

镉诱导威廉环毛蚓(*Pheretima guillelmi*) 金属硫蛋白的分离纯化及特性研究

李令媛 马宏宝 吕迎春 茹炳根 沈同

(北京大学生物学系, 蛋白质工程国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 蚯蚓威廉环毛(*Pheretima guillelmi*)经皮下注射 CdCl_2 溶液诱导后, 整体匀浆, 再经热沉淀、乙醇沉淀后, 经凝胶过滤 Sephadex G-50 柱层析, 得两个镉结合蛋白峰, 分子量依次为 43kD 及 19kD。这两个组份再分别经 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析, 各得三个镉结合蛋白峰。根据光谱学特征、硫含量及氨基酸组成等分析, 表明凝胶过滤第二峰为金属硫蛋白(MT), 经 DEAE 柱层析所得三个峰为 MT 三个亚型, N 末端分别为 Lys、Ala、Ala。

关键词: 蚯蚓; 威廉环毛蚓; 金属硫蛋白; 分离纯化

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类广泛存在于生物界的低分子量、富含半胱氨酸残基的金属结合蛋白, 具有参与机体微量元素储存、运输和代谢、拮抗电离辐射、清除羟基自由基和重金属解毒等多种作用, 可诱导合成, 有着广泛的生物学功能^[1]。金属硫蛋白的研究, 多以哺乳动物为材料, 低等动物研究报道较少。蚯蚓作为低等环节动物, 具有抗重金属及富集重金属的特性^[2], 对其与金属结合有关的蛋白质, 尤其是金属硫蛋白的研究虽有报道^[3-9], 研究工作尚很零散且不深入。同时, 蚯蚓具有蛋白含量高、价格低、易饲养等特点, 对蚯蚓金属硫蛋白的研究, 将对生物体金属硫蛋白进行比较与生理生化研究及对寻找廉价金属硫蛋白来源等都具有重要意义。

材料与方 法

一、材料

1. 蚯蚓: 威廉环毛蚓(*Pheretima guillelmi*), 采自北京大学校园。

2. Sephadex G-50、DEAE Sepharose Fast Flow、Sephacryl S-100 为 Pharmacia Co. 产品(瑞典); 高速冷冻离心机为 Hitachi SCR 20(日本); 常压液相层析系统为 LKB Co. 产品(瑞典); 高压液相层析系统为岛津 LC 6A(日本); 原子吸收分光光度计为 Philips PU 9200(英国); 极谱仪为山东电讯七厂产品(JP3-1); 超纯水制备器为 Millipore 6MA 2032(日本)。

二、方法

1. 样品提取与纯化:蚯蚓采集后养于盆中,连续七天每天皮下注射 CdCl_2 溶液一次,每公斤体重注射 Cd 量为第一天 0.5mg,第二天 1mg,第三天 2mg,第四天 3mg,第五天 3mg,第六天 4mg,第七天 4mg,第八天将蚯蚓洗净后放在湿滤纸上,24h 使之排出污物,加入等体积 Tris-HCl (0.01mol/L, pH8.6),匀浆,4°C 过夜抽提,10 000×g 离心 30 min,取上清 80°C 加热 5min,12 000×g 离心 20min,取上清加 -20°C 预冷的乙醇至乙醇终浓度 80%(V/V),-20°C 过液沉淀,10 000×g 离心 30 min,取沉淀溶于 0.02mol/L Tris-HCl,10 000×g 离心 10 min,取上清液经 Sephadex G-50 柱层析,收集含镉蛋白峰,再分别过离子交换 DEAE Sepharose Fast Flow 柱,收集含镉蛋白峰,以 Sephacryl S-100 柱脱盐,冷冻干燥得纯品干粉,-20°C 保存。

2. 分析方法:

(1)原子吸收光谱测镉、铜、锌:采用火焰法。

镉:样品 2mL,镉灯吸收波长 228.8nm,带宽 0.3nm,灯电流 6mA。

铜:样品 2mL,铜灯吸收波长 324.8nm,带宽 0.2nm,灯电流 4mA。

锌:样品 2mL,锌灯吸收波长 213.9nm,带宽 0.2nm,灯电流 8mA。

(2)巯基含量测定^[10]:取 0.2mmol/L 5,5'-二硫二(2-硝基苯甲酸)(简称 DTNB) + 0.1mol/L PBS(pH7.3) + 1mmol/L EDTA 溶液 2mL,加待测样品 10 μ L 或标准 Cys 溶液混匀,8—30min 内测 415nm 吸收值,以标准 Cys 作图,样品与之对照。

(3)低分子量含巯基蛋白的测定:采用单扫极谱法,100 μ L 样品至 1900 μ L 介质(0.1mmol/L NH_4Cl + 0.1mol/L NH_4OH + 0.2mmol/L Co^{2+})中,线扫电压 -0.05—-1.8V,峰电压 -1.5V,一阶微分,3 电极。

(4)分子量测定:HPLC 凝胶过滤。

(5)蛋白含量测定:用 Bio-Rad 试剂及其方法,即 0.8mL 样品 + 0.2mL Bio-Rad 蛋白染料于 595nm 测光吸收值,牛血清清蛋白(BSA)作标准。

(6)氨基酸组成分析:0.1mg 蛋白样品溶于 0.5mL 重蒸水中,其中 0.25mL 里加入 0.4mL 的 5.7mol/L 恒沸 HCl,抽真空封口,110°C 下水解 48h 后抽干 HCl,溶解后上机分析,茚三酮显色,570nm 和 440nm 双波长检测;另 0.25mL 样品先加 0.4mL 过甲酸,-10°C 反应 4h,抽干过甲酸,加重蒸水抽干,此过甲酸氧化样品再经上述盐酸水解方法分析氨基酸组成,即得 Cys 含量。

(7)光谱学特征分析:300nm—190nm 紫外扫描。

(8)金属置换^[11]:样品 2mL(约 1mg/mL),加 β -巯基乙醇 20 μ L,2mol/L HCl 0.2mL,0.2mol/L EDTA 50 μ L,再经 Sephadex G-25 脱盐(柱 1.2×60cm,0.2mol/L 乙酸洗脱),调 pH 至 8.0,分别加金属(Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+})及 2%牛血红蛋白,95°C(2min),离心 10 000×g (5min),取上清,加 2%牛血红蛋白,95°C(2min),离心 10 000×g(5min),取上清,测金属含量,再分别加金属(Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+}),加 2%牛血红蛋白,95°C(2min),离心 10 000×g (5min),取上清,加 2%牛血红蛋白,95°C(2min),离心 10 000×g(5min),取上清,测金属含量。本实验所用水均为超纯水(Milli-Q 水,阻抗 > 18.0M Ω),器皿尽量用塑料制品,使用前用 EDTA 及酸溶液预清洗(6mol/L HNO_3 , 24h),以防止外源金属污染。

(9)N 末端测定:Dansyl-Cl 聚酰胺薄膜层析法^[12]。

结 果

蚯蚓粗提液经凝胶过滤 Sephadex G-50 柱层析分离,层析图谱如 Fig. 1,其中前两个峰含 Cd 与 Zn. 为金属结合蛋白,依次命名为 EW-I 及 EW-II, Cd 与 Zn 的比例 EW-I 为 2, EW-II 为 3. 同样条件下进行对照样品(未经 Cd 诱导)的层析,未出现明显的 EW-I 峰(Fig. 2),说明 EW-I 受 Cd 诱导大量合成,为诱导蛋白.

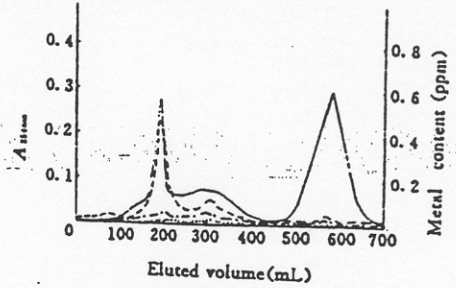
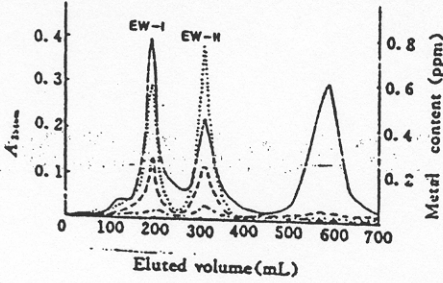


Fig. 1 Gel filtration chromatography of Cd-exposed earthworm homogenate supernatant
Column: 2.6 × 110cm.
Sephadex G-50. Flow rate: 1.6mL/min, Eluted solution: 0.02mol/L Tris-HCl, pH8.6
—A_{254nm};Cd; - - - -Cu; —Zn

Fig. 2 Gel filtration chromatography of the homogenate supernatant from control earthworm
Column: 2.6 × 110cm.
Sephadex G-50. Flow rate: 1.6mL/min.
Eluted solution: 0.02mol/L Tris-HCl, pH8.6
—A_{254nm};Cd; - - - -Cu; —Zn

Fig. 3、Fig. 4 可见,EW-I 与 EW-II 分别经阴离子交换 DEAE Sepharose Fast Flow 柱层析分离,各得 3 个金属结合蛋白组份,依次命名为 EW-I a、EW-I b、EW-I c、EW-II a、EW-II b、EW-II c.

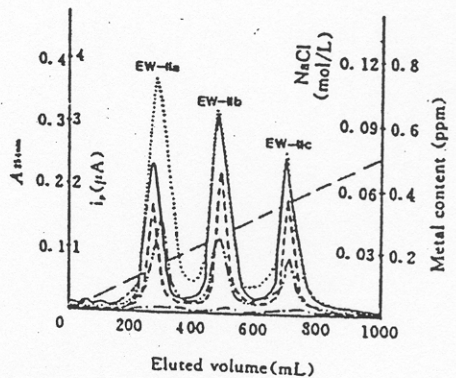
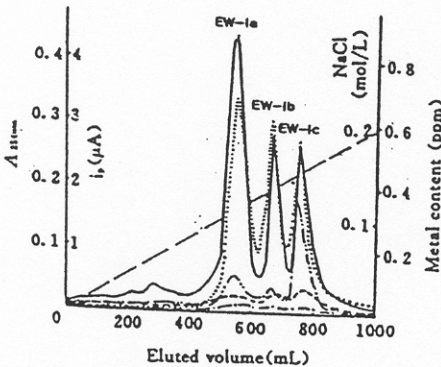


Fig. 3 Ion-exchange chromatography of EW-I from gel filtration chromatography
Column: 2.6 × 20cm, DEAE Sepharose Fast Flow. Flow rate: 1.5mL/min. Eluted solution: A. 0.01mol/L Tris-HCl, pH8.6, 1 000mL; B. A+0.4mol/L NaCl
—A_{254nm};Cd; - - - -Cu; - - - -Zn;
—Mercapto group for protein, i_P(μA)

Fig. 4 Ion-exchange chromatography of EW-II from gel filtration chromatography
Column: 2.6 × 20cm, DEAE Sepharose Fast Flow. Flow rate: 1.5mL/min. Eluted solution: A. 0.01 mol/L Tris-HCl, pH8.6, 1 000mL; B. A+0.15mol/L NaCl
—A_{254nm};Cd; - - - -Cu; - - - -Zn;
—Mercapto group for protein, i_P(μA)

测定单扫极谱-1.5V处(为低分子量含-SH蛋白的特征感应峰)峰电位,仅EW-I a、EW-I b和EW-I c有明显的感应电流(Fig. 5),说明此三个组份为富含-SH的低分子量蛋白。

由 Fig. 6 可见,EW-I a、EW-I b、EW-I c 在 250 nm 处有明显吸收峰,为金属硫蛋白中-SH 与金属 Cd 相络合的特征吸收,此三组份在加酸后 250nm 吸收峰消失,为酸性条件下脱金属所致。

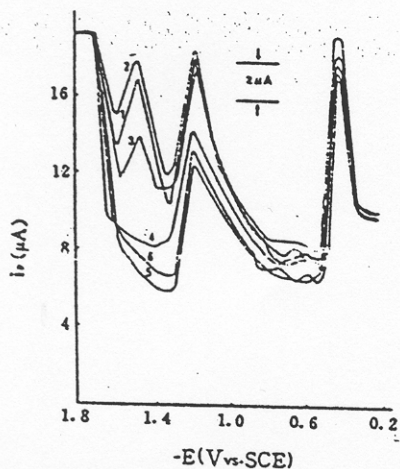


Fig. 5 Linear sweep polarography of mercapto group for earthworm cadmium-binding proteins

1:EW-I a, 2:EW-I b, 3:EW-I c, 4:EW-I a, 5:EW-I b, 6:EW-I c

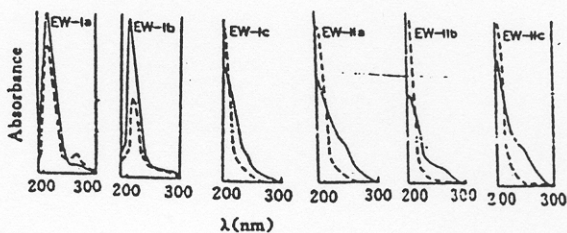


Fig. 6 Ultraviolet absorption spectra of earthworm cadmium-binding proteins

—: Sample (about 50 μg/mL) 2mL in 0.01 mol/L Tris-HCl, pH8.6,

-(-) added 30 μL 1 mol/L HCl

经 HPLC 凝胶过滤柱测定,EW-I 与 EW-I 的分子量分别为 43kD 与 19kD(Fig. 7)。

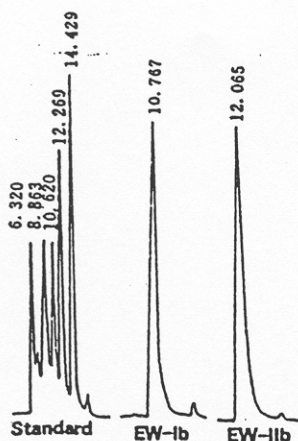


Fig. 7 Chromatographic properties of purified earthworm cadmium-binding proteins as determined by HPLC

HPLC Column: TSK/G 3000 SW, Injected volume: 10 μL, about 1mg/mL, Flow rate: 1mL/min, Elution buffer: 0.05 mol/L PBS, pH8.0

Gel Filtration Standard Component: Thyroglobulin (bovine) 670 000; Gamma globulin (bovine) 158 000; Ovalbumin (chicken) 44 000; Myoglobin (horse) 17 000; Cyanocobalamin 1 350

由 Table 1 与 Table 2 结果可见,EW-I a、EW-I b、EW-I c 具有较高的金属含量和-SH

含量,分子中 Cys 含量依次为 12.78%、12.24%、13.81%。根据 Dansyl-Cl 法测定,EW- I a、EW- I b、EW- I c 的 N-末端氨基酸残基依次为 Lys、Ala、Ala。

Table 1 The properties of constituents of earthworm cadmium-binding proteins

Items	I a	I b	I c	I a	I b	I c
Cd/molecular	3	3	2	6	5	5
Zn/molecular	1	1	2	2	2	2
Cd/Zn	3	3	1	3	2.5	2.5
Cys/molecular	14	14	27	20	20	22
-SH/metal(Cd+Zn)	3.5	3.5	6.7	2.5	2.9	3.1
Release metal(pH)	3.8	3.4	3.3	4.5	4.1	3.9
Product($\mu\text{g}/\text{EW} \cdot \text{mg}$)	—	—	—	16.5	21.1	14.8
Apparent aa/Molecular	400	400	400	160	150	160
Apparent Mr (kD)	43	43	43	19	19	19
N-terminal	—	—	—	Lys	Ala	Ala

Table 2 The amino acid composition of earthworm cadmium-binding proteins

Amino acids	I a	I b	I c	I a	I b	I c
	Mol% (aa/Mol)	Mol% (aa/Mol)	Mol% (aa/Mol)	Mol% (aa/Mol)	Mol% (aa/Mol)	Mol% (aa/Mol)
Cys	3.62(14)	3.46(14)	6.86(27)	12.78(20)	12.24(20)	13.81(22)
Asx	8.57(34)	12.56(50)	13.72(55)	12.46(20)	10.06(16)	13.96(22)
Thr	5.92(24)	11.46(46)	7.85(31)	10.33(17)	8.83(14)	7.02(11)
Ser	9.44(38)	13.14(53)	15.53(62)	8.92(14)	9.03(14)	8.53(14)
Glx	11.74(47)	14.65(59)	6.12(24)	10.46(17)	8.88(14)	12.70(20)
Pro	1.30(5)	4.88(20)	3.21(13)	2.04(3)	0.50(1)	3.79(6)
Gly	10.43(42)	10.21(41)	14.75(59)	11.21(18)	11.39(18)	11.59(19)
Ala	6.30(25)	7.13(29)	9.12(36)	9.24(15)	4.81(8)	5.75(9)
Val	4.68(19)	3.60(14)	0	3.29(5)	4.26(7)	2.84(5)
Met	1.69(7)	1.75(7)	3.24(13)	1.52(2)	1.23(2)	1.49(2)
Ile	3.30(13)	3.50(14)	4.65(19)	3.74(6)	2.11(3)	3.01(5)
Leu	7.01(28)	5.00(20)	4.73(19)	5.77(9)	3.84(6)	5.85(9)
Tyr	1.32(5)	1.42(6)	0	0.16(0)	0	1.24(2)
Phe	1.90(8)	0.57(2)	0	0.23(0)	0.32(1)	1.67(3)
Lys	6.78(27)	3.56(14)	7.77(31)	3.22(5)	4.27(7)	4.57(7)
His	6.57(26)	2.03(8)	1.06(4)	1.50(2)	8.14(13)	0.58(1)
Arg	9.23(37)	1.11(4)	1.41(6)	1.13(2)	10.12(16)	1.63(3)
Total	(399)	(401)	(399)	(155)	(160)	(150)

蚯蚓 MT EW- I a、EW- I b、EW- I c 在 pH2 以下脱金属,据此性质我们在酸性条件下使其脱金属,并加 EDTA 络合,凝胶过滤(Sephadex G-25)回收得到脱金属 MT(Apo-MT),分别加 Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 于 Apo MT 溶液中,即得到经过重组的单一金属结合形式的 MT。根据金属含量测定,它们对 Ag^+ 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的结合量依次为每摩尔蛋白 20、9、9、9 摩尔金

离子。在结合单一金属的 MT 样品中加入其它金属离子,得知蛋白分子对不同金属的亲合力情况,结果是蚯蚓三个 MT 组份(EW-I a、EW-I b、EW-I c)对 Ag、Cd、Cu、Zn 具有一致的亲力顺序,即 $Cu^{2+} > Ag^+ > Cd^{2+} > Zn^{2+}$ 。

经皮下注射 $CdCl_2$ 诱导后,每克鲜蚯蚓分离纯化得率为 EW-I a 16.5 μ g、EW-I b 21.1 μ g、EW-I c 14.8 μ g。

讨 论

金属硫蛋白自 1957 年由 Margoshes 等发现以来^[13],已得到了大量的研究,但多偏重于高等动物尤其是哺乳动物方面,对低等动物报导较少。关于蚯蚓 MT 的研究仅有零散的几篇报导。

本文首次对威廉环毛蚓 MT 进行了研究,并首次对镉诱导条件下的蚯蚓 6 个金属结合蛋白组份全部进行了分离纯化,进行了层析特性、光谱学特征、氨基酸组成、结合金属情况等分析比较,从而确定凝胶过滤第二峰经阴离子交换柱层析分离所得三个组份(EW-I a、EW-I b、EW-I c)为 MT。根据 EW-I a、EW-I b、EW-I c 光谱学特性、金属结合情况,从其氨基酸组成上的类似性,推测它们为 MT 的三个亚型。

根据第二届 MT 国际会议的建议^[14],MT 被分为三大类:第一类为蛋白质肽链 Cys 位置与首先发现的马肾中一致的 MT,如哺乳动物 MT;第二类为 Cys 位置与马肾中 MT 类似,但不一致,如酵母 MT;第三类为非典型的、非直接基因产物的一类 MT,如植物 MT,又称为类 MT(金属硫肽,或重金属结合体)。哺乳动物包括马肾 MT 分子量约 7kD,不含芳香族氨基酸,也不含 His。蚯蚓 MT 分子量为 19kD,约为马肾 MT 的两倍半,并含有芳香族氨基酸及 His。因此,蚯蚓 MT 应属于第二类 MT。

蚯蚓经凝胶过滤与离子交换两次柱层析虽可分出 6 个金属结合蛋白组份,但只有 MTs (EW-I a、EW-I b、EW-I c)的合成受镉诱导,为诱导蛋白。对照(未经 Cd 诱导)的蚯蚓凝胶过滤图谱中蛋白峰 EW-I 与诱导情况中一致,结合 Zn。Cd 被注射入蚯蚓体内后,作为竞争性金属离子参入 EW-I,而蛋白本身的合成情况并没有受到明显影响。蚯蚓具有抗重金属与富集重金属的能力,且其对重金属抗性可通过与重金属的逐渐接触而提高。蚯蚓接触金属后 MT 的合成对重金属抗性及其富集有重要意义。

参 考 文 献

- 1 茹炳根,等. 生物化学与生物物理进展,1981,18(4):254—259,289
- 2 C. A. 爱德华兹, J. R. 洛夫蒂著,戴爱云,等译. 蚯蚓生物学,科学出版社,1984:202—203
- 3 Kazuo, Suzuki T, et al. *Arch Environm Contam Toxicol*, 1980, 9:415—424
- 4 Yamamura M, Mori T, et al. *Experientia*, 1981, 37:1187—1189
- 5 Ireland M R, Richards K S. *Environmental Pollution (Series A)*, 1981, 26:69—78
- 6 Nouyen Q, Furst A. *Biological Trace Element Research*, 1988, 18:81—83
- 7 Morgan J. E. *Comp Biochem Physiol*, 1989, 92C(1):15—21
- 8 Furst A, Nouyen Q. *Biological Trace Element Research*, 1989, 21:81—85
- 9 Ramseier S, et al. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1990, 97:137—144
- 10 Ellman G L. *Arch Biochem Biophys*, 1959, 82:70—75

- 11 Diefer H H, Muller L and Abel J. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1986, 85(3): 380—388
- 12 Gray W R. *Methods in Enzymology*, Vol. 25(part B), London: Academic Press, 1972: 121—132
- 13 Margoshes M, Vallee B L. *J Am Chem Soc*, 1957, 79: 4813—4814
- 14 Fowler B A, et al. *Experientia Suppl*, 1987, 52: 21

Isolation, Purification and Biochemical Properties of Metallothionein from Earthworm (*Pheretima guillelmi*)

Li, Ling-yuan Ma, Hong-bao Lu, Ying-chun Ru, Bing-gen Shen, Tong
(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

Abstract The extract of earthworm (*Pheretima guillelmi*) induced by subcutaneous injection of cadmium (CdCl_2) was separated into two peaks containing cadmium by gel filtration chromatography Sephadex G-50 column, with molecular weight 43kD and 10kD, and named EW-I and EW-II. Each of the two fractions were further separated into three peaks containing cadmium by DEAE Sepharose Fast Flow, respectively, and they were named EW-Ia, EW-Ib, EW-Ic, EW-IIa, EW-IIb, EW-IIc, successively. According to their U.V. absorbance spectra, -SH content and amino acid composition, the fractions EW-Ia, EW-Ib, EW-Ic are earthworm metallothioneins (MTs), and the three constituents from EW-II are considered as three subforms of the earthworm. According to Dansyl-Cl analysis, the N-terminal of EW-Ia, EW-Ib and EW-Ic are Lys, Ala and Ala, respectively.

Key words: Earthworm; *Pheretima guillelmi*; Metallothionein; Isolation and Purification