

金属硫蛋白应用于重金属吸附的研究进展

汤晓燕, 陈丽杰*, 袁文杰

(大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024)

摘要:金属硫蛋白是一类广泛存在于生物体的金属结合蛋白,因其具有独特的螯合某些金属离子的功能,近年来关于金属硫蛋白在重金属吸附方面的研究日益受到关注。综述了金属硫蛋白的分子结构及其在重金属吸附方面的国内外研究进展,分析了金属硫蛋白在重金属吸附研究中存在的问题,并对未来金属硫蛋白在重金属吸附领域的应用进行了展望。

关键词:金属硫蛋白;重金属;生物吸附

中图分类号:X17

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2014)06-0032-05

Research progress of biosorption of heavy metals by metallothioneins

TANG Xiao-yan, CHEN Li-jie*, YUAN Wen-jie

(School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Metallothioneins, as a family of metal-binding proteins and derived from organisms, have attracted more and more attention recently due to its capacity of efficiently binding heavy metals. The molecular structure of metallothioneins is introduced. The latest research progress of biosorption of heavy metals by metallothioneins is reviewed. Challenges and prospects are also discussed.

Key words: metallothioneins; heavy metals; biosorption

重金属被广泛应用于各种制造及加工工业,包括镀铬工业、冶金业、制革业、电镀业、木材防腐、采矿业等^[1]。重金属离子不能通过化学或者生物方法处理而被降解,其不仅可以永久存在于生态环境中,而且可以在食物链中积累,因此重金属污染已经成为当今世界严峻的环境问题之一^[2]。重金属生物吸附法是目前有效解决重金属污染的方法之一,国内外对生物吸附法在重金属吸附领域的应用做了大量的研究工作,其中,金属硫蛋白在重金属吸附中的应用已经成为研究的热点之一。

金属硫蛋白是由 Margoshes 和 Valee 在 1957 年研究马肾脏中镉积累的过程中首次发现并分离得到的一类可结合金属离子的蛋白,随后人们在脊椎动物、无脊椎动物、软体动物等中均发现并分离得到该类蛋白^[3]。金属硫蛋白是一类低分子质量的高半胱氨酸含量、无芳香族氨基酸组成及热稳定性较好的非酶蛋白质,值得注意的是,其对金属离子具有较高亲合力,可被某些重金属离子(Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 等)或在特定环境压力下诱导表达。更为重要的是,金属硫蛋白在清除自由基、脱毒、提高动物免疫力、参与微量元素储存和转运、重金属吸附等方面有着广泛的研究及应用^[4]。针对金属硫蛋白可强力结合某些金属离子的优势,本文中综述了金属硫蛋

白的分子结构及其在重金属吸附方面的国内外研究进展。

1 金属硫蛋白吸附重金属的结构基础

前期研究表明,虽然不同来源金属硫蛋白的氨基酸序列相似,但是不同来源金属硫蛋白的氨基酸的组成和分子质量存在一定的差异,哺乳动物金属硫蛋白一般包含 61~62 个氨基酸残基,分子质量介于 6 000~7 000 Da;真核微生物的金属硫蛋白一般包含 60 个左右氨基酸残基,分子质量达到 2 000~10 000 Da;而植物金属硫蛋白一般由 2 条或者多条长度不同的多肽链构成的低聚物,分子质量为 10 000~13 800 Da。

金属硫蛋白的结构及金属硫蛋白中的半胱氨酸含量对其结合某些金属离子有重要的影响,以哺乳动物为例,哺乳动物金属硫蛋白的三级结构是由 α 和 β 2 个结构域组成,蛋白质分子的氨基末端的 30 个氨基酸残基为 β 结构域,羧基端 30~61 位的氨基酸序列为 α 结构域, α 和 β 结构域通过赖氨酸残基相连构成哑铃型^[5]。金属硫蛋白的空间结构研究表明,在这 2 个结构域内,主要通过半胱氨酸的巯基结合金属离子, α 结构域含有的 11 个半胱氨酸残基可以结合 4 个 Zn^{2+} 或 Cd^{2+} ,或者结合 5~6 个

收稿日期:2014-01-02;修回日期:2014-04-05

基金项目:辽宁省科学技术计划项目(2012229008)

作者简介:汤晓燕(1988-),女,硕士生;陈丽杰(1965-),女,硕士,副教授,从事资源环境生物技术研究,通讯联系人,0411-84706308,ljchen@dlut.edu.cn。

Cu^{2+} ; β 结构域含有的 9 个半胱氨酸残基可以结合 3 个 Zn^{2+} 或 Cd^{2+} , 或结合 5 ~ 6 个 Cu^{2+} [6]。

2 金属硫蛋白在重金属吸附中的研究进展

近年来,金属硫蛋白凭借其结合重金属离子特性,且此过程具有吸附效率高、成本低、重金属离子可回收等优点,而被广泛应用于重金属吸附领域的研究,并显现出良好的应用前景。以下分类介绍 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 等的毒性,并总结金属硫蛋白对 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 等吸附的研究进展。

2.1 Cd^{2+}

Cd 是一种生物体非必需的金属元素,能够与 O 、 Cl 、 S 等元素形成无机化合物而分布于自然界中,其具有一定生理毒性。 Cd^{2+} 对人体的器官会产生危害,急性的 Cd^{2+} 中毒可以引起肺水肿、脑出血、急性肝炎、睾丸损伤等症状;而 Cd^{2+} 的长期累积可以引起肾中毒、骨坏死、免疫毒性;国际癌症研究机构(IARC)将其归为一种致癌物,其可引起肺癌、前列腺癌、注射部位及其他组织的癌症;美国毒物管理委员会(ATSDR)将其列为第 8 位危及人体健康的有毒物质。此外, Cd^{2+} 对微生物如酵母细胞的生长代谢有抑制作用 [4,7]。不同来源的金属硫蛋白被广泛应用于 Cd^{2+} 的吸附研究如表 1 所示,研究结果显示,金属硫蛋白的来源、表达形式以及位置对 Cd^{2+} 的吸附都存在影响。

由于金属硫蛋白易被原核生物中的蛋白水解酶降解,因此以融合蛋白的形式表达可以保持结构的完整性和增加功能的稳定性,进而提高金属硫蛋白对 Cd^{2+} 的吸附率和耐性。Chaturvedi 等 [8] 通过将来源于极端嗜盐植物的金属硫蛋白基因 *SbMT-2* 融合在谷胱甘肽 S 转移酶的羧基端,表达在大肠杆菌 BL21 DE3 细胞内,与对照菌株比,基因重组菌株不仅对 Cd^{2+} 的耐受能力明显提高,而且对 Cd^{2+} 的吸附能力也有提高;相关研究表明,四膜虫金属硫蛋白(TMCd1)含有 156 个氨基酸,其中 47 个是半胱氨酸残基,可以结合 16 个 Cd^{2+} , 因此, Suleman 等 [9] 将 TMCd1 基因与谷胱甘肽 S 转移酶基因融合表达在大肠杆菌 BL21 DE3 细胞内,结果显示,重组菌株对 Cd^{2+} 的吸附量提高至 $7.90 \mu\text{mol}/\text{mg}$ 细胞干重,与对照菌株相比吸附量提高了近 19 倍;研究表明,来源于人的金属硫蛋白含有 2 个结构域, α 结构域和 β 结构域,它们分别含有 9 个和 11 个半胱氨酸,1 个金属硫蛋白的 α 结构域可以结合 3 个 Cd^{2+} , β 结构域可以结合 4 个 Cd^{2+} [14]。基于此, Ma 等 [10] 将来源

表 1 金属硫蛋白在重金属吸附中的研究

金属离子	金属硫蛋白来源	表达宿主	金属硫蛋白表达位点
Cd^{2+}	海蓬子	大肠杆菌 [8],	a
	四膜虫	大肠杆菌 [9]	a
	人	大肠杆菌 [10-11]	a, ab
	鼠, 鱼	大肠杆菌 [11]	ab
	猴	恶臭假单胞杆菌 [12]	ac
	酿酒酵母	酿酒酵母 [13]	c
	聚球藻	大肠杆菌 [13]	c
	木豆	大肠杆菌 [14], 拟南芥 [14]	a, a
	羊	大肠杆菌 [15]	ab
	Cu^{2+} 海蓬子	大肠杆菌 [8]	a
Cu^{2+}	蓝藻	恶臭假单胞杆菌 [16]	c
	人, 鼠, 鱼	大肠杆菌 [11]	ab
	木豆	大肠杆菌 [14], 拟南芥 [14]	a, a
	羊	大肠杆菌 [15]	ab
	Hg^{2+} 羊	大肠杆菌 [15]	ab
	鱼	大肠杆菌 [17]	ac
	鼠	大肠杆菌 [18]	a
	豌豆	大肠杆菌 [19-20], 沼泽红假单胞菌 [21]	a, a
	Zn^{2+} 海蓬子	大肠杆菌 [8]	a
	As^{3+} 人	大肠杆菌 [9, 22]	a, a
Pb^{2+}	羊	大肠杆菌 [15]	ab
	人类	大肠杆菌 TB1 [15]	ab
Ni^{2+}	酿酒酵母 [23]		a
	豌豆	大肠杆菌 [24-25]	a

注: a 为细胞质; b 为细胞周质; c 为细胞表面; d 为叶绿体。

于人的金属硫蛋白基因 *hMT-1A* 的 3 个重复序列与谷胱甘肽 S 转移酶融合表达在大肠杆菌 BL21 DE3 细胞内, 基因重组菌株对 Cd^{2+} 的吸附率可以达到 $56.6 \text{ nmol}/\text{mg}$ 细胞干重, 是对照菌株的近 10.6 倍。

金属硫蛋白表达位置及其来源对 Cd^{2+} 吸附存在比较大的影响, Kao 等 [11] 分别在大肠杆菌 DH5 α (*E. coli* DH5 α) 的细胞质和细胞周质内表达哺乳动物和鱼类的金属硫蛋白, 以期进一步提高吸附剂对 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 的吸附效率。研究结果表明, 金属硫蛋白的表达可以不同程度地提高大肠杆菌对 Cd^{2+} 的吸附效率, 最大吸附率可以提高 10.0% ~ 45.0%, 其中, 不同来源的金属硫蛋白在细胞质表达的重组菌株对 Cd^{2+} 的吸附率由大到小的顺序为来源于人的金属硫蛋白重组菌株、来源于鱼的金属硫蛋白重组菌株、来源于鼠的金属硫蛋白重组菌株, 而不同来源的金属硫蛋白在细胞周质表达的重组菌株对 Cd^{2+} 的吸附率由大到小的顺序为来源于鱼的金属硫蛋白重组菌株、来源于人的金属硫

蛋白重组菌株、来源于鼠的金属硫蛋白重组菌株,这说明不同来源的金属硫蛋白的金属离子结合域和活性中心的构象在金属离子结合中起着重要作用。由于哺乳动物的金属硫蛋白上的11个半胱氨酸残基可以结合4个 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 等二价金属离子,He等^[12]把猴子的金属硫蛋白基因的4个重复序列分别表达在恶臭假单胞菌细胞内和细胞表面,前者对 Cd^{2+} 的吸附率是对照菌株的2.30倍,后者是对照菌株的3.82倍。

另一方面,金属硫蛋白在细胞表面展示可以使其与金属离子直接接触,而有效解决了金属离子穿过细胞壁或胞膜的屏障问题,从而有效提高了菌体细胞对 Cd^{2+} 的吸附速率和效率,Kuroda等^[13]将酵母金属硫蛋白通过 α 凝集素细胞表面展示系统表达在酿酒酵母的细胞表面,随后 Cd^{2+} 的吸附率提高至27.1 nmol/mg细胞干重,是空载对照的12.0倍;Vida Tafakori等通过Lpp-OmpA细胞表面展示系统将蓝藻金属硫蛋白SmtA(来源于细长聚球藻PCC3601)和MtnA(来源于聚球藻属蓝藻)表达在大肠杆菌BL21 DE3细胞表面,SmtA重组菌株和MtnA重组菌株对 Cd^{2+} 的吸附率分别是20.4 nmol/mg和26.4 nmol/mg,其中金属硫蛋白MtnA含有10个半胱氨酸残基和6个组氨酸残基,而金属硫蛋白SmtA含有9个半胱氨酸残基和3个组氨酸残基^[13]。

2.2 Cu^{2+}

Cu是一种生物体所必需的微量金属元素,它是一些氧化还原酶的关键辅因子,如细胞色素氧化酶、超氧化物歧化酶、多巴胺 β -羟化酶,对生物体的生长发育及其他生理代谢有重要影响,但是生物体过多地摄入 Cu^{2+} 会对其产生很大的危害,即铜中毒。人体过多地摄入 Cu^{2+} 会引起人体肝脏和神经系统中毒,出现呕吐、痉挛、甚至死亡的症状; Cu^{2+} 对水生生物的危害也比较大, Cu^{2+} 质量浓度在0.002 mg/L时就会对鱼类产生毒性^[16]。世界卫生组织将 Cu^{2+} 的最大允许排放标准定为1.00 mg/L^[26]。自20世纪80年代以来,有关金属硫蛋白与 Cu^{2+} 之间的相互作用及金属硫蛋白对 Cu^{2+} 的吸附作用的研究被广泛报道,如表1所示。

金属硫蛋白作为一种异源蛋白质被表达在细菌和植物中,其对生物细胞的 Cu^{2+} 的吸附效率和耐受能力被广泛研究,Chaturvedi等^[8]利用谷胱甘肽转移酶的羧基端融合表达极端嗜盐植物中的金属硫蛋白基因SbMT-2,重组菌株和对照菌株相比, Cu^{2+} 的耐受能力明显提高,与此同时, Cu^{2+} 的吸附能力提

高了近2.5倍;Sekhar等^[14]将木豆的金属硫蛋白基因CcMT1在大肠杆菌BL21和拟南芥中表达后可以明显提高它们对 Cu^{2+} 的耐受能力和吸附能力,研究结果表明,异源蛋白表达对 Cu^{2+} 的吸附能力具有显著的促进作用。

相关研究证实,金属硫蛋白在细胞表面表达后可通过固定化技术进一步提高其对 Cu^{2+} 的吸附率,Ni等^[16]将蓝藻金属硫蛋白在恶臭假单胞菌细胞表面表达,再利用VRM(volcanic rock matrix)对其固定化,其对 Cu^{2+} 的最高吸附率可以达到345 nmol/mg细胞干重,这一研究结果为后续金属硫蛋白对重金属离子吸附的实际应用的研究提供了重要的理论依据和技术支持。

金属硫蛋白的表达位置对 Cu^{2+} 的吸附同样存在影响,Kao等^[11]对 Cu^{2+} 的吸附研究表明,金属硫蛋白的表达可以提高大肠杆菌DH5 α 对 Cu^{2+} 的吸附效率,对 Cu^{2+} 的吸附效率可提高21.0%~35.0%,其中金属硫蛋白在细胞质表达时对 Cu^{2+} 的吸附率要比金属硫蛋白在细胞周质表达时低;另外,Sauge-Merle等^[15]将羊金属硫蛋白分别在大肠杆菌TB1细胞质和细胞周质过表达,而金属硫蛋白在细胞周质过表达时其对 Cu^{2+} 的吸附率达到4.94 nmol/mg,比细胞质表达时的吸附率高17.1%。

2.3 Hg^{2+}

Hg^{2+} 是一种致癌重金属离子,低浓度即可对人体健康存在潜在威胁,大量临床研究表明, Hg^{2+} 可以引起脑损伤、肝肾及胃肠道功能的衰竭、中枢神经系统的损伤以及通过与细胞内的巯基基团结合引起细胞毒性^[20-21]。基于此,近年来,通过基因工程技术将外源基因导入植物或微生物可以提高其对 Hg^{2+} 的修复能力。其中,传统的修复方法是将 Hg^{2+} 还原成元素Hg,其弊端在于 Hg^{2+} 转运蛋白的必需性、元素Hg被释放入环境中后会被氧化成有毒形式进而污染生态环境。相比较而言,金属硫蛋白由于含有大量的半胱氨酸,可以和 Hg^{2+} 特异性结合,同时利用金属硫蛋白与 Hg^{2+} 的结合也可以有效地避免再污染问题,极具研究价值^[27]。不同来源的金属硫蛋白对 Hg^{2+} 吸附作用的研究如表1所示。

金属硫蛋白可以作为 Hg^{2+} 吸附剂,在微生物和植物中表达后,可以显著提高微生物和植物对环境中 Hg^{2+} 的修复能力。研究表明,金属硫蛋白具有同时吸附 Hg^{2+} 和清除自由基的能力,Lin等将来源于罗非鱼的金属硫蛋白分别表达在大肠杆菌BL21 DE3细胞表面和细胞内,金属硫蛋白的细胞表面展

示结果表明,菌体细胞对 Hg^{2+} 的吸附率明显提高,达到了 27.9 nmol/mg 细胞干重,而金属硫蛋白细胞内表达对 Hg^{2+} 的吸附率也达到了 21.4 nmol/mg 细胞干重,这些结果表明,罗非鱼金属硫蛋白可以作为 Hg^{2+} 的吸附剂^[17]。Ruiz 等^[18]将鼠的金属硫蛋白基因表达在大肠杆菌 JM109 中,相对于对照菌株的 5.00 μmol 耐受能力,重组菌株的 Hg^{2+} 耐受浓度提高至 80.0 μmol ;随后将重组菌株培养在含有 120 μmol Hg^{2+} 的液体培养基中,在 72.0 h 和 120 h 时刻检测结果显示,菌体细胞对 Hg^{2+} 的吸附量分别达到了 51.6 μmol 和 100 μmol ,表明该重组菌株可作为高效 Hg^{2+} 生物修复剂,有效吸附环境中的 Hg^{2+} 以降低污染程度。另一方面,金属硫蛋白在植物中表达同样可以提高植物对 Hg^{2+} 的富集以及植物对环境修复能力。

金属硫蛋白与 Hg^{2+} 转运蛋白同时表达可以实现对 Hg^{2+} 的特异性吸附和提高微生物对 Hg^{2+} 的吸附能力。Zhao 等^[19]将 Hg^{2+} 转运蛋白 *merT-merP* 与豌豆的金属硫蛋白同时表达在大肠杆菌 JM109 中,重组菌株对 Hg^{2+} 的耐受性与对照菌株相比提高了 6.40 倍,并且重组菌株在生长繁殖的同时可以吸附 LB 培养液中 96.0% 以上的 Hg^{2+} ;Deng 等^[20]在大肠杆菌 JM109 细胞和假单胞菌 GIM1.167 细胞内同时表达 Hg^{2+} 转运蛋白与豌豆金属硫蛋白,转基因大肠杆菌对含 Hg^{2+} 污水中的 Hg^{2+} 去除率可以达到 99.0%,其吸附效率达到 134 nmol/mg 细胞干重,与对照菌株相比提高了 51.0%,但是污水中其他离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 等并没有减少,说明转基因大肠杆菌可以实现对 Hg^{2+} 的特异性吸附。

2.4 其他重金属

金属硫蛋白也被应用于 Zn^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 、 Ni^{2+} 等重金属离子的吸附研究,如表 1 所示。Su 等^[22]将人金属硫蛋白基因 *hMT-1A* 表达在大肠杆菌 JM109 中,其对 As^{3+} 的吸附率为 4.26 nmol/mg 细胞干重,是对照菌株的 3.00 倍。同样,金属硫蛋白的表达位置对 Zn^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 的吸附性能也存在影响,Sauge-Merle 等^[15]将来源于羊的金属硫蛋白(MT)与麦芽糖结合蛋白(MBP)融合表达,重组菌株 TB1-MBP-MT 对 Zn^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 重金属离子的吸附率都有明显的提高,其中金属硫蛋白在细胞质中表达后对 Zn^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 的吸附率分别是出发菌株的 8.40、55.0、1.06 倍,金属硫蛋白在细胞周质中表达后对 Zn^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 的吸附率分别是出发菌株的 1.00、7.50、1.34 倍,金属硫蛋白在细胞质中

表达对 Zn^{2+} 、 As^{3+} 的吸附效果比在细胞周质中好,主要是因为细胞周质中的 MBP-MT 融合蛋白比细胞质中的含量低,以及在细胞周质中存在氧化环境,而金属硫蛋白中与金属离子配位结合的半胱氨酸的氧化会降低结合金属离子的能力从而降低对金属离子的吸附能力;*ZntA* 编码锌转运蛋白可以将金属离子如 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 等转运出细胞,实验结果表明,*ZntA* 的敲除对 Zn^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 的吸附有促进作用,其中重组菌株 *ZntA*-MBP-MT 对 Zn^{2+} 、 As^{3+} 、 Pb^{2+} 的吸附率分别是重组菌株 TB1-MBP-MT 的 1.20、1.33、3.50 倍^[15]。金属硫蛋白在生物体表达的量对重金属离子的吸附也存在影响,Ma 等^[10]将来源于人的金属硫蛋白基因 *hMT-1A* 的 3 个重复序列表达在大肠杆菌细胞 BL21 DE3 (*E. coli* BL21 DE3) 内,重组菌株对 As^{3+} 的吸附率可以达到 101 nmol/mg 细胞干重,是对照菌株的 3.04 倍。

Krishnaswamy 等^[24]将 Ni^{2+} 转运蛋白和金属硫蛋白同时表达在大肠杆菌 JM109 (*E. coli* JM109) 中,其中金属硫蛋白通过谷胱甘肽融合表达,在含 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 Ni^{2+} 溶液中,对 Ni^{2+} 的吸附率可以达到 15.0 nmol/mg 细胞干重,与对照菌株比提高了 6 倍多;邓旭等^[25]将高特异性 Ni^{2+} 转运蛋白和金属硫蛋白同时表达在大肠杆菌 JM109,通过对基因工程菌对 Ni^{2+} 的吸附性能研究,发现基因工程菌不仅对 Ni^{2+} 的最大吸附率提高了近 5 倍,而且对 pH、离子强度的变化及其他共存金属离子的影响都表现出更强的适应性。

Krepkiy 等^[28]利用电子顺磁共振波谱法检测到兔肝金属硫蛋白 apo-MT 将 Cr^{6+} 还原的中间产物 Cr^{4+} ,并且 apo-MT 氧化的速度和 Cr^{6+} 还原的速度呈正比,通过比较 apo-MT、Cys 和 GSH 对 Cr^{6+} 的还原速率,表明 apo-MT 的还原能力大于 Cys 和 GSH,这说明 apo-MT 是细胞内 Cr^{6+} 的主要还原剂; Cr^{3+} 和 apo-MT 反应后利用 DEAE HPLC 将 apo-MT- Cr^{3+} 从反应体系分离出来,结果表示 apo-MT 至少可以结合 2 个 Cr^{3+} 。

3 展望

金属硫蛋白对重金属吸附的研究已有 50 多年,近年来,利用金属硫蛋白基因表达的可诱导性及金属硫蛋白基因本身能选择性地高水平表达,可进行金属离子的回收和有效治理重金属污染^[29],研究者针对不同来源的金属硫蛋白对重金属吸附的影响、金属硫蛋白的过表达对重金属吸附的影响、金属硫

蛋白的异源表达对重金属吸附的影响、金属硫蛋白的融合表达对重金属吸附的影响、金属硫蛋白的细胞表面展示对重金属吸附的影响、金属硫蛋白与金属离子的结合方式等方面进行了广泛的研究,取得了显著的研究成果,为金属硫蛋白在重金属吸附中的理论研究和实际应用奠定了基础。

虽然金属硫蛋白在重金属吸附方面极具前景,但目前金属硫蛋白在重金属吸附方面还存在很多问题:①由于金属硫蛋白结构和生物学功能的复杂性,使得人们至今对它的认识还很不够,有必要进一步从蛋白结构、基因表达及调控机理等方面对金属硫蛋白进行深入研究;②在实现金属硫蛋白对某一重金属的特异性吸附尚属难题;③金属硫蛋白与重金属的结合机理需要进一步的研究;④金属硫蛋白对重金属吸附距工业化还存在一定的距离。随着研究方法的不断改进和对金属硫蛋白基因结构与调控的进一步深入研究,金属硫蛋白这一功能独特的可结合金属离子的蛋白将在治理重金属污染中发挥重要的作用。

参考文献

- [1] Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(2): 195–226.
- [2] Singh R, Sinha S. Bioremediation of heavy metals by algae: A review on evaluation of low cost and high performance biosorbents[J]. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 2013, 26(1): 1–9.
- [3] Capdevila M, Atrian S. Metallothionein protein evolution: A minireview[J]. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2011, 16(7): 977–989.
- [4] Klaassen C D, Liu J, Diwan B A. Metallothionein protection of cadmium toxicity[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 238(3): 215–220.
- [5] Wang W X, Rainbow P S. Significance of metallothioneins in metal accumulation kinetics in marine animals[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, 152(1): 1–8.
- [6] Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction[J]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2003, 533(1): 211–226.
- [7] Wang H, McCarthey A, Qiu X, et al. Cd²⁺ Impact on metabolic cells of *Saccharomyces cerevisiae* over an extended period and implications for bioremediation[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2012, 29(3): 199–205.
- [8] Chaturvedi A K, Mishra A, Tiwari V, et al. Cloning and transcript analysis of type 2 metallothionein gene (*SbMT2*) from extreme halophyte *Salicornia brachiata* and its heterologous expression in *E. coli*[J]. *Gene*, 2012, 499(2): 280–287.
- [9] Suleman A, Shakoori A R. 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.
- [10] Ma Y, Lin J, Zhang C, et al. Cd(II) and As(III) bioaccumulation by recombinant *Escherichia coli* expressing oligomeric human metallothioneins[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 185(2): 1605–1608.
- [11] Kao W C, Chiu Y P, Chang C C, et al. Localization effect on the metal biosorption capability of recombinant mammalian and fish metallothioneins in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(5): 1256–1264.
- [12] He X, Chen W, Huang Q. Surface display of monkey metallothionein α tandem repeats and EGFP fusion protein on *Pseudomonas putida* X4 for biosorption and detection of cadmium[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(6): 1605–1613.
- [13] Kuroda K, Ueda M. Bioadsorption of cadmium ion by cell surface-engineered yeasts displaying metallothionein and hexa-His[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63(2): 182–186.
- [13] Tafakori V, Ahmadian G, Amoozegar M A. Surface display of bacterial metallothioneins and a chitin binding domain on *Escherichia coli* increase cadmium adsorption and cell immobilization[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167(3): 462–473.
- [14] Sekhar K, Priyanka B, Reddy V D, et al. Metallothionein 1 (CcMT1) 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.
- [15] Sauge-Merle S, Lecomte-Pradines C, Carrier P, et al. Heavy metal accumulation by recombinant mammalian metallothionein within *Escherichia coli* protects against elevated metal exposure[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(8): 918–924.
- [16] Ni H, Xiong Z, Ye T, et al. Biosorption of copper (II) from aqueous solutions using volcanic rock matrix-immobilized *Pseudomonas putida* cells with surface-displayed cyanobacterial metallothioneins[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 204: 264–271.
- [17] Lin K H, Chien M F, Hsieh J L, et al. Mercury resistance and accumulation in *Escherichia coli* with cell surface expression of fish metallothionein[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(2): 561–569.
- [18] Ruiz O N, Alvarez D, Gonzalez-Ruiz G, et al. Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase[J]. *BMC Biotechnology*, 2011, 11(1): 82–89.
- [19] Zhao X W, Zhou M H, Li Q B, et al. Simultaneous mercury bioaccumulation and cell propagation by genetically engineered *Escherichia coli*[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1611–1616.
- [20] Deng X, Wilson D. Bioaccumulation of mercury from wastewater by genetically engineered *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(1/2): 276–279.
- [21] Deng X, Jia P. Construction and characterization of a photosynthetic bacterium genetically engineered for Hg²⁺ uptake[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3083–3088.
- [22] Su Y J, Lin J Q, Lin J Q, et al. Bioaccumulation of Arsenic in recombinant *Escherichia coli* expressing human metallothionein[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 14(5): 565–570.

无机纳米黏土用于聚合物的成核剂多为硅酸盐层状纳米材料,纳米黏土需要经过插层、剥离,实现纳米片层的均匀分散,才能有效地改善 PBS 的结晶性。PBS 中常用的有高岭土^[6]、水滑石^[7]、凹凸棒石^[8]、云母^[9]、滑石粉^[10]、蒙脱土^[11-12]等。

唐义祥等^[6]采用熔融共混法制备了 PBS/高岭土复合材料,结晶度随着纳米高岭土的增加呈先增大后下降的趋势,高岭土添加量为质量分数 6.5% 时有最大值,并且复合材料拉伸强度和断裂伸长率达到最大。

战美秋等^[7]制备了 PBS/水滑石(IIT)复合材料,镁铝水滑石(IIT)质量分数为 1% 时,结晶温度提高 10℃,拉伸强度提高 3.3 MPa,弹性模量增大 16%,且样品储能模量显著提高。

Qi 等^[8]采用原位聚合法制备了 PBS/凹凸棒石(ATP)复合材料,ATP 起到异相成核剂的作用,PBS 的结晶温度最多提高 7.7℃,当 ATP 质量分数为 3% 时,其断裂伸长率提高到 548.55%。

Zhang 等^[9]采用熔融共混法制备了 PBS/云母复合材料,云母的加入增加了 PBS 的晶核数量,而云母作为物理障碍阻碍晶体的生长,使球晶尺寸减小。

张新伟等^[10]研究了滑石粉、2,6-苯二甲酸环己酰胺(TMB-5)、碳酸钙、硫酸钙晶须、高岭土等 5 种成核剂对 PBS 结晶行为及力学性能的影响。发现这 5 种成核剂均能使球晶细化且规整均匀,结晶温度提高,结晶速率增大,拉伸强度和冲击强度都有明显提升。其中以滑石粉的成核效果最为突出,使 PBS 的结晶温度提高 11℃,拉伸强度提高 4.4 MPa。

Shih 等^[11]研究发现,过氧化二异丙苯(DCP)交联的 PBS/有机改性层状硅酸盐(OMLS)复合材料的结晶度下降,并且随蒙脱土含量的增加,结晶温度向低温移动,半结晶时间增加。通过对有机黏土进行二次功能化,使其带上环氧基团,可以使黏土的分散

效果更好,PBS 能够更快地结晶^[12]。

无机盐也常用于改善聚合物的物理机械性能,但是用于 PBS 成核改性的成核剂较少。杨海等^[13]研究了硫酸钙晶须/PBS 共混物的等温结晶过程,硫酸钙晶须的加入减缓了结晶速率,使平衡熔点降低,有利于 PBS 结晶,但对 PBS 的成核机理和生长方式没有明显影响。

无机氧化物是一类应用较多的无机成核剂,用于 PBS 的无机氧化物类成核剂主要有二氧化硅^[14-15]、二氧化钛^[16]。

罗发亮等^[14]用溶液共混法制备了 PBS/nano-SiO₂ 复合材料。当 nano-SiO₂ 质量分数为 5% 时,PBS 的结晶温度提高了 5.6℃;nano-SiO₂ 质量分数为 2% 时,PBS 的结晶度达到 42.4%。Bian 等^[15]对 nano-SiO₂/PBS 复合材料研究发现,PBS 的半结晶时间随 SiO₂ 质量分数的增加而减小,这表明纳米 SiO₂ 具有成核作用,加速 PBS 的结晶,nano-SiO₂ 质量分数为 6% 时,结晶温度提高 18.7℃,同时模量和屈服强度也略有增强。

陈阳娟^[16]用溶液分散法制备了 PBS/二氧化钛纳米管(TNTs)和 PBS/羟基磷灰石纳米棒(HAP)2 种复合材料,TNTs 和 HAP 的添加量为质量分数 5%。研究表明,TNTs 可作为一种异相成核剂提高 PBS 的结晶温度与结晶速率,结晶温度提高 5℃ 左右;HAP 限制了 PBS 的结晶成核,使其结晶温度降低,结晶速率减小。另外,TNTs 和 HAP 的加入都不同程度地降低了 PBS 的结晶度。

纳米碳材料是指分散相尺度至少有一维 < 100 nm 的碳材料,因其具有特殊的光、电、热以及机械性能,良好的生物相容性,常用于聚合物材料改性研究。用于 PBS 的成核改性的纳米碳材料包括碳纳米管^[17-19]、石墨烯^[20]、碳纤维^[21]等。

Wang 等^[17]采用熔融共混法制备了 PBS/多壁碳纳米管(MWCNTs)共混物。MWCNTs 对 PBS 有

(上接第 36 页)

- [23] Li M, Zhang Z, Shang J, et al. Enhanced Pb²⁺ biosorption by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing human metallothionein [J]. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 2014, 145 (1): 235-240.
- [24] Krishnaswamy R, Wilson D B. Construction and characterization of an *Escherichia coli* strain genetically engineered for Ni(II) bioaccumulation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66 (12): 5383-5386.
- [25] 邓旭,李清彪,卢英华,等. 基因工程菌大肠杆菌 JM109 富集废水

- 中镍离子的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(3): 343-348.
- [26] Erdem B, Özcan A, Gök Ö, et al. Immobilization of 2,2'-dipyridyl onto bentonite and its adsorption behavior of copper(II) ions [J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163(1): 418-426.
- [27] Wagner-Döbler I. Bioremediation of mercury: Current research and industrial applications [M]. UK: Caister Academic Press, 2013: 1-16.
- [28] Krepiy D, Antholine W E, Petering D H. Properties of the reaction of chromate with metallothionein [J]. Chemical Research in Toxicology, 2003, 16(6): 750-756.
- [29] 路浩,刘宗平,赵宝玉. 金属硫蛋白生物学功能研究进展 [J]. 动物医学进展, 2009, 30(1): 62-65. ■