中 国 科 学
1984 年 4 月 B 辑 第 4 期

棕色固氮菌中细菌铁蛋白的初步 X 射线晶体学研究

赵宝光 林政炯 唐有祺
(中国科学院生物物理研究所,北京)
李久蒂 王继文 图 亚
(中国科学院植物研究所,北京)

摘 要

从棕色固氮菌中分离出的细菌铁蛋白-细胞色素 b_{557},是一种较特殊的蛋白质,除与其他类型铁蛋白类似,含有一个铁核外,还含有血红素辅基. 文中还用亲合层析方法纯化细菌铁蛋白,在含有 $MgCl_2$ 的溶液中可获得砖红色立方晶体. 用微量透析方法,晶体最大的尺寸可达 0.4 × 0.4 × 0.1 mm^3. 晶体表现为光学的各向同性. 进行初步的 X 射线晶体学研究,拍摄未加层线屏的小角徘循照片,可初步确定其空间群为立方晶系的 *I*432, 晶胞参数为 230 Å. 文中还讨论了细菌铁蛋白立方晶胞中可能含有 8 个分子;并推导出其分子量为 8.26×10^5, 分子的直径为 115 Å, 分子具有 32 对称性.

铁蛋白 (Ferritin) 广泛存在于真核生物之中,自从 1937 年 Laufberger 从马脾脏中首先发现和分离出了铁蛋白[1],生物、医学和化学家们就以极大的兴趣开始了对铁蛋白的结构和功能的研究. 铁蛋白分子的结构特点是在蛋白质外壳的包围之中, 有一个电子密度很大的无机铁核,铁核中铁原子以 $(FeOOH)_8$ $(FeO{:}OPO_3H_2)$ 的形式聚集,铁原子的数量可达 4500 个以上. 而脱铁铁蛋白 (apoferritin) 是由许多相同的亚单位组成. 铁蛋白的生物功能是以可溶解的形式将铁贮存起来,以供给生物体的新陈代谢[2].

首先对马脾铁蛋白进行 X 射线晶体学研究的是 Fankuchen (1943), 当时只能得到供粉末衍射用的小晶体[3]. 随后 Harrison 开始进行 X 射线单晶结构的研究[4]. 目前对马脾脱铁铁蛋白的研究分辨率达到 2.8 Å[5].

1973 年 Bulen 从棕色固氮菌 (Azotobacter Vinelandii) 中分离得到了一种含细胞色素 *b* 及大量非血红素铁的蛋白质[6]. 1979 年 Stiefel 进一步研究指出, 此蛋白质是一种铁蛋白称为 Bacterioferritin-cytochrome, 并认为这是第一个从原核生物中分离得到的铁蛋白[7]. 与此同时, 李久蒂等在分离纯化棕色固氮菌固氮酶钼铁蛋白的过程中, 进行电泳时于聚丙烯酰胺凝胶柱

本文 1982 年 9 月 8 日收到, 1982 年 12 月 17 日收修改稿.

上发现了一个比钼铁蛋白迁移率更小的砖红色带，在50% 饱合硫酸铵条件下，其结晶为六角形片晶．经过研究，证明此蛋白属于铁蛋白类，但与真核生物铁蛋白显著不同的是：其蛋白部分同时又含有血红素辅基，属于细胞色素 *b* 类[8]．从其来源和性质分析，此蛋白质与 Bulen 分离出的蛋白质是相同的．

对上述的细菌铁蛋白-细胞色素 *b* 进行X射线晶体学的研究无疑是很有意义的，因为它不仅是一个不同种属的铁蛋白，而且它属于血红素蛋白类．在一个分子中同时存在两种类型的铁，这种情况是不寻常的，在高等生物的铁蛋白中是没有的．研究它的结构，能够帮助阐明血红素辅基、铁核和蛋白质部分之间的结构关系，为进一步研究细菌类铁蛋白的结构与功能的关系开辟道路．

1981 年 Joseph Yariv 等从大肠杆菌中也分离出了细菌铁蛋白，并进行了X射线晶体学的初步研究[9]．

一、材料和方法

棕色固氮菌用改良的 Burks 无 N_2 培养基进行发酵，发酵液 pH7.0—7.2，每升中含有 0.2 g KH_2PO_4，0.8 g K_2HPO_4，0.2 g $MgSO_4$，0.09 g $CaCl_2\cdot 2H_2O$，4.98 mg $FeSO_4$，0.252 mg $Na_2MoO_4\cdot 2H_2O$ 和 20 g蔗糖．发酵过程为：由斜面到摇瓶，由摇瓶接种子罐，接种量约为 2.5%，最后由种子罐菌液接入大罐发酵．每一步周期为 16 小时．发酵期间控制温度在 30℃ 左右，压力 0.5 公斤，并要搅拌和通空气．发酵完成后出罐，离心，收集菌糊，低温冷冻保存备用．

用免疫亲合层析方法分离纯化细菌铁蛋白．具体的方法是：在棕色固氮菌菌糊中加入等体积的 0.01*M* NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 缓冲液(pH7.0)．超声破碎 2 × 15 分钟，间歇 15 分钟．水浴加热至 55—60℃，10 分钟，然后立即冷却．2.4 × 10^4g 离心 30 分钟，将离心上清液用 0.5*N* NaOH 调至 pH7，上亲合层析柱，流速为 25ml/h．样品上柱后，用同样的缓冲液淋洗柱子，直至流出液的 A_{280} 接近于零．用 7*M* 脲缓慢流经柱子，流出液为红色的蛋白质溶液，蛋白峰较集中．洗脱液马上经 Sephadex G-25 脱盐柱脱盐．将脱盐后的稀蛋白溶液超滤浓缩，至蛋白浓度约为 1—2mg/ml．再将浓缩后的蛋白溶液离心 2.0 × 10^4g，30 分钟．在离心后的上清液中，边搅拌边加入 0.5*M* $MgCl_2$，至其浓度为 20—30m*M*．在冰箱中放置，两天后，即出现棕红色的铁蛋白微晶．溶液的颜色变浅，成为浅黄色．

用亲合层析方法，一公斤固氮菌可得大约 100mg 蛋白质样品．蛋白质的纯度用聚丙烯酰胺盘状电泳鉴定，在电泳中只出现单一的橙色条带，结果如图 1(a)．

二、单晶培养和晶体学参数测定

蛋白质单晶的培养是采用微量透析的方法，具体步骤是：将制备过程得到的微晶用 0.05*M* Tris-醋酸缓冲液溶解，3000 转/分离心 10 分钟，离心上清液做为微量透析的内液，用注射器将其吸入下部包有半透膜的微量透析管内（蛋白浓度约为 10mg/ml）．透析管的外液为含 10m*M* $MgCl_2$ 和 10m*M* NaCl 的 0.05*M* Tris-醋酸缓冲液，pH 为 7.0．将装有内液的透析管放入外液中，一天后开始改变外液 $MgCl_2$ 的浓度，使其最终浓度为 25m*M*．冰箱中静置一至二周，晶体生长即可完成．用此方法，晶体最大的尺寸可达 0.4 × 0.4 × 0.1 mm^3．晶体颜色为

棕红色，外形如图 1b. 在偏振光下观察，晶体是各向同性的.

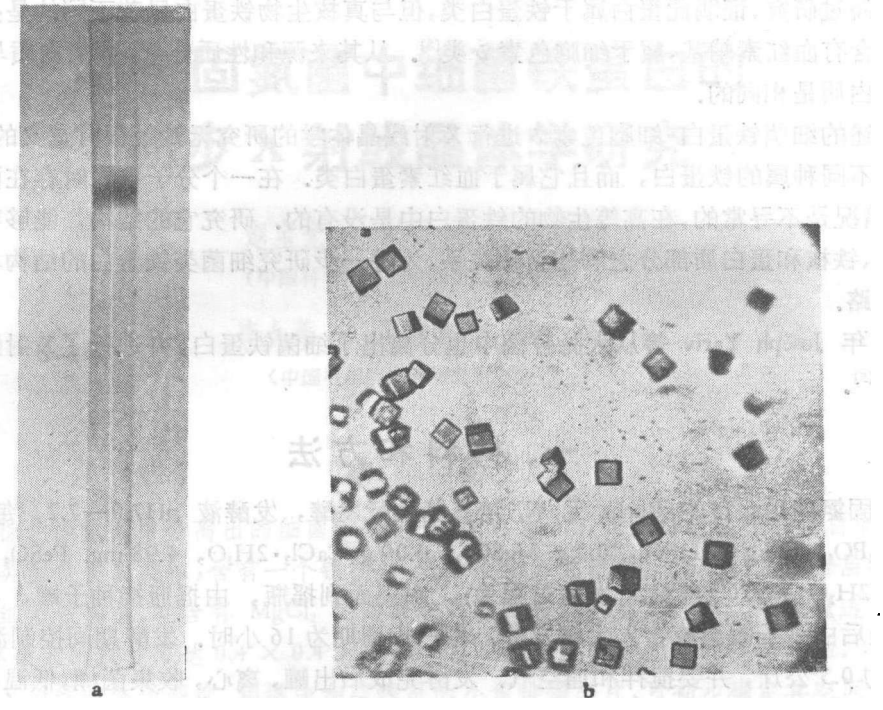

图 1 a. 亲合层析分离所得细菌铁蛋白的聚丙烯酰胺盘状电泳. b. 细菌铁蛋白的单晶体

将蛋白质单晶体封在X射线薄壁毛细管中，在旋转阳极 X 光机上用 CuK_α 辐射（聚焦 0.5 × 0.5mm，操作电流 150mA、电压 40KV)，使用徘循相机拍摄小角徘循衍射照片，晶体给出的最高衍射分辨率可达 3.5 Å. 1.5° 徘循角未加层线屏的徘循照片可以发现主要的晶体学轴. 从衍射照片可以推断，晶体沿[100]方向具有 4 次轴，沿[110]方向具有 2 次轴，沿[111]方向具有 3 次轴. 衍射点可以进行指标化，从这些对称性和衍射照片的系统消光，可以判断此晶体的空间群是 $I432$，晶胞参数 $a = 230$ Å，初步的晶体学参数列于表 1.

表 1 细菌铁蛋白的晶体学参数

点群	432
衍射群	$m3m$
可观察到的反射	$h\ k\ l$: $h+k+l=2n$, $h\ 0\ 0$: $h=2n$
空间群	$I432$
晶胞参数	$a = 229.7(6.8)$ Å
不对称单位数/晶胞	48
晶体的密度	$D = 1.48(0.05)$ g/cm³
水含量	57%(v/v)

（括号内为标准偏差）

晶体密度用比重柱法测定. 用氯代苯和碘甲烷配成梯度柱，密度值是由五颗晶体的密度平均求得的. 使用的晶体大小约为 0.2—0.3mm 长(最长方向).

晶体水含量的测定是用热失重方法. 将晶体加热至 100—110℃，10 小时，测量其失去的

水重．结果是：水含量约为 39%，相当于溶剂占晶胞体积的 57%．

三、讨　论

用梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳测定细菌铁蛋白分子量的结果表明：细菌脱铁铁蛋白与马脾铁蛋白蛋白质部分的分子量非常接近，大约为 4.2×10^5（马脾脱铁铁蛋白分子量为 4.4×10^5）．电泳结果见图 2．

马脾铁蛋白的X射线晶体结构已经确定，晶体属立方晶系，空间群为 $F432$，晶胞参数为：$a=184$ Å，晶胞中含有 4 个分子[10]，由此推得，每个分子在晶胞中平均占有的体积为 1.55×10^6 Å^3．由于细菌铁蛋白与马脾铁蛋白的分子量较接近，晶体的溶剂含量与马脾铁蛋白也相似[4]，那么可以想象，它们的分子所占有的体积也应相似．细菌铁蛋白的晶胞参数 $a=230$ Å，根据上述的计算，如果在每个晶胞中含有 8 个细菌铁蛋白的分子，那么，每个分子占有的体积为 1.52×10^6 Å^3．

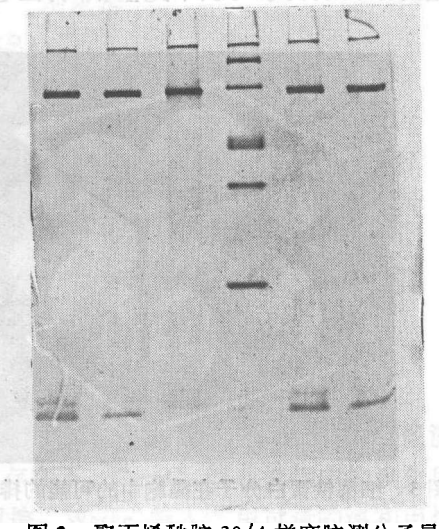

图 2　聚丙烯酰胺 30/4 梯度胶测分子量（中间为标准蛋白质分子量，从上往下它们的分子量为：6.6×10^5，4.4×10^5（马脾铁蛋白），2.3×10^5，1.4×10^5，和 6.8×10^4．其余各条带都是细菌铁蛋白，计算其分子量约为 4.2×10^5）

生化测定，每个细菌铁蛋白分子含有 24 个亚基，12 个血红素．8 个分子要分布在空间群为 $I432$ 的晶胞中，则分子可能有两种分布．第一种是 8 个相同的分子坐落在 3 重轴和 2 重轴的交点上，第二种是分子分别坐落在 a，b[1] 两套位置，坐落在 a 位置上的 2 个分子具有 432 对称性，坐落在 b 位置上的 6 个分子具有 42 对称性．采取后一种排列，则此蛋白质具有两种不同的分子，这似乎是不可能的．因此分子最可能坐落在第一种分布上．

那么，每个晶胞是否可能含有 6 个分子呢？如果每个晶胞含 6 个分子，分子的对称性则为 42，分子之间最短的距离与含 8 个分子时相同，但晶胞中堆积不均匀．另外，分子含有 8 个相同的部分，则 12 个血红素势必分成两组，8 个血红素占有一般位置，另外 4 个血红素必须坐落在 2 重轴上．血红素集团本身不具有 2 次对称性，因而这样的分布是不大可能的．综上所述，开始分析的 8 个相同分子在晶胞中的排列是较为合理的．分子在晶胞中的位置为：

$$\frac{1}{4},\frac{1}{4},\frac{1}{4};\ \frac{1}{4},\frac{3}{4},\frac{3}{4};\ \frac{3}{4},\frac{3}{4},\frac{1}{4};\ \frac{3}{4},\frac{1}{4},\frac{3}{4};$$

$$\frac{3}{4},\frac{3}{4},\frac{3}{4};\ \frac{3}{4},\frac{1}{4},\frac{1}{4};\ \frac{1}{4},\frac{3}{4},\frac{1}{4};\ \frac{1}{4},\frac{1}{4},\frac{3}{4}$$

（如图 3）．

根据晶胞参数和分子在上述 8 个位置的分布，可以计算出分子的直径为 115 Å，这个结果与电镜观察的结果相吻合．电镜的结果表明：这种细菌铁蛋白与其他种属的铁蛋白类似，由

1）此外 a，b 为 Wyckoff 标记．

铁核和围绕铁核的多亚基的外壳蛋白组成，大概是一个球形分子，分子直径约为 120 Å[8].

通过晶体的密度和水的含量，可以算出细菌铁蛋白的分子量为 8.26×10^5（此值可能偏高，因为溶剂中镁离子的重量也计算在其中了）. 根据空间群、晶胞参数和分子量，可以计算出每单位蛋白分子量所占的晶体体积 $V_M = 1.84 Å^3/\text{dalton}$，这个数值与其他球蛋白晶体一样，落在合理的统计范围内[11].

由于分子具有 32 对称性，因此 24 个亚基应分成六个相同的部分，这六个部分在分子中的堆积方式可以用图 4 表示. 每一个部分包含 4 个亚基，从晶体对称性的角度来考察，这 4 个亚基的结构或构象可以不完全相同，但它可能存在着非晶体学对称性.

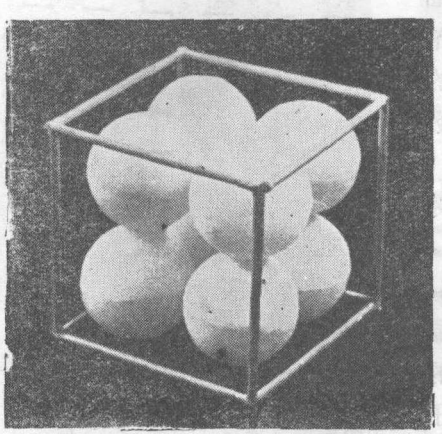

图 3 细菌铁蛋白分子在晶胞中的可能的排列方式

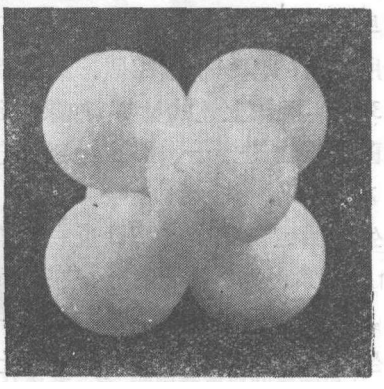

图 4 分子对称性的示意模型

生化研究的结果也发现：细菌铁蛋白分子 24 个亚基中，只含有 12 个血红素基团. 亚基分子量测定的结果也证明：24 个亚基的分子量不是全部相同的，它们分为两种. 因此，细菌铁蛋白的分子不具有马脾铁蛋白分子那样高的对称性，是可以理解的.

以上结果和讨论，只是进行了初步的结构分析. 今后，随着较高分辨率工作的开展，一定会对其结构有更深入的了解.

固氮菌的发酵是在中国农业科学院原子能研究所进行的. 承蒙董贻诚、严有为同志在实验中给予帮助，并多次与作者进行有益的讨论；梁栋材同志在实验中给予热情指导；David Stuart 博士曾给予很好的建议，特此一并致谢.

参 考 文 献

[1] Laufberger, V., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **19**(1937), 1575—1582.
[2] Crichton, R. R., *Angew. Chem. Internal. Edit.*, **12**(1973), 57—65.
[3] Fankuchen, I., *J. Biol. Chem.*, **150**(1943), 57.
[4] Harrison, P. M., *J. Mol. Biol.*, **1**(1959), 69—80.
[5] Banyard, S. H., et al., *Nature*, **271**(1978), 282—284.
[6] Bulen, W. A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**(1973), 1274—1281.
[7] Stiefel, E. I. & Watt, G. D., *Nature* (London), **279**(1979), 81—83.
[8] 李久蒂等，中国科学，1979，10:1022—1027.
[9] Joseph Yariv, et al., *Biochem. J.*, **197**(1981), 171—175.
[10] Hoare, R. J., et al., *Nature*, **255**(1975), 653—654.
[11] Matthews, B. W., *J. Mol. Biol.*, **33**(1968), 491—497.