

# 不同等电点的鲳鱼肝铁蛋白释放铁速率的比较研究

朱 锋, 陈盈盈, 胡晓慧, 林志超, 王群力, 黄河清\*

(厦门大学 生命科学学院, 生物化学与生物技术学系, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 选用热变性法、离子交换层析技术和聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (PAGE) 小批量制备电泳纯鲳鱼肝铁蛋白 (Liver ferritin of *Dasyatis akajei*, DALF) 和黄牛胰脏铁蛋白 (Scalper pancreas ferritin SPF). 等电聚胶电泳技术指出, DALF 和 SPF 分别显示 3 和 2 条不同等电点铁蛋白层析带, 推测这一现象与铁蛋白含铁量无关, 与各自蛋白壳 H 和 L 亚基分布不同且形成不同表面电荷有关. 不同等电点且相同含铁量的 DALF, 表现出不同的释放铁速率, 其释放铁全过程均可分为快速和慢速阶段, 符合一级反应动力学规律. 铁蛋白可通过自身蛋白壳 H 和 L 亚基分布和相互作用强度的差异性, 产生不同的柔性调节作用, 控制不同释放铁的速率.

**关键词:** 鱼肝铁蛋白; 等电点; 释放铁; 动力学; 调节

中图分类号: Q 51

文献标识号: A

文章编号: 0438-0479(2008)S2-0091-05

在自然界中, 与球状蛋白相似, 绝大多数铁蛋白是一种球型多亚基蛋白质, 其蛋白分子量约为 400~600 ku<sup>[1]</sup>. 透射电子显微镜技术研究表明, 铁蛋白分子结构主要由蛋白壳 (protein shell) 和位于蛋白壳中心区域的铁核 (iron core) 组成, 蛋白壳均为由 24 个单一类型或不同类型的亚基组成, 其分子结构具有高度对称性特点<sup>[2]</sup>. 铁蛋白蛋白壳外直径约为 11~13 nm, 位于蛋白壳中心的铁核直径约为 7~8 nm, 蛋白壳的厚度约为 2~2.5 nm<sup>[1-2]</sup>. 在体外, 铁蛋白释放铁动力学研究均表明, 大于隧道宽度的还原剂 FMNH<sub>2</sub>、FADH<sub>2</sub> 和生物大分子铜蓝蛋白、细胞色素 C 等在无法通过三相物质隧道的情况下, 仍然可以还原位于蛋白壳中心区域的铁核, 推测在蛋白壳上可能存在横跨蛋白壳、非物质交换隧道的电子隧道 (electron tunnel ET), 它起着接受和传递电子的作用, 其功能不同于与物质交换隧道, 但 ET 精细结构至今尚未清楚<sup>[3-4]</sup>.

鲳鱼肝铁蛋白 (Liver ferritin of *Sphyrna zygaena*, SZLF) 和细菌铁蛋白 (Bacterial ferritin, BF) 均由单类型亚基组成<sup>[1-4]</sup>. 来自 MALDI-TOF 质谱仪的激光和基质能有效解吸 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 10 889.35 和 22 030.45 确定为带双电荷 ( $M^{2+}$ ) 和单电荷 ( $M^+$ ) 的 SZLF 亚基分子量<sup>[1]</sup>. 透射电子显微镜

技术研究 SZLF 的铁核和蛋白壳亚基解离和重组过程, 揭示脱铁核铁蛋白 (apoSZLF) 包裹胰岛素 (Insulin INS) 于 apoSZLF 蛋白壳内, 构建纳米 NS 核-SZLF 途径<sup>[5]</sup>.

释放铁动力学研究表明, 铁蛋白释放铁的动力学全过程呈复杂化特点, 并伴随着混合反应级数的特性, 推测这一过程的起因是受到铁蛋白蛋白壳柔性调节速度、节奏和幅度的影响, 与铁核表层的磷铁结构无关. 无机磷酸盐是铁蛋白铁核结构的主要成分之一, 起着缓释铁速率的作用, 但无法使释放铁动力学级数由复杂转化为简单. 提高反应介质的碱度 (或酸度), 可以明显降低 (或提高) 铁蛋白释放铁的速率, 使铁蛋白释放铁的动力学过程由复杂转化成简单类型, 并以一级反应动力学方式释放完整铁核中的铁<sup>[6-7]</sup>. 至今, 已陆续提出有关铁蛋白释放铁的动力学模式和机理, 但仍然无法较为科学地揭示释放铁全过程的动力学途径. 进一步研究报道已指出, 血红素组成、亚基类型和铁核中的磷酸盐含量对铁蛋白释放铁过程中呈复杂特性所起的作用很小, 认为铁蛋白蛋白壳的柔性调节速率与幅度与释放铁速率不同步时, 将会产生不同释放铁速率, 并呈复杂动力学过程<sup>[6-7]</sup>.

本文选用柱层析和电泳技术分别小批量制备两种不同等电点的 DALF 和 SPF, 并研究其释放铁的全过程, 提出铁蛋白蛋白壳自身产生的柔性调节速率与幅度是释放铁速率过程中的限制因素之一的论点, 它为今后深入研究铁蛋白铁代谢途径与规律提供有价值的科学依据.

收稿日期: 2008-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870515) 资助

\* 通讯作者: hqhuan@xmu.edu.cn

# 1 材料与方法

## 1.1 仪器与试剂

MALDI-TOF 质谱仪 (Reflex ④) 产于德国 Bruker 公司. 稳压稳流电泳仪 DYY-④2 型, 购于北京六一仪器厂. 质谱纯 2,5-二羟基苯甲酸 (2,5-dihydroxybenzoic acid, DHB) 产于瑞士生物技术公司. 色谱纯乙腈 (Acetonitrile) 和三氟乙酸 (Trifluoroacetic acid, TFA) 分别购置上海实验试剂有限公司和 MERCK-Schuchardt 公司. SDS 分子量标准购自 Femto 公司. 葡聚糖凝胶 Sephadex G-15 购自上海试剂厂 (Pharmacia 进口分装). 三氟乙酸、乙腈 (纯度为 99%)、连二亚硫酸钠 ( $N_2S_2O_4$ ) 等其他试剂均为国产分析纯.

## 1.2 铁蛋白分离与制备

**DALF 粗分离:** 鲑鱼肝脏去除脂肪组织及膜系物后, 以 1:1.5 (质量比) 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 25 min), 随后迅速把匀浆液置于 72~75 °C 恒温水浴锅中, 热处理 15~20 min. 随后将破碎液置于 4 °C 冷却至室温, 并高速离心 (15 000 r/min) 30 min, 收集的上清液于 4 °C 放置过夜. 隔日, 分离样品溶液表层的油脂后, 再经 25 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液备用. 选用 6 层纱布组装的过滤器分离细胞碎片和固形物等杂质. 收集过滤液, 置于 -20 °C 冷冻成固体后, 冷冻干燥 2~3 d, 至样品完全成干粉状.

**铁蛋白纯化:** 将上清干粉加入适量 0.025 mol/L pH 7.25 的 Tris-HCl 缓冲液溶解后, 透析过夜, 12 000 rpm 离心 15 min 弃沉淀. 然后再用 Tris-HCl (0.025 mol/L, pH 7.25) 缓冲液预平衡过的 DE-52 (2.0 cm × 25.0 cm) 纤维素柱, 并用上述 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 去除大部分与 DE-52 亲和力较弱的杂蛋白后, 再分别用 0.10~0.25 mol/L NaCl (0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH 7.25) 线性洗脱样品. 波长 280 nm 监测, 部分收集器收集每个洗脱峰样品. 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 × 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.

选用近期陈平<sup>[1]</sup>描述的聚丙烯凝胶电泳 (PAGE) 技术进行小批量制备电泳纯 DALF, 并选用电转移技术提取电泳纯 DALF, 供选用肽质量指纹图谱技术鉴定 DALF. SPF<sup>[8]</sup> 和 MALDI-TOF/TOF 质谱技术分析铁蛋白的理化参数分析. 黄牛胰脏铁蛋白提取、纯化和制备参考黄琳已报道的方法<sup>[9]</sup>.

## 1.3 元素组成和蛋白质等电点分析

DALF 铁核中的无机铁和磷酸盐分析参考 Huang 等描述的方法<sup>[10]</sup>. 选用 Zhu 等描述的肽质量指纹图谱技术鉴定 DALF 及亚基组成<sup>[8]</sup>. DALF 和 SPF 等电点分离参考 Kong 等描述的方法进行<sup>[11]</sup>.

## 1.4 质谱分析

取 0.8 μL 样品与等体积基质 SA 混合、点样, 作质谱分析. 质谱条件: 实验所需的质谱仪是德国 BRUKER 公司生产的 REFLEX ④型 MALDI-TOF 质谱仪. 脉冲氮激光 (337 nm) 作为离子解吸电离源. 分析模型分别选用反射模式 ( $m/z$  0~6 000) 和线性模型 ( $m/z$  > 6 000), 加速电压控制在 20 kV. 平均每次测定样品的激光脉冲次数在 120 次左右. 采用外标法标定多肽质谱峰峰位<sup>[12]</sup>.

## 1.5 铁蛋白释放铁动力学

参考 Huang 等描述的方法分析铁蛋白释放铁的速率及全过程, 计算动力学参数和反应动力学级数<sup>[13]</sup>.

# 2 结果与讨论

## 2.1 柱层析法分离 DALF

柱层析分离法和蛋白质分离纯化系统是目前常用于制备电泳纯蛋白质的技术之一. 在制备粗 DALF 样品的基础上, 再采用 DEAE-纤维素 52 层析柱分离粗 DALF, 并获得的图 1 结果. 从图 1 中可看出, 粗 DALF 样品中至少有 5 种蛋白质 (图 1A-E). 选用电感耦合等离子体质谱技术 (ICP-MS) 对这 5 种蛋白质的金属元素含量进行分析, 发现其中图 1A-B 样品中含有大量的无机铁, 其余蛋白质样品含铁量很低, 这一现象说明了在收集 5 份蛋白样品中图 1A-B 两份样品因含有高铁量, 初步认定为铁蛋白. 进一步选用 ICP-MS 技术定量图 1A-B 样品含铁量, 发现蛋白质含铁量均相似, 约为 2 000  $Fe^{3+}$  /DALF. 此外, 选用 PAGE 方法分离图 1A-B 样品纯度, 发现显示单条电泳带, 属于电泳纯样品, 并显示出相同的电泳迁移率. 根据上述 DEAE-纤维素 52 层析柱分离原理, DALF 含铁量和电泳迁移率结果, 推测图 1A-B 蛋白质样品可能是含有不同等电点的 DALF, 称为 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub>. 早期研究已表明, DALF 由 H 和 L 类型的亚基组成<sup>[12]</sup>. 推测 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 构成不同等电点的起因与 H 和 L 亚基构成高度对称性铁蛋白结构的差异性, 因而使铁蛋白蛋白壳外表层的电荷分布出现的差异性, 引起等电点的差异性. 尽管 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 总的 H 和 L 亚基组成比和

含铁量可能极为相似,但由于两者蛋白壳外层电荷分布存在差异性,因而选用 DEAE-纤维素 52 层析柱法,可有效地分离 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub>。为了进一步证实上述论点,把 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 有效混合后,并选用等电聚焦电泳 (IEF) 方法,揭示 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 的等电点差异性也是必要的。

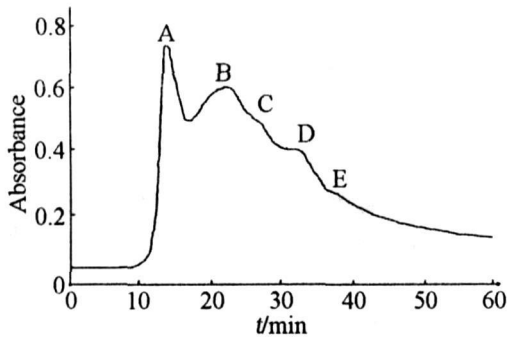


图 1 粗铁蛋白的柱层析分离谱图

Fig 1 Column chromatogram map of crude ferritin

### 2.2 电泳法分离 DALF

选用 PAGE 方法一步分离粗 DALF 样品,获得电泳纯或质谱纯 DALF,是大批量制备电泳纯 DALF 的另一种有效分离技术之一<sup>[1]</sup>,它比采用柱层析法更为直接且简单,但由于不同等电点 DALF 的蛋白壳外层电荷分布差异性较少,所以选用 PAGE 方法且利用电荷差异性难以有效分离不同等电点的 DALF。图 2 是选用 PAGE 方法小批量提取 DALF,在经 PAGE 技术分离后,所获得的电泳图谱。从图 1A 中,可看出 DALF 显示出单条蛋白质层析带。选用铁染色技术染色图 2A 样品,获得图 2B 结果,说明图 2A 蛋白样品含有大量的铁组分,即认为图 A 样品为 DALF,同时也说明了小批量制备 DALF,能获取电泳纯的 DALF 样品,

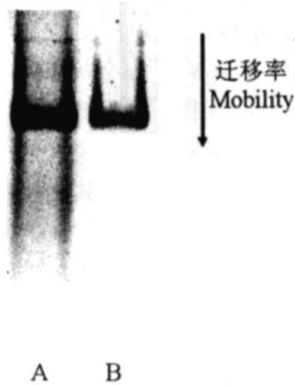


图 2 DALF 电泳和铁染图谱

A. DALF 电泳图; B. DALF 铁染图

Fig 2 DALF maps of both PAGE and iron dyeing

供满足对 DALF 分子结构与拓展新颖生物功能研究的需求。

### 2.3 不同等电点的 DALF 和 SPF

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<sup>[24]</sup>。由于铁蛋白蛋白壳由 24 个同一类型或不同类型 (例如: H 和 L 亚基) 的亚基组成,其中 H 和 L 亚基组成比随不同来源铁蛋白而变化或同一种来源的铁蛋白含铁量不同均会影响到铁蛋白的等电点迁移和形成不同等电点的蛋白层析带。图 2B 是 SPF 等电点蛋白电泳图谱,从图中可直观地看出,选用 PAGE 技术提取的电泳纯 SPF,实际上由 2 种不同等电点的 SPF 混合组成,这一差异性与组成 SPF 蛋白壳的 H 和 L 亚基分布非一致性而引起的。图 2A 是电泳纯 DALF 显示的等电点电泳图谱,图中显示了 3 中不同等电点的蛋白层析带,可分为 DALF<sub>A</sub>, DALF<sub>B</sub> 和 DALF<sub>C</sub>,其中根据蛋白层析带的宽度和颜色深度,可推出 DALF<sub>A</sub> 含量相对最高,其次为 DALF<sub>B</sub>,最小蛋白含量为 DALF<sub>C</sub>,DALF<sub>B</sub> 和 DALF<sub>C</sub> 的蛋白总量明显小于 DALF<sub>A</sub>。比较 SPF 和 DALF 显示的等电点数目和差异性,可认为 DALF 蛋白质壳 H 和 L 亚基组成和分布的复杂性高于 SPF,不同来源的铁蛋白,显示的不同等电点数目和相对含量分布也不同,这说明了这一现象不属于铁蛋白同性特征,可与铁蛋白释放和储存铁的速率有关,与不同来源动植物及微生物细胞对铁的需求量和速率不同有关。铁蛋白蛋白质壳中的亚基相互作用强度和幅度可能与铁代谢速率有关。研究相同来源的铁蛋白且不同等电点铁蛋白释放铁的动力学特性,对合理揭示铁蛋白参与铁代谢起着重要的作用<sup>[1-2]</sup>。

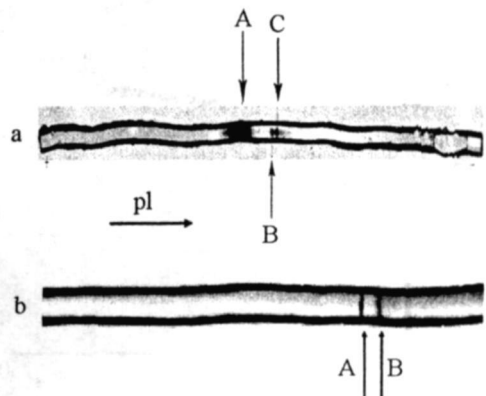


图 3 电泳纯 DALF 和 SPF 等电点电泳图谱

a. DALF; b. SPF

Fig 3 IEF maps of both DALF and SPF

### 2.4 不同等电点的 DALF 释放铁动力学特性

早期,美国 W att 实验室和作者同时提出细菌铁蛋

白释放铁过程呈复杂性与途径, 并以两种不同速率释放铁的全过程论点, 较为合理解释铁蛋白释放铁的规律<sup>[14]</sup>. 铁蛋白铁核结构可区分为含高磷铁比的铁核表层和含低磷铁比的铁核内层, 认为铁核表层的磷铁结构参与铁蛋白的生理功能, 而铁核内层的磷铁结构作为铁源, 起着供铁的作用. 在体内, 铁蛋白释放铁的过程由铁核中心逐步向铁核表层延伸, 而在体外, 释放铁的过程由铁核表层逐渐趋于铁核内层, 并伴随着混合反应级数特性, 推测这一过程的起因是受到铁蛋白蛋白壳柔性调节速率和幅度的影响, 与铁核表层的磷铁结构无关. 磷酸盐是铁蛋白铁核结构的主要成分之一, 起着缓释铁速率的作用, 但无法使释放铁动力学级数由复杂转化为简单.

图 4 是不同等电点 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 释放铁的全过程图谱, 从图中可看出 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 释放铁的趋势较为相似, 其最大释放铁量所需要的时间约为 40 min 左右, 含有相同的释放铁的量, 这与近期报道鲨鱼肝和海兔肝铁蛋白释放铁的全过程较为相似<sup>[19]</sup>. 进一步分析, 发现了 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 释放铁全过程, 可分为快速 (20 min 以内) 和慢速 (20~40 min 之间) 两阶段, 这一释放铁现象与作者近期开展的细菌铁蛋白、鲨鱼铁蛋白、海兔肝铁蛋白和马脾铁蛋白释放铁的全过程趋势较为相似, 均出现快速和慢速释放铁的两阶段过程<sup>[16, 9]</sup>. 参考作者前期已建立的释放铁的动力学方程<sup>[13]</sup>, 并对图 4 结果进行动力学计算, 可发现 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 释放铁全过程均符合快速和慢速释放铁的一级动力学规律, 这意味着, 不同等电点的铁蛋白差异性无法引起铁蛋白释放铁的动力学反应级数和规律产生变化.

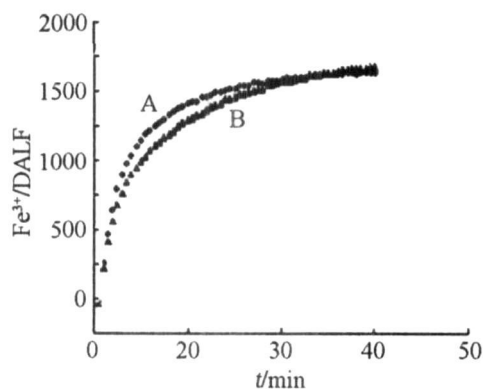


图 4 DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 释放铁全过程

A. DALF<sub>A</sub>; B. DALF<sub>B</sub>

Fig 4 A complete process of iron release in both DALF<sub>A</sub> and DALF<sub>B</sub>

放铁的速率略高于 DALF<sub>B</sub>, 但最终释放铁的速率趋于相似. DALF<sub>A</sub> 和 DALF<sub>B</sub> 释放铁的速率存在一定差别, 这与铁蛋白蛋白壳外层电荷分布不同有关, 但影响力很有限. 显然, 铁蛋白控制释放铁的速率与亚基之间的相互作用、调节作用和调节幅度有关, 是释放铁的限制性的步骤. 这些实验结果进一步证实作者近期提出有关铁蛋白释放铁的机理与途径<sup>[1, 7, 9]</sup>, 合理揭示铁蛋白蛋白壳需要由 24 个相同或不同类型亚基组成且呈现高对称性结果的重要性起着极其重要的作用.

### 参考文献:

- [1] 陈平, 黄河清, 林庆梅, 等. 电泳/质谱技术研究鲨鱼肝铁蛋白及亚基多聚体特性 [J]. 分析化学, 2007, 35(5): 667-671.
- [2] Johnson E, Cascio D, Sawaya M R, et al. Crystal structures of a tetrahedral open pore ferritin from the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [J]. Structure, 2005, 13: 637-648.
- [3] Shin K M, Lee J W, Wallace G, et al. Electrochemical properties of SWNT/ferritin composition for bioapplications [J]. Sensor and Actuators B: Chemical, 2008, 133: 393-397.
- [4] Huang H Q, Lin Q M, Wang T L. Kinetics of iron release from pig spleen ferritin with bare platinum electrode reduction [J]. Biophysical Chemistry, 2004, 97(1): 17-27.
- [5] 黄河清, 陈平, 朱斌琳, 等. 用 MALDI-TOF 质谱和电子光谱技术研究纳米胰岛素核-铁蛋白的构建技术和特性 [J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(11): 2073-2077.
- [6] 胡晓慧, 黄河清. 细菌铁蛋白电子光谱和释放铁动力学的新颖特性 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(5): 717-721.
- [7] 颜利, 黄河清, 金宏伟, 等. MALDI-TOF 质谱和电子光谱技术研究人血清铁蛋白释放铁的动力学 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(10): 1889-1892.
- [8] Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, et al. Acute toxicity profile of cadmium revealed by proteomics in brain tissue of *Paralichthys olivaceus* [J]. Aquatic Toxicology, 2006, 78: 127-135.
- [9] Huang L, Zhuo H Q, Feng L J, et al. Desorption/ionization of subunit and kinetics of iron release revealed with MALDI-TOF and electronic spectrum in liver ferritin of *Aplysia* [J]. *Chin J Anal Chem*, 2007, 35(12): 1745-1750.
- [10] Huang H Q, Watt R K, Frankel R B, et al. Role of phosphate in Fe<sup>2+</sup> binding to horse spleen ferritin [J]. Biochemistry, 1992, 32: 1681-1687.
- [11] Kong B, Huang H Q, Lin Q M, et al. Purification, electrophoretic behavior and kinetics of iron release of liver ferritin of *Dasyatis akajei* [J]. Journal of Protein Chemistry, 2003,

进一步分析可发现, 在快速释放阶段, DALF<sub>A</sub> 释

22(1): 61–70

- [12] Zhuo H Q, Huang L, Feng L J et al. Mineral oil, glycerol, and Vaseline-coated plates as matrix-assisted laser desorption/ionization sample for high-throughput peptide analysis [J]. *Analytical Biochemistry*, 2008, 378: 151–157

- [13] 黄河清, 林庆梅, 张凤章, 等. 猪脾铁蛋白电子隧道特

性及释放铁途径的研究 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(1): 10–15

- [14] Richard T D, Pitt K R, Watt G D. A kinetics study of iron release from *Azobacter vinelandii* bacterial ferritin [J]. *J Inorg Biochem*, 1996, 61: 1–13

## Compared Rate of Iron Release from the Liver Ferritins with Different Isoelectric Points in *Dasyatis akajei*

ZHU Feng CHEN Ying-ying HU Xiao-hui  
LN Zhi-chao WANG Qun-li HUANG He-qing\*

(Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** Liver ferritin of *Dasyatis akajei* (DALF) and scalper pancreas ferritin (SPF) with electrophoresis purity were prepared by heat denatured method, ion-exchange chromatography, and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in miniature. It was indicated that DALF and SPF showed three and two protein bands with different isoelectric points revealed with a technology of isoelectric point in gel, respectively. We suggested that these phenomena were unconnected with the iron content within the ferritin, but related with differential distribution both H and L subunits including forming different surface charges on the surface of ferritin shell itself. Both DALFs with different isoelectric points including same iron content showed different rate of iron release. The kinetic process for whole iron release could be divided into two phases of fast and slow rates, and both phases followed first-law kinetics. It was indicated that the ferritin had ability for controlling different rates of iron release in ferritin using differential characteristics of its subunit distribution and the interaction intensity both H and L subunits for making different flexible regulation on the surface of protein shell itself, respectively.

**Key words** fish liver ferritin; isoelectric points; kinetics; iron release; regulation