

# 金属硫蛋白的研究进展

李婷婷<sup>1,2</sup>, 宗婧婧<sup>1,2</sup>, 高学慧<sup>1,2</sup>, 陈雪昌<sup>2,3\*</sup>, 孟春英<sup>2,3</sup>, 张小军<sup>2,3</sup>, 李乐<sup>4</sup>

(1. 浙江海洋大学, 浙江舟山 316021; 2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江舟山 316021; 3. 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室, 浙江舟山 316021; 4. 中国水产科学研究院, 北京 100141)

**摘要** 金属硫蛋白(MT)是一类富含半胱氨酸、具有金属结合特性、广泛存在于动物、植物、微生物体内一类低分子量多功能诱导性蛋白。MT具有清除自由基、调节生物体内微量元素浓度、参与重金属的解毒的作用,参与激素的调节、细胞代谢的调节,在细胞增殖分化控制中都有重要作用。就金属硫蛋白的理化性质、提取纯化技术、检测技术、生物学功能等研究进展及应用前景进行综述,以期为其开发应用提供参考依据。

**关键词** 金属硫蛋白;理化性质;分离纯化;检测技术;应用前景

**中图分类号** Q51 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)25-0015-04

## Research Progress of Metallothionein

LI Ting-ting<sup>1,2</sup>, ZONG Jing-jing<sup>1,2</sup>, GAO Xue-hui<sup>1,2</sup> et al (1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316021; 2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan, Zhejiang 316021)

**Abstract** Metallothionein (MT) is a low molecular weight multifunctional induced protein, which is rich in cysteine, has metal binding properties, and widely distributes in animals, plants and microorganisms. MT can scavenge free radicals and plays important roles in modulating concentrations of trace elements and detoxification of heavy metals. In addition, MT is also involved in the regulation of hormonal and cell metabolism, the control of cell differentiation and proliferation. The research progress and application prospects of metallothionein physicochemical properties, extraction and purification techniques, detection techniques, biological functions were reviewed to provide reference for its development and application.

**Key words** Metallothionein; Physicochemical properties; Extraction and purification; Detection techniques; Application prospect

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类广泛存在于生物中的低分子量(6~7 kD)、无芳香族氨基酸、富含金属与半胱氨酸(Cys 20%~30%)的独特生物学特性的金属结合蛋白<sup>[1]</sup>。1957年,美国科学家 Margoshes 和 Vallee 最早从马肾中分离得到金属硫蛋白,继 1975 年 Prinz 从酿酒酵母中分离得到 Cu-MT 后,1977 年科学家又从大豆的根中分离出富含 Cd<sup>2+</sup> 的类金属硫蛋白<sup>[2-3]</sup>。金属硫蛋白中大量巯基赋予了其螯合重金属离子功能及重金属解毒作用,同时 MT 清除自由基的能力明显强于超氧化物歧化酶和谷胱甘肽,并调节生物体内微量元素浓度,调节细胞代谢、增殖分化,在食品、医药、保健、环境、化妆品、生物工程等领域中应用广泛<sup>[4-5]</sup>。近年来,MT 由于独特的生物学功能,逐渐受到重视并成为研究的热点。就金属硫蛋白的理化性质、提取纯化方法、最新检测技术、生物学功能等研究进展及应用前景进行综述,以期为其开发应用提供参考依据。

## 1 金属硫蛋白的理化性质

**1.1 组成** 金属硫蛋白有独特的组成和性质,先前研究发现 MT 进化具有高度保守性,根据金属含量及氨基酸组成的不同可将金属硫蛋白分为 MT-I、MT-II、MT-III 及 MT-IV 4 种亚型结构<sup>[6]</sup>。近来研究发现,不同生物体内提取出的 MT 分子的形状大小相差甚小,氨基酸序列同源性相对较高。MT 的相对分子量为 6~7 kD,分子中含有 61 个氨基酸,大部分 MT 含有 20 个 Cys,少数含有 21 个 Cys,且易与重金属离

子络合<sup>[7]</sup>。MT 的高级结构主要有 2 个独立的结构域组成,即含 4 个金属离子结合位点的  $\alpha$  域(羧基端)和含有 3 个金属离子结合位点的  $\beta$  域(氨基端)<sup>[8-9]</sup>,整个分子呈哑铃状,这种结构使 MT 具有很好的热稳定性。近年来, Duncan 等<sup>[10]</sup>综合利用核磁共振(nmR)、质谱仪(MS)技术及 X 射线衍射技术,发现利用 Cd 诱导哺乳动物金属硫蛋白, $\alpha$  域能够结合 Cd<sup>2+</sup> 达 5 个以上。

**1.2 等电点** 电泳的方法可以确定蛋白质的等电点,金属硫蛋白等电点 pI 一般在 4 左右,低 pH 值下较稳定。哺乳动物 MT 的 pI 范围在 3.9~4.6,现有的水生生物 MT 的 pI 通常在 3.5~6.0 范围内<sup>[11]</sup>。蛋白质在等电点时,因为没有相同电荷而互相排斥的影响,溶解度最小,极易沉淀析出,因此可以根据蛋白质带电性质的差异、形状大小的不同通过电泳的方法分离纯化金属硫蛋白。

**1.3 可诱导性** 金属硫蛋白作为一种应激蛋白,具有显著的可诱导性,可以采用物理或者化学方法对生物体进行诱导产生 MT。最常用的方法是重金属诱导,许多金属例如 Hg、Ag、Cu、Cd、Zn 等都能诱导 MT 的合成<sup>[12]</sup>。一些激素如糖皮质激素、肾上腺激素、胰高血糖素和环磷酸腺苷(cAMP)等通过增加肝脏 MT-mRNA 的水平诱导 MT 的合成。日常生活中,生物体会在各种外在刺激条件下引起 MT 合成增加,从而防卫保护机体<sup>[13]</sup>。安建平<sup>[12]</sup>通过不同浓度 Cd<sup>2+</sup> 诱导黄瓜产生金属硫蛋白,1 000 mg/L Cd<sup>2+</sup> 诱导黄瓜幼叶组织产生金属硫蛋白的产量最高,可达 2.62  $\mu\text{g/g}$ 。目前,大多数学者采用重金属诱导 MT 合成,但是重金属对生物体有害,且较难去除。郭祥学<sup>[13]</sup>用 Zn 诱导蓝藻提取分离出类金属硫蛋白组分,为金属硫蛋白功能深入研究提供新的途径。

**基金项目** 国家重点研发项目(2016YFF0202304)。

**作者简介** 李婷婷(1994—),女,河南周口人,硕士研究生,研究方向:水产品加工与质量安全。\*通讯作者,教授级高级工程师,博士,从事水产品质量安全及标准化方向的研究。

**收稿日期** 2018-04-14

**1.4 稳定性与光谱特性** MT结合金属能力的顺序为  $Hg^{2+} > Ag^+ > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Zn^+$ , 且与  $Cd^{2+}$  或者  $Ag^+$  结合后, 很难被其他金属置换<sup>[14]</sup>。在酸性条件下, MT上结合的金属可以脱去, 去金属的硫蛋白在低pH值下较稳定。中性条件下, 硫蛋白分子间发生二硫交联, 进而形成大分子聚合物, 生理活性发生一些变化。因此, 环境中pH的高低, MT结合金属与否, 以及结合金属的种类直接影响MT的稳定性和存在形式<sup>[15]</sup>。

MT的特征吸收峰与其氨基酸组成和所结合的金属种类密切相关, 一般蛋白质在280nm处有特征吸收峰, 由于MT不含芳香族氨基酸且金属通过硫酯键与蛋白质结合因而具有特殊吸收光谱。MT与不同金属结合产生的不同的特征吸收峰为: Zn-MT 225nm, Cd-MT 250nm, Cu-MT 275nm, Hg-MT 300nm, 因此可以根据吸收峰的不同对MT进行分离鉴定<sup>[16-17]</sup>。金属硫蛋白在脱掉金属离子后, 于190nm处有一明显的键吸收峰。

## 2 金属硫蛋白的提取和分离纯化

**2.1 金属硫蛋白的提取技术** 关于MT的结构与功能的研究是当今化学、生物学和临床医学等领域的重要课题之一, 随着研究工作的不断深入, 对MT的用量和纯度的要求越来越高。匀浆离心法是提取海洋生物中MT最常采用的方法, 提取剂选择性性质稳定且与生理体液相容性好的Tris-HCl(三羟甲基氨基甲烷, 简称Tris)缓冲溶液。不同浓度、pH的提取液, 以及样本与缓冲液的质量体积比、匀浆液离心转速大小, 时间长短, 都会对MT的提取率产生影响。因此, 不同的方法, 提取的MT含量和纯度等也不尽相同<sup>[18]</sup>。王俊坤<sup>[19]</sup>通过响应面优化分析, 改进鱼肝中MT提取工艺, 当提取剂Tris-HCl缓冲液pH在8.0~8.5, 提取温度在45~52℃, 缓冲液的浓度为0.25mol/L, 物料比为1:7, 提取时间为1h, 可获得最佳提取效果。

**2.2 金属硫蛋白的分离纯化技术** 为深入研究金属硫蛋白结构和功能特性及其相关性, 需要对金属硫蛋白提取液进行浓缩处理。在蛋白的纯化过程中, 一次性处理较多样品时, 可以采用超滤法进行脱盐浓缩, 不但耗时短, 浓缩的效率高, 而且可降低蛋白质的损失率<sup>[20]</sup>。

目前, 金属硫蛋白分离纯化技术主要有: 膜分离技术、高效液相色谱<sup>[21]</sup>、凝胶过滤色谱、离子交换色谱<sup>[22]</sup>、毛细管电泳法<sup>[23]</sup>等。最常用的方法是凝胶过滤和离子交换技术相结合方法。凝胶过滤法的缺点是不能将MT的亚型分开, 所以一般采用高效液相色谱法(HPLC)对MT进行微量分离。高效液相色谱具有分离效果显著、精密度与灵敏度佳、重现性好等优点, 对于复杂成分的分离鉴定更有应用价值。ICP-MS技术干扰较少, 精密度高, 分析速度快, 检出限较低, 动态线性范围宽, 并且可提供准确的同位素信息。高效液相色谱法(HPLC)与质谱仪(ICP-MS)联用, 不仅可以微量MT分离, 还能将MT亚型较好地分离, 从而获得较高纯度的金属硫蛋白<sup>[24]</sup>。

## 3 金属硫蛋白的检测技术

基于金属硫蛋白的理化特性、生物特性以及免疫学特

性, 主要检测方法有: 金属亲和层析、巯基检测(电化学法和分光光度法)、蛋白质检测(免疫法和色谱法)。兔肝Zn-MT是常用的MT标准品。

**3.1 金属亲和层析法** 金属亲和层析法(金属饱和法)主要是根据MT热稳定性和对不同金属的亲合力的差异性建立, 间接测定MT中金属含量的增加量, 从而计算出MT的含量。该法迅速而简单, 是测定MT最普遍使用较成熟的方法, 但是金属除与MT结合外, 可能会结合其他干扰性的小分子化合物, 使测定结果不够准确<sup>[25]</sup>, 如汞饱和法中  $Hg^+$  除了与MTs结合, 也会结合其他小分子量化合物。

**3.2 电化学法** 电化学法原理是根据巯基(-SH)在汞滴电极表面产生的氧化还原反应引起电位变化建立的, 通过测定巯基含量间接定量金属硫蛋白含量。它打破了金属饱和法的限制, 具有特异性好、灵敏度高等优点。目前, 主要测定方法有示差脉冲伏安法(DPV)<sup>[25]</sup>、示差脉冲极谱法(DPP)、阳极溶出伏安法(ASV)等<sup>[26]</sup>。Oliveria等<sup>[27]</sup>采用示差脉冲极谱法测定欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla* L)不同部位的金属硫蛋白含量, 回收率范围在97%~103%, 准确度较高。电化学法的缺点是对待测样品纯度要求较高, 当样品的含量较低时灵敏度差, 其他含巯基官能团的蛋白质化合物存在会影响分析结果<sup>[28-29]</sup>。

**3.3 分光光度法** 分光光度法是根据巯基与5,5-二硫硝基苯甲酸(DTNB)反应产生的一种黄色物质硫代硝基苯甲酸阴离子(TNBA), TNBA在波长412nm处具有强吸收峰。该方法对低含量MT灵敏度较差, Viarengo等<sup>[30]</sup>在传统方法的基础上进行改进, 将2mol/L NaCl加入DTNB试剂中, 2mol/L NaCl可使MT结构改变暴露-SH, 有利于样本与DTNB反应。

**3.4 免疫分析法** 金属硫蛋白分子量较低, 利用其免疫特异性制成抗体单体来检测金属硫蛋白的含量。免疫法适用于微量检测, 最大优点是灵敏度高、特异性好, 灵敏度在pg/mL级, 对于金属硫蛋白含量低的样品仍具有较好的检测结果。近年来, 学者们先后建立蛋白质印迹分析法、放射性免疫监测法和酶联免疫吸附法<sup>[31]</sup>。免疫分析法缺点: 不能实现蛋白同分异构体的定量分析, 并且需要高特异性抗体来源, 由于抗体比较难制备等原因影响该法发展。

**3.5 色谱分析法** 一般蛋白质在280nm处有特征吸收峰, 而金属硫蛋白通过硫酯键与蛋白质结合具有特殊吸收光谱, 通过圆二色谱法(CD)或磁圆二色谱(MCD)测量其在220~350nm的吸光度进而定性定量MT。在分析不同亚型的MT时, 学者一般采用HPLC分离技术与AAS、MS、FD等检测器联用, 通过MT标准样品进行对照, 确定待测样品MT的浓度, 灵敏度低于1μg/mL。Park等<sup>[32]</sup>运用RP-HPLC-FD方法测定狼鲈(*Dicentrarchus labrax*)肝组织中MT总量, 测定结果相比分光光度法高出1.30~1.95倍, 更准确地反映肝组织MT含量。

## 4 金属硫蛋白的生物学功能研究现状

**4.1 解除或降低重金属的毒害作用** 重金属元素具有蓄积

毒性,当重金属在机体蓄积达到一定量后,会导致重金属中毒。研究表明,当机体出现重金属急性中毒后,会出现恶心、呕吐等症状。机体长期处于重金属的环境,心血管系统、神经系统和免疫系统等会受到严重伤害。金属硫蛋白中大量巯基赋予其螯合重金属离子功能,进而解除重金属对大脑、肝、肾等重要器官的损伤。有关 MT 对重金属的解毒作用的报道已经有很多。张敬旭等<sup>[33]</sup>研究表明,铅引起的脑组织脂质过氧化反应的增强与 MT 的缺失有关,并引发铅的神经发育毒性。MT 结合金属能力的顺序为  $Hg^{2+} > Ag^{+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{+}$ ,且 MT 与  $Cd^{2+}$  或者  $Ag^{+}$  螯合后,其他金属将很难置换  $Cd^{2+}$  和  $Ag^{+}$ <sup>[34]</sup>。MT 具有抗酶解的优点,能够被人体完整吸收。MT 不但对重金属元素有抑制和解毒的作用,在基本元素的调节中也起重要作用,是目前临床上最理想的生物螯合解毒剂<sup>[35]</sup>。

**4.2 清除自由基和抗氧化作用** 机体在新陈代谢过程中会产生一些具有强氧化性的化合物,如羟基自由基、氧自由基等,这些自由基会损害机体的组织和细胞,进而引发健康问题,并出现衰老等生理现象。MT 中的巯基能保护细胞器及其他重要的生物物质,如酶类、DNA 等免受自由基的侵害<sup>[34]</sup>。MT 清除自由基能力较强,清除氧自由基的能力是谷胱甘肽的 25 倍,清除羟基自由基的能力是超氧化物歧化酶的 10 000 倍<sup>[36]</sup>。Akashi 等<sup>[37]</sup>和 Wong 等<sup>[38]</sup>研究发现,大米和西瓜中的重组 MT 可以有效地清除巯基自由基。

金属硫蛋白是体内最佳的抗氧化调节剂,抗氧化特性一直备受科学家的关注。MT 可以通过结合或释放金属离子来调节自由基的水平,对由于金属离子调节机制稳态失衡对机体造成的氧化损伤起到一定预防和修复作用<sup>[39]</sup>。MT 易被多种机制诱导产生,防止细胞因氧化所造成的炎性浸润,显著提高机体的免疫调节能力及抗氧化能力。邹学敏等<sup>[40]</sup>将 MT 注射到铬中毒小鼠发现,小鼠肝组织 SOD 活性和丙二醛(MDA)含量能够得到有效提高,MT 还可以较好地修复铬引起的肝脏氧化损伤,说明 MT 对机体具有保护和修护的双重功效。

**4.3 抗肿瘤功能** 癌症是人类的头号杀手,现代医学迫切需求新型有效的抗癌药物,MT 抗肿瘤的生物学功能已经引起人们的关注。研究发现 MT 参与肿瘤细胞的分化、增生及凋亡,同时 MT 的重金属解毒,抗自由基作用可保护细胞抵御致癌物质的作用。在一些肿瘤组织中,可检测到 MT 的过度表达,张燕等<sup>[41]</sup>研究发现,MT 在机体中表达与肿瘤组织的分化有一定联系,MT 的表达与肿瘤组织的分化成反比,进而说明 MT 的抗肿瘤作用。MT 参与肿瘤细胞的分化和增生,降低癌症发生的概率,并能有效减轻抗肿瘤药物毒副作用<sup>[42]</sup>。细胞受致癌物刺激后会产生一系列的保护机制来清除致癌物,MT 作为一种细胞凋亡抑制剂,其水平增高可能是这些保护机制之一<sup>[43]</sup>。

**4.4 抗辐射** 金属硫蛋白组分具有一定的抗电离辐射的能力,各种电离辐射作用下大量的自由基会在机体产生,生物体功能将直接或间接受到损伤。研究发现,小鼠经过一次性

强辐射电离辐射后,可诱导小鼠肝脏 MT-mRNA 的转录,从而显著延长小鼠存活时间。此外,进入生物体内的半胱氨酸能被 MT 大量吸收,作为二硫键修复原料,修复生物体内受损的细胞<sup>[44]</sup>。

## 5 金属硫蛋白的应用现状

**5.1 金属硫蛋白在医学上的应用** 金属硫蛋白的抗病作用已经被多次证明,在治疗癌症、血管疾病、重金属中毒及营养缺乏症等方面功效显著<sup>[45]</sup>。金属硫蛋白参与癌症细胞的增殖、分化、凋亡等过程,在肿瘤预防和治疗中,MT 的重金属解毒、清除自由基功能可抵御重金属和烷化剂对细胞的致癌、致突变作用。MT 与某些癌症细胞的增殖活性密切相关,因此可作为肿瘤治疗的潜在靶标,并且能有效减轻放射疗法的副作用,保护正常细胞在放疗过程中免受侵害。金属硫蛋白不仅在肿瘤细胞中表达异常,而且能抑制其他重大疾病的发生与发展。研究表明,金属硫蛋白具有抑制胃溃疡的形成、阻止脂质过氧化、增强吞噬细胞、抵抗辐射和光损伤、提高免疫力、促进细胞新陈代谢等功能特性<sup>[46]</sup>。

**5.2 金属硫蛋白在化妆美容品中的应用** MT 可作为化妆品的添加剂,安全性能好,具有抗衰老、清除色素、减轻皱纹、防治皮炎的作用,消除化学型化妆品对人体的毒副作用。MT 与 SOD 相比具有分子量小、易被机体吸收、清除羟自由基能力强、热稳定性高、半衰期长等优点,且 MT 还可以拮抗紫外线、辐射等。由于 MT 为生物制剂,且为人体所固有,因此可用于美容护肤。

**5.3 金属硫蛋白对重金属中毒的检测和环境监测** 由于 MT 广泛存在动物、植物、微生物中,且可与重金属结合的性质,不仅可以用于监测海洋环境重金属污染状况,也可作为衡量环境重金属污染状况的一个生物指标,除此之外,还可用于重金属的回收和清除环境中的重金属污染等方面。MT 也将有望通过基因工程技术来治理重金属污染,如通过植物自身 MT 的表达或外源基因导入来实现治理土壤的重金属污染,另一方面通过水生生物富集作用减少水体中的重金属含量,从而维持生态系统稳定。Baudrimont 等<sup>[47]</sup>通过监测牡蛎鳃中 MT 含量衡量海域中重金属的污染状况;Thomas 等<sup>[48]</sup>将酵母 MT 基因插入烟草基因序列中,发现转基因烟草吸收污染土壤中  $Cu^{2+}$  的能力得到显著提高。Amiard 等<sup>[49]</sup>研究认为,贻贝体内的 MT 水平与环境中钒的含量有显著相关性,因此 MT 可作为海洋中钒污染的生物监测标志物。

**5.4 金属硫蛋白在水产养殖、加工中的应用** MT 能作为饲料添加剂用于水产养殖中,不仅可以增强水生生物的免疫力和去除重金属,还能用作生长激素促进水生生物的生长繁殖<sup>[50]</sup>。在水产品加工过程中,根据 MT 与重金属的螯合功能有望将 MT 制成微型颗粒用于水产品中重金属的去除<sup>[51]</sup>。

## 6 结语

随着 MT 逐渐走入人们的视野,MT 独特的生物学功能吸引学者不断地深入研究。在应对大量 MT 产品需求时,快速得到纯度高的 MT 标准品开发技术成为关键。不同的分离纯化方法又决定着 MT 产品的纯度和提取率,所以根据不

同的来源及产品采取不同的分离纯化方法变得至关重要。目前,对其研究仍有很大发展空间,MT独特的生物学作用机制仍处于推测和假说阶段,如何快速分离出纯度高的MT方法仍有待发掘。因此,深入研究MT,在不久的将来MT必将在食品、医药、保健、环境、化妆品、生物工程等领域中发挥更大的作用,并拥有更广阔的市场前景。

## 参考文献

- [1] ROMEROY-LSART N, VAŠÁK M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins[J]. J Inorg Biochem, 2002, 88(3/4): 388-396.
- [2] 茹炳根, 潘爱华, 黄秉乾, 等. 金属硫蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(4): 254-259, 289.
- [3] 郝守进, 茹炳根. 金属硫蛋白及其在食品工业应用中的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(8): 62-67.
- [4] 徐玉凤, 李一勤, 刘进元. 水稻3型金属硫蛋白基因的分离和表达研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 12931-12933.
- [5] 李明春, 杨昭, 张飙, 等. 假丝酵母类金属硫蛋白的分离、纯化及功能研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2003, 36(3): 123-128.
- [6] 于颖敏. 金属硫蛋白的结构、性能和应用[J]. 中国石油大学胜利学院报, 2006, 20(4): 22-24.
- [7] NATH R, KAMBADUR R, GULATI S, et al. Molecular aspects, physiological function, and clinical significance of metallothioneins[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1988, 27(1): 41-85.
- [8] DUNCAN K E R, KIRBY C W, STILLMAN M J. Metal exchange in metallothioneins: A novel structurally significant Cd<sub>2</sub> species in the alpha domain of human metallothionein[J]. FEBS J, 2008, 275(9): 2227-2239.
- [9] 刘安玲, 朱必凤. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 韶关学院学报(自然科学版), 2001, 22(3): 86-91.
- [10] DUNCAN K E R, KIRBY C W, STILLMAN M J. Metal exchange in metallothioneins: A novel structurally significant Cd-5 species in the alpha domain of human metallothionein[J]. FEBS J, 2008, 275(9): 2227-2239.
- [11] 徐雨霞. 兔肝锌金属硫蛋白(MT)的诱导方法和制备工艺研究[D]. 长沙: 湖南中医学院, 2002.
- [12] 安建平, 王廷璞, 邹亚丽, 等. 镉诱导黄瓜金属硫蛋白的分离、纯化和鉴定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(18): 7514-7515.
- [13] 郭祥学, 陈正佳, 但春涛, 等. 聚球藻类金属硫蛋白的纯化及部分性质的研究[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(6): 699-703.
- [14] 王磊. 镉胁迫对泥鳅的毒理效应及金属硫蛋白基因表达的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2012.
- [15] 闫海亮, 张晶, 丁洪浩, 等. 金属硫蛋白及其诱导、分离纯化研究进展[J]. 饲料工业, 2007, 28(24): 52-54.
- [16] 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.
- [17] NORDBERG M. Metallothioneins: Historical review and state of knowledge[J]. Talanta, 1998, 46(2): 243-254.
- [18] FERNANDES D, ZANUY S, BEBIANNO M J, et al. Chemical and biochemical tools to assess to pollution exposure in cultured fish[J]. Environmental pollution, 2008, 152(1): 138-146.
- [19] 王俊坤. 海洋源金属硫蛋白的提取、纯化和检测[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [20] 王巍, 谢波, 刘芳, 等. 九州虫草中金属硫蛋白的诱导、提纯及性质研究[J]. 安徽医药, 2013, 17(3): 373-375.
- [21] 张淑红, 冯硕, 李正平, 等. 高效液相色谱(HPLC)分离和检测蛋白质[J]. 河北农业大学学报, 2003, 26(S1): 148-151.
- [22] 王雪, 赵海峰, 吕明, 等. 鼠肝中金属硫蛋白的纯化[J]. 生物技术通报, 2010(3): 178-180.
- [23] 邓川, 张玮玮, 燕艳, 等. 毛细管电泳法测定化妆品中的金属硫蛋白[J]. 实验技术与管理, 2012, 29(11): 41-43.
- [24] 李景春. 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.
- [25] ERK M, IVANKOVIC D, RASPOR B, et al. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins[J]. Talanta, 2002, 57(6): 1211-1218.
- [26] MARTÍN-DÍAZ M L, BLASCO J, SALES D, et al. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports[J]. Environmental pollution, 2008, 151(3): 631-640.
- [27] OLIVERIA M, SERAFIM A, BEBIANNO M J, et al. European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure[J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2008, 70(1): 20-26.
- [28] DABRIO M, RODRÍGUEZ A R, BORDIN G, et al. Recent developments in quantification methods for metallothionein[J]. Journal of inorganic biochemistry, 2002, 88(2): 123-134.
- [29] 王达, 葛刚, 吴兰, 等. 金属硫蛋白(MT)的分离纯化与检测技术[J]. 江西科学, 2004, 22(1): 61-65.
- [30] VIARENGO A, PONZANO E, DONDERO F, et al. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic mollusks[J]. Marine environmental research, 1997, 44(1): 69-84.
- [31] RYVOLOVÁ M, KRIZKOVA S, ADAM V, et al. Analytical methods for metallothionein detection[J]. Curr Anal Chem, 2011, 7(3): 243-261.
- [32] PARK J S, CHUNG S, PARK I S, et al. Purification and characterization of metallothionein-like cadmium binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*[J]. Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology & pharmacology, 2002, 131(4): 425-431.
- [33] 张敬旭, 符绍奎, 江河, 等. 金属硫蛋白降低铅致新生仔鼠脑组织的氧化损伤[J]. 工业卫生与职业病, 2003, 29(4): 223-226.
- [34] 张建鹏, 仲燕, 任绪义, 等. 镉诱导大鼠睾丸三种类型细胞和肝脏金属硫蛋白基因表达的研究[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(2): 184-187.
- [35] 张保林, 牟德海, 张建东, 等. 金属硫蛋白吸收与代谢动力学研究[J]. 药物生物技术, 1997, 4(2): 105-108.
- [36] SATO M, BREMNER I. Oxygen free radicals and metallothionein[J]. Free Radic Biol Med, 1993, 14(3): 325-337.
- [37] AKASHI K, NISHIMURA N, ISHIDA Y, et al. Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323(1): 72-78.
- [38] WONG H L, SAKAMOTO T, KAWASAKI T, et al. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRacl in rice[J]. Plant Physiol, 2004, 135(3): 1447-1456.
- [39] JARA-BIEDMA R, GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ R, GARCÍA-BARRERA T, et al. Evolution of metallothionein isoforms complexes in hepatic cells of *Mus musculus* along cadmium exposure[J]. Biomaterials, 2013, 26(4): 639-650.
- [40] 邹学敏, 李梓民, 杨双波, 等. 金属硫蛋白对铬染毒小鼠肝脏氧化损伤的修复作用[J]. 微量元素与健康研究, 2013, 30(6): 1-3.
- [41] 张燕, 肖婷婷, 沈祥春. 金属硫蛋白的功能及药理作用研究进展[J]. 中国药理学报, 2010, 26(6): 821-824.
- [42] 陈洁, 韩亮, 李国跃, 等. 金属硫蛋白的分离纯化技术及功能研究进展[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(5): 565-569.
- [43] 王文君, 吕娜, 尹锐, 等. 金属硫蛋白研究进展[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 13-16.
- [44] 张艳, 杨传平. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 分子植物育种, 2006, 4(S1): 73-78.
- [45] 路浩, 刘宗平, 赵宝玉. 金属硫蛋白生物学功能研究进展[J]. 动物医学研究进展, 2009, 30(1): 62-65.
- [46] 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.
- [47] BAUDRIMONT M, ANDRES S, DURRIEU G, et al. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn[J]. Aquat Toxicol, 2003, 63(2): 89-102.
- [48] THOMAS J C, DAVIES E C, MALICK F K, et al. Yeast metallothionein in transgenic tobacco promotes copper uptake from contaminated soils[J]. Biotechnol Prog, 2003, 19(2): 273-280.
- [49] AMIARD J C, JOURNEL R, BACHELEY H. Influence of field and experimental exposure of mussels (*Mytilus* sp.) to nickel and vanadium on metallothionein concentration[J]. Comp Biochem Phys C, 2008, 147(3): 378-385.
- [50] 许梓荣, 王敏奇. 高剂量锌促进猪生长的机理探讨[J]. 畜牧兽医学报, 2001, 32(1): 11-17.
- [51] 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.