

咖啡 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因 *CaSAMS3* 的克隆及表达模式分析

王曦奥^{1,2,3,4,5}, 廖振阳^{1,2,3,4,5,6}, 安娜^{1,2,3,4,5}, 胡丽松^{1,2,3,4,5,6}, 黄丽芳^{1,2,3,4,5},
赵新传⁷, 熊文艳^{1,2,3,4,5}, 庞永青^{1,2,3,4,5}, 王韞韬^{1,4,5}, 王晓阳^{1,2,3,4,5}, SANCHEZ
William Solano^{3,8}, 闫林^{1,2,3,4,5*}

1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 2. 咖啡海南省工程研究中心, 海南万宁 571533; 3. 热带香料饮料国际联合研究中心, 海南万宁 571533; 4. 农业部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 海南万宁 571533; 5. 海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室, 海南万宁 571533; 6. 热带作物生物育种全国重点实验室, 海南三亚 572024; 7. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665000; 8. 热带农业研究与高等教育中心, 哥斯达黎加图里亚尔巴 30501

摘要: S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (S-adenosylmethionine synthase, SAMS) 是催化 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 合成的关键酶, 广泛参与植物的表观遗传调控、氧化胁迫及生长发育等多项生物学过程。本研究克隆咖啡 *CaSAMS3* 基因的全长 cDNA 序列, 对其编码蛋白进行理化性质、蛋白结构、保守结构域和进化特征分析, 通过顺式作用元件分析和蛋白互作网络预测, 探讨 *CaSAMS3* 参与的代谢过程, 并结合 qRT-PCR 与亚细胞定位分析其表达模式。结果表明: *CaSAMS3* 的开放阅读框长 1173 bp, 编码一个亲水性蛋白 (分子量为 42.57 kDa, 等电点为 6.07), 其二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主, 定位于细胞膜和细胞核; 该蛋白具有典型 SAMS 保守结构域, 与猕猴桃 SAMS 同源性最高; 其启动子涉及光、激素、胁迫及生长发育相关响应元件, 包含 MYB 和 MYC 结合位点; *CaSAMS3* 存在组织特异性表达, 且在发育阶段的表达趋势与咖啡因积累一致。本研究结果为解析 *CaSAMS3* 在咖啡因合成调控中的生物学功能提供重要理论依据, 也为咖啡品质与抗性改良提供潜在靶点。

关键词: 咖啡; 咖啡因; S-腺苷甲硫氨酸合成酶; 基因克隆; 表达模式

中图分类号: S571.2 文献标志码: A

Molecular Cloning and Expression Pattern Analysis of S-adenosylmethionine Synthase Gene *CaSAMS3* in Coffee

WANG Xi'ao^{1,2,3,4,5}, LIAO Zhenyang^{1,2,3,4,5,6}, AN Na^{1,2,3,4,5}, HU Lisong^{1,2,3,4,5,6}, HUANG Lifang^{1,2,3,4,5},
ZHAO Xinchuan⁷, XIONG Wenyan^{1,2,3,4,5}, PANG Yongqing^{1,2,3,4,5}, WANG Yunlei^{1,4,5}, WANG Xiaoyang^{1,2,3,4,5},
SANCHEZ William Solano^{3,8}, YAN Lin^{1,2,3,4,5*}

1. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 2. Coffee Hainan Engineering Research Center, Wanning, Hainan 571533, China; 3. International Joint Research Center for Tropical Spice and Beverage, Wanning, Hainan 571533, China; 4. Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture & Rural Affairs, Wanning, Hainan 571533, China; 5. Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning, Hainan 571533, China; 6. National Key Laboratory of Tropical Crop Biological Breeding, Sanya, Hainan 572024, China; 7. College of Tropical Crops, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665000, China; 8. Center for Tropical Agricultural Research and Higher Education, Turrialba 30501, Costa Rica

收稿日期 2025-11-03; 接受日期 2025-11-18

基金项目 国家现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-11); 海南省自然科学基金青年基金项目 (No. 324QN309)。

作者简介 王曦奥 (1994—), 女, 博士研究生, 研究方向: 咖啡种质资源与遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 闫林 (YAN Lin), E-mail: yanlin2575@163.com。

Abstract: S-adenosylmethionine synthase (SAMS) is a key enzyme catalyzing the synthesis of S-adenosylmethionine (SAM, S-adenosylmethionine), widely involved in various biological processes in plants, such as epigenetic regulation, oxidative stress, and growth and development. In this study, the full-length cDNA sequence of *CaSAMS3* was successfully cloned from coffee, and the physicochemical properties, protein structure, conserved domains, and evolutionary characteristics of the encoded *CaSAMS3* protein were analyzed. Through cis-acting element analysis and protein interaction network prediction, and the metabolic processes involving *CaSAMS3* were explored, and its expression pattern was analyzed in combination with qPCR and subcellular localization studies. The results showed that the open reading frame length of *CaSAMS3* was 1173 bp, encoding a hydrophilic protein (molecular weight 42.57 kDa, theoretical isoelectric point 6.07), with a secondary structure mainly composed of α -helices and irregular curls, and located on cell membrane and nucleus. The protein contained a typical SAMS conserved domain and had the highest homology with SAMS in kiwifruit. Its promoter contained response elements related to light, hormones, stress, and growth and development, including MYB and MYC binding sites. *CaSAMS3* exhibited tissue-specific expression, and its expression trend during developmental stages was consistent with accumulation pattern of caffeine. This study would provide an important theoretical basis for elucidating the biological function of *CaSAMS3* in the regulation of caffeine synthesis, and provides a potential target for improving coffee quality and resistance.

Keywords: coffee; caffeine; S-adenosylmethionine synthase; gene cloning; expression pattern

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.02.003

咖啡 (*Coffea* spp.) 作为世界三大饮料植物之首, 以其复杂的风味、丰富的口感和独特的功效广受喜爱。咖啡因是咖啡中的主要生物活性成分, 也是构成咖啡苦涩风味的关键因素之一。其生物合成过程包含 3 步甲基化反应^[1], 涉及多种甲基转移酶, 包括 7-甲基黄嘌呤核苷合成酶 (xanthosine methyltransferase, XMT)、3,7-二甲基黄嘌呤甲基转移酶 (3,7-dimethylxanthine methyltransferase, DMXT) 和可可碱合酶 (7-methylxanthine methyltransferase, MXMT)^[2]等关键酶。S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 作为咖啡因生物合成过程中的唯一甲基供体^[3], 直接调控咖啡因的生物合成速率与最终积累水平。

S-腺苷甲硫氨酸合成酶 (S-adenosylmethionine synthase, SAMS), 亦称甲硫氨酸腺苷转移酶 (Methionine adenosyltransferase, MAT)^[4], 是催化 ATP 与甲硫氨酸合成 SAM 的关键酶, 广泛存在于动物^[5-6]、植物^[7-9]及微生物^[10-11]体内。SAMS 隶属于 PLN02243 超家族, 包含 3 个典型的保守结构域^[12], 包括 N 端活性域 (S-AdoMet-synt-N, PFam00438)、中央活性域 (S-AdoMet-synt-M, PFam02772) 和 C 端功能域 (SAdoMet-synt-C, PFam02773)^[13]。目前, SAMS 基因已在棉花^[14-15]、茶树^[16]、小麦^[17]、大麦^[18]、太阳花^[19]、西瓜^[13]等多种植物中被鉴定和克隆。研究表明, SAMS 参与表观遗传调控^[20-22]、抗氧化防御^[8, 23-24]及生长发育^[21, 25]等关键生物学过程。例如, 番茄 *SISAMS1* 通过调控昼夜节律相关基因 *SIG1* 的 CHG 甲基化, 增强耐盐性^[20]; 拟南

芥 *AtSAMS* 介导的 DNA 甲基化与乙烯信号, 调控花器官的发育^[21]; 茶树中鉴定出 4 个 *CsSAMS* 成员, 其中 AJ277206 被证实参与咖啡因生物合成过程中的甲基化修饰^[16]。进一步研究显示, 咖啡因可抑制真菌菌丝生长, 而茶树 SAMS 基因启动子中含有丰富的胁迫响应元件, 这可能是导致茶树炭疽病抗性差异的主要原因^[16, 26]。

目前咖啡中 SAMS 基因的鉴定与功能研究仍较为有限, 其编码蛋白基础理化性质及表达模式尚不明确。为此, 本研究对前期已鉴定的咖啡因合成相关基因 *CaSAMS3* 进行克隆, 通过生物信息学方法系统分析其编码蛋白的基础理化性质、蛋白结构、保守结构域、系统进化关系及调控网络, 并通过亚细胞定位和 qRT-PCR 技术初步分析该基因的表达模式。研究结果为揭示 *CaSAMS3* 在咖啡因生物合成调控中的生物学功能提供重要依据, 对咖啡品质改良具有参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本研究以咖啡种质资源 101 和 125 为试材, 采自中国热带农业科学院香料饮料研究所咖啡种质资源保存与试验示范基地。分别采集小果、中果、大果、转色果和熟果等 5 个不同生长发育阶段的咖啡果实, 去除外果皮后经液氮速冻, 保存至超低温冰箱 (海尔生物医疗股份有限公司, 山东青岛), 用于 *CaSAMS3* 基因的克隆和时空表达模式分析。另采集咖啡的叶、花、根、枝条及熟果样品, 用于组织特异性表达分析。

亚细胞定位分析所用烟草为本实验室保存的野生型品种。

1.1.2 菌株及载体 亚细胞定位分析所用载体为本实验室保存的 pCambia1302, 采用 GV3101 (pSoup-p19) 农杆菌菌株 (上海唯地生物技术有限公司, 上海) 转化烟草。

1.1.3 引物设计与合成 利用 Primer 3 Plus(<https://www.primer3plus.com>) 引物设计在线软件设计 CaSAMS3 基因全长克隆及 qRT-PCR 的引物, 并利用 NCBI primer blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) 在线工具分析引物的特异性, 内参引物序列参考 FERNANDES-BRUM 等^[27]。本研究所用引物均委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	用途 Function
CaSAM3-F	ATGGATACCTTCCTCTTCACC	Gene cloning
CaSAM3-R	TCAAGCTTTGGGCTTGAGAATC	
qSAMS3-F	TGCAGGTTTCTATGCCATTGG	Real-time PCR
qSAMS3-R	AGTCTCCCAAGAGAAATCAGG	
UBQ-F	AATCCGTCGCCGCATGTT	
UBQ-R	CCAGTGCATCCTGTTGTCTCA	

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 第一链合成 按照 Plant RNA Kit R6827 植物 RNA 提取试剂盒 (Omega Bio-tek, 美国) 的产品说明书提取咖啡种质资源 101 和 125 不同发育阶段种子的总 RNA, 经浓度测定和琼脂糖检测后置于超低温冰箱中保存。取 500 ng 总 RNA 样品作为模板, 使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, 美国) 合成 cDNA 第一链, 经浓度测定后置于-20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 基因克隆 取咖啡种质资源 125 小果期种子的 cDNA 样品为模板, 根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov#!/landingpage>) 数据库中 CaSAMS3 (LOC113694912) 的 CDS 序列设计引物 (表 1), 采用 PrimeSTAR® GXL Premix 预混型高保真 PCR 酶 (宝日医生物技术有限公司, 北京) 进行扩增, 反应程序和体系参照产品说明书。PCR 产物经浓度 1% 的琼脂糖凝胶电泳 (150V, 18 min) 检测后切取目的条带, 回收纯化 (Omega Bio-tek,

美国) 并委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。经序列比对验证正确的样品, 置于-20 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 生物信息学分析 根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov#!/landingpage>) 数据库中 CaSAMS3 (XP_027069629) 的氨基酸序列, 分析其理化性质、蛋白结构、保守结构域、跨膜结构、亚细胞定位及蛋白互作情况。基于基因注释信息进行基因结构分析, 提取其上游 2000 bp 序列用于顺式作用元件分析。通过 Uniprot (<https://www.uniprot.org/blast>) 在线软件获取 CaSAMS3 同源序列, 并进行多序列比对与系统进化树分析, 相关分析软件及网址详见表 2。

1.2.4 亚细胞定位分析 将克隆的 CaSAMS3 基因 CDS 序列经 Bgl II 和 Spe I 酶切后连接至 pCambia1302 表达载体, 载体构建委托北京擎科生物科技有限公司完成。将重组载体转入 GV3101 农杆菌感受态细胞中, 采用注射法侵染生长约 40 d 左右的烟草表皮细胞, 操作方法参照王曦奥^[41]的研究, 暗培养 3 d 后拍照观察。

1.2.5 表达模式分析 以咖啡种质资源 101 和 125 不同发育时期果实及 101 的叶、花、根、枝条、熟果的 cDNA 作为模板, 以 CaUBQ 为内参基因, 采用 2×Q1 SYBR qPCR Master Mix (吐露港生物科技有限公司, 上海) 在 QuantStudio™ 6 Flex 荧光定量 PCR 仪 (Life technologies, 美国) 上分析 CaSAMS3 在品种间不同发育阶段的表达规律及组织特异性, 每个反应设 3 次重复。

1.3 数据处理

采用 2^{-ΔΔCt} 法处理 CaSAMS3 的表达量数据, 使用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行统计分析, 采用 Tukey 事后检验法 (P<0.05) 进行差异显著性分析, 并用字母法标记; 利用 GraphPad Prism 6 软件制图。

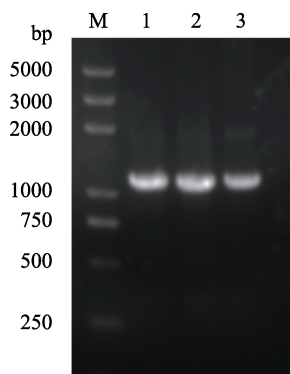
2 结果与分析

2.1 CaSAMS3 基因克隆

CaSAMS3 基因的全长 CDS 为 1173 bp, 以高咖啡因种质 125 小果期的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 1173 bp 处扩增到 1 条特异性条带 (图 1), 测序结果显示所得序列与参考基因组保持一致, 表明该基因被成功克隆。

表 2 生物信息学分析软件信息
Tab. 2 Software information of bioinformatic analysis

软件 Software	网址 URL	功能 Function
EXPASY PROTOPARAM ^[28]	https://pfam.xfam.org/search	等电点、分子量、不稳定性指数、脂肪族指数和亲疏水性
ProtScale	https://web.expasy.org/protscale	亲疏水性
SOPMA ^[29]	https://npsa.lyon.inserm.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html	二级结构
SWISS-MODEL ^[30]	https://swissmodel.expasy.org	三级结构
NetPhos-3.1	https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1	磷酸化位点
CD-Search ^[31]	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi	保守结构域
SignalP 6.0 ^[32]	https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0	信号肽
TMHMM 2.0 ^[33]	https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0	跨膜结构
WOLF PSORT ^[34]	https://wolfsort.hgc.jp	亚细胞定位
BUSCA	https://busca.biocomp.unibo.it/bacello	
Plant-mPLoc ^[35]	http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi	
DNAMAN		序列比对
MEGA X ^[36]		系统进化树
TBtools II ^[37]		基因结构
PlantCARE ^[38]	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html	顺式作用元件
psRNATarget ^[39]	http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis?function=2	miRNA 靶位点
String ^[40]	https://string-db.org/cgi/input.pl?sessionId=22GAbU7jCtt&input_page_active_form=multiple_sequences	蛋白互作



M: DL 5000 DNA marker; 1~3: *CaSAMS3* 的扩增产物。
M: DL 5000 DNA marker; 1~3: PCR product of *CaSAMS3*.

图 1 *CaSAMS3* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of *CaSAMS3* gene

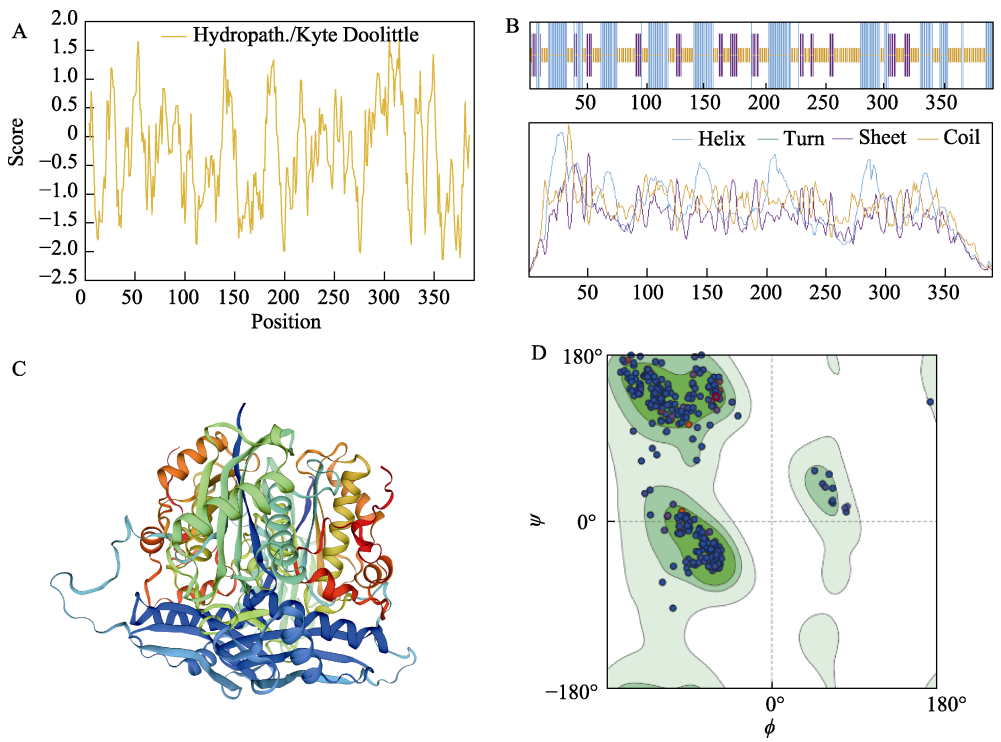
2.2 *CaSAMS3* 蛋白结构及理化性质分析

Expasy 在线软件分析结果显示，咖啡 *CaSAMS3* 蛋白的分子式为 $C_{1884}H_{2986}N_{518}O_{575}S_{15}$ ，原子数为 5978，分子量为 42.57 kDa，等电点为 6.07；不稳定指数为 23.86，脂肪族指数为 82.23，表明该蛋白较为稳定；总平均亲水性为 -0.299，最低点为 -2.111，最高点为 1.656（图 2A），推测该蛋白为亲水性蛋白。二级结构以 α -螺旋（36.67%）和无规则卷曲（47.95%）为主，延伸链（15.38%）次之，无 β -折叠（图 2B）。三级结

构（图 2C）预测 GMQE 值为 0.96，QMEAND 值为 0.90 ± 0.05 ，一致性为 88.66%，结合拉曼图结果（图 2D），证明该模型准确度较高。

咖啡 *CaSAMS3* 蛋白含有 35 个磷酸化位点，包括 17 个苏氨酸、14 个丝氨酸和 4 个酪氨酸磷酸化位点（图 3A）。CD-Search 软件分析结果显示，其 1~386 位氨基酸处存在 1 个 S-adenosylmethionine synthase 保守结构域（Accession: PLN02243）（图 3B），包含该家族的 3 段特征序列 GHPDK、GAGDQGHMFGY 和 GGGAFSGKD。SignalP 6.0 软件分析结果表明，*CaSAMS3* 蛋白不存在信号肽，为非分泌蛋白（图 3C）。跨膜结构与亚细胞定位预测显示其为非跨膜蛋白（图 3D），可能定位于细胞质和叶绿体中。

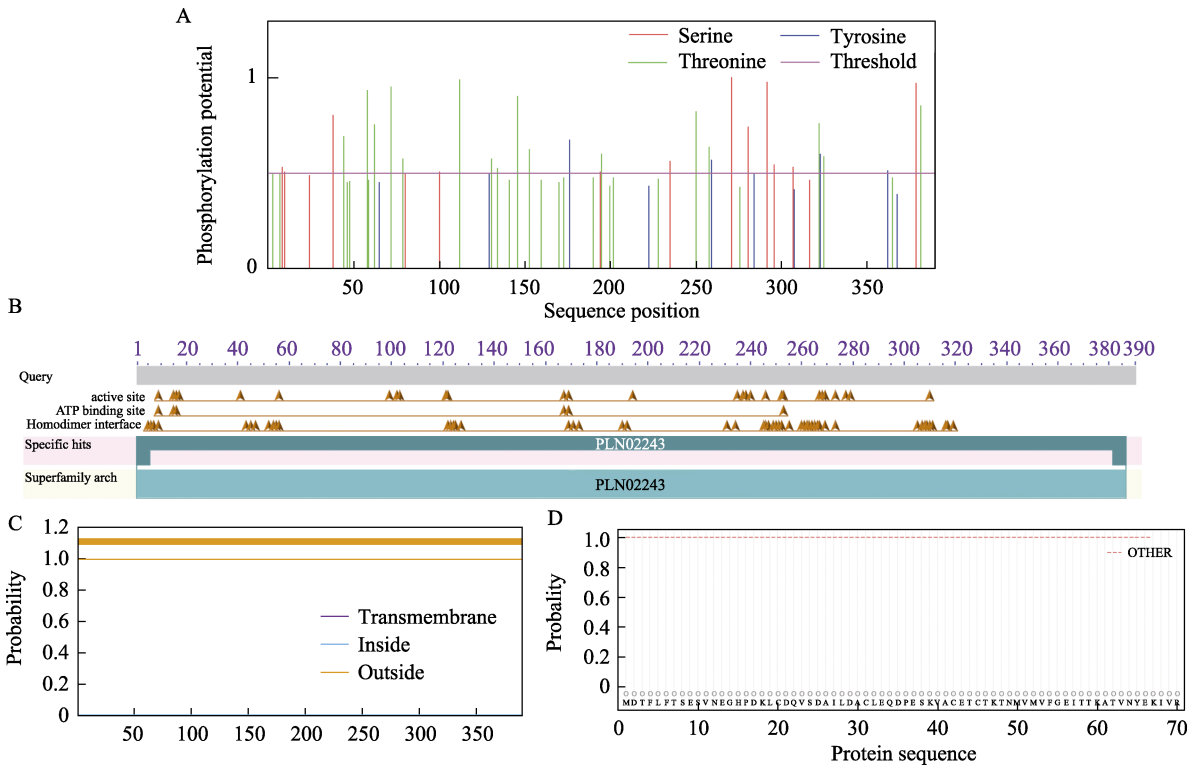
序列比对结果表明，咖啡 *CaSAMS3* 氨基酸序列与拟南芥 *AtSAMS2*、烟草 *NaSAMS1*、可可 *TcSAMS1*、陆地棉 *GmSAMS1*、黄瓜 *CsSAMS1*、大豆 *GsSAMS1* 和茶 *CsSAMS1* 的氨基酸序列相似度达到 95.26%，说明咖啡 *CaSAMS3* 与其他 *SAMS* 蛋白的同源性较高（图 4A）。咖啡与其他 30 个物种 *SAMS* 蛋白的系统进化树分析结果显示，咖啡 *SAMS3* 蛋白与猕猴桃 *SAMS* 蛋白亲缘关系最近（图 4B）。



A: 蛋白的亲水性预测; B: 二级结构预测; C: 三级结构预测; D: 三级结构预测拉曼图。
A: Protein hydrophilicity prediction; B: Secondary structure prediction; C: Tertiary structure prediction; D: Raman spectra for tertiary structure prediction.

图 2 CaSAMS3 蛋白的亲水性和结构预测

Fig. 2 Hydrophilicity and structural prediction of CaSAMS3

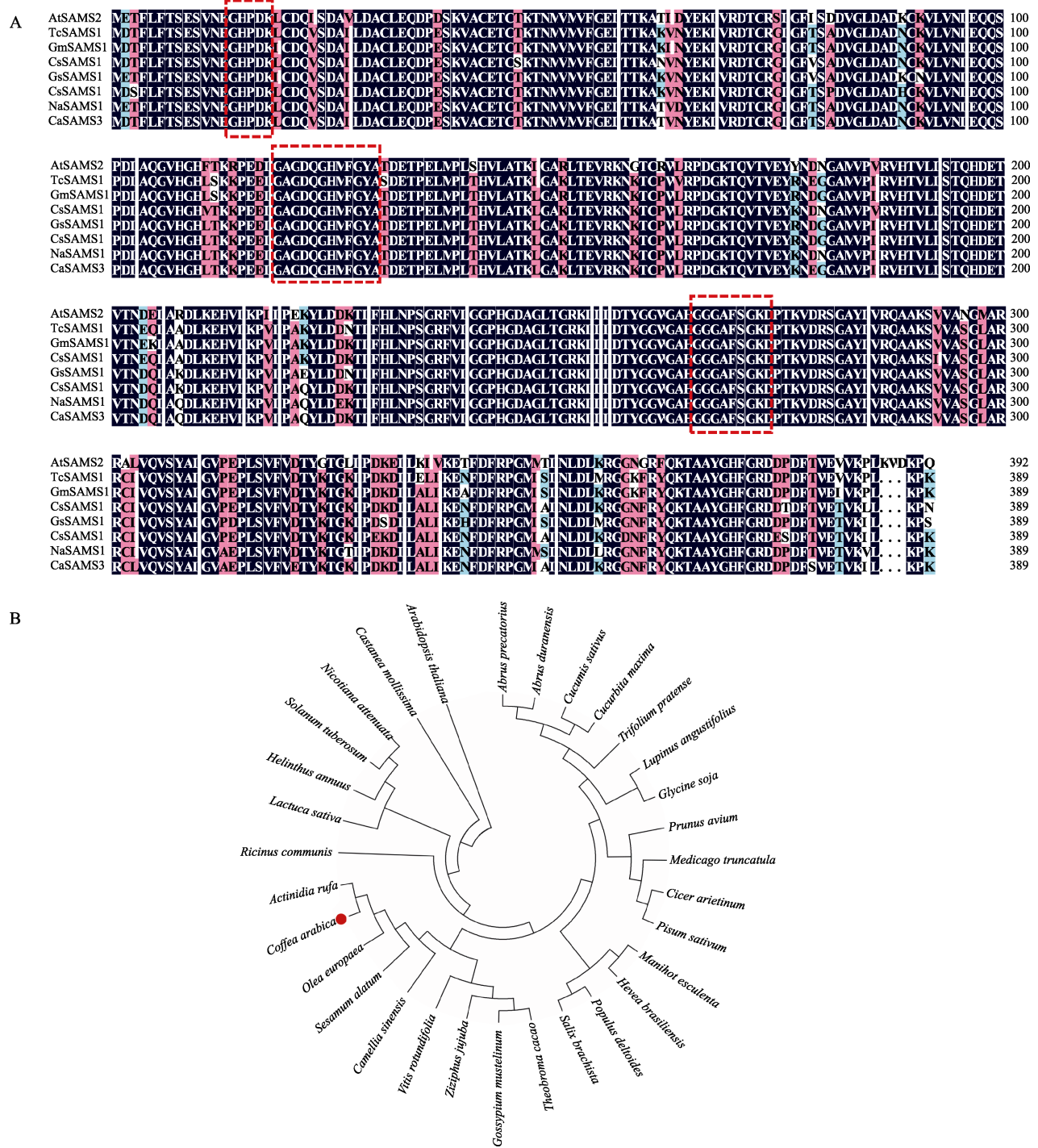


A: 磷酸化位点预测; B: 保守结构域预测; C: 跨膜结构预测; D: 亚细胞定位预测。

A: Phosphorylation sites analysis; B: Conserved domain analysis; C: Transmembrane structure analysis; D: Subcellular localization prediction.

图 3 CaSAMS3 蛋白的磷酸化位点和亚细胞定位预测

Fig. 3 Phosphorylation sites and subcellular localization prediction of CaSAMS3



A: 序列比对; B: 进化树。
A: Sequence alignment; B: Phylogenetic tree.
图 4 *CaSAMS3* 蛋白与同源蛋白的系统进化分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of *CaSAMS3* protein and homologous proteins

2.3 *CaSAMS3* 基因结构及调控网络分析

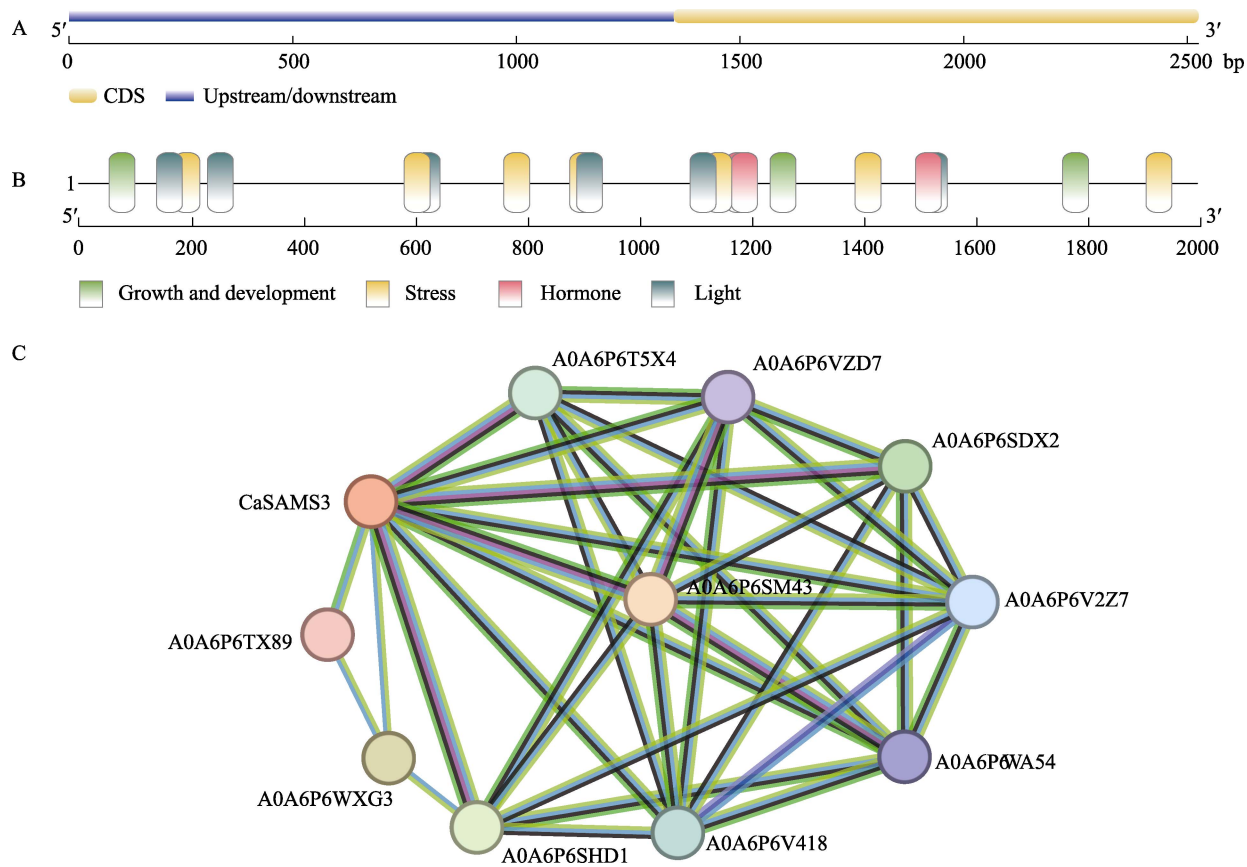
CaSAMS3 基因位于 6e 号染色体上 (3298165..3301071), 含 1 个 CDS 和 1 个 UTR, CDS 全长为 1173 bp (图 5A)。PlantCARE 软件分析结果(图 5B)显示,其启动子区含有光响应(Box

4、chs-Unit 1、G-Box、TCT-motif、TCCC-motif)、激素响应 (CGTCA-motif、TGACG-motif)、胁迫响应 (GC-motif、ARE、DRE、3-AF1 binding site) 及生长发育响应(GCN4_motif、CAT-box、O₂-site) 相关顺式作用元件,并存在 MYB 和 MYC 结合位

点，推测该基因可能受相应转录因子的调控。通过 psRNATarget 软件预测发现 20 种 microRNA 可与该基因互补，作用方式包括剪切和翻译抑制(附表 1)。

经预测，CaSAMS3 可能与 10 种蛋白 (A0A6P6SM43、A0A6P6WVG3、A0A6P6SHD1、A0A6P6SDX2、A0A6P6T5X4、A0A6P6V418、A0A6P6V2Z7、A0A6P6WA54、A0A6P6VZD7、A0A6P6TX89) 存在互作关系，蛋白注释信息见附表 2。这 11 种蛋白的聚类系数为 0.828，PPI 富

集 P 值为 $6.68\text{e-}09$ (图 5C)。GO 富集分析结果表明，这些蛋白主要参与甲硫氨酸生物合成 (GO:0009086)、 α -氨基酸生物合成和代谢 (GO:1901605, GO:1901607)、硫化物生物合成 (GO:0044272) 等生物过程，分子功能集中于 S-甲基转移酶及转氨酶活性 (GO:0008172 等)，细胞组分主要定位于胞质溶胶 (GO:0005829)。KEGG 富集分析结果表明，这些互作蛋白显著富集于半胱氨酸与甲硫氨酸代谢 (map00270)、次生代谢物的生物合成 (map01110) 等通路。



A: 基因结构; B: 顺式作用元件; C: 蛋白互作网络。
A: Gene structure; B: Cis acting element; C: Protein-protein interaction network.
图 5 *CaSAMS3* 基因的结构及调控网络分析

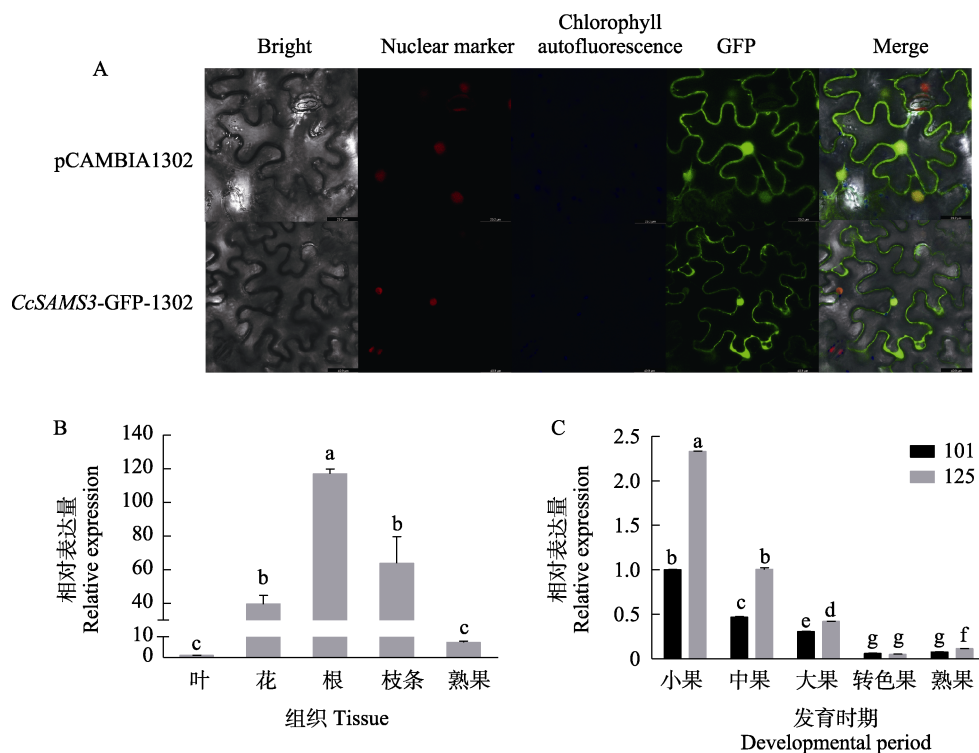
Fig. 5 Structure analysis and regulatory network of *CaSAMS3*

2.4 *CaSAMS3* 基因的表达模式分析

以 pCambia1302 空载为对照，将含有 *CaSAMS3* 基因的重组质粒通过农杆菌注射法导入带有 *mCherry* 核定位信号的烟草表皮细胞。共聚焦显微镜观察显示，空载对照组在细胞核与细胞膜上均呈现绿色荧光蛋白信号，*CaSAMS3*-GFP-1302 重组载体亦在细胞核与细胞膜上检测到绿色荧光信号 (图 6A)，表明 *CaSAMS3* 定位

于细胞膜和细胞核上，与预测结果不一致。

CaSAMS3 基因存在组织特异性表达，其在根系中的相对表达量最高，在花和枝条中次之，而在叶片中相对表达量最低 (图 6B)。*CaSAMS3* 基因的相对表达量随果实发育进程逐渐下降，且高咖啡因种质 125 在小果至熟果各时期的表达均显著高于低咖啡因种质 101 (图 6C)，表明 *CaSAMS3* 的表达与咖啡因合成存在相关性。



A: 亚细胞定位; B: 组织特异性表达分析; C: 时空表达分析。

A: Subcellular localization; B: Tissue-specific expression analysis; C: Temporal and spatial expression profiles.

不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。Different lowercase letters indicate significant difference among treatments ($P < 0.05$).图 6 *CaSAMS3* 基因的表达模式分析Fig. 6 Gene expression profiles of *CaSAMS3*

3 讨论

研究发现, SAMS 基因家族成员在不同物种中具有多样化的亚细胞定位。如毛果杨的 6 个 *PtSAMS* 成员均定位在叶绿体中^[9]; 在太阳花的 58 个 SAMS 成员中, 大多数分布于细胞骨架, 而 SAMS3 则定位于细胞质^[19]; YIN 等^[13]对葫芦科 9 种作物的 SAMS 基因家族成员鉴定, 预测这些成员分布于叶绿体、细胞膜、细胞质、细胞骨架和细胞核; CHENG 等^[42]对小麦 *TaSAMS10* 的研究发现, 该蛋白定位与细胞膜、细胞质和细胞核。上述研究结果表明, SAMS 的亚细胞定位存在明显的物种差异。本研究对咖啡 *CaSAMS3* 的验证结果显示, 其在烟草的细胞膜与细胞核中均存在绿色荧光信号, 与预测结果不一致。

SAMS 基因存在组织特异性表达, 且成员间表达水平差异显著。例如, 棉花 *GhSAMS1* 和 *GhSAMS9* 在雌蕊和花托中特异性表达, *GhSAMS8* 等多个成员则主要在茎和根中表达^[15]; 梨树 *PbSAMSs* 在花、茎、叶和花芽中的表达程度各异^[43]; 茶树 *CsSAMS2* 在根和茎中的表达量较高,

CsSAMS3 在茎中高表达, *CsSAMS1* 则普遍低表达^[16]; 在正常生长条件下, 小麦 *TaSAMS10* 在叶中表达较高, 受低温胁迫诱导后, 其在根和茎中的表达量显著上升^[17]。在本研究中, 咖啡 *CaSAMS3* 在根中的表达量最高, 花和枝次之, 叶片最低。尽管其在熟果中的表达量相对较低, 但该基因的表达量随果实成熟度的提高而逐渐下降, 且与咖啡因积累趋势一致。鉴于 SAMS 是催化 SAM 合成的关键酶, 而 SAM 作为重要的甲基供体参与咖啡因的合成, 在茶树中已被证实^[1, 16]。因此, 推测咖啡 *CaSAMS3* 在咖啡因生物合成中发挥类似作用。

除参与咖啡因的生物合成外, SAMS 还广泛参与植物的耐盐^[7]、抗旱^[23]、病原菌^[8]、虫害^[24]等多种胁迫响应。如西瓜 *CISAMS1* 受盐胁迫、冷胁迫、干旱胁迫和乙烯 (ETH)、水杨酸 (SA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 和乙烯 (ETH) 等外源激素的诱导后显著上调表达, 其沉默植株对盐胁迫、冷胁迫、干旱胁迫更为敏感^[13]; 过表达 *SISAMS1* 能够有效提高番茄的耐盐性^[7], 而水稻的 *TaSAMS10*

则能够有效提高拟南芥淹水胁迫后的成活率^[42]；小金海棠 *MxSAMS2* 的启动子对 ABA 较为敏感，且随 ABA 浓度升高，其驱动 GUS 表达的能力逐渐减弱^[44]。此外，毛果杨 *PtSAMS* 和太阳花 *HanSAMS* 的启动子区域均含有激素响应元件、胁迫响应元件及 *MYB/MYC* 转录因子结合位点^[9, 19]。本研究在咖啡 *CaSAMS3* 启动子区域鉴定到 CGTCA-motif、TGACG-motif、GC-motif 等胁迫与激素响应元件，同时检测到 *MYB* 和 *MYC* 转录因子结合位点，推测该基因可能受相应转录因子调控，参与咖啡抗逆与生长发育过程，为深入解析其功能和分子调控机制提供重要依据。

4 结论

本研究成功克隆了咖啡 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因 *CaSAMS3* 的全长 cDNA 序列，该基因编码的蛋白为亲水性蛋白，二级结构以 α -螺旋和无规则卷曲为主，含有典型的 S-adenosylmethionine synthase 结构域，并与其他 SAMS 蛋白具有较高的同源性。*CaSAMS3* 定位于细胞膜与细胞核，存在组织特异性表达，可能参与光响应、激素响应、胁迫响应和生长发育响应过程，且与咖啡因的合成存在一定程度的关联。本研究将为深入解析 *CaSAMS3* 在咖啡因合成调控中的生物学功能提供重要的理论基础，也为咖啡品质与抗性育种提供潜在靶点。

参考文献

- [1] DENG C, KU X P, CHENG L L, PAN S A, FAN L M, DENG W W, ZHAO J, ZHANG Z Z. Metabolite and transcriptome profiling on xanthine alkaloids-fed tea plant (*Camellia sinensis*) shoot tips and roots reveal the complex metabolic network for caffeine biosynthesis and degradation[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 11551288.
- [2] PERROIS C, STRICKLER S R, MATHIEU G, LEPELLEY M, BEDON L, MICHAUX S, HUSSON J, MUELLER L, PRIVAT L. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta)[J]. *Planta*, 2015, 241(1): 179-191.
- [3] KATO M, MIZUNO K, CROZIER A, FUJIMURA T, ASHIHARA H. Plant biotechnology - caffeine synthase gene from tea leaves[J]. *Nature*, 2000, 406(6799): 956-957.
- [4] PAJARES M A, MARKHAM G D. Methionine adenosyltransferase (s-adenosylmethionine synthetase)[J]. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 2011, 78: 449-521.
- [5] VELAYUTHAM M, GURU A, ARASU M V, ARASU M V, AL-DHABI N A, CHOI K C, ELUMALAI P, HARIKRISHNAN R, ARSHAD A, AROCKIARAJ J. GR15 peptide of S-adenosylmethionine synthase (S-AdMet) from *Arthrospira platensis* demonstrated antioxidant mechanism against H₂O₂ induced oxidative stress in *in-vitro* MDCK cells and *in-vivo* zebrafish larvae model[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 342: 79-91.
- [6] VELAYUTHAM M, HARIDEVAMUTHU B, ELSADEK M F, RIZWANA H, JULIET A, KARUPPIAH K M, AROCKIARAJ J. S-adenosylmethionine synthase-derived GR15 peptide suppresses proliferation of breast cancer cells by upregulating the caspase-mediated apoptotic pathway: *in vitro* and *in silico* analyses[J]. *Journal of King Saud University Science*, 2022, 34(8): 102354.
- [7] 刘越. *SISAMS1* 调控番茄耐盐性的生理与分子机制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2025.
- LIU Y. The physiological and molecular mechanisms of *SISAMS1* conferring tolerance to salt stress in tomato[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2025. (in Chinese)
- [8] 刘茹燕, 魏炳峰, 占昭宏, 吴可建, 李春霞, 陶均. 水稻 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因响应病原菌及外源激素的表达分析[J]. *江苏农业科学*, 2025, 53(4): 64-72.
- LIU R Y, WEI B Z, ZHAN Z H, WU K J, LI C X, TAO J. Expression analysis of S-adenosylmethionine synthetase gene in response to pathogenic bacteria and exogenous hormones in rice[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2025, 53(4): 64-72. (in Chinese)
- [9] 程爽, 孙昊, 任海燕, 宋海凤. 杨树 *PtSAMS* 基因家族鉴定及其干旱胁迫响应模式分析[J]. *植物生理学报*, 2025, 61(5): 663-672.
- CHENG S, SUN H, REN H Y, SONG H F. Identification of *PtSAMS* gene family in poplar and analysis of its response pattern to drought stress[J]. *Plant Physiology Journal*, 2025, 61(5): 663-672. (in Chinese)
- [10] GOU L B, LIU D, FAN T P, DENG H X, CAI Y J. Efficient spermidine production using a multi-enzyme cascade system utilizing methionine adenosyltransferase from *Lactobacillus fermentum* with reduced product inhibition and acidic pH preference[J]. *Journal of Biotechnology*, 2025, 399: 141-152.
- [11] 王伟科, 陆娜, 闫静, 宋吉玲, 袁卫东, 周祖法. 秀珍菇 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因(*PpSAMS*)的克隆与表达分析[J]. *浙江农业学报*, 2021, 33(1): 62-68.
- WANG W K, LU N, YAN J, SONG J L, YUAN W D, ZHOU Z F. Cloning and expression analysis of *PpSAMS* gene of *Pleurotus pulmonarius*[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2021, 33(1): 62-68. (in Chinese)

- [12] SEKULA B, RUSZKOWSKI M, DAUTER Z. S-adenosylmethionine synthases in plants: structural characterization of type I and II isoenzymes from *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 151: 554-565.
- [13] YIN M, HUANG Z, ASLAM A, WANG Z, WANG J, YU Y, LIU J, ZHAO D, ZHANG Y, YANG X, ZHANG R, SHI Q. Genome-wide identification of SAMS gene family in Cucurbitaceae and the role of *CISAMS1* in watermelon tolerance to abiotic stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 211: 108708.
- [14] KILWAKE J W, UMER M J, WEI Y Y, MEHARI T G, MAGWANGA R O, XU Y C, HOU Y Q, WANG Y H, SHIRAKU M L, KIRUNGU J N, CAI X Y, ZHOU Z L, PENG R H, LIU F. Genome-wide characterization of the SAMS gene family in cotton unveils the putative role of *GhSAMS2* in enhancing abiotic stress tolerance[J]. Agronomy-Basel, 2023, 13(2): 612.
- [15] SUN F L, MA J, WANG P L, YANG Y L. Genome-wide identification of the SAMS gene family in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and expression analysis in drought stress treatments[J]. Genes, 2022, 13(5): 860.
- [16] 王艺清, 王涛, 韦朝领, 戴浩民, 曹士先, 孙威江, 曾雯. 茶树 SAMS 基因家族的鉴定及互作分析[J]. 生物技术通报, 2023, 39(4): 246-258.
WANG Y Q, WANG T, WEI Z L, DAI H M, CAO S X, SUN W J, ZENG W. Identification and interaction analysis of SAMS gene family in tea plant (*Camellia sinensis*)[J]. Biotechnology Bulletin, 2023, 39(4): 246-258. (in Chinese)
- [17] 冯晓冰. 小麦 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因 *TaSAMS10* 的克隆及响应低氧功能分析[D]. 荆州: 长江大学, 2022.
FENG X B. Cloning of wheat S-adenosylmethionine synthase gene *TaSAMS10* and analysis of its function in response to hypoxia[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2022. (in Chinese)
- [18] AHMED I M, NADIRA U A, QIU C W, CAO F B, CHEN Z H, VINCZE E, WU F B. The barley s-adenosylmethionine synthetase 3 gene *HvSAMS3* positively regulates the tolerance to combined drought and salinity stress in tibetan wild barley[J]. Cells, 2024, 13(19): 1530.
- [19] ZHANG C, LI H Y, YIN J M, HAN Z B, LIU X Q, CHEN Y. Pan-genome wide identification and analysis of the SAMS gene family in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) revealed their intraspecies diversity and potential roles in abiotic stress tolerance[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1499024.
- [20] 陈欣阳. 番茄 DNA 甲基化介导 *SISAMS1* 调控 *SIG1* 响应盐胁迫的分子机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2023.
CHEN X Y. The molecular mechanism of tomato DNA methylation mediated *SISAMS1* regulating *SIG1* response to salt stress[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [21] HU W L, HU S, LI S Z, ZHOU Q, XIE Z J, HAO X H, WU S, TIAN L F, LI D P. *AtSAMS* regulates floral organ development by DNA methylation and ethylene signaling pathway[J]. Plant Science, 2023, 334: 111767.
- [22] CHEN X Y, CHEN G L, GUO S R, WANG Y, SUN J. *SISAMS1* enhances salt tolerance through regulation DNA methylation of *SIG1* in tomato[J]. Plant Science, 2023, 335: 111808.
- [23] 李和超, 李莉, 韩雪松, 陈宏伟, 刘昌燕, 沙爱华. 蚕豆 *VfSAMS2* 基因抗旱功能分析[J]. 南方农业学报, 2025, 56(3): 731-741.
LI H C, LI L, HAN X S, CHEN H W, LIU C Y, SHA A H. Drought tolerance function of faba bean *VfSAMS2* gene[J]. Journal of Southern Agriculture, 2025, 56(3): 731-741. (in Chinese)
- [24] 李芳. 棉花 *GhSAMS* 基因对棉铃虫的抗性功能研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2024.
LI F. *Helicoverpa armigera* resistance function study on cotton *GhSAMS* gene[D]. Linfen: Shanxi Normal University, 2024. (in Chinese)
- [25] LEE M B, KIM J Y. *HvVDAC1* interacts with *HvSAMS1* and is predominantly expressed during germination and grain development[J]. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2024, 33(2): 189-204.
- [26] WANG Y C, QIAN W J, LI N N, HAO X Y, WANG L, XIAO B, WANG X C, YANG Y J. Metabolic changes of caffeine in tea plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) as defense response to *Colletotrichum fructicola*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(35): 6685-6693.
- [27] FERNANDES-BRUM C N, GARCIA B D, MOREIRA R O, SAGIO S A, BARRETO H G, LIMA A A, FREITAS N C, DE LIMA R R, DE CARVALHO C H S, CHALFUN A. A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions[J]. Tree Genetics & Genomes, 2017, 13(6): 131.
- [28] DUVAUD S, GABELLA C, LISACEK F, STOCKINGER H, LOANNIDIS V, DURINX C. Expasy, the swiss bioinformatics resource portal, as designed by its users[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W216-W227.
- [29] GEOURJON C, DELEAGE G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1995, 11(6): 681-684.

- [30] WATERHOUSE A, BERTONI M, MIENERT S, STUDER G, TAURIELLO G, GUMIENNY R, HEER F T, DE BEER T A P, REMPFER C, BORDOLI L, LEPORE R, SCHWEDE T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [31] MARCHLER-BAUER A, BRYANT S H. CD-Search: protein domain annotations on the fly[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: W327-W331.
- [32] TEUFEL F, ARMENTEROS J J A, JOHANSEN A R, GISLASON M H, PIHL S L, TSIRIGOS K D, WINTHER O, BRUNAK S, VON HEIJNE G, NIELSEN H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models[J]. *Nature Biotechnology*, 2022, 40(7): 1023-1025.
- [33] CHEN Y J, YU P, LUO J C, JIANG Y. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT[J]. *Mammalian Genome*, 2003, 14(12): 859-865.
- [34] HORTON P, PARK K J, OBAYASHI T, FUJITA N, HARADA H, ADAMS-COLLIER C J, NAKAI K. WoLF PSORT: protein localization predictor[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35: W585-W587.
- [35] CHOU K C, SHEN H B. Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11335.
- [36] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [37] CHEN C J, WU Y, LI J W, WANG X, ZENG Z H, XU J, LIU Y L, FENG J T, CHENG H, HE Y H, XIA R. TBtools-II: a "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(11): 1733-1742.
- [38] LESCOT M, DEHAIS P, THIJS G, MARCHAL K, MOREAU Y, VAN DE PEER Y, ROUZE P, ROMBAUTS S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(1): 325-327.
- [39] DAI X B, ZHUANG Z H, ZHAO P X C. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W49-W54.
- [40] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, JUNGE A, WYDER S, HUERTA-CEPAS J, SIMONOVIC M, DONCHEVA N T, MORRIS J H, BORK P, JENSEN L J, MERING C. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [41] 王曦奥. 黄瓜苗期响应湿热胁迫的生理和分子机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
- WANG X A. Physiological and molecular mechanisms of cucumber seedlings responding to high temperature and high humidity stress[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2022. (in Chinese)
- [42] CHENG B Y, FENG X B, BUITRAGO S, WAN K, XU Y H, XU L, PAN R, ZHANG W Y. The wheat *TaSAMS10* improves survival rate under waterlogging stress by inducing ethylene synthesis and early flowering[J]. *Plant Growth Regulation*, 2024, 102(2): 379-393.
- [43] ZHANG Y, LI D C, FENG X F, WANG X Y, WANG M N, HAN W L, MANZOOR M A, LI G H, CHEN T Z, WANG H, CAI Y P. Whole-genome analysis of CGS, SAHH, SAMS gene families in five Rosaceae species and their expression analysis in *Pyrus bretschneideri*[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13086.
- [44] 黄华. 小金海棠缺铁胁迫表达基因 *MxSAMS2* 的上游启动子克隆与功能研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
- HUANG H. Cloning and functional study of upstream promoter of iron deficiency stress expression gene *MxSAMS2* from *Malus xiaojinensis*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2020. (in Chinese)