

棕色固氮菌中一种含细胞色素 b 的铁蛋白*

李久蒂 王继文 钟泽璞 图 亚

(中国科学院植物研究所生物固氮研究室)

董 北

(中国科学院生物物理研究所)

摘 要

棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 中存在一种含细胞色素 b 的铁蛋白。细菌提取液经 DEAE 纤维素层析及 50% 饱和硫酸铵纯化后, 得到一种六角形片状蛋白质结晶。

此蛋白质含有大量非血红素铁, 占干重的 4—6%。蛋白质分子由一电子密度很大的铁核及包围铁核的蛋白质外壳组成, 铁核直径为 70 Å, 蛋白质外壳直径为 120 Å。在铁螯合剂和还原剂的作用下, 可以从蛋白质分子中去除铁核。去铁的铁蛋白外壳的电子显微镜照相及光谱特性都与去铁前的蛋白质相似, 而电泳迁移率, 对铁蛋白抗体的免疫扩散反应也与去铁前的蛋白质相同。根据以上特性, 此蛋白质属于铁蛋白类。同时按光谱测定, 其蛋白部分含有血红素辅基, 属于细胞色素 b 类, 因此是一种含细胞色素 b 的铁蛋白。文中并讨论了这种铁蛋白在生物固氮中可能的作用。

1937 年 Laufberger^[1] 在马脾脏中发现了铁蛋白 (ferritin), 此后对铁蛋白的结构与功能进行了广泛而深入的大量研究。在真核生物中从真菌^[2]到高等植物^[3,4], 从低等的蠕虫到高等的哺乳动物^[5,6] 都发现存在铁蛋白, 哺乳动物所有的组织中包括癌细胞都存在铁蛋白。而且这些铁蛋白分子的基本结构都是一致的, 它由一个电子密度很大的无机铁核和一包围着铁核的蛋白质外壳组成。它的基本功能是贮存铁。在原核生物中, 以前没有人报道过存在类似结构的铁蛋白。1973 年 Bulen^[7] 从棕色固氮菌 (*Azotobacter Vinelandii*) 中分离得到一种含细胞色素 b 及大量非血红素铁的蛋白质, 其结晶为正方形。1979 年 Steifel^[8] 进一步研究指明此蛋白质是一种铁蛋白称为 Bacterioferritin-cytochrome, 并认为这是第一个从细菌中分离得到的铁蛋白。

1976 年我们在分离纯化棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白的过程中, 电泳时在聚丙烯酰胺凝胶柱上发现了一个比钼铁蛋白迁移率更小的砖红色带, 曾推测它可能是钼铁蛋白的高聚状态。用硫酸铵纯化法分离得到此蛋白质结晶, 并对其基本特性进行了研究, 发现它不同于钼铁蛋白而与真核生物的铁蛋白极其相似。初步研究结果已在 1978 年中澳固氮讨论会上报告^[9]。本文叙述此蛋白质的一些基本特性, 并与动物及植物铁蛋白进行比较, 证明它属于铁蛋白类。但是

本文 1979 年 6 月 9 日收到。

* 本工作是在阎隆飞、王发珠和李佳格先生指导下完成。固氮室徐继、顾天青同志亦参加了部分工作。

因为其蛋白部分同时又含有血红素辅基,属于细胞色素 b 类,这是与真核生物的铁蛋白显著不同的,故可称为含细胞色素 b 的铁蛋白。

一、材料和方法

1. 菌种 以中国科学院林业土壤研究所 230 号棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*) 为实验材料。用改良的 Burks 培养基进行大罐发酵,收集菌糊备用。

2. 分离与结晶 将菌糊用超声破碎,菌糊与 0.025M Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 之比为 1:1。细胞破碎液在 60℃ 加热 10 分钟,在 24,000g 离心 30 分钟,上清液调至 pH 7.4 进行 DEAE 纤维素柱层析。层析柱预先用含 0.1M NaCl 的 0.025M Tris-HCl 缓冲液 pH7.4 (每毫升含 0.3 毫克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 平衡。加样后层析柱相继用含有 0.1M NaCl, 0.25 M NaCl, 0.5M NaCl 的 0.025M Tris-HCl pH7.4 缓冲液 (每毫升含 0.3 毫克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 洗脱。收集 0.25 M NaCl 洗脱部分,并进行超滤浓缩,浓缩液为棕红色。按照 Jahoby^[10] 的方法,浓缩液在冰浴中加等体积 100% 饱和硫酸铵 (pH7),使最终硫酸铵饱和度达到 50%。在冰浴中放置 20 分钟,在 6,000g 离心 15 分钟,取出上清液,在室温下静置,4—5 小时后溶液中出现丝绸样闪光的微晶,静置过夜,离心收集晶体,用 50% 饱和硫酸铵洗涤结晶数次。使结晶溶于 0.025M Tris-HCl (pH7.4) 缓冲液,得到棕红色透明溶液。透析后用制备电泳进一步纯化样品进行蛋白质特性的分析。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用 Ortec 系统^[11],凝胶浓度为 5%。制备电泳凝胶柱亦按 Ortec 系统制备,凝胶浓度为 5%,电泳分离蛋白质结晶溶液后,切下砖红色主带,用缓冲液浸泡抽提,得到电泳纯样品。按照 Brill^[12] 的方法用含 8% 巯基乙酸的 0.7% α,α 联吡啶水溶液将凝胶染色,鉴定含非血红素铁的铁蛋白。

4. 蛋白质中非血红素铁的去除及铁含量的测定 用国产 WFD-Y₂ 型原子吸收分光光度计火焰部分测蛋白质的铁含量。按照 Granick^[13] 或 Crichton^[14] 的方法去除蛋白质中非血红素铁。每毫升蛋白质溶液加 α,α 联吡啶 10 毫克,对乙酸缓冲液 pH 4.6 (含 0.25 毫克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ /毫升)在氩气流下进行透析,最初可观察到透析袋内蛋白质溶液变成红色,以后外透液逐渐变成粉红色。重复上述操作,直到透析袋内蛋白质溶液不再与 α,α 联吡啶反应显示红色为止。蛋白质溶液再对蒸馏水透析,去除 α,α 联吡啶,得到不含铁的铁蛋白。按照 Crichton 的方法,蛋白质溶液对含 1% 巯基乙酸的乙酸缓冲液 pH4.6 透析 8 小时,再对重蒸水透析 24 小时,得到不含铁的铁蛋白。

5. 蛋白质含量的测定 由于蛋白质分子中所含大量非血红素铁干扰比色测定,因此采用干重法测蛋白质含量。

6. 电子显微镜观察 用 EM201C 电子显微镜对蛋白质晶体及分子进行观察照相。悬浮在 50% 饱和硫酸铵溶液中的蛋白质晶体,用 0.5% 戊二醛在 50% 饱和硫酸铵 pH7 的溶液固定 10 分钟,低速离心 5 分钟去除上清液,晶体重新悬浮于 0.025M Tris-HCl pH7.4 缓冲液,用毛细吸管使晶体沉积在涂有福尔马膜的铜网上,用蒸馏水洗涤二次,干燥后进行电子显微镜观察。蛋白质溶液按文献[15]中介绍的方法制片,用 1% 醋酸氧铀水溶液 pH7 负染,负染二次,每次一分钟,在空气中干燥后进行电子显微镜观察。

7. 吸收光谱的测定 用日立 356 型双光束分光光度计测定吸收光谱。用连二亚硫酸钠作为还原剂测定还原态光谱。按 Teale^[16] 的酸性甲基乙基酮法测定蛋白质与血红素之间的结

合方式。按 Appleby^[17] 的方法测定蛋白质还原型吡啶光谱。

8. 免疫化学分析 参照文献[18]所介绍的方法制备抗血清。用电泳纯的铁蛋白作为抗原注射家兔,每隔 10 天注射一次,每次一毫克蛋白质,共四次。第一、二次用完全佐剂,最后一次免疫一周后放血。抗血清冰冻干燥后贮存在低温冰箱备用。免疫扩散法:免疫板由 0.025M Tris-HCl pH7.4 缓冲液含琼脂糖 1.5%, 0.9% NaCl 及 0.02% NaN₃ 制成。小槽直径 3 毫米,中心槽加抗血清,周围小槽加蛋白质溶液。

二、结果与讨论

1. 含细胞色素 b 铁蛋白的结晶 用上述硫酸铵纯化法得到的结晶呈砖红色,显微镜检查为正六边形片状结晶(照片 1)。晶体易碎,在室温下在 50% 饱和硫酸铵中可保存数月,此蛋白质对热稳定,粗提物在 65℃ 加热 10 分钟后仍能分离得到此蛋白质结晶。

2. 铁蛋白中的非血红素铁 将结晶溶液对 0.025M Tris-HCl pH 7.4 缓冲液透析,然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后在凝胶上可观察到一迁移率很小的砖红色带(迁移率 0.15)。用 α, α 联吡啶染色,此带呈鲜艳的红色,表明它含有非血红素铁。用氨基黑染色,可观察到除此迁移率为 0.15 的主带外还有几条迁移率不同的带(照片 2)。用制备电泳纯化法得到主带蛋白质溶液,用原子吸收分光光度计测定此蛋白质的含铁量。每毫克干重含铁 41—60 微克,含铁量占干重的 4—6%。固氮菌培养条件和菌令不同会使铁蛋白的含铁量发生很大变化。含大量非血红素铁是铁蛋白分子的重要特征。马脾铁蛋白的铁含量大约占干重的 17—23%^[5,6]。而从其他器官和种属得到的铁蛋白含铁量则较少。

3. 含细胞色素 b 铁蛋白的分子结构 由未染色蛋白质晶体的电子显微镜照相可以看到,此蛋白质分子含有一个电子密度很大,直径为 70 Å 左右的核。核被蛋白质外壳包围。蛋白质分子有规律地排列成六角形晶格(照片 3)。在经醋酸氧铀负染的蛋白质分子电子显微镜照片中亦可以看到,此蛋白质分子是由蛋白质外壳和电子密度很大的内核组成,外壳的直径为 120 Å 左右(照片 4)。

棕色固氮菌含细胞色素 b 的铁蛋白分子的结构与真核生物铁蛋白分子的结构非常相似。马脾铁蛋白分子是由一直径为 70—75 Å, 电子密度很大的核及直径为 120 Å 左右的蛋白质外壳构成。它的蛋白质外壳是由 24 个分子量为 18000 dalton 左右的亚单位组成^[5,6]。植物和真菌的铁蛋白也具有相同的特征。柳树(*Salix fragilis* L.)的铁蛋白分子的铁核直径为 55—70 Å。蛋白质外壳由 4—6 个亚单位组成^[14]。棕色固氮菌含细胞色素 b 铁蛋白的蛋白质外壳,从电子显微镜照相上可以看到亦是由很多亚单位组成。这种蛋白质分子的更精细结构正在进一步研究中。

4. 去铁蛋白质 按 Granick^[12] 或 Crichton^[13] 所述的方法,在铁螯合剂及还原剂的作用下可以去除蛋白质分子中所含有的大量非血红素铁,得到一个淡黄色蛋白质溶液。用原子吸收分光光度计测定此蛋白质溶液只含极微量的铁。聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明其电泳迁移率与去铁前相同(照片 5)。

此去铁蛋白质分子负染的电子显微镜照相表明。此蛋白质分子为一内径为 60 Å 左右,外径为 120 Å 左右的蛋白质外壳。蛋白质外壳的大小与去铁前相同,蛋白质外壳包围着一被染料染色的中心腔(照片 6)。将含铁蛋白与去铁蛋白分别对兔抗含铁蛋白血清进行免疫扩散,两

种蛋白都具有相同的免疫沉淀反应(照片 7)。表明去除铁核后蛋白质的结构没有发生变化。上述特性进一步说明了此蛋白质分子是由铁核和蛋白质外壳组成, 铁核可以从蛋白质外壳中游离出来。上述去铁蛋白的特性与马脾铁蛋白是一致的。用上述二种方法也可以从马脾铁蛋白得到去铁蛋白^[12,13]。而去铁蛋白在电泳迁移率、电子显微镜照相, 免疫沉淀反应^[19]等方面都与去铁前相同。

5. 含细胞色素 b 铁蛋白的吸收光谱特征 用制备电泳纯化得到的铁蛋白其可见光谱为一典型的铁卟啉化合物的吸收光谱。在碱性吡啶中的还原态光谱 α 峰为 556 nm, 表明此铁卟啉属于原血红素。蛋白质溶液用酸性甲基乙基酮提取得到一含血红素的悬浮液和含蛋白质的下层溶液, 证明此原血红素辅基与蛋白质是靠非共价键结合的。用连二亚硫酸钠作为还原剂得到还原态吸收光谱, 其 γ 峰为 416nm, α 峰为 556nm, β 峰 526nm。在空气中氧化后氧化态吸收光谱 γ 峰为 414nm (图 1)。

根据上述三点可以确定蛋白质部分含有原血红素辅基, 属于细胞色素 b 类。

去铁蛋白质也具有与含铁蛋白相似的光谱特性, γ 峰为 422 nm, α 峰为 556nm, β 峰为 526 nm (图 2)。

棕色固氮菌含细胞色素 b 的铁蛋白蛋白质部分含有血红素辅基, 这是与真核生物铁蛋白显著的差异。

铁是生物体内不可缺少的元素, 铁蛋白分子的特殊结构使 Fe^{2+} 成为一种非毒性的, 可溶的和容易被利用的形式, 具有贮存和转运铁的重要生理功能。在原核生物中发现的铁蛋白与真核生物中铁蛋白基本结构是相同的, 但在蛋白质部分又同时含有血红素辅基, 这就使细菌铁蛋白的功能更加复杂化, 原血红素辅基中 $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + e$ 可逆的变化, 使它有可能在生物氧

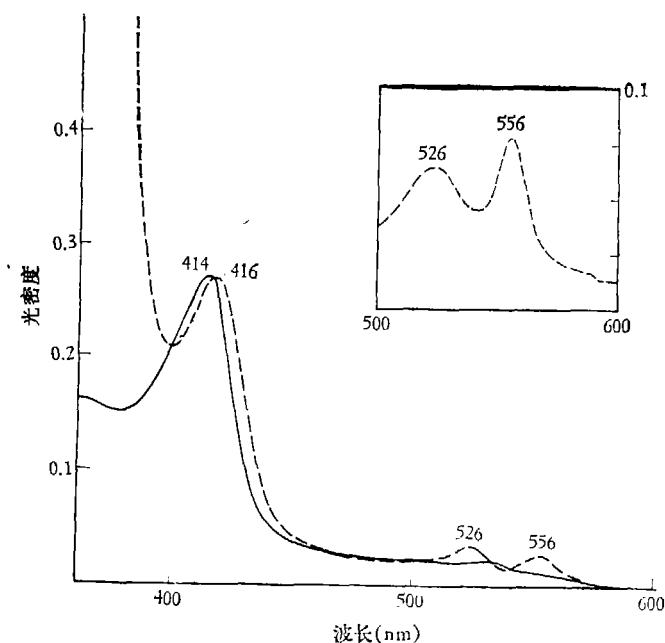


图 1 含细胞色素 b 的铁蛋白的吸收光谱
[--- 还原态光谱(加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), — 氧化态光谱]

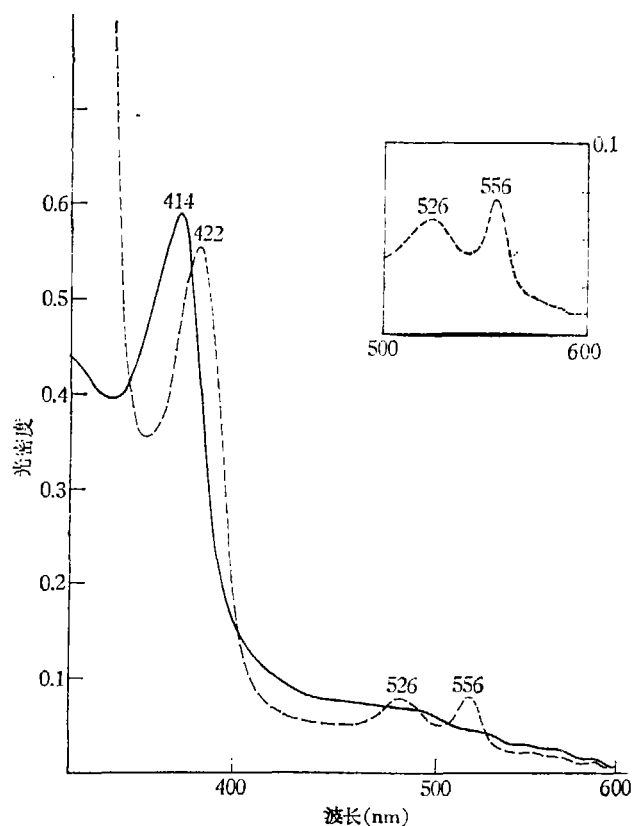


图2 含细胞色素b铁蛋白去铁后的吸收光谱

[--- 还原态光谱(加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), — 氧化态光谱]

化过程中起电子传递体的作用。另外,铁核在低氧化还原电位下,由于 $\text{Fe}^{2+} \rightleftharpoons \text{Fe}^{3+} + e$ 可逆的变化有获取几百个电子的能力,起到贮存电子的功能。这就使棕色固氮菌含细胞色素b的铁蛋白,有可能在固氮酶的氧保护机制中起重要作用。深入研究棕色固氮菌铁蛋白的生理功能及结构与功能的相互关系将是很有意义的。

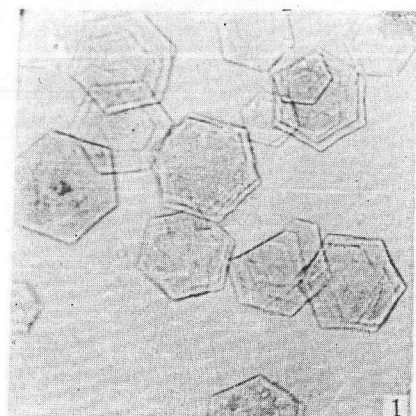
Steifel^[8] 所发现的 Bacterioferritin-cytochrome 在光谱特性,电子显微镜照相,蛋白质来源等方面都与我们所发现的含细胞色素b的铁蛋白极其相似,可能是同一种蛋白质,而由于制备方法的不同从而得到不同的结晶类型。

致谢: 中国农林科学院原子能研究所电子显微镜室傅仓生、李正兰同志帮助进行电子显微镜观察,作者深表感谢。

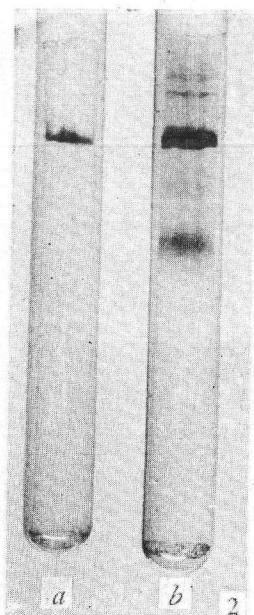
参 考 文 献

- [1] Laufberger, V., Sur la cristallisation de la ferritine, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **19** (1937), 1575—1582.
- [2] Peat, A., Occurrence of ferritin-like particles in a Fungus, *Planta*, **79** (1968), 268.
- [3] Hyde, B. B., etc., Phytoferritin I. Identification and localization, *Jour. Ultrastruct. Res.*, **9** (1963), 248—258.
- [4] Robars A. W., etc., Phytoferritin in plastids of the Cambial Zone of Willow, *Planta*, **76** (1967), 169—178.
- [5] Munro, H. N. & Linder, M. C., Ferritin: Structure, Biosynthesis and Role in Iron metabolism.

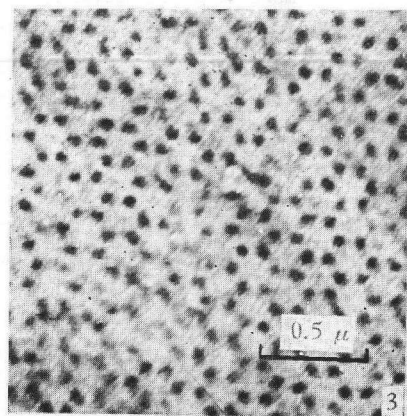
- Physiol. Rev., **58**(1978), 317—387.
- [6] Harrison, P. M., Ferritin and Haemosiderin: structure and function. In: *Iron in Biochemistry and Medicine*, ed. Jacobs, A. and Worwood M. New York, Academic Press, 1974, 73—114.
- [7] Bulen, W. A., ete, A Hemoprotein from *Azotobacter* containing Non-Heme iron: isolation and crystallization, *Biochemical and Biophys. Res. Commun.*, **54** (1973), 1274—1281.
- [8] Steifel, E. I. & Gerald, D. W., *Azotobacter* cytochrome b 557.5 is a Bacterioferritin, *Nature*, 1979 (in press).
- [9] Wang Fa-Chu et al., Hexagonal plate crystals of “Non-heme iron cytochrome b from *Azotobacter Vinelandii*”, *Chinese-Australian Symposium on Biological Nitrogen Fixation* CSIRO Division of plant industry. Canberra, 1978, February, 20—24.
- [10] Jakoby, W. B., Crystallization as a purification technique, *Methods in Enzymology XXII* (ed. Jakoby, W. B.), New York and London, Academic Press, 1971, 248—251.
- [11] Davis, L. C., et al., Nitrogenase II. Changes in the EPR signal of component I (Iron-Molybdenum protein) of *Azotobacter vinelandii* nitrogenase during repression and derepression, *Biochim. Biophys. Acta*, **256** (1972), 512—523.
- [12] Brill, W. J., et al., Detection of nitrogenase components and other nonheme iron protein in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **60**(1974), 237—241.
- [13] Granick, S., Ferritin II, Apoferritin of horse spleen, *Jour. Biol. Chem.*, **147**(1943), 91.
- [14] Crichton, R. R., Structure and function of ferritin, *Angew. Chem. Internat. Edit.*, **12** (1973), 57—65.
- [15] 辽宁林业土壤研究所固氮室电镜组,中国科学院北京植物研究所第七研究室,棕色固氮菌固氮酶 MoFe 蛋白的电子显微镜观察,科学通报, **20**, (1975) 337—340.
- [16] Teals, F. W. J., Cleavage of the heme-protein link by acid methylethyl ketone, *Biochim. Biophys. Acta.*, **35** (1959), 543.
- [17] Appleby, C. A., Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 of Baker's yeast, enzymic and chemical properties of the crystalline enzyme, *Biochem. Jour.*, **73**(1959), 539—550.
- [18] 孟广展,免疫电泳及免疫扩散技术,微生物学通报,1974,1,29—35.
- [19] Worwood, M., etc., Biochemical and immunological properties of human iso-ferritin, In *protein of iron metabolism* (ed. Brown, E. B., Aisen, P., Fielding J. & Crichton, R. R.), New York: Grune & stratton, 1977, 79—89.



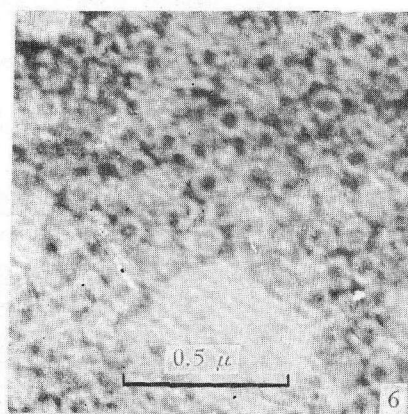
1. 棕色固氮菌中含细胞色素 b 的铁蛋白结晶显微照相 ×1500



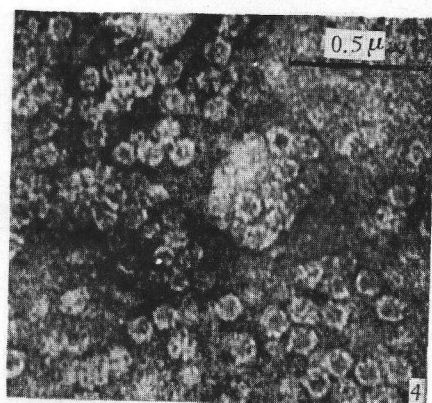
2. 含细胞色素 b 的铁蛋白结晶溶液的聚丙烯酰胺凝胶电泳图
(结晶溶液相对 0.025 M TrisHCl pH7.4 缓冲液透折后电泳, 凝胶浓度 5%。a. α,α,α'-联吡啶染色; b. 氨基黑染色)



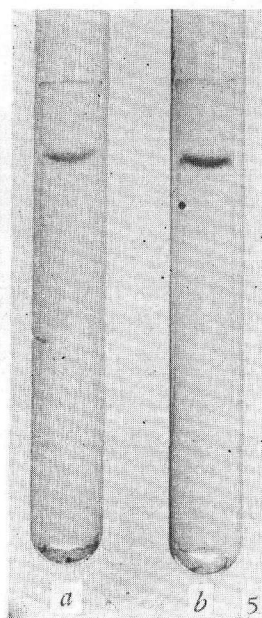
3. 未染色的含细胞色素 b 的铁蛋白晶体的电子显微镜透射图 ×280,000



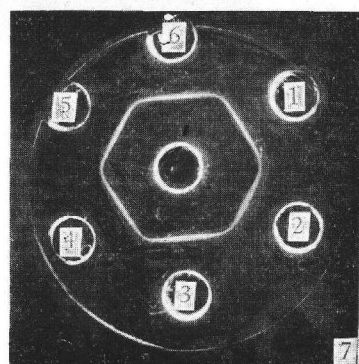
6. 含细胞色素 b 的铁蛋白去除铁核后的电子显微镜照相, 醋酸氧铀负染 ×440,000



4. 含细胞色素 b 的铁蛋白分子经醋酸氧铀负染后的电子显微镜照相 ×368,000



5. 含细胞色素 b 的铁蛋白去除铁核前后的聚丙烯酰胺凝胶电泳图 (a. 去铁前的蛋白质; b. 去铁后的蛋白质)



7. 含细胞色素 b 的铁蛋白及去铁蛋白与兔抗血清的免疫扩散反应图 (中心槽为兔抗含细胞色素 b 的铁蛋白血清。1,3,5 槽为含铁蛋白质, 2, 4,6 槽为去除铁核的蛋白质)