

一种以铁蛋白为载体包埋维生素 B₁₂ 的新方法

孙明炆, 郑嘉怡, 张胜鑫, 吕晨艳*

中国农业大学 北京

【摘要】目的 本研究以铁蛋白为纳米载体, 对维生素 B₁₂ 进行包埋。调控铁蛋白的亚基解离与组装以实现维生素 B₁₂ 的装载, 表征包埋体系并定量测出其在铁蛋白中的包埋量, 从而构建铁蛋白-维生素 B₁₂ 包埋体系。**方法** 人重链铁蛋白 (human heavy chain ferritin, HuHF) 通过大肠杆菌表达, 离子层析纯化。利用 8 M 尿素变性 HuHF, 梯度复性, 以 361 nm 下的紫外吸收表征包埋是否成功, 以高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 定量。**结果** 研究表明维生素 B₁₂ 成功被包埋在铁蛋白纳米笼内。HPLC 定量分析表明, 每个铁蛋白分子约包埋 21.7 个维生素 B₁₂ 分子。**结论** 本研究建立了一种高浓度尿素变性铁蛋白后梯度复性的方法, 构建了以铁蛋白为载体对维生素 B₁₂ 包埋体系, 为其在递送、缓释方面的应用提供参考。

【关键词】 铁蛋白; 维生素 B₁₂; 包埋; 尿素

【基金项目】 国家自然科学基金 (81703208)

A novel method for encapsulating vitamin B₁₂ within ferritin nanocages

Mingyang Sun, Jiayi Zheng, Shengxin Zhang, Chenyan Lv*

China Agricultural University, Beijing, China

【Abstract】 Objective: In this study, vitamin B₁₂ was encapsulated within ferritin as nano carrier. Regulate the disassembly and assembly of ferritin subunits to realize the encapsulation of vitamin B₁₂, qualitatively characterize the encapsulation system, and quantitatively measure the encapsulation amount of the vitamin B₁₂ in ferritin, so as to construct the ferritin vitamin B₁₂ encapsulation system. **Methods:** Human H-chain ferritin (HuHF) was expressed in E. coli and purified by ion chromatography. HuHF was denatured with 8 M urea, and gradient renaturation, UV absorption at 361 nm was detected to characterize whether the encapsulation was successful, and it was quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results:** Studies have shown that vitamin B₁₂ was successfully encapsulated in the ferritin nanocages. HPLC quantitative analysis indicated that each ferritin molecule contained approximately 21.7 vitamin B₁₂ molecules. **Conclusions:** This study established a high-concentration urea-denatured ferritin and gradient renaturation method, and constructed a vitamin B₁₂ encapsulation system with ferritin as a carrier, which provides a reference for its application in delivery.

【Keywords】 Ferritin; Vitamin B₁₂; Encapsulation; Urea

维生素 B₁₂ (vitamin B₁₂) 是一类含有钴的水溶性维生素, 又称作钴胺素, 其分子中含有咕啉环系统, 钴位于咕啉环中央。少数微生物可以合成维生素 B₁₂, 而人体自身不能合成维生素 B₁₂, 需要通过摄食动物源食品, 如肉类、乳制品、蛋、鱼和贝类等补充维生素 B₁₂^[1, 2]。维生素 B₁₂ 是人体所需必需维生素, 它参与细胞代谢 (DNA 合成与调控), 大脑

和神经系统的正常运作, 以及红细胞的形成, 对人体代谢与健康起着重要的作用^[3]。目前, 维生素 B₁₂ 缺乏是一个世界性的问题, 常发生于老年人群中, 影响着约 10%~15% 的 60 岁以上的人^[4]。维生素 B₁₂ 缺乏会导致巨幼红细胞贫血、老年痴呆等神经系统疾病^[5, 6]。此外, 维生素 B₁₂ 缺乏常伴随着其他营养素的缺乏, 如叶酸、铁、锌和蛋白质缺乏等^[7]。

*通讯作者。

维生素 B₁₂ 易被酸、碱和日光等破坏, 极大地限制了它在食品和营养领域的应用^[8]。在应用时需注意避免维生素结构的改变, 这可以通过将其包埋在保护性材料中来实现。笼形蛋白作为一种有效的递送系统, 在食品和材料科学领域受到越来越多的关注。大多数笼状蛋白尺寸在 5-100 nm 之间, 具有内部纳米空腔, 可用于小分子负载, 而蛋白外壳能够保护内部空腔与外部环境分离, 为维生素 B₁₂ 的包埋与递送提供了结构基础^[9]。与其他材料相比, 蛋白质纳米笼还具有粒径分布均匀, 可通过基因工程高效地生产和修饰的优点, 已被证明是一类适合递送多种生物活性化合物的纳米载体^[9]。

铁蛋白是一种由 24 个亚基组成的笼形蛋白, 可自组装成具有 F432 对称性的纳米笼, 其外径和内径分别约为 12 nm 和 8 nm^[10]。相比于其他纳米材料, 基于人重链铁蛋白 (human heavy chainferritin, HuHF) 的纳米颗粒具有如下的优点: (1) 结构稳定。可耐受高达 80°C 的温度 10 分钟, 耐受 pH 值范

围为 3.0~10.0^[11]。(2) 良好的生物安全性和相容性^[12]。(3) 靶向性。HuHF 可被铁蛋白受体 1 (Transferrin Receptor 1, TfR1) 特异性识别, TfR1 在多种癌细胞中过度表达, 利用这一特性可以靶向运输药物分子, 用于癌症诊断和治疗。

迄今, 铁蛋白作为载体已经包埋了叶黄素、花青素、姜黄素, 芦丁等生物活性物质^[13-16]。铁蛋白包埋的方法主要有可逆解聚自组装法以及改变通道大小的方法^[17-19]。通过 60 °C 热处理、超声处理、低浓度变性剂等扩大铁蛋白通道的方法难以将维生素 B₁₂ 这类分子量大, 结构具有刚性的分子分包埋到蛋白质空腔内酸碱条件下 (pH ≤ 2.0 或 pH ≥ 11.0) 调控的铁蛋白解聚后自组装包埋也会由于维生素 B₁₂ 在此条件下被破坏而无法应用^[20]。本研究利用 8M 尿素能破坏蛋白质的非共价键的特性使铁蛋白解聚, 并使之复性组装, 探究刚性小分子维生素 B₁₂ 的在温和条件下的包埋情况, 为维生素 B₁₂ 的递送与缓释提供了参考。

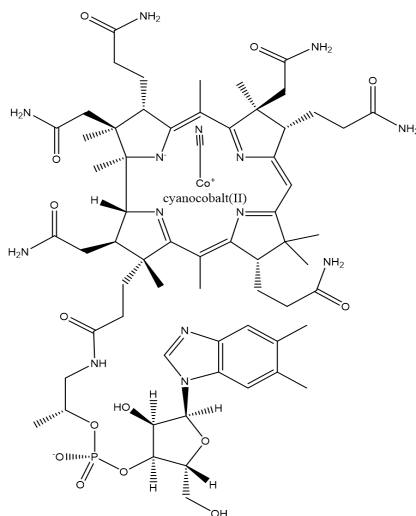


图 1 维生素 B₁₂ 的分子式

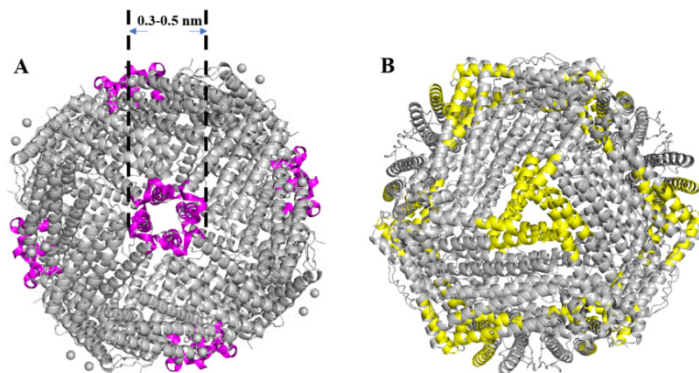


图 2 HuHF 结构图。(A) 四通轴通道; (B) 三通轴通道

1 材料与方

1.1 材料与试剂

维生素 B₁₂、尿素购自于中国北京索莱宝科技有限公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris(hydroxymethyl) methyl aminomethane, Tris) 购自北京拜尔迪生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

LC-10AT 高效液相色谱购自日本京都岛津公司; Cary 50 紫外可见分光光度计购自美国瓦里安公司。超声破碎仪购自新芝生物科技股份有限公司; 恒温摇床购自豪诚仪器制造有限公司; 电泳仪购自 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

(1) HuHF 的分离纯化

HuHF 的表达纯化参考前期研究^[21], 具体如下: 将含有 HuHF 基因的大肠杆菌接入含 10 μL 氨苄青霉素 5 ml LB 培养基中, 37°C 的恒温振荡培养 6 h。完成后将菌转接至 500 mL LB 培养基, 加入 100 μM 异丙基 β-D- 硫代半乳糖苷 (isopropyl-β-D(-)-thiogalactopyranoside, IPTG), 在 37°C 恒温振荡培养 6 h 后 10000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 20 mM 的 Tris-HCl 缓冲溶液复溶。所得溶液超声破碎 15 min, 随后 10000 r/min 离心 10 min。取上清液加入 30% (NH₄)₂SO₄, 搅拌 30 min 后 10000 r/min 离心 10 min。取上清液将 (NH₄)₂SO₄ 补至 50%, 搅拌 30 min 后 10000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 Tris-HCl 缓冲溶液复溶。复溶后 Tris-HCl 缓冲溶液透析除去 (NH₄)₂SO₄, 每隔 6 h 更换一次缓冲溶液, 共换 3 次。完成透析后, 利用二乙氨基乙基纤维素 (diethylaminoethylcellulose, DEAE) 离子交换层析纯化。采用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白纯度。用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳测定 HuHF 的纯度和表观分子量。

(2) 维生素 B₁₂ 的包埋

将维生素 B₁₂ 溶解于的 Tris-HCl 溶液 (25 mM, pH 8.0), 制成 5.4 mg/mL 储备溶液。取 0.63 mL 的 6.35 mg/mL 铁蛋白溶液于 4 支试管中。前三只试管加入尿素至 1 mL, 体系中尿素终浓度为 8 M, 搅拌 1 h, 作为为实验组。对照组加入 Tris-HCl 溶液 (25 mM, pH 8.0) 至 1 mL。在三组实验组中加维生素 B₁₂ 储备液, 使得 HuHF 与维生素 B₁₂ 摩尔比分别为 1: 300, 1: 400, 1: 500, 避光搅拌 1 h。对照组中

HuHF 与维生素 B₁₂ 摩尔比为 1: 300, 后续实验组与对照组的处理操作一致。用 Tris-HCl 溶液 (25 mM, pH 8.0) 将样品稀释至 2 mL、4 mL、8 mL、16 mL, 充分搅拌 45 min, 全程操作需严格避光。之后进行透析, 用 Tris-HCl 溶液 (25 mM, pH 8.0) 在 4 °C 进行透析 3 次, 每隔 6 h 更换一次透析液。

(3) 维生素 B₁₂ 的包埋物表征

① 定性表征

透析完成的溶液采用美国瓦里安 Cary 50 紫外/可见分光光度计测定样品在 200~700 nm 的紫外/可见光谱, 在 361 nm 下观察样品中是否出现维生素 B₁₂ 的特征吸收峰, 以此判断是否包埋成功。

② 定量表征

采用 LC-10AT 高效液相色谱对样品中的维生素 B₁₂ 含量进行定量分析。

制备标准样品: 用流动相溶解配制 20、30、40、50、60 mg/L 的维生素 B₁₂ 标准样品溶液, 过 0.22 μm 的有机相滤膜, 超声脱气 20 min。

制备实验样品: 取 3 mL 透析完成的对照组与 1: 300 实验组的样品, 分别加入 2.02 g 尿素, 溶解后避光搅拌 1 h。完成后 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液通过 0.45 μm 的水相滤膜, 将两份样品超声脱气 20 min。

液相色谱条件:

色谱柱: C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)

流动相: 0.028 M 磷酸氢二钠溶液 (pH=3.5): 甲醇=76:24 (v:v)

流速: 1.0 mL/min; 检测器波长: 361 nm; 柱温: 30°C; 进样量: 10 μL。

2 结果与分析

2.1 HuHF-维生素 B₁₂ 包埋物的鉴定与表征

根据参考文献中的方法分离纯化人重链铁蛋白 (HuHF)。SDS-PAGE 电泳表明, HuHF 亚基的分子量为 21.0 kDa。Native-PAGE 图中 440kDa 附近条带为 HuHF 的单聚体条带 (24 个亚基), 669 kDa 上面的条带是由于 HuHF 浓度较高而出现的多聚体。聚丙烯酰胺电泳与文献报道的电泳条带一致^[19]。

为了验证维生素 B₁₂ 是否包埋成功, 采用紫外分光光度计进行全波长扫描, 观察谱图中是否有 B₁₂ 的特征吸收峰。图 4 (A) 采用 8 M 尿素变性但未采用梯度稀释复性的方法, 可以看到 361 nm 处特

征吸收峰较小, 这是由于铁蛋白在复性时未包入的维生素 B₁₂ 已经由于透析流失, 导致包埋量低, 但这也证明利用尿素处理铁蛋白是可行的。因此, 在此基础上优化条件, 以铁蛋白和维生素 B₁₂ 以 1:300, 1:400 和 1:500 的比例混合, 采用 8 M 尿素变性后梯度稀释变性的方法, 图 4(B)中显示在 361 nm 处有明显的吸收, 这表明铁蛋白成功将维生素 B₁₂ 包埋。

2.2 HuHF-维生素 B₁₂ 包埋物的定量分析

为了验证人重链铁蛋白可以作为载体包埋可以载运 B₁₂, 将 HuHF-B₁₂ 复合物透析后除去游离的

B₁₂, 得到 HuHF-B₁₂ 包埋物。采用液相色谱测定铁蛋白空腔中包埋的 B₁₂ 分子的个数。B₁₂ 的液相色谱图如图 5 所示, 出峰时间在 26.60 min, 其标准曲线如图 5 插图所示。将铁蛋白用尿素变性后释放出 B₁₂ 分子, 过膜除去变性蛋白。样品的液相色谱图如图 6, 结合标准曲线, 计算得 HuHF 与维生素 B₁₂ 摩尔比为 1: 300 的对照组与实验组中维生素 B₁₂ 浓度分别为 59.6 mg/L 与 44.9 mg/L, 其差值为 14.7 mg/L, 约为 10.84 μM。而铁蛋白浓度为 0.5 μM, 故每个铁蛋白分子可包埋 21.7 个维生素 B₁₂ 分子, 包封率为 24.67%。

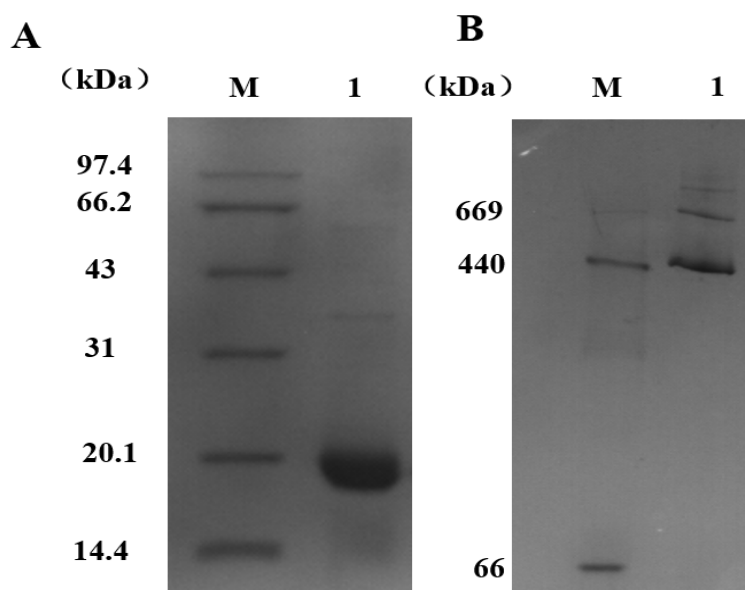


图 3 聚丙烯酰胺电泳表征。(A) SDS-PAGE 电泳 ; (B) Native-PAGE 电泳。M: 标准蛋白 Marker; 泳道 1: 纯化后的 HuHF。

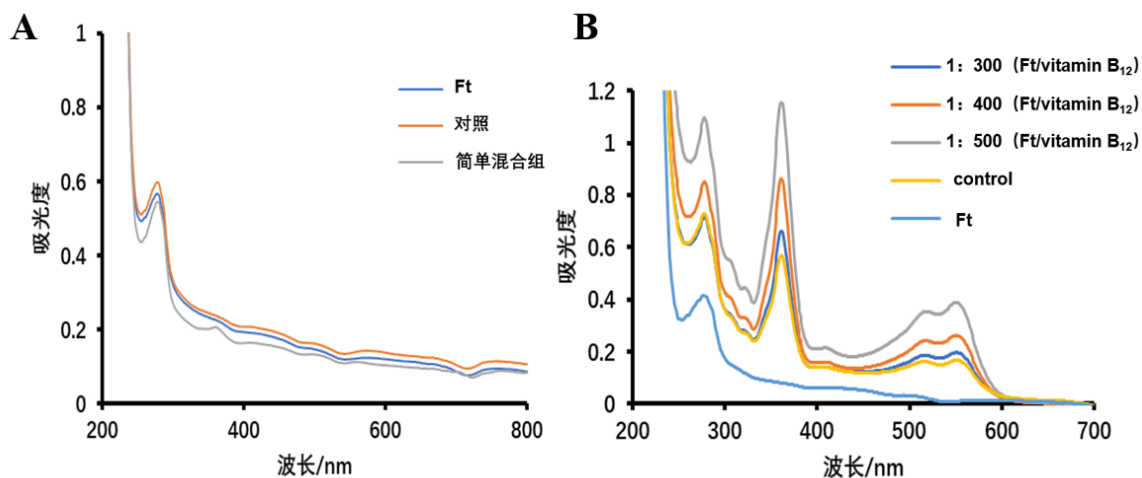


图 4 紫外/可见光谱扫描图。(A) 采用 8 M 尿素变性但未采用梯度稀释复性的方法; (B) 采用 8 M 尿素变性后梯度稀释复性的方法。

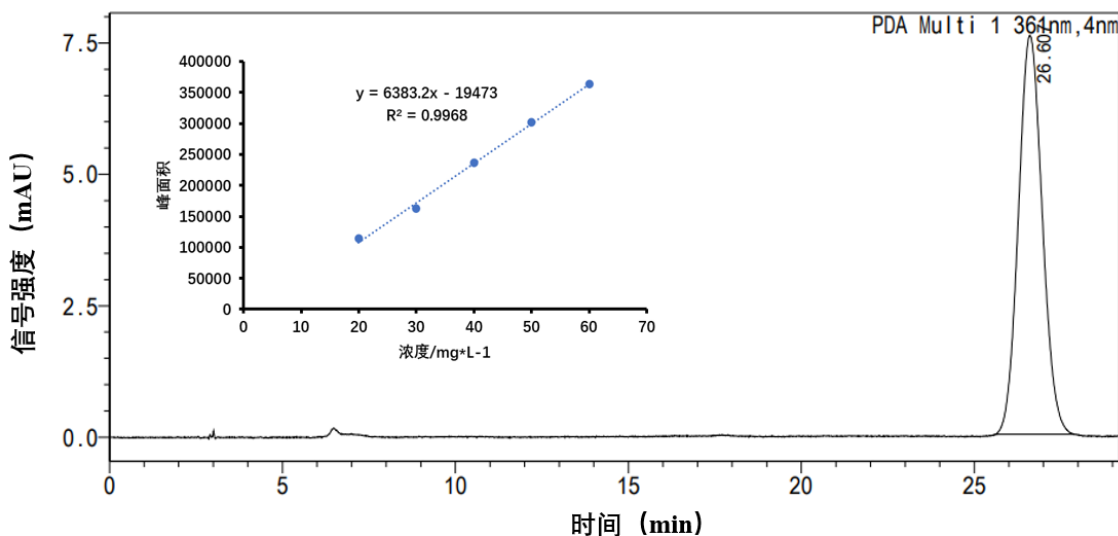


图 5 维生素 B₁₂ 的液相色谱图。插图为维生素 B₁₂ 的标准曲线。

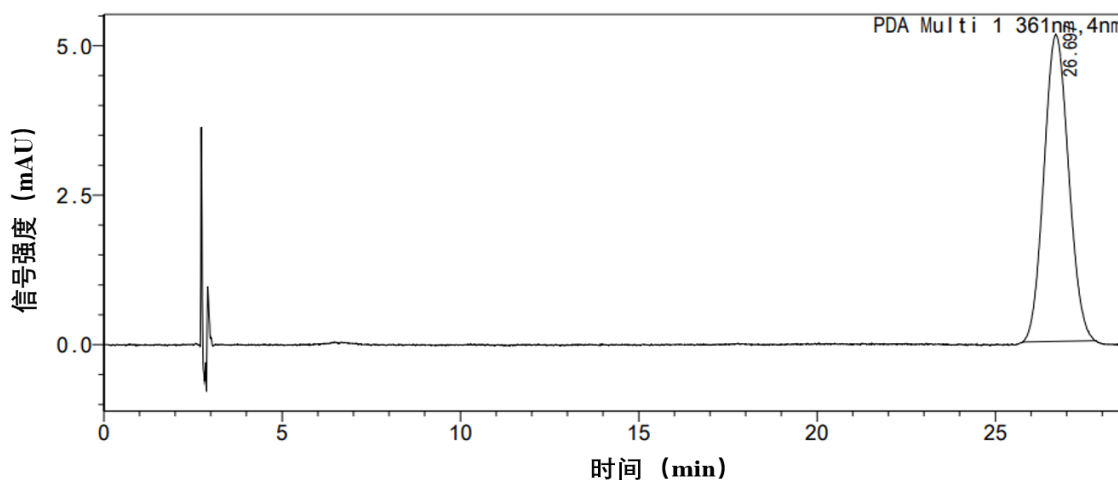


图 6 HuHF 包埋的维生素 B₁₂ 的高效液相色谱图。

3 结论

维生素 B₁₂ 在维持脑、神经系统正常生理功能以及红细胞的形成中发挥着重要作用，然而维生素 B₁₂ 的结构较为复杂，分子量大，难以通过铁蛋白的通道进入空腔中。本研究利用 8 M 尿素使铁蛋白变性，梯度稀释使其缓慢复性，从而实现维生素 B₁₂ 包埋。本研究将为营养组分在医疗、营养的应用提供一定的理论基础，也为其它结构刚性的营养素（如血红素，叶绿素等）的包埋提供一种方法和思路。

参考文献

[1] Tomohiro, Bito, Noriharu, et al. Production and characterization of cyanocobalamin-enriched lettuce

(*Lactuca sativa L.*) grown using hydroponics[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2013, 61(16): 3852-3858.
 [2] Gianluca R, Antonio L, Agnese R, et al. Vitamin B₁₂ among vegetarians: status, assessment and supplementation[J]. Nutrients, 2016,8(12):767.
 [3] Maiorova L A, Erokhina S I, Pisani M, et al. Encapsulation of vitamin B₁₂ into nanoengineered capsules and soft matter nanosystems for targeted delivery[J]. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2019,182:110366.
 [4] Pautas E, Cherin P, Jaeger C D, et al. Vitamin B₁₂ deficiency in the elderly[J]. La Presse Médicale, 1999, 28(32): 1767-1770.

- [5] Clarke, Robert. B-vitamins and prevention of dementia.[J]. The Proceedings of the Nutrition Society, 2008, 67(1): 75-81.
- [6] Huang Z B, Ahronheim J. The effect of vitamin B₁₂ deficiency on the health of older individuals [J]. Journal of the American Geriatrics Society, 1999,47(9):1155-1158.
- [7] Oh S, Cave G, Lu C. Vitamin B₁₂ (cobalamin) and micronutrient fortification in food crops using nanoparticle technology[J]. Frontiers in plant science, 2021, 12: 668819.
- [8] 赵武玲. 基础生物化学.第 2 版[M]. 基础生物化学.第 2 版, 2013:165.
- [9] Chen H, Tan X, Fu Y, et al. The development of natural and designed protein nanocages for encapsulation and delivery of active compounds[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 121:107004.
- [10] Zhao G. Phytoferritin and its implications for human health and nutrition[J]. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 2010,1800(8):815-823.
- [11] Zhang X, Zang J, Chen H, et al. Thermostability of protein nanocages: the effect of natural extra peptide on the exterior surface[J]. RSC Advances, 2019, 9(43): 24777-24782.
- [12] Romagnani S. Immunological tolerance and autoimmunity[J]. Internal and Emergency Medicine, 2006, 1(3): 187-196.
- [13] Yang R, Gao Y, Zhou Z, et al. Fabrication and characterization of ferritin-chitosan-lutein shell-core nanocomposites and lutein stability and release evaluation in vitro[J]. RSC Advances, 2016,6(42):35267-35279.
- [14] Zhang T, Lv C, Chen L, et al. Encapsulation of anthocyanin molecules within a ferritin nanocage increases their stability and cell uptake efficiency[J]. Food Research International, 2014,62:183-192.
- [15] Chen L, Bai G, Yang S, et al. Encapsulation of curcumin in recombinant human H-chain ferritin increases its water-solubility and stability[J]. Food Research International, 2014,62:1147-1153.
- [16] Yang R, Sun G, Zhang M, et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) decorating soybean seed ferritin as a rutin nanocarrier with Prolonged Release Property in the Gastrointestinal Tract[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2016,71(3):277-285.
- [17] Yang R, Liu Y, Meng D, et al. Urea-driven epigallocatechin Gallate (EGCG) permeation into the ferritin cage, an innovative method for fabrication of protein-polyphenol co-assemblies[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017,65(7):1410.
- [18] Yang R, Tian J, Liu Y, et al. Thermally induced encapsulation of food nutrients into phytoferritin through the flexible channels without additives[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2017:7b-3949b.
- [19] 张晨曦, 张晓荣, 吕晨艳, 等. 超声辅助法制备铁蛋白-虾青素包埋物[J]. 食品科学, 2021,42(11):94-101.
- [20] Kim M, Rho Y, Jin K S, et al. pH-dependent structures of ferritin and apoferritin in solution: disassembly and reassembly[J]. Biomacromolecules, 2011,12(5):1629.
- [21] Masuda T, Goto F, Yoshihara T, et al. Crystalstructure of plant ferritin reveals a novel metal binding site that functions as a transit site for metal transfer in ferritin[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010,285.

收稿日期: 2021 年 10 月 9 日

出刊日期: 2021 年 11 月 18 日

引用本文: 孙明炆, 郑嘉怡, 张胜鑫, 吕晨艳, 一种以铁蛋白为载体包埋维生素 B12 的新方法[J]. 农业与食品科学, 2021, 1(1):1-6
DOI: 10.12208/j.jafs. 20210001

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网 (CNKI Scholar)、万方数据 (WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2021 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS