

研究报告

MALD FTOF 质谱、电泳和透射电子显微镜技术研究 鲑鱼肝铁蛋白 H 和 L 亚基特性

黄河清^{*1,2,3} 胡晓慧¹ 方雪萍¹ 曹廷明¹ 孔波¹

(厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术学系¹;

海洋与环境科学学院近海海洋科学国家重点实验室²; 化学化工学院化学生物学系³, 厦门 361005)

摘要 小批量制备质谱纯鲑鱼肝铁蛋白 (liver ferritin of *Dasyatis akajei*, DALF), 以透射电子显微镜术 (TEM) 测定 DALF、蛋白壳和铁核的分子尺寸。SDS-PAGE 技术指出, DALF 由 H 和 L 两种不同类型的亚基组成。采用肽质量指纹图谱 (PMF) 技术进一步佐证 H 和 L 亚基类型和同源性。氧化还原剂中性红、劳氏紫、甲基紫精和 pH 1.5 酸度均无法削弱 DALF 的 H-L 和 L-L 亚基之间的相互作用强度, 并解吸出 L 亚基离子, 供 MALD FTOF 质谱仪分析。通过增加激光强度和降低基质 pH 途径, 可直接分析 DALF 的 H 和 L 亚基的分子量, 指出 DALF 中 H-L 和 L-L 亚基之间的相互作用强度明显高于 H-H 亚基类型。

关键词 铁蛋白, 亚基类型, 电泳, 质谱, 电泳

1 引言

铁蛋白 (ferritin) 是一种能储存铁的蛋白质^[1], 它的分子结构由蛋白壳 (直径为 11 ~ 14 nm)、铁核 (5 ~ 6 nm) 和物质交换隧道组成^[2]。哺乳动物铁蛋白蛋白壳由 H 和 L 类型亚基组成^[3], 而细菌铁蛋白 (bacterial ferritin) 和鲨鱼肝铁蛋白 (liver ferritin of shark, SLF) 均由单类型亚基组成^[4], 其中 H 亚基主要负责铁的矿化和铁核晶体形成, L 亚基起着提供酸性残基, 以促进或加速铁成核的作用^[5]。有关铁蛋白亚基之间的相互作用强度^[6]、亚基表面电荷数目及分布规律^[7]、亚基的解离和重组途径等问题尚无定论^[8,9]。来源于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪 (MALD FTOF) 的激光和基质能协同解吸 SLF 亚基为准亚基离子, 并供质谱分析^[9]。采用类似的分析技术, 已获得马脾铁蛋白 (horse spleen ferritin, HSF) 中的 H 亚基质谱峰^[10]。铁蛋白可直接从铂金电极上获取还原电子, 并供自身铁核铁还原与释放^[11]。这些异常现象与铁蛋白亚基的典型四螺旋束结构有关。利用铁蛋白亚基解离与重组特点, 可构建药物纳米多肽核-铁蛋白, 例如胰岛素纳米多肽核-铁蛋白^[12]。

本实验采用 MALD FTOF 质谱、电泳和透射电子显微镜技术研究鲑鱼肝铁蛋白分子结构、亚基类型、亚基解离和重组途径, 所建立的分析技术可为后续拓展铁蛋白结构与功能研究奠定基础, 并为分析高分子量且由多亚基组成的蛋白质结构信息提供分析技术。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

REFLEX 型 MALD FTOF 质谱仪 (德国 Bruker 公司); 蛋白质分离纯化系统 (美国 Bio-Rad 公司); GENESYSZ 型紫外-可见分光光度计 (美国热电公司); JERM-2010 透射电镜 (日本电子株式会社)。

分离介质 DEAE 纤维素-52 (华美公司); 载体两性电解质 (Amersham) pH 5 ~ 8; 胰蛋白酶 (Promega 公司); 氰-4-羟肉桂酸 (HCCA, 美国 ICN 生物医学公司); 碘乙酰胺 (Sigma 公司); 丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺等化学试剂均购自上海生工。

2008-08-18 收稿; 2008-11-19 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30870515) 资助项目

* E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

2.2 铁蛋白制备和亚基分离与分析

在厦门近海区域捕获鲢鱼 (*Dasyatis akajei*), 获取新鲜鲢鱼肝, 供实验所需。参考文献 [1, 9] 的方法, 小批量制备质谱纯 DALF。SDS-PAGE 采用 Tris 甘氨酸不连续电泳体系, 浓缩胶浓度 5% (pH 6.8), 分离胶浓度 15% (pH 8.9); 在浓缩胶电压 70 V 和分离胶电压 200 V, 4 条件下, 进行蛋白质电泳分离。采用考马斯亮蓝法进行染色和脱色。

2.3 铁蛋白电镜观察与分析

取 DALF 样品 (6~8 g/L) 直接吸附在铜网上 (20 min), 随后用 2% 磷钨酸染色 10 min, 避光干燥 120 min。在 200 kV、5~10 万放大倍数下观测铁蛋白蛋白壳和铁核的分子结构。用游标卡尺测量电镜图中球状的铁蛋白蛋白壳和铁核的最长和最短直径 (精确到小数点后面 2 位), 以求得的平均值为该铁蛋白的尺寸。测量并统计 100 个蛋白分子的蛋白壳和铁核直径, 应用 SPSS 软件进行数据统计和方差分析。

2.4 铁蛋白质谱分析与亚基鉴定

样品和饱和基质溶液按 1:1.3~1:1.5 体积比混合后, 取 0.8 μ L 混合物直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上; 在室温下自然干燥后, 将样品靶直接放入质谱仪的靶箱内, 设置激光强度为 50~40, 分子量范围 80 kDa, 进行样品分析。采用 DE (delayed extraction) 线性模式进行测量。铁蛋白亚基的肽质量指纹图谱分析参考文献 [13] 的方法, 利用网上数据库 (SWISS-PROT and TrEMBL) 鉴定 DALF 的 H 和 L 亚基类型^[14]。

参考文献 [12] 的质谱分析参数, 测量 DALF 的 H 和 L 亚基分子量。

2.5 质谱分析铁蛋白亚基 (SDS-PAGE 分离法)

参考文献 [1] 描述的 SDS-PAGE 方法分离 DALF 的 H 和 L 亚基。SDS-PAGE 分离胶采用铜染进行蛋白质染色法。具体实验步骤为: (1) 铁蛋白上样量为 2.5~10 μ g, 采用 SDS-PAGE 法进行亚基分离, 并用铜染色剂进行染色, 随后分离 H 和 L 亚基蛋白凝胶条带, 并置于 1.5 mL 无色离心管中, 用 300 μ L 色谱纯水溶液清洗, 10 μ L 10% 醋酸振荡 10 min; (2) 移弃清洗溶液, 用 100 μ L ACN 洗 20 min; (3) 用 100 μ L 甲醇洗 20 min, 100 μ L FW I (1:3:2) 振荡水洗 30 min, 样品浸泡 3 h 直到蛋白胶成透明无色; (4) 样品胶稍微干燥后, 放入 0.5 mL 无色离心管中, 捣碎成碎片且加入饱和芥子酸 [SA (0.1% TFA/ACN = 1:1)] 溶液或饱和 HCCA 溶液, 振荡 30 min 且浸泡 4 h; (5) 离心样品, 取上清液样品, 用于 MALDI-TOF 质谱分析。

2.6 有机染料直接氧化还原铁蛋白

选择氧化剂中性红、劳氏紫和还原剂甲基紫精直接氧化还原 DALF, 实验步骤参考文献 [15]。快速去除游离的氧化还原剂, 其方法参考文献 [1]。

参考文献 [12] 设定的质谱分析参数, 测量 DALF 的 H 和 L 亚基分子量。

3 结果与讨论

3.1 透射电子显微镜观测铁蛋白与铁核分子结构特征

图 1A 是 DALF 样品的透射电子显微镜 (TEM) 图谱。从图 1A 可看出, DALF 的分子结构由铁核和蛋白壳组成, 其中铁核位于蛋白壳的中心区域。图 1B 是 DALF 经弱酸介质 (pH 1.0) 处理后的 TEM 图谱。弱酸介质高效地解离了 DALF 蛋白壳, 且剥离了铁核, 显示了脱蛋白壳的铁核分子型貌。采取类似方法处理 HSF。利用 TEM 技术观测 HSF 和 DALF 的蛋白壳和铁核结构的分子尺寸 (见表 1)。从表 1 中可看出, DALF 分子尺寸略大于 HSF。同样, DALF 的蛋白壳和铁核直径也略大于

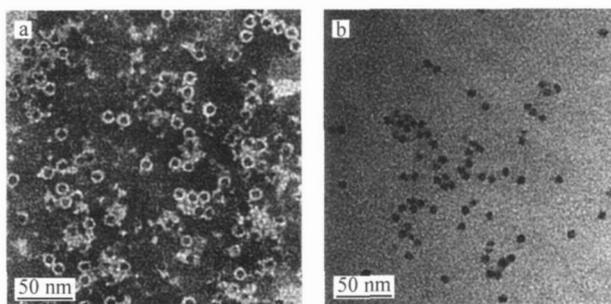


图 1 DALF (A) 和脱蛋白壳铁核 (B) 的透射电镜图

Fig 1 TEM maps of liver ferritin of *Dasyatis akajei* (DALF) (A) and its iron core (B) in absence of protein shell

HSF, 尤其铁核直径。相反, 一旦 HSF 和 DALF 的蛋白壳内酸解后, 其裸露的 DALF 的铁核直径却稍小于 HSF, 这说明了 DALF 和 HSF 蛋白壳紧密度略有不同。铁核与铁蛋白蛋白壳大小和亚基堆积的紧密度有关。此外, DALF 和 HSF 可能分别由不同比例的 H 和 L 亚基组成, 并引起了亚基之间的相互作用强度差异性, 形成不同紧密度的蛋白壳。因此, 研究 DALF 和 HSF 的电泳迁移率、亚基类型和亚基堆积的紧密度极为重要。

表 1 透射电子显微镜术测定铁蛋白的蛋白壳和铁核直径

Table 1 Diameters both protein shell and iron core determined with transmission electron microscopy in ferritin

样品 Sample	蛋白质壳直径 Protein shell in diameter (nm)	铁核直径 Iron core in diameter (nm)	铁核直径(酸处理) Iron core in diameter with acid treatment (nm)
Horse spleer ferritin, HSF	12.15 ± 0.08	6.00 ± 0.13	7.65 ± 0.14
DALF	12.40 ± 0.08	6.45 ± 0.08	7.49 ± 0.10

3.2 DALF 电泳迁移率和亚基类型

图 2 是 HSF 和 DALF 的 PAGE 图谱。从图 2 可看出, DALF 和 HSF 均呈现出单条蛋白带, 其中 DALF 电泳迁移率略高于 HSF, 这意味着电泳纯的 DALF 蛋白质分子量可能略小于 HSF, 但表 1 中却显示了 DALF 蛋白壳分子直径略大于 HSF。这一实验结果与采用 TEM 和 PAGE 技术评估铁蛋白分子量大小有所不同。毛细管电泳技术揭示 HSF 的 L/H 亚基比值约为 8/8^[16]。SDS-CGE (SDS-capillary gel electrophoresis) 技术研究发现, HSF 的 L/H 比值约为 8/7, 含有相对较高丰度的 L 亚基^[17], 推测 H/L 亚基比值高低直接影响到亚基之间的堆积与折叠紧密度, 从而引起铁蛋白蛋白壳外表层上的电荷数量和电荷分布趋势不同, 并影响到电泳迁移率^[18]。显然, 不能仅以铁蛋白在 PAGE 分离胶上的迁移率高低为评估该蛋白分子量大小的依据。

图 3 是 DALF 亚基的 SDS-PAGE 图谱。与已报道^[16,17]的 HSF 亚基类型类似, DALF 也由 H 和 L 两种不同类型亚基组成。比较图中 H 和 L 亚基显示的蛋白质色度和蛋白带宽度, 可估计 DALF 的 L/H 亚基比例略大于 1, 这一结果不同于 HSF^[16,17]。建立 H 亚基分子量比 L 亚基分子量略高 2 kDa 及铁蛋白蛋白壳均有 24 个亚基高对称性组成的实验论点基础上, 可推测 DALF 分子量应高于 HSF, 其蛋白壳直径也应略大于 HSF (表 1), 认为采用 TEM 技术测定铁蛋白分子量的方法可能比采用 PAGE 方法更科学, 不受铁蛋白蛋白壳外表层电荷分布不一致的影响。DALF 和 HSF 蛋白壳外表层的电荷分布不一致和亚基折叠紧密差异性均会影响了电泳迁移率, 并产生异常电泳迁移现象。

从图 3 中还可看出, DALF 亚基在解离过程中, 易形成 2H 和 2L 亚基二聚体, 但 2H 亚基二聚体含量明显高于 2L 二聚体含量。经统计分析, 可获悉图 3 中 DALF 的 H 和 2H 加和的蛋白量相当于 L 和 2L 加和的蛋白量, 认为 DALF 的 H/L 的亚基比例为 1, 即 DALF 由 12H 和 12L 亚基组成, 这一比值不同于 HSF 的 H/L 亚基组成比值^[8,17]。

3.3 氧化还原 DALF 的质谱特性

近期的研究表明, SLF 由单类型亚基组成, MALD-IMS 技术可直接测定 SLF 亚基的分子量, 其 m/z 为 21066.25 Da^[19], 推测 SLF 分子量约为 506 kDa。为了削弱 DALF 中 H 和 L 亚基之间相互作用的强度, 并解离成游离的 H 和 L 亚基, 供 MALD-TOF 质谱仪进行分析, 采用了氧化剂中性红、劳氏紫和还原剂甲基紫精氧化还原 DALF, 并测定其对应的质谱峰, 获得图 4 结果。图 4 显示的质谱图均与 SLF 很相似^[19], 与氧化还原剂种类无关。图 4 中所显示的 DALF 质谱峰均为带双电荷的 H 亚基 [M^{2+}], 带单电荷的 H 亚基 [M^+] 和带单电荷二 H 亚基聚合体

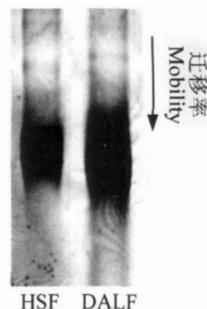


图 2 HSF 和 DALF 电泳迁移率
Fig 2 Electrophoretic mobility of both horse spleen ferritin (HSF) and DALF

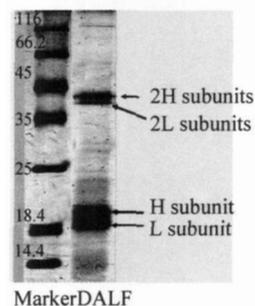


图 3 SDS-PAGE 技术分析 DALF 亚基类型
Fig 3 Subunit types of DALF determined with SDS-PAGE approaches

[2M⁺] 的质谱峰,并未显示出 L 亚基及 L 聚合体的质谱峰。从图 3 可知, DALF 亚基之间相互作用存在着 H-H、L-H 和 L-L 的可能性,但 H-H 之间相互作用强度弱于 L-H 和 L-L,使激光强度可直接解离 DALF 中 H-H 类型的亚基,并形成 H 亚基离子,供质量分析器检测;但无法解吸 L-L 和 L-H 亚基类型为单亚基离子,所以无法获得相对应的 L 亚基及 L 亚基聚合体的质谱信息(图 3)。

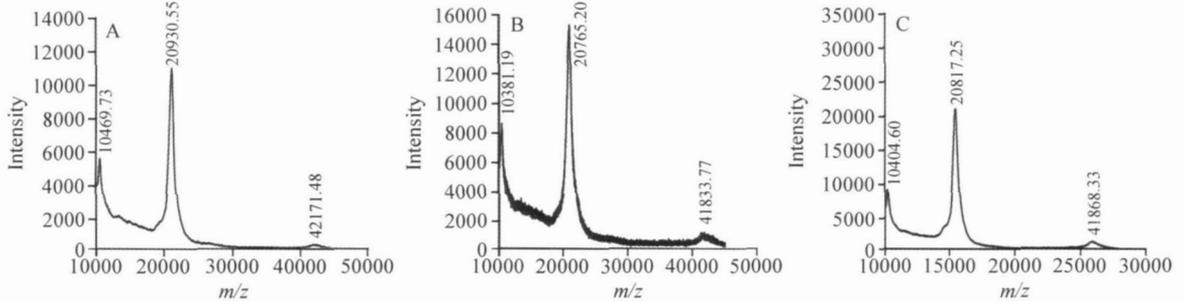


图 4 在不同氧化还原剂作用下, DALF 的 H 亚基质谱图

Fig 4 Mass spectra of H subunit in DALF under the condition of different redox reagents

A. 中性红 (neural red); B. 劳氏紫 (thionine); C. 甲基紫精 (methyl viologen)。

在弱酸环境条件下, SLF 可直接解离成亚基,并在重组成脱铁核铁蛋白 (apoSZLF) 同时,包裹胰岛素 (insulin, NS) 于蛋白壳内,构建纳米 NS 核-SZLF^[12]。采取类似的弱酸 (pH 1.5) 处理条件,解离 DALF 为亚基及亚基聚合物。实验发现,只能获得单一的 DALF 质谱峰(图 5),其中质荷比为 11873.45 和 20703.01,推测为 H 亚基产生的对应质谱峰,其亚基 (M) 分子结构可能是 [M²⁺] 和 [M⁺] 类型。这一现象说明了即使在弱酸环境下, DALF 中的 H-L 和 L-L 亚基的相互作用强度仍然很强,不易解离 L 亚基。

3.4 肽质量指纹图谱鉴定 DALF 亚基类型

由于铁蛋白蛋白壳外层含有大量的羰基、羟基和变化的 H/L 亚基比值^[18,20,21],使铁蛋白易与其它蛋白质形成复合物。为了进一步证实图 3 显示的蛋白质层析确实是 H 和 L 亚基,不含杂蛋白。采用 PMF 技术分别鉴定 H 和 L 亚基,并获得图 6 的肽质量指纹图谱。参考文献 [13,22] 的方法,利用网上数据库 (SWISS-PROT and TrEMBL) 比对分析图 6A 和图 6B 结果,可确认为铁蛋白 H 和 L 亚基,其中 H 和 L 亚基之间的同源性高达 60% 以上。这一鉴定结果进一步佐证了 DALF 确实由 H 和 L 两类不同类型的亚基组成论点。同时也为采用 MALD-TOF 质谱分离技术,检测在解离 DALF 的 H 和 L 亚基同时形成的 H 和 L 亚基离子,提出更高的分析要求。

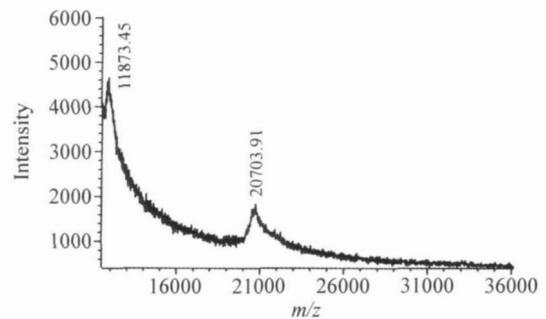


图 5 在 pH 1.5 处理后, DALF 的 H 亚基质谱图

Fig 5 Mass spectral map of H subunit in DALF after treated with medium at pH 1.5

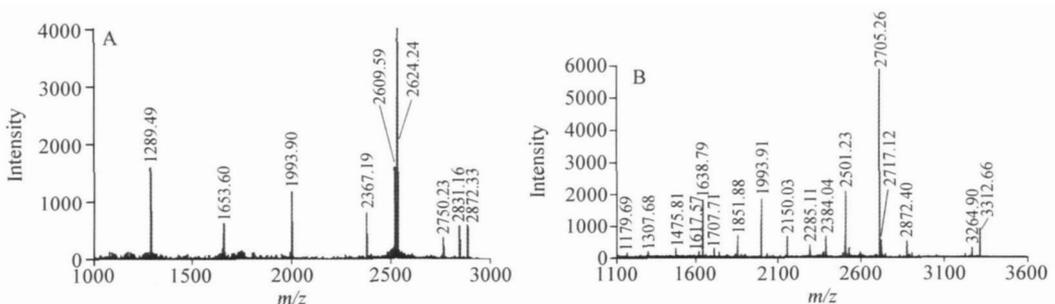


图 6 DALF 的 H 和 L 亚基肽质量指纹图谱

Fig 6 Peptide mass fingerprinting (PMF) maps of H and L subunits in DALF

A. H 亚基 (H subunit); B. L 亚基 (L subunit)。

3.5 MALD FTOF 质谱技术直接分析 DALF 的 H 和 L 亚基

通过增加来源于 MALD FTOF 质谱仪的激光强度和降低溶解 DALF 样品的基质酸度 (pH 2.5), 进行 DALF 质谱分析, 可获得图 7 质谱图。从图 7 中可看出, DALF 显示了 3 个亚基质谱峰, 其 m/z 分别为 10407.942、19305.00 和 20940.786。参考图 3 中 H 和 L 亚基 (M) 类型和对应的分子量, 可推测出 3 个质谱峰所对应的亚基分子式分别为 $[M^{2+}]_H$ 、 $[M^+]_L$ 和 $[M^+]_H$ 。值得注意的是, 采用 MALD FTOF 质谱技术可直接解离 DALF 中的 H 和 L 亚基, 并能被 TOF 检测, 但 L 亚基的解离率仍然很低, 只有部分 L 亚基从 DALF 中解离, 因而所获得的 L 亚基质谱峰的绝对强度较低 (图 7)。提高 DALF 中的 L 亚基解离率且能被 TOF 检测是研究 DALF 的 H 和 L 亚基之间相互作用强度的关键步骤, 是合理揭示铁蛋白结构与功能的关键过程, 尤其是亚基之间的调控过程与作用。

通常, 经 SDS-PAGE 方法分离后的蛋白亚基, 难以再采用 MALD FTOF 质谱技术测定亚基的质谱峰, 主要原因在于解离的亚基上已结合了大量

SDS 阴离子。为了进一步佐证 DALF 的 H 和 L 亚基分子量, 本实验在 SDS-PAGE 技术有效地分离 DALF 的 H 和 L 亚基的基础上, 采用铜染和浸取技术分别提取 H 和 L 亚基样品, 并进行质谱分析。从 DALF 经 SDS-PAGE 方法分离后的 H 亚基质谱图, 获得两个特征质谱峰, 其中 m/z 为 10250.07 和 20534.10, 认定为含双电荷的 H 亚基 (M^{2+}) 和单电荷的 H 亚基 (M^+), 其 m/z 与图 7 中显示的 H 亚基 m/z 极为接近或相似, 这说明了图 7 中所显示的质谱峰是 DALF 的 H 和 L 亚基, 而不是络合于 DALF 的微量杂蛋白。因高效地从 SDS-PAGE 分离胶中浸取 DALF 的 L 亚基有一定的难度, 所获取的 L 亚基含量较少, 造成所获得的质谱图较不理想, 故省略该图谱。尽管如此, 本实验技术仍然适合于 MALD FTOF 质谱技术直接测定 SDS-PAGE 分离胶中蛋白质亚基分子量等结构信息^[18]。

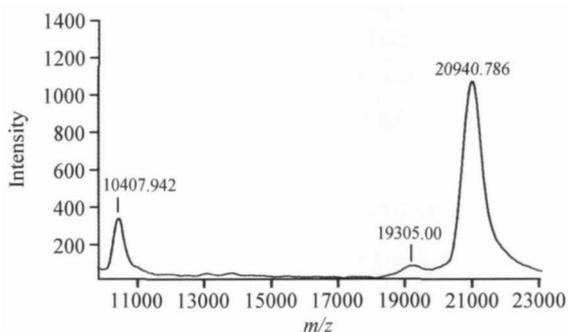


图 7 DALF 的 H 和 L 亚基质谱图

Fig 7 Mass spectra of H and L subunits in DALF

References

- Kong B, Huang H Q, Lin Q M, Cai Z, Chen P. *Applied Biochem. Biotechnol.*, **2005**, 126(2): 133 ~ 148
- Johnson E, Cascio D, Sawaya N, Glangery M, Schroder I. *Structure*, **2005**, 13: 637 ~ 648
- Bean B, Andrews S C, Treffry A, Harrison P M, Keen J N, Findlay J B C. *Biol Metals*, **1989**, 2: 77 ~ 82
- Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, Chen P. *Anal. Chem.*, **2005**, 77(6): 1920 ~ 1927
- Seo H Y, Chung Y J, Kim S J, Park C U, Kim K S. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **2003**, 63: 57 ~ 63
- Huang Lin (黄琳), Chen Xu (陈旭), Luo Lian-Zhong (罗联忠), Lin Qing (林青), Huang He-Qing (黄河清). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(8): 1045 ~ 1050
- Huang He-Qing (黄河清), Kong Bo (孔波), Lin Qing-Mei (林庆梅), Chen Jin-An (陈晋安), Cao Ting-Ming (曹廷明). *Acta Biophys. Sinica* (生物物理学报), **2002**, 18(1): 99 ~ 103
- Li M, Viravaidya C, Mann S. *Small*, **2007**, 3: 1477 ~ 1481
- Chen Ping (陈平), Huang He-Qing (黄河清), Lin Qing-Mei (林庆梅), Chen Xu (陈旭), Huang Hui-Ying (黄慧英). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(5): 667 ~ 671
- Zeng Q B, Reuther R, Oxshier J, Wang Q. *Bioorg. Chem.*, **2008**, 36: 255 ~ 260
- Shin K M, Lee J W, Gordon G W, Kim S J. *Sensors and Actuators B*, **2008**, 133: 393 ~ 397
- Huang He-Qing (黄河清), Chen Ping (陈平), Zhu Bin-Lin (朱斌琳), Lin Qing (林青), Luo Lian-Zhong (罗联忠). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2007**, 28(11): 2073 ~ 2077
- Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, Lin Q M, Cai Z W. *Aqua Toxicol.*, **2006**, 78(2): 127 ~ 135
- Bao Xiao-Dong (包晓东), Huang Lin (黄琳), Huang He-Qing (黄河清), Cai Zong-Wei (蔡宗苇). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2008**, 36(4): 433 ~ 438

- 15 Huang He-Qing(黄河清), Lin Qing-Mei(林庆梅), Xiao Zhi-Qun(肖志群), Tong Li(童丽), Kong Bo(孔波), Zhang Feng-Zhang(张凤章). *Acta Biophys Sinica*(生物物理学报), **2000**, 16(1): 39~47
- 16 Zhao Z, Malik A, Lee M L, Watt G D. *Anal Biochem.*, **1994**, 218: 47~54
- 17 Grady J K, Zang J, Laue T m, Arosio P, Chasteen N D. *Anal Biochem.*, **2002**, 302: 263~268
- 18 Huang L, Lin Z C, Lin Q, Luo L Z, Huang H Q. *Chem. J. Chinese Universities*, **2008**, 24(5): 550~556
- 19 Huang H Q, Xiao Z Q, Chen X, Lin Q M, Cai Z W, Chen P. *Biophys Chan.*, **2004**, 111(3): 213~222
- 20 Wong K K W, Colfen H, Whilton N T, Douglas T, Mann S. *J. Inorg Biochem.*, **1999**, 76: 187~195
- 21 Sanchez P, Galvez N, Colacio E, Minons E, Dominguez-Vera J M. *Dalton Trans*, **2005**, 1: 811~813
- 22 Zhuo H Q, Huang L, Feng L J, Huang H Q. *Anal Biochem.*, **2008**, 378: 151~157

Characteristics of H and L Subunits with Mass Spectrometry, Electrophoresis and Transmission Electron Microscopy in Liver Ferritin of *Dasyatis Akajei*

HUANG He-Qing^{1,2,3}, HU Xiao-Hui¹, FANG Xue-Ping¹, CAO Ting-Ming¹, KONG Bo¹

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences¹, State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science², The Key Lab of Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry & Chemical Engineering³, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Liver ferritin of *Dasyatis akajei* (DALF) with mass purity was prepared in batch. Transmission electron microscopy (TEM) was used to determine the molecular sizes of DALF, protein shell, and iron core, respectively. Experimental results of SDS-PAGE method indicated that DALF consisted of two different subunit types, H and L subunits. Moreover, both types of H and L subunits and their homology were further proved by peptide mass fingerprinting (PMF). The redox reagents such as natural read, thionine, and methyl viologen, and the acidity at pH 1.5 have no abilities for making the interaction intensity of both H-L and L-L subunits reduced to form the ions of L subunit for mass analysis with MALDI-TOF/MS, respectively. However, using a combined approach of increasing laser intensity and decreasing the matrix pH synchronously, MALDI-TOF mass spectrometric method has the ability for analyzing molecular weights both H and L subunits in DALF. It indicated that the interaction intensity of H-L and L-L subunit types was higher than that of H-H subunit type in DALF.

Keywords Ferritin, subunit type, electron microscopy, mass spectrum, electrophoresis

(Received 18 August 2008; accepted 19 November 2008)