

鲨鱼肝铁蛋白理化特性及其储存 有机磷农药分子的初步研究

肖志群^{1,2,3}, 翁朝红^{1,2,3}, 黄河清⁴

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;
3. 集美大学水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021; 4. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

[摘要] 从紫外可见光谱和电子显微结构两方面比较研究鲨鱼肝铁蛋白 (SLF)、脱铁核铁蛋白 (apoSLF) 以及储存有机磷农药分子的铁蛋白 (SLFop) 的理化特性. 结合不同程度脱铁核铁蛋白储存有机磷能力的差别及其动力学规律, 推断有机磷分子的储存位点位于铁核表层, 其储存能力受控于含高磷铁比的铁核表层结构和储存有机磷的场所, 并与介质中有机磷分子浓度有关. 研究结果为构建铁蛋白生物反应器应用于水体监测奠定基础.

[关键词] 鲨鱼肝铁蛋白 (SLF); 紫外可见光谱; 电子显微结构; 有机磷农药

[中图分类号] X 17

[文献标志码] A

0 引言

铁蛋白 (Ferritin) 是一种具有耐稀酸 (pH=2.0)、耐稀碱 (pH=12.0) 和耐较高温度 (70~75℃ 水温下不变性) 等特性的球蛋白^[1]. 分子结构由蛋白壳和内部储存磷铁的铁核组成. 铁核位于蛋白壳中心, 由 2 000~2 500 个铁离子和 300~400 个无机磷酸盐离子组成^[2]. 含高磷铁比的铁核表层参与实施铁蛋白的生理功能, 而含低磷铁比的铁核内层作为铁源, 仅起着供铁的作用^[3]. 在脊椎动物体内, 铁蛋白释放铁的过程由铁核中心逐步向铁核表层延伸, 在体外则相反, 此动力学过程受到铁蛋白蛋白壳柔性调节速度、节奏和幅度的影响^[3-5]. 铁蛋白除具有储存机体中过剩铁, 避免铁中毒及释放铁给细胞等生理功能外, 还具有体外储存重金属离子和劳氏紫等有机小分子的能力, 其储存能力受到蛋白壳柔性调节能力的影响^[6-7].

近年来生物监测和卫星遥感技术在水体污染评价中的应用愈来愈广泛^[8]. 现有的生物监测技术无法连续监测水体的污染程度, 而遥感技术要真正实现大范围的连续监测, 必须结合能准确反映水体污染程度的生物反应监测器^[9]. 本文选用含铁蛋白丰富的鲨鱼肝脏为原始材料^[10], 以敌敌畏有机磷农药为介质, 初步研究蛋白自身特性、外界有机磷农药浓度以及水体流动性等因素对铁蛋白反应器储存有机磷农药的影响, 结合鲨鱼肝铁蛋白 SLF (Shark Liver Ferritin) 的光谱特性和电子显微结构, 探讨铁蛋白储存有机磷农药分子的机制, 为进一步了解铁蛋白的结构与功能提供科学依据, 为构建能连续储存和监测有机磷污染的生物反应器奠定基础.

1 材料和方法

1.1 鲨鱼肝铁蛋白的制备与纯化

新鲜灰星鲨 (*Mustelus griseus*) 购于厦门集美菜市场, 其肝铁蛋白的制备和纯化方法参照文献 [10].

[收稿日期] 2007-07-23

[修回日期] 2007-09-30

[基金项目] 集美大学科研基金资助项目 (16136)

[作者简介] 肖志群 (1971-), 女, 讲师, 在读博士, 从事海洋生物技术研究.

1.2 脱铁核鲨鱼肝铁蛋白的制备

为了去除 SLF 铁核中的铁离子和无机磷酸盐离子, 往铁蛋白样品 (2.6 mg/mL) 中加入等质量的高铁离子还原剂 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 和亚铁离子螯合剂 α, α' -联吡啶, 抽真空除氧后充入氩气, 室温静置. 间隔不同时间段 (10 min ~ 10 h) 取样过 Sephadex G-25 柱 (pH = 7.25), 获得不同程度脱铁核鲨鱼肝铁蛋白 apoSLF (Shark Liver Apoferritin). 铁蛋白中的磷和铁含量分别采用磷钼钼蓝法和原子吸收光谱法测定^[11].

1.3 铁蛋白反应器储存有机磷农药分子

铁蛋白反应器由透析袋、鲨鱼肝铁蛋白 (2~5 mL, 0.1 mg/mL)、磁力搅拌系统及水浴恒温器构成^[6]. 将铁蛋白反应器置于有机磷农药敌敌畏稀释液 (146 $\mu\text{mol/L}$ 或 290 $\mu\text{mol/L}$) 中透析, 蠕动泵模拟流动水体, 在 0~72 h 内间隔取样过 Sephadex G-25 层析柱, 得到储存有机磷农药分子的铁蛋白 SLFop (SLF storing organophosphorus pesticides).

1.4 铁蛋白的光谱特性和电子显微结构

铁蛋白的紫外可见光谱选用日本岛津 UV-240 型紫外可见分光光度计扫描, 蛋白质浓度为 0.1 mg/mL. 采用电镜负染制片技术 (分别加一滴 SLF、apoSLF 或 SLFop (0.1 mg/mL) 样品于 300 目铜网上, 室温晾干后加一滴质量分数为 2% 磷钨酸 (pH = 7.0) 负染 12 min, 于 JEM-100CX[Ⓢ] 型透射电子显微镜下观察和拍照^[12].

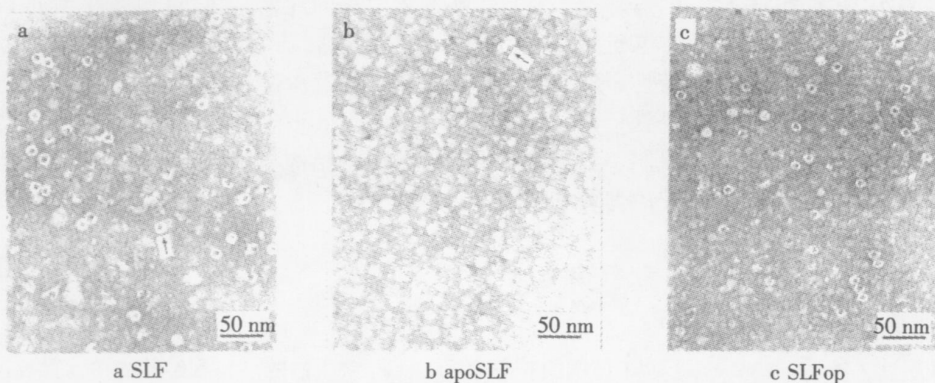
1.5 每分子 SLFop 储存有机磷分子数的测定

SLFop 分子中总含磷量由两部分组成, 即蛋白本身的无机磷酸盐离子和储存的有机磷农药分子. 因此每分子 SLFop 储存的有机磷分子数等于每分子 SLFop 总含磷分子数减去无机磷酸盐离子数. 参照文献 [13] 的过硫酸钾消化法测定每分子 SLFop 的 (蛋白样品 0.1 mg/mL) 总含磷分子数^[13], 再按磷钼钼蓝法测定 SLFop 分子中含无机磷酸盐离子数^[11], 由此计算每分子 SLFop 储存的有机磷分子数.

2 结果

2.1 SLF、apoSLF 和 SLFop 的电镜结构

从铁蛋白超微结构 (见图 1a 放大倍数为 1.5×10^5) 可看出, 鲨鱼肝铁蛋白是一种球形分子, 其蛋白壳外径约 11.5~12.5 nm, 内部包绕着一个高电子密度的铁核, 其直径约 5.8~6.8 nm, 由磷铁组成的铁核以整体形式存在于蛋白壳内. 经脱铁核作用后的 apoSLF 分子 (见图 1b) 仍呈球形结构, 但蛋白外径略有减小 (10.7~12.0 nm) 且铁核内的电子密度明显减弱. 比较图 1a SLF 和图 1c SLFop 电镜图, 外形上两者都由外围的蛋白壳及内部高电子密度的铁核组成, 但 SLFop 分子略有缩小且内部电子密度减弱, 其蛋白壳外径为 10.7~11.7 nm, 铁核内径为 5.1~6.1 nm, 均小于 SLF 蛋白壳和铁核直径.



说明: 箭头示铁蛋白分子

图 1 SLF、apoSLF 和 SLFop 的透射电镜照片

Fig.1 Transmission electron micrographs of SLF, apoSLF and SLFop

2.2 SLF、apoSLF 和 SLF_{op} 的光谱特性

图 2 为相同浓度的 SLF、apoSLF 和 SLF_{op} 的紫外 - 可见光谱。

从图 2 可以看出, SLF 在紫外区呈现两个吸收峰, 分别位于 218 nm 和 280 nm 处, 但在可见光区 (340~700 nm) 没有特征吸收峰, 吸光度随着波长红移呈减弱趋势。经脱铁核作用或储存农药后的铁蛋白在远紫外区 (200~245 nm) 仍有一个强吸收峰, 只是峰位略有红移现象。

apoSLF 和 SLF_{op} 的光谱变化主要表现在近紫外区 (240~320 nm)。apoSLF 在 280 nm 处的峰值明显高于 SLF, 且 apoSLF 的吸光度随着波长红移呈快速下降, 其变化幅度较大, 而 SLF 的吸光度呈平缓下降趋势。与 SLF 和 apoSLF 相似, 储存农药后的 SLF_{op} 在远紫外区的 222 nm 处产生强吸收峰, 吸收强度随着波长红移急剧减弱, 至 250 nm 处为最低值, 但是 SLF_{op} 的下滑幅度最小。

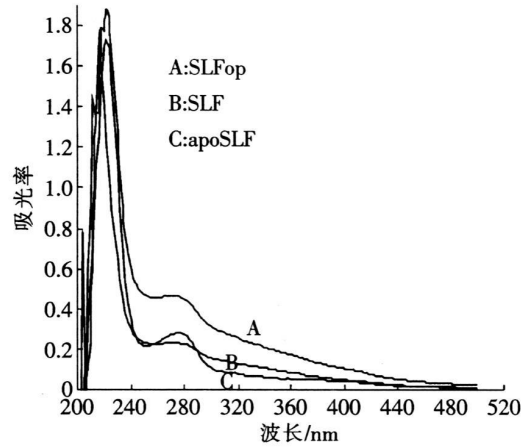


图 2 SLF、apoSLF 和 SLF_{op} 光谱特性比较
Fig.2 The spectrum of SLF,apoSLF and SLF_{op}

SLF_{op} 在可见光谱区的吸收也显著高于 SLF 和 apoSLF, 以 apoSLF 的吸收强度最弱。

2.3 apoSLF 储存有机磷农药分子的能力

为比较不同程度脱铁核后每分子 apoSLF 储存有机磷分子数的不同, 将脱铁核作用时间不同的 apoSLF 样品置于铁蛋白反应器中, 加入 146 μmol/L 的敌敌畏有机磷农药溶液, 静置反应 24 h。表 1 显示, 不同程度脱铁核 apoSLF 储存有机磷分子能力差异较大。含铁量最高的 apoSLF 每分子内储存的有机磷分子数只有 (19.56 ± 1.58) 个, 随着脱铁核反应时间的延长, 每分子 apoSLF 储存有机磷分子数加大。当脱铁核反应时间延长至 10h, 蛋白自身铁核含

表 1 不同程度脱铁核 apoSLF 储存有机磷农药分子能力

Tab 1 Storage capacity of organophosphorus by different levels of apoSLF

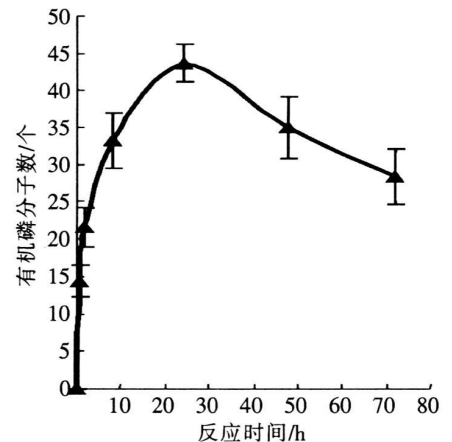
脱铁核反应时间	铁离子数	无机磷酸盐离子数	有机磷分子数
0 min	1 889 ± 16.0	138.5 ± 8.50	19.56 ± 1.58
10 min	1 638 ± 15.0	105.2 ± 6.30	22.81 ± 3.45
40 min	651.2 ± 9.10	83.40 ± 6.79	81.08 ± 7.69
1 h	485.9 ± 10.4	72.02 ± 5.46	81.29 ± 5.24
4 h	283.6 ± 11.5	53.11 ± 3.57	83.64 ± 6.92
5 h	160.2 ± 7.30	19.57 ± 3.02	85.76 ± 8.71
10 h	154.1 ± 6.30	12.04 ± 1.48	88.67 ± 4.62

说明: 有机磷农药稀释液浓度为 146 μmol/L。

的磷铁量很低时, 即每分子 apoSLF 只含 (154.1 ± 6.30) 个铁离子和 (12.04 ± 1.48) 个无机磷酸盐离子时, 每分子 apoSLF 储存的有机磷分子数达到最大值。apoSLF 储存有机磷分子的速率可区分为两相行为, 当 apoSLF 释放铁核表层的部分铁时 (脱铁核反应时间在 40 min 以内), apoSLF 以较快的速率储存有机磷分子。随着进一步的脱铁核和 apoSLF 释放铁量的递增, apoSLF 储存有机磷分子的速率减慢, 且有机磷分子的储存数量趋于饱和状态。

2.4 SLF 储存有机磷分子的动力学过程

把 SLF 铁蛋白反应器投放到 290 μmol/L 敌敌畏农药溶液中静置透析, 不同时间取样分析每分子蛋白储存有机磷分子数 (见图 3)。结果表明, 每分子 SLF 储存有机磷分子数随反应时间的延长呈上升趋势, 但不同时间段捕获有机磷分子的速率差别很大, 当每分子 SLF 储存的有机磷分子数达到



说明: 有机磷农药稀释液浓度为 290 μmol/L

图 3 SLF 储存有机磷分子的动态过程

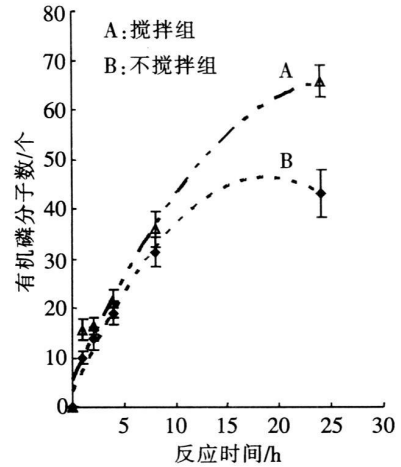
Fig.3 Kinetic process of storage organophosphorus by SLF

最大值 ((43.70 + 3.87) 个) 后, 继续延长捕获时间, 则蛋白的有机磷储存量又呈缓慢下降趋势. 这种现象可能与 SLF 铁核表层有限的络合位点数有关, 且部分有机磷农药分子可能以不稳定的非结合方式被储存, 因而容易被释放到介质中, 致使储存的有机磷分子数随着透析时间的推移而下降. 同时, 铁蛋白在 24 h 内储存有机磷分子的数量与外界有机磷浓度成正相关, 当铁蛋白反应器分别置于 146 μmol/L 和 290 μmol/L 的敌敌畏稀释液中, 24 h 后每分子 SLF 内储存的有机磷分子数分别为 (19.56 ± 1.58) 个和 (43.70 ± 3.87) 个 (见表 1 和图 3).

2.5 水体流动性对 SLF 储存有机磷分子的影响

SLF 反应器分别投放到两份浓度相同的敌敌畏稀释液中 (290 μmol/L), 其中一份通过磁力搅拌器进行搅拌 (400 r/min), 保持水体处于流动状态, 另一份静置透析. 比较每分子铁蛋白储存有机磷分子数及速率.

图 4 显示水体流动性可提高每分子 SLF 储存有机磷农药分子速率和数量, 即每分子 SLF 在 24 h 内最多能捕获 (65.69 ± 5.63) 个有机磷分子, 高于静止水体中铁蛋白的储存量及速率, 不搅拌组 24 h 内每分子 SLF 最多储存 (43.17 ± 4.58) 个有机磷分子, 且呈现饱和趋势. 这说明了大部分有机磷分子可能以稳定的共价键方式储存于 SLF 分子内, 不受水流冲击力的影响, 而水体流动性可提高有机磷小分子与反应器中铁蛋白接触频率, 从而提高铁蛋白储存有机磷分子的能力和速率. 因而在建立 SLF 反应器储存污染水体有机磷分子的动力学方程式时, 务必考虑水体流速对蛋白储存能力的影响, 这样才能准确、直接地反映水体有机磷农药的污染程度.



说明: 有机磷农药稀释液浓度为 290 μmol/L
 图 4 水体流动对 SLF 储存有机磷分子的影响
 Fig.4 Effect of water mobility on storage organophosphorus by SLF

3 讨论

动物肝铁蛋白由外围光亮的蛋白壳和高电子密度的内部铁核组成, 储存磷铁的铁核以整体形式存在于蛋白内部^[1]. 脱铁核过程伴随着铁核中磷铁的释放, 脱铁核蛋白内部的电子密度明显减弱, 其外部蛋白壳的柔性调节导致整个蛋白壳紧缩^[3-5]. 储存有机磷分子的铁蛋白超微结构与脱铁核铁蛋白相似, 其外径缩小, 内部电子密度减弱. 由此推测, 铁蛋白在储存有机磷时, 有机磷分子穿过蛋白壳的三相物质交换隧道进入铁核^[14], 与铁发生交换, 有机磷挤占了铁核部分空间, 铁蛋白释放出部分不稳定铁, 致使铁核内的电子密度降低. 随着储存反应的延续, SLF 释放铁量递增, 蛋白壳通过柔性调节作用引起三相物质交换隧道宽度变窄, 使整个蛋白的外径缩小.

为了进一步探讨铁蛋白储存有机磷分子的机制, 本研究比较分析了 SLF、apoSLF 和 SLF_{op} 的光谱特性. 通常, 远紫外区的吸收峰与蛋白的肽链构象相关; 而近紫外区的吸收主要由蛋白侧链上的芳香氨基酸残基所贡献, 裸露的铁硫簇在可见光谱区内具有特征吸收峰^[15]. 结果显示: 1) 3 种蛋白在远紫外区的吸收光谱没有明显差异, 说明脱铁核作用或储存有机磷分子的过程没有改变铁蛋白的肽链构象; 2) 3 种蛋白在可见光谱区都没有铁硫簇的特征吸收峰, 说明含有铁硫簇的铁核受到蛋白外壳屏蔽效应的影响, 失去对可见光产生强吸收的机会; 3) 脱铁核的 apoSLF 在 280 nm 处的峰值明显高于 SLF, 说明铁核在一定程度上抑制芳香族氨基酸残基在 280 nm 处的特征吸收, 但是随着波长红移, SLF 的吸收强度明显大于 apoSLF, 释放铁量越多的 apoSLF 在可见光谱区中的吸收强度越低. 这说明铁硫簇对可见光谱区的吸收仍有一定贡献. 这一光谱规律与 HSF 和 PSF 等铁蛋白的光谱特性及变化趋势很相似^[16]; 4) 储存农药后, SLF_{op} 从近紫外区至可见光区的吸光值都明显提高, 说明有机磷分子

在一定程度上影响了铁核结构并增强其对可见光吸收的影响, 其递增率高于铁蛋白释放铁时所引起的下降率, 致使蛋白的光吸收值仍然递增. 根据 SLF_{op} 与 SLF 吸光值量差与反应时间的关系, 可以推算 SLF_{op} 储存有机磷农药的速率.

SLF 储存有机磷分子的动力学研究表明, 一定时间内铁蛋白储存有机磷分子数量与外界有机磷浓度成正相关, 水体流动性也能增强铁蛋白储存有机磷分子的能力, 达到饱和后呈现缓慢下降态势; 而脱铁核程度对 SLF 储存有机磷分子能力存在影响, 当 SLF 只释放铁核表层的部分铁时, 其铁核表层仍然含有高磷铁比的结构, SLF 以较快的速率储存有机磷分子, 但是, 随着铁的释放和铁核表层高磷铁比结构的消失, 储存有机磷空间减少, SLF 储存有机磷数量达到饱和状态. 这些现象表明 SLF 可能以共价键方式储存有机磷分子, 储存能力不仅受外部蛋白壳柔性调节影响^[3-5], 而且还受控于铁核表层的高磷铁比结构和储存有机磷的空间大小. 铁核表层的高磷铁比结构是有机磷农药的络合位点, 低磷铁比的铁核内层结构结合有机小分子的能力很差, 储存速率很低. 另外, 部分有机磷分子可能以不稳定的非位点结合方式被储存, 随后容易被释放到介质中, 因此出现 SLF 储存有机磷分子数随着反应时间的推移而下降的现象.

鉴于上述研究结果, SLF 储存有机磷分子过程中伴随着释放铁和光谱特性变化的现象, 通过进一步研究 SLF 储存不同有机磷农药分子的能力及影响因素, 认为, 可根据 SLF 光谱特性及吸光度的变化判断 SLF 储存有机磷总量, 构建 SLF 反应器应用于监测水体中农药等含磷化合物的污染, 从而简化了流动水体中含磷化合物测试步骤. 在建立 SLF 反应器监测有机磷污染水体的动力学方程式时, 务必考虑水体流速对蛋白储存能力的影响. 如把该反应器与物理转换器或卫星遥感技术相结合, 将反应器获得的化学信号转化为电化学信号、光信号, 则可用于连续监测流动水体质量、分析沿海深水区域底质污染情况, 并可用于恶劣天气如强台风或地震期间的水质污染监测, 最终为政府部门科学地控制排污总量提供可靠的科学依据.

[参考文献]

- [1] HARRISON P M, HOY I G, MACARA I G, et al Ferritin iron uptake and release [J]. *Biochem J* 1974, 143(2): 445-447.
- [2] JOHNSON L J, CANNON M, WATT R K, et al Forming the phosphate layer in reconstituted horse spleen ferritin and role of phosphate in promoting core surface reactions [J]. *Biochemistry* 1999, 38(20): 6706-6713.
- [3] THEIL E C, TAKAGI H, SMALL G W, et al The ferritin iron entry and exit problem [J]. *Inorganica Chim Acta* 2000, 297(2): 242-251.
- [4] LAULHERE J P, LABOURE A M, WUYTSW NKELO V, et al Purification characterization and function of bacterioferritin from the *Cyanobacterium synechocystis* [J]. *Biochem J* 1992, 281(3): 785-793.
- [5] RICHARDS T D, PITT K R, WATT G D. A kinetics study of iron release from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin [J]. *J Inorg Biochem*, 1996, 61(1): 1-13.
- [6] 林庆梅, 乔玉欢, 黄河清. 铁蛋白反应器储存有毒金属离子的初步研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 1999, 38(6): 871-876.
- [7] 黄河清, 林庆梅, 肖志群, 等. 猪脾铁蛋白反应器储存有机小分子能力的研究 [J]. 生物物理学报, 2000, 16(4): 39-47.
- [8] 黄先玉, 刘沛然. 水体污染生物检测的研究进展 [J]. 环境科学进展, 1999, 7(4): 15-18.
- [9] 胡冠九, 刘建琳. 生物传感器在环境监测中的应用 [J]. 环境监测管理与技术, 1999, 11(2): 12-16.
- [10] 陈旭, 黄河清, 孔波, 等. 鲨鱼和虹鱼肝铁蛋白电泳纯化的制备技术 [J]. 海洋科学, 2004, 28(1): 5-19.
- [11] HUANG H Q, WATT R K, FRANKEL R B, et al Role of phosphate in Fe^{2+} binding to horse spleen holoferritin [J]. *Biochemistry* 1993, 32(6): 1681-1687.
- [12] 韦石泉, 徐慧民. 应用负染色技术电镜观察快速检测植物病毒粒子的研究 [J]. 微生物学杂志, 1985, 5(4): 7-10.
- [13] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 3版. 北京: 中国环境科学出版

社, 1989: 278-285.

- [14] MARTIN T D, MONHEIT S A, NICHEL R J et al. Electron transfer of horse spleen ferritin at gold electrode modified by self-assembled monolayers [J]. *J Electroanal Chem*, 1997, 420(2): 279-290.
- [15] 赵开弘, 周明, 李月, 等. 藻红蓝蛋白 α -亚基的低温紫外-可见吸收光谱和圆二色光谱的研究 [J]. *武汉大学学报: 自然科学版*, 1999, 45 (2): 207-210.
- [16] HUANG H Q, XU L X, ZHANG F Z et al. H_2 -uptake activity, spectra reduction potentials and kinetics of iron release on the surface of iron core from azotobacter vinelandii bacterial ferritin [J]. *Journal of Protein Chemistry*, 1998, 17(1): 45-52.
- [17] 王群力, 孔波, 黄河清. 铁蛋白纳米蛋白壳结构与功能研究新进展 [J]. *化学进展*, 2004, 16(4): 516-519.

Characteristics of Shark Liver Ferritin and Its Storage Capacity of Molecules of Organophosphorus Pesticides

XIAO Zhì-qun^{1,2,3}, WENG Zhao-hong^{1,2,3}, HUANG He-qing⁴

- (1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety (Jimei University), Fujian Province Xiamen 361021, China; 3. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China; 4. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract The properties of UV-Visible spectrum and electron microstructure of Shark Liver Ferritin (SLF) were described in detail. The comparison of the SLF structures with apoSLF (Shark Liver Apoferritin) and SLFop (SLF storing organophosphorus pesticides) was presented as well. The different capacity and kinetics process of storing OP by SLF and apoSLF indicated that the molecules of OP were stored on the surface of iron core. The capacity of SLFop was not only predominated by the protein flexibility, but also related with the complex surface of the iron core. The amount of storage OP was also related with the concentration of OP and the medium mobility. Based on the characteristics of SLF and its storage capacity on OP molecules, a ferritin bi-reactor could be constructed and applied to monitor water pollution.

Key words Shark Liver Ferritin (SLF); UV-Visible spectroscopy; electron microstructure; organophosphorus pesticides

(责任编辑 朱雪莲)