

# 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 研究人血清转铁蛋白稳定性及裂解产物

卓慧钦<sup>1</sup> 金宏伟<sup>2</sup> 黄河清<sup>\* 1,3</sup> 黄慧英<sup>1,3</sup> 蔡宗菁<sup>4</sup>

(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<sup>1</sup>,  
附属中山医院临床检验中心<sup>2</sup>, 化学生物学福建省重点实验室<sup>3</sup>, 厦门 361005)  
<sup>4</sup>(香港浸会大学化学系, 香港 999077)

**摘要** 制备质谱纯人血清转铁蛋白(HTF),供分子结构分析。选用 SDS-PAGE、胶内酶解、基质辅助激光解吸/电离质谱技术(MALDI-TOF)、数据库检索和比对技术鉴定铁饱和 HTF、双铁 HTF(HTF-2Fe<sup>3+</sup>)、单铁 HTF(HTF-Fe<sup>3+</sup>)和脱铁 HTF(apHTF)的稳定性和裂解产物。以乙腈溶液作为洗脱相,发现铁饱和 HTF在 RP-HPLC分离纯化过程中产生裂解现象。铁饱和 HTF和 HTF-2Fe<sup>3+</sup>经乙腈处理后均能产生不同分子量的短肽裂解产物,指出 HTF结构稳定性与络合铁离子数量有关。铁组分改善了 HTF分子结构的稳定性。采用比对法,研究在乙腈作用下 HTF裂解成为各种各样短肽的规律,初步阐明其裂解机理。在乙腈作用下,HTF可能通过蛋白质去折叠途径,形成不同多聚态 HTF或多肽裂解产物。推测目前用于临床诊断先天性糖基化紊乱(CDG)和慢性酒精滥用(CAA)疾病低准确率的原因可能是受 HTF裂解产物或多聚体的干扰。

**关键词** 血清转铁蛋白,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱,胶内酶解,反相高效液相色谱,标志蛋白质

## 1 引言

转铁蛋白(transferrin, TF)是一类非血红素结合铁的 $\beta$ 球蛋白,由单一肽链组成,糖基化约占6%,主要存在于脊椎动物体内。血清转铁蛋白、卵转铁蛋白、乳铁蛋白和黑素转铁蛋白共同组成转铁蛋白家族,家族成员多数具有结合铁离子的同源性末端(C和N-端)<sup>[1,2]</sup>。HTF的主要生理功能是负责运输铁或协助调节机体的铁平衡<sup>[3]</sup>。HTF在C-端结构域具有两个N-连接的糖基化位点,分别位于Asn<sub>413</sub>和Asn<sub>611</sub><sup>[4]</sup>;根据N-连接寡聚糖链末端的唾液酸数目不同,又可分为双触角、三触角、四触角结构<sup>[5]</sup>。糖链缺乏转铁蛋白(carbohydrate-deficient transferrin, CDT)通常作为诊断先天性糖基化紊乱(CDG)和慢性酒精滥用(CAA)的重要蛋白质标记物<sup>[6-8]</sup>;而等电聚焦技术(IEF)是用于诊断CDT最常用方法,也是诊断CDG的标准之一。此外,免疫比浊法和离子交换色谱法均适合于测定CDT患者血清中HTF相对含量。由于HTF和它的同分异构体的IEF迁移率很靠近,且样品预处理步骤繁琐,因而时常引起假阳性诊断结果<sup>[6-8]</sup>。本研究通过非变性梯度PAGE、不连续PAGE电泳和电转移回收胶内蛋白等方法,获得质谱纯HTF。采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)与质谱非在线联用技术研究HTF的组成、分子结构、裂解产物和稳定性等理化特性,旨在为今后提高诊断CDG和CAA疾病准确率或降低假阳性率提供科学合理的诊断技术,并为今后深入研究HTF转铁途径和机理提供分子结构信息。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器、试剂与材料

Reflex型MALDI-TOF质谱仪(德国Bruker公司);1100高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司)。基质芥子酸(SA)、2-氰-4-羟肉桂酸(CHCA)和2,5-二羟基苯甲酸(DHB)(美国ICN生物医学公司);三氟乙酸、乙腈(纯度为99%)属于HPLC级(TEDIA公司);电泳试剂(丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺等)均购于上海生物工程有限公司。

2006-10-25收稿;2007-01-31接受

本文系国家自然科学基金(N030470372)和厦门大学预研基金(Na2004xdex207, xdkicx20051009)资助项目

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

健康人群的血清(厦门大学附属中山医院临床检验中心):取 50 份不同人的血清样品混匀,起到消除个体之间的非疾病引起的差异性,样品在  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 2.2 实验方法

**2.2.1 非变性梯度 PAGE 制备 HTF** 取人血清约为 8 mL,每 mL 血清中加入 25  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$  (500 mmol/L)和 18  $\mu\text{L}$   $\text{FeCl}_3$  (10 mmol/L)混匀<sup>[7]</sup>,随后置于  $37^{\circ}\text{C}$  2 h。经铁饱和后的血清样品与缓冲液(样品缓冲液 1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8) 600  $\mu\text{L}$ ,甘油 5 mL,1% 溴酚蓝 1 mL,超纯水 3.4 mL)以 4:1(V/V)混匀,放置 0.5 h 后离心 10 min。经粗分离后的 HTF 选用梯度(4%~10%)PAGE (gradient PAGE, PAGE<sub>NG</sub>)再次分离,其中浓缩胶工作电压为 80 V,分离胶工作电压为 100 V,分离时间 10~12 h。电泳后,层析胶上呈现清晰可见的桔红色蛋白带;沿条带边缘切下,并将条带切成小胶块,采用电转技术(100 V)电转、收集 HTF。用截留分子量为 50 kDa 的超滤管,超滤 8~10 次。在此期间不断补充超纯水。浓缩后的 HTF 用 5% PAGE 进行第二次电泳分离。自制微量收集装置:将 50 kDa 超滤管直接放入电转仪阳极端,上方放置切去底部的装有胶块的离心管,直接收集蛋白。电转结束后同样超离收集样品。

**2.2.2 HTF 纯度和分子量测定** 选用分离胶为 8% 的 PAGE 鉴定 HTF 纯度。HTF 和 DHB(水的饱和溶液)各取 1  $\mu\text{L}$ ,混匀后取 0.8  $\mu\text{L}$  混合物直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上,待样品自然干燥后,将样品靶放入靶箱内进行分析(MALDI-TOF Reflex 型, Bruker, 德国)。选用脉冲氮激光(337 nm)离子源,线性模式,加速电压控制在 20 kV,脉冲宽度 2 ns,离子延迟时间 40  $\mu\text{s}$ ,真空度  $5.33 \times 10^{-5}$  Pa 正离子谱测定。多肽测定选用 SA 基质(新鲜配制的饱和溶液,溶剂为 45% 乙腈和 55% 的 0.1% 三氟乙酸水溶液)为基质,供质谱分析<sup>[9]</sup>。

**2.2.3 转铁蛋白的全蛋白胶外酶解** 1  $\mu\text{L}$  10 g/L 转铁蛋白样品,加入 30  $\mu\text{L}$  乙腈于室温作用 30 min 抽真空除去乙腈,加入 10 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇,在  $57^{\circ}\text{C}$  条件下孵育 1 h,蒸干。用 20  $\mu\text{L}$  50 mmol/L 的  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  再次溶解,适当地振荡、超声,加入适量胰酶,  $37^{\circ}\text{C}$  酶解 18 h,酶解完毕后用 0.5% 三氟乙酸终止反应,蒸干。最后用 2  $\mu\text{L}$  0.5% 三氟乙酸(TFA)溶液溶解肽片段,质谱分析,基质为新鲜配制的 CHCA(用 40% 乙腈和 60% 的 0.1% 三氟乙酸溶解到饱和)。采用高分辨率反射模式,脉冲宽度 0.5 ns,离子延迟时间 20  $\mu\text{s}$ ,其它参数设定同上。数据库检索是在 MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)检索网站,检索参数为:最大允许肽质量误差 0.3,允许有 1 个不完全裂解位点,考虑羟甲基(Hydroxymethyl)和氧化(Oxidation)修饰。

**2.2.4 RP-HPLC 分离及乙腈处理后的转铁蛋白质谱特性** apdHTF 的制备参照文献[10]中脱铁核铁蛋白的制备方法。HTF- $2\text{Fe}^{3+}$  为血清经过铁饱和后提取得到的蛋白样品。铁饱和 HTF 是 HTF- $2\text{Fe}^{3+}$  经铁过饱和后获得,方法同血清铁饱和。铁饱和 HTF、HTF- $2\text{Fe}^{3+}$  和 apdHTF 分别进行 RP-HPLC 梯度洗脱,洗脱相 A(2% 乙腈,98% 去离子水,0.1% 甲酸,0.02% TFA),洗脱相 B(95% 乙腈,5% 去离子水,0.1% 甲酸,0.02% TFA),洗脱时间 30 min,洗脱相 B 的比例由 40% 上升到 60%,流速为 0.5 mL/min,检测波长 280 nm,收集样品,真空干燥,质谱分析。铁饱和 HTF、HTF- $2\text{Fe}^{3+}$  和 apdHTF 各取 2  $\mu\text{L}$ ,用 30  $\mu\text{L}$  乙腈室温下处理 0.5 h,质谱分析。

## 3 结果与讨论

### 3.1 HTF 制备与纯度鉴定

图 1A 是经预分离后的人血清蛋白质通过天然梯度 PAGE<sub>NG</sub> 进一步分离后的电泳图谱。由于人血清 HTF 属于含铁和高丰度特性的蛋白质,蛋白质颜色呈桔红色,易于肉眼观察。采用铁染色和对比法,易从图 1A 分离胶中剥离出 a 条带,再次经 PAGE 分离得到图 1B 蛋白质层析带。参考图 1B 中所显示的蛋白质层析带的数目、位置和分辨率,可清楚看出 HTF 与其它蛋白较好的分离。图 1C 结果证实了从图 1B 中剥离的桔红色条带的纯度,同时看出其迁移率明显高于马脾铁蛋白(Horse spleen ferritin HSF),即 HTF 分子量明显小于 HSF(图 1D)。

### 3.2 MALDI-TOF 质谱技术测定 HTF 的分子量和聚合态

近期研究表明, 采用 MALDI-TOF 质谱技术能有效地测定蛋白质 (铁蛋白亚基) 及有机小分子 (儿茶素) 聚合物<sup>[11-12]</sup>。采用 MALDI-TOF 质谱技术测定 HTF 分子量和聚合态, 可获得图 2a 结果。从图中可看出, HTF-2Fe<sup>3+</sup> 呈现出 3 个分子离子峰,  $m/z$  比值分别为 40232.7、79857.5 和 158492.9, 与 Busto 所报道 HTF (美国 Sigma-Aldrich 公司产品) 研究结果很相似<sup>[15]</sup>, 说明所提取的 HTF 样品具有较高的纯度与品质。参考前人测定数据<sup>[2-5]</sup>, 可推测出图 2a 中带单电荷 HTF ( $[M + H]^+$ ) 质谱峰的  $m/z$  为 79857.5, 而  $m/z$  40232.7 和 158492.9 分别为带双电荷 ( $[M + 2H]^{2+}$ ) 和带单电荷二聚态 ( $[2M + H]^{2+}$ ) HTF。采用铁饱和处理及类似的分析方法, 可获得铁饱和 HTF 质谱图 (图 2b), 显示出 2 个分子离子峰, 其中  $m/z$  比值分别为 40431.7 和 80535.9, 其  $m/z$  比值比图 2a 约高出 678.4。经比对和推算, 可获悉后者 HTF 络合了 2 分子 Fe<sup>3+</sup> (112Da) 和 2 分子唾液酸组分。这一实验推论与近期报道有关 HTF 含有唾液酸组成的实验结果很吻合<sup>[5]</sup>。因此可以认为铁饱和后的 HTF 易络合血清中的游离唾液酸, 它可能有助于提高 HTF 中铁组分的稳定性。HTF 参与转移铁过程中, 唾液酸组分可能维持铁稳定的重要作用, 反过来铁组分又稳定 HTF 结构。尽管如此, 这些新颖的论点, 还有待于进一步深入研究和论证。

### 3.3 全蛋白胶外酶解

为了进一步证实实验所提纯的蛋白质样品 (图 1C) 为 HTF, 采用胶外酶解方法、肽指纹及数据库检索技术, 鉴定了图 1C 蛋白样品, 并获得该蛋白的肽指纹质谱图 (图 3)。检索结果: 蛋白样品与 gil37747855 Transferrin [Homo sapiens] 相匹配, 共有 55 个峰用于数据库检索, 匹配峰的数目为 22 个, 序列覆盖率为 32%, 理论分子量 ( $M_r$ ) 为 79310 Da 理论 PI 值为 6.9%。在通常情况下, 具备 20% 的序列覆盖率和大于 78% 的匹配率特性则被认为具有较高的可信度。因而图 1C 蛋白样品可确认是转铁蛋白。

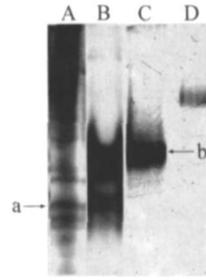


图 1 PAGE<sub>NC</sub> 方法分离 HTF 的电泳图

Fig 1 Electrophoretic map of human serum transferrin (HTF) identified by PAGE<sub>NC</sub> approach. A. HTF and other mixed protein; B. HTF and little protein separated from A (a); C. Purification of HTF separated by PAGE twice times; D. HSF (horse spleen ferritin).

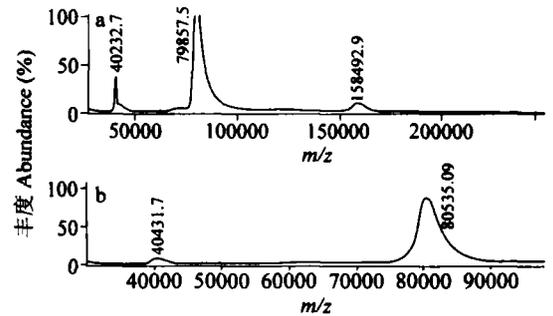


图 2 HTF (a) 和铁饱和 HTF (b) 质谱图

Fig 2 Mass spectrograms of HTF (a) and iron-saturated HTF (b)

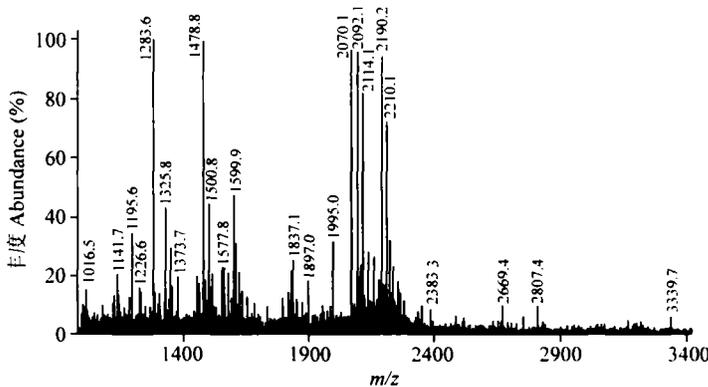
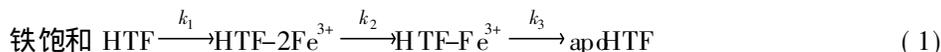


图 3 HTF 全蛋白胶外酶解肽指纹图谱

Fig 3 Map of peptide mass fingerprinting from the whole HTF out-gel digestion

### 3.4 HTF 裂解产物

通常在人血清中,转铁蛋白由 HTF-2Fe<sup>3+</sup>、HTF-Fe<sup>3+</sup>、apoHTF 混合组成,这 3 种转铁蛋白的含量比例因人而异,但主要成分是 HTF-2Fe<sup>3+</sup>。下列是作者建议的转铁蛋白的平衡过程式:



从上述反应式可直观地看出,HTF 含有不同的铁量,其中铁饱和 HTF 含铁量最高,认为少量铁直接络合于 HTF 表层;apoHTF 不含铁组分。根据含铁量不同,转铁蛋白可分为 4 个状态,其中 HTF-Fe<sup>3+</sup> 属于不稳定的过渡态,它们的平衡常数分别设定为  $k_b$ 、 $k_2$  和  $k_3$ ,推测 HTF 分子结构稳定性不仅与唾液酸组分有关,而且还与铁组分有着密切的联系。实验结果表明,铁饱和 HTF 经 RP-HPLC 分离后,产生 4 个色谱峰(图 4A),HTF-2Fe<sup>3+</sup> 与 apoHTF 分别产生 6 个和 4 个色谱峰(图 4B 和图 4C)。收集 HTF-2Fe<sup>3+</sup> RP-LPLC 洗脱的蛋白样品,旋转蒸发后,进行质谱分析,检测到  $m/z$  相应为 8697.5、2925.9、4332.9、79863.7、4150.2、3351.2,其中转铁蛋白  $m/z$  79863.7 与前面 DHB 作为基质时的  $m/z$  79857.5 只相差 6.2,暂时无法检测到比转铁蛋白分子量略小的峰,这可能是由于这种分离条件还不能将其与转铁蛋白峰分开,使其质谱信息被隐藏。HTF 属于单亚基类型的分子结构,在 RP-HPLC 中产生若干个色谱峰可能是洗脱相中的乙腈使 HTF 产生部分去折叠,形成多种聚合体或裂解 HTF 形成短肽化合物。为了进一步证实这一论点,选用乙腈直接处理铁饱和 HTF 后,再用质谱技术分析其裂解产物,并获得图 5 结果。从图 5 中可看出,铁饱和 HTF 显示出二聚体结构( $m/z$  158098, 分子结构式为  $[2M+H]^+$ )和若干个短肽( $m/z$  4158.0, 8669.9 和 8799.1)。由此看来,在乙腈作用下可能导致铁饱和 HTF 裂解形成若干短肽。同样方法处理 HTF-2Fe<sup>3+</sup>,结果见图 6 比较图 5 和图 6 发现,乙腈均能导致铁饱和 HTF 和 HTF-2Fe<sup>3+</sup> 裂解为不同分子量的小肽片段产物。其中两者均有 4158.0 的小肽,但铁饱和 HTF 的裂解产物中却显示了 1 个异于图 6 短肽质谱峰 8669.9,然而,在图 6 却发现 2 个  $m/z$  分别为 3330.4 和 5347.3 的短肽(图 6),而且这两个短肽  $m/z$  加合数与图 5 中  $m/z$  8669.9 的短肽质谱峰只差 7.8,即认为是前者为后者的裂解产物。这种现象说明铁饱和 HTF 裂解后短肽中可能含有修饰的铁组分或唾液酸组分,从而提高多肽稳定性,使其不易进一步裂解成分子量更小的短肽。有关铁组分或唾液酸组分提高短肽稳定性起因符合常规提高蛋白质结构稳定基本途径。

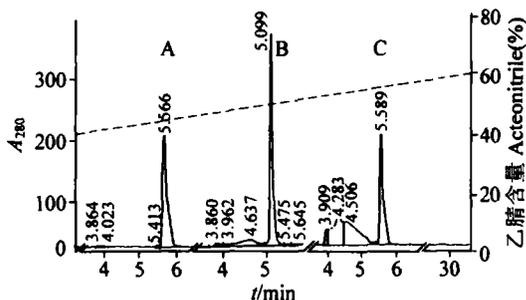


图 4 HTF 裂解产物图谱(RP-HPLC 法)

Fig 4 Chromatography of splitting produces of HTF separated with RP-HPLC

暂时无法检测到比转铁蛋白分子量略小的峰,这可能是由于这种分离条件还不能将其与转铁蛋白峰分开,使其质谱信息被隐藏。HTF 属于单亚基类型的分子结构,在 RP-HPLC 中产生若干个色谱峰可能是洗脱相中的乙腈使 HTF 产生部分去折叠,形成多种聚合体或裂解 HTF 形成短肽化合物。为了进一步证实这一论点,选用乙腈直接处理铁饱和 HTF 后,再用质谱技术分析其裂解产物,并获得图 5 结果。从图 5 中可看出,铁饱和 HTF 显示出二聚体结构( $m/z$  158098, 分子结构式为  $[2M+H]^+$ )和若干个短肽( $m/z$  4158.0, 8669.9 和 8799.1)。由此看来,在乙腈作用下可能导致铁饱和 HTF 裂解形成若干短肽。同样方法处理 HTF-2Fe<sup>3+</sup>,结果见图 6 比较图 5 和图 6 发现,乙腈均能导致铁饱和 HTF 和 HTF-2Fe<sup>3+</sup> 裂解为不同分子量的小肽片段产物。其中两者均有 4158.0 的小肽,但铁饱和 HTF 的裂解产物中却显示了 1 个异于图 6 短肽质谱峰 8669.9,然而,在图 6 却发现 2 个  $m/z$  分别为 3330.4 和 5347.3 的短肽(图 6),而且这两个短肽  $m/z$  加合数与图 5 中  $m/z$  8669.9 的短肽质谱峰只差 7.8,即认为是前者为后者的裂解产物。这种现象说明铁饱和 HTF 裂解后短肽中可能含有修饰的铁组分或唾液酸组分,从而提高多肽稳定性,使其不易进一步裂解成分子量更小的短肽。有关铁组分或唾液酸组分提高短肽稳定性起因符合常规提高蛋白质结构稳定基本途径。

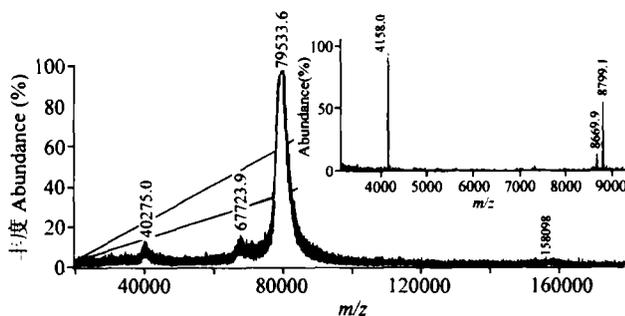


图 5 经乙腈处理后,铁饱和 HTF 的质谱图

Fig 5 Mass spectrometry map of iron-saturated HTF after treated by acetonitrile

图 4~图 6 结果表明,HTF 分子结构稳定性与络合于 HTF 中的铁数目或唾液酸组分有关,即饱和 HTF 稳定性大于 HTF-2Fe<sup>3+</sup>。为进一步证实这一论点的可信度,相同的处理方式作用于 apoHTF,获得图 7 质谱图。图中 apoHTF 显示出比 HTF-2Fe<sup>3+</sup> 更复杂的裂解产物,这更证明了转铁蛋白分子结构稳定性与含铁量数目有关。络合于转铁蛋白的铁离子不仅对该蛋白质进行修饰,而且还有助于提供蛋白质稳定性,起到抗蛋白质去折叠和由乙腈引起的蛋白裂解的重要作用。

近期 Zhu 等<sup>[13]</sup>采用蛋白质组技术筛选海洋鱼牙鲆受镉盐胁迫过程中,其大脑中的转铁蛋白通过络

合  $\text{Cd}^{2+}$  途径, 起到解毒作用。导致参与铁代谢的转铁蛋白表达量降低, 即一旦转铁蛋白失去部分铁组分或被镉盐替代时, 其分子结构稳定性趋于减弱或产生错误的分子结构, 从而失去转铁蛋白的生理功能。图 4~ 图 7 结果所描述的实验现象和阐明的转铁蛋白分子结构稳定性与铁含量的关系是一致的。

文献 [14] 报道了转铁蛋白的一级结构和多肽分子量。实验发现,  $m/z$  为 4158 0 的短肽 (图 5) 可能位于 HTF 的 490~ 508 间氨基酸残基位点的糖肽链;  $m/z$  为 8669 9 短肽 (图 5) 可能是位于 HTF 619~ 676 间氨基酸残基位点的糖链。而  $m/z$  为 8799 1 和 8669 9 短肽 (图 5) 之间差值为 129 2 与赖氨酸 (Lys) 分子量 128 1Da 很靠近。而 Lys 位点就位于转铁蛋白一级结构 618 位处, 即充分说明了上述推论的可靠性。

目前, HTF 及其同分异构体数目等生化参数正在应用于临床诊断 CDG 和 CAA 等疾病 [8 15]。但诊断准确率偏低, 其原因一直处于争论和研究阶段。从图 4~ 图 7 结果分析可推测, 如果 HTF 易受极性有机化合物影响而裂解成短肽产物, 形成不同分子量片段, 其中大片段很可能保持原有的抗体特性。

## References

- Nurizzo D, Baker H M, He Q Y, MacGillivray R T, Mason A B, Woodworth R C, Baker E N. *Biochemistry*, **2001**, 40: 1616~ 1623
- Gumero D R, Kaltashov I A. *Anal Chem.*, **2001**, 73: 2565~ 2570
- Lambert L A, Perri H, Meehan T J. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **2005**, 140: 11~ 25
- Ailor E, Takahashi N, Tsukanoto Y, Masuda K, Rahman B A, Jarvis D L, Lee Y C, Betenbaugh M J. *Glycobiology*, **2000**, 10: 837~ 847
- Busto M E D, Montes-Bayon M, Blanco-Gonzalez E, Meija J, Sanz-Medel A. *Anal Chem.*, **2005**, 77: 5615~ 5621
- Helander A, Husa A, Jeppsson J O. *Clin. Chem.*, **2003**, 49: 1881~ 1890
- Jeppsson J O, Kristensson H, Finiani C. *Clin. Chem.*, **1993**, 39: 2115~ 2120
- Amdt T. *Clin. Chem.*, **2001**, 47: 13~ 27
- Zhuo Huiqin (卓慧钦), Huang Heqing (黄河清), Weng Luna (翁露娜), Huang Huiying (黄慧英). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2007**, 28(5): 889~ 893
- Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, Chen P. *Anal Chem.*, **2005**, 77: 1920~ 1927
- Huang H Q, Xiao Z Q, Chen X, Lin Q M, Cai Z W, Chen P. *Biophys. Chem.*, **2004**, 111: 213~ 222
- Huang Hening (黄河宁), Hu Xiaohui (胡晓慧), Huang Heqing (黄河清), Yan Li (颜利), Chen Dongshi (陈东仕), Ouyang Gao liang (欧阳高亮), Zhuo Huiqin (卓慧钦). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2006**, 34(1): 52~ 56
- Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, Lin Q M, Cai Z W. *Aquatic Toxicology*, **2006**, 78: 127~ 135
- Saton i Y, Shim onishi Y, Takao T. *FEBS Lett.*, **2004**, 576: 51~ 56
- de la Calle Guntinas M B, Bordin G, Rodriguez A R. *Anal Bioanal Chem.*, **2004**, 378: 383~ 387

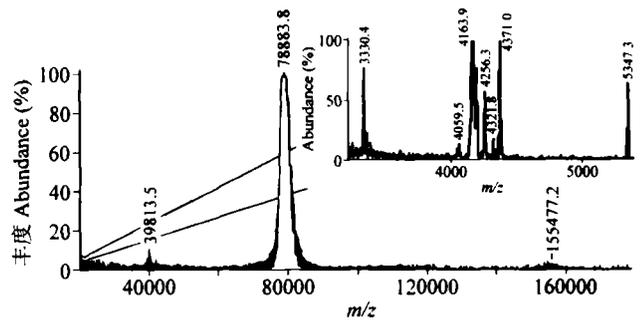


图 6 HTF-2Fe<sup>3+</sup> 经乙腈处理后的质谱图 (时间: 30 min)  
Fig 6 Mass spectrogram of HTF-2Fe<sup>3+</sup> treated with acetonitrile for 30 min

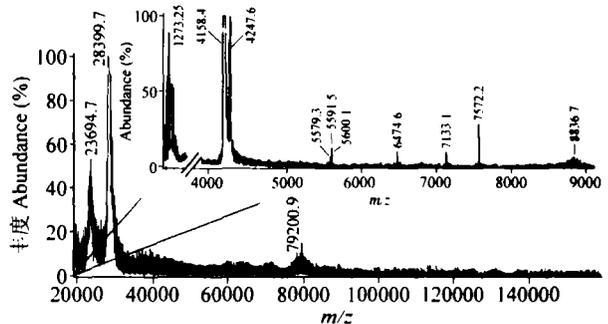


图 7 apdHTF 经乙腈处理后的质谱图 (处理时间: 30 min)  
Fig 7 Mass spectrogram of apdHTF treated with acetonitrile for 30 min

# Stability and Splitting Products Revealed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry in Human Serum Transferrin

Zhuo Hu-Qin<sup>1</sup>, Jin Hong-Wei<sup>2</sup>, Huang He-Qing<sup>\* 1,3</sup>, Huang Hu-Ying<sup>1,3</sup>, Cai Zongwei<sup>4</sup>

<sup>1</sup>The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences

<sup>2</sup>The Laboratory of Tumor Diagnosis, Zhongshan Hospital

<sup>3</sup>The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005

<sup>4</sup>(Department of Chemistry, Hongkong Baptist University, Hongkong 999077)

**Abstract** Human serum transferrin (HTF) with purity of mass spectrometry were prepared for the analysis of molecular structure. Here, several analytical techniques such as SDS-PAGE, enzymolysis out-gel MALDI-TOF mass spectrometry, database search, and comparison approach were employed to identify the stability and splitting products among iron-saturated HTF, HTF-2Fe<sup>3+</sup>, HTF-Fe<sup>3+</sup> and apoHTF. Using acetonitrile as a component of eluant for RP-HPLC separation, it was found that the eluant enabled to decompose HTF into peptides, which indicated that the structural stability of HTF was tightly relative to the iron numbers binding to the protein, and the iron played an important role in improving the stability. The regulation and pathway of forming various peptides from the HTF treated with acetonitrile directly were studied for revealing the splitting mechanism. The acetonitrile resulted in the unfolding of HTF for forming various different polymers splitting products of the protein. It could be presumed that the reason for the low reliability of diagnosis both congenital disorder of glycosylation and chronic alcohol abuse in clinic is the interferences of splitting products in HTF.

**Keywords** Human serum transferrin, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, enzymolysis out-gel, reversed phase high performance liquid chromatography, protein marker

(Received 25 October 2006; accepted 31 January 2007)

## 《现代近红外光谱分析技术》(第二版)新书出版

近红外光谱是 20 世纪 80 年代中期才为人们所关注的一种新技术。该书系统地介绍了近红外光谱技术的概貌、近红外吸收光谱的基本原理、近红外光谱仪器、常用化学计量学方法及软件、定性与定量分析、在线过程分析技术,并重点介绍了该技术的最新进展和在石油化工领域的应用。

该书可供从事分析化学、仪器分析、过程优化、化工和石油化工生产以及农业、食品、纺织、制药和环保等专业的广大科技工作者和大专院校有关师生阅读参考。

《现代近红外光谱分析技术》由陆婉珍院士主编,中国石化出版社出版。欲购请与该出版社联系(北京市东城区安定门外大街 58 号,邮编:100011;电话:010-84289974)。