

泥蚶(*Tegillarca granosa*)重组铁蛋白富集 重金属离子的特性及化学传感器的研究*

张涛¹ 苏倡² 刘艳² 张迪骏¹ 周君¹ 芦晨阳¹
明庭红¹ 司开学¹ 苏秀榕¹

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波职业技术学院 宁波 315800)

摘要 利用泥蚶(*Tegillarca granosa*)铁蛋白原核表达工程菌获得的重组铁蛋白,通过圆二色光谱分析蛋白二级结构,扫描电镜和电感耦合等离子质谱研究重组铁蛋白富集 Fe²⁺、Mn²⁺、Cd²⁺、Cr³⁺、Hg²⁺、Pb²⁺和 As³⁺等 7 种重金属离子的特性,同时探索利用重组铁蛋白修饰丝网印刷电极,设计和制备重组铁蛋白检测 Pb²⁺和 Cd²⁺浓度的电化学生物传感器。结果表明复性成功的铁蛋白多为完整的 α -螺旋结构,而复性不成功的蛋白聚集体则多为无规卷曲。重组铁蛋白的直径和形态与富集的离子种类有关。泥蚶铁蛋白对单一金属离子 Fe²⁺和 Mn²⁺的富集凸显优势。对两种混合金属离子的富集大多表现为竞争关系。但重组铁蛋白对 Hg²⁺和 As³⁺混合组的富集量明显高于单一金属离子组的富集量,对 Hg²⁺和 As³⁺混合组的富集表现出协同促进作用。重组铁蛋白传感器对 Pb²⁺和 Cd²⁺溶液的最低检测限为 10 μ g/L。

关键词 泥蚶铁蛋白; 重组表达; 富集重金属; 化学传感器; 铅和镉离子

中图分类号 Q789; S917 **doi:** 10.11693/hyhz20170300067

泥蚶(*Tegillarca granosa* Linnaeus)俗称血蚶、花蚶、粒蚶、血螺等,隶属于软体动物门(Mollusca),瓣鳃纲(Lamellibranchia),蚶目(Arcoida),蚶科(Arcidae),泥蚶属(*Tegillarca*),主要分布于印度洋及西太平洋的热带、亚热带近岸海域,在中国主要分布在黄、渤海以南的沿海地区,是我国四大传统养殖贝类之一(李太武等, 2003; 苏秀榕等, 2005; 张春丹等, 2012)。

近年来,随着沿海重金属污水排放的加重,环境中的重金属通过食物链进入人体危害健康的事件,使得泥蚶对于重金属的富集作用成为近年来研究的热点(Wang *et al*, 1999; 李学鹏等, 2008)。通过研究发现,生物体通过铁结合蛋白和对铁的外界吸收来维持铁的稳态(孙雪松等, 2007)。泥蚶对重金属污染的抗逆性与其体内编码铁蛋白基因的表达密切相关控(Jin *et al*, 2011)。典型的铁蛋白结构是由蛋白 9 外壳

和铁内核两部分构成,其中蛋白外壳是由 24 个亚基自组装形成的笼状结构(Hamburger *et al*, 2005)。铁蛋白主要存在于大多数生物体内,在铁的储存和维持体内铁代谢平衡方面具有重要的作用(Wang *et al*, 2009)。铁蛋白可以存储生物体内多余的铁,同时铁诱导铁蛋白基因表达,让机体内部产生铁蛋白对多余铁进行富集,避免发生铁中毒(Stillman *et al*, 2001)。Zhang 等(2007)发现在白斑综合症病毒或重金属刺激下,铁蛋白基因明显上调。

由于近年来我国沿海城市经济发展,水环境中重金属浓度的增加成为水体污染的主要因素之一。相比过去水中的重金属的直接检测,海洋贝类生物对重金属的富集效应被认为更适宜检测水环境中的重金属污染程度。本研究利用原核表达工程菌表达重组铁蛋白,通过圆二色光谱对纯化后的重组铁蛋白二

* 国家自然科学基金资助项目, 41676159 号, 40776075 号, 41176123 号。张涛, 硕士研究生, E-mail: 1104534052@qq.com
通讯作者: 周君, 博士, E-mail: zhougundam@foxmail.com; 苏秀榕, 教授, 博士生导师, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn
收稿日期: 2017-03-23, 收修改稿日期: 2017-04-20

级结构进行分析, 研究了对 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 和 As^{3+} 等 7 种重金属离子的富集能力, 制备了可以检测 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 浓度的电化学生物传感器。

1 材料与方法

1.1 材料

泥蚶重组铁蛋白由实验室制备。氯化亚铁(FeCl_2)、氯化镉(CdCl_2)、氯化锰(MnCl_2)、氯化汞(HgCl_2)、氯化铬(CrCl_3)、氯化铅(PbCl_2)、氯化砷(AsCl_3)、铁氰化钾($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS)、乙酸(CH_3COOH)、乙酸钠(CH_3COONa)等购于国药集团上海化学试剂有限公司。BCA 总蛋白浓度测定试剂盒购至南京建成有限公司, CLMS-2AN 多元素混合标准溶液购于美国 SamplePrep 公司, 锡元素溶液标准物质购于北京世纪奥科生物技术有限公司, 羧基修饰丝网印刷电极购于苏州长三角系统生物交叉科学研究院有限公司。标准马脾铁蛋白购于美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组铁蛋白的圆二色光谱(CD)分析 经原核表达纯化后获得的泥蚶重组铁蛋白利用超滤管浓缩至蛋白含量 1mg/mL 。取 1.0mL 样品, 采用 1mm 光径的样品池, 在波长范围为 $190\text{--}260\text{nm}$ 远紫外区域进行扫描, 氮气流量为 5L/min , 以纯水为参比溶液。利用二级结构分析软件 CDNN 对实验数据进行二级结构组成的估算, 并以标准马脾铁蛋白作为对照。

1.2.2 富集重金属的研究 富集单一重金属离子: 将纯化后的泥蚶重组铁蛋白(0.1mg/mL)利用透析装置, 分别在 0.2mmol/L 的氯化亚铁(FeCl_2)、氯化镉(CdCl_2)、氯化锰(MnCl_2)、氯化铬(CrCl_3)、氯化汞(HgCl_2)、氯化铅(PbCl_2)、氯化砷(AsCl_3)溶液中透析 12h 后, 然后利用 PBS 溶液洗去未被吸附的重金属离子。反应全过程均用磁力搅拌器, 并每隔 4h 更换一次溶液。富集处理完成后放置到 4°C 条件下, 保存备用。

富集两种重金属离子: 蛋白浓度和方法同上, 将氯化亚铁(FeCl_2)分别和氯化镉(CdCl_2)、氯化锰(MnCl_2)、氯化铬(CrCl_3)、氯化汞(HgCl_2)、氯化铅(PbCl_2)、氯化砷(AsCl_3)两两混合后的溶液中透析 12h 后, 然后利用 PBS 溶液洗去未被吸附的重金属离子。富集完成后放置到 4°C 条件下, 保存备用。

1.2.3 富集重金属后重组铁蛋白的形貌观察 取泥蚶重组铁蛋白富集重金属的处理组溶液各 $10\mu\text{L}$ 。分别滴在干净无菌的云母片表层, 静置, 自然干燥后

用高真空溅射镀膜仪进行喷金处理, 利用扫描电镜(S-3400N, 日本 HITACHI 公司)对铁蛋白富集不同重金属后的聚集形貌进行观察。利用软件 Image-Pro Plus 计算各个蛋白聚集体的大小。

1.2.4 重组铁蛋白富集重金属的能力研究 取泥蚶重组铁蛋白富集各种重金属溶液各 0.1mL , 加入 5%的稀硝酸, 摇动使样品分散, 装入微波消解系统中进行微波消解处理, 采用电感耦合等离子体质谱仪对所富集的重金属含量进行定量的分析测定。标准液为多元素混合液和锡单元素溶液, 用超纯水配成标准工作液。

1.2.5 电化学传感器的制备和检测 将羧基修饰的丝网印刷电极表面用超纯水进行清洗并晾干后备用。其中, 0.4mol/L 的 EDC 溶液和 NHS 溶液为 0.1mol/L 按照 1:1 混合后滴到丝网印刷电极上进行 30min 的羧基活化, 用超纯水清洗掉干净后, 将 $200\mu\text{L}$ 浓度为 2mg/mL 重组铁蛋白溶液滴在工作电极表面, 静置反应 30min 后用超纯水除去未反应的蛋白, 最后将修饰好的丝网印刷电极 4°C 保存。利用浓度为 5mmol/L 的 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 溶液对修饰电极和空白电极灵敏度进行检测, 然后利用修饰电极在在 pH 为 4.5 的乙酸/乙酸钠缓冲液条件下, 室温下用溶出伏安法测定浓度为 $10\mu\text{g/L}$ 、 $25\mu\text{g/L}$ 、 $50\mu\text{g/L}$ 、 $75\mu\text{g/L}$ 、 $100\mu\text{g/L}$ 的 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的电化学信号, 记录数据做标准曲线。最后在相同检测条件下对 $50\mu\text{g/L}$ 的 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 溶液重复检测 5 次, 记录数据。

2 结果与分析

2.1 圆二色谱检测结果

将分子筛层析收集到的各蛋白峰溶液, 利用圆二色谱进行分析获得各个峰蛋白溶液的复性蛋白的二级结构完整程度。泥蚶原核表达的重组铁蛋白的 α -螺旋所占比例低于标准马脾铁蛋白, 无规则卷曲所占比例则明显高于马脾铁蛋白, 但四种二级结构总体占比趋势与标准马脾铁蛋白相似, 可见经过一系列分离纯化和复性操作获得的泥蚶重组铁蛋白二级结构趋于完整, 所占比例与对照组存在微小差异(图 1)。

2.2 扫描电镜观察结果

如图 2 所示泥蚶重组铁蛋白富集 Fe^{2+} 后的聚集体仍为大小相似的圆球体, 直径大约为 $1\mu\text{m}$, 但球体间发生了粘连现象。推测为 Fe^{2+} 的氧化作用。富集 Mn^{2+} 的蛋白聚集体形貌与对照组相比变化非常明显, 由原来的小球体变为花球状结构, 且直径也增大到

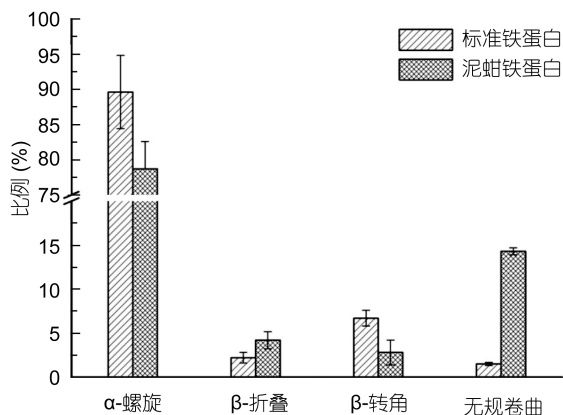


图1 泥蚶重组铁蛋白二级结构分析

Fig.1 Secondary structure analysis of recombinant proteins of *T. granosa*

5 μm 左右。富集 Cd^{2+} 的蛋白聚集体为大小均匀的小圆球状单体或聚集体,颗粒较小,直径大约为 1 μm 。富集 Cr^{3+} 的蛋白聚集体为粘连在一起的圆球体,直径大小没有变化。富集 Hg^{2+} 的蛋白为明显聚集成堆的圆球体,直径变化不明显。富集 As^{3+} 组的蛋白由原来的光滑小球体变为椭圆形、周围出现小刺状的球体结构。富集 Pb^{2+} 的蛋白小球体直径明显增大为 2—3 μm ,且 2—3 个小球体之间发生明显的相融合现象。

2.3 ICP-MS 检测结果

泥蚶重组铁蛋白在相同的条件下,对 Fe^{2+} 的富集量最高为 615.28mg/g,其次为 Mn^{2+} 的富集量 545.04mg/g。对 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 的富集量在 400mg/g 左右,而对 Cr^{3+} 、 As^{3+} 和 Pb^{2+} 的富集量均在 200mg/g 左右,由此可见泥蚶重组铁蛋白更易于富集多价态金属离子 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 。而对于 As^{3+} 的富集可能与其在溶液中的存在状态相关(图 3)。

观察比较泥蚶重组铁蛋白富集两种混合金属离子的情况发现, Mn^{2+} 与 Fe^{2+} 、 Cd^{2+} 、 As^{3+} 和 Hg^{2+} 的混合基本没有影响泥蚶铁蛋白对于 Mn^{2+} 的富集量 300mg/g 左右。而 Hg^{2+} 和 As^{3+} 的混合组增加明显,重组铁蛋白对两种混合离子的富集明显高于单一离子条件下的富集量;而大部分混合组均表现为拮抗状态,其中 Cd^{2+} 和 As^{3+} 混合组最为明显,单一离子溶液条件下富集量是混合条件下富集量的 2 倍。

2.4 传感器的制备和使用

利用泥蚶重组铁蛋白修饰的丝网印刷电极在 pH 4.5 的乙酸/乙酸钠缓冲液条件下,室温下用溶出伏安法测定不同浓度的 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的电化学信号。重金属离子浓度分由低到高分别为 10 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、75 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 。 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 溶液的最低检测限可

以达到 10 $\mu\text{g/L}$,在 10—100 $\mu\text{g/L}$ 之间表现出良好的线性关系, Pb^{2+} 溶液的回归方程为 $y = 0.2979x + 34.336$, R^2 值为 0.9960, Cd^{2+} 溶液的回归方程为 $y = 0.1651x + 6.0569$, R^2 值为 0.9342 (图 4)。在相同的检测条件下对 50 $\mu\text{g/L}$ 的 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 溶液重复检测 5 次,其偏差分别为 3.4%和 4.1%,可见重现性较好。

3 讨论

3.1 重组铁蛋白的二级结构

泥蚶重组铁蛋白的二级结构中的无规卷曲大于标准铁蛋白,此类蛋白聚集体的形成源于复性过程中高浓度的尿素溶液破坏了蛋白的天然二级结构,形成天然卷曲,复性过程中更易形成天然聚集 (Harrison *et al*, 1996; Zou *et al*, 2016)。

通过一系列复性和纯化操作获得的泥蚶重组铁蛋白在扫描电镜下我们观察为大小均匀的球体,当铁蛋白富集不同种类重金属离子后,其聚集体表面形貌发生了明显变化。首先表现为球体直径的增大,由原来的 1 μm 增加到 2—3 μm (Pb^{2+} 富集组),直径变化最为明显的 Mn^{2+} 富集组,蛋白球体直径增加为 5 μm 。Zou 等(2016)研究发现当铁蛋白内部有铁核或其他金属核填充时,蛋白球体直径较大。富集重金属后,蛋白空腔的内部被金属支撑起来,金属离子氨基酸侧链间存在着如疏水键、氢键、静电作用和范德华力等相互作用力,对蛋白质的折叠会造成较为显著的影响,从而增加了蛋白壳的厚度,使重组铁蛋白聚集体直径明显增加(Truffi *et al*, 2016)。其次蛋白聚集体之间发生了不同程度的粘连、聚集成堆而不是均匀分散,蛋白球体表面出现层状结构或者刺状结构。铁蛋白富集重金属后, H^+ 和 OH^- 一方面在构成金属核的过程中有促进作用(Levi *et al*, 2015),另一方面会与蛋白壳内外表层的氨基酸发生结合,对蛋白壳的构象发生影响,也会改变蛋白壳的柔性调节能力。这种调节能力大小影响了蛋白聚集体的表面形貌。同时,不同的重金属具有不同的氧化还原强度,会影响介质中的正负离子强度,也造成不同处理组的不同形貌变化。Yamashita 等(2010)研究铁蛋白富集 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 和 Ni^{2+} 发现,三重金属离子在进入铁蛋白内部成核过程中,氧化还原能力的不同导致铁蛋白结构发生独特的变化进而在电镜下呈现出不同的形貌。另一方面,金属离子水化可能摧毁了铁蛋白水化层,并使铁蛋白容易折叠中间体。金属离子水合作用不同,导致铁蛋白对重金属的富集强度不一,促使表面形貌

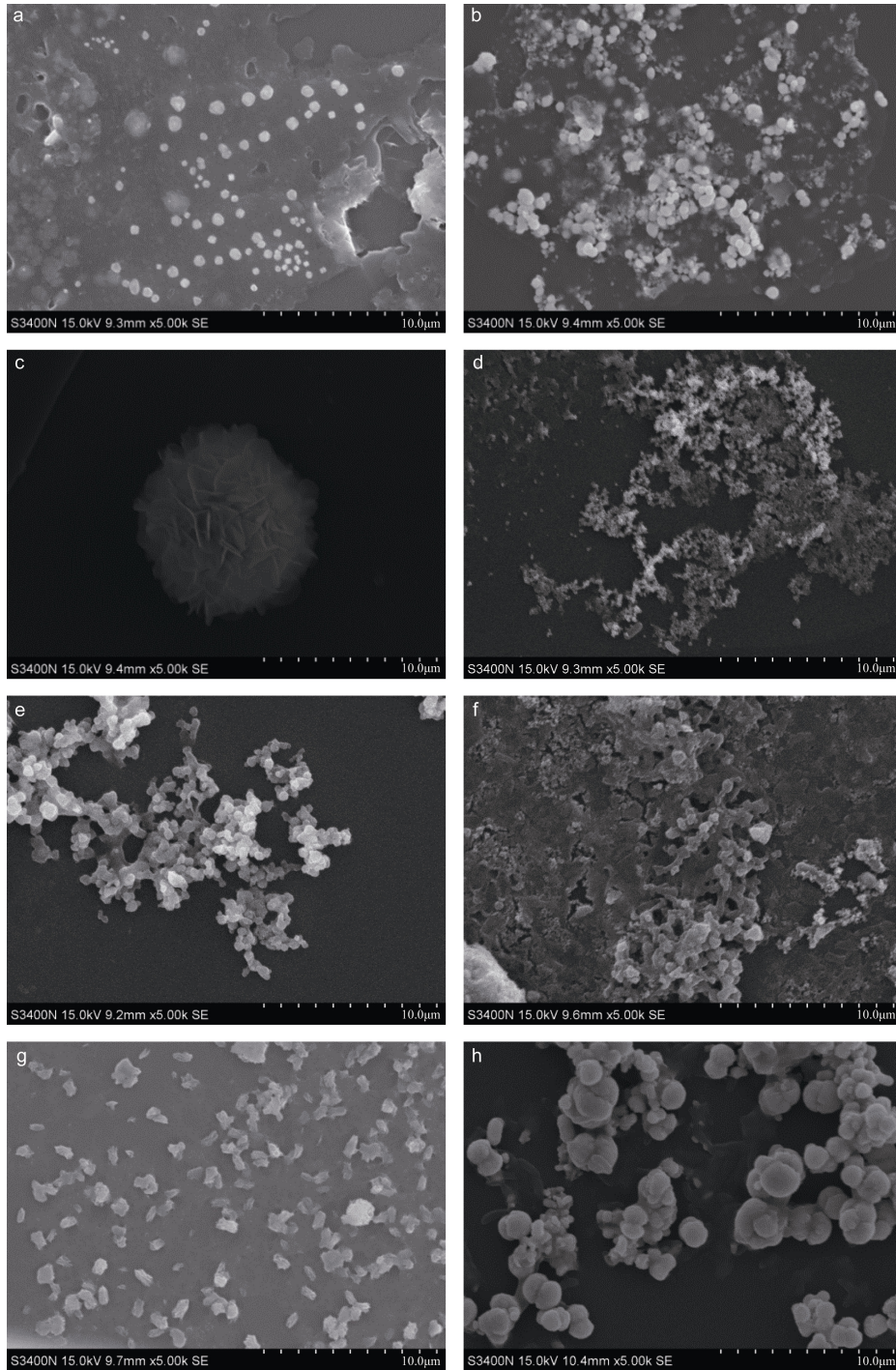


图 2 重组铁蛋白富集不同金属离子的扫描电镜图

Fig.2 SEM of different ferritins treatment groups

注: a: 空白组; b: 富集 Fe^{2+} 组; c: 富集 Mn^{2+} 组; d: 富集 Cd^{2+} 组;
e: 富集 Cr^{3+} 组; f: 富集 Hg^{2+} 组; g: 富集 As^{3+} 组; h: 富集 Pb^{2+} 组

发生不同的变化(Zolea *et al.*, 2015)。Yang 等(2007)利用铁蛋白在不同金属离子溶液中蛋白亚基间的解聚/聚合特性装载铂金属。最后, 反应系统形成了形貌各异的 Fe-铁蛋白、Cd-铁蛋白、Cr-铁蛋白、Mn-铁蛋白、

Hg-铁蛋白、As-铁蛋白和 Pb-铁蛋白的聚集体。

3.2 重组铁蛋白对重金属离子的富集

泥蚶重组铁蛋白对 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 富集相对其他重金属离子表现出明显优势。蛋白对 Fe^{2+} 的富集优势与

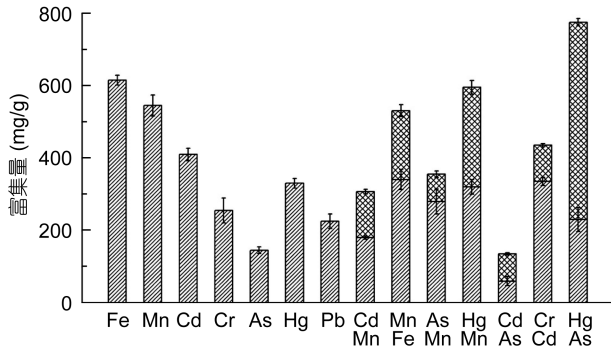


图3 泥蚶重组铁蛋白对不同重金属离子的富集量

Fig.3 Comparison of results for different metals treatment of recombinant proteins of *T. granosa*

铁蛋白本身的特性和活性位点有关。铁蛋白在生物体内的主要功能即为储存多余的 Fe^{2+} ，避免其对生物体的伤害(Yang *et al.*, 2007)。同时有研究发现当铁核内充满 Fe^{3+} 时会加速 Fe^{2+} 的氧化和储存速率(Bou-Abdallah, 2010)。重组铁蛋白对 Mn^{2+} 富集优势则源于锰很强的氧化还原特性，在锰的化学氧化过程中，二

价锰先被氧化成含大量三价锰的固体氧化物或氢氧化物，再经缓慢的歧化反应，最终生成四价锰。有研究发现生物锰氧化物形成过程中伴随着多种形式的氧化还原反应，初级锰氧化物的晶体结构也会随时间发生变化(Toner *et al.*, 2005)。

重组铁蛋白对于两种混合金属离子的富集大多表现为两种金属离子的竞争关系，例如 Cd^{2+} 和 As^{3+} 混合组、 Cr^{3+} 与 Cd^{2+} 混合组等。这是受铁蛋白内核的空间大小和结合位点的数量限制的。Wong 等(1996)就是利用铁蛋白内核空间的固定大小合成均匀大小的金属纳米颗粒。但与其他金属离子混合组不同，重组铁蛋白对 Hg^{2+} 和 As^{3+} 混合组的富集表现出协同促进作用。 Hg^{2+} 和 As^{3+} 混合组的富集量明显高于单一金属离子组的富集量。 Hg^{2+} 和 As^{3+} 同时存在可能改变了重组铁蛋白所处的溶液环境条件，研究发现溶液 pH 的升高可以显著增加铁蛋白所带负电荷量，增加静电吸引作用，富集更多的金属阳离子。

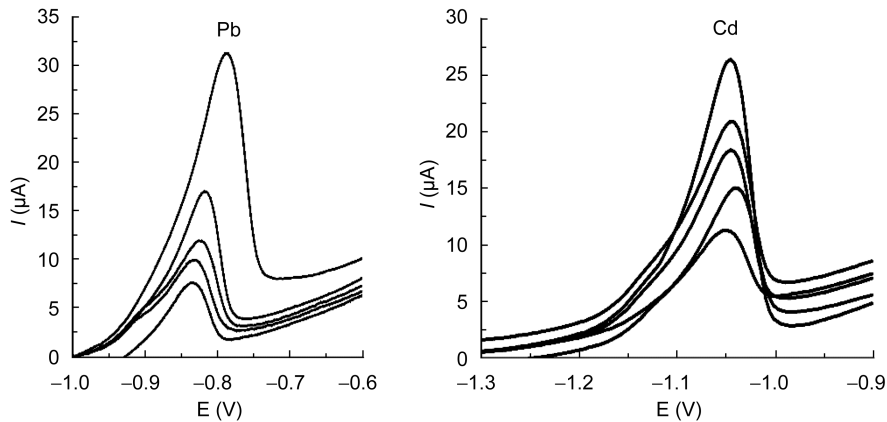


图4 泥蚶重组铁蛋白修饰电极测定 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 浓度梯度曲线

Fig.4 Determination of concentration gradient of Pb^{2+} and Cd^{2+} modified electrode of recombinant proteins of *T. granosa*

3.3 重组铁蛋白电化学生物传感器

铁蛋白具有氧化外界 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} 并在内部形成铁核的功能，同时在特定的条件下铁蛋白可以将内核中的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 释放到外界中，氧化还原过程伴随着的电子转移特性使得铁蛋白在电极上表现出传递电子的能力(Inamuddin *et al.*, 2016)。Zapien 等(2000)利用铁蛋白成功实现了在金电极上的自组装，并测得相当明确的电流-电位曲线。本实验利用重组铁蛋白富集重金属离子 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的特性，将铁蛋白固定在丝网印刷电极上以检测溶液中 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的浓度。相比于以酶作为敏感元件的生物传感器更具有专一

性和准确性(王明华等, 2013)。Wu 等(2004)也是将铁蛋白加入到制备纳米金薄膜电极的溶液体系中，发现能够显著增强电极的灵敏度和稳定性。另一方面，重组铁蛋白本身氨基酸侧链带有 $-\text{NH}_2$ 基团，可以直接与羧基修饰的丝网印刷电极发生反应实现铁蛋白的固定，无需外加修饰基团。Ritzert 等(2009)利用铁蛋白氨基酸侧链的 $-\text{NH}_2$ 基团将其直接固定在羧基修饰的金电极表面，实现在电化学方面探究铁蛋白的 Fe^{2+} 释放动力学。泥蚶重组铁蛋白电化学生物传感器在 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 溶液的最低检测限方面均能达到 $10\mu\text{g/L}$ ，相比于 Shen 等(2008)构建的 Pb^{2+} 最低检测限

1nmol/L 的脱氧核糖核酸酶金电极生物传感器有明显的优势。泥蚶重组铁蛋白修饰电极在 10—100 $\mu\text{g/L}$ 之间也表现出良好的线性关系, R^2 值达到 0.9960 和 0.9342。

4 结论

泥蚶重组铁蛋白富集 Fe^{2+} 的聚集体为直径约 1 μm 圆球体, 富集 Mn^{2+} 的为直径 5 μm 左右花球, 富集 Cd^{2+} 为直径约 1 μm 小圆球, 富集 Cr^{3+} 的为粘连在一起的圆球体, 富集 Hg^{2+} 为成堆的圆球体, 富集 As^{3+} 为椭圆形、周围出现小刺状的球体结构, 富集 Pb^{2+} 的为直径 2—3 μm 左右、且 2—3 个小球体相融合。泥蚶重组铁蛋白在相同的条件下, 对 Fe^{2+} 的富集量最高为 615.28mg/g, 其次为 Mn^{2+} 的富集量 545.04mg/g。对 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 的富集量在 400mg/g 左右, 而对 Cr^{3+} 、 As^{3+} 和 Pb^{2+} 的富集量均在 200mg/g 左右, 由此可见泥蚶重组铁蛋白更易于富集多价态金属离子 Fe^{2+} 和 Mn^{2+} 。泥蚶重组铁蛋白富集 Hg^{2+} 和 As^{3+} 为协同效应, 富集 Cd^{2+} 和 As^{3+} 为拮抗效应。泥蚶重组铁蛋白传感器对 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 溶液的最低检测限为 10 $\mu\text{g/L}$ 。

参 考 文 献

王明华, 赵二芳, 李杜娟, 2013. 检测重金属离子生物传感器的研究进展. 生物技术通报, 10: 9—11

孙雪松, 何庆瑜, 2007. 含铁蛋白介导的铁转运分子机制. 化学进展, 9(12): 1986—1990

苏秀榕, 吕振明, 李太武等, 2005. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)个体发育过程中同工酶基因表达与调控的研究. 海洋与湖沼, 36(1): 81—87

李太武, 李成华, 宋林生等, 2003. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析. 遗传多样性, 11(2): 118—124

李学鹏, 励建荣, 段青源等, 2008. 泥蚶对重金属铜、铅、镉的生物富集动力学. 水产学报, 32(4): 592—600

张春丹, 周 君, 李 晔等, 2012. 重金属胁迫对泥蚶(*Tegillarca granosa*)能量代谢酶转录水平的研究. 海洋与湖沼, 43(5): 919—923

Bou-Abdallah F, 2010. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1800(8): 719—731

Hamburger A E, West A P Jr, Hamburger Z A *et al*, 2005. Crystal structure of a secreted insect ferritin reveals a symmetrical arrangement of heavy and light chains. Journal of Molecular Biology, 349(3): 558—569

Harrison P M, Arosio P, 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1275(3): 161—203

Inamuddin, ul Haque S, Naushad M, 2016. Electrochemical studies of biocatalytic anode of sulfonated graphene/ferritin/glucose oxidase layer-by-layer biocomposite films for

mediated electron transfer. Enzyme and Microbial Technology, 87—88: 29—36

Jin C H, Li C H, Su X R *et al*, 2011. Identification and characterization of a *Tegillarca granosa* ferritin regulated by iron ion exposure and thermal stress. Developmental & Comparative Immunology, 35(7): 745—751

Levi S, Rovida E, 2015. Neuroferritinopathy: From ferritin structure modification to pathogenetic mechanism. Neurobiology of Disease, 81: 134—143

Ritzert N L, Casella S S, Zapfen D C, 2009. Surface-electrochemistry of ferritin adsorbed on 8-mercaptopentanoic acid-modified gold electrodes. Electrochemistry Communications, 11(4): 827—830

Shen L, Chen Z, Li Y H *et al*, 2008. Electrochemical DNAzyme sensor for lead based on amplification of DNA-Au Bio-Bar codes. Analytical Chemistry, 80(16): 6323—6328

Stillman T J, Hempstead P D, Artymiuk P J *et al*, 2001. The high-resolution X-ray crystallographic structure of the ferritin (EcFtnA) of *Escherichia coli*; comparison with human H ferritin (HuHF) and the structures of the Fe^{3+} and Zn^{2+} derivatives. Journal of Molecular Biology, 307(2): 587—603

Toner B, Fakra S, Villalobos M *et al*, 2005. Spatially resolved characterization of biogenic manganese oxide production within a bacterial biofilm. Applied and Environmental Microbiology, 71(3): 1300—1310

Truffi M, Fiandra L, Sorrentino L *et al*, 2016. Ferritin nanocages: A biological platform for drug delivery, imaging and theranostics in cancer. Pharmacological Research, 107: 57—65

Wang D, Kim B Y, Lee K S *et al*, 2009. Molecular characterization of iron binding proteins, transferrin and ferritin heavy chain subunit, from the bumblebee *Bombus ignitus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 152(1): 20—27

Wang W X, Fisher N S, 1999. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. Science of the Total Environment, 237—238: 459—472

Wong K K W, Mann S, 1996. Biomimetic synthesis of cadmium sulfide-ferritin nanocomposites. Advanced Materials, 8(11): 928—932

Wu Y H, Hu S S, 2004. Direct electron transfer of ferritin in dihexadecylphosphate on an Au film electrode and its catalytic oxidation toward ascorbic acid. Analytica Chimica Acta, 527(1): 37—43

Yamashita I, Iwahori K, Kumagai S, 2010. Ferritin in the field of nanodevices. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1800(8): 846—857

Yang Z, Wang X Y, Diao H J *et al*, 2007. Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin. Chemical Communications, (33): 3453—3455

Zapfen D C, Johnson M A, 2000. Direct electron transfer of ferritin adsorbed at bare gold electrodes. Journal of Electroanalytical Chemistry, 494(2): 114—120

Zhang L, Swift J, Butts C A *et al*, 2007. Structure and activity of

apoferritin-stabilized gold nanoparticles. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(11): 1719—1729
Zolea F, Biamonte F, Candeloro P *et al*, 2015. H ferritin silencing induces protein misfolding in K562 cells: A Raman analysis.

Free Radical Biology and Medicine, 89: 614—623
Zou W Y, Liu X Y, Zhao X *et al*, 2016. Expression, purification, and characterization of recombinant human L-chain ferritin. *Protein Expression and Purification*, 119: 63—68

RESEARCH OF CHARACTERISTICS OF ENRICHMENT OF HEAVY METALS BY RECOMBINANT FERRITIN FROM *TEGILLARCA GRANOSA*

ZHANG Tao¹, SU Chang², LIU Yan², ZHANG Di-Jun¹, ZHOU Jun¹, LU Chen-Yang¹,
MING Ting-Hong¹, SI Kai-Xue¹, SU Xiu-Rong¹

(1. *School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China*; 2. *Ningbo Polytechnic, Ningbo 315800, China*)

Abstract The recombinant ferritin protein taken from the *Tegillarca granosa* ferritin protein prokaryotic expression bacteria was used to design and get the electrochemical biosensors for detection of Pb²⁺ and Cd²⁺ of the recombinant ferritin protein through the analysis of the secondary structure of protein by circular dichroism (CD), the research of the characteristics of the protein to enrich 7 heavy metal ions such as Fe²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Cr³⁺, Hg²⁺, Pb²⁺ and As³⁺ by scanning electron microscope(SEM) and inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) and the exploration of the recombinant ferritin protein to modify screen-Printed Electrode. The results showed that the ultra-structure of recombinant ferritin protein with successful refolding was mainly complete α -helix, however, the structure of the protein with unsuccessful refolding is mainly an irregular one. The diameter and shape of the recombinant ferritin protein was related to the type of the enriched ions. *T. granosa* ferritin had advantage to enrich the single metal ions like Fe²⁺ and Mn²⁺ and performs as a competing role when it came to the enrichment of the 2 mixed metal ions. However, the enriched amount of the mixed metal ions of Hg²⁺ and As³⁺ was obviously higher than the enriched amount of the single metal ions and the protein just promoted the enrichment of the that mixed ion. And the lowest detection concentration of biosensors for Pb²⁺ and Cd²⁺ liquor was 10 μ g/L.

Key words *Tegillarca granosa* ferritin; recombinant expression; enrichment heavy metals; chemical sensor; lead and cadmium ions