

棕色固氮菌细菌铁蛋白捕获能力、稳定性和亚基相互作用的强度

黄琳^{1,2} 陈旭¹ 罗联忠^{1,3} 林青¹ 黄河清^{*1,2,3}

(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 化学化工学院固体表面物理化学国家重点实验室, ³ 化学生物学福建省重点实验室, 厦门 361005)

摘要 选用柱层析、电泳和反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 技术制备质谱纯棕色固氮菌细菌铁蛋白 (Bacterial ferritin of *Azotobacter vinelandii*, AVBF), 并采用释放铁动力学和肽质量指纹图谱 (Peptide mass fingerprinting, PMF) 技术分别鉴定 AVBF。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALD-TOF MS) 和电泳技术揭示 AVBF 亚基之间相互作用强度、稳定性和聚合态。AVBF 可直接捕获有机小分子亚甲蓝 (MB), 其捕获率为 $15.0 \pm 0.0 \text{ MB/AVBF}$, 认为介于 AVBF 亚基单体之间的血红素参与捕获 MB。较高浓度 (40% ~ 50%) 的乙腈和丙酮均能使 AVBF 和鲨鱼肝铁蛋白 (Liver ferritin of shark, SLF) 释放不稳定亚基, 但在较低浓度 (20% ~ 30%) 的乙腈条件下, 却需要借助来源于质谱仪的激光才能使 AVBF 或 SLF 释放不稳定亚基, 并供质谱分析。AVBF 亚基之间的相互作用强度明显低于 SLF。铁蛋白亚基之间的相互作用强度高低与铁蛋白执行释放和储存铁的速率有关。

关键词 细菌铁蛋白, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱, 电泳, 亚基, 相互作用, 稳定性, 捕获能力

1 引言

铁蛋白是一种高效储存铁的蛋白质, 存在于多数动植物及微生物细胞中^[1,2]。不同来源的铁蛋白分子结构极为相似, 均由蛋白壳、铁核和横跨蛋白壳的隧道等组成^[3,4]。细菌铁蛋白 (Bacterial ferritin, BF) 和鲨鱼肝铁蛋白 (Liver ferritin of shark, SLF) 均由单类型亚基组成^[1], 而哺乳动物铁蛋白却由 H 和 L 类型的亚基组成^[5,6]。利用铁蛋白可以构建多种反应器, 不仅可捕获各种重金属^[7], 而且也适合于捕获各种有机磷农药、有机染料、小分子药物和其它多肽分子^[8-11]。BF 蛋白壳上含有血红素成分, 并位于亚基单体之间的界面上^[3], 但有关血红素生理功能至今尚未清楚。

近期, Liu 等在晶体结构解析中发现, 棕色固氮细菌铁蛋白 (AVBF) 晶体蛋白中的 His130 和 Glu47 位点与释放、储存铁的机制有关, 横跨蛋白壳的四维通道捕获了 Ba 离子, 并提出了影响铁核形成因素和选择性机制^[12]。近年来, 发现了铁蛋白在铂 (黄) 金电极上直接表现出铁还原和释放现象, 推测还原电流是通过蛋白壳上的电子隧道 (含有血红素组成) 途径或亚基之间的柔性调节进行传递, 并供释放铁的反应^[13,14]。来源于 MALD-TOF 质谱仪的激光和外加基质能有效地解吸 SLF 释放不稳定的亚基且形成亚基离子, 供质谱分析^[13]。

本实验选用 MALD-TOF MS、电泳和有机化合物处理等技术研究 AVBF 稳定性、解离机理、捕获有机小分子能力和亚基之间相互作用的强度, 为选用 MALD-TOF MS 技术测定超大蛋白质的分子量和亚基类型提供新的分析技术, 具有重要的意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

REFLEX 型 MALD-TOF 质谱仪 (德国 BRUKER 公司); Waters 2487 型高效液相色谱仪 (Waters 公司); pH 5 ~ 8 载体两性电解质 (Amersham); 胰蛋白酶 (Promega 公司); 基质 2, 5-二羟基苯甲酸 (DHB)、芥子酸 (SA) 和肉桂酸 (HCCA) (美国 ICN 生物医学公司); 三氟乙酸 (TFA) 和 碘乙酰胺 (Sigma 公司); 丙烯酰胺等化学试剂均购于上海生工公司。

2007-11-28 收稿; 2008-03-25 接受

本文系国家自然科学基金项目 (No. 40776060) 和福建省高校创新研究团队基金资助

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

2.2 细菌铁蛋白分离与制备

按 Zhao 等^[15]描述的方法制备 AVBF。按常规 PAGE 技术验证铁蛋白的纯度,小批量电泳技术制备电泳纯 AVBF^[16]。制备质谱纯 AVBF 的主要实验步骤与条件:(1)粗 AVBF 样品经 DEAE 纤维素 52 层析柱分离纯化 3 次;(2)取纯化后的 AVBF 样品 100 μL ,再进行 RP-HPLC 分离。分离条件: C_{18} 柱;0.6 mL/min;20 min;流动相:40%乙腈/0.1% TFA 的水溶液;(3)根据色谱峰保留时间,分别收集洗脱样品,并经真空干燥浓缩至 1 mL 左右。用截流分子量 10 kD 的超滤离心管更换样品缓冲液为 100 mmol/L NH_4HCO_3 ;样品再次经真空浓缩,并用于质谱分析。

2.3 铁蛋白直接捕获亚甲蓝

铁蛋白反应器按文献 [17] 描述的方法进行构建。分别取 2.5 mL AVBF 样品和 0.4 mL 亚甲蓝 (MB) (0.1 mmol/L) 置于铁蛋白反应器中进行 AVBF 直接捕获 MB,反应时间为 100 ~ 120 min。随后,迅速取出样品置于 Sephadex G-25 层析柱 (1.7 cm \times 6.5 cm) 中,去除反应液中的游离 MB,收集已捕获 MB 的 AVBF 样品,称为 AVBF_{MB} 样品。AVBF_{MB} 光谱测定和每分子 AVBF_{MB} 捕获 MB 数量按文献 [17] 描述的方法进行分析与统计。

2.4 有机化合物预处理细菌铁蛋白

选用有机化合物乙腈和丙酮作为铁蛋白亚基解离剂,按不同百分比浓度处理 AVBF 和 SLF,并选用分离凝胶浓度为 5% 和 15% 的 PAGE 技术分别分离铁蛋白和它的亚基,其实验结果作为评价铁蛋白亚基是否解离的依据。参考文献 [7] 的方法进行铁蛋白铁染色并用透射电子显微镜观测铁蛋白分子结构。

2.5 基质配制和质谱分析

0.1% 三氟乙酸 (TFA) 水溶液和 30% 乙腈 (ACN) 按 7:1 体积比混合成溶液。根据实验要求加入饱和的芥子酸 (SA) 于混合溶液中,超声波处理 5 min,并离心 (6000 r/min) 5 min,收集上清液,即为饱和基质溶液。选用配置脉冲氮激光 (337 nm) 离子源的 MALDI TOF 质谱仪,采用线性模型分析,在加速电压控制在 25 kV 等条件下,每一个测定样品随机选择 20 ~ 25 个不同的点,平均激光脉冲次数在 120 次,相对激光强度恒定为 50%,采用标准的牛血清白蛋白外标法标定质谱峰位^[19]。按文献 [18] 描述的方法,直接分析 AVBF 亚基的类型和分子量。

2.6 肽质量指纹图谱技术鉴定铁蛋白

选用 Zhu 等^[20]描述的肽质量指纹图谱技术酶解 AVBF 亚基。按文献 [19] 所描述方法进行 AVBF 酶解产物质谱分析和检索混合肽段。检索参数设定为:最大允许的肽质量误差为 0.5 Da,每个肽段允许有 1 个不完全裂解位点。

3 结果与讨论

3.1 RP-HPLC 分离制备色谱纯细菌铁蛋白

选用 RP-HPLC 制备色谱纯 AVBF,层析图谱如图 1 所示,AVBF 样品显示出 8 个蛋白色谱峰,其中多数蛋白含量很低,保留时间位于 2.582 (图 1A) 和 3.635 (图 1B) min 处的蛋白质含量相对较高。动力学研究表明,只有图 1B 样品的释放铁的动力学规律与早期的研究报道结果相吻合^[21,22]。电子显微镜研究表明,图 1B 样品分子结构由铁核和蛋白壳组成,与哺乳动物铁蛋白极为相似,证明图 1B 样品是 AVBF,其余为杂质或脱铁 AVBF。经 RP-HPLC 纯化的 AVBF 样品,其蛋白纯度可达到质谱纯,但它直接捕获有机小分子的能力却明显降低,推测 AVBF 的部分亚基出现去折叠现象,削弱亚基之间相互作用强度,从而影响捕获有机小分子的能力。

3.2 EMF 技术鉴定细菌铁蛋白

为了获得天然的 AVBF,并适合于研究捕获有机小分子能力和铁蛋白亚基之间的相互作用强度,采

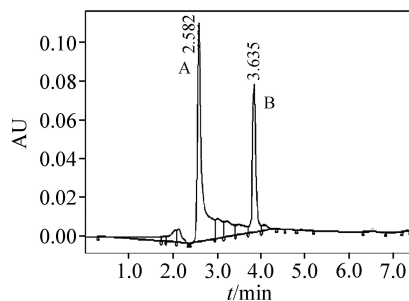


图 1 RP-HPLC 分离 AVBF 样品色谱图

Fig 1 Chromatogram of bacterial ferritin of azotobacter vinelandii (AVBF) samples separated with RP-HPLC

取 DEAE 纤维素 52 柱非串联式地连续分离 (3 次)、PAGE 纯化和电转移收集样品等联用技术制备了质谱纯 AVBF。PAGE 和 SDS-PAGE 技术研究表明, AVBF 由单类型的亚基组成, 不含脱铁核 AVBF, 其亚基类型相似于大肠杆菌细菌铁蛋白。图 2 是选用胶内酶解和 MALD FTOFMS 技术直接获得 AVBF 的肽质量指纹图谱 (PMF)。参考图 2 测定结果、选用 Rubish Peak Killer (RPK) 分析软件 (本课题组编写的分析软件) 和借助 MASCOT 检索网站中的 SWISS-PORT、MSDB 和 NCBI nr 数据库^[20], 对 AVBF 进行蛋白鉴定。经检索和分析后, 发现 AVBF 与鸡和鼠铁蛋白 H 亚基一级结构具有较高的同源性, 适合于拓展铁蛋白新功能的研究。

3.3 AVBF 直接捕获有机小分子亚甲蓝

实验使用透析袋、AVBF、磁力搅拌器等组成铁蛋白反应器, 研究 AVBF 捕获有机小分子亚甲蓝能力及数目, 结果如图 3。图 3a 是亚甲蓝在可见光区的谱图, 其特征吸收波长位于 617 和 666 nm 处。在 380 ~ 540 nm 范围内呈低吸收强度特性。AVBF 在可见光区有 3 个特征吸收峰, 其波长位于 550 (峰), 525 (峰) 和 414 (S 峰) nm 处, 主要

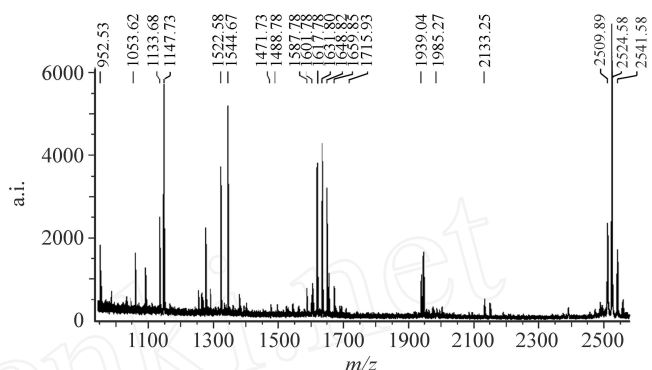


图 2 AVBF 肽质量指纹图谱图

Fig 2 Map of peptide mass fingerprinting in AVBF

AVBF 在可见光区有 3 个特征吸收峰, 其波长位于 550 (峰), 525 (峰) 和 414 (S 峰) nm 处, 主要

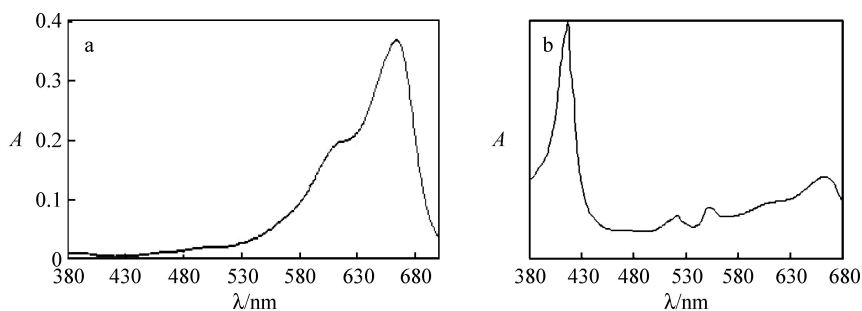


图 3 亚甲蓝 (a) 和 AVBF 已捕获和储存亚甲蓝 (b) 的光谱图

Fig 3 Spectra of both methylene blue (a) and AVBF for binding and storing to methylene blue (b)

a 亚甲蓝 (methylene blue); b AVBF 捕获和储存亚甲蓝 (AVBF for binding and storing to methylene blue)。

是由 AVBF 蛋白壳上的血红素所产生的^[22]。AVBF 捕获和储存亚甲蓝时 (AVBF_{MB}), 亚甲蓝对 AVBF 产生的特征吸收峰强度影响很小。AVBF_{MB} 在可见光谱区中显示出 5 个特征吸收峰, 其中 550 (峰)、525 (峰) 和 414 (S 峰) nm 为 AVBF 血红素的特征吸收峰。图 3b 特征吸收峰指出, AVBF_{MB} 已络合和捕获亚甲蓝。定量分析表明, 每分子 AVBF_{MB} 可捕获亚甲蓝数目高达 15.0 ± 2.0 分子, 略高于猪脾铁蛋白的捕获量^[17]。这说明 AVBF_{MB} 具有类似猪脾铁蛋白的生理功能, 血红素可能位于 AVBF_{MB} 亚基或单体界面之间, 但无法提高 AVBF_{MB} 亚基之间的相互作用强度, 只起着改善电子传递速率的作用^[1]。AVBF 血红素组成可能参与捕获亚甲蓝, 从而提高了捕获率。为了进一步证实这一论点, 本实验选用 MALD FTOFMS 技术进一步研究 AVBF_{MB} 亚基之间的相互作用强度。

3.4 质谱技术直接分析 AVBF 亚基

在基质辅助下, 来源于 MALD FTOF 质谱仪的激光能直接把由单类型、多亚基和不同类型亚基组成的蛋白质转化成蛋白质离子, 通过质量分析器进行分析, 并获得相对应的质谱峰。大量的研究已表明, 一般情况下选用 MALD FTOFMS 技术难以直接把蛋白质离子瞬时解吸成亚基离子, 并获得相对应的亚基离子的质谱峰。但却能瞬时把铁蛋白解吸成亚基分子的同时, 进一步形成亚基离子, 并获得亚基质谱峰^[1], 这反映出铁蛋白亚基自身发挥了类似基质作用, 即通过吸收激光能量, 提高了离子化率, 明显改善了检测灵敏度^[23]。选用 MALD FTOFMS 技术直接测定已收集的图 1B 的蛋白质样品, 并获得图 4 结果。从图 4 可见, AVBF 亚基解吸成亚基离子, 并获得带双电荷和单电荷的亚基 (M) $[M^{2+}]$ 和 $[M^+]$, 分

子量分别为 10401.87 和 20790.88 Da, 略小于 SLF。由此来看, AVBF 亚基之间的相互作用强度与 SLF 类似, 均处于较弱状态, 可直接释放出亚基, 形成亚基离子, 并测定相对应的亚基质谱峰。而由 H 和 L 亚基组成的哺乳动物铁蛋白, 只能释放出 H 亚基, 供质谱分析。这说明哺乳动物铁蛋白 H-L 和 L-L 亚基之间的相互作用强度明显高于 H-H 亚基结构。AVBF 亚基之间的稳定性较弱, 易释放。AVBF 可通过亚基之间的相互作用差异性, 替代类似哺乳动物铁蛋白的 H 和 L 亚基生理, 从而实现了同时参与释放铁、储存铁和捕获有机小分子的过程。

3.5 AVBF 亚基的稳定性

铁蛋白分子结构由蛋白壳 (400 ~ 440 kDa) 和铁核 (200 kDa) 组成, 但铁蛋白和脱铁核铁蛋白却表现出相似的电泳迁移率^[7], 一般认为它们的蛋白壳尺寸、蛋白壳外层电荷数目及分布规律均有较高的相似性, 因而表现出相似电泳迁移率。铁蛋白铁核组成对蛋白质电泳迁移率贡献很小, 属于罕见的蛋白质电泳行为。由于 BF 亚基分子量仅为 20 kDa 左右, 难以在同一块 PAGE 凝胶板中, 同时分离铁蛋白和它的亚基。实验结果指出, 选用 PAGE 方法分离铁蛋白的最佳凝胶浓度约为 5% ~ 6%, 质谱纯 AVBF 样品在 PAGE 凝胶板上呈单一蛋白层析带, 不含多聚体。如选用高于该凝胶浓度作为分离介质, 因凝胶筛孔过小, 难以有效分离铁蛋白。图 5 电泳图谱是选定分离胶浓度为 15% 的 PAGE 方法直接分离经乙腈和丙酮分别处理后的 AVBF 亚基 (不含多聚体)。从图 5A ~ C 中可看出, 当乙腈处理浓度低于 30% 时, 并未发现 AVBF 亚基, 即在低于 30% 乙腈处理条件下, AVBF 亚基结构是稳定的。当乙腈的处理浓度进一步提升到 40% 和 50% 时, AVBF 不仅能释放出不稳定的亚基, 同时也形成由多个亚基组成的多聚体 (图 5D ~ E), 说明了较高浓度的乙腈不仅能削弱 AVBF 亚基之间的相互作用强度, 有利于亚基解离, 同时也使亚基结构出现部分去折叠现象, 暴露亚基内陷中的疏水键, 并通过疏水键作用形成亚基多聚体。

选用丙酮处理 AVBF 时, 所获得的实验结果明显不同于乙腈。从图 5F ~ J 中可看出, 外加 20% ~ 50% 丙酮均能使 AVBF 解离成为亚基, 并使部分去折叠的亚基形成亚基多聚体。显然, AVBF 亚基之间的相互作用强度在丙酮中的稳定性低于乙腈。AVBF 在不同有机溶剂中呈现出不同的亚基稳定性, AVBF 亚基之间相互作用强度可能存在着差异性, 这一差异可能为执行着释放和储存铁及捕获有机小分子等生理功能发挥重要的作用。

3.6 基质影响、AVBF 亚基稳定性和多聚体形成

参考图 4 结果可获悉, 基质和来源于 MALD F-TOF MS 质谱仪的激光能协同使 AVBF 释放出不稳定的亚基, 并被质谱仪所检测。为了进一步了解基质 (不考虑激光强度和亚基之间的相互作用强度) 影响铁蛋白稳定性的特点和机理, 本实验选用 HCCA 和 SA 分别预处理 AVBF 和 SLF, 并结合 PAGE 分离技术, 研究铁蛋白亚基稳定性和相互作用强度, 获得图 6 实验结果。实验结果表明, 来源于 MALD F-TOF 质谱仪的激光 (包括 MALD F-TOF/TOF 质谱技术)、SA 和 HCCA 均无法直接分解铁蛋白亚基成为短肽或更小有机化合物, 铁蛋白被解离的最小单位只能是亚基单体。图 6Aa 是 BSA 显示的蛋白层析带, 其蛋白

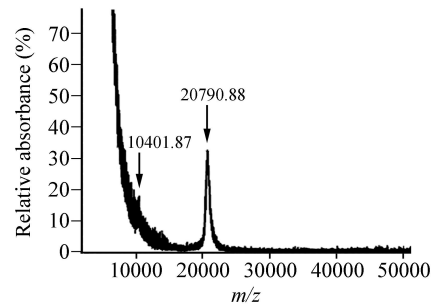


图 4 AVBF 亚基质谱图

Fig 4 Mass spectrum of AVBF subunits

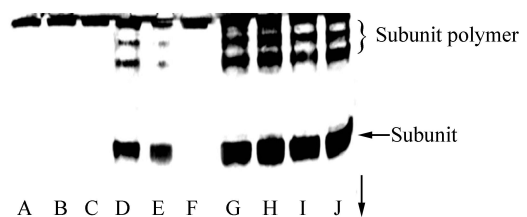


图 5 经乙腈和丙酮分别处理后, AVBF 亚基和多聚体的 PAGE 图谱

Fig 5 PAGE maps of both AVBF subunits and its polymers after treated with acetonitrile and acetone, respectively

A ~ E: 选用乙腈浓度为 0%、20%、30%、40% 和 50% 处理 AVBF (AVBF sample was treated under the reaction condition of acetonitrile concentration at 0%, 20%, 30%, 40% and 50%, respectively); F ~ J: 分别选用丙酮浓度为 0%、20%、30%、40% 和 50% 处理 AVBF (AVBF sample was treated under the reaction condition of acetone concentration at 0%, 20%, 30%, 40% and 50%, respectively)。

质迁移率略高于图 6Bb和图 6Db所对应 AVBF亚基聚合体迁移率,但明显低于另一种不同聚合类型的 AVBF亚基迁移率(图 6Dc)。图 6Bd和图 6Dd的 AVBF亚基聚合体迁移率明显高于图 6Bb、图 6Db和图 6Dc所对应的 AVBF亚基聚合体迁移率。由于 HCCA 和 SA 基质无法水解 AVBF和 SLF亚基成为短肽混合物,最小的解离单位只能是亚基单体。从图 4 中可知, AVBF的亚基分子量约为 20790.88 Da。标准蛋白质 BSA 由单亚基类型组成,其分子量约为 66 kDa。参考上述已获得的实验结果、相关信息和图 6 结果,可直观地得出以下结论:(1)图 6Bb和图 6Db的 AVBF亚基聚合体的电泳迁移率只略低于 BSA(图 6Aa),从表面现象可看出该聚合体的分子量应略高于 BSA(66 kDa),但实际上,AVBF经乙腈处理后所释放的亚基中的部分一级结构已产生了去折叠现象,暴露部分疏水基团,形成的亚基聚合体,属于非紧密的球状蛋白质;该分子的尺寸应略大于且电泳迁移率应略小于相同分子量的蛋白质(紧密球状体),例如 BSA。(2)图 6Bb和图 6Db的 AVBF亚基聚合体的分子量与 BSA 很靠近,属于 AVBF亚基三聚体(20790.88 × 3 = 62372.64 Da)。高于 BSA 电泳迁移率的 AVBF的亚基聚体只能是 AVBF亚基二聚体或亚基单体。根据蛋白质迁移率,依此类推,图 6Dc中的蛋白带是 AVBF亚基二聚体,图 6Bd和图 6Dd中的蛋白带是 AVBF亚基单体。

图 6B 和 C 分别为饱和 HCCA 加 0.1% TFA 处理 AVBF 和 SLF 后所获得的电泳图谱,从图中可看出 HCCA 能使 AVBF 释放不稳定的亚基单体且部分亚基聚合成三聚体,但而无法使 SLF 释放不稳定的亚基。选用饱和 SA 处理 AVBF 和 SLF 后,所获得的电泳图谱(图 6D-E)与图 6B-C 不同,可直观地看到 AVBF 分别形成了亚基单体(图 6Bd 和 6Dd)、亚基二聚体(图 6Dc)和亚基三聚体(图 6Bb 和 6Db),说明溶解基质中的微量 TFA 对铁蛋白亚基稳定性影响较小,SA 和 HCCA 均能使 AVBF 释放不稳定的亚基,而无法使 SLF 释放不稳定亚基,但两者引起铁蛋白亚基去折叠的强度有明显差异,HCCA 使 AVBF 释放部分去折叠的亚基,所暴露的疏水基团无法进一步聚合成二聚体,但 SA 却能使 AVBF 亚基解离且聚合成三聚体、二聚体和亚基单体。显然 HCCA 和 SA 作用于 AVBF 亚基的不同部位,所产生亚基部分去折叠的一级结构也不相同。SLF 亚基之间相互作用强度高于 AVBF。由单类型亚基组成且不同来源的铁蛋白的亚基之间的相互作用强度也有所差别。铁蛋白亚基之间的相互作用强度差异性可能是铁蛋白参与释放铁、储存铁和捕获有机小分子另一种新途径与过程。

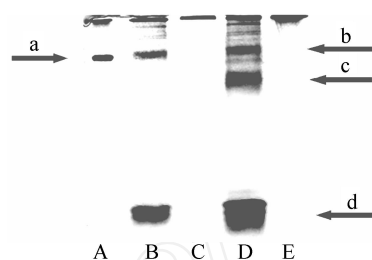


图 6 经基质处理后,AVBF亚基、多聚体的 PAGE图谱

Fig 6 PAGE map of AVBF subunits and its polymers after treated by matrix
a: 牛血清白蛋白 (BSA); b: 亚基三聚体 (subunit trimer); c: 亚基二聚体 (subunit dimer); d: 亚基单体 (subunit). A: 牛血清白蛋白 (BSA); B: AVBF + 饱和 HCCA + 0.1% TFA (AVBF + saturated HCCA + 0.1% TFA); C: 鲨鱼肝铁蛋白 + 饱和 HCCA + 0.1% TFA (SLF + saturated HCCA + 0.1% TFA); D: AVBF + 饱和 SA (AVBF + saturated SA); E: 鲨鱼肝铁蛋白 + 饱和 SA (SLF + saturated SA)。

References

- Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, Cai Z, Chen P. *B iophysical Chen istry*, **2004**, 111(1): 213 ~ 222
- Waldo G S, Ling J, Sanders-Loehr J, Theil E C. *Science*, **1993**, 259(5096): 796 ~ 798
- Macedo S, Romao C V, Mitchell E, Matias PM, Liu M Y, Xavier A V, Legall J, Teixeira M, Lindley P, Carondo M A. *Nature Structural B iology*, **2003**, 10(4): 285 ~ 290
- Hamburger A E, West Jr A P, Hamburger Z A, Hamburger P, Bjorkman P J. *Journal of M olecular B iology*, **2005**, 349(3): 558 ~ 569
- Suryakala S, Deshpande V. *Veterinary Research Canm unication*, **1999**, 23(1): 165 ~ 181
- Wai S N, Takata T, Takade A, Hammasaki N, Amado K. *Achievem ent M icrobiology*, **1995**, 164(1): 1 ~ 6
- Kong B, Huang H Q, Lin Q M. *Journal of Protein Chen istry*, **2003**, 22(1): 61 ~ 70
- Huang, H Q, Xiao, X Q, Lin Q M, Chen P. *Analytical Chen istry*, **2005**, 70(6): 1920 ~ 1927
- Ueno T, Abe S, Yokoi N. *Coordination Chen istry Reviews*, **2007**, 251(21-24): 2717 ~ 2731
- Dom inguez-Vera J M. *Journal of Inorganic Chen istry*, **2004**, 98: 467 ~ 472

- 11 Huang He-Qing(黄河清), Chen Ping(陈平), Zhu Bin-Lin(朱斌琳), Lin Qing(林青), Lou Lian-Zhong(罗联忠). *Chin. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2007**, 28(11): 2073~2080
- 12 Liu H L, Zhou H N, Xing W M, Zhao J F, Li J F, Bi R C. *FEBS Letters*, **2004**, 573(1): 93~98
- 13 Huang H Q, Lin Q M, Wang T L. *Biophysical Chemistry*, **2002**, 97(1): 17~27
- 14 Tom inaga M, Ohira A, Yamaguchi Y, Kunitake M. *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 566(2): 323~329
- 15 Zhao J F, Liu H L, Zhou H N. *Acta Botanica Sinica*, **2004**, 46(11): 1331~1337
- 16 Chen Ping(陈平), Huang He-Qing(黄河清), Lin 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
- 17 Huang He-Qing(黄河清), Lin Qing-Mei(林庆梅), Xiao Zhi-Qun(肖志群), Tong Li(童丽), Kong Bo(孔波), Zhang Feng-Zhang(张凤章). *Acta Biophysica Sinica*(生物物理学报), **2000**, 16(1): 39~47
- 18 Fang Xe-Ping(方雪萍), Huang He-Qing(黄河清). *Journal of Xiamen University*(厦门大学学报), **2004**, 43(3): 393~397
- 19 Zhuo Hui-Qin(卓慧钦), Jin Hong-Wei(金宏伟), Huang He-Qing(黄河清), Huang Hui-Ying(黄慧英), Cai Zong-Wei(蔡宗苇). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2007**, 35(6): 791~796
- 20 Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, Cai Z W. *Aquatic Toxicology*, **2007**, 78(1): 127~135
- 21 Richards T D, Watt G D. *J. Inorganic Biochemistry*, **1996**, 61(1): 1~13
- 22 Huang He-Qing(黄河清), Lin Qing-Mei(林庆梅), Wu Nan(吴楠), Li Xue-Song(李雪松). *Acta Biophysica Sinica*(生物物理学报), **2000**, 16(4): 680~687
- 23 Zhuo Hui-Qin(卓慧钦), Huang He-Qing(黄河清), Weng Lu-Na(翁露娜), Huang Hui-Ying(黄慧英). *Chin. J. Chinese Universities*(高等学校化学学报), **2007**, 28(5): 889~899

Trapping Capacities, Stability and Interaction Intensity of Subunits from Bacterial Ferritin of *Azotobacter Vinelandii*

HUANG Lin^{1,2}, CHEN Xu¹, LUO Lian-Zhong^{1,3}, LIN Qing^{1,2}, HUANG He-Qing^{*1,2,3}

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

² State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface

³ The Key Lab of Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract Bacterial ferritin with purity for the mass spectrometric analysis was prepared by the column chromatography, the electrophoresis and the RP-HPLC in *Azotobacter vinelandii*. Bacterial ferritin of *Azotobacter vinelandii* (AVBF) was further identified by both kinetics of iron release and peptide mass fingerprinting (PMF), respectively. Moreover, the interaction intensity, stability and polymer among subunits in AVBF were further revealed by both MALDI time of flight mass spectrometry and electrophoresis. AVBF can be used to trap organic small molecules such as methylene blue (MB) and the trapping rate is approximately 15.0 ± 2.0 MB/AVBF, which indicates that the heme component located at the interface between monomers of the ferritin subunit participates, contributes to trap MB. AVBF and liver ferritin of shark (SLF) can directly release its unstable subunits for the mass spectrometric analysis under the 40% - 50% condition both acetonitrile and acetone, respectively, but both proteins can not release the subunits for the analysis under the condition of 20% - 30% acetone unless both proteins absorb the laser from the mass spectrometer further. It was well known that the interaction intensity among subunits in AVBF was lower than that of SLF. The interaction intensity among protein subunits were tightly connected with the rate of iron release and storage in ferritin.

Keywords Bacterial ferritin, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, electrophoresis, subunit, interaction, stability, trapping capacity

(Received 28 November 2007; accepted 25 March 2008)