

· 药 学 基 础 ·

基于丹参功能基因的道地品质形成的分子机制

许文娟¹, 李贝宁¹, 罗凌龙¹, 张驰¹, 张小波², 李俊伶¹, 阿呷吕布¹, 王学勇^{1*}

(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资源中心, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨丹参功能基因单核苷酸多态性(SNP)和丹参有效成分之间的关系以及丹参药材产地特异性品质形成的分子机制。方法:以8个不同产地及变型的丹参为研究对象,采用高效液相色谱(HPLC)方法得到不同产地丹参成分指纹图谱,同时对丹参酮代谢途径中的3个功能基因丹参乙酰CoA酰基转移酶(*SmAACT*), 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinas(*SmCMK*), 丹参异戊烯焦磷酸异构酶(*SmIPPI*)的cDNA全长进行聚合酶链式反应(PCR)扩增、克隆测序以及生物信息学分析。结果:获得了8个产地及变型共23株丹参样品中3个功能基因*SmAACT*, *SmCMK*, *SmIPPI*的cDNA全长序列。通过对3个功能基因的SNP位点及氨基酸多态性序列分析,分别发现18, 16和14个SNP位点。HPLC指纹图谱可以将8个产地的丹参聚为两大类,北京、湖北、山东白花、山西、河南、山东紫花样品聚为一支,河北与内蒙古样品聚为另一支,这也说明丹参成分变化趋势与地理距离关联不大,而变型及品种因素对质量差异的贡献率较高。结论:不同产地丹参具有明显的遗传分化趋势,并形成了各自的产地特异性基因型。通过探讨不同产地丹参药材特异性品质形成的分子机制,为保证临床用药的稳定有效奠定基础,同时为丹参优良品种选育提供指导。

[关键词] 丹参; 单核苷酸多态性; 丹参乙酰CoA酰基转移酶(*SmAACT*); 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinas(*SmCMK*); 丹参异戊烯焦磷酸异构酶(*SmIPPI*)

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031; R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)13-0097-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210813

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210414.1428.003.html>

[网络出版日期] 2021-4-14 14:58

Molecular Mechanism of *Salvia miltiorrhiza* Quality Formation Based on Single Nucleotide Polymorphism of Functional Genes

XU Wen-juan¹, LI Bei-ning¹, LUO Ling-long¹, ZHANG Chi¹, ZHANG Xiao-bo², LI Jun-ling¹,
AGA Lyu-bu¹, WANG Xue-yong^{1*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;
2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relationship between the single nucleotide polymorphism (SNP) of function genes and effective components of *Salvia miltiorrhiza* and the molecular mechanism of specific quality formation of *S. miltiorrhiza*. **Method:** The fingerprints of components in *S. miltiorrhiza* from eight different habitats and varieties were obtained by high-performance liquid chromatography (HPLC). The full-length cDNA of three functional genes acetyl-CoA C-acetyltransferase (*SmAACT*), 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (*SmCMK*) and isopentenyl diphosphate isomerase (*SmIPPI*) in tanshinone metabolic pathway were amplified by polymerase chain reaction (PCR), cloned, and sequenced, followed by bioinformatics analysis. **Result:** The full-length cDNA sequences of three functional genes *SmAACT*, *SmCMK*,

[收稿日期] 20200909(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773841);阿拉伯-伊斯兰医药体系传统草药品种本底梳理与整理项目(2018FY100704)

[第一作者] 许文娟,在读硕士,从事药用植物与分子生药学研究, E-mail: xuwenjuan0907@163.com

[通信作者] * 王学勇,博士,教授,从事国际中药资源研发与分子生药学研究, E-mail: wxyp.d@163.com

and *SmIPPI* in tanshinone metabolic pathway were obtained from 23 strains of *S. miltiorrhiza* from eight different habitats and varieties. As revealed by the analysis of SNP and amino acid polymorphisms of three functional genes, 18, 16, and 14 SNP sites were found respectively. HPLC results showed the samples from Beijing, Hubei, Shandong (No. SDB), Shanxi, Henan, and Shandong (No. SDZ) were clustered into one branch, and those from Hebei and Inner Mongolia were clustered into another branch, which suggested that the variation trend of *S. miltiorrhiza* components had little correlation with geographical distance, but the variety was a critical factor for the quality. **Conclusion:** There was an obvious genetic differentiation trend in *S. miltiorrhiza* from different habitats, and different origin-specific genotypes were formed. The molecular mechanism of the formation of the specific quality of *S. miltiorrhiza* from different habitats was discussed, which laid a foundation for the stability and effectiveness of clinical medication, and guided the breeding of excellent varieties of *S. miltiorrhiza*.

[Key words] *Salvia miltiorrhiza*; single nucleotide polymorphism (SNP); acetyl-CoA C-acetyltransferase (*SmAAC*); 4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (*SmCMK*); isopentenyl diphosphate isomerase (*SmIPPI*)

丹参来源于唇形科鼠尾草属植物丹参的干燥根和根茎,始载于《神农本草经》,丹参具有活血祛瘀,通经止痛,清心除烦,凉血消痈的功效。丹参是临床常用药物,主要用于治疗各种心脑血管相关疾病^[1]。丹参中主要药效成分是脂溶性的丹参酮类和水溶性的酚酸类,其含量的高低是决定丹参药材品质的重要指标^[2]。受各种因素的影响,不同产地丹参质量参差不齐,有效成分含量差别也较大^[3-4]。一般认为四川、山东、河南、山西产的丹参质量好于其他地区^[5]。丹参药材品质的物质基础是药效成分,药效成分形成的内因与原植物遗传机制密切相关。虽然目前有关丹参产地特异性的研究较多,然而有关其产地特异性品质形成的分子机制研究相对较少。而现代分子研究手段可高通量整合植物的遗传信息,探究药材品质形成的分子机制。单核苷酸多态性(SNP),是单个核苷酸的变异而导致的基因多态性,是生物体中存在的最普遍的一种多态性现象,在植物功能基因组研究和遗传改良研究方面有着广泛应用^[6-7]。本研究以不同产地丹参样品为研究对象,通过对丹参中3个功能基因cDNA全长聚合酶链式反应(PCR)扩增、克隆测序、生物信息学分析、序列比对、表达载体构建等,分析了丹参酮合成途径的功能基因SNP位点及氨基酸多态性序列,得到产地特异性基因型,并与有效成分含量进行联系,得出功能基因序列多态性对终产物积累所产生的影响。并通过诱导表达得到不同产地样品的产物蛋白,从而在不同层面探讨丹参药材特异性品质形成的分子机制。研究为保证临床用药的稳定有效奠定了基础,同时对丹参优良品种的选育具有指导意义。

1 材料

8个丹参药材购买和采挖自7个不同产地,其中山东白花丹参为丹参变型 *Salvia miltiorrhiza* f. *alba*。丹参植株从产地取样后移栽至北京中医药大学药草园,第二年10月采挖。每产地选取3个单株样品分别编号,挖取主根晒干打粉。每一单株平行制备2份样品。药材经北京中医药大学王学勇教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza*,见表1。对照品隐丹参酮,丹参酮Ⅱ_A,丹参素钠(中国食品药品检定研究院,批号分别为110852-200305,110766-200417,110855-200809,纯度分别为99%,99.5%,97.8%)。LA *Taq* DNA聚合酶, M-MLV逆转录酶, RNase inhibitor, dNTP mixture, Oligo (dT), DNase I, pMD19-T载体(日本TaKaRa公司,批号分别为RR002A, 2641Q, 2313Q, 4030Q, 3806, 2270A, 6013);琼脂糖凝胶回收试剂盒(批号DH101-01),感受态细胞DH5 α (批号BC116-01),DNA Marker(批号MD104)(博迈德科技发展有限公司);LB培养基所需试剂, Tryptone, Yeast Extract, NaCl, 琼脂粉[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号分别为293-426-3, 8013-01-2, 7647-14-5, 9002-18-0];引物合成及测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;其余试剂购于汇海科仪公司。

1100系列高效液相色谱系统(美国Agilent公司),3K-15型低温高速离心机(德国Sigma有限公司),JS-680B型全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司),恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司),QL-901型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

表1 丹参试验样本

Table 1 *Salvia miltiorrhiza* from different regions

编号	来源	产地
SX	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	山西
HN	<i>S. miltiorrhiza</i>	河南南阳
HBH	<i>S. miltiorrhiza</i>	河北(红根丹参)安国
NM	<i>S. miltiorrhiza</i>	内蒙古野生
SDZ	<i>S. miltiorrhiza</i>	山东(紫花丹参)泰安
SDB	<i>S. miltiorrhiza</i> f. <i>alba</i>	山东(白花丹参)泰安
HUB	<i>S. miltiorrhiza</i>	湖北神农架
BJ	<i>S. miltiorrhiza</i>	北京密云

2 方法

2.1 不同产地丹参指纹图谱 不同产地的丹参中主要有效成分包括丹参素钠、隐丹参酮和丹参酮Ⅱ_A。测定方法参考本课题组前期建立的方法^[7],流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱(0~30 min, 20%~25%A; 30~35 min, 25%~65%; 35~65 min, 65%~85%; 65~75 min, 85%A)。

2.2 不同产地丹参功能基因SNP分析

2.2.1 cDNA序列的克隆 分别称取各产地3株丹参鲜根约1g,提取总RNA, Oligo d(T)为引物,按照Takara公司逆转录酶说明书反转录成cDNA,用软件Primer Premier 5.0分别设计1对引物,序列见表2。PCR反应条件为94℃预变性4 min; 94℃变性30 s,退火30 s, 72℃延伸2 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。丹参乙酰CoA酰基转移酶(*SmaACT*), *SmCMK*和丹参异戊烯焦磷酸异构酶(*SmIPPI*)基因的退火温度分别为58, 60, 66℃。PCR产物50 μL进行1%琼脂糖凝胶电泳检测,切下目的片段,按照博迈德琼脂糖凝胶回收试剂盒方法进行回收纯化。取胶回收产物2 μL连接pMD19-T载体,金属浴16℃连接过夜,得到重组质粒。按照博迈德*Escherichia coli* DH5α感受态细胞使用说明转化重组质粒,涂于固体培养基后倒置培养。挑取

表2 引物序列

Table 2 Primers of genes in PCR

基因	登录号	序列	扩增长度/bp
<i>SmaACT F</i>	EF635969.1	上游 5'-CGGGGTACCTTATTGGCTGCTCCATTTT-3'	1 357
<i>SmaACT R</i>		下游 5'-CCGCTCGAGCGCTCTGCTTCTCCATCTCT-3'	
<i>SmCMK F</i>	EF534309.1	上游 5'-CGGGGTACCGCTACTTGCTTCTCTCTCCA-3'	1 401
<i>SmCMK R</i>		下游 5'-CCGCTCGAGATTCTCCCCAAATCCATA-3'	
<i>SmIPPI F</i>	EF635967.1	上游 5'-CGGGGTACCATGTGCTCTTGACCAGCATCCCGT-3'	1 041
<i>SmIPPI R</i>		下游 5'-CCGCTCGAGCGGCGTCAACACCCTATTT-3'	

单菌斑转入含100 g·L⁻¹磷酸腺苷1 mL的LB液体培养基中, 37℃振荡培养过夜。取PCR检测为阳性的菌液直接送样,测序,同时留500 μL菌液加等体积30%的甘油, -80℃长期保存。

2.2.2 生物信息学分析 双向测序结果采用Contig Express软件进行拼接,得到基因全长序列;采用DNAMAN软件进行序列比对分析;采用美国国家生物信息中心(NCBI)网站ORF finder页面找到基因序列的ORF框并翻译为氨基酸序列;用ProtParam工具预测基因编码蛋白的理化性质;使用TMHMM软件对蛋白进行跨膜预测,并采用TMpred工具计算跨膜区位置及分值;使用ProtScale工具进行蛋白亲疏水性分析。运用DNAMAN软件对所测得所有产地样品序列及氨基酸序列进行比对,寻找产地特异性基因型,并得到高低含量丹参个体特异性SNP位点,研究不同产地样品SNP对基因表达的影响。

3 结果和分析

3.1 丹参指纹图谱及有效成分含量比较 不同产地丹参有效成分含量见表3,指纹图谱及聚类分析(最短距离法)见图1,2。丹参药材成分变化趋势与地理距离并无太大关联,而变型及品种因素对质量差异的贡献率较大。例如湖北样品并未与产地最近的河南样品聚为一类,反而与产地距离最远的北京样品相似度极高,来自同一栽培基地的山东白花与山东紫花样品也并未聚为一支,证明不同变型对质量差异的贡献率大于地理环境因素。

3.2 *SmaACT*基因cDNA全长克隆及产地SNP分析 以不同产地cDNA为模板,以*SmaACT*上游和*SmaACT*下游为引物按照优化好的条件进行PCR扩增,筛选阳性克隆进行测序,见图3。测序结果可靠无套峰。将双向测序结果采用Contig Express软件进行拼接,并将两端进行剪切后得到了1 341 bp的*SmaACT*基因cDNA全长序列。将此序列于NCBI

表3 丹参有效成分含量测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Content of active components in *Salvia miltiorrhiza* ($\bar{x} \pm s, n=3$)
mg·g⁻¹

编号	丹参素钠	隐丹参酮	丹参酮II _A
HBH	4.031±1.745	1.508±0.878	1.532±0.668
HUB	4.341±2.244	3.403±1.508	5.379±2.744
HN	3.670±0.842	1.737±0.850	4.314±1.544
NM	5.784±1.786	0.905±0.572	1.839±2.084
SDB	2.684±0.948	2.909±1.962	4.903±2.882
SDZ	1.686±0.348	4.347±1.592	7.534±3.050
SX	2.042±0.354	2.220±1.502	5.077±3.552
BJ	2.256±0.507	3.248±1.832	4.495±2.363

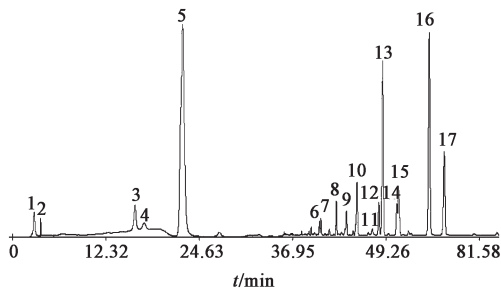
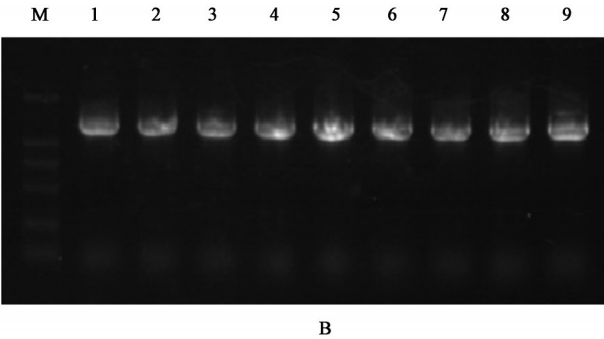
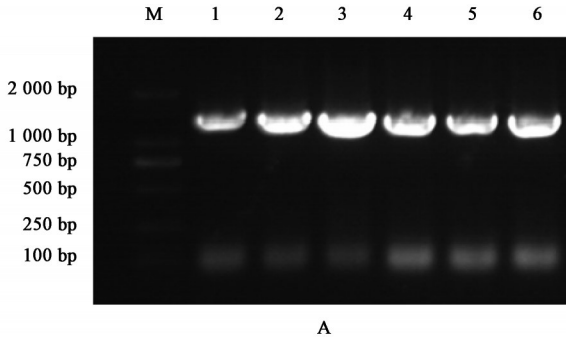


图1 丹参样品指纹谱

Fig. 1 Fingerprint of *Salvia miltiorrhiza* samples



M. Marker; A. *SmAACT* 基因 PCR; 1. NM3; 2. NM2; 3. SX2; 4. SX1; 5. SDB2; 6. SDB1; B. 菌液 PCR; 1. SDB3-1; 2. SDB3-2; 3. SDB3-3; 4. SDB2-1; 5. SDB2-2; 6. SDB2-3; 7. SDB1-1; 8. SDB1-2; 9. SDB1-3

图3 *SmAACT* 基因电泳检测

Fig. 3 Gel electrophoresis results of *SmAACT* gene

不同产地样品部分差异性位点,在第30,846,894,1032,1146,1212,1272等位点各样品具有明显的遗传分化趋势,遗传相似度达到99.38%。*SmAACT*的cDNA全长序列为1341bp,包含长度1212bp的完整ORF框,编码404个氨基酸残基,理论相对分子质量为41.3kDa,等电点为5.92,不稳定系数为29.10,是一个稳定蛋白。不同产地样本均具有能与其他所有产地相区分的特异基因型,其中脂溶性成分含量最低的内蒙古及河北样品在长度31bp处具有共同的特异性基因型A,含量最高的山东紫花样本在长度627,819,846bp处具有T-T-T基

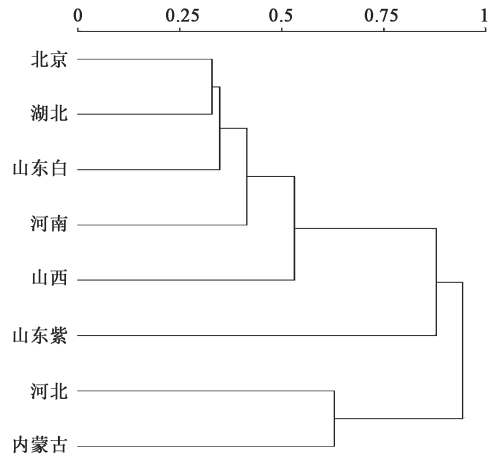


图2 不同产地丹参药材聚类分析

Fig. 2 System cluster analysis of *Salvia miltiorrhiza* from different regions

网站进行BLAST比对,其与王学勇所注册编号EF635969.1的丹参*SmAACT*基因cDNA序列相似度达到99%,证明已成功克隆得到基因cDNA全长。该基因包含完整的1212bp长度ORF框,编码404个氨基酸残基。

因型,这可能对丹参酮含量的多少的形成,具有一定的影响;产地基因型聚类中,野生品、普通栽培品、基地栽培样品显示出了一定的遗传距离,并与地理距离具有一定的关系。所得到的氨基酸序列中,SX1,SDB1样品发生了大范围的变异,并对蛋白结构和功能造成了一定影响,见表4~6,图4~6。

3.3 *SmCMK* 基因cDNA全长克隆及产地SNP分析

测序结果可靠无套峰。将双向测序结果采用Contig Express软件进行拼接,并将两端进行剪切后得到了1383bp的*SmCMK*基因cDNA全长序列,见图7。将此序列于NCBI网站进行BLAST比对,其

表4 *SmaACT*基因不同产地基因型特异性SNP位点

Table 4 Specific SNP number of *SmaACT* from different regions

基因型	31	162	246	375	543	627	681	819	846	869	894	942	1 032	1 146	1 209	1 212	1 272	1 301
AACTSX	G	G	A	G	T	C	A	C	A	G	A	A	C	C	T	C	A	T
AACTBJ	G	G	G	G	T	C	A	C	A	A	A	A	C	C	T	T	A	T
AACTHBH	A	G	A	A	A	C	A	C	A	A	A	A	T	C	T	T	A	T
AACTHN	G	G	A	G	T	C	G	C	A	A	A	G	T	C	T	C	T	T
AACTHUB	G	G	A	G	T	C	A	C	A	A	A	A	T	T	T	C	T	C
AACTNM	A	A	G	G	T	C	A	C	A	A	A	A	C	C	G	C	A	T
AACTSDZ	G	G	A	G	T	C	A	C	A	A	G	A	C	T	T	C	T	T
AACTSDZ	G	G	A	G	T	T	A	T	T	A	G	A	C	T	T	C	A	T

表5 *SmaACT*单氨基酸突变位点

Table 5 Amino acid mutation site of *SmaACT* from different regions

No.	突变样品	氨基酸突变位点	原始氨基酸	突变氨基酸
1	BJ1, HBH2, HBH3, NM2, NM3, SDB3, SX3	11	D	N
2	HUB1	21	E	G
3	BJ3	47	L	P
4	HN3	63	A	T
5	SDB2	79	F	L
6	NM1	158	S	F
7	NM3	171	K	E
8	BJ1	191	S	N
9	HUB2	205	A	V
10	SDB3	206	V	A
11	NM2	221	F	L
12	BJ2	234	R	G
13	SDZ1	254	K	E
14	HBH2	255	L	S
15	NM2	271	A	T
16	BJ2	280	G	D
17	SX3	290	Q	R
18	HUB2, NM1, SDZ3	296	G	R
19	HN3	316	F	L
20	SDZ2	334	E	K
21	HBH2	336	S	P
22	SDZ3	349	V	I
23	NM2	420	V	M

与王学勇所注册编号EF534309.1的丹参*SmCMK*基因cDNA序列相似度达到99%，证明已成功克隆得到基因全长。该基因包含完整的1 191 bp长度ORF框，编码397个氨基酸残基。

表6 *SmaACT*蛋白理化性质

Table 6 Physicochemical properties of protein of *SmaACT* from different regions

蛋白名称	氨基酸数/个	相对分子质量/Da	理论等电点	不稳定系数	脂肪系数	总平均亲水性
AACTSDZ1	403	41 275.2	5.92	29.10	99.06	0.195
AACTSX1	237	24 762.4	5.40	38.78	92.62	0.146
AACTSDZ1	116	12 077.7	8.93	54.47	87.50	0.009
AACTSDZ2	403	41 240.3	6.33	28.89	100.02	0.196
AACTNM1	403	41 433.5	6.61	28.89	99.06	0.193
AACTNM2	403	41 302.3	6.33	28.68	99.06	0.184

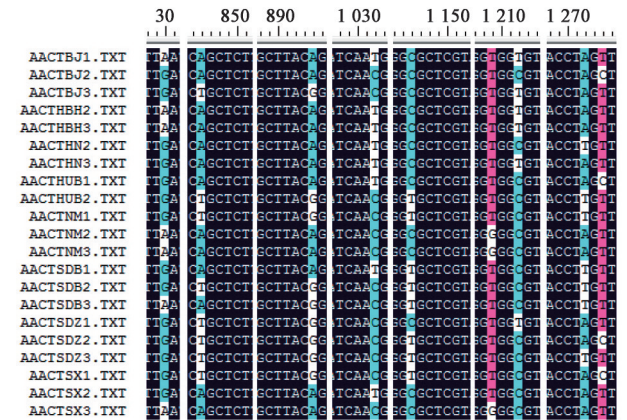


图4 不同产地丹参*SmaACT*基因cDNA序列比对

Fig. 4 Comparison of cDNA sequence of *SmaACT* in *Salvia miltiorrhiza* from different regions

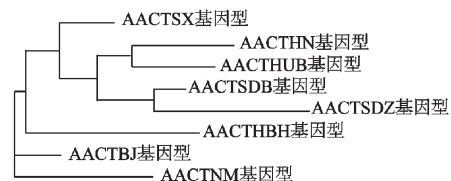


图5 *SmaACT*基因不同产地基因型聚类

Fig. 5 System cluster analysis of *Salvia miltiorrhiza* from different regions

```

AACTSX3_P.txt  G I A A C C A G . . . A F Z W E H T F V E V S G C R G P P S T I V D R L E G I G R F L A A K I R K I R 259
AACTSX1_P.txt  G I A A C C A G . . . A F Z W E H T F V E V S G C R G P P S T I V D R L E G I G R F L A A K I R K I R 254
AACTSX2_P.txt  G I A A C C A G . . . A F Z W E H T F V E V S G C R G P P S T I V D R L E G I G R F L A A K I R K I R 258
AACTSDB3_P.txt  G I A A C C A G . . . A F Z W E H T F V E V S G C R G P P S T I V D R L E G I G R F L A A K I R K I R 259
AACTSDB1_P.txt  C I V G I H S S R S E I R W E R H H H C C E R S W K V C C K V E A R T E E C N R W N C H S R 263
AACTSDB2_P.txt  G I A A C C A G . . . A F Z W E H T F V E V S G C R G P P S T I V D R L E G I G R F L A A K I R K I R 259
AACTNM3_P.txt  G I A A C C A G . . . A F Z W E H T F V E V S G C R G P P S T I V D R L E G I G R F L A A K I R K I R 259
    
```

图6 不同产地*SmAACT*氨基酸序列比对
Fig. 6 Comparison of amino acid sequence of *SmAACT* in *Salvia miltiorrhiza* from different regions

*SmCMK*的cDNA全长序列为1 383 bp,包含长度1 191 bp的完整ORF框,编码397个氨基酸残基,理论相对分子质量为43.4 kDa,等电点为6.41,不稳定系数为38.79,蛋白趋于不稳定。*SmCMK*在所检测的所有组织中都表达,但在叶片中表达较

强,茎中次之,根中最弱。在不同产地样品的cDNA序列中,第737,1 135,1 255,1 299位点处各产地样品具有明显的遗传分化趋势;不同产地样本具有能与其他所有产地相区分的特异基因型,其中脂溶性成分含量最低的内蒙古及河北样品,在长度737,1 256 bp处具有共同的C-G特异性基因型,含量最高的山东紫花及湖北样品的C-T和A-G-A-T基因型可能对高低丹参酮含量形成具有一定影响;产地基因型聚类结果表明遗传变异与有效成分积累具有一定的关系。翻译所得到的氨基酸序列差异不大,均为单氨基酸变异,可能对蛋白结构和功能造成一定影响。见表7~9,图8~10。

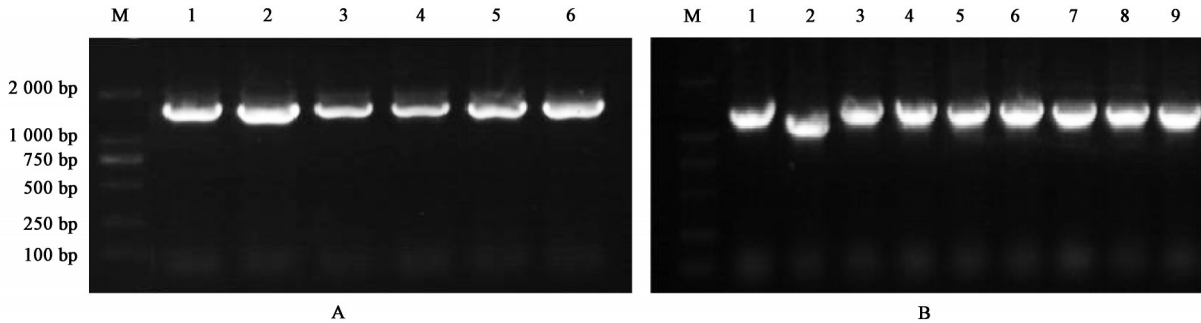


图7 *SmCMK*基因电泳检测
Fig. 7 Gel electrophoresis results of *SmCMK* gene

表7 *SmCMK*基因不同产地基因型SNP特异性位点

Table 7 Specific SNP number of *SmCMK* from different regions

基因型	88	139	146	418	731	737	929	1 032	1 125	1 136	1 195	1 200	1 239	1 256	1 275	1 299
CMKSX	T	C	A	A	T	T	C	G	T	G	A	A	T	G	C	A
CMKBJ	T	C	A	A	T	T	C	G	T	G	G	A	T	A	C	A
CMKHBH	A	T	A	A	T	C	C	G	T	C	A	A	T	G	C	A
CMKHN	T	C	A	A	T	T	C	G	T	G	A	A	T	A	C	G
CMKHUB	T	C	A	A	A	T	C	G	T	G	A	G	A	A	T	A
CMKMN	T	C	A	A	T	C	C	G	T	G	A	A	T	G	C	A
CMKSDB	T	C	A	G	T	T	C	A	C	G	A	A	T	A	C	A
CMKSDZ	T	C	C	A	T	C	T	G	T	G	A	A	T	A	C	A

3.4 *SmIPPI*基因cDNA全长克隆及产地SNP分析
测序结果可靠无套峰。将双向测序结果采用Contig Express软件进行拼接,并将两端进行剪切后得到了902 bp的*SmIPPI*基因cDNA全长序列。将此序列于NCBI网站进行BLAST比对,其与王学勇所注册编号EF635967.1的丹参*SmIPPI*基因cDNA序列相似度达到99%,证明已成功克隆得到基因全长。该基因包含完整的711 bp长度ORF框,编码237个氨基酸残基。见图11。

*SmIPPI*的cDNA全长序列为902 bp,包含711 bp长度的完整ORF框,编码237个氨基酸残基,理论相对分子质量为27.2 kDa,等电点为5.29,不稳定系数为27.87,是一个稳定蛋白。*SmIPPI*在所检测的所有组织中都表达,但在叶片和茎中表达较强,在根中表达较弱。在不同产地样品的cDNA序列中,在第319,381,492,531,564,652,655,697,884,897位点处各产地样品具有明显的遗传分化趋势;在产地特异性基因型中,内蒙古样品在243 bp处的

表8 *SmCMK*单氨基酸突变位点

Table 8 Amino acid mutation site of *SmCMK* from different regions

编号	氨基酸突变位点	突变样品	原始氨基酸	突变氨基酸
1	1	HN3	Y	L
2	3	HN3	L	A
3	4	HN3	L	F
4	13	SDZ3	S	P
5	23	SDB3	K	R
6	29	BJ2, HBH1, HBH3, NM3	F	Y/L
7	46	BJ2, HBH1, HBH3, SX2	S	L
8	48	BJ1, SDZ2, SDZ3	L	F
9	54	SDB2	S	P
10	69	SX3	T	I
11	81	NM3	E	G
12	90	SDB3	E	G
13	109	SDB3	N	D
14	114	SX3	I	V
15	139	SDB3	K	R
16	176	SX3	K	R
17	179	SX3	I	V
18	180	SDB3	D	G
19	256	HBH1	I	V
20	266	SX3	M	I
21	267	SX2	V	A
22	269	SX1	I	V
23	282	ZDZ3	K	R
24	287	NM3	N	S
25	312	SX2	V	I
26	344	NM2, SDB3	V	I
27	365	SDB3	V	A
28	375	SDB1	F	L
29	378	BJ2, HBH1, HBH3, NM3, SX3	E	D
30	392	SDZ3	E	G
31	396	SDB3	T	S
32	398	BJ1	E	G
33	400	HUB1, NM3, SX3	T	A/S

T基因型以及山东紫花样本在756 bp处的C基因型可能对高低丹参酮含量形成具有一定影响。但在产地基因型聚类中,遗传变异与地理距离及成分含量的相关性不明显。山西3号、山东白花3号和湖北1号等样品的氨基酸序列出现了较大范围的变异,可能会对蛋白结构和功能造成一定影响。见图12~14,表10,11。

表9 *SmCMK*蛋白理化性质

Table 9 Physicochemical properties of protein of *SmCMK* from different regions

蛋白名称	氨基酸数/个	相对分子质量/Da	理论等电点	不稳定系数	脂肪系数	总平均亲水性
CMKSDZ1	396	43 371.1	6.41	38.79	81.99	-0.285
CMKSDZ3	396	43 371.1	6.67	38.15	81.01	-0.283
CMKSX1	396	43 357.1	6.41	38.94	81.74	-0.286
CMKSDB1	396	43 365.1	6.41	39.01	82.98	-0.284
CMKSDB2	396	43 381.1	6.41	38.17	81.99	-0.287
CMKNM1	396	43 371.1	6.41	38.79	81.99	-0.285
CMKNM2	396	43 385.1	6.41	38.79	82.25	-0.284

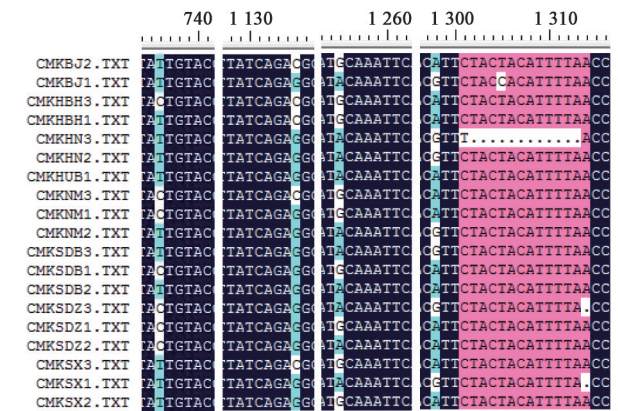


图8 不同产地丹参*SmCMK*基因cDNA序列比对

Fig. 8 Comparison of cDNA sequence of *SmCMK* in *Salvia miltiorrhiza* from different regions



图9 *SmCMK*基因不同产地基因型聚类分析

Fig. 9 System cluster analysis of *SmCMK* from different regions

3.5 基因特征性序列与脂溶性成分含量相关性 根据不同产地单株样品的有效成分含量高低,寻找不同基因序列中特异性SNP位点,并对具有特异性碱基及氨基酸序列样品进行分析,判断其与有效成分含量变化的相关性。

在2个脂溶性成分中,丹参酮II_A和隐丹参酮含量最高的均为SDZ1样品,而含量最低者均为NM2样品。SDZ1的*SmAACT*基因序列中,289,761,1000 bp处分别为A,G,A基因型,能与其他所有序列相区别,A-G-A基因型可能对丹参酮II_A高含量的形成具有一定贡献;NM2的*SmAACT*基因序列中,662,812,1259 bp处分别为C,A,A基因型,C-A-A

CMKBJ2_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKBJ1_P.TXT	KPNGSS	SFRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKHBH3_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKHBH1_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKHN3_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKHN2_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKHUB1_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKNM3_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKNM1_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKNM2_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSDB3_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSDB1_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSDB2_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSD23_P.TXT	KPNGSS	SFRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSD21_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSD22_P.TXT	KPNGSS	SFRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSX3_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSX1_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30
CMKSX2_P.TXT	KPNGSS	SLRKKIQSSRIHLIRATASDSTIGRKQLEVYVDL	30

图10 不同产地*SmCMK*基因氨基酸序列比对

Fig. 10 Comparison of amino acid sequence of *SmCMK* in *Salvia miltiorrhiza* from different regions

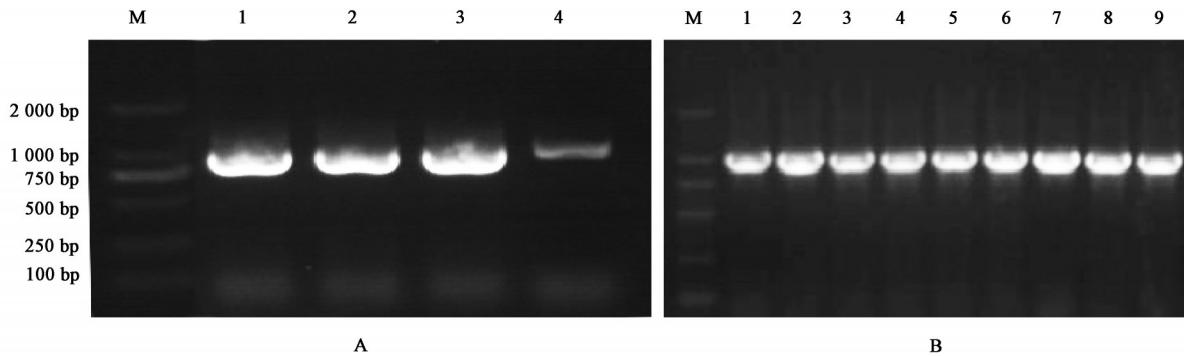
基因型可能对低含量的形成具有一定贡献。*SmCMK*基因序列中,SDZ1样品在929 bp处为T基因型,NM2基因在356 bp处为G基因型,能与其他所有序列相区分,可认为是高低含量特异性基因型。*SmIPPI*基因序列中,SDZ1样品在886 bp处为T基因型,NM2基因在97,454,837 bp处分别为G,C,G基因型,能与其他所有序列相区分,可认为是

该基因的高低含量特异性基因型。寻找引起脂溶性成分含量高低差异的不同基因SNP位点,并针对具有序列变异的样品进行追踪,有助于获得与有效成分合成相关的遗传特征。

4 讨论

近年来,随着DNA分子标记技术的快速发展,作为第三代分子标记技术,SNP检测技术在植物分类、鉴定和进化方面的研究越来越多^[8-11]。功能基因多态性与植物地理生态型密切相关,其对于研究不同产地药用植物的质量及分子机制具有重要意义。崔光红等^[12]对丹参*SmERF*基因进行SNP分析,发现不同产地样品具有产地特异的基因型,其中有5个位点在不同产地间均表现出显著差异,且聚类分析表明*SmERF*基因可按产地聚类,该基因有望作为丹参产地鉴别的标识基因。同时,CUI等^[13]通过对丹参毛状根中的*SmaACT*基因SNP分析,发现了33个多态位点,且表现出产地特异基因型,与丹参*SmERF*基因SNPs的研究结果一致。

此外针对ITS序列的等位基因特异PCR鉴别方法已经有了较为广泛的应用,通过在SNP位点设计



M. Marker; A. *SmIPPI*基因PCR; 1. HN3; 2. HN2; 3. HN1; 4. BJ1; B. 菌液PCR; 1. HN3-1; 2. HN3-2; 3. HN3-3; 4. HN2-1; 5. HN2-2; 6. HN2-3; 7. HN1-1; 8. HN1-2; 9. HN1-3

图11 *SmIPPI*基因电泳检测

Fig. 11 Gel electrophoresis results of *SmIPPI* gene

表10 *SmIPPI*基因不同产地基因型SNP特异性位点

Table 10 Specific SNP number of *SmIPPI* from different regions

基因型	177	243	318	381	465	492	531	564	651	654	696	756	881	894
IPPISX	C	C	C	A	T	A	T	G	T	T	A	G	A	-
IPPIBJ	C	C	C	G	T	A	T	A	G	T	A	G	A	T
IPPIHBH	T	C	C	G	T	A	T	A	T	T	G	G	A	T
IPPIHN	C	C	C	G	C	A	T	G	G	C	A	G	A	T
IPPIHUB	C	C	C	A	T	A	T	G	T	T	G	G	-	-
IPPINM	C	T	C	G	T	G	C	G	G	C	A	G	A	T
IPPISDB	C	C	T	G	T	G	C	A	G	C	A	G	-	T
IPPISDZ	C	C	C	A	T	G	T	G	G	C	A	C	A	T

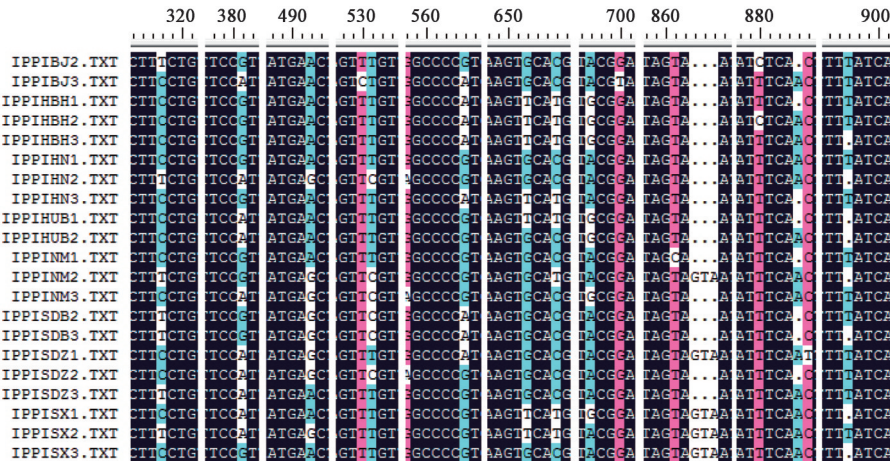


图12 不同产地丹参*SmIPPI*基因cDNA序列比对

Fig. 12 Comparison of cDNA sequence of *SmIPPI* in *Salvia miltiorrhiza* from different regions

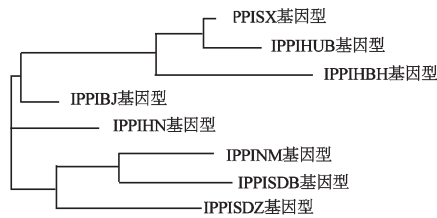


图13 *SmCMK*基因不同产地基因型聚类

Fig. 13 System cluster analysis of *SmCMK* from different regions

特异性引物,能够快速准确地鉴别人参和西洋

参^[14]、白苏和紫苏^[15]、半夏和虎掌南星^[16]等。本课题组前期研究发现功能基因 *SmAACT*, *SmCMK*, *SmIPPI* 的表达量与丹参酮成分的积累密切相关^[17]。本研究结合 HPLC 指纹图谱和功能基因的 SNP 分析,不仅获得了不同产地丹参的特异基因型,同时还获得了丹参有效成分高低含量的特异基因型。本研究在对 *SmAACT*, *SmCMK* 和 *SmIPPI* 基因 SNP 分析时分别发现 18, 16, 14 个多态位点,其中在



图14 不同产地*SmIPPI*基因氨基酸序列比对

Fig. 14 Comparison of amino acid sequence of *SmIPPI* in *Salvia miltiorrhiza* from different regions

表11 *SmIPPI*蛋白理化性质

Table 11 Physicochemical properties of protein of *SmIPPI* from different regions

蛋白名称	氨基酸数/个	相对分子质量/Da	理论等电点值	不稳定系数	脂肪系数	总平均亲水性
IPPISDZ1	236	27 191.1	5.29	27.87	94.53	-0.302
IPPIHN2	236	27 165.0	5.36	27.87	94.53	-0.310
IPPISX1	151	17 172.5	5.17	41.47	88.48	-0.240
IPPISDB2	236	27 191.1	5.29	27.87	94.53	-0.302
IPPIHBH2	228	25 847.4	5.13	32.70	99.56	-0.304
IPPIHUB2	234	26 845.6	5.20	26.03	90.34	-0.311

SmA ACT 基因序列第 30, 846, 894, 1 032, 1 146, 1 212, 1 272 位点处, *SmCMK* 基因序列的 7, 1 135, 1 255, 1 299 位点处, *SmIPPI* 基因序列的第 319, 381, 492, 531, 564, 652, 655, 697, 884, 897 位点处, 不同产地的丹参均表现出明显的遗传分化趋势。

药材质量形成的本质与药材的表型、遗传背景及环境三者有关^[18-20]。其中药效成分是决定药材质量的重要因素, 药效成分大都属于植物次生代谢产物^[21-23]。药用植物体内, 次生代谢产物的形成由关键基因和酶来调控。本实验中的 3 个基因中, *SmA ACT* 是甲羟戊酸(MVA)代谢途径中的起始酶^[24], *SmCMK* 基因为丙酮酸/磷酸甘油醛(DXP)次生代谢途径上的唯一激酶^[25], 王学勇^[26]从丹参毛状根中克隆得到其 cDNA 的序列, 并发现其与丹参酮的合成有关。*SmIPPI* 是萜类化合物生物合成过程中的核心酶^[26]。

本实验通过研究不同产地丹参功能基因 SNP 位点, 获得了不同产地丹参特异基因型。同时, 产地特异性基因型比对结果表示多数产地样本均能与其它所有产地相区分的特异基因型, 并与成分积累具有一定相关性。未来可以对丹参功能基因进行更加深入地研究, 扩大取样范围及样本量, 关注更多丹参酮合成途径的关键酶, 同时将代谢产物与终产物相联系, 形成“基因 SNP-酶活性差异-代谢中间产物差异-代谢终产物差异-药材质量差异-产地特异性品质”这一条完整的研究路线。将有助于诠释生物合成途径中的各环节对丹参酮类有效成分积累的调控机制, 为药材特异品质的形成奠定理论基础, 为优良品种选育提供依据, 也为利用生物技术提高目标成分含量或直接生产有效成分及中间体带来广阔的应用空间。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] WANG L L, MA R F, LIU C Y, et al. *Salvia miltiorrhiza*: a potential red light to the development of cardiovascular diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(7):1077-1097.
- [2] MA X H, MA Y, TANG J F, et al. The biosynthetic pathways of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Molecules*, 2015, 20(9): 16235-16254.
- [3] 王志强, 许娟, 赵志红, 等. 不同产地丹参药效组分变化规律研究[J]. *天津中医药大学学报*, 2020, 39(1): 92-97.

- [4] 张营. 不同产地丹参化学成分的含量差异性比较研究[J]. *广东化工*, 2019, 46(17):45-46, 77.
- [5] 张晓恒, 马雪红, 张钰菁, 等. 不同产地丹参的质量对比研究[J]. *中医药导报*, 2019, 25(17):33-36, 41.
- [6] 王阳, 卢虹, 黄镇, 等. 油菜查尔酮异构酶基因的克隆及 SNP 分析[J]. *华北农学报*, 2018, 33(1):102-108.
- [7] 周晓丽, 刘春生, 黄璐琦, 等. 传统道地产区与非道地产区丹参有效成分含量比较[J]. *北京中医药大学学报*, 2011, 34(3):193-196.
- [8] WANG H T, HAO N, CHEN L, et al. Development of intron polymorphism markers in major latex-like protein gene for locality-level and cultivar identification of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Springerplus*, 2016, 5(1):1-6.
- [9] CHEN X C, LIAO B S, SONG J Y, et al. A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding [J]. *Gene*, 2013, 530(1):39-43.
- [10] DOH E J, KIM J H, LEE G. Identification and monitoring of Amomi Fructus and its adulterants based on DNA barcoding analysis and designed DNA markers [J]. *Molecules*, 2019, 24(22):4193.
- [11] JIANG W J, REN L, GUO M Y, et al. Detecting *Schisandrae Chinensis* Fructus and its Chinese patent medicines with a nucleotide signature [J]. *Genes*, 2019, 10(5):11.
- [12] 崔光红, 冯华, 李文渊, 等. 丹参 ERF 基因组序列克隆与多态性分析[J]. *药学学报*, 2010, 45(9): 1188-1193.
- [13] CUI G H, WANG X Y, FENG H, et al. Molecular cloning and SNP analysis of a acetyl-CoA C-acetyltransferase gene (*SmA ACT*) from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 45(6):785-790.
- [14] 宋沁馨, 冯芳, 张心悦, 等. SNP 测定结合芯片电泳法快速鉴别人参和西洋参[J]. *药物分析杂志*, 2009, 29(1):1-5.
- [15] 罗玉明, 张卫明, 丁小余, 等. 紫苏属药用植物的 rDNA ITS 区 SNP 分子标记与位点特异性 PCR 鉴别 [J]. *药学学报*, 2006, 41(9):840-845.
- [16] 崔光红, 唐晓晶, 黄璐琦, 等. 利用等位基因特异 PCR 鉴别虎掌南星及其部分混淆品[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(10):1109-1111.
- [17] 李贝宁, 周晓丽, 黄璐琦, 等. 不同产地丹参功能基因表达水平对丹参酮类成分积累的影响[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(24):3406-3409.
- [18] 董娟娥, 张康健, 梁宗锁. 植物次生代谢与调控[M]. 杨凌:西北农林科技大学出版社, 2009:12.

- [19] LI Y Z, XIE Y, HE Y F, et al. Quality markers of traditional Chinese medicine: concept, progress, and perspective[J]. *Engineering*, 2019, 5(5): 888-894.
- [20] MA H L, QIN M J, QI L W, et al. Improved quality evaluation of *Radix Salvia miltiorrhiza* through simultaneous quantification of seven major active components by high-performance liquid chromatography and principal component analysis[J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(9): 931-939.
- [21] WANG J, KONG H W, YUAN Z M, et al. A novel strategy to evaluate the quality of traditional Chinese medicine based on the correlation analysis of chemical fingerprint and biological effect [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2013, 83: 57-64.
- [22] 尉广飞, 李翠, 李佳, 等. 丹参药材质量主要影响因素研究概况[J]. *山东中医药大学学报*, 2015, 39(5): 476-480.
- [23] AHARONI A, GALILI G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 22(2): 239-244.
- [24] 朱响昊, 苏秀红, 董诚明, 等. 冬凌草 AACT 基因的克隆与表达分析[J]. *中药材*, 2016, 39(1): 37-41.
- [25] RAMOS-VALDIVIA A C, VAN DER HEIJDEN R, VERPOORTE R. Iso-pentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis: a review of its biochemistry and function [J]. *Nat Prod Rep*, 1997, 14(6): 591-603.
- [26] 王学勇, 崔光红, 黄璐琦, 等. 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[J]. *药学学报*, 2008(12): 1251-1257.
- [责任编辑 顾雪竹]

·书讯·

优质护理在预防妊娠期糖尿病孕产妇并发症中的应用 ——评《实用内分泌与糖尿病护理实践》

妊娠期糖尿病是指女性在怀孕之后发生的血糖代谢异常性疾病,在病理产科中较为常见,其在临床的发生率约为 3.5%。高水平血糖会导致孕产妇及胎儿发生多种并发症,如早期流产、妊娠高血压、胎儿巨大、胎儿宫内发育不良、新生儿窘迫等,这些并发症严重危害孕产妇及胎儿的健康。

《实用内分泌与糖尿病护理实践》作者侯晶岩,吉林科学技术出版社 2019 年出版。作者借鉴国内外最新内分泌代谢病护理技术,在介绍内分泌代谢疾病护理的基础知识、专科操作、内分泌试验的基础上系统的阐述了内分泌代谢病常见疾病的护理和患者的健康教育,同时记录了编者在护理工作中的思维、判断、决策和实施护理的过程。

本书共分为四部分内容,介绍了临床常见内分泌疾病的护理,第一部分内容为内分泌代谢病护理概况,内分泌疾病涉及多个腺体,疾病谱包括糖尿病、肥胖、甲状腺、垂体、肾上腺、骨代谢、内分泌性高血压、性腺疾病等经常涉及与多个学科的合作,如神经外科、泌尿外科、普外科、骨科、心外科等。第二部分内容为内分泌代谢病症状护理,包括低血糖、高血压、乏力、肥胖等相关症状的护理。第三部分内容为内分泌系统疾病的护理,包括腺垂体功能减退症、甲状腺相关疾病、肾上腺相关疾病等患者的护理等。第四部分内容为内分泌系统疾病患者的健康教育,包括下丘脑及垂体疾病、甲状腺疾病、肾上腺疾病等。全书内容涵盖了内分泌的概述、临床表现、健康评估等方面的内容。书中主要介绍了优质护理在预防妊娠期糖尿病孕产妇并发症中的应用效果,具体护理如下,①情绪护理:首先为孕产妇提供安静、舒适的住院环境,保持病房的干净、整洁,注意空气流通,充分保证孕产妇有良好睡眠;护理人员要积极主动的与孕产妇进行沟通、交流,介绍顺利生产的案例来鼓舞其乐观面对,当孕产妇出现情绪低落时,可以利用音乐疗法来帮助其释放心中压力。同时,要与家属尤其是其丈夫进行良好沟通,让家人多支持、关爱、理解孕产妇,家人的态度是孕产妇最好的心灵良药。此外,在护理工作人员的陪同下做适度运动,不仅有利于血糖的稳定,而且能缓解孕产妇的情绪,提高其自信心。②疾病知识健康教育:向妊娠期糖尿病孕产妇及家人详细讲解有关妊娠期糖尿病的防治知识,重点讲述血糖控制的重要性与必要性,讲解如何有效的进行血糖控制,并要求孕产妇及家人要积极配合医护人员的治疗及护理。③膳食指导:合理膳食是血糖控制的关键,不仅要保证孕产妇有充足的营养补给,而且还要兼顾着血糖控制,因此,护理人员要针对不同病情的妊娠期糖尿病孕产妇及家人制定合理的食谱,帮助其合理膳食,避免不良情况的发生。④严密监测:要对母亲及胎儿的各项情况进行严密监测,如孕产妇的体质量、血糖、糖化血红蛋白及胎儿心率、有无宫内窘迫等,一旦出现异常,要及时进行处理。

《实用内分泌与糖尿病护理实践》编写浅显易懂,内容新颖丰富,密切结合护理实际情况,详细介绍了实用内分泌与糖尿病护理实践的护理要点,使全书兼备实用性、针对性及完整性。适合广大护理同仁阅读,尤其适用于临床一线护士、基层专科医生及对内分泌专科知识感兴趣的医护人员及学生阅读。

(作者韦迪霞,代霖虹,孙翠娥,陆舒,王三丽,桂贵婧,海南省三亚市人民医院产科,海南 三亚 572000)