

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01075

# 一个新的二色补血草金属硫蛋白基因 *LbMT2* 的克隆及其表达分析

班巧英, 刘桂丰, 王玉成, 张大伟, 蒋丽丽

东北林业大学, 哈尔滨 150040

**摘要:** 从二色补血草 cDNA 文库中分离出一个新的金属硫蛋白基因 *LbMT2* 全长 cDNA 序列。该基因全长 518 bp, 其中 5'非翻译区(UTR)64 bp, 3'非翻译区 205 bp, 开放阅读框(ORF)249 bp, 编码由 82 个氨基酸组成的蛋白质, 编码蛋白的分子量为 8.1 kDa, 理论等电点(pI)为 4.72。利用实时定量 PCR 方法研究了二色补血草在 CuSO<sub>4</sub>、CdCl<sub>2</sub>、NaCl、低温和 PEG 胁迫下不同时间该基因的表达模式。结果表明, CuSO<sub>4</sub>、CdCl<sub>2</sub>、NaCl 和低温处理均能诱导 *LbMT2* 基因在二色补血草的根和叶中的表达, 而 PEG 处理则抑制了 *LbMT2* 在根和叶中的表达。构建 *LbMT2* 基因的原核表达载体 pGEX-LbMT2, 通过 IPTG 诱导在大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 中融合表达, SDS-PAGE 电泳获得 35 kDa 的蛋白条带, 大小与预期相符。

**关键词:** 二色补血草; 金属硫蛋白; 实时定量 PCR; 原核表达

## Cloning and expression of a novel metallothionein gene *LbMT2* from *Limonium bicolor*

BAN Qiao-Ying, LIU Gui-Feng, WANG Yu-Cheng, ZHANG Da-Wei, JIANG Li-Li

Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** The full length cDNA of a novel metallothionein (*LbMT2*) gene was cloned from a cDNA library of *Limonium bicolor*. The *LbMT2* gene cloned is 518 bp in length, which includes a 64 bp of 5' untranslated region (UTR) and a 205 bp of 3' untranslated region. This gene has an open reading frame (ORF) of 249 bp in length, encoding a protein of 82 amino acid residues with the molecular mass of 8.1 kDa and theoretical pI of 4.71. The expression of *LbMT2* gene in *L. bicolor* in response to CuSO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub>, NaCl, cold, and PEG was further investigated using real time quantitative PCR. In both leaf and root of *L. bicolor*, the expression of *LbMT2* was induced by CuSO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub>, NaCl, and cold, but inhibited by PEG stress. *LbMT2* gene was inserted into a prokaryotic expression vector (pGEX-4T-2) to produce the recombinant expression vector pGEX-LbMT2. The expression of *LbMT2* in *E. coli* BL21 was induced with IPTG, which produced a protein band with expected size of 35 kDa on SDS-PAGE.

**Keywords:** *Limonium bicolor*; metallothionein; real time RT-PCR; prokaryotic expression

二色补血草 (*Limonium bicolor*) 属蓝雪科补血草属, 二年生草本植物, 是我国北方的一种重要牧草资源。多生于滩地、湖盆、戈壁、石质山坡、流动沙丘等干旱荒漠生境下, 还能够在强盐碱化土地

收稿日期: 2007-09-05; 修回日期: 2008-06-05

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(编号: 107037), 国家自然科学基金面上项目(编号: 30571509), 黑龙江省攻关重点项目(编号: GB06B303-1)资助[Supported by the Ministry of Education (No. 107037), the General Project of the National Natural Science Foundation of China (No. 30571509), the Key Projects of the Heilongjiang Province (No. GB06B303-1)]

作者简介: 班巧英(1982-), 山西人, 硕士, 专业方向: 基因工程。Tel: 0451-82191627; E-mail: banqiaoying@yahoo.com.cn

通讯作者: 王玉成(1974-), 黑龙江人, 副教授, 博士, 研究方向: 基因工程。Tel: 0451-82191627; E-mail: wangyucheng1029@yahoo.com.cn

上生长,是盐碱化地区的理想绿化植物,具有良好的抗旱、耐盐能力。因此,二色补血草是进行植物抗逆机理研究和基因克隆的优良材料。植物金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类低分子量、富含半胱氨酸的蛋白质,是一种重要的功能蛋白。尽管人们对它已进行了数十年的研究,但对其确切的生理功能尚不完全清楚。由于金属硫蛋白具有结合金属离子的能力,被认为在解除重金属离子毒害、维持组织中金属离子的稳定以及调节金属离子向特定组织的运输等方面起作用<sup>[1]</sup>。除此之外,MT蛋白还具有消除细胞内活性氧(ROS),增强对外界胁迫的适应性和调节生长等作用<sup>[2,3]</sup>。

目前,一些植物MT基因已经被克隆出来。例如:Laplaze等<sup>[4]</sup>从木麻黄(*Casuarina glauca*) cDNA 文库中分离了I型MT基因; Chatthai 等<sup>[5]</sup>从花旗松(Douglas-fir)胚cDNA文库分离了MT基因;谢东扬等<sup>[6]</sup>采用RT-PCR和3'-RACE相结合的方法获得了灵芝(*Ganoderma lucidum*)金属硫蛋白的cDNA序列等。本研究构建了NaHCO<sub>3</sub>胁迫下二色补血草的cDNA文库,通过对文库克隆的随机测序,获得二色补血草*LbMT2*基因全长cDNA序列,对该基因的序列及其蛋白产物进行了分析,并用实时定量RT-PCR分析了该基因分别在CuSO<sub>4</sub>、CdCl<sub>2</sub>、NaCl、低温和PEG胁迫下不同时间的表达情况,同时还研究了*LbMT2*基因在大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21中的表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 *LbMT2* 基因的克隆及序列分析

对二色补血草叶片组织的cDNA文库(0.4 mol/L NaHCO<sub>3</sub>胁迫48 h)的克隆进行随机测序获得了*LbMT2*基因的全长cDNA序列。采用NCBI的开放读码框寻找程序(ORF finder)确定该基因的开放读码框,用NCBI的Conserved Domains工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)预测保守区;对蛋白质的分子量和理论等电点进行了在线计算([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.htm](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.htm))。通过Blastx程序对NCBI的NR数据库进行同源性比对,并对具有同源性、不同植物来源的MT2蛋白用Clustal X1.83进行多序列比对。用Prosite软件在线分析该蛋白质的基本结构域。

### 1.2 *LbMT2* 基因在重金属、盐、旱、冷胁迫下的表达分析

#### 1.2.1 材料的处理

以温室中盆栽的2月龄二色补血草(*Limonium*

*bicolor*)幼苗为研究材料,培养基质为沙和草炭土混合物(2:1)。温室的相对湿度为65%~75%,平均温度为24℃,日照长度为14 h。重金属处理:分别用150 μmol/L的CuSO<sub>4</sub>和150 μmol/L的CdCl<sub>2</sub>溶液浇灌培养基质。盐和旱处理:分别用0.2 mol/L NaCl和20%(W/V)PEG6000溶液浇灌培养基质。冷处理:在2~3℃的培养箱进行低温胁迫。分别在胁迫后0、6、12、24、48 h取二色补血草的叶片(地上部分)和根部组织,用双蒸水清洗,迅速置于液氮中冷冻,-70℃下保存,用于RNA的分离。

#### 1.2.2 实时定量 RT-PCR 分析基因的表达

采用CTAB法<sup>[7]</sup>提取二色补血草总RNA,并用DNaseI(Promega)消化,去除DNA。然后取5 μg总RNA,加入2 μL 10×RT缓冲液、1 μL Rnasehit、1.5 μL oligo(dT)(10 mmol/L)、3 μL dNTP(10 mmol/L)、AMV反转录酶2 U(杭州博日)、9 bp随机引物1 μL(10 μmol/L),用水补足体积20 μL。反应程序为:25℃ 5 min; 42℃ 60 min。将逆转录产物稀释10倍,用作定量RT-PCR模板。

实时定量PCR反应试剂盒为SYBR Green Realtime PCR Master mix(Toyobo Co., Ltd, Osaka, Japan)。反应体系为:2×SYBR Green Realtime PCR Master mix 10 μL,引物各0.3 μL(20 μmol/L),水6.9 μL,模板2.5 μL。定量PCR反应条件为:94℃预变性30 s; 94℃ 12 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s; 78.4℃读板1 s, 45个循环。然后在荧光定量PCR仪上完成RT-PCR。用18S rRNA(EU039827)和β-Tublin(EH793552)基因作为内参基因。引物序列分别为:

*LbMT2*, 上游引物: 5'-GCGGAACTGTGGCTGTG-3',

下游引物: 5'-GCTGATGCCTCGTCAAATC-3';

18S rRNA, 上游引物: 5'-CCGTTCTTAGTTGGTGGAG-3',

下游引物: 5'-CTCGTTGAATACATCAGTGTAG-3';

β-Tublin, 上游引物: 5'-GGTTGAGTGAGCAGTTCAC-3',

下游引物: 5'-GATAACCAGACCACACCTTAGC-3'。

用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法进行基因的相对定量分析<sup>[8]</sup>。

### 1.3 *LbMT2* 基因的原核表达

#### 1.3.1 原核表达载体及所需试剂

原核表达载体pGEX-4T-2及大肠杆菌(*E. coli*) BL21为本实验室保存;限制性内切酶BamH和Xho、高保真pfu Taq酶、T4DNA连接酶等购自

Promega 公司; 凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜公司, ExTaq、DNA marker DL2000 和  $\lambda$ Hind III 购自宝生物工程(大连)有限公司; 蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)购自 Sigma 公司; 其他化学试剂等均购自国内生产厂家, 均为分析纯。

### 1.3.2 重组原核表达载体 pGEX-LbMT2 的构建及其诱导表达

根据 *LbMT2* 基因的 cDNA 序列, 设计原核表达引物。上游引物: 5'-GTACGGATCCATGTCTT-GTTGTGGCGGAACTGTGG-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点); 下游引物: 5'-GCTGCTCGAGTCA-ACCGCAAGTGCAGGGGTTGCAG-3'(下划线为 *Xho* 酶切位点)。用 PCR 的方法引入带酶切位点的 *LbMT2* 全基因, 然后将目的片段和原核表达载体 pGEX-4T-2 同时用 *Bam*HI 和 *Xho* 进行酶切, 再将酶切后的产物纯化(Cycle-pure Kit), 在 T4DNA 连接酶的作用下, 将 *LbMT2* 基因和 pGEX-4T-2 连接并转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。随机挑选单克隆转化子提取质粒, 用 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切进一步检测插入位点的正确与否。

将鉴定后的 pGEX-LbMT2 重组质粒及 pGEX-4T-2 活化, 进行融合蛋白的表达。挑取单菌落接种于含 50 mg/L Amp 的 LB 培养基中, 37 160 r/min 条件下振荡过夜, 次日用新鲜培养基按 1:50 (V/V) 将菌液稀释, 37 摇至  $OD_{600}$  为 0.4~0.6 之间, 立即加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L; 在 30 条件下分别诱导培养 3、4、5、6 h 后, 收集菌体; 加 1× 电泳上样缓冲液煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行 SDS-PAGE(12%)电泳, 电泳结束后用考马斯亮蓝染色, 脱色后观察电泳结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 *LbMT2* 基因全长 cDNA 的获得及序列分析

通过对文库克隆的随机测序获得了二色补血草金属硫蛋白基因的全长 cDNA 序列, 去除 polyA 后该序列长 518 bp。该序列开放读码框长 249 bp, 共编码 82 个氨基酸, 5'非翻译区 64 bp, 3'非翻译区 205 bp。该基因中共含有 14 个半胱氨酸(C)残基, 占氨基酸残基总数的 17.1%。组成了 N 端为 C-C-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x(2)-C、C 端为 C-x-C-x(3)-C-x-C-x(2)-C-x-C 两部分结构(x 为除半胱氨酸外的其他氨基酸)(图 1), 该结构特征属于典型的 *MT2* 型基因<sup>[9]</sup>, 因此

我们将该 *MT* 基因命名为 *LbMT2*。

```

2  cag ceg tga gaa tac cga tct agt tac tga atc gtt cac ctt cct 46
47 cga atc tgc gtg aaa ata atg tct tgt tgt ggc gga aac tgt ggc 91
      M  S  C  C  G  G  N  C  G
92  tgt gga tct gac tgc aag tgc gga aat ggc tgc gga gga tgc aag 136
      C  G  S  D  C  K  C  G  N  G  C  G  G  C  K
137 atg tac cct gac ctc agc tac acc gaa tct gga act acc acc acc 181
      M  Y  P  D  L  S  Y  T  E  S  G  T  T  T  T
182 gcc acg cta atc tct ggc gtc gct ctc cgt aag aga ttt gac gag 226
      A  T  L  I  S  G  V  A  L  R  K  R  F  D  E
227 gca tca gcg atg ggt gta gca gca gcg gag aac gat ggc tgc aaa 271
      A  S  A  M  G  V  A  A  A  E  N  D  G  C  K
272 tgc gga gac agc tgc acc tgc aac ccc tgc act tgc ggt tga tgc 316
      C  G  D  S  C  T  C  N  P  C  T  C  G  *
317 aag aac acg act ctt cat ccg etc atg aga acg gaa gtc cta tga 361
362 taa tag ccc cta gat gaa tat atg ctt cca tcc acg ggc gga gct 406
407 aga act caa aac tta cgg ggg gca ata ctt att aaa aat att ctt 451
452 cgt aac atg tag cac ata ttt tga tca tat att gag tat tca ata 496
497 tga tgt gtt tgt tgt atc aat a                                     518

```

图 1 *LbMT2* 基因的 cDNA 及推测氨基酸序列

下划线部分为 *LbMT2* 基因 cDNA 的核心序列, 终止密码子处用 “\*” 表示。

Fig. 1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *LbMT2* gene

The core sequence of *LbMT2* gene is underlined, and the termination codon is displayed by an asterisk.

### 2.2 *LbMT2* 基因的氨基酸序列分析

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 2 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, 包含有 Metallothio\_2 保守序列(位于第 24~75 氨基酸之间)。



图 2 *LbMT2* 蛋白保守区预测结果

Fig. 2 The conserved domain of *LbMT2* protein

通过 ExPASy 网站 ([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.htm](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.htm)) 在线分析, 计算该基因编码蛋白的分子量为 8.1 kDa, 理论等电点为 4.72, 该蛋白为酸性蛋白。

用 Blastx 对 *LbMT2* 蛋白序列做同源性分析, 并对 10 种不同植物来源的 *MT2* 基因所编码的蛋白质序列做多序列比对分析(图 3), 结果表明, 二色补血草 *LbMT2* 蛋白与其他 9 种植物的同源性不高, 在 52%~70% 之间。但是, 在其 N 末端、C 末端存在 2 个高度保守的富含半胱氨酸的区域, 且这些半胱氨酸残基的位置和排列方式完全一样, 提示它们可能与其功能有关。

从 Prosite 数据库 (<http://us.expasy.org/prosite/>)

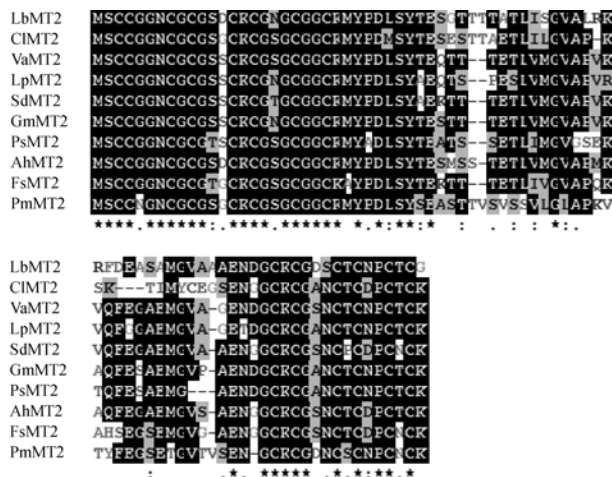


图 3 10 种植物 MT2 蛋白的多序列比对  
LbMT2: 二色补血草(EU039828); CIMT2: 党参(AB126057.1); VaMT2: 豇豆(AB176561.1); LpMT2: 扁豆(AB176567.1); SdMT2: 田菁(EF564345.1); GmMT2: 大豆(AB176559.1); PsMT2: 豌豆(AB176565.1); AhMT2: 花生(DQ178617.1); FsMT2: 山毛榉(AJ130886.1); PmMT2: 车前(AJ843994.1)。星号标记的为完全保守的氨基酸, 原点标记的为保守可替换的氨基酸。

Fig. 3 Multiple-sequence alignment of the MT2 proteins from 10 plant species  
LbMT2: Sea lavender (EU039828); CIMT2: Radix Codonopsis Pilosulae (AB126057.1); VaMT2: Cowpea (AB176561.1); LpMT2: Haricot (AB176567.1); SdMT2: Sesbania (EF564345.1); GmMT2: Soybean (AB176559.1); PsMT2: Pea (AB176565.1); AhMT2: Peanut (DQ178617.1); FsMT2: Beech (AJ130886.1); PmMT2: Plantain (AJ843994.1). Asterisk indicates the full conserved amino acid residues; dot indicates the conserved substitution of amino acid residues.

LbMT2 蛋白的结构中发现, 它含有 7 个肉豆蔻酰基化(Myristyl)位点, 分别位于第 5~10、6~11、17~22、19~24、35~40、59~64、和 67~72 位氨基酸之间; 第 30~33 位氨基酸之间有一个酪氨酸激酶 (CK2)的磷酸化位点; 在第 24~31 位氨基酸之间有一个酪氨酸激酶 (TK)的磷酸化位点(图 4)。

2.3 *LbMT2* 基因在应答重金属、盐、干旱、冷胁迫中的表达模式

为了研究 *LbMT2* 基因在重金属、盐、旱、冷不同胁迫处理下的表达模式, 我们进行了实时荧光定量 PCR(图 5)。在  $\text{CuSO}_4$  胁迫 24 h 时, *LbMT2* 在叶中的表达量达到高峰, 随后急剧下降; 但在胁迫 6、12、24、48 h 时, *LbMT2* 基因在叶中的表达量均显著高于 0 h ( $P<0.01$ )。在根中, *LbMT2* 基因的表达量随胁迫时间的延长不断提高, 在 12 h 时表达量最高, 随后缓慢下降, 其中在胁迫 12 和 24 h 的表达量与 0 h 相比, 表达量差异极显著 ( $P<0.01$ )。总体而言, 根中的表达量总是低于叶部(图 5A)。 $\text{CdCl}_2$  胁迫 12 和 48 h 时, *LbMT2* 在根和叶中表达量显著高于 0 h ( $P<0.01$ ), 在胁迫 48 h 时 *LbMT2* 基因在根和叶中表达量达到最大值(图 5B), 除了其在根部胁迫 6 h 时表达差异与 0 h 相比不显著外, 其余的表达量都与 0 h 相比差异极显著 ( $P<0.01$ )。在  $\text{NaCl}$  胁迫 24 h 时, *LbMT2* 在根和叶中表达达到高峰, 其中叶中的表达与 0 h 相比差异极显著 ( $P<0.01$ ), 根中的表达差异也十分显著 ( $P<0.05$ ), 说明  $\text{NaCl}$  胁迫诱导了 *LbMT2* 基因的表达。低温胁迫 48 h 时, *LbMT2* 基因在根和叶中的表达量明显高于对照 0 h ( $P<0.01$ )(图 5D), 说明低温胁迫诱导了 *LbMT2* 基因的表达。PEG 处理抑制了 *LbMT2* 在叶和根中的表达, 且与对照相比表达量差异极显著 ( $P<0.01$ )(图 5E)。这些结果说明, *LbMT2* 基因能够对  $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{CdCl}_2$ 、 $\text{NaCl}$ 、冷及 PEG 等的胁迫做出应答。

2.4 *LbMT2* 基因的原核表达

2.4.1 原核表达载体(pGEX-LbMT2)构建结果  
随机挑选的 4 个已构建好的 pGEX-LbMT2 载

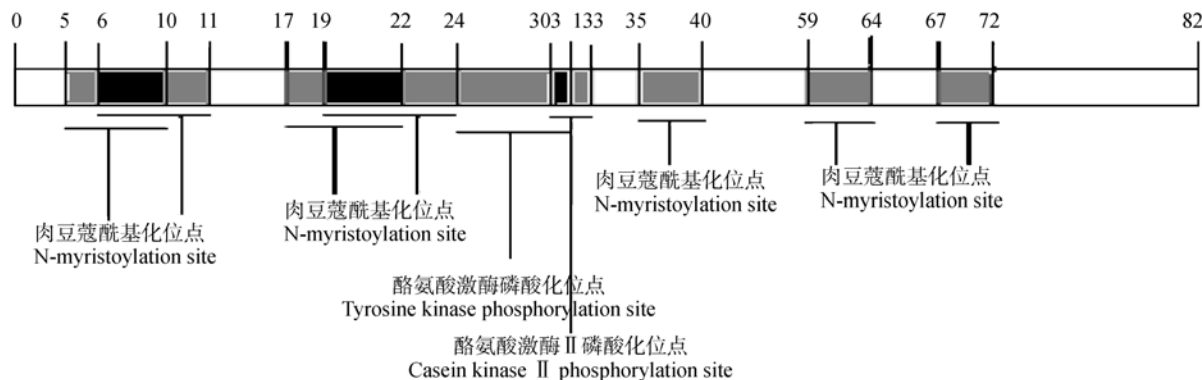


图 4 *LbMT2* 蛋白结构位点分析  
Fig. 4 Analysis of the structure site of *LbMT2* protein

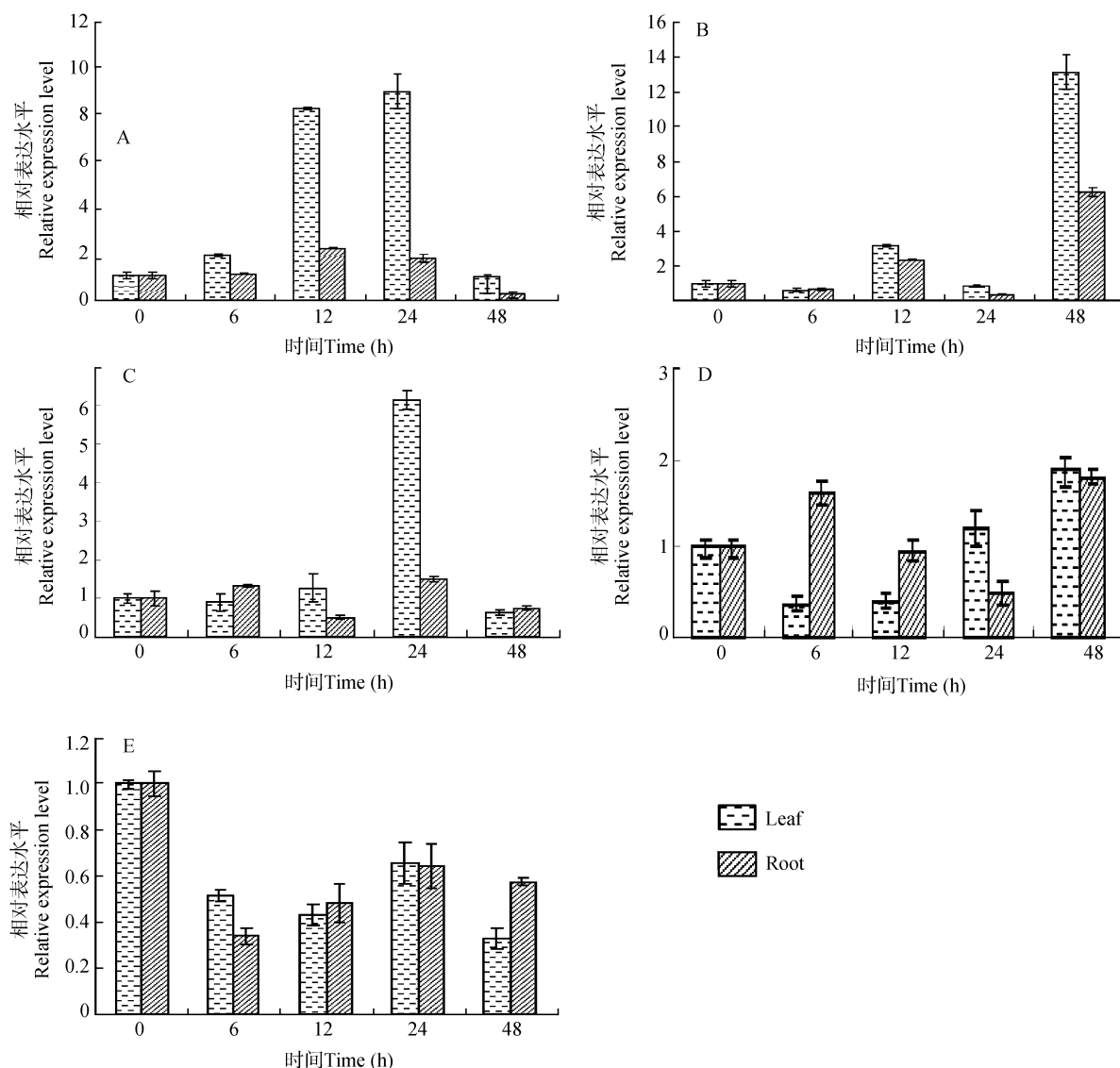


图 5 实时定量 PCR 分析二色补血草中 *LbMT2* 基因在根、叶中的表达模式

A: 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  处理; B: 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  处理; C: 0.2 mol/L NaCl 处理; D: 低温(2 ~ 3  $^{\circ}\text{C}$ )处理; E: 20% (W/V) PEG6000 处理。18S rRNA 和  $\beta$ -Tublin 用作内参, 数据为 3 次重复的平均值。

Fig. 5 Expression pattern of *LbMT2* gene in leaf and root of *L. bicolor* using real-time quantitative PCR analysis

A: 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  treatment; B: 150  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  treatment; C: 0.2 mol/L NaCl treatment; D: Low temperature (2 to 3  $^{\circ}\text{C}$ ) treatment; E: 20% (W/V) PEG6000 treatment. 18S rRNA and  $\beta$ -Tublin were used as the internal controls. Data represent the average of three replicates.

体经 *Bam*H 和 *Xho* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳结果显示 3 和 5 泳道载体的酶切产物含有目的片段 (249 bp) (图 6), 表明 3 和 5 泳道的表达载体构建成功, 可以用作原核表达。

#### 2.4.2 重组 pGEX-LbMT2 在大肠杆菌中诱导表达的结果

将构建的上述原核表达质粒 pGEX-LbMT2 及相应的空白载体 pGEX-4T-2 活化, 挑取单菌落进行诱导表达, 利用 SDS-PAGE 进行检测。质粒 pGEX-4T-2

发现有 26 kDa 左右的特异表达产物, 为 GST 蛋白产物, 而 pGEX-LbMT2 在 35.26 kDa 处出现特异的蛋白带, 其大小与预期相当, 为 GST 与 LbMT2 的融合产物, 说明 *LbMT2* 基因在大肠杆菌中成功地表达并翻译成蛋白质。从图 7 可以看出, 随着时间的增加, 蛋白表达量增加。

### 3 讨论

MT 是一类能与锌、铜、铁等多种重金属离子



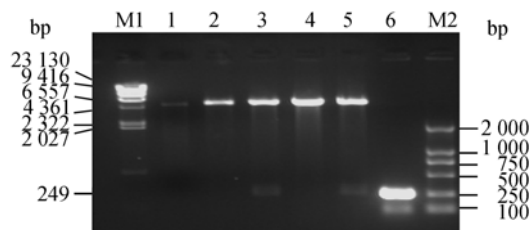


图 6 重组原核表达载体 pGEX-LbMT2 酶切鉴定

M1:  $\lambda$ DNA /Hind III DNA Marker; 1: 经 BamH I 和 Xho I 消化的空载体(pGEX-4T-2); 2~5: 随机挑选的 4 个 pGEX-LbMT2 质粒; 6: LbMT2 基因的 PCR 产物; M2: DL2000 DNA ladder.

Fig. 6 Digestion of recombinant vector pGEX-LbMT2

M1:  $\lambda$ DNA /Hind III DNA Marker; 1: Product of vector (pGEX-4T-2) digested with BamH I and Xho I; 2 to 5: Four randomly chosen pGEX-LbMT2 plasmids; 6: PCR product of LbMT2 gene; M2: DL2000 DNA ladder.

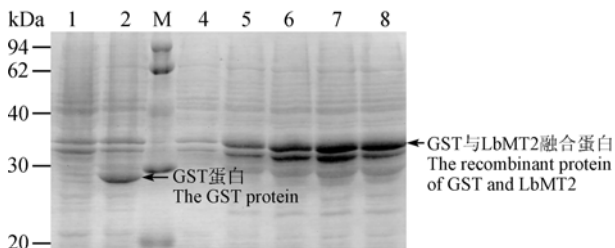


图 7 重组蛋白 pGEX-LbMT2 在大肠杆菌 BL21 中表达的 SDS-PAGE 鉴定

1: 大肠杆菌 BL21/质粒 pGEX-4T-2 为对照(不诱导); 2: 大肠杆菌 BL21/质粒 pGEX-4T-2(IPTG 诱导 6h); M: 蛋白 Marker; 4: 大肠杆菌 BL21/质粒 pGEX-LbMT2(不诱导); 5~8: 大肠杆菌 BL21/质粒 pGEX-LbMT2(IPTG 诱导 3, 4, 5, 6 h)。

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of recombinant protein pGEX-LbMT2 expressed in *E. coli* BL21

1: *E. coli* BL21/plasmid pGEX-4T-2 as control (without IPTG induction); 2: *E. coli* BL21/plasmid pGEX-4T-2 as control (6 h after IPTG induction); M: Protein marker; 4: *E. coli* BL21/plasmid pGEX-LbMT2 without IPTG induction; 5 to 8: *E. coli* BL21/plasmid pGEX-LbMT2 (3, 4, 5, and 6 h after IPTG induction, respectively).

结合的小分子蛋白质。已有的研究表明, 植物MT2蛋白氨基酸序列中半胱氨酸(Cys)的排列一般为CC, CXXC<sup>[10]</sup>, 本研究所克隆的二色补血草LbMT2基因推导氨基酸序列也有此序列结构(图 1), 其N端为C-C-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x(2)-C, C端为C-x-C-x(3)-C-x-C-x(2)-C-x-C 两部分结构(x为除半胱氨酸外的其他氨基酸), 为典型的MT2蛋白<sup>[9]</sup>。高半胱氨酸残基含量是MT蛋白的典型特征, LbMT2基因编码蛋白的半胱氨酸含量高, 占蛋白总氨基酸数的 17.1%。半胱氨酸残基不但对重金属如Cu、Zn、Pb、Ag、Hg、Cd等阳离子的亲和力大, 而且具有很强的还原性, 由于二色补血草LbMT2蛋白半胱氨酸含

量高, 因此, 可能具有较强的抗氧化胁迫能力。另有研究表明, 植物金属硫蛋白的三级结构具有富含Cys的两个结构域, N端为 $\beta$ 结构域, C端为 $\alpha$ 结构域, 都单独呈球状, 整个分子呈哑铃状, 不含 $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠, 构象十分坚固, 有很强的抗热性和抗蛋白酶能力<sup>[11]</sup>, 说明MT蛋白N端和C端在蛋白的结构与功能方面起重要作用。

从多序列比对结果(图 3)可以看出, 各种植物的MT2基因的氨基酸在数量上很接近, 而且半胱氨酸残基都集中分布在蛋白质的N端和C端, 且半胱氨酸残基的数量和排列方式完全一样, 它们的排列方式为: N端为C-C-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C-x(3)-Cx(2)-C, C端C-x-C-x(3)-C-x-C-x(2)-C-x-C。MT2蛋白N端和C端中半胱氨酸残基的数量和排列方式的保守性很强, 也说明N端和C端氨基酸序列可能在MT2蛋白的结构与功能方面起重要作用。

在胁迫 48 h内, 植物无明显的症状表现, 说明各种胁迫对植物没有造成明显的伤害, 植物体内基因的差异表达应该主要由胁迫信号感应引起的, 而不是由于细胞伤害而产生的反应。植物感受逆境胁迫的过程可分为 3 个阶段, 一是感受细胞或组织对原初信号(环境刺激)的感知转导和反应, 产生胞间信使; 二是胞间信使在细胞或组织间传递, 并最终到达受体细胞的作用位点; 三是受体细胞对胞间信使地接受、转导和反应, 从而实现对抗逆基因的表达调控<sup>[12]</sup>。这 3 个阶段在植物受到胁迫的早期完成, 植物通过感受逆境胁迫的信号传递调控抗逆基因的表达来抵抗胁迫。因此, 研究胁迫早期植物基因表达对阐明其抗逆机理非常重要。在本研究中, 我们选取了胁迫 48 h之内的 5 个时间点, 研究LbMT2基因对不同胁迫的应答, 结果可以充分说明植物在受到胁迫的早期基因表达情况。

盐和PEG是逆境胁迫中用来研究盐逆境和干旱(渗透)逆境的主要试剂, 在研究中使用适当的浓度非常重要。自然界中, 一般盐土含盐量在 30~80 mmol/L NaCl 时就已经对植物生长不利, 当土壤表层NaCl含量超过 100 mmol/L以上时, 大多数植物已不能生长。研究中多采用 100 mmol/L以上的NaCl浓度进行胁迫<sup>[13]</sup>。例如, 在Quan等<sup>[14]</sup>的研究中, 采用 200 mmol/L NaCl 胁迫小盐芥, 同样Nishiuchi 等<sup>[15]</sup>用 200 mmol/L NaCl 胁迫虎尾草。本研究中, 我们采用了 200 mmol/L NaCl, 结果表明, 二色补血草在此NaCl浓度下没表现出明显的盐害, 而 LbMT2 基因

在胁迫下表达量明显提高,说明此浓度的NaCl明显使二色补血草产生了胁迫反应。PEG6000 常用来模拟干旱逆境,其应用浓度在 10%~30%之间<sup>[16,17]</sup>。本研究中我们选取了 20 % PEG6000 进行干旱处理,结果发现,这种浓度对二色补血草没有造成胁迫强度过高而萎蔫,也使其*LbMT2* 基因产生了明显的差异表达,是一种较为适合的胁迫浓度。

实时定量PCR结果表明,重金属胁迫能够诱导*LbMT2* 基因在二色补血草根和叶中的表达(图 5A, B),说明该基因可能在二色补血草抗重金属胁迫中起作用,这与以前的研究<sup>[13]</sup>结果一致。此外,我们的研究还表明,盐胁迫诱导了*LbMT2* 基因的表达(图 5C),提示该基因可能与盐胁迫中的Na<sup>+</sup>有应答关系,与此研究相似,Oztur等<sup>[13]</sup>用 150 mmol/L NaCl 处理大麦 24 h,发现*MT2* 的转录本都表现为上调表达。有研究报道一些*MT*基因可以被干旱胁迫诱导表达<sup>[13,16]</sup>,但本研究发现渗透胁迫(PEG6000 处理)抑制了二色补血草*LbMT2* 的表达(图 5 C),这种现象值得进一步研究。目前,关于低温胁迫对*MT2* 表达量的影响,所见报道较少。我们研究发现低温胁迫下*LbMT2* 基因在二色补血草的叶和根部器官中同时被诱导表达,提示该基因可能也具有抗低温胁迫的能力。此外,定量RT-PCR表明*LbMT2* 基因在二色补血草的根部和叶部的表达量有较大差异(图 5 A),说明该基因的表达具有一定的组织器官特异性。这种现象在其他研究中也有报道,例如,蚕豆(*Vicia faba*)的*MT2* 在茎、叶、花中表达,根中不表达<sup>[18]</sup>;菊芋(*Helianthus tuberosus*) *htMT2* 优先在节和节间表达,叶、叶柄、块茎和幼根中较低,根中检测不到<sup>[19]</sup>;番茄(*Lycopersicon esculentum*)的两个*MT* 基因的转录本都是叶中比根中高<sup>[20]</sup>。原核表达的结果表明,二色补血草金属硫蛋白基因(*LbMT2*)可以在大肠杆菌中融合表达,从而为*LbMT2* 蛋白的分离和功能的进一步研究奠定基础。

目前,一些*MT*基因已经转入植物中,转基因植物具有抗镉、汞、砷、硒等元素的能力<sup>[21-23]</sup>。同时,植物*MT*基因还具有远较GST强的氧自由基清除能力<sup>[24]</sup>和抵抗盐胁迫的作用<sup>[15]</sup>。*MT* 蛋白的抗逆生理功能的研究虽然在不断深入,但它除抗氧化作用以及抗重金属胁迫外的其他功能尚不完全清楚,加之已知的植物*MT*基因数量不多,因此,从不同植物中克隆*MT* 基因,并对其在不同逆境下的不同组织中的表达情况进行研究,对进一步了解*MT* 基因的功能极为必要。本研究分离了二色补血草*LbMT2* 基因

的全长cDNA,并对其在重金属、盐、PEG和冷胁迫条件下的表达情况进行分析和原核表达,有助于进一步了解*LbMT2* 基因的功能。

## 参考文献(References):

- [1] Charbonnel-Campaa L, Lauga B, Combes D. Isolation of a type 2 metallothionein-like gene preferentially expressed in the tapetum in *Zea mays*. *J Gene*, 2000, 254 (1-2): 199-208. [\[DOI\]](#)
- [2] Van Lookeren Campagne M, Thibodeaux H, Van Bruggen N, Cairns B, Gerlai R, Palmer JT, Williams SP, Lowe DG. Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12870-12875. [\[DOI\]](#)
- [3] Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C, Jackson PJ. Plant metallothioneins. *J Biochem*, 1993, 295: 1-10.
- [4] Laplace L, Gherbi H, Duhoux E, Pawlowski K, Auguy F, Guermache F, Franche C, Bogusz D. Symbiotic and non-symbiotic expression of *cgMT1*: a metallothionein-like gene from the actinorhizal tree *Casuarina glauca*. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(1): 81-92. [\[DOI\]](#)
- [5] Chatthai M, Kaukinen KH, Tranbarger TJ, Gupta PK, Misra S. The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas fir: regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. *Plant Mol Biol*, 1997, 34(2): 243-254. [\[DOI\]](#)
- [6] XIE Dong-Yang, ZHU Wen, WU Zu-Jian, LIN Qi-Ying, XIE Lian-Hui. Cloning and sequence analysis of metallothionein gene from *Ganoderma lucidum*. *Chinese Agri Sci Bull*, 2007, 23(5): 87-90.  
谢东扬, 祝雯, 吴祖建, 林奇英, 谢联辉. 灵芝金属硫蛋白基因的克隆及序列分析. 中国农学通报, 2007, 23(5): 87-90.
- [7] WANG Yu-Cheng, BO Hai-Xia, YANG Chuan-Ping. A method for rapid isolation of total RNA from *Tamarix* and *Populus euphratica* Oliv. *J Northeast Forestry Univ*, 2003, 31(5): 99-100.  
王玉成, 薄海侠, 杨传平. 胡杨、桤柳总 RNA 提取方法的建立. 东北林业大学学报, 2003, 31(5): 99-100.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25: 402-408. [\[DOI\]](#)
- [9] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 159-182. [\[DOI\]](#)

- [10] CHANG Tuan-Jie, LIU Xiu-Hua, LIU Yin, YAN Yong-Feng, LI Shu-Ping, YAO Xiao-Hui, ZHU Zhen. Effects of metal ions and heat shock on the expression of a metallothionein-like gene *htMT2* in *Helianthus tuberosus*. *J Wuhan Univ (Nat Sci Ed)*, 2002, 48(6): 754–760.  
常团结, 刘秀花, 刘茵, 阎永峰, 李淑萍, 姚晓惠, 朱祯. 金属离子和热激处理对菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)类金属硫蛋白基因 *htMT2* 表达的影响. 武汉大学学报(理学版), 2002, 48(6): 754–760
- [11] QUAN Xian-Qing, ZHANG Hong-Tao, SHAN Lei, BI Yu-Ping. Advances in plant metallothionein and its heavy metal detoxification mechanisms. *Hereditas(Beijing)*, 2006, 28(3): 375–382.  
全先庆, 张洪涛, 单雷, 毕玉平. 植物金属硫蛋白及其重金属解毒机制研究进展. 遗传, 2006, 28(3): 375–382.
- [12] YANG Hong-Qiang, JIE Yu-Ling. Plant stress signal transduction using abscisic acid as messenger. *J Shandong Agri Univ (Nat Sci)*, 2001, 32(4): 549–554.  
杨洪强, 接玉玲. 以脱落酸为信使的植物逆境信号传递. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(4): 549–554.
- [13] Ozturk ZN, Talame V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Gozukirmizi N, Tuberosa R, Bohnert HJ. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(5–6): 551–573. [\[DOI\]](#)
- [14] Quan XQ, Wang ZL, Zhang H, Bi YP. Cloning and characterization of *TsMT3*, a type 3 metallothionein gene from salt cress (*Thellungiella salsuginea*). *DNA Seq*, 2008, 19(3): 340–346. [\[DOI\]](#)
- [15] Nishiuchi S, Liu SK, Takano T. Isolation and characterization of a metallothionein-I protein in *Chloris virgata* Swartz that enhances stress tolerances to oxidative, salinity and carbonate stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(8): 1301–1305. [\[DOI\]](#)
- [16] Jin SM, Cheng YX, Guan QJ, Liu DL, Takano T, Liu SK. A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(21): 1749–1753. [\[DOI\]](#)
- [17] TANG Zhong-Hua, GUO Xiao-Rui, ZHANG Yang-Yang, AN Zhi-Gang, YU Jing-Hua, ZU Yuan-Gang. Expression of Metallothionein-II in *Arabidopsis thaliana* improves desiccation tolerance. *Bull Bot Res*, 2005, 25(4): 415–418.  
唐中华, 郭晓瑞, 张洋洋, 安志刚, 于景华, 祖元刚. 拟南芥 *MT-II* 过量表达提高抗旱性. 植物研究, 2005, 25(4): 415–418.
- [18] Foley RC, Singh KB. Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(1): 435–444. [\[DOI\]](#)
- [19] Chang T, Liu X, Xu H, Meng K, Chen S, Zhu Z. A metallothionein-like gene *htMT2* strongly expressed in internodes and nodes of *Helianthus tuberosus* and effects of metal ion treatment on its expression. *Planta*, 2004, 218(3): 449–455. [\[DOI\]](#)
- [20] Whitelaw CA, Le Huquet JA, Thurman DA, Tomsett AB. The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Mol Biol*, 1997, 33(3): 503–511. [\[DOI\]](#)
- [21] Eapen S, D'Souza SF. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(2): 97–114. [\[DOI\]](#)
- [22] CHEN Hong, JIANG Ting-Bo, DING Bao-Jian, LI Feng-Juan, LI Shao-Chen. Obtainment of transgenic tobacco with metallothionein (*MTI*) gene from *Tamarix* sp. and analysis of its tolerance to cadmium. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(2): 247–256.  
陈虹, 姜廷波, 丁宝建, 李凤娟, 李绍臣. 转柽柳金属硫蛋白基因(*MTI*)烟草的获得及对重金属镉的抗性分析. 农业生物技术学报, 2007, 15(2): 247–256.
- [23] ZHANG Yan, YANG Chuan-Ping, WANG Yu-Cheng. Stimulation effect of overexpression of the metallothionein gene (*MT2*) from *Tamarix androssowii* on the  $\text{Cd}^{2+}$  tolerance in tobacco. *Plant Physiol Commun*, 2007, 43(4): 693–696.  
张艳, 杨传平, 王玉成. 柽柳金属硫蛋白基因(*MT2*)的过量表达对烟草耐  $\text{Cd}^{2+}$  性的促进效应. 植物生理学通讯, 2007, 43(4): 693–696.
- [24] QUAN Xian-Qing, GAO Xiang. Plant metallothionein and its function in scavenging hydroxyl radical. *J Linyi Teachers' College*, 2003, 25(6): 64–66.  
全先庆, 高翔. 植物金属硫蛋白及其在自由基清除中的作用. 临沂师范学院学报, 2003, 25(6): 64–66.