

白花丹参丙酮酸脱羧酶基因的克隆和表达分析

史仁玖, 常正尧, 王健美, 王德才*

泰山医学院医药生物技术研究所, 山东 泰安 271000

摘要: **目的** 获得白花丹参丙酮酸脱羧酶全长基因, 分析该基因在白花丹参不同组织部位, 以及缺氧胁迫处理后的该基因表达差异。 **方法** 利用cDNA文库筛选获得丙酮酸脱羧酶SmPDC基因全长, 利用半定量RT-PCR, 分析SmPDC基因在白花丹参不同部位的表达情况, 及缺氧处理条件下的表达情况。 **结果** 获得的SmPDC基因由2 190个核苷酸组成, 编码605个氨基酸, 蛋白相对分子质量约 6.485×10^4 , 等电点pI 5.49; 半定量RT-PCR检测, 该基因在丹参的根中表达量最高, 其次是茎和叶; 缺氧胁迫处理会诱导该基因的表达, 随胁迫时间延长表达量逐渐增加。 **结论** 白花丹参SmPDC基因是PDC家族新成员, 其功能与植物耐缺氧代谢途径有关。

关键词: 白花丹参; 丙酮酸脱羧酶 SmPDC 基因; 克隆; RT-PCR; 缺氧胁迫

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)01-0-0

Cloning and expression analysis of pyruvate decarboxylase gene in *Salvia miltiorrhiza*

SHI Ren-jiu, CHANG Zheng-yao, WANG Jian-mei, WANG De-cai

Institute of Medicinal Biotechnology, Taishan Medical University, Taian 271000, China

Abstract: Objective To obtain the full-length of *Salvia miltiorrhiza* pyruvate decarboxylase (SmPDC) gene, to analyze the expression differences in various tissues of *S. miltiorrhiza* after anaerobic stress treatment. **Methods** The full-length of SmPDC gene was isolated through sequencing cDNA library, and semi-quantitative RT-PCR was used to detect the gene expression levels. **Results** The full-length of SmPDC cDNA has an open reading frame of 2 190 bp. The deduced amino acid sequence of SmPDC has 605 amino acid residues which form a 64.85 kDa polypeptide with a calculated pI of 5.49. Semi-quantitative RT-PCR indicated that SmPDC gene was expressed at a high level in root, followed by stem and leaf of *S. miltiorrhiza*. Anaerobic stress could induce the expression of SmPDC gene and the expression was increased with the stress time elongating. **Conclusion** SmPDC is a new member of the PDC family and plays an important role in anaerobic respiration pathway.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge. f. *alba* C. Y. WU et H. W. Li; *Salvia miltiorrhiza* pyruvate decarboxylase gene; cloning; expression analysis; RT-PCR

白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge. f. *alba* C. Y. Wu et H. W. Li 是唇形科植物丹参的白花变型, 主产于山东, 根入药。丹参有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的功能, 用于月经不调、经闭痛经、瘀积聚、胸腹刺痛、热痹疼痛、疮疡肿痛、心烦不眠、肝脾肿大、心绞痛等症^[1]。白花丹参除具有丹参的作用和用途外, 对治疗血栓闭塞性脉管炎具有独特疗效^[2-3], 临床应用前景十分广阔。

丙酮酸脱羧酶 (pyruvate decarboxylase, PDC) 是一种以焦磷酸硫胺素 (thiamine pyrophosphate, TPP) 为辅酶的羧基裂解酶, 在植物中广泛存在。

作为发酵途径中的关键酶, PDC在胞质中结合TPP和 Mg^{2+} 组成全酶, 催化糖酵解所产生的丙酮酸脱羧生成乙醛^[4]。PDC驱动发酵代谢通路, 通过与丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 竞争代谢丙酮酸参与植物体内的能量和物质代谢, 响应缺氧、低温、高盐、机械损伤、ABA处理、病原菌感染等多种生物与非生物胁迫^[4-9], 在根瘤组织发育、休眠芽的释放、果实成熟、花粉发育与花粉管萌发等组织发育过程中也起着重要作用^[10-13]。目前已从水稻^[14]、玉米^[15]、草莓^[16]、葡萄^[17]、拟南芥^[18]、薏苡^[19]等植物中克隆出了编码PDC的cDNA序列,

收稿日期: 2012-09-03

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (ZR2010CM063)

作者简介: 史仁玖, 副教授, 主要从事药用植物分子生物学研究。Tel: (0538)62236993 E-mail: shirenjiu@163.com

*通讯作者 王德才 Tel: (0538)6236803 E-mail: dcwang@tsmc.edu.cn

但尚未见白花丹参 PDC 基因的相关报道。本研究从已经建立起的白花丹参全长 cDNA 文库中获得 1 个 PDC 基因的全长 cDNA 序列, 并对克隆的基因序列进行了生物信息学分析, 对其表达和功能进行了初步研究, 为进一步深入研究 PDC 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 1 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 PDC 基因 cDNA 的克隆

用灭菌牙签随机从白花丹参 cDNA 文库^[20]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, 发现与 PDC 基因 cDNA 一致性 85% 的 cDNA, 经进一步核酸和氨基酸序列 BLAST 比对, 证实是丙酮酸脱羧酶基因, 命名为 SmPDC 基因。

2.2 SmPDC 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.ncbi.nlm.nih.gov/blast>、http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html、<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP> 等链接的网上软件包进行。使用 DNAMAN 软件对序列进行多重比对, 并用 MEGA 4.0 软件构建进化树。

2.3 水淹胁迫处理

将生长 2 周的白花丹参幼苗放入 Hogland 营养液中, 水淹时间分别为 0、6、12、24、48、72、96 h。上述处理完成后, 根、茎、叶取样, 冷冻保存于 -70 °C 以备提取 RNA。

2.4 SmPDC 基因的表达分析

采用改良的 CTAB 法^[21]提取白花丹参第 1 对真叶期植株的根、叶、茎总 RNA。用半定量 RT-PCR 检测 SmPDC 基因在不同组织以及在水淹处理后的表达。按照 SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) 进行 RT 反应, PCR 反应的引物是上游

引物 P₁: 5'-CCAACCAATCGACCCATA-3', 下游引物 P₂: 5'-TTCCGCATCCAACCTTTA-3'; 反应程序是 94 °C、4 min, 26 个循环 (94 °C、30 s, 57 °C、35 s, 72 °C、60 s), 72 °C、5 min。18 SrRNA 作为半定量 RT-PCR 的内标基因, 所使用的特殊引物是 18SF: 5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3', 18SR: 5'-CTTGGATGTGGTAGCCGTTT-3'。产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳分离检测。每个 PCR 3 个重复, 电泳后使用伯乐凝胶成像系统 (IMAGEQ UAMT400) 采集图像, 然后利用伯乐凝胶成像系统的 Quantity One 定量分析软件分析, 3 次处理平均。

3 结果

3.1 白花丹参 PDC 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 2 190 bp 的白花丹参 PDC 全长序列, 命名为 SmPDC, GenBank 登录号为 JF775376, BLAST 显示与百脉根 PDC 84% 相似, 蓖麻 PDC 84% 相似, 拟南芥 PDC 82% 相似, 毛果杨 PDC 84% 相似, 山杏 PDC 84% 相似, 马铃薯 PDC 85% 相似 (图 1)。比对表明所获基因属于 PDC 家族。

通过 ORF Finder 寻找该基因的开放读码框, 结果显示包含 1 个 1 818 bp 的 ORF 框, 推断其编码 605 个氨基酸。由 DNAMAN 软件推算该编码蛋白的相对分子质量 6.485×10^4 , 等电点 pI 5.49。GenBank 工具预测显示这个蛋白质 N 端含有一个 PDC 和吡啶丙酮酸脱羧酶上与嘧啶碱基结合的保守区域 (TPP_PYR_PDC_IPDC), C 端含一个结合硫胺素焦磷酸的保守区域 (TPP_PDC_IPDC), 进一步证明所获基因属于 PDC 家族 (图 2)。

3.2 PDC 序列家族同源基因的氨基酸序列比较

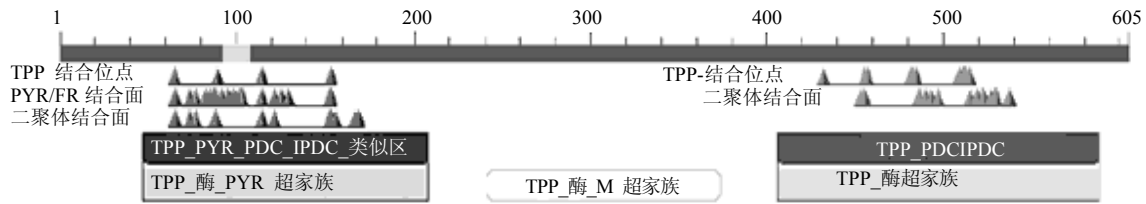
作为一个普遍存在的代谢途径中的酶, PDC 具有比较保守的结构域。用 DNAMAN 程序对百脉根 (AAO72533.1)、蓖麻 (XP 002530500.1)、拟南芥 (NP 195033.1)、毛果杨 (XP 002322997.1)、山杏 (ABZ79223.1) 和马铃薯 (BAC23043.1) PDC 的氨基酸序列进行多序列比对, 结果表明 (图 1), 发现 SmPDC 与 PDC 家族具有很高的同源性。

在 MEGA 4 软件平台上对不同植物 PDC 氨基酸序列进行分子系统进化分析 (图 3), 包括 SmPDC (JF775376), 忽地笑 *Lycoris aurea* PDC (LaPDC, ABJ99596.1), 葡萄 *Vitis vinifera* PDC (VvPDC,

ATPDC	MDTKIGSIDDCFTNG.DVCSPTNG.TVATTIHN..SVSPSSAITINYCDATLGRHLARRLVQACVTDVFSVPGDFNLT	73
LCPDC	MDVKLGSLDTTKEFASN.DVVSCATANHTTATQS..SIPSTAVSS..CDATLGRHLARRLAQICVTDVFSVPGDFNLT	72
RTPDC	MDTKIGSLDTCRPTSN.DMINPTNG.AVAATQS.SVSP.TIINA..SESTLGRHLARRLVQICVNDVFSVPGDFNLT	71
PAPDC	MDTKIGALDVCKEASN.EVGSFPNG.TAMATQN..SVSPSTVINS..SEATLGRHLARRLVQICVTDVFTVPGDFNLT	71
RCPDC	MDTNIGSIDTLKPTTT.DVCCPANG.AVCTLQSSSTVSPSSIVSS..PDSTLGRHLARRLVQCVTDVFSVPGDFNLT	73
STPDCKPPHT.DVGCLPTV.NAVTTHN....PAVAFNS..PESTLGRHLARRLVQCVTDVFGVPGDFNLT	58
SMPDC	METKIGSLNFCNSATCNGV.GCLPSNGVSSIKP....SAVAFNS..AEAATLGRHLARRLVQIDVSDVFSVPGDFNLT	71
Consensus	umdtkigsld ckp dv ng v iq ps ns eatlgrhlarrlvqigtvtdvfsvpgdfnlt	
ATPDC	LLDHLIAEPEGLNVLVGGCNELNAGYAADGYARSRVGVAVVFTFTVGGLSVLNAIAGAYSENLPVICIVGGPNSNDYGT	150
LCPDC	LLDHLIAEPEGLNVLVGGCNELNAGYAADGYARSRVGVAVVFTFTVGGLSVLNAIAGAYSENLPVICIVGGPNSNDYGT	149
RTPDC	LLDHLIAEPEGLNVLVGGCNELNAGYAADGYARSRVGVAVVFTFTVGGLSVLNAIAGAYSENLPVICIVGGPNSNDYGT	148
PAPDC	LLDHLIAEPEGLNVLVGGCNELNAGYAADGYARSRVGVAVVFTFTVGGLSVLNAIAGAYSENLPVICIVGGPNSNDYGT	148
RCPDC	LLDHLIAEPEGLNVLVGGCNELNAGYAADGYARSRVGVAVVFTFTVGGLSVLNAIAGAYSENLPVICIVGGPNSNDYGT	150
STPDC	LLDHLIAEPEGLNVLVGGCNELNAGYAADGYARSRVGVAVVFTFTVGGLSVLNAIAGAYSENLPVICIVGGPNSNDYGT	135
SMPDC	LLDDLIAEPEGLNVLVGGCNELNAGYAADGYARSRVGVAVVFTFTVGGLSVLNAIAGAYSENLPVICIVGGPNSNDYGT	148
Consensus	lldhliaepgin vggcnelnagyaadgyarsrgvgacvvftftvggslvlnaiagaysenlplicivggpnsndygt	
ATPDC	NRILHHTIGLPDFSQELRCFQTVTCYQAVVNNLEDAHELDIDTAISTALKESKPVYISVSCNLSAIPHPTFSRDPVFF	227
LCPDC	SRILHHTIGLPDFTQELRCFQTVTCFQAVVNNLEDAHECIDTAISTALKESKPVYISICNLPPIPHPTFSRDPVFF	226
RTPDC	NRILHHTIGLPDFSQELRCFQTVTCFQAVVNNLEDAHELDIDTAISTALKESKPVYISVSCNLSAIPHPTFSRDPVFF	225
PAPDC	SRILHHTIGLPDFSQELRCFQTVTCYQAVVNNLEDAHESIDTAISTALKESKPVYISISCNLAGIPHPTFSRDPVFF	225
RCPDC	NRILHHTIGLPDFSQELRCFQTVTCFQAVVNNLEDAHELDIDTAISTALKESKPVYISISCNLSAIPHPTFSRDPVFF	227
STPDC	NRILHHTIGLPDFTQELRCFQTVTCYQAVVNNLEDAHELDIDTAISTALKESKPVYISISCNLPPIPHPTFSRDPVFF	212
SMPDC	NRILHHTIGLPDFSQELRCFQTVTCYQAVVNNLEDAHELDIDTAISTALKESKPVYISVSCNLSAIPHPTFSRDPVFF	225
Consensus	nrilhhtiglpdpsqelrcfqtvtcyqavvnnleedahelidtaistalkeskpvysisicnlsaiphtfsrprepff	
ATPDC	SLAPRLSNKMGLEAAVEAATLEFLNKAVKPVIVGGPKLRVAKACDAFVELADASGYALAVMPSAKGLVPEHHPHFIGT	304
LCPDC	SLSAKLSNQMGLEAAVEAATLEFLNKAVKPVIVGGPKLRVAKASDAFVELADASGYALAVMPSAKGLVPEHHPHFIGT	303
RTPDC	SILTPKLSNKLGLEAAVEAAAEFLNKAVKPVIVGGPKLRSAHAGEAFVELADASGYALAVMPSAKGLVPEHHPHFIGT	302
PAPDC	SLSAPRLSNQMGLEAAVEAAAEFLNKAVKPVIVGGPKLRVAHAGEAFVELADASGYALAVMPSAKGLVPEHHPHFIGT	302
RCPDC	SLSAPRLSNKIGLEAAVEAAAEFLNKAVKPVIVGGPKLRVAKACEAFVELADACGYALAVMPSAKGLVPEHHPHFIGT	304
STPDC	SLSAPRLSNKMGLEAAVEAAAEFLNKAVKPVIVGGPKLRVAKACDAFVELADASGYAVAVMPSAKGLVPEHHPHFIGT	289
SMPDC	FTSPRLSNKMGLEAAVEAAAEFLNKAVKPVIVGGPKLRVAKACDAFVELADACAYPLAVMPSAKGLAPEHHPHFIGT	302
Consensus	slsprlsnkmgleaaveaataeflnkavkpvivggpklrvakacdafveladasgyalavmpsakglvpehhphfigt	
ATPDC	YWGAVSTAFCAEIVESADAYIFAGPIFNDYSSVGYSLLLKKEKAIIVQPDRTIVANGPITFGCILMKDFLRLAKRLK	381
LCPDC	YWGAVSTAFCAEIVESADAYIFAGPIFNDYSSVGYSLLLKKEKAIIVQPDRTIVANGPITFGCILMKDFLRLAKRLK	380
RTPDC	YWGAVSTAFCAEIVESADAYIFAGPIFNDYSSVGYSLLLKKEKAIIVQPDRTIVANGPITFGCILMKDFLRLAKRLK	379
PAPDC	YWGAVSTAFCAEIVESADAYIFAGPIFNDYSSVGYSLLLKKEKAIIVQPDRTIVANGPITFGCILMKDFLRLAKRLK	379
RCPDC	YWGAVSTAFCAEIVESADAYIFAGPIFNDYSSVGYSLLLKKEKAIIVQPDRTIVANGPITFGCILMKDFLRLAKRLK	381
STPDC	YWGAVSTAFCAEIVESADAYIFAGPIFNDYSSVGYSLLLKKEKAIIVQPDRTIVANGPITFGCILMKDFLRLAKRLK	366
SMPDC	YWGAVSTAFCAEIVESADAYIFAGPIFNDYSSVGYSLLLKKEKAIIVHPDRTIVANGPITFGCILMKDFLRLAKRLK	379
Consensus	ywgavstafcaeivesadayifagpifndyssvgyllllkkekaaiivqpdrtivangpifgcilmkdfllalarklk	
ATPDC	HNETAHENYRRIYVVPBGKPKESREPLRVNVLFEHQIKMLSGSETAVIAETGDSWFNCQKLRLEKCGGYEFQMQYGS	458
LCPDC	HNNAAYENYRRIYVVPBGKPKESREPLRVNVLFEHQIKMLSGSETAVIAETGDSWFNCQKLRLEKCGGYEFQMQYGS	457
RTPDC	QNTTAYDNYRRIYVVPBGKPKESREPLRVNVLFEHQIKMLSGSETAVIAETGDSWFNCQKLRLEKCGGYEFQMQYGS	456
PAPDC	HNNTAHENYRRIYVVPBGKPKESREPLRVNVLFEHQIKMLSGSETAVIAETGDSWFNCQKLRLEKCGGYEFQMQYGS	456
RCPDC	HNNTAHENYRRIYVVPBGKPKESREPLRVNVLFEHQIKMLSGSETAVIAETGDSWFNCQKLRLEKCGGYEFQMQYGS	458
STPDC	HNPTAHENYRRIYVVPBGKPKESREPLRVNVLFEHQIKMLSGSETAVIAETGDSWFNCQKLRLEKCGGYEFQMQYGS	443
SMPDC	HNKTAHENYRRIYVVPBGKPKESREPLRVNVLFEHQIKMLSGSETAVIAETGDSWFNCQKLRLEKCGGYEFQMQYGS	456
Consensus	hn tayenyhrifvpeg plk pkeplravnlfqhikmlssetaviaetgdswfncqklrleagcgyefqmqygs	
ATPDC	IGWSVGATLGYAQAVPEKRVIACTIGDGSFQVTAQDVSTMLRGGQNTIIFLINNGGYTIEVEIHDGPNVVIKNWNYTG	535
LCPDC	IGWSVGATLGYAQAVPEKRVIACTIGDGSFQVTAQDVSTMLRGGQNTIIFLINNGGYTIEVEIHDGPNVVIKNWNYTG	534
RTPDC	IGWSVGATLGYAQAVPEKRVISFIDGGSFQVTAQDVSTMLRGGQNTIIFLINNGGYTIEVEIHDGPNVVIKNWNYTG	533
PAPDC	IGWSVGATLGYAQAVPEKRVIACTIGDGSFQVTAQDVSTMLRGGQNTIIFLINNGGYTIEVEIHDGPNVVIKNWNYTG	533
RCPDC	IGWSVGATLGYAQAVPEKRVIACTIGDGSFQVTAQDVSTMLRGGQNTIIFLINNGGYTIEVEIHDGPNVVIKNWNYTG	535
STPDC	IGWSVGATLGYAQAVPEKRVIACTIGDGSFQVTAQDVSTMLRGGQNTIIFLINNGGYTIEVEIHDGPNVVIKNWNYTG	520
SMPDC	IGWSVGATLGYAQAVPEKRVIACTIGDGSFQVTAQDVSTMLRGGQNTIIFLINNGGYTIEVEIHDGPNVVIKNWNYTG	533
Consensus	igwsvgatlgyaqavpekrviafigdgsfqvtaqdvstmlrccqgq tii flinnnggytieveihdgpnyvknwnygt	
ATPDC	LVDAIHNGEGKWCWTAKVRYEELVEAETATGKDKDCLCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSRVSAANSRPPNP	606
LCPDC	LVEAIEHNGEGKWCWTKVFCDEELVEAETATGKDKDCLCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSRVSAANSRPPNP	605
RTPDC	LVDAIHNGEGKWCWTAKVFCDEELVEAETATGKDKDCLCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSRVSAANSRPPNP	604
PAPDC	LVDAIHNGEGKWCWTAKVRYEELVEAETATGKDKDCLCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSRVSAANSRPPNP	604
RCPDC	LVDAIHNGEGKWCWTAKVQCEELVEAETATGKDKDCLCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSRVSAANSRPPNP	606
STPDC	LVDAIHNGEGKWCWTAKVQCEELVEAETATGKDKDCLCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSRVSAANSRPPNP	591
SMPDC	LVDAIHNGEGKWCWTAKVQCEELVEAETATGKDKDCLCFIEVIVHKDDTSKELLEWGSRVSAANSRPPNP	604
Consensus	lvdaihnggkewt kvrceeelveaetatg kdkdclcfievivhkddtskellewgsrvsaansrppnp	

图 1 7种植物 PDC 基因氨基酸序列比对

Fig. 1 Comparison of amino acid sequence of PDC gene in seven plants



百脉根 *Lotus corniculatus* PDC (LcPDC)、蓖麻 *Ricinus communis* PDC (RcPDC)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* PDC (AtPDC)、毛果杨 *Populus trichocarpa* PDC (PtPDC)、山杏 *Prunus armeniaca* PDC (PaPDC)、马铃薯 *Solanum tuberosum* PDC (StPDC)、白花丹参 *Salvia miltiorrhiza* PDC (SmPDC)

图2 丹参 PDC 推断氨基酸序列的特征性保守区域

Fig. 2 Characteristic conserved domain of amino acid sequence in SmPDC

AAG22488.1), 香石竹 *Dianthus caryophyllus* PDC (DcPDC, AAP96920.1), PaPDC) (ABZ79223.1), 毛果杨 PDC (PtPDC, XP002322997.1), RcPDC (AAO72533.1), AtPDC (NP 195033.1), LcPDC (AAO72533.1), 玉米 PDC (ZmPDC, NP 001105052.1), 水稻 *Oryza sativa* PDC (OsPDC, NP 001049811.1), 大麦 *Hordeum vulgare* PDC (HvPDC, BAJ94428.1), 二色高粱 *Sorghum bicolor* PDC (SbPDC, XP_002465414.1), StPDC (BAC23043.1), 烟草 *Nicotiana tabacum* PDC (NtPDC, P51846.1)。发现 SmPDC 与 LaPDC 最为接近, 与 VvPDC、DcPDC、PaPDC、PtPDC 整体亲缘关系比较接近, 先聚为一簇, 与其他植物 PDC 也有较高的相似度, 与多序列比对的结果相吻合。可见 PDC 在进化过程中相对保守。

情况。结果表明, SmPDC 在白花丹参幼苗根、茎和叶组织中均有转录水平的表达 (图 4), 但是在根部表达最强。显示 SmPDC 在转录水平具有组织特异性。

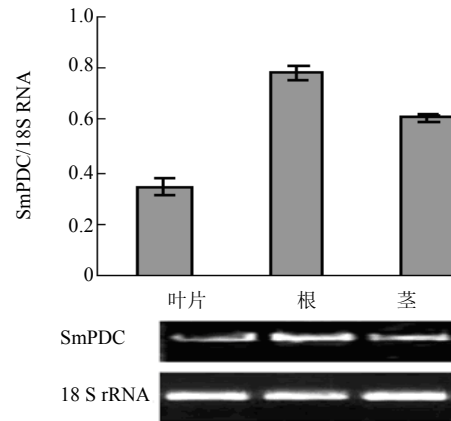


图4 SmPDC在白花丹参不同组织中的表达情况

Fig. 4 Expression of SmPDC in different tissues of *S. miltiorrhiza*

实验表明水淹处理参与 SmPDC 基因表达的调控。在 Hogland 营养液中培养不同时间, 半定量 RT-PCR 的方法检测结果表明, 根中 SmPDC 受水淹缺氧的诱导, 随胁迫时间的延长, 基因的表达量显著增加, 72 h 的表达量是对照的 4 倍多, 继续胁迫处理, 由于长时间胁迫造成的代谢紊乱导致基因表达减少 (图 5)。

4 讨论

PDC 催化乙醇发酵的第一步反应, 是这一途径的关键酶。对植物乙醇发酵的研究主要关注其在缺氧反应中的作用, 着眼于提高植株的耐淹水性。本研究首次从白花丹参中克隆了一条与耐缺氧调节相关的基因, 并利用生物信息学的方法对其核酸及其推测的蛋白序列组成进行分析。结果表明, 该基因

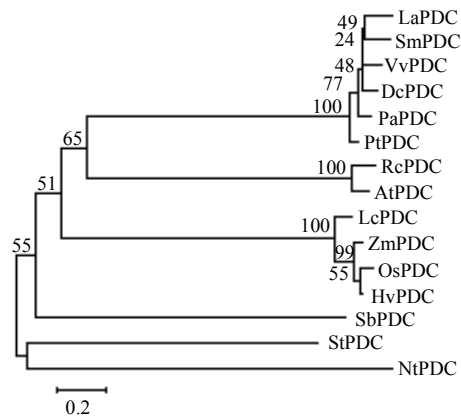


图3 15个物种中的 PDC 同源基因的系统进化分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of PDC homogene in 15 plant species

3.4 SmPDC 在丹参植株不同部位中的表达以及对环境胁迫的响应

采用半定量 RT-PCR 方法分析 SmPDC 基因在白花丹参不同组织的表达和对水淹环境胁迫的响应

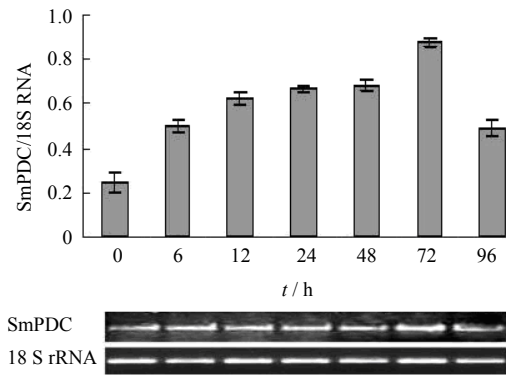


图5 SmPDC在丹参根不同缺氧胁迫时间下的表达情况

Fig. 5 Expression of SmPDC in roots of *S. miltiorrhiza* for different time of anaerobic stress treatment

与其他物种中的PDC基因有较高的相似性，命名为SmPDC，并获得含有完整ORF的基因全长，推测其蛋白质序列与结构域与其他植物的PDC基因有很高的同源性，它包括一个PDC和吡啶丙酮酸脱羧酶上与嘧啶碱基结合的保守区域，C端含有一个结合硫酸素焦磷酸的保守区域，这些序列在所有的家族成员中都是保守的，参与丙酮酸脱羧反应。

研究发现SmPDC的表达显著受到水淹缺氧的诱导，PDC在水稻^[22]、玉米^[23]、烟草^[24]和草莓^[25]中受到缺氧胁迫时表达量显著增加，以适应缺氧环境，提供能量维持生理代谢。Tadege等^[26]将从酵母菌中分离的PDC基因转入番茄，在水淹胁迫处理下PDC过表达，明显提高了耐缺氧能力。证明PDC在耐缺氧代谢中的作用。

SmPDC的表达对缺氧胁迫响应表明对丙酮酸脱羧反应的调控可能是植物胁迫响应和耐受的一个方面。缺氧是怎样诱导丙酮酸脱羧酶反应和信号转导的以及存在什么样的调控等机制值得深入探讨，为进一步培育白花丹参耐缺氧新品种奠定分子生物学基础。

参考文献

[1] 史国玉, 周凤琴, 郭庆. 丹参与白花丹参叶化学成分与药理临床研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 465-467.

[2] 郝岗平, 王健美, 史仁玖, 等. 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 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 3416-350.

[3] 朱海林, 张大伟, 孙隆儒, 等. 白花丹参总酚酸提取物对大鼠血栓闭塞性脉管炎的影响 [J]. 中草药, 2012, 43(8): 1565-1569.

[4] Tadege M, Dupuis I, Kuhlemeier C. Ethanol fermentation: New functions for an old pathway [J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4(8): 320-325.

[5] Kürsteiner O, Dupuis I, Kuhlemeier C. The pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 968-978.

[6] Kimmerer T W, Kozlowski T T. Ethylene, ethane, acetaldehyde, and ethanol production by plant under stress [J]. *Plant Physiol*, 1982, 69(4): 840-847.

[7] Tadege M, Bucher M, Sthli W, et al. Activation of plant defense responses and sugar efflux by expression of pyruvate decarboxylase in potato leaves [J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 661-671.

[8] Bolton M D, Kolmer J A, Xu W W, et al. Lr34 mediated leaf rust resistance in wheat: Transcript profiling reveals a high energetic demand supported by transient recruitment of multiple metabolic pathways [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21(12): 1515-1527.

[9] Tajima S, Larue T A. Enzymes for acetaldehyde and ethanol formation in legume nodules [J]. *Plant Physiol*, 1982, 70(2): 288-292.

[10] Ophir R, Pang X, Halaly T, et al. Gene expression profiling of grape bud response to two alternative dormancy release stimuli expose possible links between impaired mitochondrial activity, hypoxia, ethylene ABA interplay and cell enlargement [J]. *Plant Mol Biol*, 2009, 71(4/5): 403-423.

[11] Xu S B, Li T, Deng Z Y, et al. Dynamic proteomic analysis reveals a switch between central carbon metabolism and alcoholic fermentation in rice filling grains [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(2): 908-925.

[12] Mellema S, Eichenberger W, Rawyler A, et al. The ethanol fermentation pathway supports respiration and lipid biosynthesis in tobacco pollen [J]. *Plant J*, 2002, 30(3): 329-336.

[13] Gass N, Glagotskaia T, Mellema S, et al. Pyruvate decarboxylase provides growing pollen tubes with a competitive advantage in *Petunia* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(8): 2355-2368.

[14] Hossain M A, Huq E, Grover A, et al. Characterization of pyruvate decarboxylase genes from rice [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 761-770.

[15] Kelly P M, Godfrey K, Lal S K, et al. Characterization of the maize pyruvate decarboxylase gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 1259-1261.

[16] Moyano E, Encinas-Villarejo S, Lopez-Raez J A, et al. Comparative study between two strawberry pyruvate

- decarboxylase genes along fruit development and ripping, post-harvest and stress conditions [J]. *Plant Sci*, 2004, 166(4): 835-845.
- [17] Bayik E J, Sadka A, Ogrodovitch A. Fermentative metabolism in grape berries: isolation and characterization of pyruvate decarboxylase cDNA and analysis of its expression throughout berry development [J]. *Plant Sci*, 2000, 156: 151-158.
- [18] Kursteiner O, Dupuis I, Kuhlemeier C. The pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses [J]. *Plant Physiol*, 2003(132): 968-978.
- [19] 陈双建, 陈大清, 李亚男. 薏苡丙酮酸脱羧酶 1 (PDC1) 基因片段 cDNA 克隆与分析 [J]. 湖北农业科学, 2009, 7: 1543-1545.
- [20] 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): 2027-2035.
- [21] 王健美, 史仁玖, 苗苗. 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): 297-299.
- [22] Mohanty B, Ong B L. Contrasting effects of submergence in light and dark on pyruvate decarboxylase activity in roots of rice lines differing in submergence tolerance [J]. *Ann Bot*, 2003, 91: 291-300.
- [23] Peschke V M, Sachs M M. Multiple pyruvate decarboxylase genes in maize are induced by hypoxia [J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 240: 206-212.
- [24] Tadege M, Bucher M, Stahli W, *et al.* Activation of plant defense responses and sugar efflux by expression of pyruvate decarboxylase in potato leaves [J]. *Plant J*, 1998b, 16: 661-671.
- [25] Moyano E, Encinas-Villarejo S, Lopez-Raez J A. Comparative study between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripping, post-harvest and stress conditions [J]. *Plant Sci*, 2004, 166: 835-845.
- [26] Tadege M, Brandle R, Kuhlemeier C. Anoxia tolerance in tobacco roots: effect of overexpression of pyruvate decarboxylase [J]. *Plant J*, 1998, 14: 327-335.