

虾夷扇贝内脏源金属硫蛋白的提取工艺优化

孟春英^{1,2},李婷婷³,黄丽英¹,李 乐⁴,陈 思^{1,2},许 丹^{1,2},张小军^{1,2,*}

(1.浙江省海洋水产研究所,浙江舟山 316021;

2.浙江省海水增殖重点实验室,浙江舟山 316021;

3.浙江海洋大学,浙江舟山 316021;

4.中国水产科学研究院,北京 100141)

摘 要:本文主要探究虾夷扇贝内脏中金属硫蛋白的提取方法。以提取液中金属硫蛋白含量为评价指标,用单因素和响应面试验优化提取剂浓度,提取剂 pH 及加热温度。粗提物经分子筛预装柱分离纯化。结果发现,虾夷扇贝内脏中金属硫蛋白最佳提取条件为:Tris-HCl 浓度 0.01 mol/L,Tris-HCl pH 为 8.23,加热温度为 70 ℃。在此条件下实际提取液中 MT 含量为 0.115 mg/g。分子筛柱层析一步纯化后获得虾夷扇贝内脏源金属硫蛋白 MT-I 和 MT-II 2 种异构体的混合物,纯度为 81%。本研究获得的提取工艺可得到较高纯度的虾夷扇贝内脏源金属硫蛋白。

关键词:金属硫蛋白,虾夷扇贝,响应面,分子筛柱层析,提取

Optimization of Extraction Technology of Visceral Metallothionein from *Patinopecten yessoensis*

MENG Chun-ying^{1,2}, LI Ting-ting³, HUANG Li-ying¹, LI Le⁴, CHEN Si^{1,2}, XU Dan^{1,2}, ZHANG Xiao-jun^{1,2,*}

(1. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China;

2. Key Laboratory of Mariculture and Enhancement of Zhejiang Province, Zhoushan 316021, China;

3. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China;

4. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China)

Abstract: This paper mainly discussed the extraction of metallothionein from the viscera of *Patinopecten yessoensis*. Based on the content of metallothionein in the extract, the concentration of extracting agent, pH and heating temperature were optimized by single factor experiment and response surface experiment. The molecular sieve pre-packed column was used to separated the crude extra-ction. The results showed that the optimum extraction conditions of metallothi-onein in the viscera of *Patinopecten yessoensis* were as follows: the concentrate-ion of extractant was 0.01 mol/L, the pH of extractant was 8.23, and the heating temperature was 70 ℃. Under these conditions, the content of MT ext-racted was 0.115 mg/g. The mixture of MT-I and MT-II two isomers were purified by molecular sieve column chromatography. The purity of the MT-I and MT-II mixture were 81%. The extraction technology obtained in this study could obtain high purity of visceral metallothionein from *Patinopecten yessoensis*.

Key words: metallothionein; *Patinopecten yessoensis*; response surface methodolody; molec-ular sieve column chromatography; extraction

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2019)05-0176-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.05.029

引文格式: 孟春英, 李婷婷, 黄丽英, 等. 虾夷扇贝内脏源金属硫蛋白的提取工艺优化[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 176-181.

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类广泛存在于生物中的低分子质量(6~7 kDa)、高金属含量、无芳香族氨基酸、富含半胱氨酸(20%~30%)的功能

独特的金属结合蛋白^[1]。金属硫蛋白中大量巯基赋予了其螯合重金属离子功能,从而具备重金属解毒作用^[2],MT清除自由基的能力明显强于超氧化物歧

收稿日期: 2018-05-17

作者简介: 孟春英(1991-),女,硕士,助理工程师,研究方向:天然产物提取及活性研究, E-mail: mengchunying1@126.com。

* 通讯作者: 张小军(1981-),男,博士,高级工程师,研究方向:水产品质量安全及水产品加工, E-mail: xiaojun3627@163.com。

基金项目: 国家重点研发项目(2016YFF0202304); 2019年浙江科研院所专项(海水产品精深加工关键技术研究及应用示范)。

化酶和谷胱甘肽,还可调节生物体内微量元素浓度,对细胞代谢的调节,细胞分化和增殖的控制以及在参与紫外(UV)诱导反应中都有重要作用,在食品、医药、保健、环境、化妆品、生物工程等领域中具有重要应用价值^[3-4]。较多文献报道了从兔肝、真菌、细菌及海藻中提取金属硫蛋白^[5-7],贝类中的研究较少。目前只能购买到国内市场上的兔肝源金属硫蛋白,但其制备成本高,2018年市场价约为20万元/克。虾夷扇贝,滤食性双壳贝类,是我国重要的养殖贝类之一。体内尤其是内脏团中易于富集重金属^[8]。工业中虾夷扇贝的加工原材料多选用其闭壳肌,制成干制品或真空包装食品,内脏作为下脚料,利用率低。金属硫蛋白主要富集在金属元素含量丰富的肝脏、肾脏等内脏器官中,因此虾夷扇贝内脏可以作为提取金属硫蛋白的良好原材料,同时获得其纯品并研究应用功能特性,推进金属硫蛋白的广泛使用意义重大。

本研究从虾夷扇贝内脏中提取金属硫蛋白,采用单因素和响应面法优化其提取条件,并对得到的粗提物进一步研究,致力于得到一种高效快速的提取方法及低成本金属硫蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

虾夷扇贝 购买自大连刘清水产品旗舰店;分子筛预装柱(Enrich SEC 70)(BIO-RAD);三羟甲基氨基甲烷(Tris) 生物试剂,北京索莱宝科技有限公司;5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB) 色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司;MT-I对照品、MT-II对照品 大连联合博泰生物技术有限公司;乙二胺四乙酸二钠、盐酸、柠檬酸、磷酸氢二钠 均为优级纯,国药集团。

T18 匀浆机 ULTRA-TURRAX;JXN-30 高速冷冻离心机 贝克曼库尔特(Beckman Coulter Avanti);UV-3100BPC 紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;微波消解仪 迈尔斯特(Milestone ETHOS A);7900 电感耦合等离子体质谱仪 安捷伦科技(中国)有限公司;全自动蛋白纯化仪 美国伯乐(BIO-RAD)。

1.2 实验方法

1.2.1 原料处理方法 鲜活虾夷扇贝用过滤海水(过0.22 μm 除去杂质)冲洗后,去壳,取其内脏团匀浆(转速10000 r/min,每次3 min,重复三次),备用。

1.2.2 虾夷扇贝内脏中金属元素含量测定 取匀浆组织适量,按照现行国标方法^[9],采用微波消解-电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS),测定虾夷扇贝中Zn、Pb、Cd、Cu、As 几种元素含量。

1.2.3 虾夷扇贝内脏中金属硫蛋白提取 参阅相关文献的提取方法并稍加修改^[9-11]。取1.2.1中的匀浆组织适量,加入3倍体积(质量/体积)Tris-HCl提取剂(提取剂需提前配制,放置4℃预冷),同时加入1%三(2-羧乙基)膦(Tris-2-carboxyethyl-fosphine, TCEP)作为还原剂,加入Tris-HCl提取溶液后4℃提取约15 h,然后10000 r/min 离心20 min,收集上

清液加热至一定温度,除掉热不稳定的大分子蛋白组分,冰水浴快速冷却后4℃10000r/min 离心20 min,收集上清液,加入3倍体积-20℃乙醇,4℃沉淀约15 h,最后4℃条件下将沉淀物分离,弃去上清液后加入10 mL Tris-HCl 缓冲液,室温下溶解3~4 h,溶液4℃再次10000 r/min 离心20 min,收集上清液真空冷冻干燥后得到MT粗提物。

1.2.4 单因素实验

1.2.4.1 Tris-HCl 浓度对提取液中 MT 含量的影响 设定 Tris-HCl 的 pH 为 8.0,加热温度为 75℃,考察 Tris-HCl 浓度为 0、0.01、0.02、0.03、0.04 mol/L 时对提取液中 MT 含量的影响。

1.2.4.2 Tris-HCl pH 对提取液中 MT 含量的影响 设定 Tris-HCl 的浓度为 0.01 mol/L,加热温度为 75℃,考察 Tris-HCl 提取剂 pH 为 5、6、7、8、9 时对提取液中 MT 含量的影响。

1.2.4.3 加热温度对提取液中 MT 含量的影响 设定 Tris-HCl 的浓度为 0.01 mol/L, pH 为 8.0,考察加热温度为 40、50、60、70、80℃时对提取液中 MT 含量的影响。

1.2.5 响应面试验 在单因素实验的基础上,利用响应面法优化 MT 的提取工艺,选取 Tris-HCl 的浓度、Tris-HCl pH 和加热温度为考察因素,利用 Box-Behnken 模块设计三因素三水平试验,对提取条件进行优化,响应面设计实验因素及水平见表1。

表1 响应面设计实验因素及水平
Table 1 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A Tris-HCl 浓度(mol/L)	0.01	0.02	0.03
B Tris-HCl pH	7.40	8.25	9.10
C 加热温度(℃)	60	70	80

1.2.6 MT 含量测定 选择操作简便,快速直观的 DTNB 法测定样品中 MT 含量。参阅文献[12-14]中的方法并稍加改变。配制兔肝 MT-I 及 MT-II 混合对照品,浓度均为 1 μg/μL。在试管中分别加入 20、40、60、80、100、150 μL 的 MT 标准溶液,加入 10 μL 1.2 mol/L 盐酸溶液和 200 μL 0.1 mol/L EDTA,置于暗处反应 10 min 脱去金属,之后加入 5 mmol/L DTNB 试剂混匀 3 min,使 MT 与 DTNB 形成黄色络合物,用 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.25)稀释至 4 mL,在 412 nm 波长处测定显色产物硫代硝基苯甲酸阴离子(TNBA)的量。样品测定为加入 1 mL 样品溶液,其他试剂同上。以兔肝 MT-I 及 MT-II 混合对照品浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $y = 0.0172x - 0.0061$ ($R^2 = 0.998$),以此计算虾夷扇贝内脏源 MT 粗提物的浓度。

1.2.7 MT 分离纯化方法 选用亲水性聚甲基丙烯酸酯填料的分子筛预装柱(Enrich SEC 70),将兔肝-金属硫蛋白对照品 MT-I 和 MT-II 用超纯水溶解,配制成浓度为 1 mg/mL,然后稀释到 0.25 mg/mL,7000 r/min 离心 5 min,过 0.22 μm 滤膜,取 1 mL 样品注入样品环中,利用全自动蛋白纯化仪进行分子筛柱

层析。流动相 0.01 mol/L 的 Tris-HCl (pH8.25), 流速 0.5 mL/min。同时监测 220、250、275 nm 波长下流出液的信号值。流动相平衡 2 个柱体积后上样, 仪器连接自动收集器, 每管收集 3 mL。称取适量虾夷扇贝内脏源 MT 粗提物复溶, 7000 r/min 离心 5 min, 过 0.22 μm 滤膜后上机, 其他条件同上。以保留时间定性, 峰面积占比计算纯度。

1.3 数据处理

所有实验样品做 3 个平行, 运用 Excel 2010 版对单因素试验数据进行处理, 运用 Design Expert 8.0.1 软件对 Box-Behnken 实验进行设计和数据分析。

2 结果与分析

2.1 虾夷扇贝内脏中金属元素含量测定

根据 ICP-MS 测定的上机浓度及称样质量, 计算出各金属元素含量, 具体数值见表 2。由表 2 可知, 在虾夷扇贝内脏中, $\text{Zn} > \text{Cd} > \text{Cu} > \text{As} > \text{Pb}$ 。这一结果与文献报道结果一致^[15-16]。Zn、Cu 是生物体生长所需的微量元素, 但含量过高也会对生物体产生危害。Cd 不是虾夷扇贝生长所需元素, 但含量居第二高, 说明虾夷扇贝对 Cd 具有一定的富集作用。

表 2 虾夷扇贝内脏中元素含量

Table 2 The content of elements in *Patinopecten yessoensis* viscera

元素名称	Cu	Zn	As	Cd	Pb
浓度($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	2.65	49.8	1.86	15.7	0.18

2.2 单因素试验

2.2.1 提取剂浓度对 MT 含量的影响 Tris-HCl 缓冲液性质稳定, 与生理体液的相容性好, 且其与钙、镁离子不会形成沉淀, 而且相同 pH、相同浓度的 Tris-HCl 缓冲液的离子强度比其他盐类缓冲液的离子强度低, 这对蛋白类测定尤为重要, 因为高离子强度容易使某些蛋白质降低活性甚至完全失去活性^[17], 所以选择 Tris-HCl 作为提取剂。同时 Tris-HCl 缓冲液浓度与提取液中 MT 含量密切相关。由图 1 可知, Tris-HCl 浓度由 0 升至 0.01 mol/L 时, MT 含量有增大的趋势, 但不明显, Tris-HCl 浓度由 0.01 升至 0.03 mol/L 时, MT 含量缓慢下降, 为更精确确定 Tris-HCl 浓度, 响应面优化范围设置为 0.01 ~ 0.03 mol/L。

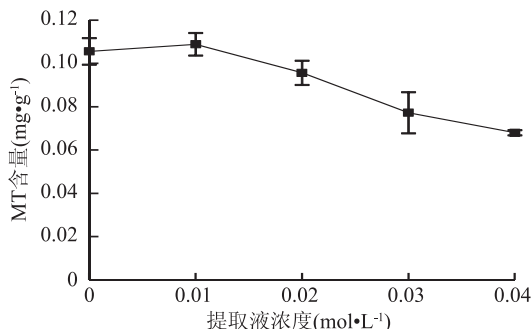


图 1 Tris-HCl 浓度对 MT 含量影响

Fig.1 The effect of concentration of extract on MT content

2.2.2 提取剂 pH 对 MT 含量的影响 Tris-HCl 缓

冲液 pH 受温度影响大, 一旦温度改变, pH 将发生变化, 从而导致蛋白质活性改变, 所以提取过程中尽量保持同一温度。同时考察 pH 对其含量的影响。由图 2 可知, 提取剂 pH 由 5 升至 7 时, MT 含量逐渐增大, 但 pH 在 7~9 时, MT 含量变化不明显。根据文献报道, 水生生物金属硫蛋白的等电点在 3.5~6.0 之间^[11], 为防止提取时金属硫蛋白产生沉淀, Tris-HCl 溶液的 pH 比等电点高一个单位左右, 进一步参照相关文献^[7], MT 提取剂多为碱性, 为进一步精确确定 pH 范围, 综合以上因素将响应面优化范围设置为 7.40~9.10。

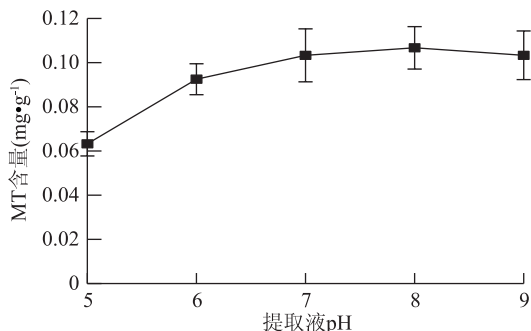


图 2 Tris-HCl pH 对 MT 含量影响

Fig.2 The effect of pH on the content of MT

2.2.3 加热温度对 MT 含量的影响 MT 本身具有一定的耐热性, 可利用这一特性除去多数热不稳定蛋白质, 进一步提高 MT 含量。由图 3 可知, 随着温度升高, MT 含量呈现先升高后下降的趋势, 加热温度在 60 $^{\circ}\text{C}$ 时 MT 含量最高。结合单因素结果及考虑 MT 的热稳定性, 同时为除去一些不耐热的杂蛋白, 因此, 响应面实验优化范围设置为 60~80 $^{\circ}\text{C}$ 。

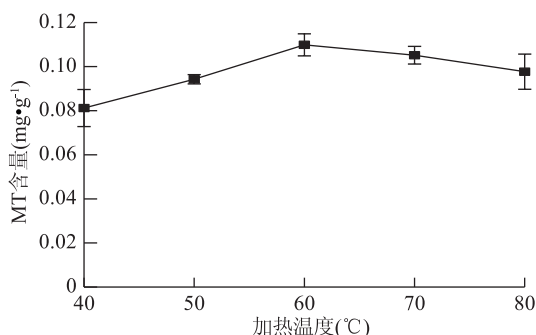


图 3 加热温度对 MT 含量的影响

Fig.3 The effect of heating temperature on the content of MT

2.4 响应面实验

2.4.1 响应面模型与分析 根据单因素实验结果设计响应面实验因素水平, 响应面实验设计方案及结果如表 3。

利用 Design Expert 8.0.1 软件, 根据表 3 中的实验数据进行二次多项式回归拟合, 得到 Tris-HCl 浓度 (A)、Tris-HCl pH (B)、加热温度 (C) 的回归方程模型, 建立 MT 含量与各因素变量的二元回归模型: $y = -4.67 + 8.64A + 0.93B + 0.03C - 0.54AB - 0.07AC + 1.41 \times 10^{-3}BC - 77.41A^2 - 0.06B^2 - 2.79 \times 10^{-4}C^2$ 。模型的方差见表 4。

表3 响应面试验设计及结果
Table 3 Response surface design and results

试验号	A	B	C	MT 含量(mg/g)
1	1	-1	0	0.052
2	1	0	1	0.086
3	0	1	1	0.092
4	0	0	0	0.112
5	-1	0	-1	0.106
6	0	0	0	0.123
7	0	0	0	0.123
8	0	-1	1	0.079
9	0	-1	-1	0.068
10	0	1	-1	0.096
11	0	0	0	0.115
12	1	0	-1	0.042
13	1	1	0	0.052
14	-1	-1	1	0.114
15	-1	1	0	0.091
16	0	0	0	0.130
17	-1	0	-1	0.102

由方差分析可知,该模型的 $F = 9.03, p = 0.0042 < 0.01$,表明实验采用的二次模型是极显著的^[18],在统计学上是有意义的。模型的失拟项的 $F = 4.64, p = 0.0860 > 0.05$,不显著,说明该模型具有很好的拟合度。因素 A Tris-HCl 缓冲液浓度的 $p = 0.0008 < 0.01$,说明提取剂浓度对提取液中 MT 含量的影响是极显著的($p < 0.01$),对于 $A^2、B^2$ 其 p 值均小于 0.01,说明 $A^2、B^2$ 对提取液中 MT 含量的影响是极显著的($p < 0.01$), C^2 的 p 值小于 0.05,说明 C^2 对提取液中 MT 含量的影响是显著的($p < 0.05$),而 B、C 一次项及 3 个因素的二次交互项的影响均不显著($p > 0.05$),结合 F 值可知,A、B 及 C 三因素对 MT 含量的影响依次为:A(提取剂浓度) > C(加热温度) > B

(提取剂 pH)。

2.4.2 响应面优化 响应面是各因素对响应值影响结果构成的三维空间曲面图,可直接反映各因素与响应值的交互作用。曲面越陡峭,对响应值的影响越大,而等高线形状可反映因素交互作用的显著程度^[19-20]。响应曲面及等高线图如图 4 所示。从图 4 可以看出响应面都为开口向下的凸形曲面,说明实验存在提取液中 MT 含量的最大值。由图 4b 等高线图可知,A 和 B 两因素的等高线成椭圆形,沿 A 轴提取剂浓度的等高线较为密集,B 轴提取剂 pH 的等高线较为稀疏,说明提取剂浓度对 MT 含量的影响比提取剂 pH 的影响大,3D 曲面图也可看出提取剂浓度的影响大于提取剂 pH;图 4d 中,B 与 C 的等高线成圆形,说明 B、C 两因素交互作用对 MT 含量的影响不显著;由图 4f 等高线图可知,A 和 C 两因素的等高线成椭圆形,沿 A 轴提取剂浓度的等高线较为密集,沿 C 轴加热温度的等高线较为稀疏,说明提取剂浓度对 MT 含量的影响比加热温度的影响大,由 3D 图可知提取剂浓度对 MT 含量的影响要高于加热温度。因此,结合等高线、3D 图及 F 值可知,三因素对 MT 含量的影响依次为:提取剂浓度 > 加热温度 > 提取剂 pH。提取剂浓度与提取剂 pH 的响应面图和提取剂浓度和加热温度的响应面图都比较陡峭,说明它们的交互作用比较明显,这与表 4 的回归分析结果一致。

2.4.3 最优条件的优化与验证 根据 Design-expert 8.0.1 软件处理实验数据所得结果,虾夷扇贝内脏中金属硫蛋白的最佳提取条件为,Tris-HCl 提取剂浓度为 0.01 mol/L,提取剂 pH 为 8.23,加热温度为 69.79 ℃,在此条件下,最佳响应结果为 0.127 mg/g。实际实验选择为 Tris-HCl 提取剂浓度为 0.01 mol/L,提取剂 pH 为 8.23,加热温度为 70 ℃,实际测得的 MT 含量为 0.115 mg/g。因此响应面法得到的预期优化条件不仅准确可靠,而且具有实际价值。

表4 二次响应面回归模型方差分析
Table 4 Variance analysis of the regression model

方差来源	平方和(10 ⁻⁴)	自由度	均方(10 ⁻⁴)	F 值	p 值	显著性
模型	110.0	9	11.86	9.03	0.0042	**
A	14.39	1	41.39	31.49	0.0008	**
B	0.389	1	0.389	0.3	0.6033	
C	2.691	1	2.691	2.05	0.1955	
AB	1.350	1	1.350	1.03	0.3455	
AC	5.856	1	5.856	4.46	0.0727	
BC	0.548	1	0.548	0.42	0.5392	
A ²	19.36	1	19.36	14.74	0.0054	**
B ²	200.9	1	20.09	15.29	0.0058	**
C ²	9.543	1	9.543	7.26	0.0309	*
残差	9.199	7	1.314			
失拟项	7.147	3	2.382	4.64	0.0860	
纯误差	2.052	4	0.513			
总离差	0.012	16				

注: * $p < 0.05$, 差异显著; ** $p < 0.01$, 差异极显著。

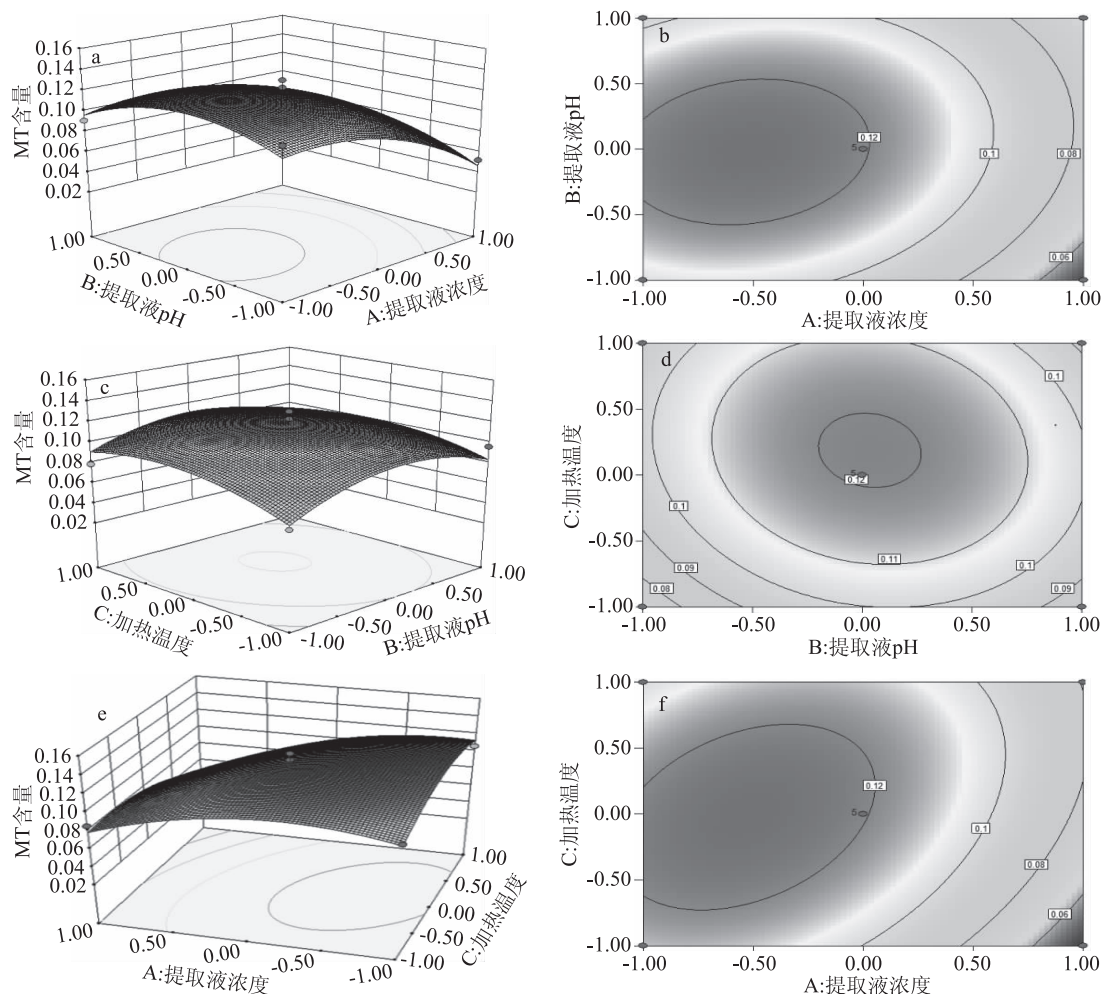


图4 各因素交互作用对 MT 含量影响 3D 图及等高线图

Fig.4 Response surface showing the effect of different factors on the total MT and contour

2.5 MT 分离纯化

将兔肝-金属硫蛋白混合对照品和虾夷扇贝内脏源粗提物经分子筛柱层析后,同时监测 3 个波长下流出液的信号值,MT-I 和 MT-II 混合对照品流出液及虾夷扇贝内脏源粗提物均在 $\lambda = 220 \text{ nm}$ 时响应值最大。对照品谱图如图 5,按保留时间先后顺序分别命名为 MF_1 、 MF_2 ,虾夷扇贝内脏源粗提物谱图如图 6 所示,按保留时间先后顺序分别命名为 Py_1 、 Py_2 。由图 5、图 6 可知,虾夷扇贝内脏源粗提物中组分的保留时间与兔肝-金属硫蛋白混合对照品的保留时间接近,且都在 $\lambda = 220 \text{ nm}$ 响应值最高,据此可推测粗提液中组分即为虾夷扇贝内脏源金属硫蛋白 2 种异构体的混合物。MT 与金属结合而产生的特征吸收峰为:Zn-MT 220 nm, Cd-MT 250 nm, Cu-MT 275 nm,据吸收峰对 MT 进行分离鉴定^[21-22]。而结合 ICP-MS 多元素测定结果,原材料中 Zn 含量明显高于 Cd、Cu 的含量,兔肝源对照品结合的也是 Zn,综合以上因素可以推测提取到的 MT 类型为 Zn-MT。由于 MT-I 和 MT-II 对照品分子量接近,所以在分子筛柱层析中较难分开。同理推测样品中为金属硫蛋白的 2 种异构体。对图谱中各个峰积分后,按峰面积占比算得虾夷扇贝内脏源粗提液中金属硫蛋白的纯度平均为 81%。

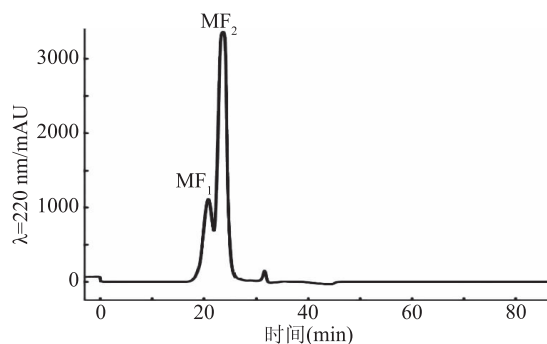


图5 兔肝金属硫蛋白混合对照品图谱

Fig.5 Chromatogram of 2 kinds of MTs in standard solution

3 讨论与结论

通过单因素及响应面法优化提取条件,获得了各因素的最佳值:Tris-HCl 提取剂浓度为 0.01 mol/L,提取剂 pH 为 8.23,加热温度为 70 $^{\circ}\text{C}$ 。在此条件下,实际实验结果为 0.115 mg/g,与模型预测的理论值基本相符。因此,本研究得到了从虾夷扇贝内脏中提取金属硫蛋白的有效方法。一步纯化后,获得 2 种异构体的金属硫蛋白混合物,其纯度约为 81%。

目前关于金属硫蛋白的研究已有多篇报道。Rubens T H 等^[23]经过一步亲和色谱柱层析技术从亚

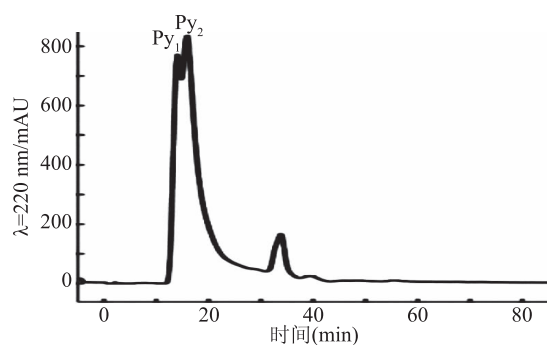


图6 样品图谱

Fig.6 Chromatogram of sample

马逊大盖巨脂鱼和酿酒酵母中获得了纯度较高的金属硫蛋白。Sandra S R 等^[24]通过 HPLC-ICP-OES 将贻贝中类金属硫蛋白分离开,色谱柱类型为阴离子交换,流动相选用 75 mmol/L Tris-HCl (pH7.4),流速 0.8 mL/min。两种类金属硫蛋白在 10 min 内可分离开。Carolina L T-D 等^[14]从罗非鱼的胆汁和肝脏中提取到了 MT,采用响应面法优化了加热温度、2 次离心时间及在提取剂中加入不同的还原剂等因素对 MT 得率的影响,采用分光光度法测定 MT 浓度,SDS-PAGE 测定相对分子质量。上述研究成果均获得了纯度较高的金属硫蛋白,本文研究结果与上述研究结果类似,获得了 2 种类型 MT 的混合物。后续还需进一步将 2 种类型 MT 分离,获得纯品后还需进行结构鉴定。虽然关于金属硫蛋白的研究成果已较多,但关于其结构鉴定方法却鲜有报道。只有掌握蛋白结构才能全面了解其性质,从而为其充分广泛的应用提供全面的理论知识。所以,对金属硫蛋白结构的鉴定意义重大,今后也将在此领域进行深入研究。

参考文献

[1] Romeroy-Isart N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins[J]. Inorganic Biochemistry, 2002, 88 (3-4): 388-396.

[2] Christopher Cobbet, Peter Goldsbrough. Phytochelatins and metal-othioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. Annu Rev Plant Biol, 2002, 53: 159-182.

[3] Sona K, Marta K, Gabriella E, et al. Microarray analysis of metallothioneins in human diseases—A review[J]. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 117: 464-473.

[4] Mie, Pedersen, Agnete L, et al. The role of metallothionein in on cogenesis and cancer prognosis[J]. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 2009, 44(1): 29-64.

[5] 党蕊叶, 齐凡, 赵淑琳, 等. 兔肝金属硫蛋白提取工艺研究[J]. 西北农业学报, 2012, 21(6): 22-25.

[6] 李明春, 李登文, 胡国武, 等. 酵母菌类金属硫蛋白的分离、纯化及性质鉴定[J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 214-221.

[7] 李景喜. 海藻中类金属硫蛋白/多肽的检测分析及对金属诱导响应研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.

[8] 王军, 翟毓秀, 宁劲松, 等. 养殖虾夷扇贝不同组织中重金属含量的分布[J]. 海洋科学, 2009, 33(8): 44-47.

[9] 卫生部. GB5009.268-2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[10] 姚冬儿, 杨慧琳, 斯兴开, 等. 基于响应面优化的褶牡蛎中金属硫蛋白提取工艺研究[J]. 现代食品科技, 2018, 34(2): 189-196, 245.

[11] 张琪, 程显好, 郭文娟, 等. 蛹虫草金属硫蛋白分离纯化及性质研究[J]. 菌物学报, 2014, 33(5): 1054-1062.

[12] 吴云辉, 王俊坤, 孙继鹏, 等. DTNB 比色法测定金属硫蛋白含量[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 196-199.

[13] 张根生, 岳晓霞, 王芮, 等. 鸡全蛋粉中金属硫蛋白检测方法的研究[J/OL]. 食品工业科技: 1-10.

[14] Caroline L T, Marcia C M R, Roberta L. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses[J]. Talanta, 2014, 120: 491-497.

[15] 庞艳华, 姜伟, 薛大方, 等. 大连沿海虾夷扇贝体内重金属含量研究与质量评价[J]. 水产科学, 2012, 31(3): 156-159.

[16] 程家丽, 张贤辉, 卓勤, 等. 我国海洋食用贝类重金属污染特征及其健康风险[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 175-181.

[17] 张红辉, 孟泽. Tris-HCl 缓冲液温度系数的测定及意义[J]. 临床检验杂志, 1993, 11(3): 122-123.

[18] 马英丽, 赵桦, 王霞, 等. 响应面法优化蜜橘果实中生物碱的超声提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 224-229.

[19] 汪泽, 崔丽虹, 唐冰, 等. 响应面法优化菠萝叶纤维多酚提取工艺[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 219-223.

[20] 何瑞, 廖钰婷, 王雪婷, 等. 复合菌发酵苦荞麸皮馒头的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2017, 38(5): 238-245.

[21] 田晓丽, 郭军华. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2005, 32(2): 119-124.

[22] Nordberg M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge[J]. Talanta, 1998, 46: 243-254.

[23] Rubens T H, Roziete M A, Bruno B H, et al. One-step purification of metallothionein extracted from two different sources[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 820: 205-210.

[24] Sandra S R, Antonio M P, Adela B B, et al. Fractionation metallothionein-like proteins in mussels with on line metal detection by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-optical emission spectrometry[J]. Talanta, 2007, 71: 1580-1586.

权威 · 核心 · 领先 · 实用 · 全面