

鱼肝铁蛋白铁核表层接受电子能力的研究

黄河清^{1,2}, 林庆梅³, 罗大民¹, 朱斌琳¹

1. 厦门大学 1. 生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室; 2. 固体表面物理化学国家重点实验室;
3. 海洋与环境科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005

摘要:采用直接电化学技术研究虹鱼肝铁蛋白(Liver Ferritin of *Dasvatis akajei*, DALF)铁核表层接受还原电子的快慢速率和释放铁的动力学级数及规律。实验结果表明,在有氧环境下,DALF铁核表层以两相行为的方式快速地从铂金电极上获得还原电子且用于释放铁反应,其释放铁的还原电位分别为-125mV和-375mV(vs.NHE,下同)。在控制还原电位为-200mV和-500mV的条件下,DALF铁核表层释放铁的速率分别为 $11.1 \text{ Fe}^{3+}/(\text{DALF} \cdot \text{min})$ 和 $33.3 \text{ Fe}^{3+}/(\text{DALF} \cdot \text{min})$,因而认为DALF从铂金电极接受电子和释放铁的速率快慢与还原电位高低有关,血红素不仅能络合于DALF蛋白壳(DALF_o)上,而且还能加速DALF_o释放铁的速率,但无法增加DALF_o释放铁的总量,DALF铁核结构中的磷铁组成存在着非均匀性,DALF铁核表层磷铁结构具有接受来自于蛋白壳电子隧道所提供的还原电子能力。

关键词: 虹鱼肝铁蛋白; 直接电化学; 释放铁; 铁核结构; 释放铁动力学

中图分类号: Q617 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)04-0754-07

在探讨生命与进化过程中,了解生物大分子之间的电子传递现象对正确理解生命代谢与进化过程起着至关重要的作用。大量实验结果已证实,在自然界中,多数蛋白质外表层上的部分极性氨基酸残基和细胞膜外表层上的活性物质均能参与生物大分子之间的电子传递和氧化还原反应^[1-4]。然而,它们在物理电极上却呈现电惰性状态,即无法从物理电极上获得还原电子且参与生化反应^[5]。近几十年来,生物物理化学工作者一直在设法构建能从金属电极上快速获得还原电子且传递给生物大分子的修饰电极,企图实现采用直接电分析技术就可直接研究生物大分子的氧化还原特性的目的,因而促使有关生物大分子的电极行为研究一直处于生物物理化学研究领域中的热点课题之^[6,7]。

近期的研究已指出,在厌氧条件下,细菌铁蛋白(Bacterial ferritin, BF)能利用自身的电子隧道-血红素(Electron-tunnel-heme, ETH)结构直接从铂金电极上获得电子且用于释放铁反应^[1,8]。哺乳动物铁蛋白和BF的铁核结构可区分为铁核表层和铁核内层,其释放铁的过程(非电化学法)呈一级(铁核表层)和零级(铁核内层)动力学反应^[9-11]。此外,实验结果还发现,在有氧条件下,DALF不仅能在铂金电极上形成局部厌氧环境,而且还能获得还原电子,这一行为使蛋白和电极之间在有氧环境下能直接进行释放铁反应成为可能,因而提出DALF或其它铁蛋白很可能存在着两种不同氧化还原电位的电子隧道结构,并用于电子传递和接受^[12]。

收稿日期: 2000-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(49876027)、教育部高等学校骨干教师资助计划基金和海洋与环境科学教育部重点实验室基金资助项目

作者简介: 黄河清, 1956年生, 教授, 电话: 0592-3186630, E-mail: hqhuang@jingxian.xmu.edu.cn.

本文采用直接电化学技术进一步研究 DALF 在有氧环境下释放铁的动力学级数和规律, 电化学特性, 电子隧道类型和铁核中磷铁结构存在着非均匀性等理化特性, 它们对正确理解铁蛋白从物理电极上接受和传递电子的机理和规律, 和为制备铁蛋白电极且用于研究生物大分子电化学特性提供科学的实验依据。

1 材料与方法

1.1 铁蛋白制备和组成分析

选用新鲜的虹鱼肝脏(Liver of *Dasyatis akajei*), 去除脂肪和杂物。DALF 的分离和纯化参考作者制备猪脾铁蛋白^[13]和黄巨富^[14]制备细菌铁蛋白的方法。纯化后的 DALF 铁核中总的铁磷比为 8:1, 每分子铁蛋白含铁量为 $2050 \pm 50\text{Fe}^{3+}$ 左右。

DALF 蛋白质浓度测定分析按常规的 Lowry 方法。DALF 铁核中的磷铁含量测定按作者前述的方法进行^[15]。

1.2 方法

1.2.1 铁蛋白直接释放铁动力学测定

采用直接电化学光谱技术测定铁蛋白释放铁的速率, 测定步骤及过程参考作者的方法^[11]; 无菌电解池的设计及制作参考作者的方法^[16]。在测定铁蛋白释放铁过程中, 电解池中的氧浓度恒定在 21278.25Pa, 其氧的分压采用了气相色谱仪热导池检测器进行分析和监控(分离层析介质: 5Å 分子筛)。DALF 释放铁动力学级数计量参考作者近期建立的铁蛋白释放铁的动力学方程式^[11]。

1.2.2 血红素络合 DALF 和释放铁速率测定

血红素(heme)络合于 DALF (DALFh) 的反应过程所需要的电解池参考作者的设计方案及制作方法^[14]; 在有氧环境下, 采用直接电化学光谱技术测定 DALFh 释放铁的动力学速率^[11]; 铁蛋白释放铁反应级数计量参考作者的方法^[11]。

2 结果与讨论

2.1 DALF 铁核表层释放铁的过程和还原电位的测定

图 1 显示了 DALF 释放铁的数量与直接还原电位的对应关系。从图 1 结果可分析出 DALF 在铂金电极上表现出非电极惰性现象。具体现象描述如下: 1) 在有氧条件下, DALF 可以直接从铂金电极上获得还原电子且用于还原铁核中的 Fe^{3+} 成为 Fe^{2+} , 并借助外加的亚铁离子螯合剂(α - α -联吡啶)螯合 Fe^{2+} 于蛋白壳外。2) 在控制电位位于 0 ~ -500 mV 范围内, 其还原电位均能使 DALF 直接从铂金电极上获得还原电子且用于释放铁核表层的铁。3) DALF 铁核表层释放铁的增加量与还原电位负移成对应的关系, 即还原电位越低, DALF 释放的 Fe^{3+} 量越多。4) DALF 释放铁的总量($1050\text{Fe}^{3+}/\text{DALF}$) 约仅占蛋白壳内总铁量($2100\text{Fe}^{3+}/\text{DALF}$) 的 1/2。因而可推出, DALF 蛋白壳上含有可直接接受由铂金电极提供电子的电子隧道结构, 其电子可供于 DALF 释放铁核表层的铁, 而位于铁核内层的铁组成仍然呈电惰性状态, 即无法接受来自于电子隧道的电子, 从而限制了进一步进行还原和释放铁的反应。5) DALF 释放铁核表层的铁量与直接作用于 DALF 的还原电位成对应关系, 并形成两个完整的氧化还原过程(曲线 A 和 B)。经分析, 这两条释放铁的动力学曲线中各自所示的最大释放铁量的 1/2 处所对应的电位分别为 DALF 参与释放铁的还原电位, 即为 -125 和 -375 mV。

在自然界中,多数金属蛋白所进行的氧化还原反应均需要有严格的厌氧环境。在厌氧条件下, BF 能利用自身蛋白壳上的 ETH 结构从铂电极上直接获得电子及参与释放铁的反应,其 ETH 还原电位分别为 -125 、 -310 和 $-370\text{mV}^{[1]}$, 其中 -125 和 -370 mV 电位与 DALF 还原电位(图 1) -125 和 -375 mV vs. NHE 很靠近。尽管 DALF 是一种非含血红素的铁蛋白,无 ETH 结构,但它能象 BF 一样,能直接从铂电极上获得还原电子,并参与释放铁的反应,具有类似于 BF 的 ETH 的功能^[1], 因而我们认为 DALF 具有类似 BF 的电子隧道结构,但不含血红素组成。此外,由于 BF 不仅在蛋白壳含有血红素组成,而且铁核内总的含磷量比 DALF 高,因而促使 BF 有能力释放自身完整铁核中的铁 ($1860\text{Fe}^{3+}/\text{BF}$), 而 DALF 只能释放占铁核中总铁量的 50% 的铁 ($1050\text{Fe}^{3+}/\text{DALF}$)。铁蛋白铁核中含磷量高低可起着沟通和加强铁核从蛋白壳电子隧道上接受还原电子能力和速率的作用^[12]。

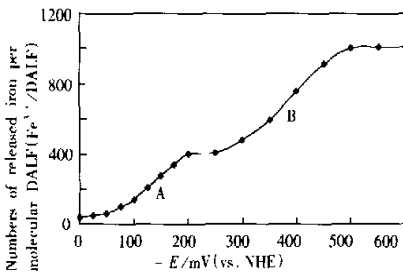


Fig.1 Reduction potential measurement of DALF by direct electrochemical technology in the absence of chemical and biological reducers and in the sterilizing air. $E_{1.2} = -125\text{mV}$, $E_{1.1} = -375\text{mV}$ (vs. NHE)

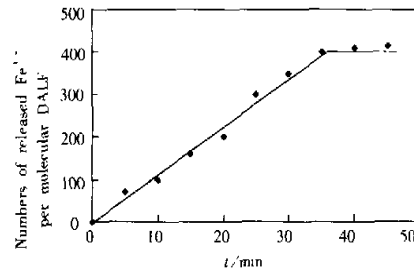


Fig.2 Kinetics of iron release from DALF at the controlled potential of -200mV (vs. NHE) in the absence of chemical and biological reducers and in the sterilizing air

2.2 在控制电位下, DALF 释放铁的动力学特性

根据图 1 曲线 A 的实验结果,选择 -200mV 为控制还原电位,研究 DALF 释放铁的动力学过程及速率。从图 2 结果可看出,每分子 DALF 最大的释放铁量为 410Fe^{3+} , 释放铁的数量与反应时间成线性对应关系,平均释放铁的速率 (K_0) 为 $11.7\text{Fe}^{3+}/(\text{DALF} \cdot \text{min})$ 。参考一般动力学特性和规律,可直接得出 DALF 以零级动力学方式释放铁核表层的铁。这一现象与近期我们采用直接电化学技术研究细菌铁蛋白释放动力学级数相同,其释放铁的速率也很靠近 [$10.5\text{Fe}^{3+}/(\text{BF} \cdot \text{min})$, 控制还原电位为 -600mV]^[11]。根据图 2 所示的实验结果可知,此时 DALF 已经释放占原铁核总铁量的 25% 的铁量,剩余 75% 的铁量于铁核中(称为 $\text{DALF}_{75\%}$)。

$\text{DALF}_{75\%}$ 样品经过 G-25 Sephadex 层析柱纯化后(除去已释放游离铁),置于电解反应池中。选择 -500mV 为控制还原电位,继续进一步研究 $\text{DALF}_{75\%}$ 释放铁速率与电位的关系。图 3 结果显示, $\text{DALF}_{75\%}$ 释放铁的数量与反应时间也是成线性对应关系,平均释放铁的速率 (K_0) 为 $33.3\text{Fe}^{3+}/(\text{DALF}_{75\%} \cdot \text{min})$, 其速率比在控制还原电位为 -200mV 下所获得的释放铁速率快三倍。显然, $\text{DALF}_{75\%}$ 释放铁的速率随着控制电位负移而递增,即控制还原电位越低,释放铁的速率越高。

为了研究 DALF 铁核中铁含量对释放铁速率的影响,我们又选择 -500mV 为控制还原电

位和含有完整铁核($2100\text{Fe}^{3+}/\text{DALF}$)的 DALF 为研究材料。图 4 结果显示, DALF 释放铁的速率和反应时间的变化趋势与图 2~3 所显示的变化规律很相似, 其平均释放铁的速率(K)为 $25\text{Fe}^{3+}/(\text{DALF}\cdot\text{min})$ 释放铁速率与反应时间仍然成对应线性关系, 并遵循零级反应动力学过程, 但释放铁的速率(K)却低于 K_0 速率, 却高于 BF [$10.5\text{Fe}^{3+}/(\text{BF}\cdot\text{min})$, 控制还原电位为 -600mV [11]] 释放铁的速率。由此可见, DALF 蛋白壳内的铁量高低也能起到限制该蛋白从铂金电极上接受电子的能力及速率的作用, 即在相同的控制电位条件下, 铁蛋白内含铁量越高, 其铁核中的铁被还原的速率就越低, 其释放铁的速率就越慢。尽管如此, DALF 和 DALF_{75%} 释放铁的最大释放铁量仍仅为原 DALF 铁核中总铁量的二分之一。

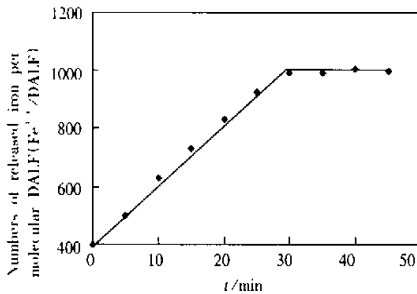


Fig.3 Kinetics of iron release from DALF_{75%} at controlled potentials of -500mV (vs NHE) in the absence of chemical and biological reducers under the air environment after the ferritin have released 25% of original Fe^{3+} within the core

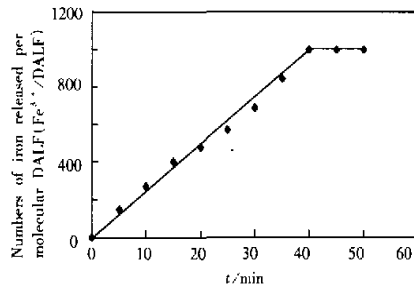


Fig.4 Kinetics of iron release from DALF in the absence of chemical and biological reducers under controlled potential of -500mV (vs NHE)

通常生物大分子之间所进行的氧化还原需在严格的厌氧条件下进行, 然而, 由于铁蛋白含有电子隧道结构 [11] 和低电位的电极所产生的磁场使铁蛋白和电极之间形成的局部厌氧环境, 促使铁蛋白在有氧环境下从物理电极上接受电子且用于释放铁的直接电化学反应成为可能 [8]。因而, 在有氧环境下, DALF 释放铁的速率比在厌氧环境下的 BF 释放铁的速率要快。显然, 氧通过控制 DALF 构象作用, 加强 DALF 加速从铂金电极上接受电子的能力, 从而达到加速释放铁速率的效果。这一结果为今后构建 DALF 电极且直接用于研究生物大分子氧化还原特性成为可能。

2.3 血红素影响 DALF 释放铁动力学特性

血红素 [17]、维生素 C [12]、生物染料和农药 [18] 等有机小分子均能络合于哺乳动物铁蛋白。在厌氧条件下, 血红素不仅能络合于马脾铁蛋白, 而且能加速铁蛋白释放铁的速率 [18]。图 5 结果表明, 在有氧环境和控制还原电位为 -500mV 条件下, DALF₀ 释放铁核表层的铁的动力学过程可区分为两相行为, 即 A 相和 B 相。在 A 相, 每分子 DALF₀ 释放铁量约 700Fe^{3+} , 占 DALF 原铁核总铁量的 34%, 平均释放铁量速率 (k_{A0}) 为 $35\text{Fe}^{3+}/(\text{DALF}\cdot\text{min})$, 比未络合血红素的 DALF 释放铁的速 (图 4) 提高 20% 左右, 比在厌氧环境下所获得 DALF₀ 释放铁速率 ($5.6\text{Fe}^{3+}/\text{DALF}_0\cdot\text{min}$) [16] 提高 6.4 倍。显然, 血红素起到稍微加速 DALF₀ 从铂金电极上获得还原电子速率的作用, 而氧调控蛋白的作用却明显改善 DALF₀ 接受电子的能力和较大幅度地提高释放铁

速率。在 B 相, 每分子 DALF_n 释放铁量约 300Fe^{3+} , 占 DALF 原铁核总铁量的 14% 的铁, 平均释放铁的速率 (k_{rel}) 为 $7.5 \text{ Fe}^{3+} / (\text{DALF} \cdot \text{min})$, 比在有氧环境下, DALF 所获得的释放铁的速率 [$5.6 \text{ Fe}^{3+} / (\text{DALF} \cdot \text{min})$] 提高 20%。这一现象说明, 在 B 相, 提高 DALF_n 释放铁的关键性因素不是由氧调控所引起的, 而是血红素。这意味着, 此时氧失去调控 DALF_n 加速从铂电极上接受还原电子的作用。尽管如此, 血红素、氧和维生素^[12] 的络合和调控只能起到加速铁蛋白释放铁的作用, 而不能提高 DALF 释放铁的总量和促使铁核内层的铁也能获得还原电子, 并得以释放。

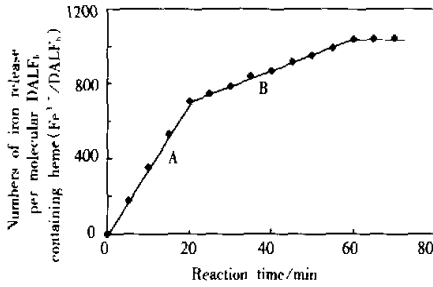


Fig. 5 Kinetics of iron release from DALF_n at controlled potentials of -500mV (vs. NHE) in the absence of chemical and biological reducers

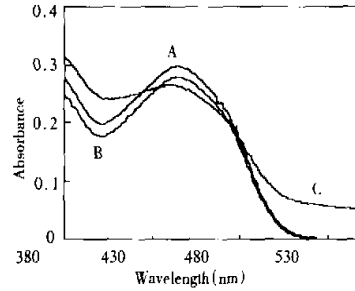


Fig. 6 Storing capacities of riboflavin by DALF at controlled potential of -500mV vs. NHE. A: DALF and Riboflavin, B: Mixture of DALF and Riboflavin with potential treatment, C: Riboflavin

2.4 DALF 储存核黄素能力及特性

近期研究已表明, 由透析袋、脱铁核铁蛋白、磁力搅拌系统等设备可构成铁蛋白反应器。该反应器在有氧环境中能储存有机小分子, 其储存数量与环境介质中有机小分子的浓度成正比关系^[11]。图 6C 是核黄素 (pH 7.25, 下同) 在可见光谱中的特征吸收峰, 其吸收峰波长位于 446nm 处。图 6A 是核黄素和 DALF 混合物所呈现的特征吸收峰。由于 DALF 在可见光谱区中呈现出无特征吸收峰现象^[9], 则图 6A 中所呈现的吸收峰实际上是核黄素所表现出的吸收峰, 其波长位于 446nm 处。在相同于图 6A 的反应条件下, DALF 和核黄素混合样品经电位处理后可得出图 6B 结果, 其特征吸收波长也是位于 446nm 处, 并未呈现红移和紫移现象, 但图 6B 所表现的吸收峰强度却低于图 6A 的吸收峰强度。这一现象说明了外加电位有利于 DALF 加速储存溶液中的核黄素。而被储存的核黄素, 因位于蛋白壳内, 受蛋白壳的光屏蔽影响而无法产生光吸收现象, 因而产生了两 (图 6A, B) 光吸收强度差异性。由此可见, 在有氧环境下, DALF 仍然直接可储存介质中游离有机小分子。这一行为可建议性地提出, 如把 DALF 构建成铁蛋白反应器, 该反应器很可能成为用于储存及监测流动水体的有机磷污染程度一项高效新颖技术。

参考文献:

- [1] Huang HQ, Zhang FZ, Xu LS, et al. Spectroelectrochemical investigation of *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin[J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998,44(1):301-307.
- [2] 陈挺, 谢远物, 董绍俊. 染料修饰电极加速氧化还原蛋白质的电化学反应[J]. 电化学, 1995, 1: 125-135.
- [3] Ramos S, Schuldiner S, Kaback, HR. The electrochemical gradient of protons and its relationship to active transport in *Escherichia coli* membrane vesicles[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976,73:1892-1896.
- [4] Teissie J. Transfer of foreign receptors to living cell surface: the bioelectrochemical approach[J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998,46:115-120.
- [5] Watt GD. An electrochemical methods for measuring redox potentials of low potential protein by microcoulometry at controlled potentials[J]. *Analytical Biochemistry*, 1979,99:399-407.
- [6] Sagara T, Nakajima H, Niki Y. Heterogenous electron transfer rate measurements of cytochrome C at mercury electrodes[J]. *J Electroanal Chem*, 1991,297:271-282.
- [7] 黄河清, 林庆梅, 吴楠, 等. 电化学技术研究铁蛋白传递电子的能力[J]. 生物物理学报, 2000, 16(4): 680-686.
- [8] 黄河清, 林庆梅, 陈翔, 等. 细菌铁蛋白氧化还原特性及电极活性的研究[J]. 生物物理学报, 1999, 15(1): 158-165.
- [9] Richards TD, Pitts KR, Watt GD. A Kinetics study of iron release from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin[J]. *J Inorg Biochem*, 1996,61:1-13
- [10] Huang HQ, Watt RK, Frankel RB, et al. Role of phosphate in Fe^{2+} binding to horse spleen holoferritin[J]. *Biochemistry*, 1993,32:1681-1687.
- [11] Huang HQ, Lin QM, Rong B, et al. Role of phosphate and kinetic characteristics of complete iron release from native pig spleen ferritin-Fe[J]. *J Protein Chem*, 1999,18(4):497-454.
- [12] 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): 8-14.
- [13] 黄河清, 林庆梅, 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] 黄巨富, 汪道涌, 汪志平, 等. PEG 和盐对棕色固氮菌细菌铁蛋白和铜铁蛋白晶体生长的影响[J]. 植物学报, 1998, 40(9): 880-882.
- [15] Huang HQ, Lin QM, Lou ZB. Construction of a ferritin reactor: An efficient means for entrapping various heavy metal ions in flowing seawater[J]. *J of Protein Chem*, 2000,19(6):441-447.
- [16] 黄河清, 林庆梅. 生物电化学电解池的设计及应用. 分析仪器[J], 1999, 120(2): 13-17.
- [17] Kadir FHA, Al-Massad FK, Moore GR. Haem binding to horse spleen ferritin and its effect on the rate of iron release[J]. *Biochem J*, 1992,282:867-870.
- [18] 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(1): 39-47.

STUDIES ON CAPACITY OF PICKING UP ELECTRONS ON THE SURFACE OF IRON CORE FORM THE FERRITIN OF FISH LIVER

HUANG He - qing^{1,2}, LIN Qing - wei¹, LUO Da - min¹, ZHU Bin - lin¹

(1. MOE Laboratory for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. State Key Laboratory for Physical of Chemistry of Solid Surfaces, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. MOE Laboratory for Sciences of marine and Environment, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The fast and slow rates of the reduction electrons on the surface of iron core in liver ferritin of *Dasyatis akajei* (DALF) were studied by direct electrochemical technology which was also used to study the kinetic order and law of iron release. In aerobic environment, the experimental results showed that DALF, as a form of biphasic behavior, not only picked the electrons up from the platinum electrode, but also used them for iron releasing. Moreover, two - reduction potential of -125 mV and -375 mV vs. NHE for iron release were determined. Using reduction potentials of -200 mV and -500 mV vs. NHE, two rates of iron release on the surface of iron core in DALF measured were $11.1\text{ Fe}^{3+}/\text{DALF}/\text{min}$ and $33.3\text{ Fe}^{3+}/\text{DALF}/\text{min}$ respectively, suggesting that the fast and slow rates of DALF picking the electrons up from the platinum electrode are tightly related to the reduction potentials. It was seen that the heme not only bound to the protein shell of DALF, but also accelerated the rate of iron release. However, the content of iron release was not increased by the heme in DALF_h. The structure composition of phosphate and iron within the DALF core were heterogeneous. The surface structure of iron core in DALF is capable of picking up the electrons come from the electron tunnel of protein shell, which are used for iron releasing.

Key Words: Liver of *Dasyatis akajei*; Direct electrochemistry; Iron release;
Structure of iron core; Kinetics of iron release