

酿酒酵母 BD101 诱导产生的金属硫蛋白 的分离纯化及鉴定*

林稚兰 常立梅

(北京大学生命科学院 北京 100871)

摘 要 从酵母菌中分离出拮抗重金属、经铜诱导产生金属硫蛋白的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) BD101。无细胞抽提液经 Sephadex G-50、DEAE Sepharose CL-4B、Sephadex G-25 三次凝胶及阴离子交换柱层析分离纯化得到两个金属硫蛋白亚型。Mr 约为 7kD, 由 60 个氨基酸组成, 其中半胱氨酸含量占 10%, 每分子金属硫蛋白 (Cu-MT) 含 6 个分子 Cys, 可结合 4 个铜原子。

关键词 酿酒酵母, 金属硫蛋白, 分离纯化

分类号 Q513

金属硫蛋白 (Metallothionein, 简称 MT) 是一类广泛存在于生物体内的低分子量、富含 Cys、能被金属诱导产生的金属结合蛋白。主要参与微量元素的储存、运输和代谢, 拮抗电离和非电离辐射; 清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基及重金属解毒等多种作用。自 1957 年 Margoshes 和 Vallee^[1] 等报道从蓄积镉的马肾脏中分离出 Cd-MT 以来, 现几乎能从所有哺乳动物、鱼类、两栖类和某些植物及真核、原核微生物中分离得到。自 1975 年 Prinz 和 Weser^[2] 从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中分离出 Cu-MT 以来, 酵母菌 56 属中已在酵母属、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、假丝酵母属 (*Candida*) 和毕赤酵母属 (*Pichia*) 中证实含有 MT^[3~5]。真核微生物中分离得到的金属硫蛋白基本结构、功能、性质与哺乳动物金属硫蛋白类似, 只在氨基酸组成、Cys 含量、诱导的金属种类和蛋白质的结构域上略有差别。所以常称为类金属硫蛋白 (Metallothionein like protein, 简称 MLP) 或酵母 MT。其主要特征为: 低分子量 (2~10kD); 高金属含量 (4~13 个金属原子 / 每分子 MT); 富含 Cys (占 6.8%~44%); 没有芳香族氨基酸或含量极微; 具有金属通过硫酯键与蛋白质结合的特殊吸收光谱 (如 Cu-MT 在 A_{270} 处有紫外吸收肩); 具有 MT 中典型的 Cys-Xaa-Cys 或 Cys-Xaa-Xaa-Cys 多肽序列 (Xaa 代表任一非特殊氨基酸残基)。目前, MT 已成为分子生物进化和蛋白质结构功能研究领域的热门课题, 在医药、保健、环保、贵重金属回收等领域也显示了广阔的应用前景。本文报道酿酒酵母 BD101 诱导产生的 Cu-MT 分离纯化及理化特性鉴定。该菌 Cu-MT 生理活性见另文^[6]。

* 国家自然科学基金资助项目 (39370021)。

申请国家发明专利 (申请号: 96100897.0)。

收稿日期: 1997-03-10

1 材料和方法

1.1 菌株

酿酒酵母 BDI01, 自本室保存菌种中分离。

1.2 培养基

YPD 培养基^[2]。

1.3 酿酒酵母 Cu^{2+} 诱导培养及无细胞抽提液制备

活化两次的种子液, 接种于 1 mmol/L CuSO_4 的 YPD 培养液中, 30°C 振荡培养 24h, 离心收集细胞, 洗涤后经超声波破壁, 除去不耐热蛋白, 再离心制成无细胞抽提液。

1.4 酵母菌金属硫蛋白分离纯化

取适当浓缩后的粗提取液, 经 Sephadex G-50 柱层析分离, 层析柱 ($3 \times 100\text{cm}$) 用 $0.01 \text{ mol/L Tris-HCl}$ (pH8.6) 缓冲液平衡, 洗脱液与平衡液相同, 层析时监测 A_{254} 、 A_{280} 、 A_{220} 紫外吸收及金属含量。收集富含 Cu 且 $A_{254} > A_{280}$ 的蛋白组分, 上 DEAE Sepharose CL-4B 阴离子交换柱, 柱层析用 $0.01 \text{ mol/L Tris-HCl}$ (pH8.6) 缓冲液平衡, 用 NaCl 梯度洗脱 (终离子浓度 0.3 mol/L), 收集富含 Cu、 $A_{254} > A_{280}$ 蛋白组分, 适当浓缩后经 Sephadex G-25 柱层析脱盐, 用 0.01 mol/L 碳酸铵缓冲液 (pH8.0) 平衡洗脱。再收集富含 Cu、 $A_{254} > A_{280}$ 蛋白组分, 冰冻干燥成纯品。

1.5 金属硫蛋白分析与鉴定

1.5.1 样品纯化及表观分子量测定: 按 King^[7]方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。按 Lehman^[8]方法进行 HPLC 凝胶过滤, 采用 TSK GW3 000 SEC-HPLC 柱。

1.5.2 金属含量测定: 用 PU9200 型原子吸收光谱仪测定。

1.5.3 氨基酸组成分析: 按 Reese 法^[9]用 Beckman MH 121 B 型氨基酸组成分析仪测定。

1.5.4 蛋白质含量测定: 按 Frohman^[10]考马斯亮蓝法。

1.5.5 巯基含量测定: 按铁峰等^[11]报道的方法, 用电化学分析仪单扫描极谱法测定。

1.5.6 紫外吸收特征光谱测定: 将待测样品适当稀释后溶解于 $0.01 \text{ mol/L Tris-HCl}$ (pH8.6) 缓冲液中, 在 $A_{190} \sim A_{300}$ 紫外扫描, 按 Byrd^[12]法制备脱辅基蛋白, 依前法同样紫外扫描。

1.5.7 金属硫蛋白含量测定: 按 David 和 Cheriam^[13]的银血红蛋白饱和法测定, 或测定分离纯化后的 Cu-MT 纯品。

2 结果

2.1 金属硫蛋白分离纯化

按方法 1.3 和 1.4 添加 CuSO_4 诱导酵母细胞和制备无细胞抽提液, 以不加 Cu^{2+} 盐为对照。无细胞抽提液经 Sephadex G-50 柱层析分离, 结果见图 1-A、B 所示。添加 Cu^{2+} 诱导的酵母细胞提取液中, 峰 II 位置出现了 $A_{254} > A_{280}$ 紫外吸收值的 Cu^{2+} 结合蛋白峰 (G-2), 没有添加 Cu^{2+} 诱导的酵母提取物中未见 Cu^{2+} 结合蛋白峰。表明确为 Cu^{2+} 诱导的金属结合蛋白。收集 G-2 组分, 经 DEAE-Sepharose CL-4B 离子交换柱层析 (图 2), 从 G-2 中得到两

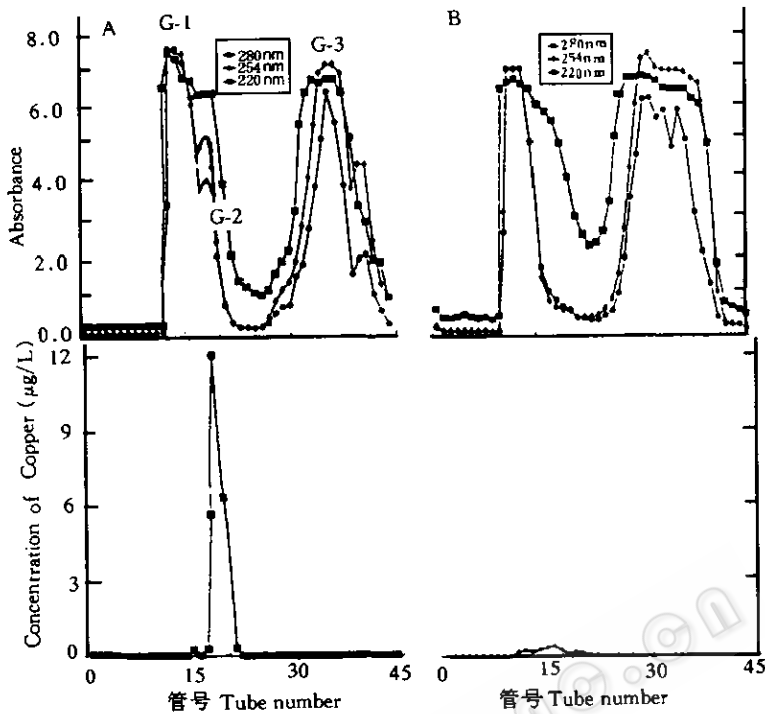


图1 BD101菌株上清液Sephadex G-50柱层析

Fig.1 Sephadex gel filtration (Sephadex G-50) analysis sup from BD101
A: with Cu²⁺; B: without Cu²⁺.

表1 酿酒酵母BD101Cu-MT₁氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of Cu-MT₁ from *Scerevisiae* BD101

氨基酸 Amino acid	Cu-MT ₁			Cu-MT ₂		
	%	残基Residues	邻近整数	%	残基Residues	邻近整数
		分子Molecule	Nearest integer		分子Molecule	Nearest integer
Cys	10.10	6.2	6	9.90	6.0	6
Asx	15.90	9.7	10	14.08	8.6	9
Thr	5.20	3.1	3	5.35	3.2	3
Ser	7.80	4.7	5	6.26	3.7	4
Glx	16.90	10.3	10	17.90	10.9	11
Pro	4.40	2.7	3	7.33	4.4	4
Gly	9.00	5.5	6	6.27	3.8	4
Ala	4.00	2.4	2	5.41	3.3	3
Val	3.80	2.2	2	3.76	2.2	2
Met	0.50	0.3	0	0.00	0.0	0
Ila	3.80	2.3	2	3.40	2.0	2
Leu	4.40	2.6	3	3.20	2.0	2
His	2.50	1.5	2	1.46	0.8	1
Lys	7.90	4.8	5	12.84	7.8	8
Arg	2.20	1.3	1	2.17	1.3	1
Tyr	0.79	0.4	0	0.00	0.0	0
Phe	0.81	0.4	0	0.67	0.4	0
Total	100.00	60.4	60	100.00	60.4	60

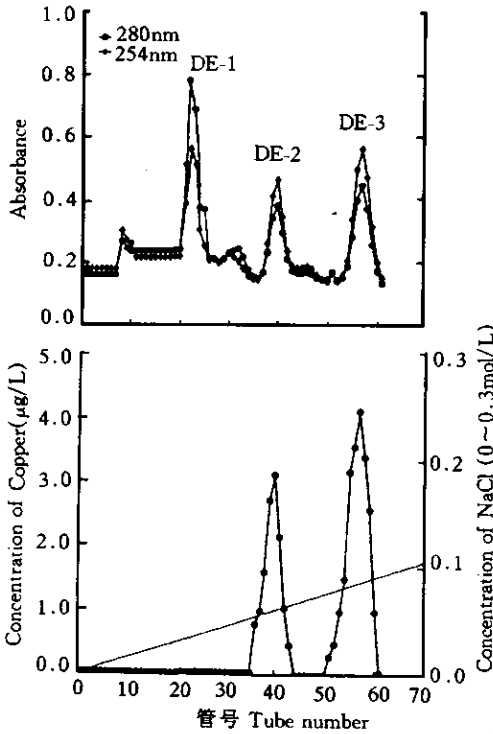


图2 BD101 菌株凝胶过滤 G-2 样品
DEAE-Sephacel-4B 离子交换层析

Fig. 2 Ion exchange chromatography (DEAE-Sephacel-4B) of G-2 fraction separated by gel filtration of BD101

个亚型。

2.2.3 金属含量: 纯化的 18.20 mg Cu-MT₁ 中含铜 600.6μg, 含蛋白质 17.47mg, 每毫克蛋白含 39.39μg 铜, 由此计算 4 克原子铜 / 克分子 Cu-MT₁; 纯化的 20.50mg Cu-MT₂ 中含铜 728.0μg, 含蛋白质 19.70mg, 每毫克蛋白质含 36.95μg 铜, 则 4 克原子铜 / 克分子 Cu-MT₂。

2.2.4 巯基蛋白鉴定: 以单扫极谱法对 Cu-MT₂ 两个亚型进行 -0.05 至 -1.8V 扫描, 在 -1.5V 处有明显的响应电流 (图 4), 为典型巯基蛋白质。

2.2.5 Cu-MT₂ 光学特性鉴定: 图 5

个富含 Cu²⁺、且 A₂₅₄>A₂₈₀ 的 Cu²⁺ 结合蛋白峰 (DE-2, DE-3), 分别收集 DE-2, DE-3 峰洗脱液, 适当浓缩后经 Sephadex G-25 柱层析脱盐, 再收集 D-2、D-3 富含 Cu²⁺、A₂₅₄>A₂₈₀ 蛋白组分, 冰冻干燥成纯品。D-2、D-3 蛋白组分分别命名为 Cu-MT₁ 和 Cu-MT₂。1L 培养液经 Cu²⁺ 诱导可获得 20~30 mg Cu-MT, 纯品。

2.2 金属硫蛋白分析鉴定

2.2.1 分子量测定: HPLC (图 3) 和 SDS-PAGE 测定结果一致。Cu-MT₂ 表观分子量 14kD, 该蛋白含 60 个氨基酸 (表 1), 根据氨基酸组成计算, 其 Mr 理论值为 7kD。与哺乳动物 MT 类似, 推测酵母菌 Cu-MT 也常以二聚体形式存在。

2.2.2 氨基酸组成: 由表 1 看出, Cu-MT 两个亚型 Cys 含量约占 10%; 酸性氨基酸含量高, 没有芳香族氨基酸或含量极微; 均由 60 个氨基酸组成, 两亚型的氨基酸含量不同, 所带电荷不一样, 故离子交换层析区分出两

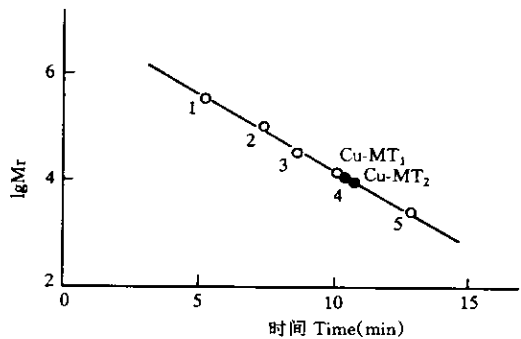


图3 从凝胶过滤 HPLC 图谱计算金属硫蛋白分子量

Fig.3 Determination of Cu-MT₂ Mr by HPLC

1. 甲状腺球蛋白 Thyroglobulin (670 000);
2. 球蛋白 Gamaglobulin (15 800);
3. 鸡卵清蛋白 Ovalbumin (4 400);
4. 肌球蛋白 Myoglobin (17 000);
5. 维生素 B12 Cyanocobalamin (1 350).

看出,从190~300nm紫外扫描表明,Cu-MT₁两个亚型在A₂₇₀附近均有明显的紫外吸收肩,为Cu(II)-SH的典型吸收特征;因缺少芳香族氨基酸,在A₂₈₀附近没有紫外吸收肩。pH 1以下EDTA溶液处理后的脱辅基蛋白,Cu(II)-SH键断裂,A₂₇₀附近紫外吸收肩消失。

2.2.6 诱导剂: 只有Cu²⁺可诱导BD101菌产生Cu-MT₁,Cd²⁺、Zn²⁺不能诱导;添加同样浓度的金属离子,虽然胞内Zn²⁺累积量6倍于Cu²⁺,但只有Zn结合蛋白,未发现Zn-MT。

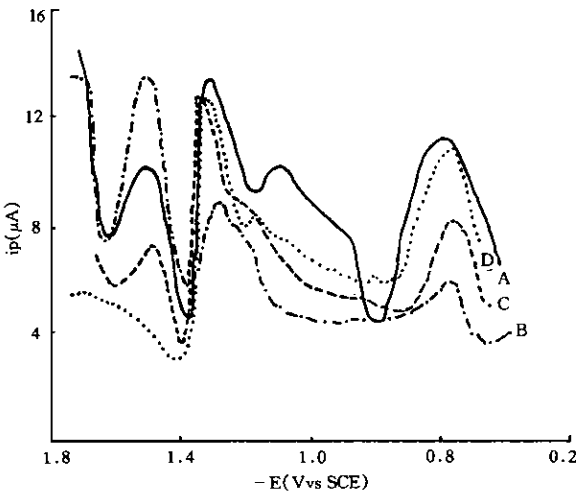


图4 Cu-MT₁巯基族线性极谱扫描
Fig.4 Linear sweep polarography of mercapto group for Cu-MT₁
A. Rabbit liver Cd-MT; B. Cu-MT₁; C. Cu-MT₂; D. H₂O.

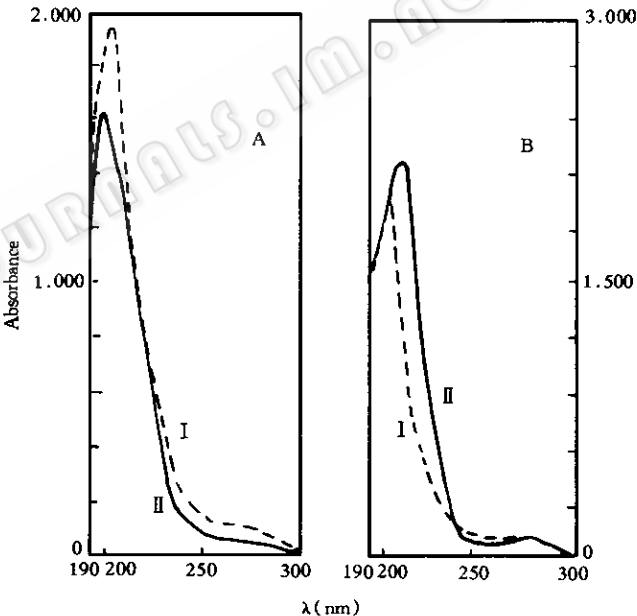


图5 Cu-MT₁紫外吸收光谱
Fig.5 Ultraviolet absorption spectra of Cu-MT₁, A: Cu-MT₁, B: Cu-MT₂
I: Cu-MT₁ or Cu-MT₂ (50μg / ml) 2ml in tris pH 8.6;
II: Free Cu from Cu-MT₁ or Cu-MT₂ .

3 讨论

从酿酒酵母 BD101 中分离纯化出经 Cu²⁺ 诱导产生的铜结合蛋白,按其理化特性分析,低分子量(Mr = 7kD),富含 Cys(10%),酸性氨基酸含量高,不含芳香族氨基酸,高金

属含量,每分子 Cu-MT_s含 6 分子 Cys,结合 4 个铜原子,在 A₂₇₀处有金属通过硫酯键与蛋白质结合的特殊吸收光谱,两个亚型,初步鉴定为酵母菌 Cu-MT_s。尚待一级结构分析有 Cys-Xaa-Cys 典型 MT_s序列再最后确证。我们分离的 BD101Cu-MT_s与 Prinz^[2]和 Naiki^[14]报道的酿酒酵母 X-2180-1Aa 和 IFO-0044Rcu 的 Cu-MT_s不同,其前者 Cu-MT_s中 Cys 含量 24.3%,一种构型,与哺乳动物 MT_s相似,每分子 Cu-MT_s结合 8~13 个铜原子;后者 Cu-MT_s中 Cys 含量仅 6.8%~7.4%,有三个亚型。我们分离的酿酒酵母 BD101 的 Cu-MT_s在小鼠 γ-射线损伤所致血小板降低的改善和回升有显著作用,对老龄小鼠与衰老相关的三项生化指标改善有显著作用^[6]。该菌 Cu-MT_s特性及生物学功能为首次报道。

参 考 文 献

- [1] Margoshes M, Vallee B L. *J Am Chem Soc*, 1957, **79**:4813~4814.
- [2] Prinz R, Weser U. *Hoepe-Seyler's Z physiol Chem*, 1975, **356**:767~776.
- [3] Premakumar R, Winge D R, Willey R D et al. *Arch Biochem Biophys*, 1975, **170**:278~288.
- [4] Murasugi A, Wada C, Hayashi Y. *J Biochem*, 1981, **90**:1561~1564.
- [5] Mehra R K, Tarbet E B, Gray M R et al. *Proc Natl Acad USA*, 1988, **85**:8815~8819.
- [6] 林稚兰, 郝富英, 王 龙等. 菌物系统, 1997, **4**:291~296.
- [7] King J, Laemmli U K. *J Mol Biol*, 1971, **62**:465~473.
- [8] Lehman L D, Klaassen C D. *Anal Biochem*, 1986, **153**:304~305.
- [9] Reese R N, Mehra R K, Tarbet E B et al. *J Biol Chem*, 1988, **263**:4186~4192.
- [10] Frohman C E, Orten J M, Smith A H. *J Biol Chem*, 1951, **193**:265~275.
- [11] 铁 峰, 王文清, 潘爱华等. 北京大学学报(自然科学版), 1993, **29**(4):400~405.
- [12] Byrd J, Hamer D H, Winge D R et al. *J Biol Chem*, 1988, **263**:6689~6694.
- [13] David L E, Cheriam M G. *Methods in Enzymology*, 1991, **205**:83~88.
- [14] Naiki N, Yamagata S. *Plant and Cell Physiol*, 1976, **17**:1281~1295.

ISOLATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF METALLTHIONEIN FROM STRAIN BD 101 OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Lin Zhilan Chang Limei

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract Selection of *Saccharomyces cerevisiae* BD101 having resistance to metal ions and producing metallothionein by inducer from *Saccharomyces*. These proteins were isolated and purified by Sephadex G-50 and subsequent DEAE Sepharose CL-4B, then Sephadex G-25 for desalination. There were two iso-MT_s for Cu-induced. The molecular weights were 7 kD and had 60 amino acids. Both Cu-MT_s were rich in Cysteine (10%). 4 atom Cu / 6 mole Cys / mole Cu-MT_s.

Key words *Saccharomyces cerevisiae*, Metallothionein, Isolation and purification