

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2013.06.023

吴秋红, 张自德, 王峰. 红树植物杯萼海桑 SAMS 基因的克隆与生物信息学分析[J]. 广西植物, 2013, 33(6):846—851

Wu QH, Zhang ZD, Wang F. Cloning and bioinformatic analysis of SAMS gene in a mangrove tree *Sonneratia alba*[J]. Guihaia, 2013, 33(6):846—851

红树植物杯萼海桑 SAMS 基因的克隆与生物信息学分析

吴秋红, 张自德, 王 峰*

(暨南大学 药学院, 广州 510632)

摘 要: 红树植物杯萼海桑是最耐盐的红树植物之一。S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase, SAMS)是 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)生物合成途径的关键酶。SAMS 作为一个逆境胁迫响应蛋白在植物的耐盐调控中发挥着极其重要的作用。本文结合杯萼海桑根的转录组注释,根据编码区序列设计引物,通过 PCR 克隆杯萼海桑 SAMS 基因的编码区 cDNA,并对其进行生物信息分析,为研究杯萼海桑适应逆境的机制奠定理论基础。结果显示 PCR 扩增了一个长 1 182 bp 的基因片段,该片段编码由 393 个氨基酸组成的 S-腺苷甲硫氨酸合成酶。同源性比对及进化树分析显示杯萼海桑的 SAMS 氨基酸序列进化上相对保守。本研究首次从红树林植物杯萼海桑中克隆 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因,并获得其编码区序列,为进一步研究杯萼海桑应对逆境胁迫的分子生物学机制与胁迫相关基因调控网络奠定基础。

关键词: S-腺苷甲硫氨酸合成酶; 杯萼海桑; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2013)06-0846-06

Cloning and bioinformatic analysis of SAMS gene in a mangrove tree *Sonneratia alba*

WU Qiu-Hong, ZHANG Zi-De, WANG Feng*

(College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 51062, China)

Abstract: *Sonneratia alba* is one of the most salt-tolerant mangroves. S-adenosylmethionine synthetase(SAMS)which was in response to abiotic stresses played an important role in salt tolerance. In order to study the biological mechanism of *S. alba* for adapting stress, the coding region of SaSAMS gene which codes a key enzyme in the S-adenosylmethionine(SAM)biosynthetic pathway was isolated. Based on the annotation of root transcriptome of *S. alba*, primers was designed and cDNA of SaSAMS gene was amplified by PCR. The complete coding sequence of SaSAMS gene was 1 182 bp and it encoded a protein of 393 amino acids. Homology comparison and evolutionary tree analysis showed that the SAMS amino acid sequences were relatively conserved in plants. The SaSAMS gene was cloned from a mangrove tree *S. alba* for the first time and this would facilitate further investigation on molecular mechanism of stress tolerance and regulation networks of stress-related genes in *S. alba*.

Key words: SAMS; *Sonneratia alba*; gene cloning; sequence analysis

红树林是生长在热带、亚热带海岸潮间带的木 盐胁迫对其影响较为突出,成为影响其生长发育的
本植物群落。在各种非生物胁迫逆境中,低温胁迫、 主要限制因子(李玫等,2009)。杯萼海桑是红树林

收稿日期: 2013-03-28 修回日期: 2013-06-25

基金项目: 国家自然科学基金(30700704)

作者简介: 吴秋红(1987-),女,山东菏泽人,硕士,主要从事生物制药研究,(E-mail)qiuHong6506@126.com。

*通讯作者: 王峰,博士,副教授,从事生物制药研究,(E-mail)24547680@qq.com。

中的先锋树种,对红树林的扩散有重要作用。它适应力强,是海桑属植物中耐盐能力最强的树种,也是所有红树林植物中耐盐能力最强的物种之一(钟才荣,2004)。因此对杯萼海桑应对逆境胁迫相关基因进行研究探索具有重要的学术意义和应用价值。

S-腺苷甲硫氨酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase, SAMS, EC 2.5.1.6)作为生物体内重要的代谢产物,参与了多种生化反应,可以催化甲硫氨酸和 ATP 反应得到 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)。SAM 有多种生理作用,可参与一些对细胞结构和功能产生重要影响的反应如转氨丙基、转甲基和转硫等(张建国等,2005),另外 SAM 还可以作为合成乙烯(ethyl-ene)、甜菜碱(betaine)和多胺(polyamine)的前体或供体,这些物质在植物体内应对逆境的反应中发挥着重要作用(周向红等,2011),这表明 SAMS 是一个逆境胁迫响应蛋白,在植物的耐盐网络中发挥着极其重要的作用。

近年来,各国学者在美洲黑杨(*Populusids*)、水稻(*Oryza sativa*)等多种植物上已成功克隆 SAMS 基因,并开展了该基因在植物应对逆境和衰老调节中作用的研究(冯艳飞等,2001)。但红树植物杯萼海桑的 SAMS 基因尚无研究报道,它在杯萼海桑逆境生理中的调节作用及影响并不清楚。本项目对此进行研究并获得了 SaSAMS 基因的完整编码序列,为后续研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

杯萼海桑采自中山大学;PCR 纯化试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技公司;pMD-18T、cDNA Synthesis Kit 购自 Takara 公司;引物合成于上海英骏公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 Chen *et al.* (2011)的研究中已获得的杯萼海桑的转录组序列,按照引物设计原则,采用引物设计软件 Primer5.0,对杯萼海桑转录组序列中的 SaSAMS 基因序列设计引物。正向 SaSAMS-FP: 5' ATGGAGAGCTTCCTATTCAC-CTCAG3', 反向 SaSAMS-RP: 5' TTAAGACT-GAGGCTTCTCCCACTTG3'。

1.2.2 杯萼海桑叶总 RNA 提取及 cDNA 合成 采用改良后的 CTAB 法进行。总 RNA 的完整性和纯

度通过 EB-琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白定量仪(Bio-Rad)检测。取 1 μg 总 RNA,以 Oligo(dT)为引物,按 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 说明操作,通过反转录生成 cDNA。

1.2.3 SAMS 编码区 PCR 扩增 PCR 反应总体体系为 20 μL (体系中含有 10 $\times$ PCR Buffer 2 μL , 10 mmol/L dNTP 2 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 上游引物 SaSAMS-FP 1 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 下游引物 SaSAMS-RP 1 μL , Taq DNA 聚合酶 0.5 μL 和 0.5 μL cDNA,另加 ddH₂O 补至 20 μL),在 PCR 仪(Eppendorf)上进行,PCR 条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,然后 30 个循环(每个循环中 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 80 s),最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 5 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 SAMS 基因的克隆及序列测定 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析和胶回收纯化连接至 pMD-18T 载体,并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,用质粒提取试剂盒对所得转化子提取质粒 DNA,重组子经质粒 PCR 鉴定后送交上海英骏公司测序。

1.2.5 序列的生物信息学分析 分析测序结果,推导开放读码框架(open reading frame, ORF)及编码蛋白的氨基酸序列,利用 ProtParam、ProtScale 和 DAS TMfilter 进行编码蛋白的各种基本理化特性、疏水性分析和跨膜结构域,利用 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)的 BLAST 在线分析工具分别对 GenBank 的非冗余核酸数据库和非冗余蛋白数据库序列进行比对分析。采用 Clustalx 和 Phylip-3.69 进行序列多重比较及系统进化树构建。并用 SOPMA 和 SWISS-MODEL 对该蛋白进行二级结构和三维结构预测。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的质量

总 RNA 核酸凝胶电泳后用核酸蛋白定量仪检测,可以观察到两条清晰明亮的条带 28S rRNA 和 18S rRNA,另外总 RNA 的 $A_{260}/A_{280} = 2.06$, $A_{260}/A_{230} = 2.15$,这表明获得的总 RNA 片段纯度较高,而且质量能满足后续实验要求。

2.2 SaSAMS 基因的克隆

RT-PCR 扩增产物经电泳后呈现出 1 条长约 1 200 bp 的单一的特异性片段(图 2),其长度与预期

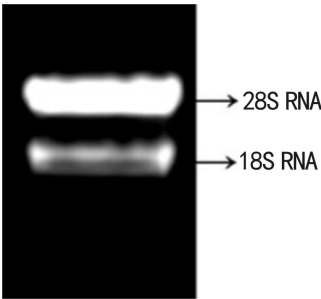


图 1 杯萼海桑总 RNA 的电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of extracted total RNA from *Sonneratia alba*

大小相符,杯萼海桑 SAMS 基因的编码序列经双向测序获得(图 3),并将其序列提交至 GenBank,获其登录号是 JX513399。

2.3 序列生物信息学分析

测序所得到的杯萼海桑 SAMS 基因的编码序列长 1 182 bp,其编码的 SaSAMS 蛋白包含 393 个氨基酸残基,分子量为 43.1kDa,含量最丰富的氨基

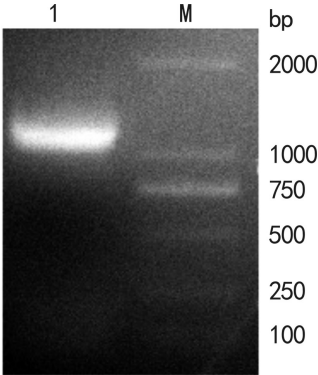


图 2 SaSAMS 基因的 PCR 扩增

M. DL2000 分子标记; 1. SaSAMS PCR 扩增产物。

Fig. 2 PCR amplification of SAMS gene in *Sonneratia alba* M. DL2000 marker; 1. SaSAMS PCR amplification product.

酸是 Gly,占 9.4%,含量最少的占 1.0%,理论等电点是 5.59。用疏水性分析结果表明:SaSAMS 在 35 位 Asp 亲水性最强(-2.16),第 306 位的 Val 疏水性最强(1.789)。分值较高的是亲水性区域,其均匀地

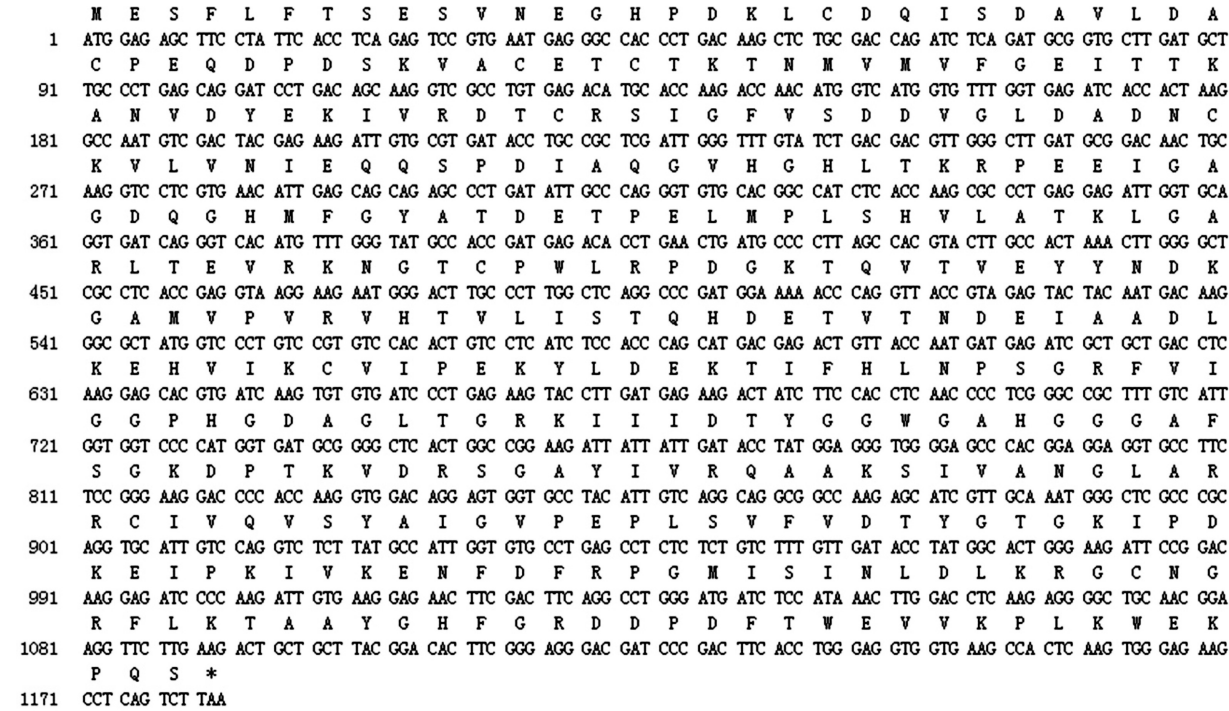


图 3 SaSAMS 的编码区序列和氨基酸序列

Fig. 3 Coding sequence and amino acid sequence of SaSAMS

分布于整个肽链中,分值性较低的是疏水性区域,其含量较少,说明 SaSAMS 在一级结构上亲水性为主,该结果与 SaSAMS 无跨膜结构域分析相符。信号肽分析表明 SaSAMS 不存在信号肽酶切位点,可

以推测,SaSAMS 在细胞质中合成后继续留在细胞质基质中直接作用于代谢产物,并不进行蛋白转运。将 SaSAMS 的氨基酸序列与蓖麻(*Ricinus communis*),长春花(*Catharanthus roseus*)等多种

生物的 SAMS 进行多序列比对(图 4),结果显示一些与酶活性密切相关的氨基酸残基在这些物种中高度保守。如 ATP 结合位点中的保守的 P 环基序(motif p loop)GGGAFSGKD(269~277),以及特征性的六肽 GAGDQG(122~127)(Kamarthapu *et al.*,2008;Yoon *et al.*,2006)。另外,SaSAMS 除包含上述高度保守的活性位点之外,还在氨基酸水平

上与其它物种的 SAMS 具有一致性。说明 SaSAMS 与其它物种的 SAMS 一样,在杯萼海桑的 SAM 的生物合成过程中扮演重要的角色,是细胞内影响生命活动的关键基因。另外发现 SaSAMS 序列中除含有多个保守的脯氨酸外,还在一些特殊位置如 32 位、334 位独有脯氨酸,这可能与它较强的抗盐性相关。

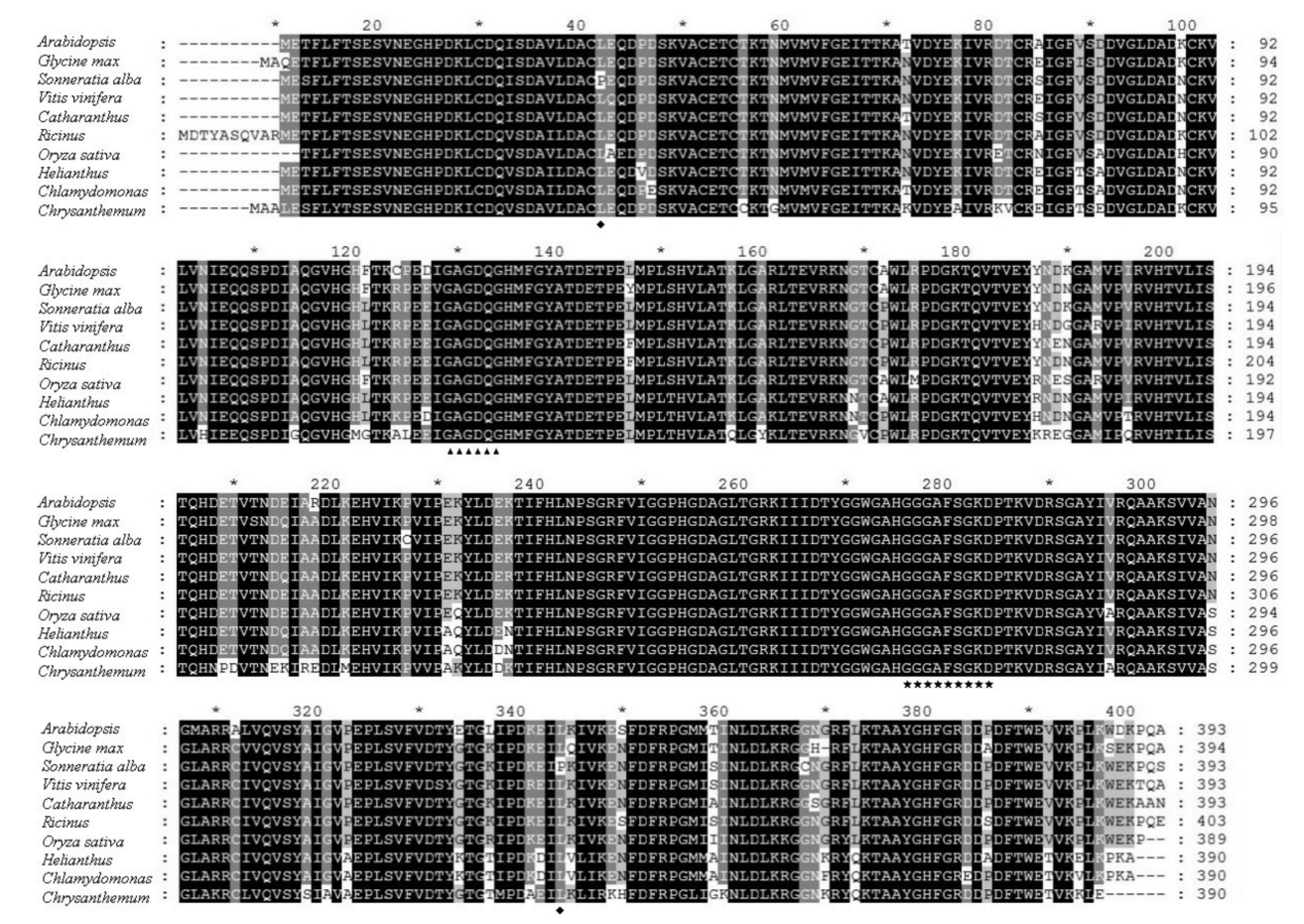


图 4 不同物种 SAMS 氨基酸序列对比 ▲ 特征性六肽;★表示 ATP 结合位点;◆表示 SaSAMS 特有的脯氨酸。
Fig. 4 Alignment of amino acid sequences of SAMS for *Sonneratia alba* and other species ▲ Characteristic six peptide; ★ ATP binding site; ◆ characteristic proline of SaSAMS.

用邻接距离法(neighbour joining, NJ)构建系统发生进化树(图 5)。从图 5 可以看出,除了莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的 SAMS 单独成簇外,其它高等植物的 SAMS 聚类成 2 大簇,与 Schroder *et al.*(1997)的研究结果相符,这种聚类关系与植物的分类地位无关。与 SaSAMS 在亲缘关系上最接近的是大戟科蓖麻的 SAMS,其序列一致性高达 97%,另外拟南芥长春花等其他高等植物也与其有较高的序列一致性,介于 90%~96%,与其关系最近的莱茵衣藻其序列一致性也达 81%。在

蛋白质水平上 SaSAMS 与其它生物的 SAMS 也表现出较高的一致性,并且种间一致性随着种属关系的变远稍有降低,充分说明 SAMS 在进化上相对保守,其功能对个体生存是必不可缺的。
为了进一步揭示编码蛋白的功能,利用 SOPMA 软件对 SaSAMS 氨基酸序列进行了二级结构分析,可以看出该蛋白含有比较丰富的二级结构,以 α -螺旋和无规卷曲为主,其中无规卷曲(cc)由 146 个氨基酸残基组成,占 37.15%; α -螺旋(Hh)由 143 个氨基酸残基组成,占 36.39%; β -折叠由 37 个

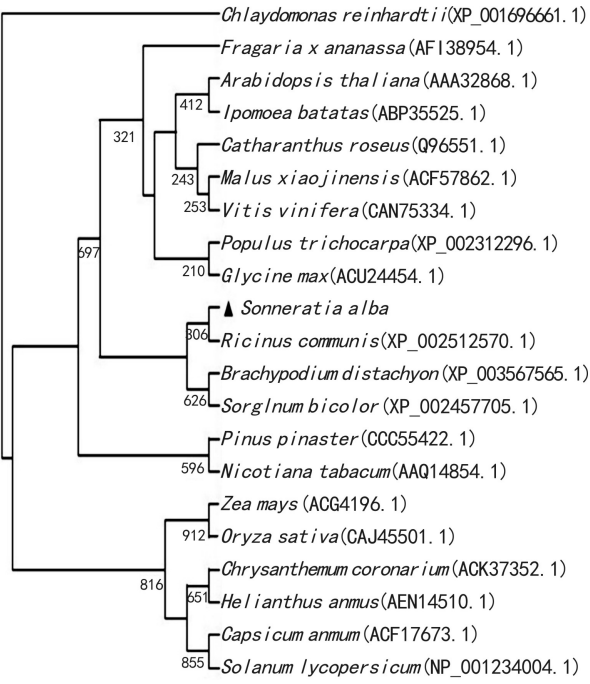


图 5 不同生物 SAMS 系统进化树 用 NJ 法构建进化树,节点前数字表示自举支持率(1 000 个复制序列),登录号显示在括号中。

Fig. 5 A phylogenetic tree based on SAMS sequences NJ method was used to construct the phylogenetic tree. The number before the node indicates bootstrap approval rating(1 000 replicating sequence). Accession numbers are displayed in parentheses.

氨基酸残基组成,占 9.31%。利用 SWISS-MODEL 提交 SAMS 蛋白序列,在蛋白质结构库中搜寻模板,最终 SAMS 蛋白的第 3~388 残基与人的 SAMS 蛋白晶体结构(2P02)序列一致性达到 65.5%,以 2P02 为模板预测了 SaSAMS 的三维模型(图 6)。

3 结论与讨论

SAMS 催化合成的 SAM 是甜菜碱、乙烯和多胺等多种生物合成的甲基供体。近年来研究发现,多胺与乙烯在植物体内存在较为广泛并发挥重要生理作用的两类生长调节物质,并且在植物抵抗逆境(水分胁迫、温度胁迫、盐胁迫等)的反应中扮演重要角色(师晨娟等,2006)。因此推断 SAMS 基因在植物耐胁迫方面可能也发挥一定作用。通过对不同种属来源的植物 SAMS 序列分析发现:植物的 SAMS 氨基酸序列具有高度的保守性,并且含有多个保守的脯氨酸。有文献报道,脯氨酸是盐胁迫下易于积

累的一种氨基酸,是盐生植物调节渗透压的一种溶质(林栖凤等,2000),这就暗示该基因对植物的生存尤其是逆境下调节相关基因的表达以适应环境的变化具有重要意义(Tsutomu *et al.*, 2003; John *et al.*, 2003)。但脯氨酸的积累究竟是由于盐胁迫引起植物损伤的征兆,还是耐盐的原因,目前尚不清楚。由此可见,SAMS 中脯氨酸的积累与耐盐性状的关系还有待进一步研究。

本研究首次克隆出杯萼海桑的 SAMS 基因完整编码序列并用生物信息学预测和分析了 SaSAMS 的氨基酸序列、理化性质、疏水性/亲水性、分子系统进化关系以及二级、三级结构,这为后期的实验研究提供了一定的理论参考依据,同时对于研究杯萼海桑以及红树林植物的的逆境胁迫相关生理的分子生物学机制奠定了基础,另外对进一步研究胁迫相关基因调控网络来说具有重要的研究价值。

致谢 感谢中山大学生命科学学院周仁超副教授在实验材料和文章修改方面提供帮助!

参考文献:

Chen SF, Zhou RC, Huang YL, *et al.* 2011. Transcriptome sequencing of a highly salt tolerant mangrove species *Sonneratia alba* using Illumina platform[J]. *Mar Genom*, **4**(2): 129—136

Feng YF (冯艳飞), Liang YR (梁月荣). 2001. Cloning and sequence analysis SAMS gene in tea tree(茶树 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的克隆和序列分析)[J]. *Tea Leaf Sci* (茶叶科学), **21**(1): 21—25

Kamarthapu V, Rao KV, Srinivas PN, *et al.* 2008. Structural and kinetic properties of *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase expressed in *Escherichia coli*[J]. *Biochem Biophys Acta (BBA)-Pro & Proteomics*, **1784**: (12) 1 949—1 958

Kodakil T, Tsujil S, Otani N, *et al.* 2003. Differential transcriptional regulation of two distinct *Sadenosylmethionine synthetase* genes(SAM1 and SAM2) of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nucl Acids Res Suppl*, **3**(1): 303—304

Li M(李政), Liao BW(廖宝文), Guan W(管伟), *et al.* 2009. Chilling injury investigation of mangrove guangdong(广东省红树林寒害的调查)[J]. *Protec For Sci Technol* (防护林科技), **89**(2): 29—31

Lin QF(林栖凤), Li GY(李冠一). 2000. Research advances in of salt resistance in Plant(植物耐盐性研究进展)[J]. *Progr Bio-technol* (生物工程进展), **20**(2): 20—25

Schroder G, Eichel J, Breinig S, *et al.* 1997. Three differentially expressed *Sadenosylmethionine synthetases* from *Catharanthus roseus*: molecular and functional characterization[J]. *Plant Molr Biol*, **33**(2): 211—222

Shi CJ(师晨娟), Liu Y(刘勇), Jing T(荆涛). 2006. Research advances in of hormone resistance in plant(植物激素抗性研究进展)[J]. *World For Res* (世界林业研究), **19**(5): 21—26

Taylor JC, Markham GD. 2003. Conformational dynamics of the active site loop of *S-adenosylmethionine synthetase* illuminated

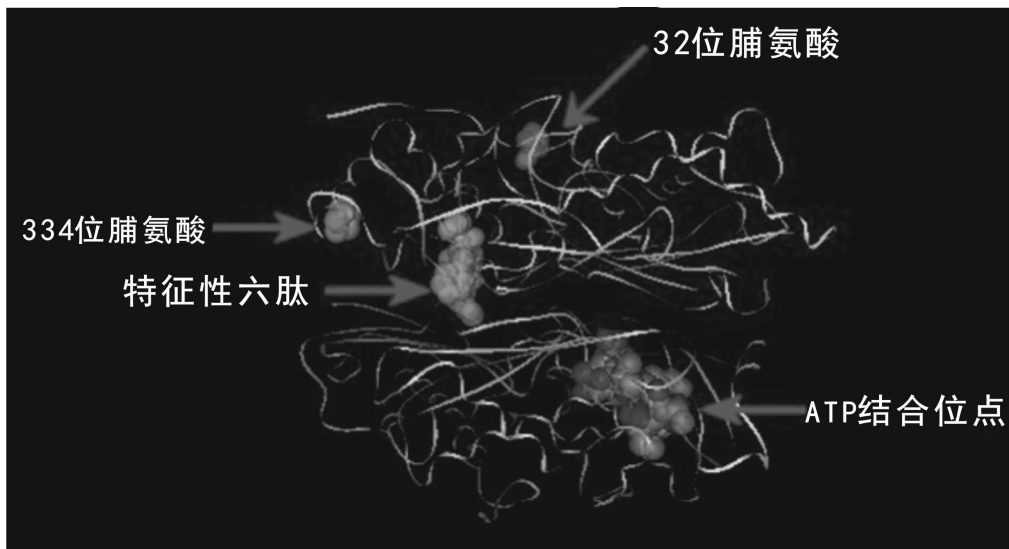


图 6 SaSAMS 的三维模型

Fig. 6 3D model of SaSAMS

bysite-directed spin labeling[J]. *Archiv Biochem Biophys*, **415** (2):164—171

Yoon GS, Ko KH, Kang HW, *et al.* 2006. Characterization of *S-adenosylmethionine synthetase* from *Streptomyces avermitilis* NRRL8165 and its effect on antibiotic production[J]. *Enzyme Micr Technol*, **39**(3):466—473

Zhang JG(张建国), Li XH(李新华), Yuan ZY(袁中一). 2005. Research advances in gene and structure of *S-adenosyl-L-methionine synthetase*(腺苷甲硫氨酸合成酶的基因及结构研究进展)[J]. *Industr Microbiol*(工业微生物), **35**(3):39—44

Zhou XH(周向红), Wang P(王萍). 2011. Cloning and analysis of SAMS gene in sunflower(向日葵 *S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因克隆与分析*)[J]. *Crops*(作物杂志), **6**:10—13

Zhong CR(钟才荣). 2004. Seedling technique of *Sonneratia alba* (杯萼海桑的育苗技术)[J]. *Fujian For Sci Technol* (福建林业科技), **31**(3):116—118

Shi X H(时兴合), Li L(李林), Chen XG(陈晓光), *et al.* 2012. Modeling on winter snow accumulation depth and its prediction in the southern pastoral areas of Qinghai(青海南部牧区前冬积雪变化及其预测的关系模型研究)[J]. *J Des Res* (中国沙漠), **32**(4):245—252

Wang X(王旭), Huang SN(黄世能), Zhou GY(周光益). 2009. Effects of the frozen rain and snow disaster on the dominant species of castanopsis forests in Yangdongshan Shierdushui Provincial Nature Reserve of Guangdong(冰雪灾害对杨东山十二度水自然保护区栲类林建群种的影响)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **45**(9):41—47

Yang F W(杨锋伟), Lu S W(鲁绍伟), Wang B(王兵). 2008. Value estimation of function of forest ecosystem damaged by frozen rain and snow in the south China(南方雨雪冰冻灾害受损森林生态系统生态服务功能价值评估)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学), **44**(11):102—110

Zhang ZX(张志祥), Liu P(刘鹏), Qiu ZJ(邱志军), *et al.* 2010. Factors influencing ice and snow damage to *Pinus taiwanensis* in Jiulongshan Nature Reserve, China(浙江九龙山自然保护区黄山松种群冰雪灾害干扰及其受灾影响因子分析)[J]. *Chin J Plant Ecol* (植物生态学报), **34**(2):223—232

(上接第 785 页 Continue from page 785)

broadleaved forest in Gutianshan National Nature Reserve, Zhejiang Province(雪灾对古田山常绿阔叶林群落结构的影响)[J]. *Biod Sci* (生物多样性), **19**(2):197—205

Michael FJ, Douglas JK, Alex JM, *et al.* 2008. Impact of the 1998 ice storm on the health and growth of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.) dominated forests in Gatineau Park, Quebec[J]. *Bull Bot Soc*, **135**(4):530—539

Michael W, Pu M. 1999. Ice storm damage to forest tree species in the ridge and valley region of southwestern Virginia[J]. *J Torr Bot Soc*, **126**(2):147—158

Nykänen ML, Peltola H, Quine CP, *et al.* 1997. Factors affecting snow damage of tree with particular reference to European conditions[J]. *Silv Fenn*, **31**(2):193—213

Richard WR. 1999. Ice storm damage in a small valley in southwestern Virginia [J]. *Castanea*, **64**(3):243—251

Richard WR, Richard JS. 2007. Ice damage to trees on the Virginia Tech Campus from ice storms[J]. *Northeast Nat*, **14**(1):51—60

Shi PJ(史培军), Chen J(陈晋). 1996. Study on monitoring snow disaster in large areas supported by GIS and RS(RS 与 GIS 支持下的草地雪灾监测试验研究)[J]. *Acta Geogr Sin* (地理学报), **51**(4):296—305