

• 药材与资源 •

热胁迫下丹参转录组 cDNA-AFLP 分析

李 东^{1,2}, 吴先军^{1,3*}, 陈 新^{4*}

1. 四川农业大学水稻研究所, 四川 温江 611130

2. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000

3. 四川农业大学 西南作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 四川 温江 611130

4. 成都中医药大学, 四川 温江 611137

摘 要: **目的** 探索热胁迫影响丹参生长和次生代谢的分子机制。**方法** 采用 cDNA-AFLP 技术对丹参热胁迫下叶片基因表达进行转录组分析。采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 对叶片 cDNA 进行双酶切, 256 对引物组合进行选择扩增, 对差异片段进行测序、功能分析和定量 RT-PCR。**结果** 共分离出 196 个差异表达转录衍生片段 (transcription derived fragments, TDFs), 其中增强与诱导表达的 TDFs 122 条, 抑制表达的 74 条; 从 NCBI 中鉴定出 147 个同源 TDFs, 另有 49 个 TDFs 为新发现序列。**结论** 热胁迫影响转录组的信号转导、转录调控、逆境响应蛋白、物质代谢等多个方面, 为进一步研究丹参有效成分的代谢调控奠定了基础。

关键词: 丹参; 热胁迫; cDNA-AFLP; 转录组; RT-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2083-09

cDNA-AFLP analysis on transcriptome of *Salvia miltiorrhiza* under heat stressLI Dong^{1,2}, WU Xian-jun^{1,3}, CHEN Xin⁴

1. Rice Research Institute of Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

2. College of Bioengineering, Sichuan University of Science & Technology, Zigong 643000, China

3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Improvement, Ministry of Education, Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China

4. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Wenjiang 611137, China

Abstract: Objective To research the molecular mechanism of growth and secondary metabolism of *Salvia miltiorrhiza* during heat stress. **Methods** The cDNA-AFLP approach was applied to identifying the transcriptome of differential genes expression in leaves. cDNA from leaves was digested by *EcoR* I and *Mse* I, and 256 primer combinations were used for selective amplification. Different transcription derived fragments (TDFs) were cloned, sequenced, and analyzed by quantitative RT-PCR. **Results** TDFs (196) were identified for their differential expression under heat stress, among which the expression of 122 TDFs was enhanced and induced and expression of 74 TDFs was suppressed. Compared the sequences of all TDFs with the NCBI databases, 147 TDFs presented homologous, while 49 TDFs with low identity or no match to known genes in NCBI might represent novel genes in *S. miltiorrhiza*. **Conclusion** The signal transduction, transcriptional regulation, stress response protein, and metabolism, etc. could be influenced by heat stress, which provides a basis for further study on the regulation of active constituent metabolism of *S. miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; heat stress; cDNA-AFLP; transcriptomes; RT-PCR

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎, 是我国常用大宗药材, 使用广泛, 主产于山东、河南、陕西、四川等省。丹

参的根中含有水溶性的酚酸类成分与脂溶性的萜醌类成分, 主要为丹酚酸B、丹参酮II_A等, 由于品种与产地不同, 遗传多样性较丰富, 不同丹参的有

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划 (IRT0453)

作者简介: 李 东 (1982—), 男, 四川德阳人, 博士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: dashtomlee@163.com

*通讯作者 吴先军 E-mail: wuxjsau@126.com

陈 新 E-mail: chennew@tom.com

效成分量存在较大差异^[1-2], 可见丹参有效成分量的高低同遗传背景和环境有关^[3-4]。

对丹参有效成分积累与环境关系的研究^[5]发现, 制约各有效成分量的主要环境因子为热量因子, 其中七月气温对有效成分量有显著影响, 年极高温是影响丹参有效成分量的重要影响因子, 生长季内温度较高有利于丹参素及丹酚酸B的积累, 而不利丹参酮II_A的积累。研究还发现九月份高温不利于丹参有效成分的积累, 而较湿润的环境有利于丹参有效成分的积累^[6]。由此可见, 适宜的温度是丹参有效成分积累的关键因素之一, 高温会对丹参有效成分的累积产生重要的影响。

在热胁迫过程中, 植物会接受一系列的信号, 并做出相应调整, 转录组将发生一系列的变化^[7], 对转录组进行研究是了解植物响应热胁迫分子机制的重要途径^[8-9]。

cDNA-AFLP是近年来发展起来的一种研究转录组变化的重要技术, 其假阳性低, 重复性好, 且不需要预先获得序列信息, 对于大量尚未测序的药用植物是最佳研究工具^[10-11], 本实验利用AFLP, 结合测序技术、生物信息学技术, 对热胁迫下丹参的转录组进行研究, 通过对表达谱中相关基因的注释和分类, 深入了解丹参响应热胁迫的特点, 为探索丹参有效成分的生物合成与调控提供依据。

1 材料与仪器

丹参药材采自四川省中江县, 经成都中医药大学药学院陈新教授鉴定为丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge。RNA提取试剂盒 (Tiangen公司), M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit试剂盒 (TaKaRa公司), *EcoR* I与*Mse* I限制性内切酶 (NEB公司), 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Omega公司), pMD[™] 19-T Vector (TaKaRa公司); 紫外分光光度计DU800 (Beckman公司), PCR反应扩增仪 (Bio-Rad公司), 实时定量PCR仪CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad公司), 垂直板电泳系统 (Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 总 RNA 提取与双链 cDNA 的制备

用幼叶组培快繁, 再生植株于 25 °C、无激素 1/2MS 培养基上培养至 12 cm 时, 备用。再生幼苗 38 °C 胁迫 48 h, 分别于 0、2、4、6、12、24、48 h 取幼叶。使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 并使用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。使用 M-MLV RTase

cDNA Synthesis Kit 试剂盒将 2 μg 总 RNA 逆转录为双链 cDNA, 重复 3 次。

2.2 cDNA-AFLP 试验

cDNA-AFLP试验体系及程序参照Bachem等^[12]方法并略加改进。使用*EcoR* I与*Mse* I限制性内切酶对 200 ng双链cDNA进行双酶切后连接接头。使用 E00 (5'-GACTGCGTACCAATTC-3') 和 M00 (5'-GATGAGTCCTGACTAA-3') 进行预扩增, 预扩增反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。将预扩增产物稀释 40 倍, 进行选择扩增, 选择性引物为E00+NN、M00+NN, 共计 256 对引物组合, 重复 3 次。选择性扩增反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 65~56 °C 退火 30 s (每个循环降低 0.7 °C), 72 °C 延伸 1 min, 12 个循环; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

2.3 差异片段的检测及提取

制备 6%变性聚丙烯酰胺凝胶, 恒定功率 65 W 预电泳 30 min, 使用移液枪将点样孔中气泡、多余尿素清除, 取 6 μL 选择性扩增产物变性后进行点样。65 W 恒定功率电泳, 待指示剂接近凝胶尽头时, 停止电泳。使用银染法进行染色。差异条带使用高盐法^[13]进行回收, 以回收后产物条带为模板进行 2 次PCR扩增, 扩增体系和程序与选择性扩增相同。使用 0.8%琼脂糖凝胶分离目的条带, 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的片段。pMD[™] 19-T Vector连接目的片段, 热激转入DH5α菌株中, 挑取 10 个阳性克隆进行PCR检测, 3 个阳性菌株测序。

2.4 测序结果分析

使用本实验室自编Bioperl程序对测序结果进行分析, 去除载体序列, 使用Blast2GO对测序结果进行Gene Ontology注释, 方法及步骤参考文献方法^[14]。

2.5 RT-PCR 定量验证

从测序结果中, 随机选择部分转录衍生片段 (TDFs) 进行定量RT-PCR验证 (表 1)。定量RT-PCR检测参照CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad公司) 与SYBR Premix ex Taq II Kit (TaKaRa公司) 说明, 并略有改进。定量RT-PCR体系为 2×SYBR Premix ex Taq II 10 μL; 引物 1 (10 nmol/mL) 0.8 μL; 引物 2 (10 nmol/mL) 0.8 μL; cDNA模板 (20 ng/μL) 1 μL; dd H₂O 7.4 μL; 总

表 1 TDFs 定量 RT-PCR 验证 ($n=3$)
Table 1 Primers for quantitative RT-PCR of TDFs ($n=3$)

编号	引物序列 5'-3'	片段长度/ bp	退火温度/ ℃	编号	引物序列 5'-3'	片段长度/ bp	退火温度/ ℃
TDF17	CTGCTCAGACCACCATCG TCTTGGCATCCCTCAAACAC	147	50	TDF150	AGCCCTTCTACGGTTGTATTTC CGGGATTTCGCACCTTATTT	153	60
TDF20	TGCGAGGCGGTTTCTGTT TCCGCAAACCTTGCTGAAGAG	176	60	TDF176	AGCCATCCATCGCAAGAGG GGCATCAGCATCGGCTAAGAG	107	55
TDF108	GGCAATTTGGTGTGTTGTTTC TTCAGCCTGCGCTCCTCA	220	56	TDF191	CGGTCGTGTTCTGATTGTTCG CATATCCTCTGGCTGGTAGGG	190	58
TDF155	AAAGAGCAGGAGGAGAAGAACG CTGAAGCGGCGAAGGAAC	74	56	TDF115	AACGAGTGGTGCCGTTCC GGATAAGCCTTGTTTAGTTACTGTTAG	231	58
TDF81	AGCGTCTGAGGGGACATCG GTCTTCCTTCGCCGCTT	78	55	TDF127	ACTGCTGGTTCATGTTCCAC TTATCATTTGTATGCCCTTCG	146	61
TDF143	AGTGCCCTACCTCCGTT AATGCTTTTGCTGCCCTAT	122	50	Actin	AGGAACCACCGATCCAGACA GGTGCCCTGAGGTCCTGTT	267	59
TDF151	TGAACTGGACGCCGAGGAG GGCAAGTGTGAGGATGAGGT	162	61	GAPDH	CCACCGTCCACTCCATCACT TGGAAGTCTGGAACGACATAC	183	62

体积 20 μ L。

PCR反应程序采用两步法：95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s；95 $^{\circ}$ C 变性 5 s，退火温度 (T_m) 退火/延伸 30 s，40 个循环；融解曲线条件为 65~95 $^{\circ}$ C，每 5 s 提升 0.5 $^{\circ}$ C。以 Actin^[15]、GAPDH^[16] 作为内参基因，进行综合分析^[17]。重复 3 次。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取

提取胁迫幼叶的 RNA，点样孔无亮斑，说明 RNA 无蛋白质污染，条带清晰（图 1），18 S、28 S 条带比例正常。紫外分光光度计检测 260、280 nm 吸光度 (A) 值， A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.1，各样品质量浓度在 100~300 ng/ μ L，符合试验要求。

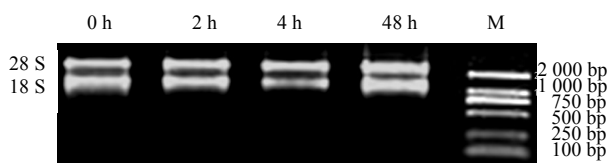
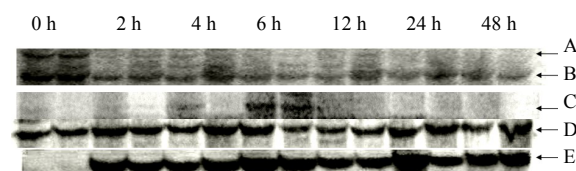


图 1 RNA 电泳结果

Fig. 1 RNA electrophoresis result

3.2 cDNA-AFLP 分析

采用 256 对引物组合对丹参热胁迫转录组进行分析，平均每对引物组合扩增出 20~40 条 TDFs，长度在 50~700 bp。其中组成型表达占绝大部分，只有少数 TDFs 出现变化，分别表现为诱导增强型表达与抑制表达（图 2）。获得差异目的片段 196



A-抑制表达 B、D-组成型表达 C、E-诱导型表达

A-suppressed B and D-expressed constitutively C and E-up-regulated

图 2 不同表达模式 TDFs

Fig. 2 TDFs with different expression patterns

条，其中上调 122 条，下调 74 条。上调的 122 条 TDFs 中，74 条 TDFs 在热胁迫过程中出现，48 条 TDFs 仅在特定时间段出现，说明热胁迫诱导了其表达。下调的 74 条 TDFs 在胁迫后某些时间段难以检测，说明高温抑制其表达。

3.3 差异片段及功能分析

使用 Blast2GO 软件对结果进行注释，共有 147 个 TDFs 在 NCBI 中已有序列同源，涉及代谢、信号转导、转录调控、逆境响应蛋白等功能，有 49 个 TDFs 未找到高相似度同源序列，预测为未知功能新基因，该类基因可能为丹参特有的参与热胁迫反应的相关基因。部分 TDFs 的 Blast2GO 注释属于不同的酶家族，这说明该类 TDFs 可能与两种以上的酶基因都具有高度相似性，由于该部分 TDFs 较短，难以辨别其功能，需进一步研究确定。

对注释结果使用 Blast2GO 进行 Gene Ontology 分析，分别找到 86 个与细胞组分相关的 TDFs，103 个

与分子功能相关的 TDFs 和 98 个与生物学作用相关的 TDFs, 共 155 个类别。数据见图 3 和表 2。

细胞组分数据分为多个层次, 主要集中在细胞内和细胞内的有膜细胞器两个部分, 其中找到了 15 个蛋白复合体, 蛋白复合体在细胞中起着十分重要的作用。

分子功能数据主要集中在结合和催化活性两个部分, 其中转录因子活性与基因的表达有着密切的关系。说明了在热胁迫情况下, 转录组有明显的变化。

生物学作用数据主要集中在代谢作用、细胞的作用和响应刺激 3 个部分, 涉及细胞的代谢、合成、细胞进程与胁迫下响应。在热胁迫情况下, 在初生代谢过程与次生代谢过程均检测到了变化, 初生代谢涉及核酸代谢、氨基酸代谢、蛋白质代谢等多个进程, 次生代谢过程检测到了 3 个基因分别为 TDF52 (天冬氨酸转氨酶)、TDF54 和 TDF181 (异胡豆苷合酶家族蛋白)。

分别对 TDFs 中涉及细胞组分、分子功能和生物学作用进行了 Level 3 水平的功能注释分析。细胞组分 Level 3 水平功能注释分析主要集中在胞内部分和有膜细胞器两部分, 其中胞内部分为 46%, 有膜细胞器为 35%。分子功能 Level 3 水平功能注释分析中, 与核苷酸结合为 21%, 与蛋白质结合为 26%, 与核酸结合为 14%, 这 3 部分均属于结合的子概念; 转移酶活性为 13%, 水解酶活性为 14%, 这两部分均属于催化活性的子概念。生物学作用 Level 3 水平功能注释分析中大分子代谢过程为 12%, 生物合成作用为 10%, 响应非生物刺激为 6%, 响应胁迫为 8%, 生物学作用调节为 6%, 含氮化合物代谢过程为 6%, 初生代谢过程为 17%。

对 TDFs 中与有效成分代谢可能相关的序列进行综合分析, 分别在生物学作用、分子功能和细胞组分中找到了 75、30 和 15 个与有效成分代谢可能相关的 TDFs。在生物学作用和分子功能中发现部分 TDFs 参与了多种功能, 见表 3 和 4。

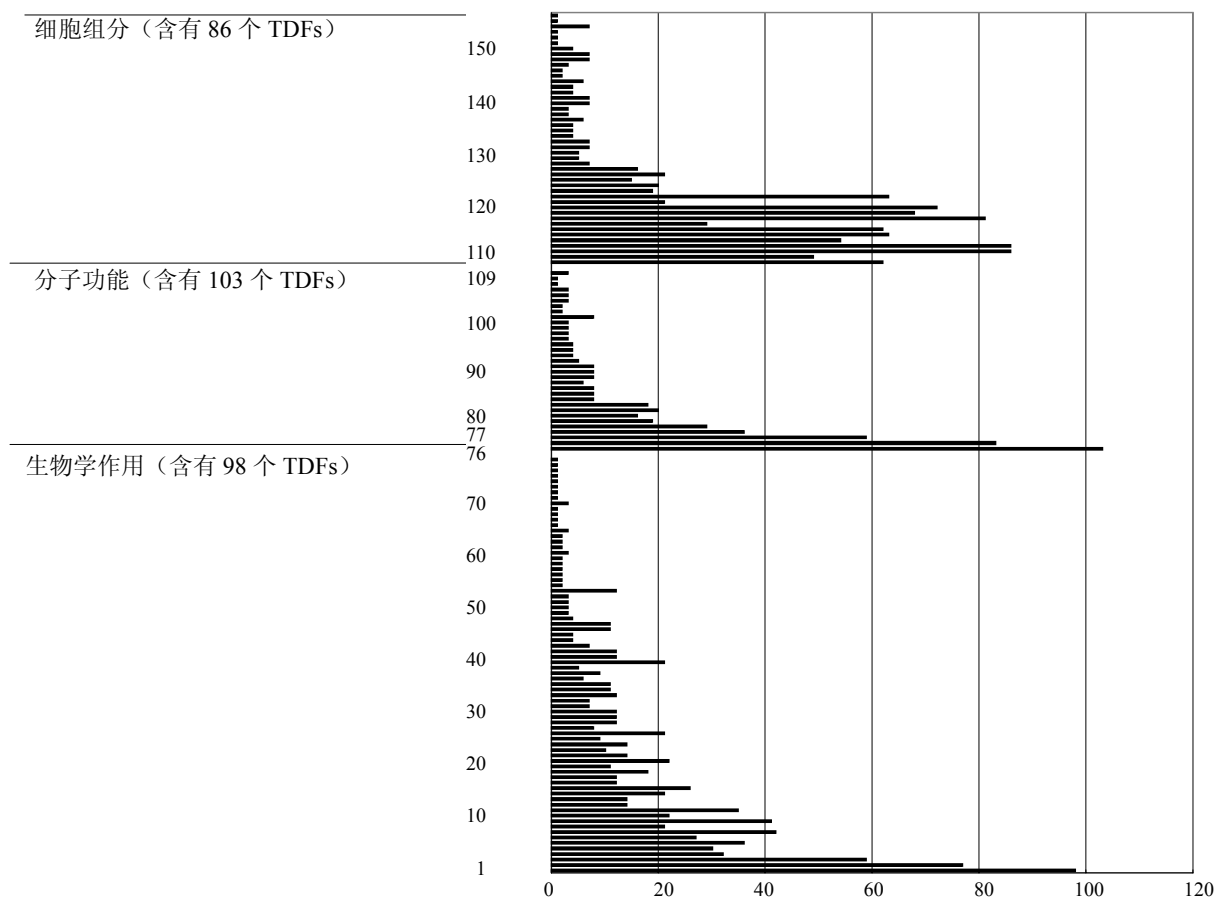


图 3 TDFs 的 Blast2GO 注释

Fig. 3 Blast2GO bar chart of all TDFs

表 2 TDFs 的 Blast2GO 注释

Table 2 Blast2GO of all TDFs

编号	描述	编号	描述	编号	描述	编号	描述
1	生物学作用	38	外部刺激响应	77	分子功能	117	质体
2	代谢进程	39	含氮化合物代谢作用	78	结合	118	细胞部分
3	初生代谢作用	40	定位	79	催化活性	119	细胞内部分
4	刺激响应	41	信号进程	80	蛋白质结合	120	细胞内
5	胁迫响应	42	大分子物质修饰	81	核苷酸结合	121	质膜
6	生物合成进程	43	generation of precursor metabolites and energy	82	水解酶活性	122	细胞器
7	蛋白质代谢过程	44	碳水化合物代谢进程	83	DNA 结合	123	线粒体
8	细胞进程	45	细胞内生物合成作用	84	核酸结合	124	核
9	非生物刺激响应	46	大分子物质生物合成作用	85	转移酶活性	125	蛋白复合体
10	大分子物质代谢进程	47	cellular component organization	86	信号传感器活性	126	膜
11	生物学作用调节	48	organelle organization	87	蛋白激酶活性	127	大分子复合体
12	细胞代谢进程	49	细胞周期	88	运输活性	128	液泡
13	多细胞有机体发育	50	次生代谢作用	89	肽酶活性	129	类囊体
14	分解代谢进程	51	蛋白质运输	90	分子传感器活性	130	细胞液
15	碱基、核苷、核苷酸和 核酸代谢进程	52	信号	91	激酶活性	131	细胞核部分
16	细胞大分子物质代谢进程	53	翻译	92	磷酸转移酶活性, 醇基受体	132	nuclear lumen
17	运输	54	细胞死亡	93	转录调节活性	133	核浆
18	信号转导	55	内源刺激物响应	94	RNA 结合	134	细胞质内有膜囊泡
19	核酸代谢进程	56	离子运输	95	酶调节活性	135	内质网
20	细胞内氨基酸及其衍 生物代谢进程	57	解剖学结构形态建成	96	转录因子活性	136	细胞内无膜细胞器
21	生物学调节	58	细胞通讯	97	受体活性	137	细胞核
22	发育进程	59	蛋白质定位建立	98	structural molecule activity	138	过氧化物酶体
23	DNA 代谢进程	60	生长	99	钙离子结合	139	Intracellular lumen
24	多细胞有机体进程	61	解剖学结构发育	100	核酸酶活性	140	胞内细胞器部分
25	转录	62	死亡	101	转移酶活性, 转移含磷集团	141	有膜囊泡
26	细胞内含氮化合物代 谢进程	63	蛋白质定位	102	碳水化合物结合	142	细胞质内囊泡
27	增殖	64	细胞生长	103	电子载体活性	143	无膜细胞器
28	信号传递	65	regulation of gene expression, epigenetic	104	hydrolase activity, acting on ester bonds	144	细胞骨架
29	定位建立	66	细胞分化	105	金属离子结合	145	细胞外区域
30	调节细胞进程	67	生物刺激响应	106	阳离子结合	146	微体
31	脂类代谢进程	68	大分子定位	107	抗氧化剂活性	147	organelle lumen
32	蛋白质修饰作用	69	细胞发育进程	108	氧结合	148	细胞器部分
33	基因表达	70	调节基因表达	109	离子结合	149	囊泡
34	细胞内大分子物质合 成作用	71	细胞大小调节	110	细胞内有膜细胞器	150	核糖体
35	小分子物质代谢进程	72	regulation of cellular component size	111	细胞质部分	151	高尔基体
36	胚胎发育	73	大分子物质代谢进程调节	112	细胞成分	152	细胞壁
37	细胞内蛋白质代谢进程	74	代谢进程调节	113	细胞	153	membrane-enclosed lumen
		75	解剖学结构大小调节	114	细胞质	154	核糖核蛋白复合体
		76	regulation of biological quality	115	细胞内细胞器	155	external structure encapsulating
				116	有膜细胞器		

表 3 生物学作用中与有效成分代谢可能相关的 TDFs 综合分析

Table 3 TDFs comprehensive analysis on possibly related active constituent metabolism in biological process

编号	RS	BP	MMP	RBP	SP	SMP	编号	RS	BP	MMP	RBP	SP	SMP
TDF1	+		+	+	+		TDF103	+		+			
TDF2	+						TDF106	+		+			
TDF3		+	+				TDF108	+		+	+		
TDF4			+				TDF112		+	+			
TDF6	+	+					TDF116			+			
TDF8		+	+	+			TDF120	+			+	+	
TDF10	+						TDF124			+			
TDF14		+	+	+	+		TDF126		+	+			
TDF17	+	+					TDF132		+	+	+	+	
TDF18	+	+					TDF134			+			
TDF19		+	+	+			TDF137	+		+			
TDF20	+	+	+	+			TDF138	+		+			
TDF21			+				TDF139				+	+	
TDF28		+					TDF141	+	+	+	+	+	
TDF31			+				TDF143		+				
TDF38	+		+				TDF144		+	+	+		
TDF42		+					TDF145	+		+			
TDF44			+				TDF146		+				
TDF45		+	+				TDF149	+		+			
TDF50	+		+				TDF150			+			
TDF51		+	+				TDF154	+					
TDF52		+				+	TDF155	+					
TDF54		+				+	TDF157	+					
TDF55	+		+				TDF166		+	+			
TDF58				+			TDF170		+	+	+	+	
TDF62	+						TDF175		+				
TDF64		+	+	+	+		TDF176				+	+	
TDF69	+		+	+			TDF180	+					
TDF72		+					TDF181		+				+
TDF74		+	+	+			TDF182	+	+				
TDF75	+						TDF183	+	+				
TDF83	+						TDF184	+					
TDF90	+						TDF185			+			
TDF94		+	+	+	+		TDF186		+				
TDF95				+	+		TDF193		+	+			
TDF98		+					TDF195	+	+	+	+	+	
TDF99				+			TDF196		+	+			
TDF100				+									

“+”-具有相关性 RS-响应刺激 BP-生物合成作用 MMP-大分子代谢作用 RBP-生物学作用调节 SP-信号进程 SMP-次生代谢过程
“+”-with correlation RS-response to stimulus BP-biosynthetic process MMP-macromolecule metabolic process RBP-regulation of biological process SP-signaling process SMP-secondary metabolic process

3.4 定量 RT-PCR 验证结果

以 Actin 和 GAPDH 作为内参进行综合分析，选取 12 个 TDFs 进行定量 RT-PCR 分析，得到热胁迫不同时间其目的基因的表达量，结果见图 4。在 cDNA-AFLP 结果中，TDF17、TDF151、TDF115 表现为上调；TDF20、TDF108、TDF81、TDF191、TDF127 表现为上调后下降；TDF155、TDF143、

TDF150、TDF176 表现为下调。定量 RT-PCR 与 cDNA-AFLP 结果基本相同，说明 cDNA-AFLP 结果真实可靠，适用于该研究。根据 Blast2GO 注释结果，TDF17、TDF20、TDF108、TDF155 为热激蛋白。TDF143 在整个热胁迫过程中前期变化不大，从 6 h 开始出现明显地下降，说明热胁迫抑制了该基因表达。TDF151 前期基本不表达，从 4 h 开始出现大

表 4 分子功能中与有效成分代谢可能相关的 TDFs 综合分析

Table 4 TDFs comprehensive analysis on possibly related to active constituent metabolism in molecular function

编号	TA	STA	TRA	ERA	编号	TA	STA	TRA	ERA
TDF1	+				TDF122	+			
TDF8			+		TDF126	+			
TDF14	+	+			TDF132	+	+		
TDF19			+		TDF139				+
TDF52	+				TDF141			+	
TDF58				+	TDF144			+	
TDF64	+	+			TDF148	+			
TDF72	+				TDF161	+			
TDF74			+		TDF166	+			
TDF79	+				TDF170	+	+		
TDF94	+	+			TDF176	+	+		
TDF95				+	TDF186	+			
TDF107				+	TDF193	+			
TDF112	+				TDF195	+	+		
TDF120		+			TDF196	+			

TA-转移酶活性 STA-信号转导活性 TRA-转录调控因子活性 ERA-酶调控因子活性
TA-transferase activity STA-signal transducer activity TRA-transcription regulator activity ERA-enzyme regulator activity

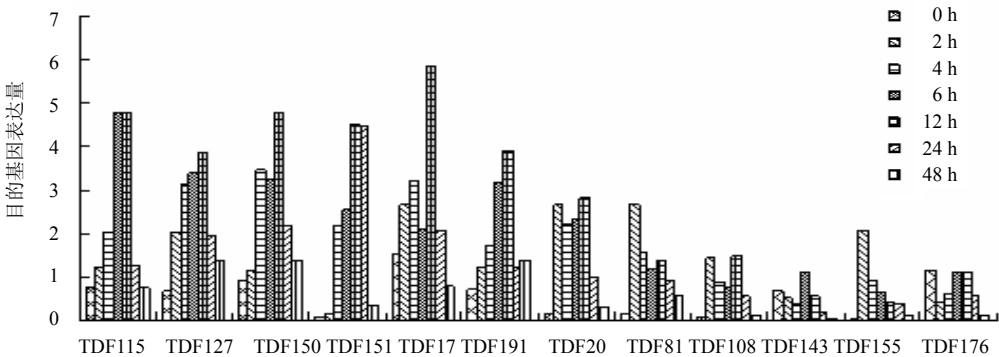


图 4 定量 RT-PCR 验证 cDNA-AFLP 结果
Fig. 4 cDNA-AFLP results of quantitative RT-PCR

量的表达，说明其表达受到了热胁迫的诱导，于 12~24 h 到达顶峰，后下降。TDF150 为未知功能蛋白，其表达在热胁迫过程中出现明显的抛物线形态，在热胁迫后的 12 h 达到顶点后随着时间开始降低。TDF176 为乙烯受体，受热胁迫影响表达降低。TDF81、TDF191、TDF115、TDF127 均为未知基因，其变化均呈显著性差异，该类基因可能是丹参特有热胁迫响应的基因，具有进一步研究的价值。

3.5 热胁迫下热激蛋白（HSP）的表达

观察到热胁迫会诱导 HSP 表达量急剧升高，通过对比，找到了多个 HSP 家族相关蛋白，见表 5。

3.6 热胁迫下激酶相关基因表达

使用 Blast2GO 对 cDNA-AFLP 结果进行基因本体分析与聚类分析，分别对细胞组分、分子功能和

表 5 cDNA-AFLP 鉴定出热激蛋白基因
Table 5 Heat shock protein sequence by cDNA-AFLP

编号	蛋白基因
TDF17	热激蛋白 70
TDF18	热激蛋白 70
TDF20	热激蛋白 90
TDF75	热激
TDF103	热激
TDF106	热激
TDF108	热激蛋白 90
TDF154	胞质类 i 小热激蛋白 1a
TDF155	热激蛋白 18
TDF157	胞质类 i 小热激蛋白 1a
TDF180	胞质类 i 小热激蛋白 1a
TDF184	胞质类 i 小热激蛋白 1a

生物学作用进行了 Level 3 水平的功能注释分析,并与其他物种及胁迫进行了比对。在功能分析中找到了 8 个与激酶相关的基因序列,见表 6。

表 6 cDNA-AFLP 鉴定出激酶相关基因序列

Table 6 Kinase related gene sequence by cDNA-AFLP

编号	酶编号	激酶
TDF14	EC:2.7.11.0	类受体蛋白激酶蛋白
TDF64	EC:2.7.11.0	蛋白
TDF94	EC:2.7.11.25	有丝分裂原蛋白激酶
TDF132	EC:2.7.10.2	原癌基因酪氨酸蛋白激酶
	EC:2.7.11.14	视紫红质激酶
	EC:2.7.11.25	有丝分裂原蛋白激酶
TDF161	EC:2.7.11.1	serine-threonine protein plant-type
TDF170	EC:2.7.11.25	有丝分裂原蛋白激酶
TDF176	EC:2.7.13.3	孢子形成传感器激酶
TDF195	EC:2.7.11.0	nonphototropic hypocotyl 1

4 讨论

4.1 cDNA-AFLP 应用于转录组变化研究

cDNA-AFLP是开展转录组研究的一个重要方法。Wee等^[18]在研究*Helicoverpa armigera*中使用 256 对引物组合共扩增到 12 500 个TDF,平均每对引物组合 48.83 个TDF;在玉米中,Hartings^[19]使用 *Bst*Y I和*Mse* I的酶切组合,覆盖率大致在 95%。由于各物种间的差异,使用不同的酶切组合对于试验结果有一定的影响。在丹参的基因组测序工作尚未完成的情况下,对于热胁迫状态下的转录组的变化情况,使用cDNA-AFLP能够有效开展丹参转录组的研究。本实验选择最为常用的*Eco*R I与*Mse* I的酶切组合,获得了较为理想的结果。

4.2 热胁迫下 HSP 的表达

热激蛋白HSP与热激因子HSF在植物的信号转导中起着非常重要的作用,调节着热胁迫下的大量基因表达。在本研究中观察到热胁迫会诱导HSP表达量急剧升高,通过对比,找到了多个HSP家族相关蛋白。其中,HSP90 主要作用是指导蛋白质的折叠,在信号转导网络、增加抗逆能力上也有一定作用,其表达可以大大增加原核与真核生物的抗逆反应,降低HSP90 的水平能导致发育畸形与形态改变^[20]。HSP70 在热及其他胁迫情况下,能够大量表达,并在细胞核富集^[21]。过量表达HSP70 能够增加耐热能力和对其他环境胁迫的耐受性^[20]。小HSP介于 17 000~30 000,被认为有独特的生理学作用^[22],热诱导产生的蛋白质与小HSP结合形成低聚物,这种低

聚物能够进行结构内修饰,从而改变表面疏水性,增加其与底物的结合力^[23]。在整个热胁迫试验中,在HSP大量表达后,部分基因受到了极为明显的调控,有研究表明植物的次生代谢与信号传导有着密切的联系,很多次生代谢产物与胁迫相关,而植物的有效成分多为次生代谢产物,由于胁迫的作用改变了代谢流的方向与平衡,从而造成有效成分的增加或是减少^[24]。

4.3 热胁迫下激酶相关基因表达

其中EC2.7.11 为与MAPK相关系列酶谱,植物在机械压力、创伤、盐害、低温、干旱等不同的逆境条件下,均能诱导和激活MAPK链,将信号不断放大并传递下去^[25]。EC2.7.11.25 为MAP3K基因,位于MAPK信号途径的上游,为早期感受并传递放大胁迫信号的基因。Huang等^[26]在水稻MAPK的研究中发现热胁迫能迅速导致OsMAPK2 基因表达量降低,Yelena等^[27]在烟草研究中发现转入MPK1 基因的植株能大大提高耐热能力,但热胁迫下MAPK 信号途径是否与其他胁迫相同,以及热胁迫下MAKP信号途径所处地位,需进一步研究。

在本研究中,找到了多个与热胁迫相关的 TDFs,各 TDFs 之间的相互关系有待进一步研究。其中 49 个丹参特有热胁迫相关 TDFs,在以后的研究中,可以通过 RACE 法获得基因的全长并鉴定功能。

参考文献

- [1] 王维婷,单成钢,倪大鹏,等.不同来源丹参种质遗传多样性的 SRAP 标记分析 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 632-635.
- [2] 杨新杰,万德光,林贵兵,等.丹参脂溶性成分的地域分布特点分析 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 809-812.
- [3] 金樟照,祝明,张文婷,等.不同产地丹参水溶性成分和脂溶性成分指纹图谱测定及相关性研究 [J]. 中草药, 2004, 35(10): 1174-1177.
- [4] 王举涛,彭代银,刘金旗,等.不同产地丹参中丹参酮 II_A 的含量比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 3: 4-5.
- [5] 李倩.环境因子对丹参生长及活性成分累积的影响规律研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006.
- [6] 贺玉林.丹参有效成分的积累及其与生态因子的关系 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.
- [7] Kotak S, Larkindale J, Lee U, et al. Complexity of the heat stress response in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2007, 10(3): 310-316.
- [8] Rizhsky L, Liang H, Shuman J, et al. When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a

- combination of drought and heat stress [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1683-1696.
- [9] 刘志勇, 杜永臣, 王孝宣, 等. 热胁迫下番茄叶片差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析 [J]. 园艺学报, 2008, 7: 1011-1016.
- [10] Jayaraman A, Puranik S, Rai N K, *et al.* cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in response to salt stress in foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. *Mol Biotechnol*, 2008, 40(3): 241-251.
- [11] 于光, 段金廛. cDNA-AFLP 技术及其在药用植物基因表达研究中的应用展望 [J]. 中国现代中药, 2008, 8: 5-7.
- [12] Bachem C W, Hoveen R S, Bruijn S M, *et al.* Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant J*, 1996, 9(5): 745-753.
- [13] 刘志勇. 热胁迫下番茄多胺代谢与基因差异表达分析 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [14] Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez J M, *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [15] 崔光红, 王学勇, 冯华, 等. 丹参乙酰CoA 酰基转移酶基因全长克隆和 SNP 分析 [J]. 药学报, 2010, 6: 785-790.
- [16] 化文平. 丹参 GGPP 合酶基因的克隆及表达分析 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2008.
- [17] Vandesompele J, De P K, Pattyn F, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): 1-12.
- [18] Wee C W, Lee S F, Robin C, *et al.* Identification of candidate genes for fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* using cDNA-AFLP [J]. *Insect Mol Biol*, 2008, 17(4): 351-360.
- [19] Hartings H. High resolution fingerprinting of transcribed genes by means of a modified cDNA-AFLP method [J]. *Maydica*, 1999, 44: 179-181.
- [20] Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, *et al.* Role of plant heat shock proteins and molecular chaperons in the abiotic stress response [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(5): 1360-1385.
- [21] Hendrick J P, Hartl F U. Molecular chaperone functions of heat shock proteins [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 349-384.
- [22] Vierling R, Nguyen H T. Heat shock gene expression in diploid wheat genotypes differing in thermal tolerance [J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 370-377.
- [23] Sun W, Van M M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1577(1): 1-9.
- [24] 杨致荣, 毛雪, 李润植. 植物次生代谢基因工程研究进展 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(1): 11-18.
- [25] 刘强, 张贵友, Kazuo S. 植物促分裂原活化蛋白 (MAP) 激酶 [J]. 植物学报, 2000, 7: 661-667.
- [26] Huang H J, Fu S F, Tai Y H, *et al.* Expression of *Oryza sativa* MAP kinase gene is developmentally regulated and stress-responsive [J]. *Physiol Plant*, 2002, 114(4): 572-580.
- [27] Yelena K, Chiu W, Tena G, *et al.* Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants [J]. *PNAS*, 2000, 97(6): 2940-2945.