

# 丹参 4-(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶的 cDNA 全长克隆及其诱导表达分析

王学勇<sup>1,2</sup>, 崔光红<sup>2</sup>, 黄璐琦<sup>2\*</sup>, 高伟<sup>2</sup>, 袁媛<sup>2</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102; 2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**摘要:** 本文首次从丹参毛状根中克隆得到了丹参 4-(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶(简称为 SmCMK) 的编码基因的全长 cDNA 序列, GenBank 注册号: EF534309。KEGG 软件分析表明: SmCMK 位于二萜类化合物生物合成的上游途径——非甲羟戊酸途径(DXP), 是 DXP 途径上唯一的激酶。所克隆的 SmCMK 基因序列全长 1 493 bp, 包括完整的开放阅读框(open readingframe, ORF), 推测编码 396 个氨基酸的多肽, 分子质量为 43.302 kDa, 等电点(pI)值为 6.78; 含有 71 bp 的 5'非转译区(5' UTR)和 232 bp 的 3'非转译区(3' UTR)。末尾具有完整的 AATAA 加尾信号和 PolyA 结构, 说明所克隆基因的序列较为完整。经序列比对分析表明, SmCMK 与其他植物 CMK 激酶家族具有较高的同源性。实时荧光定量 PCR 结果显示该基因受茉莉酸甲酯(MJ)诱导后表达水平显著升高, 与丹参酮类成分含量受 MJ 诱导后的增加趋势一致, 初步证明了 SmCMK 基因表达量与丹参酮类成分的积累之间的关系, 为进一步研究丹参酮类成分的次生代谢调控机制奠定了基础。

**关键词:** 丹参; SmCMK; RACE; 克隆; 茉莉酸甲酯

**中图分类号:** R915.2      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0513-4870(2008)12-1251-07

## A full length cDNA of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase cloning and analysis of introduced gene expression in *Salvia miltiorrhiza*

WANG Xue-yong<sup>1,2</sup>, CUI Guang-hong<sup>2</sup>, HUANG Lu-qi<sup>2\*</sup>, GAO Wei<sup>2</sup>, YUAN Yuan<sup>2</sup>

(1. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;  
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract:** This paper firstly introduced the acquired full length cDNA of 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol kinase from hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* (Abbr: SmCMK, GenBank number: EF534309). Results of KEGG analysis showed that SmCMK was belong to the upstream of none-mevalonate pathway, the only one kinase of the pathway. The full-length cDNA was deduced as encoding 4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methylerythritol kinase (designated as SmCMK), and the sequence had a 1 493 bp including 5' UTR 71 bp and 3' UTR 232 bp, an open reading frame (ORF) encoding a protein of 396 amino acid residues. The deduced protein had isoelectric point (pI) of 6.78 and a calculated molecular weight about 43 kDa, similar to cloned diterpene of CMK from other species of plants such as *Mentha piperita* and *Lycopersicon esculentum* reported previously. Real time PCR results indicated that elicitors of MJ stimulated the increase of mRNA expression of SmCMK. At the same time, results of high performance liquid chromatography (HPLC), used to examine the accumulation of diterpenoid tanshinones in hairy roots, showed that the contents of diterpenoid tanshinones in hairy root of *Salvia miltiorrhiza* were

收稿日期: 2008-06-03.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(2006CB504700); 国家高技术研究发展计划资助项目(2003AA222040).

\*通讯作者 Tel: 86-10-84738625, Fax: 86-10-84027175, E-mail: huangluqi@263.net

increased dramatically after treated with methyl jasmonate (MJ). This result showed a positive correlation between the levels of mRNA expression and tanshinones accumulation in *Salvia miltiorrhiza* stimulated by MJ. It proved primarily that the increased expression level of mRNA of SmCMK helps to enhance tanshinones' accumulation, which will be the basis for further study on the mechanism of gene regulation of secondary metabolism of tanshinones.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*. ; SmCMK; RACE; clone; methyl jasmonate

唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)根中所含的脂溶性活性成分主要为二萜醌类化合物(丹参酮类)。在高等植物中,萜类成分的生物合成至少通过两条途径,一条是甲羟戊酸(MVA)途径,另一条是非甲羟戊酸(DXP)途径<sup>[1,2]</sup>。据报道,丹参酮类成分(二萜类)的生物合成主要通过 DXP 途径<sup>[3,4]</sup>。其中 4-(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶(SmCMK)为 DXP 次生代谢途径上的唯一激酶,目前对于该酶编码基因研究报道很少,仅见拟南芥、水稻、薄荷、胡黄连和番茄等有登录(GenBank)。Rohdich<sup>[5]</sup>报道了一个来源于番茄的预测蛋白,推测其催化功能域(81~401 氨基酸残基)与大肠杆菌的 CMK 有同源性,可能是番茄中的 CMK,该催化功能域在大肠杆菌中得以表达纯化,通过放射性标记前体饲喂,证明该催化功能域能够将 4-(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇(CDP-ME)磷酸化生成 4-(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇-2-磷酸(CDP-MEP)。

本文首次报道从鼠尾草属植物丹参中克隆到了编码 SmCMK 的新基因。通过丹参 cDNA 芯片克隆得到了 SmCMK 的 cDNA 片段(另行发表)。经分析,该片段 3' 和 5' 端都不全,因此采用了 3' 和 5' RACE 技术获取了全长 cDNA 序列。经代谢途径分析可知,SmCMK 位于非甲羟戊酸(DXP)途径,与二萜类化合物生物合成密切相关。本文进一步研究了茉莉酸甲酯(MJ)对丹参毛状根 SmCMK 基因表达水平与丹参酮类成分含量的影响,初步从药用植物功能基因转录水平的角度探讨丹参酮类成分积累的基因调控机制,为丹参次生代谢基因工程的研究奠定基础。

## 材料与amp;方法

**材料** 丹参毛状根用发根农杆菌 ATCC15834 感染丹参苗获得(由林业科学学院邱德有研究员惠赠),于固体 6-7V 培养基,黑暗条件下 25 ℃ 培养保存。

**菌株、载体及培养基** DH5 $\alpha$  感受态细胞、

pMD19-T Vector(均为宝生物公司产品); X-gal、IPTG、氨苄青霉素(Amp)均为 BBI 公司产品; LB 培养基(10 g · L<sup>-1</sup> 胰蛋白胨; 5 g · L<sup>-1</sup> 酵母提取物, 10 g · L<sup>-1</sup> NaCl, 固体培养基添加 1.5% 琼脂粉),用于大肠杆菌的培养,除 NaCl 外,均为 Amresco 公司产品; 6-7V 培养基相关试剂均购自鼎国生物技术公司,用于毛状根的悬浮培养。

**主要试剂及试剂盒** CTAB-LiCl 法提取总 RNA 所需试剂(包括 CTAB、PVP40、Tris、EDTA、NaCl、亚精胺、SDS、 $\beta$ -巯基乙醇、LiCl 等)均购自 Amresco 公司; exTaq 聚合酶、DH5 $\alpha$  感受态细胞、pMD19-T Vector 以及琼脂糖凝胶 DNA 回收纯化试剂盒购自宝生物公司, SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 扩增试剂盒购自 Clontech, TAKARA BIO 公司; Oligo dT(18)引物(50  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>)、5 × M-MLV buffer[含 250 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 8.3)、375 mmol · L<sup>-1</sup> KCl、15 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 及 50 mmol · L<sup>-1</sup> dithiothreitol (DTT)]、dNTP mixture (10 mmol · L<sup>-1</sup>)、RNase inhibitor (40 U ·  $\mu$ L<sup>-1</sup>) 和 M-MLV (200 U ·  $\mu$ L<sup>-1</sup>) 逆转录酶均为宝生物公司产品; SYBGREEN PCR master mix 购自 ABI 公司。Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司; 茉莉酸甲酯购自 Sigma 公司, 隐丹参酮、丹参酮 IIA 标准品均购自中国药品生物制品检定所。

**丹参毛状根的悬浮培养及诱导处理** 参照文献[3]方法略有改进:取 6-7V 固体培养基(不含激素)暗藏保存的丹参毛状根,在无菌条件下将 2 g 湿根接种于装有 200 mL 无激素的 6-7V 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,继代培养,培养条件为 25 ℃, 110~120 r · min<sup>-1</sup> 黑暗条件下悬浮培养。培养至 18 d 后,约增重至 40 g,分设两个组,即:对照组(control)(正常培养基条件培养)和诱导组(MJ)。其中诱导组:向 6-7V 液体培养基中加入诱导子 MJ (100  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>) 进行诱导处理,每个处理设 3 个重复,每个样本在无菌条件下经 MJ 处理后,分别于 0, 1, 2, 3, 5, 10 和 15 d 共 7 个时间段分批次、无菌条件下取样收获,每次取完样后,剩余毛状根放回

三角瓶中继续培养;对照组:按照诱导组取样方式平行操作。每次取样量为 4 g 湿根,其中 2 g 鲜重用于液氮速冻后  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存(提取总 RNA),剩余 2 g 鲜重  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  干燥至衡重,精密称量毛状根的干重用于测定毛状根中丹参酮类成分(隐丹参酮和丹参酮 IIA)的含量。

**SmCMK 的 cDNA 全长克隆** 采用 CTAB-LiCl 法提取总 RNA。采用 SMART 末端快速扩增方法 (SMART<sup>TM</sup> RACE) 克隆 SmCMK 的 cDNA 全长。即 5' RACE 和 3' RACE 的方法:根据 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA 试剂盒 (Clontech, TAKARA BIO, 日本) 说明,取提取的总 RNA 3  $\mu\text{g}$ ,采用试剂盒提供的引物进行逆转录,合成 RACE 备用第一链 cDNA。

**5' RACE:**根据芯片获取的 SmCMK 的 cDNA 片段序列设计 5' RACE 扩增特异引物,记为上游 F5' 引物 5'-CCCAGCATCCCTATCCACTTCATCAG-3',下游引物为试剂盒提供的 UPM 引物。然后配制 50  $\mu\text{L}$  反应体系包括 2.5  $\mu\text{L}$  cDNA、5  $\mu\text{L}$  UPM (10 $\times$ )、1  $\mu\text{L}$  的 F5 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、34.5  $\mu\text{L}$  PCR-grade water、5  $\mu\text{L}$  advantage 2 PCR buffer (10 $\times$ )、1  $\mu\text{L}$  dNTP mix (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及 1  $\mu\text{L}$  advantage 2 polymerase mix。PCR 条件为  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min 5 个循环,接着  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min 5 个循环,然后  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s、 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 s、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min 共 25 个循环,最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。**3' RACE:**上游引物为 UPM,下游 F3' 引物为 5'-GGAGCTGGCCTTGGTGGTGGCAGCAGTA-3', cDNA 模板为 3' RACE 备用第一链 cDNA,其余 PCR 扩增条件均与 5' RACE 相同。

PCR 产物回收后与 pGEM-T 载体以 T4DNA 连接酶连接,转化至感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中并扩增,蓝白斑筛选,挑取阳性克隆,经 PCR 扩增鉴定后送样测序。利用 stadden 软件将 cDNA 芯片获得的 cDNA 片段与 RACE 测序结果进行拼接,获取 SmCMK 的 cDNA 全长。

**SmCMK 诱导表达水平的实时荧光定量 PCR 检测** 总 RNA 采用 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 提取,取 1  $\mu\text{g}$  毛状根样本提取的总 RNA 合成第一链 cDNA。其过程为:RNA 模板 1  $\mu\text{g}$ , Oligo dT (18) ( $50\text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 引物 1  $\mu\text{L}$ , 加不含 RNase 的去离子水至 6  $\mu\text{L}$ ,  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 10 min 后,冰上急冷 2 min 以上,离心,然后在离心管中配制如下反应液:2  $\mu\text{L}$  5 $\times$  M-MLV buffer [含 250  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.3), 375  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl, 15  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub> 及

50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dithiothreitol (DTT), 0.5  $\mu\text{L}$  dNTP mixture (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 0.25  $\mu\text{L}$  RNase 抑制剂 (40 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 和 0.5  $\mu\text{L}$  逆转录酶 M-MLV (200 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ),  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 1 h,  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  反应 15 min 后置于冰中冷却,直接用于 Real-time PCR 扩增或  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**荧光定量 PCR 扩增:**根据丹参内参照 Actin 和所克隆的丹参 SmCMK 的核苷酸序列设计引物。其中 Actin:上游引物记为 Fa; 5'-AGGAACCACCGA TCCAGACA-3',下游引物记为 Ra; 5'-GGTGCCTG AGCTCCTGTT-3'。SmCMK 上游引物记为 Fs; 5'-ATGAGAAAAGAAGAAGGGGATATCA-3',下游引物记为 Rs; 5'-TCAGAAAAAGACAGGGGTTG-3'。取已知浓度的模板 cDNA 溶液 1  $\mu\text{L}$ ,按 1/50、1/100、1/500、1/1 000、1/2 000 的梯度加灭菌蒸馏水稀释成不同浓度的模板溶液。稀释后分装保存,避免反复冻融,用于制作相对标准曲线。在薄壁 96 孔 PCR 板 (ABI 公司) 中每孔加入下述反应液 (25  $\mu\text{L}$  体系): SYB GREEN PCR master mix 10  $\mu\text{L}$ , 引物 F (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 引物 R (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 模板 cDNA 0.5  $\mu\text{L}$ , 灭菌去离子水至 25  $\mu\text{L}$ 。实时定量 PCR 的扩增条件为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min 后进入 35 个扩增循环:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,最后  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  维持。

采用标准曲线法计算出 SmCMK 基因与内参 actin 相比较而获得的相对拷贝数。诱导组 (MJ) 与对照组 (control) 之比 (MJ/control) 表示基因诱导表达值。数理统计采用 SPSS 软件包分析,统计结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**丹参酮类成分含量测定** 取干燥至衡重的丹参毛状根适量,研碎过 40 目筛,混匀。取药材细粉约 0.2 g,精密称定,置 20 mL 量瓶中,加甲醇溶液 4 mL,精密称重,超声处理 40 min,取出放冷,加甲醇溶液补足至原重,摇匀,静置,过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜即得。含量测定采用 RP-HPLC 色谱方法,参照文献 [6] 提供的色谱条件,对丹参毛状根隐丹参酮和丹参酮 IIA 进行含量测定。

## 结果

### 1 SmCMK 的 cDNA 全长克隆

**1.1 分子特征分析** 将 RACE 获得的 cDNA 片段与 cDNA 芯片克隆得到的 cDNA 片段进行拼接 (stadden 软件),获得了 SmCMK 基因的全长序列 (图 1),共 1 493 bp。DNAMAN 软件结合 NCBI ORF

Finder 在线软件对 SmCMK 基因全长 cDNA 序列进行分析。结果表明 SmCMK 含完整的开放阅读框 (open readingframe, ORF), 推测编码 396 个氨基酸的多肽, 分子质量为 43.302 kDa, 等电点 (pI) 值为 6.78; 同时含有 71 bp 的 5' 非转译区 (5' UTR) 和 232 bp 3' 非转译区 (3' UTR)。含有完整的 AATAA 加尾信号和 PolyA 结构。证明它是一条完整的 cDNA 全长序列。在推导的丹参 SmCMK 基因所编码的蛋白质 396 个氨基酸中, 带电氨基酸 (RKHYCDE) 出现的频率为 28.55%, 酸性氨基酸 (DE) 出现的频率为 11.37%, 碱性氨基酸 (KR) 出现的频率为 11.20%, 极性氨基酸 (NCQSTY) 出现的频率为 27.28%, 疏水性氨基酸 (ALFWV) 出现的频率为 28.54%。

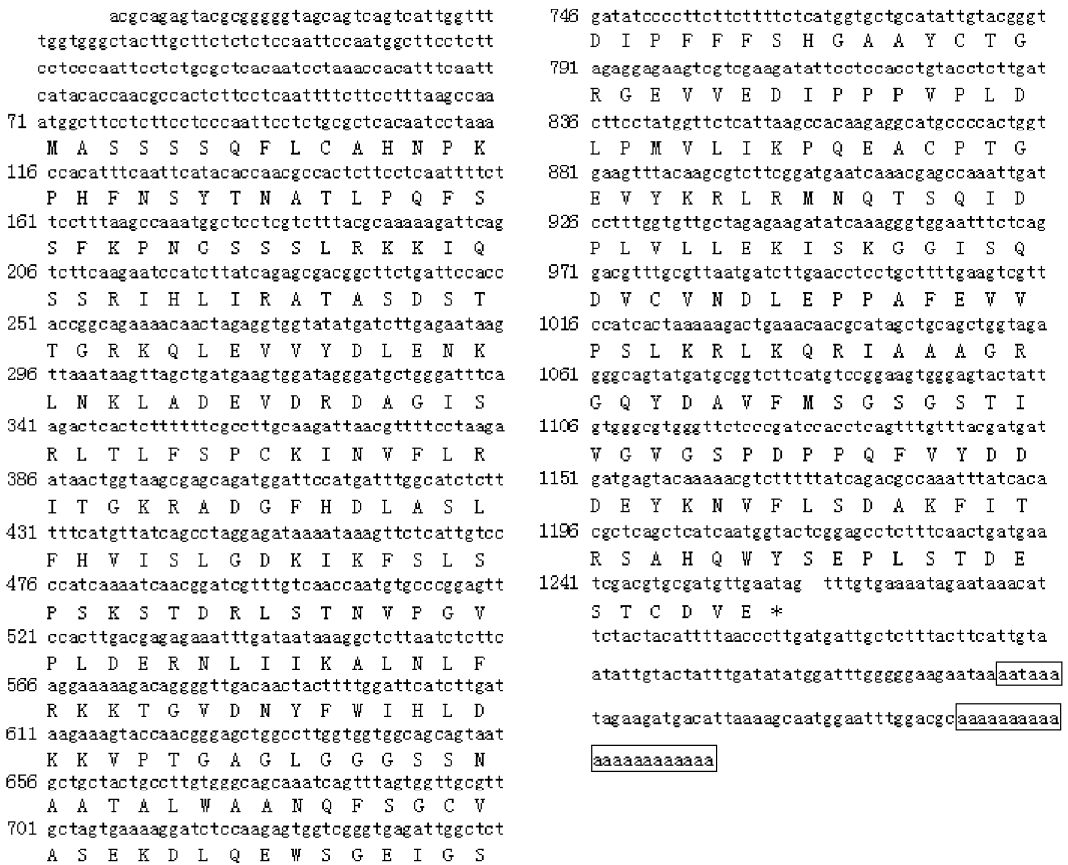
**1.2 同源性分析** BLASTX 显示丹参 SmCMK 基因与薄荷属植物 (*Mentha*) 的同源性最高, 等同性为 194/225 (86%), 与番茄属植物等同性为 170/221

(76%), 与拟南芥相比, 等同性为 161/222 (72%)。利用 DNAMAN 软件对丹参 SmCMK 与其他植物的 CMK 的氨基酸序列进行同源性比对分析, 结果表明丹参 SmCMK 与 CMK 的同源性介于 74.6% (与番茄属比较) 至 88.1% (与薄荷属比较) 之间, 具有较高的同源性, 丹参 SmCMK 与连翘、胡黄连的 CMK 同源性也较高, 分别为 83.8% 和 75.50%。位于 SmCMK 氨基酸序列 378~389 处可见较为保守的 CMK 功能域 (图 2 黑框部分)。

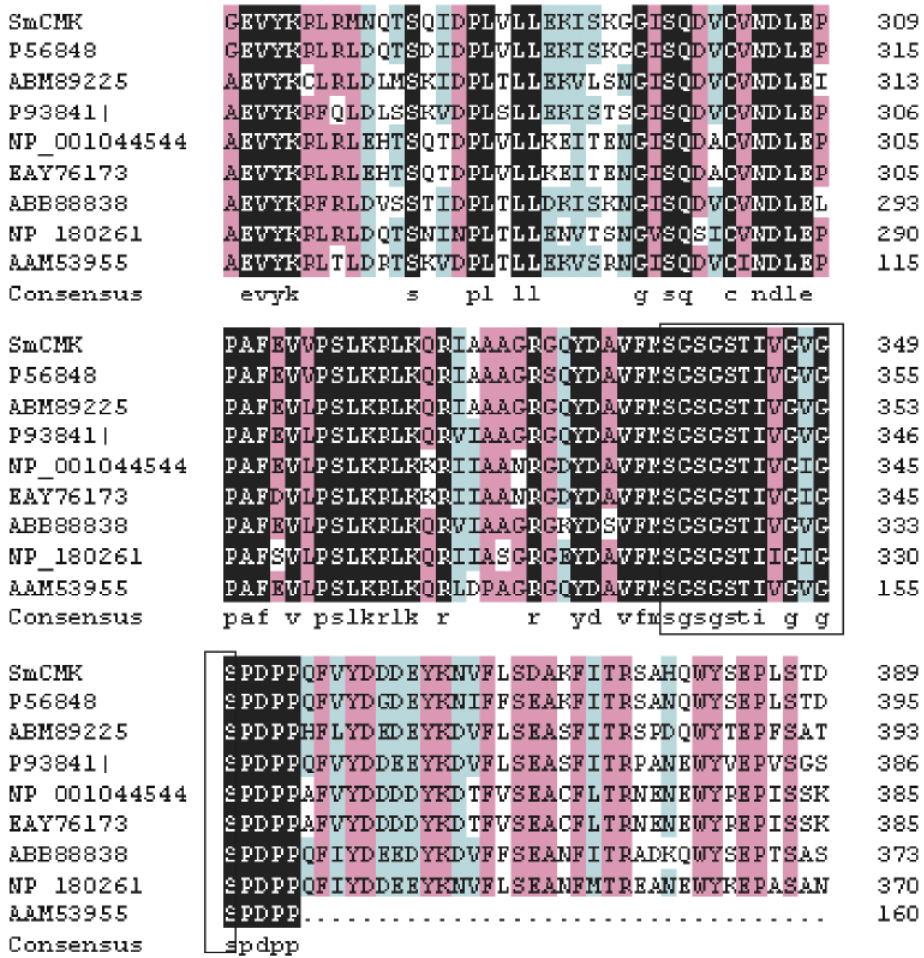
**1.3 代谢途径分析** 运用 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes) 数据库<sup>[7]</sup> 对丹参 SmCMK 参与的代谢途径进行分析。分析结果表明, SmCMK 参与了植物萜类次生代谢途径中上游途径 DXP 途径, 其功能是催化 CDP-ME 生成 CDP-MEP。

**2 SmCMK mRNA 的诱导表达分析**

根据实时荧光定量 PCR 实验检测结果数据, 采用标准曲线法, 计算出 SmCMK 基因与内参 actin 相



**Figure 1** Nucleotide and predicted amino acid sequence of SmCMK from *Salvia miltiorrhiza*. Nucleotide site number was shown on the left. Both of nucleotide and amino acid strands were sequenced completely. The structures of "AATAA" and "PolyA" were showed in the frame



**Figure 2** Multiple alignment of the putative amino acids' sequence of SmCMK with those of cloned CMK involved in other plants. The left is the number of plants and the right is position number of amino acids. Conserved domain was showed in the black frame. Annotations were showed as follows: P56848; *Mentha x piperita*, ABM89225; *Picrorhiza kurrooa*, P93841; *Lycopersicon esculentum*, NP 001044544; *Oryza sativa (japonica cultivar-group)*, EAY76173; *Oryza sativa (indica cultivar-group)*, ABB88838; *Stevia rebaudiana*, NP180261; *Arabidopsis thaliana*, AAM53955; *Forsythia x intermedia*

比较而获得的相对拷贝数(SmCMK/actin)(表1和图3A)。诱导组(MJ)与对照组(control)之比(MJ/control)表示基因诱导表达值(ratios)(表1和图3B)。

实验结果如表1、图3所示,表明茉莉酸甲酯能明显诱导丹参毛状根中丹参酮类成分次生代谢酶SmCMK基因mRNA的表达。实验检测了丹参毛状根经MJ处理0、1、2、3、5、10和15d后SmCMK基因的诱导表达情况,结果显示经MJ处理后SmCMK基因的诱导表达水平在24h内迅速达到峰值: MJ处理组(MJ)样本的相对拷贝数为5.68,而同时期对照组(control)的相对拷贝数为0.16,达同时

期对照组的34.7倍(MJ/control)(图3),之后SmCMK基因逐渐降低至正常水平。

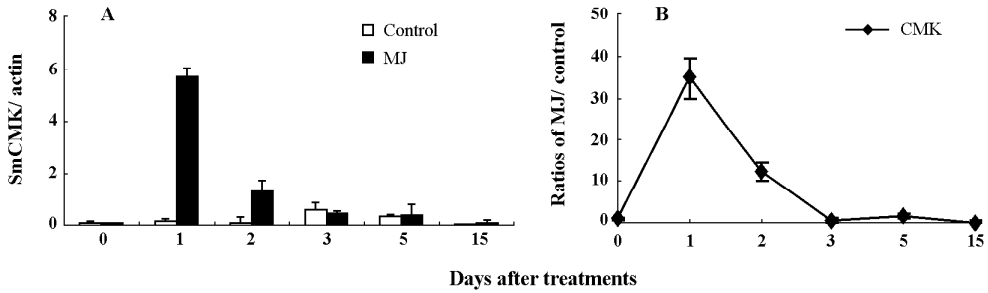
### 3 MJ 诱导处理后丹参毛状根中丹参酮类成分积累的变化

如图4、图5所示,经MJ处理后,丹参酮类成分含量迅速上升,处理后第48h,隐丹参酮成分含量达(0.057 ± 0.029) mg · g<sup>-1</sup>,是同时期对照组(0.029 ± 0.019) mg · g<sup>-1</sup>的2.0倍;丹参酮IIA(TanIIA)含量达(0.342 ± 0.161) mg · g<sup>-1</sup>,是同时期对照组(0.182 ± 0.085) mg · g<sup>-1</sup>的1.9倍。处理后第5d,隐丹参酮成分(crtan)含量达(0.149 ± 0.004) mg · g<sup>-1</sup>,是同时期对照组(0.025 ± 0.004)

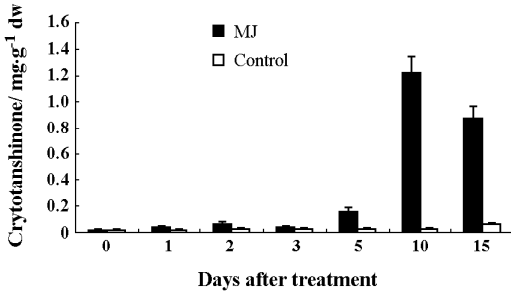
**Table 1** Effect of MJ on mRNA of CMK expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Gene	0 d	1 d	2 d	3 d	5 d	15 d
Control	0.12 ± 0.04	0.16 ± 0.08	0.11 ± 0.20	0.58 ± 0.28	0.33 ± 0.05	0.04 ± 0.01
MJ	0.10 ± 0.01	5.68 ± 0.30	1.28 ± 0.41	0.43 ± 0.14	0.42 ± 0.38	0.10 ± 0.08
Ratios	0.93 ± 0.32	34.67 ± 4.92	12.20 ± 2.16	0.70 ± 0.60	1.61 ± 0.74	0.23 ± 0.09

Control; The relative copies of gene expressions (SmCMK/actin) in control samples. MJ; The relative copies of gene expressions (SmCMK/actin) in MJ treated samples. Ratios; MJ/control

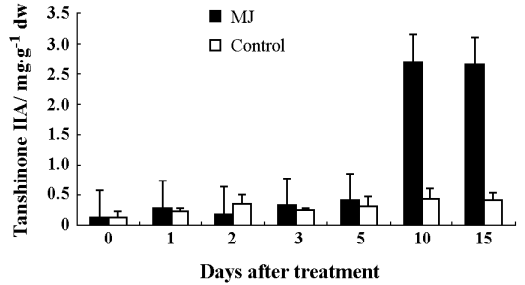


**Figure 3** Effect of MJ ( $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) on mRNA of SmCMK expression. MJ was added to culture on day 18 post inoculation; error bars for standard errors (S. E.),  $n = 3$ . A; Comparative copies (SmCMK/actin) of mRNA of CMK detected by Real-time PCR for both the control samples and the MJ treated samples. B; Ratios of MJ/control at day 0, 1, 2, 3, 5, 15 after the treatment of MJ



**Figure 4** MJ effect on Cryptotanshinone accumulation IIA accumulation in *Salvia miltiorrhiza* at different periods

$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的6.0倍;丹参酮 IIA 成分含量达  $(0.394 \pm 0.097) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 是同时期对照组  $(0.304 \pm 0.169) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的1.3倍。处理后第10 d, 隐丹参酮成分含量达  $(1.220 \pm 0.129) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 是同时期对照组  $(0.023 \pm 0.003) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的52.6倍; 丹参酮 IIA 成分含量达  $(2.701 \pm 0.337) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 是对照组  $(0.430 \pm 0.169) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的6.3倍。处理后第15 d, 隐丹参酮成分含量达  $(0.874 \pm 0.098) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 是同时期对照组  $(0.056 \pm 0.021) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的15.6倍; 丹参酮 IIA 成分含量达  $(2.662 \pm 0.271) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , 是对照组  $(0.388 \pm 0.126) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  的6.9倍。分析结果表明: 丹参毛状根经 MJ 处理之后, 丹参酮类成分在短时间内迅速积累, 其中隐丹参酮成分增



**Figure 5** MJ effect on Tanshinone in *Salvia miltiorrhiza* at different periods

长幅度较大, 与同时期对照组比较, 最大增幅达52.6倍(处理后第10 d); 丹参酮 IIA 最大增幅达6.9倍(处理后第15 d)。该结果证明受诱导子 MJ 刺激, 毛状根中丹参酮类成分在2 d后开始快速积累, 于诱导后第10 d成分积累量最高, 之后略有降低。

**讨论**

丹参次生代谢产物诱导的研究已经进行的比较广泛和深入<sup>[8,9]</sup>, 但关于丹参酮类成分次生代谢功能基因的研究, 目前报道较少。作者检索 NCBI 的公共数据库 (<http://www.ncbi.nih.gov/>, Revised: April 29, 2008.) 发现, 在 GenBank 注册的序列中, 与丹参酮类成分次生代谢相关的功能基因迄今只报道

了乙酰-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶 (HMGR, AAU87798)、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原酶(DXR, ABJ80680)、以及作者注册的丹参 4-(5'-二磷酸胞苷)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶 (SmCMK, GeneBank 注册号: EF534309), 它们分别位于萜类化合物次生代谢上游的甲羟戊酸 (MVA) 途径和 DXP 途径。本文首次克隆得到的 SmCMK 的全长 cDNA 序列, 经序列结构分析表明, 含有典型的 CMK 结构功能域是 GHMP 蛋白家族的成员之一, 与其他植物 CMK 具有较高同源性; SmCMK 经 KEGG 分析, 结果表明位于 DXP 途径, 其功能是催化 CDP-ME 磷酸化生成 CDP-MEP。据报道丹参酮类成分 (二萜类) 的生物合成主要通过 DXP 途径<sup>[3,4]</sup>。因此, 作为 DXP 途径上的唯一激酶 SmCMK 的编码基因可能与丹参酮类成分次生代谢关系密切。

本实验研究发现, 经诱导子茉莉酸甲酯 (MJ) 诱导后, 丹参 SmCMK 等酶的编码基因的表达量迅速上调, SmCMK 基因的表达水平在诱导子刺激后 24 h 达同时期对照组的 34.7 倍。与此同时, 丹参次生代谢产物如隐丹参酮的积累经 MJ 诱导后均大幅度提高, 诱导后第 10 d, 达同时期对照组 52.6 倍; 该结果提示 SmCMK 等基因的 MJ 诱导表达水平与丹参酮类成分诱导积累之间的增长趋势存在正相关关系。当然, 丹参酮类成分的诱导积累, 可能是二萜类代谢途径中诸多基因受到 MJ 诱导后增量表达、酶活性增强等因素的共同作用结果, 该推测可以在其他功能基因 (如 SmIPPI, SmFPP 等酶的编码基因) 受 MJ 诱导后增量表达以及 Ge 等报道的酶活性与丹参酮类成分的关系等文献中得到佐证<sup>[3,10]</sup>。

植物次生代谢过程是一个非常复杂的过程, 本研究首次克隆得到了丹参 CMK 的编码基因 cDNA 全长序列, 初步分析了在 MJ 诱导下丹参酮类成分积累与 SmCMK 基因表达量的关系。然而, 对于 SmCMK 基因具体功能以及对丹参酮类成分生物合成的调控机制, 还有待于通过原核表达和转入丹参

原植株中等进行更深入的分析 and 研究。

## References

- [1] Lichtenthaler HK. Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors [J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28: 785 - 789.
- [2] Laule O, Furlholz A, Chang HS, et al. Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 6866 - 6871.
- [3] Ge XC, Wu JY. Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag<sup>+</sup> and yeast elicitor [J]. Plant Sci, 2005, 168: 487 - 491.
- [4] Chen H, Chen F, Chiu FCK, et al. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 28: 100 - 105.
- [5] Rohdich F, Wungsintaweekul J, Eisenreich W, et al. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 6451 - 6456.
- [6] Wang XY, Cui GH, He XR, et al. The fingerprint for adventitious root of radix *Salviae miltiorrhizae* developed by high-performance liquid chromatography and its active component primary analysis [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2007, 13: 1 - 4.
- [7] Kanehisa M. Toward pathway engineering: a new database of genetic and molecular pathways [J]. Sci Technol Japan, 1996, 59: 34 - 38.
- [8] Zhang CH, Yan Q, Cheuk WK, et al. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag<sup>+</sup> elicitation and nutrient feeding [J]. Planta Med, 2004, 70: 147.
- [9] Yang Q, Hu ZD, Wu JY. Synergistic effects of biotic and elicitors on the production of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 188 - 191.
- [10] Wang XY. The induced gene expression analysis and active ingredient biosynthesis related gene clone from hairy roots culture of *Salvia miltiorrhiza* [D]. China academy of Chinese medical Sciences (中国中医科学院博士论文), 2007, 125.