

电泳/质谱技术研究鲨鱼肝铁蛋白及亚基多聚体特性

陈平¹ 黄河清^{*1,3} 林庆梅² 陈旭¹ 黄慧英^{1,3}

(¹ 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

² 近海海洋环境科学国家重点实验室, ³ 福建省化学生物学重点实验室, 厦门 361005)

摘要 改良鲨鱼肝铁蛋白 (liver ferritin of *Sphyrna zygaena*, SZLF) 分离技术, 并结合非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳 (NGPAGE) 制备质谱纯 SZLF, 以维系铁蛋白分子和它的亚基之间的作用类型, 供研究铁蛋白结构与功能。实验结果表明, SZLF 由分子量约为 20 kDa 的单类型亚基组成。SZLF 和它的亚基均组成不同的聚合体。聚合体类型和聚合数目与铁蛋白亚基和分离介质有关。MALD-FTOF 质谱仪的激光和基质协同能有效解吸 SZLF 中的亚基成为准分子离子, 并供质量分析, 其亚基特征质谱峰 m/z 值分别为 10889.35 和 22030.45, 确定为带双电荷 $[M + 2H]^{2+}$ 和单电荷 $[M + H]^+$ 的 SZLF 亚基分子量。SDS-PAGE 和变性 IEF 技术研究指出, 形成不同聚合态的 SZLF, 其分子之间的相互作用强度高于 SZLF 亚基自身, 难以通过 MALD-FTOF 质谱技术测定其亚基的结构信息。尽管 SZLF 由单类型亚基组成, 但它能通过聚合体和自身亚基之间的相互作用差异性发挥极其重要的生理功能。

关键词 铁蛋白, 多聚体, 质谱, 亚基

1 引言

大多数动植物及微生物均含有铁蛋白。铁蛋白的主要生理功能是为细胞合成含铁的酶蛋白提供铁源, 并储存细胞内过剩铁离子, 避免产生铁中毒^[1, 2]。SDS-PAGE、毛细管电泳、HPLC 等分析技术的研究已表明, 多数哺乳动物铁蛋白蛋白壳由 H 和 L 亚基类型组成, 而细菌铁蛋白 (bacterial ferritin, BF) 却由单类型亚基和血红素组成^[3~6]。H 亚基在铁的矿化和铁核晶体形成过程中起主要作用, 而 L 亚基可提供酸性残基以促进或加速铁的成核。由单类型亚基组成的 BF 和 SZLF^[2, 6], 如何实行与调控储存铁与释放铁的途径和机理至今尚不清楚。饱和硫酸铵沉淀法是目前提取铁蛋白的关键步骤之一^[1, 2]。但该方法, 有可能明显地改变铁蛋白亚基表面电荷的分布, 消除或减少亚基之间不同聚合态的形成, 尤其是由单亚基类型组成的铁蛋白, 从而限制了深入研究不同亚基聚合态与铁蛋白之间生理功能的对应关系。改变现有的铁蛋白提取与分离方法可有效地维系铁蛋白原有的亚基之间的相互作用强度和聚合态, 它对研究不同聚合态的铁蛋白或由不同聚合态亚基的铁蛋白调控释放与储存铁的途径和机理起着极其重要的作用。本实验采用改良的铁蛋白提取与分离技术, 在制备质谱纯 SZLF 同时, 维系了 SZLF 原有的亚基之间聚合态, 并采用电泳和质谱技术阐明了不同聚合态铁蛋白或不同聚合态亚基的铁蛋白, 在参与释放和储存铁过程中所起的重要作用^[9]。相关的研究, 尚未见详细报道。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

REFLEX 型基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱仪 (德国 Bruker 公司)。超滤离心管截留分子量分别为 10 kDa、100 kDa, 最大上样量 0.5 mL (Millipore 公司); DYY-2 型稳压稳流电泳仪 (北京六一仪器厂)。

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺等电泳试剂 (Sangon 公司); 参考样品马脾铁蛋白 (HSF, 美国 Sigma 公司); 两性电解质载体 pH 3.0 ~ 9.5、pH 4 ~ 6、pH 5 ~ 8 (北京军事医学科学院); 牛血清白蛋白 (BSA,

2006-08-15 收稿; 2006-11-03 接受

本文系国家自然科学基金 (No. 30470372) 和厦门大学预研基金 (No. 20004xdcx207, xdkicx2005 1009) 资助项目

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

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);SDS分子量标准 Marker(Signa公司);2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、2-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、芥子酸(SA)均购于美国 ICN 生物医学公司。

2.2 制备粗铁蛋白

参考文献[7,8],对粗铁蛋白的制备方法作了改进:鲨鱼肝脏去除脂肪组织及膜系物后,以1:1:2(m/m)的比例加入去离子水,用组织捣碎机高速捣碎鱼肝组织成匀浆(约15 min),随后迅速把匀浆液置于75℃恒温水浴锅中,热处理20 min,间歇搅拌,使绝大多数非耐热蛋白质变性和沉淀。随后将破碎液置于4℃冷却至室温,并高速离心(15000 r/min)30 min,收集的上清液于4℃放置过夜,吸去表层油脂后,再经25000 r/min离心20 min,收集上清液备用。将上清液分装到1000 mL的烧杯中(溶液厚度 <1 cm),用6层纱布妥善密封后,置于-20℃冷冻成固体后,冷冻干燥2~3天,至样品完全成干粉状。

2.3 铁蛋白的纯化

将上清干粉加入适量0.025 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.25)溶解后,透析过夜,以12000 r/min离心15 min,弃沉淀。然后用Tris-HCl(0.025 mol/L, pH 7.25)缓冲液预平衡过的DEAC-52(2.0 cm \times 25.0 cm)纤维素柱分离,并用上述Tris-HCl缓冲液洗脱,去除大部分与DEAC-52亲和力较弱的杂蛋白后,再分别用0.10、0.15、0.20和0.25 mol/L NaCl(0.025 mol/L Tris-HCl缓冲液, pH 7.25)洗脱。波长280 nm监测,部分收集器收集每个洗脱峰。纯化后的铁蛋白再次透析、脱盐、浓缩,再经DE-52离子交换层析柱(2.0 cm \times 20.0 cm),并用含0.25 mol/L NaCl的Tris-HCl缓冲液(pH 7.25)洗脱分离纯化。铁蛋白铁核中的铁磷含量参考文献[1,9]。铁蛋白释放铁的动力学过程参考文献[10]。

纯化后的蛋白脱盐、离心,冻干浓缩后,用最小量的DDW(double distilled water)溶解,离心去除沉淀表层的油脂。以4:1(m/m)加入天然样品于Tris-HCl缓冲液(pH 7.25)后,进行天然梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳(ND-PAGE)(100 V, 4℃, 12 h),电泳结束,将铁蛋白条带切成1 mm \times 1 mm,再用适量的DDW浸泡,在4℃下存放48 h以上,去除碎胶块,得到的铁蛋白经100 kDa超滤管超滤20 min,备用。

经梯度胶分离纯化后的铁蛋白样品,经5%天然聚丙烯酰胺电泳(70 V/120 V, 4℃, 80 min)进一步纯化。按常规切胶、浸泡、提取、超滤方法获得电泳纯铁蛋白样品,备用。

2.4 分离与测定铁蛋白亚基分子量

SDS变性聚丙烯酰胺凝胶电泳采用Tris甘氨酸不连续电泳体系(浓缩胶pH 6.8,分离胶pH 8.9),SDS聚丙烯酰胺电泳中浓缩胶浓度5%,分离胶浓度15%,浓缩胶电压70 V,分离胶200 V,电泳在4℃下进行。铁蛋白与SDS样品缓冲溶液以1:4混合后,100℃煮5 min,离心后用于电泳。考马斯亮蓝染色和脱色方法:同天然电泳。凝胶成像系统扫描确定亚基分子量及亚基组成比。

2.5 MALDI-TOF质谱分析 SZLF

样品和饱和基质溶液按1:1(V/V)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,设置激光相对强度为50%,分子量80 kDa,进行样品分析。分析采用带DE(delayed extraction)的线性模式。铁蛋白的肽指纹图谱分析参考文献[11]。利用网上数据库(Swiss-Prot and TrEMBL)对肽质量指纹图谱进行检索分析与鉴定。

3 结果与讨论

3.1 多聚态 SZLF 制备

目前,铁蛋白提取与分离主要采取饱和硫酸铵沉淀法,中和蛋白壳外表面电荷,使铁蛋白高度聚集而沉淀,无法维持原有的电荷数目和聚合状态。为了尽可能保持铁蛋白蛋白壳外表面原有的电荷数目及功能,实验对常见的铁蛋白制备技术进行改良(见2.2节),删除饱和硫酸铵沉淀步骤。改良鲨鱼肝铁蛋白(SZLF)粗制品经2次DEAE-52纤维素层析柱分离后,获得3个典型的蛋白样品峰(见图1),并分别收集样品。采用考马斯亮蓝染色和铁染色后,发现图1中样品A和B含有蛋白质,并呈现铁染阳性现象;图1中样品C呈现铁染阴性。采用铁蛋白释放铁动力学研究,发现图1中样品A和B均表现

类似于铁蛋白释放铁的过程和规律,推测其样品可能含有 SZLF。参比图 1 中样品 A 和 B 的保留时间,可获悉两者之间样品色谱峰保留时间相差约 280 min。这与两者蛋白质之间可交换的离子数目不同有关,因而推测图 1 中样品 A 和 B 可能由不同聚合态的 SZLF 组成,图 1 中样品 B 的 SZLF 可能由高于二聚体以上的 SZLF 组成,其可交换的阴离子数目明显多于 SZLF(图 1A)。为了证实这一论点,实验选用 ND-PAGE 技术进一步分离 SZLF 粗样品组分。

图 2 是采用非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(ND-PAGE)分离图 1 中样品 A 和 B 的混合物。图 2 中有 4 条不同迁移率的蛋白质带,表明该样品中至少含有 4 种不同分子结构或不同种类的蛋白质组成。进一步采取铁染色和释放铁动力学研究发现,图 2 中样品 A、B 和 C 均显示出铁蛋白基本特性,说明样品可能是铁蛋白。参考标准的 DALF(liver ferritin of *dasyatis akajei*)样品迁移率(图 2-1),同样也说明了 2C 可能是铁蛋白。而 2B 和 2C 样品可能是由不同聚合态的铁蛋白组成。电泳纯 DALF 样品(图 2-1)中同样也呈现出不同聚合态铁蛋白,这一现象进一步证实图 2-2 实验结果的可靠性。采用肽指纹技术分别鉴定图 1 和图 2 中 A、B 和 C 所对应的蛋白质,其鉴定结果均属于铁蛋白。

3.2 SZLF 多聚体质谱特性

铁蛋白蛋白壳由 24 亚基组成,其亚基分布具有高对称性特点^[12,13]。MALDI-TOF 质谱仪的激光在基质辅助下能解离铁蛋白蛋白壳中的亚基成分分子离子,并供质谱仪分析^[2]。根据上述分析原理和依据,采用电渗法技术分别分离图 2A-C 中不同聚合态的铁蛋白,并采用 MALDI-TOF 质谱技术给予逐一测定,获得图 3 结果。由图 3A、B 和 C 结果中,可看出只有图 3C 的 SZLF 中的亚基被激光和基质解吸成分子离子,供质谱检测,并获得带双电荷和单电荷的亚基(M),其分子式为 $[M + 2H]^+$ 和 $[M + H]^+$;分子量分别为 11836.64 和 22030.45 Da,略高于 SDS-PAGE 方法和 MALDI-TOF 质谱法所获得的实验结果^[2]。此外,图 3A-B 却未显示出 SZLF 的亚基特征质谱峰(分子量 80 kDa,图中只给出有质谱峰的部分,无峰部分略去),这一现象说明了由于不同聚合态 SZLF 之间的亚

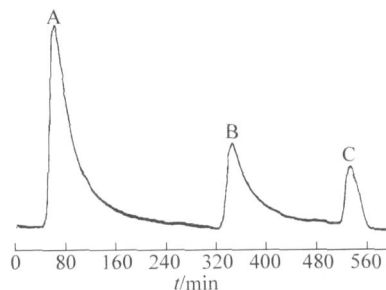


图 1 柱层析法分离 SZLF 的洗脱曲线

Fig 1 Elution profile of crude liver ferritin of *sphyra zygaena* (SZLF) separated with column chromatography

A. 洗脱剂 (eluant) 0.15 mol/L NaCl; B. 洗脱剂 (eluant) 0.20 mol/L NaCl; C. 洗脱剂 (eluant) 0.25 mol/L NaCl

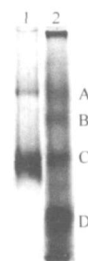


图 2 粗 SZLF 样品的 ND-PAGE 图谱

Fig 2 Non-denaturing (ND)-PAGE analysis from the crude sample of SZLF

1. 鱼缸肝铁蛋白 (live ferritin of *dasyatis akajei*) (DALF); 2. 粗鲨鱼肝铁蛋白 (crude SZLF)。

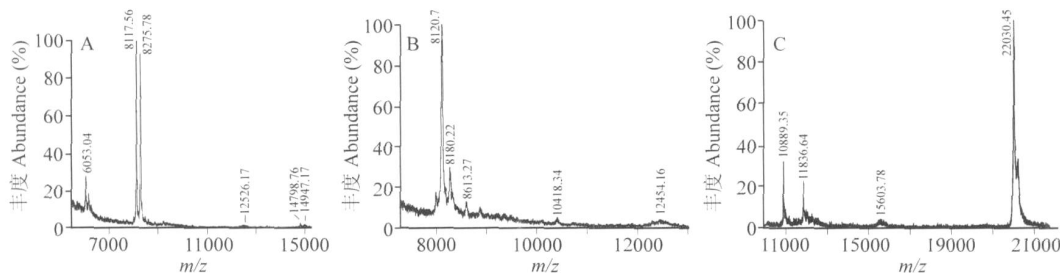


图 3 不同聚合态 SZLF 质谱图

Fig 3 Mass spectrum of SZLF with different polymers

A、B、C 分别为图 2A、2B 和 2C 样品 (are the sample extracted from Fig 2 A, B and C, respectively)。

基相互作用强度高于单分子 SZLF 自身亚基作用力,使激光和基质难于解吸多亚基聚合体为分子离子,

但能解吸络合在 SZLF 蛋白壳外表层的多肽成多肽离子,并供质谱分析(图 3A-B)。由此可见,不同 SZLF 分子之间的亚基相互作用力大于单 SZLF 蛋白壳亚基之间的作用力。为了证实单 SZLF 蛋白质壳亚基之间是否也存在着不同聚合态亚基,实验采用 SDS-PAGE 研究 SZLF 亚基之间的相互作用强度,它对今后开展铁蛋白亚基的解离和重组途径与机理研究起着极其重要的作用。

3.3 SZLF 亚基聚合态特性

3.3.1 SDS-PAGE 法分离 SZLF 亚基 SDS-PAGE 研究指出,电泳纯的 SZLF 由单类型亚基组成,其亚基分子量约为 20 kDa(图 3),略小于哺乳动物铁蛋白的 H 亚基(21 kDa),但大于 L 亚基(19 kDa)的分子量^[14,15]。为了了解 SZLF 亚基是否也含有不同聚合态结构,实验采用电转移技术分别获取图 2C 单分子铁蛋白样品,并采用 SDS-PAGE 技术给予分离,获得图 4 结果。实验结果表明, SZLF 分子显示出 3 条亚基蛋白层析带,其分子量约为 20、40 和 60 kDa。采用肽指纹分析技术分别鉴定图 4A-C 样品均为铁蛋白。结果表明, SZLF 蛋白壳中的亚基也存在着不同聚合态特性。从图 1~图 4 的实验结果,证明鲨鱼肝铁蛋白和它的亚基由不同聚合态组成,但这些铁蛋白一旦受 SDS 处理后,其结果不仅均显示出分子量为 20 kDa 的亚基组成,而且还伴随着各种各样由不同亚基聚合而成非完整铁蛋白分子结构的高聚体。表明解离后的 SZLF 亚基易在适当的条件下,可自发结合成多聚体。这一现象为今后深入研究铁蛋白解离与快速组装提供科学依据。

3.3.2 变性 IEF 分离 SZLF 亚基 双向凝胶电泳技术是目前开展蛋白质组学最常见的蛋白质组分离技术,即第一向为变性 IEF,第二向为 SDS-PAGE 的分离技术^[18]。实验采用第一向变性 IEF 技术分离电泳纯 SZLF,结果见图 5。从图中可看出,由单类型亚基组成的 SZLF 在经变性 IEF 分离后,显示出 8 条不同等电点的蛋白质层析带,其等电点分别为 4.67、4.73、4.77、4.84、5.02、5.13、5.20 和 5.37。这一现象说明了在变性 IEF 分离条件下,部分亚基自发形成 8 种不同聚合态,由此形成不同的等电点的亚基多聚体。不同的聚合体和聚合数目不仅与 SZLF 自身亚基组成与结构有关,而且还与分离介质或方法有关。例如:SDS-PAGE 和变性 IEF 分离有关,图 4 与图 5 所获得 SZLF 亚基聚合体类型与数目明显不同。铁蛋白蛋白壳的亚基和具有协同作用的铁蛋白聚合体结构对铁蛋白重组及发挥生理功能可能起着极其重要的作用。

铁蛋白分子结构由蛋白壳,铁核和物质交换隧道组成。铁核位于蛋白壳中心区域。铁蛋白蛋白壳由 24 个亚基高度对称性组成。在 pH 2.0~11.0 介质中,铁蛋白难于产生变性现象,它的铁核由数千铁离子和数百磷酸盐组成。铁蛋白蛋白壳分子量约为 440 kDa,铁核质量约为 220 kDa,但铁蛋白和脱铁核铁蛋白却显示出相似的电泳迁移率,即位于铁蛋白中心区域的铁核不影响电泳迁移率^[7]。脱铁核 DALF 未发现多聚体现象,这说明铁核组成对铁蛋白之间形成多聚体起着重要作用^[16]。此外,与自然界绝大多数蛋白质不同之处是铁蛋白在物理电极上能接受电子,并用于氧化还原反应。由于铁蛋白分子结构的特殊性,在采用 MALDI-TOF 质谱技术测定铁蛋白过程中,所获得的质谱峰是属于铁蛋白亚基或全蛋白,仍然有待于采用其它技术给予证实。相关研究需要进一步拓展多种新颖分析技术,才能更加科学合理地阐明图 3C 的实验结果,同时也为今后拓展采用 MALDI-TOF 分析质谱技术研究各类蛋白质之间亚基稳定性和大蛋白质分子量测定提供科学依据和可

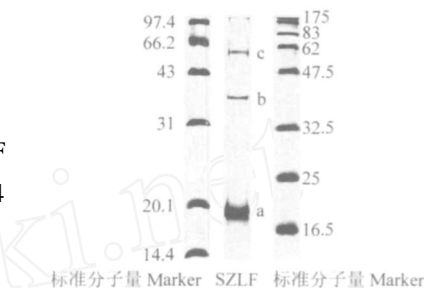


图 4 SZLF 亚基聚合体 (SDS-PAGE 法)

Fig 4 Polymers of SZLF subunits (SDS-PAGE approach)

a 亚基单体 (monomer of subunit); b 亚基二聚体 (dimer of subunits); c 亚基三聚体 (trimer of subunits)。

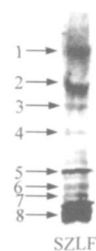


图 5 SZLF 亚基多聚体 (变性 IEF 法)

Fig 5 Polymers of SZLF subunits (denatured IEF approach)

IEF: 1. 4.67; 2. 4.74; 3. 4.77; 4. 4.84; 5. 5.02; 6. 5.13; 7. 5.20; 8. 5.37。

行性分析技术,尤其是针对异常蛋白质,例如铁蛋白和金属硫蛋白等。

References

- Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, Chen P. *Anal Chem.*, **2005**, 77(2): 1920 ~ 1927
- Huang H Q, Xiao Z Q, Chen X, Lin Q M, Cai Z, Chen P. *Biophys Chem.*, **2004**, 111(1): 213 ~ 222
- Omio K, Uehara M, Okano S, Watanabe K. *Biomaterials*, **2006**, 19: 315 ~ 322
- Suryakala S, Deshpande V. *Veterinary Res Commun.*, **1999**, 23: 165 ~ 181
- Zhao Z, Malik A, Lee M L. *Anal Biochem.*, **1994**, 218: 47 ~ 54
- Huang H Q, Lin Q M, Zhang F Z, Chen C H, Chen X, Chen Z. *Bioelectrochem. Bioenergetics*, **1999**, 38: 87 ~ 93
- Kong B, Huang H Q, Lin Q M, Kim W, Cai Z, Cao T M, Miao H, Lou D M. *J. Proteomics*, **2003**, 22: 61 ~ 70
- Geetha C, Deshpande V, Comp. *Biochem. Physiol (Part B)*, **1999**, 123: 285 ~ 294
- Huang H Q, Lin Q M, Kong B, Zeng R Y, Qiao Y H, Chen C H, Zhang F Z, Xu L S. *J. Proteomics*, **1999**, 18(4): 497 ~ 504
- Chen Ping(陈 平), Huang Heqing(黄河清), Yan Li(颜 利), Huang Hening(黄河宁), Yang Tianci(杨天赐), Zhou Changyi(周常义). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica(生物物理学报)*, **2004**, 20: 285 ~ 289
- Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, Lin Q M, Cai Z. *Aquatic Toxicol.*, **2006**, 78: 127 ~ 135
- Meldrum F C, Heywood E R, Mann S. *Science*, **1992**, 257: 522 ~ 523
- Arosio P, Adelman T G, Drysdale J W. *J. Biol. Chem.*, **1978**, 253: 4451 ~ 4458
- Durand J P, Goudard F, Pieri J, Escoubas J M, Schreiber N, Cadoret J P. *Gene*, **2004**, 338: 187 ~ 195
- Watanabe K, Hayashi K, Miyamoto T, Tanaka, M, Okano S, Yamamoto S. *Biomaterials*, **2000**, 13: 57 ~ 63

Polymer Characteristics of Shark Liver Ferritin and Its Subunits by Electrophoresis and Mass Spectrometry

Chen Ping¹, Huang He-Qing^{*1,3}, Lin Qing-Mei², Chen Xu¹, Huang Hui-Ying^{1,3}

¹The Key Laboratory for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of the Ministry of Education, School of Life Sciences,

²State Key Laboratory of Marine Environmental Science,

³Chemical Biology Laboratory of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract An analytical technology from the Liver ferritin of *Sphyma zygaena* (SZLF) has been modified for maintaining original interaction types both ferritin and its subunits for studying on the structure and function. A non-denaturing degrade polyacrylamide gel electrophoresis (ND-PAGE) was used to produce SZLF with high purity for analysis of mass spectrometry (MS). It was found that there were different polymers both SZLF and its subunits. The types and numbers of polymers were connected with the protein subunits and the separation medium. The laser come from the MALDI-TOF/MS and matrix has capacities for making the subunits of ferritin into molecular ions for mass analysis, indicating that m/z of two representative peaks are 10889.35 and 22030.45, called $[M + 2H]^{2+}$ with double charge and $[M + H]^+$ with single charge. Both SDS-PAGE and ND-PAGE revealed that the interaction intensity of SZLF with different polymer are higher than that of single protein itself, which resulted in the structural information of subunit from the SZLF were difficult to be determined by MALDI-TOF/MS. Even the protein consists of single subunit type, the polymer interaction both SZLF and its subunits still play an important role in carrying out its physiological functions.

Keywords Ferritin, polymer, mass spectrometry, subunit

(Received 15 August 2006; accepted 3 November 2006)