

# 薇甘菊水杨酸羧甲基转移酶基因的 分离鉴定及表达分析

王文天<sup>1,2</sup>, 彭少麟<sup>1,3\*</sup>, 李冬梅<sup>3</sup>, 王冬梅<sup>3</sup>, 王瑞龙<sup>3</sup>,  
田彩娟<sup>1</sup>, 赵厚本<sup>1</sup>, 卢桂敏<sup>1</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 中山大学生命科学学院, 广州 510275)

**摘要:**为研究水杨酸羧甲基转移酶基因在植物防御系统中的作用, 采用 RACE 法从薇甘菊(*Mikania micrantha*) cDNA 文库中克隆到薇甘菊水杨酸羧甲基转移酶基因 *SAMT* 全长 cDNA, 并进行外源表达以及水杨酸诱导模式分析。结果表明, 该基因 cDNA 全长 1 299 bp, 其中编码区长 1 089 bp, 编码 362 个氨基酸, Blast 显示该基因编码的氨基酸序列与仙女扇(*Clarkia breweri*)的相似性为 74%, 证实其主要功能是将水杨酸(salicylic acid, SA)甲基化成水杨酸甲酯(methyl salicylate, MeSA), 由此将该基因命名为 *MmSAMT*, GenBank 登录号为 FJ869889。将 *MmSAMT* 编码序列克隆至 pET-32a (+)载体, 转化 Rosetta-gami (DE3) 中表达, SDS-PAGE 显示单体分子量在 40 kD 左右, 与预测结果一致。Western blot 显示在 20℃、0.05 mmol/L IPTG 和 180 r min<sup>-1</sup> 下诱导 6 h, 可获得较多的可溶性蛋白质。对喷施 100 μmol/L SA 薇甘菊叶片中 *MmSAMT* 的转录谱进行研究, 该基因的诱导受到 SA 的激活, 48 h 的表达水平达最高, 暗示 *MmSAMT* 可能通过催化合成 MeSA 引发系统获得性抗性, 提高抗性防御的警戒等级。

**关键词:** 薇甘菊; *SAMT*; RACE; 原核表达; Western blot; RT-PCR;

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)05-0445-06

## Cloning, Identification and Expression of Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Gene from *Mikania micrantha*

WANG Wen-tian<sup>1,2</sup>, PENG Shao-lin<sup>1,3\*</sup>, LI Dong-mei<sup>3</sup>, WANG Dong-mei<sup>3</sup>,  
WANG Rui-long<sup>3</sup>, TIAN Cai-juan<sup>1</sup>, ZHAO Hou-ben<sup>1</sup>, HU Gui-min<sup>1</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** In order to study the role of salicylic acid carboxyl methyltransferase (*SAMT*) in plant defense system, a full-length cDNA of *Mikania micrantha SAMT* was cloned from the SMART cDNA library by RACE, then the exogenous expression and induction pattern by SA were studied. The results showed that the full-length cDNA was 1299 bp, with a 1089 bp-length coding sequence (CDS) encoding a protein of 362 amino acids. Blast result showed 74% similarity with the amino acids of *Clarkia breweri CbSAMT*, confirming that *Mikania micrantha SAMT* may play a role in methylating SA into MeSA. Therefore this gene was named as *MmSAMT* and its GenBank accession number was FJ869889. Subsequently the CDS of *MmSAMT* was integrated into pET-32a(+), then the recombinant plasmid was transformed into Rosetta-gami (DE3) for exogenous expression. A specific monomer about 40 kD could be detected by SDS-PAGE, which was consistent with prediction. Western blot showed that the efficient solubility could be obtained cultured under 20℃, 0.05 mmol/L IPTG, 180 r min<sup>-1</sup> for 6

收稿日期: 2009-02-23 接受日期: 2009-05-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(NSFC 30670385; U0633002)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

hours. The transcription profile of *MmSAMT* in *M. micrantha* leaves sprayed 100  $\mu\text{mol/L}$  SA revealed that it could be activated by SA and reached a peak after 48 hours. It implied that *MmSAMT* may participate in the SA signaling pathway via MeSA, and induce the systemic acquired resistance (SAR) as a key signal and enhance the plant defense system.

**Key words:** *Mikania micrantha*; SAMT; RACE; Prokaryotic expression; Western blot; RT-PCR

SAMT 是一种以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,水杨酸(salicylic acid, SA)为受体的甲基转移酶,催化合成水杨酸甲酯(methyl salicylate, MeSA)。由于 SA 在植物防御系统中具有极其重要的地位,MeSA 也因类似的作用而受到广泛关注。Ross 等<sup>[1]</sup>从仙女扇(*Clakia breweri*)中克隆了第一个 SAMT 基因,至今已有近 30 个 SAMT 基因得到了鉴定。虽然关于 SAMT 的研究集中在花香挥发性成分合成方面<sup>[2-3]</sup>,但近来的研究表明,SAMT 在植物防御系统中同样起着重要的作用。Remco 等<sup>[4]</sup>在纹白蝶(*Cotesia rubecula*)取食拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)所诱导的挥发性成分中发现含有 MeSA。在野生型和高盐敏感型拟南芥中,盐胁迫均可诱导 *AtSAMT* 表达上调<sup>[5]</sup>。Fukami 等<sup>[6]</sup>用 SA 处理颠茄(*Atropa belladonna*),12 h 后在其发根培养中的 SAMT 被激活,并长时间持续表达。Helena 等<sup>[7]</sup>用汞处理豌豆(*Pisum sativum*)根,从 SSH 文库中筛选到了 6 个表达上调的基因,其中就包括 *PsSAMT*。Ament 等<sup>[8]</sup>报道叶螨(*Tetranychus urticae*)侵染野生型番茄(*Solanum lycopersicum*)时,会激活 SAMT 基因的表达。这些表明 SAMT 能够对外源胁迫产生响应并发挥作用。本实验从菟丝子(*Cuscuta campestris*)侵染薇甘菊(*Mikania micrantha*)的茎消减文库中筛选到 SAMT 相关的表达序列标签(EST)<sup>[9]</sup>,并采用 cDNA 末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术从 SAMRT cDNA 文库<sup>[9]</sup>中克隆到 *MmSAMT* 全长 cDNA,并建立原核表达系统,利用 SQ-RT-PCR(semi-quantitative reverse transcription-PCR)研究其受 SA 诱导的表达模式,为研究 *MmSAMT* 的酶学特性及在防御系统中的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**植物材料** 薇甘菊(*Mikania micrantha*)选用中山大学温棚中栽培 2 个月(约 1.2~1.5 m 高)的盆苗。用 100  $\mu\text{mol/L}$  SA 进行喷洒,分别于处理 0、6、

24、48 和 96 h 时取样,液氮速冻-80 $^{\circ}\text{C}$  保存。

**主要试剂** SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit 购自 Clontech 公司;pMD-18T vector, *LA* Taq 和限制酶等购自 TaKaRa 公司;小鼠抗 6 $\times$ His 单克隆抗体和碱性磷酸酶标记的山羊抗鼠 IgG 二抗购自 TIANGEN 公司;pET-32a(+)和 Rosetta-gami (DE3) 购自 Novagen 公司;其它常规试剂均为国产分析纯。

### 1.2 *MmSAMT* 基因的克隆及序列分析

薇甘菊总 RNA 提取 Ding 等<sup>[10]</sup>的方法。按照 SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, USA) 的说明合成双链 cDNA。根据从薇甘菊茎消减文库中获得的 SAMT 基因中间序列 S98 (GenBank 登陆号 EY274803),设计 5' 和 3'-RACE 特异引物(5'-SAMT.R: 5'-CAGCACGACACTTGAGAAACATC-3'; 3'-SAMT.F: 5'-TCAAGTGTCTGCTGAAGAGATG-GTGC-3')。利用 SMART<sup>TM</sup> RACE 试剂盒提供的通用引物,进行 5' 和 3'-RACE PCR 扩增。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$  5 min;94 $^{\circ}\text{C}$  1 min,60 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  2 min,33 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  10 min。根据测序结果设计特异引物(SAMT.F1: 5'-ATATTCAAACCCTAGC-TGTGTGATC-3';SAMT.R1: 5'-TTTTGATAGCGTT-ATAAGACGACCA-3')扩增全长 cDNA 序列。

由 NCBI 网上的 Blast 程序进行相似性搜索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>);由 CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)将 PCR 扩增的序列拼结成长 cDNA;利用 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf.html>)分析 *MmSAMT* 基因的开放读码框;利用 Compute pI/Mw tool ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html))计算预测 *MmSAMT* 的分子量和等电点;CPH models 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>)预测蛋白质三维结构;序列比对采用 Clustal X 软件;利用 MEGA 4.0 软件构建系统进化树。

### 1.3 原核重组表达及 Western blot 鉴定

根据 *MmSAMT* 序列和 pET-32a(+)的多克隆位

点(MCS)设计引物,上游 *SAMT*.F2: 5'-CCG-GAATTCATGGACGTCGCTCAA-3',下游 *SAMT*.R2: 5'-ACGCGTCGACTCATATTTTCGGGTCA-3',下划线分别为 *Eco*R I 和 *Sal* I 位点。借此构建重组载体 p32-*MmSAMT*,并转化 Rosetta-gami(DE3)(以下简称 Ro.ga.)。IPTG 诱导表达及 SDS-PAGE 参照 Huang<sup>[11]</sup>的方法。SDS-PAGE 的浓缩胶和分离胶浓度分别为 5% 和 12%。

将凝胶电泳带湿转至 PVDF 膜,以抗小鼠抗 6 × His 单克隆抗体为一抗,以碱性磷酸酶标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗,进行 Western blot。随后将转印膜放入溶解稀释好的 BCIP/NBT 底物溶液的平皿中,黑暗中静置 5 min,蛋白条带呈紫蓝色时,立即将膜取出,用蒸馏水漂洗终止反应。

#### 1.4 表达分析

依据所获 cDNA 序列,分别设计基因的正向和反向基因特异引物 SQ-*SAMT*. F: 5'-ATACTCGGG-AGACAAAGCGACGA-3'; SQ-*SAMT*. R: 5'-CAAAGT-GACTCAAGAGCAAGGGC-3'。采用 SQ-RT-PCR 方法研究其诱导表达模式。PCR 扩增条件为:94℃ 4 min;94℃ 45 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,17~35 个循环;72℃ 4 min。将 PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳,根据扩增的 DNA 条带的亮度来判断 *MmSAMT* 在不同时间点的表达水平。

为使所分析基因在不同时间点的表达具有可比性,首先利用内参 *Ubiquitin* 的特异引物对不同时间点的 cDNA 第一链进行 PCR 扩增,根据其 PCR 扩增产物量调整不同时间点的 cDNA 第一链的起始浓度,使其趋于一致;另外,在进行 PCR 扩增时,扩增停止于指数增长期,使 PCR 扩增呈不饱和扩增状态,保持所分析基因的起始差异。

## 2 结果和分析

### 2.1 *MmSAMT* RACE 克隆及序列分析

根据 EY274803 序列,5'-RACE 和 3'-RACE 的 PCR 扩增结果进行琼脂糖凝胶电泳,结果表明得到两条特异性的 DNA 条带分别约为 740 bp 和 650 bp (图 1)。随后割胶回收、TA 克隆、测序和去除载体序列及接头引物序列,5'-RACE 和 3'-RACE PCR 扩增的 DNA 片段大小分别为 728 bp 和 635 bp。经电子拼接和二次 PCR,获得了 1 299 bp 的 cDNA 全长(图 1)。ORF finder 分析表明,*MmSAMT* 基因编码 362 个氨基酸,有 60 bp 的 5'-非编码序列(untranslational region, UTR)和 150 bp 的 3'-UTR,并

且 3'端具有完整的 PolyA 尾,上游有加尾信号 AATAAAA(图 2)。NCBI blast 比对及系统进化树分析表明,*MmSAMT* 属于甲基转移酶第 7 超家族蛋白,与 *Clarkia breweri* 的 CbSAMT 具有较近的亲缘关系(图 3),氨基酸序列相似性为 74%。预测 *MmSAMT* 是由两个相同亚基组成的同二聚体,其 N 末端通过两个  $\alpha$ -螺旋和两个  $\beta$ -折叠参与亚基聚合。每个单体的活性中心位于 C 端,具有两个靠近的空穴结构,分别是 SAM 结合位点和 SA 结合位点<sup>[12]</sup>。实际上,已有将 *SAMT* 作为系统发生的基因标记应用在茄科的系统发育研究中<sup>[13]</sup>。

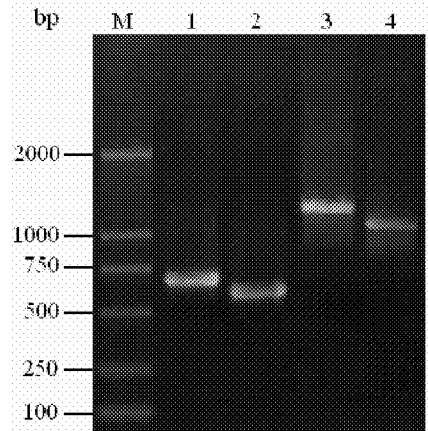


图 1 *SAMT* cDNA 克隆结果

Fig. 1 The cloning results of *SAMT* cDNA

M: DL2000 DNA Marker; 1: 5'-RACE; 2: 3'-RACE; 3: cDNA; 4: CDS

### 2.2 *MmSAMT* 的原核表达及 Western blot

SDS-PAGE 显示,*MmSAMT* 在原核中成功融合表达(图 4),大小约 60 kD。除去 Trx a tag 20 kD 外,*MmSAMT* 大小约 40 kD 左右,这与氨基酸分析的预测结果一致。晶体衍射实验证实活性 SAMT 呈同二聚体结构<sup>[12]</sup>,但由于 SDS 的变性作用,蛋白质呈单体状态,因此观察不到其四级结构的蛋白泳带。对不同浓度 IPTG 和温度下的蛋白表达情况进行研究,结果表明 0.05~1.5 mmol/L IPTG 对蛋白质产量没有明显差异,4 h 均已表达。当温度由 37℃ 降至 20℃ 时,蛋白质的可溶性增加。这可能是因为温度降低减慢了蛋白质合成的速率,新生肽链自我折叠的时间延长,从而降低了形成包涵体的比例。Western blot 结果确证了融合蛋白的表达(图 5),尽管在低 IPTG、低温条件下超声沉淀中仍有不少目的蛋白质呈包涵体状态,但在超声上清液中也有足量的可溶性蛋白质存在。由 Western blot 的结果还可以看到,*MmSAMT* 得到全序列表达,没有出现截短表达的情况。

```

1   ATATTCAAACCCACTAGCTGTGTGATCTTGGTGTAGCAAGCTAATTGTGAATCATATATTAATGAGCTCGCTCAAGTCTC
                                     M D V A Q V L
82  CGTATGAAATGGTGGTAGGGAGATATAGCTATTCCAACAAATCTCTTCTACAGAGAAAGGTTATATCGATGACAAAAACCT
R M N G G G E D Y S Y S N N S L L Q R K V I S M T K P
163 ATAATAGAAGACGCTTTGACAAACCTGTATTGTGGTATGAACTTCCCACAAACCTTAACCATGGGGGATCTTGGATGCTCA
I E E D A L I N L Y C G M N F P Q T L T M A D L G C S
244 TCTGACCCCAACACTTTGCTGGTTCATCGGAGCTGTCAAGTCAATTGACAAGATCGACAGAAATAGGCAGCAACAAT
S G P N T L L W A S E L V K S I D K I R Q K L G S N M
325 GAAACACCCGAAATACAAATGTACTTTAATGACCTCCACATAAATGATTTCAACCCATATTTCACCTGGTCCCAAAATT
E A P E I Q M Y L N D L P H N D F N T I F H S V P K F
406 CAATAACACCTTATAGAGATGCCAACCTCTTCTGTCAOCTCAGTTTATATGTTTGGTGGTGTCTGCTCATTCTATACC
Q N N L M R M P N S S C S P Q F Y V C G V P G S F Y T
487 AGGCTCTTTCTTGAAGAAAGCAITTCATTTTGTCTACTCTCTATAGGCTCATGTGGCTCTCCAGGTTCCAGATATGACA
R L F L R K S I H F V Y S S Y S L M W L S Q V P D M T
568 AGTACAACCAAGGGAGCATATATCATGTCACAACAAGCOCTCCAAATGTATAAAAGCTTATATGAGCAATTCAAAAG
S T N K G N I Y M S T T S P P N V I K A Y Y E R Q F K
649 GACTTTCTGATGTTTCACAGTGTCTGCTGAGAGATGGTGCAGGAGGCATATGGTTTGGACATATCGGGACACAA
D F L M F L K C R A E E M V P G G H M V L T I L G R Q
730 AGCCAGCATCTCTGTAGCAAGAAATGTTTACCTCTGGGATCTCTTAGCCGCTCACTAAAAGATATGGTTTCAGGGA
S D D F C S K E C C Y V W D L L A A S L N D M V S E G
811 CTGTGAGAAGAGAGAAATAGACTCATTCAACATTCACAAATCACTCTAGTCCAAAAGAGTCCGAAAGAGTGGAG
L V E E E K L D S F N I P Q Y T P S P E V R K E V E
892 AAAGAGGGTGGTTCACAAATTAAGCTCGAGCTCCTGAAAGTGAATTTGGAGCCATGCATCAGATGGGGATGATCAA
K E G S F S I N C V E V I E W N W D A C T I S D G D D Q
973 GGTATCAATATGGGCAAAATGATGCGAGCTGTGCGAGCTTGCCTTGTAGTCACTTTGGTGGTGTGATCGAGGAG
G Y N M G K C M R A V A E P L L L S H F G E S I I E E
1054 GTGTTTGAGAGTACAGAAATCATATCAGATTAGCATGGGAGGAGAGACCAAGCTTGTATAGTCCCGGTGTCAATG
V F E R Y T N H I K I S M A K E K T K L V N V T V S M
1135 ACCCGAAAATAATGATCTTTTATGATATCAATGTTAGGAAACCACTATTGGTTTGGGTGTCTTGTTAATTAAGAAATG
T R K I *
1216 TAATGCGCTTTTGTAAAGATTTAATAAAATGTTTGGTGTCTTATAAGCGTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1297 AAA
    
```

图 2 *MmSAMT* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *MmSAMT* cDNA

方框为加尾信号 Tailing signal in box.

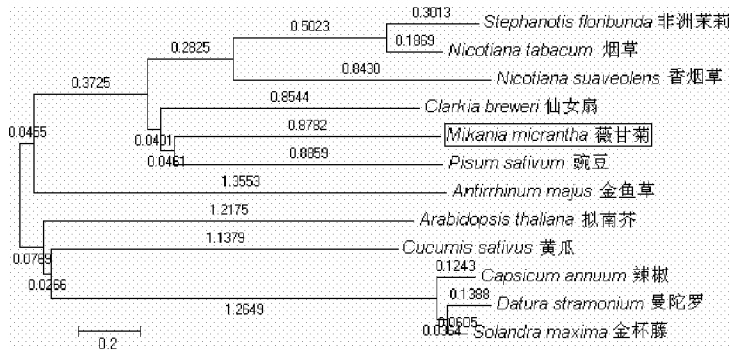


图 3 根据氨基酸序列构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree derived from consensus amino acid sequence

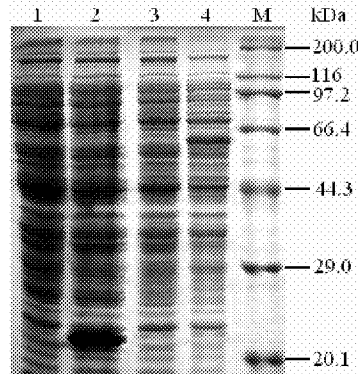


图 4 p32-*MmSAMT* 融合表达(25℃, 0.5 mmol/L IPTG, 8 h)

Fig. 4 The expression of fused p32-*MmSAMT* under 25℃, 0.5 mmol/L IPTG for 8 h

1. Ro.ga./pET-32a(未诱导 Non-induced); 2. Ro.ga./pET-32a(诱导 Induced); 3. Ro.ga./p32-*MmSAMT* (未诱导 Non-induced); 4. Ro.ga./p32-*MmSAMT* (诱导 Induced); M. Takara Protein Marker (Wide).

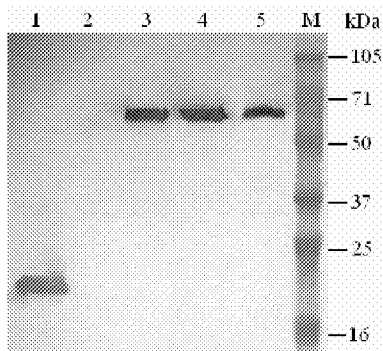


图5 Western blot 可溶性鉴定(20℃, 0.05 mmol/L IPTG, 6 h)

Fig. 5 Identification of solubility by Western blot under 20℃, 0.05 mmol/L IPTG for 6 h

1. Ro. ga./pET-32a(诱导 Induced); 2. Ro. ga./ p32-*MmSAMT* (未诱导 Non-induced); 3. Ro. ga./pET-32a(诱导 Induced)总菌体蛋白(Total protein); 4. Ro. ga./p32-*MmSAMT* (诱导 Induced)沉淀蛋白(Precipitated protein); 5. Ro. ga./p32-*MmSAMT* (诱导 Induced)上清蛋白(Supernatant protein); M: Rainbow protein standards (Mid range).

### 2.3 SA 对 *MmSAMT* 基因的诱导作用

SAMT 能催化 SA 合成 MeSA, 为研究 *MmSAMT* 在环境胁迫中的作用模式, 采用 SA 处理, 通过 SQ-RT-PCR 分析其在不同时间点的诱导表达谱。喷施 SA 后, 短时间内(6~24 h) *MmSAMT* 的表达持续上升, 48 h 达到了最高的转录水平, 96 h 趋于回落, 但仍然高于自然水平(图 5)。说明正常情况下该基因在植物体内维持低水平表达, 以调节基本的代谢, 当受到环境胁迫时该基因受到激活, 表达量升高。这表明 *MmSAMT* 基因受 SA 的诱导激活, 因此推测 *MmSAMT* 在植物水杨酸信号途径中发挥着重要作用。

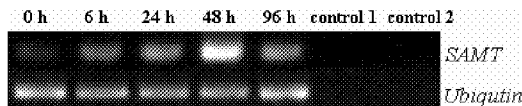


图6 SA 诱导的 *MmSAMT* 基因表达

Fig. 6 Expression of *MmSAMT* induced by SA

Control 1. RT-PCR 未加反转录酶对照 Without reverse transcriptase; Control 2. 以 ddH<sub>2</sub>O 为模板对照 ddH<sub>2</sub>O as template.

## 3 讨论

外源基因在原核细胞中的表达受多种因素的影响, 如启动子结构、RBS 位点、mRNA 二级结构、标签序列、稀有密码子、蛋白质 N 端序列、表达菌株、IPTG 浓度、培养基、温度及诱导时间等<sup>[11]</sup>。序列分析表明 *MmSAMT* 基因的 mRNA 含有丰富的二级结构, 本研究采用 pET-32a (+) 表达载体、

Rosetta-gami(DE3) 表达菌株、低 IPTG 和低温等诱导表达策略, 成功建立了 *MmSAMT* 基因的原核表达系统, 实现了遗传信息从 DNA 到蛋白质的传递, 为后期纯化 *MmSAMT* 以研究其酶学特性奠定了基础。

最新研究表明, MeSA 是系统获得性抗性的关键性移动信号分子<sup>[15]</sup>。感染花叶病毒(TMV)的烟草(*Nicotiana tabacum*)会合成大量 SA, 伴随 MeSA 浓度升高, MeSA 通过韧皮部运输到远端, 由组织中的水杨酸结合蛋白 2(salicylic acid binding protein 2, SABP2)<sup>[14]</sup>将 MeSA 水解成 SA, 从而激活 SAR<sup>[15]</sup>。转 *SAMT* 拟南芥体内 SA 被用来合成 MeSA, 造成 SA 库枯竭, 反而降低了抗病防御能力, 但是临近的野生型却可以“偷听”到转基因型释放的 MeSA 分子, 从而提高了防御能力<sup>[16]</sup>。MeSA 作为 SAR 的关键信号分子, 表明 MeSA 的合成酶 SAMT 在 SAR 过程中具有初始建立作用, 这意味着 *SAMT* 的激活将导致植株系统获得性抗性的建立。本研究表明, 喷施 SA 后的 6~48 h 内, *MmSAMT* 的表达量持续上升, 48 h 表达量达到最高水平(图 5), 即 *MmSAMT* 基因受外源 SA 的诱导激活。这与其它植物的 *SAMT* 基因受 SA 激活的研究结果一致<sup>[6,17-18]</sup>。SA 处理可使水稻(*Oryza sativa*)叶片中的 *OsBISAMT* 表达上调, 标志着植物防御系统的响应<sup>[17]</sup>。另外, Chen 等<sup>[18]</sup>证明 *AtSAMT* 在短时间内不能被 SA 显著激活。因此, SA 处理在较短时间(6~12 h)里均不能显著激活颠茄、水稻、拟南芥、薇甘菊等植株的 *SAMT*, 随着时间延长, 在较长时间(48 h)里才能被显著激活, 暗示着 *SAMT* 对 SA 处理需要一个稍长的缓慢响应时间。目前关于 *SAMT* 在植物系统获得性抗性中的作用机制研究还不够深入, 有待进一步探讨。

综上所述, 本研究采用 RACE 技术从薇甘菊 cDNA 文库中克隆了全长的 *MmSAMT* 基因, 该基因具有完整的开放阅读框, 编码 362 个氨基酸; 随后在原核表达系统中成功实现了 *MmSAMT* 基因的融合表达, 为后期的纯化及其酶学特性研究奠定了基础。SQ-RT-PCR 结果表明, *MmSAMT* 基因受外源 SA 的诱导激活, 暗示该基因可能在薇甘菊的系统获得性抗性中起着重要作用, 为进一步研究该基因在植物防御系统中的功能奠定了基础。

## 参考文献

[1] Ross J R, Nam K H, 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.
- [2] Rohrbeck D, Buss D, Effmert U, et al. Localization of methyl benzoate synthesis and emission in *Stephanotis floribunda* and *Nicotiana suaveolens* flowers [J]. *Plant Biol*, 2006, 8(5): 615–626.
- [3] Lisa M, Murfitt, Kolosova N, et al. Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: Benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 382(1): 145–151.
- [4] Remco M P, Poecke V, Maarten A, et al. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis [J]. *J Chem Ecol*, 2001, 27(10): 1911–1928.
- [5] Gong Z Z, Koiwa H, Cushman M A, et al. Genes that are uniquely stress regulated in salt overly sensitive (*sos*) mutants [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(3): 363–375.
- [6] Fukami H, Asakura T, Hirano H, et al. Salicylic acid carboxyl methyltransferase induced in hairy root cultures of *Atropa belladonna* after treatment with exogenously added salicylic acid [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(9): 1054–1058.
- [7] Helena S, Strid A. Six genes strongly regulated by mercury in *Pisum sativum* roots [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(2): 135–142.
- [8] Ament K, Kant M R, Sabelis M W, et al. Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato [J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 2025–2037.
- [9] Li D M, Stachelin C, Zhang Y S, et al. Identification of genes differentially expressed in *Mikania micrantha* during *Cuscuta campestris* infection by suppression subtractive hybridization [J]. *J Plant Physiol*, 2009, 2(2): 1–13.
- [10] Ding L W, Sun Q Y, Wang Z Y, et al. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate [J]. *Anal Biochem*, 2008, 374(2): 426–428.
- [11] Huang P T (黄培堂). *Molecular Cloning* [M]. 3 ed. Beijing: Science Publishing Company, 2006: 1217–1265. (in Chinese)
- [12] 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.
- [13] Martins T R, Barkman T J. Reconstruction of *Solanaceae* phylogeny using the nuclear gene *SAMT* [J]. *Syst Bot*, 2005, 30(2): 435–447.
- [14] Kumar D, Klessig D F. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity [J]. *PNAS*, 2003, 100(26): 16101–16106.
- [15] Park S W, Kaimoyo E, Kumar D, et al. Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance [J]. *Science*, 2007, 318(5): 113–116.
- [16] Koo Y J, Kim M A, Kim E H, et al. Over expression of salicylic acid carboxyl methyltransferase reduces salicylic acid-mediated pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(1/2): 1–15.
- [17] Xu R R, Song F M, Zheng Z. *OsBISAMT1*, a gene encoding S-adenosyl-L-methionine: Salicylic acid carboxyl methyltransferase, is differentially expressed in rice defense responses [J]. *Mol Biol Rep*, 2006, 33(3): 223–231.
- [18] Chen F, Auria J C, Tholl D, et al. An *Arabidopsis thaliana* gene for methyl salicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense [J]. *Plant J*, 2003, 36(5): 577–588.