

毕赤酵母发酵表达金属硫蛋白的制备及活性

曹慧娟¹, 徐君辉¹, 邹俊杰², 张宾², 孙继鹏³

(1. 舟山出入境检验检疫局综合技术服务中心, 浙江舟山 316021) (2. 浙江海洋大学, 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江舟山 316022) (3. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建厦门 361000)

摘要: 以 CuCl_2 诱导的巴斯德毕赤酵母发酵液为原料, 比较高温沉降和等电点沉淀法对发酵液中杂蛋白去除效果, 进而通过超滤膜分离、DEAD-FF 琼脂糖凝胶层析及 EDTA 螯合脱除 Cu^{2+} , 纯化制备 MT, 并评价其对自由基的清除活性。结果发现, 相比于等电点沉淀法, 采用 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 保温 10 min, 再以 8000 r/min 离心 20 min 的高温沉淀法, 对发酵液中杂蛋白去除及 MT 保持效果更佳; 发酵液再经 50 ku 平板膜超滤浓缩、DEAE-FF 离子交换层析, 有效保留了发酵液中 MT 并去除杂蛋白; 采用 EDTA 螯合去除 MT 中结合的 Cu^{2+} , 其脱除率达 61.90% ; 纯化制备 MT 对 Pb^{2+} 、 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 表现出一定再吸附能力, 并具有较好的 $\text{OH}\cdot$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 和 DPPH 自由基清除活性。研究结果可为酵母源 MT 的分离提取以及进一步活性开发与应用, 提供一定的参考与基础。

关键词: 金属硫蛋白; 巴斯德毕赤酵母; 提取; 纯化; 清除自由基

文章编号: 1673-9078(2018)07-149-154

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.022

Preparation and Activity of Metallothionein from the Fermented Yeast (*Pichia pastoris*)

CAO Hui-juan¹, XU Jun-hui¹, ZOU Jun-jie², ZHANG Bin², SUN Ji-peng³

(1. Integrated Technical Service Center, Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan 316021, China)
(2. Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)
(3. Third Institute of Oceanography, State oceanic Administration, Xiamen 361000, China)

Abstract: In this study, the methods to prepare metallothionein (MT) from the fermentation of yeast (*Pichia pastoris*) using high temperature heating and isoelectric precipitation were compared and used as a pre-treatment process to remove the miscellaneous proteins in the fermentation broth. Next, the ultrafiltration membrane, DEAD-FF chromatography, and the action of EDTA chelation were conducted to get high content of MT product from the yeast fermentation. The antioxidant activity *in vitro* of obtained MT was also evaluated. The results indicated that the high temperature heating ($80\text{ }^\circ\text{C}$ heating 10 min, then centrifugation at 8000 r/min for 20 min) showed better effects on the removal of heteroprotein and retention of MT, compared with the treatment of isoelectric precipitation. Additionally, the MT was significantly extracted and purified from the fermentation broth by the following processes of ultrafiltration concentration (50 ku) and DEAE-FF chromatography. The combined Cu^{2+} by extracted MT were removed by the chelation of EDTA, the concentrations of which were decreased by 61.90% . Finally, the obtained MT exhibited the re-adsorption capacity of metal elements and good capacities of $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, and DPPH scavenging activity. These results can provide a reference and theoretical basis for the extraction, the development, and the application of MT from yeast resources.

Key words: metallothionein; *Pichia pastoris*; extraction; purification; radical scavenging

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 化学名为金

收稿日期: 2018-02-09

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2016M590663); 浙江省自然科学基金项目 (LY18C200008)

作者简介: 曹慧娟 (1981-), 女, 工程师, 硕士, 研究方向: 水产品重金属安全与控制

通讯作者: 张宾 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品加工及贮藏; 孙继鹏 (1980-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 海洋生物资源活性及应用

属硫组氨酸三甲基内盐, 其是一类低分子量、高巯基含量及能结合金属离子, 且具有独特功能的蛋白质。研究表明, MT 具有清除自由基、抗电离辐射、降低重金属中毒、参与体内微量元素代谢、增强机体对抗不良状态适应能力、延缓衰老等多种生物学功能, 已在环保、医学、保健食品添加剂和化妆品等领域得到了广泛的应用^[1,2]。

MT 广泛存在于动物、植物及微生物体内, 可被重金属离子、细胞毒性药物、有机化学药物及应激刺

激等诱导合成。国内市场上常见 MT 产品,大部分来自兔肝脏中提纯获得,但其原料来源较为特殊,生产工艺复杂,提纯过程操作繁杂、产量极低且价格极其昂贵^[3]。与动植物源提取相比,通过微生物源(如酵母、枯草芽孢杆菌等)诱导表达产生 MT,具有来源广、成本低、发酵周期短等优点^[4]。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)在用于表达异源蛋白方面具有诸多优点,如酵母细胞易于分子遗传学操作、生长速度快及生物毒性低,其适于外源基因的高水平诱导表达,还可进行高密度细胞培养,利于大规模工业化生产^[5]。

关于微生物源的 MT 提取及分离纯化方法,诸如加热除杂蛋白、缓冲液匀浆离心法、凝胶过滤、离子交换及多种层析结合法等,由于微生物生长代谢的复杂性,仍存在如杂蛋白干扰严重、MT 提取率不高等问题,其分离纯化方法仍有待进一步提高。课题组前期以巴斯德毕赤酵母为对象,经培育诱导条件优化(摇床转速为 220 r/min,甲醇诱导剂 5%, CuCl_2 诱导剂 50 $\mu\text{mol/L}$,诱导时间 24 h),培养发酵液中 MT 诱导表达量达 0.29 mg/mL(结果另文报道)。本研究以巴斯德毕赤酵母发酵液为对象,对其中 MT 的提取分离及纯化条件进行优化,并初步评价获得 MT 的清除自由基活性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达菌株(GS-115),由国家海洋局第三海洋研究所海洋生物资源综合利用工程技术研究中心(厦门)经基因重组获得;考马斯亮兰 G-250、茚三酮及苯酚等,西陇化工股份有限公司;牛血清白蛋白(BSA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)等,北京索莱宝科技有限公司;Tris-(2-carboxylethyl)-phosphine(TCEP)、Ammonium 7-Fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate(SBD-F)及金属硫蛋白标准品(来自兔肝)等, Sigma-ALDRICH 上海贸易有限公司。以上实验所用试剂,均为分析纯。

Waters 2475 荧光检测器、Waters e2695 高效液相色谱仪,沃特世科技有限公司;UV-1780 紫外可见分光光度计,日本岛津仪器有限公司;Milli-Q 超纯水仪,美国 Millipore 公司;SCINOTM KT260 凯氏定氮仪、SCINOTM DT208 高温消化炉,瑞士 FOSS 公司;SRMXM-4 平板膜分离设备,三达膜科技有限公司;多功能全自动层析系统,上海沪西分析仪器厂有限公司。

1.2 酵母发酵 MT 的制备

依据课题组前期研究^[3],将毕赤酵母菌进行培育、诱导表达,制备 MT 发酵液工艺:将酵母在培育温度 30 $^{\circ}\text{C}$,初始 pH 9.0,摇床转速 240 r/min 和菌种接种量 4%条件下,进行摇瓶培育 20 h;随后将培育后酵母加入 CuCl_2 进行诱导发酵,具体在菌体密度 OD_{600} 9.7,摇床转速 220 r/min,诱导剂甲醇终浓度 5% (V/V) 和 CuCl_2 终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 条件下,进行诱导表达 24 h,获得含 MT 的毕赤酵母发酵液(结果另文报道)。

1.3 酵母发酵液的预处理

1.3.1 高温沉降法除杂

将 30 mL 发酵液分别置于 50、60、70 和 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下,恒温保存 0、10、20、30、40、50 和 60 min,取出后常温冷却至室温,8000 r/min 离心 20 min (4 $^{\circ}\text{C}$),取上清液测定 MT 含量,同时取沉淀物进行称重,考察高温沉降对发酵液中 MT 稳定性及杂质去除效果影响。

1.3.2 等电点沉淀法除杂

准确量取 1.0 mL 发酵液分别加入 0、2、4、6、8、10、12、14、16、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90 和 100 μL , 4 mol/L HCl 溶液,充分混匀后,8000 r/min 离心 20 min (4 $^{\circ}\text{C}$),取上清液测定总蛋白质和 MT 含量,考察等电点法对发酵液中 MT 耐酸性及杂质去除效果影响。蛋白质含量测定,采用考马斯亮兰法进行。

1.4 酵母发酵液中 MT 的膜分离

将经预处理后酵母发酵液,经截留分子量为 50 ku 硝酸纤维素膜超滤膜,以去除发酵液中其它杂质,获得 MT 浓缩液经冷冻干燥后即为 MT 粗提物。膜分离参数:进口压力 0.5 MPa,出口压力 0.2 MPa,超滤温度 26 $^{\circ}\text{C}$ 。考察膜分离对发酵液中杂蛋白去除效果及对 MT 截留率影响。

1.5 发酵液中 MT 的纯化

采用凝胶层析法对 MT 粗提物进一步纯化,具体参数:DEAD-FF 琼脂糖凝胶为层析介质,MT 粗提物上样浓度 0.6 mg/mL,样品溶液 pH 8.5,上样流速 1.0 BV/h。样品吸附饱和后,采用 pH 8.5, 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液洗脱吸附杂蛋白,进而通过 pH 8.5,含 0.6 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱目标蛋白(MT),层析分离收集 MT。进一步将收集的 MT 溶液,调节 pH 至 6.0,加入 0.1 mol/L EDTA(实验中,

采用 CuCl_2 进行诱导表达, 获得 MT 多以 MT-Cu^{2+} 形式存在, 需进一步去除 Cu^{2+} , 混匀反应 10 min 后, 经 SephadexG-25 脱盐, 冷冻干燥制备 MT 纯化样品。

1.6 纯化 MT 活性评价

利用 H_2O_2 与 Fe^{2+} 混合体系模拟产生 $\text{OH}\cdot$ 自由基, 通过显色剂结晶紫与 $\text{OH}\cdot$ 发生亲电加成反应而褪色作考察指标, 评价制备 MT 对 $\text{OH}\cdot$ 清除能力^[6]。利用邻苯三酚在碱性条件下发生自氧化反应, 产生 $\text{O}_2\cdot^-$ 自由基与反应物, 评价制备 MT 对 $\text{O}_2\cdot^-$ 清除能力^[7]。利用 DPPH 溶于乙醇后显紫红色, 加入自由基清除剂后, 由于孤对电子被配对从而发生褪色现象, 从而评价制备 MT 对 DPPH 自由基清除能力^[8]。

1.7 指标测定

1.7.1 MT 含量测定

取 20 μL MT 上清液, 加入 3 μL 20% (m/V) TCEP 溶液、10 μL 1 mg/mL SBD-F 溶液和 75 μL 、pH 10.5 反应缓冲液 (含 1 mol/L 硼酸、30 mmol/L EDTA 和 0.8 mol/L KOH), 混匀后 50 $^\circ\text{C}$ 水浴反应 30 min, 加入 10 μL 、4 mol/L HCl 终止反应。将混合体系采用 20 mmol/L、pH 7.5 缓冲液定容至 1 mL, 混合均匀, 经 0.22 μm 水系膜后, 进行 HPLC 分析^[9]。流动相: 乙腈:磷酸缓冲液 (25 mmol/L, pH 7.5): 甲醇体系=18:80:2; 色谱柱: ODS-BP (Sinocrom, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) C_{18} 柱; 进样量: 40 μL ; 洗脱时间: 20 min; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 25 $^\circ\text{C}$; 激发波长 380 nm, 发射波长 510 nm; 标准品: 兔肝 MT, 保留时间: 7.3~7.7 min。

1.7.2 金属含量测定

称取待测样品 0.80~1.20 g, 加入 12 mL HNO_3 和 3 mL HClO_4 , 混匀后进行消解。电热消解程序: 升温至 100 $^\circ\text{C}$, 保持 30 min; 至 130 $^\circ\text{C}$, 保持 60 min; 再升温至 150 $^\circ\text{C}$, 至消解完成; 最后升温至 180 $^\circ\text{C}$, 赶酸至样品容量约 2 mL。冷却至室温, 超纯水定容 50 mL, 原子吸收分光光度计法测定各金属元素含量^[10]。

1.8 数据统计与分析

采用 origin 8.0、SPSS 及 Design Expert 8.0 进行处理, 实验数据均为 3 次平行实验的平均值, 结果表示为平均值 \pm 标准差。

2 结果与讨论

2.1 酵母发酵液的预处理

2.1.1 高温沉降法预处理效果

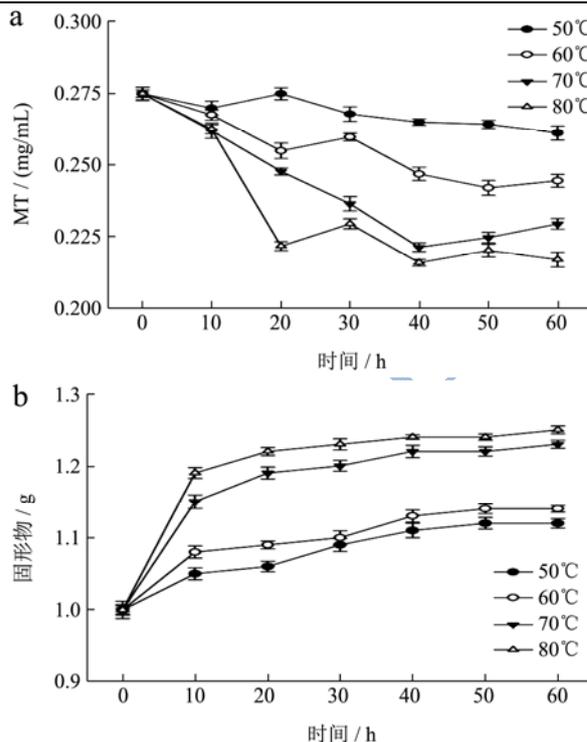


图1 加热温度对发酵液中 MT (a) 和离心沉淀 (b) 含量的影响

Fig.1 Effect of temperature and holding-time of heating on content of MT (a) and sediment (b) in fermentation broth

由图 1 结果可知, 酵母发酵液经 50~60 $^\circ\text{C}$ 加热处理 60 min, 发酵液中 MT 损失率都在 10% 以内; 30 mL 发酵液经加热离心, 获得沉淀含量范围为 1.00~1.14 g。采用 70~80 $^\circ\text{C}$ 高温处理 40 min, 发酵液中 MT 含量下降迅速。80 $^\circ\text{C}$ 条件下加热 10 min, 发酵液中 MT 损失率为 4.55%, 沉淀固形物含量范围为 1.00~1.19 g; 而加热时间超过 10 min 后, MT 损失率迅速升高。研究表明, MT 由于分子结构的特殊性, 其耐热性十分突出, 因此可利用短时、高温处理, 去除发酵液大部分耐热性较差杂蛋白, 同时也起到灭菌灭酶、减少后期纯化过程中对目的蛋白降解作用^[11]。综合考虑, 选择 80 $^\circ\text{C}$ 加热 10 min 进行发酵液预处理, 再以 8000 r/min 离心 20 min, 获得较低杂蛋白含量的酵母发酵液。

2.1.2 等电点沉降法预处理效果

在不同体积酸处理条件下, 发酵液中 MT 及总蛋白含量波动较大, 结果如图 2 所示。随着加酸量的不断增加, 上清液中总蛋白含量呈先迅速降低后趋于平缓趋势, 表明发酵液中大部分蛋白耐酸性差, 可通过加酸后离心而去除。上清液中 MT 含量总体呈平缓趋势, 仅在达到 MT 等电点时 (加酸量 42 μL) 含量最低, 说明 MT 对酸稳定性较强。在 1 mL 发酵液中加入 30 μL 4 mol/L HCl 时, 总蛋白含量达到最低, 此时 MT 损失率为 6.47%。因此, 在不改变 MT 稳定性条件下, 可通过改变发酵液的酸度, 使发酵液中杂蛋白

在酸性条件下变性或达到等电点的方法去除部分杂蛋白,达到发酵液前处理中除杂的目的^[12]。综合比较以上两种预处理方法,保证较低 MT 损失率、良好灭菌、灭酶及除杂效果,同时避免加入试剂对 MT 造成污染,并考虑到实际生产的经济性、安全性及简易性,本试验采用热处理法作为发酵液预处理方法:80℃条件下保温 10 min 后,常温 8000 r/min 离心 20 min,取上清液为预处理后酵母发酵液。

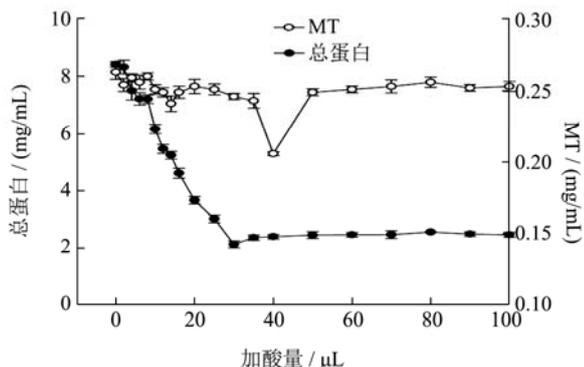


图2 加酸处理对发酵液中 MT 和离心沉淀含量的影响

Fig.2 Effects of the acidity on content of MT and sediment in fermentation broth

2.2 酵母发酵液中 MT 的膜分离效果

选用 50 ku 平板超滤膜处理后,获得发酵液中 MT 得率为 94.29%,杂蛋白去除率为 24.82%。由此,平板超滤可有效去除发酵液中残留的一些大分子量杂蛋白,并对发酵液进行高效浓缩。经 HPLC 测定,经 50 ku 平板膜超滤除杂浓缩液中 MT 浓度达 1.77 mg/mL。

2.3 发酵液中 MT 的纯化效果

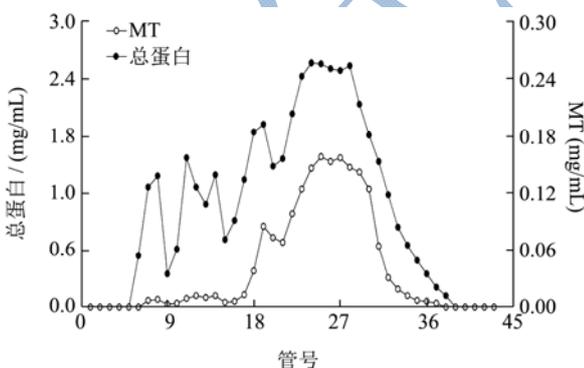


图3 DEAE-FF 柱层析分离结果

Fig.3 Column chromatography results of DEAE-FF

溶液中的带电溶质分子通过琼脂糖凝胶时,其与离子交换剂中带相同电荷的离子进行交换,从而达到分离目的。在溶液体系 pH、上样浓度及流速、洗脱缓冲液等单因素优化基础上,获得最佳纯化工艺参数为:上样浓度 0.60 mg/mL、pH 8.5 上样流速 1.00 BV/h;

10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 洗脱杂蛋白,0.60 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.5) 洗脱 MT。经平板超滤后的酵母发酵浓缩液,经 DEAE-FF 层析介质吸附及洗脱曲线,如图 3 所示。由结果可知,大部分的杂蛋白先被洗脱,MT 活性成分后被洗脱,分离效果较好。

2.4 MT 中 Cu²⁺ 的脱除效果

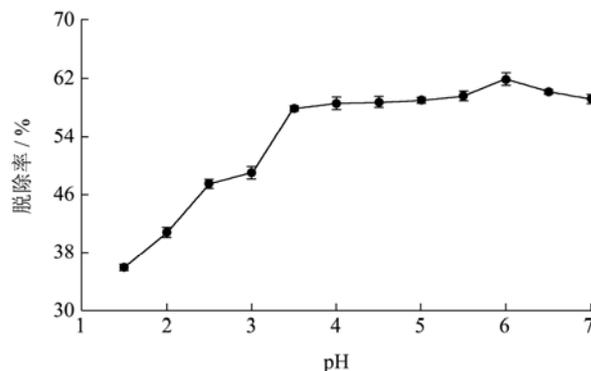


图4 不同 pH 对 MT 中结合的 Cu²⁺ 金属脱除率影响

Fig.4 Effect of different pH on the removal rate of Cu²⁺ combined by MT

EDTA 对多数重金属均具有良好螯合效果,常用作消除微量重金属导致的酶催化反应中的抑制作用。不同 pH 值的 EDTA 溶液,对 MT (DEAE-FF 柱层析纯化后) 中结合的 Cu²⁺ 脱除效果如图 4 所示。在酸性条件下,MT 中结合的 Cu²⁺ 易发生解离,部分 Cu²⁺ 能有效被 EDTA 螯合,达到脱除 Cu²⁺ 的目的^[13]。在 pH 在 1.5~4.0 范围内,MT 中结合的 Cu²⁺ 脱除率随 pH 上升而不断提高,而后逐渐趋于平缓;EDTA 溶液在 pH=6.0 时,脱除率最高达到 61.90%。在该条件下,脱除 MT 中结合的 Cu²⁺、SephadexG-25 脱盐,冷冻干燥后获得 MT 纯化样品。

在 MT 纯化样品溶液中添加一定量金属元素,评价 MT 对金属元素的再吸附性能。结果发现,MT 对 Pb²⁺、Cr⁶⁺、Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 均具有一定再吸附能力,其中对 Cr⁶⁺ 吸附率为 75.70%;其次为 Pb²⁺,吸附率为 62.10%;对 Cd²⁺ 的吸附率为 22.60%;对 Cu²⁺ 的吸附率仅为 12.40%,可能是因为原有 MT 分子中 Cu²⁺ 的结合位点已接近饱和。综上,MT 对金属元素的再吸附能力依次为 Cr⁶⁺>Pb²⁺>Cd²⁺>Cu²⁺。

2.5 纯化 MT 对自由基的清除作用

MT 是一种有效的自由基捕获剂,其在清除自由基时会释放出微量金属元素,促使免疫功能和细胞代谢,从而提高机体抗炎及自我保护修复的能力。MT 对 OH·、O₂⁻ 和 DPPH 自由基的清除率,见图 5。

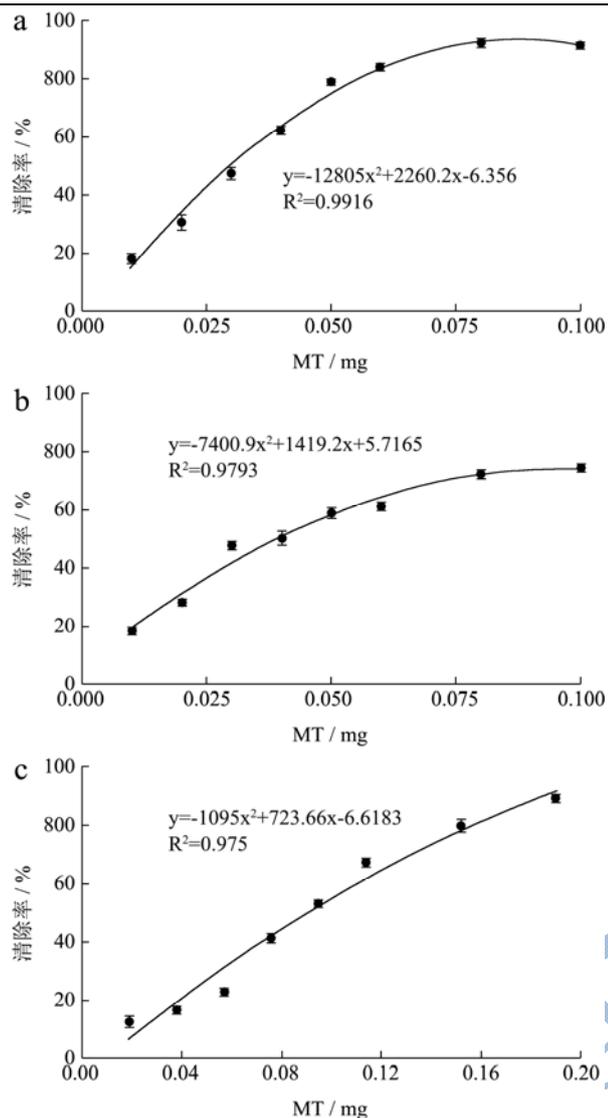


图5 MT对OH·(a)、O₂⁻·(b)和DPPH(c)自由基的清除率

Fig.5 The removal rate of OH· (a), O₂⁻· (b), and DPPH (c) radicals by MT

由结果可知, MT对H₂O₂-Fe²⁺体系(0.25 mL、0.20 mmol/L 结晶紫, 0.5 mL、1.00 mmol/L FeSO₄, 0.25 mL、0.02% H₂O₂混合体系)产生OH·自由基50%清除率量为0.03 mg; 对邻苯三酚溶液(7.5 μL、45 mmol/L)产生O₂⁻·自由基50%清除率量为0.04 mg; 对DPPH(4 mL、50 mg/L)自由基50%清除率量为0.09 mg。研究表明, MT具有较好的清除自由基能力, 其主要是MT分子中金属离子的动力学非指向性和巯基的亲中性, 使得MT在与亲电性物质发生反应, 尤其是与某些自由基发生反应。MT清除OH·自由基能力是SOD的10000倍, 而清除氧自由基的能力约是谷胱甘肽GSH的25倍, 在体内可以作为补体抗氧化剂^[14]。

3 结论

以CuCl₂诱导毕赤酵母发酵表达MT, 针对培养发酵液采用高温加热沉淀预处理法减少其杂蛋白含量, 再经平板膜超滤浓缩、DEAD-FF琼脂糖凝胶层析及EDTA螯合脱除Cu²⁺等纯化工艺, 分离制备了具有再吸附金属离子及较好清除自由基活性的MT制品。本实验优化了酵母源MT的纯化工艺, 但制备MT纯度仍不太高, 后续将进一步对酵母发酵MT高纯化产品开发深入研究。

参考文献

- [1] 宁凤, 傅俊江, 陈汉春. 金属硫蛋白及其生物学功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(9): 893-899
NING Feng, FU Jun-jiang, CHEN Han-chun. Metallothionein and their biological functions [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 33(9): 893-899
- [2] Krizkova S, Kepinska M, Emri G, et al. Microarray analysis of metallothioneins in human diseases-A review [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, Doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.10.004
- [3] 邹俊杰, 张宾, 孙继鹏, 等. 一株高产金属硫蛋白枯草芽孢杆菌的诱导发酵条件优化[J]. 食品工业科技, 2017, 17: 130-134, 229
ZOU Jun-jie, ZHANG Bin, SUN Ji-peng, et al. Optimization of induced fermentation conditions for a high-yielding *Bacillus subtilis* of metallothionein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 17: 130-134, 229
- [4] 李靖元. 假丝酵母菌筛选及金属硫蛋白制备工艺研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2013
LI Jing-yuan. Study on the screening of *Candida strains* and preparation of metallothionein [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2013
- [5] 苗兰兰, 张东杰, 王颖. 复合诱变高产金属硫蛋白酵母菌株的筛选[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 261-264
MIAO Lan-lan, ZHANG Dong-jie, WANG Ying. Screening *saccharomyces cerevisiae* of high-yield metallothionein by compound mutation [J]. Food Science, 2013, 34(19): 261-264
- [6] Liu S, Liu G, Yi Y. Novel vanadyl complexes of alginate saccharides: synthesis, characterization, and biological activities [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 121(121): 86-91
- [7] Chai H J, Chan Y L, Li T L, et al. Composition characterization of Myctophids (*Benthosema pterotum*): Antioxidation and safety evaluations for Myctophids protein hydrolysates [J]. Food Research International, 2012, 46(1):

- 118-126
- [8] Tai Z, Cai L, Dai L, et al. Antioxidant activity and chemical constituents of edible flower of *Sophora viciifolia* [J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1648-1654
- [9] Ndayibagira A, Sunahara G I, Robidoux P Y. Rapid isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm *Eisenia andrei* [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(1): 194-201
- [10] 房传栋,张宾,徐君辉,等.紫贻贝金属硫蛋白对小鼠体内镉富集的拮抗及排出功效研究[J].食品安全质量检测学报, 2017,8(7):2723-2728
FANG Chuan-dong, ZHANG Bin, XU Jun-hui, et al. Antagonism and elimination effects of metallothionein from *Mytilus edulis* on accumulation of cadmium in mice [J]. Food Safety and Quality Detection Technology, 2017, 8(7): 2723-2728
- [11] Thirumoorthy N, Shyam S A, Manisenthil Kumar K T, et al. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology [J]. World Journal of Surgical Oncology, 2011, 9: 54
- [12] Liu G D, Sheng Z, Hou C C, et al. Molecular cloning, characterization and expression analysis of metallothionein in the liver of the teleost *Acrossocheilus fasciatus* exposed to cadmium chloride [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2017, 53: 1-9
- [13] 魏欣,茹炳根.二价铅离子与金属硫蛋白相互作用的研究[J].中国生物化学与分子生物学报,1999,15(2):289-295
WEI Xin, RU Bing-gen. The interaction of two divalent lead with metallothionein [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 15(2): 289-295
- [14] 励建荣,宣伟,李学鹏,等.金属硫蛋白的研究进展[J].食品科学,2010,31(17):392-396
LI Jian-rong, XUAN Wei, LI Xue-peng, et al. Research progress in metallothionein [J]. Food Science, 2010, 31(17): 392-396