

陈 泉,秦 璐,王爱英,等. 天山雪莲 *SikMT2* 基因的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):46-49.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.012

# 天山雪莲 *SikMT2* 基因的克隆及表达分析

陈 泉<sup>1</sup>,秦 璐<sup>1</sup>,王爱英<sup>1</sup>,肖兴国<sup>2</sup>,祝建波<sup>1</sup>

(1. 石河子大学农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832003;2. 中国农业大学,北京 100083)

**摘要:**从天山雪莲叶片 cDNA 文库中分析得到一个类金属硫蛋白基因序列,命名为 *SikMT2*。生物信息学分析表明,该基因包含一个完整开放阅读框(225 bp),编码 75 个氨基酸。*SikMT2* 分子量为 7.47 ku,理论等电点是 4.44,是一个不具有信号肽的亲水性蛋白。氨基酸多序列比对发现,*SikMT2* 序列在 N 端和 C 端保守性较高,具有 MT2 的典型特征;21 个物种间的系统发育树可以看出,天山雪莲与蒲公英进化关系最近。

**关键词:**天山雪莲;*SikMT2* 基因;信息学分析;实时定量 PCR

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0046-04

金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)超家族是一类广泛存在于人体、动物、植物以及微生物体内的一种包含了半胱氨酸丰富区域小分子蛋白<sup>[1]</sup>。动物体内的 MTs 于 1957 年首次从蓄积镉的马肾中被发现<sup>[2]</sup>,植物 MTs 最早从 1977 年从大豆根中被发现<sup>[3]</sup>。近些年来研究表明,MTs 在植物中普遍存在,参与了许多生理过程,如生长发育、胚胎发生、小孢子发生、衰老、果实的发育、成熟和抗逆等<sup>[4]</sup>。同时对植物 MTs 的研究在基因的组织、器官特异性、表达特征、基因组结构和染色体定位方面得到快速的发展<sup>[5-7]</sup>。不仅如此,有报道称植物 MTs 不仅在植物解除重金属离子的毒害<sup>[8]</sup>、调节金属离子特定运输方面有重要作用<sup>[9]</sup>,还参与了细胞内氧自由基清除<sup>[10]</sup>和植物抗氧化胁迫<sup>[11]</sup>。但现阶段我们对植物 MTs 功能的研究还仅处于起步状态,MTs 参与了植物的许多生理代谢过程而且分布十分广泛,因此对植物 MTs 的研究将成为一个具有重要意义方向。

天山雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir)为菊科凤毛菊属,别称新疆雪莲、雪荷花、雪莲花等<sup>[12]</sup>。天山雪莲主要生长在新疆天山海拔 2 400~4 100 m 的高山草甸、高山冰碛石、悬崖峭壁石缝等处,最高月平均温度 3~5℃,最低月平均温度 -19~-21℃,为典型的耐极端低温的多年生高山植物<sup>[13]</sup>。天山上常年伴随着强烈的紫外线照射、极大的昼夜温差、低温等恶劣环境,但是天山雪莲产生了适应极端环境条件的独特的生存机制<sup>[14]</sup>,在如此恶劣的环境下依旧能旺盛生长并且开花<sup>[15]</sup>。因此,天山雪莲参与此类非生物胁迫的基因值得深入研究。

迄今为止,研究人员已经从拟南芥、水稻、苹果、西瓜、桉柳、小金海棠等多种植物<sup>[16-20]</sup>中分离出许多 MTs 基因。但有关天山雪莲 MT 基因的研究尚未见报道。本研究以天山雪莲为试验材料,克隆得到 1 个 MT 基因,并对其序列进行分析,

旨在为研究天山雪莲的抗逆性生理特征奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

天山雪莲试管苗由石河子大学农业生物技术重点实验室培养;植物总 RNA 提取试剂盒购自艾德莱生物科技有限公司;M-MLV 试剂盒购自 TaKaRa 公司;凝胶电泳回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;克隆载体 pGM19-T 购自 TaKaRa 公司;SYBR Green I Master Mix 购自 Roche 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 天山雪莲 *SikMT2* 基因的克隆** 随机挑取 10 个已构建的天山雪莲叶片组织的 cDNA 文库的单克隆,使用通用引物进行 PCR 鉴定,并对鉴定为阳性的菌株进行测序。通过 BLAST 分析得到的 cDNA 片段,获得 *SikMT2* 基因序列,利用 Primer5.0 设计 *SikMT2* 基因的 PCR 引物 *SikMT2*-F, *SikMT2*-R, *GAPDH*-qRTF 和 *GAPDH*-qRTR(表 1)。天山雪莲总 RNA 的提取采用植物总 RNA 提取试剂盒;cDNA 第一链的合成按照 M-MLV 试剂盒操作步骤进行,产物作为 RT-PCR 模板进行 PCR,反应程序:94℃ 5 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环。PCR 产物经回收连接至载体 pGM19-T,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α,筛选阳性克隆送至北京六合华大基因完成测序。

**1.2.2 天山雪莲 *SikMT2* 基因的序列分析** 对获得的 *SikMT2* 基顺测序结果利用 DNAMAN 软件进行分析,确定开放阅读框及相应的氨基酸序列。运用 Conserved Domains(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)网站预测蛋白的保守区;用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)和 ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/>)进行蛋白理化性质预测分析;运用 Motif Scan([http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif\\_scan](http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan))网站进行蛋白质基序预测分析;运用 TMHMM 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)网站预测蛋白质的跨膜结构;运用 SignalP 3.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)网站进行蛋白质信号肽预测;运用生物信息学软件 Jpred3(<http://www.comp-bio.dundee.ac.uk/www-jpred/index.html>)对 *SikMT2* 蛋白质

收稿日期:2014-09-10

基金项目:新疆生产建设兵团博士基金(编号:2009jc01)。

作者简介:陈 泉(1989—),男,福建永安人,硕士,主要研究方向为植物基因工程。E-mail:847543272@qq.com。

通信作者:祝建波,男,博士,研究员,研究方向为植物基因工程。

E-mail:zjbshz@126.com。

进行二级结构预测;运用 NCBI 网站的 BLAST( <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 工具进行氨基酸对比分析;运用 DNA-MAN 软件对其他物种的同源氨基酸进行多重比对;运用 Clustalx1.83 和 MEGA5.2 软件构建天山雪莲 *SikMT2* 蛋白的系统进化树。

1.2.3 天山雪莲 *SikMT2* 基因的实时定量 PCR( real time - PCR) 分析 将用于低温胁迫的天山雪莲试管苗移入 4 ℃ 光照培养箱进行低温处理;将用于盐胁迫的天山雪莲试管苗转入含有 200 mmol/L 的 MS 培养基中进行处理;将用于干旱胁迫的天山雪莲试管苗放入含有 10% 聚乙二醇( polyethyleneglycol, PEG) 的 MS 培养基中进行处理。分别取处理 0 (CK)、2、4、8、12、24、36 h 的天山雪莲叶片样品,液氮速冻, -70 ℃ 保存备用。分别提取对照和不同时间处理的样品 RNA,反转录以 cDNA 为模版,对 *SikMT2* 基因在低温和氧化胁迫下的表达进行分析。按照 Roche 公司 SYBRG Green I Master Mix 试剂盒说明书操作,以天山雪莲看家基因 *GAPDH* 作为内参基因(表 1),利用 Applied Biosystems 7500 Real time PCR 扩增,反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 个循环。结果采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对数据进行分析,每个样品进行 3 次重复,取平均值。

1	<u>ATG</u> TCTTGCTCAAGTGAAAGTGCAACTGTGGCTCAAGTGCTCATGCGGCAGCAGCTGC
1	<u>M</u> S C S S G K C N C G S S C S C G S S C
61	AACTGCAACTCAGCCGACATTGAGAGGTCGACCCCCCCCCCGTGATCGTTGATGGCGTT
21	N C N S A D I E R S T P P V I V D G V
121	GCACCCAGATGACATATGCCGAGGGAACCGAGACCAGCTTCGTTGCCGAGGGTGGAAC
41	A P Q M T Y A E G T E T S F V A E G G N
181	GGGTGCAAGTGTGGTGAAACTGCAAGTGCATCCTTGCAACTGTTAA
61	G C K C G G N C K C D P C N C *

前后方框内分别为起始密码子和终止密码子;下划线处为信号肽;“\*”表示终止密码子

图1 *SikMT2* 基因 cDNA 序列及编码区推测的氨基酸序列



图2 *SikMT2* 基因的保守结构域的预测

2.2 天山雪莲 *SikMT2* 蛋白的理化性质

用 ProtParam 工具对 *SikMT2* 蛋白质的一级结构及理化性质进行预测,结果显示该蛋白质相对分子量为 7.47ku,理论等电点( theoretical pI) 为 4.44。分子式为 C<sub>290</sub>H<sub>464</sub>N<sub>88</sub>O<sub>113</sub>S<sub>15</sub>, 不稳定指数( instabilityindex II) 为 63.23,属于不稳定蛋白;脂肪指数( aliphaticindex) 为 31.20。SignalP3.0 Server 分析结果显示,*SikMT2* 蛋白不具有转运肽。ProtScale 分析结果显示,该蛋白疏水性氨基酸数小于亲水氨基酸数,推导为亲水性蛋白(图 3)。通过 Motif Scan 工具对 *SikMT2* 的序列进行分析,结果表明 *SikMT2* 具有典型的 MT2 蛋白结构,其中包含了 1 个蛋白激酶 C 的磷酸化位点( 5 ~ 7),5 个肉豆蔻酰基化位点( 11 ~ 16、17 ~ 22、49 ~ 54、58 ~ 63、66 ~ 71),1 个酪氨酸蛋白激酶位点( 45 ~ 48)。运用生物信息学软件 TMHMM - 2.0 对 *SikMT2* 进行跨膜结构分析,结果表明该蛋白不具有跨膜结构(图 4)。运用生物信息学软件 Jpred3 对 *SikMT2* 蛋白质进行二级结构结构分析,结果表明该蛋白以无规则卷曲为主要功能结构域(图 5)。

2 结果与分析

2.1 天山雪莲 *SikMT2* 基因的克隆

通过对天山雪莲 cDNA 文库 PCR 鉴定呈阳性的单克隆菌株的测序结果 BLAST 比对得到 *SikMT2* 基因序列,根据该序列设计特异性引物。以天山雪莲为材料提取总 RNA,反转录成 cDNA,作为 PCR 扩增的模板。通过 PCR 扩增,得到 1 条 250 bp 左右的条带。将此 PCR 产物用凝胶回收试剂盒回收后连接到 pGM19 - T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆扩大培养后 PCR 鉴定,对鉴定为阳性的菌株进行测序。测序结果经 DNAMAN 软件分析,该序列包含 1 个长 225 bp 的完整开放阅读框,编码 75 个氨基酸(图 1);通过 Conserved Domains 分析,该基因编码的蛋白中含有保守的 MT2 基序(图 2)。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
<i>SikMT2</i> - F	5' - GGATCCGAATCATGCTCTTGCTCAAGTGGA - 3'
<i>SikMT2</i> - R	5' - TCTAGACGGGTCGTCGCTTAACAGT - 3'
<i>GAPDH</i> - qRTF	5' - TTCAACATTATTTCCAGCAGCAC - 3'
<i>GAPDH</i> - qRTR	5' - TA AGTAGCCTTCTTCTCAAGTCTCACA - 3'

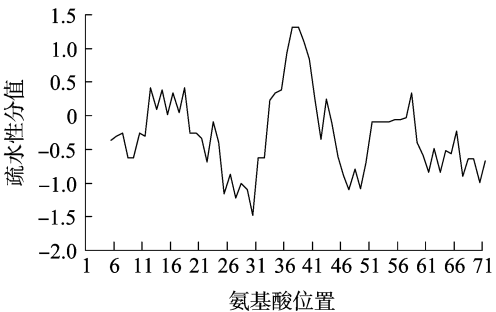


图3 *SikMT2* 疏水性/亲水性分析

2.3 同源性及进化树分析

在 GenBank 中检索发现,天山雪莲 *SikMT2* 基因编码的氨基酸序列与已经报道的其他高等植物如黑果苣荬( *Pimpinella brachycarpa*, AAC6250.1)、海紫菀( *Aster tripolium*, BAC57959.1)、黄芪( *Salvia miltiorrhiza*, AEQ54918.1)、辣椒( *Capsicum chinense*, CAI48068.1)、龙葵( *Solanum nigrum*, ACF10398.1)、蒲公英( *Taraxacum officinale*, ABA27037)、水

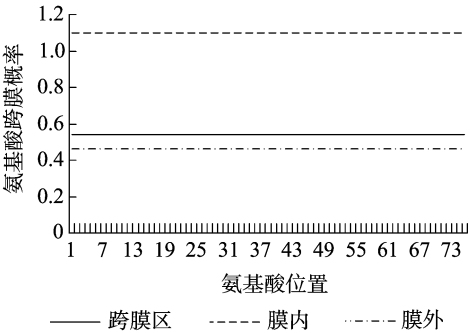


图4 SikMT2 跨膜结构预测分析

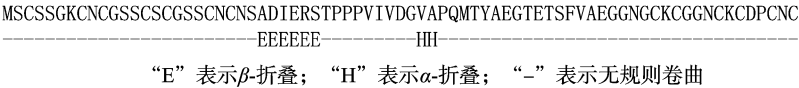


图5 天山雪莲 SikMT2 蛋白质进行二级结构结构分析

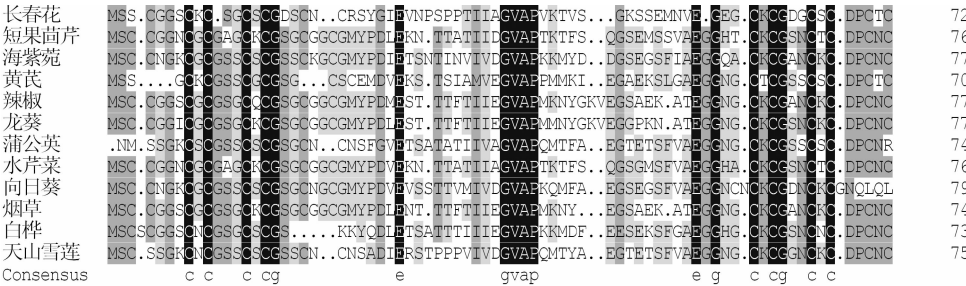


图6 SikMT2 序列与其他物种同源蛋白序列的比较

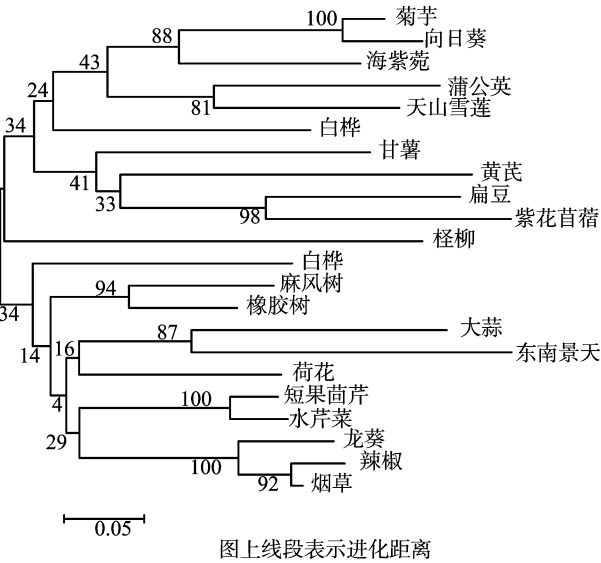


图7 植物 SikMT2 的系统发育树

2.4 天山雪莲 SikMT2 基因对低温胁迫、盐胁迫和干旱胁迫响应的 Real-Time PCR 分析

为了证明天山雪莲类萌发素蛋白基因 *SikMT2* 在抗逆中是否起作用,对 *SikMT2* 基因在 4 ℃、200mmol/L NaCl 和 10% PEG 处理下的表达情况分别进行了实时荧光定量 PCR 检测。结果显示,天山雪莲在低温胁迫、盐胁迫和干旱胁迫下

芹菜 (*Oenanthe javanica*, AAB70560. 1)、向日葵 (*Helianthus annuus*, ABO26877. 1)、烟草 (*Nicotiana tabacum*, CAC12823. 1)、长春花 (*Catharanthus roseus*, AAY84148. 1) 和怪柳 (*Tamarix androssowii*, AAT39518. 1) 的氨基酸序列具有较高的相似性,其中与蒲公英的相似性最高,达到 73. 33%。不同植物的 *MT2* 基因在多肽链的 N 端和 C 端有着非常保守的半胱氨酸序列(图 6)。用 Clustalx1. 83 和 MEGA6. 1 软件将 *SikMT2* 与 GenBank 中公布的白桦、怪柳、大蒜、东南景天、短果茴芹、甘薯、海紫菀、荷花、红豆、黄芪、菊芋、辣椒、龙葵、麻风树、蒲公英、水芹菜、向日葵、橡胶树、烟草、长春花和紫花苜蓿的 *MT* 进行系统进化分析,结果显示,天山雪莲 *MT2* 与蒲公英 *MT* 亲缘关系最近(图 7)。

*SikMT2* 基因的表达在不同时间段有明显变化(图 8)。

低温处理 *SikMT2* 的表达量水平有明显的波动。处理 2 h 后,基因的表达量是对照(CK)的 91. 4%;随着时间的延长,该基因的表达量开始变化,4 h 的表达量上调到 CK 的 1. 12 倍;处理 12 h 的表达量下降到 CK 的 47%;处理 24 h 的表达量上升为 CK 的 1. 6 倍;处理 36 h 的表达量是 CK 的 1. 4 倍。天山雪莲在 10% PEG 的培养基中胁迫 2 h 后,*SikMT2* 基因的表达水平迅速下调,表达量仅仅是 CK 的 34. 6%;在随后的处理中,*SikMT2* 基因表达水平有所上升,在 4 h 时 *SikMT2* 的表达量相当为 CK 的 107. 9%;但是接下来的处理中该基因表达水平不断降低,由 8 h 的 77. 3% 降到 36 h 的 26. 4%,*SikMT2* 基因的表达量明显降低。200 mmol/L NaCl 处理 2 h,基因的表达量上升到 CK 的 1. 81 倍;但是 4 h 的表达量有所降低,是

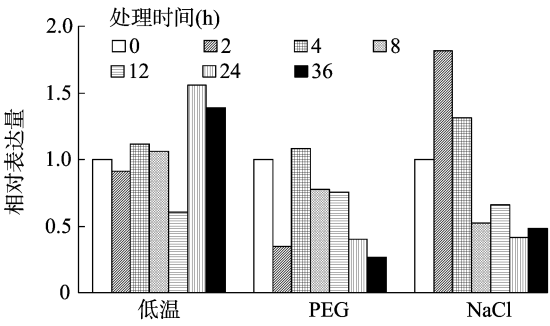


图8 低温、NaCl 和 PEG 胁迫下 SikMT2 基因的表达水平

对照 CK 的 1.31 倍;之后 *SikMT2* 基因的表达持续下降,8 h 的表达量下降到 CK 的 52.1%;12 h 的表达量下降到 CK 的 65.9%;24 h 的表达量下降为 CK 的 41.4%;36 h 后表达量为 CK 的 48.6%。

说明在非生物胁迫下,*SikMT2* 基因受到诱导表达,但随着胁迫时间的延长,表达水平呈现不同的趋势。在低温胁迫(4℃)中,*SikMT2* 的表达量有明显的起伏,但是随着处理时间的延长,基因的表达量缓慢增长;在盐胁迫和干旱胁迫过程中,*SikMT2* 的表达量随着处理时间的延长而降低。

### 3 讨论与结论

目前,人们已经对植物的抗逆功能进行了深入的研究。研究表明植物处于逆境胁迫条件下产生的活性氧首先袭击膜系统,破坏生物膜上酶的空间结构及生物膜的通透性,致使细胞死亡<sup>[21]</sup>。重金属离子作为重要的胁迫因子同样诱导植物产生氧自由基和过氧化物<sup>[22-24]</sup>。

在对克隆得到的天山雪莲 *SikMT2* 蛋白进行同源性及进化树分析时发现,*SikMT2* 与其他植物氨基酸序列比对中 MTs 蛋白的 N 端和 C 端的半胱氨酸(Cys)残基非常保守,这些半胱氨酸残基为 MTs 提供了丰富的巯基,也为 MTs 的三位结构域提供了基础,MTs 可以将两端富含 Cys 的区域折叠成适合结合金属离子的构象<sup>[25]</sup>。金属硫蛋白中丰富的巯基含量以及重金属结合能力决定了其功能方面的多样性<sup>[10]</sup>。研究表明,MTs 丰富的巯基含量为其提供了抗氧化能力,MTs 清除羟自由基(—OH)的能力约为超氧化物歧化酶(SOD)的 10 000 倍,而清除氧自由基的能力约是谷胱甘肽(GSH)的 25 倍<sup>[26]</sup>,而 Akashi 等从野生西瓜中分离出金属硫蛋白 CLMT2 同样具有很强的氧自由基清除能力<sup>[11]</sup>。Reynold 和 Crawford 对面包小麦 *EcMT* 基因的研究发现,*EcMT* 基因通过夺取依赖  $Zn^{2+}$  的 DNA、RNA 聚合酶及锌指蛋白中的  $Zn^{2+}$ ,从而调控相关基因的表达<sup>[4]</sup>。由此推断植物 MTs 可能是植物体内重要的抗氧化小分子,而且可能参与了基因的表达调控。

本研究 Real-Time PCR 分析发现,低温、NaCl 和 PEG 胁迫下,*SikMT2* 基因受到诱导表达,而且表达量有明显区别。笔者认为 *SikMT2* 基因的表达与植物的抗逆性有关,但是该基因的调控方式和生理功能有待进一步鉴定和证实。

### 参考文献:

- [1] Robinson N J, Tommey A M, Kuske C, et al. Plant metallothioneins [J]. Biochem, 1993, 29(5): 1-10.
- [2] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex[J]. J Am Chem Soc, 1957, 29: 4813-4814.
- [3] Casterline J L, Barnett N M. Isolation and characterization of cadmium-binding components in soybean plants[J]. Plant Physiol, 1977, 59: 115-124.
- [4] 常团结, 朱 祯. 植物金属硫蛋白研究进展(二)[J]. 生物技术通报, 2002, 18(5): 1-6.
- [5] Hudspeth R L, Hobbs S L, Anderson D M, et al. Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 31(3): 701-705.
- [6] Whitelaw C A, le Huquet J A, Thurman D A, et al. The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) [J]. Plant Molecular Biology, 1997, 33(3): 503-511.
- [7] Gritsch A, Ganai M, Stephan U W, et al. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato [J]. Plant Molecular Biology, 1998, 37(4): 701-714.
- [8] Robinson N J, Wilson J R, Turner J S. Expression of the type 2 metallothionein-like gene *MT2* from *Arabidopsis thaliana* in  $Zn^{2+}$ -metallothionein-deficient *Synechococcus* PCC 7942: putative role for MT2 in  $Zn^{2+}$  metabolism [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 30(6): 1169-1179.
- [9] Eapen S, D'Souza S F. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals [J]. Biotechnology Advances, 2005, 23(2): 97-114.
- [10] 全先庆, 高 翔. 植物金属硫蛋白及其在自由基清除中的作用 [J]. 临沂师范学院学报, 2003, 25(6): 64-66.
- [11] Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, et al. Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 323(1): 72-78.
- [12] 孙 辉, 祝建波. 利用简并引物克隆天山雪莲 *SikPIP* 基因片段及 RNAi 载体的构建 [J]. 生物技术通报, 2010(6): 107-112.
- [13] 陈发菊, 杨映根, 赵德修, 等. 我国雪莲植物的种类、生境分布及化学成分的研究进展 [J]. 植物学通报, 1999, 16(5): 561-566.
- [14] 黄继红, 谭敦炎. 雪莲的研究进展 [J]. 新疆农业大学学报, 2002, 25(2): 8-13.
- [15] 祝建波, 刘海亮, 王 重, 等. 天山雪莲叶片全长 cDNA 文库的构建 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(6): 170-173.
- [16] Murphy A, Zhou J, Goldsbrough P B, et al. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Physiology, 1997, 113(4): 1293-1301.
- [17] 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(1): 29-35.
- [18] 樊连梅, 刘更森, 刘成连, 等. 苹果金属硫蛋白基因 *MdFjMT2* 克隆及生物信息学分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 782-789.
- [19] 常万霞, 王玉成, 姜 静, 等. 柞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.
- [20] 张玉刚, 韩振海. 小金海棠金属硫蛋白基因 *MxMT2* 克隆与生物信息学分析 [J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 60-63.
- [21] Ramachandra Reddy A, Chaitanya K V, Vivekanandan M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants [J]. Journal of Plant Physiology, 2004, 161(11): 1189-1202.
- [22] 方 勇, 陈 曦, 陈 悦, 等. 外源硒对水稻籽粒营养品质和重金属含量的影响 [J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4): 760-765.
- [23] 江行玉, 赵可夫. 植物重金属伤害及其抗性机理 [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(1): 92-99.
- [24] 孟 丽, 李德生, 李海茹, 等. 重金属镉对日本槐木叶绿素和保护酶活性的影响 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 178-180.
- [25] 常团结, 朱 祯. 植物金属硫蛋白研究进展(一) [J]. 生物技术通报, 2002, 18(3): 5-10.
- [26] 张 艳, 杨传平. 金属硫蛋白的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2006, 4(3): 73-78.