

白木香 AsMAPK3 基因的原核表达及其在洋葱表皮瞬时表达体系中的定位研究

徐艳红¹, 田美慧^{1,2}, 吕菲菲³, 孙佩文¹, 魏建和^{1,3*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193
2. 东北林业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040
3. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所海南分所 海南省南药资源保护与开发重点实验室, 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海南 海口 570311

摘要:目的 构建国产沉香基原植物白木香 AsMAPK3 基因的原核表达载体, 诱导重组蛋白正确表达, 并研究 AsMAPK3 的亚细胞定位情况, 为抗体制备准备材料, 为筛选其互作蛋白及进一步研究其功能奠定基础。方法 通过 PCR 方法克隆 AsMAPK3 基因的部分编码序列, 构建重组原核表达载体 pET-28a-AsMAPK3, 并诱导蛋白表达。克隆 AsMAPK3 基因全长编码区, 构建绿色荧光蛋白 (GFP) 瞬时表达载体 pAN580-AsMAPK3, 通过基因枪法转化洋葱表皮, 荧光显微镜观察 GFP 的发光情况。结果 含有重组表达载体的大肠杆菌 BL21(DE3) 在 37 °C 经 0.5 mmol/L 异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG) 诱导 4 h 后, 可获得相对分子质量约为 39 000 的融合蛋白, 该融合蛋白在上清和包涵体中均有表达。瞬时转化洋葱表皮 GFP 荧光观察发现, AsMAPK3 主要在细胞核和质膜表达。结论 成功实现了 AsMAPK3 的体外表达和纯化, 明确了 AsMAPK3 的亚细胞定位, 为后续开展其功能研究奠定了基础。

关键词: 白木香; MAPK; 原核表达; 瞬时表达; 大肠杆菌

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2133-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.024

Prokaryotic expression of *Aquilaria sinensis* AsMAPK3 gene and its localization in transient expression system in onion epidermis

XU Yan-hong¹, TIAN Mei-hui^{1,2}, LV Fei-fei³, SUN Pei-wen¹, WEI Jian-he^{1,3}

1. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education & National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
2. Northeast Forestry University, Harbin 150040, China
3. Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine & Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

Abstract: Objective To construct a prokaryotic vector of AsMAPK3 gene from *Aquilaria sinensis*, the original plant of agarwood, and induce the recombinant proteins expression so as to study the subcellular localization of AsMAPK3. This work will prepare materials for antibody preparation and lay a foundation for screening the interaction proteins and further studying their functions. **Methods** Partial cDNA sequence was amplified by PCR and recombined to pET-28a vector to construct a prokaryotic expression vector pET-28a-AsMAPK3, and induced the expression of the fusion protein. The full-length cDNA of AsMAPK3 was amplified and subcloned to pAN580 vector to construct a pAN580-AsMAPK3 transient expression vector. The recombinant plasmid of pAN580-AsMAPK3 was introduced into the onion epidermis by gold particle bombardment, and GFP fluorescence was observed by

收稿日期: 2017-12-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573525, 81673549); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程--重大协同创新项目 (2016-I2M-2-003); 海南省自然科学基金项目 (20163150)

作者简介: 徐艳红 (1980—), 女, 博士, 主要从事药用植物次生代谢产物合成与调控研究。Tel: (010)57833363 E-mail: yhxu@implad.ac.cn

*通信作者 魏建和 Tel/Fax: (010)57833016 E-mail: wjianh@263.net

luorescence microscope. **Results** The *Escherichia coli* BL21 (DE3) containing the recombinant plasmid was induced with 0.5 mmol/L isopropyl- β -D-galactoside (IPTG) at 37 °C for 4 h, and a fusion protein about 39 000 was obtained which was expressed in supernatant and inclusion bodies. The results of GFP fluorescence observation of transient transformed onion epidermis showed that AsMAPK3 was mainly expressed in the nucleus and plasma membrane. **Conclusion** The expression and purification of AsMAPK3 *in vitro* were successfully carried out, and the subcellular localization of AsMAPK3 gene was confirmed. This work provides a substantial foundation for follow-up function study of AsMAPK3.

Key words: *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg; MAPK; prokaryotic expression; transient expression; *Escherichia coli*

沉香是沉香属物种受伤害后诱导产生的含树脂木材,是珍稀濒危南药和高价值的世界性资源。沉香属植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 是我国生产沉香的唯一正品植物来源,也是一种典型的诱导型药用植物。白木香只有受到外界伤害时,才能在伤口及周围木质部产生倍半萜和色酮等沉香药材的主要成分^[1-5]。研究表明,沉香的形成是白木香防御反应的产物^[6]。然而,从“伤害信号的接收到沉香倍半萜类物质形成”这一过程的分子调控机制一直未得到清晰揭示,制约了高效稳定结香技术的突破。

蛋白质可逆磷酸化是生物内普遍存在的一种响应外界刺激的调节机制,在信号转导中发挥重要作用^[7]。蛋白质的磷酸化与去磷酸化过程主要依赖蛋白激酶和蛋白磷酸酶。蛋白激酶通过膜受体感受外界信号,导致胞内一些离子和分子浓度发生变化从而将激活蛋白磷酸化途径,调控下游抗性相关基因的表达^[8]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联系统就是由一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶组成,被认为是植物细胞将胞外刺激转换成胞内反应的主要途径之一,可通过逐级磷酸化反应将胞内信号级联放大,形成庞大的信号网状,从而响应外界环境^[9-11]。MAPK 处于级联系统的最下游,其活性受蛋白质可逆磷酸化的调节,通过磷酸化作用而激活,磷酸酶的去磷酸化作用而使其失活^[12]。活化的 MAPK 既可作为信号转导的一个环节继续磷酸化下游特异的靶蛋白,又可以进入细胞核激活转录因子,调控基因的表达^[13-14]。植物中存在的 MAPK 级联系统由 MAPK 与 MAPKK 和 MAPKKK 组成。对植物 MAPK 级联系统的研究起步较晚,但进展非常迅速。大量的证据表明,MAPK 级联系统在植物各种信号转导途径中起重要作用^[15-16]。

为揭示从“伤害信号→沉香倍半萜合成”的分子机制,课题组前期进行了健康和伤害白木香茎的转录组测序,发现一系列转录因子和蛋白激酶的表达受伤害诱导显著上调,其中包括 MAPK 级联系统^[17]。本实验从白木香转录组数据中共鉴定得到 34 条差异表

达的 MAPKs 序列,进一步通过荧光定量 PCR,发现 AsMAPK2、AsMAPK3、AsMAPK5、AsMAPK15 对外源 MeJA 处理的响应显著^[17]。已有的研究表明,MAPK 级联途径广泛参与植物生长发育和逆境的信号转导过程。其中,AtMAPK3、AtMAPK4、AtMAPK6 和它们的上游激酶及其在其他植物中的同源基因的研究较为清楚,而 MAPK 家族的其他 MAPKs 研究较少^[18]。在植物对干旱、高盐和低温等环境胁迫的防御机制中,发现拟南芥 AtMAPK3 显著响应这些逆境处理条件,5 min 内被诱导表达,1 h 内显著增强,随后持续增加至 24 h 到达峰值^[19];Asai 等^[20]通过拟南芥瞬时表达系统揭示了免疫反应中的 1 条 MAPK 级联信号组分,即 MEKK1→MKK4/MK5→MAPK3/MAPK6。活化的 MAPK3/MAPK6 能够调节 WRKY22/WRKY29,从而激活防卫基因转录产生免疫反应。由于 MAPK3 处于众多信号途径的交叉点,本实验对白木香中 AsMAPK3 基因的原核表达及其亚细胞定位进行研究,以期后续深入研究其功能奠定基础。

1 仪器与材料

高速冷冻离心机(eppendorf 公司);水浴锅(国华电器有限公司);基因枪(Bio-Rad 公司)、PCR 仪(Bio-Rad 公司);迷你型电泳槽(Bio-Rad 公司);NanoDrop 2000C 紫外可见分光光度计(Thermo 公司);荧光显微镜(Olympus 公司)。白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 愈伤组织由本实验室培养,经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所魏建和教授鉴定。

2 方法

2.1 白木香总 RNA 提取及 cDNA 的合成

利用 RNA 提取纯化试剂盒(Aidlab 公司,中国)提取总 RNA。1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,分光光度计 NanoDrop 2000C(Thermo Scientific 公司,美国)测定 RNA 浓度。取约 2 μ g RNA 利用 Super SMARTTM PCR cDNA 合成试剂盒(Clontech 公司,美国)进行反转录,合成 cDNA

第 1 链，作为基因克隆的模板。

2.2 AsMAPK3 基因扩增

选取白木香 AsMAPK3 基因 (KR092345) 部分序列设计特异引物，上游引物加入 BamH I 酶切位点：5'-CGGGATCCATGGCAGCTGGAGGTCAA-CTAG-3'，下游引物加入 SalI 酶切位点：5'-CGGTC-GACCAACATTCTATCCATTAGATCTATTGCC-3'，加下划线部分即为引入的酶切为点。以白木香 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 体系：LA Taq 酶 1 μL，10×LA 缓冲液 2.5 μL，dNTP mixture (2.5 mmol/L) 2 μL，上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL，cDNA 1.0 μL，ddH₂O 17.5 μL，终体系为 25 μL。PCR 反应程序：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，59 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1.5 min，30 个循环；72 °C 延伸 10 min；4 °C 保存。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后，回

收并纯化目的 DNA 片段，并与 pEASY-Simple 克隆载体连接，转化 Trans-T1 感受态细胞，在含有 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-吡喃半乳糖苷 (X-gal) 和异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 的氨苄青霉素 (100 μg/mL) 平板上进行蓝白斑筛选，挑取白斑振荡培养过夜，经菌液 PCR 验证后，送测序确定阳性克隆。

2.3 原核表达载体 pET-28a-AsMAPK3 的构建

将经测序目的基因序列正确的 pEASY-Simple-AsMAPK3 重组质粒和 pET-28a 载体质粒分别用 BamHI 和 SalI 进行双酶切，回收目的片段后，利用 T4 连接酶连接，如图 1 所示。将连接产物转化 Trans-T1 后，均匀涂布在含有卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 固体培养基中，37 °C 倒置培养 12~16 h。经菌液 PCR 和酶切鉴定为阳性的 pET-28a-AsMAPK3 质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行表达。

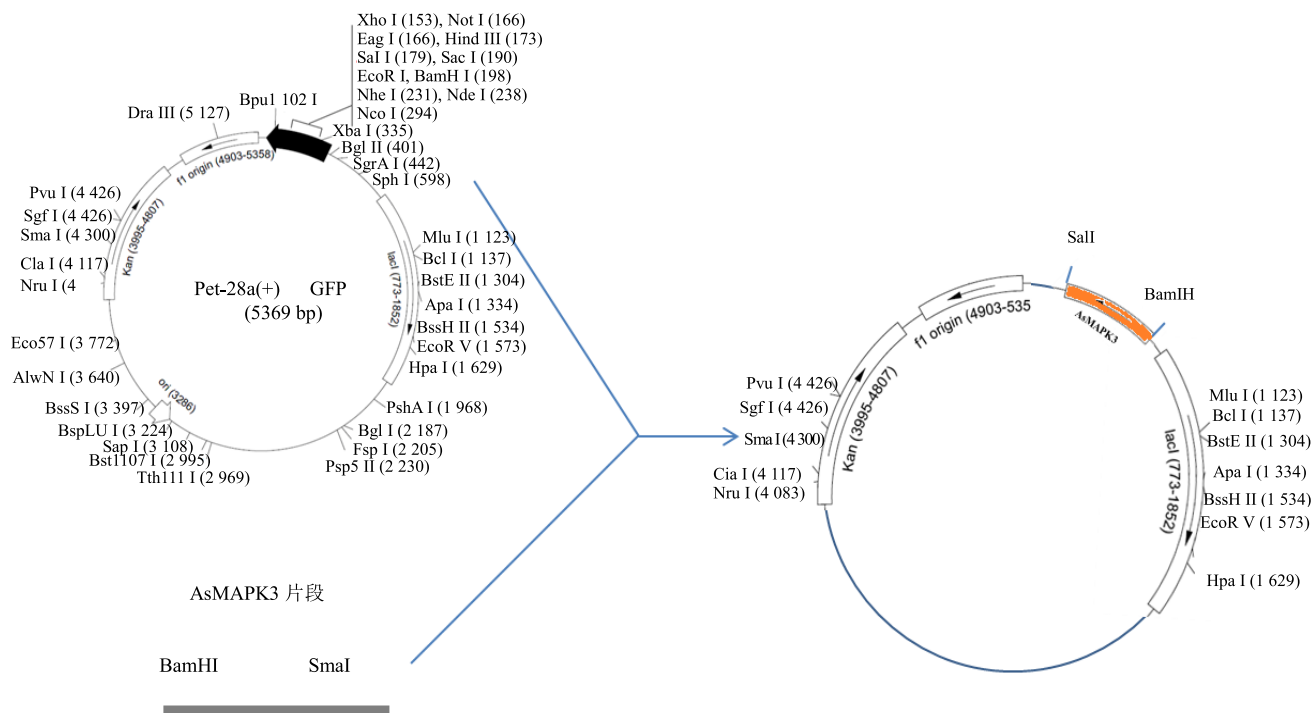


图 1 原核表达载体 pET-28a-AsMAPK3 的构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of construction of prokaryotic expression vector pET-28a-AsMAPK3

2.4 AsMAPK3 基因的原核表达

将含有重组质粒 pET-28a-AsMAPK3 的 *E. coli* BL21 (DE3) 阳性克隆振荡培养过夜，菌液以 1 : 50 稀释于含有卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 液体培养基中，37 °C 培养至 $A_{600} \approx 0.6$ 时，加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L，继续培养 4 h，离心收集菌体，经 1×PBS 样品缓冲液重悬，反复冻融 4~5 次充分裂解菌体，沸水煮 5 min 使蛋白变性后，10%

SDS-PAGE 电泳检测分析。

2.5 融合蛋白的纯化

按照确定的诱导条件诱导蛋白大量表达，8 000 r/min 离心 10 min，收集细胞，用于下一步的亲纯化。用 40 mL 结合缓冲液 (含蛋白酶抑制剂) 重悬细胞，超声处理，超声 3 s，间停 7 s，400 W 超声 30 min；4 °C、8 000 r/min 离心 30 min，上清用 0.45 μm 滤器滤过，沉淀置于冰上备用。

取 1 mL Ni-NTA His Bind 树脂, 用结合缓冲液平衡后加到过滤后的上清中, 冰上结合 4 h。将上述混合物上柱子, 让溶液流出。用洗涤缓冲液洗涤树脂, 每次 10 mL, 重复 3 次。用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白, 每次 1 mL, 重复 3 次, 收集洗脱液。每管取少许样品进行 SDS-PAGE, 检测蛋白纯化情况。

2.6 AsMAPK3-GFP 瞬时表达载体的构建及转化

在 AsMAPK3 ORF 2 端分别设计含有 SpeI 和 BamHI 位点的 PCR 引物, 扩增 AsMAPK3 全长编码区。PCR 产物回收后连接测序载体 pEASY-Simple Blunt。对测序正确的克隆提取质粒, 用 SpeI/BamHI 双酶切回收目的片段, 用 T4 连接酶与同时双酶切回收的表达载体 pAN580 (图 2) 片段连接。将连接产物转化大肠杆菌感受态 Trans-T1, 得到的单克隆分别进行菌液 PCR 和酶切 2 种方法鉴定。阳性克隆为构建正确的 pAN580-AsMAPK3 表达载体。构建正确的质粒基因枪法转化洋葱表皮, 黑暗培养 16 h 后激光显微镜观察。

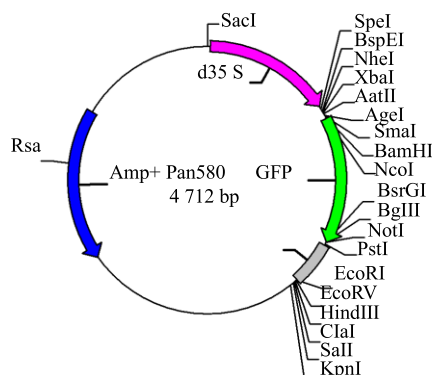
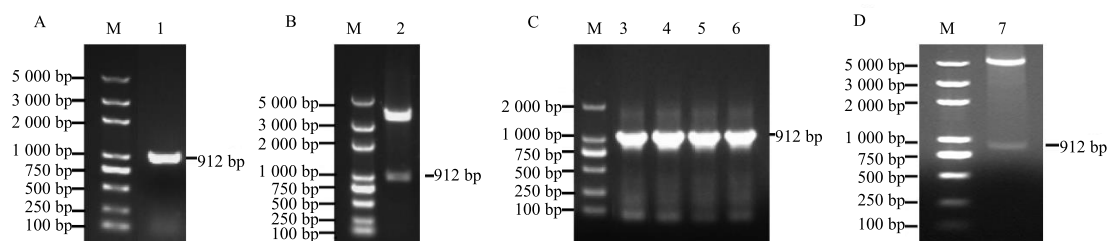


图 2 瞬时表达载体 pAN580 质粒图谱

Fig. 2 Map of pAN580 vector used for transient expression



A-目的片段的 PCR 扩增 B-PCR 扩增片段连接 T 载体连接阳性克隆的 BamHI/SalI 酶切鉴定 C-pET-28a-AsMAPK3 构建菌液 PCR

D-pET-28a-AsMAPK3 质粒双酶切鉴定 M-Marker 1~7-样品

A-PCR amplification of target fragment B-enzyme digestion identification of positive clones by BamHI/SalI C-identification of pET-28a-AsMAPK3 positive clones by bacteria PCR D-enzyme digestion identification of pET-28a-AsMAPK3 plasmid M-Marker 1~7-samples

图 3 AsMAPK3-28a 原核表达载体的构建

Fig. 3 Construction of AsMAPK3-28a prokaryotic expression vector

3 结果与分析

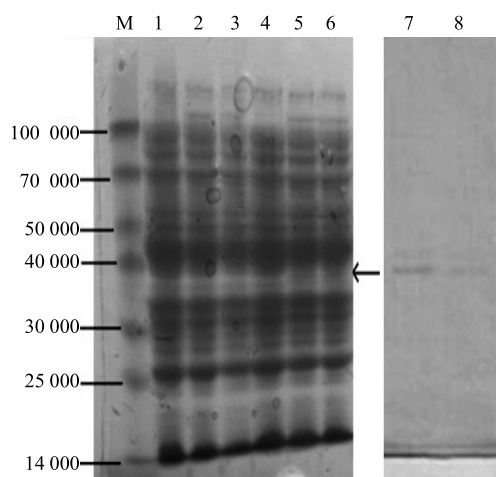
3.1 pET-28a-AsMAPK3 原核表达载体的构建

以反转录的一链 cDNA 为模板, yhAsMAPK3-f 和 yhAsMAPK3-r 为引物扩增 AsMAPK3 基因的部分编码区, 得到 912 bp 片段 (图 3-A)。经连接、转化和测序得到正确的阳性克隆。构建正确的 pEASY-Simple-AsMAPK3 质粒经过 BamHI/SalI 双酶切 (图 3-B) 后回收目的片段, 与经过同样酶切的 pET-28a 载体连接。转化得到单克隆, 经过菌液 PCR (图 3-C) 和酶切鉴定 (图 3-D), 最终获得构建正确的 pET-28a-AsMAPK3 原核表达载体。

3.2 重组蛋白的诱导表达

将空载体 pET-28a 和构建正确的 pET-28a-AsMAPK3 质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 中, 进行目的蛋白的诱导表达。37 °C 培养菌液, 当检测其 A_{600} 值在 0.4~0.6 时, 向菌液中加入 IPTG 使其终浓度分别为 0.25 mmol/L 和 0.5 mmol/L, 同时以未加 IPTG 的菌液作为空白对照。为了得到有活性的可溶性目的蛋白, 首选了低温 16 °C 诱导。24 h 后离心收集菌体, 超声提取蛋白。分别取总蛋白、超声后上清及超声后沉淀的蛋白样品 5 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果显示, 在 2 种 IPTG 浓度下, 所有样品都没有检测到目的蛋白条带。

接下来对温度进行优化, 选择 37 °C 诱导, IPTG 终浓度设为 0.5 mmol/L。诱导 4 h 后, 离心收集菌体。利用 SDS-PAGE 对超声提取的上清和沉淀中的总蛋白进行电泳检测, 发现经 IPTG 诱导的菌液比未经 IPTG 诱导的菌液多出 1 条约 42 000 的蛋白条带 (图 4), 说明该条件下成功诱导了融合蛋白 His-AsMAPK3 的表达。进一步为得到有活性的蛋白, 通过 Ni 柱对上清中可溶性蛋白进行纯化, 得到大小正确的目的蛋白。



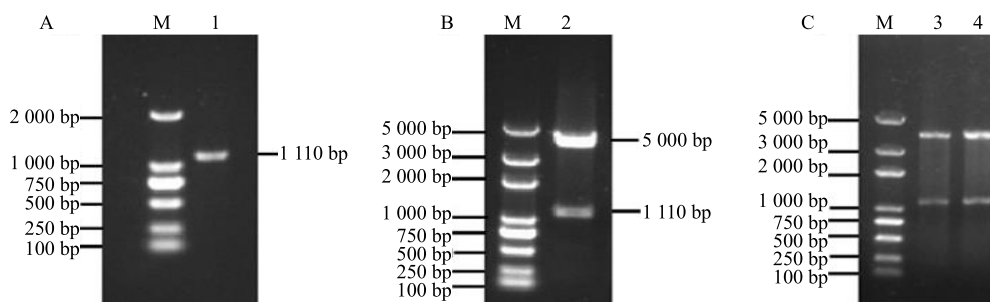
M-Marker 1-pET-28a 载体不诱导 2、3-pET-28a 载体 IPTG 诱导表达 4-pET-28a-AsMAPK3 不诱导 5、6-pET-28a-AsMAPK3 融合蛋白 IPTG 诱导表达 7、8-融合蛋白纯化
M-Marker 1-induction of pET-28a vector 2, 3-IPTG induction of pET-28a vector 4-no induction pET-28a-AsMAPK3 5, 6-IPTG induction of pET-28a-AsMAPK3 7, 8-purification of recombinant protein

图 4 重组表达质粒 pET-28a-AsMAPK3 诱导表达产物检测
Fig. 4 Products detection of recombinant plasmid pET-28a-AsMAPK3

3.3 AsMAPK3 基因在洋葱表皮细胞的亚细胞定位

3.3.1 AsMAPK3-GFP 瞬时表达载体的构建 经反转录合成的 cDNA 链为模板, 用引物 AsMAPK3-f 和引物 AsMAPK3-r 经过 PCR 扩增出一条特异的 1 110 bp 的 DNA 条带 (图 5), 将其回收, 连接 pEASY-Simple-Blunt 载体。测序正确的质粒经 BamHI/SpeI 双酶切, 回收 AsMAPK3 片段, 再将其连接到 GFP 瞬时表达载体 pAN580 上。BamHI/SpeI 双酶切 5 h 后, 出现 4 712 bp 和 1 110 bp 2 条带, 说明 AsMAPK3 基因已连接到表达载体 pAN580 上。进一步经过测序验证该构建是正确的。

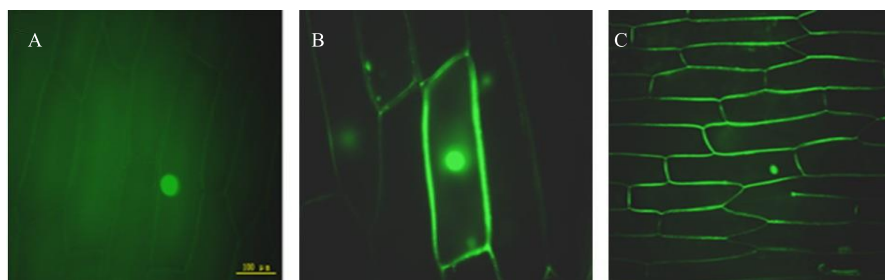
3.3.2 AsMAPK3-GFP 质粒轰击洋葱表皮及荧光观察 将构建好的重组质粒 pAN580-AsMAPK3-GFP 与金粉微载体混合制成金粉-DNA 的复合体。1.1 kPa 压力下, 在基因枪的轰击作用下, 将质粒快速转入 MS 培养的洋葱表皮细胞, 进行 16~24 h 的黑暗培养。在激光共聚焦显微镜蓝色光激发下观察。发现洋葱表皮细胞核和细胞膜都有很强的绿色荧光发出 (图 6), 证明 AsMAPK3 定位在细胞膜和细胞核中。



A-AsMAPK3 全长 ORF 克隆 B-AsMAPK3-pEASY-Simple 双酶切鉴定 C-AsMAPK3-pAN580 双酶切鉴定 M-Marker 1~4-样品
A-cloning of full-length of AsMAPK3 ORF B-enzyme digest identification of AsMAPK3-pEASY-Simple vector C-enzyme digest identification of AsMAPK3-pAN580 vector M-Marker 1~4-samples

图 5 AsMAPK3-pAN580 瞬时表达载体的构建

Fig. 5 Construction of transient expression vector AsMAPK3-pAN580



A-空载体 pAN580 轰击洋葱表皮 B、C-AsMAPK3-pAN580 轰击洋葱表皮
A-transformed onion epidermis with empty vector pAN580 plasmid B, C-transformed onion epidermis with AsMAPK3-pAN580 plasmid

图 6 瞬时转化洋葱表皮绿色荧光检测

Fig. 6 Green fluorescence of onion epidermis transformed with transient expression vector

4 讨论

白木香是典型的伤害诱导型药用植物,其活性成分倍半萜的合成是一系列伤害信号转导到靶基因启动表达的过程。前期研究推测,MAPK可能参与伤害诱导沉香倍半萜合成的调控^[11]。而对蛋白激酶活性的分析主要依赖于特异性的磷酸化识别蛋白,如抗体或者磷酸化识别结构域。因此,表达有活性的蛋白及制备特异性强的抗体是研究蛋白激酶功能的必备条件。本实验首次对白木香中AsMAPK3基因进行原核表达,并对其亚细胞定位进行了探索,以期后续深入研究其参与调控沉香的形成奠定基础。

原核表达系统具有易操作、产量高、稳定性好、经济实惠等优点,是体外蛋白表达的有效途径^[21-22]。外源基因在大肠杆菌的表达分为2个阶段,第1阶段为质粒生长阶段,主要保证质粒的稳定性和提高质粒的拷贝数;第2阶段为融合蛋白表达阶段,待细菌生长达到饱和以后才诱导融合蛋白的表达。目的基因能否在大肠杆菌中正确表达,受很多因素的影响,比如目的基因本身的特性、诱导温度、IPTG浓度及诱导时间等,其中以温度影响最为明显。本研究发现,在低温16℃条件下诱导20h,未能诱导目的蛋白表达,而在37℃,0.5mmol/L IPTG诱导4h,可诱导AsMAPK3蛋白表达,并且在上清和包涵体中都有表达。由于包涵体蛋白在形成过程中容易存在不正确折叠,可能导致蛋白结构的变化从而限制其活性,因此本研究仅对上清中的可溶性蛋白进行了纯化,为制备高质量的抗体准备材料。

了解基因的亚细胞定位是全面理解其整体功能的重要环节,瞬时表达系统是快速研究基因定位和功能的理想平台。本研究构建了GFP标签的瞬时表达载体pAN580-AsMAPK3-GFP,借助于基因枪法瞬时转化^[23],在洋葱表皮中对AsMAPK3的亚细胞定位进行初步研究。结果显示AsMAPK3主要在细胞核和质膜表达,在胞质中也有少量表达,说明AsMAPK3可能在这些部位(如与核中的转录因子及膜上受体相互作用)发挥其调控功能。以往的研究表明,不同的MAPKs有不同的亚细胞定位,包括细胞膜、细胞核、细胞质或原生质体^[24-27]。如玉米 *Zea Mays* ZmMAPK1和ZmMAPK17定位于细胞核^[24-25];拟南芥 AtMAPK4定位于质膜和细胞核^[26],而AtMPK6、AtMPK11、AtMPK13则在细胞质和细胞核中表达^[27]。不同的MAPKs定位不同

是与其生物学功能紧密相关的。本研究得到了AsMAPK3的原核表达蛋白并明确了其亚细胞定位,为后续抗体制备及深入研究AsMAPK3的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Hashimoto K, Nakahara S, Inoue T, *et al.* A new chromone from agarwood and pyrolysis products of chromone derivatives [J]. *Chem Pharm Bull*, 1985, 33(11): 5088-5091.
- [2] Ito M, Okimoto K, Yagura T, *et al.* Induction of sesquiterpenoid production by methyl-jasmonate in *Auilaria sinensis* cell suspension culture [J]. *J Essent Oil Res*, 2005, 17(2): 175-180.
- [3] Kumeta Y, Ito M. Characterization of δ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(4): 1998-2000.
- [4] Chen H Q, Wei J H, Yang J S, *et al.* Chemical constituents of agarwood originating from the endemic genus *Aquilaria* plants [J]. *Chem Biodiver*, 2012, 9: 236-250.
- [5] Chen H Q, Yang Y, Xue J, *et al.* Comparison of compositions and antimicrobial activities of essential oils from chemically stimulated agarwood, wild agarwood and healthy *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg trees [J]. *Molecules*, 2011, 16(6): 4884-4896.
- [6] 张兴丽. 白木香中伤害诱导形成的沉香是防御反应的产物 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [7] 裴丽丽, 郭玉华, 徐兆师, 等. 植物逆境胁迫相关蛋白激酶的研究进展 [J]. *西北植物学报*, 2012, 32(5): 1052-1061.
- [8] 吴涛, 宗晓娟, 谷令坤, 等. 植物中的MAPK及其在信号传导中的作用 [J]. *生物技术通报*, 2006(5): 1-7.
- [9] Zhang S, Klessig D F. MAPK cascades in plant defense signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(11): 520-527.
- [10] Yang K, Liu Y, Zhang S. Activation of mitogen-activated protein kinase pathway involved in disease resistance in tobacco [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 741-746.
- [11] Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling [J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(7): 339-346.
- [12] 陈娅斐, 冯斌, 赵小明, 等. MAPK级联途径在植物信号转导中的研究进展 [J]. *植物学报*, 2005, 22(3): 357-365.
- [13] Popova E, Antonov D, Sergeeva E, *et al.* The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress

- responses [J]. *Eur J Inorg Chem*, 2014, 32(1): 40-52.
- [14] 杨洪强, 接玉玲. 植物 MAPK 其在病原信号传递中的作用 [J]. *植物病理学报*, 2003, 33(1): 8-13.
- [15] Rodriguez M C S, Petersen M, Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signaling in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61(1): 621-649.
- [16] Meng X Z, Zhang S Q. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. annu. rev. [J]. *Phytopathol*, 2013, 51(1): 245-266.
- [17] Xu Y H, Zhang Z, Wang M X, *et al.* Identification of genes related to agarwood formation: Transcriptome analysis of healthy and wounded tissues of *Aquilaria sinensis* [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1): 227-229.
- [18] 张振才, 梁 燕, 李 翠. 植物 MAPK 级联途径及其功能研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2014, 42(4): 207-214.
- [19] Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, *et al.* AtMAPKs: A gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Lett*, 1993, 336(3): 440-444.
- [20] Asai T, Tena G, Plotnikova J, *et al.* MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity [J]. *Nature*, 2002, 415(6875): 977-983.
- [21] Esposito D, Chatterjee D K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags [J]. *Curr Opin Biotech*, 2006, 17(4): 353-358.
- [22] Waugh D S. Making the most of affinity tags [J]. *Trends Biotech*, 2005, 23(6): 316-320.
- [23] Klein T M, Wolf E D, Wu R, *et al.* High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells [J]. *Nature*, 1987, 327(6117): 70-71.
- [24] Wu L J, Zu X F, Zhang H M, *et al.* Overexpression of ZmMAPK1 enhances drought and heat stress in transgenic *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2015, 88(4/5): 429-443.
- [25] Kosetsu K, Matsunaga S, Nakagami H, *et al.* The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(5): 3778-3790.
- [26] Pan J, Zhang M, Kong X, *et al.* ZmMAPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses [J]. *Planta*, 2012, 235(4): 661-676.
- [27] Zeng Q, Chen J G, Ellis B E. AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2011, 67(5): 895-906.