

鲨鱼和虹鱼肝铁蛋白电泳纯的制备技术

陈旭, 黄河清, 孔波, 曹廷明, 肖志群

(厦门大学 生命科学学院生物学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用硫酸铵分级盐析、DEAE 阴离子交换层析、Sephacryl S-300 凝胶层析技术分离纯化鲨鱼肝铁蛋白(Liver ferritin of *Sphyma zygaena*, SZLF)和虹鱼肝铁蛋白(Liver ferritin of *Dasyatis akajei*, DALF)。电子显微镜技术揭示了SZLF和DALF的分子结构, 阐明了两者蛋白均由蛋白壳和铁核组成。柱层析和电泳技术拓展了电泳纯的SZLF和DALF制备方法, 并可用于制备其他高纯度的铁蛋白。

关键词: 铁蛋白; 电泳分离; 层析分离; 高纯度

中图分类号: Q51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)01-0015-05

铁是活泼的过渡重金属元素, 它能提供 d 电子轨道, 并参与络合和氧化还原反应, 显示出许多独特的化学特性。铁蛋白广泛地存在于微生物、植物和动物的机体内, 它起着储存和释放铁的生理功能^[1-2]。来源于无脊椎动物、植物、微生物的铁蛋白只含有一种亚基, 其生理功能相当于哺乳动物铁蛋白两个亚基合为一体时所表达的功能^[3]; 而哺乳类动物铁蛋白均由两种不同类型的亚基组成, 即 H 和 L 亚基^[4-6]。另据报道, 人类铁蛋白有三种亚基 L、H、G 亚基, 富含 L 亚基的铁蛋白又称碱性铁蛋白主要存在于肝脾组织细胞中, 富含 H 亚基铁蛋白又称酸性铁蛋白则存在于心、肾、造血组织和恶性组织细胞中, 而在血清中铁蛋白含量较少, 全部由 L 和 G 亚基组成^[4]。近十几年来, 由于已报道的铁蛋白分子结构有所差别, 上述结论一直处于争论之中, 推测这一现象可能与分析时所采用的铁蛋白纯度有关。因而, 提取高纯度铁蛋白是研究铁蛋白分子结构的关键。然而仅仅利用现在常用的凝胶过滤层析和离子交换层析难以获得电泳纯级别的蛋白, 而亲和层析和高效液相色谱(HPLC)由于种种原因难以在所有实验室普及。本文选用柱层析和电泳技术, 探讨分离纯化高纯度的海洋动物铁蛋白技术, 它为研究铁蛋白分子结构与功能提供高纯度样品, 具有一定科学意义。

1 实验材料与方法

1.1 试剂

提取鱼肝铁蛋白所需的材料为新鲜虹鱼肝脏和

鲨鱼肝脏, 均购自厦门市水产品市场。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、Tris、牛血清白蛋白均为上海生工产品; SDS 分子量标准(Biolab); Sephadex G-25、Sephacryl S-300(Pharmacia); DEAE 纤维素-52(Wateman); 载体两性电解质(pH3.0~9.5, 北京军事医学科学院); 三氟乙酸(TFA, 为日本东京化成工业株式会社产品); 碘乙酰胺(Sigma); 马脾铁蛋白(Serva); 胰蛋白酶(Promega V5111); 截留分子量为 100u 的透析袋(北京经科); 乙氰(ACN)为国产色谱纯; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 粗蛋白制备

粗蛋白制备方法参考黄河清^[1]的方法并略加修改: 虹鱼或鲨鱼肝脏去除脂肪组织后, 以质量 1:1.5 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 15 min), 随后迅速把匀浆液置于 70~75 °C 恒温水浴锅中, 振荡热处理 20 min, 使绝大多数非耐热蛋白质变性和沉淀。随后将破碎液置入 4 °C 冰浴锅中冷却至室温, 并高速离心(8 200 r/min

收稿日期: 2003-03-05, 修回日期: 2003-06-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(40276033); 厦门市科技项目和教育部海洋与环境重点实验室基金项目

作者简介: 陈旭(1977-), 男, 福建厦门人, 硕士, 从事动物分子生物学研究; 黄河清, 通信作者, 电话: 0592-2183255, E-mail: hquang@xmu.edu.cn

30 min, 收集上清液备用。

在每 100 mL 上清液中加入硫酸铵 35 g, 搅拌溶解, 于 4 °C 冰箱静置过夜, 使铁蛋白结晶。次日, 将样品以 9 200 r/min 4 °C 离心 30 min, 弃上清, 收集黄色沉淀, 并用 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.25) 溶解, 置于透析袋内透析 (4 °C, 36 h), 去除硫酸铵。经过透析的粗铁蛋白再次离心 (8 200 r/min, 4 °C, 20 min) 去杂蛋白并取上清液。

1.3 铁蛋白分离纯化

经充分透析后的粗铁蛋白液以 7 000 r/min 转速, 离心 15 min, 弃去沉淀, 将上清加入事先用 Tris-HCl (0.025 mol/L, pH 7.25) 缓冲液预平衡的 DEAE 52 (2.0 cm × 20.0 cm) 纤维素柱, 并用相同浓度的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 去除大部分与 DEAE-纤维素柱亲和力较弱的杂蛋白后, 再用 0.25 mol/L NaCl Tris-HCl, pH7.25) 洗脱铁蛋白, 并在波长为 280 nm 紫外检测分析仪和部分收集器收集各蛋白样品。

纯化后的铁蛋白再次透析、脱盐、浓缩, 上样于已用 Tris-HCl (0.025 mol/L, pH 7.25) 缓冲液平衡的 Sephacryl S-300 柱 (1.5 cm × 50 cm), 调节洗脱液流速为 30 mL/h, 280 nm 波长检测和收集铁蛋白样品。

经纯化和浓缩后的铁蛋白, 再经 DEAE-52 离子交换层析柱 (2.0 cm × 15.0 cm), 并分别用 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 mol/L NaCl (Tris-HCl 缓冲液, pH7.25) 洗脱分离纯化。

1.4 脱盐

用 Sephadex G-25 层析介质柱 (1.7 cm × 32 cm), 0.025 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.25) 除去上述铁蛋白样品中的盐类物质。脱盐后的铁蛋白经截流分子量为 100 ku 的透析袋透析, 最后冷冻干燥。

1.5 电泳纯 SZLF 和 DALF 的制备

聚丙烯酰胺凝胶电泳按文献 [7~8] 的方法进行, 略加修改。冷冻干燥后的铁蛋白溶于 pH7.4 的 Tris-HCl 缓冲液, 使用大板双垂直板电泳槽 (DYCZ-24B, 北京六一厂), 配制天然聚丙烯酰胺凝胶, 胶厚 1.5 mm, 分离胶 6%, 高度约 9 cm, 浓缩胶 3% 约 2 cm, 不插梳子, 灌后用水或无水乙醇封胶, 使之形成一个平坦表面。每板上样 10 mL 左右。电泳完毕后, 从凝胶上沿电泳方向切下宽约 1 cm 的条带, 考马斯亮蓝染色 20 min, 脱色 20 min, 即可看到蛋白条带。根据条带位置从剩余胶块中将铁蛋白条带从胶块中切下, 切成 1 mm³ 的碎块, 置入蛋白质回收槽, 使用天然电泳缓冲液和截留分子量为 100 u 的透析膜, 120 V 电泳 36 h。电泳完毕后小心洗下附着在膜上的红褐色铁蛋白。将纯化过的铁蛋白浓缩、超滤。

铁蛋白铁染色技术参考 Perrie^[9,10] 的方法: 天然聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 凝胶先在铁染色液 [0.1 mol/L K₃Fe(CN)₆ 溶于 0.05 mol/L Tris-Cl 缓冲液中 (pH7.5, 含 0.1 mol/L NaCl), 棕色瓶中 4 °C 可保存 2 周] 中避光染色 10 min, 再用考马斯亮蓝染色。铁染色后不影响蛋白染色。

蛋白浓度测定采用常规的 Lowry 分析法。

1.6 DALF 电子显微镜观察

200 目的铜网于样品中沾去少量铁蛋白溶液, 空气中干燥后, 在铜网上滴加 2% 磷钨酸负染, 染色 10 min 后, 用滤纸吸干多余的磷钨酸溶液, 铜网置于电子显微镜下, 1 × 10⁵ ~ 1.5 × 10⁵ 放大倍数下观察^[11]。

2 结果与讨论

2.1 铁蛋白粗分离

经过 DEAE 纤维素柱层析纯化的 SZLF 粗提液通过 Sephacryl S-300 排阻层析柱, 用缓冲液 (Tris-HCl 缓冲液, pH7.25) 进一步纯化时, 出现两个样品层析峰 (图 1), 第一个层析峰的样品经电泳层析纯化后, 发现

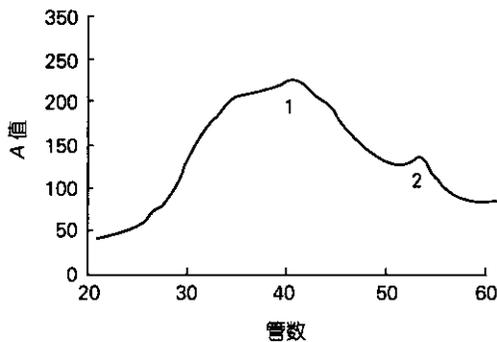


图 1 SZLF 粗提液 Sephacryl S-300 柱层析洗脱曲线

Fig.1 Elution profile of crude ferritin solution from a Sephacryl S-300 column

该样品含有 SZLF 和其它杂蛋白。经纯化后的样品, 再次经 Sephacryl S-300 排阻层析柱二次纯化后, 所收集的 SZLF 样品直接加入到 DEAE-52 柱上, 并采用分步盐洗脱技术分离, 可获得 4 个样品洗脱峰, 如图 2 所示。说明后者层析柱分离 SZLF 比前者更有效。经电泳分析, 图 2 中第一、二个洗脱峰组蛋白染色和铁染色均呈阳性, 均含有大量的铁, 其电泳迁移率与马脾铁蛋白 (Horse spleen ferritin, HSF) 很靠近, 因而初步推断其组成可能是 SZLF; 而第三、四个色谱峰的蛋白样品, 经蛋白染色呈阳性, 而铁染色呈阴性, 因而认定后两者蛋白属于杂蛋白。由此可见, 在利用 DEAE-52 柱层析

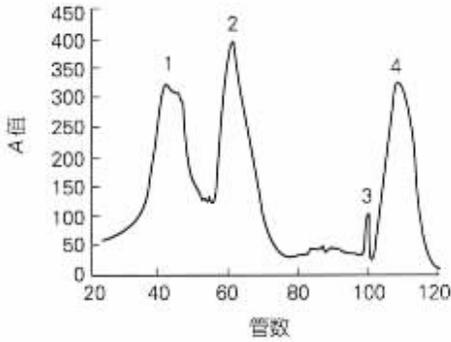


图2 SZLF DEAE52 柱层析洗脱曲线

Fig.2 Elution profile of ferritin solution from a DEAE52 column after gel exclusion chromatography

图中 1, 2, 3, 4 编号分别为采用 0.20 ,0.25 ,0.30 ,0.35 mol/L NaCl 洗脱的样品峰

纯化 SZLF 的过程中, 铁蛋白在盐浓度为 0.20 ~ 0.25 mol/L 范围内被洗脱下来。实验结果也表明, 在分离 DALF 过程中, 采用上述盐浓度范围同样也能获得相似的实验结果。

2.2 铁蛋白电镜图

电子光谱和 X 光衍射技术研究已表明, 铁蛋白的分子结构由蛋白壳和铁核组成, 蛋白壳由 20 个亚基组成球状空腔体, 铁核位于蛋白壳空腔中^[11, 12], 由铁和磷构成, 并以高铁磷氢氧化物结晶态存在^[13]。此外, 铁蛋白具较高热稳定性且耐稀酸和稀碱, 高盐度和置于水体数天内透析都不会使铁核中的铁磷组分大量地释放于蛋白壳外, 这是由于蛋白亚基内部和亚基之间大量存在盐桥和氢键, 而且铁核与蛋白壳之间有较强的相互作用, 蛋白壳中也存在着许多铁结合位点^[14]。铁蛋白释放动力学研究已指出, 每分子铁蛋白的铁核由数千铁化合物和无机磷酸盐组成, 表现出高密度电子特性, 在电镜下呈黑色球状体。图 3~5 是 HSF, SZLF 和 DALF 的电镜图, 从图中可以很清楚看出, 经上述层析柱纯化后蛋白样品在电子显微镜观察下外形与前人报道的铁蛋白结构一致, 即各自的分子结构, 均由高亮的蛋白壳包裹着高电子密度的铁核(黑色), 这一现象说明了经柱层析技术分离纯化后所收集的蛋白均为较高纯度的铁蛋白。另外, 附加实验, 即体外铁蛋白释放铁动力学研究^[1]进一步验证所收集蛋白样品为较高纯度的铁蛋白。早期, 有关铁蛋白分子及亚基结构的分子结构一直存在着争议, 其主要起因与实验所用的铁蛋白纯度不够有一定的关联。因



图3 HSF 电镜图($\times 10^6$)

Fig.3 Electron micrograph of negative stained HSF

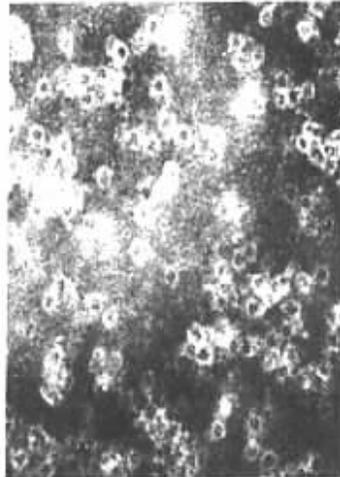


图4 SZLF 电镜图($\times 10^6$)

Fig.4 Electron micrograph of negative stained SZLF

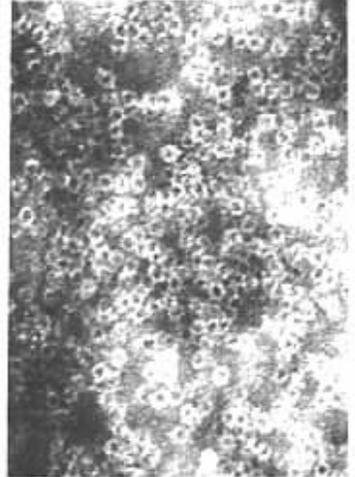


图5 DALF 电镜图($\times 10^6$)

Fig.5 Electron micrograph of negative stained DALF

此, 纯化高纯度的铁蛋白是分析铁蛋白生化参数及一级结构必备条件之一, 具有重要的科学意义。

2.3 铁蛋白聚合体

图 6 和图 7 分别显示了铁蛋白经 DEAE - 52 柱

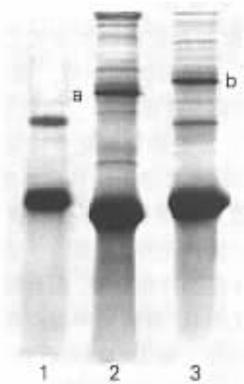


图6 DEAE-52层析洗脱组分聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳蛋白染色图

Fig.6 Native PAGE of the elution of DEAE 52 column after protein stained
1. HSF 2. SZLF 3. DALF

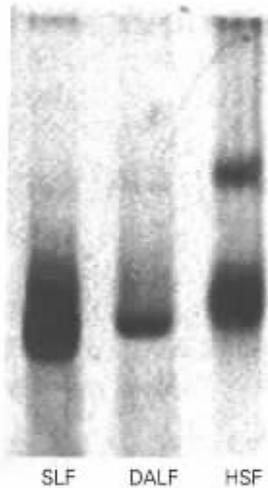


图8 经电泳纯化后的铁蛋白组分在聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳上的染色图

Fig.8 Native PAGE of the elution of ferritin after gel purified

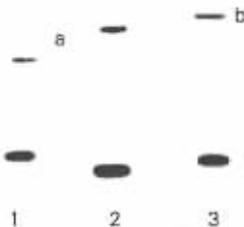


图7 DEAE-52层析洗脱组分聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳铁染色图

Fig.7 Native gradient PAGE of the elution of DEAE 52 column after iron stained
1. HSF 2. SZLF 3. DALF

层析分离后的样品纯度。经天然聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,并进行蛋白染色和铁染色,SZLF和DALF迁移率高于HSF(图6),这一现象说明前者的分子量小于后者。此外,图3中所标识的a和b条带分别表示SZLF和DALF呈多聚体状态。比较图3和图4结果可得出,铁蛋白经铁染色后呈阳性,而其它蛋白呈阴性。由此来看,经过多次柱层析纯化后的铁蛋白样品仍然含有一定的杂蛋白,单凭离子交换层析和凝胶过滤层析技术很可能难于获得到电泳纯的铁蛋白。

2.4 铁蛋白电泳纯制备

图8是经制备电泳技术纯化后的铁蛋白再次经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离的结果。从图中可以看出,经过电泳纯化后,无论是DALF还是SLF基本上

已不含有杂蛋白层析带,均为电泳纯的铁蛋白,其蛋白纯度很适合于铁蛋白一级结构测定和生理功能等理化参数的研究。

上述的实验结果说明,从鱼类肝脏分离电泳纯或高纯度的铁蛋白需要采用柱层析和常规电泳非在线联用分离技术,如果仅选用填充柱层析分离技术难以获得高纯度的铁蛋白。目前常用的蛋白质、多肽纯化方法主要是采用钠离子交换层析和凝胶过滤层析技术,然而,通常这些技术难以获得高纯度的蛋白质,从而直接影响所获得铁蛋白生化参数的可靠性,而结合常规电泳技术后,不仅适合于微量及大量蛋白的纯化,而且费用低,速度快,回收率高,是纯化高纯度蛋白质的一种行之有效的方法。

参考文献:

- [1] 黄河清,张凤章,许良树.马脾和猪脾铁蛋白理化性质的比较[J].动物学报,1997,43:170-177.
- [2] 张凤章,黄河清,林庆梅,等.棕色固氮菌细菌铁蛋白释放铁的动力学方程和性质[J].生物物理学报,1998,14:13-20.
- [3] Stiefel E I, Watt G D. *Azotobacter cytochrome b557.5 is a bacterioferritin*[J]. *Nature*, 1979, 279 (3): 81-83.
- [4] Andrews S C, Arosio P, Botke W, et al. Structure, function, and evolution of ferritins[J]. *J Inorg Biochem*, 1992, 47: 161-174.

- [5] Heusterspreute M, Crichton R R. Amino acid sequence of horse spleen apoferritin[J]. **FEBS Lett**, 1981, 129: 322 – 337.
- [6] Theil E C. Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms[J]. **Annu Rev Biochem**, 1987, 56: 289 – 315.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京 科学出版社, 2000. 79 – 90, 112 – 120.
- [8] 坎普 R M, 危特曼 – 利伯德 B, 乔里 – 帕帕多普洛 T. 蛋白质结构分析 制备、鉴定与微量测序[M]. 北京 科学出版社, 2000. 66 – 71, 206 – 207.
- [9] Suryakala S. Purification and characterization of liver ferritins from different animal species[J]. **Veterinary Research Communications**, 1999, 23: 165 – 181.
- [10] Geetha C. Vijay Deshpande. Purification and characterization of fish liver ferritins[J]. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** 1999, 123: 285 – 294.
- [11] Kong B, Huang H Q. Purification, electrophoretic behavior, and kinetics of iron release of liver ferritin of *Dasyatis akajei* [J]. **Journal of Protein Chemistry** 2003, 22(1): 61 – 70.
- [12] Huang H Q. Role of phosphate and kinetic characteristics of complete iron release from native pig spleen ferritin – Fe[J]. **Journal of Protein Chemistry**, 1999, 35(48): 87 – 93.
- [13] Treffry A, Hawkins C, Williams J M, *et al.* Lability of iron at the dinuclear centers of ferritin studied by competition with four chelators[J]. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 1996, 1(1): 49 – 60.
- [14] Treffry A, Hawkins C, Williams J M, *et al.* Lability of iron at the dinuclear centers of ferritin studied by competition with four chelators[J]. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 1996, 1(1): 49 – 60.

Preparation technology for isolation and purification of ferritins with electrophoresis degree livers of *Sphyma zygaena* and *Dasyatis akaje*

CHEN Xu, HUANG He – qing, KONG Bo, CAO Ting – ming, XIAO Zhi – Qun
(Department of Biology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Mar., 5, 2003

Key words: Ferritin; electrophoretic separation; chromatography separation; high purification degree

Abstract : Liver ferritin of *Sphyma zygaena* (SZLF) and Liver ferritin of *Dasyatis akajei* (DALF) were isolated by ammonium sulfate fractions, anion exchange chromatography with DEAE – 52 column and gel exclusion chromatography with sephacryl S – 300 column. Using the electron microscope, the molecular structure of both SZLF and DALF could be observed showing that both proteins consisted of a protein shell and iron core. We were able to develop the electrophoretic preparation method for SZLF and DALF using column chromatography and electrophoretic technology allowing for the preparation of other high – purity ferritins.

(本文编辑 张培新)