

## 苹果*N*-乙酰基-5-羟色胺-*O*-甲基转移酶基因的克隆及原核表达

吴成成, 李保华, 练森, 梁文星, 王彩霞\*

青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东青岛266109

**摘要:** 以‘富士’和‘嘎啦’苹果(*Malus pumila*)叶片总RNA为模板, 利用反转录PCR (RT-PCR)技术, 克隆*N*-乙酰基-5-羟色胺-*O*-甲基转移酶(ASMT)基因, 通过DNAMAN、MEGA 5.1、ProtParam等生物信息学软件对基因cDNA序列、系统进化关系、理化性质等进行分析, 将克隆的苹果ASMT基因与表达载体pET32a连接, 构建原核表达载体并转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达菌株Rosetta (DE3)中, 优化原核表达条件, 用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测融合蛋白的可溶性, 用蛋白免疫印迹法(western blot)和酶活性测定验证目的蛋白的表达。结果表明, 获得了苹果ASMT的全长cDNA序列, 命名为*MpASMT1* (GenBank登记号MF135479)。该基因开放阅读框(ORF)为1 077 bp, 编码358个氨基酸。*MpASMT1*编码蛋白的理论分子量约为39.7 kDa, 等电点为5.42, 是非分泌型、疏水的稳定蛋白; 其263位组氨酸(His)为催化位点, 225位谷氨酸为底物*S*-腺苷甲硫氨酸结合位点。多序列比对及系统发生树分析表明, *MpASMT1*编码的氨基酸序列与珠美海棠(*M. zumi*) *MzASMT1* (KJ123721)同源性最高, 相似性达99.2%, 其次为葡萄(*Vitis vinifera*) ASMT (LOC100248671), 氨基酸序列相似性为66.4%。原核表达结果显示, 经0.25~2.0 mmol·L<sup>-1</sup>异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导的重组质粒可特异性表达分子量约58 kDa的融合蛋白, 且低温条件(15和25°C)能够提高该蛋白的可溶性表达; western blot分析表明融合表达蛋白能与His单克隆抗体特异性结合, 纯化蛋白的酶活性为7.8 pmol·mg<sup>-1</sup> (蛋白), 进一步证实*MpASMT1*编码蛋白成功表达。

**关键词:** 苹果; *MpASMT1*; 克隆; 生物信息学; 原核表达

褪黑素(melatonin)是一种生物必需的吲哚胺类小分子物质, 其化学名称为*N*-乙酰基-5-甲氧基色胺, 首先在牛(Bovini)的松果体中发现, 因此又称“松果体素”。褪黑素在动物和人体中具有重要的作用, 可以提高机体的免疫力, 调节生理节律, 延缓衰老及抗肿瘤等, 已被开发成产品大量应用于人类保健和医疗(Hardeland等2012; Carillo-Vico等2013; Reiter等2013)。植物中褪黑素的研究起步较晚, 直到1993年才首次在牵牛花(*Ipomoea nil*)中发现褪黑素, 随后利用色谱和质谱等技术在番茄(*Solanum lycopersicum*)、香蕉(*Musa × paradisiaca*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、苹果(*Malus pumila*)等植物中检测到褪黑素的存在, 但不同植物组织中褪黑素的含量存在较大差异(Dubbels等1995; Kim等2016; 王蕊等2016; Ye等2017)。

褪黑素可在植物组织内自由移动, 能够清除自由基且具有抗氧化作用, 被认为是一种新的植物生长调节剂(Hernández-Ruiz等2004; Kim等2016)。现已证实, 褪黑素在高等植物中具有广泛的生理功能, 能够调节种子发芽、植物开花、叶片衰老、果实成熟等生理过程(Arnao和Hernández-Ruiz 2014; Zhang等2015), 还可缓解干旱、重金属、低温等环

境胁迫对植物造成的损伤(Tan等2012; Reiter等2015)。此外, 外源褪黑素处理可显著提高苹果叶片中防御酶活性和抗病相关基因的表达, 从而诱导寄主对褐斑病菌(*Diplocarpon mali*)的抗性(Yin等2013); 褪黑素也可作为一种信号分子激发拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草对丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)的抗性反应(Lee等2014); 最近, Aghdam和Fard (2017)还发现外源褪黑素处理可显著降低草莓(*Fragaria × ananassa*)的采后腐烂并维持草莓的营养品质。

植物中褪黑素的合成需要4个连续的酶促反应, 其中*N*-乙酰基-5-羟色胺-*O*-甲基转移酶(*N*-acetylserotonin *O*-methyltransferase, ASMT; EC 2.1.1.4)是最后一个关键催化酶。Kang等(2011)首次在水稻(*Oryza sativa*)中克隆了ASMT, 该基因在叶片衰老、重金属、除草剂等逆境条件下被显著诱导表达, 而高温和黑暗也能提高ASMT的酶活性进而增加褪黑素的合成(Byeon和Back 2014)。Park等

收稿 2017-07-10 修定 2017-11-22

资助 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-28)、国家自然科学基金(31272001)和山东省“泰山学者”建设工程专项。

\* 通讯作者(cxwang@qau.edu.cn)。

(2013a)对水稻中的3个*ASMT*同源基因进行了研究,发现基因表达均受茉莉酸甲酯和脱落酸的诱导,但酶的催化活性较低。Zuo等(2014)在珠美海棠(*M. zumi*)中克隆了*MzASMT1*,该基因在拟南芥中过量表达后,褪黑素含量提高了2~4倍,降低了活性氧水平,增强了植株的抗旱性。Byeon等(2016)对拟南芥的*AtASMT*进行了克隆和功能分析,研究表明,基因表达受到重金属镉的诱导,在水稻中过量表达*AtASMT*,*ASMT*酶活性和褪黑素含量均显著升高。

目前,对于*ASMT*基因在植物抗病性中的作用研究还鲜有报道。苹果炭疽叶枯病(*Glomerella leaf spot*, GLS)是近年我国苹果上新发现的一种病害,导致苹果叶片早期大量脱落,也危害果实产生坏死斑,严重影响果实产量和品质(Wang等2012, 2015; 张路等2015)。不同苹果品种对炭疽叶枯病菌围小丛壳(*Glomerella cingulata*)的敏感性存在显著差异,‘富士’‘红星’等品种高度抗病,而‘嘎啦’‘秦冠’‘乔纳金’等品种则非常敏感。本实验室前期转录组测序结果显示,‘富士’和‘嘎啦’接种炭疽叶枯病菌后,苹果*ASMT*的表达量明显升高,且抗病品种中基因表达量升高更显著,推测该基因在苹果抗炭疽叶枯病菌反应中可能担任重要角色。本研究以‘富士’和‘嘎啦’为材料,通过克隆*MpASMT1*基因,对其序列进行生物信息学分析,并通过原核表达获得重组蛋白,旨在为进一步研究*MpASMT1*基因在苹果抗病性中的功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

三四年生‘富士’和‘嘎啦’苹果(*Malus pumila* Mill.)幼树栽植于青岛农业大学试验田,待其枝条上第5片叶完全展开后,取其健康叶片,用于提取总RNA,反转录获得cDNA,作为基因克隆的模板。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 植物总RNA提取和cDNA合成

利用植物柱式总RNA抽提纯化试剂盒(上海生工生物工程公司)进行总RNA的提取,使用P330超微量分光光度计(德国Implen公司)检测RNA的浓度,并用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测提取RNA的质量。以5 μg总RNA为模板, Oligo(dT)<sub>18</sub>为引物,

参照Prime Script™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit(大连TaKaRa公司)说明书反转录成cDNA。

#### 1.2.2 苹果*MpASMT1*基因的克隆

根据实验室前期转录组测序数据和定量PCR验证结果,‘嘎啦’叶片接种炭疽叶枯病菌*G. cingulata*后,*MpASMT1*表达量相比对照升高了2.5倍,而‘富士’接种病原菌后*MpASMT1*表达量升高为对照的8.6倍(数据未发表)。结合Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)网站公布的苹果全基因组序列,利用Oligo 7软件设计*MpASMT1*基因的上下游引物(*MpASMT1* Fwd: 5'-ATGGAGG-GAGATGAAGCAAGAGAT-3'; *MpASMT1* Rev: 5'-CTAAAGAAAACTTCAATGAGGGATCT-3'),克隆该基因。以上述cDNA为模板,PCR扩增体系为: 2×PrimeSTAR® Max DNA Polymerase(大连TaKaRa公司) 12.5 μL,上下游引物各0.5 μL, cDNA 0.25 μL, 双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)补足至25 μL。PCR反应程序为: 95°C预变性3 min; 95°C变性10 s, 59°C退火15 s, 72°C延伸6 s, 35个循环; 最后72°C延伸10 min。经1%琼脂糖凝胶电泳检测并回收PCR产物,连接至克隆载体pMD18T,热击转化法转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α,筛选阳性克隆提取质粒,委托青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。

#### 1.2.3 *MpASMT1*序列的生物信息学分析

将克隆获得的*MpASMT1*序列在NCBI数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行Blast验证和同源性分析,并利用DNAMAN对苹果*MpASMT1*和其他物种*ASMT*编码氨基酸序列进行多重比对,采用软件MEGA 5.1构建*MpASMT1*蛋白系统发生树。蛋白质的基本理化性质预测利用Expasy生物信息学网站的ProtParam工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行。使用SOPMA在线软件([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl))进行蛋白质二级结构预测。

#### 1.2.4 *MpASMT1*表达载体构建和原核表达

根据苹果*MpASMT1*序列及原核表达载体pE-T32a的多克隆位点分析,利用Oligo 7软件设计一对带有酶切位点的引物: 5'-CGCGGATCCATG-GAGGGAGATGAAGCAAGAG-3' (划线处为*Bam*HI酶切位点)和5'-CCCAAGCTTCTAAAGAAAA-

CTTCAATGAGGGA-3' (划线处为*Hind* III酶切位点)。以测序正确的质粒为模板, 利用上述引物进行PCR扩增, *Hind* III和*Bam*H I对纯化PCR产物及表达载体pET32a进行双酶切。目的条带回收纯化后, 用T4连接酶进行连接, 连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 菌落PCR和双酶切验证后, 进行测序鉴定阳性克隆, 获得重组表达载体, 命名为pET32a-*MpASMT1*。

将重组质粒pET32a-*MpASMT1*转化大肠杆菌感受态细胞Rosetta (DE3), 挑取阳性单克隆接种到含有50 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素的LB液体培养基中, 于37°C、200 r·min<sup>-1</sup>恒温振荡培养12 h; 按1%的接种量转接到新鲜的LB培养基中, 按上述条件进行培养, 待OD<sub>600</sub>达0.6~0.8时, 加入异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)至终浓度为1 mmol·L<sup>-1</sup>, 于不同时间(4、6、8、10和12 h)取样, 并添加不同终浓度的IPTG (0.25、0.5、1.0和2.0 mmol·L<sup>-1</sup>)分别进行诱导。菌液离心后, 沉淀用磷酸缓冲液(PBS, pH 7.8)重悬浮, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)检测蛋白表达情况。

### 1.2.5 融合蛋白的可溶性、蛋白免疫印迹检测及酶活性测定

在15、25和37°C条件下, 分别用1 mmol·L<sup>-1</sup>的IPTG进行诱导, 收集菌液离心后用PBS重新悬浮沉淀, 冰浴条件下超声破碎, 于4°C、10 000 $\times$ g离心10 min, 分别收集上清和沉淀(付楠霞等2014)。经SDS-PAGE分离后将蛋白电转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(美国Bio-Rad公司)上, 首先用5% (m/V)脱脂奶粉室温封闭2 h, 随后加入组氨酸(His)单克隆抗体室温孵育2 h, 用TBST缓冲液(包括50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7.8, 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 0.05% Tween 20)洗涤PVDF膜3次后, 加入碱性磷酸酯酶标记的马抗鼠免疫球蛋白(IgG), 室温孵育2 h, 再次用TBST洗涤PVDF膜, 最后用氮蓝四唑(nitro-blue tetrazolium, NBT)/5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸盐(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, BCIP)底物进行显色10 min, 终止反应观察拍照。利用镍柱对His标签融合蛋白进行纯化, 酶活性测定参考Zuo等(2014)的方法, 以*S*-腺苷甲

硫氨酸和*N*-乙酰基-5-羟色胺为底物, 利用色谱技术测定褪黑素的产生量; 酶活性以每毫克蛋白催化产生的褪黑素量[pmol·mg<sup>-1</sup> (蛋白)]表示。

## 2 实验结果

### 2.1 苹果*MpASMT1*基因的克隆和序列分析

选取健康的‘富士’和‘嘎啦’叶片提取总RNA, 反转录成cDNA。以该cDNA为模板, 用*MpASMT1* Fwd和*MpASMT1* Rev特异性引物进行PCR扩增, 产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 在约1 000 bp处均有一特异性条带(图1)。将条带进行克隆测序均获得1 077 bp的核苷酸序列, 经DNAMAN软件比对分析, 发现‘富士’和‘嘎啦’中所克隆的*ASMT*基因序列完全一致。在NCBI数据库中Blastn发现该序列与珠美海棠的*MzASMT1* (KJ123721)序列相似性最高, 为99.6%, 与其他植物*ASMT*序列的相似性也在60%以上。进一步用推导的氨基酸序列进行Blastp, 发现与其他果树的*ASMT*编码氨基酸序列相似性在43%以上。由此判断克隆所得的全长cDNA序列为苹果*ASMT*, 命名为*MpASMT1*, 并将序列上传至GenBank数据库(登记号: MF135479)。

### 2.2 *MpASMT1*编码蛋白的理化性质和二级结构预测

利用ExPASy的ProtParam在线分析软件推测*MpASMT1*编码蛋白的基本理化性质: 该蛋白质理

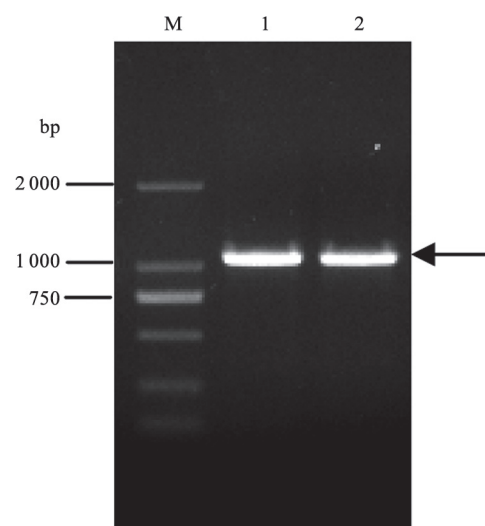


图1 苹果*MpASMT1*的PCR扩增  
Fig.1 PCR amplification of *MpASMT1* from *M. pumila*  
M: DNA分子量标准; 1: ‘富士’; 2: ‘嘎啦’。

论分子量约为39.7 kDa, 理论等电点(pI)为5.42, 预测分子式为 $C_{1801}H_{2825}N_{465}O_{513}S_{18}$ , 不稳定系数为32.26, 平均疏水系数为0.054, 推测蛋白为疏水的稳定蛋白。氨基酸组成中酸性氨基酸(Asp+Glu) 48个, 碱性氨基酸(Arg+Lys) 36个, 说明MpASMT1蛋白是带负电荷的。此外, 该基因编码的氨基酸序列没有信号肽, 是一种非分泌型蛋白, 属于AdoMet-MTases超级家族, 17~358位氨基酸为催化区域, 263位组氨酸为催化位点, 225位谷氨酸为底物S-腺苷甲硫氨酸结合位点。利用SOPMA在线软件对MpASMT1蛋白的二级结构进行分析, 发现其二级结构主要由 $\alpha$ -螺旋、随机卷曲、 $\beta$ -折叠和 $\beta$ -转角四种结构类型组成, 其中 $\alpha$ -螺旋含量最高, 占二级结构中的41.62%, 说明MpASMT1蛋白的二级结构是稳定的。

### 2.3 MpASMT1编码氨基酸序列比对及系统发生树分析

将苹果MpASMT1编码的氨基酸序列与珠美海棠、可可树(*Theobroma cacao*)、沙梨(*Pyrus pyrifolia*)、拟南芥、葡萄和水稻ASMT编码的氨基酸序列进行多重比对, 结果如图2所示: 所比对的7种不同植物ASMT编码氨基酸序列之间具有一定的同源性, 相似性为58.4%。MpASMT1与不同来源的ASMT同源性存在较大差异, 其中与珠美海棠氨基酸序列相似性最高, 为99.2%; 其次为葡萄和可可树, 相似性分别为66.4%和52.4%; 而与拟南芥AtASMT氨基酸序列相似性最低, 仅为35.4%。不同植物间ASMT蛋白序列中催化位点高度保守, 均为组氨酸(His, H), 但底物结合位点不同: 苹果与珠美海棠ASMT蛋白的底物结合位点为谷氨酸(Glu,

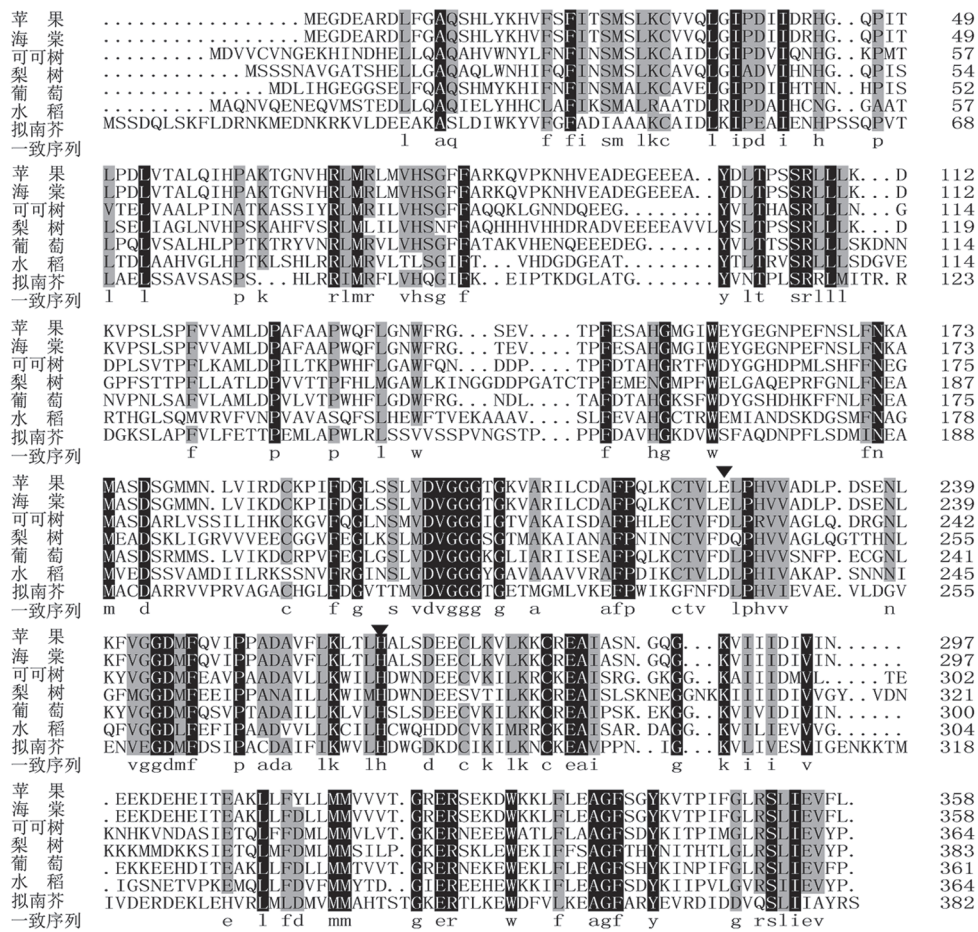


图2 苹果与其他6种植物ASMT编码氨基酸序列多重比对

Fig.2 Multiple alignment of deduced amino acid sequences of ASMT1 from *M. pumila* and six other plants

黑色三角代表底物结合位点(E和D)和催化位点(H), 黑色区域代表氨基酸同源性为100%, 灰色区域代表氨基酸同源性在75%以上。

G), 其他植物中该蛋白的底物结合位点为天冬氨酸(Asp, D)。此外, 苹果与珠美海棠ASMT氨基酸序列中仅3个位点存在差异, 即第143、186和313位氨基酸, 表现出属内同源性高, 属间同源性相对较低的特点。

利用氨基酸Blastp比对功能进行同源性搜索, 对搜索到的12种不同植物来源的ASMT氨基酸序列加上MpASMT1, 采用MEGA 5.1软件中的邻接法构建系统发生树, 结果如图3所示: 苹果与海棠和葡萄聚在一个分支, 说明MpASMT1与海棠和葡萄中ASMT的亲缘关系较近; 玉米(*Zea mays*)、乌拉尔图小麦(*Triticum urartu*)、糙伏毛燕麦(*Avena strigosa*)和水稻单独聚在一个分支, 与MpASMT1亲缘关系较远, 可能与它们同属于单子叶植物有关; 模式植物拟南芥单独为一个分支, 与其他12种植物的亲缘关系均较远, 说明植物ASMT蛋白氨基酸序列在系统进化上具有一定的变异性。

#### 2.4 MpASMT1原核表达条件优化和SDS-PAGE检测

利用Hind III和BamH I对重组质粒pET-MpASMT1进行双酶切, 酶切产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 在1 000 bp处有一条特异性条带, 且重组质粒的测序结果与克隆序列完全一致, 表明苹果MpASMT1原核表达载体pET-MpASMT1构建成功。将鉴定正确的重组质粒pET-MpASMT1转化大

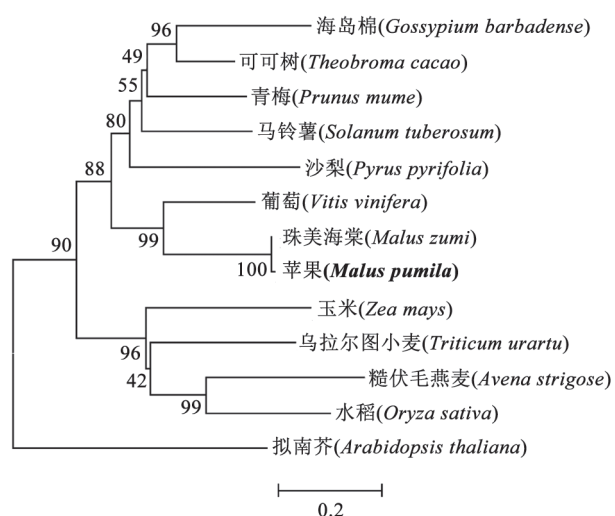


图3 苹果及其他植物ASMT氨基酸序列的系统发生树  
Fig.3 Phylogenetic tree of ASMTs from *M. pumila* and other plants  
分支线上数值表示系统发生树分支可信度。

肠杆菌Rosetta (DE3), 经1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG诱导后, 于不同时间取样进行SDS-PAGE电泳分析, 结果显示(图4), pET32a空载体经诱导后和重组质粒pET-MpASMT1未诱导时, 均未出现明显的特异性条带, 而重组质粒经IPTG诱导后产生了一条分子量约58 kDa的特异性条带, 由于载体中His表达标签为18 kDa, 所诱导蛋白的实际大小约为40 kDa, 与MpASMT1预测蛋白大小(39.7 kDa)一致, 表明MpASMT1基因在大肠杆菌中已成功表达。融合蛋白在诱导后4 h开始高效表达, 随诱导时间延长表达量升高, 但在诱导8 h后表达量趋于稳定。从图5的结果可看出, 0.25~2.0 mmol·L<sup>-1</sup>的IPTG均可诱导融合蛋白的表达, 但不同浓度IPTG对MpASMT1在大肠杆菌中的表达量没有显著影响。

#### 2.5 融合蛋白的可溶性、蛋白免疫印迹及酶活性分析

离心收集诱导后的含重组质粒pET-MpASMT1

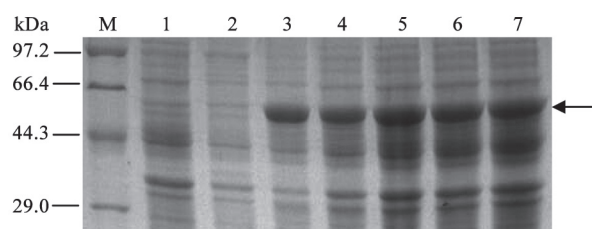


图4 pET-MpASMT1在大肠杆菌中表达蛋白的SDS-PAGE检测  
Fig.4 SDS-PAGE analysis of recombinant MpASMT1 protein in *E. coli*

M: 蛋白分子量标准, 图5~7同; 1: pET32a诱导8 h; 2: pET-MpASMT1未诱导; 3~7: pET-MpASMT1于37°C诱导4、6、8、10和12 h。

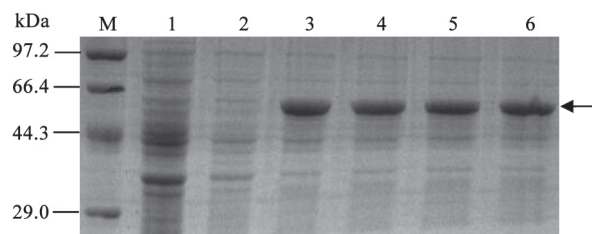


图5 不同IPTG浓度对pET-MpASMT1在大肠杆菌中表达的影响

Fig.5 Effects of different IPTG concentrations on recombinant MpASMT1 protein expression in *E. coli*

1: pET32a诱导8 h; 2: pET-MpASMT1未诱导; 3~6: pET-MpASMT1于0.25、0.5、1.0和2.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG浓度下诱导6 h。

的大肠杆菌DE3, 经超声破碎后, 分别取上清和沉淀进行SDS-PAGE检测, 结果如图6所示: 温度对*MpASMT1*在大肠杆菌中的表达量和可溶性影响较大。在37°C下诱导, 融合蛋白表达量较低, 沉淀和上清中的蛋白含量相当; 而在15和25°C下诱导, 融合蛋白的表达量较高, 且蛋白主要存在于上清中, 沉淀中含量较低, 表明此温度下重组蛋白主要以可溶性蛋白形式表达。

用His表达标签的特异性单克隆抗体, 对融合表达蛋白进行蛋白免疫印迹(western blot)分析, 结果显示(图7), pET-*MpASMT1*经IPTG诱导后产生的约58 kDa目标条带与His单克隆抗体发生了特异性识别, PVDF膜上出现信号较强的单一免疫条带, 而与诱导后pET32a空载体和未诱导的pET-*MpASMT1*无反应, PVDF膜上没有出现免疫条带。酶活性测定结果表明, 纯化的融合蛋白可体外合成褪黑

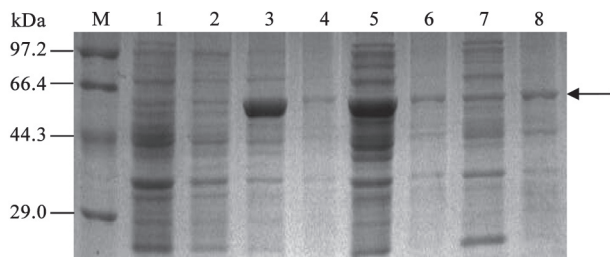


图6 融合蛋白可溶性分析

Fig.6 Solubility analysis of recombinant *MpASMT1* protein

1: pET-32a诱导8 h; 2: pET-*MpASMT1*未诱导; 3和4: 15°C诱导, 菌液超声破碎后的上清和沉淀; 5和6: 25°C诱导, 菌液超声破碎后的上清和沉淀; 7和8: 37°C诱导, 菌液超声破碎后的上清和沉淀。

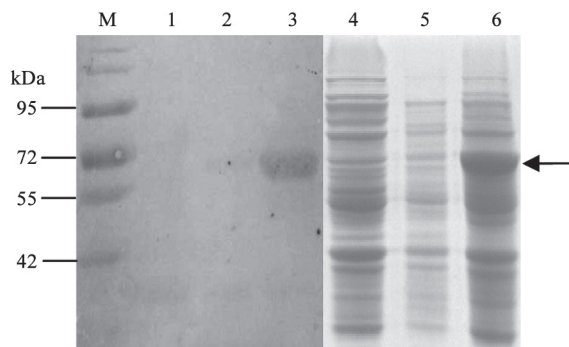


图7 融合蛋白western blot分析

Fig.7 Western blot analysis of recombinant *MpASMT1* protein

1和4: pET-32a诱导8 h; 2和5: pET-*MpASMT1*未诱导; 3和6: pET-*MpASMT1*诱导8 h。

素, 其活性为7.8 pmol·mg<sup>-1</sup> (蛋白), 进一步证实*MpASMT1*编码蛋白正确表达。

### 3 讨论

褪黑素在植物中具有多样而重要的生理功能, 相关研究在园艺植物及农作物上受到越来越多的关注(Arno和Hernández-Ruiz 2015; 王蕊等2016)。褪黑素广泛存在于植物中, 但其含量在不同植物、不同组织甚至不同环境中存在显著差异。除植物本身遗传特性的影响外, 各种逆境胁迫均可影响褪黑素的合成。植物体内褪黑素由色氨酸经过4步酶促反应合成, 色氨酸脱羧酶(tryptophan decarboxylase, TDC)和色胺-5-羟化酶(tryptamine 5-hydroxylase, T5H)主要催化色氨酸产生血清素, *ASMT*可催化血清素形成褪黑素, 是调控植物体内褪黑素合成的关键功能基因(Park等2013b; Byeon和Back 2016)。研究已证实, 低温、重金属、干旱等胁迫条件下, 植物*ASMT*的表达显著上调, 褪黑素的含量也随之升高(Park等2013a; Zuo等2014; Byeon等2016)。此外, 外源褪黑素也可影响植物体内褪黑素的含量, 进而缓解病原菌侵染、盐胁迫、高温等生物或非生物因素对植物造成的损伤(Yin等2013; Lee等2014; 王伟香等2016)。目前, 褪黑素在植物抗病性中作用的研究还较少, 仅Park等(2009)发现辣椒(*Capsicum annuum*) *PepTDC1*的表达受病原菌的诱导, *TDC*在水稻中过表达具有延迟衰老和抵抗病菌侵染的作用(Kanjanaphachot等2012), 但*ASMT*是否参与植物抗病尚未见报道。

结合课题组前期转录组测序结果, 本研究以‘富士’和‘嘎啦’为材料, 采用反转录PCR技术获得了苹果*N*-乙酰基-5-羟色胺-*O*-甲基转移酶基因的全长cDNA序列, 分析显示两个苹果品种的*ASMT*序列完全一致, 命名为*MpASMT1*, 开放阅读框1 077 bp, 编码358个氨基酸, 分子量为39.7 kDa; *MpASMT1*核苷酸序列及其推导的氨基酸序列与珠美海棠*MzASMT*序列相似性分别为99.6%和99.2% (Zuo等2014)。多重序列比对发现, 苹果*MpASMT1*编码的氨基酸序列与葡萄的*ASMT*氨基酸序列具有相对较高的相似性(66.4%), 而与水稻、拟南芥甚至沙梨*ASMT*氨基酸序列相似性均不高; 植物*ASMT*酶的催化位点高度保守, 均为组氨酸, 而底物结合位

点相对保守, 为谷氨酸和天冬氨酸。*MpASMT1*系统发生分析表明, 该基因编码的氨基酸序列与珠美海棠和葡萄的亲缘关系最近(Zuo等2014)。虽然植物ASMT与动物褪黑素合成途径的最后一个酶高度同源, 但本研究获得的*MpASMT1*与第一个克隆的水稻*ASMT*编码氨基酸序列相似性为39.7%, 与拟南芥*AtASMT*编码氨基酸序列相似性更低, 为35.4%, 且拟南芥与水稻*ASMT*编码氨基酸序列相似性也仅为31% (Kang等2011; Byeon等2016)。由此说明, *ASMT*在同属植物中具有高度保守性, 但不同属植物间存在较大变异性, 从而使该基因能在不同物种间发挥其独特的生物学功能, 这是否与不同植物中褪黑素含量有较大差异存在相关性, 还有待进一步研究。

本研究以pET32a为载体, 转化大肠杆菌Rosetta (DE3)菌株, 在IPTG诱导下高效表达了*MpASMT1*融合蛋白, 结果表明IPTG浓度对蛋白表达量没有明显的影响, 但温度可显著影响蛋白表达量和蛋白的可溶性。较低的诱导温度有利于提高原核表达体系中可溶性蛋白的形成, 降低不溶性包涵体的表达(Schein和Noteborn 1988; 曾祥玲等2016)。本研究发现, 15和25°C条件下进行诱导, *MpASMT1*融合蛋白表达量和可溶性较高, 37°C进行诱导时, 蛋白表达量较低且包涵体增加。Ben-Abdallah等(2011)在大肠杆菌系统中原核表达了动物*ASMT*, 发现融合蛋白以包涵体存在, 无法进行活性测定, 而植物*ASMT*的原核表达蛋白多是可溶的, 但*ASMT*酶活性存在一定差异(Park等2013b; Zuo等2014; Byeon和Back 2016)。本研究中具有酶活性的可溶性重组蛋白的获得, 为深入解析苹果*MpASMT1*的蛋白质结构及在褪黑素生物合成中的功能提供参考。

### 参考文献(References)

- Aghdam MS, Fard JR (2017). Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria × ananassa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity. *Food Chem*, 221: 1650–1657
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2014). Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? *Trends Plant Sci*, 19 (12): 789–797
- Arnao MB, Hernández-Ruiz J (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *J Pineal Res*, 59 (2): 133–150
- Ben-Abdallah M, Bondet V, Fauchereau F, et al (2011). Production of soluble, active acetyl serotonin methyl transferase in *Leishmania tarentolae*. *Protein Express Purif*, 75 (1): 114–118
- Byeon Y, Back K (2014). Melatonin synthesis in rice seedlings in vivo is enhanced at high temperatures and under dark conditions due to increased serotonin *N*-acetyltransferase and *N*-acetylserotonin methyltransferase activities. *J Pineal Res*, 56 (2): 189–195
- Byeon Y, Back K (2016). Melatonin production in *Escherichia coli* by dual expression of serotonin *N*-acetyltransferase and caffeic acid *O*-methyltransferase. *Appl Microbiol Biot*, 100 (15): 6683–6691
- Byeon Y, Lee HJ, Lee HY, et al (2016). Cloning and functional characterization of the *Arabidopsis* *N*-acetylserotonin *O*-methyltransferase responsible for melatonin synthesis. *J Pineal Res*, 60 (1): 65–73
- Carillo-Vico A, Lardone PJ, Álvarez-Sánchez N, et al (2013). Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci*, 14 (4): 8638–8683
- Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, et al (1995). Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res*, 18 (1): 28–31
- Fu NX, Zhai F, Jiang M, et al (2013). cDNA cloning sequence analysis and prokaryotic expression of farnesyl pyrophosphate synthase from *Epicauta gorhami* Marseul (Coleoptera: Meloidae). *Sci Agr Sin*, 47 (2): 273–283 (in Chinese with English abstract) [付楠霞, 翟枫, 姜鸣等(2013). 锯角豆芫菁法尼基焦磷酸合酶的cDNA克隆、序列分析及原核表达. *中国农业科学*, 47 (2): 273–283]
- Hardeland R, Madrid JA, Tan DX, et al (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J Pineal Res*, 52 (2): 139–166
- Hernández-Ruiz J, Cano A, Arnao MB (2004). Melatonin: a growth-stimulating compound present in lupin tissues. *Planta*, 220 (1): 140–144
- Kang K, Kong K, Park S, et al (2011). Molecular cloning of a plant *N*-acetylserotonin methyltransferase and its expression characteristics in rice. *J Pineal Res*, 50 (3): 304–309
- Kanjanaphachot P, Wei BY, Lo SF, et al (2012). Serotonin accumulation in transgenic rice by over-expressing tryptophan decarboxylase results in a dark brown phenotype and stunted growth. *Plant Mol Biol*, 78 (6): 525–543
- Kim M, Seo H, Park C, et al (2016). Examination of the auxin hypothesis of phytomelatonin action in classical auxin assay systems in maize. *J Plant Physiol*, 1190: 67–71
- Lee HY, Byeon Y, Back K (2014). Melatonin as a signal molecule triggering defense responses against pathogen attack in *Arabidopsis* and tobacco. *J Pineal Res*, 57 (3): 262–268
- Park S, Byeon Y, Back K (2013a). Functional analyses of three ASMT gene family members in rice plants. *J Pineal*

- Res, 55 (4): 409–415
- Park S, Byeon Y, Kim YS, et al (2013b). Kinetic analysis of purified recombinant rice *N*-acetylserotonin methyltransferase and peak melatonin production in etiolated rice shoots. *J Pineal Res*, 54 (2): 139–144
- Park S, Kang K, Lee K, et al (2009). Induction of serotonin biosynthesis is uncoupled from the coordinated induction of tryptophan biosynthesis in pepper fruits (*Capsicum annuum*) upon pathogen infection. *Planta*, 230 (6): 1197–1206
- Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, et al (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev Med Chem*, 13 (3): 373–384
- Reiter RJ, Tan DX, Zhou Z, et al (2015). Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. *Molecules*, 20 (4): 7396–7437
- Schein CH, Noteborn MHM (1988). Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. *Nat Biotechnol*, 6 (3): 291–294
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, et al (2012). Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot*, 63 (2): 577–597
- Wang B, Li BH, Dong XL, et al (2015). Effects of temperature, wetness duration and moisture on the conidial germination, infection and disease incubation period of *Glomerella cingulata*. *Plant Dis*, 99 (2): 249–256
- Wang CX, Zhang ZF, Li BH, et al (2012). First report of *Glomerella* leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. *Plant Dis*, 96 (6): 912
- Wang R, Yang XL, Xu H, et al (2016). Research progress of melatonin biosynthesis and metabolism in higher plants. *Plant Physiol J*, 52 (5): 615–627 (in Chinese with English abstract) [王蕊, 杨小龙, 须晖等(2016). 高等植物褪黑素的合成和代谢研究进展. *植物生理学报*, 52 (5): 615–627]
- Wang WX, Zhang RM, Sun Y, et al (2016). Effect of exogenous melatonin on the antioxidant system of cucumber seedling under nitrate stress. *Acta Horti Sin*, 43 (4): 695–703 (in Chinese with English abstract) [王伟香, 张锐敏, 孙艳等(2016). 外源褪黑素对硝酸盐胁迫条件下黄瓜幼苗抗氧化系统的影响. *园艺学报*, 43 (4): 695–703]
- Ye T, Hao YH, Yu L, et al (2017). A simple, rapid method for determination of melatonin in plant tissues by UPLC coupled with high resolution orbitrap mass spectrometry. *Front Plant Sci*, 8: 64
- Yin L, Wang P, Li M, et al (2013). Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch. *J Pineal Res*, 54 (4): 426–434
- Zeng XL, Zheng RR, Luo J, et al (2016). Cloning and characterization of cinnamate 4-hydroxylase (C4H) genes from *Osmanthus fragrans*. *Acta Horti Sin*, 43 (3): 525–537 (in Chinese with English abstract) [曾祥玲, 郑日如, 罗靖等(2016). 桂花C4H基因的克隆与表达特性分析. *园艺学报*, 43 (3): 525–537]
- Zhang L, Wang CX, Li BH, et al (2015). Sexual reproduction, biological characteristics and pathogenicity of ascospores of *Glomerella cingulata*. *Mycosystema*, 34 (6): 1101–1110 (in Chinese with English abstract) [张路, 王彩霞, 李保华等(2015). 围小丛壳 *Glomerella cingulata* 子囊孢子交配繁殖、生物学特性及致病性. *菌物学报*, 34 (6): 1101–1110]
- Zhang N, Sun Q, Zhang H, et al (2015). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *J Exp Bot*, 66 (3): 647–656
- Zuo B, Zheng X, He P, et al (2014). Overexpression of *MzASMT* improves melatonin production and enhances drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *J Pineal Res*, 57 (4): 408–417



## Cloning and prokaryotic expression of *N*-acetylserotonin *O*-methyltransferase gene in *Malus pumila*

WU Cheng-Cheng, LI Bao-Hua, LIAN Sen, LIANG Wen-Xing, WANG Cai-Xia\*

College of Plant Health and Medicine, Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

**Abstract:** *N*-acetylserotonin *O*-methyltransferase gene (*MpASMT1*) was amplified by reverse transcription PCR from leaves of *Malus pumila* Mill. 'Fuji' and 'Gala'. Full-length cDNA sequence, phylogenetic relationship and physicochemical properties of this gene were analyzed by a variety of bioinformatics softwares such as DNAMAN, MEGA 5.1 and ProtParam. Then, a recombinant plasmid pET-*MpASMT1* was constructed using pET32a as a fused expression vector. Optimal conditions for recombinant protein expression were determined in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) including inducing time, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration and inducing temperature. Recombinant protein expression and solubility of *MpASMT1* were detected by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Western blot and enzyme activity assay were used to confirm the successful expression of *MpASMT1* in *E. coli*. The results show that full-length cDNA sequence of *MpASMT1* from *M. pumila* was obtained and its GenBank accession number is MF135479. Its open reading frame (ORF) of 1 077 bp encodes 358 amino acid residues with a predicted molecular weight of 39.7 kDa and an isoelectric point value of 5.42. *MpASMT1* is a non-secretory and hydrophobic stable protein. The 263 aa histidine is a catalytic site and 225 aa glutamate is a substrate binding site of *S*-adenylyl methionine. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis showed that the encoded protein had the closest genetic relationship with *M. zumi* *MzASMT1* (GenBank: KJ123721) and *Vitis vinifera* *ASMT* (GenBank: LOC100248671), and the similarities of amino acid sequences were 99.2% and 66.4%, respectively. Prokaryotic expression results showed that efficient expression of recombinant *MpASMT1* protein about 58 kDa was realized when induced by 0.25–2.0 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG in *E. coli*. However, lower temperature (15 and 25°C) could increase the solubility of recombinant protein. Western blot analysis showed that the recombinant protein could be specifically recognized by His monoclonal antibody, and the enzyme activity of purified *MpASMT1* protein was 7.8 pmol·mg<sup>-1</sup> (protein), which further confirms that *MpASMT1* protein was successfully expressed.

**Key words:** apple; *MpASMT1*; cloning; bioinformatics; prokaryotic expression

Received 2017-07-10 Accepted 2017-11-22

This work was supported by Chinese Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-28), the National Natural Science Foundation of China (31272001), and Taishan Scholar Construction Foundation of Shandong Province.

\*Corresponding author (cxwang@qau.edu.cn).