

研究工作

鲫鱼金属硫蛋白的提纯及性质研究*

任宏伟 王文清

(北京大学技术物理系, 北京 100871)

茹炳根 李令媛 潘爱华

(北京大学生物系, 北京 100871)

王英彦

(北京环境保护研究所, 北京 100061)

提 要

用氯化镉诱导鲫鱼 (*Carassius auratus*), 应用层析介质 Sephacryl S 体系从鱼肝脏中提取金属硫蛋白 (MT), 并对其性质进行研究. 实验表明鲫鱼 MT 的性质与哺乳动物 MT 的性质十分相似. 分子量约 10 000, 含丰富的半胱氨酸, 较多的赖氨酸, 不含芳香族氨基酸. 紫外 250nm 处强吸收, 280nm 处几乎没有吸收. 鱼 MT 含 7 个金属每分子, 并含有 20 个巯基. 测得鲫鱼 MT 等电点 pI 在 5.6 左右.

关键词 金属硫蛋白, 鲫鱼, 镉诱导

金属硫蛋白 (metallothionein MT) 是一类低分子量蛋白质 (分子量 6 000—10 000), 1957 年由 Margoshes 和 Vallee 在马肾脏中首次发现, 1960 年 Kagi 和 Vallee 将它命名为金属硫蛋白^[1]. 现已在人、兔等几乎所有哺乳动物体内发现 MT 的存在. MT 分子中不含芳香族氨基酸, 含丰富的半胱氨酸 (30%), 并通过半胱氨酸上的巯基与许多二价金属结合, MT 结合 7 个金属每分子. 在高等植物、真核生物、原核生物中也发现有 MT 或类似 MT 蛋白的存在. 由于 MT 存在的广泛性以及与金属的高亲合性, 人们对其功能进行了大量研究. 现已证明 MT 在机体内参与重要微量元素如 Zn, Cu 等的代谢^[2]. MT 在抗组织损伤、抗重金属毒性方面也起重要作用^[3]. 在水生动物中如海鲰、蟹、海胆以及一些鱼类^[4-7]都发现有 MT 存在. 有的国家已将水生动物体内 MT 作为一种环境污染情况的指标来研究^[8]. 本实验从镉诱导的鲫鱼肝脏中提取出 MT 并对其性质和特征进

行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料及仪器

纯种鲫鱼 500g/尾购自北京万庄鱼场. Tris (Sigma); Sephacryl S-200, DEAE Sepharose Fast Flow, Sephacryl S-100 (Pharmacia AB), Ellman's 试剂 DTNB (Sigma); 超速冷冻离心机 (Beckman L 8-80 M); 原子吸收分光光度计 (Philip PU 9200); 高效液相色谱仪 (岛津 LC-6A); 旋转式冷冻浓缩机 (SAVANT LtD SVC 100) 氨基酸分析仪 (Beckman 121 MB); 全自动快速电泳仪 (Pharmacia Phastsystem TM); HPLC 柱 (Bio-Sill SEC-125 7.5mm × 300mm, Bio-Rad Co.).

1.2 鲫鱼 MT 的诱导合成

取 20 尾纯种鲫鱼在池内喂养一周后, 用

* 863-103-21-09 资助项目.

收稿日期: 1992-03-27

修回日期: 1992-06-12

CdCl₂ 腹腔注射诱导. 实验第1天 2mg/kg 剂量照射, 第4天 4mg/kg, 第7天 6mg/kg, 第10天 8mg/kg 注射, 第11天宰杀. 取出肝脏 50g 于 -70℃ 冷冻箱备用.

1.3 鲫鱼 MT 的分离纯化

取出肝脏组织用生理盐水洗净, 剪碎置于 1.5 倍于肝脏体积的 0.01mol/L Tris-HCl pH8.6 缓冲液中. 在匀浆器中匀浆, 将匀浆液用超速离心机以 106 000g 4℃ 离心 60min. 取上清液置 80℃ 水浴中加热 3min 同时不停搅拌, 再用离心机以 10 000g 4℃ 离心 3min, 得到 50ml 上清液. 将上清液分两次上预先用 0.01mol/L Tris-HCl pH 为 8.6 缓冲液平衡好的 Sephacryl S-200 凝胶柱 (2.6cm × 100cm), 在室温下进行层析分离. 按 5ml 管收集流出液, 检测 254nm 和 280nm 处的紫外吸收值, 同时测定样品组分的 Cd 原子吸收值. 取 254nm 处具高吸收值同时原子吸收 Cd 高的组分, 汇集后上预先用上述缓冲液平衡好的 DEAE-Sephacryl S-200 凝胶柱 (2.6cm × 100cm), 进行离子交换层析, 以 Tris 缓冲液进行直线梯度洗脱 (A 液: 0.01 mol/L Tris-HCl pH8.6; B 液: 0.50 mol/L Tris-HCl pH 8.6). 以 5ml/管收集. 将收集的流出液样品测紫外吸收和原子吸收测 Cd²⁺. 收集其高峰部分即为 MT 组分, 将其冷冻浓缩到体积为 15—20ml, 再上预先用 0.01mol/L (NH₄)₂CO₃ 平衡好的 Sephacryl S-100 分离柱 (1.6cm × 120cm) 进行脱盐. 所得 MT 组分冷冻干燥后, 得无色干粉 10mg.

1.4 分子量测定

1.4.1 HPLC 测定纯化鱼 MT 分子量

称取鲫鱼 MT 2mg 溶于 1.0ml 0.01mol/L 磷酸缓冲液 (PBS) 中, 取 10μl 注入 HPLC (Bio-Sill SEC -125, 7.5mm × 300mm) 柱. 在 254nm 处进行紫外监测. 以 0.05mol/L Na₂SO₄ + 0.05mol/L NaH₂PO₄, pH8.5 缓冲液作流动相. 根据标准蛋白保留时间确定鱼 MT 分子量.

1.4.2 SDS-PAGE 系统测定鱼 MT 分子

量 参考 Laemmli^[9] 方法以 15%—20% 聚丙烯酰胺浓度梯度凝胶电泳测鱼 MT 分子量. 考马斯亮蓝 R-250 染色, 冰醋酸脱色.

1.5 金属含量测定

将鲫鱼 MT 样品配成 1.0mg/ml 溶液, 取 10μl 用 PBS 稀释至 1.0ml, 用原子吸收分光光度计测定 Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ 的吸收值. 用牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准试剂, 应用 Bio-Rad 试剂作显色液测定鱼 MT 溶液的蛋白含量, 确定出每分子 MT 所含各金属的量.

1.6 巯基含量的测定

称取一定量鲫鱼 MT 样品 (巯基含量 0.1—0.5μmol), 配成小于 50μl 溶液. 加入 10μl 1.2mol/L HCl 和 200μl 0.1mol/L EDTA 反应 10min 脱去金属. 加入 200μl Ellman's 试剂 (含 5mmol/L DTNB, 1mmol/L EDTA, 6mol/L 盐酸胍, 0.1mol/L PBS, pH7.3), 混匀 3min 使 MT 变性后与 DTNB 形成黄色络合物, 用 0.1mol/L PBS pH7.3 稀释至 4ml 在 412nm 处测紫外吸收值. 用 $C = DA/\epsilon$ 算巯基浓度. 式中 $\epsilon = 1.23 \times 10^4$ (mol/L)⁻¹ · cm⁻¹, A 为吸收值, D 为稀释倍数.

1.7 氨基酸组成分析

称取鱼 MT 200μg 加入 0.4ml 过甲酸 10℃ 反应 4h 后冻干抽去甲酸. 加入 0.4ml 5.7mol/L HCl, 再于水解管中抽真空封口, 在 110℃ 用不同时间分步水解至 24h. 抽去 HCl 后, 上氨基酸分析仪进行分析.

1.8 等电点测定

应用全自动快速电泳仪, 将 Parafilm 胶在加样板上划痕定好加样位置. 用加样器将样品加到 Phast IEF, pH3—9 的分离介质上. 以 1100V 电压进行分离 0.5h, 用考马斯亮蓝 R-250 染色 60min 后脱色观察, 等电点 pI 在 5.6 左右.

2 结果与讨论

金属硫蛋白 (MT) 是一种非常保守的蛋白质. 在哺乳类动物体内的 MT 分子的氨基酸组成都极其相似. 它们特点是: 没有芳香族氨基

酸,因而在紫外 280nm 处几乎没有吸收. 含有丰富的半胱氨酸, 当其巯基与金属结合后在紫外 254nm 处表现出强的吸收. 应用这些性质结合原子吸收结果可在层析分离中确定出 MT 的组分. 图 1 所示凝胶过滤层析图谱, 第一个峰为一些大分子蛋白, 第二个峰的紫外及原子吸收的结果表明是 MT 组分.

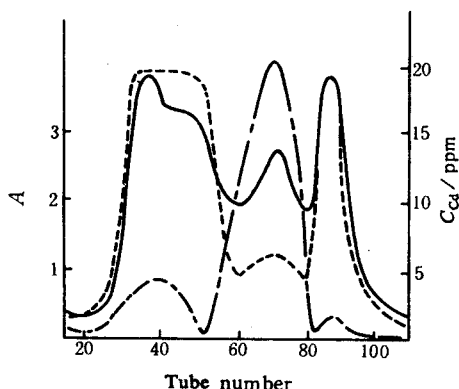


图 1 鱼肝匀浆的上清液的凝胶过滤层析
Fig. 1 Gel filtration of supernatant from the fish liver homogenate

A_{254nm} (—), A_{280nm} (···) C_{Cd} (— · —)
柱尺寸 (Column size): 2.6cm×100cm 流洗液
(Elution with): 0.01mol/L Tris-HCl, pH 8.6
流速 (Flow rate): 120ml/h, 5ml/tube

图 2 所示鱼 MT 在进行离子交换时的图谱. 在直线梯度洗脱中鱼 MT 在 0.15mol/L Tris-HCl 浓度下被解吸下来, 并且是单一的峰, 这与 Aruna^[10]从 Catfish 中提取 MT 的结果相同. 说明鲫鱼体内 MT 不存在亚型, MT 分子间没有电荷上的差异.

用 Sephacryl S-100 脱盐结果见图 3. 鲫鱼 MT 脱盐层析的主峰为 MT, 而后面的小峰经原子吸收测定无金属成分, 可以认为是样品中的盐类成分. 冻干后得率为肝脏含 0.2mg MT 每克. 这比 Overall 从海鲈中提取 MT 的得率高 1 倍以上^[4]. 在提取中本文应用新型凝胶 Sephacryl S 体系, 由于其高强度、耐高压、高分辨率的特点, 使提取过程比用 Sephadex 传统方法加快 4 倍. 所提取样品鉴定后证明分辨率不受影响.

表 1 表示鲫鱼 MT 氨基酸组成分析与

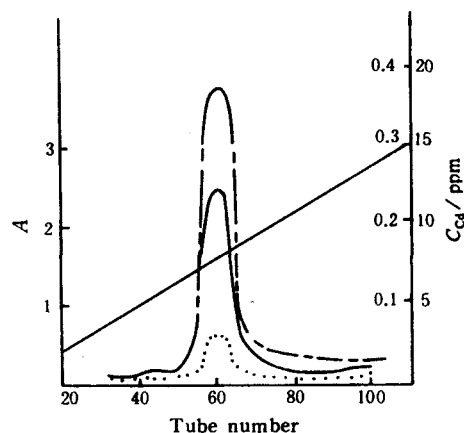


图 2 MT 在 DEAE Sepharose Fast Flow 上的离子交换层析

Fig. 2 Ion exchange chromatography (DEAE Sepharose Fast Flow) of pooled fractions from gel filtration

A_{254nm} (—), A_{280nm} (···), C_{Cd} (— · —)
柱尺寸 (Column size): 2.6cm×35cm 流洗液;
直线梯度洗脱

Eluted with: the linear gradient of Tris-HCl buffer (A buffer: 0.01 mol/L Tris-HCl, B buffer: 0.50 mol/L Tris-HCl, pH 8.6) 流速 (Flow rate): 90 ml/h, 10ml/tube

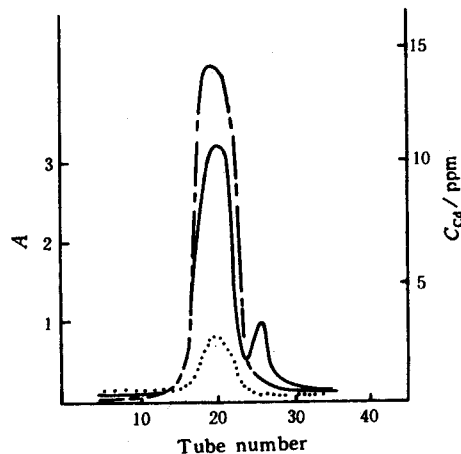


图 3 MT 样品脱盐洗脱图

Fig. 3 Elution profile of desalination of the MT sample

A_{254nm} (—), A_{280nm} (···), C_{Cd} (— · —) 柱尺寸 (column size): 1.6cm×120cm 流洗液: 0.01 mol/L (NH₄)₂CO₃ Eluter with: 0.01 mol/L ammonium carbonate on the Sephacryl S-100 column 流速 (flow rate): 60ml/h, 6ml/tube

海鲈、小沙鱼^[11]的组成作比较。由表可见鲫鱼 MT 氨基酸组成中半胱氨酸含量为 29.3mol%。应用 Ellman's 试剂测定巯基结果与此相同。赖氨酸含量也较高,为 13.9mol%,与海鲈、小沙鱼组成相似。他们都不含有芳香族氨基酸,这与哺乳类动物 MT 的分析结果一致。

表 1 鱼肝 MT 的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of fish liver metallothionein

氨基酸残基 Amino acid residue	mol%		
	鲫鱼 Carassius auratus	海鲈 ^[4] Pleice	小沙鱼 Dogfish
Cys	29.3	20.3	31.1
Asp	7.1	9.7	9.4
Thr	5.5	5.8	9.3
Ser	11.9	8.9	9.1
Glu	3.9	6.4	5.0
Pro	3.4	4.0	6.4
Gly	6.6	10.2	10.9
Ala	11.7	7.2	2.7
Ile	2.8	1.5	1.8
Leu	2.0	3.5	0.8
Phe	0.4	0.8	0
Lys	13.9	11.4	10.2
His	0.2	0	0
Arg	0.8	3.6	0
Met	0	0	2.8
Tyr	0	0	0
Total	99.5	93.3	99.5

MT 与金属的结合能力因金属元素的不同而有差别。降低溶液 pH 值可使金属释放,这种状态下 MT 将失去紫外 250nm 处的吸收特征。在 pH7.4 时,MT 在 250nm 处有明显吸收。正常体内 MT 主要以 Zn-MT 形式为主,由于用 CdCl₂ 诱导,使 MT 分子中的 Zn²⁺ 被结合力强的 Cd²⁺ 取代。本文得到鲫鱼 MT 中 Zn²⁺, Cu²⁺ 的含量为 2—3%,鲫鱼 MT 结合 7 个金属每分子。

由于 MT 分子的哑铃形空间结构,在层析中测得的分子量比蛋白测序后得到的分子量要高,一般在 10 000 左右。用 HPLC 分子筛层析测分子量比哺乳类 MT 分子量稍小。图 4 所示 A 为鱼 MT, B 为兔 MT 的 HPLC 结果。A 的保留时间较 B 稍长,这种差别有稳定的重复性。两种 MT 虽均为脊椎动物,但其分子构成

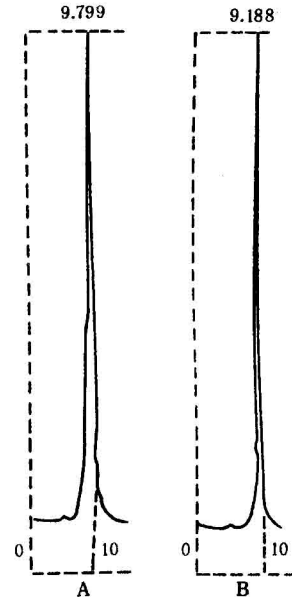


图 4 纯化鱼 MT 与兔 MT 的 HPLC 色谱

Fig. 4 Chromatographic properties both the purified fish MT and rabbit MT by HPLC

柱大小 (Column size): Bio-Sill SCE-125, 300mm
× 7.5mm

A: 鱼 MT, fish MT B: 兔 MT rabbit MT

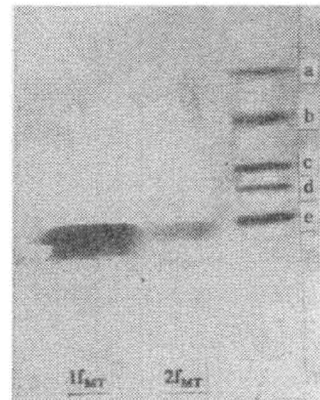


图 5 SDS-PAGE 测鱼 MT 分子量

Fig. 5 Determination of molecular weight of

fish MT by SDS-PAGE

标准蛋白 Marker 分子量 Mr

- a. 牛血清蛋白 (Albumin Bovine) 66 000
- b. 卵清蛋白 (Albumin Egg) 45 000
- c. 碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase) 29 000
- d. 胰蛋白酶抑制剂 (Trypsin inhibitor) 20 100
- e. α-乳清蛋白 (α-Lactalbumin) 14 200

1f_{MT}: 20μg 样品 (20μg MT sample)

2f_{MT}: 5μg 样品 (5μg MT sample)

仍存在一定差异,反映在层析行为不完全一样。图5为鲫鱼MT电泳结果,与标准蛋白比较分子量在10 000左右。

哺乳类动物MT的等电点pI在3.9—4.6之间,已发现的水生动物MT的pI在3.5—6^[12]。鲫鱼MT等电点测定结果在5.6左右。

以上关于鲫鱼MT的分子量、紫外吸收特点、金属结合能力,巯基和氨基酸组成分析的结果完全符合Kägi等关于MT的命名原则^[1],证明本文提取的样品为鲫鱼MT。

参 考 文 献

- 1 Kägi J H R, Vallee B L. Metallothionein; a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*, 1960; **235**:3460
- 2 Brenner I. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia Suppl*, 1987; **52**:81
- 3 Webb M, Cain K. Function of metallothionein. *Biochem Pharmacol*, 1982; **31**:137
- 4 Overnell, J, Coombs T L. Purification and properties of plaice metallothionein, a cadmium binding protein from liver of plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem J*, 1979; **183**:277
- 5 Olafson R W, Sin R G, Boto K G. Isolation and chemical characterization of heavy metal binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol*, 1979; **62B**:407
- 6 Nemer M, Wilkinson D G, Travaglini E C *et al*. Sea urchin metallothionein sequence: Key to an evolutionary diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; **82**:4992
- 7 Olafson R W, Thompson J A J. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar Biol*, 1974; **28**:83
- 8 Hideaki K, Teijiro T, Youki O *et al*. Protection by metallothionein against cadmium toxicity. *Comp Biochem Physiol*, 1982; **73C**(1):129
- 9 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature Lond*, 1970; **227**:680
- 10 Aruna C, Indu B M. Purification and immunological characterization of catfish (*Heteropneustes fossilis*) metallothionein. *Mol Cell Biochem*, 1987; **78**:55
- 11 Juan H, Rosa F. Dogfish metallothionein I purification and characterization and comparison with rat metallothionein. *Comp Biochem Physiol*, 1986; **83C**(1):99
- 12 Hideaki K, Youki O Separation and purification of (Cd, Cu, Zn) metallothionein in carp hepato-pancreas. *Biochem Physiol*, 1982; **73C**(1):121

Purification and Identification of Metallothionein from *Carassius Auratus* Liver Induced by Cadmium Chloride

Ren Hongwei Wang Wenqing

(Department of Technical Physics, Peking University, Beijing 100871)

Ru Binggen Li Lingyuan Pan Aihua

(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

Wang Yingyan

(Beijing Environment Protect Institute, Beijing 100081)

ABSTRACT

The metallothionein (MT) was purified from the liver of *Carassius auratus* induced by exposure to cadmium chloride and characterized. It shows very similar to mammalian metallothioneins in all of its properties. The MT of the fish contains high cysteine contents (30%) and with an absence of aromatic acid residues. The thiol groups of the cysteine residues combine with the cadmium in SH/Cd molar ratio of 3 : 1 and produce a characteristic absorption maximum at 250 nm, minimum at 280 nm. The metal analyses reveal only traces of zinc and copper in addition to cadmium. The molecular weight is determined to be about 10 000 by gel filtration on HPLC and SDS-PAGE method. The isoelectric point of fish MT is demonstrated to be about 5.6.

Key words metallothionein, *Carassius auratus*, isolation and purification, cadmium chloride induced