

不结球白菜金属硫蛋白基因的克隆及表达分析

刘东让^{1,2}, 侯喜林², 张昌伟², 肖 栋^{1,2,3*}

(1 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081; 2 南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; 3 江苏现代园艺工程技术中心, 南京 210095)

摘 要: 通过 RACE 技术, 从不结球白菜抗病品种‘苏州青’叶片克隆到金属硫蛋白(metallothionein)基因的全长 cDNA 序列(*BcMT2*)。序列分析结果表明, *BcMT2* 基因的 cDNA 全长为 528 bp, 其中开放阅读框长度为 243 bp, 共编码 80 个氨基酸, 相对分子质量为 8.02×10^3 Da, 理论等电点是 4.61。氨基酸同源系统进化分析表明, 不结球白菜 *BcMT2* 基因属于 II 类植物 *MT2* 基因家族, 且与同科植物的进化关系相近, 其中与大白菜第 5 号染色体的基因(*Bra029765*)相似性最高(100%)。qRT-PCR 分析表明, *BcMT2* 基因在不结球白菜叶中表达最强; 霜霉病菌诱导后, *BcMT2* 基因在抗病品种‘苏州青’中的表达量于 48 h 达到峰值, 而在感病品种‘矮脚黄’中的表达量于 72 h 达到峰值; 盐处理条件下, *BcMT2* 基因在抗病品种‘苏州青’中的表达量于 12 h 达到峰值, 而在感病品种‘矮脚黄’中的表达量于 24 h 达到峰值; ABA 处理下, ‘苏州青’中其表达量于 24 h 达到峰值, 且在‘矮脚黄’中 *BcMT2* 基因的表达趋势与‘苏州青’类似; 干旱处理条件下 *BcMT2* 基因的表达在两材料中均受到抑制。*BcMT2* 原核表达分析发现, 在 37 °C、1.0 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导 2、4、6 h 后, 均检测到了一条蛋白分子质量约为 8×10^3 Da 的表达特异条带, 这与预期融合蛋白的相对分子质量的理论值 8.02×10^3 Da 相符。研究表明, 不结球白菜 *BcMT2* 基因在受到生物胁迫和非生物胁迫等逆境条件下均发挥着重要作用, 且 *BcMT2* 在大肠杆菌中成功实现融合表达, 为进一步进行蛋白水平和转基因功能研究奠定了基础, 也为选育高产、优质的不结球白菜新品种提供重要的理论依据。

关键词: 不结球白菜; 金属硫蛋白基因; qRT-PCR; 原核表达

中图分类号: Q785; Q786; S634; S634.3 **文献标志码:** A

Cloning and Expression Analysis of Metallothionein Gene in Non-heading Chinese Cabbage

LIU Dongrang^{1,2}, HOU Xilin², ZHANG Changwei², XIAO Dong^{1,2,3*}

(1 Key Laboratory of Biology and Germplasm Enhancement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2 State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3 Jiangsu Engineering and Technology Center for Modern Horticulture, Nanjing 210095, China)

Abstract: The full-length cDNA sequence of metallothionein gene (*BcMT2*) was cloned from the leaves of non-heading Chinese cabbage disease resistant cultivar ‘Suzhouqing’ by race technique. qRT-PCR was used to analyze the expression pattern of this gene in different tissues under biotic stress (*P. parasitica*) and abiotic stress (salt, drought, ABA) treatment conditions. SDS-PAGE technology was used for analysis of prokaryotic expression characteristics for this gene. Sequence analysis showed that the full-length cDNA of *BcMT2* gene was 528 bp. The length of the open reading frame was 243 bp and encoded a total of 80 amino acids. The relative molecular mass was 8.02×10^3 Da, and the theoretical isoelectric point was

收稿日期: 2018-09-17; 修改稿收到日期: 2018-11-23

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0101701); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室开放课题(IVF201804)

作者简介: 刘东让(1997-), 男, 在读本科生, 主要从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究。E-mail: 601657849@qq.com

* 通信作者: 肖 栋, 博士, 讲师, 主要从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究。E-mail: dong.xiao@njau.edu.cn

4. 61. The phylogenetic analysis of amino acid homology showed that the non-heading Chinese cabbage *BcMT2* gene was belonged to the *MT2* gene family of class II plants and had similar evolutionary relationship with other plants of the same family. Among of them, the gene had the highest homology (100%), comparing with the gene (*Bra029765*) on A05 in Chinese cabbage. Quantitative real-time analysis showed that the expression of *BcMT2* gene was the strongest in leaves of non-heading Chinese cabbage. The expression of *BcMT2* gene was peaked at 48 h after infection by *Pseudoperonospora cubensis* in the disease-resistant variety ‘Suzhouqing’, while the expression level was peaked at 72 h in the susceptible variety ‘Aijiaohuang’. Under salt treatment condition, the expression level of *BcMT2* gene was peaked at 12 h in the resistant variety ‘Suzhouqing’, while the expression level was peaked at 24 h in the susceptible variety ‘Aijiaohuang’. Under ABA treatment, the expression level was peaked at 24 h in ‘Suzhouqing’, and the expression tendency of *BcMT2* gene in ‘Aijiaohuang’ was similar to that of ‘Suzhouqing’. The expression of *BcMT2* gene was inhibited in both materials under drought treatment conditions. Analysis of *BcMT2* prokaryotic expression revealed that a specific molecular band of about 8×10^3 Da was detected at 2, 4, and 6 h after induction at 37 °C and $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG, which is related to the expected fusion protein. Results showed that non-heading cabbage *BcMT2* gene plays an important role in the stress environment such as biotic stress and abiotic stress. In this study, *BcMT2* has successfully achieved fused expression in *Bacillus coli*. The results established the foundation for the next step in the study of protein levels and the study of transgenic functions. Moreover, it will also provide important theoretical basis for breeding new non-heading cabbage varieties with high yield and good quality.

Key words: non heading Chinese cabbage; metallothionein gene; qRT-PCR; prokaryotic expression

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种富含半胱氨酸短肽的低分子量蛋白,普遍大小为 $5 \sim 10 \times 10^3 \text{ Da}$ ^[1]。1957年,金属硫蛋白在马肾皮质中被发现,植物 MT 最早是于 1977 年从大豆根中发现,现已发现 MT 广泛分布于动物、植物、真菌及细菌等几乎所有生物体内^[2-6]。Fowler 等^[7]根据 MT 中 Cys 残基的排列方式,将所有生物的 MT 分为 3 类(I、II 和 III 类)。

植物中,根据半胱氨酸残基数目和排列的不同可将 MT 归为 II 类^[8-9]。根据 Cobbett 等^[10]的分类,可将植物 II 类 MT 进一步分为 4 种类型:MT1(p1)、MT2(p2)、MT3(p3)与 MT4(pec/Ec 蛋白)。已有研究表明,植物 MT2 包含 2 个富含半胱氨酸的结构域,每个域包含 1 个高度保守的 MSCCG-GNCGCG 结构以及 3 个 Cys-Xaa-Cys 模块,被大约 40 个的氨基酸残基连接,多分布在地上部分^[11]。据报道,MT 与植物的生长发育、胚发育、果实成熟、衰老、抗逆反应以及基因调控等过程有关^[12]。目前多数研究认为,MT 的主要功能是与生物体内的金属离子相结合,从而起到运输、储存金属离子、维持细胞内的氧化-还原平衡等作用,而且生物体内的 MT 大多需经过金属离子、细胞分裂素、盐、干旱等胁迫诱导才会表达^[13]。植物激素脱落酸(ABA)作为重要的内源信号物质,在诱导植物抗病反应中发挥了重要作用^[14]。因此,克隆 MT 基因并分析该基

因的表达特征,对探讨不结球白菜对逆境的响应机理及抗逆分子育种具有重要价值。人们已从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa* L.)、甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)、芹菜(*Apium graveolens* L.)、平邑甜茶(*Malus hupehensis*)等植物中克隆了编码 MT 蛋白的基因或 cDNA 序列^[1,12,15-17]。但与对动物 MT 的研究相比,对植物 MT 的研究远远不足^[18]。近年来,对植物 MT 基因在组织器官特异性、表达特征和基因组结构等方面的研究得到一定发展^[4]。尽管已从植物中克隆到许多编码 MT 的基因,但对不结球白菜 MT 基因的研究报道很少。

不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis*)是中国重要的绿叶蔬菜,由于世界范围内的广泛引种,不结球白菜逐渐成为世界性蔬菜^[19]。各类病害、外源 ABA、盐、干旱等生物和非生物胁迫常影响不结球白菜生长发育,导致其产量下降,品质降低^[14,20]。因此,本研究以 cDNA-AFLP 方法从不结球白菜中获得的受霜霉病菌诱导的差异表达片段为基础^[21],利用 RACE 技术从不结球白菜抗病系‘苏州青’中克隆了 *BcMT2* 基因,并进行了氨基酸序列分析。同时通过 qRT-PCR 技术分析 *BcMT2* 基因在不同组织、生物胁迫(霜霉病菌)及非生物胁迫(盐、干旱、ABA)处理条件下的表达模式,并通过原核表达对该基因的蛋白特征进行鉴定。旨在深入研

究 *MT* 基因在不结球白菜上的表达模式,进而为选育高产、优质的新品种提供重要的理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料为南京农业大学园艺学院白菜课题组提供的不结球白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) 抗病品种‘苏州青’和感病品种‘矮脚黄’。所有的种子先在 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HgCl}_2$ 里消毒 20 min, 再用蒸馏水冲洗 10 次。后将 2 个品种的种子分别播种于 2 个 72 孔穴盘的灭菌基质中,后放置于人工气候箱中培养,每日 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 光照培养 16 h, $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 暗培养 8 h, 相对湿度 ($85\% \pm 5\%$)。待催芽 28 d (5~6 片真叶)后,分别从 2 个品种中选出 63 株长势良好的植株用于诱导处理。

1.2 实验方法

1.2.1 生物、非生物胁迫处理及取样 从感病的不结球白菜上分离霜霉病菌 (*P. parasitica*), 配成 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 孢子囊悬浮液,霜霉病病原菌接种液的制备参照陈晓峰^[22]的方法。播种 28 d 后,分别用霜霉病接种液、 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG6000、 $400 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA 及纯水对选出的植株进行处理,取样时间点有 5 个,每个时间点 3 个重复,即每个品种每个胁迫处理 15 株植株,纯水处理需 3

个重复,总计每个品种需 63 株样本。处理后在人工气候箱 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 黑暗中保湿 24 h,然后揭掉遮光物,再在 $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 光照培养 16 h, $16 \text{ }^\circ\text{C}$ 暗培养 8 h,相对湿度 ($85\% \pm 5\%$) 条件下培养,直至采样结束。组织特异性表达分析使用的材料分别取自 2 份未经胁迫处理的不结球白菜植株苗期 (播种后 28 d) 的根、茎、叶。胁迫处理表达分析,分别在处理后 12、24、48、72 和 96 h 进行取样。上述材料取样后立即在液氮中冰冻,使用前保存在 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中。

1.2.2 RNA 提取和 cDNA 合成 使用 RNA Simple Total RNA Kit 试剂盒 (TaKaRa) 提取样品总 RNA,具体方法参照说明书。用核酸仪对提取的总 RNA 浓度和纯度进行检测。cDNA 使用 Prime-ScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒 (TaKaRa) 反转录合成,作为基因克隆所需的模板。

1.2.3 BcMT2 全长 cDNA 克隆 以霜霉病菌诱导后 24 h 的不结球白菜‘苏州青’叶片为试材,使用 3'/5'RACE System 试剂盒 (Invitrogen) 克隆基因全长 cDNA 序列。具体操作过程参考陈晓峰^[22]的方法。克隆 *BcMT2* 基因的引物见表 1,引物设计用在线软件 Primer 3 ([http://bioinfo. ut. ee/primer3-0.4.0/](http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)),引物由南京擎科公司合成。

1.2.4 序列分析 用 Bioxm 2.7 软件分析 *BcMT2* 基因序列的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。

表 1 本研究用到的各种引物信息

Table 1 List of information of primers in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	作用 Function
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T) ₁₇	
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGHHGGGHHGGGHHG	接头引物 Adaptor primers
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
<i>BcMT2</i> _3'-RACE_F1	TCTGCTATTCTTCGGTCTTTC	3'-RACE 引物 3'-RACE primers
<i>BcMT2</i> _3'-RACE_F2	CGGCGATGAAGAACCAGTAC'	
<i>BcMT2</i> _5'-RACE_R1	TACAAACTGACTCATCCGACA'	5'-RACE 引物 5'-RACE primers
<i>BcMT2</i> _5'-RACE_R2	CACCGTAAAACAAAACCTA'	
<i>BcMT2</i> _RT_F	ATGTCTTGCTGTGGTGGAAC	实时定量 PCR 检测 qRT-PCR
<i>BcMT2</i> _RT_R	TTACAGGTGCAAGGTCACA	
<i>β-actin</i> _F	ATCAACTACCAGCCTCCAAC	内标基因 Reference gene
<i>β-actin</i> _R	CTGCTGTGTTGTTGCTGATC	
<i>BcMT2</i> _Up	GACGGATCCATGTCTTGCTGT	原核表达 Prokaryotic expressive
<i>BcMT2</i> _Down	CGCGAGCTCTCATTACAGGTG'	

注: F. 正向引物; R. 反向引物; UP. 上游引物; Down. 下游引物; 下划线为 *Sac* I 和 *Bam* H I 酶切位点序列; 酶切位点之前碱基为保护碱基。

Note: F. Forward; R. Reverse; UP. Upstream primer; Down. Downstream primer; Underlined. Sequence of *Sac* I and *Bam* H I. The front of the restriction site is protective bases

不同物种 *BcMT2* 基因的氨基酸序列从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中搜索获得;同源性计算利用 NCBI 网站 Blast 程序;氨基酸编码的蛋白质相对分子质量、理论等电点、不稳定指数等通过在线软件 Protparam (<https://web.expasy.org/Protparam/>)完成;疏水性预测采用 protscale (<https://web.expasy.org/protscale/>);信号肽预测采用 SignalP4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);跨膜区域预测采用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>);蛋白质结构域分析采用 NCBI-Conserved Domain SearchInterpro;蛋白质二级结构预测采用 Prabi (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_phd/)等在线工具;多重序列比对及进化树构建通过 DNAMAN 5.2 进行^[23]。

1.2.5 实时定量分析 *BcMT2* 转录表达水平 cDNA 合成使用 PrimeScript™ RT 试剂盒 (TaKaRa) 说明书完成。实时定量 PCR 使用 SYBR Prime-Script RT-PCR Kit II 试剂盒 (TaKaRa, Japan) 完成,PCR 反应体系采用 20 μ L 体系: MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, *rTaq* 酶 0.2 μ L, 引物 *BcSGT1_RT_F* 和 *BcSGT1_RT_R* 各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 补齐至 20 μ L。PCR 程序采用两步法: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 94 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环;设置 60 $^{\circ}$ C 到 95 $^{\circ}$ C 的熔解曲线。3 次重复,用纯水作为对照。试验数据采用 $\Delta\Delta C_T$ 方法^[24] 和 Excel 2010 软件进行分析,差异显著性分析采用 SPSS19.0 软件进行。

1.2.6 原核表达 将克隆的 *BcMT2* 基因连接至 pMD19-T 载体,再转化 DH5 α 感受态细胞,获得重组质粒 pMD19-T-*BcMT2*。用 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切及菌液 PCR 鉴定后,含阳性重组质粒的菌液送交南京擎科公司测序。把上述测序正确的重组质粒作为模板,以上游引物 *BcMT2_Up* 和下游引物 *BcMT2_Down* 扩增 *BcMT2* 基因编码区(表 1)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,割胶回收后用限制性内切酶 *Sac* I 和 *Bam*H I 双酶切,构建重组表达质粒 pET29a-*BcMT2*,转化大肠杆菌 BL21(DE3)。挑取阳性菌落接种至 5 mL LB 液体培养基中(含 200 μ g \cdot mL⁻¹ 氨苄青霉素),37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,以此作为种子液。取种子液用终浓度为 0.6 和 1.0 mmol \cdot L⁻¹ 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导

Escherichia coli BL21 (DE3) 表达融合蛋白,设置取样时间分别为 2、4、6 h。取菌液 3 mL, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 s,弃上清液,用 100 μ L 的 1 \times SDS-PAGE 加样缓冲液重悬菌体,将上清液参照 Tashakkori 等^[25] 的方法进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 *BcMT5* 基因 cDNA 全长克隆以及序列分析

以 cDNA-AFLP 方法从不结球白菜中获得的霜霉病菌诱导的差异表达片段(397 bp)为基础,采用 RACE 技术获得其全长,命名为 *BcMT2*(登录号为 AB439836)。该基因 cDNA 序列全长为 528 bp,含有 243 bp 的完整开放阅读框,编码 80 个氨基酸(图 1)。预测其编码蛋白质化学式为 C₃₁₉H₄₉₇N₉₁O₁₁₇S₁₇, 分子质量为 8.02 \times 10³ Da,理论等电点为 4.61。属于酸性蛋白,不稳定指数为 43.29,属于不稳定蛋白,脂肪指数为 22.00。ProtScale 亲/疏水性预测显示:该蛋白属于亲水性蛋白,总平均亲水指数(GRAVY)为-0.245;该蛋白无信号肽,并且不存在跨膜区域;该蛋白在第 23~239 个氨基酸处有一个 Metallothio-2 结构域。属于植物 MT2 家族,又与拟南芥中的多种金属硫蛋白序列进行比对,*BcMT2* 也属于植物 MT2(图 2)。蛋白二级结构预测结果显示:其为延伸链和无规则卷曲,分别占 17.5% 和 82.5%。该基因在起始密码子 ATG 之前有 A,符合 Kozak 规律;在 3' 端有 poly(A) 尾,这些都符合

```

TCTGCTATTTCTCGGCTTCTCGAGAAAATGTCCTGCTGGTGGAAACTGIGGTTGT 60
                               M S C C G G N C G C (10)
GGATCTGGCTGCAAGTCGGCAACGGTTCGGGAGGTTGCAAAAATGACCCGGACTTGGGC 120
G S G C K C G N G C G G C K M Y P D L G (30)
TTTTCCGGCGAGTCGACCACGACCGAGACTTTCGCTTCGGCGTTGCACCGCGATGAAG 180
F S G E S T T T E T F V F G V A P A M K (50)
AACCAATCAGAGGCTTCGGAGAGGGTTCGGTGAGAACGATGCATGCAAGTGTTGGATCT 240
N Q Y E A S G E V A E N D A C K C G S (70)
GACTCGAAGTGTGACCCCTTGACCTGTAAATGATAATAAGAACCTTCTAAGGAGGCAGA 300
D C K C D P C I C K * (80)
GATAATCAGAGTTTAATTAATTAAGTAACCTAATGATGTTCTAGGTTTGTITTTACGG 360
TGTAATAATGCTGCGAGGCTTTTGTCTTTTATGCCGATAATGGTTTTCGTTTGTGTGACG 420
TCATACTAGATGTTCTGCCATGTCATGTGTGTCGGATGATGTCAGTTTGTACTCTAICT 480
TTTCTATGGAATGAAAGTGAATGATTTCTCTGAAAAAATAAAAAAAAAA 528

```

方框表示起始密码子,下划线表示 Metallothio-2 结构域,*表示终止密码子

图 1 *BcMT2* 核苷酸序列(上)及其翻译的氨基酸序列(下)

Square frame indicates the translation initiation codon, underline indicates the amino acid sequence of the Metallothio-2, an asterisk (*) indicates the stop codon
Fig. 1 The nucleotide (upper row) and amino acid sequence (lower row) of *BcMT2*

有效翻译的基因全长 cDNA 的特征。

2.2 BcMT2 蛋白氨基酸序列同源性和系统进化分析

将 *BcMT2* 编码的氨基酸序列及从 NCBI 中 BLAST 获取的其他植物 MT2 氨基酸序列(编码区)进行系统树分析。结果(图 3)显示,不结球白菜 *BcMT2* 与大白菜第 5 号染色体的基因(Bra029765)的相似性为 100%;与萝卜、拟南芥和甘蓝相似性分别为 97%、96%和 95%;与高山南芥和甘蓝型油菜相似性在 85%以上。表明同科植物的氨基酸序列相似度较高。由此发现十字花科植物的 *BcMT2* 蛋白与同属植物的进化关系最近,呈现种属特性。

2.3 BcMT2 基因的组织特异性表达分析

结果(图 4)表明,*BcMT2* 基因在两份材料的叶中表达最强,且表达量远高于根和茎。另外,*BcMT2* 基因在两份材料茎中的表达量存在显著差异

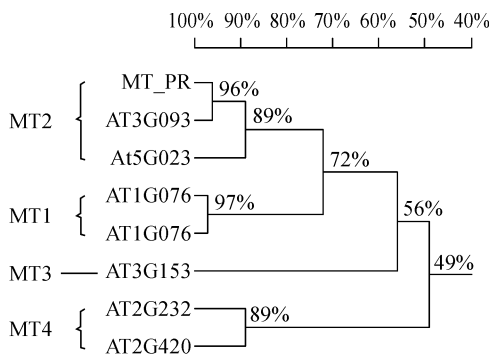


图 2 *BcMT2* 和拟南芥中金属硫蛋白氨基酸序列的进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of amino acid sequences of *BcMT2* and metallothioneins of *Arabidopsis thaliana*

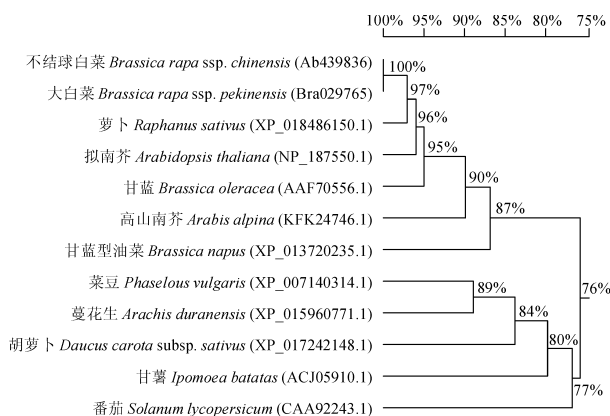


图 3 不同植物 *BcMT2* 蛋白的系统树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *BcMT2* proteins from different plants

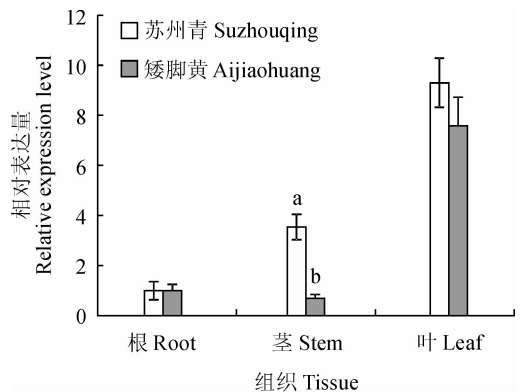
($P < 0.05$),且在‘苏州青’茎中的表达量约为在‘矮脚黄’中的 5.93 倍,而在根和叶中表达量差异不显著。

2.4 生物及非生物胁迫下 BcMT2 的表达分析

由图 5 可见,霜霉菌感染处理下,*BcMT2* 基因在抗病品种‘苏州青’中的表达量于 48 h 达到峰值(为对照的 6.01 倍),而在感病品种‘矮脚黄’中的表达量于 72 h 达到峰值(为对照的 5.6 倍);在盐处理下,*BcMT2* 基因在抗病品种‘苏州青’中的表达量于 12 h 达到峰值(为对照的 2.51 倍),而在感病品种‘矮脚黄’中的表达量于 24 h 达到峰值(为对照的 2.22 倍);在 ABA 处理下,‘苏州青’中其表达量于 24 h 达到峰值(为对照的 17.25 倍),且在‘矮脚黄’中 *BcMT2* 基因的表达趋势与‘苏州青’类似;而在 2 个材料中,干旱处理均抑制了 *BcMT2* 基因的表达。*t* 测验表明在 4 个处理过程中,在部分时间点上抗病系‘苏州青’与感病系‘矮脚黄’之间表达量存在显著差异。表明 *BcMT2* 基因在不结球白菜受生物和非生物胁迫的干扰后参与了防卫反应,而且在抗病系植株上比感病系植株上表达更早、表达量更强。

2.5 BcMT2 基因的原核表达分析

对 *BcMT2* 进行原核表达分析,发现在 37 °C 条件下,0.6 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导 2、4、6 h 后,均没有融合蛋白表达。而 1.0 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导 2、4、6 h 后,在底部出现明显的表达特异条带(图 6)。 *BcMT2* 在 *E. coli* BL21(DE3)中获得了表达,表达蛋白的相对分子质量约为 8 × 10³ Da。

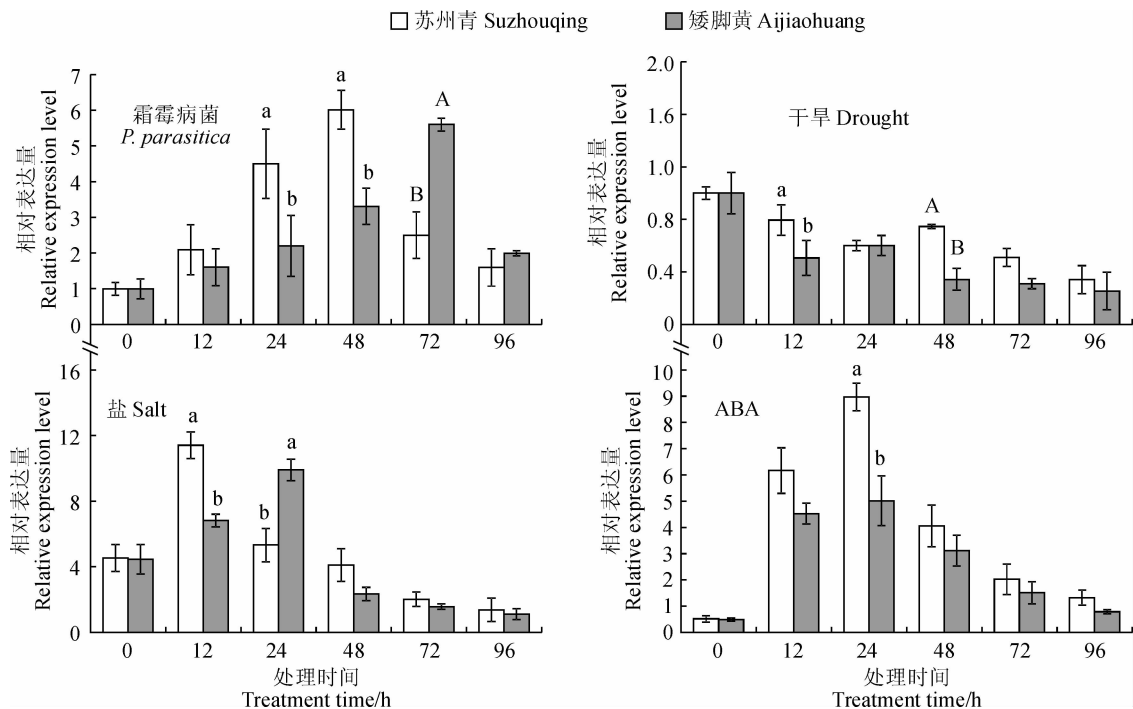


不同小写字母表示 0.05 水平差异显著性

图 4 不同不结球白菜 *BcMT2* 基因的组织特异性表达分析

Different normal letters mean significant difference at 0.05 level

Fig. 4 Tissue specificity expression profiles of *BcMT2* gene in different non-heading cabbages



不同小写字母表示 0.05 水平差异显著性;不同大写字母表示 0.01 水平差异显著性

图 5 ‘苏州青’和‘矮脚黄’胁迫诱导后 *BcMT2* 基因的表达

Different normal letters mean significant difference at 0.05 level; different capital letters mean significant difference at 0.01 level

Fig. 5 Expression of *BcMT2* in ‘Suzhouqing’ and ‘Aijiaohuang’ under stress

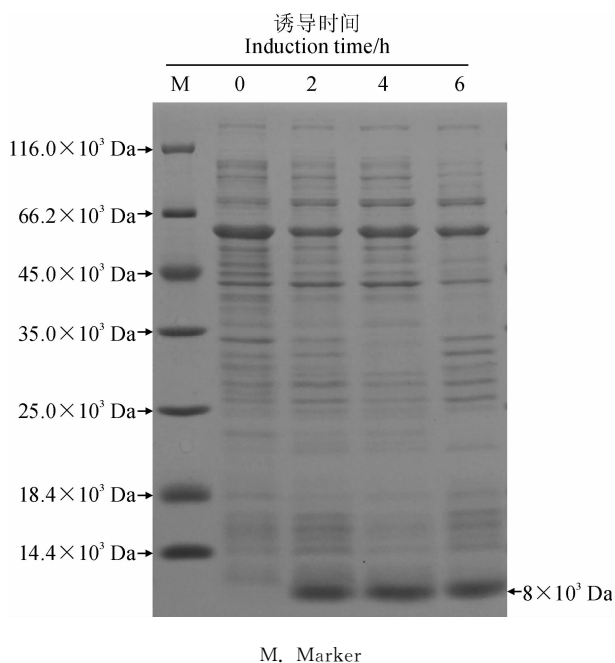


图 6 *BcMT2* 基因原核表达 SDS-PAGE 电泳

Fig. 6 SDS-PAGE electrophoresis of the prokaryotic expression of *BcMT2* gene

3 讨论

据报道,植物 *MT* 基因家族成员的多肽长度为 45~87 个氨基酸残基, Cys 残基含量在 10~17 个,

而 His 残基含量很低^[4]。本研究在通过 cDNA-AFLP 技术得到的一个差异表达片段基础上,利用 RACE 技术克隆了 *BcMT2* 基因的全长序列。通过核苷酸和氨基酸序列分析,发现 *BcMT2* 基因编码 80 个氨基酸,其中含有 14 个 Cys 残基,占总氨基酸数的 17.5%。这与王顺才等^[16]在平邑甜茶中的研究结果一致。植物 *MT2* 多肽 N 端通常具有高度的保守序列 MSCCGGNCGCGS, Cys 残基有典型的 CC、CXC 和 CXXC 排列方式,而且 C 端包含 3 个按 CXC 方式排列的 Cys 基序^[10]。本研究发现 *BcMT2* 基因编码蛋白含有与之相同的保守序列 MSCCGGNCGCGS,同时 N 端包含 1 个 CC、1 个 CXXC 及 2 个 CXC 基序,在 C 端也有 3 个 CXC 基序。这与水稻、平邑甜茶、芹菜等植物的研究结果相一致^[1,16,26]。进一步,将 *BcMT2* 基因氨基酸序列与拟南芥 *MT* 氨基酸序列进行比对,构建进化树,发现与拟南芥 *MT2* 的进化关系最近。此外,多重序列比对分析表明,*BcMT2* 基因氨基酸序列与同科的大白菜、萝卜、拟南芥等植物具有很高的同源性,其中与大白菜第 5 号染色体的基因 (Bra029765) 一致性最高 (100%)。综合这些结果,不结球白菜 *BcMT2* 基因属于 II 类植物 *MT2* 基因家族。

目前普遍认为,植物 *MT* 基因的表达具有明显

的组织特异性。已有研究发现, *MT2* 在地上部的表达明显高于根^[1]。拟南芥 *AtMT1* 在根中表达丰富, 在叶中的表达量低; *AtMT2* 在叶中的表达量比根中的高; *AtMT3* 主要在果实和叶中表达; *AtMT4* 主要在种子中表达^[4,18,27]。本研究也发现, *BcMT2* 基因在不结球白菜地上部(茎、叶)中的表达量明显高于根, 且叶中的表达量明显高于其他部位, 这与齐世静等^[28]的研究结果一致。

适宜的环境有利于白菜的生长发育, 而异常的环境则会抑制白菜的生长发育, 甚至导致死亡。霜霉病、干旱、盐及外源激素等外界生物和非生物胁迫会严重影响白菜的品质和产量。为了适应这些逆境, 植物进化出了一套复杂的抵御系统^[9]。金属硫蛋白基因在金属解毒方面可以发挥很大的作用^[1,18]。目前在 *MT* 基因表达影响因素方面, 金属离子研究已有很多。除此之外, *MT* 基因表达还受环境胁迫、激素、病菌侵染等因素的调节^[4,21,29]。Xiao 等^[21]通过 cDNA-AFLP 发现 *MT2* 基因在霜霉菌诱导下于 48 h 后表达量达到峰值。这与本实验 *BcMT2* 在‘苏州青’中的表达趋势一致, 同时发现不论在抗病系‘苏州青’还是感病系‘矮脚黄’上 *BcMT2* 均受到霜霉病菌的诱导, 且在抗病系比在感病系表达量更早、更强。说明 *BcMT2* 的诱导与基因型的抗病或感病能力有一定的联系。已有多项研究在不同植物上表明, 盐和外界 ABA 处理会诱导 *MT* 基因的表达^[1,16,27,29]。这与本研究结果一致, 且

发现 *BcMT2* 基因在不结球白菜抗病系‘苏州青’和感病系‘矮脚黄’上的表达量出现了不同时间的诱导高峰。表明 *BcMT2* 涉及的防卫反应可能是在不同时间段, 通过产生不同的信号途径对外源胁迫发挥作用。另有研究显示, 干旱胁迫下 *MT* 基因的表达大幅度上升^[30]。而陈逸云^[1]则在芹菜品种‘六合黄心芹’中发现, 干旱胁迫会抑制 *MT2* 基因的表达。本研究结果与陈逸云^[1]类似, 在干旱胁迫下, *BcMT2* 基因在 2 个不结球白菜品种中的表达均受到了抑制。

BcMT2 原核表达分析发现, 分别在 37 °C、1.0 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导 2、4、6 h 后, 检测到了一条蛋白分子质量约为 8 × 10³ Da 的表达特异条带, 其与预期融合蛋白的相对分子质量的理论值 8.02 × 10³ Da 相符。而含有转化子但未经诱导的菌体在该蛋白条带处未出现此条带, 因此可以基本确定这一蛋白条带为表达的融合蛋白。

综上所述, 不结球白菜 *BcMT2* 基因属于 II 类植物 *MT2* 基因家族, 受霜霉病菌、盐、外源激素 ABA 等外界生物和非生物胁迫诱导表达, 表明不结球白菜 *BcMT2* 基因在处于生物胁迫和非生物胁迫等逆境环境中均发挥着重要作用, 且 *BcMT2* 在大肠杆菌中成功实现融合表达, 这为下一步蛋白水平研究和转基因功能研究提供了条件, 也将为选育高产、优质的不结球白菜新品种提供重要的理论依据。

参考文献:

- [1] 陈逸云. 芹菜金属硫蛋白基因的克隆和功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
- [2] MARGOSHES M, VALLEE B L. A cadmium protein from equine kidney cortex[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1957, **79**(17): 4 813-4 814.
- [3] CASTERLINE J L, BARNETT N M. Isolation and characterization of cadmium binding components in soybean plants[J]. *Plant Physiology*, 1977, **59**(6 Suppl): 124.
- [4] HASSINEN V H, TERVAHAUTA A I, SCHAT H, et al. Plant metallothioneins-metal chelators with ROS scavenging activity [J]. *Plant Biology (Stuttg)*, 2011, **13**(2): 225-232.
- [5] PALACIOS O, ATRIAN S, CAPDEVILA M. Zn- and Cu-thioneins: a functional classification for metallothioneins [J]. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2011, **16**(7): 991-1 009.
- [6] VASAK M, MELONI G. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, **16**(7): 1 067-1 078.
- [7] FOWLER B A, HILDEBRAND C E, KOJIMA Y, et al. Nomenclature of metallothionein [J]. *Experientia Supplementum*, 1987, **52**(52): 19-22.
- [8] CHATURVEDI A K, PATEL M K, MISHRA A, et al. The SbMT-2 gene from halophyte confers abiotic stress tolerance and modulates ROS scavenging in transgenic tobacco[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(10): e111379.
- [9] ZHANG M, TAKANO T, LIU S, et al. Abiotic stress response in yeast and metal-binding ability of a type 2 metallothionein-like protein (PutMT2) from *Puccinellia tenuiflora* [J]. *Molecular Biology Report*, 2014, **41**(9): 5 839-5 849.
- [10] COBBETT C, GOLDSBROUGH P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, **53**(1): 159-182.
- [11] COZZA R, BRUNO L, BITONTI M B. Expression pattern of

- a type-2 metallothionein gene in a wild population of the psammophyte *Silene nicaeensis*[J]. *Protoplasma*, 2013, **250** (1): 381-389.
- [12] YUAN J, CHEN D, REN Y, *et al.* Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, *OsMT2b*, downregulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice[J]. *Plant Physiology*, 2008, **146**(4): 1 637-1 650.
- [13] 赵之伟, 曹冠华, 李 涛. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2013, **35**(3): 390-398.
ZHAO Z W, CAO G H, LI T. Research progress of metallothionein[J]. *Journal of Yunnan University*, 2013, **35**(3): 390-398.
- [14] 刘世拓, 肖 栋, 许玉超, 等. 不结球白菜过氧化还原蛋白基因 *Brc2-Cys Prx* 的克隆和表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2017, **40**(1): 40-47.
LIU S T, XIAO D, XU Y C, *et al.* Clone and expression analysis of *Brc2-Cys Prx* gene from non-heading Chinese cabbage [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, **40** (1): 40-47.
- [15] GUO W J, BUNDITHYA W, GOLDSBROUGH P B. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper[J]. *New Phytologist*, 2003, **159**(2): 369-381.
- [16] 王顺才, 梁 东, 马锋旺. 平邑甜茶金属硫蛋白基因 *MhMT2* 的克隆和表达分析[J]. 中国农业科学, 2012, **45**(14): 2 904-2 912.
WANG S C, LIANG D, MA F W. Cloning and expression analysis of metallothionein gene *MhMT2* in *Malus hupehensis* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, **45**(14): 2 904-2 912.
- [17] ABDELMIGID H M. Expression analysis of type 1 and 2 metallothionein genes in rape (*Brassica napus* L.) during short-term stress using sqRT-PCR analysis[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2016, **54**(3): 212.
- [18] FREISINGER E. Plant MTs-long neglected members of the metallothionein superfamily[J]. *Dalton Transactions*, 2008, **47**(47): 6 663-6 675.
- [19] 黄菲艺, 唐 君, 侯喜林, 等. 不结球白菜响应 ABA 和低温基因 *WRKY18* 的克隆及表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2015, **38**(2): 189-196.
HUANG F Y, TANG J, HOU X L, *et al.* Cloning and expression analysis of *WRKY18* gene in non-heading Chinese cabbage under ABA and low temperature treatments[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, **38**(2): 189-196.
- [20] 张飞雪, 虞章红, 刘坤宇, 等. 不结球白菜醛酮还原酶 *BcAKR4C9* 基因的克隆及表达分析[J]. 南京农业大学学报, 2018, **41**(2): 240-247.
ZHANG F X, YU Z H, LIU K Y, *et al.* Cloning and expression analysis of aldo-keto reductase gene *BcAKR4C9* from non-heading Chinese cabbage[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, **41**(2): 240-247.
- [21] XIAO D, LIU S T, WEI Y P, *et al.* cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in incompatible interaction between infected non-heading Chinese cabbage and *Hyaloperonospora parasitica* [J]. *Horticulture Research*, 2016, **3**: 16 034.
- [22] 陈晓峰. 不结球白菜抗真菌病基因的克隆与表达分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [23] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, **28**(10): 2 731-2 739.
- [24] XIAO D, WANG H, BASNET R K, *et al.* Genetic dissection of leaf development in *Brassica rapa* using a genetical genomics approach[J]. *Plant Physiology*, 2014, **164**(3): 1 309-1 325.
- [25] TASHAKKORI M M, TEBIANIAN M, TABATABAEI M, *et al.* Cloning, expression, and purification of recombinant protein MPT-64 from a virulent strain of *Mycobacterium bovis* in a prokaryotic system[J]. *International Journal of Mycobacteriology*, 2016, **5** Suppl 1(5): S249.
- [26] MIR G, DOMENECH J, HUGUET G, *et al.* A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, **55**(408): 2 483-2 493.
- [27] REN Y J, LIU Y, CHEN H Y, *et al.* Type 4 metallothionein genes are involved in regulating Zn ion accumulation in late embryo and in controlling early seedling growth in *Arabidopsis*[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2011, **35**(4): 770-789.
- [28] 齐世静, 于星宇, 温友伟, 等. 小白菜 *BcGSH* 的克隆及其与 *BcMT2a* 基因的表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2018, **26** (7): 1 164-1 173.
QI S J, YU X Y, WEN Y W, *et al.* Cloning of *BcGSH* and expression analysis of it and *BcMT2a* in *Brassica campestris* ssp. *chinensis*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2018, **26**(7): 1 164-1 173.
- [29] ZHOU Y, CHU P, CHEN H, *et al.* Overexpression of *Nelumbo nucifera* metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2011, **235**(3): 523-537.
- [30] JIN S, CHENG Y, GUAN Q, *et al.* A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses[J]. *Biotechnology Letters*, 2006, **28**(21): 1 749-1 753.