb on Cp..... 60

6 Effct of some Chelators on The Metal-Cp Binding..... 62

SUMMARY..... 65

REFERENCES..... 67

BIOGRAPHY..... 72

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	The relationship between ferrous iron oxidation by Ceruloplasmin and its transport to heme synthesis.....	9
2	Standard curve of Pb determined by F-AAS.....	32
3	Standard curve of Cu determined by F-AAS.....	33
4	Effect of Pb on copper level on serum proteins.....	37
5	Effect of Pb on serum oxidase activity.....	38
6	Sephadex G-200 column chromatography of Pb-treated serum.....	40
7	Sephadex G-200 column chromatography of Pb-toxicated patient serum.....	41
8	Sephadex G-200 column chromatography of normal serum.....	42
9	Disc-PAGE of Pb binding protein.....	44
10	Effect of pH on metal binding on ceruloplasmin.....	46
11	Storage of Pb bound Cp.....	48
12	Relationship between metal binding and oxidase activity on purified ceruloplasmin.....	51
13	Effect of some chelators on IEF-pattern of Cp.....	54

LIST OF TABLES

Table Page

1 Lowest observed effect levels for induced health effects..... 7

2 The relationship between Pb binding and Cu released on serum protein(s)..... 36

3 Effect of some chelators on metal-Cp binding..... 53

ABBREVIATION

A	Absorbance
δ-ALAD	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
δ-ALAS	Delta-aminolevulinic acid synthetase
BSA	Bovine serum albumin
^{o}C	Degree celcius
Cp	Ceruloplasmin
Cu	Copper
em	Emission
F-AAS	Furnace Atomic Absorption Spectrophotometer
Fe	Iron
g	Gram
hr	Hour
IEF-PAGE	Isoelectric Focusing Polyacrylamide Gel Electrophoresis
l	Liter
M	Molar
μmole	Micromole
μg	Microgram
μl	Microliter
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter

ND-PAGE	Nondenaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis
nm	Nanometer
no.	Number
Pb	Lead
ppb	part per billion (µg/l)
PPD	p-Phenylenediamine-di-hydrocloride
ppm	part per million (µg/l)
%	Percentage
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethylenediamine
Tf	Transferrin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
Vit	Vitamin