

电泳和质谱技术研究4种胰脏铁蛋白的亚基类型和等电点特性

林志超¹, 林青¹, 朱峰¹, 黄河清^{1,2,3*}

(1. 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;

2. 厦门大学化学化工学院固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;

3. 厦门大学化学生物学福建省重点实验室, 福建 厦门 361005)

摘要 :采用电泳和质谱技术对所制备的鸡、鸭、牛和猪胰脏铁蛋白的亚基类型和等电点特性进行了研究。采用天然聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术研究的结果表明,上述4种铁蛋白呈现不同的迁移率,据此可知鸡胰铁蛋白的相对分子质量(M_r) > 鸭胰铁蛋白的 M_r > 黄牛胰铁蛋白的 M_r > 猪胰铁蛋白的 M_r ,而且均大于马脾铁蛋白(HSF)的 M_r 。采用十二烷基硫酸钠(SDS)-PAGE技术研究的结果表明,上述4种铁蛋白均由H(heavy chain)和L(light chain)类型的亚基组成,但H和L亚基的相对数量(即H/L亚基数量的比值)有差别。采用肽指纹图谱技术分别鉴定各铁蛋白的H和L亚基。选用变性电聚焦方法研究发现,上述4种铁蛋白分别由3~6种不同等电点的亚基聚合物组成,说明铁蛋白的H和L亚基之间呈现复杂的相互作用和不同的聚合物。不同陆生动物胰脏铁蛋白亚基之间相互作用的强度和聚合态存在着差异,这一差异特性可能与调控铁蛋白释放铁的速率有关,也与动物对铁的需求和铁解毒速率有关。

关键词 :电泳;质谱;肽质量指纹图谱;铁蛋白;胰脏;亚基;鉴定

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)01-0096-06 栏目类别 :研究论文

Characteristics of subunit types and isoelectric points in four pancreas ferritins by electrophoresis and mass spectrometry

LIN Zhichao¹, LIN Qing¹, ZHU Feng¹, HUANG Heqing^{1,2,3*}

(1. Department of Biochemistry and Biotechnology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005,

China; 2. State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, College of Chemistry & Chemical

Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. The Key Lab of Chemical Biology

of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : The pancreas ferritins from chickens, ducks, cattle and pigs were isolated by thermal denaturation, ammonium sulphate fractionation and DEAE-52 cellulose anion exchange chromatography separately, in order to obtain the characteristics both subunit types and isoelectric points. Four ferritins such as chicken pancreas ferritin (ChPF), duck pancreas ferritin (DPF), cattle pancreas ferritin (CaPF), and pig pancreas ferritin (PPF) showed different mobility in polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The relative molecular masses (M_r) of these ferritin were indicated to be $M_r(\text{ChPF}) > M_r(\text{DPF}) > M_r(\text{CaPF}) > M_r(\text{PPF})$, which are all bigger than that in horse spleen ferritin (HSF). Sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE results indicate that ChPF, DPF, CaPF and PPF consist of H and L subunits, showing different ratios of H/L subunits. Two subunit types in the ferritin were further identified by peptide-mass fingerprinting (PMF) technology. The four ferritins such as ChPF, DPF, CaPF and PPF in denatured-isoelectric focusing (IEF) gel show the subunit polymers containing from 3 to 6 with different pI values, respectively. These phenomena reveal the complicated interactions and different polymers between H and L subunits in the ferritins. There are differences both interaction intensities and polymers in the ferritin subunits coming from different mammals. These heterogeneity may response to the rate of iron release in ferritins and to the detoxification requirement of iron in animals *in vivo*.

* 通讯联系人: 黄河清, 教授, 博士生导师, 研究方向为蛋白质结构与功能。E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 40776060)和福建省高校创新团队资金项目。

收稿日期: 2008-06-27

论文第一作者和第二作者对本文贡献相同, 排名不分先后。

Key words : electrophoresis ; mass spectrometry (MS) ; peptide mass fingerprinting ; ferritin ; pancreas ; subunit ; identification

在自然界中,铁蛋白(ferritin)是一种很特殊的储存铁的蛋白质,它由 24 个亚基组成,且以高对称性结构方式构成球状蛋白体,并作为细胞内储存和供给铁的“仓库”^[1-3]。铁蛋白分子结构由蛋白质壳、铁核和横跨蛋白质壳的隧道组成^[4]。哺乳动物包括人类铁蛋白主要由两类亚基(称为 H(heavy chain)和 L(light chain)型亚基)组成,而细菌铁蛋白(bacterial ferritin, BF)和鲨鱼肝铁蛋白(liver ferritin of shark, SLF)却由单类型亚基组成^[5-7]。铁蛋白的 H 亚基主要负责氧化 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} , 并把铁储存于蛋白质壳内的铁核中;而 L 亚基主要承担在铁蛋白空腔内表面提供酸性残基以促进铁核形成的生理功能。经大量的文献检索后发现开展有关铁蛋白结构与功能研究的实验材料均选用商品化产品马脾铁蛋白(HSF)。不同种属来源的铁蛋白亚基类型、H/L 亚基数量的比例、不同等电点的铁蛋白、铁蛋白铁核组成和横跨蛋白壳隧道结构与功能等系列问题一直存在着争议,其中有关亚基类型问题更为突出。

大量的临床诊断报告和研究报道已指出,人血清中超微量铁蛋白的含量高低可作为诊断人类各类重大疾病的辅助性标志物,例如肿瘤^[8]、糖尿病^[9]和心血管等疾病,但能否作为高效的疾病诊断的蛋白标志物却一直存在着争议。至今,有关人血清中铁蛋白的定量分析主要依据来源于它的蛋白壳相对含量,并未考虑铁蛋白的分子结构特征,尤其是未考虑铁蛋白亚基类型和 H/L 亚基数量的比值变化与疾病的关系等重要因素。由于铁蛋白的 H 和 L 亚基之间的相对分子质量(M_r)相差不大,若直接采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)且未经优化分离,通常会因分辨率较差而影响分离结果^[10,11]。此外,铁蛋白是一种易与其他蛋白络合的蛋白质,因而在分离制备过程中,易络合其他杂蛋白,直接影响铁蛋白亚基类型的定性分析。即使采用高效液相色谱分离鉴定技术,若未建立优化的高效分离条件,同样也难以有效地分离铁蛋白的 H 和 L 亚基,因而影响了准确地定性分析铁蛋白亚基类型和半定量分析它的 H/L 亚基数量比例等铁蛋白分子结构的重要理化参数。

本文在优化建立的小批量制备动物胰脏铁蛋白^[11]的基础上,采用电泳和质谱技术对鸡、鸭、牛和猪胰脏铁蛋白的亚基类型、等电点特性进行了研究;此外,还采用蛋白质组学技术进一步鉴定了铁蛋白

亚基类型。

1 实验部分

1.1 主要仪器、材料与试剂

Agilent 1100 分析型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);REFLEX III 型基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)(德国 Bruker 公司);超速离心机(美国 Beckman 公司)。

提取胰脏铁蛋白——鸡胰铁蛋白(ChPF)、鸭胰铁蛋白(DPF)、黄牛胰铁蛋白(CaPF)和猪胰铁蛋白(PPF)所需的 4 种动物胰脏均来源于新鲜组织。DEAE-52 纤维素(Wateman 公司);丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris) (Sangon 公司);马脾铁蛋白(华美生物公司);SDS 蛋白质分子质量标准品(Sigma 公司);胰蛋白酶(Promega 公司);质谱基质:2,5-二羟基苯甲酸(DHB)、2-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、芥子酸(SA)(美国 ICN 生物医学公司);两性电解质载体(北京军事医学科学院);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 胰脏铁蛋白的制备

采用文献[11]的方法制备上述 4 种动物脾脏铁蛋白。

1.2.2 PAGE 分离胰脏铁蛋白

采用 Tris-甘氨酸不连续电泳体系,浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 5%,浓缩胶电压为 70 V,分离胶电压为 120 V。未加 SDS 的 PAGE(即天然 PAGE)的样品处理:铁蛋白与天然 PAGE 的样品缓冲液(由 3.1 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、5 mL 甘油和 0.5 mL 1% 溴酚蓝组成)以 1:4 的体积比混合后,离心去除沉淀物,收集上清液用于电泳分离。考马斯亮蓝染色和脱色方法:按文献[11]进行。铁染色方法:将上述铁蛋白经天然 PAGE 分离后,将凝胶用双蒸水(DDW)洗 3 遍,然后加入铁染色液(由 0.1 mol/L $K_3Fe(CN)_6$ 、0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mol/L NaCl 组成),迅速置于暗处避光染色 10 min,然后弃去铁染色液,用 DDW 迅速漂洗一次,加入显影液(由 10% 甲醇和 10% 三氟醋酸(TCA)水溶液组成)覆盖凝胶,至少振荡 0.5 h,即可在黄色背景中出现蓝色的蛋白条带。采用凝胶成像系统扫描确定 4 种铁蛋白的相对分子质量(M_r)。

1.2.3 SDS-PAGE 分析铁蛋白亚基类型

采用 Tris-甘氨酸不连续电泳体系,浓缩胶浓度

为 5% ,分离胶浓度为 15% ,浓缩胶电压为 70 V ,分离胶电压为 200 V ,变性 SDS-PAGE 在 4 ℃ 下进行分离。铁蛋白与 SDS 样品缓冲液(由 0.6 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.8)、5 mL 50% 甘油、1 mL 1% 溴酚蓝、0.5 mL β-巯基乙醇或 0.2 g 二硫苏糖醇(DTT)组成)以 1:4 的体积比混合后,于 100 ℃ 煮 5 min ,随后离心除去沉淀物,收集上清液用于电泳分离。考马斯亮蓝染色和脱色方法:按文献[11]进行。选用凝胶成像扫描系统确定及分析铁蛋白亚基类型和亚基之间的组成比。根据 SDS-PAGE 凝胶板上的蛋白质谱带数目,定性分析亚基类型。

1.2.4 质谱技术与鉴定铁蛋白亚基

取 0.1% 的三氟乙酸(TFA)水溶液和 30% 的乙腈(CAN)按 7:1 的体积比配成混合溶液。根据试验要求加入饱和的芥子酸于该混合溶液中,超声波处理 5 min ,离心(6 000 r/min) 5 min ,收集上清液,即为饱和基质溶液。将铁蛋白亚基和饱和基质溶液按 1:1 的体积比混合后,取 1 μL 混合物直接点在 MALDI-TOF-MS 的专用样品靶上,在室温下自然干燥后,将样品靶直接放入质谱仪的靶箱内进行样品分析。选用配置脉冲氮激光(337 nm)离子源的 MALDI-TOF-MS ,采用线性模型分析,在加速电压控制在 25 kV 等条件下,每一测定样品随机选择 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标定质谱峰位。

铁蛋白亚基肽指纹图谱分析参考文献[12]的方法,利用网上数据库(SWISS-PROT and TrEM-BL)对肽指纹图谱进行检索分析与鉴定^[13]。

1.2.5 变性等电聚焦(IEF)电泳测定 4 种铁蛋白变性等电点

采用文献[11]的方法对 ChPF 等 4 种铁蛋白进行变性 IEF 电泳分析^[11]。

2 结果与讨论

2.1 胰脏铁蛋白的天然 PAGE 图谱

图 1 是 4 种胰脏铁蛋白和 HSF 的天然 PAGE 图谱,从中可看出 ChPF、DPF、CaPF 和 PPF 呈现不同的迁移率。与 HSF 的迁移率相比,ChPF 的迁移率(V_{ChPF})最低,而 PPF 的迁移率(V_{PPF})最高,即 $V_{PPF} > V_{CaPF} > V_{DPF} > V_{ChPF}$ 。根据 PAGE 分离的基本原理,不同来源的同一类型的蛋白质,其电泳迁移率越高,对应的相对分子质量(M_r)越小。根据这一原理,可获悉在这 4 种胰脏铁蛋白中,ChPF 的 M_r 最大,DPF、CaPF 和 PPF 的 M_r 按顺序依次降低,但它们均大于 HSF 的 M_r 。为了进一步证实图 1 的电泳

谱带中的蛋白质是否是铁蛋白,本文选用铁染色法进行染色,并获得图 2 所示的结果。图 2 中的 5 种蛋白质均显示出铁染色现象,表明它们均属于高含铁量的蛋白质,其蛋白质的迁移率和电泳谱带的长度与图 1 结果极为相似,这进一步说明所制备的蛋白质具有较高的纯度,可称为电泳纯蛋白质,为后续揭示 4 种胰脏铁蛋白的亚基类型和不同等电点提供了高纯度的蛋白质样品。根据图 1 中的 5 种铁蛋白来源及动物的进化地位,可获悉哺乳动物的胰脏和脾脏铁蛋白(如:黄牛胰脏、猪胰脏和马脾脏铁蛋白)的 M_r 均小于卵生动物(如:鸡和鸭)的,这些差异性与不同的动物组织细胞内铁蛋白储存铁的数量和释放铁的速率有关,同时可能也与各自铁蛋白之间的 H/L 亚基数量的比例不同有关。

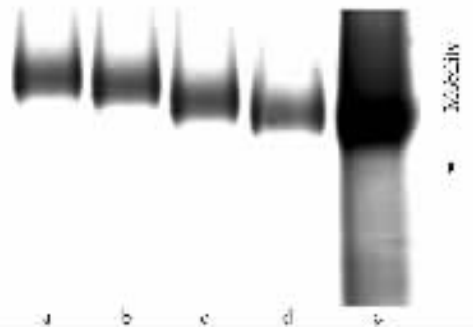


图 1 4 种胰脏铁蛋白和马脾铁蛋白的 PAGE 图谱
Fig. 1 PAGE maps of four pancreas ferritins and horse spleen ferritin
a. ChPF; b. DPF; c. CaPF; d. PPF; e. HSF.

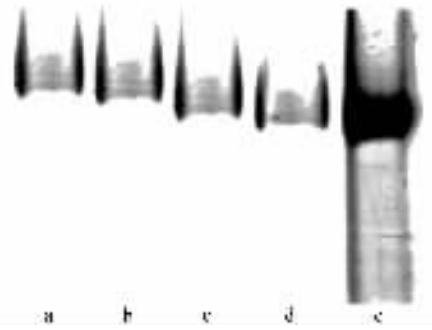


图 2 4 种胰脏铁蛋白和马脾铁蛋白的铁染色图谱
Fig. 2 Iron-staining maps of four pancreas ferritins and horse spleen ferritin
a. ChPF; b. DPF; c. CaPF; d. PPF; e. HSF.

2.2 铁蛋白亚基类型

已知动物铁蛋白均由 24 个呈高对称性结构的亚基组成,亚基之间的结合紧密度与铁蛋白分子的尺寸大小有关,因而会影响到铁蛋白的电泳迁移率,从而直接影响铁蛋白 M_r 的定性结果。高效分离且鉴定不同来源的铁蛋白的亚基类型和 H/L 亚基数量的比值,对于科学合理地揭示铁蛋白的结构与功能极为重要。

采用 SDS-PAGE 等方法得到的研究表明,上述 4 种胰脏铁蛋白均由 H 和 L 两种亚基组成,这一规律与多数陆生动物的铁蛋白亚基类型相似。但图 3-b 和图 4-b 的结果却显示,DPF 和 CaPF 之间的 H 和 L 亚基相对数量(亚基蛋白显色度)比值有所不同,即 DPF 的 H 亚基数量明显少于 L 亚基(见图 3-b),而 CaPF 的 H 和 L 亚基的相对数量(亚基蛋白显色度)差别较小(见图 4-b),即 CaPF 的 L 亚基(L_{CaPF})的数量只略高于 H 亚基(H_{CaPF})的数量。由于 DPF 和 CaPF 均由 24 个亚基组成,H 亚基的 M_r (21 000)均略高于 L 亚基的 M_r (19 000)^[11],根据 H_{DPF}/L_{DPF} (图 3-b)相对数量明显小于 H_{CaPF}/L_{CaPF} (图 4-b)的分析结果,可推算出 DPF 的 M_r 实际上小于 CaPF 的 M_r ,而不是大于 CaPF 的 M_r 。需要注意的是,这个结论不同于图 1 中所显示的 $V_{CaPF} > V_{DPF}$ (即 $M_r(DPF) > M_r(CaPF)$)的实验结果。

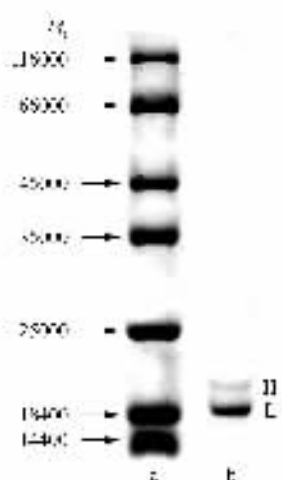


图 3 鸭胰铁蛋白的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 3 SDS-PAGE maps of DPF
a. markers ; b. DPF.



图 4 黄牛胰铁蛋白的 SDS-PAGE 图谱
Fig. 4 SDS-PAGE maps of CaPF
a. markers ; b. CaPF.

铁蛋白分子结构由蛋白壳(M_r 为 440 000)、铁核(M_r 为 220 000)和横跨蛋白壳的隧道组成,但铁蛋白和脱铁核铁蛋白(apoferritin)经 PAGE 分离后却显示出相似的迁移率和等电点^[9]。这一异常现象说明了位于铁蛋白的蛋白壳与亚基之间的相互作用较强,亚基之间所组建的蛋白壳空腔具有较高的刚性,即使去除铁核也不会影响具有刚性结构的蛋白壳分子尺寸和外表层的电荷分布情况,仍将保持铁蛋白和脱铁核铁蛋白具有相同迁移率的异常电泳现象。然而,不同来源的铁蛋白,由于其亚基一级结构的差异性,使得亚基自身的折叠紧密度和亚基之间的相互作用强度略有差别,导致 24 个亚基组成的铁蛋白分子尺寸表现出差异性,造成铁蛋白的迁移率与铁蛋白的实际 M_r 无法呈现一一对应的关系。这一异常现象和论点至今尚未见详细报道。因而,采用 SDS-PAGE 方法(见图 3 和图 4)分析铁蛋白的 M_r 可能比采用 PAGE 方法(见图 1)更为科学和合理。铁蛋白分子尺寸的大小可能与不同来源的铁蛋白在机体中储存铁的数量以及释放铁的速率有关。哺乳动物(例如本文中的牛和猪)的铁蛋白电泳迁移率高于卵生动物(例如本文中的鸡和鸭)铁蛋白,但实际铁蛋白的 M_r 大小却出现反常现象,其主要原因与铁蛋白亚基自身折叠和组建蛋白壳的紧密度有关。

2.3 肽质量指纹图谱技术鉴定铁蛋白亚基

肽质量指纹图谱(PMF)技术是目前蛋白质组学研究中用于鉴定蛋白质的主要分析手段之一^[13]。铁蛋白易络合其他杂蛋白,并在 SDS-PAGE 层析板上显示出多条蛋白质谱带,这使得仅用 SDS-PAGE 方法鉴定铁蛋白的 M_r 及其亚基类型的准确性被质疑。因此,选用 PMF 技术进一步鉴定铁蛋白的亚基类型是很有必要的。图 5 是 ChPF 和 CaPF 亚基的 PMF 图谱,其所显示的肽指纹峰的数量和短肽的质荷比(m/z)的信号相对强度均能够满足 PMF 技术鉴定铁蛋白亚基类型的基本要求。经过相关数据库检索和比对后,可以获得表 1 所示的检索结果。从表 1 中可以直观地看出,图 3 中显示的亚基蛋白质谱带均归属于铁蛋白的 H 和 L 亚基类型。此外,实验中还选用了相似的 PMF 分析技术对 DPF 和 PPF 的亚基类型进行比对鉴定,同样也能获得 DPF 和 PPF 的 H 和 L 亚基的鉴定结果。通过这些现象认定本文所制备的鸡、鸭、牛和猪胰脏铁蛋白均由 H 和 L 亚基组成,但它们的 H/L 亚基数量的比值不同(见图 3 和图 4),其各自的铁蛋白分子尺寸也存在着差异(见图 1)。

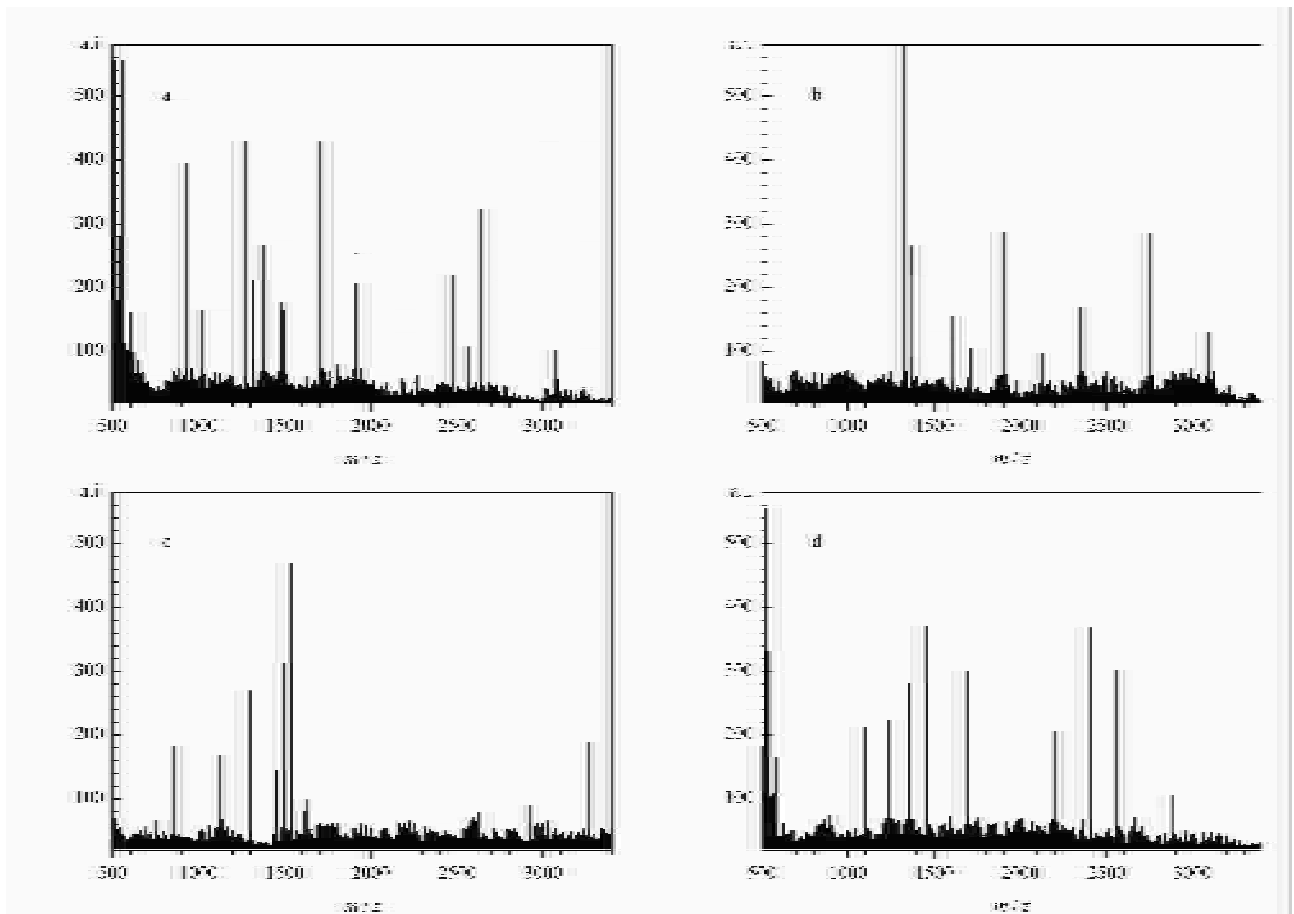


图 5 CaPF 和 ChPF 亚基的肽质量指纹谱图

Fig. 5 PMF maps of CaPF and ChPF subunits

a. subunit H of CaPF ; b. subunit L of CaPF ; c. subunit H of ChPF ; d. subunit L of ChPF.

表 1 铁蛋白亚基类型的鉴定结果

Table 1 Identified results of subunit types in ferritins

Subunit type	Protein name	Mowse score	Peptides matched	Sequence coverage/%
CaPF-H	ferritin heavy chain (ferritin H subunit)	143	10 (17)	83
CaPF-L	ferritin , light polypeptide	98	7 (15)	51
ChPF-H	ferritin , heavy polypeptide 1	124	9 (15)	68
ChPF-L	ferritin light chain 2 (ferritin L subunit 2)	81	6 (14)	45

PMF 技术是开展蛋白质组学研究过程中用于鉴定未知蛋白质或多肽的首选分析技术之一。表 1 中的匹配肽段数(peptides matched)的含义是图 5 中所提供的蛋白质肽段数目与指定检索数据库中的参考蛋白质肽段数目的匹配程度,例如,表 1 显示了 CaPF-H 样品的匹配肽段数为 10(17),即从 CaPF 的 H 亚基的 PMF 图谱(见图 5-a)中筛选出可用于鉴定的 17 个肽段,其中有 10 个肽段的质荷比值与数据库中的参考铁蛋白 H 亚基肽段的质荷比值相对应。覆盖率(sequence coverage)是指 CaPF 的 H 亚基一级结构与数据库中的参考铁蛋白 H 亚基一级结构的相似程度,也称为同源性。通常,检索分数(Mowse score)大于 50 分时,对未知蛋白质的鉴定结果已具备较高的可信度;检索分数越高,所鉴定

的蛋白质的可信度越高。从表 1 中可直观地看出,本实验中 CaPF 和 ChPF 的亚基类型的鉴定结果具有较高的可信度。

2.4 变性胰脏铁蛋白的等电点

近期的实验结果已经表明,鲑鱼肝铁蛋白(DALF)和鲨鱼肝铁蛋白(SLF)存在着不同的等电点(pI),这一现象可能与铁蛋白的蛋白壳内含铁量不同有关。不同含铁量的铁蛋白,其铁核结构可能直接影响蛋白质壳表层的电荷分布,使之产生不同的等电点现象^[4,12]。图 6 是 ChPF、DPF、CaPF 和 PPF 变性后产生的不同等电点的电泳图谱,4 种胰脏铁蛋白均显示了蛋白质的 4~6 个不同等电点, pI 介于 5.8 与 6.6 之间,其中 CaPF 和 PPF 显示了 4 个不同等电点的亚基聚合物,而 ChPF 和 DPF 却分

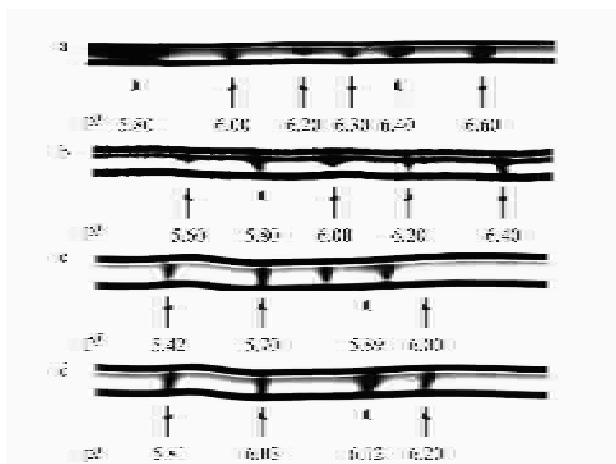


图 6 4 种变性胰脏铁蛋白的等电聚焦电泳图

Fig. 6 IEF maps of four denatured pancreas ferritins
a. ChPF; b. DPF; c. CaPF; d. PPF.

别显示了 6 个和 5 个不同等电点的亚基聚合体。初步推测胎生胰脏铁蛋白(CaPF 和 PPF)形成的不同等电点的亚基聚合体数目少于卵生胰脏铁蛋白(ChPF 和 DPF)。胰脏铁蛋白经 SDS 变性后,各自产生 4~6 种不同亚基聚合态且显示不同等电点的蛋白质。根据等电点分离原理,可以推测同一种类型的电泳纯蛋白质呈现出不同等电点,其主要原因与蛋白质壳外层所携带的电荷数目与电荷分布的差异性有关^[14]。脊椎动物的 L 亚基与具有催化活性的 H 亚基组合成聚合体后,至少能够获得 25 种铁蛋白异构物(包括两种 H/L 亚基的组合),而且聚合体的构成与铁的含量有关^[5,15-17]。图 3 和图 4 的电泳研究结果已经表明,上述 4 种胰脏铁蛋白均由 H 和 L 两种亚基组成,因此认为它们呈现不同等电点的主要原因在于 H 和 L 亚基之间形成了多种亚基聚合体,使得亚基聚合体表层带有不同的电荷数目,电荷分布也不同,因而表现出不同的等电点特性。而多种聚合体的出现反映了铁蛋白 H 和 L 亚基之间复杂的相互作用,这种复杂的相互作用又是与亚基之间相互作用强度不同有关,而这种作用强度的不同又是与铁蛋白含铁量有着密切的关系。组成铁蛋白的亚基聚合体的生理功能和作用尚不清楚,可能与铁蛋白亚基之间协助参与释放和储存铁的过程有关^[5]。从图 6-a 和图 6-b 中可以直观地看出 ChPF 和 DPF 的亚基聚合体蛋白染色带的宽度和色度深浅有明显的不同,这与 ChPF 和 DPF 亚基聚合体数量和亚基总数量有关。进一步分析还可以发现, CaPF 和 PPF 亚基聚合体蛋白染色带的宽度和色度深浅差别相对较小,推测这两种铁蛋白所形成的亚基聚合体中的亚基数量较为接近,同时也说明卵生动物胰脏铁蛋白(ChPF、DPF)亚基之间的

相互作用复杂性明显高于胎生动物胰脏铁蛋白(CaPF、PPF)。陆生动物的胰脏铁蛋白亚基之间存在的这种相互作用的强度和聚合态的差异性可能与调控铁蛋白储存量和释放铁的速率有关,并且与动物对铁的需求和铁解毒速率也有一定的关系,而相关系列问题还有待于进一步进行研究。

3 结语

采用电泳和质谱技术对不同铁蛋白——鸡、鸭、牛和猪胰脏铁蛋白的亚基类型和等电点特性进行了研究。所建立的电泳分离技术可为今后以铁蛋白分子结构特征作为诊断人类重大疾病的高效标志蛋白质提供新的科学依据,其研究具有重要意义。

参考文献:

- [1] Harrison P M, Arosio P. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1275: 161
- [2] Treffry A, Hawkins C, Williams J M, et al. *J Biol Inorg Chem*, 1996, 1: 49
- [3] Huang L, Chen X, Lin Q, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (黄琳,陈旭,林青,等.分析化学), 2007, 35(12): 1745
- [4] Huang H Q, Xiao Z Q, Chen X, et al. *Biophys Chem*, 2004, 111: 213
- [5] Huang L, Chen X, Lin Q, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (黄琳,陈旭,林青,等.分析化学), 2008, 36: 1045
- [6] Clardy S L, Earley C J, Allen R P, et al. *J Lab Clin Med*, 2006, 147: 67
- [7] Zhao G H, Su M H, Chasteen N D. *J Mol Biol*, 2005, 352: 467
- [8] Prutki M, Poljak-Blazi M, Jakopovic M, et al. *Cancer Lett*, 2006, 238: 188
- [9] Tarim E, Kilicdag E, Bagis T, et al. *Int J Gynaecol Obstet*, 2004, 84: 259
- [10] Chen P, Huang H Q, Lin Q M, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (陈平,黄河清,林庆梅,等.分析化学), 2007, 35(5): 667
- [11] Kong B, Huang H Q, Lin Q M, et al. *Appl Biochem Biotech*, 2005, 126: 133
- [12] Zhu J Y, Huang H Q, Bao X D, et al. *Aquat Toxicol*, 2006, 78: 127
- [13] Kimura S, Kameyama A, Nakaya S, et al. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2488
- [14] Huang H Q, Chen P, Zhu B L, et al. *Chemical Journal of Chinese Universities* (黄河清,陈平,朱斌琳,等.高等学校化学学报), 2007, 28(11): 2073
- [15] Zanotti G, Papinutto E, Dundon W, et al. *J Mol Biol*, 2002, 323: 125
- [16] Lavoie D J, Ishikawa K, Listowsky I. *Biochemistry*, 1978, 17: 5448
- [17] Santambrogio P, Massover W H. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 148: 1363