

白木香丙二烯氧化物环化酶基因 (*AsAOC1*) 的克隆与表达分析

董先娟^{2#}, 李铁铮^{3#}, 冯莹莹², 王晓晖^{2*}, 高博闻^{1*}

(1. 包头医学院, 内蒙古 包头 014060; 2. 北京中医药大学中药学院中药现代研究中心, 北京 100029;
3. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

摘要: 丙二烯氧化物环化酶 (allene oxide cyclase, AOC) 是茉莉酸生物合成途径中的一个关键酶, 在植物防御反应中发挥重要作用。本研究根据白木香转录组高通量测序结果设计引物扩增, 利用 RT-PCR 技术从白木香中首次克隆得到 1 个 AOC 基因, 命名为 *AsAOC1*, 并进行生物学信息分析、原核表达和纯化、组织特异性分析及非生物胁迫和激素诱导表达分析。白木香 *AsAOC1* 基因的开放阅读框 (ORF) 长 753 bp, 编码 251 个氨基酸, 其蛋白分子质量是 27.46 kD。生物学信息分析表明 *AsAOC1* 蛋白包含 1 个保守的 allene_ox_cyc 结构域, 系统进化树显示 *AsAOC1* 蛋白与川桑 (*Morus notabilis*) AOC 蛋白具有较高的同源性。构建原核表达载体 pET28a-*AsAOC1* 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株中成功表达 *AsAOC1* 重组蛋白, 利用 Ni²⁺亲和色谱纯化得到可溶性 *AsAOC1* 重组蛋白。实时荧光定量 PCR 检测结果表明 *AsAOC1* 基因在茎中表达量最高, 根与茎尖次之, 叶中表达量最低。盐、干旱、低温以及重金属胁迫均能够诱导白木香愈伤组织中 *AsAOC1* 基因表达; 茉莉酸甲酯、水杨酸、赤霉素和脱落酸诱导后, 愈伤组织中 *AsAOC1* 基因的表达量明显上升。本研究为进一步研究茉莉酸途径在白木香结香机制和植物防御反应中作用奠定基础。

关键词: 白木香; 丙二烯氧化物环化酶; 茉莉酸; 生物学信息分析; 原核表达; 表达分析
中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0467-09

Cloning and expression analysis of allene oxide cyclase gene from *Aquilaria sinensis*

DONG Xian-juan^{2#}, LI Tie-zheng^{3#}, FENG Ying-ying², WANG Xiao-hui^{2*}, GAO Bo-wen^{1*}

(1. Baotou Medical College, Baotou 014060, China; 2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

Abstract: Allene oxide cyclase (AOC), a key enzyme in biosynthesis of jasmonic acid, plays an essential role in the plant defense system. In present study, a full length cDNA of *AsAOC* gene was cloned by the reverse transcription PCR from *Aquilaria sinensis* calli. Meanwhile, the bioinformatics, prokaryotic expression, purification, tissue-specific expression analysis, and expression analysis under different abiotic stresses and hormone treatments were performed. The open reading frame (ORF) of *AsAOC1* gene was 753 bp, encoding a protein of 251 amino acids with a calculated molecular mass (MW) of 27.46 kD. Bioinformatic analysis showed that *AsAOC1* protein contains a conserved allene_ox_cyc domain in C-terminus. The phylogenetic analysis indicated that *AsAOC1* protein had the highest level of homology with the AOC protein from *Morus*

收稿日期: 2017-10-09; 修回日期: 2017-12-29.

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81503182); 内蒙古自然科学基金博士基金 (2017BS0803); 包头医学院科学研究项目 (BYJJ-YF201608).

#同等贡献.

*通讯作者 Tel: 86-472-7167795, E-mail: gaobw001@163.com;

Tel: 86-10-64286180, E-mail: wangxhui2014@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0988

notabilis. The recombinant *AsAOC1* protein was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells using the prokaryotic expression vector pET28a-*AsAOC1* and was purified by Ni^{2+} affinity chromatography. Expression analysis in different tissues indicated that *AsAOC1* was primarily observed in stems, and then stem tips and roots, following by leaves. The transcript level of *AsAOC1* was induced by various abiotic stresses including salt, drought, cold, and heavy metal stress. Furthermore, *AsAOC1* expression level was enhanced upon methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA), gibberellin (GA3), and abscisic acid (ABA) treatments. These results provide valuable insights into the role of JA in the mechanism of agarwood formation and plant defense system.

Key words: *Aquilaria sinensis*; allene oxide cyclase; jasmonate; bioinformatics analysis; prokaryotic expression; expression analysis

白木香 (*Aquilaria sinensis*) 是我国特有而珍贵的药用植物^[1], 也是国产名贵药材沉香的唯一正品植物来源, 已被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES) 附录 II^[2]和国家濒危二级保护植物^[3]。沉香是我国传统名贵中药, 具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘等功效, 对于胸腹胀闷疼痛、胃寒呕吐呃逆、肾虚气逆喘急等有显著疗效^[1], 药理研究表明, 沉香具有消化系统和中枢神经系统的保护作用。另外, 沉香是一种名贵香料, 具有龙涎香与檀香混合物的香味, 至今仍旧无法复制这种香味^[4]。健康的白木香并不产生沉香, 只有通过自然因素 (雷劈、火烧、虫蛀等) 或者人为因素 (砍伤、打洞、接菌等) 的作用才能形成沉香, 但是沉香形成的分子机制一直没有揭示, 严重制约高效人工结香技术的建立^[5]。化学成分分析结果表明, 倍半萜类物质与苯乙基色酮类物质是决定沉香品质的主要化学成分^[6], 文献报道茉莉酸甲酯能够明显诱导白木香愈伤组织与悬浮细胞产生倍半萜类物质^[7,8], 而盐胁迫能够诱导白木香悬浮细胞及愈伤组织中苯乙基色酮物质的产生^[9], 因此沉香结香机制与茉莉酸途径及植物防御反应密切相关。

茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 及其挥发性甲酯衍生物茉莉酸甲酯 (methyl-jasmonate, MeJA) 和氨基酸衍生物统称为茉莉酸类物质 (jasmonates, JAs), 对植物的生长发育、系统防御以及次生代谢产物的合成起着关键的调控作用。丙二烯氧化物环化酶 (allene oxide cyclase, AOC) 是 JA 合成中的关键酶, 它能够特异性地环化催化丙二烯氧化物 [12,13(S)-epoxylinolenic acid] 进行结构重排, 并生成茉莉酸产物的前体 10,11-二氢-12-氧植物二烯酸 (12-oxo-phytodienoic acid, OPDA)^[10], 其活性对于代谢中间产物最终转化成茉莉酸产物至关重要^[11]。研究表明, AOC 基因的功能与植物的胁迫反应相关。Stenzel 等^[12]研究发现番茄叶片受伤诱导后, 诱导维管束中 AOC 表达促进 JA

的合成, 通过 JA 的增加来调节 AOC 依赖的局部伤反应, 说明 AOC 在植物伤害防御反应中起到关键作用。Yamada 等^[13]和 Pi 等^[14]分别发现红树与喜树中的 AOC 基因具有很好的耐盐性, 说明 AOC 基因能够提高植物的抗逆性。因而分离丙二烯氧化物环化酶的编码基因并分析其表达对于理解其在植物生长发育和逆境胁迫中的作用具有重要意义。目前在玉米^[15]、番茄^[16]、拟南芥^[17]等植物中克隆得到了 AOC 基因并对其相关功能进行了研究, 在白木香中, 茉莉酸甲酯参与沉香特征性成分—倍半萜类物质的生物合成调控。但目前白木香 *AsAOC* 基因的克隆、蛋白原核表达以及生长发育及防御反应尚未见文献报道, 因此研究白木香中 *AsAOC* 的生物信息学、原核表达及在非生物胁迫和激素处理下的表达方式有利于丰富 AOC 的生物合成功能及在植物防御反应中的重要作用, 同时有利于阐明白木香结香机制。本研究中通过分析高通量测序结果, 在白木香愈伤组织中克隆得到一条 AOC 基因的 cDNA 全长, 命名为 *AsAOC1*, 并对其序列进行了生物学信息分析, 通过荧光定量 PCR 技术分析其在不同组织中的表达差异, 并研究其在受到盐、干旱、低温及重金属胁迫和外源茉莉酸甲酯、水杨酸、脱落酸和赤霉素处理不同时间愈伤组织中的表达及积累情况, 为研究沉香结香机制及植物的防御反应机制奠定基础。

材料与方法

材料及处理 本实验使用从广州移植、现种植于北京中医药大学中药现代研究中心 3 年的白木香, 于 6 月份采集新鲜的根、茎、茎尖及叶提取总 RNA, 检测 *AsAOC1* 基因在不同器官中的特异性表达。利用白木香叶片和茎尖诱导的愈伤组织, 选取长势相同的白木香愈伤组织, 分别经 NaCl ($150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、低温 ($4 \text{ }^\circ\text{C}$)、 CdCl_2 ($500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、甘露醇 (750

mmol·L⁻¹) 4 种非生物胁迫及脱落酸 (ABA) (150 μmol·L⁻¹)、茉莉酸甲酯 (MeJA) (150 μmol·L⁻¹)、赤霉素 (GA3) (150 μmol·L⁻¹)、水杨酸 (SA) (150 μmol·L⁻¹) 4 种外源激素处理, 在处理 0、12、24、36、48 h 提取 RNA 作为样品检测 *AsAOC1* 基因在各种处理下的表达差异。所用菌种为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α、BL21 (DE3), 购自天根生物科技有限公司; pET28a (Novagen) 由本实验室保存。

白木香组织及愈伤组织中总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 按照 EASYspin Plus 植物 RNA 快速提取试剂盒 (Aidlab, 中国) 实验操作步骤进行植物总 RNA 提取, 利用 NanoDrop 2000C 检测 RNA 浓度, 同时利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性和质量。利用 Sigma 公司的反转录酶 M-MLV 将白木香的总 RNA 反转录为第一链 (cDNA), 反转录的条件按照说明书进行。

***AsAOC1* 基因序列全长克隆** 从白木香转录组高通量测序结果中获得 1 个由表达序列标签拼接而成的序列, 经注释分析发现为具有完整开放阅读框的 *AsAOC* 基因, 依据该序列利用 Primer 软件设计两端特异性引物 (AOC-1, AOC-2), 引物序列见表 1。以白木香总 RNA 的反转录产物为模板, 按照下列体系对白木香中 *AsAOC1* 基因进行扩增: cDNA 1 μL、LA Taq (2.5 U·μL⁻¹) 0.5 μL、10×LA Taq buffer 5 μL、dNTP Mix (2.5 mmol·L⁻¹) 4 μL、10 μmol 引物各 1 μL, 终体积为 50 μL。反应: 94 °C 预变性 5 min; 然后进行 35 个循环 (94 °C 40 s, 59 °C 30 s, 72 °C 60 s), 循环结束后 72 °C 延伸反应 10 min, 4 °C 保存。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 利用 Axygen DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。将回收后的 PCR 产物与 pMD19-T 连接, 转化到 DH5α 菌株, 在氨苄青霉素抗性的平板上进行筛选, 并经过菌落 PCR 检测后送上海英潍捷基公司测序。

白木香 *AsAOC1* 生物信息学分析 通过在线软

件 ProtParam 预测蛋白结构, 分析目的基因编码蛋白质的氨基酸组成、蛋白质相对分子质量、理论等电点及稳定性等参数; 采用 SignalP 4.1 Server 进行细胞定位预测; 通过 ExPASy 中的 SOPMA 工具分析蛋白质序列的二级结构; 利用 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件构建蛋白质三级结构模型; 利用软件 TMHMM 2.0 进行蛋白质跨膜结构分析; 将所获得的 *AsAOC1* 基因编码的氨基酸序列在 GenBank 数据库中进行 Blast P 对比分析, 利用 DNAMAN 对其他物种的 *AsAOC1* 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析; 通过 MEGA 6.0 软件构建 Neighbor-joining 系统进化树, 进化距离的计算采用泊松校正法, Bootstrap 重复次数为 1 000 次。

***AsAOC1* 原核表达载体的构建及异源表达** 利用引物 AOC-5B 和 AOC-3X (表 1) 扩增 *AsAOC1* 基因全长, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切包含有目的基因 *AsAOC1* 的 PCR 产物以及表达载体 pET28a, 酶切产物纯化后, 利用 T4 DNA 连接酶, 将酶切 PCR 产物与酶切载体连接, 连接产物转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 挑取经扩增筛选、测序鉴定正确的单克隆; 提取质粒 pET28a-*AsAOC1*, 将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。挑取单菌落接种于含有 50 μg·mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 活化过夜; 活化菌液按 1:100 比例加入到适量新鲜含有 50 μg·mL⁻¹ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.6 左右, 加 IPTG 至终浓度 0.8 mmol·L⁻¹。先 180 r·min⁻¹, 37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6, 调节温度至 18 °C 振荡培养 16 h 诱导 *AsAOC1* 过度表达; 4 °C, 12 000 r·min⁻¹ 离心收集大肠杆菌菌体之后, 悬浮于 40 mmol·L⁻¹ KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ 咪唑) 中。将菌体置于冰上, 用超声破碎仪 (Colo Parmer) 来破碎细胞, 破碎液高速离心 30 min 以上。取上清液, 利用镍离子亲和色谱柱纯化 *AsAOC1* 蛋白, 先以 20 mmol·L⁻¹ KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 500 mmol·L⁻¹ NaCl 和 40 mmol·L⁻¹ 咪唑) 洗脱以去除杂蛋白, 再以 15 mmol·L⁻¹ KPB 缓冲液 (pH 7.5, 含 10% 甘油和 500 mmol·L⁻¹ 咪唑) 洗脱目的蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达。

白木香 *AsAOC1* 基因在不同组织和不同的冷胁迫时间的表达分析 利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 的方法检测白木香不同组织中 *AsAOC1* 基因表达情况和不同胁迫处理和激素处理时间的表达情况。分析使用 SYBR Green I

Table 1 Primers sequences

Primer role	Primer name	Primers sequence (5'-3')
Sequence	AOC-1	ATGGCTTGCTCAAGCTCGGCCCT
	AOC-2	TTAATCGGTGAAATTGGCGATGG
Amplification	AOC-5B	CGCGGATCCATGGCTTGCTCAAGCTCGGCCCT
	AOC-3X	CCGCTCGAGTTAATCGGTGAAATTGGCGATGG
qRT-PCR	AOC-3	AGACTACGGTCACATCTCTG
	AOC-4	AGGTAGAAGGTGTAGAAGAGC
	GAPDH-1	CTGGTATGGCATTCCGTGTA
	GAPDH-2	AACCACATCCTCTCGGTGTA

荧光染料法, 在 qRT-PCR 仪上进行。选取白木香 *GAPDH* 基因作为目标基因定量表达的内参基因, 引物序列见表 1。每个样品设 3 个重复, 重复 3 次。反应体系中含有 10 μL STBR Premix Ex Taq 酶、上下游引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL 、模板 0.5 μL 、总体积为 20 μL 。反应程序是: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s (每次循环后采集荧光), 40 个循环后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 65~95 $^{\circ}\text{C}$ 做熔解曲线分析, 每个温度以每步 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 上升, 每个温度停留 5 s。根据溶解曲线判断 RT-PCR 产物的特异性, 相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行分析。

结果与分析

1 白木香 *AsAOC1* 基因全长 cDNA 的克隆

根据白木香愈伤组织转录组测序结果, 以白木香愈伤组织的 cDNA 为模板进行扩增, 利用 PCR 方法进行扩增后得到约 750 bp 片段, 扩增结果见图 1, 将 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上, 测序结果经过 NCBI 的 BLAST 比对, 确定该扩增产物是 *AOC* 基因的全长, 基因命名为 *AsAOC1*, 其序列长度为 753 bp, 编码 251 个氨基酸。

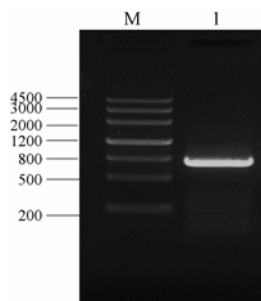


Figure 1 Cloning of *AsAOC1* gene from *Aquilaria sinensis* calli. M: DNA marker; I: PCR product of *AsAOC1* gene

2 *AsAOC1* 的生物学信息分析

2.1 *AsAOC1* 理化性质分析、亚细胞定位、跨膜区域分析 通过 ProtParam 软件预测 *AsAOC1* 基因编码的蛋白的理化性质。推测 *AsAOC1* 编码的蛋白分子式为 $\text{C}_{1241}\text{H}_{1931}\text{N}_{325}\text{O}_{366}\text{S}_8$, 相对分子质量为 27 516.42, 理论等电点为 8.85, 不稳定系数 II 为 50.09, 属于不稳定蛋白, 总平均亲水性 GRAVY 为 -0.283, 为亲水

性蛋白; 通过蛋白质亚细胞定位软件 SignalP 4.1 Server 预测结构表明, 白木香 *AsAOC1* 蛋白主要定位于细胞质。利用 TMHMM 2.0 预测白木香 *AsAOC1* 的跨膜区域, 预测结果表明 *AsAOC1* 没有跨膜区域。

2.2 *AsAOC1* 蛋白的二级结构分析及三维结构预测 利用 ExPASy 中的 SOPMA 工具预测 *AsAOC1* 基因编码蛋白的二级结构, 结果显示 *AsAOC1* 蛋白的二级结构由 46.80% 的随机卷曲 (random coil)、21.20% 的 α -螺旋 (α -helices)、25.60% 的延伸链 (extended strand) 和 6.4% 的 β -折叠 (β -turn) 组成 (图 2), 推测随机卷曲是其最大量的二级结构元件, 而 α -螺旋、延伸链和 β -折叠散布于整个蛋白中。

将白木香 *AsAOC1* 的氨基酸序列通过 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件建立了 *AsAOC1* 的三维结构模型, 选择拟南芥 *AOC* 的结构模型为模板, 对白木香 *AsAOC1* 的结构进行预测, 结果表明, 白木香 *AsAOC1* 与拟南芥 *AOC* 一致性为 64.74%, 具有参考价值。具体三维结构如图 3 所示。



Figure 3 The deduced three-dimensional structure of *AsAOC1* protein

2.3 白木香 *AsAOC1* 氨基酸序列分析和系统进化树分析 将白木香 *AsAOC1* 氨基酸序列与 GenBank 中其他植物中的 *AOC* 氨基酸序列进行比对, 通过 DNAMAN 软件与多种植物进行多序列比对分析 (图 4), 发现 *AsAOC1* 含有 1 个高度保守的 allene-ox-cyc 结构和 8 个 β 延伸连 (图 4 中用箭头标出), 并且还含有保守活性位点的保守氨基酸 (图 4 中用 * 标出)。同时比对结果显示, 白木香 *AsAOC1* 氨基酸序列与土瓶草 (*Cephalotus follicularis*)、石榴 (*Punica granatum*)、

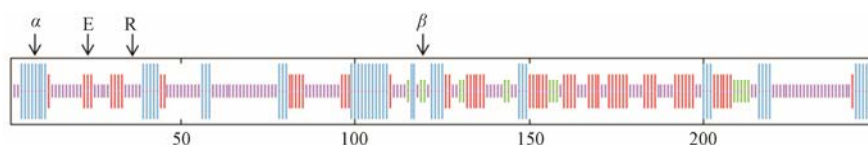


Figure 2 Predicted secondary structure of *AsAOC1* protein with SOPMA. α : α -helices; β : β -turn; E: Extended strand; R: Random coil

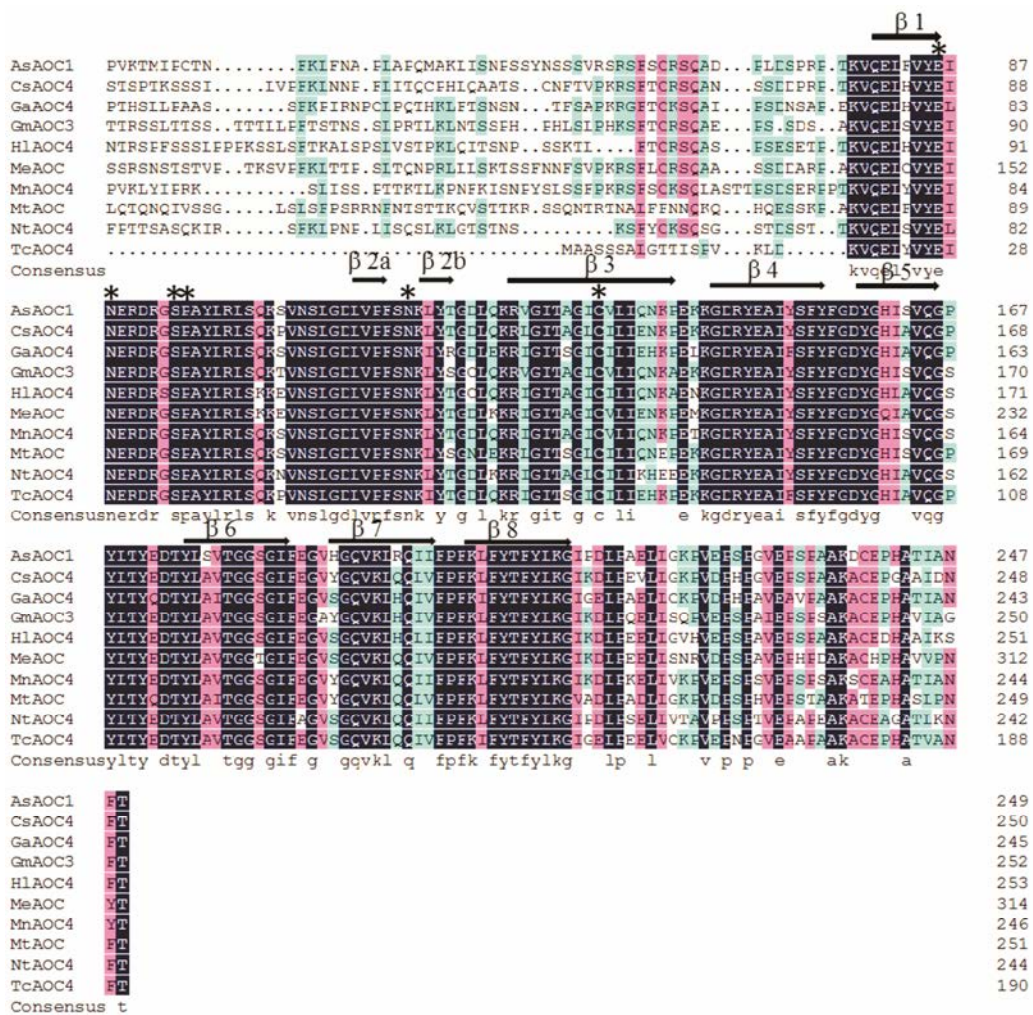


Figure 4 Multiple sequence alignment of *AsAOC1* and AOC from other plant species. Black shading indicates amino acid identities, red and blue shading indicates amino acid with different similarity. The catalytic residues which is the active site of AOC proteins are shown with asterisk. The black arrow stands for β -extend strand. As: *Aquilaria sinensis*; Cs: *Citrus sinensis*; Ga: *Gossypium arboreum*; Mn: *Morus notabilis*; Gm: *Glycine max*; Hl: *Humulus lupulus*; Me: *Manihot esculenta*; Nt: *Nicotiana tabacum*; Tc: *Theobroma cacao*

可可 (*Theobroma cacao*) 中 AOC 氨基酸序列相似性分别为 73%、71% 和 70%。为了进一步了解白木香 *AsAOC1* 蛋白在植物 AOC 家族中的进化位置, 从 NCBI blastp 的比对结果中选取来源于其他植物的 39 条 AOC 蛋白序列, 包括乔木类植物甜橙、橡胶等, 模式植物拟南芥、玉米、烟草等, 以及其他植物如茄、苜蓿等利用 MEGA6.0 构建了系统进化树 (图 5)。从图 5 可以看出, 白木香 *AsAOC1* 与桑树 (*Morus notabilis*) AOC 蛋白亲缘关系比较接近。

3 *AsAOC1* 原核表达分析

将原核表达载体 pET28a-*AsAOC1* 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 通过预实验探索及 SDS-PAGE 电泳检测蛋白是否可溶并确定最佳诱导条件, 使用终浓度为 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 于 18°C 下诱导 16 h 达到最佳效果。由于 *AsAOC1* 在其氨基酸序列的 N

端带有一个 6 个 His (组氨酸) 的标签, 用镍离子亲和色谱柱纯化 *AsAOC1* 蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测发现在 30 kD 出现一条 *AsAOC1* 蛋白纯化条带 (图 6)。

4 *AsAOC1* 基因器官特异性表达分析

利用荧光定量 PCR 检测 *AsAOC1* 基因的组织特异性表达, 结果显示 *AsAOC1* 基因在白木香所有组织中均有表达, 在茎中表达最高, 根和茎尖次之, 在叶中表达最低, 说明 *AsAOC1* 基因表达具有器官特异性 (图 7)。

5 *AsAOC1* 基因在不同非生物胁迫和激素诱导下的表达分析

为验证白木香 *AsAOC1* 在植物防御反应中的作用, 对白木香的愈伤组织分别进行盐、干旱、低温及重金属处理, 以相同生长情况下未进行任何处理的愈伤组织做对照, 不同时间点取样提取 RNA 后进行

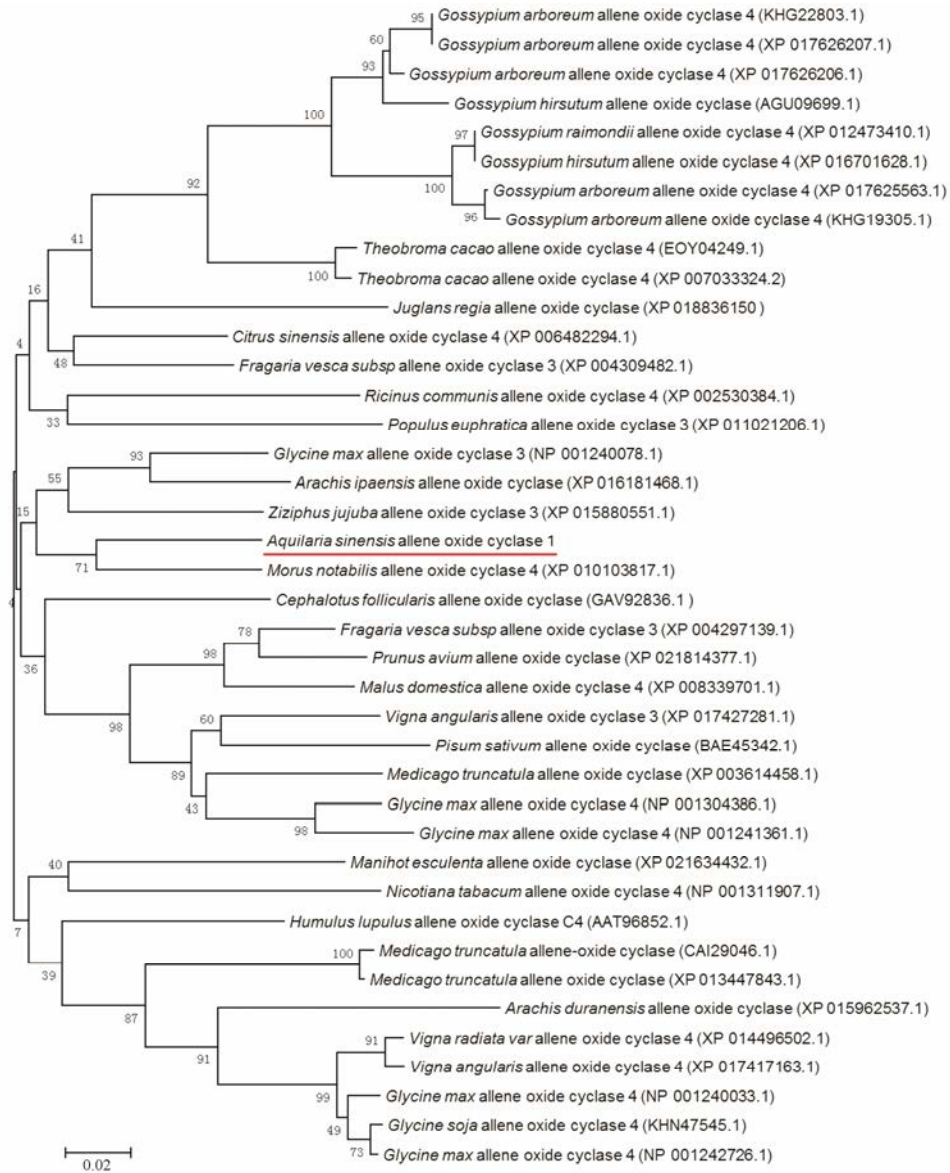


Figure 5 Phylogenetic analysis of AOC proteins from plants

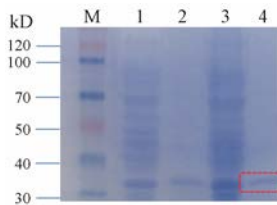


Figure 6 SDS-PAGE analysis of recombinant AsAOC1 protein. M: Marker; 1: Uninduced *E. coli* containing pET28a-AsAOC1; 2: Soluble protein from induced *E. coli* containing pET28a-AsAOC1; 3: Insoluble fraction from the induced *E. coli* containing pET28a-AsAOC1; 4: The purified recombinant AsAOC1 protein

实时荧光定量 PCR 分析, 检测 *AsAOC1* 的表达水平。实验结果显示盐、干旱、低温和重金属胁迫下均可以诱导 *AsAOC1* 基因的表达。经 NaCl 处理后 *AsAOC1* 基因表达量在 36 h 时达到最高, 之后随时间的增加

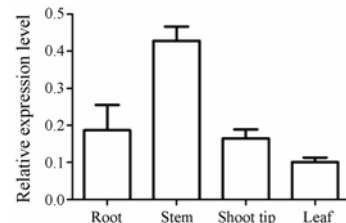


Figure 7 Relative expression level of *AsAOC1* gene in different tissues. Note: Repeat 3 samples, each for 3 times

表达量逐渐降低 (图 8)。而甘露醇诱导产生的干旱胁迫条件下, *AsAOC1* 的表达出现双峰现象, 在 12 h 表达量升高, 24 h 降低, 之后上升在 48 h 达到最高。在低温处理后, *AsAOC1* 的表达也出现双峰现象, 12 h 表达量达到最高, 是对照的 15.8 倍, 24 h 降低, 之后上升, 48 h 达到最高 (图 8)。在重金属胁迫下, 12 h

AsAOC1 表达量达到最高, 是对照的 31 倍, 之后 48 h 内的表达量逐渐降低 (图 8)。

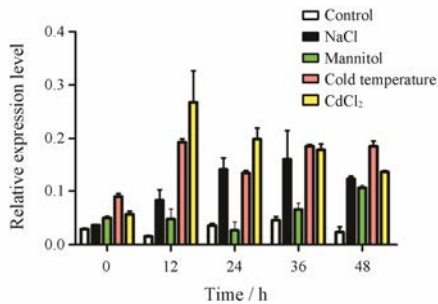


Figure 8 Relative expression level of *AsAOC1* gene under different abiotic stresses in *Aquilaria sinensis* calli. Note: Repeat 3 samples, each for 3 times

研究发现苹果 *MdAOC1* 基因能够被茉莉酸甲酯、水杨酸诱导^[18], 说明植物激素的调控可能是交叉作用的。本研究对白木香的愈伤组织进行茉莉酸甲酯、水杨酸、脱落酸和赤霉素处理, 实验结果表明, 茉莉酸甲酯诱导 *AsAOC1* 基因的表达, 在 24 h 达到最高, *AsAOC1* 基因的表达量是对照的 4 倍, 之后逐渐下降 (图 9)。水杨酸、赤霉素和脱落酸处理后使 *AsAOC1* 基因表达量上升, 在 12 h 表达量到达最高点, 之后逐渐降低 (图 9)。

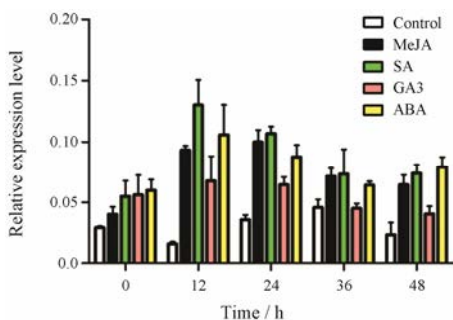


Figure 9 Relative expression level of *AsAOC1* gene under different hormone treatments in *Aquilaria sinensis* calli. MeJA: Methyl jasmonate; SA: Salicylic acid; GA3: Gibberellin; ABA: Abscisic acid. Note: Repeat 3 samples, each for 3 times

讨论

茉莉酸广泛存在于植物的幼嫩组织与器官中, 能够通过信号转导调节植物生长发育与应激反应。AOC 蛋白作为 JA 合成途径中的关键酶, 在苹果^[19]、玉米^[20]、拟南芥^[17]等多种植物中已有研究, AOC 能够参与茉莉酸及其衍生物的合成代谢, 对于植物的生长发育和抵抗逆境胁迫起到重要作用^[18]。而茉莉酸能够调控白木香中倍半萜类物质的生物合成^[7, 8], 同时研究表明盐胁迫能够诱导沉香中另一特征性成分

—苯乙基色酮的生物合成, 所以研究白木香的 *AsAOC1* 基因的原核表达及在不同非生物胁迫和激素处理下的表达分析, 有利于研究 *AsAOC1* 基因体外的生物合成功能和在植物防御反应中的作用, 为进一步研究 *AsAOC1* 基因在白木香的结香过程中的作用奠定基础。

目前多种植物中已经分离得到 AOC 基因, 本研究首次在白木香愈伤组织中扩增得到 *AsAOC1* 基因全长, 并对基因进行生物学信息分析, 细胞定位预测结果表明, 白木香 *AsAOC1* 定位于细胞质中; 三维结构预测结果表明白木香中 *AsAOC1* 与拟南芥中 AOC 的三维结构相似; 多重序列分析, 发现 *AsAOC1* 与其他物种具有较高的同源性, 含有 1 个高度保守的 allene-ox-cyc 结构, 聚类分析结果表明 *AsAOC1* 与桑树的相似性较高。本研究首次在大肠杆菌中表达了白木香的 *AsAOC1* 蛋白, 希望能够在蛋白水平研究白木香中 *AsAOC1* 蛋白的生物学功能和体外研究 *AsAOC1* 蛋白的生物合成功能。通过构建原核表达载体 pET28a-*AsAOC1* 在 BL21 (DE3) 菌株中诱导表达了白木香 *AsAOC1* 蛋白, 而且重组蛋白 *AsAOC1* 在表达菌中能够以可溶性蛋白存在, 经 SDS-PAGE 电泳结果显示, 纯化产物浓度较高且条带单一, 为进一步研究 *AsAOC1* 的功能奠定基础。

不同植物 AOC 在不同的组织器官中具有不同的表达模式, Stenzel 等^[21]发现拟南芥中 AOC 基因具有不同的表达模式, *AtAOC1* 和 *AtAOC2* 在叶中的表达量很高, *AtAOC3* 则在花组织中表达量较高, 而 *AtAOC4* 主要在根中表达。在苹果^[19]中 *MdAOC1* 基因在各组织中均有表达, 并且在茎中的表达量最高。本研究表明, 白木香的 *AsAOC1* 基因具有器官特异性, 在茎中表达量最高, 根和茎尖次之, 叶中的表达量最少。茉莉酸作为植物体内广泛存在的植物激素, 能够作为信号分子参与植物的抗逆反应。番茄在受到机械损伤时, 发现伤害处理后叶片中 AOC 的表达量上升^[22]; 高盐或低温处理麻风树, 发现经处理后 *JaAOC* 基因的表达量快速增加, 对其过表达可以提高转基因烟草的耐盐性和抗冻性^[23], 这表明 AOC 的表达可能在植物防御反应中起着重要作用^[24]。在植物生长过程中, 盐、干旱、低温和重金属是最常见的非生物胁迫, 本研究表明, 盐、低温、干旱以及重金属胁迫均能促进白木香 *AsAOC1* 基因的表达, 并且重金属镉对 *AsAOC1* 的表达量影响最大。这些实验结果表明 *AsAOC1* 基因参与植物的非生物胁迫防御反应, *AsAOC1* 基因也可能与盐胁迫诱导的沉香特征性成分 2-苯乙

基色酮的生物合成相关。

茉莉酸、水杨酸、赤霉素、脱落酸等植物激素不仅能够单独发挥作用,而且还可以依赖于各激素彼此间的相互作用,它们一起共同调节植物体重要的生命活动,形成复杂的应答网络^[25]。外源茉莉酸能够诱导苹果^[19]、水稻^[26]、拟南芥^[27]中 AOC 基因的表达;SA 处理能够促进水稻 AOC 基因的表达^[26],玉米中 SA 不仅促进 AOC 的表达,还刺激依赖 AOC 活性的 OPDA 的增加^[20]。水杨酸抑制喜树 CaAOC 基因的表达,而脱落酸能够极大的增强喜树 CaAOC 基因的表达,有意思的是,在研究水稻 OsAOC 基因的表达量时,发现脱落酸明显抑制其表达量,而水杨酸不但不抑制其表达,反而有增强其表达量的趋势^[28]。以上研究均表明多种激素参与调控 AOC 基因的表达。本研究中利用外源的茉莉酸、水杨酸、脱落酸和赤霉素处理白木香的愈伤组织,首次表明茉莉酸甲酯、水杨酸以及脱落酸均可以诱导白木香中 AsAOC1 基因的表达,说明 AsAOC1 基因的表达受多种激素调控。AsAOC1 基因是茉莉酸生物合成的关键酶,因此在沉香特征性成分生物合成过程中起重要作用,AsAOC1 基因的蛋白表达及非生物胁迫和激素处理下的表达分析,为进一步研究白木香结香的分子调控机制奠定基础,同时有利于丰富植物的防御反应的研究。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [2] CITES. Amendments to Appendix I and II of CITES [C]. Bangkok, Thailand: Proceedings of Thirteenth Meeting of the Conference of the Parties, 2004: 2–14.
- [3] State Environmental Protection Administration of China. Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences. List of Rare and Endangered Plants in China (Vol 1) (中国珍稀濒危保护植物名录:第一册) [M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [4] Feng YY, Zhang ZX, Shi SP, et al. Expression analysis of allene oxide synthase gene from *Aquilaria sinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1962–1969.
- [5] Zhang Z, Yang Y, Wei JH, et al. Advances in studies on mechanism of agarwood formation in *Aquilaria sinensis* and its hypothesis of agarwood formation induced by defense response [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2010, 41: 156–159.
- [6] Chen HQ, Wei JH, Yang JS, et al. Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. Chem Biodiv, 2012, 9: 236–250.
- [7] Xu YH, Liao YC, Zhang Z, et al. Jasmonic acid is a crucial signal transducer in heat shock induced sesquiterpene formation in *Aquilaria sinensis* [J]. Sci Rep, 2016, 6: 21843.
- [8] Liao YC, Xu YH, Zhang Z, et al. Prokaryotic expression and purification of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg AsMYC2 protein [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 662–667.
- [9] Wang XH, Gao BW, Liu X, et al. Salinity stress induces the production of 2-(2-phenylethyl)chromones and regulates novel classes of responsive genes involved in signal transduction in *Aquilaria sinensis* calli [J]. BMC Plant Biol, 2016, 16: 119.
- [10] Jiang KJ, Pi Y, Tang KX, et al. Jasmonate biosynthetic pathway: its physiological role and potential application in plant secondary metabolic engineering [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2010, 45: 137–148.
- [11] Schaller F. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signaling molecules [J]. J Exp Bot, 2001, 52: 11–23.
- [12] Stenzel I, Hause B, Maucher H, et al. Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato—amplification in wound signaling [J]. Plant J, 2003, 33: 577–589.
- [13] Yamada A, Saitoh T, Mimura T, et al. Expression of mangrove allene oxide cyclase enhances salt tolerance in *Escherichia coli*, yeast, and tobacco cells [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43: 903–910.
- [14] Pi Y, Liao Z, Jiang K, et al. Molecular cloning, characterization and expression of a jasmonate biosynthetic pathway gene encoding allene oxide cyclase from *Camptotheca acuminata* [J]. Biosci Rep, 2008, 28: 349–355.
- [15] Hamberg M, Fahlstadius P. Allene oxide cyclase: a new enzyme in plant lipid metabolism [J]. Arch Biochem Biophys, 1990, 276: 518–526.
- [16] Ziegler J, Stenzel I, Hause B, et al. Molecular cloning of allene oxide cyclase the enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 19132–19138.
- [17] Hause B, Stenzel I, Miersch O, et al. Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana* [J]. Phytochemistry, 2003, 64: 971–980.
- [18] Zhou Y, Wang TS, Dong K, et al. Cloning and expression analysis of allene oxide cyclase gene (*CfAOC*) in *Cymbidium faberi* [J]. North Hort (北方园艺), 2015: 84–89.
- [19] Cao YB, Bai SH, Dai HY. Cloning and expression analysis of allene oxide cyclase gene *MdAOC1* from *Malus domestica* [J]. Forestry Sci Technol (林业科学), 2013, 49: 73–80.
- [20] Ziegler J, Hamberg M, Miersch O, et al. Purification and characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds [J]. Plant Physiol, 1997, 114: 565–573.

- [21] Stenzel I, Otto M, Delker C, et al. Allene oxide cyclase (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue- and organ-specific promoter activities and *in vivo* heteromerization [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63: 6125–6138.
- [22] Hause B, Stenzel I, Miersch O, et al. Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles [J]. *Plant J*, 2000, 24: 113–126.
- [23] Liu B, Wang WG, Gao JH, et al. Molecular cloning and characterization of a jasmonate biosynthetic pathway gene for allene oxide cyclase from *Jatropha curcas* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2010, 32: 531–539.
- [24] Laudert D, Weiler EW. Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signaling [J]. *Plant J*, 1998, 15: 675–684.
- [25] Zhang GH, Zhang YJ, Gu RZ, et al. Advances on gibberellins mechanism [J]. *Acta Bot Boreal* (西北植物学报), 2009: 412–419.
- [26] Agrawal GK, Jwa NS, Agrawal SK, et al. Cloning of novel rice allene oxide cyclase (*OsAOC*): mRNA expression and comparative analysis with allene oxide synthase (*OsAOS*) gene provides insight into the transcriptional regulation of octadecanoid pathway biosynthetic genes in rice [J]. *Plant Sci*, 2003, 164: 979–992.
- [27] Stenzel I, Hause B, Miersch O, et al. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Boil*, 2003, 51: 895–911.
- [28] Agrawal GK, Jwa NS, Shibato J, et al. Diverse environmental cues transiently regulate *OsOPRI* of the “octadecanoid pathway” revealing its importance in rice defense/stress and development [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 310: 1073–1082.