

# 裂殖性酵母菌 ATCC 2476 鎘結合物質之研究

陳均全 莊榮輝

臺灣大學 微生物與生物化學研究所 生物化學組

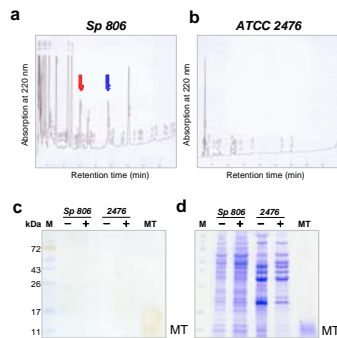
## 摘要

裂殖性酵母菌 (*Schizosaccharomyces pombe*) ATCC 2476 對鎘具有耐受性。加鎘誘導後，發現 ATCC 2476 不產生金屬硫蛋白質 (MT, metallothionein) 及植物螯合素 (PCs, phytochelatins) 結合鎘，以降低鎘造成的細胞毒性。實驗結果發現細胞內有一鎘誘導產生且和鎘結合的物質，命名為胞內鎘結合物質 (ICdBC, intracellular cadmium binding complex)。ICdBC 不含硫醇基 (-SH)，原態分子量約為 9.6 kDa，經有機萃取、蛋白酶處理、核酸酶處理，皆不影響其原態分子量及鎘結合能力，利用 Dubois's 法測定總醣，發現 ICdBC 亦非醣類；其熱穩定性高，經 100°C 處理後，仍保有所結合的鎘。ATCC 2476 以鎘濾紙擴散培養，在特定區域菌體表面出現金屬光澤，推測可能是細胞外鎘累積物所造成，收集並純化細胞表面鎘結合物質，並命名為胞外鎘結合物質 (ECdBC, extracellular cadmium binding complex)。實驗結果顯示，ECdBC 擁有和 ICdBC 相同的特性，包含：不含硫醇基、相同原態分子量、其鎘結合能力不受有機萃取、蛋白酶、核酸酶處理的影響。Pulse-chase 實驗顯示，ATCC 2476 菌體內累積的鎘隨著誘導時間增加而上升，在無鎘環境下，會將菌體內鎘排出；ICdBC 鎘結合量亦隨著此趨勢消長。經實驗證明，當細胞內鎘向外排出時，細胞表面的 ECdBC 鎘結合量上升，且和 ICdBC 鎘結合量下降成正相關。

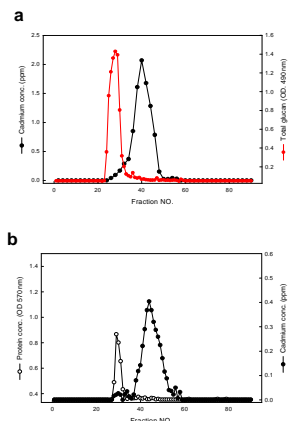
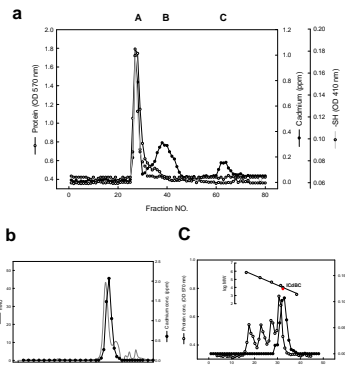
## 結果

### ● ATCC 2476 有一非植物螯合素或金屬硫蛋白質的鎘結合物質 — ICdBC

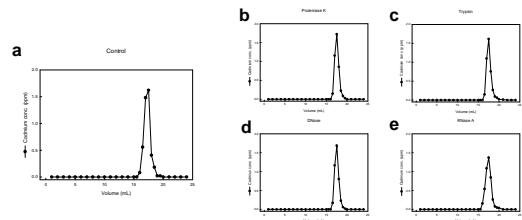
**Fig. 1a-d** ATCC 2476 加鎘誘導 12 h 後，利用 ddH<sub>2</sub>O 清洗菌體以移除含鎘培養液，以粗抽緩衝液 (50 mM Tris pH 7.6) 打破細胞，移去細胞碎片，以粗抽取液進行以下實驗。已知裂殖性酵母菌 *Sp 806* 利用 PCs 結合鎘離子。利用逆相高效能層析儀 (reverse phase HPLC) 檢驗 *Sp 806* 粗抽取液中的 PCs (PC<sub>2</sub> 及 PC<sub>3</sub>)，PC<sub>2</sub> 和 PC<sub>3</sub> 的滯留時間分別是 15.1 min (↓) 及 23.9 min (↓) (a)。ATCC 2476 不論是否經鎘誘導，皆無 PCs 的存在 (b)。利用 anti-MT mAb (abcam, UC1MT) 檢驗 MT 的存在，以 DAB 呈色，*Sp 806* 做為對照組，不論是否經鎘誘導 (-: 不加鎘, +: 加鎘誘導) 都不會產生 MT；以兔子肝臟 MT (Sigma, M-7641) 做為對照組，分子量約為 10 kDa；不論 ATCC 2476 是否經鎘誘導皆無 MT (c)。蛋白質定量為 20 μg，以 15% SDS-PAGE 分離，實際轉印量經 Coomassie Brilliant Blue 染色結果 (d)。



**Fig. 2a-c** 經鎘誘導 ATCC 2476 粗抽取液以膠體過濾法 (Sephadex G-50, 16 mm i.d. x 90 cm) 分離，分別以 Bradford 法、Ellman 法測定蛋白質含量及硫醇基 (-SH)；鎘含量以原子吸收光譜儀 (AAS) 測定之。其中 B 峰為鎘誘導性鎘結合物質，不含硫醇基，命名為 ICdBC (a)。將 ICdBC 利用 FPLC (Superdex 200) 進一步純化，收集鎘結合峰，以性質分析 (b)。將 ICdBC 和標準蛋白質：thyroglobulin (670 kDa)，bovine  $\gamma$  globulin (158 kDa)，chicken ovalbumin (44 kDa)，equine myoglobin (17 kDa)，vitamin B12 (1.35 kDa) 混合後，以 FPLC (Superdex 200) 分離，以 Bradford 法測定蛋白質量，原子吸收光譜儀測定鎘。推算 ICdBC 原態分子量約為 9.6 kDa。

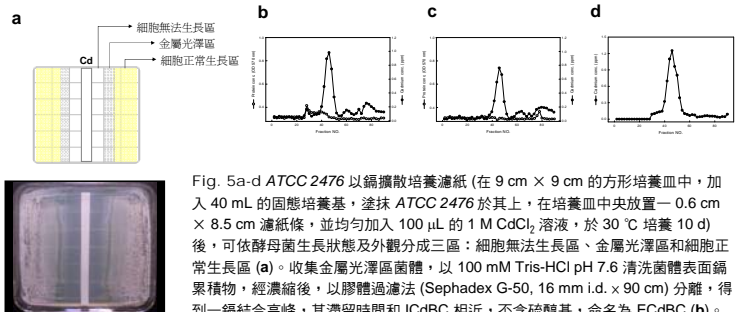


**Fig. 3a-b** ICdBC 以膠體過濾法 (Sephadex G-50, 16 mm i.d. x 90 cm) 分離，分別以 Bradford 法、Dubois's 法測定蛋白質量及總醣，鎘結合高峰和總醣高峰滯留時間不一致，因此推測 ICdBC 並非醣類 (a)。利用 PCI 溶液 (phenol: chloroform: isoamyl alcohol = 25: 24: 1) 對 ATCC 2476 粗抽取液進行有機萃取，ICdBC 會保留於水層，以膠體過濾法 (Sephadex G-50, 16 mm i.d. x 90 cm) 分離，和 Fig. 2a 比較，ICdBC (peak B) 其滯留時間及鎘結合量皆不受影響 (b)。



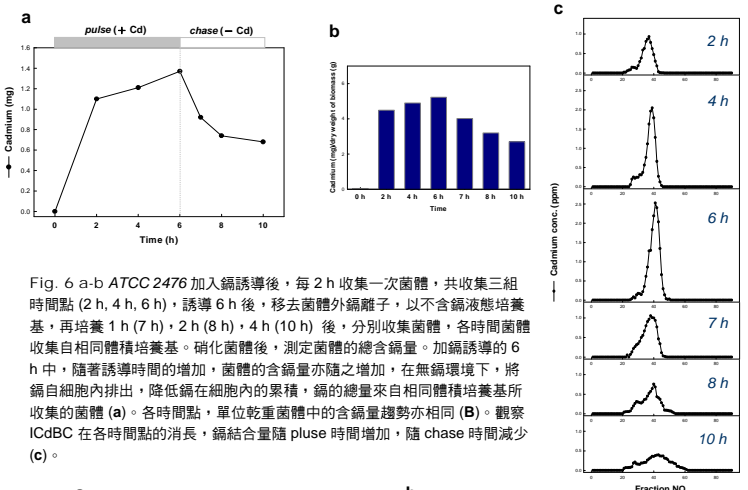
**Fig. 4a-e** 經純化的 ICdBC，以 FPLC (Superdex 200) 分離之，分別以蛋白酶：proteinase K 處理 (b)，trypsin 處理 (c)；核酸酶：DNase 處理 (d)，RNase A 處理 (e)。各處理層析圖譜和對照組 (a) 比較後，發現 ICdBC 的原態分子量及其鎘結合量，皆無顯著影響。此外，嘗試其他蛋白酶 (papain、 $\alpha$ -chymotrypsin) 亦無影響 (data not show)。各酵素添加量：proteinase K 及 trypsin 為 2 μg；DNase 及 RNase A 為 20 unit。

### ● ATCC 2476 經濾紙擴散培養，具金屬光澤的菌體表面有一鎘結合物質 — ECdBC

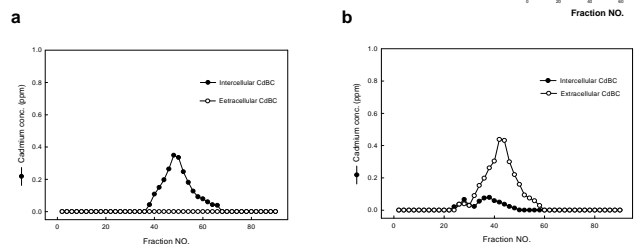


**Fig. 5a-d** ATCC 2476 以鎘擴散培養濾紙 (在 9 cm x 9 cm 的方形培養皿中，加入 40 mL 的固態培養基，塗抹 ATCC 2476 於其上，在培養皿中央放置一 0.6 cm x 8.5 cm 濾紙條，並均勻加入 100 μL 的 1 M CdCl<sub>2</sub> 溶液，於 30°C 培養 10 d) 後，可依酵母菌生長狀態及外觀分成三區：細胞無法生長區、金屬光澤區和細胞正常生長區 (a)。收集金屬光澤區菌體，以 100 mM Tris-HCl pH 7.6 清洗菌體表面鎘累積物，經濃縮後，以膠體過濾法 (Sephadex G-50, 16 mm i.d. x 90 cm) 分離，得到一鎘結合高峰，其滯留時間和 ICdBC 相近，不含硫醇基，命名為 ECdBC (b)。以膠體過濾法 (FPLC, Superdex 200) 測定 ECdBC 原態分子量，約為 9.6 kDa (data not show)。菌體表面清洗液以 PCI 溶液進行有機萃取後，收集水層進行膠體過濾法 (Sephadex G-50, 16 mm i.d. x 90 cm) 分離，和 ICdBC 相似，ECdBC 仍保有其鎘結合能力 (c)。具金屬光澤的菌體內亦含有 ICdBC (d)。

### ● ATCC 2476 會將菌體內累積的鎘向外排出，與 ECdBC 形成複合體累積於菌體表面



**Fig. 6 a-b** ATCC 2476 加入鎘誘導後，每 2 h 收集一次菌體，共收集三組時間點 (2 h, 4 h, 6 h)，誘導 6 h 後，移去菌體外鎘離子，以不含鎘液態培養基，再培養 1 h (7 h)，2 h (8 h)，4 h (10 h) 後，分別收集菌體，各時間菌體收集自相同體積培養基。硝化菌體後，測定菌體的總鎘量。加鎘誘導的 6 h 中，隨著誘導時間的增加，菌體的含鎘量亦隨之增加，在無鎘環境下，將鎘自細胞內排出，降低鎘在細胞內的累積，鎘的總量來自相同體積培養基所收集的菌體 (a)。各時間點，單位乾重菌體中的含鎘量趨勢亦相同 (b)。觀察 ICdBC 在各時間點的消長，鎘結合量隨 pulse 時間增加，隨 chase 時間減少 (c)。



**Fig. 7 a-b** ATCC 2476 於液態培養基中加鎘誘導 6 h 後，收集菌體，均勻塗抹在不含鎘的固態培養基上，再培養一天後，將菌體收集。經液態加鎘培養 6 h 後，菌體內有 ICdBC 的生成，而液態培養時 ECdBC 不會在菌體表面累積 (a)。若將等量的菌體於無鎘固態培養基上，再培養 1 d 後，發現菌體內鎘結合量下降，而在菌體表面有 ECdBC 的累積，且鎘排出量約等於固態培養前的菌體內鎘累積量 (b)。