

# 异常汉逊酵母 BD102 金属硫蛋白的分离纯化和鉴定\*

林稚兰 马国栋 李福荣\*\* 舒建芬 常立梅

(北京大学生命科学院 北京 100871)

**摘 要:**从异常汉逊酵母中分离出拮抗  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  等重金属、并经铜、镉诱导产生金属硫蛋白的异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*) BD102。无细胞抽提液经 Sephadex G-50、DEAE Sepharose CL-6B、Sephadex G-25 三次凝胶及阴离子交换柱层析分离纯化,  $\text{Cu}^{2+}$  诱导得到 Cu-MTs 两个亚型,  $\text{Cd}^{2+}$  诱导得到 Cd-MT 一个亚型。Mr 分别约为 7kD 和 7.5kD, 由 60 和 61 个氨基酸组成, 其中半胱氨酸含量各为 6.8% 和 10%。每分子金属硫蛋白 (Cu-MTs 或 Cd-MT) 可结合 4 个铜或镉原子。

**关键词:** 异常汉逊酵母, 金属硫蛋白, 分离纯化

**中图分类号:** Q513 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 02-0216-07

金属硫蛋白 (Metallothionein, 简称 MT) 为一类广泛存在于生物体内的低分子量、富含半胱氨酸、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; 清除羟基自由基; 拮抗电离辐射和非电离辐射和重金属解毒等多种生理作用<sup>[1]</sup>。自 1975 年 Prinz 和 Weser 等报道从酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中分离出 Cu-MT 以来, 在酵母菌的 56 个属中只在酵母属 (*Saccharomyces*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、假丝酵母属 (*Candida*) 3 个属近 10 个种中有 MTs 的报道<sup>[2]</sup>。大致分为四个类型: (1)  $\text{Cu}^{2+}$  诱导产生类似哺乳动物的 MTs, 如酿酒酵母 X-2180-Aa<sup>[3]</sup>; (2)  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  盐诱导合成类似植物的螯合肽, 如粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) L-972<sup>[4]</sup>; (3)  $\text{Cu}^{2+}$  诱导产生既不同于哺乳动物的 MT, 又不同于植物的螯合肽, 但与哺乳动物 MTs 属性相同, 只是 MTs 分子中半胱氨酸含量低 (6.8% ~ 7.4%) 的第三类, 如酿酒酵母 IFO-0044Rcu<sup>[5]</sup>; (4) 另外有些酵母菌对重金属有两套系统, 且受不同金属离子调控, 如光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*) 67<sup>[6]</sup>,  $\text{Cu}^{2+}$  诱导时产生类似哺乳动物的 Cu-MT,  $\text{Cd}^{2+}$  诱导时产生类似植物重金属螯合肽的 Cd 结合肽。我们分离的异常汉逊酵母 BD102 菌株,  $\text{Cu}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  诱导均产生 MTs, 只是 MTs 分子略有不同, 汉逊酵母属 (*Hansenula*) 中发现 Cu-MT 和 Cd-MT 尚属首次报道, 是研究细胞对重金属解毒机理的理想材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

异常汉逊酵母 (*Hansenula anomala*) BD102, 自食品酿造废液中分离。

\* 国家自然科学基金项目 (39370021)

\*\* 河南信阳师范学院生物系进修教师

作者简介: 林稚兰 (1933-), 女, 江苏省丹阳市人, 北京大学生命科学院生物化学与分子生物学系教授, 主要从事教学和科学研究, 研究方向: 微生物生化及遗传。

收稿日期: 2000-03-27, 修回日期: 2000-06-30

## 1.2 培养基

YPD 培养基<sup>[7]</sup>。

## 1.3 异常汉逊酵母 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 诱导培养及无细胞抽提液制备

活化两次的种子液,接种于  $1\text{mmol/L}$   $\text{CuSO}_4$  或  $\text{CdCl}_2$  的 YPD 中,  $30^\circ\text{C}$  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

取适当浓缩后的抽提液,经 Sephadex G-50 柱层析分离,层析柱 ( $3\text{cm} \times 100\text{cm}$ ) 用  $0.01\text{mol/L}$  Tris-HCl ( $\text{pH}8.6$ ) 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  $A_{254} > A_{280}$  富含 Cu、Cd 的蛋白组分,上 DEAE-Sephadex CL-6B 阴离子交换柱,柱层析用  $0.01\text{mol/L}$  Tris-HCl ( $\text{pH}8.6$ ) 缓冲液平衡,用 NaCl 梯度洗脱(终离子浓度  $0.3\text{mol/L}$ ),收集  $A_{254} > A_{280}$  富含 Cu、Cd 的蛋白组分,适当浓缩后经 Sephadex G-25 柱层析脱盐,用  $0.01\text{mol/L}$  碳酸铵缓冲液 ( $\text{pH}8.6$ ) 平衡洗脱。再收集  $A_{254} > A_{280}$  富含 Cu、Cd 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 样品纯度及分子量测定:按 Lehman<sup>[8]</sup> 方法进行 HPLC 凝胶过滤,采用 TSK GW 3000 SEC-HPLC 柱。按 King<sup>[9]</sup> 方法进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

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<sup>[10]</sup> 用 Beckman MH121B 型氨基酸组成分析仪测定。

1.5.4 蛋白质含量测定:按 Frohman<sup>[11]</sup> 考马斯亮蓝法。

1.5.5 巯基含量测定:按铁峰<sup>[12]</sup> 等报道方法,用电化学分析仪单扫极谱法测定。

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 ( $\text{pH}8.6$ ) 缓冲液中,在  $A_{190} \sim A_{300}$  紫外扫描,按 Byrd<sup>[13]</sup> 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<sup>[14]</sup> 的银血红蛋白饱和法或 Klein 等<sup>[15]</sup> 的铜血红蛋白饱和法测定。

## 2 结果

### 2.1 金属硫蛋白分离纯化

按方法 1.3 和 1.4 添加  $\text{CuSO}_4$  或  $\text{CdCl}_2$  诱导酵母细胞和制备无细胞抽提液,以不加金属盐为对照。无细胞抽提液经 Sephadex G-50 柱层析分离,结果见图 1。在图 1A、1B 添加  $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  诱导的酵母细胞抽提液中,峰 II 位置出现了  $A_{254} > A_{280}$  紫外吸收值的  $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  结合蛋白峰(G-2 或 G'-2);未加  $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  诱导的酵母提取液中没有  $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  结合蛋白峰。表明确为  $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$  诱导的金属结合蛋白。

分别收集 G-2、G'-2 组分,经 DEAE-Sephadex CL-6B 离子交换柱层析(图 2A、B),从 G-2 中得到两个富含  $\text{Cu}^{2+}$ 、并  $A_{254} > A_{280}$  的  $\text{Cu}^{2+}$  结合蛋白峰(DE-2、DE-3),从 G'-2 中得到一个富含  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $A_{254} > A_{280}$  的  $\text{Cd}^{2+}$  结合蛋白峰(DE-1'),再分别收集 DE-2、DE-3 和 DE-1' 峰洗脱液,适当浓缩后经 Sephadex G-25 柱层析脱盐,收集 D-2、D-3 和 D-1' 富含  $\text{Cu}^{2+}$  或  $\text{Cd}^{2+}$ 、 $A_{254} > A_{280}$  蛋白组分,冰冻干燥成纯品。D-2、D-3 蛋白组分命名为  $\text{Cu-MT}_1$

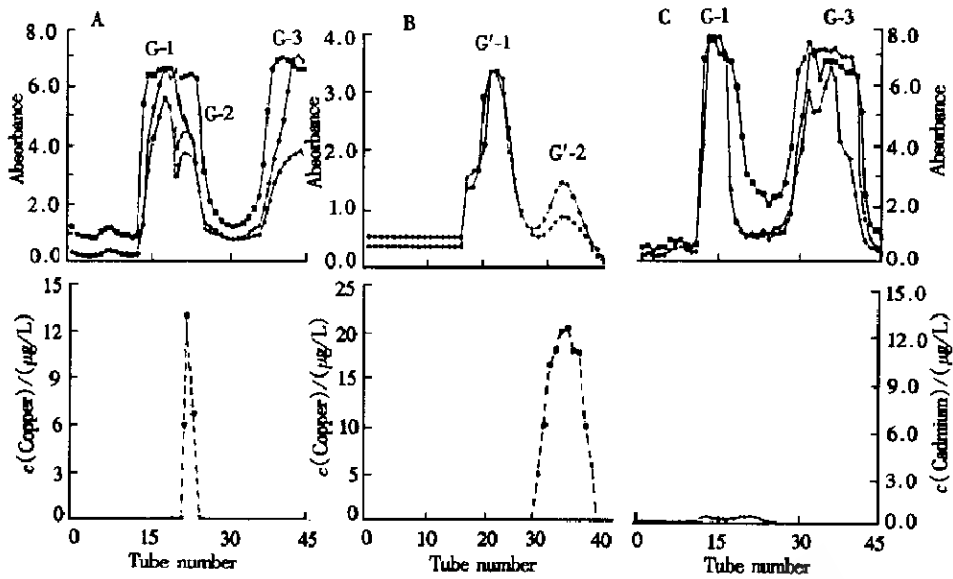


图 1 BD102 上清液 Sephadex G-50 柱层析

Fig.1 Sephadex G-50 gel filtration analysis of the soluble lyophilized proder from BD102

A: with  $\text{Cu}^{2+}$ ; B: with  $\text{Cd}^{2+}$ ; C:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  free.

$A_{280}$  (●---●);  $A_{254}$  (◆---◆);  $A_{220}$  (■---■) and Cu content (●---●); Cd content (■---■).

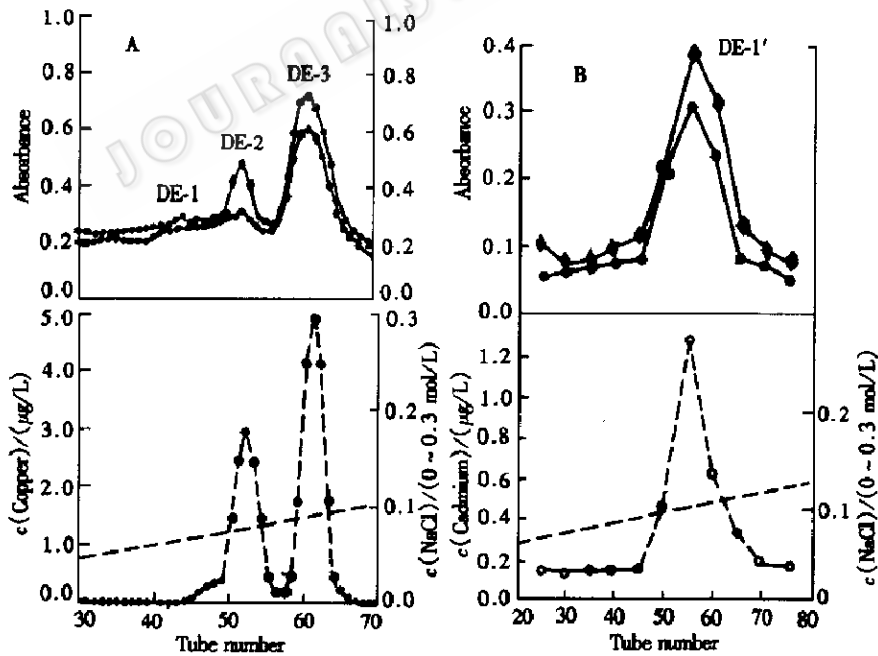


图 2 BD102 菌株凝胶过滤 G-2、G-2 样品 DEAE-Sephacrose CL-6B 离子交换柱层析

Fig.2 Ion exchange chromatography (DEAE-Sephacrose CL-6B) of G-2, G-2' from strain BD102 fractions separated by gel filtration

$A_{254}$  (◆---◆);  $A_{280}$  (●---●); Cu content (●---●); Cd content (○---○). Broken line represents gradient of NaCl (...).

和 Cu-MT<sub>2</sub>,D-1'命名为 Cd-MT。1L 培养液经 Cu<sup>2+</sup> 或 Cd<sup>2+</sup> 诱导可得 20mg MTs 纯品。

2.2 金属硫蛋白分析鉴定

2.2.1 分子量测定:HPLC 图谱(图 3)和 SDS-PAGE 测定结果一致。Cu-MTs 的分子量为 14kD,蛋白含 60 个氨基酸(表 1);Cd-MT 分子量为 15kD,该蛋白含 61 个氨基酸(表 1)。根据氨基酸组成计算,其 Mr 理论值分别为 7kD 和 7.5kD。与哺乳动物 MT 相似。推测其 MTs 为二聚体。

2.2.2 氨基酸组成:由表 1 看出 Cu-MTs 两个亚型 Cys 含量为 6.6 ~ 6.8%,由 60 个氨基酸组成,两个亚型氨基酸含量不同,所载电荷不一样,故离子交换层析区分出两个亚型;而 Cd-MT 的 Cys 含量 10%,由 61 个氨基酸组成。两种 MTs 中酸性氨基酸含量皆高,没有芳香族氨基酸或含量极少。

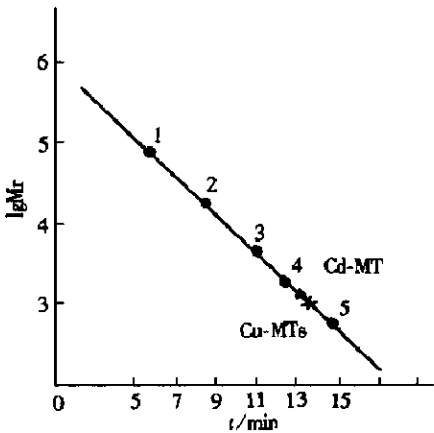


图 3 从 HPLC 图谱计算金属硫蛋白分子量

Fig.3 Determination of Cu-MTs and Cd-MT Mr by HPLC  
1. Thyroglobulin (670000); 2. Gammaglobulin (158000);  
3. Ovalbumin(44000); 4. Myoglobin(17000);  
5. Cyanocobalamin (1350).

表 1 异常汉逊酵母 BD102MTs 氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of MTs from *Hansenula anomala* BD102

Amino acid	Cu-MT <sub>1</sub>			Cu-MT <sub>2</sub>			Cu-MT <sub>3</sub>		
	%	Residues	Nearest integer	%	Residues	Nearest integer	%	Residues	Nearest integer
		Molecule			Molecule			Molecule	
Cys	6.60	4.0	4	6.83	4.2	4	10.72	6.4	6
Asx	10.60	6.4	6	13.73	8.3	8	13.39	8.2	8
Thr	6.50	3.9	4	5.70	3.6	4	5.04	3.1	3
Ser	6.98	4.2	4	7.20	4.3	4	6.76	4.1	4
Glx	16.56	10.1	10	12.93	7.9	8	19.97	12.2	12
Pro	7.54	4.6	5	4.80	2.9	3	0.00	0.0	0
Gly	10.60	6.4	6	9.92	6.1	6	12.50	7.6	8
Ala	6.80	4.1	4	8.50	5.2	5	6.07	3.7	4
Val	3.90	2.3	2	6.25	3.8	4	4.89	3.0	3
Met	0.00	0.0	0	0.00	0.0	0	0.00	0.0	0
Ile	4.30	2.6	3	6.10	2.3	2	5.46	3.3	3
Leu	6.20	3.8	4	6.00	3.6	4	6.67	4.1	4
Tyr	0.00	0.0	0	0.00	0.0	0	0.00	0.0	0
Phe	0.00	0.0	0	0.95	0.6	1	0.00	0.0	0
Lys	8.20	4.9	5	7.80	4.8	5	0.00	4.0	4
His	1.12	0.6	1	1.49	0.9	1	0.00	0.0	0
Arg	4.10	2.4	2	1.80	1.1	1	2.04	1.2	1
Total	100.00	60.3	60	00.00	59.6	60	0.00	60.9	61

2.2.3 金属含量:纯化的 20.00mg Cu-MT<sub>1</sub>(蛋白质含量 19.2mg)中含铜 730μg,每 mg 蛋白含铜 38.02μg,由此计算 4.18(4)克原子铜/克分子 Cu-MT<sub>1</sub>;纯化的 20.00mg Cd-MT (蛋白质含量 19.2mg)中含镉 1140μg,每 mg 蛋白含镉 59.38μg,为 3.97(4)克原子镉/克

分子 Cd-MT (计算时所用的分子量或原子量 Da 为 Cu-MT<sub>1</sub>: 7000, Cd-MT: 7500, Cu: 63.5, Cd: 112.4)。

**2.2.4 巯基蛋白鉴定:**以单扫极谱法对 Cu-MTs 进行 -0.05 至 -1.8V 扫描,在 -1.5V 处有明显的响应电流(图 4),证实为典型的巯基蛋白质。

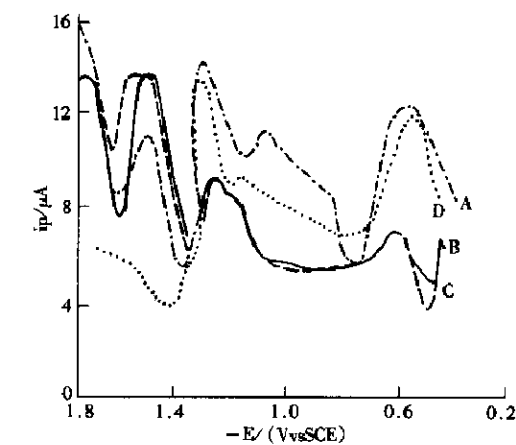


图 4 Cu-MTs 巯基族线性极谱扫描

Fig.4 Linear sweep polarography of Mercapto group for Cu-MTs

A. Rabbit liver Cd-MT; B. Cu-MT<sub>1</sub>;  
C. Cu-MT<sub>2</sub>; D. H<sub>2</sub>O.

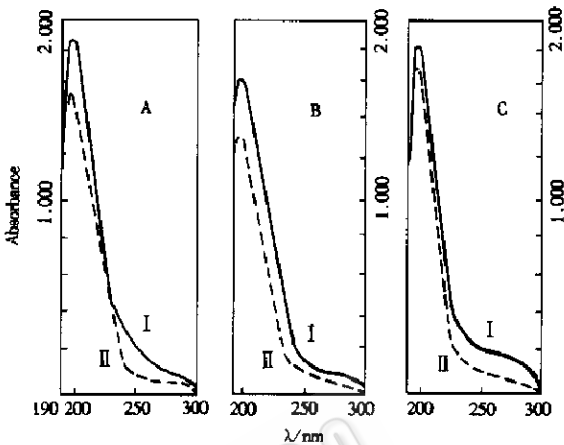


图 5 Cu-MTs 和 Cd-MT 紫外吸收光谱

Fig.5 Ultraviolet absorption spectra of Cu-MTs and Cd-MT  
A. Cu-MT<sub>1</sub>; B. Cu-MT<sub>2</sub>; C. Cd-MT.

I : Cu-MTs or Cd-MT (50μg/ml) 2ml in Tris pH8.6;  
II : Free Cu from Cu-MTs or free Cd from Cd-MT.

**2.2.5 MTs 光学特性鉴定:**图 5 看出,从 190~300nm 紫外扫描表明,Cu-MTs 两个亚型在 A<sub>270</sub>附近均有明显的紫外吸收肩,在 A<sub>254</sub>附近,Cd-MT 有明显紫外吸取肩,为 Cu( II )-SH 和 Cd( II )-SH 的典型吸收特征;因缺少芳香族氨基酸,在 A<sub>280</sub>附近没有紫外吸收肩。在低 pH 下 EDTA 溶液处理后的脱辅基蛋白,Cu( II )-SH 和 Cd( II )-SH 键断裂,故 A<sub>270</sub> 和 A<sub>254</sub>附近紫外吸收肩消失。

3 讨论

从异常汉逊酵母 BD102 中分离纯化出经 Cu<sup>2+</sup> 或 Cd<sup>2+</sup> 诱导产生的铜结合蛋白和镉结合蛋白,依其理化特性分析,低分子量(Mr:7kD、7.5kD),富含(Cys(10%、6.8%),酸性氨基酸含量高,不含芳香族氨基酸或含量极低,高金属含量,每分子 Cu-MTs 含 4 分子 Cys、结合 4 个铜原子,在 A<sub>270</sub>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;而每分子 Cd-MT 含 6 分子 Cys、结合 4 个镉原子,只有一个亚型,在 A<sub>254</sub>处有金属通过硫酯键与蛋白质结合的特殊吸收光谱。已知分子量与 MT 相近的大多数金属结合蛋白(如质体蓝素、星花蓝素、Ps 蓝蛋白等)Cys 含量低(1.0%~5.6%)、有芳香族氨基酸(1.8%~6.0%)、低金属含量(<1 克原子金属/每克分子结合蛋白)。为此,初步鉴定异常汉逊酵母 BD102 的金属结合蛋白为酵母菌的 MTs,待一级结构分析有典型的 MTs 序列 Cys-Xaa-Cys 再最后确证。从 Cys 含量来看,异常汉逊酵母 BD102 的 MTs 与已往报道的酿酒酵母、椭圆酿酒酵母、光滑球拟酵母 MTs 不同<sup>[16]</sup>,与 Naiki N<sup>[5]</sup> 报道的酿酒酵母 IFO-

0044Cu 相似(该菌 Cu-MTs 中 Cys 为 6.8%~7.4%),但该株菌 Cu-MTs 有三个亚型,且不被  $\text{Cd}^{2+}$  诱导。BD102 菌株 MTs 对抗重金属有两套系统,既可被  $\text{Cu}^{2+}$ 、又可被  $\text{Cd}^{2+}$  诱导,但不能被  $\text{Zn}^{2+}$  诱导,添加同样量的  $\text{Zn}^{2+}$ ,虽然胞内锌累积量 6 倍于铜、镉,确只有 Zn 结合蛋白,未发现 Zn-MT。汉逊酵母属 MTs 的特性为首次报道。

**致谢** 工作中得到茹炳根教授的指导和大力支持及帮助,在此表示感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Butt T R, Ecker D J. *Microbiol Rev*, 1987, **51**:351~364.
- [2] 林稚兰,常立梅. 生物工程进展,1996, **16**(3):33~43.
- [3] Prinz R, Weser U. *Hoope-Seyler's Z physiol Chem*, 1975, **356**:767~776.
- [4] Murasugi A, Wada C, Hayashi Y. *J Biochem*, 1981, **90**:1561~1564.
- [5] Naiki N, Yamagata S. *Plant and Cell Physiol*, 1976, **17**:1281~1295.
- [6] Mehra R K, Tarbet E B, Gray M R, et al. *Proc Natl Acad USA*, 1988, **85**:8815~8819.
- [7] 林稚兰,常立梅. 微生物学报,1998, **38**(4):289~284.
- [8] Lehman L D, Klaassen C D. *Anal Biochem*, 1986, **153**:304~305.
- [9] King J, Laemmli U K. *J Mol Biol*, 1971, **62**:465~473.
- [10] Reese R N, Mehra R K, Tarbet E B, et al. *J Biol Chem*, 1988, **263**:4186~4192.
- [11] Frohman C E, Orten J M, Smith A H. *J Biol Chem*, 1951, **193**:265~275.
- [12] 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.
- [13] Byrd J, Hamer D H, Winge D R, et al. *J Biol Chem*, 1988, **263**:6689~6694.
- [14] David L E, Cherian M G. *Methods in Enzymology*, 1991, **205**:85~88.
- [15] Klein D, Bartsch R, Summer K H. *Anal Biochem*, 1990, **189**:35~39.
- [16] Tohoyama H, Inouhe M, Joho M, et al. *J Indus Microbiol*, 1995, **14**:126~131.

## ISOLATION, PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF METALLOTHIONEIN FROM STRAIN BD102 OF *HANSENULA ANOMALA* \*

Lin Zhilan Ma Guodong Li Furong Shu Jianfen Chang Limei

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

**Abstract:** Metallothionein (MTs) in Cu and Cd resistant strain BD102 of *Hansenula anomala* were induced by administration of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$ . These proteins were isolated and purified by Sephadex G-50 and subsequent DEAE-Sepharose CL-6B, then Sephadex G-25 for desalation. There were two isoform MTs by Cu (Cu-MTs), one form induced by Cd (Cd-MT). The molecular weights of the Cu-MTs and the Cd-MT were about 7kD and 7.5kD respectively. Exposure of *Hansenula anomala* to copper salts stimulated formation of two isoform Cu-MTs with a cysteine content of 6.6~6.8% and had 60 amino acids. Exposure of *Hansenula anomala* to cadmium, stimulated formation of Cd-MT with a cystein content of

---

10 % was synthesized and had 61 amino acids.4 atom Cu or Cd/mole MTs.

**Key words:** *Hansenula anomala*, Metallothionein, Isolatoxin and purification

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

---