

用圆二色性和荧光光谱技术研究纳米吡咯红 G核-铁蛋白的构建机理

陈盈盈¹, 黄琳^{1,3}, 季学涛¹, 林青¹, 陈平¹, 柯才焕², 黄河清^{1,2,3}

- (1. 厦门大学生命科学学院生物化学与生物技术学系,
2. 海洋与环境科学学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室,
3. 化学化工学院, 福建省化学生物学重点实验室, 厦门 361005)

摘要 小批量制备了电泳纯鲨鱼肝铁蛋白 (Liver ferritin of *Sphyrna zygaena*, SZLF), 对 SZLF的结构与功能进行了研究. 在 pH = 2.0 ~ 10.0条件下, 选用圆二色性 (Circular dichroism, CD)光谱技术研究了 SZLF和脱铁核 SZLF (apoSZLF)二级结构转换的基本特征和变化趋势, 揭示了 SZLF蛋白壳的亚基稳定性、相互作用强度和去折叠现象. 利用酸碱中和方法, 解离 SZLF蛋白壳亚基, 并再次构建成完整 SZLF. 用紫外-可见分光光度法和荧光光度法研究了构建纳米吡咯红 G核-铁蛋白的途径. 定量分析结果表明, 每分子 apoSZLF可捕获 12 分子吡咯红 G于蛋白壳内, 构建纳米吡咯红 G核-铁蛋白. 分析了 apoSZLF直接捕获和释放吡咯红 G的途径与速率, 为后续构建高容量纳米顺铂核-铁蛋白药物载体提供了可行性技术.

关键词 铁蛋白; 结构转换; 纳米吡咯红 G核-铁蛋白; 光谱分析

中图分类号 O657

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2010)05-0896-09

在自然界中, 多数动植物及微生物细胞中均存在着一种高效和高容量储存无机铁磷的蛋白质^[1]. 铁蛋白分子结构主要由蛋白壳、铁核和横跨蛋白壳的物质隧道组成^[2,3], 其中蛋白壳由 24个同一类型或不同类型 (H和 L)的亚基组成^[4,5], 铁核由数千个无机铁氧化合物和数百无机磷酸盐组成^[1,2]. 与细胞色素 C类似, 铁蛋白亚基由 4 螺旋束结构构成, 在金属电极或修饰电极上均表现出非电活性特点, 即可以从金属电极中接受还原电子, 并转化成化学能, 供自身铁核进行氧化还原反应^[6,7], 这一特点与铁蛋白特殊亚基结构和高对称性亚基排布组合有关, 但采用铁蛋白电极直接测定生物大分子的氧化还原电位, 或把电能转换为化学能供细胞或组织使用, 还需进一步提高铁蛋白从电极上接收和传递电子的速率.

铁核置换与亚基重组研究指出, 铁蛋白铁核可被置换成锰核、铜核、银/金核、镉核或铀核, 并用于开展治疗肿瘤疾病^[8,9]或研制高容量磁盘. 铁蛋白反应器可直接捕获流动水体中的中性红、劳氏紫及各种有机磷农药等有机小分子, 用于连续监测和评估环境污染程度. 据推测, 在这一捕获过程中, 铁蛋白亚基之间出现瞬间错位, 达到了拓宽隧道通道效果, 有利于直接捕获有机小分子^[2]. 选用酸碱中和技术可直接使铁蛋白壳亚基解离与重组, 并用于在蛋白壳内捕获抗肿瘤药物 14 羟正定霉素 (Doxorubicin), 构建 14 羟正定霉素-铁蛋白载体^[10]. 近期, 作者选用透射电子显微镜技术研究 SZLF铁核和蛋白壳亚基解离和重组的全过程, 成功地构建了纳米胰岛素核-铁蛋白^[11], 但有关铁蛋白亚基解离与重组技术捕获有机小分子或多肽的途径与机理, 尤其是亚基解离和重组过程中的螺旋折叠、去折叠和二级结构转换等问题, 至今尚不清楚.

选用透射电子显微镜 (Transmission electron microscopy, TEM)技术可直接观测到不同酸度条件下铁蛋白的蛋白壳和铁核的分子尺寸变化的趋势与规律, 从而揭示了鲑鱼肝铁蛋白 (Liver ferritin of *Dasyatis akajei*, DALF)和猪胰铁蛋白 (Pig pancreatic ferritin, PPF)中 H-H, H-L和 L-L亚基之间的相互

收稿日期: 2009-07-22

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 30870515)和国家“九七三”计划项目 (批准号: 2010CB12640)资助.

联系人简介: 黄河清, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事生物分析化学研究. E-mail: hquang@xmu.edu.cn

作用情况^[12,13]。采用外延 X射线晶体结构分析技术也陆续揭示了铁蛋白精细结构和关键氨基酸残基的生物功能。对于铁蛋白蛋白壳亚基二级结构转换现象, Maria等^[14]利用 CD技术进行了初步的研究, 并较为详细地描述和揭示了二级结构转换的趋势, 但针对铁蛋白亚基解离(去折叠)或重组后(折叠)后的生物功能的研究却很少。

本文以由单类型亚基组成的 SZLF为研究材料, 选用圆二色性、紫外-可见光谱和荧光光谱技术为分析手段, 研究了在弱酸和弱碱环境下, SZLF产生亚基解离、去折叠、折叠和重组为铁蛋白的分子机制, 构建了纳米吡咯红 G核 铁蛋白, 并揭示其构建机理, 所拓展的构建与分析技术可为后续开展纳米药物核 铁蛋白(如纳米顺铂核 铁蛋白)研究提供可行性技术。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

马脾铁蛋白(HSF, 美国 Sigma公司); 牛血清白蛋白(BSA, Sangon公司); 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, Sangon公司); 三氟乙酸(TFA, 日本东京化成工业株式会社); DEAE纤维素-52(Wateman公司); SDS分子量标准 Marker(Sigma公司); 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、2-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)及芥子酸(SA)均购于美国 ICN 生物医学公司。用于分离纯化与鉴定铁蛋白所需试剂均为上海生工公司和 Sigma公司的色谱纯产品。

超滤离心管截留分子量分别为 10000和 100000; AKTA Purifier 100快速蛋白纯化系统(瑞典 Amersham Biosciences公司); JEM2100HC透射电子显微镜(日本电子公司); Jasco J-810型圆二色光谱仪(日本分光公司); DU650型紫外-可见分光光度计(美国 Beckman公司); F-2000型荧光分光光度计(日本日立公司); REFLEX 型基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS, 德国 Bruker公司)。

1.2 实验过程

1.2.1 铁蛋白的制备和鉴定 小批量 SZLF的提取、分离、纯化和浓缩技术均参照文献[11]方法进行。铁蛋白分子量测定和迁移率等理化参数的测定参照文献[15]方法进行。采用考马斯亮蓝法测定铁蛋白的蛋白含量。

1.2.2 铁蛋白亚基和亚基类型分析 SDS-PAGE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 5%, 分离胶浓度 15%, 浓缩胶电压 70 V, 分离胶电压 200 V, 电泳分离过程在 4℃下进行。SDS电泳的样品处理: 将铁蛋白与 SDS样品缓冲液以体积比 4:1混合后, 于 100℃加热 4~5 min, 随后离心, 去除沉淀物, 收集上清液用于电泳分离。考马斯亮蓝染色和脱色参照文献[16]方法进行。铁蛋白的亚基鉴定选用肽质量指纹图谱(Peptide mass fingerprinting, PMF)技术^[16]、网上数据库(SWISS-PROT, TrEMBL, Ms-Fit网站 NCB Inr)和 Paws软件进行鉴定、比对和分析。检索设置参数为: Digest Used: Trypsin; Max #Missed Cleavages: 2; Constant Mods: carbamidomethyl(C); Maximum Report Hits: 20; Possible Modification: Oxidation of M; Minimum Matches: 4; Sort Type: Score Sort; Min Parent In Matches: 1; MOWSE On: 1; MOWSE P Factor: 0.4。

1.2.3 圆二色性光谱测定 SZLF二级结构转换 将浓缩后的电泳纯 SZLF样品加入到不同 pH值的 TFA-NaOH缓冲液中, 使实验蛋白质的终浓度为 0.1 mg/mL。室温下将样品放置 4 h。样品 pH值采用高精度的 pH酸度计进行监控。取不同 pH值的 SZLF样品 0.6 mL, 用 J-810型 CD光谱仪进行测定。石英样品池的光程为 0.1 cm, 灵敏度为 2 mdeg/cm, 扫描测定波长范围 190~260 nm, 扫描时间 0.5 s, 扫描速度 100 nm/min, 分辨率 0.1 nm, 在室温下测定铁蛋白的 CD光谱。

1.2.4 铁蛋白亚基解离和构建纳米吡咯红 G核 铁蛋白 铁蛋白亚基解离和构建纳米吡咯红 G核 铁蛋白的主要实验步骤如下: (1) 在室温下, 取 2 mL apoSZLF样品(2 mg/mL)加入 1 mL甘氨酸-醋酸缓冲液(pH=2.5)中, 用弱酸调节样品 pH=2.5, 并对铁蛋白样品进行荧光和紫外-可见光谱全扫描。

(2) 将铁蛋白样品用弱酸处理 20 min, 加入吡咯红 G并控制其终浓度为 600 μmol/mL。反应进行 3 min后, 用 4.0 mol/L Tris-HCl(pH=7.0)调节样品的 pH值至 4.0, 随后静置 30 min后, 收集样品且进行紫

外可见和荧光光谱全扫描分析。(3) 混合吡咯红 G 的铁蛋白样品, 在 Tris-HCl 缓冲液 (25 mmol/L, pH = 7.25) 中透析 10 h, 去除游离吡咯红 G。(4) 收集透析后样品且离心 10 min (12000 r/min), 再次除去变性蛋白, 加入含有巯基乙醇和 BMSF 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.25), 超滤 3 次, 除去游离的有机染料分子, 并浓缩蛋白样品。(5) 将浓缩后的 SZLF 样品再次离心 10 min (12000 r/min), 收集上清液, 去除沉淀物。(6) 将上清液样品等分为两份, 一份用 1 mol/L HCl 调节 pH 值至 1.0 反应 20 min 后, 再用 0.1 mol/L NaOH 中和反应体系的 pH 值至 7.0, 并离心 20 min (12000 r/min), 收集上清液, 去除沉淀物。另一份参比样品采用不解离 SZLF 亚基处理方法。所有样品均选用 320 nm 波长作为荧光激发波长, 并对样品进行发射荧光光谱扫描测定。

1.2.5 铁蛋白电镜观察 将 30 μ L 5.0 mg/mL SZLF 样品在 200 目铜网上吸附 20 min 后, 用 2% 磷钨酸染色 10 min, 用滤纸轻轻地吸收多余的磷钨酸溶液, 并在空气中避光干燥 120 min, 把铜网置于电子显微镜下, 在 10 ~ 15 万放大倍数下观察和拍摄铁蛋白分子结构^[17]。

1.2.6 质谱技术鉴定铁蛋白 MALD FTOF 质谱仪的脉冲氮激光 (337 nm) 为离子解吸电离源。选用线性和高分辨率反射分析模型, 加速电压为 20 kV。平均每次测定样品的激光脉冲次数在 120 次之间。采用外标法定多肽质谱峰峰位。将纳米核铁蛋白和饱和基质溶液按体积比 1:1 混合后, 取 0.8 μ L 混合物直接点滴在 MALD FTOF 质谱仪专用样品靶上, 在室温下自然干燥后, 将样品靶直接置于质谱仪靶箱内进行质谱分析^[18, 19]。

2 结果与讨论

2.1 MALD FTOF 质谱技术鉴定鲨鱼肝铁蛋白亚基

图 1 是 SZLF 亚基胶内酶解的肽质量指纹图谱, 对谱峰进行比对分析发现, 有 7 个质谱峰能获得较好的匹配效果。由鉴定结果可知, SZLF 亚基与大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) 铁蛋白的 H 亚基具有较高的同源性, 一级结构覆盖率为 38.98%。覆盖短肽的一级结构序列见表 1。从覆盖率可判断已获得的实验蛋白样品为 SZLF。SDS-PAGE 技术进一步研究表明, SZLF 由单类型亚基组成, 其中亚基分子量约为 20000, SZLF 分子量大约为 480000, 其结果与作者近期报道的 SZLF 理化参数极为相似^[20], 但明显低于黄豆铁蛋白分子量 (560000) 和亚基分子量 (26500 和 28000)^[21]。这些异常现象说明, 来源于不同物种的铁蛋白亚基类型和分子量差别较大, 这导致铁蛋白之间同源性比对、分析和鉴定结果不理想, 指出选用 PMF 技术直接鉴定来源于不同物种的铁蛋白时, 可能会出现铁蛋白亚基一级结构覆盖率偏低的现象, 最终直接影响鉴定结果的可信度, 因而还需要选用其它辅助性分析技术进一步佐证。

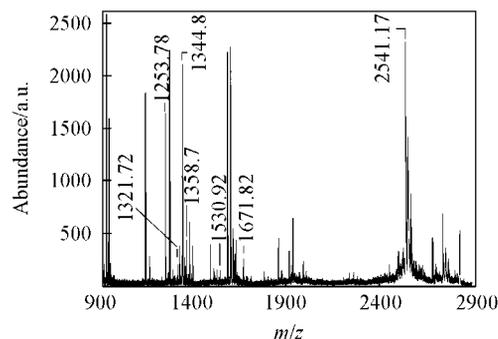


Fig 1 PMF map of subunit in SZLF

Table 1 Identification results of subunit with PMF technology in SZLF

Submitted, m/z	Matched, m/z (MH ⁺)	Database sequence
1253.78	1253.6848	SVNQSLDLHK
1321.72	1321.6284	FFKNQ SHEER
1344.80	1344.7866	IFLQDVKKPEK
1358.70	1358.7175	ELGDWVTNLR
1530.92	1530.8275	SIKELGDWVTNLR
1671.82	1671.7505	MGAPQNGMAEYLFDK
2541.17	2541.1748	MGAPQNGMAEYLFDKHILGKEST

2.2 弱碱区域 SZLF 二级结构的基本特性

相对于多数蛋白质而言, 铁蛋白具有很强的抗逆性。在 pH = 3.0 ~ 10.0 介质中, 在反应温度低于 75 及饱和硫酸铵等条件下, 铁蛋白不会变性, 仍然保持原有的结构与功能。在 pH = 7.0 ~ 10.0 范围

内, 铁蛋白只能直接释放铁核内层中部分不稳定的磷铁组成, 不影响铁核表层的铁磷组成及蛋白壳内表层氨基酸残基的相互作用强度^[1,22]. 参照小批量制备电泳纯或质谱纯铁蛋白的方法, 从鲨鱼肝中提取、分离、制备和纯化了电泳纯的铁蛋白, 并采用 EMF 技术对实验 SZLF 样品和亚基类型进行鉴定, 同时选用 TEM 技术^[11~13]观察和拍摄铁蛋白分子结构和尺寸, 获得 SZLF 电镜图 [图 2(B)].

本实验所需的 SZLF 样品均为电泳纯或质谱纯. 图 2(A)是在 pH = 7.0 ~ 10.0 条件下 SZLF 的紫外圆二色性光谱图. 当反应介质的 pH 由 7.0 逐渐提升到 10.0 时, 铁蛋白只能释放部分对弱碱不稳定的铁磷组分^[1]. 在 190 ~ 260 nm 波长范围内, 不同 pH 的 SZLF 所显示的 CD 光谱强度和变化趋势很相似 (图 2), 并带有典型的 螺旋的结构特征, 即在 192 nm 处显示出一个正的特征肩峰吸收, 且在 208 和 222 nm 处显示出 2 个负的特征肩峰吸收谱带, 这些特征峰与由 4 螺旋束组成的铁蛋白亚基结构的 CD 特征光谱极为相似. 在 pH = 7.0 ~ 10.0 范围内, 弱碱介质 (OH⁻) 对铁蛋白蛋白壳的基本结构特征、二级结构转换和亚基之间的相互作用影响较少或微弱 (图 2). 铁蛋白、铁蛋白蛋白壳及亚基结构在弱碱区域 (pH = 7.0 ~ 10.0) 内稳定, 不易产生亚基解离和去折叠现象.

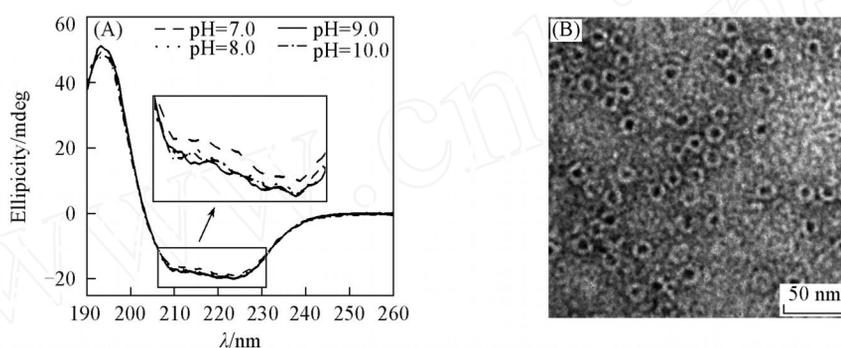


Fig 2 Ultraviolet spectrogram of circular dichroism from the SZLF(A) and transmission electron micrograph of SZLF at pH = 7.0(B)

Inset: partial magnification spectrogram.

表 2 示出了在 pH = 7.0 ~ 10.0 条件下 SZLF 二级结构的基本参数. 从表 2 中可看出, SZLF 的螺旋结构比例极为靠近且不含 折叠结构, 即铁蛋白亚基结构特征是以 螺旋结构为主, 只分别显示出低于 11% 和 8% 的 转角和无规则卷曲的结构特点. 这些实验数据表明, 在 pH = 7.0 ~ 10.0 条件下, SZLF 蛋白壳和它的亚基的基本二级结构未发生较为明显的结构转换现象, 其分子结构较为稳定. 只有在进一步提高介质的碱度时, 才有可能使 SZLF 释放出全部或部分亚基, 并产生亚基结构转换或去折叠现象. 因而若单纯选用 pH = 7.0 ~ 10.0 的反应介质作为解离铁蛋白亚基、释放铁核和重组或构建成纳米吡咯红 G核 铁蛋白的基本反应条件, 可能不太适合.

Table 2 Basic parameters of secondary structure of SZLF at pH = 7.0 ~ 10.0

pH	Percentage (%)			
	Helix	-sheet	Tum	Random
7.0	91.7	0.0	6.3	2.0
8.0	88.5	0.0	9.3	2.1
9.0	82.5	0.0	10.2	7.2
10.0	83.7	0.0	10.5	5.7

为进一步削弱铁蛋白蛋白壳与铁核及亚基之间的相互作用强度, 迅速解离亚基且重新包装吡咯红 G, 快速构建纳米吡咯红 G核 铁蛋白, 选用弱酸 (pH = 2.0 ~ 6.0) 作为亚基解离的基本条件, 研究了不同酸度对 SZLF 蛋白壳的基本结构特征、二级结构转换和亚基之间的相互作用强度的影响.

2.3 弱酸区域 SZLF 的二级结构基本特性

释放铁动力学研究表明, 在弱酸介质中, 铁蛋白释放铁的速率明显高于在弱碱介质中的释放速率^[15,21]. 铁蛋白以一级反应动力学方式释放铁核表层的铁, 以零级反应动力学方式释放铁核内层的铁, 释放铁的速率和动力学级数的不同与铁蛋白蛋白壳调控能力及幅度有关^[1,22]. 在不同 pH 值的弱酸介质中, SZLF 释放了铁核表层的铁磷成分^[1,18], 这一现象与过量 H⁺ 影响铁蛋白亚基二级结构有关.

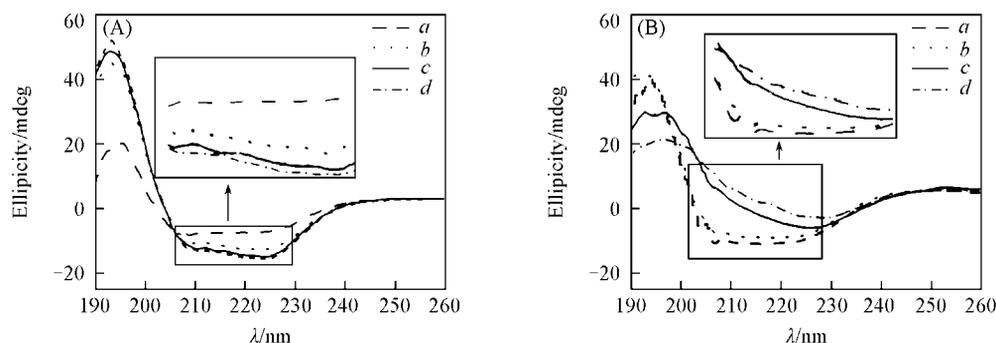


Fig 3 Ultraviolet spectrogram of circular dichroism from the ferritin at pH = 3.0—6.0

(A) SZLF; inset partial magnification spectrogram; (B) apoSZLF; inset partial magnification spectrogram. a pH = 3.0; b pH = 4.0; c pH = 5.0; d pH = 6.0

图 3(A)是 pH = 3.0 ~ 6.0 条件下 SZLF 的紫外圆二色性光谱图。从图中可看出,在波长 190 ~ 260 nm 范围内,不同 pH 值的铁蛋白所显示的紫外圆二色性光谱均较为相似,即在 192 nm 处显示出一个正的特征肩峰吸收,且在 208 和 222 nm 处显示出 2 个负的特征肩峰吸收谱带,具有螺旋结构特点,符合铁蛋白亚基结构的基本特征,但存在着差别较大的 CD 值(以 mdeg 为单位)。表 3 给出了在 pH = 2.0 ~ 6.0 条件下, SZLF 和脱铁核 SZLF (apoSZLF) 的二级结构的基本参数。由表 3 可见,在 pH = 2.0 ~ 6.0 条件下, SZLF 的基本二级结构特征仍然以螺旋结构为主,与弱碱区域类似(见表 2),其中转角和无规则卷曲的比率也较为靠近。由于圆二色性光谱提供的结构参数适用于分析蛋白质的二级结构特征,难以揭示蛋白质的三级精细结构特点和构象变化趋势,所以只能借助其它辅助性参数,才能合理地揭示蛋白质的构象变化的起因和趋势,从中揭示其功能。

Table 3 Basic parameters of secondary structure of SZLF and apoSZLF at pH = 2.0—6.0

Protein	pH	Percentage (%)			
		-Helix	-Sheet	Tum	Random
SZLF	2	30.8	27.3	17.4	24.4
	3	92.5	0.0	7.5	0.0
	4	91.3	0.0	6.0	2.7
	5	90.6	0.0	6.4	3.0
	6	92.6	0.0	5.9	1.5
apoSZLF	2	38.3	28.5	8.8	24.3
	3	60.8	13.6	4.1	21.6
	4	71.3	0.0	28.7	0.0
	5	64.7	0.0	35.3	0.0
	6	90.3	0.0	9.7	0.0

已知蛋白质的色氨酸 (Trp)、酪氨酸 (Tyr) 和苯丙氨酸 (Phe) 可在紫外区显示出各自的特征吸收峰,一旦亚基组合后,能在 280 nm 处或附近显示组合特征吸收峰,可作为蛋白质固有的特征吸收峰和定量分析蛋白质含量的依据,适合于解释蛋白质的构象变化趋势。图 3(A) 给出了不同 pH 值的 SZLF 在 190 ~ 260 nm 范围内的 CD 光谱图,这些 CD 值变化同样也适合于解释 SZLF 的三级(构象)结构变化和二级结构转换现象。在 pH = 3.0 ~ 6.0 范围内, SZLF 表现出不同的 CD 值,说明 SZLF 发生了构象变化或亚基之间相互作用减弱,但均未产生明显的二级结构转换现象,亚基去折叠可能性较小。这种蛋白质或亚基的构象变化趋势与图 2 显示的结果明显不同,说明了在 pH = 3.0 ~ 6.0 之间, SZLF 的蛋白壳结构较为稳定,但随着反应介质的酸度降低, SZLF 铁核表层释放铁的数量随之递增,明显降低了铁核表层的铁磷组成与蛋白壳内表层氨基酸残基相互作用的强度,因而发生蛋白壳亚基构象变化或部分去折叠现象,使 SZLF 易释放较为不稳定的亚基,例如 H 亚基^[23],可供质谱分析亚基的类型和分子量。

为了进一步了解 SZLF 蛋白质壳亚基间相互作用的强度,通过制备脱铁核 SZLF (apoSZLF),获得了在 pH = 3.0 ~ 6.0 条件下,脱铁核 SZLF 的紫外圆二色性光谱图,将图 3(B) 与图 3(A) 结果进行相比分析可发现,在 pH = 3.0 ~ 6.0 条件下和波长 190 ~ 260 nm 范围内, apoSZLF 仍然保持着螺旋结构的基本特征,但 apoSZLF 之间的 CD 值差别较大,变化趋势也明显不同,这说明 apoSZLF 不仅产生构象变

化,同时发生了二级结构转换.从表3数据可看出,在pH=6.0条件下,apoSZLF的二级结构特征与SZLF较为相似;当pH降低到4.0~5.0时,apoSZLF构象已经产生近35%的转角,出现了二级结构转换迹象,但仍不明显.在pH=2.0~3.0环境下,apoSZLF蛋白壳亚基同样也产生解离且部分释放成为游离亚基,并产生去折叠现象,明显产生了二级结构转换现象.在pH=3.0时,apoSZLF的二级结构特征为60.8%螺旋,13.6%折叠,4.1%转角,21.6%无规则卷曲;当pH进一步降低到2.0时,apoSZLF的二级结构特征发生了更加激烈变化,即38.3%螺旋,28.5%折叠,8.8%转角,24.3%无规则卷曲.显然,在弱酸介质中,apoSZLF蛋白壳结构稳定性低于SZLF,更有利于蛋白壳亚基的解离和重组.选用弱酸解离apoSZLF亚基,并用于构建纳米有机化合物/多肽核-铁蛋白的方法要比选用弱碱介质更为简单.此外,选用apoSZLF构建纳米吡咯红G核-SZLF肯定比选用SZLF更合适,至少可避免SZLF解离后残留铁核的干扰和影响重组率.通常,过低的酸度介质会水解有机化合物和多肽,因此选择一种能抗弱酸且不易分解的有机化合物或多肽作为构建纳米有机化合物/多肽核-SZLF的包裹物也是极其重要的.

2.4 紫外光谱法构建和分析纳米吡咯红G核-铁蛋白

对甲基蓝、中性红、金橙G和吡咯红G等10种常见的染料逐一进行紫外-可见和荧光光谱稳定性和抗弱酸能力的比对分析,结果发现,吡咯红G是唯一具有可见光强吸收并发射荧光的有机染料且在弱酸性溶液中性质稳定,不发生红移或紫移现象.

吡咯红G是分子量为302.80的二苯并吡喃类生物染色剂,化学结构式为 $C_{17}H_{19}CN_2O$,其中二苯并吡喃环的共轭双键可产生荧光(图4插图是吡咯红G分子结构).由于吡咯红G具备可见光强吸收和发射荧光的特点,并且在pH=2.0的酸性介质不被水解,因而被认为是构建纳米有机化合物核-铁蛋白的理想纳米被包装材料.参考图2和图3以及表2和表3的结果,选用弱酸解离apoSZLF亚基途径,对吡咯红G进行纳米包裹,构建纳米吡咯红G核-铁蛋白,并选用紫外-可见光谱法研究由apoSZLF亚基和纳米吡咯红G混合重组前后纳米吡咯红G核-SZLF的光谱变化趋势.

在pH=2.0条件下,该化合物的特征吸收峰波长位于350,490和540nm处,不出现红移和紫移现象,其分子结构稳定于弱酸介质中.图4谱线a是在pH=2.0条件下apoSZLF的游离亚基与吡咯红G混合后的紫外-可见光谱图,可见在其特征吸收峰中,280nm处是铁蛋白的吸收峰,其余3个峰均来自游离的吡咯红G,说明吡咯红G直接络合于游离的铁蛋白亚基上的可能性较小或含量极微.比较图4谱线a和b可知,当反应介质的pH由2.0逐步提升到4.0时,280nm的蛋白吸收峰强度减弱,而吡咯红在350nm的次吸收峰强度没有明显变化,490和540nm两个主峰的强度都略有减弱,由此可初步说明,在去折叠的铁蛋白亚基逐步组装成铁蛋白的同时,将部分吡咯红G包裹于蛋白壳中心区域内,并屏蔽了已包裹吡咯红G对可见光的吸收,即构建了吡咯红G核-SZLF,减少了反应体系中游离吡咯红G的浓度,降低了吡咯红G特征吸收峰的吸收强度,最终形成了图3曲线b的结果.由于两者的吸收值差别较小,直接影响到定量分析捕获吡咯红G的数量和速率.筛选与建立更加方便且灵敏的分析技术是定量分析纳米吡咯红G核-SZLF中吡咯红G含量的关键.

2.5 荧光光谱法构建和分析纳米吡咯红G核-铁蛋白

为了进一步提高定量分析apoSZLF捕获吡咯红G的检测灵敏度,作者选用荧光光谱法,利用apoSZLF亚基的解离和重组特性,通过研究纳米吡咯红G核-SZLF构建前后吡咯红G荧光强度的变化,从中推算出吡咯红G核-SZLF蛋白壳中吡咯红G的数量,并用于定量分析apoSZLF捕获吡咯红G数量和速率.在严格控制反应apoSZLF浓度和反应液体积基础上,构建纳米吡咯红G核-SZLF并分析释放

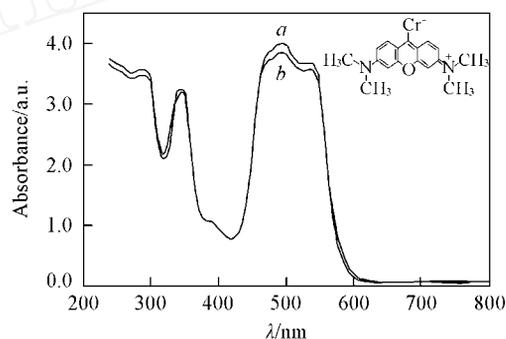


Fig 4 UV-Vis spectrogram of nanometer pyronine G core-SZLF

a Mixture of pyronine G and dissociate subunits of SZLF at pH=2.0; b nanometer pyronine G core-SZLF at pH=4.0
Inset: molecular structure of pyronine G

吡咯红 G 的速率, 获得了图 5 所示的结果. 图 5(A) 是构建纳米吡咯红 G 核-SZLF 过程的荧光发射光谱图 (激发波长 320 nm), 首先在 pH = 2.5 条件下, SZLF 亚基部分解离且混合一定量的吡咯红 G 后, 在 320 nm 激发波长作用下产生荧光光谱图 [图 5(A) 谱线 b]; 然后, 把反应介质的酸度中和到 pH = 4.0 或更高的 pH 值时, 此时游离的亚基迅速重组成 SZLF, 并在蛋白壳中心区域包裹了一定数量的吡咯红 G. 由于蛋白壳产生的光屏蔽效应, 将一定数量的吡咯红 G 包裹于蛋白壳内, 使溶液中的吡咯红 G 浓度降低, 造成荧光强度迅速减弱, 并获得图 5(A) 谱线 a 结果. 从图 4 结果可知, 已成功地构建了纳米吡咯红 G 核-SZLF, 进一步分析可知, 直接络合于铁蛋白蛋白壳外表层的吡咯红 G 仍然产生一定的发射光谱的强度, 即图 5 中光谱强度的变化值, 仅显示铁蛋白包裹吡咯红 G 的数量, 不包括直接络合于铁蛋白蛋白壳外表层上的吡咯红 G 数量.

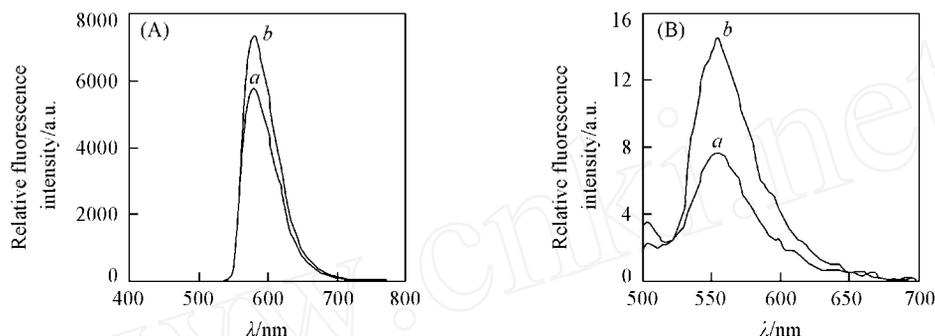


Fig 5 Fluorescence emission spectra of nanometer pyronine G core-SZLF and release of pyronine G

(A) Construction of nanometer pyronine G core-SZLF; a pH = 4.0; b pH = 2.5;

(B) release of pyronine G from the ferritin core; a pH = 7.0; b pH = 1.0

图 5(B) 是纳米吡咯红 G 核-SZLF 释放吡咯红 G 的发射荧光光谱图. 主要实验步骤如下: 首先将包装混合物在 pH = 7.25 的缓冲液中充分透析, 除去未结合的吡咯红和其它杂质分子, 通过离心和超滤除去变性的蛋白和未能牢固结合的染料分子. 将得到的包装复合物平均分成两份, 将其中一份加入 pH = 1.0 的 HCl, 使铁蛋白完全解离后离心取上清液, 另一份样品中加入等体积 $[V(\text{DDW}) = V(\text{HCl})]$ 的 DDW 作为参照. 2 份样品均未出现上述的紫外-可见分光特征吸收峰, 但仍有特征荧光发射峰图谱 [图 5(B)], 这是因为荧光分光光度法比紫外-可见分光光度法灵敏 (约 2~3 个数量级). 因包埋的染料分子荧光被蛋白壳所屏蔽, 未处理前样品的荧光完全由络合于蛋白壳外表面的吡咯红分子贡献 [图 5(B) 谱线 a], 而经 HCl 处理后溶液的荧光则是包埋在蛋白壳内部和络合在外表面吡咯红的总和 [图 5(B) 谱线 b]. 由于图 5(B) 谱线 b 的荧光强度明显大于图 5(B) 谱线 a, 说明纳米吡咯红 G 核-SZLF 已把捕获的纳米吡咯红 G 通过亚基解离方式同时释放于介质中.

对于稀溶液, 固定激发光波长、强度和液层厚度时, 物质发出的荧光强度和溶液的浓度成正比, 即 $I_f = K \cdot c$. 比较待测液与已知浓度的标准溶液的荧光强度, 可以求出待测液中荧光物质的浓度. 即 $I_x = I_{f_x} / I_{f_0} \times c_0$, 则 $c_x = I_x / I_{f_0} \times c_0$ (式中 c_x 为吡咯红 G 测定浓度; I_{f_x} 为吡咯红 G 产生的荧光强度; I_{f_0} 为荧光强度对照; c_0 为吡咯红 G 对照浓度). 根据图 5(B) 结果, $I_{f_{B-A}} = 6.86$, 选取一系列标准溶液中最接近于该荧光强度的一个样品 ($c_0 = 2 \times 10^{-3}$ mg/mL, $I_{f_0} = 9.03$) 作为基准物, 求得 $c_{B-A} = I_{f_{B-A}} / I_{f_0} \times c_0 = 6.86 / 9.03 \times 2 \times 10^{-3} = 1.48 \times 10^{-3}$ mg/mL, 即溶液中包埋入核的吡咯红 G 浓度. 已测得的铁蛋白最终浓度为 0.2 mg/mL. 已知吡咯红 G 分子量为 302.89, 铁蛋白分子量均约为 4.8×10^5 , 求得每个铁蛋白约包装 12 (11.727) 个吡咯红 G, 因此利用 apoSZLF 亚基解离与重组途径, 构建了纳米吡咯红 G 核-SZLF.

本组曾选用透射电子显微镜技术、亚基解离和重组途径, 研究 apoSZLF 包裹胰岛素于 apoSZLF 蛋白壳内, 构建纳米胰岛素核-SZLF^[11], 而本文选用圆二色性光谱和荧光光谱技术揭示构建纳米吡咯红 G 核-SZLF 的途径, 这些实验结果和论点可为构建纳米胰岛素核-SZLF 提供佐证, 并为后续构建高存量纳米顺铂核-铁蛋白药物载体提供可行性技术.

铁蛋白的分子结构由蛋白壳、铁核和横跨蛋白壳的隧道组成^[1,2]. 多数铁蛋白的铁核由数千分子

的铁氧化物和数百分子的无机磷酸盐组成, 这一异常特征给鉴定铁蛋白提供了许多分析技术. 目前, 已建立用于鉴定铁蛋白质的方法有释放铁动力学^[1,6]、铁核组成分析^[1,24]、TEM法^[17,25]及放射免疫分析法等. 目前, PMF是开展蛋白质组学研究的主要分析技术之一, 多用于鉴定未知蛋白质^[17,26]. 近期, 本课题组^[12,13]把 PMF和 MALDI-TOF/MS技术作为辅助性分析技术用于鉴定铁蛋白及亚基之间相互作用的强度. 随后, 这些分析技术也被其它铁蛋白课题组所采纳以鉴定铁蛋白^[4,27]. 但由于受现有的国内外各大数据库提供的铁蛋白鉴定信息的限制, 目前选用 PMF技术鉴定哺乳动物的铁蛋白的结果较为理想, 而鉴定海洋鱼类铁蛋白时却显示出低匹配率的结果. 本实验所需的 SZLF是采用事先经 PAGE和 SDS-PAGE分离, 并在分离胶中显示单条蛋白质层析带的样品. 说明实验样品纯度为电泳纯或质谱纯^[6]; 同时也发现了 SZLF蛋白壳由单类型亚基组成, 其结果不同于由 H和 L亚基类型组成的哺乳动物铁蛋白^[13]. 选用 PMF技术和 Ms-Fit网站 NCB Inr的数据库对 SZLF进行鉴定, 其鉴定结果与大西洋鲑 (*Salmo salar*)铁蛋白 H亚基有较高的匹配率, 其覆盖率为 39.8%. 如果用 Paws软件和马脾铁蛋白 L亚基序列直接进行比对分析, 其覆盖率约为 59%, 高于选用数据库鉴定的结果, 这些鉴定结果同样也说明了选用 PMF技术鉴定海洋动物铁蛋白时其鉴定结果为低覆盖率的特点, 还需要选用其它分析技术加以佐证.

参 考 文 献

- [1] Huang H. Q., Watt R. B., Frankel R. B., *et al.* Biochemistry[J], 1993, **32**: 1681—1687
- [2] Huang H. Q., Xiao Z. Q., Lin Q. M., *et al.* Anal. Chem. [J], 2005, **77**: 1920—1927
- [3] Johnson E., Cascio D., Sawaya M. R., *et al.* Structure[J], 2005, **13**: 637—648
- [4] Zeng Q. B., Reuther R., Oxsher J., *et al.* Bioinorg. Chem. [J], 2008, **36**: 255—260
- [5] Grady J. K., Zang J., Laue T. M., *et al.* Anal. Biochem. [J], 2002, **302**: 263—268
- [6] Huang H. Q., Lin Q. M., Wang T. L. Biophys. Chem. [J], 2002, **97**: 17—27
- [7] Shin K. M., Lee J. W., Wallace G. G., *et al.* Sensors Actuators B: Chem. [J], 2008, **133**: 393—397
- [8] Ensign D., Young M., Douglas T. Inorg. Chem. [J], 2004, **43**: 3441—3446
- [9] Butts C. A., Swift J., Kang S. G., *et al.* Biochemistry[J], 2008, **47**: 12729—12739
- [10] Simseknd E., Kilic M. A. Mag. Materials[J], 2005, **293**: 509—513
- [11] HUANG He-Qing(黄河清), CHEN Ping(陈平), ZHU Bin-Lin(朱斌琳), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2007, **28**(11): 2073—2077
- [12] HUANG Lin(黄琳), CHEN Xu(陈旭), LUO Lian-Zhong(罗联忠), *et al.* Chin. J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 2008, **36**(8): 1045—1050
- [13] Huang L., Lin Z. C., Lin Q., *et al.* Chem. Res. Chinese Universities[J], 2008, **24**(5): 550—556
- [14] Maria E. M., Rocha F. D., Brian B., *et al.* Arch. Biochem. Biophys. [J], 2003, **409**: 349—356
- [15] Kong B., Huang H. Q., Lin Q. M., *et al.* J. Prot. Chem. [J], 2003, **22**: 61—70
- [16] FENG Li-Jian(冯丽剑), HUANG Lin(黄琳), ZHUO Hui-Qin(卓慧钦), *et al.* Chin. J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 2008, **36**(5): 557—582
- [17] Kong B., Huang H. Q., Lin Q. M., *et al.* Applied Biochem. Biotechnol. [J], 2005, **126**: 133—147
- [18] HUANG Lin(黄琳), CHEN Dong-Shi(陈东仕), YAN Li(颜利), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009, **30**(2): 314—319
- [19] LI Guo-Chen(李国琛), WANG Yan-Hong(王颜红), WU Ren-An(吴任安), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2010, **31**(2): 269—273
- [20] CHEN Ping(陈平), HUANG He-Qing(黄河清), LIN Qing-Mei(林庆梅), *et al.* Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 2007, **35**(5): 667—671
- [21] HU Ju(胡菊), LAO Xia-Yun(廖夏云), DENG Jian-Jun(邓建军), *et al.* Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2009, **30**(10): 2003—2008
- [22] Huang H. Q., Lin Q. M., Kong B., *et al.* J. Prot. Chem. [J], 1999, **18**: 497—504
- [23] HUANG He-Qing(黄河清), HU Xiao-Hui(胡晓慧), FANG Xue-Ping(方雪萍), *et al.* Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) [J], 2009, **37**(5): 631—635
- [24] Revenant M. C., Goudable J., Besudonnet A., *et al.* Clin. Chem. [J], 1985, **31**: 640—642
- [25] Pierre T. G. S., Chan P., Bauchspiess K. R., *et al.* Coord. Chem. Rev. [J], 1996, **151**: 125—143

- [26] Zhuo H. Q., Huang L., Feng L. J., *et al.* Anal Biochem. [J], 2008, 378: 151—157
[27] Giorgi A., Mignogna G., Bellapadrona G., *et al.* Arch Biochem Biophys [J], 2008, 478: 69—74

Construction Mechanism of Nanometer Pyronine G Core-Ferritin Revealed with Circular Dichroism and Fluorometry

CHEN Ying-Ying¹, HUANG Lin^{1,3}, JI Xue-Tao¹, LI N Qing¹, CHEN Ping¹,
KE Cai-Huan², HUANG He-Qing^{1,2,3*}

(1. Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences,

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science,

3. Key Laboratory of Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry & Chemical Engineering,
Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract Liver ferritin of *Sphyma zygaena* (SZLF) with electrophoresis purity was prepared in batch to study its structure and function in batch. Under the condition of pH = 2.0—10.0, circular dichroism and fluorometry were used to study the primary structural characteristics and change trend of secondary structure conversion both SZLF and apoSZLF, respectively, and revealed the stability, the interaction intensity, and the unfold behavior among subunits of SZLF shell. Using the approach of acidic and basic neutralization, the subunits of protein shell in SZLF can be disassociated, and these subunits disassociated can be also recombined into another new complete ferritin again, which sets up a reasonable technology for constructing a nanometer pyronine G core-ferritin (NPGCF). Both UV-Vis spectrophotometry and fluorometry were used to study the construction pathways of NPGCF, giving quantitatively twelve pyronine G molecules that were directly trapped into its protein shell for constructing NPGCF by each apoSZLF molecule. In addition, these techniques not only analyze both the pathway and the rate for trapping and releasing pyronine G, but also construct another new drug carrier of nanometer cisplatin core with high carrying capacity-ferritin.

Keywords Ferritin; Structure conversion; Nanometer pyronine G core-ferritin; Spectrum analysis

(Ed : A, G)

第二届太阳燃料和太阳电池国际会议征稿通知

第二届太阳燃料和太阳电池国际会议,即第十五届国际光合作用大会的会后会,将于2010年8月28~31日在美丽的滨海城市——大连举行。本次会议由中国科学院大连化学物理研究所和大连理工大学联合举办,届时将有数十位国际和国内著名的太阳能研究领域的专家、学者莅临与会并做大会报告。值此盛会即将召开之际,我们诚挚地邀请您的参加,并热切期待与您的交流。

本次会议的主题将围绕当前太阳能利用研究中的两个最主要的发展方向——太阳燃料和太阳电池来进行,具体讨论的主要议题有:(1)人工光合作用制备太阳燃料,包括光催化分解水制氢、光催化还原二氧化碳等前沿应用基础科学问题;(2)太阳能光化学转化中遇到的瓶颈科学问题;(3)太阳电池研究新技术、新材料、新工艺等。更多详情请登陆以下相关网站:

中国科学院大连化学物理研究所: <http://www.canli.dicp.ac.cn/News/news20100401.htm>

大连理工大学: <http://finechem.dlut.edu.cn/2nd-International-Symposium-on-Solar-Fuels-and-Solar-Cells/>

联系方式:

韩洪宪博士(学术),中国科学院大连化学物理研究所催化基础国家重点实验室503组,邮政编码:116023;电话:0411-84379302;传真:0411-84374447;电子邮箱:hxhan@dicp.ac.cn

方堃女士(会务),电话:0411-84379307;传真:0411-843794447;电子邮箱:kunfang@dicp.ac.cn