

水稻金属硫蛋白基因家族鉴定及 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 功能分析

苗渝青^{1,2}, 张超^{1,2}, 韩子静^{1,2}, 翟雨航^{1,2}, 张文祺^{1,2}, 金锐^{1,2}, 张振华^{1,2*}, 陈海飞^{1,2*}

1 湖南农业大学 资源学院, 湖南 长沙 410128

2 湖南省岳麓山实验室, 湖南 长沙 410128

苗渝青, 张超, 韩子静, 翟雨航, 张文祺, 金锐, 张振华, 陈海飞. 水稻金属硫蛋白基因家族鉴定及 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 功能分析[J]. 生物工程学报, 2026, 42(1): 288-302.

MIAO Yuqing, ZHANG Chao, HAN Zijing, ZHAI Yuhang, ZHANG Wenqi, JIN Rui, ZHANG Zhenhua, CHEN Haifei. Identification of rice metallothionein gene family and functional analysis of *OsMT1.3A* and *OsMT1.4A*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2026, 42(1): 288-302.

摘要: 金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类低分子量蛋白。目前,已有大量关于植物吸收和调控重金属 Cd 积累的分子机制的研究,然而研究结果相对来说不够系统,主要集中于部分转运蛋白的研究。为系统揭示金属硫蛋白在水稻调控网络中的潜在功能,并弥补现有研究在基因家族层面系统性的不足的缺口,本研究通过生物信息学分析,共鉴定到 14 个水稻金属硫蛋白基因家族成员,水稻金属硫蛋白基因家族成员的 motif 有较大差异,蛋白序列的进化树分析将其分为 4 类亚家族,其中 *OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*、*OsMT1.4C*、*OsMT1.1C*、*OsMT1.1G* 串联成簇分布在 12 号染色体上。预测的顺式元件与植物激素、生长、环境、光响应相关。大部分的金属硫蛋白受各类激素诱导表达,镉胁迫诱导其中 10 个成员的表达量上调。*OsMT1.3A*、*OsMT1.3B* 保守结构域与其他 OsMTs 差异较大,表达模式与其他家族基因截然不同。异源表达 *OsMT1.3A*、*OsMT1.4A* 显著提高了细菌和酵母对 Cd 的耐受性,水稻中过表达 *OsMT1.4A* 显著增加了有效穗数和产量。本研究为通过生物技术的手段培育 Cd 耐受并具有修复 Cd 污染潜力的农作物提供了优异的基因资源。

关键词: 水稻; 微生物; 镉胁迫; 金属硫蛋白基因家族; 表达模式

资助项目: 国家自然科学基金(32172669); 湖南省科技创新计划(2024RC3179)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172669) and the Hunan Province Science and Technology Innovation Plan (2024RC3179).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Zhenhua, zhzh1468@163.com; CHEN Haifei, chenhaifei@hunau.edu.cn

Received: 2025-01-11; Accepted: 2025-05-12; Published online: 2025-06-10

Identification of rice metallothionein gene family and functional analysis of *OsMT1.3A* and *OsMT1.4A*

MIAO Yuqing^{1,2}, ZHANG Chao^{1,2}, HAN Zijiang^{1,2}, ZHAI Yuhang^{1,2}, ZHANG Wenqi^{1,2}, JIN Rui^{1,2}, ZHANG Zhenhua^{1,2*}, CHEN Haifei^{1,2*}

1 College of Resources, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 Yuelushan Laboratory, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: Metallothionein (MT) is a low molecular weight protein. At present, a large number of studies on the molecular mechanisms of plant uptake and regulation of heavy metal Cd accumulation have been carried out. However, the research results obtained are relatively not systematic enough, mainly focusing on the study of some transporter proteins. To bridge the existing gap in systematic understanding of the metallothionein gene family, we aimed to uncover its potential functions within the rice regulatory network. Through bioinformatics analysis, a total of 14 rice MT gene family members were identified. The motif structure prediction indicated that there were great differences among members of this family, which could be classified into 4 subfamilies by phylogenetic analysis of protein sequences. *OsMT1.4A*, *OsMT1.4B*, *OsMT1.4C*, *OsMT1.1C*, and *OsMT1.1G* existed in series clusters on the 12th chromosome. The predicted *cis*-elements were related to plant hormones, growth, environment, and light responses. The expression of most members was induced by various plant hormones, and the expression of 10 members was upregulated by cadmium (Cd) stress. The *OsMT1.3A* and *OsMT1.3B* subfamilies showed greatly differed conserved domains from other OsMTs genes, and their expression patterns were completely different from those of other families. Heterologous expression of *OsMT1.3A* and *OsMT1.4A* significantly improved the tolerance of bacteria and yeast to Cd, and overexpression of *OsMT1.4A* in rice significantly increased the effective panicle number and yield. This study provides excellent genetic resources for breeding Cd-tolerant crops with potential for remediation of Cd pollution by biotechnology.

Keywords: rice; microorganism; cadmium stress; metallothionein (MT) gene family; expression pattern

镉是植物非必需重金属元素，在植物细胞内引起活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生及脂质过氧化，竞争与其化学性质类似的必需金属元素参与的生理代谢活性位点，从而干扰正常的生命过程，导致细胞膜解体、核酸降解、细胞死亡、光合效率降低、植物生长发育受阻等^[1-2]。目前，镉通过食物链的富集作用，对水稻安全生产、人类健康构成严重威胁。植物演

化出一套复杂的机制以应对重金属毒害，主要包括调节重金属吸收、细胞壁及液泡的区隔化、细胞质镉的螯合。其中，植物螯合肽(phytochelatin, PC)、金属硫蛋白及一些氨基酸、有机酸通过螯合细胞质镉以降低毒害作用^[3-4]。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类生物中广泛存在的富含半胱氨酸的低分子量蛋白质，其分子量在 7-10 kDa 之间^[5-6]。根据半胱氨酸残

基在蛋白质 N 端和 C 端的排列顺序, 可以将植物中的 MT 分为 4 种类型^[7], 在维持植物体重金属离子稳态和耐受性及其他非生物胁迫中扮演着重要角色^[8]。过表达 *AtMT4a* 和 *AtMT4b* 显著增加拟南芥在锌胁迫条件下的根长和种子大小, 突变体则呈相反趋势^[9]。过表达 *MT2a/MT2b* 可以提高拟南芥在 Cu 和 Cd 胁迫下的生物量^[10]。原核表达 *OsMTs1.1A*、*OsMTs1.1B*、*OsMTs1.4A*、*OsMTs1.4B*、*OsMTs1.4C* 显著提升大肠杆菌对 Hg 的耐受性^[11]。伴矿景天 SpMTL 定位于胞质, 并在胞质中螯合镉, 以降低镉的毒害^[12]。水稻 MT 家族多个成员能够被镉诱导表达^[13]。烟草中异源表达 *OsMT1.1A* 使更高比例的镉分布在根和下部叶, 限制镉向幼嫩组织的移动, 进而提高烟草对镉的耐受性^[14-15]。在水稻中, 新兴化学污染物镓会导致植物螯合酶表达下调或失活, *OsMT1a*、*OsMT1d*、*OsMT1f*、*OsMT1g*、*OsMT2a* 和 *OsMT2b* 被诱导表达^[16]。综上所述, 金属硫蛋白在螯合重金属并限制其转运过程中发挥重要作用。

MT 对高温、干旱等其他非生物胁迫有所响应。在盐胁迫条件下, 水稻 *OsMT1.1A* 在根部大量表达, 根部和地上部分积累大量盐分^[17]。由于大量 Cys 的存在, MT 能清除 ROS, 已有研究发现拟南芥的 1 型 MT 能被 ROS 诱导^[18]。最近有研究发现, 在金属胁迫条件下, 水稻 MT 除了螯合金属, 同时在清除 ROS 方面也起着重要作用^[16]。除此之外, 金属硫蛋白还能够与细菌相互作用, 促进甘蓝型油菜在盐胁迫下的生长^[19]。在水稻中, 已经发现 *OsMT1.3A* 在抗氧化中起作用^[20]。尽管有不少 OsMTs 被发现在不同逆境中起着重要的作用, 但是 *OsMT1.4A* 在水稻中的功能尚不清楚, 且目前对 MT 基因的生物学功能研究主要集中在动物领域, 而在植物中的研究多聚焦于拟南芥和番茄这类模式植物。相比之下, 对于水稻中 MT 基因的研究尚显不足, *OsMT1.4A* 相关研究较少。本研究采用同源比对法, 对水稻 MT 基因家族进行了鉴定, 并

对其序列信息、理化性质、进化关系、基因结构以及启动子顺式作用元件等进行了系统分析。此外, 本研究分析了水稻 MT 基因的表达模式, 初步探究了 *OsMT1.3A*、*OsMT1.4A* 在 Cd 耐受性和金属离子吸收中的功能, 以期为进一步理解该基因家族的生物学功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 水稻 MT 基因家族成员鉴定及理化性质分析

在 NCBI 网站上下载水稻、玉米和拟南芥基因组序列文件、CDS 序列文件、蛋白质序列文件及 gff3 数据格式文件。通过在 Pfam 数据库中下载 Metallothio_2 (Pfam 数据库登录号: PF01349) 对应的模型文件, 利用 hmmsearch 程序将 HMM 文件在水稻、玉米和拟南芥蛋白质文件中进行检索, 利用 NCBI 中的 CD-Search 工具进一步筛选得到的蛋白序列, 最终筛选得到水稻、玉米和拟南芥 MT 家族的所有成员。使用成员的氨基酸序列, 利用 ExPASy-Proparam 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 得到 OsMT 家族的基本理化性质, 其中包括氨基酸数量、蛋白质分子量、等电点、亲水系数。

1.2 水稻 MT 家族基因染色体定位和进化树分析

利用 OsMT 家族基因的完整氨基酸序列, 通过 BLASTn 搜索并确定 OsMT 家族基因在基因组的位置。通过在线软件 (https://mg2c.iask.in/mg2c_v2.1/) 绘制 OsMT 基因家族基因的染色体定位图。利用 MTs 的蛋白序列, 使用 MEGA11.0 软件 (<http://www.megasoftware-e.net/>) 通过邻接法 (neighbor joining, NJ) 进行系统发育树构建。为了获得更可靠的分支聚类, 将 bootstrap 值设置为 1 000, 并将其余参数设置为默认值。

1.3 水稻 MT 家族基因的保守基序/域和基因结构分析

使用在线软件 MEME 4.12.0 ([<http://journals.im.ac.cn/cjbcn>](http://memes-</p></div><div data-bbox=)

uite.org/tools/meme)预测 OsMT 家族基因的保守结构元件,最大基序数设置为 10。将 OsMT 家族成员的全长基因组 DNA 和 CDS 序列提交到在线软件 Gene Structure Display Server 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)中预测并绘制 OsMT 家族基因的外显子-内含子结构示意图。

1.4 水稻 MT 家族基因的顺式作用元件分析

为了鉴定水稻 MT 家族基因启动子中可能的顺式元件,从 NCBI 中下载水稻基因组序列,利用 NCBI 中的 BLAST 功能找到水稻 MT 家族所有成员所在基因组位置,下载基因上游 2.0 kb 的基因组序列,并将该序列提交至 PLACE v. 30.0 (<http://www.dna.affr-c.go.jp/PLACE/>)以识别能够与启动子区域结合的顺式作用元件。采用 TBtools 软件进行可视化。

1.5 不同激素和镉诱导下水稻 MT 家族基因的转录

使用鉴定到的水稻 MT 家族基因 RAP (rice annotation project) 号,在 RAP 数据库 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp>)检索,确定目标基因在不同样本中的表达量,从而了解 OsMT 家族在不同条件下的转录水平,并使用 TBtools 绘制热图。

为了探究 OsMT 家族对镉的响应情况,通过 RAP 数据库获取镉胁迫下 OsMT 家族转录水平,并使用平均值绘制基因家族响应模式的折线图。

1.6 异源表达分析

为了探究 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 在微生物中对镉耐受的影响,使用正向引物(5'-GGATCC ATGATGGGGTCTGTAGCATA-3')和反向引物(5'-GGATCCATGCATTGCACTCATCTCAA-3')扩增 *OsMT1.3A*,使用正向引物(5'-GGATCCATGC ATTGCACTCATCTCAA-3')和反向引物(5'-GTCGACGCGAGTTGCAGGGATTGCAT-3')扩增 *OsMT1.4A*,这 2 个片段都带有 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点的接头。通过酶切酶连将 *OsMT1.3A* 及 *OsMT1.4A*

连接到 pYES2 和 pET32a 载体上,并转化 DH5 α 菌株(pYES2)和 BL21 菌株(pET32a)以进行实验。通过镉浓度梯度实验确定镉离子合适的浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$,这一浓度对细菌的生长和增殖有抑制作用,但不会杀死细菌。每 1 h 对 DH5 α 菌株进行采样测 OD_{600} 值,每组设置 5 个生物学重复。每 2 h 对 BL21 菌株进行采样测 OD_{600} 值,每组设置 5 个生物学重复。

使用 PEG/LiAc 法将 pYES2-*MT1.3A* 和 pYES2-*MT1.4A* 转化到对镉敏感的缺陷型酵母的突变体 *ycf1* 中。将镉浓度为 70 $\mu\text{mol/L}$ 的酵母固体培养基(synthetic dropout media-uracil, SD-ura)设为实验组,对照组为正常 SD-ura 培养基,并检测对照组和实验组培养 3 d 后的酵母镉含量,每组设置 5 个生物学重复。

1.7 过表达 OE-*MT1.4A* 遗传材料大田农艺性状调查

野生型水稻‘中花 11’ (*Oryza sativa* L. ‘ZH11’)和过表达 OE-*MT1.4A* 遗传材料种植于有效态 Cd 0.482 mg/kg、全 Cd 0.706 5 mg/kg 的土壤中,采用正常田间施肥量施肥,施尿素 391.3 kg/hm²,氧化钾(K₂O) 120 kg/hm²,过磷酸钙(CaHPO₄) 90 kg/hm²,钾肥作底肥一次性基施,氮肥基肥占比 60%,分蘖肥占比 25%,穗肥占比 15%,磷肥基追比为 7:3。将相关遗传材料的水稻种子经过 1 周的泡发后集中播种于大田,待水稻生长 30 d 至苗期时进行大田插秧,幼苗以单株间隔 17 cm \times 20 cm 移植,成熟后测定农艺性状,每个株系设置 6 个生物学重复。

1.8 数据处理与分析

所有实验数据采用 SPSS 软件进行统计分析显著性检验,数据以 5 次或 6 次生物学重复的平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,并采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行不同处理之间的显著性分析($P < 0.05$)。最后采用 Origin 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 水稻 MT 基因家族成员鉴定及理化性质分析结果

鉴定水稻中 MT 的家族成员, 以 OsMT1.4A 蛋白质序列作为查询对象, 通过 NCBI 的 BLAST 进行检索, 在 Pfam 数据库中下载 Metallothio_2 (PF01349) 对应的模型文件进一步筛选, 共鉴定到 14 个 MT 家族成员。通过 ExPASy-Proparam 在线工具 (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 OsMT 家族的基本理化性质, 发现水稻 MT 蛋白家族氨基酸数量在 60–134 之间, 蛋白质分子量整体较低, 等电点在 4.58–11.72 之间, 电荷差异较大, 所有蛋白的 GRAVY 值均为负, 均属于亲水性蛋白(表 1)。

2.2 染色体定位和进化树分析

水稻 MT 基因分布于水稻 12 条染色体中的 6 条, 其中 12 号染色体上的 5 个 MT 基因紧密聚集在一起 (150 kb 内), 其中 *OsMT1.1C*、*OsMT1.4B* 位于负链, *MOsT1.4A*、*OsMT1.1G*、*OsMT1.4C* 位于正链上, 其基因结构和保守基序高度相似, 提示这些串联的 MT 基因可能经历了基因复制事件(图 1)。

为了进一步揭示物种间的进化关系, 本研究利用比较基因组学的方法分析了水稻、玉米以及小麦 MT 构建的进化树。所有 MTs 共聚为

表1 水稻MT家族基因理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of MT family genes in rice

Gene name	Numbers of amino acids	Molecular weight (kDa)	pI	GRAVY
<i>MT1.2D</i>	64	6.3	5.1	-2.08
<i>MT1.2A</i>	82	7.8	4.8	-0.10
<i>MT1.3A</i>	105	12.2	11.7	-0.41
<i>MT1.2C</i>	80	7.6	4.6	-0.18
<i>MT1.1B</i>	72	7.1	5.1	-0.14
<i>MT1.2B</i>	90	9.8	8.9	-0.22
<i>MT1.3B</i>	65	6.8	4.9	-0.53
<i>MT2.1A</i>	134	15.3	9.9	-0.37
<i>MT1.1A</i>	60	6.1	5.7	-0.45
<i>MT1.1C</i>	78	7.6	5.6	-0.09
<i>MT1.4B</i>	79	7.7	6.0	-0.00
<i>MT1.4A</i>	107	11.1	7.9	-0.13
<i>MT1.1G</i>	76	7.5	4.8	-0.11
<i>MT1.4C</i>	79	7.7	8.9	-0.23

4 类, 其中水稻、玉米、小麦的 MTs 并未形成独立的物种分支, 而是交叉分布; 其中小麦主要以 II、IV 型为主, 水稻 MTs 均匀地聚类在进化树的各个分支上, 聚类在一起的 OsMTs 和小麦玉米 MTs 蛋白序列有一定差异。有意思的是水稻第 12 条染色体上的 5 个串联的 OsMTs 聚在同一分支上, 提示 *OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*、*OsMT1.4C*、*OsMT1.1C*、*OsMT1.1G* 的功能可能高度保守, 且相互冗余(图 2)。

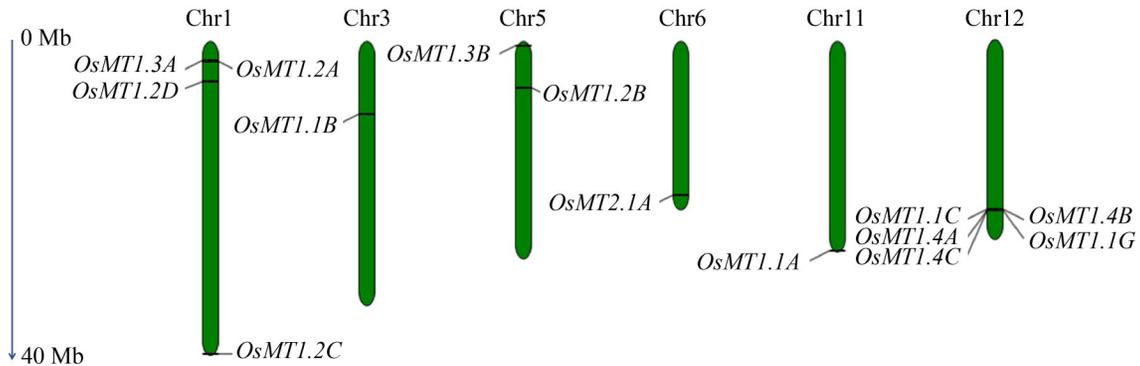


图1 水稻MT家族成员染色体定位 Chr: 染色体。

Figure 1 Chromosome localization of MT family members in rice. Chr: Chromosomes.

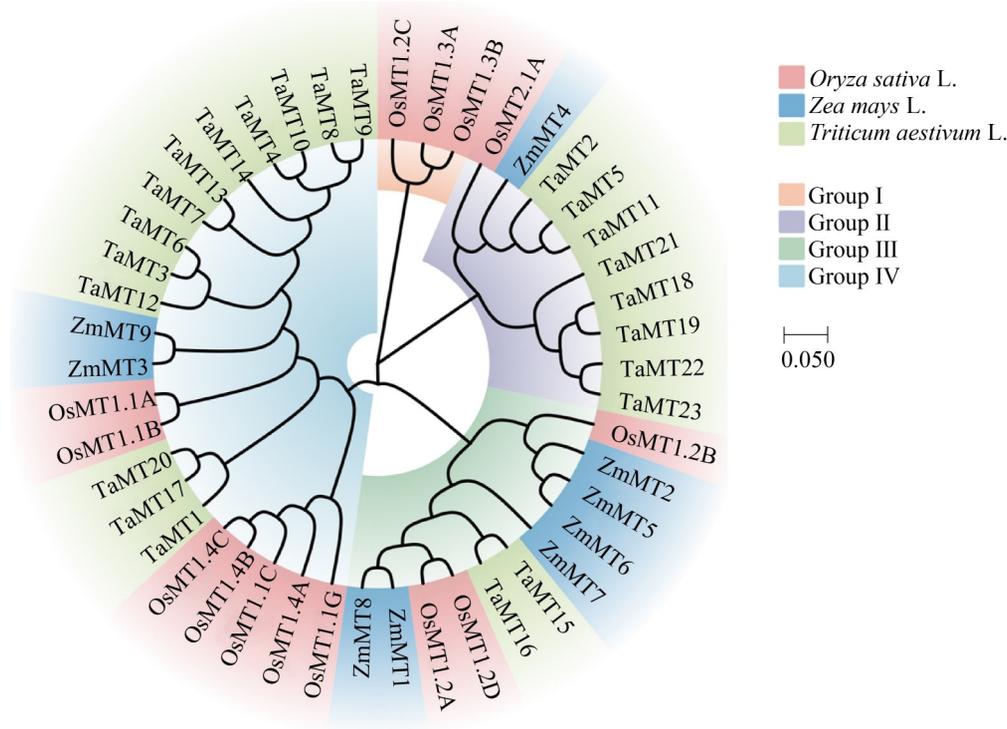


图2 水稻、玉米、小麦MT家族蛋白系统进化分析

Figure 2 Evolutionary analysis of MT family system in rice, corn, and wheat.

2.3 保守基序/域和基因结构分析

基因结构分析表明, *OsMTs* 基因家族外显子数目都不超过 3 个, 所有成员外显子数目均为 2 个或 3 个, 外显子数目非常相近。内含子数量一般都是 1 个或 2 个, 其中 *OsMT1.3A* 并不包含内含子。MT 基因存在 10 种类型的特征基序(motif), 大多数 MT 基因包含其中 4 - 5 种不同的 motifs。其中, *OsMT1.3A*、*OsMT1.3B* 的保守结构数量和类型与其他 MT 基因差异较大, *OsMT1.3A* 只有 2 个 motifs, *OsMT1.3B* 只有 3 个 motifs, *OsMT2.1A* 存在 3 个相同的 motifs, 提示 *OsMT1.3A*、*OsMT1.3B*、*OsMT2.1A* 与其他 MT 基因存在较大差异的功能分化(图 3)。

2.4 启动子调控元件分析

为了鉴定水稻 MT 家族的转录调控的核心作用元件, 本研究利用 PLACE v.30.0 预测了 *OsMTs* 起始密码子上游 2.0 kb 启动子包含的顺

势作用调控元件。结果表明, 水稻 MT 家族基因启动子有超过 30 种类型的顺式作用元件(*cis*-regulatory element, CRE), 启动子序列中激素、光、生长调节、环境胁迫的响应元件显著富集。其中, *MT1.1C* 含有的生长调节元件最多; *OsMT1.1A* 含有的激素响应元件最多; *OsMT1.2B* 的光响应元件最多; 在环境胁迫响应元件中, *OsMT1.1G* 的元件数量显著高于其他 MTs (图 4)。以上结果表明 *OsMTs* 可能广泛参与植物生长、激素调控、光及环境胁迫响应。

2.5 不同激素和镉诱导下水稻 MT 家族基因的转录

激素信号广泛参与植物的生长发育和逆境响应, 金属硫蛋白家族大部分基因的转录被脱落酸、赤霉素、生长素、茉莉酸激素所诱导。其中 *OsMT1.1A*、*OsMT1.4A*、*OsMT1.4C*、*OsMT1.1B* 的表达受 4 种激素的强烈诱导, *OsMT1.4C*、*OsMT1.1G*、*OsMT1.2C* 受脱落酸强

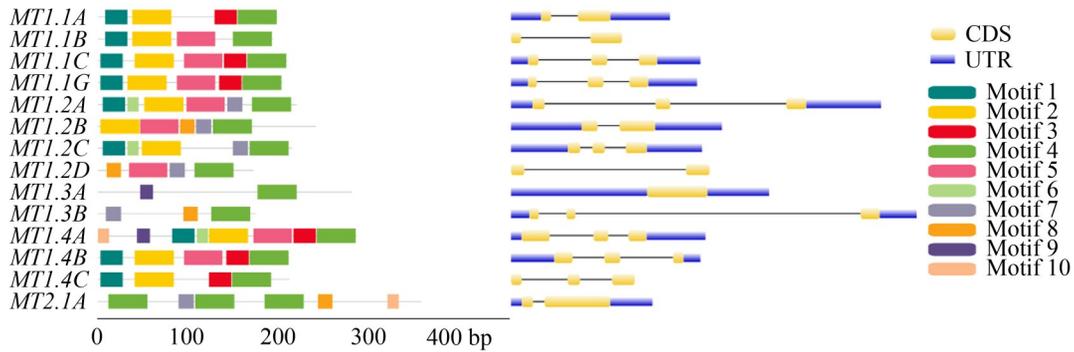


图3 水稻MT基因家族成员保守基序分析 CDS: 编码区序列; UTR: 非翻译区; Motif: 保守基序。

Figure 3 Conservative motif analysis of MT gene family members in rice. CDS: Coding region sequence; UTR: Untranslated region; Motif: Conserved base sequence.

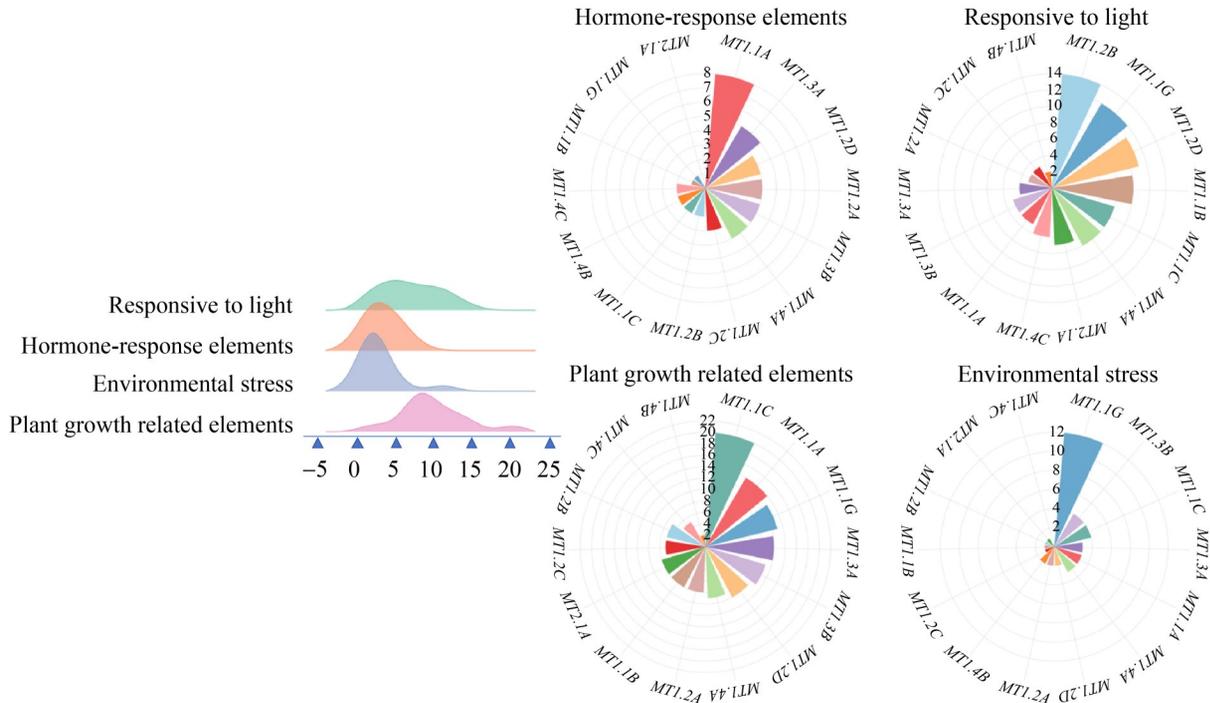


图4 水稻MT家族成员上游顺势元件分析 左侧图为基因家族成员启动子类型的数量分布区间, 右侧圆图为基因家族成员在每种启动子类型数量。

Figure 4 Analysis of upstream homeotropic elements in rice MT family members. The graph on the left shows the distribution intervals of the number of promoter types for gene family members, and the circle graph on the right shows the number of gene family members in each promoter type.

烈诱导; *OsMT1.4B* 除了不响应赤霉素外, 受另外 3 种激素强烈诱导。值得注意的是, 在进化树处于同一分支类型的 *OsMT1.3A*、*OsMT1.3B*

和 *OsMT2.1A* 不受激素的调控, 表达水平也最低。其他家族基因的表达水平受激素信号的调控相对较弱(图 5)。以上结果表明 *OsMT* 家族基

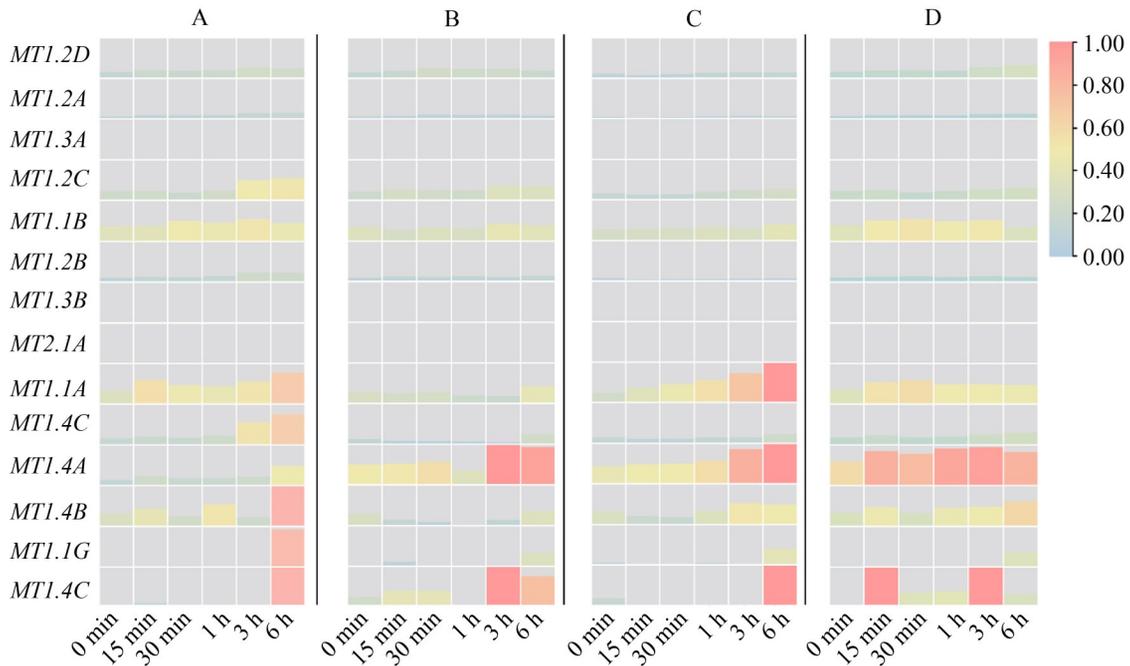


图5 不同激素诱导水稻MT家族成员的差异表达谱热图 A: 脱落酸; B: 赤霉素; C: 生长素; D: 茉莉酸。

Figure 5 Heat map of differential expression profiles of rice MT family members under different hormones. A: Abscisic acid; B: Gibberellin; C: Auxin; D: Jasmonic acid.

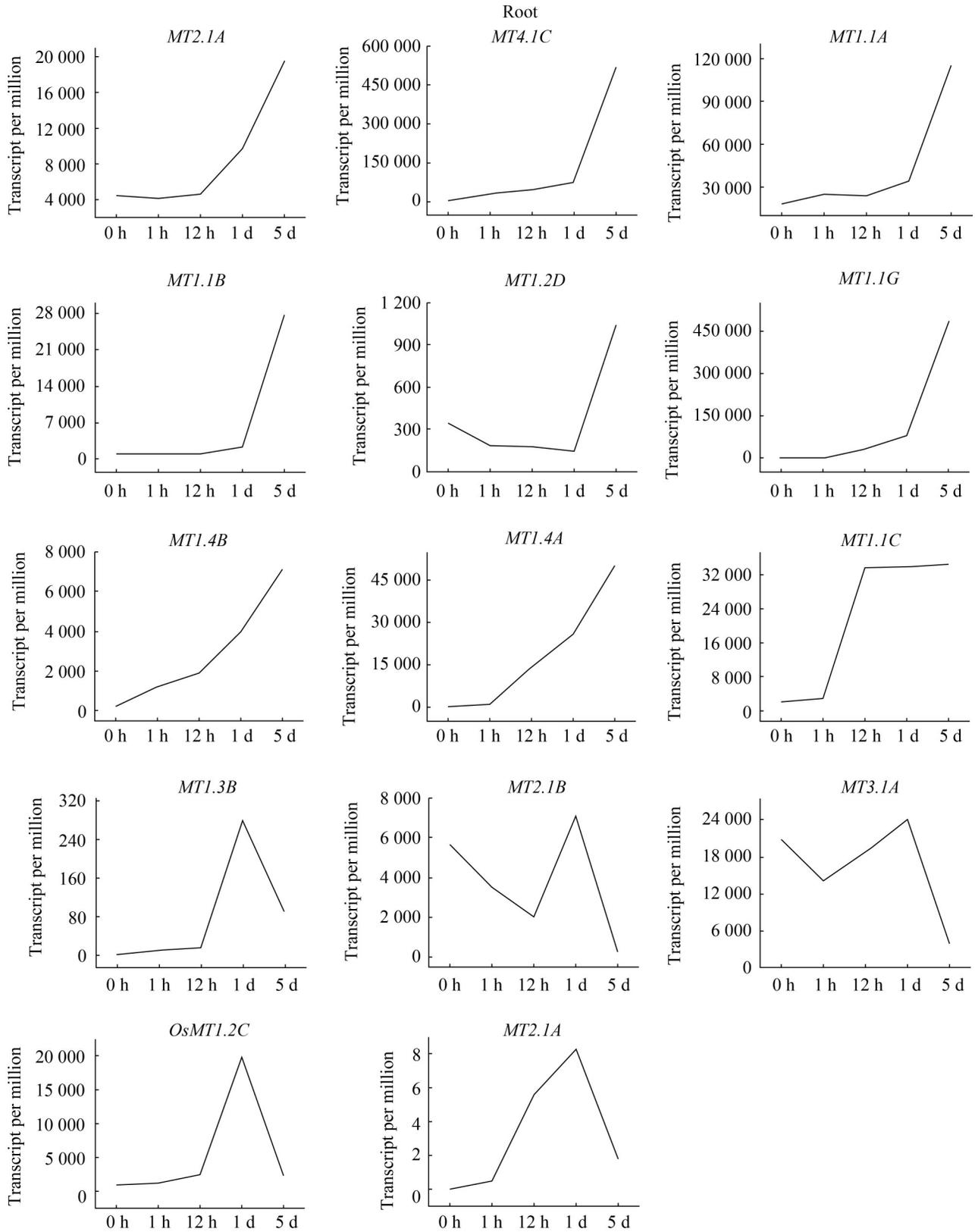
因大部分成员受到激素信号的调控。

大部分 *OsMTs* 家族基因被镉胁迫强烈诱导表达, 诱导倍数达 10 - 100 倍(图 6)。根系中 *OsMT1.4C*、*OsMT1.1G*、*OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*、*OsMT1.1B*、*OsMT1.1A* 均在镉胁迫 1 d 时开始被强烈诱导表达; *OsMT1.1C*、*OsMT2.1A* 在镉胁迫早期(12 h)被强烈诱导上调表达。但 *OsMT1.3A*、*OsMT1.3B*、*OsMT1.2B*、*OsMT1.2C* 的表达均被镉胁迫抑制。地上部与根部趋势一致, *OsMT1.3A*、*OsMT1.3B*、*OsMT1.2B* 的表达被镉胁迫抑制, 其他家族基因均被镉胁迫所诱导上调表达; 其中 *OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*、*OsMT1.1C* 对镉胁迫的响应较快, 镉处理 1 h 后表达量显著上调。此外, *OsMT2.1A* 在根和地上部表达水平较低。以上结果表明大部分 *OsMTs* 基因均被镉不同程度地诱导表达上调, 但是同一亚家族成员 *OsMT1.3A*、*OsMT1.3B* 被镉胁迫抑制, 提示

OsMTs 家族基因在水稻应对镉胁迫中可能发挥不同的作用。

2.6 异源表达 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 对细菌和酵母镉耐受的影响

选择上述被镉胁迫强烈诱导的基因 *OsMT1.4A* 和抑制基因 *OsMT1.3A*, 探究其在镉耐受中的作用。利用 pYES2 和 pET32a 这 2 种表达载体, 在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中实现了 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 基因的表达。在 2 种表达系统中, *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 的表达均显著增强了宿主菌对镉的耐受性, 与空载体对照组相比具有显著差异, 正常培养条件下无差异, 表明异源表达 *OsMT1.3A*、*OsMT1.4A* 提高了大肠杆菌对 Cd 胁迫的耐性(图 7A)。为了进一步验证 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 在真核生物中的作用, 将 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 在镉敏感突变酵母 *ycf1* 中表达。结果表明表达 *OsMT1.3A* 和



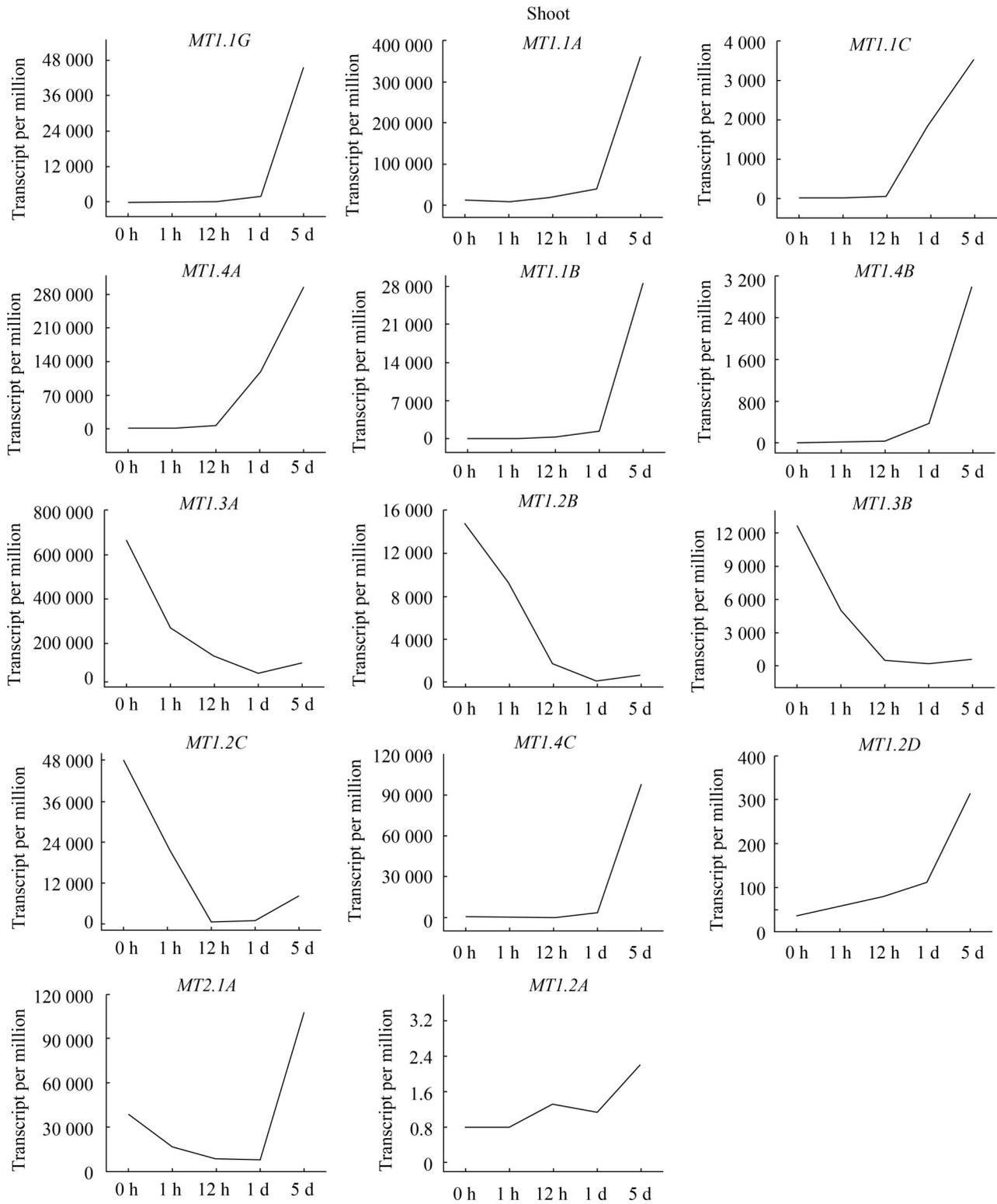


图6 镉胁迫下水稻地上部及地下部MT家族成员的响应模式

Figure 6 Response patterns of MT family members in rice aboveground parts under cadmium stress.

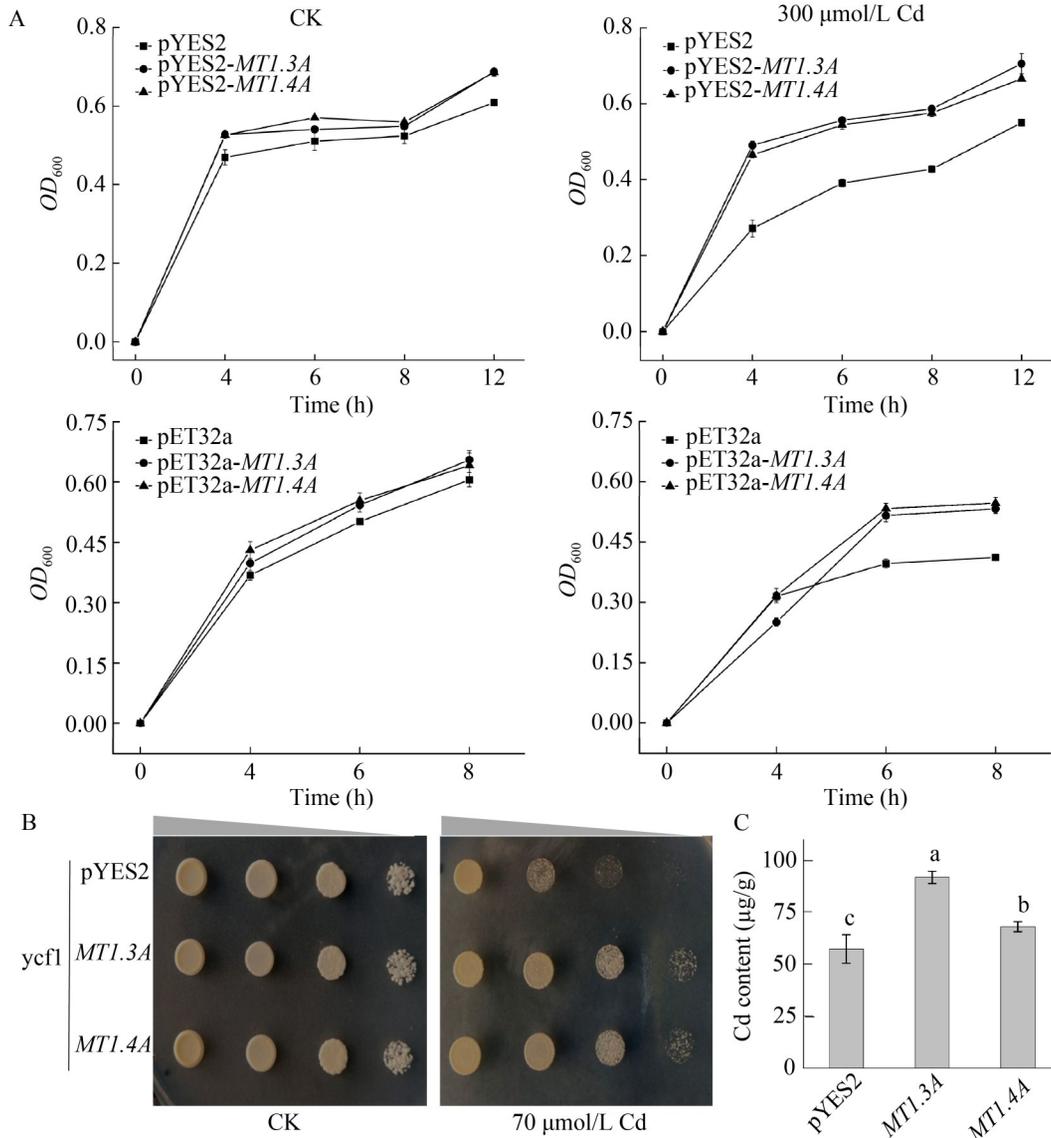


图7 Cd胁迫下异源表达*OsMT1.3A*和*OsMT1.4A*的大肠杆菌生长曲线和酵母生长及镉吸收 A: 大肠杆菌生长折线图; B: 酵母在SD-ura平板上生长3d后的表型; C: 在SD-ura培养基中加入70 μmol/L的镉培养3d后酵母所吸收的镉含量。每组测定设置5次重复, 不同字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

Figure 7 Microbial growth curves of heterologous expression of *OsMT1.3A* and *OsMT1.4A* under Cd stress. A: Discounted growth plot of *Escherichia coli*; B: Yeast phenotype on SD-ura plate after 3 days; C: The cadmium content absorbed by yeast after 3 days of cultivation with 70 μmol/L of cadmium added to SD-ura medium. Each assay contained 5 replicates, with different letters indicating significant differences between treatments ($P<0.05$).

OsMT1.4A 均提高了酵母 *ycf1* 的耐受性, 且表达 *OsMT1.3A* 和 *OsMT1.4A* 的酵母体内的镉含量显著高于空载体对照(图 7B、7C)。以上结果表明整合重金属镉可能是所有 MT 的共同特征, 与

该基因在水稻中是否受镉诱导无关。

2.7 过表达 *OsMT1.4A* 对水稻农艺性状的影响

利用 35S 组成型启动子将 *OsMT1.4A* 在水稻

中过表达, 过表达 *OsMT1.4A* 的水稻相较于野生型品种‘ZH11’植株穗数更多。过表达 *OsMT1.4A* 株系产量整体高于野生型, 其中 2 个株系产量显著高于野生型; 过表达材料与野生型之间在株高方面整体差异不大, 仅有 OE2 的株高显著高于野生型; OE1、OE2、OE3 株系的有效穗数均显著高于野生型, 这可能是 OE-*OsMT1.4A* 的单株产量更高的主要原因(图 8)。

3 讨论

金属硫蛋白(MT)家族在植物应对非生物胁迫中扮演着关键角色, 目前已发现该家族参与植物的生长发育、活性氧(ROS)清除及重金属离子解毒等过程^[21-22]。最近有研究发现, MT 在盐

胁迫下, 对细菌响应并促进甘蓝型油菜的生长^[19]。MT 在水稻中面对新型污染物镓(gallium, Ga)亦表现出显著的耐受性调控功能^[16]。然而, 水稻中 MT 基因家族成员较多, 同一家族的成员在水稻中可能行使冗余、协同或截然不同的生物学功能。本研究鉴定了水稻金属硫蛋白基因家族成员, 并对其进化关系、基因结构、保守基序、染色体定位、顺式作用元件分布、激素响应模式、镉胁迫下的差异表达特性以及功能进行了综合分析。初步探讨了 OsMTs 的基因序列特征和对环境响应的差异, 为深入研究 OsMTs 在水稻生长发育和逆境响应的功能奠定基础。

本研究发现水稻 MTs 基因家族成员在结构

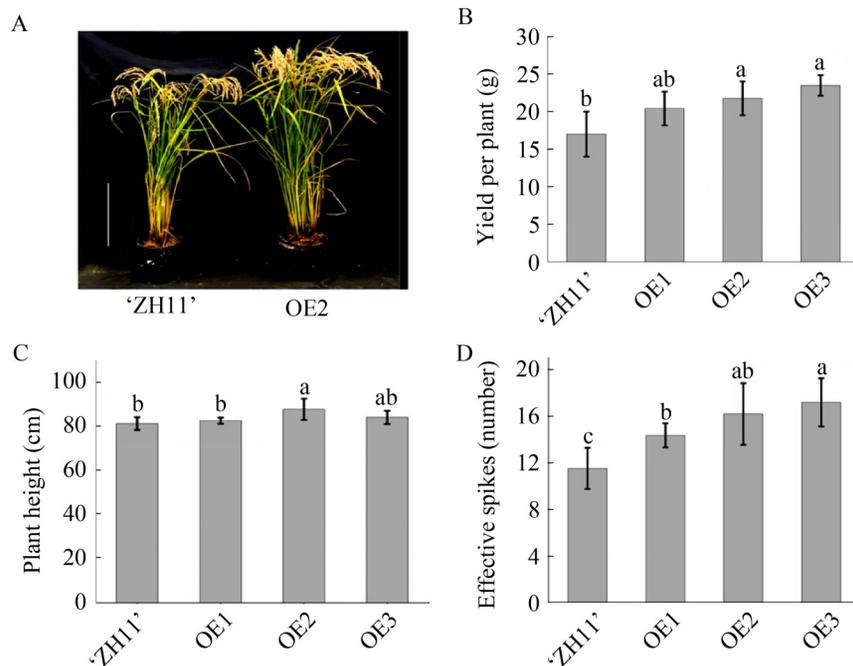


图8 大田中过量表达 *OsMT1.4A* 的水稻农艺性状及表型 A: 水稻 OE2 和‘ZH11’表型图。比例尺=25 cm。B: 单株产量。C: 水稻株高。D: 有效穗数。每组测定设置 6 次重复, 不同字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

Figure 8 Agronomic traits and phenotypes of rice overexpressing *OsMT1.4A* in the field. A: Rice OE2 and ‘ZH11’ phenograms. Scale bar=25 cm. B: Yield per plant. C: Rice plant height. D: Effective number of spikes. Each assay contained 6 replicates, with different letters indicating significant differences between treatments ($P < 0.05$).

和表达调控方面存在显著差异,其位于12号染色体的OsMT基因簇序列高度同源,可能来源于基因复制事件,这些基因对激素和镉胁迫的响应模式类似,可能参与相同的生物学过程且相互冗余。在缺氧条件下水稻根系*OsMT1.1A*、*OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*的表达下调与通气组织的形成有关^[23]。在盐胁迫条件下,*OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*、*OsMT1.4C*表达下调;在干旱胁迫下,*OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*、*OsMT1.4C*的表达在24 h后上调,其中*OsMT1.4C*在8 h表达下调。这些结果清楚表明这些成簇的OsMT基因在非生物胁迫下共调节植物的抗逆性^[15],因此该OsMT基因簇的生物学功能尤其值得关注。启动子元件分析发现MT的启动子区域富集大量顺式作用元件,主要包括激素响应元件、植物生长元件、环境响应元件、光响应元件,分析这些顺式作用元件有助于揭示该基因响应环境胁迫的表达调控机制及其在植物重金属耐受性中的潜在功能。本研究发现*OsMT1.1A*启动子中植物生长调节元件数量比其他OsMTs多,*OsMT1.1A*除了受逆境诱导之外,在正常下苗期和繁殖阶段表现出极高的转录水平,这些结果与目前报道的发育调控基因表达模式一致^[24-26],表明OsMTs可能广泛参与植物生长过程。此外,本研究发现其中一个亚家族成员*OsMT1.3A*和*OsMT1.3B*的表达模式与其他家族基因截然不同,其对激素不响应,且被镉胁迫抑制表达。目前研究发现*OsMT1.3A*在盐耐受及抗氧化胁迫中起到了一定作用^[27],但*OsMT1.3B*在水稻中的功能尚不明确,表明*OsMT1.3A*和*OsMT1.3B*在水稻中的生物学功能可能与其他家族基因存在差异。

植物MT含有45-87个氨基酸残基^[28],其中半胱氨酸(Cys)残基的数量介于10-17个之间。这些蛋白含有1个富含半胱氨酸的结构域,其典型特征为Cys-X-Cys。2个富含半胱氨酸的结构域之间通常由一段较长的可变序列所隔开,而这段间隔区的具体功能目前尚不明确^[8]。有研

究推测,这段间隔区可能与蛋白质的稳定性或定位有关,或者可能参与蛋白质折叠,形成稳定的“金属-MT”复合物^[29]。目前已有研究表明MTs是关键的重金属解毒分子,在景天中,*SpMTL*通过在胞质螯合镉来降低镉毒害,敲除之后显著降低了景天在镉胁迫下的生物量^[12]。上述研究结果及本研究的结果均说明OsMTs能够参与细胞内镉螯合解毒。本研究发现异源表达*OsMT1.3A*和*OsMT1.4A*提高了大肠杆菌和*ycf1*酵母菌株的镉耐受性,且表达*OsMT1.3A*和*OsMT1.4A*的酵母菌株的镉含量显著高于空载体对照,需要注意的是,即使*OsMT1.3A*蛋白在异源表达中可与镉螯合,但是*OsMT1.3A*在水稻中的表达被镉强烈抑制,说明*OsMT1.3A*可能主要参与水稻其他的生物学过程。本研究发现过表达*OsMT1.4A*能够通过提高水稻有效穗数进而增加产量,说明*OsMT1.4A*参与水稻生长发育调控。

4 结论

本研究鉴定出14个亲水性小分子蛋白OsMTs家族成员,成员之间蛋白分子质量、等电点差异较大,可分为4类亚家族,其中*OsMT1.4A*、*OsMT1.4B*、*OsMT1.4C*、*OsMT1.1C*、*OsMT1.1G*同源性较高,属于同一亚家族,且串联分布在第12条染色体上。OsMTs基因上游启动子区域富集大量顺式作用元件,广泛受激素及重金属镉调控。但是,*OsMT1.3A*、*OsMT1.3B*的保守结构数量和类型与其他OsMTs差异较大,表达模式与其他家族基因截然不同,对激素不响应,且被镉胁迫抑制表达。异源表达镉胁迫强烈诱导基因*OsMT1.4A*和抑制基因*OsMT1.3A*均提高细菌和酵母的镉耐受性。过表达*OsMT1.4A*显著提高了水稻有效穗数和产量,但*OsMT1.3A*、*OsMT1.4A*的具体作用机理仍待进一步研究。

作者贡献声明

苗渝青:方案设计、实验操作、数据处理、初稿

写作; 张超、翟雨航、张文祺、金锐: 实验操作; 韩子静: 提供材料、实验操作; 张振华: 提供经费、监督指导; 陈海飞: 提供经费、监督指导、稿件修改润色、方案设计。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 张星雨, 叶志彪, 张余洋. 植物响应镉胁迫的生理与分子机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2021, 57(7): 1437-1450.
ZHANG XY, YE ZB, ZHANG YY. Advances in physiological and molecular mechanism of plant response to cadmium stress[J]. Plant Physiology Journal, 2021, 57(7): 1437-1450 (in Chinese).
- [2] PAN Y, ZHU MC, WANG SX, MA GQ, HUANG XH, QIAO CL, WANG R, XU XF, LIANG Y, LU K, LI JN, QU CM. Genome-wide characterization and analysis of metallothionein family genes that function in metal stress tolerance in *Brassica napus* L.[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(8): 2181.
- [3] HALL JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53(366): 1-11.
- [4] LV YY, DENG XP, QUAN LT, XIA Y, SHEN ZG. Metallothioneins BcMT1 and BcMT2 from *Brassica campestris* enhance tolerance to cadmium and copper and decrease production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant and Soil, 2013, 367(1): 507-519.
- [5] ZIMERI AM, DHANKHER OP, McCAIG B, MEAGHER RB. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation[J]. Plant Molecular Biology, 2005, 58(6): 839-855.
- [6] JANSSENS TKS, ROELOFS D, van STRAALLEN NM. Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates[J]. Insect Science, 2009, 16(1): 3-18.
- [7] BHARGAVA A, CARMONA FF, BHARGAVA M, SRIVASTAVA S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 105: 103-120.
- [8] COBBETT C, GOLDSBROUGH P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 159-182.
- [9] REN YJ, LIU Y, CHEN HY, LI G, ZHANG XL, ZHAO J. 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 & Environment, 2012, 35(4): 770-789.
- [10] AN ZG, LI CJ, ZU YG, DU YJ, WACHTER A, GROMES R, RAUSCH T. Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(14): 3575-3582.
- [11] YANG MX, ZHANG F, WANG F, DONG ZG, CAO QF, CHEN MC. Characterization of a type 1 metallothionein gene from the stresses-tolerant plant *Ziziphus jujuba*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(8): 16750-16762.
- [12] PENG JS, DING G, MENG S, YI HY, GONG JM. Enhanced metal tolerance correlates with heterotypic variation in SpMTL, a metallothionein-like protein from the hyperaccumulator *Sedum plumbizincicola*[J]. Plant, Cell & Environment, 2017, 40(8): 1368-1378.
- [13] Van HOOFF NALM, HASSINEN VH, HAKVOORT HWJ, BALLINTIEN KE, SCHAT H, VERKLEIJ JAC, ERNST WHO, KARENlampi SO, TERVAHAUTA AI. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (moench) garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene[J]. Plant Physiology, 2001, 126(4): 1519-1526.
- [14] 唐伟. OsMT 基因耐受重金属特性的初步研究[D]. 广州: 广州大学, 2017.
TANG W. Study on OsMT gene resistance characteristics of heavy metals[D]. Guangzhou: Guangzhou University, 2017 (in Chinese).
- [15] KUMAR G, KUSHWAHA HR, PANJABI-SABHARWAL V, KUMARI S, JOSHI R, KARAN R, MITTAL S, PAREEK SL, PAREEK A. Clustered metallothionein genes are co-regulated in rice and ectopic expression of *OsMT1e-P* confers multiple abiotic stress tolerance in tobacco via ROS scavenging[J]. BMC Plant Biology, 2012, 12: 107.
- [16] LU JF, ZHAN H, KANG Y, TIAN P, YU XZ. Phytochelatin- and metallothionein-mediated detoxification of gallium in rice seedlings[J]. Environmental Technology & Innovation, 2025, 37: 103989.
- [17] CHENG MX, YUAN HR, WANG RH, ZOU JN, LIANG T, YANG F, LI SQ. Genome-wide identification and analysis of the metallothionein genes in *Oryza* genus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(17): 9651.
- [18] NAVABPOUR S, MORRIS K, ALLEN R, HARRISON E, A-H-MACKERNES S, BUCHANAN-WOLLASTON V. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(391): 2285-2292.
- [19] MIEREK-ADAMSKA A, TYLMAN-MOJŻESZEK W, PAWEŁEK A, KULASEK M, DĄBROWSKA GB. The potential role of *Brassica napus* metallothioneins in salt stress and interactions with plant growth-promoting bacteria[J]. Genes, 2025, 16(2): 166.
- [20] ZHOU GK, XU YF, LIU JY. Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors[J]. Journal of

- Plant Physiology, 2005, 162(6): 686-696.
- [21] LESZCZYSZYN OI, IMAM HT, BLINDAUER CA. Diversity and distribution of plant metallothioneins: a review of structure, properties and functions[J]. Metallomics, 2013, 5(9): 1146-1169.
- [22] YANG JL, CHEN Z, WU SQ, CUI Y, ZHANG L, DONG H, YANG CP, LI CH. Overexpression of the *Tamarix hispida* *ThMT3* gene increases copper tolerance and adventitious root induction in *Salix matsudana* Koidz. [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2015, 121(2): 469-479.
- [23] YAMAUCHI T, FUKAZAWA A, NAKAZONO M. METALLOTHIONEIN genes encoding ROS scavenging enzymes are down-regulated in the root cortex during inducible aerenchyma formation in rice[J]. Plant Signaling & Behavior, 2017, 12(11): e1388976.
- [24] COOPER B, CLARKE JD, BUDWORTH P, KREPS J, HUTCHISON D, PARK S, GUIMIL S, DUNN M, LUGINBÜHL P, ELLERO C, GOFF SA, GLAZEBROOK J. A network of rice genes associated with stress response and seed development[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(8): 4945-4950.
- [25] HRUZ T, LAULE O, SZABO G, WESSENDORP F, BLEULER S, OERTLE L, WIDMAYER P, GRUISSEM W, ZIMMERMANN P. Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes[J]. Advances in Bioinformatics, 2008, 2008(1): 420747.
- [26] LEI GJ, YAMAJI N, MA JF. Two metallothionein genes highly expressed in rice nodes are involved in distribution of Zn to the grain[J]. New Phytologist, 2021, 229(2): 1007-1020.
- [27] MEKAWY AMM, ASSAHA DVM, UEDA A. Constitutive overexpression of rice metallothionein-like gene *OsMT-3a* enhances growth and tolerance of *Arabidopsis* plants to a combination of various abiotic stresses[J]. Journal of Plant Research, 2020, 133(3): 429-440.
- [28] HASSINEN VH, TERVAHAUTA AI, SCHAT H, KÄRENLAMPI SO. Plant metallothioneins-metal chelators with ROS scavenging activity [J]. Plant Biology, 2011, 13(2): 225-232.
- [29] KIM YO, KANG H. Comparative expression analysis of genes encoding metallothioneins in response to heavy metals and abiotic stresses in rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis thaliana*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2018, 82(9): 1656-1665.