

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2014.0553

何永吉,刘进平,李颖君,等.2014.华溪蟹功能性重组金属硫蛋白的表达及抗血清制备[J].环境科学学报,34(9):2434-2439

He Y J, Liu J P, Li Y J, et al. 2014. Expression of functional metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in *E. coli* and preparation of its antiserum[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 34(9): 2434-2439

## 华溪蟹功能性重组金属硫蛋白的表达及抗血清制备

何永吉,刘进平,李颖君,王兰\*

山西大学生命科学学院,太原 030006

收稿日期:2013-11-11 修回日期:2013-12-21 录用日期:2013-12-24

**摘要:**采用 SUMO 融合表达系统表达河南华溪蟹金属硫蛋白(Metallothionein, MT)经 Ni 离子螯合柱分离纯化后,用 SDS-PAGE、紫外光谱扫描鉴定,并对重组 MT 的金属结合及清除自由基能力进行了检测。同时,利用纯化的融合蛋白 SUMO-MT 免疫 BALB/c 小鼠制备抗血清,间接 ELISA 检测该抗血清的效价,Western blot 和免疫组化染色检测其特异性。结果表明,河南华溪蟹 MT 以可溶形式获得表达,经金属螯合层析纯化后分析仍具有金属结合特性和清除自由基的生物学功能。免疫 BALB/c 小鼠后获得特异性的抗 MT 抗血清,该抗血清具有较高的效价和良好的特异性,可识别组织 MT,用于免疫组化分析。

**关键词:**河南华溪蟹;金属硫蛋白;抗血清

文章编号:0253-2468(2014)09-2434-06 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

## Expression of functional metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in *E. coli* and preparation of its antiserum

HE Yongji, LIU Jinping, LI Yingjun, WANG Lan\*

School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006

Received 11 November 2013; received in revised form 21 December 2013; accepted 24 December 2013

**Abstract:** To produce functional metallothionein (MT) of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) and its antiserum, the gene for the crab MT was over-expressed as fusions with SUMO in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. The purified MT was identified by SDS-PAGE and UV absorbance spectrometry analysis. Chemical and functional characteristics of the recombinant MT were investigated. Subsequently, the BALB/c mice were immunized with the purified MT and the resulted antiserum was analyzed by ELISA, Western blotting and immunohistochemical staining. Results showed that the high purity MT was obtained by SUMO fusion protein system and exhibited intact metal binding ability and hydroxyl radical scavenging ability. The antiserum of high titer against MT of *S. henanense* was prepared in mice and was proven to have a good specificity by Western blotting and immunohistochemical staining. The present study could help to elucidate the mechanism of how the crab MT is effective in heavy metal detoxification and provide a scientific basis for development of an ELISA for determination of MT.

**Keywords:** *Sinopotamon henanense*; metallothionein; antiserum

### 1 引言(Introduction)

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类广泛存在于生物界、低分子量(6000~7000 Da)、富含半胱氨酸而无芳香族氨基酸和组氨酸、热稳定性良好、可被金属诱导、功能独特的非酶类蛋白质

(Hamer, 1986; Kagi et al., 1988)。自从 1957 年哈佛大学的 Margoshes 和 Vallee 在研究马肾脏蓄积镉的过程中首次发现并分离出 MT 以来(Margoshes and Vallee, 1957)在真核微生物、高等植物、原核生物中陆续发现有 MT 的存在(Carpenè et al., 2007)。研究表明,MT 主要与重金属的解毒有关,重金属进入

基金项目:国家自然科学基金(No. 30970361);高等学校博士学科点专项科研基金(No. 20111401110010);山西省自然科学基金(No. 2010011043-2)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30970361), the Doctor Subject Foundation of the Ministry of Education of China (No. 20111401110010) and the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2010011043-2)

作者简介:何永吉(1980—)男, E-mail: heyongji\_919@163.com; \* 通讯作者(责任作者), E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

Biography: HE Yongji (1980—), male, E-mail: heyongji\_919@163.com; \* Corresponding author, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

机体可特异性诱导 MT 的高水平表达,进而整合一定的重金属形成重金属-MT 复合物,或者夺取与其他功能蛋白结合的重金属离子来降低功能蛋白的损伤,减少重金属对组织的损害(Bremner, 1987),这是生物体重要的解毒机制之一.由于水生生物体内的 MT 与水环境和体内组织中的重金属具有显著的相关性,因此,MT 可作为水环境重金属暴露和毒性效应早期警报的主要生物标志物,为水环境污染程度提供客观和全面的指标(Amiard *et al.*, 2006).目前,关于 MT 作为生物标志物的相关报道主要集中在鱼类、贻贝和牡蛎等软体动物中(Ma *et al.*, 2008),而蟹类中、特别是与淡水蟹类相关的研究国内外鲜见报道.同时,由于定量检测方法的限制,MT 作为生物标志物在环境监测方面的应用还未能进一步开发.目前,MT 含量的测定方法主要有金属结合法、电化学法、色谱分析法等,因 MT 蛋白的特殊性,上述测定方法无一不受 MT 结合金属种类、MT 同形体多态性等因素的影响而对结果产生偏差.而酶联免疫吸附测定(ELISA)以其灵敏性高、特异性好、操作简单、费用低廉且可准确、特异、高通量地实现 MT 的定量测定,正逐步应用于环境监测、医疗检验等方面(Nakajima *et al.*, 2010; Yudkovski *et al.*, 2008; Apostolova *et al.*, 1998).而建立 ELISA 方法的关键是高效价、高特异性抗体的制备.

河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)由海洋蟹多元转化而成,属于甲壳纲、十足目中一个特殊分支.作为生活于水体基底层的低等生物,溪蟹直接面对沉积在水体的金属离子,是一种较为理想的水环境监测指示生物,其组织中的 MT 含量作为一种监测水体重金属暴露的生物标志物,客观反应水体污染水平(Ma *et al.*, 2008).因此,本研究在制备功能性重组河南华溪蟹 MT 的基础上,利用纯化的融合蛋白 SUMO-MT 免疫小鼠,获得抗华溪蟹 MT 抗血清,以期为深入研究 MT 的重金属解毒机制及进一步建立快速、敏感的 ELISA 检测方法奠定基础.

## 2 材料与方 法(Materials and methods)

### 2.1 材料

重组工程菌 PET-28a-SUMO-MT/BL21(DE3)由本实验室构建、保存,健康雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司,羟自由基测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所, PVDF

膜(0.22 μm)购自 Bio-Rad 公司,Quick Antibody-Mouse5W 免疫佐剂购自北京康碧泉生物技术公司,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 GeneTex 公司,AP 标记的羊抗鼠 IgG 购自生工生物工程(上海)股份有限公司,邻苯二胺(OPD)和 NBT/BCIP 显色剂购自 Amresco 公司,DAB 染色试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司,其余常规试剂均为国产分析纯.

### 2.2 方法

2.2.1 重组 MT 蛋白的制备及鉴定 根据本实验室之前建立的方法, IPTG 诱导重组工程菌 PET-28a-SUMO-MT/BL21(DE3)表达河南华溪蟹 MT 蛋白,经 Ni 离子螯合柱分离纯化,制备重组华溪蟹 MT (He *et al.*, 2014).纯化获得的重组融合蛋白 SUMO-MT 经超滤浓缩交换至储存液(0.01 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> PMSF, 10 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, pH = 7.8)后, SDS-PAGE 分析其纯度.采用 UNICO UV-2102 PC 型紫外可见分光光度计在 190~300 nm 波长下进行紫外光谱扫描分析鉴定重组 MT.

### 2.2.2 重组 SUMO-MT 与金属离子的结合能力分析

根据 Yang 等(2007)建立的方法略加改良测定重组 SUMO-MT 的金属结合能力.利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,以牛血清白蛋白 BSA 为标准,测定重组 MT 蛋白浓度;同时取 1 mL 重组蛋白纯化样品置于硝化瓶中,加入硝酸/高氯酸(1:3)后置于电热板上消化完全,火焰原子吸收分光光度计(日本 SHIMADZU AA26300)测定重组蛋白中的 Zn 含量.重组蛋白 SUMO-MT 分子量以 26000 Da 计, SUMO-MT 分子与 Zn 原子的物质的量比  $R_{MT/Zn}$  利用以下公式计算:

$$R_{MT/Zn} = C_{MT} / (26000 / C_{Zn} / 65) \quad (1)$$

式中  $R_{MT/Zn}$  为 SUMO-MT 分子与 Zn 原子的物质的量比,  $C_{MT}$  为重组 SUMO-MT 蛋白浓度(mg·mL<sup>-1</sup>),  $C_{Zn}$  为重组蛋白中 Zn 浓度(mg·mL<sup>-1</sup>).

### 2.2.3 重组 SUMO-MT 清除自由基能力分析

羟基自由基(·OH)是体内最活泼的活性氧,而 Fenton 反应是最常见的产生羟基自由基的化学反应, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量和 Fenton 反应产生的·OH量成正比,当给予电子受体后,用 griess 试剂显色,形成红色物质,其呈色与·OH的量呈正比(Lindsey *et al.*, 2000).分别在反应体系中加入不同浓度的重组 SUMO-MT 检测其清除羟自由基能力.实验方法按照羟自由基测定试剂盒操作说明,在 550 nm 波长下,用双蒸水调零,测定各管吸光度.羟自由基清除率  $SR_{MT}$  按照以下公式

计算:

$$SR_{MT} = (A_{control} - A_{sample}) / A_{control} \times 100\% \quad (2)$$

式中,  $SR_{MT}$  为羟自由基清除率,  $A_{control}$  为空白对照的吸光度值,  $A_{sample}$  为样品的吸光度值.

2.2.4 SUMO-MT 抗血清的制备 按照 Quick Antibody-Mouse5W 免疫佐剂说明书进行小鼠免疫. 选择 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 5 只, 取纯化后的重组 SUMO-MT 蛋白免疫小鼠. 首次免疫每只小鼠取 0.5 mL 目的蛋白 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 与等体积 Quick Antibody-Mouse5W 水溶性免疫佐剂迅速混合后, 于小鼠后腿小腿肌肉注射免疫, 每只小鼠注射 100  $\mu\text{L}$ , 免疫前尾部静脉取血作为阴性对照. 3 周后按照同样的方式加强免疫一针. 5 周后, 小鼠摘除眼球取血, 室温静置 1 h 后  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min. 上清置于  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱内过夜, 待血液凝固后,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下离心 10 min. 取上清, 加入 0.02%  $\text{NaN}_3$ , 无菌分装于  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存.

2.2.5 抗血清效价的测定 根据 Kim 等 (2011) 建立的间接 ELISA 法测定 SUMO-MT 抗血清的效价. 选取 96 孔酶标板, 每孔用碳酸盐缓冲液 ( $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2 \text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3$ ,  $\text{pH} = 9.6$ ) 包被重组 SUMO-MT ( $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ), 留空白对照孔,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  保存过夜; 次日取出, 弃去孔内液体, 洗涤液 PBST ( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PBS}$ ,  $0.1\% \text{ Tween}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ) 洗 3 次, 每次 5 min; 加入 BSA 封闭液 ( $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h; 洗涤 3 次后, 加入  $\text{pH} = 7.4$ 、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PBS}$  倍比稀释的免疫后小鼠血清及免疫前血清 (稀释倍数为 200~204800),  $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  作用 1 h; 洗涤 3 次, 加入 1:5000 PBSTB ( $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ PBS}$ ,  $1\% \text{ BSA}$ ,  $0.1\% \text{ Tween}$ ,  $\text{pH} = 7.4$ ) 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 1 h; 洗涤 3 次, 加入底物邻苯二胺 (OPD) 溶液  $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ , 暗处显色 30 min, 加入  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ,  $30 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ , 终止反应.  $492 \text{ nm}$  处酶标仪测定. 每块酶标板同时设空白对照、阴性对照和阳性对照. 以  $P/N \geq 2.1$  的最高血清稀释倍数表示抗体效价.

2.2.6 Western blot 和免疫组化鉴定抗血清的特异性 重组 SUMO-MT 蛋白纯化样和重组 TF (阴性对照) 经 15% SDS-PAGE 电泳分析后, 用电转仪 (Bio-Rad) 将 SDS-PAGE 胶中的蛋白转至 PVDF 膜上, 用封闭液 (PBST+5% 脱脂奶粉) 封闭过夜, PBST 洗膜 4 次,  $10 \text{ min} \cdot \text{次}^{-1}$ , 加入 1:500 稀释的自制抗血清作为一抗,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜, PBST 洗膜 4 次后, 加入 1:5000

稀释的 AP 标记的羊抗鼠 IgG, 室温反应 2 h, 用 PBST 洗膜 4 次后, 最后用 BCIP/NBT 显色试剂盒避光显色并拍照.

免疫组化实验按照 DAB 染色试剂盒说明书进行. 经不同镉浓度 ( $5.8$ 、 $11.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 1 d 的河南华溪蟹石蜡包埋鳃组织经脱蜡、水化后用柠檬酸缓冲液高压修复抗原, 自然冷却后蒸馏水淋洗, 再用 PBS 漂洗 2 次, 每次 3 min; 滴加内源性过氧化物酶封闭液, 室温 10 min, PBS 充分淋洗; 滴加封闭用正常羊血清工作液, 室温 10 min, 甩干; 滴加所制备的抗 MT 血清  $50 \mu\text{L}$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  过夜, 过夜后  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  复温 40 min, 然后 PBS 充分淋洗; 滴加生物素标记的羊抗鼠 IgG, 室温 10 min, PBS 充分淋洗; 滴加 HRP 标记的链霉素亲和素, 室温 10 min, PBS 充分淋洗; DAB 显色时间为 1~5 min, 显色后复染 2 min, 盐酸酒精分化, PBS 充分淋洗, 脱水、透明、封片、镜检.

### 3 结果 (Results)

#### 3.1 重组 MT 的表达、纯化及紫外光谱扫描鉴定

利用本实验之前建立的方法制备了重组河南华溪蟹 MT 融合蛋白. 纯化获得的重组融合蛋白 SUMO-MT 经 SDS-PAGE 检测 (图 1), 其分子量约为 26 kD, 且纯度较高, 可以用于特异性抗血清的制备. 重组 SUMO-MT 经超滤交换至储存液后, 在 190~300 nm 波长下进行紫外光谱扫描 (图 2), 结果显示, 重组蛋白分别在 216 nm 和 285 nm 处出现两个特征吸收峰, 分析其 216 nm 处为 Zn-MT 特征吸收峰, 而 285 nm 处为 SUMO 标签的特征吸收峰, 与预期结果一致.

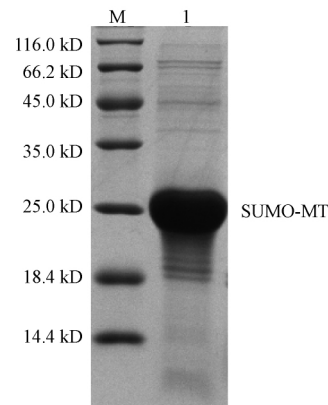


图 1 SDS-PAGE 分析 SUMO-MT 纯化样品 (1: SUMO-MT 纯化样品; M: 蛋白质 Marker)

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the purified SUMO-MT (1: the purified SUMO-MT; M: Marker protein)

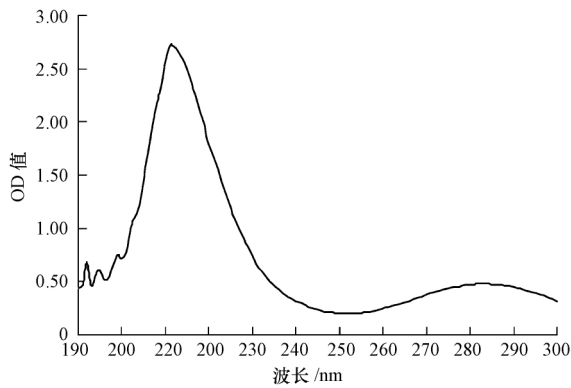


图2 重组 MT 纯化样紫外扫描光谱分析

Fig.2 UV absorbance spectrometry analysis of recombinant SUMO-MT

### 3.2 重组 SUMO-MT 的金属结合能力测定

利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,以牛血清白蛋白 BSA 为标准,测定重组 SUMO-MT 蛋白浓度  $C_{MT}$  为  $0.827 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,重组蛋白经硝化、定容后,测定其 Zn 含量为  $0.012 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  根据公式(1) 计算其物质的量比为 1:6,与天然华溪蟹 MT 蛋白一致,证明重组 SUMO-MT 仍具有较强的金属结合能力。

### 3.3 重组 SUMO-MT 羟基自由基清除率的测定

利用羟基自由基测定试剂盒,分别在反应体系中加入不同浓度的重组 SUMO-MT,检测其清除羟基自由基能力.结果如图 3 所示,当重组 SUMO-MT 浓度为  $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,羟基自由基清除率达 51%,当浓度为  $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,羟基自由基清除率达 95%,证明重组 SUMO-MT 具有较强的清除自由基的能力(图 3)。

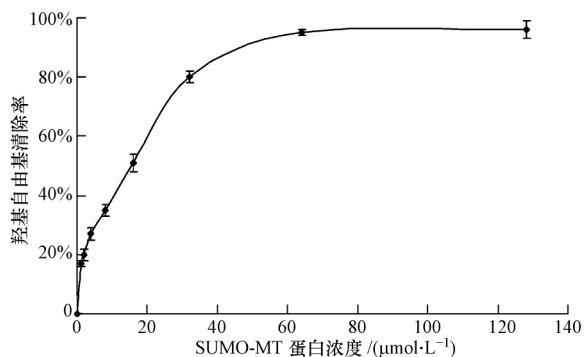


图3 重组 SUMO-MT 蛋白清除羟基自由基能力测定

Fig.3 Hydroxyl radical scavenging ability of recombinant SUMO-MT protein

### 3.4 SUMO-MT 抗血清效价检测

采用间接 ELISA 法测定 SUMO-MT 抗血清的效价(表 1),结果表明,以 SUMO-MT 免疫小鼠,均可

获得较高效价的抗血清.其中,3<sup>#</sup>小鼠血清效价最高,当最大稀释度至 102400 时,其  $OD_{492}$  为 0.47,且  $P/N \geq 2.1$ ,抗血清的效价高达 1:102400.

表 1 小鼠血清效价检测

Table 1 Results of indirect ELISA to determine antibody activities of anti-SUMO-MT serum

小鼠编号	P/N	稀释比
1 <sup>#</sup>	2.15	1:12800
2 <sup>#</sup>	2.31	1:25600
3 <sup>#</sup>	2.41	1:102400
4 <sup>#</sup>	2.17	1:12800
5 <sup>#</sup>	2.20	1:51200

### 3.5 SUMO-MT 抗血清 Western blot 分析

以 1:500 稀释的自制抗血清作为一抗,对重组 SUMO-MT 纯化样、经 IPTG 诱导的工程菌组织全蛋白和重组 TF(阴性对照)进行 Western blot 分析,结果显示,自制抗血清可以识别重组 SUMO-MT 而与重组 TF 无特异性结合(图 4)。

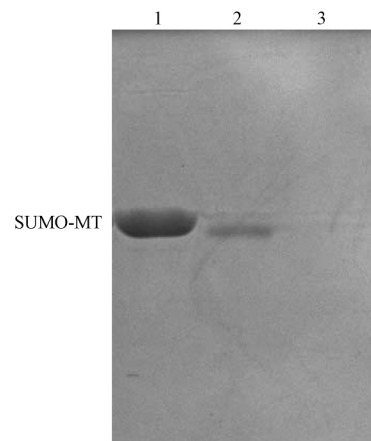


图4 抗血清的 Western blot 鉴定(1: SUMO-MT 纯化样品; 2: 经 IPTG 诱导的重组工程菌 PET-28a-SUMO-MT/BL21( DE3) 全菌样; 3: 重组 TF 蛋白对照)

Fig.4 Western blot of recombinant SUMO-MT fusion protein with anti-SUMO-MT serum (1: the purified SUMO-MT; 2: induced cell extract by 1 mM IPTG; 3: recombinant TF protein)

### 3.6 免疫组化染色

以制备的 SUMO-MT 抗血清检测了经不同镉浓度( $5.8, 11.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理的河南华溪蟹鳃组织,结果显示,所制备的抗血清可以与组织中的 MT 特异性结合.免疫组化染色结果表明,组织中的 MT 主要定位于细胞质中,呈棕褐色,且随着镉处理浓度的增加,MT 的表达量也在升高(图 5)。



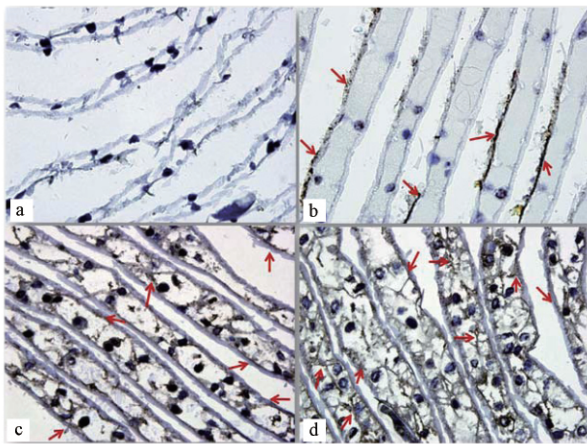


图5 DAB 染色法检测 MT 蛋白在镉处理河南华溪蟹鳃组织中的表达 (a. 阴性对照 (PBS 替代一抗); b. 正常对照组华溪蟹鳃组织; c.  $5.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$  染毒 1 d 华溪蟹鳃组织; d.  $11.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$  染毒 1 d 华溪蟹鳃组织;  $\rightarrow$  表示 MT;  $\times 600$  倍)

Fig.5 Light micrographs of gill tissue of *S. henanense* (a. Negative control; b. Control group; c. Exposure to  $5.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$  for 1 d; d. Exposure to  $11.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CdCl}_2$  for 1 d;  $\rightarrow$  stands for MT;  $\times 600$ )

#### 4 讨论 (Discussion)

MT 是自然界中广泛存在的一种可诱导的应急蛋白质. 研究表明, MT 具有重金属解毒、清除自由基及防止细胞癌变等功能 (Eckschlager *et al.*, 2009). MT 因其独特的功能和作用, 已成为一种具有广阔应用前景的医药蛋白资源, 也是一种理想的保健品、化妆品的添加剂. 目前, 已有多种来源的 MT 获得了重组表达 (Jie *et al.*, 2005; Sauge-Merle *et al.*, 2012; 曹晓敏等, 2007), 但依然存在表达量较低、易降解、极易形成包涵体等诸多问题. 这主要是由于 MT 分子量较小, 半衰期短, 在大肠杆菌体内不稳定且易被酶降解; 且 MT 富含半胱氨酸, 极易形成无生物活性的包涵体. 同时, 由于 MT 在大肠杆菌内极不稳定, 脱金属硫蛋白对细胞的毒性及细胞对金属离子的耐受性差等问题, 一直难以获得比较高的产率 (Mejare *et al.*, 2001). 课题组在前期研究中, 利用 SUMO 融合表达系统实现了河南华溪蟹 MT 的可溶表达. 在此基础上, 本研究对重组制备的 SUMO-MT 进行了金属结合能力和自由基清除能力的测定, 进一步证实了重组 SUMO-MT 具有和天然 MT 蛋白一致的生物学功能.

由于定量检测方法的限制, MT 作为生物标志

物在环境监测方面的应用还未能进一步开发. 目前, 国内外许多学者通过免疫学方法 (ELISA 或免疫组化) 对 MT 进行定量和定位分析测定, 但建立该方法的关键是特异性的抗体的制备. 而华溪蟹组织 MT 蛋白分子量仅有 7 kD 左右, 蛋白免疫原性较弱 (Kim *et al.*, 2001), 因此, 本研究利用分子量为 26 kD 的功能性重组华溪蟹 SUMO-MT 蛋白作为抗原. 同时, 抗血清制备实验中, 利用新型的水溶性佐剂 Quick Antibody 替代传统的福氏佐剂, 该佐剂具有免疫针次少、抗原用量低、抗体产生快、抗体滴度高、不需乳化等诸多特点. 结果表明, 利用 SUMO-MT 和 Quick Antibody 佐剂制备了效价较高、特异性好的华溪蟹 MT 抗血清. 该 MT 抗血清应用于不同镉染毒处理的河南华溪蟹鳃组织免疫组化实验, 可特异性识别组织中的 MT. MT 抗血清的制备, 为进一步建立快速、敏感的 ELISA 测定方法及 MT 重金属解毒机制的深入研究奠定了基础.

#### 5 结论 (Conclusions)

1) 利用 SUMO 融合表达系统完成了河南华溪蟹 MT 的重组制备, 经 SDS-PAGE 及紫外光谱扫描鉴定后, 检测其仍具有与金属离子结合和清除自由基的生物学功能.

2) 以功能性重组河南华溪蟹 MT 为抗原, 制备了小鼠抗血清. 该抗血清效价经间接 ELISA 法测定最高达 1:102400, Western blot 分析其具有良好的特异性, 并可特异性识别河南华溪蟹组织中的 MT, 可应用于免疫组化定位及定性检测.

责任作者简介: 王兰 (1960—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事典型重金属污染物的生物学效应与分子机制方面的研究. E-mail: lanwang@sxu.edu.cn.

#### 参考文献 (References):

- Amiard J C, Amiard-Triquet C, Barka S, *et al.* 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers [J]. *Aquatic Toxicology*, 76(2): 160–202
- Apostolova M, Nachev C, Koleva M, *et al.* 1998. New competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of metallothionein in tissue and sera [J]. *Talanta*, 46(2): 325–333
- Bremner I. 1987. Nutritional and physiological significance of metallothionein [J]. *Experientia Supplementum*, 52: 81–107
- 曹晓敏, 李冰, 陈祯, 等. 2007. 中华绒螯蟹重组金属硫蛋白的原核表达与分离纯化 [J]. *生物医学工程学杂志*, 24(2): 409–412
- Carpene E, Andreani G, Isani G. 2007. Metallothionein functions and structural characteristics [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine*

- and Biology ,21: 35-39
- Eckschlager T , Adam V , Hrabeta J , *et al.* 2009. Metallothioneins and cancer[J]. Current Protein & Peptide Science ,10( 4) : 360-375
- Hamer D H. 1986. Metallothionein[J]. Annual Review of Biochemistry , 55( 1) : 913-951
- He Y , Ma W , Li Y , *et al.* 2014. Expression of metallothionein of freshwater Crab ( *Sinopotamon henanense* ) in *Escherichia coli* enhances tolerance and accumulation of zinc , copper and cadmium [J]. Ecotoxicology ,23( 1) : 56-64
- Jie L , Kaifeng S , Dian Y , *et al.* 2005. Chracterization of expression and stability of recombinant cystein-rich protein MT1A from yeast [J]. Protein & Peptide Letters ,12( 6) : 567-571
- Kagi J H R , Schaffer A. 1988. Biochemistry of metallothionein [J]. Biochemistry ,27( 23) : 8509-8515
- Kim N , Shon S H , Kim , C T , *et al.* 2011. Responses of label-free metallothionein sensor immobilized with thiolated antibody [J]. Current Applied Physics ,11( 5) : 1210-1214
- Lindsey M E , Tarr M A. 2000. Quantitation of hydroxyl radical during Fenton oxidation following a single addition of iron and peroxide[J]. Chemosphere ,41( 3) : 409-417
- Ma W , Wang L , He Y , *et al.* 2008. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in freshwater crab *Sinopotamon henanense* during acute exposure to waterborne cadmium [J]. Environmental Toxicology ,23( 3) : 393-400
- Margoshes M , Vallee B L. 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex [J]. Journal of the American Chemical Society , 79( 17) : 4813-4818
- Mejára M , Bülow L. 2001. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals [J]. Trends in Biotechnology ,19( 2) : 67-73
- Nakajima K , Kodaira T , Kato M , *et al.* 2010. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein-I and -II in plasma of humans and experimental animals [J]. Clinica Chimica Acta ,411( 9/10) : 758-761
- Sauge-Merle S , Lecomte-Pradines C , Carrier P , *et al.* 2012. Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure [J]. Chemosphere ,88( 8) : 918-924
- Yang F , Zhou M , He Z , *et al.* 2007. High-yield expression in *Escherichia coli* of soluble human MT2A with native functions [J]. Protein Expression and Purification ,53( 1) : 186-194
- Yudkovski Y , Rogowska-Wrzesinska A , Yankelevich I , *et al.* 2008. Quantitative immunochemical evaluation of fish metallothionein upon exposure to cadmium [J]. Marine Environmental Research ,65( 5) : 427-436