

丹参乙酰 CoA 酰基转移酶基因全长克隆和 SNP 分析

崔光红¹, 王学勇^{1,2}, 冯 华¹, 赵静雪¹, 黄璐琦^{1*}

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

摘要: 乙酰 CoA 酰基转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 为萜类化合物生物合成甲羟戊酸 (MVA) 途径的起始酶, 催化使 2 个分子的乙酰 CoA 缩合为乙酰乙酰 CoA。利用基因芯片结合 RACE 方法, 从丹参毛状根中得到一个 AACT 基因 (*SmA ACT*, accession No. EF635969), 该基因全长 1 623 bp, 含有 1 个 1 200 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 399 个氨基酸, 对应基因组序列含有 9 个内含子。序列同源性分析和分子进化分析表明 *SmA ACT* 是一种与植物类异戊二烯 MVA 途径相关的蛋白, 其表达量受到生物和非生物诱导子酵母和 Ag⁺ 的诱导, 并伴随丹参酮类成分积累。在丹参根、茎、叶中均有表达, 根中的表达量明显高于茎和叶中的表达量。单核苷酸多态性分析表明, 在第 6 至第 9 内含子约 600 bp 范围内, *SmA ACT* 共存在 33 个多态位点, 且表现出产地特异基因型。该基因的克隆分析为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; 乙酰 CoA 酰基转移酶; 单核苷酸多态性

中图分类号: R931.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 06-0785-06

Molecular cloning and SNP analysis of a acetyl-CoA C-acetyltransferase gene (*SmA ACT*) from *Salvia miltiorrhiza*

CUI Guang-hong¹, WANG Xue-yong^{1,2}, FENG Hua¹, ZHAO Jing-xue¹, HUANG Lu-qi^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: Acetyl-CoA C-acetyltransferase (AACT) is the first enzyme in the terpene synthesis pathway, catalyzed two units of acetyl-CoA to acetoacetyl-CoA. In order to study the tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*, a novel AACT gene, *SmA ACT*, was cloned using cDNA microarray and RACE strategy. The full length cDNA of *SmA ACT* is 1 623 bp (accession No. EF635969), which contained a 1 200 bp open reading frame (ORF) encoding a 399 amino acid protein. Nine introns were found in the genomic sequence. *SmA ACT* was upregulated by YE and Ag⁺ elicitors both with cDNA microarray and quantitative RT-PCR analyses along with the accumulation of tanshinones. Sequence homology comparison and phylogenetic analysis all suggested that *SmA ACT* belonged to the class of acetyl-CoA C-acetyltransferase. The transcription level of *SmA ACT* was relatively higher in root than that in stem and leaf tissues. SNP analysis revealed that *SmA ACT* was highly variable in the region of 6 to 9 introns with 33 SNPs in the 600 bp region, there are 5 SNPs in the cDNA region while they are all synonymous cSNPs. Some special genotypes were found in *Salvia miltiorrhiza* from different areas. *SmA ACT* will be an useful gene for further analyze the mechanism of gene regulation among the tanshinones biosynthesis.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; acetyl-CoA C-acetyltransferase; single nucleotide polymorphism

收稿日期: 2009-11-06.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2006CB504700); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 资助项目 (2007AA02Z104); 国家自然科学基金资助项目 (30801517).

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

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) 中的主要活性成分丹参酮类化合物, 具有肝损伤保护^[1]、抑制肿瘤细胞增长^[2]等药理作用。丹参酮类化合物是由异戊二烯为基本结构单元构建的二萜醌类化合物。二萜的共同前体牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸 (GGPP) 可由两条途径合成, 一条为存在于胞质溶胶里的甲羟戊酸 (MVA) 途径, 另一条为存在于质体里的丙酮酸/磷酸甘油醛途径 (DXP 途径)。乙酰 CoA 酰基转移酶 (acetyl-CoA C-acetyltransferase, AACT) 催化 MVA 途径上第一个酶促反应, 使 2 个分子的乙酰 CoA 缩合为乙酰乙酰 CoA, 属于硫解酶 (thiolase) 家族。

本文通过 cDNA 芯片技术获得丹参乙酰 CoA 酰基转移酶 cDNA 片段, 并克隆得到全长 cDNA 和基因组序列。cDNA 芯片结果与实时荧光定量 PCR 结果一致, 均表明 *SmaACT* 受到诱导子酵母提取物 (yeast extraction, YE) 和 Ag^+ 的诱导, 并伴随丹参酮类成分增加, 提示 *SmaACT* 为丹参酮类成分生物合成 MVA 途径中的起始酶。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 分析初步显示, *SmaACT* 具有丰富的变异, 并呈现出产地特异基因型。这些为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调控机制和次生代谢基因工程的研究奠定了基础。

材料与方法

实验材料 丹参毛状根为发根农杆菌 15834 直接感染的方式进行 Ri-质粒转化诱导的毛状根。取 6~7 V 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 6~7 V 液体培养基的 500 mL 三角瓶中进行继代培养, 培养至 18 d 后作为试验材料。培养条件为 25 °C, 110~120 r·min⁻¹, 黑暗条件下培养。

SmaACT 单核苷酸多态性初步研究共采用了 3 个不同产地的 18 个丹参样品, 其中四川中江大叶丹参 (SCDY) 5 个、四川中江小叶丹参 (SCXY) 3 个、陕西商洛丹参 (SL) 3 个和山东莱芜丹参 (LW) 7 个。

诱导子制备和含量测定 利用诱导子组合 YE+ Ag^+ 对上述毛状根进行处理, 分别于处理后 0、1、2、4、6 和 9 d 收获材料, 分别进行含量测定和 RNA 提取^[3]。YE 制备过程为取 25 g 酵母提取物溶于 125 mL 蒸馏水中, 加入 100 mL 无水乙醇, 置于 4 °C 冰箱静置 4 d, 倾去上清液, 胶状沉淀溶于 125 mL 蒸馏水中, 加入无水乙醇 (乙醇含量达 80%) 2 次沉淀, 离心, 沉淀溶

于 100 mL 蒸馏水中, 120 °C 灭菌 20 min, 冷却后置于 4 °C 冰箱备用。 Ag^+ 的制备为取 AgNO_3 50.96 mg 溶于 100 mL 蒸馏水中, 制备得 3 mmol·L⁻¹ 的 Ag^+ 。诱导子处理浓度为 200 mL 培养基中加入 2 mL YE 和 66.7 μL Ag^+ 。

芯片制备和杂交 采用丹参 cDNA 芯片^[4, 5]克隆 *SmaACT* 基因。大致流程为 CTAB 法提取丹参根总 RNA, 采用 Pharmacia 公司 QuichprepTM Micro mRNA Purification Kit 分离 mRNA 后, 通过在 cDNA 分子两端加上 *EcoR* I/*Not* I 接头, 在 T4 多核苷酸激酶的作用下磷酸化, 与表达载体 λ ZAP Express Predigested Vector 连接, 然后用包装蛋白在体外包装连接产物, 感染 *E.coli* XL1-Blue MRF' 构建成 cDNA 文库。挑取分离良好的噬菌斑进行 PCR 扩增, 经过电泳检测、纯化、再次电泳检测后得到 4 354 个克隆用于芯片点制。以丹参 *actin* 基因作为阳性对照, 不含 DNA 的点样液和 PolyA 为阴性对照。

将 YE+ Ag^+ 处理 2 d 的材料与未处理的材料进行芯片杂交, 探针标记采用间接标记法。芯片杂交进行两次重复并进行正反交试验。芯片用 LuxScan 1/A 双通道激光扫描仪进行扫描, 用 GenePix P4.0 图像分析软件对芯片图像进行分析, 数据用 Lowess 方法进行归一化。采用两倍差异标准结合 T-test 方法来确定差异表达基因。

cDNA 全长克隆 采用 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech 公司) 试剂盒进行 *SmaACT* 5'末端的扩增, 按照说明书进行操作。总 RNA 用 Trizol (Invitrogen 公司) 试剂盒提取, 步骤详见试剂盒操作手册。以设计的 GSP1 (5'-CCTCAAA ACCCCAAGAGAGTGACCAAG-3') 为 5' RACE 特异引物, 进行 cDNA 5'末端的扩增。PCR 条件为 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 2 min (35 个循环), 72 °C 7 min。扩增得到长约 1 100 bp 的特异性 cDNA 片段。琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Takara 公司) 回收目的片段, 按 pMD19T 载体 (Takara 公司) 试剂盒操作手册将上述片段克隆至 pMD19-T 载体中, 鉴定阳性克隆并测序 (北京三博远志生物有限公司)。

基因结构分析 采用 CTAB 法提取丹参总 DNA。在 *SmaACT* 的两端设计引物, 以丹参 DNA 为模板, PCR 反应体系: 100 ng DNA, 引物终浓度 0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 10 μL 2×Taq Plus Master Mix, 终体积 20 μL 。反应条件: 94 °C 预变性 3 min, 然后进行 35 个循环: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2.5 min, 最后 72 °C

延伸 5 min。切胶回收, 连接克隆, 测序, 结果与 cDNA 序列比较。

SmAACT 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 μg 毛状根样本提取的总 RNA 合成第一链 cDNA。其过程为: RNA 模板 1 μg , Oligo dT (18) ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 引物 1 μL , 加不含 RNase 的去离子水至 6 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 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_2 及 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT (dithiothreitol), 0.5 μL dNTP mixture ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 0.25 μL RNase 抑制剂 ($40 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 和 0.5 μL 逆转录酶 M-MLV ($200 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 42 $^{\circ}\text{C}$ 保温 1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min 后置于冰中冷却, 直接用于 Real-time PCR 扩增或 -20°C 保存备用。

荧光定量 PCR 扩增: 以丹参 *actin* (GenBank accession number DQ243702) 基因作为内参, 采用荧光定量 PCR 检测 *SmAACT* 的表达情况。*actin* 引物为 Fa: 5'-GGTGCCCTGAGGTCCTGTT-3'和 Ra: 5'-AGG AACCACCGATCCAGACA-3'。*SmAACT* 引物为 Fs: 5'-ATGCTGAAGGACGGACTCTGGGATG-3'和 Rs: 5'-TTGTCAACAATGGTGGATGG-3'。取已知浓度的模板 cDNA 溶液 1 μL , 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 μL 体系): SYB GREEN PCR master mix 10 μL 、引物 F ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、引物 R ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 、模板 cDNA 0.5 μL , 灭菌去离子水至 25 μL 。实时定量 PCR 的扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 后, 进入 35 个扩增循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

采用标准曲线法计算出 *SmAACT* 基因与内参 *actin* 相比较而获得的相对表达量。诱导组 (YE+Ag⁺) 与对照组 (control) 之比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“平均值 $\pm$ SD”表示。

生物信息学分析 差异基因经单侧测序后, 经过 gap4 软件进行拼接聚类形成 Unigene 后进行 BLASTX、BLASTN 比对分析。采用 NCBI 的开放阅读框寻找程序 (ORF finder) 确定该基因的开放阅读框。通过 Prosite 数据库 (<http://us.expasy.org/prosite/>) 分析 *SmAACT* 蛋白的结构位点, 并对不同物种来源的 AACT 用 MEGA 构建分子进化树^[6]。

结果

1 芯片杂交试验结果

通过 cDNA 芯片杂交、差异基因测序、序列拼接及 BLAST 比对分析, 一个 cDNA (Chip30h04) 被注释为乙酰辅酶 A 酰基转移酶, 诱导子处理 2 d 中的表达量明显高于对照, 平均为对照组的 3.199 7 倍 (表 1), 表明该基因受诱导子诱导效果显著。同时, YE+Ag⁺能迅速刺激丹参酮类成分的积累, 在处理 9 d 后, 隐丹参酮的含量增幅可高达 35.8 倍^[3]。提示该基因可能与丹参酮类生物合成有关。

2 *SmAACT* 全长克隆和序列分析

根据 cDNA 芯片得到的核心序列, 通过 5'-RACE 得到全长 cDNA 序列。该基因全长 1 623 bp。通过 ORF finder 寻找该基因的开放阅读框, 结果显示在 26~1 325 bp 有一个 1 200 bp 的 ORF 框, 推断其编码 399 个氨基酸 (图 1)。由 DNAMAN 软件推算该编码蛋白的相对分子质量为 41 193.3, 等电点为 6.26。

通过 Prosite 数据库分析该蛋白质的结构位点, 发现 349~365 aa 为硫解酶特异序列 NvhGGaVSIGH PIGcSG。

将此基因 ORF 序列通过 BlastN 在线比较, 结果显示该序列与已报道的巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (AB294686 和 AB294687)、萝卜 *Raphanus sativus* (X78116.1) 的一致度分别为 78%和 76%, 由此可初步断定所克隆获得的 cDNA 序列编码的应为一个 AACT 蛋白, 命名为 *SmAACT*, GenBank 号为 EF635969。

使用 MEGA 软件, 采用邻结法 (neighbor-joining, NJ) 构建了 AACT 的系统进化树 (图 2)。选择 8 种植物、2 种藻类和 4 种真菌的 AACT 进行进化分析。从进化树中可见, 藻类和植物聚为一个大的分支, 单

Table 1 Gene expression ratio of *SmAACT* by cDNA microarray

cDNA	Gene expression level (ratio)								Mean (M)	Standard error (SE)
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Chip30h04	2.800 0	3.760 0	4.383 8	4.158 4	2.348 6	2.027 1	2.872 2	3.248 0	3.199 7**	0.299 0

*Ratio1-ratio8 is gene expression level of YE+Ag⁺/control hybridization result; **Significantly different by T test of 99%

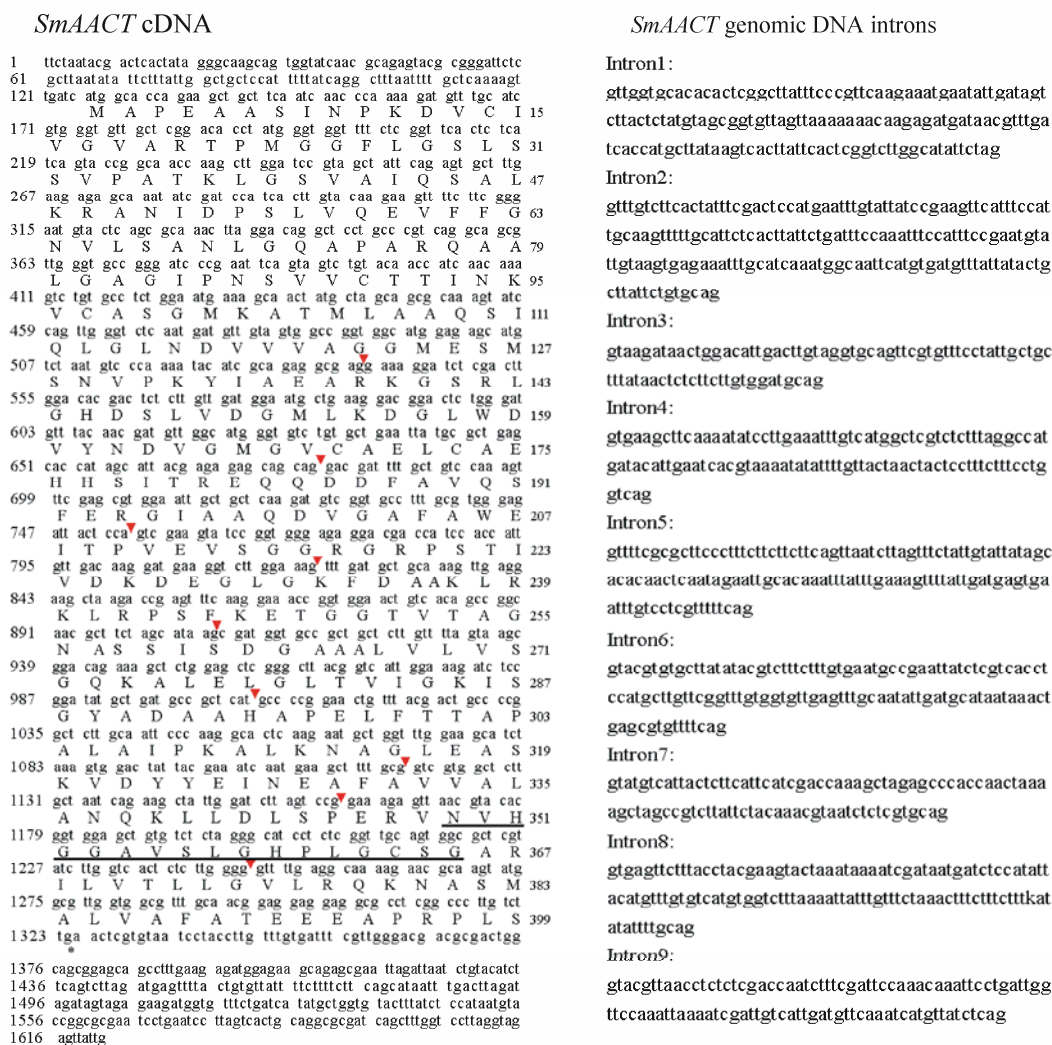


Figure 1 Nucleotide, deduced amino acid sequences of *SmAACT* from *Salvia miltiorrhiza*. The *SmAACT* ORF encodes a putative protein of 399 amino acids including a thiolase domain which was underlined. Nine introns interrupt the coding region at the points signaled by arrowheads

子叶植物水稻 *Oryza sativa*、玉米 *Zea mays* 与双子叶植物遗传距离较大，这与传统的分类结果吻合。

SmAACT 与植物 *AACT* 的同源性比藻类高，同时，与双子叶植物烟草 *Nicotiana tabacum*、胡黄连 *Picrorhiza kurrooa* 的同源性比单子叶植物高。这些结果显示了 *SmAACT* 蛋白的分子进化过程，同时表明 *SmAACT* 是一种与植物 MVA 途径相关的蛋白。

3 基因结构分析

从 *SmAACT* 基因 ORF 两侧设计引物对丹参基因组 DNA 进行扩增，得到约 2 700 bp 序列，克隆测序后与其 cDNA 序列进行比对，发现 *SmAACT* 基因有 9 个内含子，分别为 152、180、80、113、130、122、91、121 和 102 bp (图 1)。内含子/外显子的边界均符合 GT-AG 剪切模式，其中 7 个内含子位于 0 相位，2 个内含子位于 2 相位。内含子 A、T 含量为 64%，明

显大于 G、C 碱基含量，符合一般内含子的规则。

4 丹参 *SmAACT* 表达谱分析

利用实时荧光定量 PCR 对 *SmAACT* 基因在丹参植株不同器官及毛状根中的诱导表达进行了分析，结果显示 *SmAACT* 基因在丹参器官中均有表达，其中根中的表达量明显高于茎和叶中的表达量，根中表达量为茎中的 4.84 倍 (图 3A)。毛状根诱导表达分析表明，*SmAACT* 基因受到提取物和 Ag^+ 的诱导，在处理 1、2、4 和 6 d 分别为对照的 3.6、2、2.6 和 2.4 倍 (图 3B)，该结果与芯片杂交结果一致，证明了芯片杂交试验的可靠性，同时为诱导子提高丹参酮类含量的机制研究提供了基础。

5 *SmAACT* 基因单核苷酸多态性分析

对来源于不同产地的丹参进行 PCR 扩增和测序分析，结果表明 *SmAACT* 基因在不同个体中存在大

量的单核苷酸变异位点, 在第 6 内含子到第 9 内含子约 600 bp 范围内, 共存在 33 个多态位点。该 33 个位点中, C-T、A-G 转换分别为 6 个和 21 个, A-T、A-C、G-T 颠换分别为 3 个、2 个和 1 个 (表 2), 可见, 转换的发生频率 (81.81%) 显著高于颠换的频率。变异位点绝大多数 (28 个) 位于内含子区, 5 个位于编码区, 但均为同义突变, 未引起氨基酸序列的改变。从

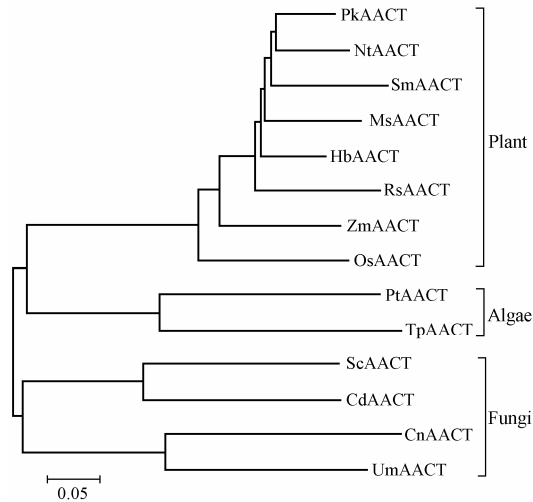


Figure 2 Phylogenetic tree of SmAACT and their related sequences. The tree was constructed by the MEGA program (Kumar et al., 2004) using the neighbor-joining method. Numbers on nodes indicate the bootstrap values after 1000 replicates. The AACT sequences were obtained from the GenBank database. Plant origin: PkAACT (*Picrorhiza kurroa*; GenBank accession No. ABC74567), NtAACT (*Nicotiana tabacum*; AAU95618), MsAACT (*Medicago sativa*; ACX47470), HbAACT (*Hevea brasiliensis*; BAF98277), RsAACT (*Raphanus sativus*; CAA55006), OsAACT (*Oryza sativa*; BAB39872), ZmAACT (*Zea mays*; ACG34735), PtAACT (*Phaeodactylum tricornutum*; XP_002185228), TpAACT (*Thalassiosira pseudonana*; XP_002291097), CnAACT (*Cryptococcus neoformans*; XP_569717), CdAACT (*Candida dubliniensis*; CAX43676), ScAACT (*Saccharomyces cerevisiae*; EDN61111), UmAACT (*Ustilago maydis*; XP_759718)

Table 2 Distribution of SNPs in the 610 bp sequence of *SmAACT* from 4 populations. The exact position of the SNP is indicated. Heterozygotes are indicated by K (G/T), R (G/A), S (G/C), W (A/T), Y (T/C), M (A/C) and were detected by double peak in the electropherograms

Single nucleotide polymorphism site (bp)	Population			
	SCDY	SCXY	SL	LW
59	A	A	A	A/R
62	T	T	T	T/W
77	A	A	A/G	A/M
98	G	G	G	A/G/R
107	A	A	A	A/R
116	A	A	A	A/R
170	T	T	T	A/T
175	A	A	A	A/R
188	G	G	G	G/R
196	T	T	T	T/Y
198	R	R	A	A
207	A	A	A	A/G/R
242	A	A	A	A/R
244	C	C	C	C/Y
277	C	C	C	C/M
328	G	G	G	A/R/G
338	R	R	G/R	G
347	A	A	A	G/R
356	C	C	C	C/T/Y
361	T	T	T	T/W
369	G	G	G	A/G/R
373	G	G	G	A/R/G
400	A	A	A	A/G/R
405	T	T	T	K/T
425	A	A	A	A/G/R
497	C	C	C	C/Y
595	T	T	T/Y	C/T/Y
596	G	G	G/R	A/G/R
598	Y	Y	C	C
604	A	A	A/R	G/R
605	A	A	A/R	G/R
609	R	R	G/R	G
610	G	G	G/R	A/G/R

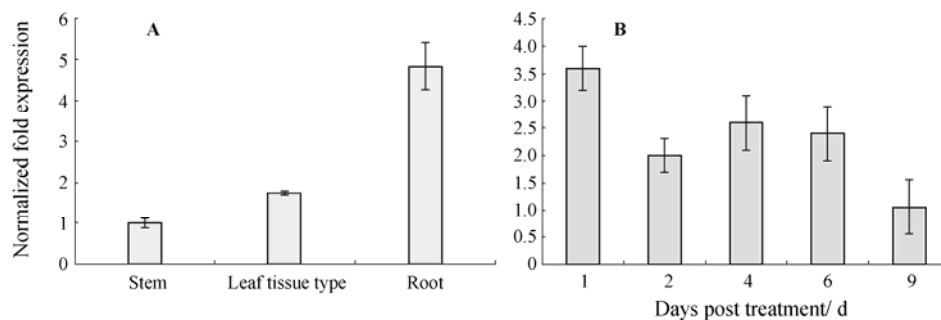


Figure 3 Real-time quantitative RT-PCR analyses of the *SmAACT* in leaf, stem, and root tissues of *Salvia miltiorrhiza* (A), and expression patterns of *SmAACT* in hairy root of *Salvia miltiorrhiza* after treated with yeast extraction and Ag^+ (B). Data were normalized to *Salvia miltiorrhiza actin* expression level. The mean expression value was calculated with three independent replicates. Vertical bars represent the standard deviation

表 2 可见, 四川大叶型 (SCDY) 和小叶型 (SCXY) 丹参所有碱基序列均一致, 且 33 个位点中仅有 4 个杂合位点。陕西商洛 (SL) 丹参有 7 个杂合位点, 而山东莱芜丹参的杂合位点达到 29 个, 表明山东丹参遗传多样性高, 为一个高度杂合的群体。同时, 部分位点表现出产地特异基因型, 如四川中江的大叶和小叶型丹参在 198 bp 和 598 bp 均为 AG 和 CT 型, 而其他产地的均为 AA 和 CC 型。

讨论

AACT 基因已经从银杏^[7]、喜树^[8]等植物克隆和进行了相关分析, 但丹参 AACT 基因研究未见报道。在本研究中报道了丹参中克隆的 *SmAACT* 基因, 该基因编码的氨基酸与其他植物的 AACT 的同源性分析和分子进化分析表明推导的 *SmAACT* 是一种与植物类异戊二烯 MVA 途径相关的蛋白, 其表达量受到生物和非生物诱导子酵母提取物和 Ag^+ 的协同诱导, 并伴随丹参酮类成分积累, 表明 *SmAACT* 编码一个功能性蛋白。

诱导子可用来提高植物次生代谢产物的含量, 其作用机制可概括为诱导子作为一种外界信号被植物细胞膜上的受体所识别, 并与之结合, 从而引起细胞膜上及细胞内一系列反应, 使与次生代谢产物有关的酶合成或活性发生变化, 从而引起植物基因表达发生变化, 最终导致次生代谢产物的合成和积累^[9]。诱导子能显著提高丹参酮类成分含量已有大量报道, 但其作用机制研究较少涉及^[10, 11]。*SmAACT* 为萜类合成起始酶基因, 其表达量的提高将为丹参酮类成分的积累提供充足的“原料”。利用基因芯片技术分析诱导子处理前后基因表达谱的变化, 得到了大量与诱导子和丹参酮生物合成相关的基因, 为从分子水平研究诱导子的调控机制奠定了基础。

SmAACT 单核苷酸多态性分析表明, *SmAACT* 基因具有丰富的单核苷酸变异, 虽编码区变异未引起氨基酸功能的改变, 但内含子区域的改变也有可能引起基因表达的差异, 从而引发次生代谢产物的改变。*SmAACT* 丰富的单核苷酸变异表明丹参为一个遗传变异较大的物种, 产地特异基因型的发现提示基因型可能是影响其质量的主要因素, 而这些变异能否导致基因表达差异及其作用机制则是值得深入研究的课题。

References

- [1] Xu JK, Hiroshi K, Zheng JJ, et al. Protective effect of tanshinones against liver injury in mice loaded with restraint stress [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 631–635.
- [2] Jing J, Zheng H, Wang J, et al. Growth inhibition and multidrug resistance-reversing effect of tanshinone II A on human breast cancer cell with estrogen receptor negative [J]. J Sichuan Univ (Med Sci Ed) (四川大学学报 医学版), 2007, 38: 391–395.
- [3] Wang XY, Cui GH, Huang LQ, et al. The effect of elicitors on the accumulation of tanshinones in hairy root of *Salvia miltiorrhiza* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 976–978.
- [4] Cui GH, Huang LQ, Tang XJ, et al. Functional genomics studies of *Salvia miltiorrhiza* I. Establish cDNA microarray of *Salvia miltiorrhiza* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1137–1141.
- [5] Cui GH, Huang LQ, Qiu DY, et al. Functional genomics studies of *Salvia miltiorrhiza* II. Gene expression profiling of different stage of hairy root [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1267–1272.
- [6] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinform, 2004, 5: 150–163.
- [7] Xiao CQ, Cao H, Chi RA. Progress in the application of elicitors to promote the production of plant secondary metabolites [J]. Nat Prod Res Dev, 2004, 16: 472–476.
- [8] Kim SM, Kuzuyama T, Kobayashi A, et al. 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda* [J]. Planta, 2008, 227: 287–298.
- [9] Wang Q, Pi Y, Hou R, et al. Molecular cloning and characterization of 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase (CaHDR) from *Camptotheca acuminata* and its functional identification in *Escherichia coli* [J]. BMB Rep, 2008, 41: 112–118.
- [10] Yan Q, Hu Z, Tan RX, et al. Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with *in situ* adsorption, elicitation and semi-continuous operation [J]. J Biotechnol, 2005, 119: 416–424.
- [11] Shi M, Kwok KW, Wu JY. Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2007, 46: 191–196.