

丹参肉桂醇脱氢酶基因 (*SmCAD*) 的克隆及表达分析

葛茜, 邝静, 武玉翠, 张媛, 肖娅萍, 王喆之*

(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,
陕西师范大学生命科学学院, 西安 710062)

摘要: 肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)依赖于 NADPH 还原肉桂醛及其衍生物, 是催化木质素单体生物合成途径的最后一步关键酶。通过分析丹参转录组数据库, 从丹参中获得一条肉桂醇脱氢酶基因, 命名为 *SmCAD* (Genbank 注册号: HQ162287)。该序列包含一个长为 1083 bp 的开放阅读框, 有 3 个内含子和 4 个外显子, 编码 360 个氨基酸, 含有 NADP(H) 结合域, Zn1 和 Zn2 锌结合位点。利用 BD walking 的方法获得其启动子序列 1202 bp, 序列分析结果表明, *SmCAD* 启动子区包含茉莉酸甲酯(MeJA)、脱落酸(ABA)、赤霉素(GA₃) 响应元件以及 MYB 结合位点。利用实时荧光定量 PCR 分析表明, 该基因在丹参根、茎、叶中均有表达, 且其表达受到 MeJA 的诱导和 GA₃ 的抑制, 推测该基因可能参与了丹参对外源信号的应答反应。研究结果可为进一步研究 *SmCAD* 基因在丹参中的具体功能提供理论依据。

关键词: 丹参; 肉桂醇脱氢酶; 生物信息学分析; 基因表达

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)03-0261-08

Cloning and Expression Analysis of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase (*SmCAD*) Gene in *Salvia miltiorrhiza* Bunge

GE Qian, KUANG Jing, WU Yu-Cui, ZHANG Yuan, XIAO Ya-Ping, WANG Zhe-Zhi*

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

Abstract: Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) catalyzes the reduction reaction of cinnamic aldehyde and its derivatives depending on the NADPH. It is the key enzyme in the last step of lignin biosynthesis. A novel CAD gene designated as *SmCAD* (GenBank accession No.: HQ162287) was cloned from *Salvia miltiorrhiza* Bunge according to the transcription databases. It contained a 1083 bp open reading frame, including 3 introns and 4 exons, and encoded a protein of 360 amino acids. The predicted *SmCAD* protein had Zn1 and Zn2 binding sites and NADP(H) binding domain. A total of 1202 bp promoter sequences were obtained using BD walking method, and sequence analysis revealed that there were MeJA, ABA, GA₃ response elements and MYB binding sites. Real-time quantitative PCR showed that *SmCAD* was expressed in different organs, and its expression was induced by MeJA and inhibited by GA₃. These results suggested that this gene may be involved in the response of exogenous signals. This study contributes to the theoretical basis of the specific function of *SmCAD*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; Cinnamyl alcohol dehydrogenase; Bioinformatics analysis; Gene expression

收稿日期: 2012-10-23, 修回日期: 2012-12-19。

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(2012JQ4013); 中央高校基本科研业务费专项资助资金(GK201102017); 陕西省教育厅科学技术研究发展计划(12JK0833)。

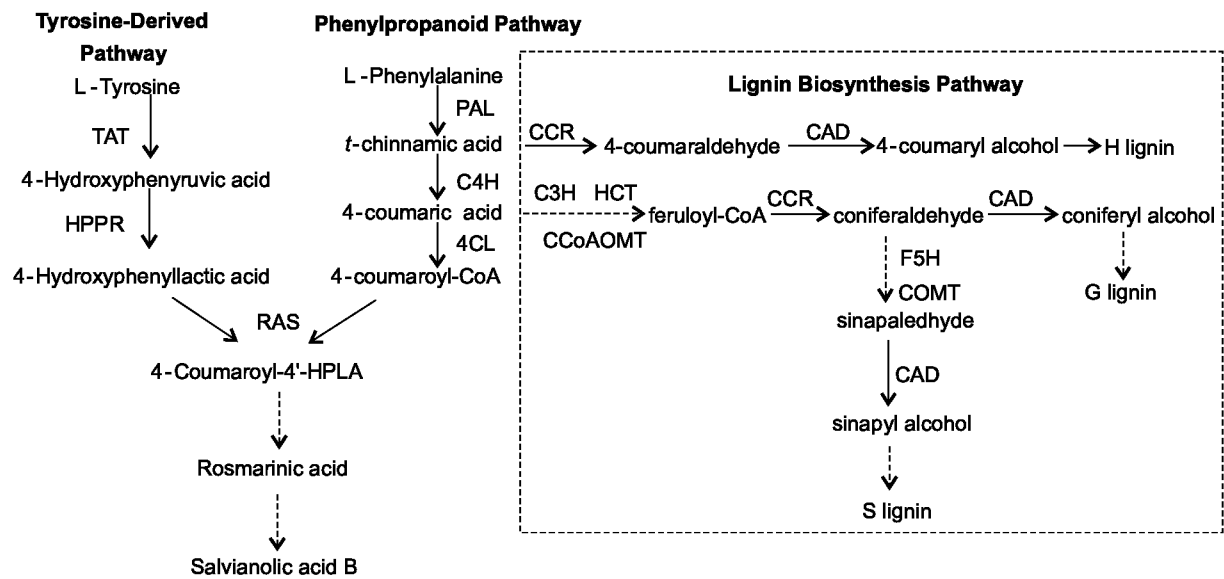
作者简介: 葛茜(1988-), 女, 硕士, 研究方向为植物分子生物学、植物基因工程(E-mail: geqian@stu.snpu.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence): 王喆之, 教授, 博士生导师(E-mail: zzwang@snpu.edu.cn)。

木质素 (Lignin) 是植物体内含量仅次于纤维素的一类大分子有机物, 位于植物细胞次生壁中, 是植物细胞壁的骨架物质^[1]。木质素的合成非常复杂, 它涉及不同酶的多步催化反应。肉桂醇脱氢酶 (cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD) 催化木质素单体合成的最后一步反应——依赖于 NADPH 还原肉桂醛及其衍生物, 合成不同木质素单体^[2], 因此推测在丹参中也存在相同的合成途径 (图 1)。CAD 最早是从烟草茎部分离得到, 目前其同源基因已在火炬松、桉树、云杉、拟南芥、水稻等多个物种中被报道^[3-9], 其功能在不同物种中亦有所差异。在拟南芥中, *AtCAD5* 主要参与了 S 型木质素的合成, 其突变体中 S 型木质素单体减少了 92%^[10]。利用 RANi 干涉的方法降低玉米 *CAD* 基因的表达, 发现其茎部总木质素含量没有改变, 但 S 型木质素与 G 型木质素的比率略有下调, 而叶脉中总木质素含量显著提高, 说明在不同植物中不同的 CAD 对木质素合成的影响存在差异^[11]。CAD 作为植物木质素合成途径中重要的限速酶, 其基因的表达可调控木质素单体的合成, 在

木质素积累过程中的作用尤为重要。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 为唇形科鼠尾草属多年生草本植物, 具有抗动脉粥样硬化、促进血液循环和抗炎抗肿瘤等作用^[12]。其活性成分丹酚酸 B 和迷迭香酸等酚酸类化合物与木质素单体均由苯丙烷类化合物衍生而来, 因此酚酸类化合物和木质素单体合成具有相同的上游代谢通路 (图 1)。已有研究显示, 利用 RNAi 技术下调木质素合成相关基因 *CCR*、*C3H* 等, 可在降低木质素含量的同时明显提高黄酮和酚酸类物质的含量^[13, 14]。而在丹参中也有报道显示: 木质素的合成与丹酚酸 B 类物质的累积密切相关^[15, 16], 因此通过抑制木质素合成使代谢产物流向酚酸类合成方向, 以提高酚酸类化合物在丹参中的含量, 已成为基因改造丹参、获得优良丹参种质的新思路。鉴于此, 分离并鉴定丹参中木质素合成途径上的关键酶基因, 将为利用基因工程的方法提高丹参中酚酸类活性成分的含量提供理论基础。尽管目前已有多个木质素合成相关基因在丹参中被陆续克隆和研究, 但催化木质素单体生物合成的最后一步关键酶基因——丹参



CAD: 肉桂醇脱氢酶 (Cinnamyl alcohol dehydrogenase); CCR: 肉桂酰辅酶 A 还原酶 (Cinnamoyl-CoA reductase); F5H: 阿魏酸-5-羟化酶 (Ferulate 5-hydroxylase); COMT: 咖啡酸-O-甲基转移酶 (Cinnamate O-methyl transferase); HCT: 莽草酸/奎宁酸羟基肉桂酰转移酶 (Hydroxyl cinnamoyl CoA transferase); C3H: 香豆酸-3-羟化酶 (Coumarate 3-hydroxylase); CCoAOMT: 咖啡酰辅酶 A-3-O-甲基转移酶 (Caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase); RAS: 迷迭香酸合成酶 (Rosmarinic acid synthase); 4CL: 4-香豆酰辅酶 A 连接酶 (Hydroxycinnamate CoA ligase); C4H: 肉桂酸-4-羟化酶 (Cinnamate 4-hydroxylase); PAL: 苯丙氨酸裂解酶 (Phenylalanine ammonia lyase); HPPR: 对羟基苯丙酮酸还原酶 (Hydroxyl phenyl pyruvate reductase); TAT: 酪氨酸氨基转移酶 (Tyrosine amino transferase)。

图 1 丹参中丹酚酸 B 以及木质素生物合成途径^[16]
Fig. 1 Proposed biosynthetic pathway of salvianolic acid B and lignin in *Salvia miltiorrhiza*

CAD 基因的克隆和表达分析研究还有待开展。

我们从丹参中克隆了肉桂醇脱氢酶基因(*SmCAD*), 并进行了氨基酸序列同源性分析及蛋白质三级结构预测。利用 BD walking 的方法获得启动子序列, 根据启动子区所具有的顺式作用元件, 进一步分析其不同组织及相应胁迫下的表达模式, 为研究 *SmCAD* 基因在丹参中的具体功能和培育优良丹参品系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)种子采自陕西天士力植物药业商洛有限公司商州药源基地, 于盛有蛭石、草木灰(蛭石: 草木灰=1:1)的基质中萌发, 在人工气候箱内培养(宁波, RXZ-500D), 光照强度 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光周期: 光照 16 h/黑暗 8 h; 温度 25°C , 湿度 48%。种子萌发并长出第一对真叶后移栽至营养钵中, 每个营养钵 3 棵幼苗, 每隔 3 d 浇灌 1 次水。培养 60 d 的丹参幼苗用于各种胁迫处理。培养 2 年的丹参植株用于组织特异性表达的研究。

1.2 处理方法

将盛花期的 2 年丹参植株小心取出, 洗净, 分别收集其根、茎、叶、花, 用于组织特异性表达的研究。脱落酸(ABA)处理: 用 $100 \mu\text{mol/L}$ ABA 溶液过量喷洒幼苗, 使叶片完全浸湿, 分别于 0、3、6、10、24 h 收集材料; 茉莉酸甲酯(MeJA, 5 mmol/L)处理: 方法同 ABA 处理丹参幼苗, 分别于 0、0.5、2、4、8、12、24、48 h 收集材料; 赤霉素(GA_3 , $150 \mu\text{mol/L}$)处理: 方法同 ABA 处理丹参幼苗, 分别于 0、2、4、6、8、12、24、48、72 h 收集材料; 所有材料经液氮速冻, -80°C 保存, 用于提取总 RNA。

丹参总 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[17]进行, 丹参总 RNA 的提取采用 OMEGA 公司 E. Z. N. A.™ Plant RNA Kit 进行, 并按照 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书合成丹参 cDNA 第一链。

1.3 *SmCAD* 基因的克隆

对本实验室建立的丹参转录组数据库^[18]进行

BLAST 比对分析, 电子克隆获得丹参肉桂醇脱氢酶基因 *SmCAD*。采用 Premier 5.0 软件设计一对特异性 PCR 扩增引物(F: 5'-AATGGCGAAAT-CACCCGAA-3'; R: 5'-ATAAACAGGACAACAG-AAGAACACG-3') 分别以丹参 cDNA 和 DNA 为模板, 扩增 *SmCAD* 片段。反应程序为: 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min 20 s, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。在已知 DNA 序列的基础上设计引物(GSP1: 5'-CT-TCTTTCCCACCTCTGTTACCACTCCCA-3'; GSP2: 5'-CATCACCAGTAGCCCTGAAGATACGCCA-3'), 采用 BD Genome Walker™ DNA walking 的方法^[19]获得该基因的启动子区核酸序列。扩增片段经凝胶回收后与 pMD19-T simple vector (购自 TAKARA 公司)连接并转化大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆后送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 丹参 CAD 蛋白的生物信息学分析

用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>、DNA star 进行开放阅读框的查找和翻译; 用 SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_auto-mat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)、SwissMode(<http://swissmodel.expasy.org/>)、Plantcare 完成二级结构和三维结构预测及启动子区顺式作用元件分析。用 Clustal W、MEGA 4.0 完成氨基酸多序列比对及系统树构建。

1.5 *SmCAD* 基因的表达模式分析

以移栽培养 60 d 的丹参幼苗 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应, 以丹参持家基因 β -Actin 为内参, 检测 *SmCAD* 的表达量, 引物见表 1。反应条件: 95°C 变性 3 min; 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 25 s, 40 个循环。每个实验重复 3 次。数据分析采用“ ΔCt ”的方法, 并用 SPSS 13.0 中 one-way ANOVA 方法进行单因素方差分析, 利用 Tukey test 分析不同样品间的差异显著性($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 *SmCAD* 基因序列的获得

对丹参转录组数据库进行 BLAST 分析的结果显示, 其中一条序列(Contig1317)与 *AtCAD8* 基因

表 1 实时荧光定量 PCR 检测 *SmCAD* 基因表达所用引物
Table 1 Primers used for the expression analysis of *SmCAD* by RT-PCR

基因 Genes	产物长度(bp) Product	引物 Direction	序列 Sequence
<i>SmCAD</i>	176	SmCADS	5'-CCCCAAAATCATCCCCACTT-3'
		SmCADA	5'-TCATGGGGCTGTAGGTGGTG-3'
β -Actin	278	ActinS	5'-AGGAACCACCGATCCAGACA-3'
		ActinA	5'-GGTGCCCTGAGGTCTCTT-3'

序列具有较高的一致性，将其命名为 *SmCAD*。提取丹参总 RNA，经 RT-PCR 反应，扩增出一条长 1092 bp 的条带，包含 1083 bp 的 ORF；以丹参 gDNA 为模板经 PCR 扩增出一条 1515 bp 的条带，与 cDNA 序列比对发现该序列包含 4 个外显子和 3 个内含子。内含子长度分别为 206 bp、89 bp 和 89 bp，采用 GSDS 在线工具，得到丹参 CAD 基因结构(图 2)。

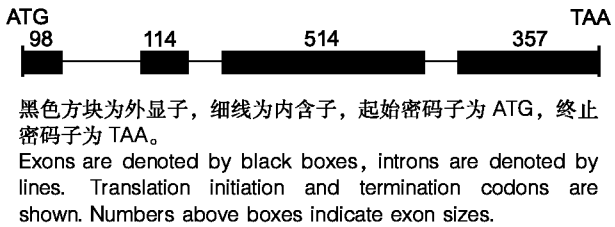


图 2 丹参 *CAD* 基因 PCR 扩增结果及基因结构示意图
Fig. 2 Structure of *CAD* gene in *S. miltiorrhiza*

2.2 *SmCAD* 基因启动子区的克隆及分析

采用 DNA walking 的方法获得 *SmCAD* 基因起始密码子 ATG 上游 1202 bp 的非编码 5'侧翼序列。利用 PlantCARE database 对 *SmCAD* 基因 5'侧翼序列的顺式作用元件进行分析，结果显示(图 3)，转录起始位点(TSS)位于 ATG 上游 73 bp，定义为“+1”，TATA box 位于转录起始位点上游 25 bp 处，符合真核生物 TATA box 的位置特点，同时包含有多个 CAAT box。在 *SmCAD* 启动子区内，还存在脱落酸响应元件 ABRE、生长素响应元件 AuxRR-motif、茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif(TGACG-motif)、赤霉素响应元件 GARE-motif 以及 MYB 转录因子结合位点 MBS，MBS 元件在木质部特异表达的基因启动子区经常出现，受机械损伤诱导^[20]。推测 *SmCAD* 基因的表达受到 MYB 转录因子的调控以及脱落酸、生长素、茉莉酸、赤霉素等多种胁迫响应信号分子的诱导。

2.3 *SmCAD* 氨基酸序列分析

2.3.1 同源性分析

用 Blastp 对丹参 *CAD* 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析，发现丹参 *CAD* 基因编码的氨基酸序列与拟南芥、水稻、云杉中 *CAD* 蛋白的同源性分别为 75%、64% 和 57%。在 MEGA4.0 软件平台上采用 Neighbor-Joining 方法，以软件默认参数构建系统进化树，对不同物种 *CAD* 氨基酸序列进行分子系统进化分析(图 4)，发现丹参 *CAD* 与拟南芥 *CAD7* 和 *CAD8* 最为接近。根据种间核苷酸和氨基酸序列同源性的差异可将 *CAD* 分成 3 类，分析显示 *SmCAD* 属于 Group II，即促进木质素生长的一类 *CAD* 类群^[21]。

多重序列比较发现，*SmCAD* 氨基酸序列具有催化锌结合位点(Zn1，catalytic Zn binding site) GHE (X)₂G (X)₅ G(X)₂ V，它是酶促催化时 Zn 的结合位点，另外还有锌结合位点(Zn2，structural Zn binding site)即 GD (X)_{9,10} C (X)₂ C (X)₂ C (X)₇ C 和保守的 NADP(H) 结合域 GLGGXGH(图 5)，与其他物种 *CAD* 保守区只有少数氨基酸残基不同。这些保守区域普遍存在于 *CAD* 家族成员之中，其底物结合位点的氨基酸残基在不同物种中也是严格保守的。

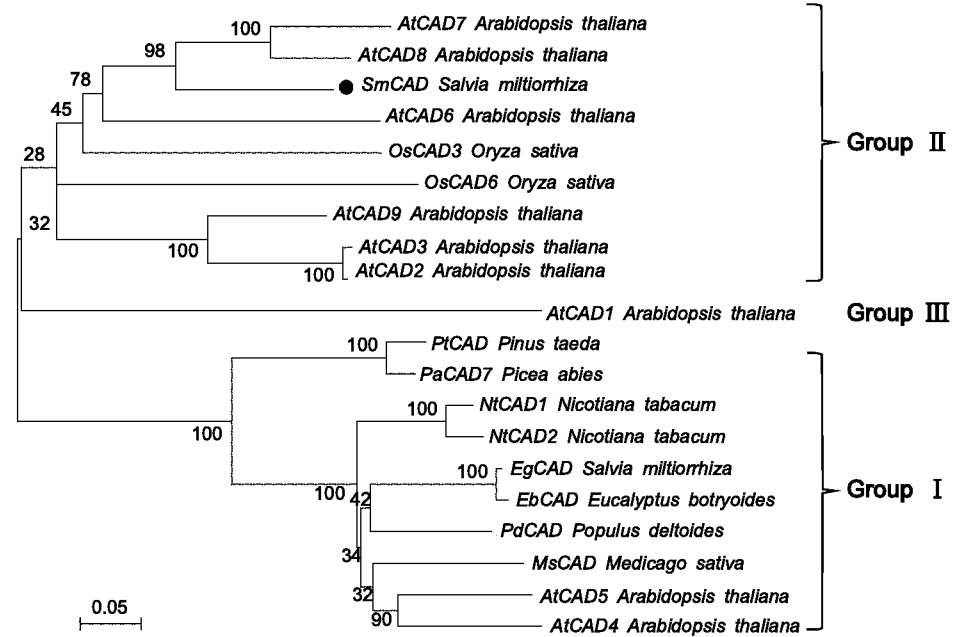
2.3.2 *SmCAD* 结构预测和分析

蛋白质分子的多肽链借助氢键折叠和盘曲成比较稳定的空间结构，称为蛋白质二级结构，是一级结构与三维构象之间的桥梁。利用 SOPMA 程序对 *SmCAD* 蛋白的二级结构进行预测，结果显示，该蛋白的二级结构由 41.94% 的不规则卷曲、27.22% 的 α -螺旋、23.89% 的延伸链和 6.94% 的 β -转角构成。用 SWISS-MODEL 对 *SmCAD* 蛋白的三级结构进行预测，得到该蛋白的三级结构图(图 6)，预测其三级结构以二聚体形式存在。根据

CGACCAGCCCCGGCGGTAATAATTAATTATATAAATACTACTTAACTATAAAATTCACAAACATACTTAAATAATTAA
ACAATAGCTCCTTATTTCCCTTGTCAAAAGAAACACCTCAAAATCTGCGGGACAGAGGAAGTATAATATTTATAATTT
ATTTAGATTCTACAATATGTGGAATGCAACTCAGAGATGATGTGGAATTATTTGTCAAGATAATTAGAATGAAGTAGAA
TT[CAAAAT]CATGTTATTTAGGCTGCCACATAGGTAGATCCTATTTTCTTATTATATAGAAGATTGTTATAGTTAAATT
CAAT-box ABRE
ACAAAAAGTATTGAATAGAGCTACTCCCTCCGTCACAAATTTAATGCCCTGTTGGCTTTCAAAAACGTCCACAAAT
TAATGCCCTGTTTTGCTTTTTGTACCCTTTACTCTCTACTTTTTCTATATTTACTACCCTTTGCCACTAATGGACCCA
AuxRR-core
CCTTCAAACACCTTTTCACTTTTATATTCTATATTTACTACACTTTATCACTTTATCACTTTAGTCAACTACTTTATC
ACTTTAGTCAACTACCTTATATTTTCATCCACATCACCTTTTTCAGCTTCTTAGTCTCCGTGCCAGGACCCAAAGTAGG
GCATTAATTTGTGGACGGAGGGAGTATATTAGAAAGAATATGAACAGTTTACTCTAAATTTTAAAAATGAGACATTTAT
TAAACAAAACAAGAAAAAGGTGAAATGGAACACTTATTAATACACGGGTGGAATATTTGGAATTTTATACTCCACCTG
AATTGAACTTCAAGGTGTCTAGAATAAATAGATTTTCAAGTCTAAACAGAAAGTAAAAATGTGACATTATAGGAGCA
ATTGATGTTGAACGGTTCAGGTGTGCGGTGGAATTAATGAAAAAATATTAGAATCTAGAATGAGTTTGAAGAAGGTCC
GARE-motif
GAATTGTGACACCCCTCCTTCTCTACTAGTTGATAAAATATTGCAAAAAAAATTGAGTTGGCTTTCTTGACTCAACT
MBS
GTAACAGTCTACGCTTATCGCTTTGAGTATTCACACCACGGCAGCCGGGACGAACGTCACACTCTTCTTCTATAAATA
CGTCA-motif TATA-box
CCACTCTCACACCTTCTGCCAAACATCACAAACTCATTTCCAATCTCTCAATTTTCTATACTCTTTGCTTTCTTAT
TSS
ACTAATTCATATTCTTAAATG

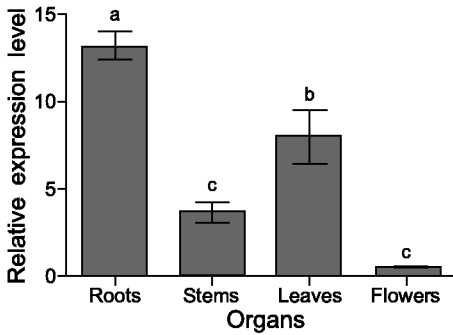
转录起始位点标为“TSS”，顺式作用元件用下划线或方框表示。
Predicted transcription start site is marked as TSS and cis-acting elements are underlined or framed.

图 3 *SmCAD* 启动子区 5'侧翼序列分析
Fig. 3 Analysis of the sequence in *SmCAD*'s promoter



拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; 细叶桉 *Eucalyptus botryoides*; 蓝桉 *Eucalyptus globulus*; 紫花苜蓿 *Medicago sativa*; 烟草 *Nicotiana tabacum*; 水稻 *Oryza sativa*; 云杉 *Picea abies*; 美洲黑杨 *Populus deltoides*; 火炬松 *Pinus taeda*。基因名及注册号 (The sequences were as follows): *AtCAD1*: Q9CAI3.1; *AtCAD2*: Q9SJ25.1; *AtCAD3*: Q9SJ10.1; *AtCAD4*: P48523.1; *AtCAD5*: O49482.1; *AtCAD6*: O65621.1; *AtCAD7*: Q02971.2; *AtCAD8*: Q02972.1; *AtCAD9*: P42734.2; *EbCAD*: P50746.1; *EgCAD*: O64969.1; *MsCAD*: P31656.1; *NtCAD1*: P30359.1; *NtCAD2*: P30360.1; *OsCAD3*: Q337Y2.1; *OsCAD6*: Q7XWU3.2; *PaCAD7*: Q08350.1; *PdCAD*: P31657.2; *PtCAD*: P41637.1。

图 4 *SmCAD* 与其他相关 CADs 氨基酸序列的系统发生树
Fig. 4 Phylogenetic analysis of *SmCAD* protein with other related proteins



相同字母表示显著性相同 ($p < 0.05$)。
Means designated by the same letter do not differ significantly according to Tukey test ($p < 0.05$).

图7 丹参 *CAD* 基因在丹参不同部位的表达
Fig. 7 Expression of *SmCAD* gene in different organs of *S. miltiorrhiza*

表达量迅速升高至对照的 8.5 倍，并持续高表达 10 h 以上 (图 8: b)。对丹参幼苗进行 GA_3 处理，该基因的表达整体处于被抑制的状态，于 24 h 表达量有所回升，但仍显著低于对照，随处理时间延长呈周期性变化 (图 8: c)，这与启动子分析结果相一致。

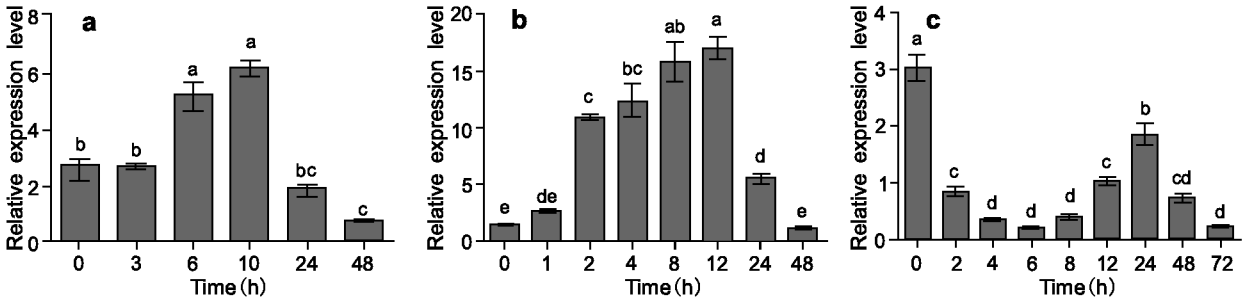
3 讨论

本研究从丹参中克隆了一条肉桂醇脱氢酶基因，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了分析。该基因所含的开放阅读框长为 1083 bp，有 3 个内含子，共编码 360 个氨基酸。Barakat 等将毛白杨的 *CADs* 基因，按 inron-exon 结构类型分为三类^[9]，丹参 *CAD* 基因不完全符合其中任何一类分类标准，但与 PattenI 结构最为相似，仅缺少 4 号内含子，即该类基因最后两个外显子在丹参中合并成一个，说明 *CAD* 的基

因结构并不严格保守。按 Barakat 等的分类方式，*SmCAD* 的表达模式与第 III 组 *CAD* 基因表达模式相近，在木质化组织及叶中表达量最高，属于第二大类 *CAD* 蛋白^[9]，系统树分析也显示 *SmCAD* 是第二大类 *CAD* 蛋白家族成员之一，推测 *SmCAD* 可能参与了木质素合成及胁迫条件下的木质素合成，产生应急反应。

SmCAD 启动子区序列分析表明其含有响应 ABA、MeJA、 GA_3 和光环境信号基序，以及 MYB 转录因子结合位点。其他物种中也具有类似的元件，如甘薯 *lbCAD1* 启动子转录调控研究表明，该基因受机械伤害及 SA、JA 和 ABA 等多种生物和非生物胁迫诱导^[22]。据此对 *SmCAD* 基因进行荧光定量分析显示，其同样受到多种激素的调控，ABA 和 MeJA 均能诱导 *CAD* 基因的表达，而 GA_3 的胁迫对该基因的表达有强烈的抑制作用，说明 *SmCAD* 基因可能同时参与了抗逆响应。

肉桂醇脱氢酶是木质素合成最后阶段的重要限速酶，除了参与合成木质素之外，还与植物的抗逆胁迫以及生长发育等相关，其家族成员之间在长期进化中也可能存在功能冗余或功能分工。我们从丹参中克隆并分析了这条 *CAD* 基因，其分子特征及表达模式与其他物种 *CAD* 基因所类似，说明其很可能为 *CAD* 家族成员之一，可能也参与丹参中木质素的合成，这还需要进一步的实验验证。但是，*CAD* 基因家族成员功能多样，丹参 *CAD* 基因可能还存在其他未知功能，因此其具体功能仍有待于进一步的深入研究，探索其在丹参中的具体功能，丰富 *CAD* 基因家族的功能多样性。



a: 100 μ mol/L ABA; b: 5 mmol/L MeJA; c: 150 μ mol/L GA_3 .

图8 丹参 *CAD* 基因在不同处理下的表达

Fig. 8 Expression of *SmCAD* gene in different treatments

参考文献:

- [1] Vanholme R, Demedts B, Morreel K, *et al.* Lignin biosynthesis and structure [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(3): 895–905.
- [2] Tobias C M, Chow E K. Structure of the cinnamylalcohol dehydrogenase gene family in rice and promoter activity of a member associated with lignification [J]. *Planta*, 2004, 220(5): 678–688.
- [3] O'Malley D M, Porter S, Sederoff R R. Purification, characterization, and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98(2): 1364–1371.
- [4] Goffner D, Joffroy I, Grima-Pettenati J, *et al.* Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus xylen* [J]. *Planta*, 1992, 188: 48–53.
- [5] 黄海燕, 王玉富, 薛召东, 等. 亚麻 CAD 基因克隆及序列分析[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(5): 496–498.
- [6] 倪志勇, 李波, 吕萌, 等. 棉花肉桂醇脱氢酶基因的克隆与分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 23–29.
- [7] Schubert R, Sperisen C, Müller-Starck G, *et al.* The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene structure in *Picea abies* (L.) Karst: genomic sequences, Southern hybridization, genetic analysis and phylogenetic relationships [J]. *Trees*, 1998, 12: 453–463.
- [8] Kim S J, Kim M R, Bedgar D L, *et al.* Functional reclassification of the putative cinnamyl alcohol dehydrogenase multigene family in *Arabidopsis* [J]. *PNAS*, 2004, 101(6): 1455–1460.
- [9] Barakat A, Bagniewska-Zadworna A, Choi A, *et al.* The cinnamyl alcohol dehydrogenase gene family in *Populus*: phylogeny, organization, and expression [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9(1): 26.
- [10] Sibout R, Eudes A, Pollet B, *et al.* Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 848–860.
- [11] Fornalé S, Capellades M, Encina A, *et al.* Altered lignin biosynthesis improves cellulosic bio ethanol production in transgenic maize plants down-regulated for cinnamyl alcohol dehydrogenase [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(4): 817–830.
- [12] 赵仁霞. 丹参的现代药理研究及临床应用[J]. 中国医药指南, 2011, 9(12): 291–292.
- [13] Rest B, Danoun S, Boudet A M, *et al.* Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools [J]. *JXB*, 2006, 57(6): 1399–1411.
- [14] Coleman H D, Park J Y, Nair R, *et al.* RNAi-mediated suppression of *p*-coumaroyl-CoA 3'-hydroxylase in hybrid poplar impacts lignin deposition and soluble secondary metabolism [J]. *PNAS*, 2008, 105(11): 4501–4506.
- [15] Wang Z J, Cui L J, Chen C, *et al.* Downregulation of Cinnamoyl CoA Reductase Affects Lignin and Phenolic Acids Biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30: 1229–1236.
- [16] Zhang Y, Yan Y P, Wang Z Z. The *Arabidopsis* PAP1 transcription factor plays an important role in the enrichment of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58(23): 12168–12175.
- [17] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11–15.
- [18] Hua W P, 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.
- [19] 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*, 2011, 39(5): 5775–5783.
- [20] Rahantamalala A, Rech P, Martinez Y, *et al.* Coordinated transcriptional regulation of two key genes in the lignin branch pathway-CAD and CCR is mediated through MYB-binding sites [J]. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 130.
- [21] 龚琰, 许梦秋. 木质素合成关键酶——肉桂醇脱氢酶的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010, 4: 47–49.
- [22] Kim Y H, Bae J M, Huh G H. Transcriptional regulation of the cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from sweet potato in response to plant developmental stage and environmental stress [J]. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(7): 779–791.