

九州虫草 Zn^{2+} 胁迫下金属硫蛋白的诱导产生规律及性质研究

张 琪¹, 程显好^{2*}, 郭文娟¹, 刘凤红², 王朝霞²

1. 天津工业大学, 天津 300000

2. 鲁东大学菌物科学与技术研究院, 山东 烟台 264100

摘 要: 目的 探讨 Zn^{2+} 胁迫下九州虫草 *Cordyceps kyusyuensis* 金属硫蛋白 (MT) 的产生及性质。方法 以培养基中添加 ZnSO_4 的方式, 研究九州虫草在 Zn^{2+} 胁迫下 MT 的产生规律。通过超声波细胞破碎、提取和凝胶柱色谱法对 MT 进行分离纯化, 利用考马斯亮蓝法进行纯度鉴定。用电喷雾质谱法测定 MT 的相对分子质量, 以 Ellman's 方法测定巯基的量, 以原子火焰吸收法测定 Zn 的量, 以 Ag 饱和分析法结合原子吸收光谱 (AAS) 测定 MT 的量, 用氨基酸自动分析仪对 Zn-MT 进行氨基酸组成分析。通过对羟基自由基 ($\text{HO}\cdot$)、DPPH 自由基 ($\text{DPPH}\cdot$) 和超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 的清除率实验探讨九州虫草 MT 的抗氧化活性。结果 菌丝体中 Zn 和 MT 的量随着培养基中 Zn^{2+} 质量浓度 (0~15 g/L) 的增加而增加。在 10 L 发酵罐培养时, 培养基中 Zn^{2+} 质量浓度为 15 g/L, 培养时间为 56 h, 金属硫蛋白的量为 14.335 mg/g 菌丝体 (湿质量)。对九州虫草的菌体蛋白通过 2 次凝胶柱色谱, 冷冻干燥得到九州虫草 MT, 电喷雾质谱法测得其相对分子质量为 6 750, 每分子 Zn-MT 氨基酸总量为 56 个, 含有 20 个半胱氨酸, 含极少量的芳香族氨基酸, 可结合 6 个 Zn 原子。九州虫草 Zn-MT 对于 $\text{HO}\cdot$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 有较好的清除作用, 清除效果依次为 $\text{O}_2^{\cdot-} > \text{DPPH}\cdot > \text{HO}\cdot$, 其半数清除率质量浓度 (IC_{50}) 分别为 71.49、80.58、100.65 mg/L。结论 通过紫外扫描图谱分析、蛋白柱色谱图谱分析、九州虫草 Zn-MT 理化性质以及抗氧化活性的测定, 可以判断其与标准的兔肝 MT 非常相似, 进一步可以确定通过九州虫草菌丝体液态发酵法可生产 MT, 以期为工业生产提供可靠的理论依据。

关键词: 九州虫草; 金属硫蛋白; 分离纯化; 氨基酸组成; 抗氧化活性

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)21-2997-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.011

Production and properties of metallothionein in *Cordyceps kyusyuensis* under Zn^{2+} stress

ZHANG Qi¹, CHENG Xian-hao², GUO Wen-juan¹, LIU Feng-hong², WANG Zhao-xia²

1. Tianjin Polytechnic University, Tianjin 300000, China

2. Institute of Mycological Science and Technology, Ludong University, Yantai 264100, China

Abstract: **Objective** To explore the production and properties of metallothionein (MT) in *Cordyceps kyusyuensis* under the zinc ion (Zn^{2+}) stress. **Methods** By adding ZnSO_4 to the culture, the production regularity of MT in *C. kyusyuensis* under Zn^{2+} stress was explored. Ultrasonic cell disruption, crude extraction, and gel column chromatography were employed to isolate and purify the MT. The methods of Coomassie brilliant blue, electron spray mass spectrometry (ESMS), Ellman's reagent colorimetry, atomic flame absorption spectrometry, silver saturation method with atomic absorption spectrometry analysis, and amino acid analyzer were used to determine the purity, molecular weight, sulfhydryl content, zinc content, MT content, and amino acid composition, respectively. In addition, the anti-oxidative activity was identified by scavenging capacity of hydroxyl radicals ($\text{HO}\cdot$), DPPH radicals ($\text{DPPH}\cdot$), and superoxide anion radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$). **Results** The contents of Zn and MT in mycelia increased strikingly with the increase of Zn^{2+} concentration (0–15 g/L) in the culture medium. In 10 L fermenter, MT achieved the maximum yield up to 14.335 mg/g mycelium (wet weight) with Zn concentration of 15 g/L in 56 h, and the biomass reached 16.921 g/L. The *C. kyusyuensis* Zn-MT was obtained with Sephadex G-50 and Sephadex G-25 gel filtration, and dried by vacuum freeze-drying. The molecular weight of the protein was 6 750, one molecule Zn-MT binded six zinc atoms and contained 56 molecules of amino acid, which contained 20 molecules of cysteine

收稿日期: 2013-06-29

基金项目: 山东省自然科学基金联合专项资助 (ZR2010CL005); 烟台市科技发展计划项目资助 (2011069)

作者简介: 张 琪 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。Tel: 18353512283 E-mail: weifangzhangqi@163.com

*通信作者 程显好 Tel: 13695359213 E-mail: chengxianhao@sohu.com

and one molecule of histidine. The eliminating action of *C. kyusyuensis* Zn-MT for HO•, DPPH•, and $O_2^{\cdot-}$ was better than that of glutathione, and the eliminating action was different in $O_2^{\cdot-} > DPPH\bullet > HO\bullet$. The concentration of half clearance rate was 71.49, 80.58, and 100.65 mg/L. **Conclusion** According to ultraviolet scan pattern analysis, protein column chromatogram analysis, physicochemical properties, and anti-oxidative activity of *C. kyusyuensis* Zn-MT, it is similar with the characteristics of standard animal MT, and a certain concentration of zinc sulfate liquid fermentation of *C. kyusyuensis* could induce the synthesis of Zn-MT, which could provide the reliable theoretical basis for the industrial production.

Key words: *Cordyceps kyusyuensis* (Fr.) Link; metallothionein; separation and purification; amino acid composition; anti-oxidative activity

金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 是一类广泛存在于生物体内的低相对分子质量、高巯基含量、能大量结合金属离子的蛋白质。自从 1957 年美国生物学家 Margoshes 和 Vallee^[1]首次从马肾中分离出镉结合的 MT (Cd-MT), 1975 年 Prinz 和 Weser^[2]从酿酒酵母中分离出铜结合的 MT (Cu-MT) 以来, 目前几乎能从所有的哺乳动物、两栖类、鱼类、某些植物和原核、真核微生物体中分离得到 MT^[3-5]。真核微生物中分离出的 MT 在氨基酸组成、半胱氨酸 (Cys) 的量, 结合金属的数量及其蛋白质的结构域上与哺乳动物 MT 有差别, 但其基本结构、性质、功能类似^[6]。此类 MT 的特征主要有: 低相对分子质量 (2 000~10 000), 富含 Cys (约占 6.8%~44.0%), 没有或含极微量的芳香族氨基酸, 高金属的量 (每分子 MT 约结合 4~13 个金属原子)。研究表明, MT 是一种体内清除自由基最强的蛋白质, 其清除能力强于谷胱甘肽 (GSH)^[7]。由于 MT 具有重要的生物学功能和良好的应用前景, 其已成为世界各国科学家竞相研究的热点。

本实验室前期工作中发现, 几种虫草属真菌对于 Zn^{2+} 、Mn 离子具有较高耐受与富集特性^[8-9], 进一步研究发现, 九州虫草可以由富集到体内的金属离子诱导而产生大量 MT。本实验仅就九州虫草在 Zn^{2+} 胁迫下 MT 的诱导产生规律、分离纯化、性质鉴定及抗氧化活性进行了探讨, 以期九州虫草 MT 开发利用提供理论依据。

1 仪器与材料

LDZX—50KB 型立式压力灭菌器 (上海申安医疗器械厂), HZQ—Q 全温振荡培养箱 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司), AA800 型原子吸收分光光度计 (美国 PE 公司, 附带微机和打印机), 超净工作台, KQ—100TDB 高频数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), Eppendorf 冷冻干燥离心机, LGJ—10B 型真空冷冻干燥仪 (北京四环科学仪器厂有限公司), 电喷雾质谱仪 (美国 Agilent

公司), 日立 835—50 型氨基酸自动分析仪 (日立公司)。

九州虫草 *Cordyceps kyusyuensis* CFCC89250, 购于中国林业微生物菌种保藏管理中心, 保存于试管 PDA 培养基斜面上。标准品兔肝 MT (Sigma 公司), Sephadex G-50、Sephadex G-25、1, 1-二苯基苦基苯肼 (DPPH) 均购自上海蓝季科技发展有限公司, 除标明外, 其余均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 不同 Zn^{2+} 质量浓度下诱导产生九州虫草 Zn-MT 的规律

2.1.1 培养基与试剂 试管斜面培养基: 马铃薯琼脂培养基 (PDA 培养基): 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 2%, pH 5.5~7.0; 发酵培养基: 葡萄糖 2.5%, 蛋白胨 0.6%, 酵母浸粉 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.1%, pH 5.5~7.0。

2.1.2 九州虫草液体种子的制备 将保藏的菌种接入试管斜面 PDA 培养基中, 25 °C 培养 7 d, 置于 4 °C 保存备用。将 200 mL 液体培养基装于 500 mL 锥形瓶, 于 121 °C 灭菌 30 min, 将活化好的菌种接入液体培养基中, 每瓶接 0.5 cm² 大小菌种 1 块, 25 °C, 150 r/min 于摇床中培养 3 d。

2.1.3 九州虫草菌丝体内 Zn 的定量测定 称取烘干至恒定质量的菌丝样品 0.1 g, 加入 10 mL 体积比为 4:1 的浓硝酸-高氯酸的消化液, 在沸水浴中加热至澄清, 用去离子水适度稀释后采用原子吸收分光光度计进行测定, 重复 3 次。测试条件为波长 285.2 nm, 狭缝 3 mm, 灯电流 5 mA, 灯电压 170 V, 空气流量 15 L/min, 乙炔流量 5 L/min。

2.1.4 九州虫草菌丝体内 Zn-MT 的定量测定^[10] 利用 Ag 饱和分析法结合原子吸收光谱 (AAS) 检测含 MT 的溶液中 MT 的量。基于 Ag^+ 与 MT 的高亲和力及 MT 的热稳定性, 具体方法: 称取烘干至恒定质量的菌丝样品 0.1 g, 加入 10 mL 体积比为 4:1 的浓硝酸-高氯酸的消化液, 在沸水浴中加热

至澄清,用去离子水将消化液定容至 100 mL。取 0.2 mL 消化液,加入 0.5 mL 25 $\mu\text{g/mL}$ 的 AgNO_3 溶液,待完全反应后,加入 100 μL 质量分数为 2% 的血红蛋白溶液,以结合过量的 Ag^+ ,加热使血红蛋白完全沉淀,则与 MT 结合的 Ag^+ 完全存在于上清液中,通过 AAS 测定其中 Ag^+ 的量,利用公式: $\text{MT} = (C_{\text{Ag}^+} - C_{\text{BKG}}) \times 3.55 \times V_{\text{T}} / m$ 计算出菌丝体中 MT 的量。其中 C_{Ag^+} 为最终上清液中 Ag^+ 质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$), C_{BKG} 为不加样品液的空白样品最终上清液的读数 ($\mu\text{g/mL}$); V_{T} 为最终总体积 (mL); m 为得到样品液所用菌丝体的质量 (mg)。

2.1.5 ZnSO_4 诱导九州虫草 Zn -MT 生产条件的确定 液体培养基中添加 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,在 0~20 g/L 设置 Zn^{2+} 质量浓度梯度为 1 g/L,共设 20 个实验组和 1 个空白对照组,每组 5 个平行实验。在 500 mL 摇瓶中装 200 mL 液体培养基,接入 5 mL 液体种子,置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床中培养 7 d。滤过之后,将菌丝体用清水洗 3 次,分别测其菌丝体 Zn^{2+} 的量和菌丝体中 MT 的量。随着培养基中 Zn^{2+} 质量浓度的不同,二者的变化规律见图 1。九州虫草菌丝体内富集 Zn 的量与合成 Zn -MT 的量存在正相关关系。在 Zn^{2+} 质量浓度为 0~16 g/L,九州虫草菌丝体内合成 MT 的量随着富集 Zn 量的增加而增加。在 Zn^{2+} 质量浓度为 15 g/L 时,菌丝体内合成 MT 的量最大。然而在 Zn^{2+} 质量浓度为 16~20 g/L,可能是金属离子质量浓度太大,超出了生物体的抵抗能力,影响了生物体内 Zn 的运输通道或破坏了生物体的正常代谢途径,菌丝体内 Zn 的量呈降低趋势,而随之 MT 的量也呈降低趋势。由此确定 Zn^{2+} 诱导九州虫草合成 MT 的质量浓度为 15 g/L。

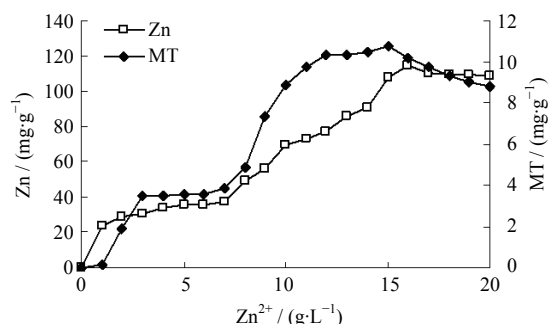


图1 培养基中不同质量浓度 Zn^{2+} 下菌丝体中 Zn 的量和 MT 的量

Fig. 1 Contents of Zn and MT in mycelia with different Zn^{2+} concentration

2.2 10 L 发酵罐放大培养九州虫草菌丝体

2.2.1 九州虫草菌丝体的发酵罐放大培养 根据“2.1”项中单因素试验设计方法对 ZnSO_4 诱导九州虫草 MT 生产条件的筛选,取 Zn^{2+} 质量浓度为 15 g/L。其发酵条件:装液量 6 L/10 L,接种量 6%,通气量 350 L/h,发酵搅拌转速 300 r/min,发酵温度 25 $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 6.0,发酵时间 72 h。

2.2.2 10 L 发酵罐放大培养条件下九州虫草菌丝体生物量及 MT 量的变化规律 在 10 L 发酵罐培养条件下,测定了九州虫草菌丝体生物量及 MT 随培养时间的变化规律,结果见图 2。培养至 48 h 时,菌丝体生物量达到 18.325 g/L,菌丝体内 MT 的量为 12.871 mg/g 菌丝体湿质量;而在 56 h 时生物量降低为 16.921 g/L,菌丝体内 MT 的量却提高至 14.335 mg/g 菌丝体湿质量。由此确定发酵终点为 56 h。

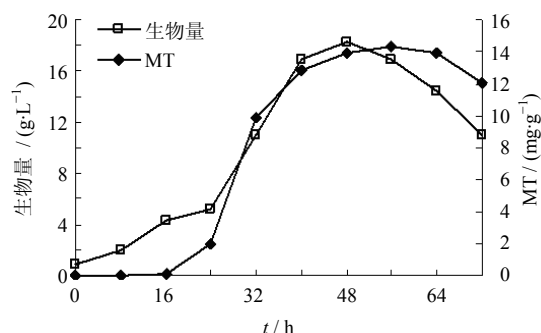


图2 发酵过程中九州虫草生物量与 MT 的量

Fig. 2 Mycelia biomass and MT contents of *C. kyusyuensis* in fermentation process

2.3 九州虫草 Zn -MT 的分离及性质鉴定

2.3.1 九州虫草 Zn -MT 的粗提取 过滤菌丝体,用无菌水洗涤 3~4 次;称取一定质量的菌丝体于烧杯中,以每克湿菌丝体加入 4 mL 1 mol/L NaOH 溶液的比例加入 NaOH 溶液,充分搅拌混匀,用 0.05 mol/L 的稀盐酸调 pH 值至 8.5。置于 100 W 超声功率下超声波提取 40 min,混匀后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 20 min。取上清液于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中热变性除杂蛋白质 10~15 min,冷却,再 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 25 min,取上清液,测量并记录其体积。

2.3.2 粗提取液的紫外吸收光谱特征图 粗提取液在 pH 值为 8.5 和 2.0 条件下,于 210~310 nm 紫外区进行连续扫描,间隔为 1 nm。最终绘制粗提取液的紫外吸收光谱特征图(图 3)。九州虫草锌结合蛋白在 210~300 nm 出现明显肩峰,该光谱特征与兔肝 MT 光谱特征相似。在 254 nm 处有 MT

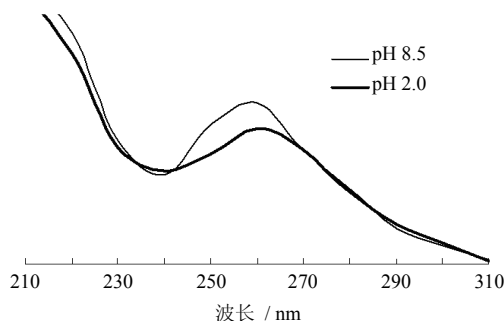


图3 Zn-MT粗提取液紫外扫描光谱图

Fig. 3 Ultraviolet absorption spectra of Zn-MT in crude extract solution

的特征吸收峰, 280 nm 处无特征吸收峰, 说明九州虫草 Zn-MT 不含芳香族氨基酸。又因为通过对比纯化的九州虫草锌结合蛋白组分与标准 Zn-MT 的反相色谱图, 发现两者的脱金属色谱图很相似。参照现有的研究报道, 又鉴于九州虫草锌结合蛋白与典型的动物 MT 的光谱特征的相似性, 基本可以断定本研究中提取的蛋白质为预期得到的九州虫草 Zn-MT。

2.3.3 九州虫草 Zn-MT 的纯化 将“2.3.1”项中的上清液上样于预先充分平衡好的 Sephadex G-50 (40 cm×5 cm) 柱进行色谱分离, 纯水作为洗脱剂进行洗脱, 体积流量 1.2 mL/min, 每 10 分钟收集 1 管。对洗脱液进行紫外 (254 nm) 吸光度值 (A_{254}) 和 Zn 信号检测, 结果见图 4。第 10 管处有 1 个较强的紫外吸收峰, 对应的 Zn 信号偏低, 由其外观呈现黄色, 是 1 个未知成分; 而第 40 管处又出现 1 个强的紫外吸收峰, 且其对应的 Zn 信号很强, 该峰的洗脱位置与标准品兔肝 MT 的位置一致, 为 Zn-MT 组分。收集该洗脱峰的洗脱液, 适当浓缩后真空冷冻干燥得到 MT 粗品。用超纯水溶解冻干粉, 再用脱盐柱 Sephadex G-25 (50 cm×2.5 cm), 以超纯水为洗脱剂, 体积流量 0.6 mL/min, 每 10 分钟收集 1 管, 进行脱盐再纯化, 收集 Zn 结合的 MT 组分, 经真空冷冻干燥得到九州虫草 Zn-MT 纯品。用考马斯亮蓝法 (Bradford 法) 测定样品中蛋白质的纯度^[11]。

2.4 九州虫草 Zn-MT 的性质鉴定

2.4.1 基本性质测定 用原子火焰吸收法测定样品中 Zn 的量^[12]; 用 Ellman's 方法测定巯基的量^[13]。结果表明, 纯化的 Zn-MT 27.01 mg 中含 1.6 mg Zn, 巯基的量为 3.054 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白质, 即每毫克纯化的 Zn-MT 中含 59.24 μg Zn 和 3.544 μmol 的巯基,

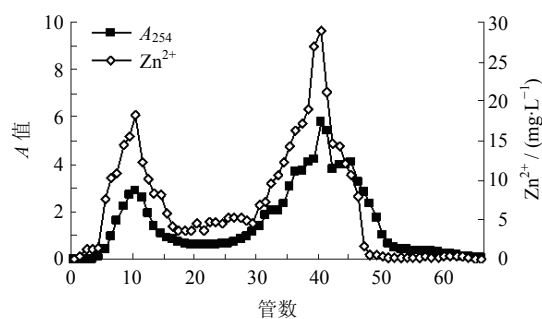


图4 九州虫草粗提取液经 Sephadex G-50 凝胶色谱分离的色谱图

Fig. 4 Sephadex G-50 gel filtration column separation of crude extract from *C. kyuensis*

由此推算出每分子 Zn-MT 含有 6 个 Zn 原子和 20 个巯基。

样品相对分子质量测定^[14] 将 MT 干粉溶于含 0.1% 乙酸的甲酸溶剂中, 配成 2 mg/L 的样品液, 用电喷雾质谱法 (ES-MS) 测定相对分子质量, 其检测限可低于 1 fmol。采用电喷雾离子化正离子方式 (ESI^+), 离子源雾化室参数: 毛细管电压为 3.5 kV, 离子源温度 90 $^{\circ}\text{C}$, 锥电压 10 V, 干燥气 (氮气) 温度 130 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气体积流量 400 L/h, 雾化气 (氮气) 压力为 0.25 MPa, 体积流量 70 L/h, 样品液由仪器内置的蠕动泵进行注射, 体积流量为 10~20 L/min。采集质量范围 m/z 0~16 000, 由仪器软件调节仪器参数并处理数据。电喷雾质谱法测定九州虫草 MT 相对分子质量结果见图 5。用电喷雾质谱仪软件计算得其相对分子质量为 6 750, 比兔肝 Zn-MT 的相对分子质量略小。

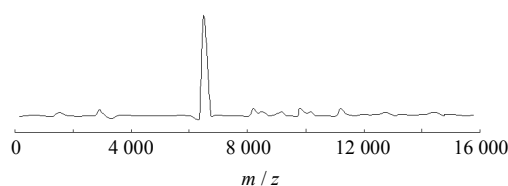


图5 九州虫草 Zn-MT 电喷雾质谱图

Fig. 5 ESMS spectrum of Zn-MT in *C. kyuensis*

2.4.2 氨基酸组成测定 日立 835—50 型氨基酸自动分析仪; 分离柱: 150 mm×2.6 mm (填充日立 2619 型阳离子交换树脂); 脱氨柱 (50 mm×4 mm, 填充树脂为日立 2650); 柱温 53 $^{\circ}\text{C}$; N_2 压力 28 kPa; 茚三酮体积流量 0.3 mL/min, 柱压 0.9~1.0 MPa; 缓冲液: 柠檬酸钠、柠檬酸、氯化钠配成 pH 3.5 的溶液, 缓冲液体积流量 0.4 mL/min, 柱压 8.82~9.8 MPa; 水解氨基酸标准品 (含 2.5 mmol/L 18 种标准

氨基酸, Sigma 公司); 检测波长 440 nm 和 570 nm; 进样量 50 μ L; 分析时间 70 min。

准确称量 MT 冻干粉 5 mg, 加 6 mL 浓度为 6 mol/L HCl 溶液, 于 110 $^{\circ}$ C 真空状态下水解 24 h, 启封后加 1 mL 浓度为 0.02 mol/L NaOH 溶液静置 4 h, 用 0.1 mol/L 的 HCl 溶液中和后用 0.02 mol/L HCl 溶液稀释于 250 mL 量瓶中, 上机分析氨基酸。再取 5 mg 样品用过甲酸氧化法处理样品后上机分析 Cys 的量^[15]。

由表 1 氨基酸组成测定结果显示, 九州虫草 Zn-MT 总数趋近于 56 个氨基酸。其中, 疏水性氨基酸, 如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸共有 11 个, 占 19.6%; Cys 20 个, 占 35.7%, Cys 数目与“2.3.3”项中巯基数目相符; 还含有 1 个组氨酸, 占 1.8%。而典型的哺乳动物 MT (以小鼠肝脏 MT-II 为例)^[16], 每分子含有 18 个 Cys, 并可结合 7 个 Zn 原子, 其中 Cys 占 28%, 疏水氨基酸占 22.7%, 不含任何芳香族氨基酸或组氨酸。对比说明本研究中的九州虫草 MT 与典型的哺乳动物 MT (以小鼠肝脏 MT-II 为例) 相类似。另外, 从九州虫草中提取的这类 MT 疏水性弱于动物 MT,

表 1 九州虫草 Zn-MT 氨基酸成分
Table 1 Amino acid composition of Zn-MT
from *C. kyusyuensis*

氨基酸	质量分数 / %	残基数	邻近整数
Cys	34.700 1	20.1	20
天冬氨酸	9.681 8	5.1	5
苏氨酸	1.492 1	0.9	1
丝氨酸	0	0	0
谷氨酸	17.240 0	9.2	9
脯氨酸	3.744 0	2.3	2
甘氨酸	5.364 8	4.9	5
丙氨酸	0.234 9	0.2	0
缬氨酸	8.177 1	4.7	5
甲硫氨酸	0.236 2	0	0
异亮氨酸	4.255 6	2.8	3
亮氨酸	2.441 6	1.2	1
苯丙氨酸	0.091 7	0	0
组氨酸	2.599 6	1.2	1
赖氨酸	4.226 5	2	2
精氨酸	4.949 7	2.2	2
酪氨酸	0	0	0
总量	99.435 7	56.4	56

因此在色谱过程中不易聚合变性, 提高了蛋白质纯化的产率, 利于九州虫草 MT 的工业化大规模生产。

2.5 九州虫草 Zn-MT 的抗氧化实验

2.5.1 九州虫草 Zn-MT 对羟基自由基($\cdot$ OH)的清除作用 $\cdot$ OH 具有极高的氧化电位, 是自然界中仅次于氟的氧化剂, 是目前所知活性氧自由基中对生物体毒性最强、危害最大的一种自由基。大量研究证明, MT 和 GSH 对 $\cdot$ OH 的清除能力很强^[7]。以 GSH 清除 $\cdot$ OH 的效果作为样品清除 $\cdot$ OH 能力的比较, 以一定质量浓度的 Zn^{2+} 溶液为对照。按文献方法^[17]测定。由测定结果(图 6)可知, 清除 $\cdot$ OH 的能力随着 Zn-MT 质量浓度的增加而呈增长趋势, 且其半数清除率质量浓度(IC_{50})为 100.65 mg/L, GSH 的 IC_{50} 为 61.85 mg/L, 且 Zn^{2+} 对 $\cdot$ OH 几乎没有清除作用。九州虫草 Zn-MT 清除 $\cdot$ OH 的能力弱于 GSH。

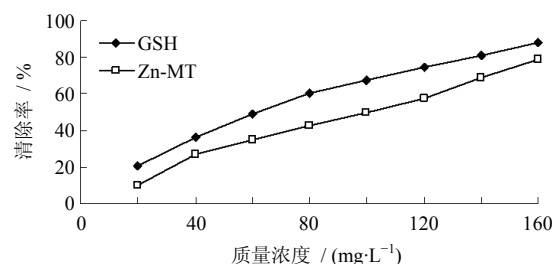


图 6 九州虫草 Zn-MT 清除 $\cdot$ OH 的能力

Fig. 6 Hydroxyl radical eliminating ability
of Zn-MT in *C. kyusyuensis*

2.5.2 九州虫草 Zn-MT 对 DPPH 自由基(DPPH $\cdot$)的清除作用 DPPH $\cdot$ 是一种紫黑色的稳定的醇溶性自由基, 于 517 nm 波长处有强吸收。在其乙醇溶液中加入自由基清除剂时溶液颜色由紫色向黄色变化, 且颜色变化程度与自由基清除程度呈线性关系。通过在 517 nm 处的 A 值来反应自由基被清除的程度, 清除自由基的能力越强, 其抗氧化活性越高^[18]。九州虫草 Zn-MT 清除 DPPH $\cdot$ 的能力与 GSH 作比较, 以一定质量浓度的 Zn^{2+} 溶液作为对照。按文献方法^[19-21]测定, 结果见图 7。对 DPPH $\cdot$ 的清除能力随着 MT 质量浓度的增加而增加。且九州虫草 Zn-MT 和 GSH 的 IC_{50} 分别为 80.58 mg/L 和 90.75 mg/L, 而 Zn^{2+} 对 DPPH $\cdot$ 的清除率几乎为 0。实验结果表明, 按半数清除率质量浓度计算, 得九州虫草 Zn-MT 清除 DPPH $\cdot$ 的能力是 GSH 的 1.1 倍。

2.5.3 九州虫草 Zn-MT 对超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的清除作用 $O_2^{\cdot-}$ 是机体内生命代谢产生的寿命很长的自由基, 具有很强的氧化性。本实验是利用邻

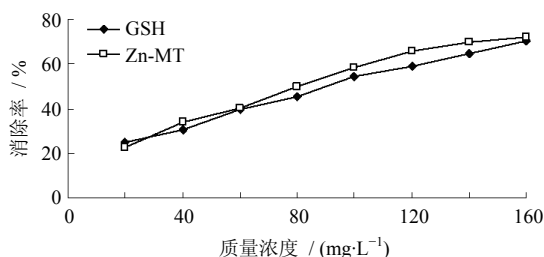
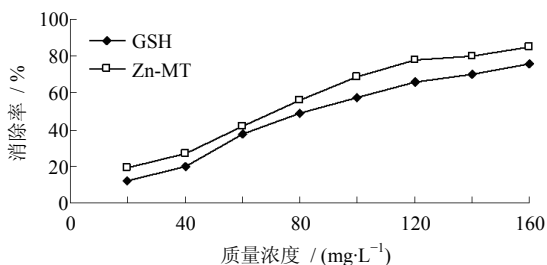


图7 九州虫草 Zn-MT 清除 DPPH·的能力

Fig. 7 DPPH radical eliminating ability of Zn-MT in *C. kyusyuensis*

苯三酚在碱性环境下发生自氧化反应测定抗氧化剂对其产生的 $O_2^{\cdot-}$ 的清除作用。以 GSH 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力作为比较实验,以含 Zn^{2+} 的溶液作为对照实验。按文献方法^[22]测定,结果见图 8。随着九州虫草 Zn-MT 质量浓度的增加,对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力增强。其中九州虫草 Zn-MT 和 GSH 的 IC_{50} 分别为 71.49 mg/L 和 82.44 mg/L, Zn^{2+} 对 $O_2^{\cdot-}$ 无清除作用。由此得知样品对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力是 GSH 的 1.2 倍,稍强于 GSH。

图8 九州虫草 Zn-MT 清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力Fig. 8 Superoxide anion radical eliminating ability of Zn-MT in *C. kyusyuensis*

综上所述,九州虫草 Zn-MT 对于 $HO\cdot$ 、 $DPPH\cdot$ 、 $O_2^{\cdot-}$ 都有较好的清除作用,清除效果依次为 $O_2^{\cdot-} > DPPH\cdot > HO\cdot$ 。 IC_{50} 分别为 71.49、80.58、100.65 mg/L,九州虫草 Zn-MT 抗氧化能力稍强于 GSH。

3 讨论

目前商品化的 MT 大多是从兔肝中提取分离的,其技术要求高、生产成本高等缺点造成 MT 非常昂贵。因此,寻求来源丰富、开发廉价的材料成为降低 MT 生产成本的重要途径。真核微生物的 MT 相对分子质量范围较大,为 2 000~10 000,氨基酸组成较一般蛋白质差异较明显,不含或含极微量的苯丙氨酸、色氨酸等芳香族氨基酸和组氨酸,且具有较强的抗氧化活性。本研究中所得到的九州虫草 MT 的相对分子质量、Cys 的量、结合金属数

量等均在符合这些基本的真核微生物 MT 特征。九州虫草菌丝体在金属离子胁迫下会合成 MT,且其诱导合成 MT 的条件不严苛、设备简单、成本低、生产周期短,MT 产量可观。本研究不仅发现了这种能诱导合成 MT 的虫草材料,而且提供了一种简单易行的提纯工艺,这对工业生产很有意义。

参考文献

- [1] Margoshes M, Vallee B L. Cadmium-binding protein from equine kidney cortex [J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 79(17): 4813-4814.
- [2] 林稚兰,常立梅. 真核微生物的类金属硫蛋白 [J]. 生物工程进展, 1996, 16(3): 33-43.
- [3] Vallee B L. Introduction on Metallothionein [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 205(1): 3-7.
- [4] Tsunoo H, Kino K, Nakajima H, et al. Mouse liver metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition, and metal content [J]. *J Bio Chem*, 1978, 253(12): 4172-4174.
- [5] Kagi J H R. Overview of metallothionein [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 205(1): 613-626.
- [6] Kojima Y. Definitions and nomenclature of metallothionein [J]. *Methods Enzymol*, 1991, 205(1): 8-10.
- [7] Thonalley P, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress kinetics and mechanisms of reaction with superoxide and hydroxyl radicals [J]. *Bioch Biophys Acta*, 1985, 827(1): 36-44.
- [8] 程显好,盖宇鹏,孙慧涌,等. 蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 对锌的耐性与富集特征 [J]. 生态学报, 2010, 30(6): 1449-1455.
- [9] 罗毅,程显好,张聪聪,等. 九州虫草菌丝体对 Mn 的耐性及富集 [J]. 生态学报, 2012, 32(2): 499-507.
- [10] 张保林,盛湘蓉,刘兴军,等. 金属硫蛋白测定方法—银饱和和分析法 [J]. 药物生物技术, 1996, 3(1): 31-33.
- [11] 张志涛,刘金生,许强,等. Bradford 法测定牛奶中蛋白质含量 [J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 1003-5788.
- [12] 张丰德,樊廷玉. 现代生物学技术 [M]. 天津: 南开大学出版社, 1994.
- [13] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. *J Food Sci*, 1974, 39(1): 49-51.
- [14] 孔毅,吴梧桐,吴如金. 蛋白质分子量测定方法比较研究 [J]. 分析仪器, 2003, 2(1): 44-46.
- [15] 贾桂兰,王芝. 盐酸水解液过甲酸氧化法测定胱氨酸效果的试验报告 [J]. 养殖技术顾问, 1990, 2(4): 15-18.

- [16] 茹炳根, 潘爱华, 王正新, 等. 小鼠肝脏金属硫蛋白 Metallothioneins 的分离纯化与鉴定 [J]. 生物化学杂志, 1991, 7(8): 285-290.
- [17] 王 萍, 葛丽花. 阿魏酸低聚糖的体外抗氧化性质的研究 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(3): 8-11.
- [18] 许申鸿, 杭 瑚. 用 DPPH•分析法研究野生植物的抗氧化活性性 [J]. 青岛大学学报: 自然科学版, 1999, 12(3): 75-78.
- [19] Zhu L J, Chen J, Tang X Y, *et al.* Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysate [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(8): 2714-2721.
- [20] Wu H C, Chen H N, Shiau C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. *Food Res Int*, 2003, 36(9/10): 949-957.
- [21] Sharma O P, Bhat T K. DPPH antioxidant assay revisited [J]. *Food Chem*, 2009, 113(4): 1202-1205.
- [22] 程玉红, 李志荣, 付 琦. 银杏叶提取物抗超氧自由基活性研究 [J]. 安阳师范学院学报, 2007, 8(2): 80-82.