

丹参转录因子 *SmbHLH93* 的克隆及表达模式分析

周宏骏, 武玉翠, 晋鑫鑫, 饶丽华, 王喆之*

陕西师范大学生命科学学院, 教育部药用资源与天然药物化学重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西 西安 710062

摘要: 目的 克隆丹参碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)类转录因子 *SmbHLH93*, 并初步探究该基因的功能。方法 采用 PCR 和 RT-PCR 技术分别从 DNA 和 cDNA 水平克隆得到了 *SmbHLH93* 基因, 进一步通过 BD Walking 获得了该基因的 5' 启动子区。生物信息学分析 *SmbHLH93* 蛋白的理化性质、结构特点和系统进化关系。结合启动子区分析软件和 qPCR, 研究 *SmbHLH93* 在丹参不同部位和环境诱导下的表达模式。结果 获得 *SmbHLH93* 基因序列 954 bp 和 5' 启动子区 1 583 bp, 其中开放阅读框(ORF) 657 bp, 有 3 个内含子和 4 个外显子, 编码 218 个氨基酸, 含有 bHLH 和 ACT_UUR-ACR-like 结构域, 无跨膜区域, 可能定位于细胞核。表达模式分析结果显示该基因的表达量在根中最高, 茎中最低, 且随着花的形成逐渐降低。光和低温诱导 *SmbHLH93* 的高表达, 而水杨酸(SA)抑制其表达。结论 克隆得到丹参 bHLH 类转录因子新成员 *SmbHLH93*, 初步预测其参与了丹参花的发育过程和丹参次生代谢途径的调控。

关键词: 丹参; *SmbHLH93*; 基因克隆; 生物信息学; 表达模式分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)23-3449-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.23.018

Cloning and expression pattern analysis of transcription factor *SmbHLH93* from *Salvia miltiorrhiza*

ZHOU Hong-jun, WU Yu-cui, JIN Xin-xin, RAO Li-hua, WANG Zhe-zhi

Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: **Objective** To clone and characterize a basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor *SmbHLH93* from *Salvia miltiorrhiza*, and to predict its probable function. **Methods** *SmbHLH93* was cloned by PCR and RT-PCR from genomic DNA and cDNA, while its 5' promoter region was cloned by BD Walking. Analysis on physico-chemical property, structure characteristic, and phylogenetic relationships of *SmbHLH93* protein was carried out by bioinformatic method. Gene expression in different organs and inducing conditions was detected by qPCR. **Results** Gene sequences of *SmbHLH93* (954 bp) were obtained, including three introns and four exons, and the open reading frame was 657 bp, encoding 218 amino acids. Its promoter region had 1 583 bp nucleotides. The putative *SmbHLH93* protein contains bHLH and ACT_UUR-ACR-like domains, without transmembrane helices, and located in the nucleus. The gene expression was highest in roots and lowest in stems. With the development of flowers, its expression decreased gradually. Light and low temperature could induce high expression of *SmbHLH93*, while salicylic acid (SA) inhibited its expression. **Conclusion** A new member of bHLH transcription factor, *SmbHLH93*, is cloned from *S. miltiorrhiza*, and it could be involved in the development of flower and regulation of secondary metabolic pathways in *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; *SmbHLH93*; gene cloning; bioinformatics; expression pattern analysis

bHLH 转录因子包含高度保守的碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构域, 普遍存在于各种真核生物中, 且在生命活动中发挥多种功能^[1]。研究表明, 这类转录因子在动物中调节神

收稿日期: 2014-04-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31270338); 陕西省科技厅科技计划项目(2012K19-02-04); 陕西学前师范学院基金(2014QNKJ078, 2014QNKJ079)

作者简介: 周宏骏(1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药生物技术。Tel: 18392154594 E-mail: zhouhongjunx@163.com

*通信作者 王喆之, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物资源和植物分子生物学研究。

Tel: (029)85310260 E-mail: zzwang@snnu.edu.cn

经、肌肉和心脏的发育；在酵母中调控磷吸收和糖酵解途径；在植物中参与表皮分化、响应环境胁迫或调控次生代谢^[2-4]。植物 bHLH 家族成员数量众多，是被子植物中的第二大类转录因子^[5]，迄今为止在拟南芥中发现了 147 个，水稻中 167 个^[6]。

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科多年生草本植物，以其干燥根及根茎入药，是我国常用的道地药材之一，用于治疗心脑血管疾病、乳腺癌和肝炎等^[7-10]。之前的转录组 (SRX021907) 研究显示，丹参中有 76 个 bHLH 类转录因子^[11]，这些转录因子很可能参与丹参生长发育和次生代谢的调控过程。目前，bHLH 类转录因子在拟南芥中研究较多，而在丹参中只克隆得到了 *SmbHLH1*。本研究从丹参转录组中得到了 1 条 bHLH 类转录因子的 unigene，以此为基础克隆获得 *SmbHLH93* 基因及其 5' 启动子区。对启动子区、蛋白质的结构性质和系统进化等进行生物信息学分析。研究该基因在不同部位以及不同处理条件下的表达模式。根据分析结果初步预测了 *SmbHLH93* 的功能，为进一步深入研究该基因奠定基础，为今后该领域的研究提供了新的理论依据。

1 材料与试剂

丹参种子采购于陕西天士力植物药业商洛有限公司商州药源基地，发育至开花阶段后经由陕西师范大学植物组田先华教授鉴定，为中药丹参的药源植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge。种子在含有土与蛭石 (1:1) 的基质中萌发，于人工气候箱内培养 (RXZ 型—500D，宁波)，光照强度 8 000 lx，光周期为光照 16 h/黑暗 8 h；温度 (25±2) °C，湿度 48%。培养 60 d 的丹参幼苗用于各种胁迫处理。500 μmol/L 水杨酸 (SA)、8 °C 的低温、黑暗 3 d 后持续光照处理丹参幼苗，其他条件不变。取培养 2 年的丹参的根、茎、叶和花，花分为 3 个时期取材：花苞刚刚形成 (F-I 期)、花瓣明显成型但未绽开 (F-II 期)、花盛开 (F-III 期)。所有材料经液氮速冻，-80 °C 保存，用于提取总 RNA。

DNA、质粒、RNA 提取和胶回收试剂盒 (购自 OMEGA)；2×Taq Master Mix (购自西安润德生物技术有限公司)；pMD19-T simple vector、LA Taq 酶、SYBR® Premix Ex Taq II、PrimeScript® RT reagent Kit (购自 TaKaRa)。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。*Escherichia coli* DH5α 为本实验室保存。

2 方法

2.1 *SmbHLH93* 基因以及启动子区的克隆

提取培养 60 d 的丹参幼苗的 DNA 和 RNA。用 PrimeScript® RT reagent Kit 将 RNA 反转录为 cDNA。根据丹参转录组数据库中 Unigene9499_danshen 片段，经电子克隆得到 *SmbHLH93*。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 *SmbHLH93F* 和 *SmbHLH93R* (表 1)，在 gDNA 和 cDNA 水平上进行 PCR 和 RT-PCR，获得该基因的 DNA 全长和开放阅读框 (ORF)。反应程序为 95 °C 预变性 3 min；94 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，30 个循环；72 °C 复性 10 min。在全长序列的基础上设计引物 GSP1、GSP2、GSP3 和 GSP4 (表 1)，联合接头引物 AP1 和 AP2，通过 BD Genome Walker™ DNA walking^[12] 获得 5' 启动子区。回收产物连接至 pMD19-T simple vector，转化 DH5α，筛选阳性克隆送至华大基因进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')
<i>SmbHLH93F</i>	ATGTCAATTCCTTCCTCGACGG
<i>SmbHLH93R</i>	TTACAAACATCTCCCTCCGTAGCCT
GSP1	CCAAACCCAGATTTCAACC
GSP2	GACCTCATCTCGCCGCCCGAATT
GSP3	GCAGGATCGAACTTGAAAGCTGATGAGC
GSP4	CAAAAAGCAGTCGAATTAATTTGGGAGCCA
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
RTb93F	GCCGAAGATTAGCAAGATG
RTb93R	CCTTGAAGTAGTTCCGAATG
ActinF	AGGAACCAACCGATCCAGACA
ActinR	GGTGCCCTGAGGTCTGT

2.2 *SmbHLH93* 基因序列和蛋白的生物信息学分析

用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 DNASTar 寻找 ORF 并翻译。通过 GSDS 在线工具 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>) 分析 *SmbHLH93* 的基因结构。采用 ExPASy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析蛋白质的理化性质；ExPASy-ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质的亲疏水性；TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白质的跨膜结构域；SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 分析蛋白质的二

级结构; SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 分析蛋白质的三维立体结构; TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 和 NucPred (<https://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/>) 分析蛋白质的亚细胞定位。运用 PlantProm-TSSP (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析启动子区的顺式作用元件以及预测转录起始位点。多重序列相似性比对由 ClustalX2 和 ExPASy-BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) 完成。通过 MEGA4.0 邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统树。

2.3 *SmbHLH93* 的表达模式分析

提取不同部位和各种处理的 RNA, 用 PrimeScript[®] RT reagent Kit 反转录得到 cDNA, 作为实时荧光定量 PCR 的模板。内参为丹参持家基因 β -actin (DQ243702.1)。设计引物 RTb93F、RTb93R、ActinF 和 ActinR (表 1), 检测 *SmbHLH93* 在不同部位和各种处理下的表达量。qPCR 反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 50 个循环。每个样品重复 3 次。运用比较 C_t 值的 “ $\Delta\Delta C_t$ ” 法对定量数据进行计算处理分析, 样品间的差异显著性则通过 SPSS13.0 软件进行分析。

3 结果与分析

3.1 *SmbHLH93* 基因的克隆和分析

根据设计的全长引物扩增获得 *SmbHLH93* 序列 954 bp。用 BLAST 和 DNASTar 比对分析, 发现该基因 ORF 全长 657 bp, 有 4 个外显子, 3 个内含子 (图 1)。

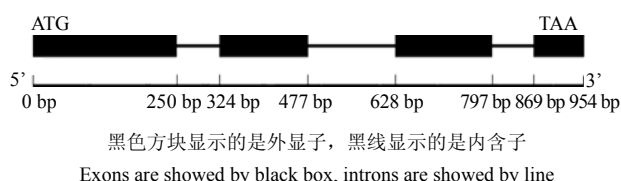


图 1 *SmbHLH93* 的基因结构示意图

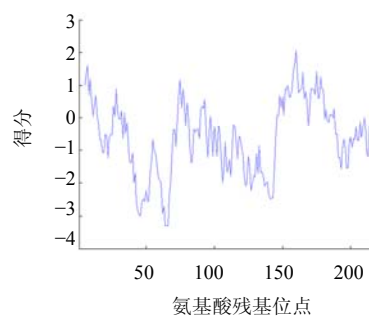
Fig. 1 Structure of *SmbHLH93* gene

3.2 蛋白质结构预测和分析

SmbHLH93 基因编码 218 个氨基酸。通过 NCBI 对序列的保守区进行分析, 发现该序列含有 Helix-loop-helix 保守结构域, 并且具有与 DNA 的 E-box/N-box 结合的特殊位点, 初步认定该基因编码的是 bHLH 家族蛋白。进一步 BLAST 比对后发现该

基因与拟南芥等物种的 bHLH93 蛋白相似度较高, 故将其编码基因命名为 *SmbHLH93*。此外, *SmbHLH93* 蛋白还具有 ACT_UUR-ACR-like 结构域, 属于 ACT 超家族。

采用 ExPASy-ProtParam 分析蛋白质理化性质, 相对分子质量为 24 860, 理论 pI 为 8.43, 是碱性蛋白质。带负电荷的残基 (Asp+Glu) 总数 32, 带正电荷的残基 (Arg+Lys) 总数 35。不稳定指数 57.56, 是不稳定蛋白, 其半衰期在体外的哺乳动物网状细胞中为 30 h, 酵母体内大于 20 h, 大肠杆菌体内大于 10 h。运用 ExPASy-ProtScale 预测该蛋白为亲水性蛋白 (图 2)。用 SOPMA 软件预测 *SmbHLH93* 蛋白的二级结构, 表明该蛋白含有 119 个 α 螺旋, 占 54.59%; 27 个延伸链, 占 12.39%; 11 个 β 转角, 占 5.05%; 61 个无规卷曲, 占 27.98%。对三级结构预测中, SWISS-MODEL 分析得到该基因氨基酸序列 59~102 的 44 个残基形成了 helix-loop-helix 典型的 U 型结构。通过 TMHMM 软件分析得知, 该编码蛋白质无跨膜区域, 全部位于膜外。亚细胞定位预测结果表明, 该蛋白可能定位于细胞核, 不定位



纵坐标正值为疏水, 负值为亲水

On ordinate, positive value indicates hydrophobicity, while negative value indicates hydrophilicity

图 2 *SmbHLH93* 蛋白的亲疏水性分析

Fig. 2 Hydrophobicity and hydrophilicity analysis on *SmbHLH93* protein

3.3 启动子区的克隆及分析

BD Walking 获得起始密码子上游 1 583 bp 的 5' 侧翼序列。通过在线预测软件 PlantProm-TSSP 和 PlantCARE 分析获得的启动子区 (图 3), 发现转录起始位点 (transcription initiation site, TIS) 位于 ATG 上游 325 bp 处, 定位为 “+1”。在 TIS 上游存在多个 CAAT-box, 并且在 -22 bp 处存在一个 TATA-box, -1 198 bp 处还存在一个启动增强子。该基因包含多

CGACGGCCCGGGCTGGTAAACAAATCAAAATTTAAATTAGAAATATAT
 ATATATATATAAATTATAAAAAATTAATCAATTTCCCCACCACCCCGG
 AGCCCCAAACCAACCCGACCGATGCCACCCATTCTTTGTAGCAGCAAC
 CCGAATAAATCAACAAGGATTCATCTTTACTCTTTAGTATAGCAGAACGTT
 TTAGTCATATTTTGAAGTCGGGTTTTTTTTTTTTTTTCTCGCGCGCAA
 TTAATAAATTTTCAACGAGGCGGGGTGCTAGCGCGCGCACAGCGCAAC
 TTGCTGCATCGAGGCGGCACGTCCCCGGCTGTGGATGCTCTAAGAAGGCT
 TAATTAGATAGTCATGATGTGATGTGTATATATGTTGGTAGCATAA
 AAATGAAAGAAATTCATGTGCTCTTCTCTGTTGCAATCTCTTC
 TTTTAAATACGCACGGTTCCGAACACAAAACAAAAGAGACATAATAAT
 CACTGAATAGTTAAAGGGTACACCTAAACAGTAGTTAAAATAAAAC
 AAAAAATGAATTACCGAAGCAGCTGCAGCATTACTAACCTTTTCCGAAA
 AAGAAAATCAACTTTTGCAGGATCGAACTTGAAAGCTGATGAGCATCT
 ATCGGTATCCGGATCCATAAACCCATTAAATTAATTAATTAATTTGTTAT
 CCAATCACC AAAAGCAGTCGAATTAATTTGGGAGCAATTAATTACAAA
 GGAAAAGACAAATACAGGTACATGTTGCCAACACTGAAGATGGTGATTC
 ATATTTATGCCAAAGAAAAATAGATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
 CAAAAAGAAAAAGAGTCACAAATATAATTTATTTGATACTTATTAAT
 GTGTGAATCTGCAGTCTCAATGCTAGCTTAAACCTTTTCGTTTAGACAG
 ATTTGTGGGTCAAACCTCTCATCTGTAACGCGACTTATAAGAATGTGAAC
 CCTCTCTGCTTTCAGATTTTCGGTGCTTTTCAAAATTAATTAATTAATTAAT
 GATGTGTACACGAGCTCACCTTCAAGTGTGTGGAAATTAATAATGAAAA
 CTGGGCGCCATTAGATTACTATAATTTATAATACTACTAATAAACAGGATT
 TAATTTCAAGCCCTCTAGGTTTTATTTACACAAGTCACAAATAGCTAGGTA
 ATTAATCTCTTACATAATCATCTTATATATAATTTCTTCCACTCCCAACAA
 AATTCTACCTAGCCTTCTTGTAAATCTAGAGAGAGAAATGGAGCAGCTTA
 CTCAACACAGTAGTCTCTTAGAGGAGCTAATCATGCCTCCAAAGATAGAG
 TCCTCTTCTCTACCGAATCTTCCAAAACACTTGGAACCTCACTCCTTTCG
 ACCAAACCCAGATTTCAACCTACCATTACAAATCCTTCGCTCCTCGACC
 TCATCTCGCCGCCGAATTCGCCACCCCTTGCCCTTGGGCGAATTCATC
 CCTTTCTCGACGCCCTTGCTCGCCGACTTCGGATCCTTGTACGACAGGG
 ACGATCTGCCGCCAATG

转录起始位点标记为“+1 TIS”，顺式作用元件用阴影、下划线或方框表示

Transcription initiation site is marked as +1 TIS and cis-acting elements are shadowed, underlined or framed

图 3 *SmbHLH93* 基因 5'启动子区序列分析

Fig. 3 Sequence analysis of 5' promoter region of *SmbHLH93* gene

个顺式作用元件，其中与光调控相关的最多，有 BOX4、G-box、Sp1 等。还存在 GA₃ 响应元件 GARE-motif，低温响应元件 LTR，SA 响应元件 TCA-element、缺氧响应元件 GC-motif 等。

3.4 同源性分析和系统发育比较

采用 MEGA4.0 构建系统进化树（图 4）。目前，bHLH93 基因被研究发现的并不多，而在有限的被发现的物种中 *SmbHLH93* 与 *AtbHLH93* (NP_569014.1)、*MtbHLH93* (XP_003603699.1)、*TcbHLH93* (EOY15558.1) 同源性最高。与拟南芥其他 bHLH 转录因子的同源性也较高，其中与花粉发育相关基因 *AtDYT1* (NP_193864.1) 和 *AtAMS* (NP_179283.2) 的亲缘关系最近。*SmbHLH93* 氨基酸序列与 *MtbHLH93*、*TcbHLH93*、*AtbHLH93*、

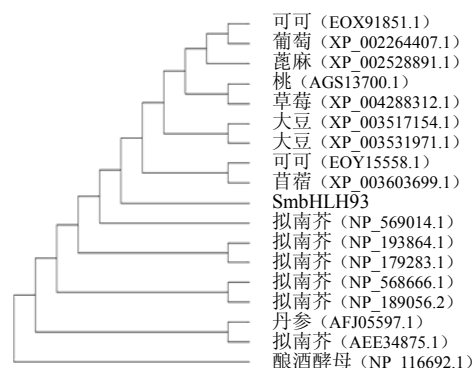


图 4 *SmbHLH93* 与其他物种 bHLH 类转录因子的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *SmbHLH93* with bHLH transcription factors from other species

GmbHLH93-like 亚型 I (XP_003531971.1) 和亚型 XI (XP_003517154.1) 相似度很高, 为 69%、69%、66%、68% 和 69%。对以上序列和功能可能相关的拟南芥 bHLH 转录因子 AtAMS 和 AtFAMA (NP_172746.2) 进行多重序列比对 (图 5)。与其他物种的 bHLH93 氨基酸序列进行比对, 发现该蛋白在 bHLH 结构域和 C 端非常保守。虽然与

AtAMS 和 AtFAMA 的整体相似度只有 30% 和 45%, 但 bHLH 结构域的一致性很高, C 端也有较高相似性。根据比对结果, 以及参考植物 bHLH 分类图^[13], SmbHLH93 更接近于 bHLH 家族的亚型 I 或者亚型 XI。

3.5 不同部位以及花的不同发育阶段表达特异性

qPCR 分析 SmbHLH93 在不同部位的表达, 结

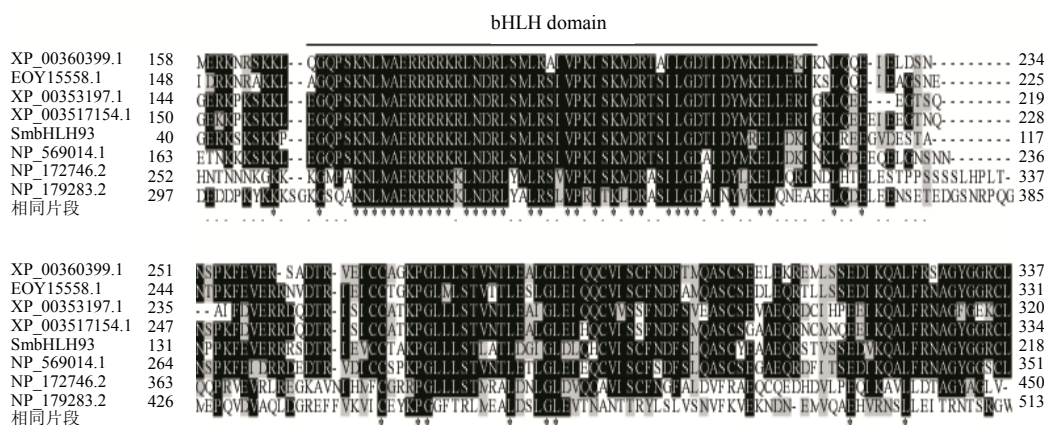


图 5 SmbHLH93 蛋白与其他物种 bHLH 类转录因子相似性分析

Fig. 5 Similarity analysis of SmbHLH93 protein and bHLH transcription factors from other species

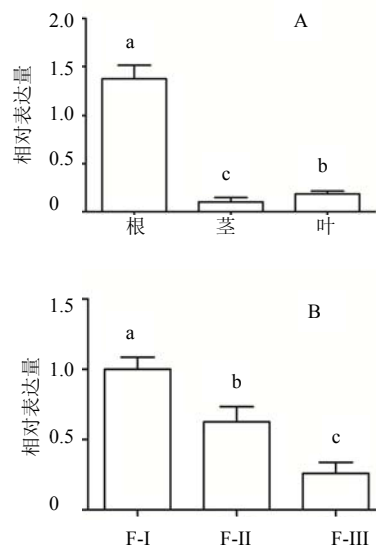
果显示该基因在根、茎、叶、花中均有表达。其在根中的表达显著高于叶和茎, 表达量大约是叶中的 7 倍, 几乎是茎中的 13 倍 (图 6-A)。在花的 3 个不同发育阶段中, F-I 期的表达量最高, 其次是 F-II 期, F-III 期最低, 随着花的发育成熟其表达量呈递减趋势 (图 6-B)。在各个部位中不均匀的表达可能与 SmbHLH93 行使不同的功能密切相关。

3.6 不同诱导条件下表达模式分析

光处理可诱导 SmbHLH93 基因的表达 (图 7-A), 黑暗处理 3 d 后 (光照 0 h) SmbHLH93 表达量下降, 光照 2 h 后恢复正常, 之后表达量逐渐升高, 在 24 h 达到最高值, 是对照 (ck) 的 6 倍, 24 h 后逐渐降低到与 ck 相近的正常值。低温处理 6 h 内, SmbHLH93 表达量稍微有所下降, 8 h 达到最大值, 达到 0 h 的 4 倍左右 (图 7-B)。持续低温 24 h 以后, SmbHLH93 的表达量普遍提高。SA 处理下 (图 7-C), SmbHLH93 的表达一直受到明显的抑制, 在 24 h 有所恢复, 不过仍显著低于对照, 之后表达量又开始下降。

4 讨论

植物 bHLH 是一类非常古老而庞大的基因家族, 广泛参与植物的生长发育、应对环境胁迫和调控次生代谢。目前在拟南芥中研究较多, 已经发现了与气孔发育相关的 AtSCREAM2、AtFAMA 和 AtSPCH^[14-15],



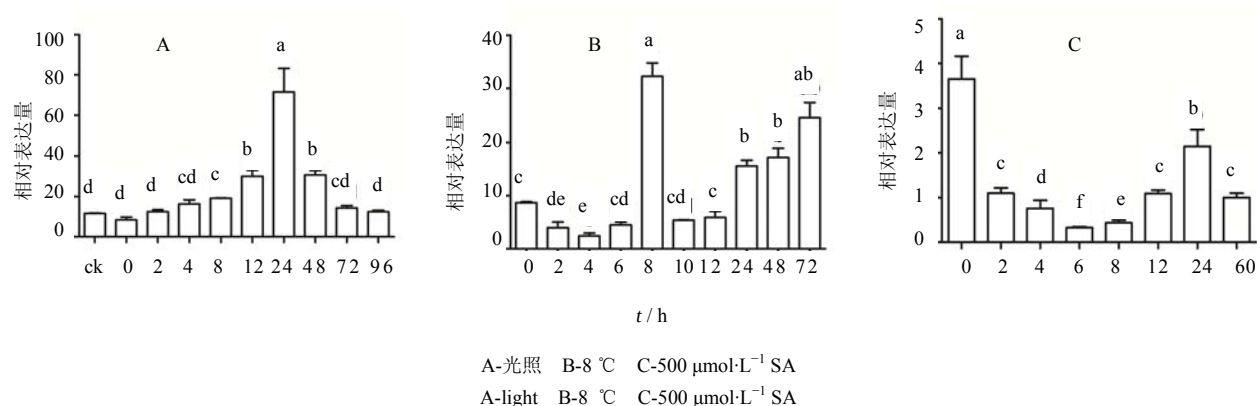
A-SmbHLH93 在根茎叶中的表达 B-SmbHLH93 在花的 3 个发育阶段的表达; 不同字母表示有显著差异 ($P < 0.05$), 下同

A-expression of SmbHLH93 in root, stem, and leaf B-expression of SmbHLH93 in three flower stages

Relative expression represented by different letters shows significant difference ($P < 0.05$), same as below

图 6 SmbHLH93 在丹参不同部位以及花不同发育阶段的表达

Fig. 6 Expression of SmbHLH93 in different fractions and flower stages of *S. miltiorrhiza*

图7 不同诱导条件下 *SmbHLH93* 的表达Fig. 7 Expression of *SmbHLH93* under different induction conditions

与花粉发育相关的 *AtSPL*、*AtDYT1* 和 *AtAMS*^[16-17]，与抗低温胁迫相关的 *AtICE1*^[18] 以及与 MYB 类转录因子协同调节花青素代谢途径的 *GL3* 和 *EGL3*^[19] 等。然而，关于 *bHLH93* 的研究并不多，其中已被报道进行功能研究的只有 *AtbHLH93*。研究显示 *AtbHLH93* 蛋白能与 *AtFAMA* 形成异源二聚体，负调控气孔的形成^[20]，且在雄性不育 *AtSPL* 突变体中 *AtbHLH93* 的表达量代偿性提高，可能参与花的发育^[21]。本研究首次克隆得到了 *SmbHLH93*，其氨基酸序列与 *MtbHLH93*、*TcbHLH93*、*AtbHLH93*、*GmbHLH93*-like 亚型 I 和亚型 XI 相似度较高，虽然这些序列两两之间的相似度都没有超过 70%，但多重序列比对却发现它们的 *bHLH* 结构域和 C 端非常保守，说明 *bHLH93* 在不同物种中其 *bHLH* 结构域和 C 端以外的序列变异较大，进化不够保守。*SmbHLH93* 蛋白除了与 *AtbHLH93* 有较高的相似性，与花粉发育相关的 *AtDYT1* 和 *AtAMS* 亲缘关系也很近，其中 *bHLH* 结构域与 *AtAMS* 的一致性很高，C 端也有较高相似性。该基因在花的 F-I 期至 F-III 期，随着花的盛开和花粉发育的成熟，表达量逐渐降低的趋势也符合这一功能特点。推测 *SmbHLH93* 参与了花的发育过程。

与 *AtbHLH93*、*AtDYT1* 和 *AtAMS* 不同，*SmbHLH93* 蛋白除了属于 *bHLH* 家族，还属于 *ACT* 超家族，具有 *ACT_UUR-ACR-like* 结构域。比对发现 *AtSCREAM2* 和 *AtFAMA* 也有该结构域。*ACT_UUR-ACR-like* 由各种形式的 *ACT* 结构域组成。而 *ACT* 结构域最早是在细菌中发现，通常通过特异性结合小分子配体来调控酶的功能，参与氨基酸和嘌呤的生物合成或者细菌代谢和转录的

调节^[22-23]。在拟南芥和水稻中发现有些蛋白含有多重重复的 *ACT* 结构域，其结构与细菌传感器蛋白 *GlnD* 相似，推测具有调节和传感作用^[24-26]。说明 *SmbHLH93* 不仅具有转录因子调节基因表达的功能，还可能与其他配体结合调控酶的功能或参与信号传导，至于是否与 *AtSCREAM2* 和 *AtFAMA* 有相似的功能，今后可以通过干涉、过表达、酵母双杂和功能互补等实验进行验证。

浇灌 0.5~3 mmol/L 的 SA，丹参酮 II_A、隐丹参酮和丹酚酸 B 量明显提高^[27]。本研究中丹参幼苗经 0.5 mmol/L 的 SA 处理后，*SmbHLH93* 的表达立刻受到了明显的抑制，虽然在 24 h 表达量有所升高，但仍显著低于对照。由此看来 *SmbHLH93* 与丹参次生代谢途径的调控相关，但具体调控机制还不清楚，需要进一步的实验来进行证明。

参考文献

- [1] Heim M A, Jakoby M, Werber M, et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity [J]. *Mol Biol Evol*, 2003, 20(5): 735-747.
- [2] Amoutzias G D, Robertson D L, Oliver S G, et al. Convergent evolution of gene networks by single-gene duplications in higher eukaryotes [J]. *EMBO Rep*, 2004, 5(3): 274-279.
- [3] Stevens J D, Roalson E H, Skinner M K. Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation [J]. *Differentiation*, 2008, 76(9): 1006-1022.
- [4] Castillon A, Shen H, Huq E. Phytochrome interacting factors: Central players in phytochrome-mediated light signaling networks [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(11): 511-518.

- 514-521.
- [5] Xiong Y, Liu T, Tian C, *et al.* Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots [J]. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(1): 191-203.
- [6] Li X, Duan X, Jiang H, *et al.* Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1167-1184.
- [7] Zhang S, Ma P, Yang D, *et al.* Cloning and characterization of a putative R2R3 MYB transcriptional repressor of the rosmarinic acid biosynthetic pathway from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73259.
- [8] Xu H, Zhang L, Zhou C C, *et al.* Metabolic regulation and genetic engineering of pharmaceutical component tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4(24): 2591-2597.
- [9] Hua W, Zhang Y, Song J, *et al.* De novo transcriptome sequencing in *Salvia miltiorrhiza* to identify genes involved in the biosynthesis of active ingredients [J]. *Genomics*, 2011, 98(4): 272-279.
- [10] 韦 辉, 刘素香, 刘 毅, 等. 丹参药材的综合质量评价研究 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(5): 343-347.
- [11] 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.
- [12] Hua W, Song J, Li C, *et al.* Molecular cloning and characterization of the promoter of SmGGPPs and its expression pattern in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5775-5783.
- [13] Pires N, Dolan L. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants [J]. *Mol Biol Evol*, 2010, 27(4): 862-874.
- [14] Pillitteri L J, Torii K U. Breaking the silence: three bHLH proteins direct cell-fate decisions during stomatal development [J]. *Bioessays*, 2007, 29(9): 861-870.
- [15] Kanaoka M M, Pillitteri L J, Fujii H, *et al.* SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1775-1785.
- [16] Feng B, Lu D, Ma X, *et al.* Regulation of the Arabidopsis anther transcriptome by DYT1 for pollen development [J]. *Plant J*, 2012, 72(4): 612-624.
- [17] Yang W, Ye D, Xu J, *et al.* The Sporocyteless gene of Arabidopsis is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein [J]. *Genes Develop*, 1999, 13(16): 2108-2117.
- [18] Lee B H, Henderson D A, Zhu J K. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1 [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11): 3155-3175.
- [19] Xu W, Grain D, Bobet S, *et al.* Complexity and robustness of the flavonoid transcriptional regulatory network revealed by comprehensive analyses of MYB-bHLH-WDR complexes and their targets in Arabidopsis seed [J]. *New Phytol*, 2014, 202(1): 132-144.
- [20] Ohashi-Ito K, Bergmann D C. Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(10): 2493-2505.
- [21] Ma X, Feng B, Ma H. AMS-dependent and independent regulation of anther transcriptome and comparison with those affected by other Arabidopsis anther genes [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12: 23.
- [22] Liberles J S, Thorolfsson M, Martinez A. Allosteric mechanisms in ACT domain containing enzymes involved in amino acid metabolism [J]. *Amino Acids*, 2005, 28(1): 1-12.
- [23] Grant G A. The ACT domain: a small molecule binding domain and its role as a common regulatory element [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(45): 33825-33829.
- [24] Liu Q. Computational identification and systematic analysis of the ACR gene family in *Oryza sativa* [J]. *J Plant Physiol*, 2006, 163(4): 445-451.
- [25] Zhang Y, Pohlmann E L, Roberts G P. GlnD is essential for NifA activation, NtrB/NtrC-regulated gene expression, and posttranslational regulation of nitrogenase activity in the photosynthetic, nitrogen-fixing bacterium *Rhodospirillum rubrum* [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(4): 1254-1265.
- [26] Hsieh M H, Goodman H M. Molecular characterization of a novel gene family encoding ACT domain repeat proteins in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(4): 1797-1806.
- [27] 李 明, 宋利国. 水杨酸对丹参幼苗营养期生长及品质影响的研究 [J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(1): 233-236.