

鲨鱼肝铁蛋白亚基解离与组装机理的研究

林青^{1,2} 陈平¹ 季学涛¹ 柯才焕² 黄河清^{*1,2,3}

(厦门大学生命科学院生物化学与生物技术学系¹, 近海海洋环境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 小批量制备质谱纯鲨鱼肝铁蛋白 (Liver Ferritin of *Sphyma zygaena*, SZLF)。在弱酸介质 (pH 1.0) 中, 天然电泳结果显示, SZLF 蛋白质亚基 20 min 后开始解离。选用透射电子显微镜跟踪 SZLF 亚基解离与重组全过程和蛋白壳与铁核尺寸变化, 发现 SZLF 在亚基解离过程中, 随着 pH 值的降低, 铁核和蛋白壳的尺寸呈现相同的变化趋势, 这种变化趋势可能与铁核内层铁的释放和蛋白壳的解离与去折叠有关。SZLF 蛋白壳的重组过程则是一个快速过程, 并且是由松散熔球态向紧密态转变的过程。SZLF 由单类型亚基组成, 而马脾铁蛋白 (Horse Spleen Ferritin, HSF) 由 H 和 L 两种亚基类型组成。在基质 pH 3.0 条件和激光辅助下, 混合 HSF 和 SZLF 仍然可释放各自的亚基且形成准亚基离子, 供基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析, 说明此时 SZLF 的亚基间相互作用强度减弱但并没有去折叠。TEM 技术在铁蛋白解离和重组过程中的应用, 为进一步研究铁蛋白纳米包装的过程和机理提供新颖的、可行的和更加直观的研究手段。

关键词 铁蛋白; 电子显微镜; 亚基解离与组装; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

1 引言

哺乳动物肝脾组织内富含有一种能高效储存细胞内游离铁的蛋白质, 称为铁蛋白 (Ferritin)^[1,2]。与其它多数蛋白质分子结构相比, 铁蛋白的分子结构极为特殊, 它由蛋白壳和铁核组成, 其中铁核 (直径约为 8 nm) 位于蛋白壳 (直径约为 11 ~ 12 nm) 的中心区域^[3,4]。铁核主要由无机铁和无机磷酸盐组成^[5], 铁代谢和储存过程需借助横跨铁蛋白蛋白壳隧道为出入通道^[6]。毛细管电泳^[7]、质谱、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)^[8] 和反向高效液相色谱 (RP-HPLC)^[9] 等分析技术已揭示多数哺乳动物和大部分鱼类铁蛋白由 H 和 L 两类亚基组成, 而细菌铁蛋白和 SZLF^[10] 均由单类型亚基组成, 但绝大多数铁蛋白蛋白壳均由 24 个亚基组成, 且以高对称性结构组装成抗逆性强的球形体蛋白质, 例如: 在饱和硫酸铵、75 和 pH 2.0 ~ 10.0^[11] 条件下, 铁蛋白蛋白壳和铁核组成均保持着较高的稳定性^[5]。

有关锰核铁蛋白、钴核铁蛋白、铜核铁蛋白和钴/锰核铁蛋白^[12] 的研究已陆续报道。构建铁蛋白反应器且应用于捕获流动水体中的有机磷农药和重金属^[13] 亦有报道。近年来, 利用铁蛋白亚基快速解离与组装特性, 陆续构建了胰岛素核铁蛋白^[14]、去铁敏 B (Desferrioxamine B) 核铁蛋白^[15] 和药物核铁蛋白载体等, 但铁蛋白亚基解离和组装机理尚未清楚。透射电子显微镜、原子力显微镜、圆二色性光谱等分析技术是研究铁蛋白亚基解离与组装和亚基去折叠与折叠过程的有效分析技术, 但用于监控铁蛋白亚基解离和组装机理的研究甚少^[10,16]。本研究结合电泳和透射电子显微镜 (TEM) 技术初步揭示铁蛋白亚基解离与组装机理, 分析蛋白壳与铁核紧密度变化过程, 并选用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 技术进一步佐证相关的实验结果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LABCONCO Fexzone 18 冻干机 (美国 Labconco 公司); 超滤离心管, 截留分子量为 100 kDa, 最大上样量 0.5 mL (美国 Millipore 公司); JEM2100 透射电子显微镜 (日本电子公司); DYY-2 型稳压稳流电

2009-07-14 收稿; 2009-09-29 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30870515) 和 "973" 计划项目 (No. 32010CB12640) 资助

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

泳仪(北京六一仪器厂); REFLEX III型基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(德国 Bruker公司)。

三氟乙酸(TFA)和乙腈(Acetonitrile)购自德国 Merck公司;电泳试剂(丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等)购于上海 Sangon公司;马脾铁蛋白(美国 Sigma公司);基质芥子酸(美国 CN 生物医学公司);其它试剂均为国产分析纯。

2.2 鲨鱼肝铁蛋白的制备及其结构测量

参考文献 [17] 的方法制备鲨鱼肝铁蛋白(Liver Ferritin of *Sphyma zygaena*, SZLF)。选用 Lowry法测定蛋白含量。

电泳纯的 SZLF样品(6~8 g/L)直接铺上且吸附于铜网表层 20 min后,用 2%磷钨酸染色 10 min,避光干燥 120 min。在 200 kV, 5~10万放大倍数条件下,观察铁蛋白蛋白壳和铁核的透射分子结构图。

由于铁蛋白不是绝对球形结构,需要参照 Rahman描述的分析方法^[18],随意挑选 100个铁蛋白分子作为测量物,分别用电镜配置的游标卡尺,测量每个铁蛋白、蛋白壳和铁核的最长与最短直径或厚度,并求得总平均值,即为铁蛋白、蛋白壳和铁核的直径或厚度。

2.3 质谱技术分析 SZLF

SZLF样品和饱和芥子酸(Sinapic Acid, SA)溶液按体积比 1:1混合后,取 0.8 μ L混合物直接点在 MALD FTOFMS专用样品靶上,待在室温下自然干燥后,将样品靶直接放入质谱仪的靶箱内进行样品分析。采用带 DE(Delayed extraction)的线性模式分析 SZLF亚基组成和分子量^[19]。

2.4 解离铁蛋白亚基

取等量的 SZLF干粉,分别用 pH 1.0, 2.0, 3.0和 4.0的 HCl溶解且处理 20 min后,用截留分子量为 100 kDa的超滤管超滤 3次,并用相同体积的 DDW 溶解洗脱 SZLF。SZLF经不同 pH介质(pH 1.0~4.0和 pH 10.0~13.0)处理后,选用 TEM观察 SZLF的分子结构和亚基之间的堆积紧密度。

2.5 电泳技术分离铁蛋白亚基

用等体积的 HCl(pH 1.0)溶解且处理等 SZLF干粉,处理时间分别为 20, 40, 60, 80, 100, 120和 180 min。随后用适量 NaOH中和,并选用分离胶为 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离铁蛋白亚基。

PAGE方法:采用 Tris甘氨酸不连续电泳体系(浓缩胶 pH 6.8,分离胶 pH 8.8),浓缩胶浓度 3%,分离胶浓度 10%,浓缩胶电压 80 V,分离胶 140 V,电泳在 4 \times 下进行。按文献 [17] 进行考马斯亮蓝染色和脱色。

2.6 亚基快速组装铁蛋白

用 HCl(pH 1.0)处理 SZLF(2 mL, 6.5 g/L) 30 min后,再用 1 mol/L NaOH逐渐调高介质 pH值至 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0。取出 20 μ L SZLF样品进行粘片、染色、干燥,然后进行 TEM观察。对蛋白壳和铁核的分子结构尺寸大小进行测量分析^[19]。

3 结果与讨论

3.1 酸性解离 SZLF亚基

铁蛋白由 24个亚基且高对称性地组装成球形蛋白质,亚基之间和亚基与铁核的相互作用强度和稳定性存在着明显差异,但相关的研究甚少。表 1是在不同酸性(pH 1.0~4.0)环境下,能被截留分子量为 100 kDa的超滤管截留的 SZLF相对百分含量。在反应介质为 pH 4.0

条件下,被截留在超滤管中的 SZLF相对蛋白总量为 100%,与未经弱酸处理的 SZLF含量相同。这说明了 SZLF亚基及亚基结构在 pH 4.0的介质中是稳定的,未发生亚基解离现象。当反应介质 pH下降到 3.0时,被截留在超滤管中的 SZLF蛋白含量为 85%~90%,约有 10%~15%的 SZLF的亚基被解离。在反应介质 pH进一步下降到 2.0时,被解离成亚基的 SZLF占总蛋白含量的 20%~30%,约 1/3的 SZLF亚基在 pH 2.0的弱酸环境中极不稳定,易被解离成游离且去折叠的单亚基、多亚基聚合体或肽链。鲑鱼肝铁蛋白(Liver ferritin of *dasyatis akajei*, DALF)和马脾铁蛋白(Horse spleen ferritin, HSF)经

表 1 SZLF酸解离后的蛋白量(%)

Table 1 Quantity of remain protein in total protein after liver ferritin of *sphyma zygaena*(SZLF) dissociated by different pH

	pH 1.0	pH 2.0	pH 3.0	pH 4.0
剩余蛋白占总蛋白				
Percentage of remain protein in total protein(%)	55~60	70~80	85~90	100

HCl 介质 (pH 1.0) 处理后显示出了只有铁核分子形貌的 TEM 图谱, 说明了弱酸介质能高效地解离 DALF 和 HSF 的蛋白壳亚基, 从而使裸露的铁核分子结构完全暴露出来^[19]。在弱酸环境下, 铁蛋白蛋白壳亚基结构呈现极不稳定特性, 而铁核结构却表现出高度稳定性特点。在相同的弱酸条件下 (pH 1.0), 约占总蛋白量 60% 的 SZLF 被超滤管截留, 这说明 60% SZLF 亚基仍然紧紧络合于铁核上没有被超滤下来, 而其余 40% 亚基则已经被解离成游离的亚基或水解成肽链。铁蛋白各个亚基的稳定性有所不同, 这可能与亚基和铁核之间的相互作用强度不同有关, 详细机理有待于进一步研究。

在 pH 1.0 的酸度条件下研究处理时间对 SZLF 亚基解离和亚基聚合态的影响, 并获得图 1 结果。

从图 1 可看出, 如处理时间控制在 20 min (图 1-2), SZLF 只显示出一条轻淡的蛋白质层析带 (图 1E), 估计该蛋白的分子量约为 14 kDa, 明显小于 SZLF 的亚基分子量, 推测是亚基的分解产物, 这说明在 20 min 和 pH 1.0 环境下, SZLF (图 1-2F) 蛋白壳及其亚基结构是稳定的, 未产生释放不稳定亚基现象。而随着处理时间从 20 min 到 180 min (图 1 中 3~9) 延长, SZLF 显示了 5 条层析带 (图 1 中 A~D), 其电泳迁移率均高于图 1 中的 F 条带, 这一现象说明了在 pH 1.0 条件下, 处理时间长于 20 min 时, SZLF 蛋白壳亚基 (M) 均被解离成去折叠的游离亚基, 并形成了单体 (M, 20~21 kDa, 图 1-A)、二聚体 (2M, 图 1-B)、三聚体 (3M, 图 1-C) 和微量的四聚体 (图 1-D), 其中以亚基单体为主。参考表 1 和图 1 结果, 将 SZLF 亚基结构稳定性分为 3 个阶段, 即稳定阶段、稳定松散阶段和不稳定阶段。SZLF 亚基存在着不同的稳定性, 推测可能与它们和铁核之间的相互作用强度有关, 而 SZLF 的铁核结构比它的蛋白壳亚基结构呈现出更高的结构稳定特性。为了进一步佐证上述论点, 选用 TEM 技术观测在不同酸度环境下, SZLF 蛋白壳和铁核分子结构的变化趋势和特点, 揭示 SZLF 蛋白壳亚基和铁核分子结构的稳定性以及 SZLF 释放不稳定亚基的规律, 为铁蛋白纳米包装多肽药物^[14]和有机药物提供科学依据和可行性技术。

将 SZLF 亚基结构稳定性分为 3 个阶段, 即稳定阶段、稳定松散阶段和不稳定阶段。SZLF 亚基存在着不同的稳定性, 推测可能与它们和铁核之间的相互作用强度有关, 而 SZLF 的铁核结构比它的蛋白壳亚基结构呈现出更高的结构稳定特性。为了进一步佐证上述论点, 选用 TEM 技术观测在不同酸度环境下, SZLF 蛋白壳和铁核分子结构的变化趋势和特点, 揭示 SZLF 蛋白壳亚基和铁核分子结构的稳定性以及 SZLF 释放不稳定亚基的规律, 为铁蛋白纳米包装多肽药物^[14]和有机药物提供科学依据和可行性技术。

将 SZLF 亚基结构稳定性分为 3 个阶段, 即稳定阶段、稳定松散阶段和不稳定阶段。SZLF 亚基存在着不同的稳定性, 推测可能与它们和铁核之间的相互作用强度有关, 而 SZLF 的铁核结构比它的蛋白壳亚基结构呈现出更高的结构稳定特性。为了进一步佐证上述论点, 选用 TEM 技术观测在不同酸度环境下, SZLF 蛋白壳和铁核分子结构的变化趋势和特点, 揭示 SZLF 蛋白壳亚基和铁核分子结构的稳定性以及 SZLF 释放不稳定亚基的规律, 为铁蛋白纳米包装多肽药物^[14]和有机药物提供科学依据和可行性技术。

3.2 SZLF 亚基解离途径 (弱酸处理途径)

早期研究已表明, 猪脾铁蛋白 (Pig spleen ferritin, PSF) 和 HSF 的铁核主要由无机磷酸盐和铁组成。铁蛋白铁核的磷铁组成处于非均匀状态, 可分为高磷铁比的铁核表层和低磷铁核比的铁核内层。H⁺ 和 OH⁻ 参与磷铁的释放, H⁺ 迫使铁蛋白释放铁核内层的铁且加速铁的释放, 而 OH⁻ 迫使铁蛋白释放铁核表层的铁且减慢释放铁的速率^[5]。为科学揭示此现象, 选用 TEM 技术研究在不同酸碱度情况下 SZLF 亚基解离的趋势。图 2A 是 SZLF (pH 7.0) 分子结构电泳图。从图 2 可看出, SZLF 由高电子密度铁核和低电子密度蛋白壳构成, 蛋白壳由若干个亚基 (环状结构中的白色颗粒) 或亚单位组成, 亚基之间堆积紧密度并不高, 并有横跨蛋白质壳内外的通道。经分子结构尺寸统计发现, SZLF 蛋白壳的平均直径为 13.06 nm, 其中铁核平均直径为 6.38 nm, 蛋白壳的平均厚度为 3.34 nm。随着反应介质的酸度递增, pH 值降低至 4.0 和 3.0 时, 可分别获得图 2B 和图 2C 结果。从两幅电泳图中未观察到 SZLF 蛋白壳亚基完全或部分解离迹象, 说明 pH 在低于 7.0 和高于 3.0 条件下, 反应介质中的 H⁺ 迫使 SZLF 释放铁核内层中的铁磷组成, 不影响或不减弱铁核表层的铁与蛋白壳内表层氨基酸的相互作用强度, 也不影响 SZLF 的电泳迁移率, 所以无法从电泳图中观察到铁蛋白分子结构的明显变化, 但此时 SZLF 铁核中心区域实际上已经出现电泳无法观测到的空心。

图 2D 是在 pH 2.0 条件下 SZLF 分子结构的电泳图。图 2D 清晰地显示只有部分 SZLF 具有完整的分子结构, 而剩余部分的 SZLF 则发生了亚基解离现象。较高的 H⁺ 浓度不仅迫使 SZLF 大量释放铁核内层中的铁磷组分, 而且造成 SZLF 蛋白壳部分发生亚基解离, 甚至被水解成单条肽链。

图 2E 和图 2F 是 SZLF 经弱酸 (pH 1.0) 处理后的电泳图。从图 2E 可见, 弱酸介质能使 SZLF 蛋白

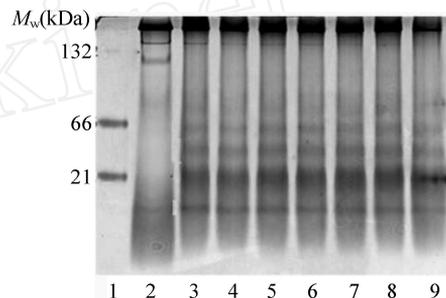


图 1 SZLF 天然电泳图 (不同处理时间, pH 1.0)

Fig 1 PAGE map of SZLF (different treatment time at pH 1.0)

泳道 1 (Channel 1): Marker; 泳道 2~9 依次处理时间 (Treatment time of channel 2~9): 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 min.

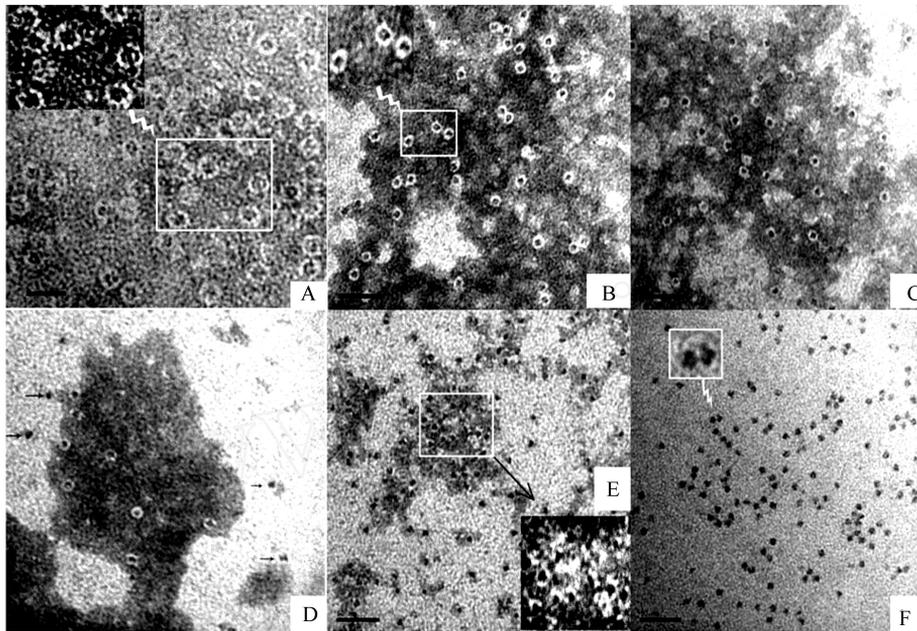


图 2 在不同 pH 条件下 SZLF 的透射电子显微镜图 (弱酸处理)

Fig 2 TEM map of SZLF under the condition of different pH (treatment of weak acidity)

A. pH 7.0; B. pH 4.0; C. pH 3.0; D. pH 2.0; E, F. pH 1.0.

壳完全解离成游离的亚基、亚基聚合体和肽链,并能在 TEM 下观察到完全裸露的空心铁核轮廓。对图 2E 局部区域放大,可清晰地看出少量去折叠的亚基聚合体盘绕着铁核,形成了亚基聚合体-铁核复合物结构。这种复合物结构大小具有随意性或无规则性。去折叠程度越大,暴露的疏水基团越多,形成的聚合体直径越大。铁核被该复合物无规律地包裹在其中(见图 2F),最终形成包涵体或沉淀的铁核-蛋白质(丝状结构),无法呈现出标准铁蛋白的分子结构特征,只显示铁核结构特点(图 2E 和图 2F)。

3.3 SZLF 亚基解离途径 (弱碱处理途径)

释放铁动力学研究已表明,铁蛋白在弱碱介质中释放铁的速率明显低于在弱酸介质中,推测释放铁的速率差异性主要与蛋白质壳的调控和释放铁核中的铁分布不同有关^[20]。图 3 是 SZLF 经弱碱处理途径获得的电镜图。从图 3A 可看出,与弱酸处理现象类似, SZLF 亚基同样也随着反应介质中的 OH^- 浓度增加而急剧解离。当反应介质 pH = 13.0 时(图 3A), SZLF 亚基几乎完全被解离,只显示裸露松散的铁核。此现象主要起因在随着反应介质中的 OH^- 浓度递增,伴随着与蛋白壳内表层氨基酸残基络合的铁磷组成快速释放,从而导致 SZLF 亚基失去络合位点而迅速释放。图 3A 裸露的黑色斑点主要是由铁核内层铁磷组成的铁核电镜图,其组成不同于由铁核表层组成的空洞铁核(图 2F),不受或略受蛋白壳的包裹与约束,显示较高的自由膨胀率,因而推测图 3A 显示的铁核直径应该略大于图 2F 显示的铁核,但图 3A 中显示的铁核仍然络合少量去折叠的亚基,且形成多聚体铁核的数量也不多,多数处于游离状态,这与图 3F 显示的铁核分布规律极为相似。但在反应介质 pH 14.0 环境下,铁核出现了明显的聚集状态,以铁核簇的方式出现。推测在 pH 14.0 的反应介质中,高浓度的 OH^- 迫使络合于游离的铁核上的去折叠亚基成为无规则的肽链,此时大量疏水氨基酸残基外露,提高不同铁核之间的肽链疏水残基相互作用机率,加速了铁核多聚体的形成(图 3B)。由此可见,铁蛋白、铁核和蛋白壳的分子大小与弱酸或弱碱处理途径有关,与络合铁核的亚

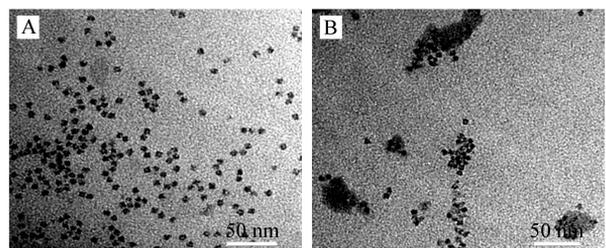


图 3 经弱碱处理 SZLF 的透射电子显微镜图

Fig 3 TEM map of SZLF with alkalescence treatment

A. pH 13.0; B. pH 14.0.

基

基数目和去折叠程度有关。

3.4 SZLF 亚基酸碱解离过程中的分子尺寸变化

表 2 是在不同 pH 值下, SZLF 蛋白壳和铁核显示的分子直径。从表 2 可见, 即 SZLF 分子直径越大, 蛋白壳的厚度越厚、铁核分子的直径也越大, 表现出蛋白壳内充满结实和膨胀的铁核, 并需要有 24 个亚基且高对称性包裹着铁核, 形成一定厚度的蛋白壳的基本结构特征。反应介质的 pH 降到 4.0, SZLF 释放部分铁核内层的铁, 并伴随铁核缩小迹象, 导致蛋白壳和 SZLF 分子直径缩小 (表 2)。随着反应介质的酸度降低到 pH 3.0, 蛋白壳中的部分亚基间的相互作用减弱, 之前的紧密结构变得松散, 减少了蛋白壳对铁核包裹的限制, 使蛋白壳和铁核分子略微增大, 引起 SZLF (pH 3.0) 分子直径的增大。以此类推, 铁核含铁量的降低, 蛋白壳对铁核包裹紧密度和蛋白壳去折叠后所产生松散亚基结构等因素, 便可合理地解释表 2 的实验数据。SZLF 蛋白壳的亚基是通过降低亚基之间的相互作用强度, 蛋白质去折叠和逐一被剥离等途径解离的。部分 SZLF 亚基紧紧络合于铁核上, 并形成松散的多聚且去折叠的亚基包裹铁核, 这可能是蛋白壳内表层的氨基酸残基紧紧络合于铁核表层的部分高磷铁比的铁而形成的。

表 2 SZLF 蛋白壳和铁核尺寸分析

Table 2 Dimension analysis of SZLF including protein shell and iron core

	pH 7.0	pH 4.0	pH 3.0	pH 2.0	pH 1.0	pH 13.0	pH 14.0
铁蛋白直径 Ferritin diameter (nm)	13.06 ± 0.12	11.86 ± 0.15*	12.14 ± 0.10*	11.76 ± 0.13*	-	-	-
铁核直径 In core diameter (nm)	6.38 ± 0.94	6.10 ± 0.10	6.28 ± 0.10	5.98 ± 0.13*	7.70 ± 0.11*	8.31 ± 0.08*	8.00 ± 0.14*
蛋白壳厚度 Thickness of protein shell (nm)	3.34 ± 0.10	2.88 ± 0.12	2.93 ± 0.15	2.89 ± 0.07	-	-	-

*: 与 pH 相比差异显著 (Significantly different from the control (SZLF) pH 7.0) ($p < 0.05$)。

3.5 铁蛋白复性与组装

由图 2E 可知, 在反应介质 pH 1.0 中, SZLF 蛋白壳的多数亚基被解离成游离亚基或去折叠肽链, 但表 3 结果却显示出, 当酸度从 pH 1.0 递增至 pH 2.0 时, SZLF 铁核和蛋白壳厚度却与天然 SZLF 分子尺寸很相似, 这说明了游离的亚基或去折叠亚基迅速包裹裸露铁核形成铁蛋白分子结构的理论。但此时, SZLF 蛋白壳亚基的堆积仍然是松散的, 蛋白壳是否由 24 个亚基且高对称性组成尚不清楚, 但从表 2 结果中可推测, 蛋白壳的亚基数目可能少于 24 个, 因为重组的 SZLF (pH 2.0) 蛋白壳亚基结构是松散的。随着介质 pH 逐步递增, 铁核由松散逐渐转化成稍微紧密结构, 构成蛋白壳的亚基数目逐渐增加, 从而稍微增加蛋白壳的厚度, 使 SZLF 分子结构 (pH 4.0) 的尺寸应略大于天然 SZLF (pH 7.0)。随着反应介质 pH 不断地上升, 铁核和蛋白壳紧密度不断地增加, 最终形成了 SZLF 铁核和蛋白壳厚度均小于天然状态 (pH 7.0) 的 SZLF。推测在进行弱酸解离 SZLF 过程中, SZLF 已释放一定量的酸不稳定铁 (铁核内层的铁) 和产生去折叠的亚基, 导致重组的 SZLF 的含铁量和组成蛋白壳的亚基数目均小于天然 SZLF (pH 7.0), 所构成的 SZLF 铁核和蛋白壳厚度自然均小于天然 SZLF (pH 7.0) (表 3)。而这种尺寸差异的程度可能与 SZLF 亚基重组所需要的时间和反应介质 pH 递增速率有关。相关的 SZLF 复性与重组途径及机理还有待于进一步研究。

表 3 在组装过程中, SZLF 蛋白壳和铁核尺寸分析

Table 3 Dimension analysis of SZLF including protein shell and iron core during reassembling

	pH 7.0	pH 1.0 ~ 2.0	pH 2.0 ~ 4.0	pH 4.0 ~ 7.0
铁蛋白直径 Ferritin diameter (nm)	13.06 ± 0.12	13.42 ± 0.39	13.28 ± 0.28	11.31 ± 0.16*
铁核直径 In core diameter (nm)	6.38 ± 0.94	6.52 ± 0.16	6.20 ± 0.14	5.40 ± 0.09*
蛋白壳厚度 Protein shell thickness (nm)	3.34 ± 0.10	3.45 ± 0.15	3.54 ± 0.08	2.96 ± 0.13*

*: 与 pH 相比差异显著 (Significantly different from the control (SZLF) pH 7.0) ($p < 0.05$)。

3.6 SZLF 亚基解离和相互作用

不同浓度的乙腈、丙酮等有机溶剂处理 SZLF 并不能使它解离成单亚基状态。图 1-3 已指出, 弱酸介质会消弱铁蛋白部分亚基的相互作用强度, 易形成游离或去折叠亚基, 并形成不同分子尺寸的铁蛋白

结构。为了进一步证实图 1-4 实验结果,选用具有一定弱酸的基质(SA, 0.1% TFA 和 30% 乙腈, pH 3.0)预处理 SZLF,获得 MALDI-TOF 质谱图(图 4)。图 4 中 3 个质谱峰分别对应 SZLF 的带双电荷亚基、带单电荷亚基(M^+)和带单电荷亚基二聚体所对应的质谱峰,即 M^{2+} , M^+ 和 $2M^+$,其中单电荷亚基含量最高,而带单电荷亚基二聚体含量比较低,说明了弱酸介质使 SZLF 解离了少部分对弱酸不稳定的亚基,并转变成亚基离子,供质谱仪分析;同时说明了被解离的亚基瞬时形成二聚体的机率较低。这进一步佐证了图 1-3 关于 SZLF 亚基解离途径和分子结构尺寸变化与蛋白壳亚基解离程度和紧密度有关的论点。

图 5 中显示 m/z 10362.334, 20649.589, 41382.517 也是 SZLF 产生的对应质谱峰。尽管两图之间的质谱峰所对应的 m/z 略有差别,但均属于误差范围内。进一步分析发现, SZLF 混合样品中混入的少量 HSF 也产生了对应的 H 和 L 亚基质谱峰,如 m/z 20028.150 和 21487.632。这说明在 pH 3.0 条件下,无论是 SZLF 的 H-H 相互作用还是 HSF 中的 H-H、H-L 和 L-L 的相互作用都有减弱,所以在激光的辅助作用下亚基被解离出来而被质谱检测到。同时也说明两种铁蛋白的亚基并未出现去折叠的现象。因为亚基去折叠以后,很容易相互结合形成分子量较大的聚合物,而这种聚合物很难被质谱检测到。由此,可以得出与电镜研究相同的结论,在 pH 3.0 条件下,在 H^+ 的作用下 SZLF 铁核内部的磷铁组分被释放出来,而亚基之间的相互作用强度和结合紧密度也受到了一定的影响,致使一些相互作用较弱的亚基开始被解离出来而被质谱检测,而相互作用较强的亚基则没有受到影响,它们需要更低的 pH 条件才能使它们解离出来并去折叠。这一切都说明 pH 3.0 是亚基开始解离但却并没有完全解离的阶段。

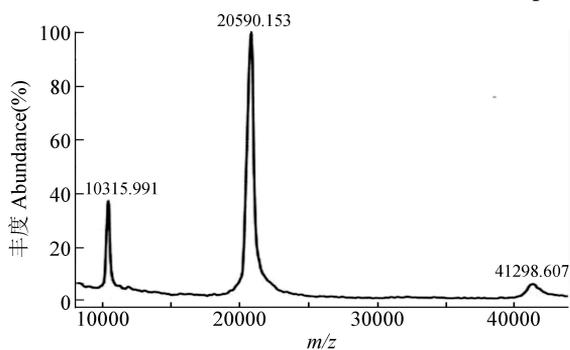


图 4 SZLF 的质谱图

Fig 4 Mass spectrogram of SZLF

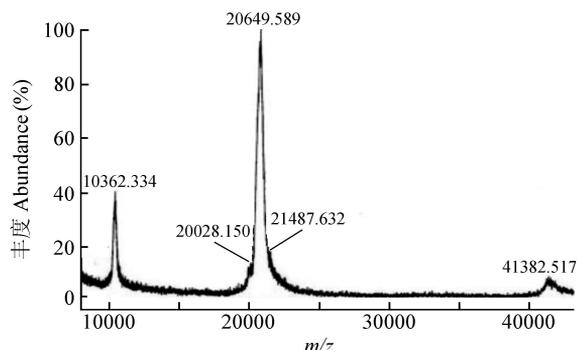


图 5 混合 HSF 的 SZLF 质谱图

Fig 5 Mass spectrogram of SZLF mixed with horse spleen ferritin (HSF)

3.7 结论

在亚基弱酸解离的过程中, SZLF 内部的铁核和外部的蛋白壳部分都发生了变化:从 pH 7.0 ~ 4.0 的过程中,铁核内部的铁逐步释放出来,表现为铁核直径的缩小,而铁核的缩小也使外部的蛋白壳直径随之缩小;而当 pH 降至 3.0,亚基之间的相互作用力减弱, SZLF 的结构变得松散,致使表面上看到蛋白壳的直径有所增大;当 pH 降至 2.0 时,较高的 H^+ 浓度不但使 SZLF 使铁核内层的铁磷组分大量释放,而且使 SZLF 蛋白壳部分发生亚基解离,甚至被水解成单条肽链;在 pH 1.0 时, SZLF 蛋白壳一部分被完全解离成亚基聚合物、游离的亚基和亚基去折叠肽链,一部分去折叠的亚基聚合物和铁核并未完全脱离,形成了亚基聚合物-铁核复合物。亚基弱碱解离的过程则与酸解离过程有所不同, OH^- 使与蛋白壳内表层氨基酸残基络合的铁核外层的铁磷组成快速释放, pH 13.0 时大部分 SZLF 亚基失去络合位点而与铁核脱离处于游离状态,而此时的铁核几乎不受蛋白壳的包裹与约束,显示较高的自由膨胀率,因而其直径增加也比较明显。在亚基重组的过程中, pH 1.0 ~ 2.0 的过程是游离和去折叠亚基快速包裹裸露铁核的过程,之后的过程则是由松散状态向紧密有序结构重组的过程。

References

- 1 Suryakala S, Deshpande V. *Veterinary Res Comm.*, **1999**, 23(1): 165 ~ 181
- 2 HUANG Lin (黄琳), CHEN Xu (陈旭), LN Qing (林青), ZHU Bin-Lin (朱斌琳), HUANG He-Qing (黄河清). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 36(12): 1745 ~ 1750

- 3 Barceb F, Otero C, Moore G R. *BioMetals*, **1995**, 8(3): 45 ~ 47
- 4 Li Y X, Ito T. *Anal Chem.*, **2009**, 81(2): 851 ~ 855
- 5 Huang H Q, Richard K W, Frankel R N, Watt G D. *Biochemistry*, **1993**, 32(8): 1681 ~ 1687
- 6 Johnson E, Cascio D, Sawaya M R, Gingery M, Schroder I. *Structure*, **2005**, 13(3): 637 ~ 646
- 7 Zhao Z, Malik A, Lee M L, Watt G D. *Anal Biochem.*, **1994**, 218(1): 47 ~ 54
- 8 de Zoysa M, Lee J. *Fish & Shellfish Immunol*, **2007**, 23(3): 624 ~ 635
- 9 Huang L, Lin Z C, Lin Q, Luo L Z, Huang H Q. *Chem. Res Chinese Universities*, **2009**, 25: 550 ~ 556
- 10 CHEN Ping(陈平), HUANG He-Qing(黄河清), L N 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
- 11 Watt R K, Frankel R B, Watt G D. *Biochemistry*, **1992**, 31(40): 9673 ~ 9680
- 12 Zhang B, Harb J N, Davis R C, Choi S, Kim J W, Miller T, Chu S H, Watt G D. *Biochemistry*, **2006**, 45: 5766 ~ 5774
- 13 Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, Chen P. *Anal Chem.*, **2005**, 77(6): 1920 ~ 1927
- 14 HUANG He-Qing(黄河清), CHEN Ping(陈平), ZHU Bin-Lin(朱斌琳), L N Qing(林青), LUO Lian-Zhong(罗联忠). *Chin. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2007**, 28(11): 2073 ~ 2077
- 15 Dominguez-Vera J M. *J. Inorg Biochem.*, **2004**, 98(3): 469 ~ 472
- 16 Li M, Viravaidya C, Mann S. *Small*, **2007**, 3(9): 1477 ~ 1481
- 17 Kong B, Huang H Q, Lin Q M, Kim W S, Cai Z W, Cao T M, Miao H, Luo D M. *J. Prot Chem.*, **2003**, 22(1): 61 ~ 70
- 18 Rahman I H A, Chua-anusorn W, Webb J, Macey D J, St Pierre T G. *Anal Chim. Acta*, **1999**, 393(1-2): 235 ~ 243
- 19 HUANG He-Qing(黄河清), HU Xiao-Hui(胡晓慧), FANG Xue-Ping(方雪萍), CAO Ting-Ming(曹廷明), KONG Bo(孔波). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2009**, 37(5): 631 ~ 635
- 20 HUANG He-Qing(黄河清), L N Qing-Mei(林庆梅), ZHANG Feng-Zhang(张凤章), CHEN Zhong(陈中), LUO Zhan-Bo(雒占波), XU Liang-Shu(徐良树). *Chinese J. Biochem. and Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学学报), **1999**, 15(1): 10 ~ 15

Dissociation and Recombination Mechanism of Ferritin Subunits in the Liver of *Sphyrna Zygaena*

L N Qing^{1,2}, CHEN Ping¹, J I Xue-Tao¹, KE Cai-Huan², HUANG He-Qing^{*1,2,3}

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, ²State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, ³The Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University; Xiamen 361005)

Abstract Liver ferritin of *Sphyrna zygaena* (SZLF) with purity of mass spectrum was prepared in batch. Under the condition of acidifying medium at pH 1.0, PAGE showed that SZLF subunits treated for 20 min began to dissociate. A whole process of subunit dissociation and recombination was monitored by transmission electron microscopy (TEM). In addition, the changes of size of both protein shell and iron core were also determined by TEM directly. It was found that in the acid dissociation process of SZLF subunits, the size of iron core and protein shell showed the same trend of change, which might be related to not only the iron release of inner iron core but the dissociation and unfolding of the protein shell. The passway of SZLF recombination is a fast step, which is a conversion process from incompact molten globule to compact ferritin. Under the assistant of matrix acidity pH 3.0 and laser, SZLF mixed with horse spleen ferritin (HSF) still has capacity to release its subunits to form subunit ions for mass analysis by a MALDI-TOF mass spectrometer, which indicates that the interaction intensity between the subunits was weakened but they were not unfolded under this pH condition. TEM technology can be applied in studying both dissociation and recombination in ferritin subunits.

Keywords Ferritin; Transmission electron microscopy; Subunit dissociation and recombination; Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry

(Received 14 July 2009; accepted 29 September 2009)