

# 白木香 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的克隆与表达分析

董先娟<sup>1</sup>, 冯莹莹<sup>1</sup>, 刘 晓<sup>1</sup>, 齐博文<sup>1</sup>, 闫雅如<sup>1</sup>, 丁 宁<sup>1</sup>,  
吴 云<sup>1</sup>, 高博闻<sup>2\*</sup>, 王晓晖<sup>1\*</sup>

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

**摘要:** *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶 (*S*-adenosylmethionine synthetase, SAMS) 是植物代谢过程中的一个关键酶, 在植物响应生物与非生物胁迫中发挥着重要作用。本研究根据白木香转录组高通量测序结果结合 RACE、RT-PCR 技术从白木香愈伤组织中首次克隆得到 1 个 SAMS 基因, 命名为 *AsSAMS1*, 并对其进行生物学信息分析、原核表达与纯化、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 *AsSAMS1* 基因的开放阅读框 (ORF) 长 1 183 bp, 编码 393 个氨基酸, 其蛋白分子质量是 43.13 kDa。生物学信息分析表明 *AsSAMS1* 蛋白含有 3 个 SAMS 的特征序列, 系统进化树显示 *AsSAMS1* 蛋白与野大豆 (*Glycine soja*) SAMS 蛋白具有较高的同源性。构建原核表达载体 pET28a-*AsSAMS1* 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中成功表达 *AsSAMS1* 重组蛋白, 利用 Ni<sup>2+</sup>亲和色谱纯化得到可溶性 *AsSAMS1* 重组蛋白。实时荧光定量 PCR 检测结果表明 *AsSAMS1* 基因在茎中表达最高, 叶和茎尖次之, 在根中表达最低。盐、干旱、低温以及重金属胁迫均能够提高 *AsSAMS1* 的表达量及其产物 *S*-腺苷甲硫氨酸的含量; 茉莉酸甲酯、水杨酸、脱落酸、赤霉素也能够诱导白木香愈伤组织中 *AsSAMS1* 基因表达。本研究可以为进一步研究 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶在白木香结香机制和植物防御反应中的作用奠定基础。

**关键词:** 白木香; *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶; 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) 10-1743-10

## Cloning and expression analysis of *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Aquilaria sinensis*

DONG Xian-juan<sup>1</sup>, FENG Ying-ying<sup>1</sup>, LIU Xiao<sup>1</sup>, QI Bo-wen<sup>1</sup>, YAN Ya-ru<sup>1</sup>, DING Ning<sup>1</sup>,  
WU Yun<sup>1</sup>, GAO Bo-wen<sup>2\*</sup>, WANG Xiao-hui<sup>1\*</sup>

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

**Abstract:** *S*-adenosylmethionine synthetase, a key enzyme in plant metabolism, plays an essential role in the plant defence system. In present study, a full length cDNA sequence of *AsSAMS1* gene was cloned by RACE and reverse transcription PCR from *Aquilaria sinensis* calli. Meanwhile, the bioinformatics, prokaryotic expression, tissue-specific expression analysis, and expression analysis under different abiotic stresses and hormone treatments were performed. The open reading frame (ORF) of *AsSAMS1* gene was 1 183 bp, encoding a protein of 393 amino acids with a calculated molecular mass (MW) of 43.13 kDa. Bioinformatic analysis indicated that *AsSAMS1* contained 3 SAMS characteristic sequences. The phylogenetic analysis indicated that

收稿日期: 2018-06-27; 修回日期: 2018-09-04.

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

\*通讯作者 Tel: 86-10-64286180, E-mail: wangxhui2014@163.com;

Tel: 86-472-7167795, E-mail: gaobw001@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0591

AsSAMS1 protein had the highest level of homology with SAMS protein from *Glycine soja*. The recombinant AsSAMS1 protein was successfully expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells using the prokaryotic expression vector pET28a-AsSAMS1 and the recombinant AsSAMS1 was purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. Expression analysis results in different tissues indicated that *AsSAMS1* was primarily observed in stems, and then stem tips and leaves, following by roots. The transcript level of *AsSAMS1* and the content of *S*-adenosylmethionine (SAM) were induced by various abiotic stresses including salt, drought, cold, and heavy metal stress. Furthermore, *AsSAMS1* expression level was enhanced upon methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA), gibberellin (GA3), and abscisic acid (ABA) treatment. These results provided valuable insights for further study on the role of SAMS in the mechanism of agarwood formation and plant resistance.

**Key words:** *Aquilaria sinensis*; *S*-adenosylmethionine synthetase; bioinformatics analysis; prokaryotic expression; expression analysis

白木香 (*Aquilaria sinensis*) 是我国特有而珍贵的药用植物<sup>[1]</sup>, 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<sup>[2]</sup>和国家濒危二级保护植物<sup>[3]</sup>。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<sup>[1]</sup>, 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, 至今仍无法复制这种香味<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>。长期以来, 白木香为适应逆境胁迫<sup>[6, 7]</sup>, 进化产生了一系列对逆境胁迫的防御机制。在白木香遭受外界生物与非生物胁迫时, 可以使多种基因诱导表达<sup>[8, 9]</sup>, 进而引起植物体内抵御胁迫的反应。

*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶 (*S*-adenosylmethionine synthetase, SAMS) 是植物代谢过程中的一个关键酶, 它能催化 ATP 和甲硫氨酸反应生成 *S*-腺苷甲硫氨酸 (*S*-adenosyl-methionine, SAM), 是重要的甲基供体, 并且是生物合成多胺和乙烯等的前体, 能够参与植物的转氨丙基、转甲基和转硫等多种重要的生化反应过程, 在指导中间体走向特定生物合成途径中起着至关重要的作用<sup>[10–12]</sup>。同时, SAMS 还可以与 RNA 结合参与基因的表达调控<sup>[13]</sup>。研究表明, SAMS 基因的功能与植物的胁迫反应密切相关<sup>[14–16]</sup>。小麦中 SAMS 是其抗旱节水中的关键基因, SAMS 基因的表达受水分胁迫及水分胁迫后复水诱导<sup>[16]</sup>。Ma 等<sup>[17]</sup>发现盐地碱蓬中 SAMS 基因在盐胁迫下表达量升高, 酶活性检测发现盐胁迫条件下该酶的活性增强。Guo 等<sup>[18]</sup>研究

表明 ABA、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 NO 相互作用进而介导冷胁迫下 *MfsAMS1* 的表达, 并且过表达该基因后还可以显著提高 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的抗氧化保护作用, 可以增强转基因植株对低温和低温胁迫的耐受性, 说明 SAMS 基因能够提高植物的抗逆性。因而分离 *S*-腺苷甲硫氨酸合成酶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。目前在高山离子芥<sup>[19]</sup>、蜈蚣草<sup>[20]</sup>、番茄<sup>[21]</sup>、拟南芥<sup>[22]</sup>等植物中克隆得到了 SAMS 基因并对其相关功能进行了研究, 但是白木香 SAMS 基因的克隆、蛋白原核表达、及其在植物防御反应中作用尚未见文献报道, 因此研究白木香中 SAMS 的生物信息学、蛋白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 SAMS 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的结香机制。本研究中通过分析高通量测序结果, 利用 RT-PCR 结合 RACE 技术对白木香愈伤组织中克隆得到一条 SAMS 基因的 cDNA 全长, 命名为 *AsSAMS1*, 并对其序列进行了生物学信息分析和蛋白原核表达分析, 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amp;方法

**材料及处理** 白木香种苗是从广州移植, 现种植于北京中医药大学中药现代研究中心 6 年 (白木香培养条件: 室温 25 ℃左右, 湿度在 60% 左右), 采集 6 月份的白木香的根、茎、茎尖及叶提取总 RNA, 检测 *AsSAMS1* 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 mmol·L<sup>-1</sup>)、低温 (4 °C)、CdCl<sub>2</sub> (500 μmol·L<sup>-1</sup>)、甘露醇 (750 mmol·L<sup>-1</sup>) 4 种非生物胁迫及脱落酸 (ABA) (150 μmol·L<sup>-1</sup>)、茉莉酸甲酯 (MeJA) (150 μmol·L<sup>-1</sup>)、赤霉素 (GA3) (150 μmol·L<sup>-1</sup>)、水杨酸 (SA) (150 μmol·L<sup>-1</sup>) 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 *AsSAMS* 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 购自天根生物科技有限公司。高效液相色谱仪 (LC-20), 日本 Shimadzu 公司; 色谱柱: Ultimate LP-C18 (4.6 mm×250 mm, 5.0 μm), 中国月旭科技公司; *S*-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 购自美国 Sigma 公司; 三氯乙酸购自中国 Aladdin 公司。

**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。

**白木香 *AsSAMS1* 基因核心片段的克隆** 从白木香转录组高通量测序结果<sup>[6]</sup>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 *AsSAMS1* 核心片段, 依据该序列利用 Primer 软件设计两端特异引物, 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 *AsSAMS1* 基因进行扩增: cDNA 1 μL, LA Taq (2.5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, 10×LA Taq buffer 5 μL, dNTP Mix (2.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 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 2 min 30 s; 程序循环结束后 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 *AsSAMS1* 基因的 RACE 扩增** 根据已经获得的核心片段设计 2 条特异引物, 见表 1, 进行 RACE 扩增。按照 Clontech RACE 试剂盒将白木香的总 RNA 反转录成 cDNA, 并按照试剂盒说明书扩增白木香 *AsSAMS1* 基因的 3'端。将扩增的片段利用 Axygen DNA 凝胶回收试剂盒回收, 将回收后的 PCR 产物与 pMD19-T 连接, 转化到 DH5α 菌株, 在氨苄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。将 RACE 测序结果与核心序列结果进行拼接, 得到 *AsSAMS1* 基因的全长。根据拼接的序列, 设计特异引物, 以反转录 cDNA 为模板, PCR 验证序列的正确性。扩增程序为 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 2 min 30 s; 程序循环结束后 72 °C 延伸反应 10 min, 4 °C 保存。扩增产物进行电泳检测、切胶回收、克隆和测序验证。

**白木香 *AsSAMS1* 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、蛋白质分子量、理论等电点及稳定性等参数; 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 *AsSAMS1* 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

**Table 1** Primers sequence

Primer role	Primer name	Primers sequence (5'-3')
Core Sequence	SAMS-1	ATGGAGACCTTCTATTACATC
Amplification	SAMS-2	TCAATGATGATCTACGGCCAGTG
3' RACE	SAMS-3	CCTCGCAACCAAGCTTGGAGCACGCC
	SAMS-4	CGCTGCTGACCTCAAGGAGCATGTG
Sequence Amplification	SAMS-5	ATGGAGACCTTCTATTACATC
	SAMS-6	TCAAGCTTGGGGCTTCTCCAC
	SAMS-5E	CCGGAATTCATGGAGACCTTCTATTACATCTG
qRT-PCR	SAMS-3S	ACGCGTCACTCAAGCTTGGGGCTTCTCCAC
	SAMS-R1	CCACACCGTTCTTATCTCCAC
	SAMS-R2	CCACTCTGTCCACCTTTGT
	GAPDH-1	CTGGTATGGCATTCCGTGTA
	GAPDH-2	AACCACATCTCTTCGGTGTA

其他物种的 *SAMS* 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 1000 次。

**AsSAMS1 原核表达载体的构建及异源表达** 利用引物 SAMS-5E 和 SAMS-3S (表 1) 扩增 *AsSAMS1* 基因全长, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切包含有目的基因 *AsSAMS1* 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 DH5 $\alpha$  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-*AsSAMS1*, 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  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  活化过夜; 活化菌液按 1:100 比例加入到适量新鲜含有 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达 0.6 左右, 加 IPTG 至终浓度 0.8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。先 180  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达 0.4~0.6, 调节温度至 16  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 16 h 诱导 *AsSAMS1* 过度表达; 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心收集大肠杆菌菌体之后, 悬浮于 40  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  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 *AsSAMS1* 蛋白, 先以 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KPB 缓冲液 (pH 7.9, 含有 500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 和 40  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑) 洗脱以去除杂蛋白, 再以 15  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KPB 缓冲液 (pH 7.5, 含 10% 甘油和 500  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑) 洗脱目的蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测重组蛋白表达。

**白木香 *AsSAMS1* 基因在不同组织和不同的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 *AsSAMS1* 基因表达情况和不同胁迫处理和激素处理下不同时间的表达情况。分析使用 SYBR Green I 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  $\mu\text{L}$  STBR Premix Ex Taq 酶、上下游引物 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 0.4  $\mu\text{L}$ 、模板 0.5  $\mu\text{L}$ , 总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。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

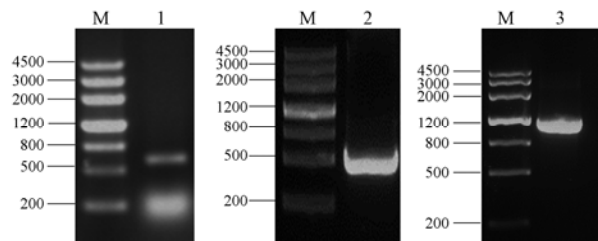
析, 每个温度以每步 0.5  $^{\circ}\text{C}$  上升, 每个温度停留 5 s。根据熔解曲线判断 RT-PCR 产物的特异性, 相对定量分析采用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  方法进行分析。

**愈伤组织中的 *S*-腺苷甲硫氨酸检测** 为验证 *AsSAMS1* 基因在胁迫和激素处理下的表达变化与产物 *S*-腺苷甲硫氨酸积累之间的关系, 将不同非生物胁迫处理后 *AsSAMS1* 基因表达量最高时间点的 0.3 g 白木香愈伤组织进行研磨, 提取研磨液置于 1.5 mL 离心管中, 加入 400  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  三氯乙酸 40  $\mu\text{L}$ , 冰上静置 30 min, 以 14000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min, 取上清 180  $\mu\text{L}$ , 用 0.22  $\mu\text{m}$  针头过滤器过滤, 进样分析。色谱条件: 流动相: A 乙腈, B 0.15% 三氟乙酸, 梯度洗脱程序: 0~10 min, 1% A; 10~15 min, 1%~95% A; 15~20 min, 95% A; 20~27 min, 1% A; 流速为 0.9  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样体积 8  $\mu\text{L}$ 。标准溶液配制: 称取 SAM 2.5 mg, 加水溶解, 配成浓度为 1.0、0.8、0.5、0.4、0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的标准溶液。

## 结果与分析

### 1 白木香 *AsSAMS1* 基因全长 cDNA 的克隆

利用 *AsSAMS1* 基因保守序列设计引物, 通过 RT-PCR 扩增获得白木香 *AsSAMS1* 基因的核心片段, 通过 BLAST 与 NCBI 中已知的 *SAMS* 基因序列进行比对分析, 确定该核心序列为 *SAMS* 基因序列, 见图 1A; 根据核心序列设计特异引物, 进行 3' RACE 扩增, 扩增结果见图 1B。3' RACE 扩增所得片段测序结果表明扩增序列与核心序列存在重叠片段, 说明此扩增序列为白木香 *SAMS* 基因序列, 将 3' RACE 扩增片段和核心片段序列拼接后得到含有完整 ORF 框的全长序列, 设计特异引物, 利用白木香 RNA 反转录产物进行扩增, 扩增结果如图 1C 所示, 扩增的序列全长为 1182 bp, 编码 393 个氨基酸, 测序结果与拼接结果一致, 将该基因命名为 *AsSAMS1*。

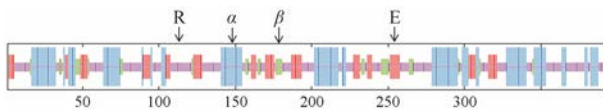


**Figure 1** Cloning of *AsSAMS1* gene from *Aquilaria sinensis* calli. M: DNA marker; 1: Amplification of *AsSAMS1* core sequence; 2: Amplification of *AsSAMS1* 3' RACE; 3: PCR product of *AsSAMS1* gene

## 2 AsSAMS1 的生物学信息分析

**2.1 AsSAMS1 理化性质分析、亚细胞定位、跨膜区域分析** 通过 ProtParam 软件预测 AsSAMS1 基因编码的蛋白的理化性质。推测 AsSAMS1 编码的蛋白分子式为 C<sub>1912</sub>H<sub>3008</sub>N<sub>528</sub>O<sub>585</sub>S<sub>14</sub>, 相对分子质量为 43 200.94, 理论等电点为 5.59, 不稳定系数 II 为 22.59, 属于稳定蛋白, 总平均亲水性 GRAVY 为 -0.342, 为亲水性蛋白; 利用 TMHMM 2.0 预测白木香 AsSAMS1 的跨膜区域, 预测结果表明 AsSAMS1 没有跨膜区域。

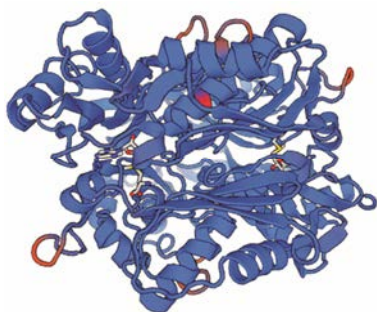
**2.2 AsSAMS1 蛋白的二级结构分析及三维结构预测** 运用 ExPASy 中的 SOPMA 工具预测 AsSAMS1 基因编码蛋白的二级结构, 结果显示 AsSAMS1 蛋白的二级结构由 43.26% 的随机卷曲 (random coil)、32.32% 的  $\alpha$ -螺旋 ( $\alpha$ -helices)、16.54% 的延伸链 (extended strand) 和 7.89% 的  $\beta$ -折叠 ( $\beta$ -turn) 组成 (图 2), 推测随机卷曲是其最大量的二级结构元件, 而  $\alpha$ -螺旋、延伸链和  $\beta$ -折叠散布于整个蛋白中。



**Figure 2** Predicted secondary structure of AsSAMS1 protein with SOPMA.  $\alpha$ :  $\alpha$ -helices;  $\beta$ :  $\beta$ -turn; E: Extended strand; R: Random coil

将白木香 AsSAMS1 的氨基酸序列通过 SWISS-MODEL Workspace 在线分析软件建立了 AsSAMS1 的三维结构模型, 因为目前的三级结构数据库中没有植物相关的 SAMS 的结构模型, 因此选择人类 SAMS 的结构模型为模板, 对白木香 AsSAMS1 的结构进行预测, 结果表明, 白木香 AsSAMS1 与人类 SAMS 一致性为 67.28%, 具有参考价值。具体三维结构如图 3 所示。

**2.3 白木香 AsSAMS1 氨基酸序列分析和系统进化树分析** 将白木香 AsSAMS1 氨基酸序列与 GenBank



**Figure 3** The deduced three-dimensional structure of AsSAMS1 protein

中其他植物中的 SAMS 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 AsSAMS1 包含 3 个 SAMS 的特征序列, 分别为 GHPDK、GAGDQGHMFGY、GGGAFSGKD (图 4 中用红色虚线标出)。多重比对分析发现, 白木香 AsSAMS1 氨基酸序列与橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、黑丝苔草 (*Gossypium raimondii*)、野生烟草 (*Nicotiana attenuata*) 中 SAMS 氨基酸序列相似性分别为 98%、97%、97%。说明白木香 AsSAMS1 的氨基酸序列与其他植物氨基酸序列之间有较高的同源性, 不同植物 SAMS 存在高度保守序列, 但也存在明显差异。为了进一步了解白木香 AsSAMS1 蛋白在植物 SAMS 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 35 条 SAMS 蛋白序列, 利用 MEGA6.0 构建了系统进化树 (图 5)。从图 5 可以看出, 白木香 AsSAMS1 与野大豆 (*Glycine soja*) SAMS 蛋白亲缘关系比较接近, 同源性为 57%, 可以确定该蛋白为 SAMS 蛋白, 并且 SAMS 种间保守性随着种属关系变远略有降低。

## 3 AsSAMS1 原核表达分析

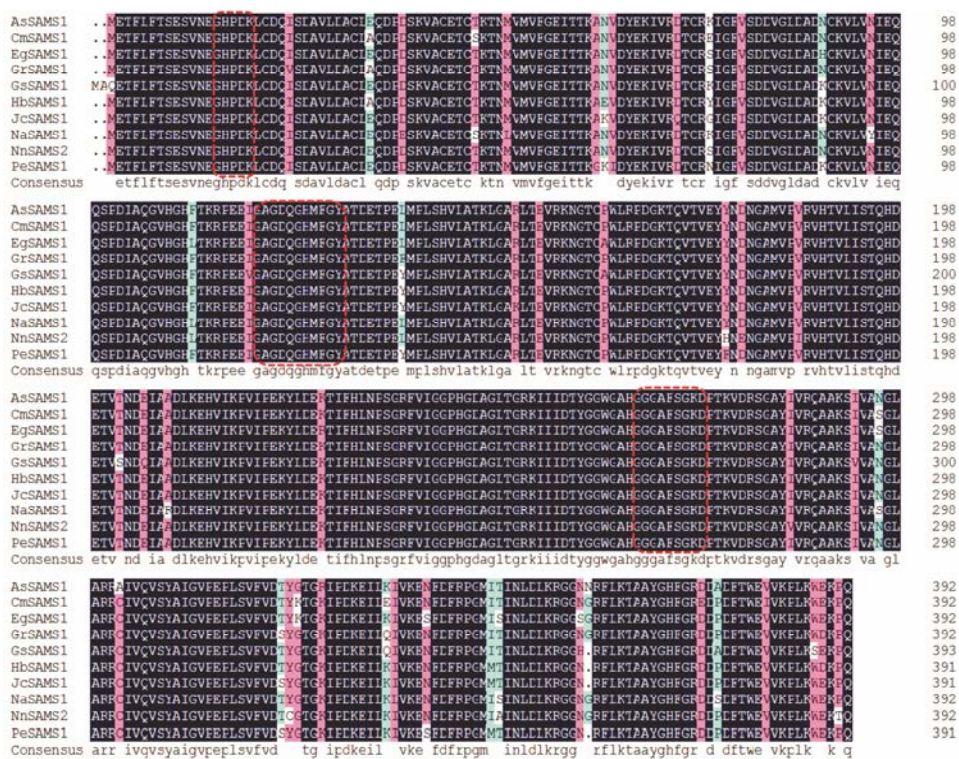
将原核表达载体 pET28a-AsSAMS1 质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 通过预实验探索及 SDS-PAGE 电泳检测蛋白是否可溶并确定最佳诱导条件, 使用终浓度为 0.8 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 于 16 °C 下诱导 16 h 达到最佳效果。由于 AsSAMS1 在其氨基酸序列的 N 端带有一个 6 个 His (组氨酸) 的标签, 用镍离子亲和色谱柱纯化 AsSAMS1 蛋白, 利用 SDS-PAGE 检测发现在 44 kDa 出现一条 AsSAMS1 蛋白纯化条带 (图 6)。

## 4 AsSAMS1 基因器官特异性表达分析

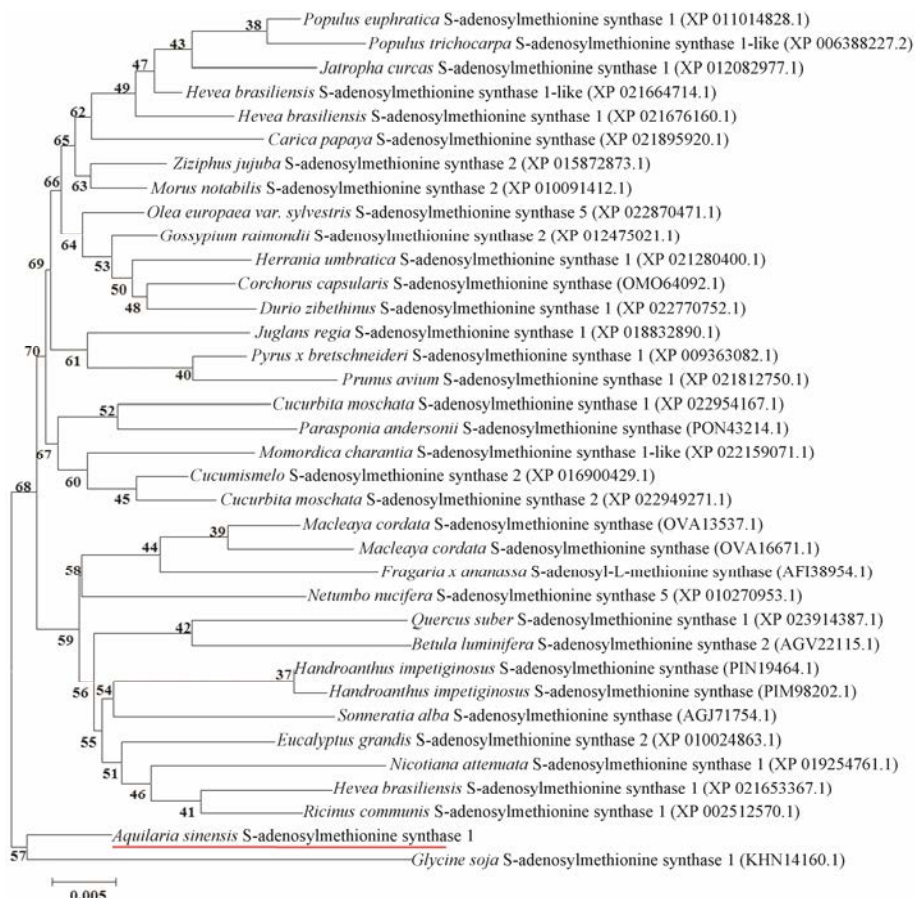
利用荧光定量 PCR 检测 AsSAMS1 基因的组织特异性表达, 结果显示 AsSAMS1 基因在白木香所有组织中均有表达, 在茎中表达最高, 叶和茎尖次之, 在根中表达最低, 说明 AsSAMS1 基因表达具有器官特异性 (图 7)。

## 5 AsSAMS1 基因在不同非生物胁迫和激素诱导下的表达分析

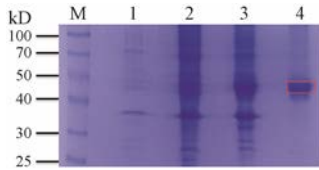
SAMS 在植物抗逆反应中起着重要作用<sup>[23]</sup>, 研究表明 SAMS 不仅能够响应低温<sup>[24]</sup>、干旱胁迫, 还能够参与盐胁迫与氧化胁迫等<sup>[25]</sup>。为验证白木香 AsSAMS1 在植物防御反应中的作用, 对白木香的愈伤组织分别进行盐、干旱、低温及重金属处理, 以相同生长情况下未进行任何处理的愈伤组织作对照, 不同时间点取样提取 RNA 后进行实时荧光定量 PCR 分析, 检测 AsSAMS1 的表达水平。实验结果显示盐、



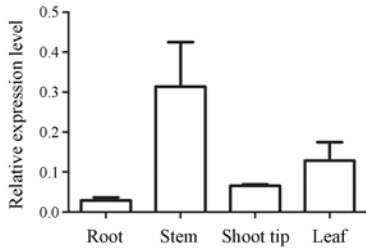
**Figure 4** Multiple sequence alignment of AsSAMS1 and SAMS from other plant species. Black shading indicates amino acid identities, red and blue shading indicates amino acid with different similarity. The conserved sequence of SAMS proteins are shown under the red line. As: *Aquilaria sinensis*; Na: *Nicotiana attenuata*; Nn: *Nelumbo nucifera*; Eg: *Eucalyptus grandis*; Hb: *Hevea brasiliensis*; Pe: *Populus euphratica*; Gr: *Gossypium raimondii*; Cm: *Cucurbita moschata*; Gs: *Glycine soja*; Jc: *Jatropha curcas*



**Figure 5** Phylogenetic analysis of SAMS proteins from plants



**Figure 6** SDS-PAGE analysis of recombinant AsSAMS1 protein. M: Marker; 1: Uninduced *E. coli* containing pET28a-AsSAMS1; 2: Soluble protein from induced *E. coli* containing pET28a-AsSAMS1; 3: Insoluble fraction from the induced *E. coli* containing pET28a-AsSAMS1; 4: The purified recombinant AsSAMS1 protein



**Figure 7** Relative expression level of *AsSAMS1* gene in different tissues. Note: Repeat 3 samples, each for 3 times

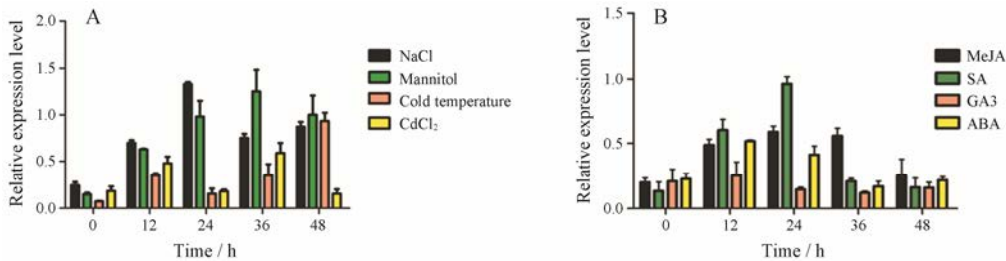
干旱、低温和重金属胁迫下都诱导 *AsSAMS1* 基因的表达。经 NaCl 处理后 *AsSAMS1* 基因表达出现双峰现象, 在 24 h 时达到最高, 之后随时间的增加表达量逐渐降低, 48 h 表达量再次升高 (图 8A)。而甘露醇诱导产生的干旱胁迫条件下, *AsSAMS1* 的表达随时间的增加在 36 h 表达量最高, 在低温处理后, *AsSAMS1* 的表达也出现双峰现象, 12 h 表达量升高, 24 h 降低,

之后上升, 48 h 达到最高 (图 8A)。在重金属胁迫下, *AsSAMS1* 表达量在 12 h 升高, 之后随时间的增加 36 h 的表达量达到最高, 出现双峰现象 (图 8A)。

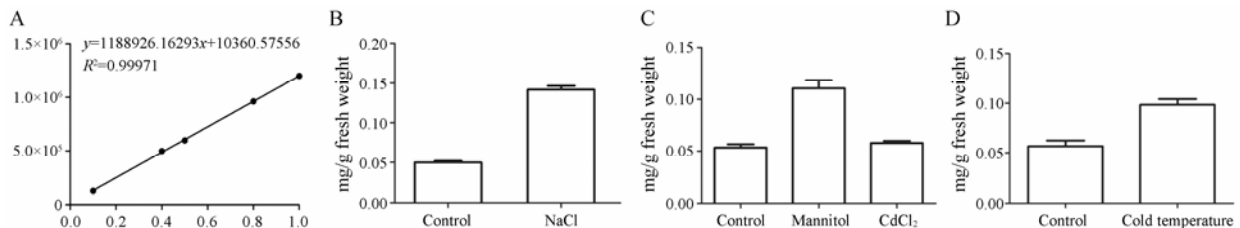
为研究白木香中扩增得到的 *AsSAMS1* 基因是否受到脱落酸 (ABA)、赤霉素 (GA3) 信号通路以及茉莉酸甲酯 (MeJA)、水杨酸 (SA) 等激素的诱导。本研究对白木香愈伤组织进行茉莉酸甲酯、水杨酸、赤霉素、脱落酸处理, 实验结果表明, 在茉莉酸甲酯和水杨酸诱导下, *AsSAMS1* 基因的表达量在 24 h 达到最高, 之后随时间的增加表达量逐渐降低 (图 8B); 而经 ABA 和 GA3 诱导后, *AsSAMS1* 的表达量在 12 h 最高 (图 8B)。利用 GA3 处理愈伤组织后, *AsSAMS1* 的表达量变化微小, 说明 GA3 对白木香中 *AsSAMS1* 基因的表达影响微弱。

## 6 不同胁迫影响 *S*-腺苷甲硫氨酸的合成

上述实验结果表明, 非生物胁迫条件下对白木香中 *AsSAMS1* 的表达量影响比较大, *AsSAMS1* 能够合成 *S*-腺苷甲硫氨酸 (SAM), 因此非生物胁迫下可能会影响 SAM 的积累量。为检测不同胁迫处理下 *AsSAMS1* 基因表达是否会影响白木香愈伤组织中产物 *S*-腺苷甲硫氨酸的积累, 本研究首先构建 SAM 的标准曲线。取配置好的标准品溶液, 采用优化的流动相和洗脱程序进行 HPLC 分析, 重复 3 次, 以峰面积 ( $y$ ) 对 SAM 浓度 ( $x$ ) 绘制标准曲线。如图 9A 所示。标准曲线方程为:  $y = 1\ 188\ 926.162\ 93x + 10\ 360.575\ 56$ ,



**Figure 8** Relative expression level of *AsSAMS1* gene under different abiotic stress and different hormone treatments in *Aquilaria sinensis* calli. A: Relative expression level of *AsSAMS1* gene under different abiotic stress; B: Relative expression level of *AsSAMS1* gene under different hormone treatments. MeJA: Methyl jasmonate; SA: Salicylic acid; GA3: Gibberellin; ABA: Abscisic acid. Note: Repeat 3 samples, each for 3 times



**Figure 9** Content of SAM under different abiotic stress in *Aquilaria sinensis* calli. A: The standard curve of SAM; B: The content of SAM under NaCl treatment at 24 h; C: The content of SAM under mannitol and CdCl<sub>2</sub> treatment at 36 h; D: The content of SAM under cold temperature at 48 h

$R^2 = 0.99971$ 。其次,检测不同胁迫处理下 *AsSAMS1* 基因表达量最高时 SAM 的积累量,实验结果表明盐胁迫对 *AsSAMS1* 基因表达量影响最大,并在 24 h 达到最高, SAM 积累量在盐胁迫诱导 24 h 下最高;重金属  $\text{CdCl}_2$  胁迫下对 *AsSAMS1* 基因表达量影响最小,而 SAM 的积累量也最少;甘露醇诱导产生的干旱胁迫和低温胁迫诱导产生的 SAM 积累量少于 NaCl 诱导下的积累量,但高于  $\text{CdCl}_2$  诱导下的积累量,这些实验结果表明在不同胁迫下 *AsSAMS1* 基因表达量上升, SAM 的积累量也上升, SAM 的积累量变化趋势与 *AsSAMS1* 基因表达量变化趋势一致。

## 讨论

S-腺苷甲硫氨酸合成酶是 S-腺苷甲硫氨酸代谢途径的关键酶,是乙烯、多胺等合成的前体物质<sup>[10,11]</sup>,在体内主要起转甲基、转硫和转丙氨基的作用。近年来研究表明 SAMS 作为 S-腺苷甲硫氨酸合成的催化酶,其能够参与植物的抗逆反应<sup>[26,27]</sup>。

SAMS 蛋白作为植物代谢过程中的关键酶,在番茄<sup>[21]</sup>、拟南芥<sup>[22]</sup>等植物中已有研究,同时 SAMS 也可以参与多种逆境胁迫,对于植物的生长发育起着重要作用<sup>[28,29]</sup>。所以对白木香中 *AsSAMS* 进行蛋白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 *AsSAMS* 基因体外合成功能和在植物防御反应中的作用,为进一步研究 *AsSAMS* 基因在白木香结香过程中的作用奠定基础。目前多种植物中分离得到 SAMS 基因,本研究利用 RACE、RT-PCR 技术首次在白木香愈伤组织中克隆得到 1 条 *AsSAMS1* 基因全长,并对其进行生物信息学分析,三维结构预测结果表明白木香中 *AsSAMS1* 与人类 SAMS 的三维结构相似;多重序列分析,发现 *AsSAMS1* 与其他物种具有较高的同源性,含有 3 个 SAMS 的特征序列,聚类分析结果表明 *AsSAMS1* 与野大豆 (*Glycine soja*) SAMS 蛋白的相似性较高。本研究首次在大肠杆菌中表达了白木香的 *AsSAMS1* 蛋白,希望能够在蛋白水平研究白木香中 *AsSAMS1* 蛋白的生物学功能和体外研究 *AsSAMS1* 蛋白的生物合成功能。本研究通过构建原核表达载体 pET28a-*AsSAMS1* 在 BL21 (DE3) 菌株中诱导表达了白木香 *AsSAMS1* 蛋白,而且重组蛋白 *AsSAMS1* 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,为进一步研究 *AsSAMS1* 的功能奠定基础。

不同植物 SAMS 在不同的组织器官中具有不同

的表达模式, Zhu 等<sup>[30]</sup>发现玉米中克隆得到的 *SAMS1-4* 具有组织特异性,在根茎中的表达量明显高于叶中的表达量。拟南芥中 2 个氨基酸序列相似性较高的 *SAMS1* 和 *SAMS2* 基因,在根和茎中的表达量很高<sup>[31]</sup>。本研究表明,白木香的 *AsSAMS1* 基因具有器官特异性,在茎中表达量最高,叶和茎尖次之,而根中的表达量最少。SAMS 作为 S-腺苷甲硫氨酸合成的催化酶,其能够参与植物的抗逆反应。蝴蝶兰在 4 °C 低温胁迫下 SAMS 基因能够在短时间内对低温做出积极调控反应,提高蝴蝶兰的抗冷能力<sup>[24]</sup>。苜蓿叶片中的 *MfSAMS1* 能够被低温诱导,转基因烟草发现,过表达 *MfSAMS1* 基因增强转基因植物的抗冷能力<sup>[18]</sup>。说明 SAMS 的表达可能在植物防御反应中起着重要作用。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 *AsSAMS1* 基因的表达及 SAM 的积累量的增加,并且 NaCl 对 *AsSAMS1* 的表达量和 SAM 的积累量影响最大;文献报道 NaCl 能够诱导白木香愈伤组织产生大量的 2-苯乙基色酮类化合物(沉香的主要特征成分)<sup>[6]</sup>。实验结果表明 *AsSAMS1* 基因参与植物的非生物胁迫防御反应, *AsSAMS1* 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。

SAMS 基因的表达能够受到外源脱落酸、赤霉素等的诱导<sup>[23,32]</sup>,番茄中 *SAMS1* 和 *SAMS3* 能够特异性地受 ABA 的诱导表达。ABA 诱导盐地碱蓬的 *SAMS2* 基因,发现其表达量明显提高。赤霉素能够调节小麦糊粉中 S-腺苷甲硫氨酸合成酶的表达<sup>[33]</sup>。脱落酸、赤霉素、茉莉酸甲酯、水杨酸等激素彼此间能够相互作用,共同调节植物体内重要的生命活动。因此,本研究利用外源的茉莉酸、水杨酸、脱落酸和赤霉素处理白木香的愈伤组织,表明茉莉酸甲酯、水杨酸以及脱落酸均可以诱导白木香中 *AsSAMS1* 基因的表达,但是赤霉素对其表达影响不大。文献报道茉莉酸甲酯和水杨酸均可以诱导沉香产生特征性成分—倍半萜类化合物<sup>[34,35]</sup>。本研究结果表明 *AsSAMS1* 基因的表达与沉香特征性成分的生物合成可能受多种激素交叉调控。对 *AsSAMS1* 基因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]. In Proceedings of Thirteenth Meeting of the Conference of the Parties, Bangkok, Thailand, 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] 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.
- [7] Wang XH, Dong XJ, Feng YY, et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NADPH oxidases involve in regulation of 2-(2-phenylethyl) chromones accumulation during salt stress in *Aquilaria sinensis* calli [J]. Plant Sci, 2018, 269: 1–11.
- [8] Dong XJ, Wang XH, Gao BW, et al. Cloning and expression analysis of allene oxide cyclase gene from *Aquilaria sinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2018, 53: 468–487.
- [9] Wang XH, Shi SP, Tu PF, et al. Identification and functional characterization of three type III polyketide synthases from *Aquilaria sinensis* calli [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 486: 1040–1047.
- [10] Roeder S, Dreschler K, Wirtz M, et al. SAM levels, gene expression of SAM synthetase, methionine synthase and ACC oxidase, and ethylene emission from *N. suaveolens* flowers [J]. Plant Mol Biol, 2009, 70: 535–546.
- [11] Merchante C, Alonso JM, Stepanova AN. Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation [J]. Curr Opin Plant Biol, 2013, 16: 554–560.
- [12] Sauter M, Moffatt B, Saechao MC, et al. Methionine salvage and *S*-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis [J]. Biochem J, 2013, 451: 145–154.
- [13] Grundy FJ, Henkin TM. Regulation of gene expression by effectors that bind to RNA [J]. Curr Opin Microbiol, 2004, 7: 126–131.
- [14] Kevbrin VV, Zengler K, Lysenko AM, et al. *Anoxybacillus kamchatkensis* sp. nov., a novel thermophilic facultative aerobic bacterium with a broad pH optimum from the Geyser valley, Kamchatka [J]. Extremophiles, 2005, 9: 391–398.
- [15] Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, et al. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling [J]. Annu Rev Plant Biol, 2009, 60: 455–484.
- [16] Chen R, Chen L, Hu YG, et al. Expression analysis of wheat *S*-adenosylmethionine synthetase gene during water stress and re-watering by semi-quantitative RT-PCR [J]. J Trit Crops (麦类作物学报), 2009, 29: 954–958.
- [17] Ma X, Wang Z, Qi Y, et al. Isolation of *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Suaeda salsa* and its differential expression under NaCl stress [J]. Acta Bot Sin, 2003, 45: 1359–1365.
- [18] Guo Z, Tan J, Zhuo C, et al. Abscisic acid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide interactions mediated cold-induced *S*-adenosylmethionine synthetase in *Medicago sativa* subsp. *falcata* that confers cold tolerance through up-regulating polyamine oxidation [J]. Plant Biotechnol J, 2014, 12: 601–612.
- [19] Ding C, Chen T, Yang Y, et al. Molecular cloning and characterization of an *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Chorispora bungeana* [J]. Gene, 2015, 572: 205–213.
- [20] Luo J, Liu M, Zhang C, et al. Transgenic centipedegrass (*Eremochloa ophiuroides* [Munro] Hack.) overexpressing *S*-adenosylmethionine decarboxylase (SAMDC) gene for improved cold tolerance through involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO signaling [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1655.
- [21] Gong B, Wang X, Wei M, et al. Overexpression of *S*-adenosylmethionine synthetase 1 enhances tomato callus tolerance to alkali stress through polyamine and hydrogen peroxide cross-linked networks [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2016, 124: 377–391.
- [22] Mao D, Yu F, Li J, et al. Feronia receptor kinase interacts with *S*-adenosylmethionine synthetase and suppresses *S*-adenosylmethionine production and ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell Environ, 2015, 38: 2566–2574.
- [23] Pulla RK, Kim YJ, Parvin S, et al. Isolation of *S*-adenosyl-L-methionine synthetase gene from *Panax ginseng* C.A. Meyer and analysis of its response to abiotic stresses [J]. Physiol Mol Biol Plants, 2009, 15: 267.
- [24] Yuan XY, Lei ZH, Cui B, et al. Cloning of a *S*-adenosylmethionine synthetase gene from *Phalaenopsis amabilis* and its expression under low temperature [J]. Plant Physiol J (植物生理学报), 2015, 51: 754–762.
- [25] Song XP, Yang LT, Li YR, et al. Cloning and expression of sugarcane *S*-adenosylmethionine synthetase gene *ScSAM* [J]. Acta Agron Sin (作物学报), 2014, 40: 1002–1010.
- [26] Shen W, Nada K, Tachibana S. Involvement of polyamines

- in the chilling tolerance of cucumber cultivars [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 431–440.
- [27] Hatmi S, Gruau C, Trotel-Aziz P, et al. Drought stress tolerance in grapevine involves activation of polyamine oxidation contributing to improved immune response and low susceptibility to *Botrytis cinerea* [J]. *J Exp Bot*, 2014, 66: 775–787.
- [28] Kasukabe Y, He L, Nada K, et al. Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45: 712–722.
- [29] Fan R, Wang H, Wang YL, et al. Proteomic analysis of soybean defense response induced by cotton worm (*Prodenia litura*, fabricius) feeding [J]. *Proteome Sci*, 2012, 10: 16.
- [30] Zhu JY, Wang HY, Yu AiL, et al. Differential expression of maize *S*-adenosylmethionin synthetase gene family members during salt stress [J]. *J Nucl Agric Sci (核农学报)*, 2011, 3: 427–431, 493.
- [31] Peleman J, Boerjan W, Engler G, et al. Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding *S*-adenosylmethionine synthetase [J]. *Plant Cell*, 1989, 1: 81–93.
- [32] Alcázar R, Altabella T, Marco F, et al. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance [J]. *Planta*, 2010, 231: 1237–1249.
- [33] Mathur M, Satpathy M, Sachar RC. Phytohormonal regulation of *S*-adenosylmethionine synthetase by gibberellic acid in wheat aleurones [J]. *BBA-Mol Cell Res*, 1992, 1137: 338–348.
- [34] Okudera Y, Ito M. Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria* calli and cell suspension cultures [J]. *Plant Biotechnol*, 2009, 26: 307–315.
- [35] 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.