

## 丹参 *SmJRB2* 基因的克隆与功能鉴定

金鑫<sup>1</sup>, 李坤<sup>2</sup>, 郑子桢<sup>2</sup>, 周伟<sup>2</sup>, 廖望仪<sup>3</sup>, 开国银<sup>1,2</sup>

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 311402; 3. 浙江物产长乐创龄生物科技有限公司, 浙江 杭州 311123)

**摘要:** 【目的】丹参 *Salvia miltiorrhiza* 是治疗心脑血管疾病的常用中药材。解析丹参药效物质合成代谢的分子调控机制能为丹参优质新品种的选育提供科学依据。【方法】基于比较转录组挖掘获得响应甲基茉莉酸 (MeJA) 诱导的转录因子 *SmJRB2*。采用同源克隆技术克隆获得该基因的编码序列, 并进行生物信息学分析。采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 *SmJRB2* 基因的组织表达和 MeJA 诱导表达特征; 基于农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导的丹参遗传转化技术对 *SmJRB2* 基因的功能进行鉴定。【结果】*SmJRB2* 共编码 501 个氨基酸, 属于 bHLH 转录因子家族的 MYC 类转录因子。*SmJRB2* 基因在丹参叶片和主根中的表达量最高。*SmJRB2* 基因强烈响应 MeJA 的诱导, 诱导 4 h 时表达量最高。超表达 *SmJRB2* 促进丹参酮的积累, 抑制表达 *SmJRB2* 基因则降低丹参酮的合成。【结论】*SmJRB2* 是丹参酮代谢合成的正向调节因子。图 8 表 1 参 40

**关键词:** 丹参; *SmJRB2*; 克隆; 表达特征; 功能鉴定

中图分类号: S330 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2024)00-0001-09

### Cloning and functional identification of *SmJRB2* gene in *Salvia miltiorrhiza*

JIN Xin<sup>1</sup>, LI Shen<sup>2</sup>, ZHENG Zizhen<sup>2</sup>, ZHOU Wei<sup>2</sup>, LIAO Wangyi<sup>3</sup>, KAI Guoyin<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 2. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Changle Chuangling Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 311123, Zhejiang, China)

**Abstract:** [Objective] *Salvia miltiorrhiza* is a traditional Chinese medicine used in clinical treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases. Elucidating the molecular regulation mechanism of metabolism and synthesis of pharmacophore of *S. miltiorrhiza* can provide scientific basis for breeding new varieties of *S. miltiorrhiza* with high quality. [Method] The transcriptional factor *SmJRB2* in response to methyljasmonic acid (MeJA) induction was picked out based on comparative transcriptome mining. The coding sequence of this gene was cloned using homologous cloning technology and analyzed by bioinformatics. The tissue expression and MeJA induced expression of *SmJRB2* gene were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). The function of *SmJRB2* gene was identified based on the genetic transformation technology of *S. miltiorrhiza* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. [Result] The results showed that *SmJRB2* encoded 501 amino acids and belonged to the MYC transcription factor of bHLH transcription factor

收稿日期: 2023-12-21; 修回日期: 2024-03-14

基金项目: 浙江省自然科学基金面上项目 (LY20H280008); 全国大学生创新创业训练计划项目 (202010344024); 浙江中医药大学教育教学改革一般项目 (2020010, YB20023)

作者简介: 金鑫 (ORCID: 0009-0001-3551-9609), 从事药用植物组织培养、功能基因组学研究。E-mail: 1917350934@qq.com。通信作者: 廖望仪 (ORCID: 0009-0003-3408-699X), 高级农艺师, 从事药用植物栽培与种质资源创新利用研究。E-mail: 574643681@qq.com。开国银 (ORCID: 0000-0001-7586-9067), 教授, 博士, 从事药用植物种质资源创新利用、药效物质代谢合成分子调控和基因组学研究。E-mail: kaiguoyin@163.com

family. The expression of *SmJRB2* gene was the highest in leaves and principal root. *SmJRB2* gene was intensively induced by MeJA and its highest expression level peaked at the induction time of 4 h. Overexpression of *SmJRB2* promoted the accumulation of tanshinones and suppression of *SmJRB2* gene decreased the biosynthesis of tanshinones. [Conclusion] *SmJRB2* is a positive regulator of tanshinone metabolic synthesis. [Ch. 8 fig. 1 tab. 40 ref.]

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*; *SmJRB2*; cloning; expression profile; functional identification

丹参 *Salvia miltiorrhiza* 为唇形科 Lamiaceae 鼠尾草属 *Salvia* 多年生草本植物, 又称红根、赤参<sup>[1-2]</sup>。其主要药用部位为干燥根或根茎, 具有活血通经、祛瘀止痛、清心除烦、凉血消痈等功效<sup>[3]</sup>。研究表明: 丹参含有多种化学活性成分, 主要为脂溶性的萜类化合物和水溶性的酚酸类成分, 具有保护心肌、抗凝血、抗炎、抗肿瘤等药理学功效<sup>[4-5]</sup>。目前, 丹参面临野生种质资源被破坏、栽培生长周期长、有效成分含量低等问题<sup>[6]</sup>, 使得丹参品质退化, 其原料药在临床上的可持续利用受限。因此, 研究丹参药用活性成分的生物合成分子机制, 可为丹参品种的选育提供科学依据。

茉莉酸信号分子参与植物生长发育等多个生理活动的调控, 尤其在生物和非生物胁迫的防御反应中发挥着关键作用<sup>[7-8]</sup>。GE 等<sup>[9]</sup>研究表明: 甲基茉莉酸 (MeJA) 能诱导促进丹参酮的合成。ZHOU 等<sup>[10]</sup>研究发现: 丹参毛状根用 MeJA 处理后, 酚酸类成分的含量显著提高。迄今为止, 丹参酮在生物合成途径上的相关合成酶基因被大量克隆与鉴定<sup>[11-14]</sup>; 多个具有调控功能的转录因子如 bHLH、MYB 等也相继被挖掘<sup>[15-21]</sup>, 这些研究为全面解析转录因子调控丹参次生代谢物生物合成奠定了良好的基础。研究表明: bHLH 类转录因子能响应 MeJA 信号调控植物次生代谢物的合成<sup>[21-25]</sup>。本研究通过比较转录组数据库, 筛选获得 1 个响应 MeJA 诱导显著上调的丹参 bHLH 类转录因子。采用同源克隆的方法, 克隆了该转录因子, 命名为 *SmJRB2* 基因。基于农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 介导的丹参遗传转化技术, 对 *SmJRB2* 基因在丹参药用成分代谢合成中的功能及其表达特征进行了分析, 以探究 *SmJRB2* 基因在 MeJA 信号通路中的功能, 为解析丹参品质的形成机制和品种分子选育提供理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

丹参无菌苗, 亚细胞定位瞬时表达载体和遗传转化超表达载体 (pHB-X-YFP), 大肠埃希菌 *Escherichia coli* 菌株 (DH5 $\alpha$ ), 农杆菌菌株 C58C1、GV3101 和 EHA105 为浙江中医药大学中药生物技术实验室保存; 平末端试剂盒 (pEASY-Blunt Cloning, 北京全式金生物科技公司), 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (上海生工生物公司), 植物总 RNA 提取试剂盒和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 试剂盒 (天根生物技术有限公司), 限制性核酸内切酶 (Thermo Fisher Scientific 公司), PowerUp<sup>TM</sup> SYBRT<sup>TM</sup> Green Master (Applied Biosystem 公司)。

### 1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

按照植物总 RNA 提取试剂盒操作说明, 提取丹参总 RNA, 用质量浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳来检测其完整性, 并使用微量核酸蛋白测定仪测定 RNA 的浓度与 260、280 nm 下吸光度比值  $D(260/280)$ , 检测合格后备用。使用 RT-qPCR 试剂盒对检测合格的 RNA 进行反转录, 合成双链 cDNA 备用。

### 1.3 *SmJRB2* 基因的克隆与遗传转化载体构建

以丹参 cDNA 为模板, 基于已测得的丹参转录组数据 (NCBI 登录号: GSE100970) 拼接获得的 *SmJRB2* 序列信息, 设计特异性引物组合 *SmJRB2-BamH I*-F 和 *SmJRB2-Spe I*-R, 以及 *SmJRB2-Anti-BamH I*-F 和 *SmJRB2-Anti-Spe I*-R (表 1), 用来扩增目标 *SmJRB2* 基因序列; 将 PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 将获得的 DNA 片段切下, 通过胶回收试剂盒回收; 取 5  $\mu$ L 胶回收产物进行凝胶电泳检测, 剩余的 DNA 回收片段用于克隆载体 pMD-19T 构建、转化大肠杆菌、阳性克隆鉴定与测序检测。测序正确的 *SmJRB2* 基因序列用于 pHB 超表达和反义抑制表达载体的构建。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>SmJRB2-BamH I</i> -F	TCTCTCTAAGCTTGGATCCATGGGA AAGAAAGT ATGGTGAATGAAGAAG	<i>SmCPS1</i> -609R	TTCGAACCCACAAGTCATGT
<i>SmJRB2-Spe I</i> -R	GCCCTTGCTCACCATACTAGTTTTCAA GAGAGCAG CAGTAACTTATCTTTCA	<i>SmKSL1</i> -1480F	GTGTGACCCTTCTGCTAGCA
<i>SmJRB2-Anti-BamH I</i> -F	GGACTAGTATGGGAAAGAAAGTATGG TGGAAATG	<i>SmKSL1</i> -1630R	TGCATTGTCTTGGGAAGATG
<i>SmJRB2-Anti-Spe I</i> -R	CGGGATCCTCATTTCAAGAGAGCAGC AGTAACT	<i>SmDXS2</i> -1828F	TTGGAGATTGGGAAGGGAAGGAT
QF23	CCAAAGTTGTAAAGGCGTTGAGA	<i>SmDXS2</i> -1980R	AGGCTTGAGAATCTCGCATCAG
NOS-R	TGGTGCAGATGAACTTCAGGGT	<i>SmDXR</i> -1248F	CGACGAGAAAATCGGATACCTGG
<i>rolB</i> -F	GCTCTTGCAAGTCTACCTCTC	<i>SmDXR</i> -1424R	CATACAAGAGCAGGACTCGAACC
<i>rolB</i> -R	GATCGCCTCGTCAATACCAT	<i>SmHMGR</i> -QF	TCGTTTTCAATAAGTCGAGTAGA
<i>SmCPS1</i> -459F		<i>SmHMGR</i> -QR	ATTCTGAAGGAAGTCCAAAACAT
		<i>SmCYP76AH1</i> -1010F	TCGTGGATGAGTCGGCAAT
		<i>SmCYP76AH1</i> -1168R	TGAGTATCTGAGTCCCT
		<i>SmActin</i> -QF1011	AGCACCGAGCAGCATGAAGATT
		<i>SmActin</i> -QR1210	AGCAAAGCAGCGAACGAAGAGT

#### 1.4 生物信息学分析

使用 Vector NTI 对候选基因的氨基酸进行同源比对分析, 比较其保守结构域并着色。通过网站 NCBI 的 blastp 工具筛选同源氨基酸序列, 采用 MEGA 5.1 绘制进化树。使用网站 ExPASy 分析蛋白质的分子量和理论等电点; 使用网站 TMHMM Server v2.0 分析其是否有跨膜结构域; 使用网站 SignalP 4.1 Server 分析基因信号肽<sup>[26-28]</sup>。

#### 1.5 基因表达特征分析

向培养 1 个月且生长状态良好的毛状根中加入  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 MeJA 进行诱导处理, 选择 0、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、9.0 和 12.0 h 共 8 个时间点进行收获, 每个时间点 3 次重复。以稀释 20 倍的 cDNA 为模板, 根据需检测的基因设计特异 RT-qPCR 检测引物 (表 1)。以丹参 *Actin* 为内参基因, 进行 RT-qPCR 检测, 反应体系:  $8.0 \mu\text{L}$  RNase-free ddH<sub>2</sub>O,  $10.0 \mu\text{L}$  2×SuperReal PreMix,  $0.2 \mu\text{L}$  50×ROX Reference Dye,  $0.4 \mu\text{L}$  正向引物 (QF),  $0.4 \mu\text{L}$  反向引物 (QR),  $1.0 \mu\text{L}$  模板 (cDNA)。

#### 1.6 转基因载体的构建与遗传转化

将上述测序正确的 pMD-19T-*SmJRB2* 大肠埃希菌阳性克隆以及包含 pHB-X-YFP 空质粒的大肠埃希菌, 分别提取质粒后用 *BamH I* 和 *Spe I* 进行双酶切、电泳和切胶回收纯化; 取 *SmJRB2* 基因回收片段与 pHB-X-YFP 空质粒双酶切回收的大片段进行连接、转化大肠埃希菌、阳性克隆鉴定及再转化 C58C1 农杆菌。

#### 1.7 阳性毛状根的鉴定

采用十六烷基三甲基溴化铵法 (CTAB) 法<sup>[13]</sup> 分别提取上述获得的丹参毛状根系总 DNA, 作为 PCR 反应扩增的模板; 再依据 *SmJRB2* 基因编码序列设计上游引物 QF, pHB 载体中 NOS 终止子设计下游引物 NOS-R, 扩增特异性 DNA 片段序列; 再采用引物 *rolB*-F 和 *rolB*-R 扩增 *rolB* 基因 (表 1)。将不含 *SmJRB2* 基因的 pHB 空载体进行遗传转化, 以获得超表达和反义抑制的毛状根, 再以提取的总 DNA 为模板进行扩增, 作为 PCR 鉴定的阴性对照。PCR 反应条件如下:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性 5 min;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 45 s,  $58 \text{ }^\circ\text{C}$  退火 45 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 1 min, 35 个循环;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 8 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳验证是否为阳性毛状根系。

#### 1.8 转基因毛状根扩大培养与丹参酮合成酶基因的表达定量检测

根据阳性鉴定结果, 筛选出超表达效果较好的阳性毛状根, 将生长良好的毛状根接入  $100 \text{ mL}$  1/2MS 液体培养基中, 在摇床中  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  避光扩大培养, 培养至 60 d 即可收根。分别检测丹参酮合成途径 *DXS2*、*DXR*、*HMGR*、*CPS1*、*KSL1* 和 *CYP76AH1* 基因的表达量, 检测引物如表 1 所示。

#### 1.9 丹参酮质量分数测定

分别收集 3 个 *SmJRB2* 超表达与 3 个抑制表达毛状根系, 用液氮研磨成粉, 冷冻干燥处理 24 h; 取  $100 \text{ mg}$  干粉, 加入  $16 \text{ mL}$  甲醇/三氯甲烷 (体积比为 3:1), 超声处理 1 h 后再过夜浸提,  $12\ 000 \times g$  离心 10

min 收集上清液倒入蒸馏烧瓶中，50 °C 蒸馏去掉提取液，6 500×g 离心 10 min 收集药效提取物干物质。收集的干物质用 1 mL 蒸馏水充分溶解，再用 0.22 μmol·L<sup>-1</sup> 滤膜过滤。过滤后的样品通过高效液相色谱 (HPLC) 检测毛状根中丹参酮的质量分数<sup>[29]</sup>。

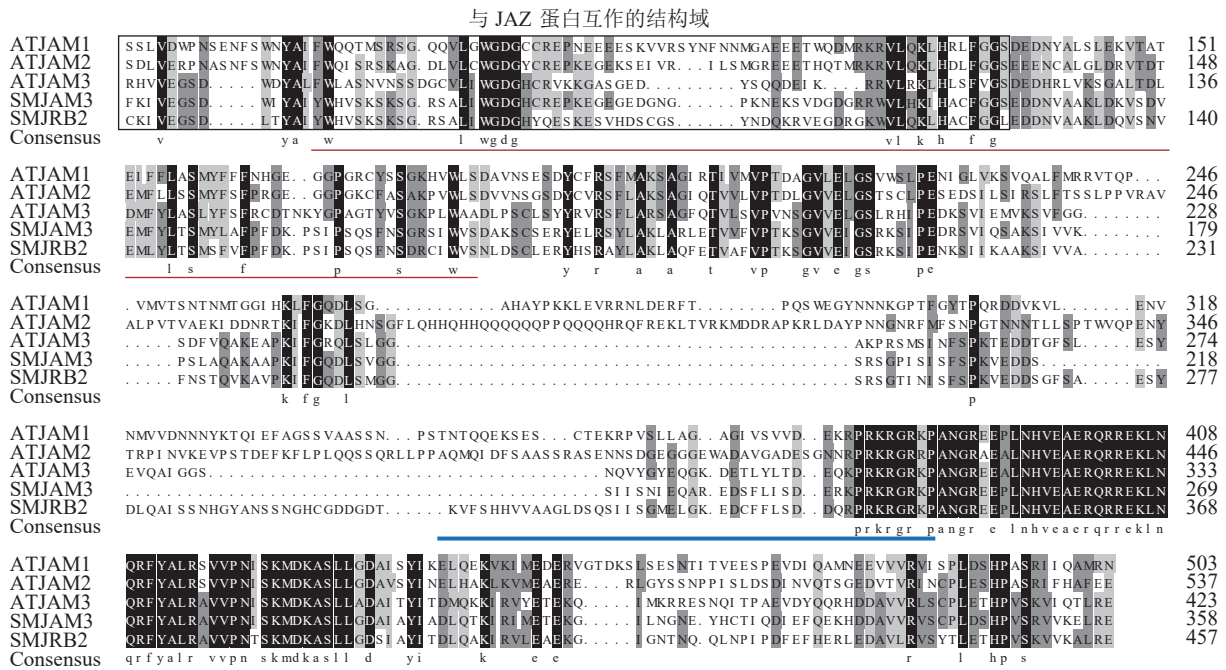
### 1.10 数据分析

所有测试数据用 SPSS 16.0 进行 *t* 检验单因素方差分析。所有基因表达量和丹参酮质量分数检测均为 3 次生物学重复，取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 SmJRB2 基因的克隆与序列分析

通过 PCR 扩增获得 *SmJRB2* 基因的编码序列，全长为 1 506 bp，共编码 501 个氨基酸，包含 71 个酸性氨基酸和 58 个碱性氨基酸；蛋白质分子量为 55.57 kD，理论等电点为 5.57。对拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *AtJAM* 与 *SmJRB2* 进行蛋白同源比对分析发现：*SmJRB2* 基因蛋白与拟南芥 *AtJAM3* 蛋白序列的同源性最高。*SmJRB2* 基因含有 2 个 bHLH-MYC 亚家族的保守结构域 (图 1)，其中 1 个位于 N 端的 bHLH-MYC 结构域 (114~228 区段)；另外 1 个位于 C 端的 HLH 结构域 (354~405 区段)，说明 *SmJRB2* 极可能属于 bHLH 转录因子家族的 MYC 类转录因子。



At. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; Sm. 丹参 *Salvia miltiorrhiza*。红线代表 N 端的 bHLH-MYC 结构域；蓝线代表 C 端的 HLH 结构域。

图 1 *SmJRB2* 与其他 bHLH 类转录因子的多重序列比对  
 Figure 1 Multiple alignment of *SmJRB2* gene with other bHLH transcription factors

### 2.2 SmJRB2 基因的进化特征

分别以丹参、葡萄 *Vitis vinifera*、长春花 *Catharanthus roseus* 及拟南芥 *AtMYC* 和 *AtJAM* 基因的氨基酸序列为研究对象，利用邻接法构建了 *SmJRB2* 蛋白的系统进化树 (图 2)。结果表明：*SmJRB2* 与拟南芥 *AtJAM* 家族成员聚在同一分支，而与 MYC 类转录因子的亲缘关系相对较远；在拟南芥 *AtJAM* 家族成员中，*SmJRB2* 与 *AtJAM3* 蛋白具有相对最近的亲缘关系。在拟南芥中，*AtJAM3* 是 MYC 类转录因子在 JA 信号通路中基因靶点的竞争子<sup>[30-31]</sup>，说明 *SmJRB2* 与 *AtJAM3* 具有相似的功能。

### 2.3 SmJRB2 基因的组织表达和诱导表达特征

通过 RT-qPCR 检测 *SmJRB2* 基因在丹参各个组织中的表达量。结果表明：*SmJRB2* 基因在叶中表达量最高，在主根中表达量次之，在须根和茎的表达量相对较低 (图 3)。利用 RT-qPCR 分析在 MeJA 诱导下丹参毛状根中 *SmJRB2* 基因的表达变化。结果表明：*SmJRB2* 受 MeJA 诱导 0.5 h 后，表达量显著上调 ( $P < 0.05$ )，而诱导 4 h 时 *SmJRB2* 表达量达到最高，上调 15 倍以上，表明 *SmJRB2* 强烈响应 MeJA

的诱导 (图 4)。

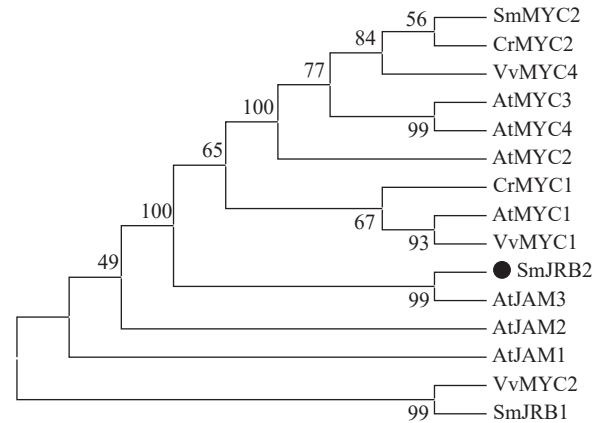
### 2.4 *SmJRB2* 基因的功能验证

#### 2.4.1 *SmJRB2* 过表达与抑制表达载体的构建及遗传转化

将 C58C1 空菌株、pHB-*SmJRB2*-YFP (图 5A)+C58C1、pHB-*SmJRB2*-Anti-YFP (图 5B)+C58C1 阳性农杆菌活化后, 以丹参无菌苗叶片为外植体进行遗传转化。转化后叶片置于 1/2MS+500 mg·L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠 (Cef)+100 mg·L<sup>-1</sup> 卡那霉素 (Kana) 的培养基上培养, 每周更换 1 次培养基; 4 周后待叶片伤口处出现发根后, 再转接到 1/2MS+300 mg·L<sup>-1</sup> Cef+100 mg·L<sup>-1</sup> Kana 的培养基上, 每周更换 1 次培养基; 2 周后再转到 1/2MS+200 mg·L<sup>-1</sup> Cef+100 mg·L<sup>-1</sup> Kana 的培养基上, 每周更换 1 次培养基; 2 周后置于无抗生素的 1/2MS 培养基上。将 2 cm 以上的毛状根置于 1/2MS 培养基中分株系单独培养, 用于阳性检测与扩大培养。

2.4.2 转基因毛状根阳性克隆 PCR 鉴定 以鉴定成功的 pHB-*SmJRB2*-YFP 重组子作为阳性对照, 以 C58C1 空菌株诱导的毛状根的 DNA 为阴性对照, 分别检测超表达 (*SmJRB2*-OE) 和抑制表达 (*SmJRB2*-Anti) 各 30 个株系中 *SmJRB2*、*rolB* 基因的靶序列。结果表明: *SmJRB2* 过表达阳性株系有 8 个, 阳性率为 26.67%; 抑制表达阳性株系有 9 个, 阳性率为 30% (图 6)。

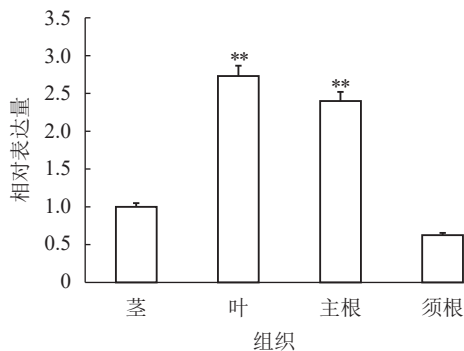
2.4.3 转基因毛状根丹参酮合成通路基因的表达量检测 选取 3 个超表达转基因毛状根系, 对



Sm. 丹参 *Salvia miltiorrhiza*; Cr. 长春花 *Catharanthus roseus*; Vv. 葡萄 *Vitis vinifera*。

图 2 *SmJRB2* 蛋白的进化分析

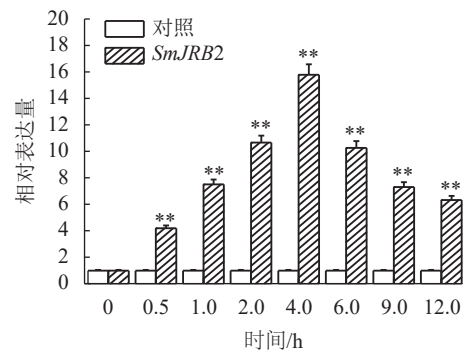
Figure 2 Phylogenetic tree of *SmJRB2* protein



\*\* 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 3 *SmJRB2* 基因组织表达特征分析

Figure 3 Tissue expression profiles of *SmJRB2* gene



\*\* 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图 4 *SmJRB2* 基因 MeJA 诱导表达特征

Figure 4 Expression profiles of *SmJRB2* gene induced by MeJA

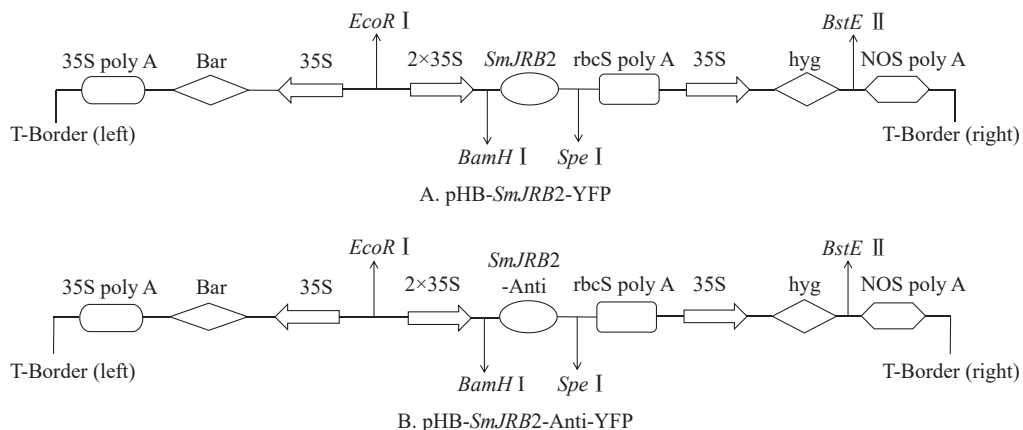


图 5 *SmJRB2* 过表达载体 (A) 和抑制表达载体 (B) 示意图

Figure 5 Schematic diagram of *SmJRB2* overexpression vector (A) and suppression expression vector (B)

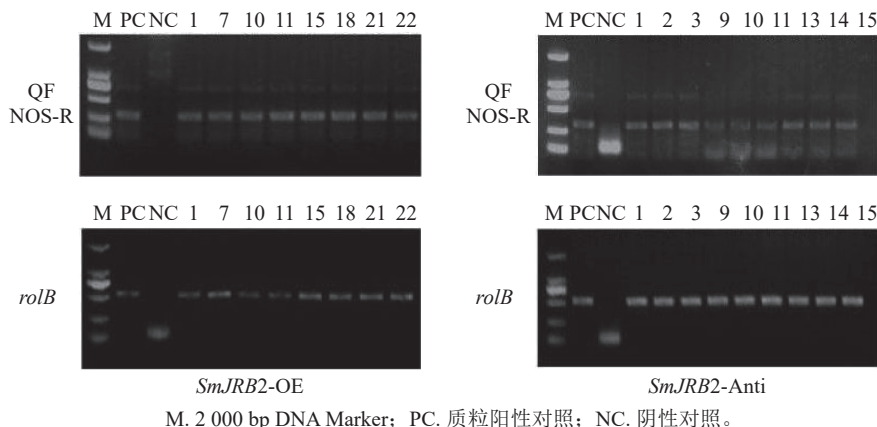
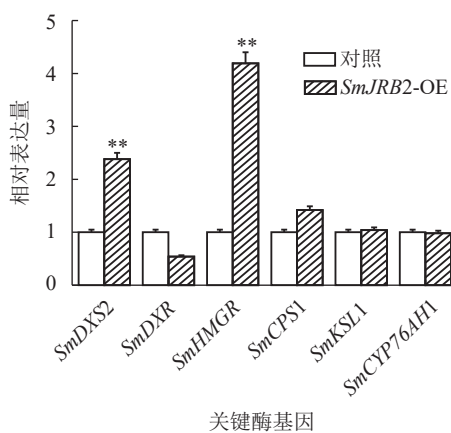


图6 转基因毛状根的PCR鉴定

Figure 6 PCR identification of transgenic hairy roots

*SmJRB2* 过表达毛状根丹参酮代谢途径中关键酶基因的表达量进行 RT-qPCR 分析。结果显示：丹参酮代谢通路中 *SmDXS2* 和 *SmHMGR* 基因的表达量显著上调 ( $P < 0.05$ ) (图 7)。*SmJRB2* 基因可通过上调丹参酮代谢途径的 *SmDXS2*、*SmHMGR* 和 *SmCPS1* 等关键酶基因的表达来促进丹参酮的代谢合成。

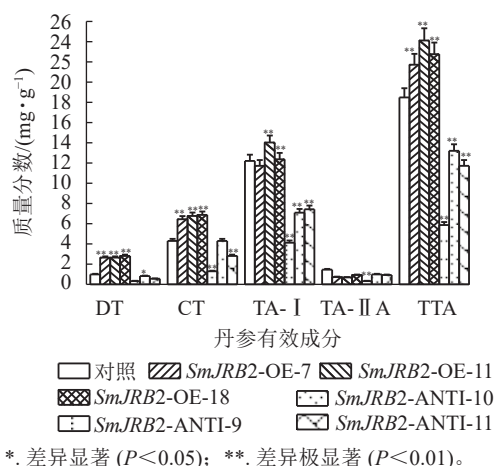
2.4.4 转基因毛状根中丹参酮的质量分数检测 过表达 *SmJRB2* 后, 3 个超表达毛状根系中二氢丹参酮 (DT)、隐丹参酮 (CT)、丹参酮 I (TA-I) 和总丹参酮 (TTA) 的质量分数均显著提高 ( $P < 0.05$ ); 3 个抑制表达毛状根系中丹参酮 DT、CT、TA-I 和 TTA 的质量分数均显著下调 ( $P < 0.05$ ), TTA 质量分数最低, 仅为对照的 0.31 倍; 丹参酮 II A (TA-II A) 质量分数在转基因毛状根中无显著变化 (图 8)。结果表明: *SmJRB2* 促进毛状根中丹参酮的积累, 是丹参酮代谢的正向调节因子。



基因表达量为 3 个毛状根系检测值的平均值;  
\*\*. 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图7 *SmJRB2* 基因过表达转基因毛状根丹参酮代谢途径中关键酶基因的表达特征

Figure 7 Relative expression profiles of key enzyme genes in tanshinone biosynthetic pathway in *SmJRB2* gene overexpression transgenic hairy roots of *Salvia miltiorrhiza*



\*. 差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*\*. 差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

图8 *SmJRB2* 转基因毛状根中丹参酮质量分数  
Figure 8 Contents of tanshinones in *SmJRB2* transgenic hairy root lines

### 3 讨论

本研究基于比较转录组测序的结果, 采用同源克隆技术克隆了 *SmJRB2* 基因的全长编码序列。将 *SmJRB2* 基因、丹参转录组数据库获得的 *SmJRB1* 基因, 以及拟南芥、葡萄、长春花等物种中的 MYCs、JAMs 转录因子合并构建系统进化树, 发现 *SmJRB2* 基因与拟南芥的 *AtJAM3* 具有较高的同源关系, 且含有 MYC 和 JAM 保守结构域。基于候选基因的遗传转化实验验证发现, *SmJRB2* 对丹参酮的合成起正向调控作用。YANG 等<sup>[32]</sup> 研究发现: MYCs 类转录因子作为正向调节子, 能显著正调控丹参酮和丹参酚酸的合成。ZHAO 等<sup>[33]</sup> 研究发现丹参 JAM 类转录因子会抑制丹参酚酸的代谢合成。对 *SmJRB2* 蛋白的结构域进行分析, 结合基因进化特征, 推测所克隆的 *SmJRB2* 基因属于 MYC 类转录因子的 JAM 类亚型,

具有其他物种 JAM 亚型转录调控因子的类似基因功能。

组织表达和诱导表达特征分析表明：*SmJRB2* 转录因子在丹参根、茎、叶中均有表达，且在叶片和主根中的表达量相对最高，在须根和茎中的表达量相对较低。*SmJRB2* 属于 MYC 类转录因子，叶片中 *SmJRB2* 的高表达不仅有利于叶片和茎的生长，还有利于次级代谢产物的生物合成<sup>[34-36]</sup>。结果显示：*SmJRB2* 能够响应 MeJA 的诱导，且在诱导后 2~4 h 内的表达量较高。汪琬宜等<sup>[37]</sup>和 ZHOU 等<sup>[38-40]</sup>研究发现，MeJA 是丹参酮和丹参酚酸代谢合成的有效诱导子。因此，推测 *SmJRB2* 是 MeJA 调控丹参药效物质代谢合成的信号响应因子，可为 MeJA 调控丹参药效物质代谢合成分子机制的阐释提供理论参考。

## 4 结论

本研究克隆了 *SmJRB2* 转录因子，基于农杆菌介导的遗传转化技术分析了该基因的组织表达，发现 *SmJRB2* 转录因子在植物的根、茎和叶中均有表达，且在叶中的表达量最高。同时，*SmJRB2* 能响应 MeJA 的诱导且显著上调。初步阐明了 *SmJRB2* 转录因子对丹参次生代谢产物合成的影响，得出 *SmJRB2* 是丹参酮代谢合成的正向调控因子。本研究进一步完善了 *SmJRB2* 转录因子的调控理论体系，并为丹参优质新品种选育提供了分子靶标和理论基础。

## 5 参考文献

- [1] ZHANG Siyuan, LUO Hua, SUN Shiyi, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* Bge. (Danshen) for inflammatory bowel disease: clinical evidence and network pharmacology-based strategy for developing supplementary medical application [J/OL]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, **12**: 741871 [2023-11-28]. doi: 10.3389/fphar.2021.741871.
- [2] 李坤, 林爱真, 杨媛, 等. 丹参酮生物合成分子调控机制的研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, **35**(2): 367 – 375.  
LI Shen, LIN Aizhen, YANG Yuan, *et al.* Research progress on molecular regulation mechanism involved in the biosynthetic pathway of tanshinone in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2018, **35**(2): 367 – 375.
- [3] CHEN Xiuping, GUO Jiajie, BAO Jiaolin, *et al.* The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): a systematic review [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2014, **34**(4): 768 – 794.
- [4] WANG Xin, LEE W Y W, ZHOU Xuelin, *et al.* A pharmacodynamic-pharmacokinetic (PD-PK) study on the effects of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on midazolam, a model CYP3A probe substrate, in the rat [J]. *Phytomedicine*, 2010, **17**(11): 876 – 883.
- [5] ZHU Guoxue, WU Xiaoqian, JIANG Shujun, *et al.* The application of omics techniques to evaluate the effects of Tanshinone II A on dextran sodium sulfate induced ulcerative colitis [J]. *Molecular Omics*, 2022, **18**(7): 666 – 676.
- [6] LANGE B M, RUJAN T, MARTIN W, *et al.* Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(24): 13172 – 13177.
- [7] SHI Min, ZHOU Wei, ZHANG Jianlin, *et al.* Methyl jasmonate induction of tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots is mediated by JASMONATE ZIM-DOMAIN repressor proteins [J/OL]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 20919 [2023-11-28]. doi: 10.1038/srep20919.
- [8] WANG Doudou, HUANG Feifei, YAN Pengcheng, *et al.* Cytosolic and nucleosolic calcium-regulated molecular networks in response to long-term treatment with abscisic acid and methyl jasmonate in *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. *Genes*, 2022, **13**(3): 524 [2023-11-28]. doi: 10.3390/genes13030524.
- [9] GE Xiuchun, WU Jianyong. Induction and potentiation of diterpenoid tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by beta-aminobutyric acid [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, **68**(2): 183 – 188.
- [10] ZHOU Yangyun, SUN Wei, CHEN Junfeng, *et al.* *SmMYC2a* and *SmMYC2b* played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J/OL]. *Scientific Reports*, 2020, **10**(1): 7201 [2023-11-28]. doi: 10.1038/srep22852.
- [11] HAO Xiaolong, SHI Min, CUI Lijie, *et al.* Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on tanshinone production and biosynthetic gene expression in transgenic *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2015, **62**(1): 24 – 31.

- [12] LI Caili, LI Dongqiao, SHAO Fenjuan, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in *Salvia miltiorrhiza* [J/OL]. *BMC Genomics*, 2015, **16**(1): 200[2023-11-28]. doi: 10.1186/s12864-015-1411-x.
- [13] ZHENG Han, JING Li, JIANG Xihong, *et al.* The ERF-VII transcription factor *SmERF73* coordinately regulates tanshinone biosynthesis in response to stress elicitors in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *The New Phytologist*, 2021, **231**(5): 1940 – 1955.
- [14] SHI Min, ZHU Ruiyan, ZHANG Yi, *et al.* A novel *WRKY34-bZIP3* module regulates phenolic acid and tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, **73**: 182 – 191.
- [15] ZHANG Xin, LUO Hongmei, XU Zhichao, *et al.* Genome-wide characterisation and analysis of bHLH transcription factors related to tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Scientific Reports*, 2015, **5**(1): 11244 – 11256.
- [16] LI Caili, LU Shanfa. Genome-wide characterization and comparative analysis of R2R3-MYB transcription factors shows the complexity of MYB-associated regulatory networks in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *BMC Genomics*, 2014, **15**(1): 277 – 286.
- [17] 王晓荣. 丹参 bHLH 类转录因子的基因克隆及功能初步研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2015.  
WANG Xiaorong. *Isolation and Function Analysis of bHLH Transcription Factor in Salvia miltiorrhiza* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2015.
- [18] TIAN Qian, HAN Limin, ZHU Xiaoya, *et al.* *SmMYB4* is a R2R3-MYB transcriptional repressor regulating the biosynthesis of phenolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J/OL]. *Metabolites*, 2022, **12**(10): 968[2023-11-28]. doi: 10.3390/metabo12100968.
- [19] YANG Rao, WANG Shengsong, ZOU Haolin, *et al.* R2R3-MYB transcription factor *SmMYB52* positively regulates biosynthesis of salvianolic acid B and inhibits root growth in *Salvia miltiorrhiza* [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(17): 9538[2023-11-28]. doi: 10.3390/ijms22179538.
- [20] ZHANG Jianhong, LV Haizhou, LIU Wanqing, *et al.* bHLH transcription factor *SmbHLH92* negatively regulates biosynthesis of phenolic acids and tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2020, **12**(3): 237 – 246.
- [21] LIU Shucan, WANG Yao, SHI Min, *et al.* *SmbHLH60* and *SmMYC2* antagonistically regulate phenolic acids and anthocyanins biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Journal of Advanced Research*, 2022, **42**: 205 – 219.
- [22] 郭肖红, 高文远, 陈海霞, 等. 金属离子对丹参酮 II -A 和原儿茶醛生物合成的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, **30**(12): 885 – 888.  
GUO Xiaohong, GAO Wenyuan, CHEN Haixia, *et al.* Effects of mineral cations on the accumulation of tanshinone II -A and protocatechuic aldehyde in the adventitious root culture of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, **30**(12): 885 – 888.
- [23] 张鑫, 宋经元, 胡鸾雷, 等. bHLH 转录因子调控植物活性成分生物合成的研究进展[J]. 药学学报, 2014, **49**(4): 435 – 442.  
ZHANG Xin, SONG Jingyuan, HU Yuanlei, *et al.* Research progress of the regulation on active compound biosynthesis by the bHLH transcription factors in plants [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, **49**(4): 435 – 442.
- [24] CHEN Cheng, LIU Fu, ZHANG Kaixuan, *et al.* MeJA-responsive bHLH transcription factor *LjbHLH7* regulates cyanogenic glucoside biosynthesis in *Lotus japonicus* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, **73**(8): 2650 – 2665.
- [25] WANG Ning, SHU Xiaochun, ZHANG Fengjiao, *et al.* Transcriptome-wide characterization of bHLH transcription factor genes in *Lycoris radiata* and functional analysis of their response to MeJA [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, **13**: 975530[2023-11-28]. doi: 10.3389/fpls.2022.975530.
- [26] 李磊磊. 丹参 *WRKY* 转录因子 *SmWRKY54* 的功能初步研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2016.  
LI Leilei. *The Functional Study of SmWRKY54 Transcription Factor in Salvia miltiorrhiza* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016.
- [27] 孟超敏, 耿翡翠, 卿桂霞, 等. 陆地棉低磷胁迫应答基因 *GhGDPD1* 的克隆与表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2023, **40**(4): 723 – 730.  
MENG Chaomin, GENG Feifei, QING Guixia, *et al.* Cloning and expression analysis of low phosphorus stress response gene *GhGDPD1* in *Gossypium hirsutum* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, **40**(4): 723 – 730.
- [28] 卓娟, 侯丹, 林新春. 毛竹 *PhebHLH6* 基因克隆及表达分析[J]. 浙江农林大学学报, 2023, **40**(4): 731 – 737.  
ZHUO Juan, HOU Dan, LIN Xinchun. Cloning and expression analysis of *PhebHLH6* gene from *Phyllostachys edulis* [J].



*Journal of Zhejiang A&F University*, 2023, **40**(4): 731 – 737.

- [29] LI Lin, WANG Donghao, ZHOU Li, *et al.* JA-responsive transcription factor *SmMYB97* promotes phenolic acid and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, **68**(50): 14850 – 14862.
- [30] SASAKI-SEKIMOTO Y, JIKUMARU Y, OBAYASHI T, *et al.* Basic helix-loop-helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2013, **163**(1): 291 – 304.
- [31] NAKATA M, OHME-TAKAGI M. Two bHLH-type transcription factors, JA-ASSOCIATED MYC2-LIKE2 and JAM3, are transcriptional repressors and affect male fertility [J]. *Plant Signaling and Behavior*, 2013, **8**(12): e26473.
- [32] YANG Na, ZHOU Wenping, SU Jiao, *et al.* Overexpression of *SmMYC2* increases the production of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, **8**: 1804 [2023-11-28]. doi: 10.3389/fpls.2017.01804.
- [33] ZHAO Shujuan, ZHANG Jinjia, TAN Ronghui, *et al.* Enhancing diterpenoid concentration in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots through pathway engineering with maize C1 transcription factor [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, **66**(22): 7211 – 7126.
- [34] HE Kunrong, DU Jiancan, HAN Xiao, *et al.* PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1 (PHR1) interacts with JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ) and MYC2 to modulate phosphate deficiency-induced jasmonate signaling in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2023, **35**(6): 2132 – 2156.
- [35] ZHUO Mengna, SAKURABA Y, YANAGISAWA S. A jasmonate-activated *MYC2-Dof2.1-MYC2* transcriptional loop promotes leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2020, **32**(1): 242 – 262.
- [36] DENG Huaiyu, LI Qi, CAO Ruizhi, *et al.* Overexpression of *SmMYC2* enhances salt resistance in *Arabidopsis thaliana* and *Salvia miltiorrhiza* hairy roots [J/OL]. *Journal of Plant Physiology*, 2023, **280**: 153862 [2023-11-28]. doi: 10.1016/j.jplph.2022.153862.
- [37] 汪琬宜, 蒋喜红, 张利华, 等. 丹参转录因子 *SmbHLH1* 基因的克隆和表达分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, **36**(24): 3416 – 3420.  
WANG Wanyi, JIANG Xihong, ZHANG Lihua, *et al.* Isolation and characteristics of *SmbHLH1* gene in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2011, **36**(24): 3416 – 3420.
- [38] ZHOU Wei, WANG Shuai, SHEN Yafang, *et al.* Overexpression of *SmSCR1* promotes tanshinone accumulation and hairy root growth in *Salvia miltiorrhiza* [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, **13**: 860033 [2023-11-28]. doi: 10.3389/fpls.2022.860033.
- [39] ZHOU Wei, SHI Min, DENG Changping, *et al.* The methyl jasmonate-responsive transcription factor *SmMYB1* promotes phenolic acid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J/OL]. *Horticulture Research*, 2021, **8**(1): 10 [2023-11-28]. doi: 10.1038/s41438-020-00443-5.
- [40] ZHOU Wei, HUANG Qiang, WU Xiao, *et al.* Comprehensive transcriptome profiling of *Salvia miltiorrhiza* for discovery of genes associated with the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids [J/OL]. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 10554 [2023-11-28]. doi: 10.1038/s41598-017-10215-2.