

MALDI-TOF 质谱技术研究铁蛋白 蛋白壳表层的电荷分布

黄河清^{1,2,3}, 孔波¹, 林庆梅³, 陈晋安¹, 曹廷明¹

(厦门大学 1. 生命科学学院; 2. 海洋与环境科学教育部重点实验室;

3. 固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要:采用 Sephacryl S-300 排阻层析和 DEAE-纤维素层析技术分离纯化鲑鱼肝铁蛋白(Liver ferritin of *Dasyatis Akajei*, DALF)。纯化后的 DALF 经梯度聚丙烯酰胺凝胶再次分离后,显示出两条凝胶带,即单分子 DALF 和双聚态 DALF。选用基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS)研究 DALF 的电荷分布时,发现 DALF 蛋白壳表面上显示出三种不同质荷比的分子离子峰,其质荷比为 10369.41 m/z、20710.33 m/z 和 41809.43 m/z。当 DALF 亚基被解离后,这三个分子离子峰随之消失,因而推测 DALF 蛋白壳表层存在着高密度正电荷区域,并与该蛋白形成非电惰性有着密切联系。通过拟出 DALF 蛋白壳表面电荷分布模型,进一步阐明 DALF 从铂电极上接受电子的机理。

关键词: 鲑鱼肝; 铁蛋白; 质谱; 电泳; 电荷分布; 电子传递

中图分类号: Q617 文献标识码: A 文章编号: 1000-6737(2002)01-0099-05

铁蛋白广泛地存在于动植物及微生物机体中^[1,2]。在体内,铁蛋白的主要生理功能是储存细胞中过剩的游离铁,避免铁中毒。然而,一旦细胞缺铁时,铁蛋白作为铁供应源,释放铁给细胞^[3,4]。电子显微镜和电子光谱技术研究表明,铁蛋白分子结构由蛋白壳和铁核组成,蛋白壳由 24 个高对称性亚基组成,铁核由数千氢氧化铁离子和数百无机磷酸盐分子组成^[5,6]。铁蛋白蛋白壳上含有两种横跨蛋白壳的隧道,即三相(X.Y.Z)物质交换隧道和电子隧道,前者的作用供无机磷铁及其他小分子进出,后者的功能起着接收及传递电子的作用^[7,8]。经改造及修饰后的铁蛋白反应器能储存有机小分子和各种重金属离子^[9,10],并有可能用于直接监测流动水体污染程度。

铁蛋白是一种非电惰性的蛋白质,这一特性不同于多数蛋白质^[11]。生物电化学技术研究表明,细菌铁蛋白不仅有三相物质交换隧道,而且还含有能从铂金电极上直接接受电子且用于还原自身铁核的电子隧道结构,其隧道中点电位分别为 -125、-310、-370mV(相对于 NHE,下同)^[8,11]。随后,我们又发现了猪脾铁蛋白和 DALF 也是一种非电惰性的蛋白质,并提出哺乳动物铁蛋白也具有电子隧道结构的看法^[9,12]。近几年来,美国 Zapfen 实验室和我们陆续发表了有关铁蛋白能直接从黄

(铂)金电极上接受电子的研究结果^[8-10,12,13],并几乎同时提出铁蛋白易吸附在电极上,并产生了构象变化,以致形成从电极上接受电子能力的论点和模型^[11,14]。这一模型已经为研究铁蛋白直接从物理电极上接受电子能力的机理^[12]和为拓展铁蛋白电化学反应器新功能研究^[13]提供可行性技术。

本文采用了基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱技术(Matrix-assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI/TOF MS)研究铁蛋白蛋白壳表层的电荷分布,企图寻找电子隧道形成机制、电子隧道类型和蛋白与电极吸附位点,从而更合理地阐明铁蛋白直接从电极上接受电子的机理,并为研究其他非电惰性蛋白酶的生物电化学特性和酶催化机理提供新的研究技术。

1 材料与方法

1.1 材料

制备 DALF 的原材料均选用新鲜鲑鱼鱼肝,并去

收稿日期: 2001-8-13

基金项目: 国家自然科学基金(49876027),教育部骨干教师资助计划和海洋环境科学教育部重点基金资助项目

作者简介: 黄河清,教授,电话:(0592)2186630, E-mail: hquang@jingxian.xmu.edu.cn.

除脂肪。

1.2 方法

1.2.1 铁蛋白制备

DALF 分离、结晶和纯化按前述方法进行^[14]。DALF 按常规非变性聚丙烯酰胺电泳技术进行蛋白纯度鉴定。凝胶制备分为浓缩胶和分离胶，浓缩胶浓度为 3% 和线形梯度浓度胶为 4% - 12%。铁蛋白经电泳分离后，随后进行固定，考马斯亮蓝染色，脱色和凝胶成像系统扫描，并确定纯度。铁蛋白经柱层析技术分离后，该蛋白质在电泳凝胶层析带中显示出单分子和二聚态状态。本实验所用的样品事前均为单分子 DALF，不含二聚体的 DALF。

1.2.2 MALDI/TOF MS 技术测定铁蛋白蛋白壳表层电荷分布

选用 BRUKER 公司制造的基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱仪 (REFLEX III 型号) 分析铁蛋白蛋白壳表层电荷分布情况。仪器分析条件综合参考相关文献资料^[15,16]。最后确定条件是：激光波长 337nm，所有数据均以正离子方式采集，加速电压 23KV，延迟时间 40,000 - 1,400ns 之间。基质选用 BRUKER 公司提供的芥子酸。

1.2.3 DALF 亚基制备参考文献[16]方法进行。

2 结果与讨论

2.1 DALF 电泳特性

铁蛋白的分子结构由蛋白壳(厚度为 50 - 60Å)和铁核组成，铁核位于蛋白壳中心^[1,2]，它由数千铁氢氧化物分子 (2100Fe³⁺/DALF) 和数百无机磷化合物分子 (300 P_i/DALF) 组成，铁核分子量约在 20ku 左右。图 1 是 DALF 和脱铁核 DALF (apoDALF) 电泳图。实验前，DALF 样品已经重结晶，并再次经 DEAE - 纤维素层析介质纯化二次，但从图 1 - 1 中可看出，经高度纯化后的 DALF 在凝

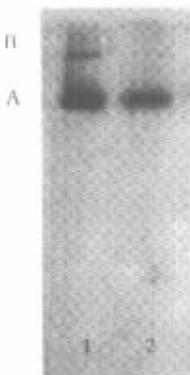


Fig.1 PAGE of DALF and apoDALF
1. A: DALF, B: Dimer - DALF 2. A: apoDALF

胶层析带中仍然显示出两条(A 和 B), A 带的迁移率大于 B 带,即后者蛋白分子量大于前者。经组成分析,A 和 B 带组成均为 DALF,B 带的 DALF 呈二聚体状态,而 A 带的 DALF 呈单分子状态。

图 1 - 2 是脱铁核 DALF (apoDALF) 的电泳图。从图 1 中可看出,失去铁核的 apoDALF 电泳迁移率与 DALF (A 带) 相似,即仅仅 DALF 蛋白壳参与电泳行为,而位于 DALF 蛋白壳中的铁核组成很可能不参与电泳行为,不影响 DALF 的迁移率。由此来看,铁蛋白铁核中铁磷组成及数量对该蛋白表层电荷分布影响不大。

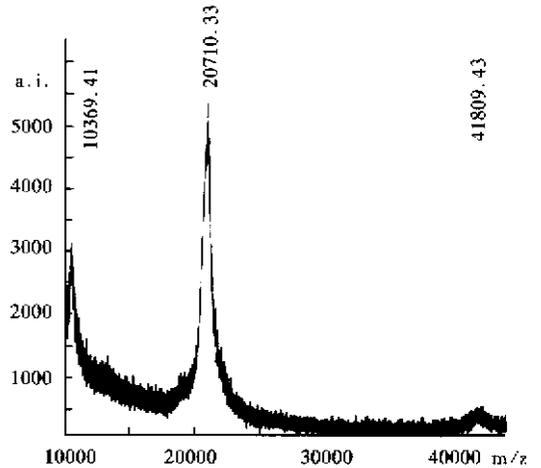


Fig.2 Mass spectrogram of DALF

2.2 DALF 质谱特性

经分离纯化后的 DALF，采用 Sephacryl S - 300 分子筛层析法测定该蛋白的分子量为 400ku 左右,它与 HSF 分子量(440ku)相近。通常,MALDI/TOF MS 技术研究蛋白质理化特性过程中,一般可按双电荷峰 [M + 2H]²⁺, 分子离子峰 [M + H]⁺ 和二聚体离子峰 [2M + H]²⁺ 等方式分析蛋白酶的纯度和分子量^[17]。图 2 是单分子 DALF 离子峰质谱图。从图中可看出,DALF 呈现 3 个分子离子峰,其离子峰的质荷比分别位于 10,369.41, 20,710.33 和 41,809.43 处,大于 45,000 的质荷比区域均无 DALF 分子离子峰。

由于本实验所选用的样品均为单分子型的 DALF,样品中不存在二聚体,而铁核中的铁磷组成又不参加电泳行为(见图 1)。图 2 中 DALF 的最大质荷比 41,809.43 小于 DALF 分子量(400ku)近 10 倍。显然,常规 MALDI/TOF MS 技术计算生物大分子分子量方式不适合用于计量带有高正电荷密度的 DALF 分子量。因而假定这三个分子离子峰

的形成可能是由 DALF 蛋白壳表面某些区域正电荷数量相对集中而引起的。如按 DALF 分子量为 $4.0 \times 10^5 \text{u}$ 计算 ,DALF 蛋白壳表层高密度正电荷集中区域的正电荷数分别为 38.6 Z/DALF, 19.3 Z/DALF 和 9.6Z/DALF。

在自然界中 ,多数蛋白质呈电惰性。近期 ,我们和 Zapfen 课题组的研究认为 ,铁蛋白是一种非电惰性蛋白质 ,其电子传递途径可能与铁蛋白蛋白壳上电子隧道结构或与物理电极产生可逆吸附有关。DALF 能形成三个分子离子峰 ,这说明 DALF 由三种相同分子量 ,但蛋白壳表层却带有不同电荷密度的蛋白质混合组成。这一现象说明了 DALF 蛋白壳外表层的正电荷具有高密度集中特点 ,并使铁蛋白产生了具有定向吸附于带负电位的铂电极的能力 ,引起构象变化 ,促使 DALF 蛋白壳的电子隧道展示出从铂电极上接受电子能力 ,表现出非电惰性的特性^[8]。由于铁蛋白蛋白壳表层的正高密度电荷可能与具有负电位的铂电极产生定向作用 ,从而减少了铁蛋白与电极接触机率 ,使该蛋白释放铁的速率明显小于用化学还原剂与铁蛋白无定向结合所形成的释放铁速率^[8,14]。

2.3 DALF 亚基的质谱特性

实验表明 ,铁蛋白蛋白壳由 24 个高对称性的亚基组成 ,其按组成隧道的亚基数分为三相物质交换隧道 ,四相隧道 ,二相隧道和电子隧道^[18]。图 3 是 DALF 亚基的质谱图。从图中可看出 ,单亚基无法呈现亚基分子正离子峰 ,因而推测该亚基不具有高密度正电荷集中区。显然 ,DALF 蛋白壳表层上所呈现的三个高密度正电荷区域(图 2)与铁蛋白蛋白壳具有的特色结构和亚基排列方式有关。一旦铁蛋白分子结构被损坏 ,DALF 原有的隧道结构将随铁蛋白分

子结构被解离而消失 ,形成 DALF 蛋白壳上的高密度正电荷集中区随着该蛋白分子结构瓦解而消失的现象(图 3)。铁蛋白单亚基结构不存在高密度正电荷集中区。

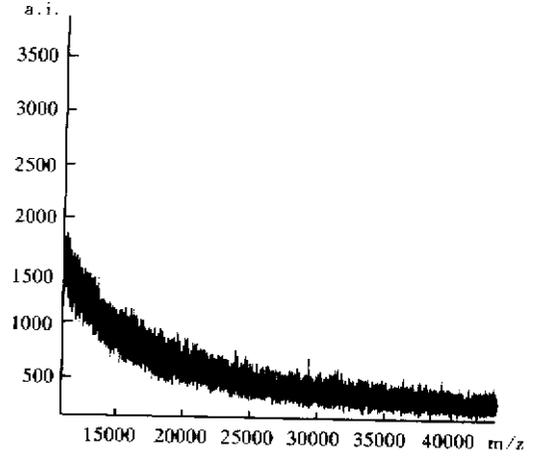


Fig.3 Mass spectrogram of DALF subunit

2.4 铁蛋白从铂电极上接受电子的模型

近期的研究表明 ,铁蛋白的非电惰性特性起因不仅与该蛋白的电子隧道结构有关^[8, 13] ,而且铁蛋白还受还原金属电极所产生强磁场的影响 ,从而引起蛋白壳产生构象变化 ,导出电子传递途径。根据图 2、图 3 的结果 ,我们认为铁蛋白蛋白壳表层可能含有三种不同正电荷密度区域 (38.6 Z/ DALF, 19.3 Z/DALF 和 9.6Z/ DALF)。当铁蛋白通过浓度扩散靠近具有低还原电位的铂电极时 ,由于低电位电极能产生较强的磁场 ,通过磁场定向作用 ,使铁蛋白蛋白表层电荷形成相对集中区域 ,定向吸附于电极上 ,并参与电子隧道形成 ,最终使铁蛋白产生从电极上接受电子的能力 ,因而呈非电惰性状态(图 4)。不同

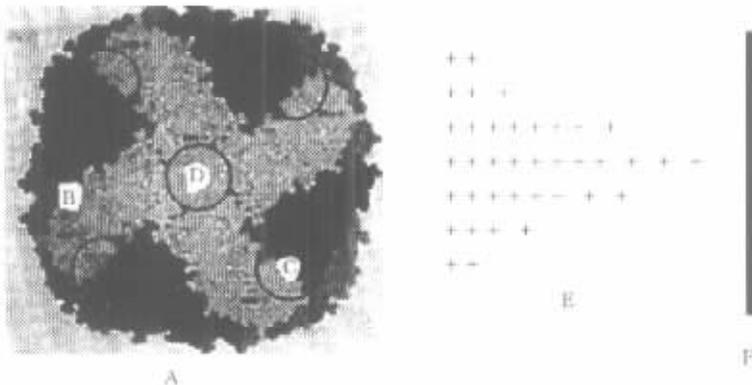


Fig.4 A Model of picking up the electrons between DALF and the electrode. A: Ferritin, B: Protein shell, C: Three - fold channel, D: Four - fold channel, E: Charge distribution, F: Electrode

电荷密度的 DALF 受电极吸附强度不同及停留于电极上的时间也不同,但从电极上接受电子的能力相似,所以铁蛋白始终以零级反应动力学方式释放完整的铁核的铁^[8,13,14]。

参考文献:

- [1] Chasteen ND, Harrison PM. Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of iron storage[J]. *J of Structural Biol*, 1999,126:182-194.
- [2] Huang HQ, Watt RK, Frankel RB, et al. Role of phosphate in Fe^{2+} binding to horse spleen holoferritin[J]. *Biochemistry*, 1993,32:1681-1687.
- [3] Strang S, Morante S, Stefanini S, et al. Nucleation of the iron core occurs at the three-fold channels of horse spleen ferritin: an EXAFS study on the native and hemically-modified protein[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994,1164:331-341.
- [4] Mann S, Williams JM, Treffry A, et al. Reconstituted and native iron-cores of bacterioferritin and ferritin[J]. *J Mol Biol*, 1987,198:405-416.
- [5] Huang HQ, Lin QM, Kong B, et al. Role of phosphate and kinetic characteristics of complete iron release from native pig spleen ferritin-Fe[J]. *J Protein Chem*, 1999,18:497-454.
- [6] Yang D, Nagayama K. Permeation of small molecules into the cavity of ferritin as revealed by proton nuclear magnetic resonance relaxation[J]. *Biochem J*, 1995,307:253-256.
- [7] Yang X, Chasteen ND. Molecular diffusion into horse spleen ferritin: A nitroxide radical spin probe study[J]. *Biophys J*, 1996,71:1587-1595.
- [8] Huang HQ, Zhang FZ, Xu LS, et al. Spectroelectrochemical investigation of *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin[J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1998,44:301-307.
- [9] 黄河清, 林庆梅, 肖志群, 等. 猪脾铁蛋白反应器储存有机小分子能力的研究[J]. *生物物理学报*, 2000,16:39-47.
- [10] 黄河清, 吴楠, 林庆梅, 等. 硒-铁蛋白电化学反应器储存含磷化合物的研究[J]. *生物物理学报*, 2001,17:495-501.
- [11] 黄河清, 林庆梅, 陈翔, 等. 细菌铁蛋白氧化还原特性及电极活性的研究[J]. *生物物理学报*, 1999,15:158-165.
- [12] 黄河清, 林庆梅, 罗大民, 等. 鱼肝铁蛋白铁核表层接受电子能力的研究[J]. *生物物理学报*, 2001,17(4):754-760.
- [13] Zapfen DC, Johnson MA. Direct electron transfer of ferritin adsorbed at bare gold electrode[J]. *J of Electrochemical Chem*, 2000,494:14-20.
- [14] 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学报*, 1999,15:8-14.
- [15] 周国华, 罗国安, 朱敏生. 基质辅助激光解吸质谱法在生物大分子质量研究中的应用[J]. *药物学报*, 1998,33:290-295.
- [16] Babiker EE. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy protein[J]. *Fod Chemistry*, 2000,70:139-145.
- [17] Li LJ, Gard RW, Sweedler JV. Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling[J]. *TIBTECH APPL*, 18:152-160.
- [18] Lobreaux S, Yewdall SJ, Briat JF, et al. Amino-acid sequence and predicted three-dimensional structure of Pea seed ferritin[J]. *Biochem J*, 1992,283:931-939.

STUDIES ON CHARGE DISTRIBUTION ON THE SURFACE OF PROTEIN SHELL OF FERRITIN WITH A MASS SPECTROMETRIC TECHNOLOGY OF MATRIX - ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION/TIME OF FLIGHT(MALDI - TOF MS)

HUANG He - qing^{1,2,3}, KONG Bo¹, LIN Qing - me², CHEN Jin - an¹, CAO Ting - ming¹

(1. School of Life Sciences; 2. MEO Laboratory of Marine and Environmental Science; 3. State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Liver ferritin of *Dasyatis Akajei*(DALF) was separated and purified with exclusion chromatography and DEAE - cellulose chromatography. After being purified, DALF was further separated by the grads of polyacrylamide gel electrophoresis to show two protein bands, a single molecular DALF and a dimer ferritin. Using a technology of MALDI - TOF MS for studying the charge distribution, three peaks of molecular ion with different m/z from DALF were found on the surface of the ferritin, which are measured to be 10,369.41 m/z , 20,710.33 m/z and 41,809.43 m/z . However, these peaks are disappearing while DALF was decomposed into the sub-unit, suggesting that there is positive charge area of high density on the surface of DALF protein shell. These phenomena are tightly connected to the electro - active properties of the protein. In order to understand the mechanism of picking up electrons from the physical electrode, a model was established to study the charge distribution on the surface of protein shell of DALF.

Key Words: Liver of *Dasyatis Akajei*; Ferritin; Mass spectrometry; Electrophoresis; Charge distributing; Electron transfer