

• 生物技术与方法 •

基于类弹性蛋白融合金属硫蛋白的构建及其生物学活性评价

刘龙英, 汪婷婷, 于伟, 徐思梦, 叶贤龙*

赣江中药创新中心, 江西 南昌 330000

刘龙英, 汪婷婷, 于伟, 徐思梦, 叶贤龙. 基于类弹性蛋白融合金属硫蛋白的构建及其生物学活性评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4242-4253.

LIU Longying, WANG Tingting, YU Wei, XU Simeng, YE Xianlong. Construction and biological activity of metallothionein fused with ELP[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4242-4253.

摘要: 金属硫蛋白(metallothionein, MT)在去除重金属、抗氧化和免疫调节等方面发挥重要作用。当前获取天然 MT 蛋白的首选方法是从组织中提取, 工艺复杂且收率很低。近年来涌现多种标签融合后异源表达的设计, 如 GST 或 His 等。然而后期标签的去除大大降低了收率, 因此难以实现工业化生产。类弹性蛋白(elastin-like polypeptides, ELPs)融合技术能够实现目标蛋白的可溶性表达且纯化工艺简便快捷。本研究将 ELP 与 MT 蛋白融合, 通过 ELP 融合显著增加了 MT 的可溶性表达, 采用多次可逆相变循环(inverse transition cycling, ITC)处理等纯化工序高效简便地获得了纯度 97%以上的 ELP-MT 蛋白。获得的 ELP-MT 蛋白 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt, ABTS]自由基清除率 IC_{50} 为 $0.77 \mu\text{mol/L}$, 为维生素 E 衍生物 Trolox 的 53.7 倍, 同时表现出较强的 1,1-二苯基-2-三硝基肼(1,1-diphenyl-2-trinitrohydrazine, DPPH)自由基清除能力。并且 ELP-MT 对小鼠胚胎成纤维细胞 NIH/3T3 细胞无增殖毒性, 可显著促进 NIH/3T3 细胞黏附和迁移, 具有良好的生物相容性。本研究构建的 ELP-MT 融合蛋白同时具有金属硫蛋白和弹性蛋白的特性, 为重组 MT 蛋白的规模化生产和其在食品保健及化妆品领域的应用开发奠定了技术基础。
关键词: 金属硫蛋白; 类弹性蛋白; 可溶性表达; 多次可逆相变循环纯化; 生物学活性

Construction and biological activity of metallothionein fused with ELP

LIU Longying, WANG Tingting, YU Wei, XU Simeng, YE Xianlong*

Ganjiang Chinese Medicine Innovation Center, Nanchang 330000, Jiangxi, China

Abstract: Metallothionein (MT) plays a significant role in heavy metal removal, antioxidant

资助项目: 赣江中药创新中心自主部署项目(CMSC32204)

This work was supported by the Ganjiang Chinese Medicine Innovation Center Self-deployed Project (CMSC32204).

*Corresponding author. E-mail: yexianlong@jcmsc.cn

Received: 2024-02-06; Accepted: 2024-04-26; Published online: 2024-04-30

defense, and immune regulation. The current predominant approach for obtaining natural MT is extraction from tissue, which often entails complex procedures resulting in limited yields. In recent years, researchers have adopted the strategy of fusing labels such as GST or His for the heterologous expression of MT. However, a challenge in industrial production arises from the subsequent removal of these labels, which often leads to a significant reduction in the yield. The fusion with elastin-like polypeptides (ELPs) offers a promising solution for achieving soluble expression of the target protein, while providing a simple and fast purification process. In this study, ELP was fused with MT, which significantly up-regulated the soluble expression of MT. The fusion protein ELP-MT with the purity above 97% was obtained efficiently and simply by inverse transition cycling (ITC). ELP-MT exhibited a remarkable 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ammonium salt (ABTS) scavenging activity, with the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.77 $\mu\text{mol/L}$, which was 53.7 times that of the vitamin E derivative Trolox. In addition, the fusion protein demonstrated strong 1,1-diphenyl-2-trinitrohydrazine (DPPH) scavenging ability. Furthermore, ELP-MT had no toxicity to the proliferation and promoted the adhesion and migration of NIH/3T3 cells. All these results indicated that ELP-MT had good biocompatibility. We constructed the fusion protein ELP-MT combining the unique properties of MT and elastin, laying a technical foundation for the large-scale production of recombinant MT and facilitating the applications in food, health supplement, and cosmetic industries.

Keywords: metallothionein (MT); elastin-like polypeptides (ELPs); soluble expression; purification by inverse transition cycling (ITC); biological activity

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类普遍存在于生物体内的富含半胱氨酸的低分子量(6–7 kDa)的多功能诱导性蛋白,具有丰富的硫醇基团(30%半胱氨酸)^[1–3]。自1953年Mackay等^[4]首次从马肾中发现并分离出MT以来,科研工作者们陆续从动物、植物和微生物中都分离得到了MT,且在不同物种(包括原核生物、植物、无脊椎动物和脊椎动物)中的组织器官均能分离得到MT,它们在结构和数量上存在不同^[5–6]。金属硫蛋白在进化上具有高度的保守性,可根据金属离子含量和氨基酸组成的不同分为MT-I、MT-II、MT-III及MT-IV共4种亚型。MT参与体内各种重要生理活动,如重金属解毒、清除自由基、调节体内微量元素浓度,并在抗肿瘤、抗凋亡、调节激素和调节细胞代谢及增殖分化过程中扮演了重要角色^[7–10]。为了研究MT的金属结合能力,要求MT蛋白有较高的提取量及纯度。

尽管传统的组织提取方法是制备天然MT蛋白的首选方法,但会受到程序复杂和低回收率的限制。与传统方法相比,MT的异源表达表现出表达率高、成本低等优势。已有报道采用枯草杆菌、链球菌、酵母菌等多种底盘来表达重组MT蛋白,需要添加高重金属胁迫适应来筛选菌株从而实现MT蛋白的生产,也曾报道基因工程重组载体导入大肠杆菌中,并采用高密度发酵生产MT蛋白^[11–13],但效果均不理想,其主要的因素为MT产量过低,且诱导过程存在重金属污染而未能投入工业化发酵提取。近年来报道了许多GST或His融合设计在大肠杆菌中表达可溶性MT的方法,但标签对MT与金属的结合能力会有影响,而SUMO融合的MT蛋白实际产量也不高^[14–15]。

弹性蛋白(elastin, ELN)是生皮组织中弹性纤维的主要成分,主要存在于韧带和脉管壁。弹

性纤维与胶原纤维共同赋予组织弹性和抗张能力。类弹性蛋白(elastin-like polypeptides, ELPs)是一种参照弹性蛋白中高度重复序列,通过基因工程技术构建的由(VPGXG)_n 五肽重复序列串联重复而成的多肽^[16]。与天然弹性蛋白相似,ELPs 具有良好的细胞相容性,在体内可降解为天然氨基酸,免疫排斥反应低,这些优势使其广泛应用于软骨、椎间盘组织修复,血管移植,眼、肝组织再生和细胞层工程^[17]。Nettles 等^[18]的研究表明,由五肽重复单元的 ELPs 具有促进软骨细胞的增殖、黏附、迁移的作用。ELP 蛋白单独或与外源基因在 N 端或 C 端形成融合蛋白表达时具有相转变特性,即达到一定温度时 ELP 蛋白或 ELP 融合蛋白能发生从溶液到凝聚态的可逆转变。通过 ELP 凝聚态的可逆转变,利用离心就能分离重组蛋白,即简单多次的可逆相变循环(inverse transition cycling, ITC)处理就可从蛋白混合液中选择性地分离出 ELP 融合蛋白^[19-21]。研究人员发现将一种诱导增殖的配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)膜蛋白与弹性蛋白融合后,包涵体表达的目的蛋白可以成功以可溶形式表达且具有生物活性^[22],说明 ELP 也可以提高目的蛋白的溶解度。ELP 目前已在蛋白纯化^[19,23]、组织工程、药物载体微粒等方面得到广泛研究和应用^[24-26]。

本研究构建了金属硫蛋白与弹性蛋白融合的 ELP-MT 蛋白,该融合形式可以通过高效简便的纯化工艺制备纯度在 97%以上的目的蛋白。获得的 ELP-MT 蛋白表现出较强的自由基清除能力,且具有良好的生物相容性,对 NIH/3T3 细胞无增殖毒性,可显著促进 NIH/3T3 细胞黏附和迁移。本研究构建的 ELP-MT 融合蛋白兼备了金属硫蛋白和弹性蛋白的特性,为重组 MT 蛋白的工业化生产及多领域的应用开发奠定了技术基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株及生化试剂

重组质粒委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成,大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)购自北京全式金生物技术股份有限公司。三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均购自上海泰坦科技股份有限公司。氢氧化钠(NaOH)、氯化钠(NaCl)、尿素(urea)均购自上海麦克林生物生化科技股份有限公司。异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、咪唑、还原性谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)、卡那霉素(kanamycin, Kan)、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)及乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetraacetic acid-2Na, EDTA-2Na)均购自北京索莱宝科技有限公司。2,2'-氨基-二(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐[2,2'-amino-di(2-ethyl-benzothiazoline sulphonic acid-6) ammonium salt, ABTS]、过二硫酸钾、1,1-二苯基-2-硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。蛋白质定量试剂盒及蛋白低分子量非预染 marker 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司。CCK-8 试剂盒(cell counting kit-8)购自江苏艾迪生生物科技有限公司。

1.2 原核表达载体的构建及重组蛋白的表达

将人源性金属硫蛋白 hMT-IV 序列(GenBank 登录号: NP_116324.2)根据密码子偏好性进行优化,委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成相应的基因,并分别连入 pET28a(+)、pGEX-4T-1 及 pSUMO 载体构建重组质粒。其中 ELP-MT 融合蛋白目的基因(300 个氨基酸的 VPGXG 五肽重复与 hMT-IV 融合)委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成后直接连入 pET28a(+)载体。最终这些

构建的重组质粒通过 DNA 测序确认质粒成功合成。将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)菌株获得重组金属硫蛋白表达菌株。进一步挑取重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)后涂布平板的单菌落于 20 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养过夜, 按 1% 的比例接种于 20 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养至 OD_{600} 值为 0.4–0.8 后, 加入 IPTG 至终浓度为 0.25 mmol/L 进行诱导, 18 $^{\circ}\text{C}$ 、80 r/min 培养 16 h 后即完成重组蛋白的表达。

1.3 ELP-MT 的纯化

ELP-MT 融合蛋白的纯化主要包括菌体的破碎、ITC 分离纯化及阴离子交换层析。

菌体破碎: 诱导表达的菌液 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。1 L 菌液离心后的菌体用 40 mL 含有 PBS (pH 7.2, 添加 2 mol/L Urea) 的缓冲液重悬, 并添加终浓度为 1 mg/mL 的溶菌酶(北京索莱宝科技有限公司), 冰上超声破碎(300 W 功率, 破 2 s 停 3 s, 共 4 min), 破碎 3 次。

ITC 分离纯化: 菌体破碎后经 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取离心上清(40 mL)加入适量的 3 mol/L 硫酸铵溶液使反应体系中硫酸铵终浓度为 0.5 mol/L, 充分混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min。收集的沉淀用 40 mL 含有 20 mmol/L Tris 的缓冲液(pH 8.0)进行复溶, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 收集复溶上清, 至此为一轮 ITC 处理。重复进行 3 轮 ITC 处理, 每个步骤样品取 80 μL , 加入 20 μL 5 \times Loading buffer, 沸水浴 10 min 后进行 12% SDS-PAGE 电泳检测, 鉴定并分析纯化情况。

阴离子交换层析: 使用 AKTA avant 蛋白纯化仪, 选择色谱柱 BaByBio Q (13 mm \times 38 mm, 5 mL), 流动相 A 相为 Buffer A (10 mmol/L PB, pH 7.2), B 相为 Buffer B (10 mmol/L PB, 1 mol/L NaCl, pH 7.2); 检测波长为 215 nm; 流速设定为

3 mL/min。样品为上一步复溶样品(用 0.45 μm 的滤膜过滤), 上样完成后用 100% 流动相 B 梯度洗脱, 收集具有紫外吸收的馏分, 并进行 12% SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 ELP-MT 的可逆相变

取浓度分别为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 ELP-MT 蛋白, 以 PBS 为空白对照, 加入 96 孔板中, 每孔 100 μL 。将 BioTek Synergy H1 酶标仪控制温度为 25–42 $^{\circ}\text{C}$, 每升温/降温 1 $^{\circ}\text{C}$, 维持温度孵育 2 min, 于 OD_{350} 读数, 检测并记录吸光度值。

1.5 DPPH 自由基清除能力检测

用 24 mL 95% 乙醇溶解 1 mg DPPH, 配制 DPPH 母液溶液。用 PBS 对其进行稀释至 517 nm 吸光度值为 0.6–1.0。确保 1 mL 反应体系中包含 400 μL DPPH 溶液, 添加 600 μL PBS 后吸光度值在线性区间。取 5 支 1.5 mL EP 管, 加入 400 μL 0.1 mmol/L DPPH 溶液, 600 μL 不同浓度的样品溶液(0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 mg/mL), 避光反应 30 min, 在 517 nm 处测吸光度值为 A_s ; 取 400 μL 0.1 mmol/L DPPH 溶液, 加入 600 μL 体积 PBS 溶液, 避光反应 30 min, 在 517 nm 处测吸光度值为 A_0 , 清除率计算公式(1)如下:

$$\text{DPPH 清除率}\%=(A_0-A_s)/A_0\times 100\% \quad (1)$$

1.6 ABTS 自由基清除能力检测

称取 3 mg ABTS 用 735 μL ddH₂O 溶解, 称取 1 mg 焦硫酸钾(K₂S₂O₈)用 1 430 μL ddH₂O 溶解; 分别取上述溶液 0.5 mL 混合后于室温条件在黑暗处反应 12 h; 次日用 PBS (pH 7.4) 对该母液进行稀释, 以 PBS 为背景对照, 统一在 734 nm 处检测吸光度值。空白组吸光度为 A_0 ; 待测样品组为 A_s 。按公式(2)计算 ABTS 清除率。

$$\text{ABTS 清除率}\%=(A_0-A_s)/A_0\times 100\% \quad (2)$$

1.7 细胞活性检测

取对数期生长的 NIH/3T3 细胞, 以 5×10^3 个孔的密度铺设于 96 孔板中, 并在最外圈留出孔加入 PBS, 防止细胞干涸, 然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂

的恒温培养箱中过夜。次日移去旧培养基,所有样品均用完全培养基按照 1:10 比例进行稀释;每孔加入 100 μL 继续培养。作用 24 h 之后,弃去培养基,加入 100 μL 新培养基及 10 μL CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2-4 h 后,测定 450 nm 处吸光度。其中公式(3)中 A_s 为实验组 OD_{450} 处吸光度值, A_c 为空白对照组 OD_{450} 处吸光度值。

$$\text{Cell viability (\%)} = A_s/A_c \times 100 \quad (3)$$

1.8 细胞黏附实验

包被孔板:向 96 孔培养板中加入 100 μL 0.5、0.25、0.125 mg/mL ELP-MT 及 MT 蛋白,以 PBS 为对照组,每组设立 3 个复孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜。

次日,小心移去溶液,无菌 PBS 润洗 1 次,每孔加入 100 μL 5% BSA 在培养箱中静置 1 h。使用 PBS 浸洗孔板 2 次,取对数期生长的 NIH/3T3 细胞,以 2×10^4 个/孔的密度铺设于 96 孔板中,并在最外圈留出孔加入 PBS,防止细胞干涸,然后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中培养 40 min。用预冷的 PBS 洗板 3 次,加入 100 μL 新培养基及 10 μL CCK-8 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2-4 h 后,测定 450 nm 处吸光度。相对黏附率计算公式(4)如下:

$$\text{Cell adhere rate (\%)} = A_s/A_c \times 100 \quad (4)$$

其中 A_s 为实验组 OD_{450} 处吸光度值, A_c 为空白对照组 OD_{450} 处吸光度值。

1.9 细胞迁移实验

细胞铺板:取对数生长期的 NIH/3T3 细胞,胰蛋白酶消化成单细胞后,加入含血清的培养基终止反应,1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞沉淀,重悬细胞并计数,取适量细胞悬液均匀接种于 12 孔板中(2.5×10^5 个/孔),加入培养基至每孔 1 mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO_2 培养箱中进行培养。待细胞长成单层细胞时,弃去培养基并使用 1 mL 枪头划痕(每孔划 2 条,用紫外消毒后的直尺做参考)。划线完成后,使用无菌 PBS 轻轻洗涤细胞 2-3 次,尽可能洗去划下的细胞,使留下的间隙肉眼即清

晰可见,然后更换 1 mL 0.1% 血清培养基。并向培养基中加入终浓度为 3.6 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白溶液,溶剂对照组只加 0.1% FBS DMEM 培养基及 PBS,拍摄 0 h 细胞划痕照片。

细胞培养与观察:将细胞放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。18 h 后取出细胞,在显微镜下观察并拍摄与 0 h 相同位置的照片。

数据分析:使用 ImageJ 软件打开图片后,测定划痕面积;分析计算公式(5)如下:

$$\text{Cell migration rate (\%)} = (1 - S_{18}/S_0) \times 100 \quad (5)$$

其中, S_{18} 为 18 h 时划痕面积; S_0 为 0 h 时划痕面积。

2 结果与分析

2.1 不同融合形式 MT 蛋白的表达

不同融合形式的 MT 蛋白经过原核表达载体的构建,在大肠杆菌中诱导重组蛋白表达,使用 SDS-PAGE 鉴定融合蛋白的表达情况。野生型 MT、GST-MT、SUMO-MT 及 ELP-MT 蛋白的理论分子量大小分别为 8.67、31.68、20.29、28.57 kDa,电泳结果显示(图 1),以上蛋白的分子量大小分别为 13、32、25、29 kDa 左右,其中野生型的 MT 与 SUMO-MT 融合蛋白实际条带大小偏大,GST-MT 与 ELP-MT 两种融合蛋白实际条带大小与理论相近。野生型的 MT 基本以包涵体形式表达,而 GST-MT、SUMO-MT 和 ELP-MT 融合蛋白均以可溶形式表达。三种融合表达的形式在获得可溶性表达量方面差异不大,SUMO-MT 融合的形式表达量略低。对于 GST-MT 与 SUMO-MT 融合蛋白,还需要切除 GST 或 SUMO 标签来获得 MT 蛋白,这一步的损失较大^[14-15]。但 ELP-MT 融合蛋白可保留具有生物学特性的 ELP 片段,避免了切除融合片段的步骤,因此,在整体目的蛋白制备量方面将体现出明显的优势。

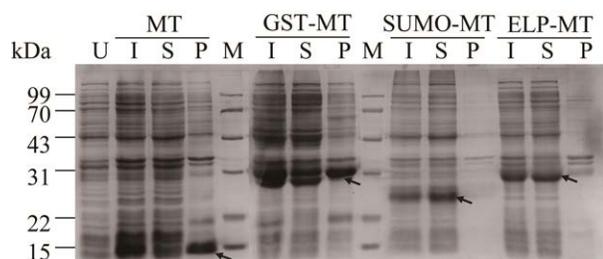


图 1 不同融合形式的 MT 蛋白表达 SDS-PAGE 鉴定 图中箭头指示的位置为实际的目的蛋白表达条带. M: 蛋白分子量标准品; U: 未诱导样本; I: 诱导后样本; S: 诱导后破碎上清; P: 诱导后破碎沉淀

Figure 1 SDS-PAGE analysis of different recombinant MT proteins. The arrows in the figure indicate the actual target protein expression bands. M: Molecular mass markers; U: Uninduced; I: Induced; S: Supernatant; P: Precipitate.

2.2 多种融合 MT 蛋白的纯化工工艺研究

经过对不同融合形式的 MT 蛋白初步的纯化工工艺探索, 发现 GST-MT 融合蛋白经过 GST 柱亲和层析后很难被洗脱下来, 如图 2A 所示, 最终收集到的馏分中 GST-MT 蛋白含量甚微。考虑到较大的 GST 标签融合形式可能会影响 MT 蛋白的金属结合活性^[14-15,27], 因此进一步对 GST 标签进行了切除, 大大降低了目标蛋白的整体收率, 获得目的蛋白如图 2A 中 MT (Δ GST) 样本(Δ GST 表示去除 GST 标签的含义)。SUMO 标签融合形式与 GST 融合极为相似, 融合标签较大, 虽暂无文献报道, 也存在影响 MT 蛋白相关活性的风险^[28-29]。而且 SUMO 融合的形式表达量略低, 在进行初步的 Ni 柱纯化后目的蛋白表现出不稳定沉淀析出状态(图 2A, 泳道 1),

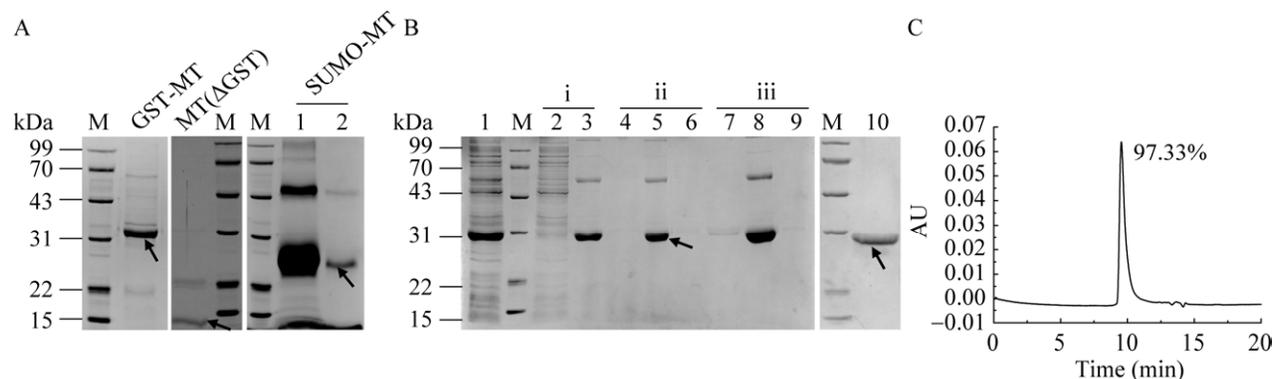


图 2 多种融合金属硫蛋白的纯化制备 A: GST-MT 和 SUMO-MT 融合蛋白纯化过程中的 SDS-PAGE 分析. Lane 1: SUMO-MT 纯化过程中蛋白不稳定沉降收集的沉淀样本; Lane 2: SUMO-MT 纯化过程中蛋白不稳定沉降收集的上清样本. B: ELP-MT 融合蛋白纯化过程中的 SDS-PAGE 分析. Lane 1: 超声破碎后的上清; Lane 2、4、7: 3 次 ITC 处理后的上清; Lane 3、5、8: 将 3 次 ITC 处理得到的沉淀重新溶解后的上清; Lane 6、9: 后 2 次 ITC 处理后复溶沉淀样品; Lane 10: 纯化的 ELP-MT 蛋白. C: SEC-HPLC 分析 ELP-MT 纯度. 图中箭头所指示的位置为目标蛋白的条带位置

Figure 2 Purification of multiple fusion expressed MT proteins. A: SDS-PAGE analysis of GST-MT and SUMO-MT in the purification process. Lane 1: A precipitated sample of unstable protein precipitation in solution during the SUMO-MT purification process; Lane 2: The supernatant after the precipitation of unstable protein in solution during the purification process of SUMO-MT. B: SDS-PAGE analysis of ELP-MT in the purification process. Lane 1: The supernatant after sonication; Lane 2, 4, 7: The supernatant after three ITC treatments; Lane 3, 5, 8: The supernatant of the precipitate obtained by three ITC treatments was redissolved; Lane 6, 9: The samples that failed to dissolve after redissolving precipitates from the last two ITC treatments; Lane 10: Purified ELP-MT protein. C: SEC-HPLC analysis of ELP-MT. The arrows in the figure indicate the actual target protein expression bands.

残留在上清中的目的蛋白含量非常的少(图 2A, 泳道 2)。进一步将标签切除, 较大的损失导致收集的馏分未能在 SDS-PAGE 中检测到 MT 蛋白。ELP-MT 融合形式主要为可溶性蛋白表达, 利用融合的可溶性弹性蛋白 ELP 具有温度诱导的可逆相变特性, 经过尝试发现 3 次 ITC 处理后, 即可获得纯度大于 90% 的目的蛋白, 大大简化了复杂的纯化步骤(图 2B)。利用阴离子层析柱进一步精纯, 采用 SEC-HPLC 分析表明纯度高达 97.33%, 产量可达 23.63 mg/L(图 2C)。

2.3 ELP-MT 的相变性能研究

通过对不同温度下 ELP-MT 蛋白溶液的浊度进行检测来研究 ELP-MT 的相变性能。结果见图 3, 随着温度从 25 °C 升高至 42 °C, 待测样品溶液 OD_{350} 吸收值有所升高, 继而随着温度的缓慢下降, 待测样品溶液逐渐恢复澄清。因此, ELP-MT 蛋白可在 (40 ± 2) °C 左右达到最佳相变温度。不同的蛋白浓度下, 相变趋势一致, 表明 ELP-MT 融合蛋白具备可逆相变特性的。该结果不仅解析了 ELP-MT 融合蛋白拥有与 ELP 蛋白同样的可逆相变特性, 为 MT 蛋白的纯化制备提供了简便快捷的 ITC 处理方法, 同时将为后期 MT 蛋白多领域的应用提供更多可能的形式。

2.4 ELP-MT 的 DPPH 自由基清除能力检测

采用 DPPH 自由基清除检测方法对 ELP-MT 融合蛋白的自由基清除能力进行探究。DPPH 自由基在 517 nm 处有最大吸收波长, 在乙醇和乙醇水溶液中呈深紫色, DPPH 自由基被还原会导致溶液褪色, 此时 517 nm 处吸光度值下降, 其褪色程度与自由基清除剂的含量相关。图 4 结果表明阴性对照 BSA 基本不具备 DPPH 自由基清除作用, 选用 MT (为 MTΔGST, 简称 MT) 作为对照组样本。结果表明, ELP-MT 和 MT 均具备 DPPH 自由基清除能力。在不同的浓度下, 二者形成的自由基清除能力曲线趋势一致, 几乎能够

重叠。这表明二者的 DPPH 自由基清除能力相当, 当 ELP-MT 和 MT 浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, DPPH 自由基清除能力趋于饱和状态, 说明 ELP 的融合形式并没有影响 MT 蛋白的自由基清除能力。

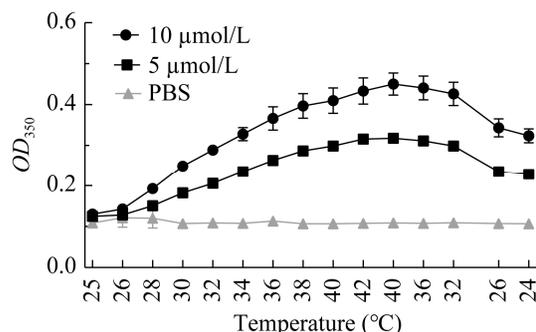


图 3 ELP-MT 的浊度曲线 采用 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 ELP-MT 蛋白进行相变性质探究, 每个测试温度设置 3 个复孔, 并选用 PBS 作为阴性对照样本组

Figure 3 Turbidity curves for ELP-MT. Two concentrations of ELP-MT protein, 5 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$, were selected for exploration. Three repeat sample groups were set at each exploration temperature, and PBS was selected as the negative control sample.

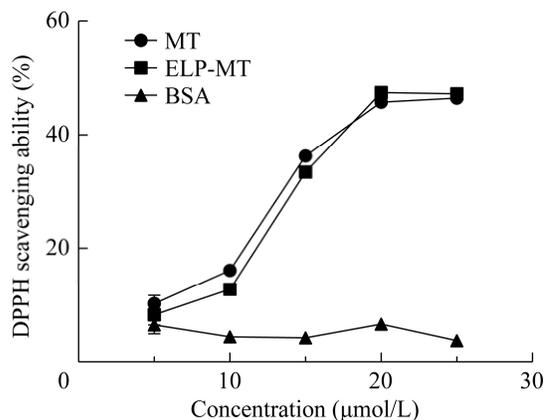


图 4 ELP-MT 的 DPPH 自由基清除能力曲线
Figure 4 DPPH scavenging ability curves of ELP-MT.

2.5 ELP-MT 的 ABTS 自由基清除能力检测

ABTS 自由基清除法是最常见的用于评价药用植物或纯化合物的抗氧化活性的一种方法。其 734 nm 或 405 nm 处具有特征吸收峰,在一定范围内吸光度的变化与自由基被清除的程度成正比,吸光度下降的程度即可反映样本清除 ABTS 自由基的能力。由图 5 可知,在测试浓度范围内,MT 及 ELP-MT 对 ABTS 自由基具有不同程度的清除作用,随着样品浓度的不断增加,ABTS 自由基清除率表现出递增的趋势。当 MT 及 ELP-MT 浓度达到 4 $\mu\text{mol/L}$ 时,ABTS 自由基清除能力基本达到饱和。经计算,ELP-MT 融合蛋白 ABTS 自由基清除能力的 IC_{50} 为 0.77 $\mu\text{mol/L}$,

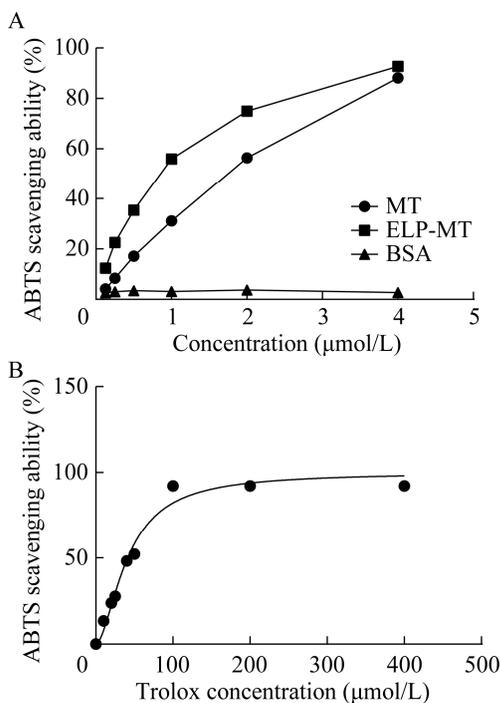


图 5 ELP-MT 的 ABTS 自由基清除能力曲线 A: MT、ELP-MT 对 ABTS 的清除水平。B: 维生素 E 衍生物 Trolox 对 ABTS 的清除水平。

Figure 5 ABTS scavenging ability curves of ELP-MT. A: ABTS scavenging ability curves of MT, ELP-MT. B: ABTS scavenging ability curves of Trolox.

MT 的 IC_{50} 为 1.54 $\mu\text{mol/L}$, 以维生素 E 衍生物为阳性对照,其 IC_{50} 为 41.35 $\mu\text{mol/L}$, ELP-MT 的 ABTS 自由基清除能力为维生素 E 衍生物 Trolox 的 53.7 倍,表明 ELP-MT 具备显著的 ABTS 自由基清除能力,在 4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内效果优于未融合的 MT。

2.6 ELP-MT 的细胞生物学活性

NIH/3T3 细胞是细胞生物学和生物医学研究领域常用的细胞系之一,它源自小鼠胚胎成纤维细胞,可用于多种细胞过程的实验测定,包括细胞迁移及黏附实验^[30-32]。为了研究 ELP-MT 融合蛋白在 NIH/3T3 细胞中是否具备相关的生物学活性,首先设置不同浓度的 ELP-MT (3.2、1.6、0.8 $\mu\text{mol/L}$),与 NIH/3T3 细胞于细胞培养箱中孵育 24 h 后,利用 CCK-8 法测定细胞的存活率。结果如图 6A 所示,ELP-MT 作为外源蛋白,对 NIH/3T3 细胞活力无影响,说明 ELP-MT 融合蛋白对 NIH/3T3 细胞没有潜在的细胞毒性,具有良好的生物安全性。

由于 ELP-MT 具备温度相变特性,会在孔板上形成与孔壁结合较牢固的小颗粒,推测其可能有利于细胞黏附,可能具有良好的促细胞黏附特性。因此,使用 3 个不同的蛋白量进行包被,开展 NIH/3T3 细胞的黏附实验。图 6B 表明,在 50 μg 的 ELP-MT 包被量下,可显著地促进 NIH/3T3 细胞黏附,且孔间差异小,而 MT 本身无促进细胞黏附的作用。

为进一步探究 MT 蛋白融合 ELP 后是否具备 NIH/3T3 细胞促迁移活性,取对数生长期的 NIH/3T3 细胞,以 2.5×10^5 个/孔细胞密度进行铺板,进行细胞划痕实验。向细胞培养基中加入 ELP-MT 融合蛋白,溶剂对照组只加 0.1% FBS DMEM 培养基及 PBS,拍摄 0 h 及 18 h 细胞划痕照片。结果如图 6C、6D 所示,ELP-MT 融合蛋白在 3.6 $\mu\text{mol/L}$ 时可显著促进 NIH/3T3

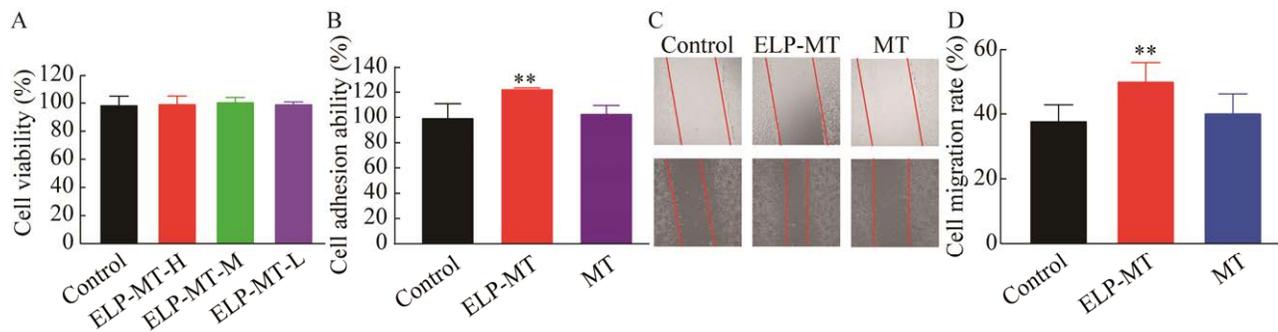


图 6 ELP-MT 在 NIH/3T3 细胞增殖、黏附、迁移方面的生物活性 A: ELP-MT 融合蛋白在高、中、低浓度下(3.2、1.6、0.8 $\mu\text{mol/L}$)处理 NIH/3T3 细胞 24 h 后,采用 CCK-8 法检测细胞毒性. B: 0.5 mg/mL ELP-MT 和 MT 蛋白分别处理 NIH/3T3 细胞 24 h 后,检测促细胞黏附能力. C: 不同蛋白实验组促细胞迁移实验的细胞划痕图片. D: 3.6 $\mu\text{mol/L}$ ELP-MT 和 MT 蛋白分别处理 NIH/3T3 细胞,采用划痕法测定促细胞迁移能力(**: $P < 0.01$). $n = 3$, 即设置 3 个检测复孔

Figure 6 Biological activity of ELP-MT on proliferation, adhesion, and migration of NIH/3T3. A: Cell cytotoxicity was detected by a CCK-8 assay after 24 h of treatment with ELP-MT at high, middle and low concentrations (3.2, 1.6, 0.8 $\mu\text{mol/L}$). B: NIH/3T3 cells were treated with 0.5 mg/mL ELP-MT or MT proteins for 24 h, and the cell adhesion ability was detected by a cell adhesion assay. C: Image captured by cell migration experiment from different experimental groups. D: The cell migration ability was measured by scratch assay after treatment with ELP-MT and MT at 3.6 $\mu\text{mol/L}$ (**: $P < 0.01$). $n = 3$, three duplicate sample groups.

细胞迁移,而单独的 MT 蛋白与空白对照组无明显差异,表明单独的 MT 蛋白不具备 NIH/3T3 细胞促迁移活性,ELP-MT 融合蛋白因融合了 ELP 表现出显著的 NIH/3T3 细胞促迁移活性。

3 讨论与结论

金属硫蛋白是一类普遍存在于生物体内的金属结合蛋白,具有金属结合能力和高诱导特性的低分子量蛋白质。这些富含半胱氨酸的短肽对多种重金属有高度亲和性,主要有镉、铜和锌^[33-34]。在微生物和人类中普遍存在金属硫蛋白,并且其结构高度保守。MT 结构呈哑铃状,包含 α -domain 和 β -domain 两个可与金属结合的区域^[35-36]。研究发现,相较于谷胱甘肽,MT 与羟基自由基反应的观察结果提高了 340 倍,引起了研究人员对 MT 中硫反应性的兴趣,并进行了大

量关于其作为自由基清除剂的研究。目前,在体外评估 MT 清除自由基能力方面主要集中在活性氧、羟基自由基、DPPH 及 ABTS 等人造自由基上,并涉及 MT 还原力以及总抗氧化能力测定^[13,37]。从不同物种组织中分离纯化的 MT 所表现的清除自由基活性和抗氧化能力具有明显差异。目前,商品化的 MT 大多从兔肝中诱导提取,其生产成本低、价格昂贵。寻找廉价且含有丰富 MT 的新资源是降低生产成本及扩大其应用领域的重要途径。

截至目前, Sekhar 等^[38]及 Sauge-Merle 等^[39]已经利用大肠杆菌表达不同来源的 MT。然而,MT 的高半胱氨酸含量干扰细胞质内部的氧化还原途径,SH 基团的分子内反应可能导致 MT 在大肠杆菌表达中形成包涵体。此外,由于分子量低,MT 表现出极其的不稳定。Sauge-Merle

等曾利用麦芽糖结合蛋白 (maltose-binding proteins, MBP) 融合标签在 *E. coli* 中过表达 MBP-MTII, 最终成功获取了少量可溶形式的 MBP-MT^[39]。Shahpiri 等则将水稻来源的 OsMT1-OsMT4 与 GST 标签融合, 在大肠杆菌中进行过表达以获取可溶性的金属硫蛋白^[27]。然而一些学者指出融合标签部分(包括 GST 和 His 等)可能会干扰 MT 的金属结合能力^[14-15,27], 若去除标签则比较费时费力。Li 和 Ma 等尝试将河南华溪蟹(*Sinopotamon honanense*)来源的 MT 与 SUMO (类泛素蛋白修饰分子)融合, 改善了重组单体和低聚 MT 的蛋白质折叠和溶解度, 但产量仍旧不理想^[15,28-29,40]。

本研究通过比较 MT、GST-MT、SUMO-MT 和 ELP-MT 重组蛋白在 *E. coli* 中可溶性的表达情况, 发现 MT 主要以包涵体形式表达。而 GST、SUMO 和 ELP 的融合均可促进 MT 的可溶性表达。对这些融合蛋白进行纯化研究, 结果显示 GST-MT 的纯化工艺得率低且耗时长, 而 SUMO-MT 纯化过程中存在不稳定性, 容易发生沉淀现象。此外, GST 与 SUMO 标签的融合也可能对 MT 蛋白的金属结合活性产生影响。相比之下, 优选的 ELP-MT 蛋白由于融合 ELP 的可逆相变特性, 再使用 ITC 技术进行简单纯化制备即可得到纯度高于 97% 的目标蛋白。该工艺简单便捷, 相对于需要 GST 或 Ni 柱亲和层析的 GST-MT 或 SUMO-MT 融合形式, 在大大降低了制备成本的同时, 也解决了制备产量低的问题。

通过纯化获得的 ELP-MT 蛋白进行一系列生物学活性研究发现, 其具有良好的 ABTS 自由基清除能力(IC_{50} 为 $0.77 \mu\text{mol/L}$), 远低于 Trolox (IC_{50} 为 $41.35 \mu\text{mol/L}$)。同时还表现出 DPPH 自由基清除能力, 更有力地证明了 ELP-MT 具有抗氧化作用。有研究表明 ELP 与天然弹性蛋白

相似, 在体内可降解为天然氨基酸, 免疫排斥反应低, 表现出良好的细胞相容性^[17]。Nettles 等^[18]的研究表明, 由五肽重复单元的 ELP 具备促进软骨细胞的增殖、黏附及迁移的作用。进一步在 NIH/3T3 细胞模型中测试发现, 在实验浓度下 ELP-MT 对 NIH/3T3 细胞无增殖毒性, 并且可以促进 NIH/3T3 细胞的黏附及迁移, 说明 ELP-MT 具有良好的生物相容性并具有促进修复的潜力。这些特性是未经融合处理的 MT 样本所不能展示出来的。总体而言, 融合的 ELP-MT 不仅具备金属硫蛋白的自由基清除能力, 同时还拥有类弹性蛋白良好的生物相容性、促细胞黏附及迁移等相关特性。本研究为规模化生产 MT 并进一步促进其在化妆品及食品保健领域应用提供了新的实验依据。

REFERENCES

- [1] GE DL, ZHANG L, LONG ZH, CHI CF, LIU HH. A novel biomarker for marine environmental pollution: a metallothionein from *Mytilus coruscus*[J]. *Aquaculture Reports*, 2020, 17: 100364.
- [2] WANG XL, SCHNOOR M, YIN LM. Metallothionein-2: an emerging target in inflammatory diseases and cancers[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2023, 244: 108374.
- [3] CHEN YZ, ZHAO J, YE H, CEYLAN-ISIK AF, ZHANG BF, LIU Q, YANG Y, DONG ML, LUO BJ, REN J. Beneficial impact of cardiac heavy metal scavenger metallothionein in sepsis-provoked cardiac anomalies dependent upon regulation of endoplasmic reticulum stress and ferroptosis but not autophagy[J]. *Life Sciences*, 2024, 336: 122291.
- [4] MACKAY EA, OVERNELL J, DUNBAR B, DAVIDSON I, HUNZIKER PE, KÄGI JH, FOTHERGILL JE. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 218(1): 183-194.
- [5] 吕新芳, 毛伟腾, 滑朝阳, 李玉春. 海洋无脊椎动物金属硫蛋白研究进展[J]. *海洋通报*, 2015, 34(3): 241-246. LÜ XF, MAO WT, HUA ZY, LI YC. A review on the research of metallothionein in marine invertebrates[J].

- Marine Science Bulletin, 2015, 34(3): 241-246 (in Chinese).
- [6] YU XY, LI Y, TIAN XH, ZANG XY, YANG SY, QIAO HH, ZHU CF, MOUSSIAN B, WANG YW. Pb exposure causes non-linear accumulation of Pb in *D. melanogaster* controlled by metallothionein B and exerts ecological effects[J]. Science of the Total Environment, 2023, 900: 165680.
- [7] MAARMAN GJ. Pulmonary arterial hypertension and the potential roles of metallothioneins: a focused review[J]. Life Sciences, 2018, 214: 77-83.
- [8] MERLOS RODRIGO MA, JIMENEZ JIMEMEZ AM, HADDAD Y, BODOOR K, ADAM P, KRIZKOVA S, HEGER Z, ADAM V. Metallothionein isoforms as double agents-their roles in carcinogenesis, cancer progression and chemoresistance[J]. Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy, 2020, 52: 100691.
- [9] SAMUEL MS, DATTA S, KHANDGE RS, SELVARAJAN E. A state of the art review on characterization of heavy metal binding metallothioneins proteins and their widespread applications[J]. Science of the Total Environment, 2021, 775: 145829.
- [10] HÜBNER C, HAASE H. Interactions of zinc- and redox-signaling pathways[J]. Redox Biology, 2021, 41: 101916.
- [11] 曹慧娟, 徐君辉, 邹俊杰, 张宾, 孙继鹏. 毕赤酵母发酵表达金属硫蛋白的制备及活性[J]. 现代食品科技, 2018, 34(7): 149-154.
- CAO HJ, XU JH, ZOU JJ, ZHANG B, SUN JP. Preparation and activity of metallothionein from the fermented yeast (*Pichia pastoris*)[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(7): 149-154 (in Chinese).
- [12] 官丽莉, 陈昱, 朱栋, 韩怡来, 崔琪, 李海燕, 李校堃, 姜潮. oleosin-MT 融合蛋白在拟南芥中的表达及鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(10): 155-161.
- GUAN LL, CHEN Y, ZHU D, HAN YL, CUI Q, LI HY, LI XK, JIANG C. Expression and identification of oleosin-MT fusion protein in *Arabidopsis*[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2015, 43(10): 155-161 (in Chinese).
- [13] 刘阳, 彭翠, 吴彦辰, 邓夕莞, 毛新芳, 刘忠渊. 盐穗木金属硫蛋白 HcMT 的体外自由基清除活性及抗氧化能力[J]. 中国生物工程杂志, 2022, 42(9): 17-26.
- LIU Y, PENG C, WU YC, DENG XW, MAO XF, LIU ZY. Free radical scavenging activity and antioxidant capacity of metallothionein HcMT from *Halostachys caspica in vitro*[J]. China Biotechnology, 2022, 42(9): 17-26 (in Chinese).
- [14] SULEMAN A, SHAKOORI AR. Evaluation of physiological importance of metallothionein protein expressed by *Tetrahymena cadmium* metallothionein 1 (TMCd₁) gene in *Escherichia coli*[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2012, 113(5): 1616-1622.
- [15] HE YJ, MA WL, LI YJ, LIU JP, JING WX, WANG L. Expression of metallothionein of freshwater crab (*Sinopotamon henanense*) in *Escherichia coli* enhances tolerance and accumulation of zinc, copper and cadmium[J]. Ecotoxicology, 2014, 23(1): 56-64.
- [16] VARANKO AK, SU JC, CHILKOTI A. Elastin-like polypeptides for biomedical applications[J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2020, 22: 343-369.
- [17] YANG SS, WEI SL, MAO Y, ZHENG HX, FENG JT, CUI JH, XIE X, CHEN FL, LI H. Novel hemostatic biomolecules based on elastin-like polypeptides and the self-assembling peptide RADA-16[J]. BMC Biotechnology, 2018, 18(1): 12.
- [18] NETTLES DL, KITAOKA K, HANSON NA, FLAHIFF CM, MATA BA, HSU EW, CHILKOTI A, SETTON LA. *In situ* crosslinking elastin-like polypeptide gels for application to articular cartilage repair in a goat osteochondral defect model[J]. Tissue Engineering Part A, 2008, 14(7): 1133-1140.
- [19] XING L, WU W, ZHOU BH, LIN ZL. Streamlined protein expression and purification using cleavable self-aggregating tags[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10: 42.
- [20] BAHNIUK MS, ALSHEMEMRY AK, UNSWORTH LD. High-yield recombinant expression and purification of marginally soluble, short elastin-like polypeptides[J]. BioTechniques, 2016, 61(6): 297-304.
- [21] LIN CY, LIU JC. Incorporation of short, charged peptide tags affects the temperature responsiveness of positively-charged elastin-like polypeptides[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2019, 7(34): 5245-5256.
- [22] ZHANG J, MA L, ZHANG SQ. Expression and purification of soluble human APRIL in *Escherichia coli* using ELP-SUMO tag[J]. Protein Expression and Purification, 2014, 95: 177-181.
- [23] MULLERPATAN A, CHANDRA D, KANE E, KARANDE P, CRAMER S. Purification of proteins using peptide-ELP based affinity precipitation[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 309: 59-67.
- [24] GILROY CA, ROBERTS S, CHILKOTI A. Fusion of

- fibroblast growth factor 21 to a thermally responsive biopolymer forms an injectable depot with sustained anti-diabetic action[J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 277: 154-164.
- [25] MOZHDEHI D, LUGINBUHL KM, SIMON JR, DZURICKY M, BERGER R, VAROL HS, HUANG FC, BUEHNE KL, MAYNE NR, WEITZHANDLER I, BONN M, PAREKH SH, CHILKOTI A. Genetically encoded lipid-polypeptide hybrid biomaterials that exhibit temperature-triggered hierarchical self-assembly[J]. *Nature Chemistry*, 2018, 10: 496-505.
- [26] DESPANIE J, DHANDHUKIA JP, HAMM-ALVAREZ SF, MacKAY JA. Elastin-like polypeptides: therapeutic applications for an emerging class of nanomedicines[J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 240: 93-108.
- [27] SHAHPIRI A, MOHAMMADZADEH A. Mercury removal by engineered *Escherichia coli* cells expressing different rice metallothionein isoforms[J]. *Annals of microbiology*, 2018, 68(3): 145-152.
- [28] HE YJ, WANG L, MA WL, LU XX, LI YL, LIU JP. Secretary expression, immunoaffinity purification and metal-binding ability of recombinant metallothionein (ShMT) from freshwater crab *Sinopotamon henanense*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 169: 457-463.
- [29] LI XF, REN ZM, WANG L, MA WL. Genetic modifications of metallothionein enhance the tolerance and bioaccumulation of heavy metals in *Escherichia coli*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 222: 112512.
- [30] SHATALIN YV, KOPYAKOVA MI, SHUBINA VS. Modulation of adhesion and migration of NIH/3T3 cells in collagen materials by taxifolin derivatives[J]. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2023, 17(1): S85-S93.
- [31] McGARRY K, SEFAT E, SUH TC, ALI KM, GLUCK JM. Comparison of NIH 3T3 cellular adhesion on fibrous scaffolds constructed from natural and synthetic polymers[J]. *Biomimetics*, 2023, 8(1): 99.
- [32] WU IC, LIOU JW, YANG CH, CHEN JH, CHEN KY, HUNG CH. Self-assembly of gelatin and collagen in the polyvinyl alcohol substrate and its influence on cell adhesion, proliferation, shape, spreading and differentiation[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2023, 11: 1193849.
- [33] KORKOLA NC, STILLMAN MJ. Structural motifs in the early metallation steps of Zn(II) and Cd(II) binding to apo-metallothionein 1a[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2024, 251: 112429.
- [34] LIU YJ, YAO JL, JIANG BY, YUAN R, XIANG Y. Metallo-base pair-mediated DNA probe for label-free, amplified and catalytic electrochemical detection of metallothionein[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2024, 401: 134895.
- [35] KRĘŻEL A, MARET W. The bioinorganic chemistry of mammalian metallothioneins[J]. *Chemical Reviews*, 2021, 121(23): 14594-14648.
- [36] ESSIG YJ, LESZCZYŚYŃ OI, ALMUTAIRI N, HARRISON-SMITH A, BLEASE A, ZEITOUN-GHANDOUR S, WEBB SM, BLINDAUER CA, STÜRZENBAUM SR. Juggling cadmium detoxification and zinc homeostasis: a division of labour between the two *C. elegans* metallothioneins[J]. *Chemosphere*, 2024, 350: 141021.
- [37] 马文丽, 和柳芝, 杨月, 李玉英, 王兰. TAT介导的金属硫蛋白的穿膜效应及对细胞氧化损伤的修复作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(9): 1266-1272. MA WL, HE LZ, YANG Y, LI YY, WANG L. Cell-penetrating effects and repair of cell oxidative damage of TAT-metallothionein fusion proteins[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 37(9): 1266-1272 (in Chinese).
- [38] SEKHAR K, PRIYANKA B, REDDY VD, RAO KV. Metallothionein 1 (CeMT1) of pigeonpea (*Cajanus cajan*, L.) confers enhanced tolerance to copper and cadmium in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2011, 72(2): 131-139.
- [39] SAUGE-MERLE S, LECOMTE-PRADINES C, CARRIER P, CUIÑÉ S, DUBOW M. Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(8): 918-924.
- [40] MA WL, LI XF, WANG Q, REN ZM, WANG L. Tandem oligomeric expression of metallothionein enhance heavy metal tolerance and bioaccumulation in *Escherichia coli*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 181: 301-307.

(本文责编 陈宏宇)