

细菌铁蛋白氧化还原特性及电极活性的研究

黄河清¹ 林庆梅² 陈翔¹ 陈中¹ 许良树¹ 张凤章¹
(厦门大学生物学系¹, 环境科学研究中心², 厦门 361005)

摘 要

棕色固氮菌细菌铁蛋白能直接快速地从金属铂电极上得到电子或提供电子给铂电极。经-600 mV(相对于NHE)还原电位处理后,还原态细菌铁蛋白在可见光谱区中(380-580nm)所呈现的整体吸收光谱强度明显高于氧化态细菌铁蛋白的吸收光谱强度。经氯化钴处理后的细菌铁蛋白表现出较弱的电极活性及释放铁的速率明显下降。此外,细菌铁蛋白在体外模拟棕色固氮菌整体细胞内的微量氧环境体系中仍有氢还原现象,因而推测细菌铁蛋白在该菌体内也能进行吸氢反应。细菌铁蛋白是一种类似有吸氢酶功能的蛋白质。

关键词: 棕色固氮菌 细菌铁蛋白 电极活性 光谱特性 血红素-电子隧道
吸氢活性

在自然界中,绝大多数含有金属簇的蛋白质及酶在物理电极上均表现出惰性特性,无法从电极上直接接收电子或提供电子给电极^[1,2]。因而,想用物理电极直接研究蛋白质及其它生物大分子的氧化还原特性时,只能采用电化学-染料中间体法^[3-4]。但该方法受中间体的氧化还原电位范围的限制及在它电极上接收电子能力较弱等因素的影响,因而通常无法采用酶-中间体-底物还原技术快速直接研究酶催化底物过程的机理^[2-5]。

铁蛋白在自然界中是一种很特殊的蛋白质,它广泛地存在哺乳动物、植物及微生物的机体中^[6-8]。细菌铁蛋白与哺乳动物铁蛋白的分子结构很相似,两者的分子结构均由高对称的二十四个亚基组成的蛋白壳(80-100埃)包围着一个由数千 Fe^{3+} 和磷酸盐组成的非均匀铁核^[9-10]。动物铁蛋白在可见光谱区中无特征吸收峰^[8],而细菌铁蛋白位于可见光谱区550(α 峰),525(β 峰)和414 nm(S峰)处有明显可定量的特征吸收峰^[11],其峰的形成及强度均与蛋白壳上的血红素(heme)对光吸收有关^[12-13],而不是由位于该蛋白壳内中心部位的铁核对光吸收的反应。

早期的研究结果指出:马脾铁蛋白(Horse spleen ferritin 简称HSF)象其它蛋白质一样对物理电极表现出惰性,因而它在汞电极上表现出无还原电流特性^[14]。但近期的研究结果却表明了:棕色固氮菌细菌铁蛋白(Bacterial ferritin of azotobacter vinelandii,简称AVBF)有电极活性,并提出AVBF的电极活性与该蛋白壳上的血红素所构成了电子隧道(heme-electron-tunnel)有关的看法^[15]。此外,在严格厌氧环境下,AVBF能表现出类似吸氢酶的生理功能,并以 $450\text{H}_2/\text{AVBF}$ 的速率进行吸氢反应^[11]。

本文选用光谱电化学技术,化学还原法及电子传递链功能基团改造法探讨AVBF的光谱,电化学特性和电子隧道功能,进一步阐明AVBF的蛋白壳上的血红素-电子隧道的功能,它对今后构建细菌铁蛋白电极直接测定生物大分子的电化学特性提供有价值理论研究依

据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器设备

棕色固氮菌 OP 和 230 分别引自美国威斯康新大学固氮研究中心和沈阳应用生态林业土壤研究所。部分实验所需的试剂购置美国 Sigma 公司产品。小批量菌体培养选用改良的 Burk 无氮培养基,并用 100 立升发酵罐进行好氧发酵。对数生长期收集菌体备用。

光谱电化学测试系统由电化学综合测定仪,三电极厌氧电解池,恒温,恒搅拌速度系统和紫外可见双光束分光光度计组成。厌氧电解池设计参考前述的方法^[15]。

1.2 方法:

1.2.1 AVBF 的制备及纯化

粗制品 AVBF 的分离及纯化参考李久蒂^[6]和黄河清^[12]的方法。实验所需的 AVBF 样品用低压液相色谱仪(DEAE 纤维素柱,洗脱液: 0.15mol/L NaCl/pH7.25)进一步纯化。光谱监测系统的波长固定在 417nm 处。

1.2.2 蛋白质浓度和铁含量分析

经纯化的 AVBF 蛋白浓度分析按常规 Lowry 方法。标准蛋白选用 98% 纯度的牛血清白蛋白,并用紫外分光光度(280nm)法作为辅助性方法进行比较和参考用 Lowry 方法所测定的蛋白浓度的准确性。用原子吸收分光光度法测定经硝化过的 AVBF 含铁量。

1.2.3 AVBF 释放铁的速率的定量(化学还原测定法)分析按前述的方法进行^[8,13]。

1.2.4 氯化钴对 AVBF 释放铁速率的影响

分别取 0.05M 氯化钴溶液 10 ml 与 AVBF 样品(30mg / ml) 10ml 均匀混合,并在磁力搅拌器上恒温(30℃)反应 30 分钟。实验所需 AVBF 样品应事先用 0.025mmol/L Tris- HCl/0.15mmol/L NaCl(pH.7.0)缓冲液,在 Sephadex G- 25 柱(2×12cm)纯化。AVBFco(AVBF 经氯化钴处理的)释放铁的速率测定按前述的方法进行^[15,16]。

1.2.5 不同 pH 值的 AVBF 制备

取 AVBF 样品 60ml 并均匀分成 5 份。不同 pH 值的 AVBF 制备及纯化参考黄河清的方法^[2,8]。

1.2.6 AVBF 的吸氢还原反应及活性测定均参考前述的方法^[11]。

1.2.7 光谱电化学法直接测定 AVBF 释放铁速率参考黄河清的方法^[11]。

2 结 果

2.1 AVBF 电极活性及可逆性特性

图 1A 结果表明;经低压液相色谱仪纯化后的 AVBF 在可见光谱区(380- 580nm)有明显定量分析的特征吸收峰,其最大吸收峰分别位于 550(α 峰),525(β 峰)和 414nm(S 峰)。如用 - 600mV(相对 NHE, 30℃, 以下相同)电位直接厌氧还原氧化态的 AVBF 成为还原态(图 1B;铁核中 Fe^{3+} 组分已被还原成为 Fe^{2+})的 AVBF(简称 AVBFr)。此时,AVBFr 在可见光谱区中的特征吸收峰峰位与图 1A 所示的结果很相似。但是,AVBFr 的整体吸收曲线强度随铁核中的 Fe^{3+} 组分被还原成 Fe^{2+} 离子含量递增而增加,因而 AVBFr 的光谱吸收强度明显高于 AVBF 的光谱吸收强度。图 1C 结果表明;用恒定+ 600 mV 电位可直接厌氧氧化 AVBFr 成

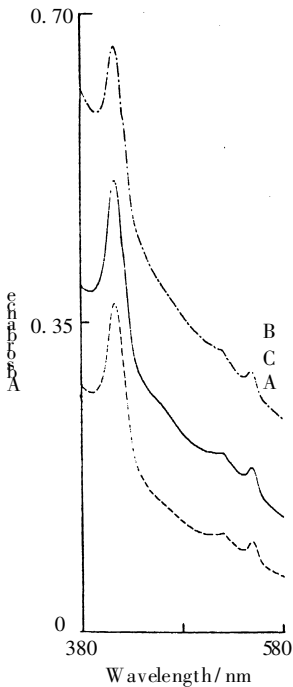


Fig. 1 Redox spectra of AVBF (pH 7.25). A: Spectrum of AVBF. B: Spectrum of AVBF_r at reduction potential of -600 mV. C: Spectrum of AVBF_o at oxidation potential of +600 mV.

为氧化态 AVBF_o (此时, AVBF_r 中的 Fe²⁺ 已被氧化成 Fe³⁺, 简称 AVBF_o)。AVBF_o 在可见光谱区 (380–580 nm) 的整体曲线吸收强度随着 AVBF_r 铁核中的 Fe²⁺ 离子逐渐被铂电极所氧化而减弱。然而, 尽管 AVBF_o 的光谱吸收强度比 AVBF_r 的光谱强度低, 但它仍比 AVBF 的光谱强度稍为高些。

2.2 AVBF 的紫外光谱及氧化还原特性

图 2A 是不同 pH 的 AVBF 在紫外光谱区中的光谱特性。从图 2A 结果可看出: 随着反应介质的 pH 值逐步递增, AVBF 在紫外光谱区的光谱吸收强度也依次逐渐增强。此外, 在 pH 值 5.0–8.0 范围内, AVBF 的最大吸收峰峰位表现出 5nm 的红移现象。从图 2A, B 所示结果比较分析可知: 在 100% 氢气的气氛下, 不同 pH 的 AVBF 经氢还原 (吸氢现象) 后 (AVBF_{rh}) 的紫外光谱特性与图 2A 结果明显不同, 即在 pH 7.0–8.0 的介质中, AVBF_{rh} 光谱吸收强度增加最大, 其次是 pH 6.0 的 AVBF_{rh}。而在 pH 5.0 时, AVBF_{rh} 的光谱的吸收强度不仅没有递增, 反而减弱。但在 pH 9.0 时, AVBF_{rh} 的光谱吸收强度几乎保持不变。此外, 在反应介质 pH 变化从 5.0–8.0 范围内, AVBF_{rh} 的最大特征吸收峰峰位表现 10 nm 的红移现象。

图 2C 结果表明: 在 2% O₂ 和 95% H₂ 混合气中, AVBF 同样也可以被 H₂ 还原成 AVBF_r (简称为 AVBF_{roh}), 并伴随着吸氢反应。不同 pH 的 AVBF_{roh} 在紫外光谱区中的整体曲线的吸收强度明显高于所对应 pH 的 AVBF (图 2A) 的吸收强度, 但两者的光谱吸收强度的变化趋势均随着反应介质中的 pH 值递

增而增强, 其变化趋势很相似。比较图 2B, D 结果可知: 如先用 100% H₂ 还原 AVBF 成为 AVBF_{rh}, 随后再用 5% O₂ 氧化 AVBF_{rho}。此时, 不同 pH 的 AVBF_{rho} 在紫外区的吸收强度和光谱的变化趋势与图 2B 结果基本相似, 并均在紫外光谱区中的最大吸收峰值红移了 10nm (280–290 nm)。但两者光谱吸收强度的唯一差别较大是在 pH 6.0, AVBF_{rho} 的吸收强度明显高于所对应的 pH 的 AVBF_{rh} 的吸收强度。

2.3 不同 pH 的 AVBF 的可见光谱特性

图 3 结果表明: pH 范围为 5.0–9.0 的 AVBF 经 100% H₂ 还原后均在可见光谱区中仍呈现可定量分析的电子特征吸收光谱, 其最大吸收峰峰位分别位于 550 (α 峰), 525 (β 峰) 和 414 nm (S 峰), 没有吸收峰峰位红移现象。如比较不同 pH 的 AVBF (相同的蛋白浓度) 在可见光谱区中的吸收强度可知^[11, 12, 15]: pH 6.0, 7.0, 8.0 的 AVBF 经 100% 氢气还原后, 其整体的光谱强度均有增强, 其中 pH 8.0 的 AVBF 增加幅度最大。但 pH 5.0 和 pH 9.0 的 AVBF 的光谱吸收强度增加幅度比较很小, 即 Abs_{pH 8.0} > Abs_{pH 7.0} > Abs_{pH 6.0} > Abs_{pH 9.0} > Abs_{pH 5.0}。比较图 3 和图 2B 结果可知: 不同 pH 的 AVBF 经 100% H₂ 还原后, 其整体光谱吸收强度在紫外区和可见区的变化趋势均存在明显差异。

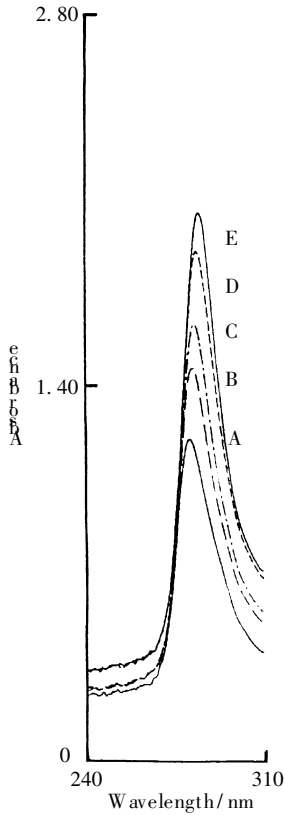


Fig. 2A Spectra of AVBF in the different pH medium. A: pH5.0, B: pH6.0, C: pH7.0, D: pH8.0, E: pH9.0.

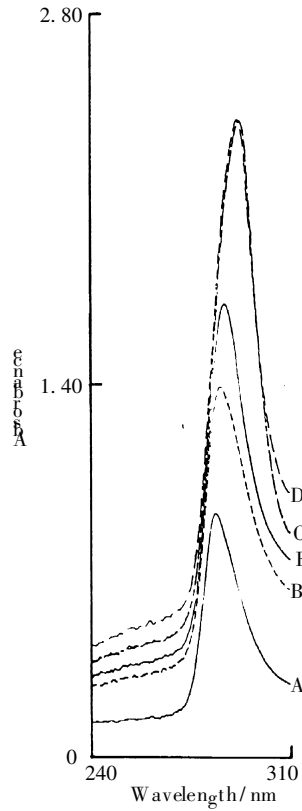


Fig. 2B Spectra of AVBFrh in the different pH medium. A: pH5.0, B: pH6.0, C: pH7.0, D: pH8.0, E: pH9.0.

2.4 AVBFCo 释放铁的速率及反应级数

Co^{2+} 对 AVBF 蛋白壳上的血红素中的 Fe^{3+} 有竞争替换作用。图 4 结果表明, 经氯化钴处理后的 AVBFCo 释放铁 ($Na_2S_2O_4$ 还原法) 全过程的平均速率为 $7.3Fe^{3+} / AVBF / min$, ($30^{\circ}C$), 它比我们近期报道的 AVBF 释放铁的速率 $15Fe^{3+} / AVBF / min$ 慢 1.0 倍左右, 与经磷酸盐处理后的 AVBF 释放铁的速率较相似 ($6.4Fe^{3+} / AVBF / min$)^[13]。如把图 4 结果分别代入常规的零级, 一级或二级反应动力学方程, 其结果均无法获得一条用纵坐标表示释放铁速率及用横坐标表示反应时间的直线, 即存在着混合级反应。

2.5 用物理电极还原 AVBFCo 释放铁速率及反应级数

图 5 结果指出, AVBFCo 能直接从铂电极 ($-600mV$) 上得到还原电子并自身还原铁核中的 Fe^{3+} 组分为 Fe^{2+} , 而不需要额外加入化学还原剂, 生物还原剂及生物染料中间体还原 AVBFCo 铁核中的 Fe^{3+} , 就能使它在铂电极提供的还原电位条件下直接释放 Fe^{3+} 。图 5 结果表明; 用铂电极直接还原时, AVBFCo 释放整体铁核的铁的速率反应时间成对应的正比关系, 平均释放铁的速率是 $5.2Fe^{3+} / AVBFCo / min$, 比图 4 所示速率略低点。此外, AVBFCo 释放整

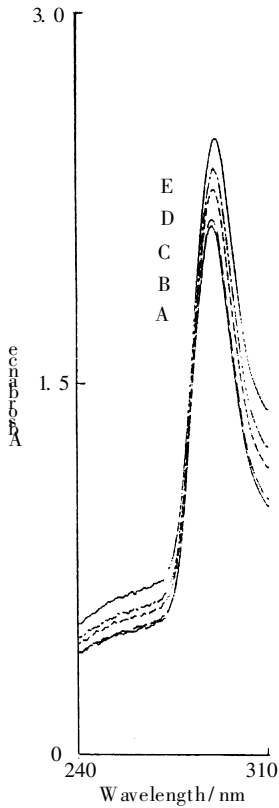


Fig. 2C Spectra of AVBFroh by 98% H₂ reduction in the presence of 2% O₂ and different pH medium. A: pH 5.0, B: pH 6.0, C: pH 7.0, D: pH 8.0, E: pH 9.0.

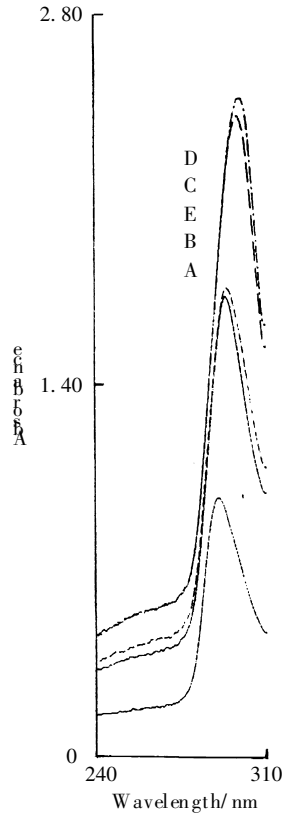


Fig. 2D After being reduced by 100% H₂ and then oxidized by 5% O₂, spectra of AVBFrho in the different pH medium. A: pH 5.0, B: pH 6.0, C: pH 7.0, D: pH 8.0, E: pH 9.0.

体铁核的铁的速率始终保持为 $5.2Fe^{3+}/AVBF_{Co}/\text{min}$ (K 值不变)。释放铁的速率与反应时间成线性关系, 与 AVBF_{Co} 铁核中的含铁量无关。因而可知, AVBF_{Co} 释放铁的动力学符合零级反应动力学特征性质。AVBF_{Co} 释放铁的全过程的动力学反应级数属于零级反应。AVBF_{Co} 蛋白壳上的血红素- Co²⁺ 结构并不能使原释放铁的动力学级数由原零级反应转化成一或混合级反应。血红素- Co²⁺ 结构限制了铁蛋白传递电子的速率, 使 AVBF_{Co} 释放铁的速率明显下降。

3 讨 论

血红素以共价键的方式结合 AVBF 的蛋白壳上, 脱血红素的 AVBF 象 HSF 一样在可见光谱区中无特征吸收峰^[17]。显然, AVBF 的特征吸收峰实际上是该蛋白壳上的血红素对可见光吸收的结果。不同 pH 的 AVBF 在可见光谱区呈现不同的吸收强度的主要原因是 H⁺, OH⁻ 参与铁核结构^[18], 并引起蛋白壳发生了柔性的调节, 促使蛋白壳表层能对光产生吸收的血红

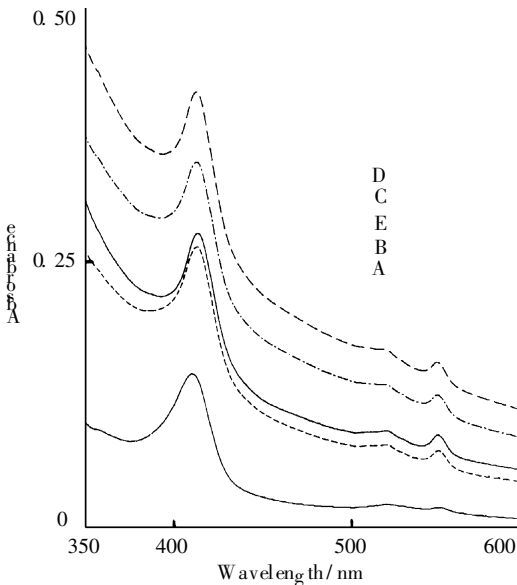


Fig. 3 Visible spectra of AVBFrh by 100% H₂ reduction ranging from 350 to 580nm. A: pH5.0, B: pH6.0, C: pH7.0, D: pH8.0, E: pH9.0.

素组分的数目随之发生变化，因而获得不同的光吸收强度(图 3)。但由于 H⁺，OH⁻ 分别影响 AVBF 蛋白壳的柔性调节的方向，速率及幅度可能不一样，所以蛋白在偏酸性的介质中所释放铁的速率比在偏碱性介质中的释放铁的速率快^[16]。

AVBF 和大多数蛋白质一样在紫外光谱区 280 nm 处中均有特征吸收峰，这一吸收峰主要是蛋白壳上的色氨酸，酪氨酸及丙苯氨酸对紫外光吸收的贡献。随着反应介质 pH 递增，蛋白壳柔性调节能力及幅度也发生变化，并使蛋白壳表层的色氨酸，酪氨酸及丙苯氨酸的相对含量也随之变化，因而形成了 AVBF 的吸收峰强度随着 pH 递增而增加的现象。此外，这三种氨基酸的相对含量也随 pH 递增而不同，因而出现 5 nm 的红移现象。用 100% 纯氢气还原时，可能 H₂ 在生理 pH 范围内 (pH7.0- 8.0) 对 AVBF 蛋白壳

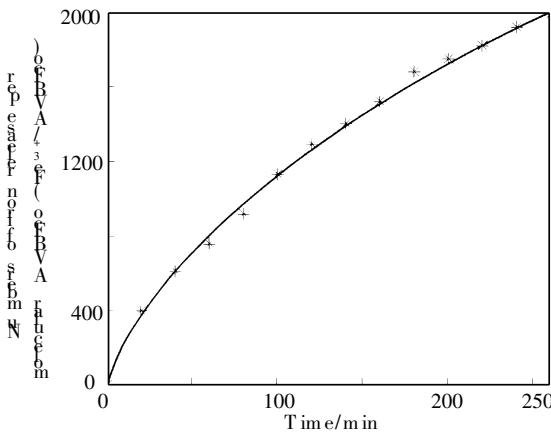


Fig. 4 Kinetics of iron release of AVBFco treated by cobaltic chlorides.

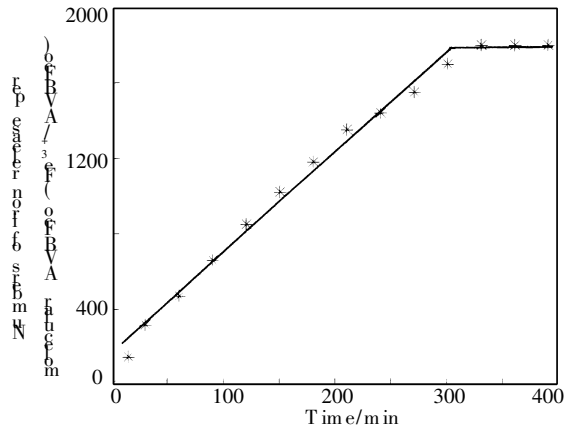


Fig. 5 Kinetics of iron release of AVBFco by direct electrochemical reduction at - 600 mV in the absence of mediator.

柔性调节幅度最大，从而引起蛋白壳在紫外光谱区 280 nm 处所形成吸收强度最大，并伴随着 10nm 的红移现象。显然，红移现象和光谱吸收强度的变化均与蛋白壳自身产生的柔性调节幅度大小有密切联系。但在可见光谱区中，AVBF 所呈现的特征吸收峰与血红素有关，所以无论 AVBF 蛋白壳所产生的柔性调节幅度有多大，其光谱吸收强度与蛋白壳表层血红素含量有关，与其它组分无关，因而不产生红移现象。

棕色固氮菌是好氧型的固氮菌，固氮酶对氧极为敏感，遇氧易失活^[19]。但该菌菌体内中含

有氧保护蛋白,所以使菌体细胞内始终处于微氧环境,确保固氮酶能在微氧条件下固氮成氨。在体外和严格的厌氧环境下,AVBF能表现出吸氢活性的新生理功能,其活性最大为 $450\text{H}_2/\text{AVBF}^{[15]}$ 。但在模拟微量氧的环境下,AVBF仍可被氢所还原(图1,2),因而推测;AVBF在棕色固氮菌体内也可能进行吸氢反应。AVBF是一种具有吸氢酶活性的蛋白质。

Pt电极绝对不可能直接穿过蛋白壳上只有几十埃宽度的物质交换隧道还原铁蛋白铁核中的铁组分。不含血红素组分的HSF在汞电极上无还原电流^[14],而AVBF在Pt电极上呈现出还原电流。因而,推出AVBF蛋白壳上的血红素是构成电子隧道的主要成分分子,起着传递及输送电子的作用。如AVBF蛋白壳上的血红素中铁离子被 Co^{2+} 所取代后,可能直接影响电子传递的速率,但并不影响蛋白壳的柔性调节能力,因而只起降低AVBF释放铁的速率的作用,并不能改变AVBF释放铁的动力学反应级数。根据上述结果和推论可知;AVBF蛋白壳上可能含有电子隧道结构,血红素似乎是电子隧道主要的成分之一。

参考文献

- 1 Watt G D.: *An electrochemical method for measuring redox potentials of low potential proteins by microcoulometry at controlled potentials. Analytical Chemistry*, 1979, 99(2): 399- 407.
- 2 黄河清, Watt R T, 和 Watt G D 等: 马脾铁蛋白铁核表层特性, 厦门大学学报(自然科学版) 1993, 32(5): 628- 633.
- 3 Watt G D.: *A microcalorimetric procedure for evaluating the kinetic parameters of enzyme-catalyzed reactions: kinetic measurements of the nitrogenase system. Analytical Biochemistry*, 1990, 187(1): 141- 146.
- 4 Pierik A J, Wassink H, Hakker H, et al.: *Redox properties and EPR spectroscopy of the P cluster of azotobacter vinelandii MoFe Protein. Eur. J. Biochem.* 1993, 212(1): 51- 56.
- 5 Watt G D, Huang H Q, Reddy K R N.: *Redox properties of the nitrogenase proteins from azotobacter vinelandii. Molybdenum Enzymes, Cofactors, and Model Systems. Stiefel, E. I. et al. eds. American Chemical Society, Washing, DC, 1993, 535(1): 233- 256.*
- 6 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, 中国科学, (B辑), 1979, 10: 1681- 1687.
- 7 Theil E C. *Ferritin: Structure, gene, regulation, and cellular in animals, plants, and microorganisms. Ann. Rev. Biochem.* 1987, 56: 289- 315.
- 8 黄河清, 张凤章, 许良树: 猪脾和马脾铁蛋白理化特性的比较, 动物学报, 1997, 43(2): 170- 177.
- 9 Stiefel E I, and Watt G D.: *Azotobacter vinelandii b557.5 is a bacterioferritin. Nature*, 1979, 279(1): 81- 83.
- 10 Harrison P M, Hoy T G et al.: *Ferritin iron uptake and release. Biochem. J.*, 1974, 143(1): 445- 451.
- 11 Huang H Q, Xu L S, Zhang F Z, Lin Q M et al.: *H₂- uptake activity, spectra, reduction potentials, and kinetics of iron release on the surface of iron core from azotobacter vinelandii bacterial ferritin. Journal of Protein Chemistry.* 1998, 17(1): 45- 52.
- 12 黄河清, 张凤章, 陈灿和等: 细菌铁蛋白释放铁的动力学研究, 生物物理学报, 1996, 12(1): 33- 37.
- 13 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, 生物物理学报, 1998, 14(1): 13- 19.
- 14 Imai N, Umezawa Y, et al.: *An electrochemical study of the iron storage protein, ferritin. Biochim. Biophys. Acta.* 1980, 626(2): 501- 506.
- 15 Huang H Q, Zhang F Z, Xu L S, Lin Q M et al.: *Spectroelectrochemical investigation of azotobacter vinelandii bacterial ferritin. Journal of Electroanalytical Chemistry(Bioelectrochemistry and Bioenergetics).* 1998, 44(1): 301- 307.
- 16 Funk F, Lenders J P, Crichton R. R. et al.: *Reductive mobilisation of ferritin iron. Eur. J. Biochem.* 1985, 152(1): 167- 172.

- 17 Watt G D et al.: *Further characterization of the redox and spectroscopic properties of azotobacter vinelandii bacterial ferritin*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1993, 51(4): 745– 758.
- 18 Huang H Q, Watt R K, Frankel R B, et al.: *Role of phosphate in Fe²⁺ binding to horse spleen holoferritin*. *Biochemistry*, 1993, 32(6): 1681– 1687.
- 19 Huang H Q, Koffors M, Simpson F B. et al.: *Purification, composition, charges, and molecular weight of FeMo cofactor from azotobacter vinelandii nitrogenase*. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1993, 52(1): 59– 75.

STUDIES ON REDOX CHARACTERISTICS AND ELECTRODE ACTIVITY OF BACTERIAL FERRITIN

Huang Heqing¹ Lin Qingmei² Chen Xiang¹ Chen Zhong¹

Xu Liangshu¹ Zhang Fengzhang¹

(*Department of Biology¹, The Research Center of Environment Science²,
Xiamen University, Xiamen, 361005, China*)

ABSTRACT

Bacterial ferritin from *Azotobacter vinelandii* can directly and quickly pick reduction electrons from a metal platinum electrode or provide electrons to it. The spectral absorbance intensity in the visible spectrum (380– 580 nm) of reduced bacterial ferritin after treated by the potential at – 600 mV vs. NHE is evidently higher than that of the oxidized it. Being treated by cobalt chloride, the ferritin exhibits weak activity to the electrode and its rate for iron release decreases evidently. It suggests that on the protein shell of bacterial ferritin exist a structure of partial electron tunnel consisting of mixed composition of heme– Fe²⁺ and heme– Co²⁺. H₂– uptake phenomenon of the bacterial ferritin is still found in an analogy system of micro– oxygen environment of entire cell *Azotobacter vinelandii* in vitro, which indicates that the H₂– uptake reaction can be carried out by the ferritin within the cell. The bacterial ferritin is a protein which possesses characteristics of H₂– uptake hydrogenase– like activity.

Key Word: *Azotobacter vinelandii* Bacterial ferritin Electrode activity
Spectral characteristics Heme– electron– tunnel
Hydrogenase activity