

中国水仙水杨酸甲酯合成酶基因克隆与表达分析

林江波, 王伟英, 邹晖, 戴艺民*

(福建省农业科学院甘蔗研究所, 福建 漳州 363005)

摘要: 为了解中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)花香气形成的分子机理,以花发育形成相关基因的 SSH 文库获得的 cDNA 片段为基础,利用 RACE 技术从中国水仙花朵中克隆了水杨酸甲酯合成酶基因,命名为 *NtSAMT1* (GenBank No. JX273470),其 cDNA 全长 1323 bp,包含 1 个 1131 bp 完整阅读框架,编码 376 个氨基酸,具有 Methyltransf_7 superfamily 蛋白保守区,与仙女扇(*Clarkia breweri*) SAMT 蛋白(1m6eX)的三维结构相似。系统进化树分析表明,中国水仙与梗稻的 SAMT 蛋白亲缘关系最近。原核表达结果表明 *NtSAMT1* 在大肠杆菌中能高效表达。半定量 RT-PCR 分析表明, *NtSAMT1* 在花蕾期就有表达,第 1 天完全开放时各部位均有表达,以雄蕊与雌蕊的表达量最高,第 8 天已检测不到表达。

关键词: 中国水仙; 水杨酸甲酯合成酶; 基因表达

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.02.007

Cloning and Expression Analysis of *NtSAMT1* Gene from *Narcissus tazetta* var. *chinensis*

LIN Jiang-bo, WANG Wei-ying, ZOU Hui, DAI Yi-min*

(Sugarcane Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou 363005, China)

Abstract: In order to understand molecular mechanism of floral scent formation of *Narcissus tazetta* var. *chinensis*, based on a fragment cDNA from different florescence suppression subtractive hybridization (SSH), the salicylic acid carboxyl methyltransferase gene was cloned from *N. tazetta* var. *chinensis* by RACE and RT-PCR, named *NtSAMT1* (GenBank No. JX273470). The full length of *NtSAMT1* cDNA was 1323 bp with an 1131 bp ORF, which encoded a protein of 376 amino acids with a conservative domain of methyltransf_7 superfamily. *NtSAMT1* is similar to SAMT of *Clarkia breweri* (1m6eX) in three-dimensional structure. The *NtSAMT1* is predicted an unstable protein. Phylogenetic analysis showed that SAMT in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* had close relationship to that in *Oryza sativa Japonica* (BAD12867). Prokaryotic expression showed that recombinant pGEX-*NtSAMT1* had highly expression in *E. coil* BL21. Semi-quantitative RT-PCR revealed that *NtSAMT1* could expression in all tissues of buds, the expression in stamens and pistils was the highest at first day after blooming and its expression disappeared at the eighth day after blooming. The expression of *NtSAMT1* could be detected in scape, petal, corolla, stamen and pistil of the first day of blooming, expression of *NtSAMT1* in the first day flowers was in order as stamen, pistil > scape > petal, corolla.

Key words: *Narcissus tazetta* var. *Chinensis*; SAMT; Gene expression

中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*)为石蒜科(Amaryllidaceae)水仙花属多年生草本鳞茎花

卉,是中国十大名花之一。其花清新淡雅,具有很特殊的香味,是冬季室内观赏花卉的上品。戴亮等^[1]

收稿日期: 2012-04-23

接受日期: 2012-08-14

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2010J01091); 福建省农科院创新重点项目(2007YCXZ02)资助

作者简介: 林江波, 硕士, 副研究员, 主要从事观赏植物生物技术研究工作。E-mail: linjiangbo1976@yahoo.com.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: dymttn@yahoo.com.cn

利用色谱-质谱法(GC-MS)对漳州水仙花头香的化学成分分析结果表明,水仙花头香中含量最高的组分是酯类,约占 38%,其次为酮类、醇类和有机酸。黄巧巧等^[2]采用活性炭吸附丝累积采集水仙花开放过程中不同时段活体香气成分,鉴定了 55 种香气组分,其中萜烯类化合物有 10 种,醇类有 9 种,烯炔类 8 种,酮、醛类 6 种,酯类 3 种,醚类 3 种,酸类 1 种。对水仙花开放过程中香气释放的变化规律研究表明,在花开初期香气组分寥寥无几,随着花的盛开,其香气成分逐渐增多,到第 12 天时,鲜花吐香量达到最高,不同的化合物,其成熟规律不同。

水杨酸甲酯(methyl salicylic acid, MeSA)是植物内一种重要的气态甲酯分子,是花香味的主要组分之一^[3]。MeSA 是在水杨酸甲酯合成酶(S-adenosyl-L-Met: salicylic acid carboxyl methyltransferase, SAMT)的催化下,由 S-腺苷-L-蛋氨酸(SAM)提供甲基,由水杨酸(SA)提供羧基部分而合成的。迄今为止,已相继从仙女扇(*Clarkia breweri*)^[4]、金鱼草(*Antirrhinum majus*)^[5]、非洲茉莉(*Stephanotis floribunda*)^[6]、蜡梅(*Chimonanthus praecox*)^[7]等植物中克隆到 SAMT 基因,但还未见到有关中国水仙 SAMT 基因的研究报道。我们在构建中国水仙花发育形成相关基因的 SSH 文库,筛选克隆中国水仙花发育相关的 cDNA 片段的研究过程中,获得一个编码与已知植物 SAMT 氨基酸序列有较高同源性的 cDNA 片段。为了更好地了解中国水仙花香气形成的分子机理,利用 RACE 技术克隆了该基因全长 cDNA 序列,并利用生物信息学方法,对其编码产物的序列特征、理化性质等进行预测,构建了原核表达载体并成功诱导表达,通过半定量 RT-PCR 技术分析该基因在中国水仙各器官中的表达情况,为进一步研究该基因的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

中国水仙(*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) ‘金盏银台’商品球购自福建省龙海市九湖镇,用清水培养。分别取不同花期的花,用液氮冻结后,置于 -70℃ 冰箱中保存备用。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 HB101、BL21 (DE3),原核表达载体 pGEX-4T-1 由福建省农业科学院甘蔗研究所基础实验室保存。克隆载体

pMD19-T,购自宝生物工程(大连)有限公司。

Ex Taq DNA 聚合酶、BamH I、Xho I、Prime-Script™ Reverse Transcriptase、RNAiso Plus 和 5'-Full RACE Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 总RNA的提取与cDNA的克隆

采用 RNAiso Plus 进行总 RNA 的提取,用微量紫外可见分光光度计(ND-1000)测定 260 nm 和 280 nm 下的吸光值,计算 RNA 纯度和浓度。用 PrimeScript™ Reverse Transcriptase 进行 cDNA 第 1 链的合成。

根据从 SSH 文库中获得的 cDNA 序列,设计 5' RACE 引物 SAMT5: 5'-GCCTTTACTTCTCCATAGC-3', 3' RACE 引物 SAMT3: 5'-GATAGGAAGGG-ATGATGTGC-3' 和 3' adaptor 引物: 5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTT-3'。5' RACE 按照 5'-Full RACE Kit 说明书操作, Inner PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。3' RACE 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后,切胶回收目的片断,检验产物胶回收情况。将 PCR 胶回收产物连接到 pMD19-T 上,转化大肠杆菌,挑选单克隆进行扩繁,对单克隆进行 PCR 验证,挑选阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测序结果用 DNAMAN V 6.0 进行拼接。

1.3 序列分析与比较

将拼接结果通过 BLAST X 和 BLAST P 搜索 NCBI 的核苷酸和蛋白质数据库,进行序列相似分析及氨基酸保守结构域预测;用 ProtParam 对蛋白质进行理化性质分析;登陆 <http://swissmodel.expasy.org/>, 使用自动搜索模式预测蛋白质的三级结构^[8-10]。

1.4 原核表达载体的构建及表达

根据拼接结果,设计 1 对引物: SAMET1: 5'-GGGGATCCATGAAGGTTGAAGTTGATC-3'; SAMET2: 5'-GGGCTCGAGTTATACGACATTA-

CATC-3'。在引物上下游分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点,用于扩增 SAMT 基因完整开放阅读框。PCR 扩增条件如下:94℃预变性 5 min,然后 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1.5 min,共 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物和原核表达载体 pGEX-4T-1 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,回收基因和载体片段。将基因片段和 pGEX-4T-1 载体片段用 T₄ DNA 连接酶连接过夜,连接产物转化感受态 HB101,涂在含有 Amp 的 LB 平板上,挑取单克隆进行扩繁,对单克隆进行 PCR 验证后,送上海生工生物工程技术有限公司测序。将鉴定为阳性的重组原核表达质粒转化大肠杆菌 *Esheria coli* BL21 (DE3),用 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 检测,考马斯亮蓝 R-250 染色检测蛋白表达情况。

1.5 基因表达

以等量的总 RNA 合成 cDNA 第一链,运用半定量 RT-PCR 检测基因的表达情况。*NtSAMT1* 引物为 SAMT3 和 SAMT5,产物长度 471 bp,以中国水仙 *ACTIN* 基因(本实验室克隆,未发表)为内参,引物分别为:ACT3: 5'-GCGGGGCATTTTGA CTTTGA-3' 和 ACT4: 5'-GAGAACCTCTGGGCATCGGA-3',产物长度 601 bp。PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min,然后 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 40 s, 26 个循环。重复 3 次,使结果一致。

2 结果和分析

2.1 5' RACE和3' RACE

以提取的 RNA 为模板,参照 5'-Full RACE Kit 说明书进行第一链合成,用引物 SAMT5 和试剂盒

提供的引物 5' RACE Outer Primer 和 5' RACE Inner Primer 进行 PCR;用随机引物反转录的 cDNA 为模板,用引物 SAMT3 和 3' adaptor 进行 PCR。将 PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,5' RACE 在 900 bp 左右有 1 条亮带(图 1: A),3' RACE 在 900 bp 左右有 1 条亮带(图 1: B)。PCR 产物回收连接、转化及 PCR 验证后送上海生工生物工程技术有限公司测序,分析测序结果显示获得 5' 末端和 3' 末端。

将 3' RACE 和 5' RACE 的测序结果用 DNAMAN V6.0 进行序列拼接及开放阅读框分析。结果表明,所获得的 cDNA 全长有 1323 bp (GenBank No. JX273470),包含 1 个 1131 bp 完整阅读框,编码 376 个氨基酸,5' 末端非翻译区 58 bp,3' 末端非翻译区 134 bp,命名为 *NtSAMT1*。

2.2 开放阅读框的克隆

用随机引物反转录的 cDNA 为模板,用引物 SAMET1 和 SAMET2 进行 PCR 扩增,电泳结果显示在 1200 bp 左右的地方有一条亮带,大小与拼接得到的 *NtSAMT1* 完整开放阅读框大小一致(图 1: C)。PCR 产物回收连接、转化及 PCR 验证后送上海生工生物工程技术有限公司测序,测序结果与拼接结果一致,获得带 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的 *NtSAMT1* 的 ORF。

2.3 生物信息学分析

利用 NCBI 的 BLAST P 在蛋白保守区数据库 (Conserved Domain Database, CDD)对 *NtSAMT1* 基因进行蛋白保守区预测,结果有 1 个与该基因匹配的蛋白保守区,为 Methyltransf_7 superfamily, E 值为 9.47E-109;使用 BLAST X 软件对推导

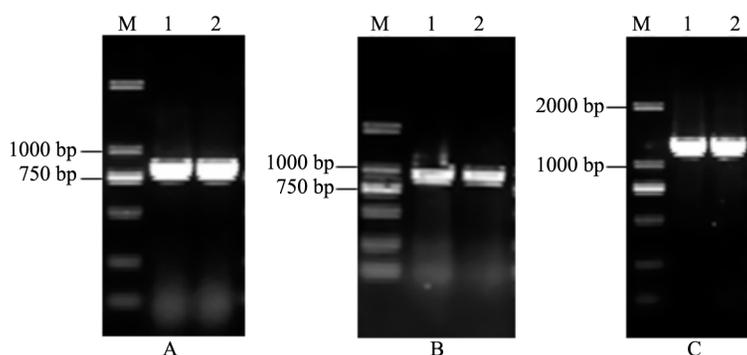


图 1 PCR 电泳结果。M. 分子量标记; A. 5'RACE; B. 3'RACE; C. 开放阅读框。

Fig. 1 PCR products by electrophoresis. M. DNA marker (100–2000); A. 5' RACE; B. 3' RACE; C. ORF.

的 NtSAMT1 氨基酸序列进行同源性检索,结果表明, NtSAMT1 与 粳稻(*Oryza sativa* 'Japonica', BAD12867)、蜡梅(ABU88887)、大豆(*Glycine max*, ACF33514)的同源性均为 66%;在 <http://swissmodel.expasy.org> 上对 NtSAMT1 蛋白质的三级结构进行预测,结果表明, NtSAMT1 与 仙女扇的 SAMT(1m6eX)蛋白质的三维结构相似,氨基酸序列同源性为 40.69%;利用 MEGA 软件将 NtSAMT1 推导的氨基酸序列与其他 12 种物种的 SAMT 进行聚类分析(图 2),结果表明, NtSAMT1 与 粳稻的亲缘关系最近,同处一个分枝上。

ProtParam 预测表明,该蛋白的分子量为 42.49 kD,理论等电点为 5.06,负电荷的氨基酸残基数(Asp + Glu)为 52,正电荷的氨基酸残基数(Arg + Lys)为 34;脂肪系数为 82.87,总平均疏水性为 -0.104,不稳定系数为 45.53,是不稳定的蛋白。

PROSITE 在线分析结果表明, NtSAMT1 推导的氨基酸序列中有一系列与蛋白修饰调控有关的功能位点,包括 4 个 N-酰基化位点(14 ~ 19、101 ~ 106、133 ~ 138、172 ~ 177), 2 个 N-糖基化位点(23 ~ 26、366 ~ 369), 5 个酪蛋白激酶 II 磷

酸化位点(25 ~ 28、41 ~ 44、232 ~ 235、249 ~ 252、340 ~ 343), 3 个蛋白激酶 C 磷酸化位点(41 ~ 43、48 ~ 50、86 ~ 88)。

2.4 原核表达

重组原核表达质粒 pGEX-NtSAMT1 转化入大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3),用 1 mmol L⁻¹ IPTG 诱导 6 h 后,经 SDS-PAGE 电泳及考马斯亮蓝染色。结果(图 3)表明,携带重组质粒 pGEX-NtSAMT1 的 *E. coli* 菌株中出现 1 条约 68.5 kDa 的蛋白条带,而未诱导的菌株中无相应蛋白条带。由于融合蛋白中 GST 编码的蛋白约为 26 kDa,因此,所表达的蛋白条带大小与 NtSAMT1 预测的 42.49 kDa 基本一致。

2.5 表达分析

用半定量 RT-PCR 法对 NtSAMT1 基因在中国水仙不同花期的表达进行分析,结果表明, NtSAMT1 在花蕾中就有表达,完全开放第 1 天的表达量最高,第 2 天开始表达量略有下降,到第 8 天已检测不到表达。同时, NtSAMT1 在完全开放第 1 天的花萼、花瓣、副冠、雄蕊和雌蕊等部位中均有表达,但表达

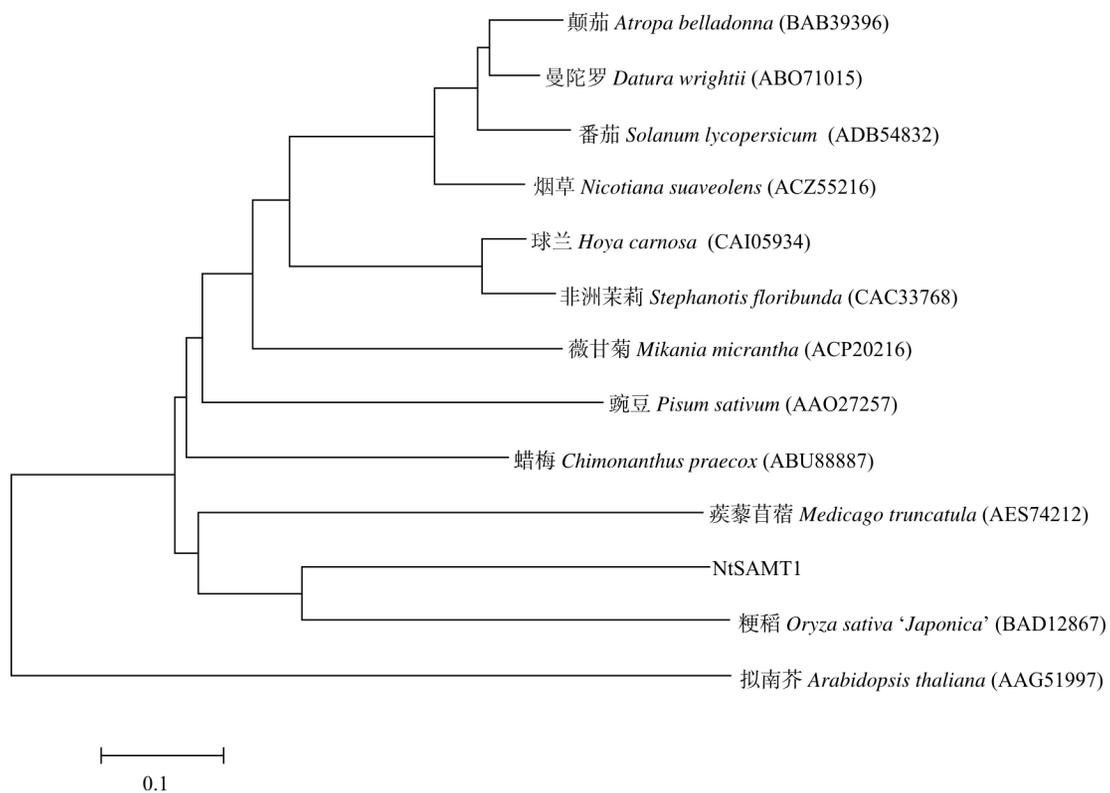


图 2 NtSAMT1 与已知 SAMT 基因氨基酸同源性比对树状图

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the amino acid of NtSAMT1 and twelve SAMT alignment.

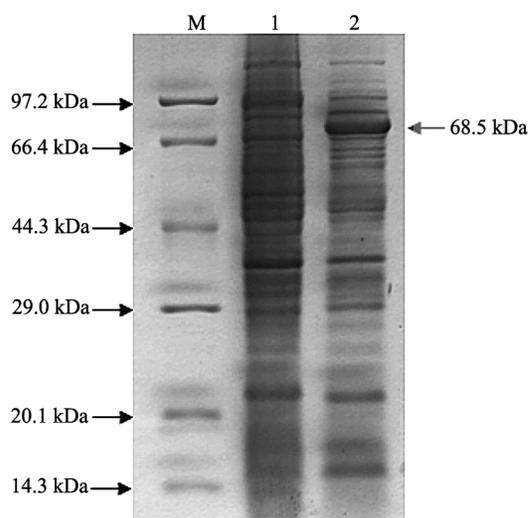


图3 *NtSAMTI* 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳。M. 分子量标记; 1. 诱导前; 2. 诱导后。

Fig. 3 SDS-PAGE of *NtSAMTI* expressed in *Escherichia coli*. M: Marker; 1. Before induction; 2. After induction.

量存在差异,以雄蕊与雌蕊的表达量最高,其次是花萼,花瓣与花冠的表达量最低。而 *ACTIN* 基因在开花的各时期的表达量基本一致(图 4)。

3 讨论

MeSA 是植物花香味的主要成分之一,在 SAMT 的催化下,由 SAM 提供甲基,SA 提供羧基部分合成。SAMT 属于 Methyltransf_7 superfamily 成员。对仙女扇 SAMT 蛋白的三维结构已有详细的研究^[11]。本研究从中国水仙的花朵中克隆到了 *NtSAMTI* 基因,推导的氨基酸序列具有一个 Methyltransf_7 superfamily 保守区,其蛋白三维结构与仙女扇(1m6eX) SAMT 蛋白的三维结构相似。因此,可以推断其属于水杨酸甲酯合成酶基因。

Dudareva^[12]等研究了仙女扇花朵苯环型酯类

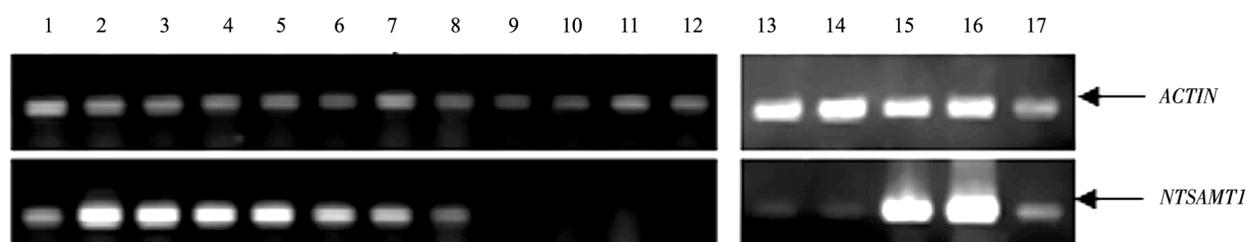


图4 *NtSAMTI* 基因的表达。1. 花蕾; 2~12. 完全开放的第1~11天; 13. 花瓣; 14. 副冠; 15. 雄蕊; 16. 雌蕊; 17. 花萼。

Fig. 4 Expression of *NtSAMTI*. 1: Bud; 2~12. Blooming from the first to eleventh day; 13: Petal; 14: Corolla; 15: Stamen; 16: Pistil; 17: Scape.

的释放规律,水杨酸甲酯在花开放 12~24 h 的释放量达到最高,第 2 天的前 12 h 还维持高水平,此后开始下降;乙酸苜酯的释放高峰是在开放的 12~24 h;苯甲酸苜酯的释放高峰期是在开放的 24~36 h;花瓣是水杨酸甲酯和乙酸苜酯的主要释放器官,雌蕊是苯甲酸苜酯的主要释放器官。*NtSAMTI* 在花蕾期就有表达,完全开放的第 1 天表达量最高,第 2 天表达量开始稍微下降,到第 8 天已没有表达,可见 *NtSAMTI* 在花期的表达模式与花朵香气的散发过程是基本一致的。*NtSAMTI* 在第 1 天完全开放的雄蕊与雌蕊的表达量最高,这可能与吸引昆虫授粉有关^[13]。

SA 是苯甲酸(BA)的一种衍生物, SAMT 并非特异地甲基化 SA。仙女扇的 SAMT 相对特异地甲基化 SA,也会甲基化 BA 及其它衍生物,但对 BA 及其衍生物的甲基化效率较低^[4,14]。Pott 等^[14]的研究表明,非洲茉莉(*Stephanotis floribunda*)的

SAMT 对 SA 甲基化活性是 BA 甲基化活性的 9 倍,但花朵散发出的苯甲酸甲酯的量是水杨酸甲酯的 15 倍,这与体内含有的 SA、BA 的总量有关, *S. floribunda* 花瓣中 BA 含量是 SA 含量的 1000 到 2000 倍。*NtSAMTI* 表达量与其编码的酶活性间的关系及对 SA 的甲基化活性的影响还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Dai L, Yang L P, Guo Y J, et al. Analysis of fragrance volatile chemical constituents of Zhangzhou narcissus [J]. *Chin J Chromatogr*, 1992, 10(5): 280-283.
戴亮, 杨兰苹, 郭友嘉, 等. 漳州水仙花头香的化学成分分析 [J]. 色谱, 1992, 10(5): 280-283.
- [2] Hang Q Q, Feng J Y. Study on the variation in narcissus aroma composition during blossoming [J]. *J Instrum Anal*, 2004, 23(5): 110-113.
黄巧巧, 冯建跃. 水仙花开放期间香气组分变化的研究 [J]. 分

- 析测试学报, 2004, 23(5): 110–113.
- [3] Knudsen J T, Tollsten L, Bergström L G. Floral scents: A checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques [J]. *Phytochemistry*, 1993, 33(2): 253–280.
- [4] Ross J R, Nam K H, D'Auria J C, et al. S-adenosyl-L-methionine: Salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 367(1): 9–16.
- [5] Negre F, Kolosova N, Knoll J, et al. Novel S-adenosyl-L-methionine: Salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme responsible for biosynthesis of methyl salicylate and methyl benzoate, is not involved in floral scent production in snapdragon flowers [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 406(2): 261–270.
- [6] Pott M B, Effmert U, Piechulla B. Transcriptional and post-translational regulation of S-adenosyl-L-methionine: Salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT) during *Stephanotis floribunda* flower development [J]. *Plant Physiol*, 2003, 160(6): 635–643.
- [7] Ma L, Li H F, Peng C C, et al. Cloning of SAMT gene cDNA from *Chimonanthus praecox* and its expression in *Escherichia coli* [J]. *Agri Sci Techn*, 2012, 13(1): 88–93.
- [8] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(2): 195–201.
- [9] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(13): 3381–3385.
- [10] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(15): 2714–2723.
- [11] Zubieta C, Ross J R, Koscheski P, et al. Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(8): 1704–1716.
- [12] Dudareva N, Raguso R A, Wang J H, et al. Floral Scent Production in *Clarkia breweri*: III. Enzymatic synthesis and emission of benzenoid esters [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(2): 599–604.
- [13] Dudareva N, Murfit L M, Mann C J, et al. Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(6): 949–961.
- [14] Pott M B, Hippauf F, Saschenbrecker S, et al. Biochemical and structural characterization of benzenoid carboxyl methyltransferases involved in floral scent production in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens* [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 1946–1955.