

# 苹果金属硫蛋白基因 *MdFjMT2* 克隆 及生物信息学分析

樊连梅<sup>1,2</sup>, 刘更森<sup>2</sup>, 刘成连<sup>2</sup>, 原永兵<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>青岛农业大学生命科学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 青岛 266109;

<sup>2</sup>青岛农业大学园林园艺学院/青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 青岛 266109)

**摘要:**以红富士苹果 (*Malus domestica* CV Red Fuji) 浓红型芽变和其条红母株为试材, 构建抑制性差减杂交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 文库, 差异筛选 SSH-cDNA 文库, 经过大量测序构建红富士苹果 EST 序列本地数据库, 对本地数据库进行 Blastn 检索, 得到 42 条金属硫蛋白基因 *MdFjMT2* 的 cDNA 片段, 通过序列拼接和逆转录 PCR (RT-PCR) 方法, 获得了红富士苹果金属硫蛋白基因 *MdFjMT2* 全长 cDNA 序列 (Gen-bank 登录号为 HQ730757), 该基因全长 684bp, 其中 5' 非翻译区 97bp, 3' 非翻译区 347bp, 编码区 (Coding sequence, CDS) 为 240bp, 编码 79 个氨基酸, 推测蛋白分子量为 7.7938kDa, 理论等电点为 4.75。该基因具有金属硫蛋白基因的典型结构域特征, 编码的氨基酸序列中含有 14 个半胱氨酸残基 Cys (C), Cys 残基的排列特征是以 CC, CXC 和 CXXC 集中分布在肽链的 N 端和 C 端。系统进化分析表明 *MdFjMT2* 与砂梨 (*Pyrus pyrifolia*)、苹果 (*Malus domestica*) 和小金海棠 (*M. xiaojinensis*) 等植物金属硫蛋白具有较近的亲缘关系, 与扁桃 (*Prunus dulcis*)、旱柳 (*Salix matsudana*)、美味猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*) 等植物的亲缘关系较远。生物信息学分析结果表明, *MdFjMT2* 主要位于叶绿体中, 没有信号肽, 是非跨膜亲水性蛋白, 其蛋白质二级结构的主要元件是无规则卷曲, 没有功能结构域。这些结果为 *MdFjMT2* 的结构与功能挖掘提供一定的参考。本研究结果有助于研究该基因在苹果着色中的作用, 阐明苹果着色的分子机制。

**关键词:**红富士苹果; 金属硫蛋白; *MdFjMT2*; 基因克隆; 生物信息

## Cloning and Bioinformatic Analysis of Metallothionein-like Protein Gene (*MdFjMT2*) from Apple (*Malus domestica*)

FAN Lian-mei<sup>1,2</sup>, LIU Geng-sen<sup>2</sup>, LIU Cheng-lian<sup>2</sup>, YUAN Yong-bing<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science/Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong, Qingdao 266109 <sup>2</sup>College of Landscape and Horticulture/Qingdao Key Lab of Modern Agriculture Quality and Safety Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109)

**Abstract:** An apple EST local database of apple fruit (*Malus domestica* cv Red Fuji) was constructed by differential screening and a large number of sequencing against the suppression subtractive hybridization cDNA library from *M. domestica* cultivar Red Fuji coloring type sports and its wild type. A metallothionein (MT) gene, named *MdFjMT2* (Accession No. HQ730757) was cloned by RT-PCR and splicing of 42 cDNA sequences that were obtained by Blastn searching against the EST local database. The full length cDNA encoding metallothionein gene *MdFjMT2* was 684bp, including 97bp of 5' untranslated region and 347bp of 3' untranslated region. It had a coding sequence (CDS) of 240bp, encoding 79 amino acid residues. The protein molecular weight was 7.7938 kD and the theoretical pI was 4.75. Gene *MdFjMT2* contained the conserved domains of all known MT, with 14 Cys (C) residues, ranking in the feature of CC, CXC, and CXXC, and locating at protein N terminus and C terminus. The phylogenetic tree analysis revealed that the amino acids sequence of *MdFjMT2* shared higher similarity with *Pyrus Pyrifolia*, *M. domestica*, and *M. xiaojinensis*, but lower similarity with *Prunus dulcis*, *Salix matsudana*, and *Actinidia delicio-*

收稿日期: 2010-12-29

修回日期: 2011-04-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471200); 公益性行业科研专项子课题 (200903044); 青岛农业大学高层次人才启动基金 (630929)

作者简介: 樊连梅, 博士, 讲师。研究方向: 果树分子生物学。E-mail: lianmeifan@163.com

通讯作者: 原永兵, 博士, 教授。研究方向: 果树发育生理与分子生物学。E-mail: yyb@qau.edu.cn

万方数据

sa. Bioinformatics analysis showed that *MdFjMT2* was mainly located in chloroplasts. It had no signal peptide and belonged to the hydrophilic non-transmembrane protein. *MdFjMT2* had no functional domains and random coil was the major components of its secondary structure. These results provided information for further structure and functional study of *MdFjMT2*. The results would be useful to study the functions of gene, and clarify molecular mechanisms of apple coloring.

**Key words:** *Malus domestica* cv Red Fuji; Metallothionein; *MdFjMT2*; Gene cloning; Bioinformation

金属硫蛋白 (Metallothioneins, MTs) 是一类富含半胱氨酸 (Cystine, Cys)、低分子量 (6000 ~ 7000Da), 并且具有独特的金属硫四面体络合结构的多肽。MTs 广泛分布于动物、植物和微生物体内, 动物体内的 MTs 于 1957 年首次于蓄积镉的马肾中被发现<sup>[1]</sup>, 植物 MTs 最早于 1977 年从大豆根中发现<sup>[2]</sup>。植物 MTs 在解除重金属离子的毒害、调节金属离子特定运输等方面有重要作用<sup>[3]</sup>。近些年来, 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等方面得到快速的发展<sup>[4-6]</sup>。据报道金属硫蛋白还与植物的胚胎发育、果实成熟、衰老等过程有关<sup>[7]</sup>。随着植物分子生物学研究的发展, 目前已经从拟南芥、水稻、菊芋、西瓜、怪柳、小金海棠等多种植物<sup>[8-13]</sup> 中分离出许多 MTs 基因。但对其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 的研究将成为一个重要的方向。

本研究利用 SSH-cDNA 文库差异筛选的 *MdFjMT2* 片段拼接和 RT-PCR 扩增, 从红富士苹果浓红型芽变果实的果皮中克隆了该基因, 同时, 利用生物信息分析方法与技术从分子水平上揭示 *MdFjMT2* 的氨基酸序列与组成、进化关系、理化性质、亚细胞定位、跨膜区与信号肽、疏水性/亲水性、蛋白质二三级结构以及功能等进行分析与预测。从而为进一步研究该基因在红富士苹果浓红型芽变过程的功能、作用机理及其今后的转基因工作奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物材料** 红富士苹果成熟果实采自山东省青岛市一苹果园发现的具有浓红型芽变的苹果树。削取果皮, 经液氮处理后置于 -70℃ 冰箱中保存备用。

**1.1.2 菌株和载体** 大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 DH 5 $\alpha$  由本实验室保存, pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

**1.1.3 主要生化试剂** 反转录酶、限制性内切酶、

rTaq 酶、Hs-Taq 酶、RNase H 酶、dNTP、DNA Marker、DNA 胶回收试剂盒、质粒快速抽提试剂盒。引物由上海英俊生物有限公司 (Invitrogen) 合成。PCR-Select cDNA Subtraction Kit 试剂盒购自 Clontech 公司。PolyTtract<sup>®</sup> mRNA Isolation Systems III 试剂盒购自 Promega 公司。其他试剂均为国产或进口的分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取与 mRNA 的分离纯化** 苹果果实总 RNA 的提取采用改良的 CTAB 法<sup>[14]</sup>。mRNA 的分离纯化按 PolyTtract<sup>®</sup> mRNA Isolation Systems III 试剂盒说明书进行。纯化的 mRNA 于 -70℃ 保存备用。

**1.2.2 SSH 文库的构建及阳性克隆的测序** 依据 Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit 说明, 逆转录 cDNA 第一链, PCR 法合成双链 cDNA 用于苹果果皮 SSH-cDNA 文库的构建。利用斑点杂交对转化子进行筛选, 随机选取若干阳性克隆, 由上海英俊生物技术有限公司以 M13 为引物进行测序。

**1.2.3 金属硫蛋白基因的序列获得** 将 SSH-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 ContigExpress 进行序列拼接。根据序列拼接的全长序列设计特异性引物, 扩增金属硫蛋白基因 MT 的 cDNA 全长, PCR 产物经过琼脂糖凝胶回收、纯化后, 连接到 pMD18-T 载体, 然后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。挑取阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司进行测序。

**1.2.4 生物信息学分析** 将测序得到的核酸序列和推导的氨基酸序列分别在美国国立生物技术信息中心 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上用 BLASTn 和 BLASTp 进行序列相似性分析。BLAST 比对之后, 用 ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 搜索框来预测完整的 CDS 区, 用 NCBI 的 Conserved Domains 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测蛋白的保守区域, 并对 *MdFjMT2* 结构域进行分析。氨基酸多重比较分析由 Vector NTI Suite 的组

件 AlignX 和 Clustal X 1.81 完成,然后用 BioEdit 软件计算相似性数值,用 Treecon 1.3b 做系统发育树状图。应用 ExPASy Proteomics Server 的 ProtParam 程序 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 分析蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量、等电点等理化性质;应用服务器 WoLF PSORT (<http://wolfpsort.org/>) 进行蛋白亚细胞定位预测;利用 TM-HMM Server v. 2.0 (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 和 Tmpred Server ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 程序进行蛋白质跨膜区段预测;利用 SignalP 3.0 Server (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 程序分析预测蛋白 N-末端的信号肽序列;应用 ExPASy Proteomics Server 的 ProtScale 程序 (<http://expasy.org/tools/protscale.html>) 以默认算法 (Hphob./Kyte& Doolittle) 进行疏水性和亲水性分析<sup>[15]</sup>;利用 SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_ss\\_pred.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_ss_pred.html)) 预测 MdFjMT2 蛋白的二级结构<sup>[16]</sup>;利用 SAM-T08 程序预测 MdFjMT2 蛋白的三级结构 ([http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM\\_T08/T08-query.html](http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T08/T08-query.html))。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 和 mRNA 的检测

用美国伯乐 (Bio-rad) SmartSpec plus 微量紫外可见分光光度计测定总 RNA 在 260nm 和 280nm 的吸光度值,OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值为 1.8~2.0,表明总 RNA 纯度较高。琼脂糖凝胶电泳法检测总 RNA 的完整性、mRNA 完整性和大小,28S RNA 条带的亮度约为 18S RNA 条带的 2 倍,表明 RNA 的完整性好,可以用于后续试验研究。mRNA 电泳呈弥散的条带,表明纯化效果好,可用于 cDNA 合成。

### 2.2 差异筛选消减 cDNA 文库

利用斑点杂交对构建的 SSH-cDNA 文库进行差异筛选。将得到阳性克隆 (EST) 进行测序,将测序得到的 EST 核酸序列和推导的氨基酸序列分别在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上用 BLASTn 和 BLASTp 进行序列相似性分析。总计筛选得到 42 条苹果金属硫蛋白 MdFjMT2 的 cDNA 片段,片段大小范围在 200~500bp 之间,将这 42 条 cDNA 片段构建成本地数据库。

### 2.3 金属硫蛋白基因 MdFjMT2 全长序列的拼接与克隆

将本地数据库中的 42 条苹果金属硫蛋白 cDNA 万方数据

NA 片段用拼接软件 ContigExpress 进行序列拼接。去掉中间的重叠区域,得到 684bp 的 MdFjMT2 序列。然后根据该序列设计特异性引物,以红富士苹果浓红型芽变 cDNA 为材料进行 PCR 扩增,扩增产物经 TA 克隆后选取阳性送样测序。将测序结果和拼接序列进行比对,二者的结果一致 (图 1)。

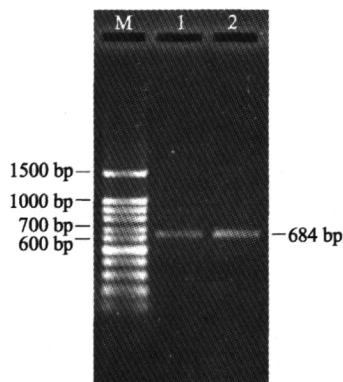


图 1 MdFjMT2 基因 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of MdFjMT2 gene amplified by PCR

1,2: MdFjMT2 基因 PCR 扩增的结果  
M: 标准分子量 Marker (100bp DNA Ladder)  
1,2: Gene amplification of MdFjMT2 gene  
M: Marker (100bp DNA Ladder)

### 2.4 红富士苹果 MdFjMT2 基因的序列分析

红富士苹果浓红型芽变 MdFjMT2 在 NCBI 的核苷酸数据库中进行 Blastn 比对,发现其与苹果 *M. domestica* AMT2 基因 (GenBank 登录号: U61973) 序列相似性非常高,期望值为 0.0,相似性为 96%。红富士苹果中 MdMT2 基因与其他果树的金属硫蛋白基因的亲缘关系也比较近,序列相似性具体信息如表 1 所示。

生物信息学分析结果表明,该基因属于 MT2 型基因,将其命名为 MdFjMT2,该序列编码区 (CDS) 为 240bp,编码 79 个氨基酸,其中 5' 非翻译区 97bp,3' 非翻译区 347bp (图 2)。带有下划线的序列为编码区,ATG 为起始密码子,TGA 为终止密码子。

### 2.5 MdFjMT2 蛋白理化性质的预测

用 ProtParam 预测红富士苹果 MdFjMT2 蛋白理化性质,推测该蛋白的分子式为 C<sub>297</sub>H<sub>483</sub>N<sub>91</sub>O<sub>114</sub>S<sub>20</sub>,相对分子质量为 7.7938kDa,等电点为 4.75;理论推导半衰期大约为 30h,不稳定参数为 43.25,为不稳定蛋白 (稳定蛋白为 40 以下)。该蛋白中相对含量较多的氨基酸是 Tyr (6 个,1.6%) 和 Cys (14 个,

表 1 红富士苹果浓红型芽变与其他果树之间 *MTs* 核苷酸序列的相似性

Table 1 Genetic similarity of *MT* nucleotide sequence between red Fuji red bud sport and other fruit trees

金属硫蛋白基因 <i>MTs</i> gene	登录号 Ac. No.	遗传相似性 (%) Genetic similarity
<i>Malus domestica</i> metallothionein-like protein (AMT1) mRNA, complete cds	U61973	96
<i>Pyrus pyrifolia</i> PPFUR8 mRNA for metallothionein-like protein, complete cds	AB021785	87
<i>Pyrus pyrifolia</i> metallothionein-like protein (mlp) mRNA, complete cds	FJ393460	90
<i>Malus xiaojinensis</i> metallothionein-like protein (Met1) mRNA, complete cds	GQ906589	87
<i>Pyrus pyrifolia</i> strain Whangkeumbae metallothionein-like protein (MT1) mRNA, partial cds	AF195206	86
<i>Prunus persica</i> mRNA for metallothionein-like protein	AJ243532	80

1 acgcgggggttcaaacagagcttgcgtttatctgcttctgtgcatcaattcaatcaaa  
61 ctttcgctgtgaaatttcaatctccaattccaataatgtcgtcgtgctgcgggtgtaa  
M S S C C G G K  
121 atgtggttgcgggtccggctgcagctcggcagtgctgcaacgggtggtggatggctcc  
C G C G S G C S C G S G C N G C G M A P  
181 tgatctgagctacatggagggtccaccactgagaccctcgtcatggaggttgcctccca  
D L S Y M E G S T T E T L V M G V A P Q  
241 gaagtctcacatggagcctctgagatgggagtgctgccgagaacggatgcaagtgcgg  
K S H M E A S E M G V A A E N G C K C G  
301 agacaactgcacctgcaaccctgcaactgcaagtgcagggatcgagatgacaccttct  
D N C T C N P C N C K \*  
361 gatgaagcaagagaatcgcgggctgtatggttagcagtaataatgtagctggtggtg  
421 tcgtaatcatgcatgatccaatttacgaagctggttttagaataaaggccca  
481 tggtctctctgagctgcactcactaggttagatctggtcctaggttatgctgct  
541 tgttctgtgtttgctttgtacctgccggcgccgctcgattgtgttttagttgtg  
601 ttaacttggtggtgattatgtgtttctgattaaattaagaaaaactgtcccaaaa  
661 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

图 2 *MdFjMT2* 基因序列及编码区推测的氨基酸序列  
Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the complete cDNA of *MdFjMT2*

标注有下划线的核苷酸序列为编码区,  
ATG 为起始密码子, TGA 为终止密码子

The underlined nucleotide sequences are coding sequence,  
ATG is the initiation codon, and TGA is the stop codon

17.7%)、Gly (14 个, 17.7%)、Ser (9 个, 11.4%)、Met (6 个, 7.6%)、Ala (5 个, 6.3%)、Asn (5 个, 6.3%)、Glu (5 个, 6.3%)、Lys (4 个, 5.1%)、Thr (4 个, 5.1%); 该蛋白中含量比较少的氨基酸是 Gln (1 个, 1.3%)、His (1 个, 1.3%)、Tyr (1 个, 1.3%); 该蛋白中不含有 Arg、Ile、Phe 和 Trp。带负电荷的残基 (Asp + Glu) 总数为 7; 带正电荷的残基 (Arg + Lys) 总数为 4。亲水性平均数为 -0.132, 并且其脂肪指数为 27.22, 预测该蛋白为亲水性蛋白。

2.6 *MdFjMT2* 氨基酸多重序列比对和进化分析

2.6.1 氨基酸多重序列比对 将红富士苹果 *Md-* 万方数据

*FjMT2* 基因推导的氨基酸序列在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 BLASTp, 下载相关序列并利用 Vector NTI Suite 的组件 AlignX, 将 *MdFjMT2* 同其他物种的金属硫蛋白进行氨基酸多重序列比对分析, 由图 3 可以看到, 红富士苹果 *MdFjMT2* 蛋白同其他物种如小金海棠 (*M. xiaojinensis*)、砂梨 (*Pyrus pyrifolia*) 等都有较高的序列相似性, 属金属硫蛋白家族, 编码的氨基酸序列的中部保守性很低, 不含有 Cys, 但 Cys (C) 残基的数目和位置却具有很高的保守性, 共含有 14 个 Cys 残基, 呈 C-C、C-X-C 和 C-X-X-C 形式排列, 并且集中在肽链的 N 端和 C 端, 其中 C-X-C 三肽模体序列出现 5 次。

用 NCBI 的 Conserved Domains 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测该蛋白的保守区域, 预测结果表明, 在第 26 ~ 78 氨基酸之间是 Metallothio\_2 保守序列, 具有金属硫蛋白基因典型结构域特征, 因而该基因为 II 类金属硫蛋白基因 (Class II metallothioneins) (图 4)。

2.6.2 进化分析 根据氨基酸多重序列比对分析结果, 绘制出了红富士苹果金属硫蛋白 *MdFjMT2* 与其他物种金属硫蛋白成员之间的系统发育树状图 (图 5)。分析结果表明 *MdFjMT2* 与砂梨 (*Pyrus pyrifolia*)、苹果 (*M. domestica*) 和小金海棠 (*M. xiaojinensis*) 等植物金属硫蛋白遗传相似性较高, 遗传相似性分别为 99%、99% 和 93%, 保持了较近的亲缘关系, 与扁桃 (*Prunus dulcis*)、旱柳 (*Salix matsudana*)、美味猕猴桃 (*Actinidia deliciosa*)、三叶橡胶 (*Hevea brasiliensis*)、皱瓣水仙 (*Narcissus pseudonarcissus*)、丹参 (*Salvia miltiorrhiza*)、豌豆 (*Pisum sativum*) 等植物的金属硫蛋白遗传相似性较低, 在 60% ~ 78% 之间, 亲缘关系较远 (图 5, 表 2)。

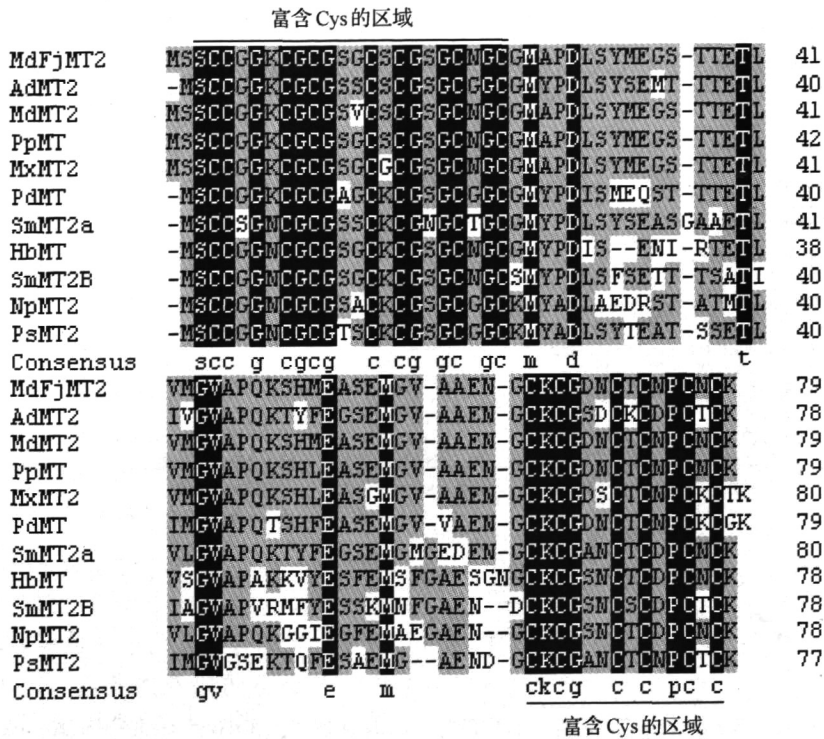


图 3 苹果金属硫蛋白 MdFjMT2 与其他植物的金属硫蛋白氨基酸多重序列比对

Fig. 3 Multiple alignment of the amino acid sequence of metallothionein MdFjMT2 with MTs from other plants

相同和保守的氨基酸残基用黑色和灰色分别表示,两个富含 Cys 的区域用黑色的上划线或下划线表示  
 Identical amino acid residues and conservation amino acid residues are indicated in black and grey, respectively. The two Cys-rich domains is also indicated with black above or under line

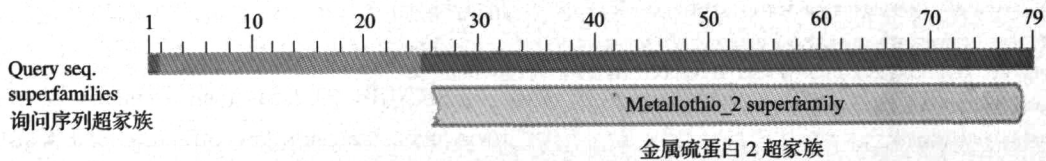


图 4 苹果金属硫蛋白 MdFjMT2 蛋白保守域分析

Fig. 4 Analysis of conserved domain of MdFjMT2

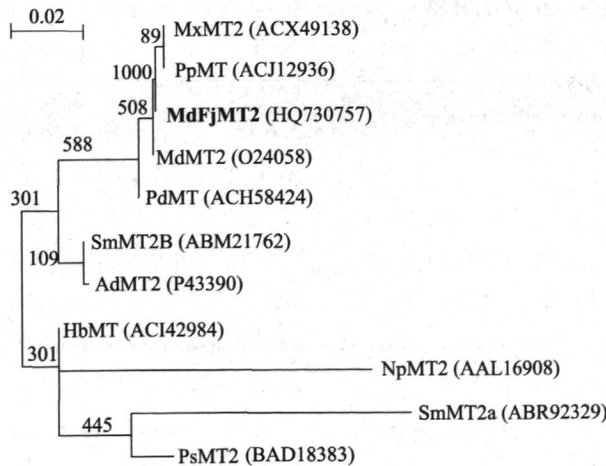


图 5 苹果金属硫蛋白 MdFjMT2 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on metallothionein protein MdFjMT2

图 5 分支上的数字表示可信度,括号里的为 GenBank 序列登录号,比例尺表示 100 个氨基酸里有 2 个替换  
 Annotation: Significant bootstrap probability values are indicated at the branch points. The numbers in the parenthesis are the GenBank accession numbers, Bar, 2 substitution per 100 amino acid positions

表 2 苹果金属硫蛋白 *MdFjMT2* 序列与其他植物金属硫蛋白的相似性

Table 2 Similarity of *MdFjMT2* sequence with other plant metallothionein

参比 Reference	登录号 Ac. No.	遗传相似性 (%) Genetic similarity
MxMT2 ( <i>Malus xiaojinensis</i> )	ACX49138	93
PpMT ( <i>Pyrus pyrifolia</i> )	ACJ12936	99
MdMT2 ( <i>Malus domestica</i> )	O24058	99
PdMT ( <i>Prunus dulcis</i> )	ACH58424	78
SmMT2B ( <i>Salix matsudana</i> )	ABM21762	56
AdMT2 ( <i>Actinidia deliciosa</i> )	P43390	73
HbMT ( <i>Hevea brasiliensis</i> )	ACI42984	65
NpMT2 ( <i>Narcissus pseudonarcissus</i> )	AAL16908	62
SmMT2a ( <i>Salvia miltiorrhiza</i> )	ABR92329	71
PsmMT2 ( <i>Pisum sativum</i> )	BAD18383	60

2.7 金属硫蛋白亚细胞定位

用服务器 WoLF PSORT 对红富士苹果 *MdFjMT2* 进行蛋白亚细胞定位预测, *MdFjMT2* 主要分布在苹果细胞的叶绿体(定位预测为 10.0)中,其次在细胞核(定位预测为 2.0)、线粒体(定位预测为 2.0)的各个组分中也有一定分布。

2.8 *MdFjMT2* 跨膜结构域和信号肽预测分析

进行跨膜结构域和信号肽预测分析能全面认识和了解蛋白质的亚细胞定位。利用 TMHMM

Server v. 2.0 和 TMpred Server 软件对 *MdFjMT2* 进行蛋白质跨膜结构域预测,结果均表明该蛋白不存在跨膜结构域,整条肽链都位于细胞膜外(图 6A1、A2)。利用 SignalP 3.0 Server 程序的神经网络 (Neural networks, NN) 和隐马尔科夫模型 (Hidden Markov Models, HMM) 预测 *MdFjMT2* 蛋白均发现该蛋白不存在信号肽序列(图 6B1、B2)。以上结果表明红富士苹果的 *MdFjMT2* 蛋白属于非分泌型、非跨膜蛋白类。

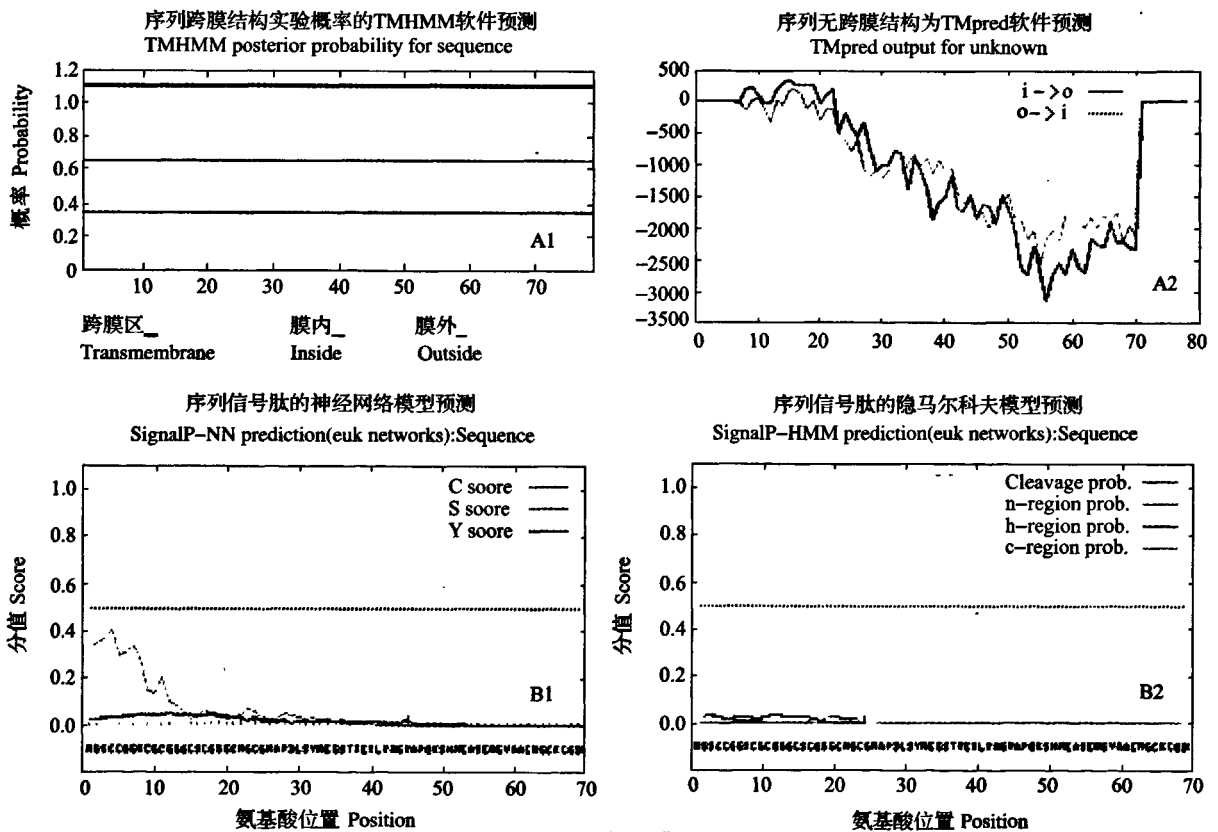


图 6 信号肽与跨膜区预测

Fig. 6 Prediction of signal peptides and trans-membrane regions

A1 和 A2: 跨膜区预测, B1 和 B2: 信号肽预测

A1 and A2: Prediction of trans-membrane regions, B1 and B2: Prediction of signal peptides

## 2.9 MdFjMT2 疏水性/亲水性预测和分析

利用 ExPASy Proteomics Server 的 ProtScale 程序,根据模型 Hphob./Kyte & Doolittle 对红富士苹果的 MdFjMT2 蛋白质疏水性和亲水性进行分析,由于氨基酸分值越低亲水性越强和分值越高疏水性越

强的规律,从疏水性分析结果可以看出(图7),MdFjMT2 金属硫蛋白的中部有较强疏水区,而其两端为明显亲水区。多肽链第 52 位 Met 具有最低的分值 -1.481 和最强的亲水性;第 42 位 Val 具有最高的分值 1.305 和最强的疏水性。

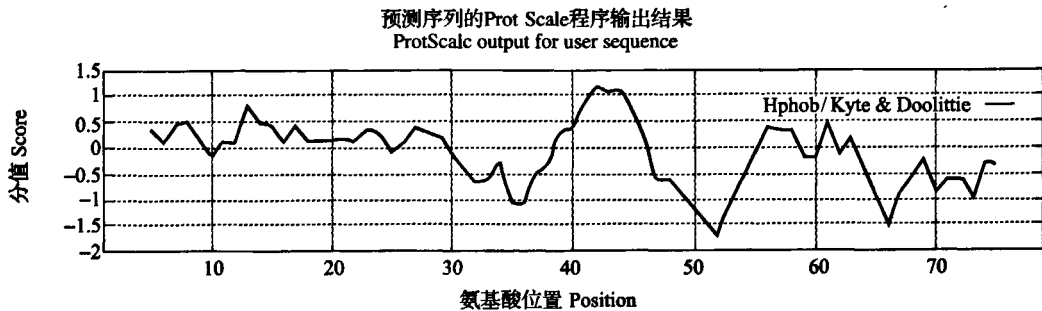


图7 MdFjMT2 的疏水性 P 亲水性分析预测

Fig.7 Predication of hydrophobicity/hydrophilicity for MdFjMT2

## 2.10 MdFjMT2 蛋白的二级和三级结构预测

用 SOPMA 结构预测程序预测红富士苹果 MdFjMT2 蛋白的二级结构。分析表明,MdFjMT2 蛋白的二级结构中包括 13.92% 的  $\alpha$ -螺旋 (Alpha helix)、7.59% 的  $\beta$ -折叠片 (Beta sheet)、6.33% 的  $\beta$ -转角 (Beta turn)、72.15% 的无规则卷曲 (Random

coil)。在 50~54 号残基 (TLVMG) 形成  $\beta$  折叠可能性比较大,MdFjMT2 蛋白的二级结构中无规则卷曲占大多数,预测形成  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的氨基酸很少(图 8A, B)。将待预测的 MdFjMT2 氨基酸序列提交给 SAM-T08 程序预测该蛋白的三级结构,结果显示没有预测到其三级结构。

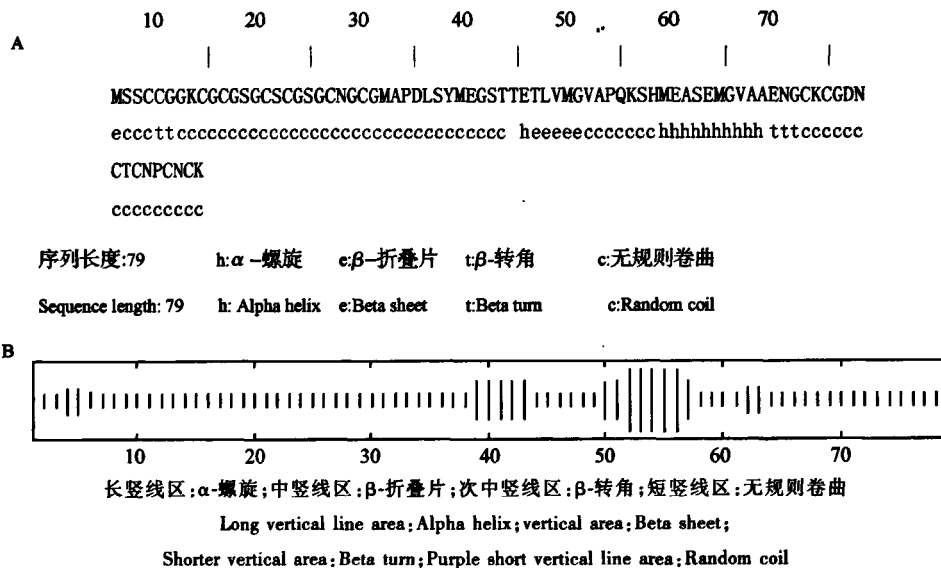


图8 MdFjMT2 二级结构预测

Fig.8 Predication of the Secondary Structures of MdFjMT2

## 3 讨论

目前植物 MTs 一般根据氨基酸序列中 Cys 的排列方式进行分类。本研究根据 Cobbett<sup>[17]</sup> 的分类方法将红富士苹果 MdFjMT2 归为第 2 类。对克隆的红富士苹果 MdFjMT2 蛋白的理化性质、亚细胞定位、跨膜区与信号肽、疏水性/亲水性,蛋白质二、三

级结构以及功能等进行了生物信息分析与预测。MdFjMT2 蛋白的二级结构中无规则卷曲占大多数,预测形成  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠的氨基酸很少,这与文献报道的 MTs 中不含  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -折叠,而是一种很坚固的构象的结论相符合<sup>[18]</sup>。由于植物 MT2 在蛋白质数据库中没有相似的结构模型,所以没有预测到三级结构。目前关于植物金属硫蛋白的结构报道很

少。据文献报道植物 MTs 中间区域协助两端富含半胱氨酸的区域相互靠近,从而和金属离子结合形成一个结构域<sup>[19-20]</sup>。因而今后面临的一个重要研究课题是获得植物 MT2 蛋白晶体并对其进行结构解析,为利用生物信息学进行植物 MTs 结构分析与功能预测奠定基础,使植物 MTs 的研究和利用更能深入开展。

金属硫蛋白最显著的功能是结合金属离子和清除氧自由基。此外它参与生长发育、胚胎发生、果实发育等生理代谢过程,目前,人们已经对植物 MTs 的这些功能进行了研究。有文献报道蚕豆的两种 MTs 基因参与金属离子的运输和供给<sup>[21]</sup>。金属硫蛋白功能的多样性取决于其丰富的巯基含量及重金属结合能力<sup>[22]</sup>。目前,对于植物 MTs 蛋白的抗逆生理功能研究不断深入,但其他功能还未完全清楚。

不同物种、不同 MTs 类型、不同组织器官、不同外界条件下,植物 MTs 基因表达特性各不相同,同时植物 MTs 基因表达具有可诱导性。金属离子、激素、糖饥饿、高盐、干旱、臭氧、低温等不同环境因素都会影响对植物 MTs 基因的表达<sup>[23]</sup>。在植物体中 MTs 基因普遍表达水平较高,并且结构比较保守,许多随机测序的植物 cDNA 文库中 MTs 基因的 EST 都居最多之列,水稻 MTs 基因的转录本约占 3%<sup>[24]</sup>,盐芥 EST MTs 基因占 1.71%<sup>[25]</sup>,菠萝 cDNA 文库中 MTs 的 EST 占总数的 50%<sup>[26]</sup>。本研究发现构建的红富士苹果 SSH-cDNA 文库中,浓红型芽变苹果 11.65% *MdFjMT2* 的 EST 比其母株片红果实表达高,说明 *MdFjMT2* 基因在由片红(野生型)突变为浓红型芽变过程中丰度表达,暗示该基因有可能在果实着色过程中参与了某些生理生化过程和分子水平的基因表达调控。展开对红富士苹果 *MdFjMT2* 在果实着色方面的研究,将为果实着色领域的研究开拓新的领域。因此,红富士苹果 *MdFjMT2* 基因的克隆,将有助于进一步研究该基因的重要功能。

#### 参考文献

- [1] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex [J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 29: 4813-4814
- [2] Casterline J L, Barnett N M. Isolation and characterization of cadmium-binding components in soybean plants [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59: S-124
- [3] 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 Mol Bio*, 1996, 30: 1169-1179

- [4] Hudspeth R L, Hobbs S L, Anderson D M, et al. Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31 (3): 701-705
- [5] Whitelaw C A, Le Huquet J A, Thurman D A, et al. The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) [J]. *Plant Mol Bio*, 1997, 33 (3): 503-514
- [6] Giritch A, Ganai M, Stephan U W, et al. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato [J]. *Plant Mol Bio*, 1998, 37 (4): 701-714
- [7] 常团结,朱栋.植物金属硫蛋白研究进展(一)——植物 MT 的分类、特征及其基因结构[J].生物技术通报,2002,3:5-10
- [8] Murphy A, Zhou J, Goldsbrough P B, et al. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1293-1301
- [9] 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
- [10] 常团结,陈蕾,路子显,等.菊芋类金属硫蛋白基因 *huMT2* 的克隆及其表达特征分析[J].植物学报,2002,40(10): 1188-1193
- [11] Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, et al. Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought induced type 2 metallothionein in wild water melon [J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 2004, 323 (1): 72-78
- [12] 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
- [13] 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
- [14] Ksenija G, Alvaro H, Schuyler S K. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction [J]. *Plant Mol Bio Rep*, 2004, 12 (22): 437-443
- [15] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. *J Mol Bio*, 1982, 157: 105-132
- [16] Geourjon C, Deléage G. SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments and joint prediction [J]. *Cabios*, 1995, 11: 681-684
- [17] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis [J]. *Ann Rev Plant Bio*, 2002, 53: 159-182
- [18] 张艳,杨传平.金属硫蛋白的研究进展[J].分子植物育种,2006,4(S1):73-78
- [19] Kille P, Winge D R, Harwood J L, et al. A plant metallothionein produced in *E. coli* [J]. *FEBS Let*, 1991, 295: 171-175
- [20] Jordi D, Gisela M, Gemma H, et al. Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding [J]. *Biochimie*, 2006, 88: 583-593
- [21] Foley R C, Liang Z M, Singh K B. Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba* [J]. *Plant Mol Bio*, 1997, 33: 583-591
- [22] 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
- [23] 全先庆,张洪涛,单雷,等.植物金属硫蛋白及其重金属解毒机制研究进展[J].遗传,2006,28(3):375-382
- [24] Matsumura H, Nirasawa S, Terauchi R. Transcript profiling in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using serial analysis of gene expression (SAGE) [J]. *Plant*, 1999, 20: 719-726
- [25] Wang Z L, Li P H, Fredrickson M, et al. Expressed sequence tags from *Thellungiella hapophila*, a new model to study plant salt tolerance [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 609-616
- [26] Moyle R, Fairbairn D J, Ripi J, et al. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 101-112



作者: [樊连梅](#), [刘更森](#), [刘成连](#), [原永兵](#), [FAN Lian-mei](#), [LIU Geng-sen](#), [LIU Cheng-lian](#), [YUAN Yong-bing](#)

作者单位: [樊连梅, FAN Lian-mei \(青岛农业大学生命科学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 青岛266109; 青岛农业大学园林园艺学院/青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 青岛266109\)](#), [刘更森, 刘成连, 原永兵, LIU Geng-sen, LIU Cheng-lian, YUAN Yong-bing \(青岛农业大学园林园艺学院/青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室, 青岛, 266109\)](#)

刊名: [植物遗传资源学报](#) **ISTIC PKU**

英文刊名: [Journal of Plant Genetic Resources](#)

年, 卷(期): 2011(5)

## 参考文献(26条)

1. 常团结;朱祯 [植物金属硫蛋白研究进展\(一\)--植物MT的分类、特征及其基因结构](#) 2002
2. Moyle R;Fairbairn D J;Ripi J [Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein](#) 2005
3. Wang Z L;Li P H;Fredricksen M [Expressed sequence tags from Thellungiella hapophila, a new model to study plant salt tolerance](#) 2004
4. Matsumura H;Nirasawa S;Terauchi R [Transcript profiling in rice \(Oryza sativa L\) seedlings using serial analysis of gene expression \(SAGE\)](#) 1999
5. 全先庆;张洪涛;单雷 [植物金属硫蛋白及其重金属解毒机制研究进展](#) 2006(03)
6. 全先庆;高翔 [植物金属硫蛋白及其在自由基清除中的作用](#) 2003(06)
7. Foley R C;Liang Z M;Singh K B [Analysis of type I metallothionein cDNAs in Vicia faba](#)[外文期刊] 1997
8. 常万霞;王玉成;姜静 [怪柳金属硫蛋白基因的克隆及分析](#) 2006(01)
9. Akashi K;Nishimura N;Ishida Y [Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought induced type 2 metallothionein in wild water melon](#)[外文期刊] 2004(01)
10. 常团结;陈蕾;路子显 [菊芋类金属硫蛋白基因htMT2的克隆及其表达特征分析](#) 2002(10)
11. Yu L H;Umeda M;Liu J Y [A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem](#)[外文期刊] 1998
12. Murphy A;Zhou J;Goldsbrough P B [Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from Arabidopsis thaliana](#)[外文期刊] 1997
13. Jordi D;Gisela M;Gemma H [Plant metallothionein domains: functional insight into physiological metal binding and protein folding](#) 2006
14. Kille P;Winge D R;Harwood J L [A plant metallothionein produced in E. coli](#)[外文期刊] 1991
15. 张艳;杨传平 [金属硫蛋白的研究进展](#) 2006(z1)
16. Cobbett C;Goldsbrough P [Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis](#) [外文期刊] 2002
17. Geourjon C;Deléage G [SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments and joint prediction](#) 1995
18. Kyte J;Doolittle R F [A simple method for displaying the hydropathic character of a protein](#)[外文期刊] 1982
19. Ksenija G;Alvaro H;Schuyler S K [RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction](#) 2004(22)
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](#) 2010(02)
21. Giritch A;Ganal M;Stephan U W [Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato](#)[外文期刊] 1998(04)
22. Whitelaw C A;Le Huquet J A;Thurman D A [The isolation and characterization of type II metallothionein-like genes](#)

from tomato (Lycopersicon esculentum L.)[外文期刊] 1997(03)

23. Hudspeth R L;Hobbs S L;Anderson D M Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton[外文期刊] 1996(03)

24. Robinson N J;Wilson J R;Turner J S Expression of the type 2 metallothionein-like gene MT2 from Arabidopsis thaliana in Zn<sup>2+</sup>-metallothionein deficient Synechococcus PCC 7942:Putative role for MT2 in Zn<sup>2+</sup>-metabolism[外文期刊] 1996

25. Casterline J L;Barnett N M Isolation and characterization of cadmium-binding components in soybean plants 1977

26. Margoshes M;Vallee B L A cadmium protein from equine kidney cortex[外文期刊] 1957

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zwyczyxb201105019.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201105019.aspx)