

## 研究报告 Original Papers

## 星星草 cDNA 文库构建和金属硫蛋白(MT-1)基因的克隆

刘桂丰\* 褚延广 王玉成 侯英杰 杨传平

东北林业大学林学院林木遗传育种教研室, 哈尔滨 150040

**摘要** 以受 NaHCO<sub>3</sub> 胁迫后的星星草叶片组织为材料构建了 cDNA 文库, 文库的初始滴度为 2.0×10<sup>6</sup> pfu, 重组率为 95%, 平均插入片段长度为 0.8 kb, 扩增后文库的滴度为 4.0×10<sup>9</sup> pfu·mL<sup>-1</sup>。文库克隆随机测序获得了星星草的金属硫蛋白(MT-1)基因的全长 cDNA 序列, 显示文库中含有一定量的全长基因。MT-1 基因全长 622 bp, 其中 5' 非翻译区 57 bp, 3' 非翻译区 343 bp, 开放读码框长 222 bp, 编码 73 个氨基酸, 氨基酸序列中具有植物 MT-1 蛋白特有的金属响应元件(MRE)序列, MT-1 蛋白的分子量为 7.814 kD, 理论等电点为 4.72。

**关键词** 星星草; cDNA 文库; NaHCO<sub>3</sub> 胁迫; 金属硫蛋白

## Construction of cDNA Library and Cloning of Metallothionein (MT-1) Gene from *Puccinellia tenuiflora*

LIU Gui-Feng\*, CHU Yan-Guang, WANG Yu-Cheng, HOU Ying-Jie, YANG Chuan-Ping

Laboratory of Forest Genetics and Breeding, College of Forest, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract** cDNA library was constructed from *Puccinellia tenuiflora* leaves under NaHCO<sub>3</sub> stress. A primary *P. tenuiflora* library of 2×10<sup>6</sup> pfu was obtained through testing, and the recombinant efficiency of cDNA library was 95%. The average insert size was 0.8 kb, while the titer of amplified library was 4.0×10<sup>9</sup> pfu·mL<sup>-1</sup>. The metallothionein type 1 cDNA was obtained through sequencing clones picked randomly, suggesting some full-length cDNAs were contained in the library. MT-1 was 622 bp in length, including 57 bp of 5' untranslated region and 343 bp of 3' untranslated region. The cDNA had an open reading frame of 222 bp, which contained a deduced amino acid sequence of 73 residues, and had a plant MT-1 special core sequence of metal responsive element (MRE). Molecular weight and theoretic isoelectric point of the protein was 7.814 kD and 4.72, respectively.

**Key words** *Puccinellia tenuiflora*; cDNA library; NaHCO<sub>3</sub> stress; metallothionein

星星草(*Puccinellia tenuiflora*)属禾本科碱茅属植物, 是盐碱草甸的优势种和建群种, 广泛分布于我国北方各地, 它的耐盐碱和耐干旱特性已受到人们的广泛关注。范亚文等<sup>[1]</sup>报道星星草能有效提高土壤有机质含量和铁、锰可利用性, 并降低全钠、全镁和全钙含量。尹尚军等<sup>[2]</sup>报道, 星星草在盐(NaCl)、碱(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)胁迫下, 其体内有机酸含量随着胁迫程度的增大而明显上升, 但含水量、总氮和叶绿素含量则随之明显下降。以往星星草的抗逆研究主要集中在田间和室内实验材料的抗性生理特征与其对盐碱土壤条件的适应能力测定, 而对星星草抗盐碱分子机制的研究及相关基因的克隆尚未见报道。另外, 金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类广泛存在于动物、微

生物与高等植物中的低分子量(6~7 kD)的金属结合蛋白或多肽, 其硫醇和金属离子的含量极高, 二者约占总分子量的 10%<sup>[3]</sup>。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。基于 MT 的金属结合特性, 人们结合实验推测 MT 除了具有基本的金属离子转运与存储作用外, 还能消除细胞内活性氧, 增强对外界胁迫的适应性和调节生长<sup>[4,5]</sup>。基于以上事实, 本文通过对 NaHCO<sub>3</sub> 胁迫下星星草 cDNA 文库的构建和 cDNA 克隆的随机测序, 获得星星草 MT-1 基因的

收稿 2004-10-08 修定 2004-12-28

资助 国家“973”计划(G1999016000)和国家转基因植物研究与产业化专项(JY03A1802)。

\*E-mail: liuguifeng@126.com, Tel: 0451-82190607

全长 cDNA, 并对此种基因的基因序列、蛋白结构位点进行了分析。由于植物抗盐性为数量性状, 涉及大量基因的表达, 因此, 系统抗盐机制的研究需要选择可同时对大量基因表达进行研究的高通量技术, 本文中星星草 cDNA 文库的构建可供高通量的基因表达分析(如 EST 技术、基因芯片技术)时参考。

## 材料与方法

温室中盆栽的星星草(*Puccinellia tenuiflora*)用  $0.4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NaHCO}_3$  溶液浇灌, 进行胁迫处理, 在胁迫 72 h 后取星星草的健康叶片用双蒸水清洗, 迅速置于液氮中冷冻,  $-80^\circ\text{C}$  下保存备用。

cDNA 文库构建试剂盒为 ZAP-cDNA<sup>®</sup> Synthesis Kit and ZAP-cDNA<sup>®</sup> GigapackIII<sup>®</sup> Gold Cloning Kit (Stratagene 公司)。mRNA 分离试剂盒 PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System IV 为 Promega 公司产品。ExTaq 购自宝生物工程(大连)有限公司。T<sub>3</sub> 引物 / T<sub>7</sub> 引物由北京赛百盛生物技术公司合成, M13-20 引物 / M13 反向引物由上海生工生物技术服务公司合成。

采用 CTAB 法<sup>[6]</sup>提取星星草总 RNA, 取 0.6 mg 总 RNA, 用 PolyAtract<sup>®</sup> mRNA Isolation System IV 分离 mRNA, 具体步骤参照试剂盒用户手册进行。

构建 cDNA 文库和检测滴度时, 取 5  $\mu\text{g}$  星星草 mRNA, 用 ZAP-cDNA<sup>®</sup> Synthesis Kit 合成 cDNA 第 1 链和第 2 链, 双链 cDNA 经末端补平后连接上 EcoRI 接头, 再经 XhoI 酶解后用 Sepharose CL-2B 柱分离收集大于 400 bp 的片段, 连接于 Uni-ZAP<sup>®</sup> XR 载体上。用 GigapackIII Gold Packaging Extract 对连接产物进行体外包装, 包装产物转染 SOLR<sup>™</sup> 后铺于含 X-gal 和 IPTG 的平板, 根据噬菌斑数计算文库的滴度和重组率。

采用 PCR 方法检测文库插入片段长度。分别用移液器吸取 6  $\mu\text{L}$  无菌水, 在平板上选取 10 个白斑吸打数次, 将菌液转入 PCR 管中。于  $90^\circ\text{C}$  下灭活噬菌体 10 min, 以其为模板, 用载体两端的测序引物 T<sub>3</sub>、T<sub>7</sub> 为引物, PCR 检测文库插入片段长度。PCR 反应体系为:  $10\times\text{PCR}$  缓冲液 2  $\mu\text{L}$ 、dNTP 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、ExTaq 1 U、引物 T<sub>3</sub> 和 T<sub>7</sub> 各 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、模板 2  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为:

$94^\circ\text{C}$  预变性 1 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $56^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  保温 7 min。PCR 产物的长度用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳技术检测。

cDNA 文库的扩增及重组克隆筛选均按 ZAP-cDNA<sup>®</sup> GigapackIII<sup>®</sup> Gold Cloning Kit 用户手册进行操作。文库克隆的随机测序获得金属硫蛋白 1 (MT-1) 基因的序列, 运用 BLASTX 与 NCBI 的 NR 数据库进行同源性比对, 并对不同物种来源的 MT 基因进行多序列联配。用 Prosite 软件在线分析该蛋白质的基本结构域。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 Clustal X1.83 对 15 个物种的 17 个 MT 基因进行分子进化分析。

## 实验结果

### 1 cDNA 文库的构建及插入片段长度的检测

将合成的 cDNA 第 1、第 2 链产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 发现它的最大转录长度远超过 1 kb, 平均长度集中于 1 kb 左右(图 1)。滴度测定的结果表明, 所建立的星星草 cDNA 文库初始滴度为  $2\times 10^6$  pfu, 重组率为 95%。用 PCR 法检测文库克隆插入片段长度, 结果如图 2。经 PCR 检测, 10 个克隆的 PCR 产物长度在 0.4~1.4 kb 之间, 抛除载体序列 0.12 kb, 插入片的平均长度约为 0.8 kb。文库经扩增后, 其滴度为  $4.0\times 10^9$  pfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

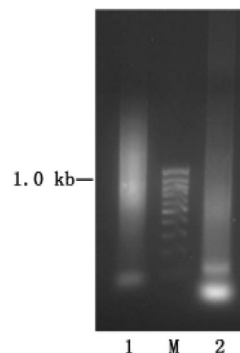


图 1 cDNA 第 1、第 2 链合成产物的电泳图谱  
Fig. 1 Electrophoretogram of products of first and second strand cDNA synthesis

1: cDNA 第 1 链; 2: cDNA 第 2 链; M: 100 bp 分子量标准。

### 2 MT-1 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和运用 BLASTX

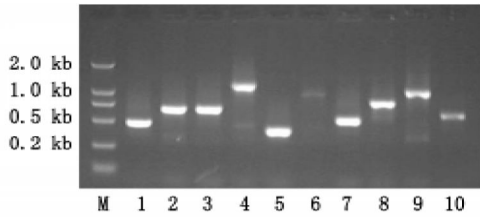


图2 cDNA文库插入片段的PCR检测  
Fig.2 PCR detection of insert sizes in cDNA library  
M: DL2000 分子量标准; 1~10: PCR 产物。

与NCBI的NR数据库进行同源性比对, 获得了星星草MT-1基因的cDNA序列, 去除载体和polyA后该序列长571 bp。

从图3和图4可见:

(1)用ORF Finder寻找cDNA的开放读码框, 结果发现该序列开放读码框位于第58~279 bp之间, 长222 bp, 共编码73个氨基酸(图3)。

从本文中克隆的星星草MT-1基因cDNA和推导的氨基酸序列图中可以看出, 此种基因的5'非翻译区(5'-UTR)第13~23 bp处有一个明显的金属响应元件(metal responsive element, MRE), 它包含一个11碱基的核心序列(tgc cga ttc gg); 该基因的开放阅读框中共含有12个半胱氨酸(C)残基, 组成了C-x-C-x(3)-C-x-C-x(3)-C-x-C, C-x-C-x(3)-C-x-C和C-x-C三部分结构(x为除半胱氨酸外的其它

氨基酸)。这些都是已发现的植物MT-1基因所具有的典型特征<sup>[7]</sup>。

(2)通过ExPASy网站([http://us.expasy.org/tools/pi\\_tool.htm](http://us.expasy.org/tools/pi_tool.htm))的在线分析, 推测该基因编码蛋白的分子量为7.814 kD, 理论等电点为4.72。

用BLASTX对MT-1基因序列的同源性分析和对9种不同植物来源的MT-1基因所编码蛋白质序列的联配分析的结果(图4)表明, 所分析的9种植物MT-1基因所编码的蛋白质序列在其N末端、C末端以及第40~50位氨基酸之间存在3个高度保守的区域, 其中前两部分也是富含C的区域。分析结果表明, 星星草MT-1基因与来源于紫羊茅(*Festuca rubra*)和大麦(*Hordeum vulgare*)的MT-1基因的同源性最高, 分别为90%和89%, 与来源于豌豆(*Pisum sativum*)和番薯(*Ipomoea batatas*)的MT-1基因的同源性最低, 分别为39%和34%。

从Prosite数据库(<http://us.expasy.org/prosite/>)分析MT-1蛋白的结构位点中发现, 其53~64位氨基酸之间含有一个醛脱氢酶(aldehyde dehydrogenase)的半胱氨酸激活位点, 同时含有3个肉豆蔻酰基化(myristyl)位点(分别位于第6~11、10~15和59~64位氨基酸之间)和第61~64位氨基酸之间的一个酪氨酸激酶II(CK2)的磷酸化位点(图5)。

```

1   cac gag gcc tog tgc cga ttc gg aag agg gta atc tca agg tta 45
                                     MRE
46   gat att tgg agg atg tct tgc aac tgt gga tca agc tgc ggc tgc 90
                                     M S C M C G S S C G C
91   ggc tca aac tgc aag tgc ggc aag atg tac oct gac ctg gac gag 135
12   G S M C K C G K M Y P D L D E 26
136  cag gtc agc acc acc acc cag gac gtc gtc gtc ctg ggc gbg gog 180
27   Q Y S T T T Q A V V V L G V A 41
181  oct gag aac aag gcc ggg cag ttt gag atg gcc gcc ggc aag toc 225
42   P E N K R G Q F E M R R G K S 56
226  ggc gag ggc tgc agc tgc ggc gac aac tgc aag tgc aac oct tgc 270
57   G E G C S C G D N C K C N P G 71
271  aac tgt taa gct gca cgc gac gog atg cgc ttg tgt gat ggt gbg 315
72   M C * 73
316  ttg gtg ogt aag taa ata acc aca gaa gca ttc tga oag gag ttc 360
361  gag caa gta cgc tog tgt gga cgt gbg gbg tgt ggt tct gct tgc 405
406  tog ctt ctg ctt ctg att ctg ctt ctt ggt ggt cgt gct ttc oct 450
451  tgt gtg ttt gtg ttg ttg ctt gbg ttc ttc tgt aat tgc ttc att 495
496  cta ggc ttc cga cta tgg agt atg gag tga tga att aat ata cac 540
541  gcc aga caa gtt tgc cta aat tat tat ttt taa aaa aaa aaa 585
586  aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa a 622
    
```

图3 MT-1基因的cDNA序列分析

Fig.3 MT-1 cDNA sequence analysis

下划线部分为MT-1基因cDNA序列核心部分(core region), 终止密码子处用“\*”表示。

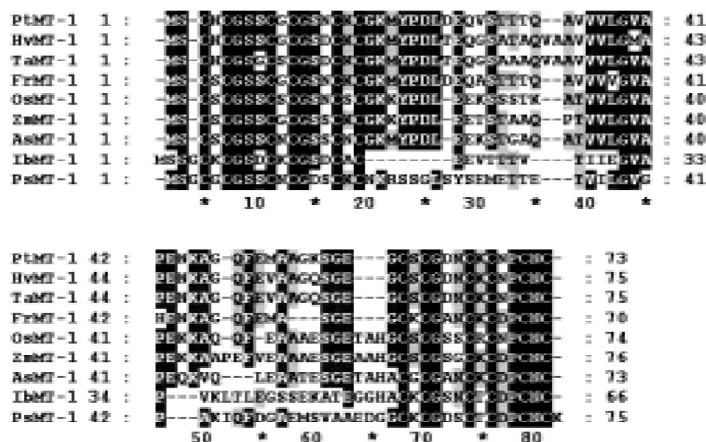


图4 9种植物MT-1基因推测氨基酸序列的联配

Fig. 4 Alignment of the deduced amino acid sequences of 9 plants MT-1 family genes

9种MT-1基因的来源物种为: 星星草Pt(*Puccinellia tenuiflora*)、大麦Hv(*Hordeum vulgare*)、小麦Ta(*Triticum aestivum*)、紫羊茅Fr(*Festuca rubra*)、水稻Os(*Oryza sativa*)、玉米Zm(*Zea mays*)、大蒜As(*Allium sativum*)、番薯Ib(*Ipomoea batatas*)和豌豆Ps(*Pisum sativum*)。

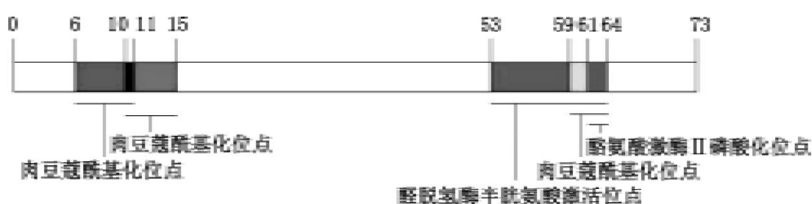


图5 MT-1蛋白结构位点分析

Fig. 5 Motif analysis of MT-1 protein

另外, 根据星星草MT-1蛋白的BLASTX分析结果, 结合GenBank的其它数据, 选取来源于15种植物的17个不同的MT蛋白序列(包括8种MT-1蛋白、4种MT-2蛋白和4种尚未被明确分类的MT蛋白), 与所克隆的星星草MT-1蛋白序列一起在Clustal X1.83下进行进化分析的结果见图6。

## 讨论

MT是一类能与锌、铜、铁等多种重金属原子结合的小分子量蛋白质。已有的研究表明, MT蛋白氨基酸序列的C残基的数量和所在位置高度保守, 具有C-x-C、C-x-y-C和C-C的序列结构<sup>[7]</sup>。已发现的植物体内MT基因主要分为MT-1、MT-2两种类型, 其中MT-1基因所编码蛋白的氨基酸序列具有典型的C-x-C-x(3)-C-x-C的特征<sup>[8,9]</sup>。本文所克隆的MT基因氨基酸序列的5'端和3'端分别有一个C-N-C-G-S-S-C-G-C和C-S-C-

G-D-N-C-K-C的结构, 属于MT-1类型基因。

MT是逆境条件下植物体抗氧化防卫体系中一类重要基因。盐胁迫导致植物体产生大量活性

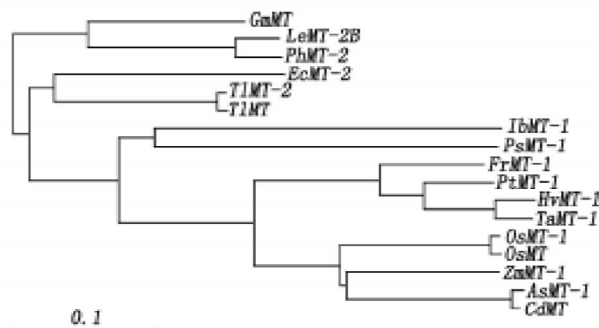


图6 18种植物MT家族蛋白的分子进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of MT family genes in 17 plants

MT蛋白来源物种未在图4中出现的分别为: 大豆Gm(*Glycine max*)、番茄Le(*Lycopersicon esculentum*)、牵牛Ph(*Petuniahybrida*)、凤眼莲Ec(*Eichhornia crassipes*)、香蒲Tl(*Typha latifolia*)和狗牙根Cd(*Cynodon dactylon*)。

氧,对细胞组分造成严重伤害。MT-1蛋白可通过与其羟硫基结合的金属原子和活性氧(OH·、O<sub>2</sub><sup>-</sup>等)的反应,使蛋白自身发生氧化或修饰,在释放金属原子的同时消除活性氧<sup>[3]</sup>,是一类有效的活性氧清除剂。研究证明,ZnMT-1清除OH·的能力是谷胱甘肽(glutathione, GSH)的100倍,并对DNA有一定的保护作用<sup>[10]</sup>。

目前,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外的其它功能尚不完全清楚,加之已知的植物MT基因数量不多,因此,从不同植物的不同发育时期、不同环境条件下克隆MT基因,进一步研究植物体内这类重要基因的功能就显得极为必要。本研究从cDNA文库中分离了星星草MT-1基因的全长cDNA并对其序列进行分析的结果,有助于进一步了解NaHCO<sub>3</sub>胁迫下星星草MT-1基因对植株耐盐性的调节和植物耐盐的分子机制。

盐碱地中除了以NaCl为主要盐分的盐渍土外,以NaHCO<sub>3</sub>为主的苏打土也不占少数。以往人们研究中性盐(NaCl)影响植物时往往忽视NaHCO<sub>3</sub>等碱性盐危害植物的重要性。一般来说,碱性盐除了有中性盐的离子毒害和渗透胁迫作用外,由其所导致的高pH环境也明显降低矿质元素可利用性<sup>[11]</sup>。星星草是一种适生于碱地生境的植物,它能在较高浓度Na<sup>+</sup>和pH值的土壤中正常生长,因此,用NaHCO<sub>3</sub>对其进行胁迫处理,诱导星星草中盐、碱胁迫应答基因的表达,进而研究星星草的抗盐碱机制,这在理论研究和农业生产应用中都有意义。植物的耐盐性是一种数量性状,涉及到大量基因的参与和相互作用,所以,选择一种合适的方法研究植物耐盐性很重

要。实践证明,cDNA文库技术是高效地对大量基因同时进行研究的重要手段,也是其它在基因组水平上研究基因表达的技术(如基因芯片技术、EST技术等)的基础。据此,我们认为本文结果对研究星星草抗盐碱机制和抗逆基因克隆来说,可能有一定的参考价值。

### 参考文献

- 1 范亚文,孙国荣,阎秀峰等. 种植星星草对盐碱草地土壤养分状况的改良作用. 植物研究, 2001, 21(4): 599~604
- 2 尹尚军,石德成,颜宏. 碱胁迫下星星草的主要胁迫反应. 草业学报, 2003, 12(4): 51~57
- 3 Núria R-I, Milan V. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. J Inorg Biochem, 2002, 88: 388~396
- 4 van Lookeren Campagne M, Thibodeaux H, van Bruggen N et al. Evidence for a protective role of metallothionein-1 in focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 12870~12875
- 5 Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C et al. Plant metallothioneins. Biochem J, 1993, 295: 1~10
- 6 王玉成,薄海侠,杨传平. 胡杨、柽柳总RNA提取方法的建立. 东北林业大学学报, 2003, 31(5): 99~100
- 7 Chen HJ, Hou WC, Yang CY et al. Molecular cloning of two metallothionein-like protein genes with differential expression patterns from sweet potato (*Ipomoea batatas*) leaves. J Plant Physiol, 2003, 160(5): 547~555
- 8 Rhonda CF, Liang ZM, Karam BS. Analysis of type 1 metallothionein cDNA in *Vicia faba*. Plant Mol Biol, 1997, 33: 583~591
- 9 Robinson NJ, Tommey AM, Kuske C et al. Plant metallothioneins. Biochem J, 1993, 295: 1~10
- 10 帖建科,李令媛,茹炳根. 金属硫蛋白清除自由基及其对自由基引起的核酸损伤保护作用的研究. 生物物理学报, 1995, 11(2): 276~281
- 11 石德成. 磷酸中和缓解Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>对星星草的胁迫作用. 草业学报, 1995, 4(4): 34~38