

# 细菌铁蛋白电子光谱和释放铁动力学的新颖特性

胡晓慧, 黄河清\*

(厦门大学生命科学学院 生物化学与生物技术学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 棕色固氮菌细菌铁蛋白(Bacterial ferritin of *Azotobacter vinelandii*, AvBF) 分子结构由蛋白壳、铁核和横跨蛋白壳的电子隧道组成。细菌铁蛋白由 24 个相同类型的亚基组成, 其分子量略高于鲑鱼肝铁蛋白(Liver ferritin of *Dasyatis akajei*, DALF)。电泳纯的 AvBF 在可见光谱区内呈现出 4 个特征吸收峰, 波长分别位于 414( $\alpha$  峰), 525( $\beta$  峰), 555(S 峰) 和 585(未知) nm。经  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  还原后, 其 AvBF 在紫外可见区内的整体吸收峰强度明显增高。经物理铂金电极还原后, AvBF 的  $\alpha$  特征吸收峰(414 nm) 强度随着控制还原电位降低(-200, -400, -600 mV vs NHE) 而增强。动力学研究表明, 在弱碱(pH8.0) 条件下, AvBF 和 DALF 均以二分之一一级反应动力学方式释放铁, 均未表现出释放铁速率转换行为, 认为 AvBF 和 DALF 的释放铁速率和铁蛋白蛋白壳的柔性调节速率处于同步进行状态, 使铁蛋白释放铁的过程符合二分之一一级反应动力学规律。

**关键词:** 细菌铁蛋白; 棕色固氮菌; 电子光谱; 释放铁; 动力学

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2006)05-0717-05

在体内, 铁蛋白主要的生理功能是释放铁, 供合成含铁的酶蛋白对铁的需求, 并储存细胞介质中的过剩游离铁, 从而避免产生铁中毒。在细胞内, 铁的转移和运输由转铁蛋白和它的受体负责。目前, 有关铁蛋白和转铁蛋白参与铁代谢的途径与机理的研究已有详细的研究报道<sup>[1]</sup>。细菌铁蛋白与哺乳动物铁蛋白在分子组成上存在着差异性, 具体如下: (1) 细菌铁蛋白含有血红素成分; 蛋白质由单类型亚基组成; 铁核中含有高磷酸盐含量和高磷铁比值(1 □ 1.2) 特征<sup>[2,3]</sup>。现已有报道提出合成铁蛋白蛋白壳在先, 储存铁在后的学术观点<sup>[4]</sup>, 这一看法将有助于理解铁蛋白储存铁的途径与机理。研究铁蛋白释放铁规律和动力学特征是了解铁蛋白进行铁代谢途径与机理的重要手段之一。但由于绝大多数铁蛋白释放铁过程呈复杂性, 无法采用简单动力学规律阐明释放铁全过程与规律, 使相关的研究进展开展较为缓慢<sup>[5,6]</sup>。1996 年, 美国 Watt 实验室和黄河清等人同时提出细菌铁蛋白释放铁过程呈复杂性, 发现了铁蛋白以两种不同速率途径释放铁的全过程, 并建立相关的动力学方程, 较为合理地解释其释放铁的机理。早期研究结果表明, 铁蛋白铁核结构可区分为含高磷铁比的铁核表层和含低磷铁比的铁核内层, 认为铁核表层的磷铁结构参与铁蛋白的生理功能, 而

铁核内层的磷铁结构作为铁源, 起着供铁的作用<sup>[8]</sup>。在体内, 铁蛋白释放铁的过程由铁核中心逐步向铁核表层延伸, 而在体外, 释放铁的过程由铁核表层逐渐趋于铁核内层, 并伴随着混合反应级数特性, 推测这一过程的起因是受到铁蛋白蛋白壳柔性调节速率和幅度的影响, 与铁核表层的磷铁结构无关<sup>[8]</sup>。磷酸盐是铁蛋白铁核结构的主要成分之一, 起着缓释铁速率的作用, 但无法使释放铁动力学级数由复杂转化为简单<sup>[3]</sup>。血红素组成、亚基类型和铁核中的磷酸盐含量对铁蛋白释放铁过程中呈复杂性所起的作用很小, 认为铁蛋白蛋白壳的柔性调节速率与幅度与释放铁速率不同步时, 将会产生不同释放铁速率, 并呈复杂动力学过程。本文选用电子显微镜、电子光谱、生物电化学和  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  还原法等分析技术探讨 AvBF 电子光谱和释放铁动力学的新颖特性, 进一步证实蛋白壳的柔性调节速率与幅度是铁蛋白释放铁速率和过程中的限制因素的论点, 它为今后深入研究铁蛋白铁代谢途径与规律提供有价值的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

棕色固氮菌 OP 菌株(*Azotobacter vinelandii* OP) 引自美国威斯康星大学固氮研究中心。部分实验所需的试剂购买于美国 Sigma 公司产品。棕色固氮菌用改良的 Burks 无氮培养基(1 000 mL 蒸馏水中含葡萄糖 20 g, 柠檬酸钠 20 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

收稿日期: 2005-06-25

基金项目: 国家自然科学基金(30470372) 资助

作者简介: 胡晓慧(1980-), 女, 硕士研究生。

\* 通讯作者: hquang@xmu.edu.cn

0.2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.1 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.015 g,  $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6H_2O$  0.005 g, 琼脂 18 g, pH 7.0) 在 100 L 发酵罐中发酵. 对数生长期收集菌体备用.

### 1.2 方法

(1) 铁蛋白制备与纯化  $A_vBF$  和  $DALF$  的分离及纯化参考李久蒂<sup>[5]</sup>的方法. 实验所需  $A_vBF$  和  $DALF$  分别经 DEAE-52 纤维素柱, 并采用 0.20 mol/L NaCl 的 Tris-HCl(pH7.25) 缓冲液洗脱, 收集粗铁蛋白样品. 随后, 选用天然梯度凝胶电泳技术进一步纯化铁蛋白. 实验所需的铁蛋白( $A_vBF$  和  $DALF$ ) 均为电泳纯.

(2)  $A_vBF$  直接电位还原 三电极电解池设计参考黄河清方法<sup>[7]</sup>, 控制电位分别为 -200、-400 和 -600 mV (相对标准氢电极电位), 还原时间控制在 45 min. 采用光谱电化学技术<sup>[8]</sup>测定铁蛋白释放铁的动力学过程和电子光谱.

(3)  $A_vBF$  的电镜观察 电泳纯的  $A_vBF$  用 2% 磷钨酸染色 10 min 后, 直接置于透射电子显微镜中, 在 10 万放大倍数下观测与拍摄铁蛋白的分子结构.

(4) 铁蛋白释放铁动力学测定 弱碱性铁蛋白 (pH8.0) 样品制备参考黄河清已报道的方法<sup>[7]</sup>. 选用  $Na_2S_2O_4$  为还原剂和  $\alpha$ -联吡啶为亚铁螯合剂. 铁蛋白释放铁的速率测定和换算动力学参数均参考黄河清的方法<sup>[6,7]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 $A_vBF$ 和 $DALF$ 亚基特性

图 1 是  $DALF$  和  $A_vBF$  经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离后的电泳图. 从图中可看出  $DALF$  和  $A_vBF$  在 PAGE 层析板上呈现出单条蛋白带, 这说明实验所采用的铁蛋白样品已达到电泳纯, 符合研究铁蛋白理化特性的基本材料的要求. 进一步表观现象分析后, 发现  $DALF$  (图 1 左边) 迁移率比  $A_vBF$  (图 1 右边) 快, 其  $DALF$  的分子量略小于  $A_vBF$ .

### 2.2 $A_vBF$ 的电镜分析

$A_vBF$  分子结构由电子隧道、蛋白壳和铁核组成, 铁核位于蛋白壳中心区域. 由于铁核具有高电子密度特性, 所以铁蛋白经负染法处理后, 即可在电子显微镜下观察到铁蛋白的基本分子结构特征. 图 2 是  $A_vBF$  电镜图, 放大倍数 10 万倍. 从图中清楚看出,  $A_vBF$  基本分子结构由蛋白壳和铁核组成, 其中黑色球状物是带有高电子密度特点的铁核, 位于蛋白壳中心, 蛋白壳包裹铁核. 从动植物及微生物机体中获取的各类铁蛋

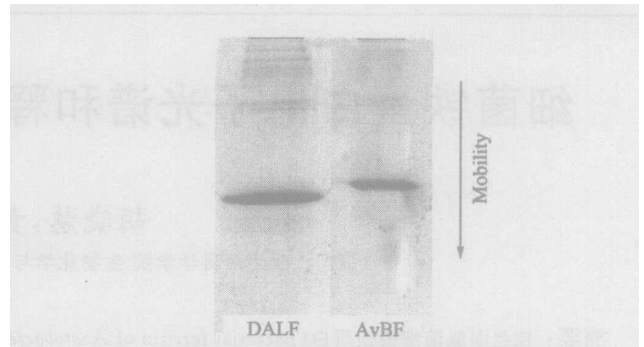


图 1  $DALF$  和  $A_vBF$  聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis pattern of PAGE both  $DALF$  and  $A_vBF$

白均有高对称的 24 个亚基组成, 但亚基类型不同. 细菌铁蛋白由单类型亚基组成, 而  $DALF$  由 H 和 L 不同类型的亚基组成. 但进一步比较  $A_vBF$  和  $DALF$  的电镜图<sup>[9,10]</sup>后, 作者发现  $A_vBF$  呈现的基本分子结构与  $DALF$  很相似, 没有明显结构特征的差别, 即相同亚基类型和不同类型亚基组成的铁蛋白, 从电子显微镜技术层次上, 其铁蛋白分子结构很相似. 近期的研究已表明, 细菌铁蛋白与哺乳动物铁蛋白在释放铁的过程中均表现复杂动力学特性, 呈现出两种不同速率特点, 这一现象说明了释放铁过程与铁蛋白亚基类型、铁核组成、是否含有血红素组成和分子结构 (图 2) 无

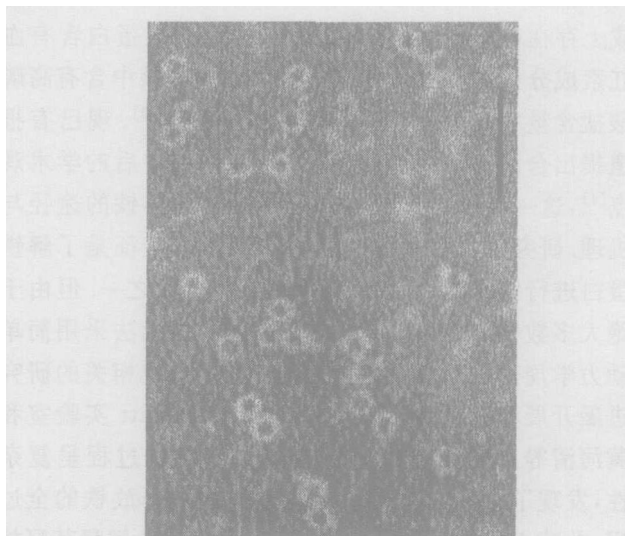


图 2  $A_vBF$  电镜图

标杆尺度: 50 nm

Fig. 2 Electron micrograph of  $A_vBF$

### 2.3 $A_vBF$ 的电子光谱特性

早期研究已表明, 在紫外可见光谱区内, 动物铁蛋白电子光谱的吸收强度随着波长的红移而减弱, 没有明显的特征吸收峰 (除 280 nm 蛋白质固有吸收峰

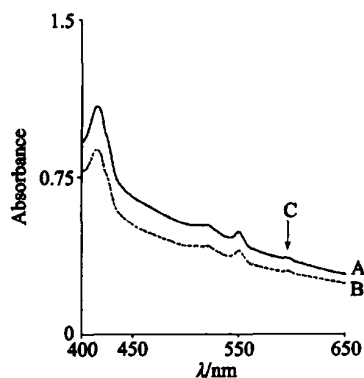


图 3 AvBF 电子光谱图

A: 经  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  还原后的 AvBF

B: AvBF C: 未知组成的吸收峰(585 nm)

Fig. 3 Electronic spectra of AvBF

外)<sup>[13]</sup>. 细菌铁蛋白因含有血红素组成, 则在 414( $\alpha$ 峰), 525( $\beta$ 峰), 555(S 峰) 呈现出 3 个血红素特征吸收峰<sup>[8]</sup>. 图 3 是 AvBF 在波长位于 400~ 650 nm 范围内的特征电子光谱, 却表现出 4 个特征吸收峰, 与早期研究报道的结果略有不同, 其波长分别为 414( $\alpha$ 峰), 525( $\beta$ 峰), 555(S 峰) 和 585(未知) nm, 其中前 3 个吸收峰是 AvBF 蛋白壳表层上的血红素对光产生吸收的特有吸收峰, 而位于 585 nm 吸收峰是未知组成对可见光产生的吸收峰, 其引起光吸收的组成尚未清楚. AvBF 经  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  还原后, 铁蛋白铁核中的高铁组成被还原成亚铁组成后, 其整体吸收曲线强度明显增强, 而 414( $\alpha$ 峰), 525( $\beta$ 峰), 555(S 峰) 和 585(未知) nm 的峰位却未出现红移或紫移现象. 这一现象说明了, 铁蛋白被还原后, 其蛋白壳亚基结构和铁核组成均未被完全还原分解, 但却产生构象变化, 导致铁蛋白在紫外可见光谱区内的整体吸收强度得以提高. 值得一提的是位于 585 nm 处的特征吸收峰却未随着铁蛋白被还原而消失, 说明了该吸收峰形成与铁蛋白中铁组成价态和蛋白壳发生构象变化无关, 推测可能由细菌铁蛋白的二聚体或多聚体引起的特征吸收峰, 详细有待于进一步研究.

## 2.4 AvBF 电化学光谱特性

与多数蛋白不同, 铁蛋白在物理电极(或黄金电极等)上能直接获得还原电子<sup>[14]</sup>. 这些新颖现象与铁蛋白属于非电极惰性的蛋白质类型有关, 它利用横跨蛋白壳的电子隧道从物理电极上获得电子, 并产生自身的铁核还原现象, 其还原效果类似于采用化学还原剂直接还原的效果. 为证实这一论点, 作者选用生物电化学光谱技术, 采用三电极体系分别控制还原电位为 -200、-400 和 -600 mV(相对氢电极电位)研究 AvBF 还原后的光谱性质变化. 图 4 是在波长位于 414 nm

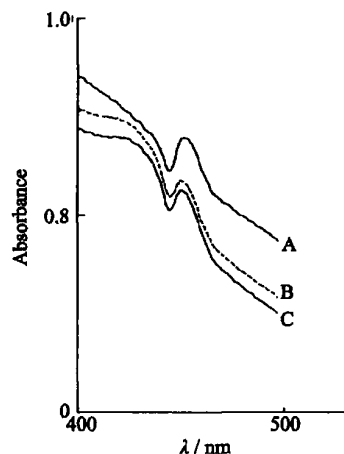


图 4 AvBF 经不同物理电位直接还原后的光谱特性

A: AvBF+ 还原电位(-600 mV)

B: AvBF+ 还原电位(-400 mV)

C: AvBF+ 还原电位(-200 mV)

Fig. 4 Spectral characteristics of AvBF reduced with different physical potentials

处, 不同还原电位直接还原 AvBF 后的光谱变化趋势图. 从图中可以看出, AvBF 在 414 nm 处的特征吸收峰强度随着还原电位逐步降低, 还原能力提高而增强. 这一现象说明了, AvBF 中的铁核组成在不同还原电位的物理电极上获得还原电子速率和程度不同, 随着控制还原电位逐渐降低, AvBF 铁核中的铁组成逐渐被还原, 最后引起蛋白壳产生的构象变化, 并产生光谱吸收值递增, 其光谱变化趋势与采用强化学还原剂  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  直接还原 AvBF 所产生的光谱效应类似. 这一现象进一步肯定 AvBF 是一种非电极惰性的蛋白质, 它能迅速从物理电极上获得还原电子, 并产生自身铁还原现象, 这一直接从物理电极上直接接受电子的新颖行为可为今后研制 AvBF 电极且用于直接生物电分析奠定良好的研究基础与提供科学依据.

## 2.5 AvBF 和 DALF 释放铁动力学

体外释放铁的过程由铁核表层逐渐趋于铁核内层, 并伴随着混合反应级数特性, AvBF 在体外生理 pH 条件下释放铁的全过程代入二分之一级动力学方程式, 结果出现两相(A, B), 其转折点时间位于 30 min 处, 且 AvBF 的 A 相区符合一级动力学规律, 而 B 相区符合零级反应动力学规律<sup>[6]</sup>. DALF 体外生理 pH 条件下铁释放全过程的动力学特征与 AvBF 相似, 不同的是 DALF 的转折点时间位于 20 min 处. 为了进一步研究非生理 pH 值下, 铁蛋白释放铁动力学是否仍保持两相行为, 本实验选用弱碱性(pH 8.0)介质, 分别测 AvBF 和 DALF 的铁释放的全过程, 并将结果代入

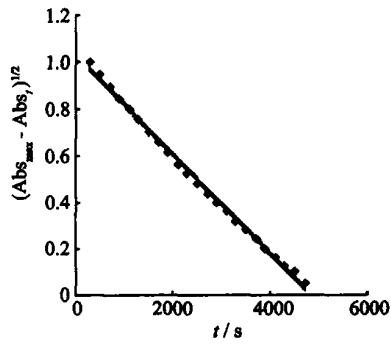


图5 AvBF 在 pH8.0 时释放铁的动力学

$Abs_{max}$ : 在释放铁过程中 AvBF 释放最大的铁量时的吸收值

$Abs_t$ : 在释放铁的反应时间( $t$ )内, AvBF 释放铁量的吸收值

Fig. 5 Kinetics of iron release from AvBF at pH8.0

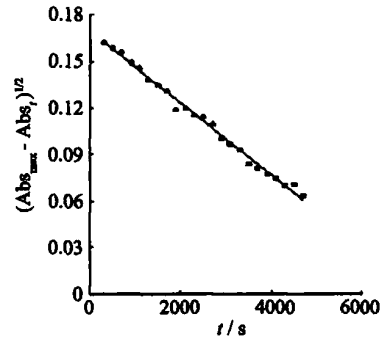


图6 DALF 在 pH8.0 时释放铁的动力学

$Abs_{max}$ : 在释放铁过程中 AvBF 释放最大的铁量时的吸收值

$Abs_t$ : 在释放铁的反应时间( $t$ )内, AvBF 释放铁量的吸收值

Fig. 6 Kinetics of iron release from DALF at pH8.0

二分之一级动力学方程式, 结果如图 5 和 6, 均成单一直线, 与生理 pH 条件下不同. 在 pH8.0 条件下,  $Na_2S_2O_4$  作为还原剂, AvBF 和 DALF 释放铁的全过程符合二分之一级动力学规律, 呈单相而非两相行为. 已有研究提出铁蛋白释放铁的速率及相数与还原剂  $Na_2S_2O_4$  浓度及铁还原速率无关, 与该蛋白蛋白壳的自身调节速率有关<sup>[10]</sup>. 在弱碱性 (pH8.0) 区域里,  $OH^-$  使铁蛋白蛋白壳产生了自身调节和构象变化, 并使 AvBF 和 DALF 在反应体系 pH8.0 中能有效的利用隧道的开关控制作用或改变隧道宽度, 控制  $Na_2S_2O_4$  利用浓度扩散方式穿过蛋白壳三相隧道的扩散速率, 有效降低释放铁的速率, 减少不同速率的相数, 最终以单一级反应方式, 达到释放铁速率相数转换的结果<sup>[12]</sup>. 因此, 本实验所获得的实验结果进一步验证了蛋白壳的柔性调节速率与幅度是铁蛋白进行释放铁速率过程中限制性因素的论点.

参考文献:

[1] Andrews S C, Robinson A K. Bacterial iron homeostasis [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27: 215- 237.  
 [2] Harrison P M, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. [J] Biochimica et Biophysica Acta, 1996, 1275: 161- 203.  
 [3] Raguzzi F, Lesuisse E, Crichton R R. Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letter, 1988, 231: 253- 258.  
 [4] Stiefel E I, Watt G D. *Azotobacter cytochrome b557.5* is a bacterioferritin[J]. Nature, 1979, 279: 81- 83.  
 [5] 李久蒂, 王继文, 钟泽璞, 等. 棕色固氮菌中一种含细胞色素 b 的铁蛋白[J]. 中国科学(B 辑), 1979, 10: 1681-

1687.  
 [6] 张凤章, 黄河清, 林庆梅, 等. 棕色固氮菌细菌铁蛋白释放铁的动力学方程和性质[J]. 生物物理学报, 1998, 14(1): 13- 19.  
 [7] Huang H Q, Watt R K, Frankel R B, et al. Role of phosphate in iron ( $2^+$ ) binding to horse spleen holoferritin [J]. Biochemistry, 1993, 32: 1681- 1687.  
 [8] Huang H Q, Xu L S, Zhang F Z, et al.  $H_2$ -uptake activity, spectra, reduction potentials, and kinetics of iron release on the surface of iron core from *azobacter vinelandii* bacterial ferritin[J]. Journal of Protein Chemistry, 1998, 17(1): 45- 52.  
 [9] Kong B, Huang H Q, Lin Q M, et al. Effect of pH and phosphate on trapping capacity of various heavy metal ions with ferritin reactor in flowing seawater [J]. Protein Chem., 2005, 26(2): 133- 148.  
 [10] Kong B, Huang H Q, Lin Q M, et al. Purification electrophoretic behavior, and kinetics of iron release of liver ferritin of *dasyatis akajei* [J]. Protein Chem., 2003, 22(1): 61- 70.  
 [11] 黄河清, 林庆梅, 张凤章, 等. 猪脾铁蛋白电子隧道特性及释放铁途径的研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(1): 10- 14.  
 [12] 黄河清, 张凤章, 林庆梅, 等. 马脾铁蛋白释放铁的反应级数和速率相数的转换[J]. 动物学报, 1999, 45(2): 170- 177.  
 [13] 黄河清, 张凤章, 许良树. 猪脾和马脾铁蛋白理化特性的比较[J]. 动物学报, 1997, 43(2): 170- 177.  
 [14] Huang H Q, Zhang F Z, Xu L S, et al. Spectroelectrochemical investigation of *Azobacter vinelandii* bacterial ferritin[J]. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 1998, 44(1): 301- 307.

# The Novel Properties of Electron Spectrum and Kinetics of Iron Release from Bacterial Ferritin

HU Xiao-hui, HUANG He-qing\*

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Molecular structure from bacterial ferritin of *Azotobacter vinelandii* (AvBF) consists of protein shell, iron core and electron tunnel across its shell. AvBF is composed of 24 subunits with single types, but its molecular weight is a little higher than that of Liver ferritin of *Dasyatis akajei* (DALF). AvBF with electrophoresis purity showed four characteristic absorbance peaks (CAPs) in visible spectral region, which their wavelength were 414( $\alpha$ ), 525( $\beta$ ), 555(S), 585(unknown) nm. The whole absorbance intensity in AvBF enhanced evidently while reduced with excess  $N_2S_2O_4$ . The intensity of CAPs at 414 nm( $\alpha$  peak) increased going with the controlled potential to shift to negative at -200, -400, -600 mV vs NHE, respectively, in response to reduce with physical electrode. The kinetics showed that both AvBF and DALF released its iron as a law of half-order in the absence of rate exchange, indicating that both proteins carried out the same rate of iron release while both protein engaged in the similar regulation rate of protein shell itself, which resulted in the kinetic laws of iron release both ferritins followed a half-order reaction.

**Key words:** bacterial ferritin; *Azotobacter vinelandii*; electron spectrum; iron release kinetics

• 简 讯 •

## 2005 年度厦门大学获专利权项目一览表( )

序号	专利号	专利类型	发明创造名称	发明人
01	03106908.8	发明	锌锰电池正极	董全峰, 林祖赓, 尤金跨
02	03103072.6	发明	松材线虫的快速分离装置及其检测方法	潘沧桑
03	02128454.7	发明	锶铋钨钛氧化物微波陶瓷及其凝胶注模制造方法	熊兆贤, 方辰
04	03101176.4	发明	活性氧化铝的制备方法	方维平, 王跃敏, 盛景云
05	03132936.5	发明	杂色鲍雌核发育的诱导方法	柯才焕, 蔡明夷
06	02122325.4	发明	三价铬彩虹色钝化液	蔡加勒, 黄令, 周绍民
07	02141718.0	发明	荧光稀土络合物硅纳米颗粒类标记物及其制备方法	李庆阁, 许晔
08	00129601.9	发明	一种蓝藻穿梭质粒表达载体及其用于表达胸腺素 $\alpha 1$ 的方法	章军, 楼士林, 徐虹, 罗田
09	03109958.0	发明	乙醛酸、乙醇酸、乙二醇及草酸的检测方法	陈声培, 孙世刚, 黄桃, 张麒
10	03119735.3	发明	可充锂电池用纳米复合聚合物电解质及其制备方法	杨勇, 杜洪彦, 程琥
11	02154606.1	发明	InGaAs/InP PIN 光电探测器及其制造工艺	陈朝, 刘宝林
12	02143833.1	发明	一种合成高对映体纯(2S, 3S)-1-叔丁氧基羰基-3-羟基-2-苯基哌啶的方法	黄培强, 刘良先
13	02102973.3	发明	列管式固定床电解槽	李军, 樊金红, 苏玉忠
14	02142327.X	发明	氨合成催化剂及其制备方法	廖代伟, 林敬东, 王欣莹, 陈鸿博, 蔡启瑞
15	02126729.4	发明	表面张力驱动液流的芯片化的高密度微阵列液体转移装置	田昭武, 林华水, 周勇亮

厦门大学科技处