



白花丹参顺式还原酮加双氧酶基因的克隆、 分子特征和表达调控分析

郝岗平*, 王健美, 史仁玖, 张显忠
(泰山医学院 生物科学系, 泰安 山东 271000)

[摘要] 目的:获得白花丹参与乙烯和多胺合成的顺式还原酮加双氧酶(acireductone dioxygenase, *ARD*)基因(命名为 *SmARD*)序列,并进行生物信息学分析和初步的表达特性研究。方法:利用全长 cDNA 文库技术,从两年生白花丹参根中获得目的基因 *SmARD* 序列。利用 BLAST 进行序列比对,ORF Finder 寻找该基因的开放读码框,prosite 分析蛋白质的基本结构域。用半定量 RT-PCR 检测其在白花丹参幼苗根、茎、叶和成花中的表达情况。结果:得到 688 bp 的 *SmARD* 基因全长序列。具有一个 591 bp 的开放读码框,编码 196 个氨基酸,预测蛋白质相对分子质量 23.27 kDa。使用预测的 *SmARD* 蛋白序列在 NCBI 中进行蛋白保守域分析,发现 *SmARD* 与 *ARD/ARD'* 家族具有很高的同源性。半定量 RT-PCR 表明,*SmARD* 在白花丹参幼苗根、茎、叶和成花等组织中均有转录水平的表达,但是在根部表达最强。水分亏缺处理 3 d,150 mmol · L⁻¹ NaCl 处理 1 d,4 °C 低温处理 1 d 和 100 μmol · L⁻¹ ABA 处理 1 d 均抑制 *SmARD* 的表达,100 μmol · L⁻¹ 茉莉酸甲脂(MJ)和 10 μmol · L⁻¹ 乙烯利(ETH)处理 1 d 诱导 *SmARD* 的表达。结论:首次得到白花丹参的顺式还原酮加双氧酶(*ARD*)基因序列,为其参与白花丹参响应逆境和次生代谢产物合成的信号调节功能研究奠定了基础。

[关键词] 白花丹参;顺式还原酮加双氧酶(*ARD*)基因;序列分析;表达分析

顺式还原酮加双氧酶(acireductone dioxygenase, *ARD*)家族参与甲硫氨酸循环,甲硫氨酸循环中的活性甲硫氨酸(*S*-adenosylmethionine, SAM)是乙烯和多胺合成的前体^[1]。在 ACC(1-aminocycloprane-1-carboxylate)合酶的催化下,SAM 转变为 ACC,ACC 又在 ACC 氧化酶的催化下合成乙烯。SAM 在脱羧酶催化下转变为 dSAM,这是多胺生物合成途径的限速步骤。脱羧 dSAM 在亚精胺合成酶催化下转变为亚精胺,而亚精胺和 dSAM 在精胺合成酶的催化下合成精胺。

乙烯和多胺都参与调控植物的生长和发育,同时还对植物耐受生物和非生物胁迫(如淹水、干旱、盐胁迫和冷胁迫等)起关键作用^[2-3]。另外,乙烯和多胺也参与植物次生代谢产物合成的调节,如外源 spd 和 put 可以明显促进甜菜毛状根中甜菜碱的积累^[4];乙烯可以调节光诱导的花青素合成^[5-6]。

生长在泰山的白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba* C. Y. WU et H. W. Li 是紫花丹参的变型,系多年生草本植物。通常以根部入药,具有活血化瘀、痛经止痛的功能。白花丹参除具丹参的生物活性和用途外,对治疗血栓性脉管炎具有独特疗效^[7-8]。现在,白花丹参已做为一个新品种被收录进《山东省中药材标准》(2000 年版)^[9]。通过实验研究,证明白花丹参与丹参的化学成分基本相同,含有脂溶性成分丹参酮类,水溶性成分酚酸类^[10]。但是白花丹参中的水溶性成分明显高于紫花丹参,约为紫花丹参的 2 倍,这是化学成分方面较大的不同^[9]。另外白花丹参中铁、镁、锰等 5 种微量元素也高于紫花丹参^[11]。因此,白花丹参具有重要的医药和经济价值。

本研究从已经建立起来的白花丹参全长 cDNA 文库^[12]中获得 1 个 *ARD* 基因的全长 cDNA 序列,对其进行详细的生物信息学分析及其在白花丹参幼苗根、茎、叶和成花中的表达,以及在不同非生物胁迫和激素处理下的表达情况进行了分析,为进一步深入研究 *ARD* 基因参与白花丹参响应逆境和次生代谢产物合成的信号调节功能奠定了基础。

1 材料

白花丹参两年生根的全长 cDNA 文库由本实验

[稿件编号] 20100720010

[基金项目] 山东省科攻项目(2007GG2NS02051);山东省自然科学基金项目(ZR2010CM063);山东省中医药科技发展计划项目(2007-165)

[通信作者] * 郝岗平, Tel: (0538)6222043, E-mail: haogangping@163.com



室构建、保存;白花丹参播种于蛭石和营养土 1:1 比例的混合基质中,于 25 °C,16 h 光照下培养。

cDNA 第一链合成试剂盒为 SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, 11754-050), PCR 试剂购自 Takara (大连),其他生化试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 白花丹参 ARD 基因 cDNA 的克隆 用灭菌牙签随机从白花丹参 cDNA 文库挑取阳性克隆至 1.5 mL 装有液体培养基的离心管中,形成穿刺菌,由 TaKaRa 公司完成插入片段的测序。将测序结果与 GenBank 中登录基因进行同源性比较和功能预测分析。

2.2 SmRAD 基因 cDNA 的生物信息学分析 生物信息学分析主要采用 DNASTar 软件包及 <http://www.expasy.org> 等链接的网上软件包进行。使用 CLUSTAL W (1.82) 软件对序列进行多重比对,并用 MEGA 4.0 软件,采用相邻节点 (NJ) 算法构建进化树。

2.3 各种胁迫与激素处理 水分亏缺处理,白花丹参播种于蛭石和营养土 1:1 比例的混合基质中,于 25 °C,16 h 光照下培养 2 周,然后给基质浇透水,即不吸水时,将不吸的水倒掉,控水 3 d。冷处理,将生长 2 周的白花丹参幼苗放入 4 °C 的生长箱中,低温处理 1 d;盐胁迫处理,用 150 mmol · L⁻¹ NaCl 的 Hogland 营养液早晚各浇 1 次幼苗,处理 1 d。激素处理,在 Hogland 营养液中加入乙烯利 (ETH)、ABA、茉莉酸甲酯 (MJ) 和水杨酸 (SA),使终浓度分别为 10,100,100,2 mmol · L⁻¹,早晚各浇 1 次幼苗,处理 1 d。上述处理完成后,对根部取样,冷冻保存于 -70 °C 以备提取 RNA。

2.4 SmRAD 基因的表达分析 采用改良的 CTAB 法提取白花丹参第 1 对真叶期植株的根、叶、茎和成花总 RNA^[13]。用半定量 RT-PCR 检测 SmRAD 基因在不同组织以及在不同非生物胁迫和激素处理下的表达情况。按照 SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) 进行 RT 反应,PCR 反应的引物是上游引物 RADF:5' AATTCGCTACTGAAAGGGTTTG,下游引物 RADR:5' ATATTACAGGAAAGCAGCGAT-TCCA,反应程序是 94 °C 4 min,26 个循环 (94 °C 35 s,50 °C 35 s,72 °C 50 s),72 °C 5 min。18S rRNA 作为半定量 RT-PCR 的内标基因,所使用的特

异引物是 18SF (5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3') 和 18SR (5'-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT-3')。产物在含溴化乙锭的 1% 的琼脂糖凝胶上电泳分离检测。

3 结果

3.1 白花丹参 RAD 序列的获得及序列分析 从白花丹参全长 cDNA 文库挑取阳性克隆,测序,将测序结果与 GenBank 中登录基因进行同源性比较和功能预测分析,获得 688 bp 的白花丹参 RAD 全长序列,命名为 SmRAD,GenBank 登录号为 HQ437659。通过 ORF Finder 寻找该基因的开放读码框,结果显示在 27 ~ 617 bp 有 1 个 591 bp 的 ORF 框,推断其编码 196 个氨基酸。由 DNAMAN 软件推算该编码蛋白的相对分子质量 23.27 kDa,等电点 pI 4.75,通过 chloroP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) 的预测显示这个蛋白质有 9 个氨基酸残基构成的信号肽,可能定位于叶绿体或其他质体中。

3.2 RAD 序列家族同源基因的氨基酸序列比较 作为一个普遍存在的代谢途径中的酶,ARD 具有比较保守的结构域,其中的某些氨基酸在不同物种中的同源基因中都是保守的^[14]。使用预测的 SmARD 蛋白序列在 NCBI 中进行蛋白保守域分析,发现 SmARD 与 ARD/ARD' 家族具有很高的同源性。进一步选择不同物种中的一些同源基因的氨基酸序列与 SmARD 进行多重序列比较,发现 SmARD 与这些基因的氨基酸序列都是同源的,这些物种包括拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (AAM6380), *A. lyrata* subsp. *lyrata* (XP_002868260.1), 芥菜型油菜 *Brassica juncea* (AAR03591), 大车前 *Plantago major* (CAL49076), 马铃薯 *Solanum tuberosum* (ABW34717), 蓖麻 *Ricinus communis* (XP_002517071), 大麦 *Hordeum vulgare* (BAB61039)、西方蜜蜂 *Apis mellifera* (XP_624227), 产酸克雷伯式菌 *Klebsiella oxytoca* (AAD11793), 水稻 *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (AAX55895)。联配的结果表明,3 个组氨酸残基和 1 个谷氨酸残基在所有的同源基因中都是保守的 (图 1)。这些氨基酸残基可能参与金属离子的结合^[14]。

3.3 SmARD 与家族同源基因的氨基酸序列的系统进化分析 上述 11 个物种中的 ARD 同源基因的

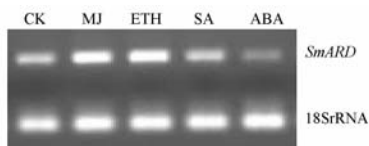


图5 4种激素对 *SmARD* 基因表达的影响

构域有很高的同源性,它包括的3个组氨酸残基和1个谷氨酸残基在所有的家族成员中都是保守的,可能参与金属离子的结合^[14]。

研究发现 *SmARD* 的表达受到外源 ABA 的抑制,这意味着 *SmARD* 可能与乙烯和 ABA 的互作有关系。既然 ABA 抑制 *SmARD* 的表达,且在旱、冷、盐胁迫下积累,那么这些条件下 *SmARD* 表达水平的下降可能归因于 ABA 的效应。总之,*SmARD* 的表达对非生物胁迫和植物激素的响应表明植物激素对甲硫氨酸循环的调控可能是植物胁迫响应和耐受的一个方面。

鉴于 *SmARD* 的表达受到乙烯和 MJ 的诱导,推测 *SmARD* 可能行使 *ARD* 功能以促进 MTA 通过甲硫氨酸循环再合成 Met,从而维持乙烯和多胺的快速合成。*SmARD* 基因表达通过控制乙烯和多胺的合成来调节白花丹参对环境胁迫的响应和次生代谢产物的合成。推测 *SmARD* 与乙烯和多胺的合成和信号转导之间存在某种联系,那么它是怎样参与乙烯和多胺合成和信号转导的,存在什么样的调控等机制值得深入探讨。

[参考文献]

[1] Bürstenbinder K, Waduware I, Schoor S, et al. Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in *Arabidopsis*[J]. *Plant J*, 2010, 62: 977.

[2] Bleecker A B, Kende H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16: 1.

[3] Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J. Polyamines and environmental challenges: Recent development[J]. *Plant Sci*, 1999, 140: 103.

[4] Suresh B, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, et al. Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments[J]. *Process Biochem*, 2004, 39: 2091.

[5] Craker L E, Wetherbee P J. Ethylene, light, and anthocyanin synthesis[J]. *Plant Physiol*, 1973, 51: 436.

[6] Craker L E, Wetherbee P J. Ethylene, carbon dioxide, and anthocyanin synthesis[J]. *Plant Physiol*, 1973, 52: 177.

[7] 林琦, 陆金国. 丹参抗动脉硬化的研究进展[J]. *山西中医*, 2002, 18(4): 56.

[8] 王培军, 高长请, 李蜜. 丹参与白花丹参中丹参酮 ILA 的含量研究[J]. *甘肃中医*, 2004, 17(4): 42.

[9] 马丽虹, 翟树林, 王传杰. 白花丹参的开发进展[J]. *中国林副特产*, 2005, 20(1): 72.

[10] 齐永秀, 曹明亮, 王晓丹, 等. 泰山野生丹参与种植丹参根、茎、叶中三种有效成分含量的分析比较[J]. *药物生物技术*, 2006, 13(4): 279.

[11] 齐永秀, 杨志孝, 李珂, 等. 白花丹参与紫花丹参微量元素分析比较[J]. *泰山医学院学报*, 2004, 25(6): 589.

[12] Hao G P, Shi R J, Wang J M, et al. Construction of full-length cDNA library of white flower *Salvia miltiorrhiza* Bge f. *alba* root and partial EST sequence analysis[J]. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(10): 2027.

[13] 王健美, 史仁玖, 苗苗, 等. 高质量的泰山白花丹参根部总 RNA 的提取及 DDRT-PCR 检测[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(2): 97.

[14] Pochapsky T C, Pochapsky S S, Ju T, et al. Modeling and experiment yields the structure of acireductone dioxygenase from *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2002, 9: 966.



Cloning, molecular characterization and expression of acireductone dioxygenase (*ARD*) gene from *Salvia miltiorrhiza*

HAO Gangping^{*}, WANG Jianmei, SHI Renjiu, ZHANG Xianzhong

(Department of Biological Science, Taishan Medical University, Taian 271000, China)

[**Abstract**] **Objective:** To study the acireductone dioxygenase (designated as *SmARD*) gene of *Salvia miltiorrhiza* through bioinformatics and characterization of its tissue expression and response expression on stress in shoot. **Method:** *SmARD* gene was obtained by sequencing cDNA library constructed by us. BLAST was used for alignment, ORF finder software was applied to find open reading frame, prosite was used to analyze the protein characterization. Semi-quantitative RT-PCR was used to detect the gene expression level. **Result:** The full-length cDNA of *SmRAD* was 688 bp long with a 591 bp ORF (open reading frame) that putatively encoded a polypeptide of 196 amino acids, with a predicted molecular mass of 23.27 kDa. The deduced amino acid sequence of *SmRAD* of gene shared high homology with other known RADs. Semi-quantitative RT-PCR analysis indicated that *SmRAD* was constitutively expressed in roots, stems, flower and leaves of *S. miltiorrhiza*, with the high expression in roots. In addition, *SmRAD* expression level under different stress condition was also analyzed in root, including signaling components for plant defence responses, such as methyl jasmonate, salicylic acid and ABA, as well as drought, cold and salt abiotic stress. The expression of *SmRAD* was suppressed by water deficit treatment for 3 d, 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 4 °C cold and 100 mmol · L⁻¹ ABA treatment for 1 d, but induced by 100 mmol · L⁻¹ MJ and 10 mmol · L⁻¹ ETH. **Conclusion:** A novel *SmARD* gene was cloned from *S. miltiorrhiza*. This study will enable us to further understand the role of *SmARD* in the defense response under different abiotic stress and in synthesis of active compounds in *S. miltiorrhiza* at molecular level.

[**Key words**] *Salvia miltiorrhiza*; acireductone dioxygenase (*ARD*) gene; sequence analysis; expression analysis

doi:10.4268/cjcm20110326

[责任编辑 吕冬梅]