

的光度标准,可以在200~2600nm范围内使用同一标准进行检定/校准,同时也解决了使用标准溶液带来的量值传递及现场检定/校准的困难,对于提高分光光度计检定/校准的准确

度,特别是对于国防大型试验的现场检定与校准工作,具有十分重要的意义。

收稿日期:1998-11-09

张国民,男,工程师,主要从事化学计量检定及标准物质研究工作。

Development of a new UV-VIS-NIR transmittance standard material for spectrophotometer. Zhang Guomin, Xin Delin, Pan Zhongquan, Zhang Guofeng (The First-Rank Chemometric Station of the Commission of Science, Technology and Industry for National Defence, Jinan, 250031)

A new transmittance standard material of UV-VIS-NIR region has been developed for the testing and calibration of spectrophotometers. The making of the standard is described. The factors affecting the uncertainty of the standard are discussed in detail based on experimental data. The main specifications of the standard are compared with those of several foreign standards.

## 生物电化学电解池的设计及应用\*

黄河清

林庆梅

(厦门大学生物学系,厦门,361005)

(厦门大学环科中心,厦门,361005)

**摘 要** 根据生物大分子的生理特性,设计了三种不同的电化学电解池,分别用于研究猪脾铁蛋白、细菌铁蛋白的电化学特性,以及电诱导棕色固氮菌表达新生理特性。说明了电解池的设计特点,给出了电解池示意图。实验结果表明,猪脾铁蛋白及细菌铁蛋白能直接从铂电极上获得还原电子,是非电极惰性蛋白质。棕色固氮菌能在电调控下被诱导成抗氨阻遏的菌株,合成固氮酶。这三种电解池也适用于分析各种酶、蛋白质及细胞的电化学特性,并具有快速、准确、方便等特点。

**关键词** 电化学电解池 三电极体系 氧化还原 铁蛋白 棕色固氮菌

### 1 引 言

在自然界中,大多数蛋白质、酶及细胞对物理电极(如铂电极、金电极及汞电极)呈电惰性状态<sup>[1,2]</sup>。这一现象使采用物理电极直接研究酶、蛋白质、细胞组织及器官的电化学特性受到限制,而只能通过测定生物染料中间体(如甲基紫精、中性红)在电极上接收电子的

能力、特性及它们与生物大分子的反应程度来间接地分析酶、蛋白质、细胞组织及器官的电化学特性。

近期,在研究棕色固氮菌细菌铁蛋白(*azotobacter vinelandii* bacterial ferritin, AVBF)及细胞色素C(cytochrome C)的电极活性时却发现,这两种蛋白质均在电极上表现出电化学特性,能直接从物理电极上接收还原电子,属于非电极惰性蛋白质<sup>[3,4]</sup>。棕色固氮菌整体细胞(AV细胞)在三电极体系直接还原作用下,

\* 国家自然科学基金(No. 49876027)及福建省自然科学基金(No. 96006)资助项目。

也能表现出较强的抗氮阻遏能力,表达高固氮活性,显示出新的生理特性<sup>[5]</sup>。亚铁氧化硫杆菌(*thiobacillus ferrooxidans*)经电化学生物反应池处理,能加速细胞分裂,在相同的培养条件下,每毫升培养基的细胞数由 $1 \times 10^7$ 迅速增加到 $5 \times 10^9$ ,为原来的500倍<sup>[6]</sup>。

近十几年来,随着生物电化学技术的深入发展,有关光谱电化学电解池的设计及用途已有详细报道。但许多电解池存在工艺复杂,成本较高,电解池内三电极过密等缺陷,影响了光谱测定的重复性及准确性。此外,蛋白质及酶直接从电极上接收电子的速率通常低于从化学还原剂得到电子的速率,因而只能适当增加工作电极(阴极)的面积,以提高蛋白质接收电子的速率,缩短还原平衡时间。

如果根据生物大分子的结构及生理特性,设计合理的电解池,就有可能改善电极与某些生物大分子之间的电子传递及电极活性。本文利用自制的电解池研究了猪脾铁蛋白(pig spleen ferritin, PSF)、细菌铁蛋白的电化学特性,电诱导棕色固氮菌表达新生理特性。这些电解池不仅适合研究铁蛋白及AV细胞的电极活性,而且适合于研究蛋白质和细胞的电化学生物特性。

## 2 实验条件与方法

### 2.1 仪器与试剂

DHZ-1型电化学综合测试仪,电解池为三电极系统;THZ-82型恒温振荡器;78-1型磁力搅拌器;103G型气相色谱仪;WY-2型原子吸收分光光度仪;日本岛津UV-240型紫外可见分光光度计。

$C_2H_2$ 及 $H_2$ 纯度均为99%。 $\alpha'$ -联吡啶等试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

### 2.2 菌体培养及电调控培养

棕色固氮菌-OP菌株,引自美国威斯康星大学细菌系。200mL改良的Burk's无氮培养基,分装在10个100mL三角瓶中并灭菌(pH7.25),冷却后用于培养菌体。菌体在THZ

-82型恒温振荡器(120r/min, 30℃)培养。对数生长期(20h)收集菌液,放置冰箱中,在3h内使用。电调控处理菌体的反应温度为30℃。每一实验点都均匀取样20mL菌液。根据实验需要选择不同电位处理菌液,至恒电位仪显示反应体系平衡为止(残余电流200~5 $\mu$ A)。随后,迅速取出经电处理过的菌液,与对照样品同时高速(10000r/min)离心20min,弃去上清液,分别加入10mL磷酸缓冲液(pH7.25)悬浮菌体,分别放置在20mL的血清瓶(3mL菌液)中,并加入2.0mL  $C_2H_2$ ,用于菌体的固氮酶活性测定。AV细胞的固氮酶活性测定按文献[5]报道的方法进行。

### 2.3 铁蛋白分离及纯化

AVBF和PSF的分离及纯化按文献[7,8]所报道的方法进行。

### 2.4 蛋白浓度及铁蛋白含铁量测定

细胞及铁蛋白的蛋白质浓度测定均按常规Lowry方法进行。铁蛋白铁核中的含铁量采用分光光度法<sup>[9]</sup>或原子吸收分光光度法测定。

### 2.5 铁蛋白释放铁的动力学测定

AVBF和PSF释放铁的实验操作步骤及速率测定方法均按文献[7-9]报道的方法进行。

## 3 结果与讨论

### 3.1 厌氧型直接电化学电解池

图1是一个以汞阴极为工作电极用于研究PSF电化学特性的厌氧电解池。该电解池能提供大面积工作电极(汞阴极)及较大的还原电流,以便使PSF铁核中的 $Fe^{3+}$ 能在较短时间内得到还原。然而,实验结果却表明,在控制电压为-100, -200, -300, -400, -500, -600mV(相对于标准氢电极电位,下同)及严格厌氧条件下,PSF均在汞电极上表现出电惰性状态,无还原电流。出现这种情况的原因是,汞是蛋白质的强烈变性剂,因而PSF在汞电极上会迅速变性,失去蛋白壳上原有的电子隧道结构<sup>[10]</sup>,所以呈现出电惰性状态。

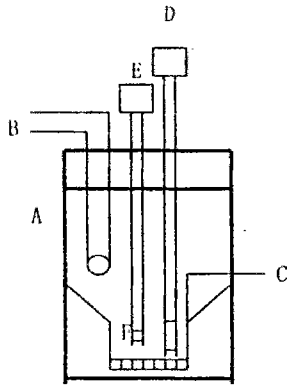


图1 汞阴极厌氧型电解池

- A. 电解池 B. 气体循环系统 C. 汞阴极 (工作电极)
- D. 饱和甘汞电极 E. 铂丝辅助电极 F. 汞

根据上述情况,我们又设计了一个以铂电极为工作电极的厌氧电解池,见图2。该电解池也能提供大面积(2cm × 5cm)工作电极和较大还原电流。此外还配置了惰性气体搅拌系统,尽可能减少浓度扩散电位,加速PSF在铂电极上的还原。实验结果表明,在这个电解池中,PSF能利用自身蛋白壳上的电子隧道结构<sup>[10]</sup>从铂电极上接收还原电子,迅速将铁核中的Fe<sup>3+</sup>还原为Fe<sup>2+</sup>。因而证实,PSF实际上是一种非电惰性蛋白质,即电极活性蛋白质。

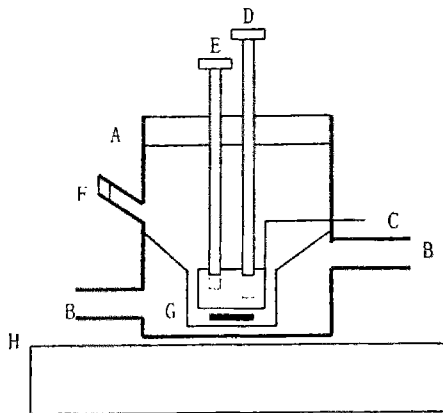


图2 铂阴极厌氧型电解池

- A. 电解池 B. 水浴恒温系统 C. 铂阴极
- D. 饱和甘汞电极 E. 铂丝辅助电极
- F. 惰性气体循环系统 G. 磁力搅拌棒 H. 磁力搅拌器

猪碑铁蛋白 (PSF) 的分子结构有一个由

高对称的 24 个亚基组成的蛋白壳 (8 ~ 10nm) 包围着的由数千个 Fe<sup>3+</sup> 和磷酸盐组成的非均匀铁核<sup>[11,12]</sup>, 并有三相物质交换隧道, 如图3所示。在体外, 铁蛋白释放铁时, 需要强还原剂 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 才能通过三相物质交换隧道 (图3中C) 将铁核中的 Fe<sup>3+</sup> 还原为 Fe<sup>2+</sup>, 还需要 α'α-联吡啶将 Fe<sup>2+</sup> 螯合在蛋白壳外<sup>[12,13]</sup>。

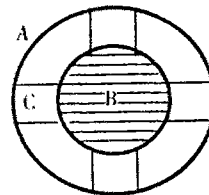


图3 铁蛋白分子结构

- A. 蛋白壳 B. 铁核 C. 三相物质交换隧道

但是, 如果用图2所示的厌氧型电解池作为PSF释放铁的反应器, 只需在控制铂电极电位为-600mV的厌氧条件下(铂电极作为电子供体), 就能使PSF直接释放铁, 无需额外加入化学还原剂或生物染料中间体。

PSF释放铁的全过程线性回归曲线方程为 Y = 7.9058 + 19.8102X, 线性相关系数为 r = 0.9994。可见, PSF释放的铁量与时间成线性关系, 释放铁的动力学过程遵循零级反应规律, 其电子传递过程仅仅发生在蛋白壳上的电子隧道与电极之间, 而不是通过蛋白壳的物质交换隧道。释放铁的速率与电子隧道接收电子快慢有关, 与蛋白壳自身调节能力无关。

### 3.2 厌氧型光谱电化学电解池

图4是自制光谱电化学电解池。它的电解池也有面积足够大的工作电极, 可在不同控制电位下厌氧测定蛋白质的光谱特性。控制电位处理蛋白质和光谱测定需分别进行。电解池垂直旋转90度, 把电解池中的比色杯插入分光光度计比色槽中, 即可进行光谱测定。但两者在同一个电解池中完成, 不易漏氧及丢失样品, 操作步骤简单快速。此外, 电解池加工工艺较简单, 成本低廉, 是较理想的生物光谱电化学电解池。

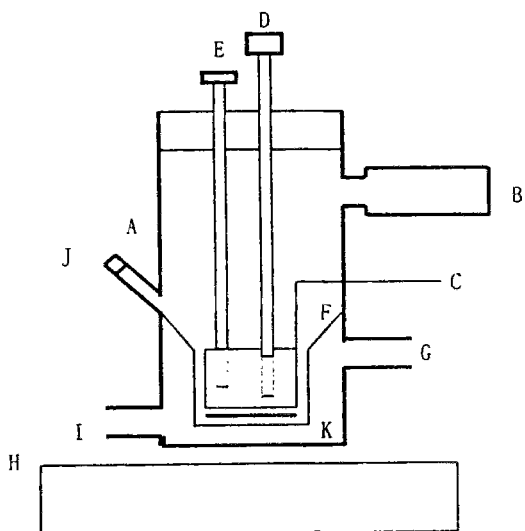


图 4 厌氧型生物光谱电化学电解池

- A. 电解池 B. 比色杯 C. 铂阴板 (工作电极)
- D. 饱和甘汞电极 E. 铂丝辅助电极 (阳极) F. 样品池
- G. 水浴恒温系统输出口 H. 磁力搅拌器
- I. 水浴恒温系统输入口 J. 惰性气体循环系统 K. 磁力搅拌棒

图 5 是用图 4 光谱电化学电解池测定获得的 AVBF 氧化还原的光谱变化过程。

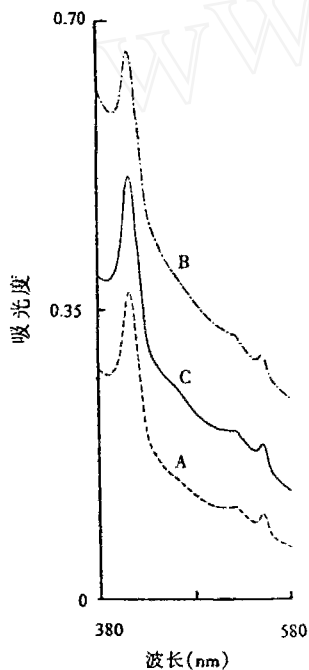


图 5 AVBF 的电化学光谱特性

- A. AVBF 光谱 B. AVBF<sub>r</sub> 光谱 (-600mV 电位处理)
- C. AVBF<sub>o</sub> 光谱 (+600mV 电位处理)

图 5 曲线 A 是 AVBF 的吸收光谱。从图 5 可以看出,氧化态 AVBF(AVBF<sub>o</sub>)能直接从铂电极(-600mV)上得到电子并还原自身的铁核,最终转化成还原态 AVBF(AVBF<sub>r</sub>),引起铁蛋白在可见光谱区整体吸收强度递增(图 5 曲线 B)。然而,在严格的厌氧条件和 +600mV(氧化电位)控制电压的处理下,AVBF<sub>r</sub> 铁核中的 Fe<sup>2+</sup> 逐渐被氧化成 Fe<sup>3+</sup>(图 5 曲线 C),因而在可见区整体吸收光谱强度随之递减。

这说明,AVBF 不仅可以从物理电极上接收电子,而且可以把自身的电子传递给氧化电极,同时也说明图 4 所示电解池较适合于研究蛋白质及酶的光谱电化学特性。

### 3.3 好氧型微生物电化学反应池

好氧型微生物菌体在培养过程中需要在一定的氧分压环境下才能繁殖。加入反应池中的氧气应事先通过过滤系统除去其中的杂菌,避免对培养菌体的污染。图 6 所示是一种能过滤去除空气中杂菌的电诱导微生物菌体生物电化学反应池。它是在图 3 所示电解池的基础上补充了一个过滤装置,因此与图 3 所示电解池有着很相同的特点。

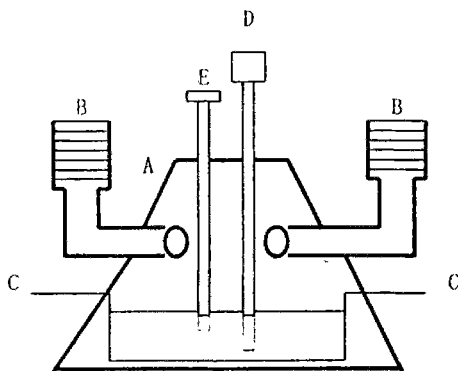


图 6 好氧型微生物菌体电化学反应池

- A. 电化学反应池 B. 除菌通过滤装置 C. 铂电极 (阴极)
- D. 饱和甘汞电极 E. 铂丝辅助电极

此外,微生物培养繁殖需要在恒温环境及恒速震荡中进行,因而该反应池的设计不必再考虑恒温系统及磁力搅拌系统,但要考虑在线连接电极系统,因为菌体培养过程是在控制还原或氧化电位条件下进行的。

$\text{NH}_4^+$ 是棕色固氮菌固氮酶合成的强抑制剂,固氮微生物能利用 $\text{NH}_4^+$ 作为生长所需的氮源,不合成固氮酶,无固氮活性<sup>[14]</sup>。然而,实验结果却发现,用图6所示电化学反应池,外加慢速扫描电位(-500mV~+500mV,2mV/min)电培养棕色固氮菌时,能使该菌停止对 $\text{NH}_4^+$ 的摄取,并启动被 $\text{NH}_4^+$ 所抑制的固氮基因,使其进行正常转录及表达,使菌体能在较高 $\text{NH}_4^+$ 环境下合成固氮酶,表达出较高的固氮活性(35nmol  $\text{C}_2\text{H}_4$ /mg protein/min)。

从上述结果可看出,图6所示电化学反应池适合于电调控培养好氧型微生物表达新生理功能,是一个比较理想的微生物电培养反应池。

#### 参考文献

- 1 Watt G D. Anal Biochem, 1979, 99: 399-407
- 2 黄河清, 瓦特 R K, 瓦特 G D, 富兰克尔 R B. 厦门大学学报(自然科学版), 1993, 32: 628-633
- 3 Kazanskaya I, Lexa D, Bruschi M, Chottard G. Biochemistry, 1996, 35: 13411-13418
- 4 Huang H Q, Zhang F Z, Xu L S, Lin Q M, Huang J W, Zeng D. J Electroanal Chem, 1998, 44: 301-307
- 5 黄河清, 张凤章, 许良树, 曾定. 福建分析测试, 1996, 5: 447-450
- 6 Blake R C, Howard G T, McGinness S. Applied and Environment Microbiology, 1994, 60: 2704-2710
- 7 Huang H Q, Xu L S, Zhang F Z, Qiu X F, Lin Q M, Huang J W, Zao H, Huang N C, Zeng R Y, Zeng D. J Protein Chem 1998, 17: 45-52
- 8 黄河清, 张凤章, 许良树. 动物学报, 1997, 43: 171-177
- 9 Huang H Q, Lin Q M, Zhang F Z, Chen C H, Chen X, Chen Z. J Electroanal Chem, 1999, 48: 1561-1569
- 10 黄河清, 林庆梅, 张凤章, 陈中, 锥占波, 许良树. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15: 10-17
- 11 Harrison P M, Hoy T G, Macara I G, Hoare R J. Biochem J, 1974, 143: 225-451
- 12 Huang H Q, Watt R K, Frandel R B, Watt G D. Biochemistry, 1993, 32: 1681-1687
- 13 黄河清, 张凤章, 陈灿和, 邱雪慧, 许良树, 曾定. 生物物理学报, 1996, 12: 33-37
- 14 Lanne C, Krone W, Konings W, Haaker H, Veeger C. J Biochem, 1980, 193: 39-46

收稿日期: 1999-01-11

黄河清, 男, 副教授, 主要从事生物电化学及蛋白质结构与功能的研究。

**Design and applications of bioelectrochemical cells.** Huang Heqing (Department of Biology, Xiamen University, Xiamen, 361005), Lin Qingmei (Center of Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, 361005)

According to the physiological properties of biological large molecules, three different electrochemical cells were designed for studying electrochemical properties of pig spleen ferritin (PSF) and bacterial ferritin, and for electrically inducing azotobacter vinelandii cell (AV cell) to express new physiological properties. The diagrammatic sketches of the electrochemical cells are given and their characteristics described. Experimental results indicate that PSF and bacterial ferritin are able to obtain reductive electrons from platinum electrode directly, showing that they are electrically active on the electrode, and AV cells can be successfully induced into ammonium-resistant strain. The applications show that these cells are applicable for analyzing enzymes, proteins and living cells and have the advantages of rapidity, convenience and accuracy.

#### 第四届全国粘度学术交流会征文通知

中国仪器仪表学会分析仪器学会拟于1999年秋召开第四届全国粘度学术交流会(具体时间、地点待定),交流近年来粘度测量技术研究、开发及应用方面的经验,研讨国内外粘度测量仪器的最新发展动向与水平。热忱欢迎大家踊跃撰稿,参加交流。每篇论文控制在5000字以内,论文前应有500字以内的摘要。来稿请注明作者姓名、年龄、职务(职称)、联系电话、工作单位、详细通讯地址及邮政编码。1999年5月30日以前将论文题目及摘要寄粘度专业委员会秘书组。全文请于1999年6月30日前寄出。来稿请寄:成都市人民中路三段三号成都仪器厂粘委会秘书组 姚思齐收 邮编:610031,电话:(028)6620764