

巩子路,田童童,朱新荣,等. 植物铁蛋白钙复合物的制备[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):292-294.

植物铁蛋白钙复合物的制备

巩子路¹, 田童童¹, 朱新荣¹, 邹圣东², 赵广华³, 张 建^{1,3}

(1. 石河子大学食品学院, 新疆石河子 832003; 2. 新疆生产建设兵团特色果蔬工程研究中心, 新疆石河子 832003;
3. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:铁蛋白是由中空的蛋白质外壳和铁核组成的,内、外直径分别约为 8 和 11 nm,这种特殊的结构,使钙进入铁蛋白内部空腔成为可能,为活性钙源的制备提供了新的载体。通过超滤法和透析法制备了铁蛋白钙复合物,利用透射电镜技术直观观察了钙离子进入铁蛋白内部的过程,为进一步开发安全、高效、可控的补钙剂提供理论依据。

关键词:铁蛋白;脱铁铁蛋白;钙离子;植物

中图分类号: TS201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0292-03

目前,国内外学者对人体钙营养进行了长期研究,一致指出钙营养缺乏属于全球性健康问题,发展中国家尤其是亚洲国家的平均钙摄入量最低。我国大部分人都处于缺钙状态,少数人则严重缺钙,佝偻病仍为常见,尤其在中国北部患病率高达 44%。引发钙缺乏的原因,除了天然的遗传因素外,更直接的原因主要有两个方面,一是钙的日常摄入量不足,二是钙的吸收利用率低。因此,如何改善钙营养状况,是世界也是我国迫切需要解决的问题^[1-3]。

目前市场上的补钙剂主要有无机钙、有机钙和天然生物钙 3 类,其消化吸收均依赖于胃酸解离出 Ca^{2+} 。但是, Ca^{2+} 容易在碱性的小肠液中生成胶稠状的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 沉淀,使 Ca^{2+} 的表观吸收率仅为 25%~40%,且 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 胶稠状物可粘附在肠壁表面,也影响其他营养元素的吸收^[4-6]。因此,寻找新的钙源和探索新的钙吸收利用途径,对开发新型的钙螯合营养强化剂具有重要意义。

铁蛋白是天然存在于生物体细胞中的一类铁贮藏蛋白,它由中空的蛋白质外壳和铁核组成,内、外直径分别约为 8 和 11 nm,这种特殊的结构,使钙进入铁蛋白内部空腔成为可能,为活性钙源的制备提供了新的载体,其特点:一是天然蛋白外壳可屏蔽其他食品组分、胃肠环境对钙因子的干扰和影响;二是利用铁蛋白的独特吸收机制提高钙在体内的吸收率^[7-11]。

本研究利用植物铁蛋白独特的结构特点,对植物铁蛋白进行改性处理,将其铁核置换为钙,形成一种蛋白-钙体系的新型钙源,为进一步开发安全、高效、可控的补钙剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

收稿日期:2013-04-05

基金项目:新疆生产建设兵团科技支疆专项计划(编号:2010ZJ13);

石河子大学创新团队(编号:2011ZRKXTD-0803);石河子大学青年骨干教师培训(编号:3152SPXY01027)。

作者简介:巩子路(1990—),男,硕士,主要从事食品生物化学研究。

E-mail:694624941@qq.com。

通信作者:张 建,博士,副教授,主要从事食品生物化学研究。

E-mail:zhangjian0411@163.com。

铁蛋白来源参考 Deng 等报道的方法,提取葵花籽粕铁蛋白^[12];连二亚硫酸钠(Sigma)、2,2-联吡啶(Sigma)、Tris(Amresco)、HCl(北京化工厂)等试剂均为分析纯;超纯水系统(Milli-Q Gradient,美国),紫外可见分光光度计(Cary 50 spectrophotometer,美国 Varian 公司),电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)(Hewlett packard 4500,美国),透射电镜(TEM)(Hitachi S-5500,Hitachi 公司,日本),基质辅助激光解析电离化/飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)(Reflex III, Bruker 公司,德国)。

1.2 试验方法

1.2.1 脱铁铁蛋白(ApoPSF)的制备 采用刘文营报道的方法进行脱铁铁蛋白的制备^[13]。

1.2.2 蛋白质中铁含量的测定 铁含量测定按照 Carter 报道的方法^[14]进行:取 20 μL 铁蛋白溶液,加入 250 μL 30% 三氯乙酸,用蒸馏水定容至 1 mL,混合均匀后 10 000 g 离心 1 min;取 650~750 μL 上清液于新离心管中,依次向其中加入 100 μL 饱和乙酸铵、62.5 μL 0.12 mol/L 抗坏血酸,以及 62.5 μL 0.25 mol/L Ferrozine,用蒸馏水定容至 1 mL;反应 4 h 后,在 562 nm 下测定紫外吸光值,利用摩尔相关系数 $\varepsilon = 27\ 900$ 换算可得溶液中铁浓度。

1.2.3 蛋白中结合钙含量的测定 采用 3 种方法进行测定比较。①ICP-MS 法:样品用 1 mL 硝酸消化,用 2% 硝酸定容至 10.00 mL 上机测定,ICP-MS 测定时以 ^{45}Sc 为内标物。②MALDI-TOF-MS 法:样品用 0.1% 三氯乙酸溶解制备,收集数据范围为 10~100 ku。③钙离子选择性微电极法:采用以 P.V.C 为载体的电极膜,磷酸酯类钙盐为电活性物质。

1.2.4 ApoPSF-Ca 复合物的制备 透析法:将去除铁、浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ApoPSF 溶液(以 pH 值 7.5、5 mmol/L MOPS 缓冲液进行配制。下同)装入处理好的透析袋中,将其置于终浓度为 5 mmol/L CaCl_2 (MOPS 配制)的透析液中,使 ApoPSF 和 Ca^{2+} 浓度比为 1:5 000,搅拌透析 1 h,重复换透析液 3 次,每次 1 h,以保证 ApoPSF 和溶液中的 Ca^{2+} 充分结合。待反应充分后,将装有 ApoPSF 的透析袋放入没有 CaCl_2 的缓冲液中去掉游离的 Ca^{2+} ,同样重复换 3 次缓冲液,以确保 Ca^{2+} 的完全去除。最后,将 ApoPSF 的透析袋放置于终浓度为 5 mmol/L Na_2CO_3 (MOPS 配制)的溶液中,同样搅拌透析

1 h,重复换 3 次透析液,以除去游离的 CO_3^{2-} 。以上步骤为一次完整的载钙过程,重复完整过程 3 次,使蛋白质最大程度地结合 Ca^{2+} ,以制备高钙量的 ApoPSF - Ca - CO_3^{2-} 复合物。同样的方法,将阴离子 CO_3^{2-} 换为 PO_4^{3-} 重复上述试验步骤,制备 ApoPSF - Ca - PO_4^{3-} 复合物。

超滤法:将脱铁液浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 ApoPSF 溶液加入到 40 mL 终浓度为 5 mmol/L CaCl_2 的 MOPS 超滤液中,缓慢搅拌反应 1 h 后,用 100 kDa 滤膜将样品超滤至 5~10 mL;接着,向样品中加入 40 mL MOPS 缓冲液,缓慢搅拌 1 h,超滤至 5~10 mL,重复 3 次,去除游离在缓冲液中的 Ca^{2+} ;最后,将 40 mL 终浓度为 5 mmol/L 的 Na_2CO_3 溶液(MOPS 配制)加入到样品中,缓慢搅拌反应 1 h 后,超滤,并重复加入 3 次,以除去游离的 CO_3^{2-} 。以上步骤为一次完整的载钙过程,重复完整过程 3 次,制备高钙量的 ApoPSF - Ca - CO_3^{2-} 复合物。同样的方法,将阴离子 CO_3^{2-} 换为 PO_4^{3-} 重复上述试验步骤,制备 ApoPSF - Ca - PO_4^{3-} 复合物。

1.2.5 透射电镜(TEM)方法观察 试验按照 Douglas 等所述方法^[15]并加以改进:将碳膜包被的铜网放置在干净的蜡盘或封口膜上,用吸管将制备好的浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的样品滴加在铜网上,盖上盘,静置 10 min;用滤纸吸掉铜网上的样品,待样品干燥后,再在铜网上滴加 2% 的醋酸铀染液,并静置染色 10 min;用滤纸吸掉多余的染液,置干燥器中 24 h 后,透射电镜在 30 kV 观察样品。

1.2.6 数据分析 用 Origin 7.5 软件进行数据处理,并且用 SAS 9.0 统计软件进行差异显著性分析($P \leq 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 ApoPSF 中铁残留的检测

在蛋白浓度相同的情况下,将脱铁前后的铁蛋白样品进行铁含量检测,结果发现,脱铁前后铁蛋白铁含量分别为 2 389.34 和 2.36 $\mu\text{mol/L}$,铁蛋白的铁脱除率为 99.9%,达到了铁离子脱除的目的,可以保证后续试验的顺利进行。

2.2 载钙蛋白中钙离子的检测

由表 1 可见,3 种方法检测蛋白中钙离子含量,试验结果相互之间没有显著性差异;ICP - MS 和钙离子选择性微电极法直接可以从样品中检测出钙离子的含量,而 MALDI - TOF - MS 法则是间接(先测定载钙蛋白的分子量,然后测载钙蛋白与钙形成螯合物的分子量,最后两者相减就可以计算出样品中钙离子的含量)来获得样品中钙离子的含量,MALDI - TOF - MS 法测定较繁琐。另外,在实际操作过程中发现,钙离子选择性微电极法受电压影响过大,往往需要重复许多次数才能得到较好的结果。因此,ICP - MS 法是检测载钙蛋白中钙离子含量的最适方法,在后续试验中被采用。

表 1 不同检测方法检测 ApoPSF - Ca 中的钙离子含量

制备方法	Ca (mg/L)	ApoPSF ($\mu\text{mol/L}$)	Ca/ApoPSF (mol/mol)
ICP - MS 法	14.61 \pm 0.62	3.57 \pm 0.11	142.24 \pm 2.02a
MALDI - TOF - MS 法	—	3.42 \pm 0.08	140.72 \pm 2.57a
钙离子选择性微电极法	14.15 \pm 0.38	3.39 \pm 0.02	141.32 \pm 2.39a

2.3 ApoPSF - Ca 复合物的制备

依据铁蛋白独特的结构性质,分别采用了透析法和超滤法制备了 ApoPSF - Ca - CO_3^{2-} 和 ApoPSF - Ca - PO_4^{3-} 2 种蛋白钙复合物,通过 ICP - MS 方法测定结合钙的含量来比较各自的载钙效果,进一步比较 2 种制备方法及 2 种复合物的优缺点。由试验结果(表 2)可见,不同的操作方法会影响 ApoPSF 载钙能力的大小,不论是 ApoPSF - Ca - CO_3^{2-} 还是 ApoPSF - Ca - PO_4^{3-} 复合物,采用透析法制备的复合物,其载钙能力是超滤法的近 3 倍;超滤法制备的 2 种复合物中 1 分子 ApoPSF 可结合钙分别为 42.24 和 53.72 个,透析法制备的复合物结合比例则分别是 137.57 和 142.14,无论是采用哪种阴离子,只要是采用同一种方法制备,其复合物载钙量之间没有显著性差异,不同的阴离子不会影响 ApoPSF 的载钙能力。因此,采用透析法来制备蛋白钙复合物是一个最适合的方法。

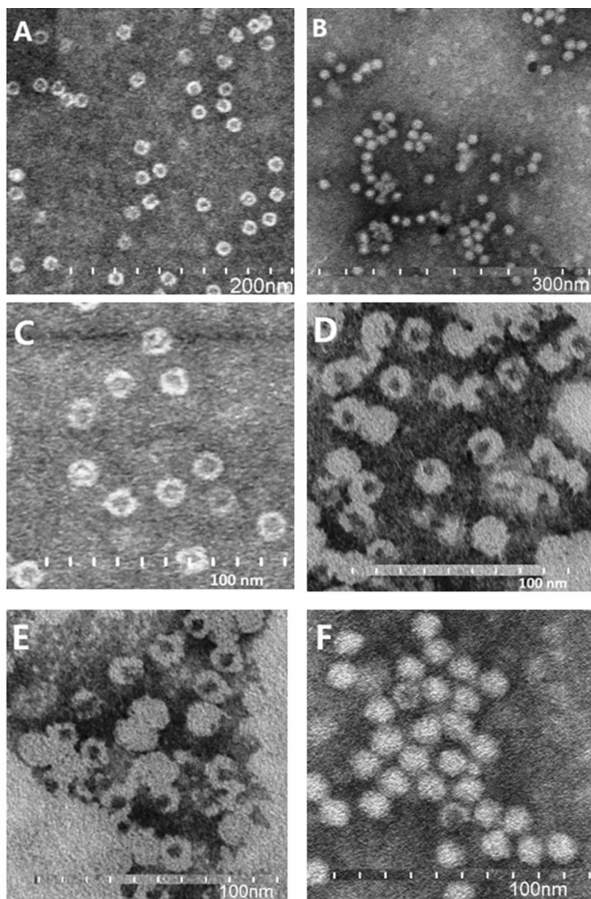
表 2 ApoPSF - Ca 中结合钙的含量

制备方法	样品	Ca (mg/L)	ApoPSF ($\mu\text{mol/L}$)	Ca/ApoPSF (mol/mol)
超滤法	ApoPSF - Ca - CO_3^{2-}	3.41 \pm 0.52	2.02 \pm 0.02	42.24 \pm 1.37
	ApoPSF - Ca - PO_4^{3-}	5.44 \pm 0.21	2.53 \pm 0.06	53.72 \pm 0.81
透析法	ApoPSF - Ca - CO_3^{2-}	13.15 \pm 0.38	2.39 \pm 0.02	137.57 \pm 2.39
	ApoPSF - Ca - PO_4^{3-}	14.61 \pm 0.62	2.57 \pm 0.11	142.14 \pm 2.02

2.4 TEM 观察分析

为更直观地了解 Ca^{2+} 与 ApoPSF 的相互作用机制,采用 TEM 方法对其进行观察研究。由图 1 可知,在没有 Ca^{2+} 的情况下(图 1 - A、C),白色圆圈即为 ApoPSF 的蛋白质外壳外直径约为 11 nm,内直径约为 8 nm,厚度约为 3 nm,蛋白外壳内部是和背景相似的暗色,这是醋酸铀负染色剂进入到蛋白质外壳内部的染色;向 ApoPSF 中依次添加 Ca^{2+} ,使 Ca^{2+} /ApoPSF 比例分别为 50 : 1、100 : 1、1 000 : 1(图 1 - B、D、E、F),随着钙量的增加,外直径仍然为 11 nm,而白色的 ApoPSF 壳内部黑色的染色区域不断减少;在 Ca^{2+} /ApoPSF 为

50 : 1 时,蛋白质壳内部染色区域直径缩小约为 5 nm,且有少量蛋白质外壳中不存在黑色区域, Ca^{2+} 的加入导致了醋酸铀不能很好地进入到蛋白质外壳中染色(图 1 - D),在 Ca^{2+} /ApoPSF 为 100 : 1 时,更多的蛋白质外壳内部没有了黑色区域,随着 ApoPSF 内部结合钙数量的增多, Ca^{2+} 占据了 ApoPSF 内部空腔,导致醋酸铀几乎无法进入到 ApoPSF 空腔内部(图 1 - E);当 Ca^{2+} /ApoPSF 为 1 000 : 1 时,蛋白质几乎全部为白色颗粒而无黑核,意味着 Ca^{2+} 已经完全占据 ApoPSF 内部空腔,醋酸铀无法进入到 ApoPSF 内部进行染色。



Ca²⁺/ApoPSF 比分别为 0 : 1 (A 和 C)、50 : 1 (D)、100 : 1 (E)、1 000 : 1 (B 和 F); A 和 B 放大倍数为 180 000, C、D、E 和 F 放大倍数为 500 000

图1 Ca²⁺/ApoPSF 不同比例 TEM 图

3 小结与讨论

使用透析法制备出的蛋白钙复合物的载钙能力要显著高于超滤法,每 100 g 复合物中含有约 1 g 的钙元素,这可能是由于超滤过程中的高压操作阻止了体系中蛋白质与 Ca²⁺ 的结合,从而降低了蛋白质结合钙的能力。Masuda 对大豆铁蛋白晶体结构解析可知其钙结合位点为 136 个^[16],本试验透析法测得 1 分子 ApoPSF 可结合约 140 个 Ca²⁺,结果基本一致。

TEM 技术是材料科学研究的重要手段,能够提供极微细材料的组织结构、晶体结构等方面的信息,还可以进行原位的成分分析(能谱仪 EDS)。研究以蛋白质为主要成分的颗粒状材料最常用的处理方法是将样品负染色,通过增强其反差,即呈现暗的背景和亮的颗粒形态,来观察蛋白质的形态细节,常用的负染色剂有醋酸铀、磷钨酸、硅钨酸及酮酸铵等。本试验选用醋酸铀作为负染色剂,利用液滴法将蛋白质材料加在载网的支持膜上,然后滴加负染色剂,干燥,进行电镜观察,其动态过程形象地展示了 Ca²⁺ 与 ApoPSF 的相互作用过程, ApoPSF - Ca 复合物中的 Ca²⁺ 结合在 ApoPSF 内部空腔,且整个过程中蛋白质的外部形态不会发生大的变化。因此,蛋白质外壳可以隔绝内部 Ca²⁺ 与外界环境相接触,有效地保护了

Ca²⁺ 使其维持较好的溶解状态,而不易受体系中其他组分干扰而形成沉淀。

参考文献:

- [1] Abrams S A. Nutritional rickets; an old disease returns[J]. Nutrition Reviews, 2002, 60(4): 111 - 115.
- [2] Pedersen J I. Vitamin D requirement and setting recommendation levels - current nordic view[J]. Nutrition Reviews, 2008, 66 (Suppl 2): 165 - 169.
- [3] 滕卫军, 季峰. 肝硬化患者骨密度变化的临床意义[J]. 浙江医学, 2009, 31(2): 176 - 177.
- [4] 包小兰. 大豆肽与钙结合形成可溶性复合物的机制及其稳定性的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [5] 刘青, 甘林火, 邓爱华, 等. 新氨基酸螯合钙制剂 L - 亮氨酸钙的急性毒性及致突变性[J]. 华侨大学学报: 自然科学版, 2009, 30(4): 429 - 431.
- [6] San Martin C D, Garri C, Pizarro F, et al. Caco - 2 intestinal epithelial cells absorb soybean ferritin by mu2 (AP2) - dependent endocytosis[J]. The Journal of Nutrition, 2008, 138(4): 659 - 666.
- [7] Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for Iron storage, antioxidation and more[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2009, 1790(7): 589 - 599.
- [8] Briat J F, Ravet K, Arnaud N, et al. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants[J]. Annals of Botany, 2010, 105(5): 811 - 822.
- [9] Li C, Fu X, Qi X, et al. Protein association and dissociation regulated by ferric ion: a novel pathway for oxidative deposition of iron in pea seed ferritin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(25): 16743 - 16751.
- [10] Fu X, Deng J, Yang H, et al. A novel EP - involved pathway for iron release from soya bean seed ferritin[J]. Biochemical Journal, 2010, 427(2): 313 - 321.
- [11] Yang H, Fu X, Li M, et al. Protein association and dissociation regulated by extension peptide: a mode for iron control by phytoferritin in seeds[J]. Plant Physiology, 2010, 154(3): 1481 - 1491.
- [12] Deng J, Liao X, Hu J, et al. Purification and characterization of new phytoferritin from black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed[J]. Journal of Biochemistry, 2010, 147(5): 679 - 688.
- [13] 刘文营, 张建, 童军茂, 等. 铁蛋白脱铁机制的建立及脱铁前后光谱变化的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(9): 2552 - 2554.
- [14] Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the sub-microgram level with a new reagent (ferrozine)[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 40(2): 450 - 458.
- [15] Douglas T, Stark V T. Nanophase Cobalt oxyhydroxide mineral synthesized within the protein cage of ferritin[J]. Inorganic Chemistry, 2000, 39(8): 1828 - 1830.
- [16] Masuda T, Goto F, Yoshihara T, et al. Crystal structure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(6): 4049 - 4059.