

# 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)重组 Fe-铁蛋白 和 Mn-铁蛋白的性质解析\*

明庭红<sup>1</sup> 初双双<sup>1</sup> 苏 倡<sup>2</sup> 刘 艳<sup>2</sup> 司开学<sup>1</sup> 张迪骏<sup>1</sup>  
王朝阳<sup>1</sup> 周 君<sup>1</sup> 芦晨阳<sup>1</sup> 苏秀榕<sup>1</sup>

(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** 利用缢蛏(*Sinonovacula constricta*)重组铁蛋白富集 Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>制备重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白,通过扫描电镜、X 射线能量色散能谱仪(EDS)和 MALDI TOF/TOF 质谱系统测定蛋白的表面形貌变化、金属元素的能量变化和肽段分子量。利用综合物性测量系统(PPMS)测定蛋白纳米颗粒在室温 300K,外加磁场 3T 下的磁学性质变化。结果显示,重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白与空白相比,表面形貌发生明显变化,Fe-铁蛋白仍为小球状,Mn-铁蛋白聚集体呈片层花球状,Cd-铁蛋白聚集体呈小圆球状,Mn-铁蛋白富集 Cd<sup>2+</sup>后呈片层花瓣散落状。Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白分别检测出相应金属元素且都有其特征能量态。两种重组蛋白的肽谱图与空白组相比,除铁蛋白保守肽段外还出现各自的特征肽段,推测与铁蛋白对 Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>的富集功能密切相关。Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白纳米颗粒磁滞回线形状与铁蛋白空白组基本相同,呈顺磁性特征,磁性强度随 Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>富集量的增加而增大。通过比较 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白与空白组在富集 Hg<sup>2+</sup>、AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和 Cd<sup>2+</sup>三种重金属离子方面能力的差异,发现 Fe-铁蛋白对 Hg<sup>2+</sup>、AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和 Cd<sup>2+</sup>三种重金属的富集能力是空白组的 2.4 倍、1.7 倍和 3.7 倍。Mn-铁蛋白对 Hg<sup>2+</sup>、AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和 Cd<sup>2+</sup>三种重金属离子在相同条件下的富集能力也有明显提高,分别为铁蛋白空白组的 1.8 倍、3.0 倍和 4.6 倍。本研究结果为 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白在重金属污染治理方面的应用提供了数据参考。

**关键词** 缢蛏; 重组 Fe-铁蛋白; 重组 Mn-铁蛋白; 表面形貌; 磁学性质; 富集能力  
**中图分类号** Q789; S968.3 doi: 10.11693/hyhz20170400103

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)俗称蛏子、海蛏,属软体动物门(Mollusca)、双壳纲(Bivalvia)、异齿亚纲(Heterodonta)、帘蛤目(Veneroida)、竹蛏科(Solcnidae)、缢蛏属(*Sinonovacula*)广泛分布于中国、日本和朝鲜等国的沿海地区。缢蛏营养丰富,味道鲜美,是一种高蛋白、低脂肪、低热量的海洋健康水产品(Li *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2012; Tran *et al.*, 2015)。同时,其对重金属污染的耐受能力也得到广泛关注,研究表明这与其体内的铁结合蛋白密切相关(Andrews *et al.*, 1992)。

铁结合蛋白(ferritin)简称铁蛋白,最早于 1937 年从脊椎动物马的脾脏中纯化分离出来,是一类广泛存在于动物、植物和微生物中,由 24 个亚基组成的 450kDa 巨大复合体(杜莉利等, 2008; 贺静静等, 2009)。外形结构呈笼子状球形,由蛋白壳和铁核两部分组成(Crichton *et al.*, 2010),具有耐稀酸(pH 2.1)、耐稀碱(pH 12.1)和较高温度(70—75 °C)不变性等特点(王群力等, 2004)。

近年来,鉴于铁蛋白具有良好的抗逆性,目前对其应用的研究也越来越多,包括抗肿瘤、磁性

\* 国家自然科学基金资助项目, 40776075 号, 41176123 号, 41676159 号。明庭红, 博士研究生, E-mail: mth151013@163.com  
通讯作者: 苏秀榕, 教授, 博士生导师, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn  
收稿日期: 2017-04-28, 收修改稿日期: 2017-05-29

材料、电化学传感器、环境治理等多个方面。Martin 等(2008)研究发现, 脑组织和肿瘤组织内铁蛋白等含铁磁性物质的变化是肿瘤和神经性疾病的重要诊断标记。Guertin 等(2007)对马脾铁蛋白的磁学性质进行了深入研究, 为其在磁共振成像方面的应用打下基础。Abbaspour 等(2012)利用去铁铁蛋白构建了一种检测单核苷酸多态性的电化学传感器。王群力等(2004)利用铁蛋白建立了一系列捕获环境中有机磷农药的系统。Li 等(2012)的研究发现浙江枝吻纽虫的重组铁结合蛋白具有富集二价重金属离子  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{2+}$  的能力。本研究通过缙蛭重组铁蛋白富集  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  制得 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白, 利用扫描电镜和 X 射线能量色散能谱仪研究铁蛋白形貌和金属元素能量的变化, 并结合 MALDI TOF/TOF 对 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白肽段进行了肽谱分析, 通过综合物性测量系统探究了两种重组蛋白纳米颗粒的磁学性质。最后比较了 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白与空白组在富集  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{AsO}_4^{3-}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  三种重金属离子方面能力的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

缙蛭重组铁蛋白(*Sinonovacula constricta* ferritin, ScFER), 通过体外表达、纯化方法制备(0.1mg/mL)。氯化铁( $\text{FeCl}_3$ )、氯化锰( $\text{MnCl}_2$ )、氯化镉( $\text{CdCl}_2$ )、氯化汞( $\text{HgCl}_2$ )、砷酸钠( $\text{Na}_3\text{AsO}_4$ )均为分析纯, 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于南京建成有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白的制备** 将复性后的缙蛭重组铁蛋白利用透析装置分别在浓度为 1mmol/L 的  $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{MnCl}_2$  和  $\text{CdCl}_2$  溶液中透析 12h, 然后分别在 0.1mol/L 的 PBS 溶液中透析 12h, 以除去未被吸附的  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$ 。反应过程中磁力搅拌, 并每隔 4h 更换一次溶液。富集处理完成后置于 4°C 保存备用。

**1.2.2 蛋白表面形貌观察及能谱检测** 取富集  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  的铁蛋白溶液 10 $\mu\text{L}$ , 分别滴在干净的云母片上, 自然干燥后用导电胶将一面粘牢在样品台上, 放入真空蒸发仪中喷金处理, 置于扫描电子显微镜和 X 射线能量色散能谱仪(S-3400N, SU-70, 东京, 日本)对各处理组蛋白的结构和元素进行定性分析。能谱仪采用 Si(Li)固体探头, 探头距离 40mm,

样品倾斜 30°, 工作距离 21mm, 分析时间 100s。

**1.2.3 蛋白肽分子量的测定** 取 20 $\mu\text{L}$  蛋白溶液, 用终浓度 10mmol/L 二硫苏糖醇(DTT), 37 °C 反应 1h, 终浓度 25mmol/L 吡啶-3-乙酸(IAA), 37 °C 避光反应 0.5h, 按酶:蛋白为 1 : 50 比例加入胰蛋白酶, 酶解过夜, C18 除盐冻干。样品用 200 $\mu\text{L}$  50%乙腈, 0.1%三氟乙酸(TFA)溶解, 取出 10 $\mu\text{L}$ , 加 30 $\mu\text{L}$  50%乙腈, 0.1% TFA。取 1 $\mu\text{L}$  点样在靶板上, 再点 1 $\mu\text{L}$   $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)基质。利用 MALDI-TOF-TOF(AB SCIEX) 仪器通过肽质量指纹法 (Peptide Mass Fingerprint, PMF)和肽碎片离子鉴定法对肽分子量进行测定(杨倩等, 2015)。

**1.2.4 蛋白磁性强度的测定** 取重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白 10mL 分装于离心管中, 封口后放入冷冻干燥机(ALPHA 1-2LD plus, Christ, Osterode, 德国)内冻干。取冻干的蛋白粉末 1mg 左右放入综合物性测量系统(PPMS, Quantum Design, San Diego, 美国), 设定外加磁场为 3T, 温度为 300K 进行磁性强度测量。

**1.2.5 蛋白富集重金属能力的测定** 将重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白利用透析装置分别在浓度为 1mM 的  $\text{CdCl}_2$  溶液、 $\text{HgCl}_2$  溶液和  $\text{Na}_3\text{AsO}_4$  溶液中透析 12h, 然后分别在 0.1mol/L 的 PBS 溶液中透析 12h, 以除去未被吸附的  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$  和  $\text{AsO}_4^{3-}$ , 并设置缙蛭重组铁蛋白为对照组。反应过程中磁力搅拌器, 并每隔 4h 更换一次溶液。富集处理完成后各取 0.1mL, 加入 5%的稀硝酸, 摇动使样品分散, 然后装入微波消解系统(MARS, CEM, Boston, 美国)中进行微波消解, 采用电感耦合等离子体质谱仪(X Series, Thermo Fisher scientific, New York, 中国)分析测定富集的重金属含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白形貌特征

从图 1(S1)可以看出实验制备得到的缙蛭重组铁蛋白聚集体为球状, 蛋白团之间相互分离, 聚集体直径在 1 $\mu\text{m}$  左右, 与标准马脾铁蛋白形状和大小相似。Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白富集  $\text{Cd}^{2+}$  之后, 蛋白聚集体的表面形貌发生了明显变化。Fe-铁蛋白与空白组相比, 蛋白球体直径增加, 且球体之间出现粘连(图 1, S2)。Mn-铁蛋白组表面形貌变化更加明显, 由原来的蛋白球体变为花团状, 且直径明显增大(图 1, S3)。富集  $\text{Cd}^{2+}$  后基本为小圆球状单体或聚集体(图 1, S4)。Fe-铁蛋白富集  $\text{Cd}^{2+}$  后蛋白聚集体表现为小圆球聚集

体(图 1, S5)。Mn-铁蛋白  $\text{Cd}^{2+}$ 富集组呈现出花团状球体花瓣散落, 中间还夹杂着数个小圆球的状态(图 1, S6)。

Fe-铁蛋白富集  $\text{Cd}^{2+}$ 后蛋白聚集体由原来均匀分散的小圆球变为聚集成堆的圆球体。推测 Fe-铁蛋白

在富集  $\text{Cd}^{2+}$ 的同时也受到了  $\text{Cd}^{2+}$ 的影响, 蛋白之间发生聚集。Mn-铁蛋白富集  $\text{Cd}^{2+}$ 后抑制了 Mn-铁蛋白聚集体形成花球, 使局部产生片层花瓣。小圆球聚集体边缘模糊, 呈粘连状。不同金属离子对铁蛋白的折叠具有不同的作用, 从而产生不同的表面形貌。

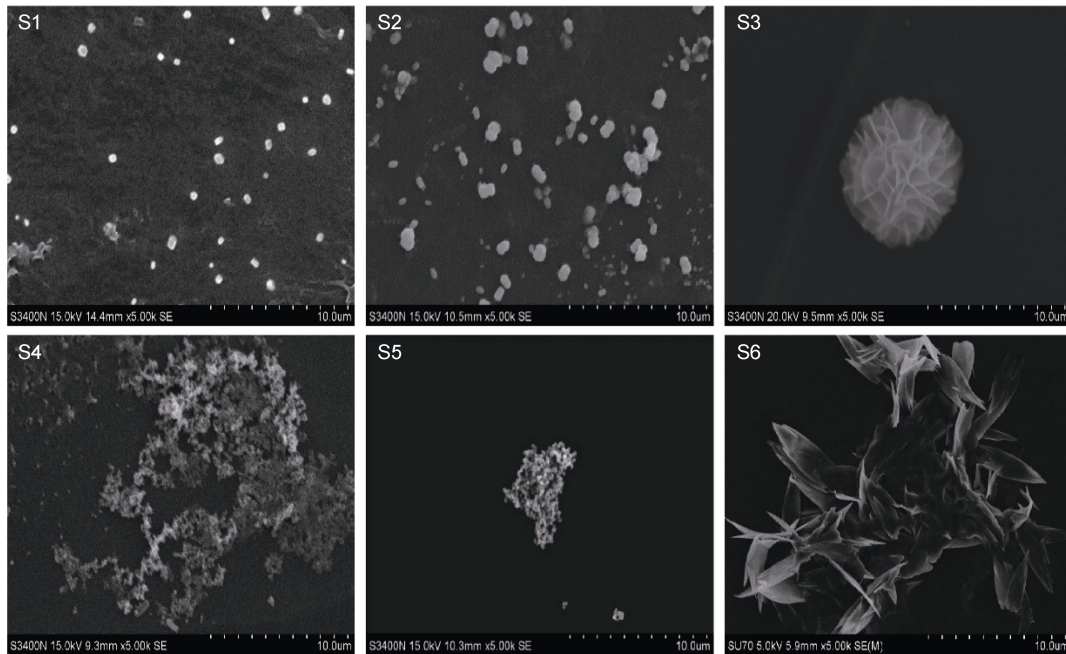


图 1 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白的扫描电镜图

Fig.1 SEM images of different ferritin treatment groups

注: S1: ScFER 空白组; S2: Mn-ScFER 组; S3: Fe-ScFER 组; S4: Cd-ScFER 组; S5: Fe-ScFER 富集  $\text{Cd}^{2+}$ 组; S6: Mn-ScFER 富集  $\text{Cd}^{2+}$ 组

## 2.2 蛋白的能谱分析

利用 X 射线色散能谱仪(EDS)检测发现: 空白组检测出 Si、Na、K、Cl、C、N、O、P 等 8 种元素(图 2, S1)。其中 Si、Na、K、Cl 等元素可能来自于云母片; C、N、O、P 等元素可能来自于铁蛋白, 这四种元素是蛋白质的重要组成元素, 未检测出铁、锰和镉三种金属元素。Fe-铁蛋白、Mn-铁蛋白和 Cd-铁蛋白均检测出了相应的金属元素, 说明 ScFER 具有富集  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和  $\text{Cd}^{2+}$ 三种金属离子的能力。同时, 在 Fe-铁蛋白富集  $\text{Cd}^{2+}$ 组和 Mn-铁蛋白富集  $\text{Cd}^{2+}$ 组中均检测出了铁、镉和锰、镉两种元素, 说明 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白也具有富集  $\text{Cd}^{2+}$ 的功能。

比较各金属离子富集组能谱图发现:  $\text{Fe}^{3+}$ 在 0.8keV 和 6.4keV 两处出峰,  $\text{Mn}^{2+}$ 在 0.6keV 和 5.9keV 两处出峰,  $\text{Cd}^{2+}$ 在 3.1keV 和 3.3keV 两处出峰, 三种金属在不同的激发能级均有出峰, 说明铁蛋白在富集  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和  $\text{Cd}^{2+}$ 三种金属离子的过程中, 金属离子发生得失电子, 从而在能谱图表现出不同的能量级

(图 2)。Fe-铁蛋白组富集  $\text{Cd}^{2+}$ 后除在  $\text{Fe}^{3+}$ 检测到 0.8keV 和 6.4keV 两处出峰外, 在 7.1keV 也检测到铁元素。推测铁蛋白在富集  $\text{Fe}^{3+}$ 和  $\text{Cd}^{2+}$ 两种混合金属过程中发生了独特的化学反应, 从而使铁元素出现新的能量态。

## 2.3 肽谱分子量

利用 MALDI TOF/TOF 质谱系统对重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白胰蛋白酶酶解后的肽段进行检测分析发现: 缙蛭重组铁蛋白的肽段在 655Da 处出现高强度单一峰, 在 1.26kDa、1.48kDa、1.81kDa 等处出现较小的峰, 这与 Peptide Cutter 网站预测胰蛋白酶切肽段分子量基本相符。Fe-铁蛋白的肽谱图在 655Da 处也出现高强度峰与空白组一致, 同时在高分子量段 1.32kDa、1.88kDa、1.93kDa 等处出现特征峰, 可能与铁蛋白富集  $\text{Fe}^{3+}$ 后肽段分子量发生变化有关(图 3)。Mn-铁蛋白也在 655Da 处有峰但强度较低, 推测此肽段为铁蛋白一段保守序列, 其肽段的氨基酸序列为 DDVALK, 这可能与富集金属离子的性质无

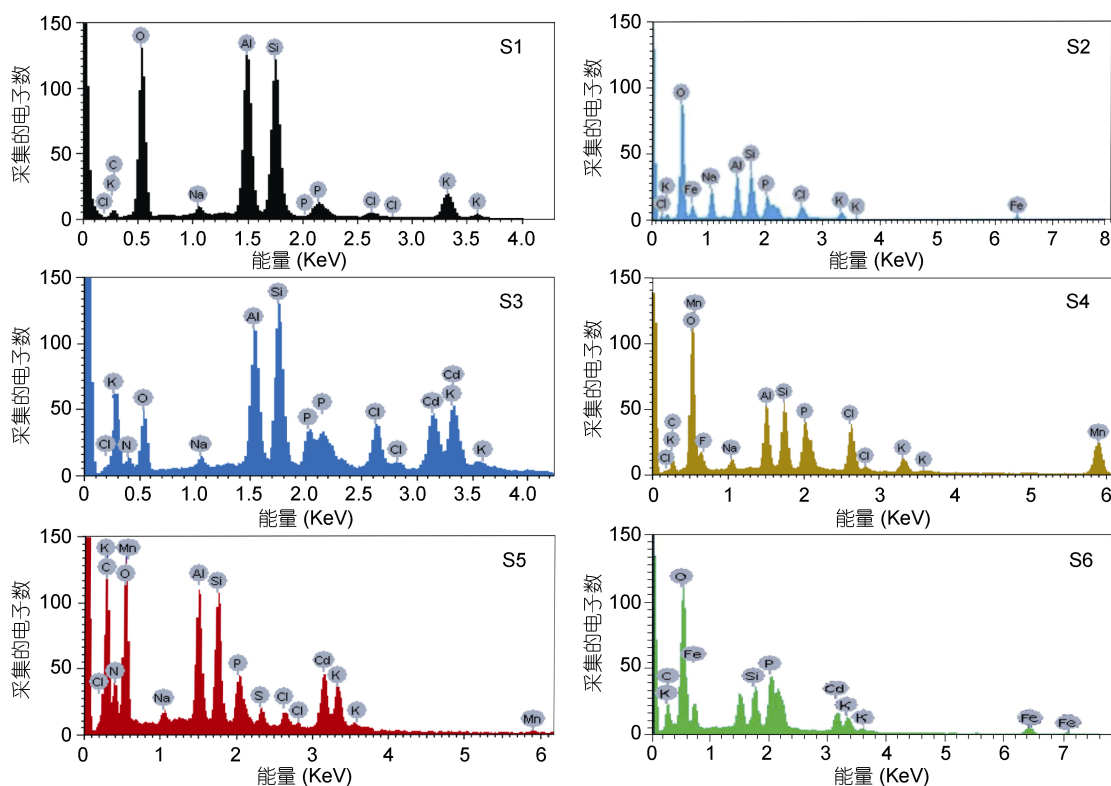


图2 铁蛋白富集不同重金属的能谱图

Fig.2 EDS of ferritins after heavy metals treatments for different groups

注: S1: ScFER 空白组; S2: Fe-ScFER 组; S3: Cd-ScFER 组; S4: Mn-ScFER 组; S5: Mn-ScFER 富集  $\text{Cd}^{2+}$  组; S6: Fe-ScFER 富集  $\text{Cd}^{2+}$  组

关。Mn-铁蛋白在 1.26kDa、1.47kDa、1.53kDa 和 1.76kDa 等处出现特征峰, 且峰强度较高。

由图 3 可知, Fe-铁蛋白的肽谱图与空白组相比, 除了共有的 655Da 处的峰外, 在 1000—2000Da 分子量段出峰明显, 推测为铁蛋白与  $\text{Fe}^{3+}$  结合所致。根据 Fe-铁蛋白的肽段位移推测, 铁蛋白在与  $\text{Fe}^{3+}$  结合过程中, 肽谱图中 1.32kDa、1.88kDa、1.93kDa 等处出现的特征峰为其  $\text{Fe}^{3+}$  结合肽段。同理推测 Mn-铁蛋白肽谱图中的 1.26kDa、1.47kDa、1.53kDa 和 1.76kDa 等高强度峰为其与  $\text{Mn}^{2+}$  结合的特征肽段。对比 Fe-铁蛋白的肽谱图与 Mn-铁蛋白肽谱图可见, 两者在 655Da、713Da、1.26kDa 等处都出现肽段峰, 推测为铁蛋白在富集  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  时均发挥作用的功能肽段。

#### 2.4 蛋白的磁性强度分析

利用综合性物性测量系统对重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白纳米颗粒磁性强度进行检测。图 4 中 S1 为铁蛋白空白组在室温 300K, 外加磁场 3T 下的磁滞回线。如图所示磁滞回线为一条过原点的直线, 呈顺磁特征, 与田兰香等(2010)的研究结果相吻合, 研究发现马脾铁蛋白在室温 300K 时, 蛋白颗粒呈典型的顺

磁特征(Pead *et al*, 1995)。图 4 中 S2 和 S3 为重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白粒的磁滞回线, 磁滞回线形状与铁蛋白空白组基本相同, 但在相同的外加磁场下, 蛋白颗粒所呈现出的磁场强度明显高于空白组。这可能是由于铁蛋白在富集  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  这两种磁性金属时, 形成了某些金属氧化物, 从而增加了蛋白颗粒的磁性强度。

随着  $\text{Fe}^{3+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  富集量的增加, 铁蛋白颗粒磁性强度明显上升, 但当富集量超过  $100 \times 10^{-6}$  左右后, 磁性强度增加的幅度减缓(图 4, S4), 可能是因为缢蛏重组铁蛋白催化氧化铁锰两种磁性金属形成氧化物的能力达到了最大限度, 同时铁核的空间也是受限的, Yamashita 等(2010)就是利用脱铁铁蛋白空腔的空间限制来控制磁性颗粒的大小。

#### 2.5 蛋白富集重金属的能力

重组 Fe-铁蛋白对  $\text{Hg}^{2+}$ 、 $\text{AsO}_4^{3-}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  三种重金属的富集能力是铁蛋白空白组的 2.4 倍、1.7 倍和 3.7 倍(图 5), 这可能是  $\text{Fe}^{3+}$  对铁蛋白富集重金属的过程起到了促进作用, Ebrahimi 等(2013)研究发现铁核内充满  $\text{Fe}^{3+}$  时会加速金属离子的氧化速率。铁蛋白除了

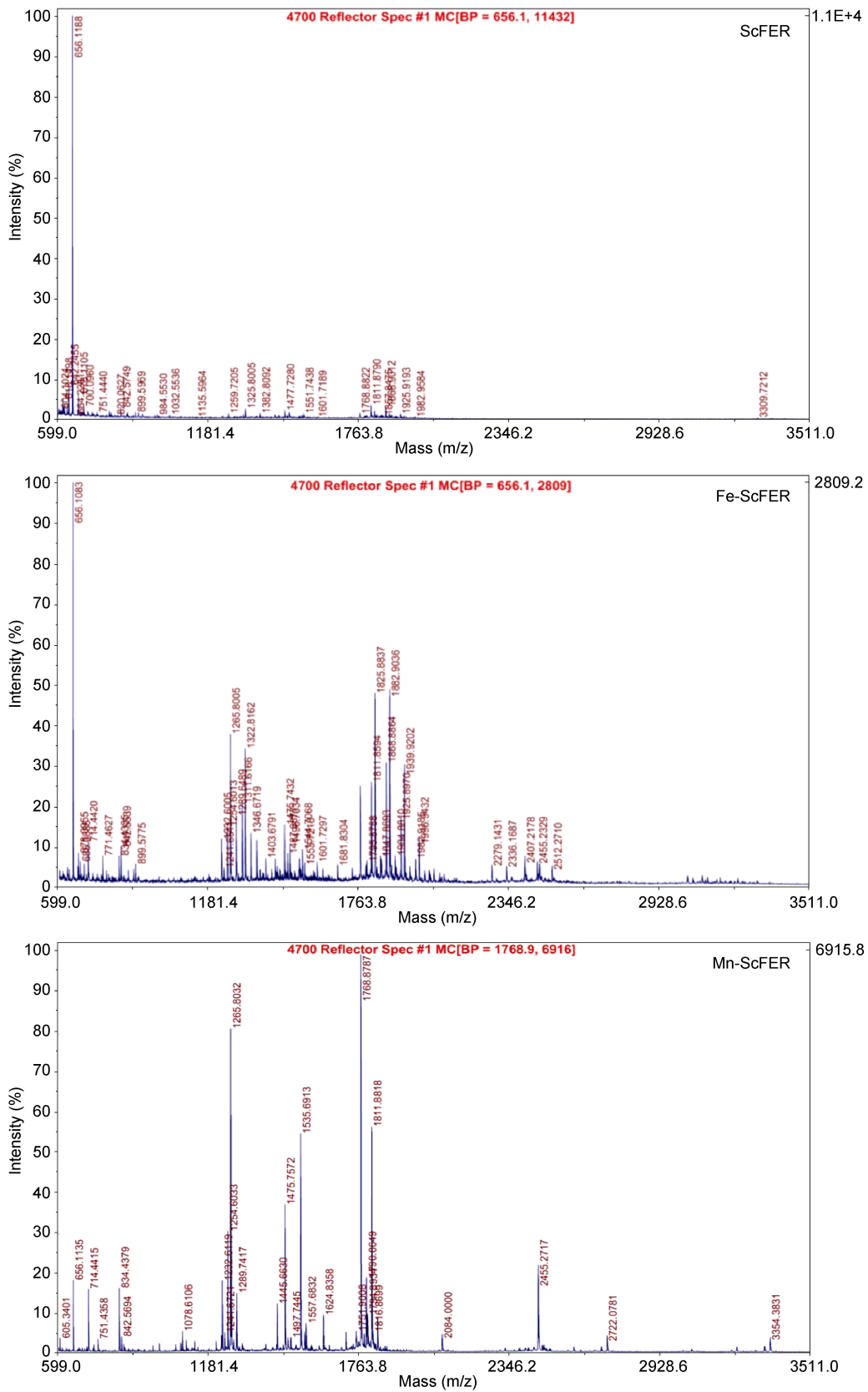


图3 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白的肽谱图  
Fig.3 Peptide mass charts of different ferritin treatment groups

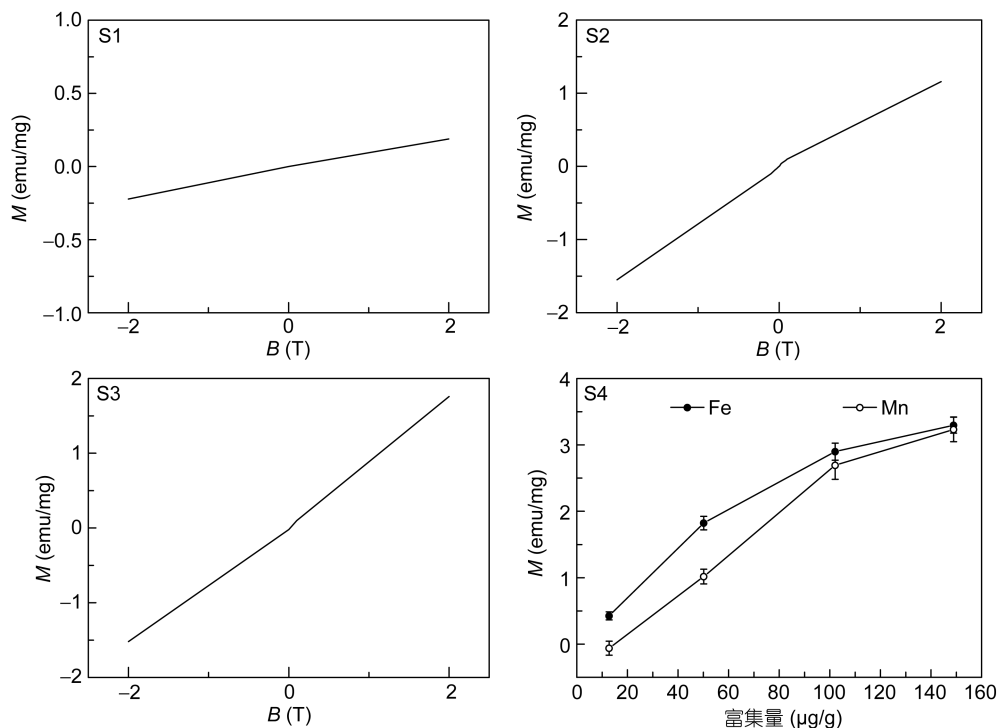


图 4 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白的磁滞回线

Fig.4 Hysteresis loops of different ferritin treatment groups

注: S1: ScFER 空白组; S2: Fe-ScFER 组; S3: Mn-ScFER 组; S4: ScFER 在 3T 下磁性强度随铁锰富集量的变化曲线

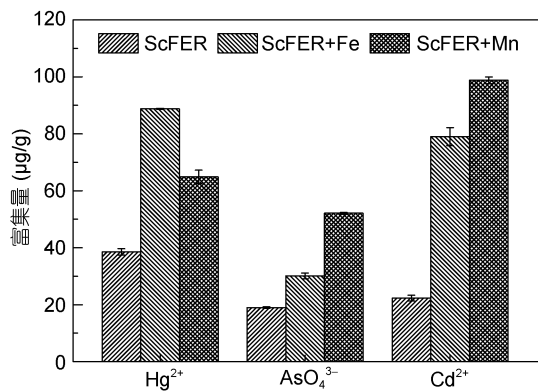


图 5 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白对 Hg<sup>2+</sup>、AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和 Cd<sup>2+</sup>的富集差异

Fig.5 Contents of Hg<sup>2+</sup>, AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, and Cd<sup>2+</sup> in different ferritin treatment groups

能够富集 Fe<sup>3+</sup>以外, 还能富集许多其他重金属离子, 这与铁蛋白表面富集重金属的非特异性基团有关, 特异性基团的种类和数量, 以及基团与不同重金属的结合能力都有可能影响铁蛋白对金属的富集能力差异(Yamashita *et al*, 2010)。由图 5 可以看出, 重组 Mn-铁蛋白对 Hg<sup>2+</sup>、AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和 Cd<sup>2+</sup>三种重金属在相同条件下的富集能力不同, 分别为铁蛋白空白组的 1.8 倍、3.0 倍和 4.6 倍。这可能与铁蛋白在富集 Mn<sup>2+</sup>后

形成的花团状蛋白聚集体有关, 白德奎等(2010)研究了这种花团状锰氧化物对重金属砷的吸附动力学。

### 3 讨论

缢蛏重组铁蛋白与马脾标准铁蛋白相比内部没有铁核, 可以更大程度富集 Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>形成重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白。其蛋白聚集体在表面形貌方面与铁蛋白空白组相比发生了明显变化。铁蛋白与金属离子结合的配体和其他氨基酸侧链间存在着相互作用力, 如疏水键、氢键、静电作用和范德华力等(Li *et al*, 2011), 可能构成蛋白壳的亚基数目, 蛋白壳厚度等的变化。不同金属离子对铁蛋白的折叠具有不同的影响导致其产生不同的表面形貌(Hilton *et al*, 2012)。Fe-铁蛋白变为直径增大的圆球体, Mn-铁蛋白变为花团状球体, 与 Chen 等(2015)的研究结果相符合。重组铁蛋白对于 Fe<sup>3+</sup>的储存包括 Fe<sup>3+</sup>的迁移和铁芯矿物的成核和生长, 而重组铁蛋白与 Mn<sup>2+</sup>的相互作用更为复杂, 比较 Mn-铁蛋白的表面形貌和 XRD 结果发现形成的花团状球体为一种生物锰氧化物, 并且其结构近似于水钠锰矿的结晶(Mayanna *et al*, 2015)。

研究发现重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白具有顺铁磁性和富集重金属的功能, 并且其对于重金属 Hg<sup>2+</sup>、

AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和 Cd<sup>2+</sup>的富集能力明显高于重组铁蛋白。已有研究表明天然形成的铁氧化物和锰氧化物是重金属离子非常有效的清除剂, 锰氧化细菌(MOB)形成的生物锰氧化物可以有效的吸附 Ba<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>等重金属离子(Mayanna *et al.*, 2015), 其吸附方式为表面吸附, 并且锰氧化物表面电荷的多少也会明显影响吸附效果(Feng *et al.*, 2007)。Mn-铁蛋白的花团状多层结构极大的增加了铁蛋白的比表面积, 有效增强了富集重金属离子的功能。Fe-铁蛋白对于重金属离子的富集主要是与铁蛋白内部的空腔有关。有研究表明, 磷酸可以促进 Fe<sup>3+</sup>进入铁核内, 而当铁核内充满 Fe<sup>3+</sup>时会加速金属离子的氧化速率。铁蛋白的3倍通道表现出柔性结构, 可以允许各种金属离子进出(Bou-Abdallah, 2010)。重组铁蛋白的内部空腔结构为重金属离子的富集提供了空间, 无核铁蛋白捕获重金属离子的机制非常复杂, 位点包括蛋白壳的内外表面、三相和二相隧道及铁核表面和深层, 同一结合位点可以结合不同的金属离子, 而同一金属离子也可以结合不同的位点, 但结合能力存在差异(Treffry *et al.*, 1984)。因此, 通过制备无定形铁氧化物也可以实现对重金属砷的吸附(Youngran *et al.*, 2007)。

重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白与铁蛋白相似均呈现顺次特征, 与 Cao 等(2010)制备的重组人铁蛋白超顺磁性纳米颗粒表现出相同的磁性特征。但相同磁场下 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白的磁性强度是空白组 10 倍左右, 并且在 3T 外加磁场下的磁性强度大小与 Fe<sup>3+</sup>和 Mn<sup>2+</sup>富集量有关。磁性纳米颗粒可以作为一种重金属离子吸附剂, Xie 等(2015)的研究发现磁性四氧化三铁复合纳米颗粒微球(CS/XOREC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)可以实现对 Cu<sup>2+</sup>和 Cd<sup>2+</sup>自发的吸附, 且符合 Langmuir 吸附模型, Yue 等(2011)利用磁性铁锰氧化物实现了对 Pb<sup>2+</sup>和 Cu<sup>2+</sup>的自发吸附。

#### 4 结论

本文通过比较 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白与空白组在富集 Hg<sup>2+</sup>、AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>和 Cd<sup>2+</sup>三种重金属离子方面能力的差异, 发现 Fe-铁蛋白对这三种重金属的富集能力分别为空白组的 2.4 倍、1.7 倍和 3.7 倍, Mn-铁蛋白对它们在相同条件下的富集能力也有明显提高。本研究结果表明, 磁性纳米材料在重金属离子的吸附方面有着巨大的优势。重组 Fe-铁蛋白和 Mn-铁蛋白由于其独特的顺铁磁性和良好的重金属富集能力, 将

在重金属污染治理与检测方面发挥效用。

#### 参 考 文 献

- 王群力, 孔 波, 黄河清, 2004. 铁蛋白纳米蛋白壳结构与功能研究新进展. 化学进展, 16(4): 516—519
- 田兰香, 曹长乾, 刘青松等, 2010. 马脾铁蛋白磁性纳米颗粒的低温磁学性质研究. 科学通报, 55(23): 2312—2320
- 白德奎, 朱露萍, 王艳艳等, 2010. 氧化锰、氧化铁、氧化铝对砷( )的吸附行为研究. 岩矿测试, 29(1): 55—60
- 杜莉莉, 李太武, 苏秀榕等, 2008. 可口革囊星虫(*Phascoloma esculenta*)铁结合蛋白基因的研究. 海洋与湖沼, 39(3): 252—256
- 杨 倩, 王 丹, 常丽丽等, 2015. 生物质谱技术研究进展及其在蛋白质组学中的应用. 中国农学通报, 31(1): 239—246
- 贺 静 静, 李 晔, 李太武等, 2009. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)cDNA 文库的构建及铁结合蛋白基因(Ferritin)序列分析. 海洋与湖沼, 40(3): 289—295
- Abbaspour A, Noori A, 2012. Electrochemical detection of individual single nucleotide polymorphisms using monobase-modified apoferritin-encapsulated nanoparticles. Biosensors and Bioelectronics, 37(1): 11—18
- Andrews S C, Harrison P M, Yewdall S J *et al.*, 1992. Structure, function, and evolution of ferritins. Journal of Inorganic Biochemistry, 47(1): 161—174
- Bou-Abdallah F, 2010. The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1800(8): 719—731
- Cao C Q, Tian L X, Liu Q S *et al.*, 2010. Magnetic characterization of noninteracting, randomly oriented, nanometer-scale ferrimagnetic particles. Journal of Geophysical Research: Solid Earth, 115(B7): B07103
- Chen L P, Zhou J, Zhang Y Y *et al.*, 2015. Preparation and representation of recombinant Mn-Ferritin flower-like spherical aggregates from marine invertebrates. PLoS One, 10(4): e0119427
- Crichton R R, Declercq J P, 2010. X-ray structures of ferritins and related proteins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 1800(8): 706—718
- Ebrahimi K H, Hagedoorn P L, Hagen W R, 2013. Phosphate accelerates displacement of Fe(III) by Fe(II) in the ferroxidase center of *Pyrococcus furiosus* ferritin. FEBS Letters, 587(2): 220—225
- Feng X H, Zhai L M, Tan W F *et al.*, 2007. Adsorption and redox reactions of heavy metals on synthesized Mn oxide minerals. Environmental Pollution, 147(2): 366—373
- Guertin R P, Harrison N, Zhou Z X *et al.*, 2007. Very high field magnetization and AC susceptibility of native horse spleen ferritin. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 308(1): 97—100
- Hilton R J, Zhang B, Martineau L N *et al.*, 2012. Anion deposition into ferritin. Journal of Inorganic Biochemistry, 108: 8—14
- Li C H, Li H, Su X R *et al.*, 2011. Identification and characterization of a clam ferritin from *Sinonovacula constricta*. Fish & Shellfish Immunology, 30(4—5): 1147—1151
- Li C H, Li Z, Li Y *et al.*, 2012. A ferritin from *Dendrorhynchus zhejiangensis* with heavy metals detoxification activity. PLoS One, 7(12): e51428
- Martin W R W, Wieler M, Gee M, 2008. Midbrain iron content in

- early Parkinson disease: A potential biomarker of disease status. *Neurology*, 70(16): 1411—1417
- Mayanna S, Peacock C L, Schäffner F *et al*, 2015. Biogenic precipitation of manganese oxides and enrichment of heavy metals at acidic soil pH. *Chemical Geology*, 402: 6—17
- Niu D H, Feng B B, Liu D B *et al*, 2012. Significant genetic differentiation among ten populations of the razor clam *Sinonovacula constricta* along the coast of china revealed by a microsatellite analysis. *Zoological Studies*, 51(3): 406—414
- Pead S, Durrant E, Webb B *et al*, 1995. Metal ion binding to apo, holo, and reconstituted horse spleen ferritin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 59(1): 15—27
- Ren Y M, Li N, Feng J *et al*, 2012. Adsorption of Pb(II) and Cu(II) from aqueous solution on magnetic porous ferrosphenel  $MnFe_2O_4$ . *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1): 415—421
- Tran T N, Niu D H, Nguyen H D *et al*, 2015. Populations genetic structure of the razor clam *Sinonovacula constricta* from China, Korea and Vietnam. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61: 429—436
- Treffry A, Harrison P M, 1984. Spectroscopic studies on the binding of Iron, Terbium, and Zinc by Apoferritin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 21(1): 9—20
- Xie M J, Zeng L X, Zhang Q Y *et al*, 2015. Synthesis and adsorption behavior of magnetic microspheres based on chitosan/organic rectorite for low-concentration heavy metal removal. *Journal of Alloys and Compounds*, 647: 892—905
- Yamashita I, Iwahori K, Kumagai S, 2010. Ferritin in the field of nanodevices. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(8): 846—857
- Youngran J, Maohong F A N, Van Leeuwen J *et al*, 2007. Effect of competing solutes on arsenic (V) adsorption using iron and aluminum oxides. *Journal of Environmental Sciences*, 19(8): 910—919
- Yue Y, Liu P, Zhang Z *et al*, 2011. Approaching the theoretical elastic strain limit in copper nanowires. *Nano Letters*, 11(8): 3151—3155

## RECOMBINANT FE-FERRITIN AND MN-FERRITIN FROM CHINESE RAZOR CLAM *SINONOVACULA CONSTRICTA*

MING Ting-Hong<sup>1</sup>, CHU Shuang-Shuang<sup>1</sup>, SU Chang<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>2</sup>, SI Kai-Xue<sup>1</sup>, ZHANG Di-Jun<sup>1</sup>, WANG Zhao-Yang<sup>1</sup>, ZHOU Jun<sup>1</sup>, LU Chen-Yang<sup>1</sup>, SU Xiu-Rong<sup>1</sup>

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo 315211, China;  
2. Ningbo Vocational and Technical College, Ningbo 315800, China)

**Abstract** The recombinant ferritin in Chinese razor clam *Sinonovacula constricta* were exposed to the same concentration of  $Fe^{3+}$  and  $Mn^{2+}$  to prepare for recombinant Fe-ferritin and Mn-ferritin. Scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS) and MALDI TOF/TOF mass spectrometry were applied to study changes in protein surface morphology, energy of metal elements, and molecular weight of peptides. The magnetic properties changes of protein nanoparticles were measured by physics property measurement system (PPMS) at room temperature (300K) and an external magnetic field (3T). The results indicate that compared with the ScFER, the surface topography of Fe-ferritin and Mn-ferritin changed obviously. Fe-ferritin remained globular, Mn-ferritin aggregates resembled lamellar flower, and Cd-ferritin aggregates were small round ball in shape, while Mn-ferritin that  $Cd^{2+}$ -enriched formed lamella flower-like aggregate. Characteristic energy states of corresponding metal elements were detected from Fe-ferritin and Mn-ferritin. Compared with the ScFER, the peptides of the two recombinant proteins were distinct in addition to the conserved peptides of ferritin, suggesting that ferritin was closely related to the enrichment of  $Fe^{3+}$  and  $Mn^{2+}$ . Fe-ferritin and Mn-ferritin nanoparticles had the same hysteresis loop as the blank group, showing paramagnetic characteristics, and the magnetic intensity increased with the increase of  $Fe^{3+}$  and  $Mn^{2+}$  contents. By comparing the ability of Fe-ferritin and Mn-ferritin in enriching heavy metals  $Hg^{2+}$ ,  $AsO_4^{3-}$  and  $Cd^{2+}$ , we found that the ability of Fe-ferritin enrichment of  $Hg^{2+}$ ,  $AsO_4^{3-}$  and  $Cd^{2+}$  was 2.4, 1.7, and 3.7 times, and that of Mn-ferritin under the same conditions 1.8, 3.0, and 4.6 times higher of that of ScFER, respectively. These results provide a reference for the application of Fe-ferritin and Mn-ferritin in heavy metal pollution control.

**Key words** *Sinonovacula constricta*; recombinant Fe-ferritin; recombinant Mn-ferritin; surface morphology; magnetic properties; enrichment ability