

# 小金海棠金属硫蛋白基因 $M\text{MT}2$ 克隆 与生物信息学分析

张玉刚<sup>1,2</sup>, 韩振海<sup>2</sup>

(1. 青岛农业大学 园林园艺学院, 山东 青岛 266109; 2 中国农业大学 园艺植物研究所, 北京 100193)

**摘要:** 以苹果属植物小金海棠 (*Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang) 为试材, 将差异筛选消减 cDNA 文库得到的 27 个金属硫蛋白 cDNA 片段序列构成本地数据库, 通过电子拼接和 RT-PCR 相结合的方法, 分离到了小金海棠金属硫蛋白基因  $M\text{MT}2$  (Genbank 登录号为 GQ06589)。该基因全长 610 个碱基, 开放阅读框 (ORF) 为 240 bp 编码 80 个氨基酸, 推测分子量 7.74 kDa。该基因具有金属硫蛋白基因的典型结构域特征, 编码的氨基酸含有 14 个半胱氨酸 Cys 分布在蛋白质的 N 端和 C 端, 呈 Cys-Cys-Cys-X-Cys-Cys-X-X-Cys 形式排列。通过系统进化树分析, 小金海棠  $M\text{MT}2$  与沙梨、杏树、美洲李等植物保持了较近的亲缘关系, 与欧洲山毛榉、旱柳、红小豆、鼠尾草等植物亲缘关系较远。

**关键词:** 苹果属小金海棠; 金属硫蛋白;  $M\text{MT}2$

中图分类号: S661.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)02-0060-04

## Cloning and Bioinformatic Analysis of Metallothionein Gene ( $M\text{MT}2$ ) in *Malus xiaojinensis*

ZHANG Yuguang<sup>2</sup>, HAN Zhenhai<sup>1</sup>

(1. College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** A metallothionein gene was cloned by RT-PCR and splicing of 27 cDNA sequences that were identified by differential screening of the subtracted cDNA library from *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang which was named  $M\text{MT}2$  (Accession No. GQ06589). The full length cDNA of  $M\text{MT}2$  is 610 bp including the open reading frame (ORF) of 240 bp. It encodes a protein of 80 amino acids with a molecular weight of 7.74 kDa. The  $M\text{MT}2$  contained the conserved domains shared in all known MT which has 14 Cys residues (cys) that have conserved sequence position at N terminal and C terminal of protein ranking in the forms of Cys-Cys-Cys-X-Cys and Cys-X-X-Cys. The phylogenetic tree suggested that  $M\text{MT}2$  was closer to the MT of sand pear, almond and apricot but farther with the MT of European beech, hankow willow and adzuki bean.

**Key words:** *Malus xiaojinensis*; Metallothionein;  $M\text{MT}2$

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是一种广泛存在于生物界、低分子量、富含巯基和金属的非酶类蛋白质<sup>[1]</sup>。Margoshes 和 Vallee<sup>[2]</sup> 在研究金属生物学作用时, 从动物器官中分离出一种富含巯基、能整合大量金属离子的蛋白质, 将其称之为金属硫蛋白。金属硫蛋白基因参与了植物的许多生理代谢过程, 能够清除植物体内自由基, 其巯基 (SH) 能强烈整合有毒金属, 并将之排出体外, 实现对重金属离子的解

毒功能。其表达受金属离子及其他因素, 如胁迫、激素、热激、损伤等的影响<sup>[3]</sup>。具有组织器官特异性和可诱导性。目前, 已经从拟南芥<sup>[4]</sup>、水稻<sup>[5]</sup>、西瓜<sup>[6]</sup>、柽柳<sup>[7]</sup>、二色补血草<sup>[8]</sup>、丹参<sup>[9]</sup>、灵芝<sup>[10]</sup>、菊芋<sup>[11]</sup>等多种植物中分离出许多 MT 基因。

小金海棠是笔者实验室从 40 多种试材中筛选出的铁高效基因型植物, 具有较强的抗盐和抗缺铁胁迫能力, 是良好的果树砧木资源。笔者从小金海

收稿日期: 2010-01-23

基金项目: 北京市重点实验室“果树逆境生理与分子生物学实验室”资助项目

作者简介: 张玉刚 (1973-) 男, 山东枣庄人, 副教授, 博士, 主要从事园艺植物育种与分子生物学研究。

通讯作者: 韩振海 (1963-) 男, 陕西人, 教授, 博士生导师, 主要从事果树抗逆生理与分子生物学研究。

棠上克隆了金属硫蛋白基因, 将为研究小金海棠的抗性机理、金属硫蛋白基因在植物体内的作用和功能以及为今后的转基因工作打下基础。

# 1 材料和方法

## 1.1 试验材料

苹果属植物小金海棠 (*Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang) 种子层积 20 d 左右, 播种于基质中 (高压灭菌后的蛭石), 待幼苗长出 3~4 片真叶时, 转入水培, 方法参见文献 [12]。当幼苗长至 4 月龄时, 采取白色新生根, 称鲜质量, 液氮冷冻后 -70℃ 保存。

小金海棠消减 cDNA 文库为笔者前期构建 [13]。

## 1.2 方法

1.2.1 差异筛选消减 cDNA 文库 差异筛选构建好的消减 cDNA 文库, 具体方法参见 PCR-selected Differential Screening (Clontech USA) 试剂盒说明书。杂交和洗膜方法参见 Kong 等 [14]。

1.2.2 金属硫蛋白基因的电子拼接 将差异筛选消减 cDNA 文库得到的金属硫蛋白基因 cDNA 片段序列构建成本地数据库, 利用拼接软件进行电子拼接。

1.2.3 金属硫蛋白基因 cDNA 全长的克隆 根据电子拼接的全长序列设计基因两端的特异性引物, 扩增 cDNA 全长, PCR 产物连接到 PGEM-T 载体后转化大肠杆菌 DH5α。

1.2.4 小金海棠金属硫蛋白基因开放阅读框分析和系统进化树的构建 开放阅读框的分析和氨基酸的 BLAST 在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 上进行, 功能保守区利用 <http://myhits.isb.sil.ch/> 和 NCB 的 Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Structure/cdd/wrpsb.cgi) 进行预测分析, 系统进化树的构建在 <http://www.ebi.ac.uk/> 进行 [15]。

# 2 结果与分析

## 2.1 差异筛选消减 cDNA 文库

按照 Clontech 公司的 PCR-selected Differential Screening Kit 试剂盒说明书对已经构建的 cDNA 文库进行差异筛选。将得到阳性克隆 (ESTs) 测序后利用 BLASTn 和 BLASTx 相结合在 NCB 的网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行同源序列比对, 然后按其功能分为 9 大类: 基础代谢、蛋白合成、核酸代谢、金属转运、膜蛋白、信号转导、转录因子、胁迫应答和未知蛋白。在胁迫应答蛋白中筛选得到了金属硫蛋白 cDNA 片段 27 个, 片段大小为 200~500 bp 将这 27 个 cDNA 片段构建成本地数据库。

## 2.2 全长序列的拼接与克隆

将本地数据库中的 27 个 cDNA 片段用拼接软件进行拼接。去掉中间重叠区域, 得到 636 bp 的序列。然后根据拼接序列设计基因两端的特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增产物送上海生工测序。测序结果同用软件拼接的全长进行比对, 二者的结果基本一致。

## 2.3 小金海棠金属硫蛋白基因 *MxMT2* 序列分析

2.3.1 金属硫蛋白基因 *MxMT2* 序列基本信息 利用电子拼接和 RT-PCR 相结合的方法, 克隆得到了小金海棠金属硫蛋白基因的全长, 属于 MT2 型基因, 将其命名为 *MxMT2* (图 1), GenBank 登录号为 GQ06589。该基因全长 610 个碱基, 开放阅读框 (ORF) 为 240 bp, 5' 非翻译区有 55 bp, 3' 非翻译区有 315 bp, 该基因编码 80 个氨基酸, 推测分子量为 7.74 kDa。

```
1      ACGCGGGATTCAAACAGAGTTGTGGTCATCTGCCTTATTGTCATCAATCCAAAAATGTC
                                         M S
61      GTCGTGCTGCGGTGTTAAATGTGGTTGCGGGTCCGGCTGCGGCTGCGGCAGTGGCTGCAA
      S C C G G K C G C G S G C G C G S G C N
121     CGGGTGCGGGATGGCTCTGATCTGAGCTACATGGAGGGTCCACCACTGAGACCCCTTGT
      G C G M A P D L S Y M E G S T T E T L V
181     CATGGGAGTTGCTCCCCAGAAGTCGCACTTAGAGGCATCTGGGATGGGAGTTGCAGCTGA
      M G V A P Q K S H L E A S G M G V A A E
241     GAACGGATGCAAGTGCGGGGATAGCTGCACCTGCAACCCCTGCAAGTGCACCAAGTGAGT
      N G C K C G D S C T C N P C K C T K *
301     GACAGATGTACCATCTGACGAAGCAAGAGAACCCTTGGGCTTCTATGTTTACAGTAGT
361     AATCTATGTGTGTCTGGTAATTATGATCCTAATGTACCAAGGTCGTGTGTAGTAATA
421     AAGTAGCCATGGCTTGCCCTCTGACCTGCGGATCCACTAGGCTAGGATCTGCTGAGGATG
481     ATCCTAGGTTACGGCTGCTTGTCTGTGTTTCTATCATGTGTTGTAGAGTTGGATCA
541     TACTGTGTGATGAAATGAATGAAAACTGCTTGTTTACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
601     AAAAAAAAAA
```

方框内序列为开放阅读框, ATG 为起始密码子, TGA 为终止密码子。  
The sequence in square is open reading frame. ATG is the initiation codon. TGA is the terminator codon.

图 1 小金海棠金属硫蛋白基因序列及推测的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and putative amino acid sequences of *MxMT2* gene

2.3.2 小金海棠金属硫蛋白 *MxMT2* 同其他物种的金属硫蛋白氨基酸多序列比对分析 将小金海棠 *MxMT2* 假定的氨基酸序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 并利用 CLUSTALW (1.82) (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>) 同其他物种的金属硫蛋白进行氨基酸多序列比对分析, 由图 2 可

以看到,小金海棠 *MxMT2* 同其他物种如沙梨 (*Pyrus pyrifolia*), 杏树 (*Prunus dulcis*), 美洲李 (*Prunus americana*) 等都有较高的序列同源性, 属金属硫蛋白家族, 编码的氨基酸含有 14 个半胱氨酸 Cys 残基 呈 Cys-Cys-X-Cys-Cys-X-X-Cys 形式排列, 分布在蛋白质的 N 端和 C 端, 中间被无 Cys 的区域分开。

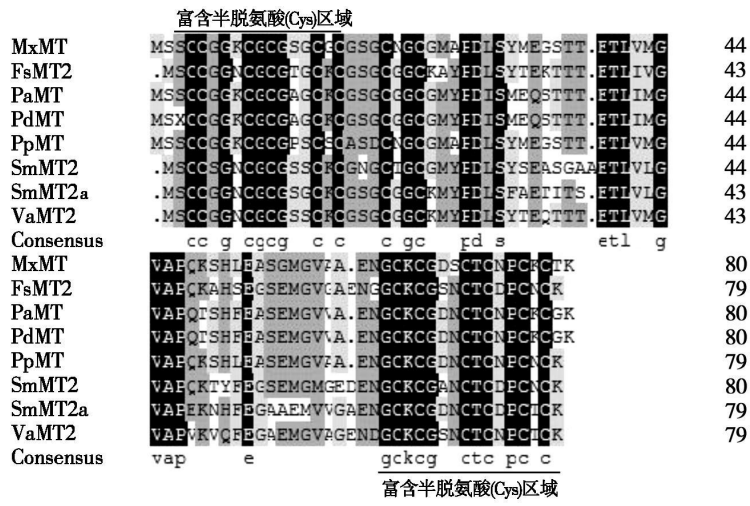


图 2 小金海棠金属硫蛋白 *MxMT2* 同其他物种的金属硫蛋白氨基酸多序列比对分析

Fig 2 Alignment of MT from different plants

用 NCBI 的 Conserved Domains 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白的保守区, 如图 3 所示, 根据预测的保守区结果可知该基因为 2 型金属硫蛋白基因 (Class II metallothioneins), 包含有 Metallothio 保守序列 (位于第 26~78 氨基酸之间)。具有金属硫蛋白基因典型结构域特征。

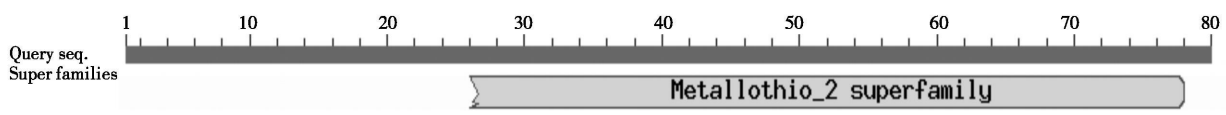


图 3 小金海棠金属硫蛋白 *MxMT2* 蛋白保守域分析

Fig 3 Analysis conserved domain of *MxMT2*

2.3.3 小金海棠金属硫蛋白 *MxMT2* 同其他物种的进化关系聚类分析 根据多序列比对分析结果, 绘制出了小金海棠金属硫蛋白 *MxMT2* 与其他物种金属硫蛋白成员之间的进化关系聚类分析图 (图 4)。从图 4 看出, 小金海棠 *MxMT2* 与沙梨、杏树等植物保持了较近的亲缘关系, 与欧洲山毛榉、旱柳、红小豆、鼠尾草等植物亲缘关系较远。

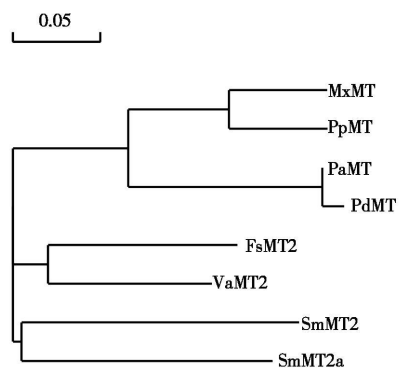


图 4 小金海棠 *MxMT2* 同其他物种的金属硫蛋白系统进化树分析

Fig 4 The phylogenetic tree of the metallothionein sequences

### 3 讨论

小金海棠是笔者实验室经多年努力从 40 多个苹果属植物的种或生态型中筛选到第一个苹果铁高效基因型<sup>[12]</sup>。小金海棠金属硫蛋白基因 *MxMT* 是差异筛选缺铁情况下构建的消减 cDNA 文库得到的。研究表明, 在缺铁胁迫下, 小金海棠表现出典型的机制型植物的缺铁适应性反应<sup>[16]</sup>。当植物受到缺铁逆境胁迫时, 必然会产生一系列的反应以适应环境的要求。*MxMT* 基因在缺铁情况下的表达既可能是植物应对逆境的应激机制, 也可能是植物体已经受到逆境伤害的一项指标。植物 MT 基因在植物中普遍表达水平较高并且结构保守, 其丰富的巯基含量及与重金属结合能力暗示了它在金属离子运输、动态平衡的维持及离子代谢等方面起作用。在缺铁胁迫下, 植物为了得到更多的铁, 必然会诱导表达一些与铁吸收、运输相关的基因, 如 *NAS*<sup>[17, 18]</sup>, *IRT* 基因<sup>[19]</sup>表达明显增强。*MxMT* 基因在缺铁情况下的表达是植物对逆境胁迫的一种适应性反应,

推测它可能在螯合铁离子方面起作用, 然后通过运输途径供给植物生长、代谢需要。另一方面, 缺铁条件又造成了其他金属离子的相对过高, 为了维护环境离子的平衡, MxMT<sub>2</sub>也可能参与了与其他金属离子的螯合, 起到对金属离子的“解毒”功能。至于 MxMT<sub>2</sub>参与铁代谢的具体机制以及如何与金属离子螯合起到解毒功能, 还需要进一步的研究。

参考文献:

[ 1 ] Romero J, Sarti N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins [ J ]. J Inorg Biochem, 2002 88(3/4): 388—396

[ 2 ] Marogoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex [ J ]. Journal of the Am Chem Soc, 1957 79: 4813

[ 3 ] Choi D, Kim H M, Yun H K, et al. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from Nicotiana glauca L. [ J ]. Plant Physiol, 1996 112: 353—359

[ 4 ] Angus M, Zhou J M, Peter B, et al. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from Arabidopsis thaliana [ J ]. Plant Physiol, 1997 113: 1293—1301

[ 5 ] Yu L H, Umeda M, Liu J Y, et al. A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem [ J ]. Gene, 1998 206: 29—35

[ 6 ] Akashi K, Ishinura N, Ishida Y, et al. Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought induced type 2 metallothionein in wild water melon [ J ]. Biochem Biophys Res, 2004 323(1): 72—78

[ 7 ] 常万霞, 王玉成, 姜 静, 等. 柽柳金属硫蛋白基因的克隆及分析 [ J ]. 东北林业大学学报, 2006 34(1): 3—6

[ 8 ] 班巧英, 刘桂丰, 王玉成, 等. 一个新的二色补血草金属硫蛋白基因 LbMT<sub>2</sub> 的克隆及其表达分析 [ J ]. 遗传, 2008 30(8): 1075—1082

[ 9 ] 崔光红, 毛 莹, 黄璐琦, 等. 丹参功能基因组学研究 III—丹参金属硫蛋白 MT-2 基因的分析 [ J ]. 中国中药杂志, 2007 32(14): 1393—1395

[ 10 ] 谢东扬, 祝 雯, 吴祖建, 等. 灵芝金属硫蛋白基因的克隆及序列分析 [ J ]. 中国农学通报, 2007 23(5): 87—90

[ 11 ] 常团结, 陈 蕾, 路子显, 等. 菊芋类金属硫蛋白基因 hMT<sub>2</sub> 的克隆及其表达特征分析 [ J ]. 植物学报, 2002 40(10): 1188—1193

[ 12 ] Han Z H, Wang Q, Shen T. Comparison of some physiological and biochemical characteristics between iron-efficient and iron-inefficient species in the genus Malus [ J ]. Journal of Plant Nutrition, 1994 17: 1257—1264

[ 13 ] 张玉刚, 韩振海, 许雪峰, 等. 小金海棠抑制性消减 cDNA 文库的构建及文库的质量分析 [ J ]. 中国农学通报, 2005 21(3): 77—80

[ 14 ] Kong J, Gong J M, Zhang Z G, et al. A new AOX homologous gene Osm1 from rice (Oryza sativa L.) with an alternative splicing mechanism under salt stress [ J ]. Theoretical and Applied Genetics, 2003 107: 326—331

[ 15 ] 张 强. 青花菜 BoPG1 基因的分子克隆及其生物信息学分析 [ J ]. 华北农学报, 2009 24(3): 26—30

[ 16 ] 刘书娟. 双子叶植物铁高效基因型缺铁适应性反应与指标的研究 [ D ]. 北京: 中国农业大学, 1993

[ 17 ] Zhang Y G, Kong J, Han Z H, et al. Isolation and characterization of a nicotianamine synthase gene MxNas1 in Malus xiaojinensis [ J ]. The Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 2009 84(1): 47—52

[ 18 ] 张玉刚, 许雪峰, 韩振海, 等. 抑制性消减杂交分离苹果缺铁诱导的相关基因 [ J ]. 园艺学报, 2007 34(3): 555—560

[ 19 ] 王 忆, 戚金亮, 韩振海, 等. 苹果 MxMT<sub>2</sub> 基因的克隆与原核表达 [ J ]. 园艺学报, 2007 34(4): 999—1000