

# 聚丙烯酰胺凝胶基体中蛋白条带内金属含量的 同步辐射 X 荧光定量分析\*

刘颖斌<sup>1,2</sup> 高愈希<sup>1;1)</sup> 陈春英<sup>1</sup> 李柏<sup>1</sup> 喻宏伟<sup>1</sup>

王江雪<sup>1</sup> 何伟<sup>1</sup> 黄宇营<sup>1</sup> 柴之芳<sup>1</sup>

1 (中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

2 (浙江大学医学院附属第二医院 杭州 310009)

**摘要** 建立了同步辐射 X 荧光 (SRXRF) 定量分析人血红蛋白等电聚焦 (IEF) 分离后聚丙烯酰胺凝胶基体中蛋白条带内 Fe 的方法. 用组成基本相同的浓缩胶将铁含量已知的牛血清白蛋白电泳成单一条带作为定量标准, 得到 SRXRF 测定凝胶基体中蛋白条带铁含量的校准曲线, 其线性回归系数  $R^2$  在 0—5.1ng Fe 范围内为 0.9897, 在本实验条件下检出限为 0.63ng, 对人血红蛋白电泳分离后蛋白条带内铁含量测定的回收率约为 106%, 该联用技术可用于生物样品蛋白质中微量元素的分布研究, 可同时给出蛋白质的微量元素组成和等电点等信息.

**关键词** 微量元素 种态分析 同步辐射 X 荧光 电泳 金属蛋白

## 1 引言

微量元素具有重要的生物学功能, 体内约 25% 的蛋白质为金属蛋白, 金属蛋白是微量元素生物学功能最主要的执行者, 所以研究生物样品中金属蛋白的分布对评价微量元素营养状态、理解其生物学意义是非常重要的. 研究的方法一般是先将蛋白质提取并分离, 然后测定各蛋白中的微量元素种类和含量. X 荧光分析 (XRF) 是一种多元素分析方法. 用同步辐射 (SR) 做为 XRF 的激发光源可使其相对检出限达到 10ng/g<sup>[2]</sup>, 样品只需几微克. 该技术已被成功地用于研究各种病理组织和正常组织、甚至一个细胞中微量元素的测定以了解疾病机理以及微量元素的生物化学行为<sup>[3-6]</sup>. 在以往的工作中, 我们用 SRXRF 直接测定了人肝细胞胞质溶胶电泳分离后凝胶基体中各蛋白条带所含微量元素的相对含量<sup>[7-11]</sup>, 并对定量方法作了初步研究<sup>[12, 13]</sup>. 本研究用浓缩胶将铁含量已知的牛血清白蛋白电泳成单一条带作为 SRXRF 测定凝胶基体中蛋白条带铁含量的定量标准, 测定了人血红蛋白经

过 IEF 分离后各亚型条带内的微量元素含量, 建立了一种新的生物样品中金属蛋白的形态分析方法.

## 2 实验部分

### 2.1 试剂

人血红蛋白, 牛血清白蛋白, Tris(Sigma Co.); Acrylamide, N, N'-Methylenebis-acrylamide (Biomol Co.); 载体两性电解质 (pH 5—7) 为 Bio-Red 产品. 其余试剂均为分析纯以上级别的国产试剂. 所有溶液全部使用经 Milli-Q 系统 (Millipore) 再处理的去离子水配制.

### 2.2 定量标准的制备

参照 Davis<sup>[14]</sup> 的方法, 配制 4% 的常规聚丙烯酰胺电泳浓缩胶, 内含 5% 甘油、2.2% 的载体两性电解质, 厚 0.5mm. 牛血清白蛋白用常规电泳样品缓冲液溶解, 加一定量样品溶液于样品槽, 恒压 40V 电泳, 蛋白进入凝胶约 10mm 时停止电泳, 用 6% 甲醛、40% 乙醇固

\* 国家自然科学基金(10475092, 10490180)和中国科学院重要方向性项目(KJCX2-N01)资助

1) E-mail: gaoyx@mail.ihep.ac.cn

定蛋白 10min, 水洗 10min, 用玻璃纸覆盖凝胶, 置真空干燥器中干燥至恒重.

用 ICP-MS(Series X7, Thermo Electron Co)测定牛血清白蛋白溶液以及人血红蛋白样品溶液中的铁含量, 记录 $^{58}\text{Fe}$ 的读数, 用 CLARITAS 质量控制标准 21(SPEX CerliPrep Inc.)做工作曲线求算样品铁含量.

### 2.3 人血红蛋白等电聚焦分离

IEF 分离在 DYY-III36 型等电聚焦池(北京六一仪器厂)上进行.  $115\times 85\times 0.5\text{mm}$  的 4% 聚丙烯酰胺凝胶(内含 5% 甘油, 2.4% 的载体两性电解质 pH 5—7, 1% 的载体两性电解质 pH 6—9)过夜陈化后, 在 80V 恒压条件下预电泳 20min. 取  $2\mu\text{L}$  血红蛋白样品溶液(内含 50% 甘油, 蛋白含量约  $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,  $10000\times\text{g}$  离心分离 10min 去不溶物)滴加到胶上, 样品斑点直径约 5mm. 聚焦采取分步升压方式: 100V, 15min; 150V, 15min; 200V, 90min. 聚焦结束后, 凝胶在真空条件下快速干燥至恒重.

### 2.4 同步辐射 X 荧光分析

蛋白条带内铁含量的 SRXRF 分析在北京正负电子对撞机(BEPC)的 4W1A 同步辐射束线上完成. 储存环中电子束流能量为  $2.2\text{GeV}$ , 束流强度约  $100\text{mA}$ . 样品移动台(TSA200 型, 北京卓立汉光公司)可在计算机控制的步进马达驱动下沿  $x$ ,  $y$  二维方向上移动以改变入射光斑位置, 移动步长为  $0.0025\text{mm}$ . 从样品发射出的 X 射线由 Si(Li) 探测器(PGT Inc. LS 30143-DS)探测, 探头与入射 SR 线共平面且相互垂直, 距样品照射点  $20\text{mm}$ , 信号用 PGT 多道分析仪(MCA4000)获取输出.

用  $11.5\text{keV}$  的单色同步辐射光激发样品, 调节入射光斑( $1\times 3\text{mm}$ )位置于条带一端, 在 300s 的计数时间内, 光斑一直沿条带均匀缓慢移动, 计数结束时光斑移到该条带另一端. 沿电泳方向每  $1\text{mm}$  取一个谱. 采用 AXIL 软件处理数据, 并用康普顿散射峰对铁元素峰进行归一化处理以抵消束流强度变化对信号强弱产生的影响, 归一化的信号峰面积与相应位置的铁含量成正比. 在相同的条件下以同样的方式测量定量标准干胶膜上蛋白条带的荧光谱, 以归一化后铁的信号峰面积对铁含量作图得工作曲线, 据此求出人血红蛋白 IEF 分离后电泳方向上各测量点的铁含量.

## 3 结果与讨论

### 3.1 蛋白质分离

为避免分离过程中金属的丢失, 本研究采用非变性的 IEF 技术分离蛋白质, IEF 分离在较低的工作电压下 ( $20\text{V}/\text{cm}$ ) 进行, 可以避免蛋白质上专一结合(以共价键等强作用力结合)的金属在电场作用下的丢失, 这一部分金属往往具有更加重要的生物学功能. IEF 结束后, 真空快速干燥凝胶, 避免了通常用酸性固定试剂所引起的金属解离. 图 1 是人血红蛋白等电聚焦分离的电泳图谱, 肉眼可分辨有 15 个条带. 血红蛋白不同亚型因肽链组成不同, 等电点不同, 可通过 IEF 分离成不同的条带, 这用 SDS-PAGE 和高效液相色谱(HPLC)是难以分辨的. 以往的工作中使用 2.4% 的载体两性电解质 pH 5—7, 1% 载体两性电解质 pH 6—9, 厚度  $1\text{mm}$  的胶可将血红蛋白分成肉眼可分辨的 11 个条带<sup>[13]</sup>, 本研究采用 2.4% 的载体两性电解质 pH 5—7,  $0.5\text{mm}$  的薄胶分离蛋白质, 提高了分离分辨率, 降低了本底信号, 这些都有利于随后的 SRXRF 测定.



图 1 人血红蛋白等电聚焦图谱

### 3.2 工作曲线及检出限

用 SRXRF 进行定量分析时, 由于标准和样品成分的差异, 基本效应(吸收、增强)对分析结果的影响是必须加以考虑的. 以往的工作中, 我们曾以已知金属含量的牛血清白蛋白经 IEF 电泳制作 SRXRF 定量标准<sup>[12]</sup>, 其基体与样品测定几乎完全一致, 但牛血清白蛋白 IEF 处理后呈现多个条带, 测定系列标准做工作曲线耗时费力, 限制了方法的实际应用; 此外, 还使用均匀掺入一定量金属离子和蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶做 SRXRF 测定的定量标准<sup>[13]</sup>, 其组成与用于 IEF 分离的凝胶基本相同, 操作比较简便, 但凝胶标准的均匀性是需要特别注意的. 本研究采用浓缩胶将已知金属含量的一系列蛋白溶液电泳成单一条带(见图 2), 为使凝胶组成与 IEF 用胶一致, 在浓缩胶内加入 5% 甘油、2.2% 的载体两性电解质(浓缩胶内 Tris-HCl 缓冲液浓度约 0.2%), 条带宽度小于  $1\text{mm}$ , 用  $1\times 3\text{mm}$  的光斑足以覆盖条带宽度. 光斑在计数时间内沿条带缓慢均匀移动, 实现了对条带的“覆盖”, 得到的工作曲线(图 3), 在  $0\text{—}5.1\text{ng Fe}$  范围内  $R^2$  为 0.9897, 线性略差可能与各条带形状不完全一致有关. 另外, 在蛋白上

样量大时, 拖尾现象逐渐显现, 这些需要进一步改善. 用浓缩胶电泳制备定量标准的优势是操作简便, 可以将多种金属蛋白混合样品堆积成单一条带用于多元素定量分析.

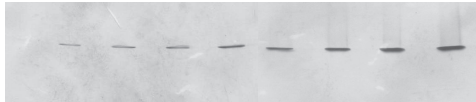


图 2 牛血清白蛋白浓缩胶电泳图谱; 从左到右 上样量为 0.0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 7.5, 12.0, 20.0 $\mu\text{L}$  牛血清白蛋白溶液(蛋白含量 5mg/mL, 铁含量 256ng/mL)

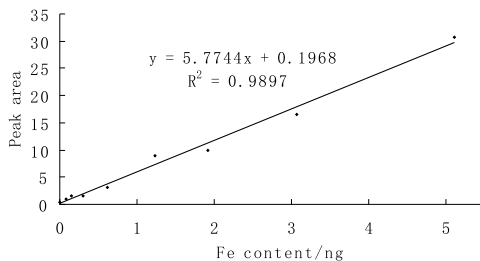


图 3 SRXRF 测定凝胶基体中蛋白条带内铁含量的校准曲线

表 1 血红蛋白等电聚焦分离后不同条带的等电点及金属含量\*

pI <sub>s</sub>	4.8	5.0—5.4	5.5	5.9	6.1	6.2	6.8	7.5	Cathode	Recovery (%)
Fe/ng	4.83	2.38	1.40	4.24	<检出限	1.46	1.32	2.96	~18.8	~106.1

\*样品溶液铁含量分别为 17.83 $\mu\text{g mL}^{-1}$  上样量为 2.0 $\mu\text{L}$ .

因为未对负极区域的铁做严格的定量分析, 且该区域铁可能来源于实验中引入的铁污染, 所以表内所列回收率也仅具有有限的参考价值. 对于一个新的分析方法而言, 严格的分析质量保证措施是不可或缺的, 由于缺少适应于电泳分离后蛋白条带内微量元素分析的标准参考物质, 以及电场作用下非专一结合的金属离子从蛋白质上的丢失, 严格的回收实验还没法进行, 这些都需要在以后的工作中加以改进.

本研究初步建立了 SRXRF 测定凝胶基底中蛋白

以  $N_B$  表示 Fe 的背景计数, 则其标准偏差为  $N_B^{1/2}$ , 检出限为  $3N_B^{1/2}$ , 在本研究中为 3.61. 以绝对含量表示为  $3N_B^{1/2}(mt)^{-1}$ , 其中:  $m$  为灵敏度(单位: counts/s·ng),  $t$  为计数时间(s). 据此计算得在本实验条件下, Fe 的测定检出限为 0.63ng.

### 3.3 人血红蛋白 IEF 分离后条带内金属含量的测定

人血红蛋白电泳分离后, 记录沿电泳方向各点 XRF 谱, 当元素信号峰计数大于其检出限 ( $3N_B^{1/2}$ ) 时, 认为含有该元素, 信号经 Ar 峰归一后与工作曲线对照, 求出该点元素含量, 结果表明: 在正极区附近有一铁峰含铁 4.83ng, 可能是由血红蛋白分解释放出的铁卟啉产生的; 而负极区的铁峰, 可能是靠静电作用结合的铁在电泳过程中脱离蛋白质或是所用试剂中的游离铁泳动到该区域所致. 铁遍及整个负极区域, 而不仅限于泳道对应位置, 考虑到在电极区覆盖有电极条, 基体与标准明显不同, 因而不能拿本实验所用标准对电极区铁含量进行严格定量分析. 此外共检出 7 个含铁条带, 等点电和含铁量列于表 1.

条带内微量元素的方法, 结合 IEF 分离技术, 组成一种可用于生物样品中金属蛋白检测的准在线联用技术, 它可以同时给出蛋白质含量、等电点、所含金属种类、数量等信息, 且测定过程不破坏蛋白质样品, 有利于根据测定结果对感兴趣蛋白进行进一步的生化研究, 这些对于其他联用技术如 HPLC/ICP-MS 是比较困难的. 因其多元素分析特性, 该技术还可用于研究不同元素之间的协同、拮抗等生物效应研究, 方法的建立和完善将为金属蛋白组学研究提供新的技术.

## 参考文献(References)

- Hiroki H J. Anal. At. Spectrom., 2004, **19**: 5—14
- Langevelde F, Vis R D. Anal. Chem., 1991, **63**: 2253—2259
- Geraki K, Farquharson M J, Bradley D A. Phys. Med. Biol., 2002, **47**: 2327—2339
- Ide-Ektessabi A, Fujisawa S, Sugimura K et al. X-Ray Spectrom., 2002, **31**: 7—11
- Twining B S, Baines S B, Fisher N S et al. Anal. Chem., 2003, **75**: 3806—3816
- Ortega R, Bohic S, Tucoulou R et al. Anal. Chem., 2004, **76**: 309—314
- CHEN C Y, ZHANG P Q, CHAI Z F et al. Science in China (English version), 2000, **43**: 88—92
- GAO Y X, CHEN C Y, CHAI Z F et al. Analyst, 2002, **127**: 1400—1404
- GAO Y X, CHEN C Y, ZHANG P Q et al. Anal. Chem. Acta, 2003, **485**: 131—137
- GAO Yu-Xi, CHEN Chun-Ying, ZHAO Jiu-Jiang et al. Chinese J. Anal. Chem., 2003, **31**: 395—398 (in Chinese) (高愈希, 陈春英, 赵九江等. 分析化学, 2003, 31: 395—398)
- GAO Y X, LIU Y B, CHEN C Y et al. J. Anal. At. Spectrom., 2005, **20**: 473—475
- GAO Yu-Xi, FENG Wei-Yue, LI Bai et al. Nuclear Techniques, 2004, **27**: 165—168 (in Chinese)

(高愈希, 丰伟悦, 李柏等.核技术, 2004, 27:165—168)

(董元兴, 高愈希, 陈春英等. 分析化学, 已接受)

13 DONG Yuan-Xing, GAO Yu-Xi, CHEN Chun-Ying et al.  
Chinese J. Anal. Chem., (in Chinese, Accepted)

14 Davis B J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1964, 121 404—427

## Quantitative Analysis of Iron in Protein Bands Existing in Polyacrylamide Gel Matrix with Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence \*

LIU Ying-Bin<sup>1,2</sup> GAO Yu-Xi<sup>1;1)</sup> CHEN Chun-Ying<sup>1</sup> LI Bai<sup>1</sup> YU Hong-Wei<sup>1</sup>  
WANG Jiang-Xue<sup>1</sup> HE Wei<sup>1</sup> HUANG Yu-Ying<sup>1</sup> CHAI Zhi-Fang<sup>1</sup>

1 (Institute of High Energy Physics, CAS, Beijing 100049, China)

2 (Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

**Abstract** A procedure has been proposed for quantification of Fe in protein bands in polyacrylamide gel matrix with synchrotron radiation X-ray fluorescence (SRXRF) analysis. Human hemoglobin was separated with isoelectric focusing (IEF), and Fe amounts in protein bands were measured with SRXRF. Calibration standards were prepared by electrophoresis of bovine serum albumin containing known amounts of Fe with stacking gel. The calibration curves can be obtained in a range of 0—5.1ng Fe and linear relationship between dosage of metals and fluorescent intensity can be observed ( $R^2 = 0.9897$ ). The method provides detection limit of 0.63ng Fe, and the recovery of Fe determination is about 106%. The hyphenated technique of SRXRF and IEF has advantages of quantifying trace elements in proteins and identifying the proteins simultaneously. It can be employed for speciation analysis of trace elements in biological samples.

**Key words** trace element, speciation analysis, synchrotron radiation X-ray fluorescence, electrophoresis, metalloprotein

---

\*Supported by National Natural Science Foundation of China (10475092, 10490180) and Chinese Academy Sciences (KJ CX2-N01)

1) E-mail: gaoyx@mail.ihep.ac.cn