

DTNB比色法测定金属硫蛋白含量

吴云辉¹, 王俊坤^{2,3}, 孙继鹏^{2*}, 曾嘉玲¹

(1. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361100; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005;

3. 中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用5,5'-二硫硝基苯甲酸(DTNB)作为金属硫蛋白(MT)巯基衍生生化试剂, 通过优化反应条件, 应用比色法测定412nm波长处显色产物硫代硝基苯甲酸阴离子(TNBA)的量确定金属硫蛋白含量。结果表明: MT含量在2~15 μg 和10~150 μg 范围内呈良好线性, 线性回归方程分别为 $A_{412\text{nm}}=0.0059C+0.0251$ 和 $A_{412\text{nm}}=0.0052C+0.0201$, 相关系数分别为 $R^2=0.9942$ 和 $R^2=0.9997$, 平均回收率为99.94%($n=6$, $\text{RSD}=0.27\%$), 精密度良好($n=6$, $\text{RSD}=0.7\%$), MT最低定量限可达到2 μg , 从而建立了一种操作简便易行的金属硫蛋白快速检测方法。

关键词: 金属硫蛋白; 5,5'-二硫硝基苯甲酸(DTNB); 测定

Colorimetric Determination of Metallothionein Using DTNB

WU Yun-hui¹, WANG Jun-kun^{2,3}, SUN Ji-peng^{2*}, ZENG Jia-ling¹

(1. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361100, China; 2. Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 3. College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: A colorimetric method for the determination of metallothionein (MT) was established using 5,5'-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as the derivatizing agent and measuring the absorbance of the colored product TNBA at 412 nm. The results showed that a linear relationship of MT was obtained within the concentration range of 2–15 μg and 10–150 μg . The corresponding equations were $A_{412\text{ nm}} = 0.0059C + 0.0251$ ($R^2 = 0.9942$), and $A_{412\text{ nm}} = 0.0052C + 0.0201$ ($R^2 = 0.9997$). The average recovery was 99.94% ($n = 6$, $\text{RSD} = 0.27\%$), with good precision ($n = 6$, $\text{RSD} = 0.7\%$). The limit of detection of the method was 2 μg . In conclusion this study has developed a simple and rapid method to determine MT.

Key words: metallothionein (MT); 5,5'-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB); determination

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)16-0196-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201316039

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种富含半胱氨酸的小分子金属结合蛋白, 其结构在生物进化中高度保守, 分子质量为6000~7000D, 含有61个氨基酸, 其中20个氨基酸为半胱氨酸, 少数含有21个^[1-2]。MT是具有极其重要生理功能的一种天然活性物质, 对多种重金属具有高度亲和性, 可被多种金属(镉、锌、银等)诱导产生, 是体内唯一结合镉的蛋白质, 具有重金属解毒、清除自由基等功效^[3-5]。MT在抗辐射、消炎、心血管系统抗损伤保护剂及与肿瘤细胞的分化和增生等方面的应用潜力备受人们关注^[6-8]。因此, 它在功能食品行业中显示诱人的前景: 1)作为有效的重金属生物脱除剂, 开发适于冶金、采矿等特殊职业疾病的保健食品; 2)作为营养添加剂,

可降低血液黏度、改善血液循环、减少自由基的损伤, 开发抗辐射产品及适于动脉粥样硬化等心血管疾病保健品; 3)因其具有对锌、铜等微量元素的储存、运输和代谢功能, 可以补充生物锌, 有利于缺锌儿童正常生长发育; 4) MT可有效地增强机体的应激反应和抵抗力, 提高人体免疫力和抗衰老能力, 添加到保健品中, 使体弱劳者恢复青春活力^[9]。

在MT长期研究过程中仍存在许多不足, 目前尚没有一个MT的快速标准检测方法, 对MT的测定大多采用镉-血红蛋白饱和法和银饱和法, 该法采用的金属除与MT结合外, 还与其他一些小分子质量化合物结合, 由于利用金属含量间接推算MT含量, 因此特异性较差^[10], 且该法

收稿日期: 2012-08-19

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201205022); 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项(海三科2013014)

作者简介: 吴云辉(1961—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为食品加工与检测。E-mail: wyhxm61@163.com

*通信作者: 孙继鹏(1980—), 男, 博士后, 研究方向为海洋药物与食品化学。E-mail: sunjipeng80@163.com

仅能反映Cd-MT含量, 长期接触重金属Cd对人体不利。酶联免疫吸附方法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)因其灵敏度高, 特异性好, 已开始应用于MT的微量检测, 其检测灵敏度可达1.5ng/mL, 但此法根据不同来源MT需定制特定试剂盒, 且价格较为昂贵^[11-12]。一些衍生试剂如4-氟-7-硫代苯并咪唑铵(SBD-F)、单溴二胺(mBBBr)、4-(氨磺酰)-7-氟-2,1,3-苯并恶二唑(ABD-F)等也可与MT中的巯基反应产生强荧光化合物, 通过高效液相色谱法-荧光检测所生成的衍生化合物可推算MT巯基含量, 此法灵敏度较高, 但较为耗时。本实验采用DTNB比色法测定MT中巯基含量, 以推算MT含量, 该法操作简便易行, 快速直观, 可用于测定生物体中金属硫蛋白的含量。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

5,5'-二硫硝基苯甲酸(DTNB) 中国J&K Science公司; 兔肝金属硫蛋白(MT, 纯度≥99%) 美国Sigma公司; EDTA、盐酸、磷酸盐等其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV1700紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; 电子天平(读数精度0.1mg)、pH计 瑞士Mettler Toledo公司。

1.3 方法

1.3.1 DTNB稳定性

取400μL 5mmol/L DTNB溶液, 分别加入7.6mL pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0的0.1mol/L磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液, pH7.5、8.0、8.5、9.0的0.1mol/L Tris-HCl缓冲液, 每隔2h于412nm波长处测定吸光度, 以考察DTNB在不同pH值条件下的稳定性。

1.3.2 金属硫蛋白巯基含量测定

在试管中分别加入不同体积标准金属硫蛋白溶液(质量浓度为1μg/μL), 加入10μL 1.2mol/L盐酸溶液和200μL 0.1mol/L EDTA, 置暗处反应10min脱去金属, 加入5mmol/L DTNB试剂混匀3min, 使MT与DTNB形成黄色络合物, 用缓冲液稀释至4mL, 在412nm波长处测定紫外吸光度, 定量巯基含量, 以推算金属硫蛋白总量。

2 结果与分析

2.1 波长确定

5mmol/L的5,5'-二硫硝基苯甲酸(DTNB)溶于pH8.0磷酸缓冲溶液, 最大吸收波长为323nm。在pH8.0时, DTNB与含巯基蛋白(PS⁻)相互作用, 生成黄色的硫代硝基苯甲酸阴离子(TNBA), 生成的TNBA在412nm波长处有最大吸收^[13-14]。

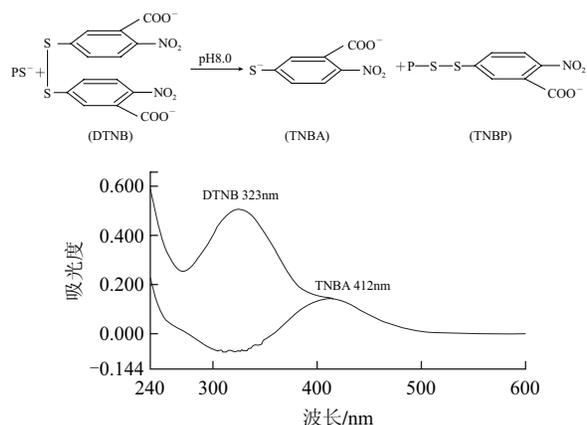


图1 DTNB和TNBA紫外-可见吸收光谱
Fig.1 UV-visible absorption spectra of DTNB and TNBA

2.2 DTNB在不同pH值条件下的稳定性

DTNB在偏酸性溶液中较为稳定(图2a), 当pH值小于4.0, DTNB在24h后, 412nm波长处吸光度基本没有发生变化, DTNB在pH4.0、pH5.0两缓冲液体系, 24h后412nm波长处吸光度略有增加。如图2b, 随着介质pH值的升高, DTNB二硫键逐渐断开, 裂解成TNBA双阴离子, 当pH9.0时, 裂解速率激增。因此, 本实验在采用DTNB作为MT测定的衍生试剂, 为减少DTNB自身降解的影响, 配制DTNB储存液选用pH4.0的磷酸缓冲溶液。

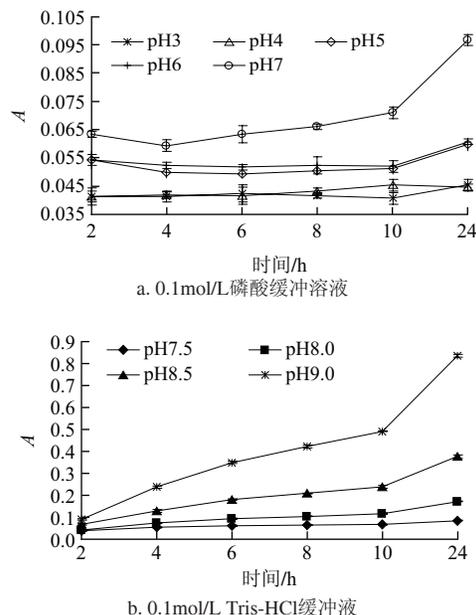


图2 DTNB在不同pH值缓冲液吸光度随时间变化
Fig.2 Effect of buffer pH on the absorbance of DTNB as a function of time

2.3 MT与DTNB反应体系最佳pH值

MT与DTNB反应生成TNBA的量与反应体系最终pH值密切相关, 如图3所示, 随着pH值的升高, 反应体系在412nm波长处吸光度逐渐增加, pH值小于4.0时, 由于硫原子质子化作用, 吸光度降低, 当pH值大于7.0吸光度在

90min内基本保持不变, 达到最大值。因此, 本实验在采用DTNB作为MT测定的衍生生化试剂, 同时为减少DTNB在碱性条件下自身降解的影响, MT与DTNB反应体系最终以pH7.5的0.1mol/L Tris-HCl缓冲液稀释至4mL。

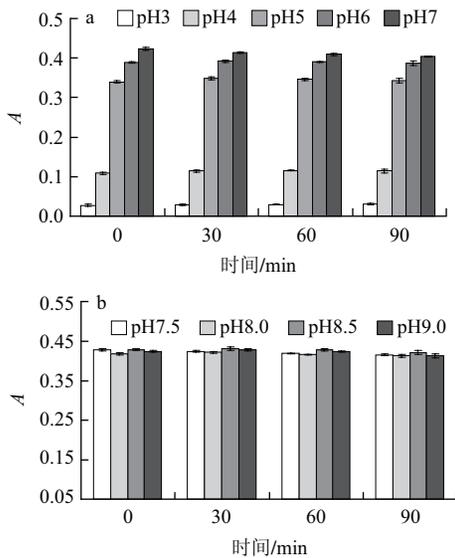


图3 MT与DTNB在磷酸缓冲液(a)和Tris-HCl缓冲液(b)中的吸光度
Fig.3 Effect of buffer type and pH on the absorbance of MT/DTNB as a function of time

2.4 显色物TNBA不同时间稳定性

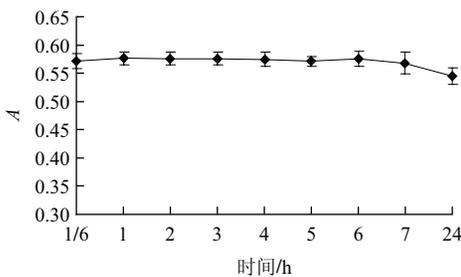


图4 TNBA随时间变化曲线
Fig.4 Temporal stability of TNBA

如图4所示, MT与DTNB在pH7.5的0.1mol/L Tris-HCl缓冲液中, 较短时间内反应生成显色物TNBA, 生成产物TNBA于反应后6h内稳定, 不会因时间的变化而发生变化, 有利于方法的建立。

2.5 MT含量与显色物吸光度线性范围

为了考察MT含量和生成显色物质TNBA在412nm波长处吸光度的线性关系, 分别在40μL 5mmol/L的DTNB中依次加入不同含量的MT标准溶液, 反应后以pH7.5的0.1mol/L Tris-HCl缓冲液稀释至4mL, 并测定412nm波长处吸光度, 结果如图5所示。当DTNB含量一定(40μL×5mmol/L), MT含量小于300μg, 生成的显色物质TNBA随MT含量呈线性增加趋势, MT含量增加到300μg, 生成TNBA的吸光度呈一固定数值。

当衍生生化试剂DTNB为一恒定值时(40μL×5mmol/L), 随着加入MT含量的增加, λ_{max}=412nm波长处吸光度与MT含量呈良好的线性关系。MT含量在10~150μg范围内, 线性回归方程为A_{412nm}=0.0052C+0.0201, R²=0.9997, MT含量在2~15μg范围内, 线性回归方程为A_{412nm}=0.0059C+0.0251, R²=0.9942, MT最低定量限可达到2μg。

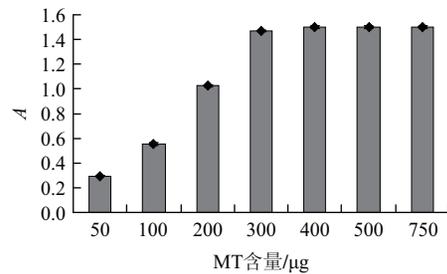


图5 不同含量MT与DTNB反应412nm吸光度
Fig.5 Absorbance at 412 nm against MT amount

2.6 精密度

配制MT标准溶液2.5μg/μL, 分别取标准溶液20μL, 连续吸取6个标准溶液与40μL 5mmol/L DTNB试剂反应, 计算得相对标准偏差(RSD)为0.7%。

表1 精密度测定结果
Table 1 Precision of the corlometric method

次数	1	2	3	4	5	6
吸光度	0.280	0.282	0.280	0.276	0.283	0.279
RSD/%	0.7					

2.7 鱼肝脏MT含量测定

参考孟凡平等^[15]提取菲律宾蛤仔金属硫蛋白的方法, 提取鱼肝脏金属硫蛋白, 按照本方法进行含量测定, 并与采用文献[16-17]HPLC-荧光法测定结果进行比较, 结果见表2。

表2 鱼肝脏中MT含量分析结果
Table 2 Comparison between the corlometric method and HPLC with fluorescence detection used for the assay of MT in fish liver

方法	化合物	回归方程	相关系数(R ²)	MT含量/(mg/g)
HPLC-荧光法	MT	I=42.233C-0.6447	0.9995	0.057±0.0015
DTNB比色法	MT	A _{412nm} =0.0059C+0.0251	0.9942	0.061±0.0024

注: I为峰面积/10⁶EU; A_{412nm}为吸光度; C为MT含量/μg。

从表2可知, 采用本方法测定鱼肝脏中MT含量为0.061mg/g, 与HPLC-荧光法测定结果0.057基本吻合, 在MT含量大于2μg时, DTNB比色法与HPLC-荧光法无显著性差异, 而采用HPLC-荧光法需要SBD-F、6-IAF、mBBr等作为衍生生化试剂, 此类试剂较为昂贵, 且衍生反应比较复杂^[18-19]。

2.8 加标回收率

取一定量鱼肝脏金属硫蛋白提取液, 分别加入不同

量MT标准溶液, 做加标回收实验, 不同水平加标回收率分别为99.83%、100.03%和99.97%, RSD分别为0.61%、0.15%和0.06%。

表3 MT加标回收率分析结果

Table 3 Recovery of MT from spiked positive sample

样品MT含量/ μg	MT添加量/ μg	MT测得量/ μg	回收率/%	RSD/%
	10	57.2	99.3	0.61
		57.9	100.5	
		57.4	99.7	
47.6	50	97.8	100.2	0.15
		97.5	99.9	
		97.6	100	
	80	127.6	100	0.06
		127.5	99.9	
		127.6	100	

3 结论与讨论

本实验对MT比色定量法进行了系统的研究, 探索建立了生物样品中MT测定方法, 通过优化得到最佳测定条件, 为保持DTNB储存液稳定性, 采用pH4.0的磷酸缓冲溶液配制, MT与DTNB形成黄色络合物, 最终以pH7.5的0.1mol/L Tris-HCl进行缓冲液稀释。MT含量在2~15 μg 和10~150 μg 范围内呈良好线性关系, 最低定量限可达2 μg , 且方法回收率和精密度良好。

该法具有操作简便、快速直观的特点, 为生物样品中金属硫蛋白含量测定提供了参考方法, 相对传统MT的测定方法, 该法避免因测定特异性而产生的误差, 且可在较短时间内进行大批量样品的测定。该法除了适于样品中金属硫蛋白含量测定外, 还可用于其他含巯基化合物的测定, 如广泛存在于动物、植物、谷物和油料种子种的谷胱甘肽, 焙烤制品及鱼糜制品中广泛使用的面团改良剂半胱氨酸等^[20]。如果生物样品中有其他含巯基化合物, 采用测定巯基推算MT含量的方法都会存在检测值出现虚高现象, 因此, 在MT提取过程中可采用加热变性、多级盐析及醇沉法消减一些含巯基化合物对测定结果的影响。

参考文献:

[1] 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学报, 2006, 20(4): 22-24.
 [2] CLEMENTE C, VINCENZO C. Solution structure of MT_{nc}, a novel metallothionein from the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*[J]. Structure, 2003, 11: 435-443.
 [3] CONRAD C C, WALTER C A, RICHARDS ON A, et al. Cadmium

toxicity and distribution in metallothionein I and II deficient transgenic mice[J]. J Toxicol Environ Health, 1997, 52: 527-543.

[4] BUICO A, CASSINO C, DONDERO F, et al. Radical scavenging abilities of fish MT-A and mussel MT-10 metallothionein isoforms: an ESR study[J]. J Inorg Biochem, 2008, 102: 921-927.
 [5] KUSAKABE T, NAKAJIMA K, SUZUKI K, et al. The changes of heavy metal and metallothionein distribution in test is induced by cadmium exposure[J]. J Bio Metals, 2008, 21(1): 71-81.
 [6] 帅怡, 彭双清, 张立实, 等. 金属硫蛋白及其在心血管系统疾病发生中的作用[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(4): 615-618.
 [7] PETROSILLO G, VENOSA N D, RUGGIERO F M, et al. Mitochondrial dysfunction associated with cardiac ischemia/reperfusion can be attenuated by oxygen tension control. Role of oxygen-free radicals and cardiolipin[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2005, 1710(2/3): 78-86.
 [8] WU Y, SIADATY M S, BERENS M E, et al. Overlapping gene expression profiles of cell migration and tumor invasion in human bladder cancer identify metallothionein 1E and nicotinamide N-methyltransferase as novel regulators of cell migration transcriptomes of bladder cancer migration[J]. Oncogene, 2008, 27(52): 6679-6689.
 [9] 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.
 [10] 张保林, 盛湘溶, 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] 吴力专, 张彬, 李丽立. 猪金属硫蛋白抗体的制备及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(2): 204-208.
 [12] 张亨山, 赵金垣, 张振龙, 等. 检测金属硫蛋白夹心法ELISA的建立和初步应用[J]. 中国免疫杂志, 1997, 13(4): 228-231.
 [13] GUAN X M, HOFFMAN B, DWIVEDI C, et al. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 31(2): 251-261.
 [14] RAGGI M A, MANDRIOLI R, CASAMENTI G, et al. HPLC determination of glutathione and other thiols in human mononuclear blood cells[J]. Biomedical Chromatography, 1998, 12(5): 262-266.
 [15] 孟范平, 肖静, 赵顺顺, 等. 菲律宾蛤仔金属硫蛋白的提取方法优化[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(7): 121-125.
 [16] ARISTOCLE N, GEOFFREY I S, PIERRE Y R. Rapid isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm *Eisenia andrei*[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39: 194-201.
 [17] GHAZI I E, MENGE S, MIERSCH J, et al. Quantification of metallothionein-like proteins in the mussel *Mytilus galloprovincialis* using RP-HPLC fluorescence detection[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(24): 5739-5744.
 [18] HAASE H, MARET W. A differential assay for the reduced and oxidized states of metallothionein and thionein[J]. Analytical Biochemistry, 2004, 333: 19-26.
 [19] KOSOWER N S, KOSOWER E M. Thiol labeling with bromobimanes[J]. Methods Enzymol, 1987b, 143: 76-84.
 [20] 周爱梅, 潘珂, 黄文华, 等. 几种添加剂对鳙鱼鱼糜凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 50-54.