

• 研究简报 •

固定 Fe³⁺ 的磁性微球分离富集鼠肝中铁结合蛋白的初步研究

方彩云^a 王 胜^a 刘清萍^a 晏国全^a
陆豪杰^{*,a,b,c} 杨芃原^{*,a,b,c}

(^a 复旦大学化学系 上海 200433)

(^b 复旦大学生物医学研究院 上海 200032)

(^c 复旦大学教育部创新科学仪器工程中心 上海 200433)

摘要 采用键合 Fe³⁺ 的纳米材料分离富集了大鼠肝脏中的铁结合蛋白质组, 并进行了质谱分析. 在相同的起始富集蛋白质量以及相同的吸附和洗脱条件下, 键合了 Fe³⁺ 的磁性纳米材料比未键合金属离子的空白材料富集了更多的蛋白质, 经质谱鉴定得到 42 个蛋白质, 主要包括代谢酶类、呼吸链主要成员、氧化还原蛋白、转运蛋白、血红蛋白等.

关键词 磁性纳米材料; 铁结合; 蛋白质组

Preliminary Study of Iron-binding Proteins in Rat Liver by Magnetic Microsphere Immobilized Iron Affinity Chromatography

FANG, Cai-Yun^a WANG, Sheng^a LIU, Qing-Ping^a YAN, Guo-Quan^a
LU, Hao-Jie^{*,a,b,c} YANG, Peng-Yuan^{*,a,b,c}

(^a Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200433)

(^b Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032)

(^c Education Ministry Engineering Center for Innovative Scientific-instrument, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract Iron-binding proteome of rat liver were enriched by Fe³⁺-immobilized silica nanomaterials and analyzed by HPLC-MS. More proteins were identified with enrichment of the Fe³⁺-immobilized silica nanomaterials than those with normal silica nanomaterials when the starting proteins with the same amount and the same conditions of absorption and elution were used. Finally, 42 iron-binding proteins were identified, which were mainly referred to enzymes of metabolism, members of respiratory chain, proteins involved in oxidation-reduction, transporters and hemoglobins.

Keywords magnetic nanomaterial; iron-binding; proteome

金属在许多生化反应中起催化中心的作用, 同时也是大量调节蛋白的结构中心. 在所有已发现的蛋白质中, 有 1/3 以上必须以金属离子或金属结合部位作为辅因子. 金属蛋白和金属酶在存储和转运金属离子、电子转移、信号转导、基因表达调控等方面都发挥着重要功能, 如铁卟啉使血红蛋白具有载氧功能, 铁-硫原子簇使硫氧还蛋白进行电子转移等. 铁是人体必需的造血营

养元素之一, 参与细胞酶类的合成, 保持细胞的正常功能, 维持机体的生命活动^[1]. 肝脏是人体重要的代谢脏器, 对微量元素的代谢关系非常密切, 也是一个贮存铁的重要器官, 铁主要以铁蛋白的形式存在于肝细胞内. 机体内缺铁时会造成免疫功能和细胞功能的广泛损伤, 使淋巴细胞内 DNA 合成障碍, 抗体产生受阻, 白细胞和巨噬细胞杀伤能力下降. 如: 患急性肝炎时, 因肝细

* E-mail: pyyang@fudan.edu.cn; luhaojie@fudan.edu.cn

Received February 4, 2008; revised May 12, 2008; accepted June 3, 2008.

上海市重点学科建设项目(No. B109)、863 探索课题(No. 2006AA02Z134)资助项目.

胞坏死释出铁元素, 从而引起血清铁升高^[2]. 因此, 研究金属结合蛋白对于理解那些在金属相关的疾病中起关键作用的蛋白质的生物功能和结构是非常重要的.

随着学科的发展, 蛋白质组学的研究内容不断增加. 由于生物样品体系的复杂性以及研究任务的各不相同, 样品的预处理往往显得极为重要. 学科的交叉渗透使得具有特殊结构的纳米材料已越来越多地被用于蛋白质组学研究中, 如应用纳米粒子富集痕量肽段^[3,4], 磷酸化肽的分离富集^[5-8]. She 等^[9]以商品化的固定金属离子螯合色谱(IMAC)研究了三种肝癌细胞系 Hep G2, Mz-Hep-1 和 SKHep-1 中与 Cu 和 Zn 结合的蛋白质组.

我们采用键合 Fe^{3+} 的磁性纳米材料富集和质谱鉴定的方法初步分析了大鼠肝脏中与铁结合的蛋白质组.

1 实验

1.1 化学试剂

丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R-250、Tris、十二烷基硫酸钠(SDS)和溴酚兰为 Amresco (Solon, OH, USA) 的产品; 乙腈(高效液相色谱纯)为 Merck (Darmstadt, Germany) 公司的产品; 胰蛋白酶(测序级, Promega 公司); 甲酸(FA, 色谱纯, FLUKA 公司); 实验中所用水为 Milli-Q 去离子水, 18 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$. 咪唑, 分子生物级(上海迈坤化工有限公司). 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 样品制备

大鼠肝脏组织用生理盐水清洗, 液氮研磨破碎, 加入样品提取缓冲液(lysis buffer, 其组成为 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Triton X-100, 137 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 10% 甘油), 匀浆, 混悬, 离心后取上清, 用 Bradford 法蛋白定量. 用键合了 Fe^{3+} 的纳米材料(合成方法见[10,11])富集得到与铁结合的蛋白质混合物. 具体步骤为: 将材料先用 lysis buffer 洗 4 次, 与蛋白质混合物混合 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 离心弃上清, 再用 lysis buffer 洗孵育后的材料 4 次以去除非特异性吸附, 最后用 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑洗脱蛋白质, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后, 考马斯亮蓝染色. 在相同条件下用没有固定 Fe^{3+} 的材料进行实验作为对照. 将所得的电泳条带分成 10 等分切胶、酶解、色谱分离和质谱鉴定.

1.3 色谱及质谱条件

色谱条件: 色谱系统采用 LC-Packings 色谱系统. 色谱柱: Michrom, Magic C18, 5 μm , 100 \AA . 流动相 A: 5% 乙腈-0.1% FA; 流动相 B: 95% 乙腈-0.1% FA. 流速 200 nL/min . 梯度程序: 0~5 min, B 相为 5%; 5~65 min, B 相由 5% 升至 60%; 65~70 min, B 相升至 90%; 70~80 min, 保持 90% B; 80~90 min, B 相由 90% 降为 0.

质谱条件: 利用 Qstar XL 采集数据. MS 扫描范围: 180~2000 Da (m/z); 每次扫描选择 3 个母离子进行 MS/MS 扫描, 碎片离子扫描范围: 100~2000 Da (m/z). 仪器校正: 实验前采用聚丙烯酰胺(PPG) (购自 ALDRICH 公司, 分子量分布为 100~3000 Da)校正质谱仪, 溶剂为 1:1 甲醇和水(V:V)含 1% 乙酸.

1.4 数据库搜索

用 MASCOT 软件搜索, 数据库为 NCBI, 种属为大鼠, 最大允许漏切位点为 1, 酶为胰蛋白酶. 设置的可变修饰为 carbamidomethylation(半胱氨酸)和 oxidation(甲硫氨酸). 质量误差范围设置: PMF 0.3 Da, MS/MS 0.3 Da; Search 时电荷数为 +1, +2, +3.

2 结果与讨论

将固定了 Fe^{3+} 的纳米材料富集下来的蛋白质混合物(标记为 Sample)和未键合 Fe^{3+} 的纳米材料富集得到的蛋白质混合物(标记为 Control)进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 如图 1 所示.

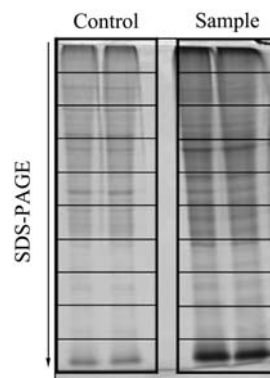


图 1 大鼠肝脏蛋白质经 SiO_2 纳米材料富集(左)和经键合 Fe^{3+} 的 SiO_2 纳米材料富集(右)得到的 SDS-PAGE 图

Figure 1 SDS-PAGE of protein mixture of rat liver enriched by silica nanomaterials (left) and Fe^{3+} -immobilized silica nanomaterials (right)

Both gel lanes were cut into 10 equal length bands. After in gel digested, each band was analyzed by HPLC-MS

从凝胶电泳图谱上可直观地发现, 在相同的起始富集蛋白质量、相同的吸附和洗脱条件下, 用固定了 Fe^{3+} 的材料吸附获得了比空白材料更多的蛋白质, 这表明肝组织中存在大量的能与铁结合的蛋白质.

将条带等分成 10 段, 经切胶、酶解、HPLC-MS 分析, 最终得到 Fe^{3+} 特异吸附(差减掉空白对照的结果)的蛋白有 42 个. 我们发现固定了 Fe^{3+} 离子的材料吸附了一些代谢酶类(如 catalase, phenylalanine hydroxylase)、呼吸链主要成员(如 electron-transferring-flavoprotein

dehydrogenase)、氧化还原蛋白(如 superoxide dismutase 2, thioredoxin domain containing 7)、转运蛋白(如 betaine-homocysteine methyltransferase)、血红蛋白[如 hemoglobin beta chain(血红素结合铁)]等, 这些蛋白都结合铁离子. 例如 catalase 有 4 个血红素亚基与 Fe 直接结合, 负责过氧化物的代谢和无机离子转运, 我们鉴定到该酶 14 个非冗余的肽段. 大鼠肝脏中铁结合蛋白质的结果见表 1.

3 结论

利用固定 Fe^{3+} 的纳米材料分离富集了大鼠肝脏中的铁结合蛋白质组, 经凝胶电泳分离、胶上酶解后, 色谱质谱分析, 共得到了 42 个蛋白质, 主要包括代谢酶类、呼吸链主要成员、氧化还原蛋白、转运蛋白、血红蛋白等.

表 1 大鼠肝脏中铁结合蛋白列表

Table 1 Iron-binding proteins identified from rat liver

No.	GI	Protein Name	No.	GI	Protein Name
1	40018568	Tubulin	22	7106240	Aldo-keto reductase family 7, member A3
2	13591902	Actinin	23	54792127	ATP synthase, H ⁺ transporting
3	6978435	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase	24	62657931	PREDICTED: homogentisate 1,2-dioxygenase
4	57527204	Alpha-ETF	25	34858400	PREDICTED: similar to Alpha-1-inhibitor III precursor
5	6978515	Apolipoprotein A-I	26	34876714	PREDICTED: similar to Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2
6	31377525	Argininosuccinate lyase	27	34860789	PREDICTED: similar to Microsomal triglyceride transfer protein
7	40445397	Beta-glo	28	34867525	PREDICTED: similar to mKIAA0002 protein
8	21955142	Pregnancy-zone protein	29	62639437	PREDICTED: similar to zinc finger protein 69
9	6978607	Catalase	30	62651585	PREDICTED: thioredoxin domain containing 7
10	6978681	Catechol-O-methyltransferase	31	8394076	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6
11	38454200	Choline dehydrogenase precursor	32	8394079	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2
12	8393215	CTL target antigen	33	8394082	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3
13	23463315	Cytochrome P450	34	8394331	Superoxide dismutase 2
14	13928984	Dihydropyrimidinase	35	55742723	Dimethylglycine dehydrogenase precursor
15	6978813	Epoxide hydrolase 1	36	52138635	Electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase
16	16758954	Fructose-1,6-bisphosphatase 2	37	8392833	Acetyl-coenzyme A dehydrogenase, medium chain
17	47087121	Heat shock 70kD protein 1-like	38	11968144	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1
18	51890229	Heat shock 90kDa protein 1, beta	39	6978431	Acetyl-Coenzyme A dehydrogenase
19	11560087	Liver glycogen phosphorylase	40	8392836	Acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1
20	6981236	Myosin	41	6981330	Phenylalanine hydroxylase
21	6981312	Ornithine transcarbamylase	42	13540663	Betaine-homocysteine methyltransferase

References

- Zhang, H.; Zhao, Y.-X.; Yang, L.-X.; Yang, H.-D.; Zhang, L.-X. *Occup. Health* **2000**, *16*, 89 (in Chinese). (张辉, 赵尹肖, 杨丽霞, 杨海迪, 张来新, 职业与健康, **2000**, *16*, 89.)
- Liu, X.-S.; Pan, K.-H.; Fan, Z.-P. *Acta Acad. Med. Jiangxi* **1993**, *33*, 201 (in Chinese). (刘晓松, 潘抗恒, 范志平, 江西医学院学报, **1993**, *33*, 201.)
- Zhang, Y.-H.; Wang, X.-Y.; Shan, W.; Wu, B.-Y.; Fan, H.-Z.; Yu, X.-J.; Tang, Y.; Yang, P.-Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 615.
- Xu, F.; Wang, Y.-J.; Wang, X.-D.; Zhang, Y.-H.; Tang, Y.; Yang, P.-Y. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1751.
- Zhang, Y.-H.; Yu, X.-J.; Wang, X.-Y.; Shan, W.; Yang, P.-Y.; Tang, Y. *Chem. Commun.* **2004**, 2882.
- Pan, C.-S.; Ye, M.-L.; Liu, Y.-G.; Feng, S.; Jiang, X.-G.; Han, G.-H.; Zhu, J.-J.; Zou, H.-F. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 3114.

- 7 Zhou, H.-J.; Xu, S.-Y.; Ye, M.-L.; Feng, S.; Pan, C.-S.; Ji-ang, X.-G.; Li, X.; Han, G.-H.; Fu, Y.; Zou, H.-F. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2431.
- 8 Wang, Y.-B.; Chen, W.; Wu, J.-S.; Guo, Y.-L.; Xia, X.-H. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1387.
- 9 She, Y.-M.; Narindrasorasak, S.; Yang, S.-Y.; Spitale, N.; Roberts, E.-A.; Sarkar, B. *Mol. Cell. Proteomics* **2003**, *2*, 1306.
- 10 Xu, X.-Q.; Deng, C.-H.; Gao, M.-X.; Yu, W.-J.; Yang, P.-Y.; Zhang, X.-M. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 3289.
- 11 Xu, X.-Q. *Ph.D. Dissertation*, Fudan University, Shanghai, **2007** (in Chinese).
(徐秀青, 博士论文, 复旦大学, 上海, **2007**.)

(A0802044 SUN, H. P.; DONG, H. Z.)