

丹参转录因子基因*SmMYC* amiRNA表达载体的构建及其对丹参的转化

王浩如¹, 王健^{1,2}, 王仕英¹, 王喆之^{1,*}

¹教育部药用植物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院, 西安710119; ²安康学院农学与生命科学院, 陕西安康, 725000

摘要: 丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)为我国传统中药, 其活性成分的药理作用广泛, 尤其在防治心血管病药物中具有重要作用。丹参水溶性酚酸类物质合成途径由苯丙烷代谢和酪氨酸代谢共同参与而成。转录因子对植物次生代谢起着十分重要的调节作用。我们前期测序结果显示, *SmMYC*是一个丹参bHLH类转录因子, 可能参与丹参酚酸类化合物生物合成的调控。本研究利用拟南芥miRNA319前体为模板骨架, 通过over-lapping PCR技术构建旨在能对*SmMYC*进行特异性沉默的artificial miRNA (amiRNA)植物表达载体, 命名为pCambia1302-amiR-*SmMYC*, 并通过农杆菌介导的遗传转化方法将其导入丹参。Real-time PCR结果显示, 所得转化阳性株系中*SmMYC*的mRNA水平均呈现不同程度的下降, 同时酚酸类代谢途径中相关酶基因的表达也表现为相应程度的下调; 福林酚法检测结果显示, 转化株系中总酚酸含量均低于同期的野生型丹参。以上实验结果初步显示丹参*SmMYC*可能作为一个重要的转录因子参与酚酸类活性物质的代谢调控, 同时为进一步研究*SmMYC*在丹参酚酸类化合物生物合成中的调控功能奠定了基础。

关键词: 丹参; bHLH转录因子; amiRNA; 遗传转化

Construction of Artificial microRNA Expression Vector Directing Specific Silencing of the Transcription Factor Gene *SmMYC* and Subsequent Transformation into *Salvia miltiorrhiza*

WANG Hao-Ru¹, WANG Jian^{1,2}, WANG Shi-Ying¹, WANG Zhe-Zhi^{1,*}

¹Key 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 710119, China; ²College of Agriculture and Life Science, Ankang University, Ankang, Shaanxi 725000, China

Abstract: *Salvia miltiorrhiza* Bunge is the traditional Chinese medicine, whose active constituents have extensive pharmacological activities in the clinical treatment, especially play an important role in heart vascular disease drug. The biosynthesis pathway of phenolic acid, the category of water-soluble active components of *Salvia miltiorrhiza*, is composed of both phenylpropanoid pathway and tyrosine metabolic one. Transcription factors play a very important role in regulation of the plant secondary metabolism. We speculated that *SmMYC*, a bHLH transcription factor of *Salvia miltiorrhiza*, was potentially involved in regulation of the phenolic acid compounds biosynthesis of *Salvia miltiorrhiza*. In this study, based on the *Arabidopsis thaliana* miRNA319 precursor, we constructed an artificial miRNA (amiRNA) plant expression vector using the overlap PCR technology, designated as pCambia1302-amiR-*SmMYC*, which was transformed into *Salvia miltiorrhiza*, subsequently. Real-time PCR results showed that, in the positive transgenic plants, *SmMYC* mRNA abundance presented the significantly lower compared with control. The expression level of the enzyme genes involved in phenolic acid compounds biosynthesis pathways rendered lower to some different extents compared with control. Furthermore, the Folin-Ciocalteu assay results showed that the total phenolic acid content in the positive transgenics were much lower than that of wild type. The results above suggested that the *SmMYC* might be an important transcription factor governing phenolic acids metabolism, and lay a firm foundation for further exploration of *SmMYC* role in phenolic acid compounds biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; bHLH transcription factor; amiRNA; transformation

收稿 2013-08-01 修定 2013-09-06

资助 国家自然科学基金(31170281)、陕西省自然科学基金(2011K-16-02-01)、陕西省教育厅自然科学专项基金(11JK0610)和安康学院高层次人才科研启动基金(AYQDZR200926)。

* 通讯作者(E-mail: zzwang@snnu.edu.cn)。

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)为唇形科鼠尾草属多年生草本植物,其根中活性成分能活血调经、祛瘀生新、清心除烦,为重要常用中草药(国家药典委员会2010)。丹参的主要活性成分分为两类:一类为水溶性的酚酸类物质,另一类为脂溶性的丹参酮类化合物(Li等2009)。水溶性酚酸类化合物是丹参的主要药用成分之一,主要包括迷迭香酸、丹参素、咖啡酸、丹酚酸A、丹酚酸B、紫草酸等(Liu等2007)。丹参水溶性酚酸类成分药理意义重大,其中丹酚酸B是目前已知的抗氧化作用最强的天然产物之一,也是丹参中含量最高、抗氧化活性最强的化合物,能显著抑制动物的心、脑、肝、肾、睾丸的脂质过氧化(李国樟等2010)。

丹参中水溶性成分如丹酚酸B、迷迭香酸等的生物合成由苯丙烷代谢途径和酪氨酸代谢途径共同参与而成(Li等2009)。苯丙烷类代谢途径中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)和4-香豆素辅酶A连接酶(4CL),酪氨酸代谢途径中的酪氨酸氨基转移酶(TAT)和羟苯基丙酮酸还原酶(HPPR)以及迷迭香酸合酶(RAS)共同参与了迷迭香酸及其衍生酚酸类物质的生物合成过程(图1)。目前发现,转录因子可以通过调控植物次生代谢物合成途径中多个关键酶基因的表达,从而有效地激活或抑制整条代谢途径,影响次生代谢产物的合成和积累。

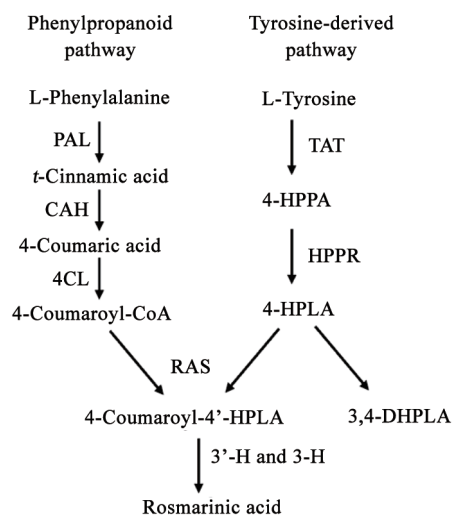


图1 丹参酚酸类化合物的生物合成途径(摘自Yan等2006)

Fig.1 Proposed phenolic acids biosynthetic pathway of *S. Miltiorrhiza* (cited from Yan et al 2006)

迄今为止,已从众多植物中分离鉴定出能调控苯丙烷类代谢途径的转录因子。其中bHLH类转录因子广泛参与植物的生长发育和胁迫应答,尤其在植物次生代谢方面起着十分重要的调控作用。在水稻中发现含有173个bHLH转录因子,拟南芥含有158个,使它成为被子植物第二大转录因子(Xiong等2005)。本实验室在前期丹参转录组测序中得到1个bHLH基因序列,我们命名为*SmMYC*(EST序列号为Unigene15990_danshen)。氨基酸序列比对结果显示,*SmMYC*与其他植物参与苯丙烷类代谢调控的bHLH类转录因子具有较高的同源性。因此我们推测*SmMYC*在丹参苯丙烷类代谢途径也可能具有重要的调控作用。

随着分子生物学技术的快速发展, RNA干扰技术(RNA interference, RNAi)已经成为对基因进行沉默的有效工具。但该技术的缺陷在于同时存在对其他基因也进行潜在沉默的可能,即脱靶效应(off-target effect)。鉴于此,一种高效、特异的基因沉默技术应运而生,即artificial microRNA (amiRNA)介导的基因沉默。该方法是将针对靶基因设计出的相应amiRNA及其互补链amiRNA*替换植物中保守miRNA前体的miRNA-miRNA*结构,进而在植物细胞内被加工成能对靶基因进行特异沉默的amiRNA。amiRNA已经成功地在拟南芥、番茄、水稻和烟草等多种植物中甚至在单细胞藻类中得到应用(Molnar等2009),并被证实不论是通过组成型启动子还是组织特异性启动子表达,均能很好地实现目的基因的沉默(Shi等2010),具有高效性、高特异性以及无脱靶效应等优点。本实验利用拟南芥内源miR319a前体为骨架,构建了以沉默丹参*SmMYC*的amiRNA植物表达载体并对丹参进行了转化,旨在得到对该基因进行特异性沉默的转基因株系,为进一步探究丹参*SmMYC*的功能奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌DH5 α 和根癌农杆菌EHA105由本实验室保存。质粒pRS300由中科院遗传所提供。植物表达载体pCambia1302由本实验室保存。

1.2 植物材料与生长条件

本研究所用丹参种子购自陕西天士力植物药

业商洛有限责任公司商州丹参药源基地。

丹参种子用流水冲洗后用75%乙醇表面灭菌20 s, 用0.1%升汞溶液表面灭菌10 min, 无菌水冲洗7~8次, 种子置于MS基本培养基上萌发。无菌苗的培养条件: 温度(25±2) °C; 光周期16 h/ 8 h (昼/夜), 光照强度15~20 μmol·m⁻²·s⁻¹, 湿度60%~80%。

2 方法

2.1 人工microRNA的分子设计及克隆

利用在线软件WMD (<http://wmd2.weigel-world.org>)设计靶向丹参*SmMYC*基因的amiRNA、amiRNA*以及用于over-lapping PCR的引物I、II、

III、IV (表1)。通用引物A (5'-CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC-3')和B (5'-GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG-3')分别与pRS300质粒中MIR319a外围序列配对。

以质粒pRS300为模板, 在第一轮的PCR中首先扩增出amiRNAs前体的5'臂(片段a)、中心环(片段b)和3'臂(片段c), 然后以这3个片段的DNA混合物为模板, 以A和B为引物扩增覆盖整个前体d (Schwab等2006)。利用2%琼脂糖凝胶电泳回收纯化片段d, 连接至克隆载体PMD-18T中, 转化感受态DH5α, 挑取阳性克隆, 菌落PCR和酶切验证鉴定, 并测序确定。

表1 重叠PCR引物

Table 1 List of over-lapping PCR primers

amiRNA /amiRNA*	引物序列(5'→3')
I	GATTATGCTCAATCAGACTGCGATCTCTCTTTGTATTC
II	TCATTGATTCTCTTTGATTATGCTCAATCAGACTGCGATC
III	GATCACAGTCTGATTCAGCATATTCACAGGTCGTGATATG
IV	AGGAATATATATGTAGATCACAGTCTGATTCAGCATATTC

2.2 引入酶切位点

设计两端分别带有*Bg*III和*Bst*EII酶切位点的上、下游引物(5'-CATGGTNACCGATCGCAGTC-TGATTGAGCATAA-3'和5'-CATAGATCTGATCA-CAGTCTGATTCAGCATAT-3'), 以2.1得到的测序正确的质粒为模板扩增amiRNA/amiRNA*茎环结构。

2.3 植物表达载体构建

对测序验证正确的包含amiRNA的质粒和pCambia1302载体分别进行*Bg*III和*Bst*EII双酶切。回收相应大小目的片段, 用T4 DNA连接酶4 °C连接过夜。转化感受态DH5α, 挑选阳性克隆, 提取质粒DNA经菌落PCR和酶切验证鉴定后测序验证。构建示意图见图2所示。

2.4 丹参转基因植株的获得

利用液氮冻融法(Höfgen和Willmitzer 1988)将

植物表达载体pCambia1302-amiR-*SmMYC*转入根癌农杆菌EHA105感受态细胞中, 按照Yan和Wang (2007)建立的农杆菌介导的丹参外源基因转化方法浸染丹参叶片。经过200 mg·L⁻¹头孢霉素和4 mg·L⁻¹潮霉素B筛选后得到转化株系。

2.5 转基因丹参株系DNA水平的检测

转化丹参植株DNA的提取采用杭州博日植物DNA提取试剂盒进行。根据表达载体上的CaM-V35S启动子序列和amiRNA序列设计PCR检测引物, 对抗性苗进行PCR检测, PCR上、下游引物分别为5'-CATAGATCTGATCACAGTCTGATTCAG-CATAT-3'、5'-ACCTAACAGAACTCGCCG-TAAAG-3'。

2.6 转基因株系中amiRNA、*SmMYC*以及酚酸合成途径中酶基因表达水平的Real-time PCR检测

Trizol法提取丹参阳性转化株系叶片总RNA。



图2 amiRNA植物表达载体构建示意图

Fig.2 Construction scheme of amiRNA plant expression vector

首先用DNase去除总RNA中基因组DNA, 然后采用PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa)进行cDNA反转录以及One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)进行amiRNA的polyA加尾及其反转录反应。amiRNA实时荧光定量PCR所用的下游引物为试剂盒通用引物Uni-miR qPCR Prime, 其他所用引物见表2。PCR的反应程序为: 94 °C, 1 min; 94 °C, 10 s; 60 °C, 25 s (40 cycles)。反应结束后, 以丹参*ubiquitin*作为内参基因, 荧光信号值采用“比较Ct值的相对定量法”进行基因表达定量分析。每个样品反应进行3个重复。

表2 实时荧光定量PCR分析所用引物序列
Table 2 List of primers used for real-time PCR analysis

引物	序列(5'→3')
<i>SmUbi</i> -F	ACCCTCACGGGAAGACCATC
<i>SmUbi</i> -R	ACCACGGAGACGGAGGACAAG
MiRNA Forward Primer	GACTGCGATCTCTCTTTGTATTCC
<i>SmMYC</i> -F	GATGGCTACTGCAAATCAAAAGG
<i>SmMYC</i> -R	AATCTTTTGGATAATTCTCTGAAG
<i>SmPAL1</i> -F	GATAGCGGAGTGCAGGTCGTAC
<i>SmPAL1</i> -R	CGAACTAGCAGATTGGCAGAGG
<i>Sm4CL</i> -F	TCGCCAAATACGACCTTTCC
<i>Sm4CL</i> -R	TGCTTCAGTCATCCCATAACC
<i>SmTAT</i> -F	CAACTGCTGGTCTTCCACAAAC
<i>SmTAT</i> -R	GCGAGCCAAAACGGACA
<i>SmHPPR</i> -F	TGACTCCAGAAAACAACCCACATT
<i>SmHPPR</i> -R	CCCAGACGACCCTCCACAAG
<i>SmRAS</i> -F	GCAAACGAGCACCACCTATCC
<i>SmRAS</i> -R	GTCTTGGAGCGGGTTTCG

2.7 总酚含量测定

每个待测株系选取3株40 d左右长势较一致的植株, 分别取根于30 °C烘干直至恒重, 研磨粉末过40目筛, 称取20.0 mg待测样品, 加入1 mL提取液(甲醇:丙酮=7:3, V/V), 30 °C超声萃取20 min, 3 824×g离心上清液用于水溶性酚酸的提取。本实验总酚含量的测定采用Folin-Ciocalteu法(Zhang等2010)。每个样品反应进行3个重复。

实验结果

1 amiRNA/amiRNA*茎环结构序列的获得及鉴定

以质粒pRS300为模板, over-lapping PCR结果如图3-A, 片段大分别为256 bp、176 bp及298 bp。以这3个片段的DNA混合物为模板扩增整个前体

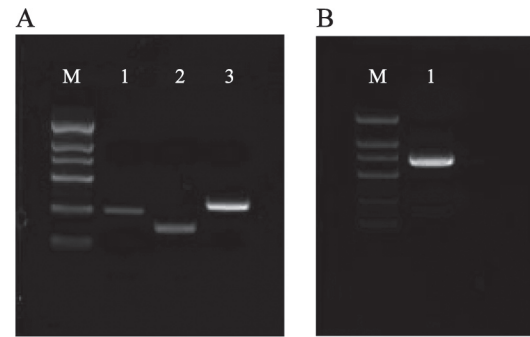


图3 *SmMYC* amiRNA-amiRNA*茎环结构的PCR扩增
Fig.3 PCR amplification of *SmMYC*-amiRNA stem-loop structure

A: PCR扩增amiRNAs前体的a、b、c片段, 1、2、3泳道分别为a、b、c片段的PCR产物; B: amiRNA-amiRNA*茎环结构的PCR扩增1泳道为amiRNA-amiRNA*茎环结构的PCR产物。图中M为DL2000分子量标准, 条带由上到下分别表示2 000、1 000、750、500、250和100 bp, 图5和图6同此。

的片段, 大小为680 bp, 与预期结果相一致(图3-B)。测序结果表明, 拟南芥内源miR319a前体序列中除了miRNA-miRNA*结构被amiRNA-amiRNA*替换外, 其他碱基构成没有发生任何变化, 从而保证了所构建的人工amiRNA序列能够形成与拟南芥内源miR319a前体一样的茎环结构(图4)。

2 *SmMYC* amiRNA植物表达载体的构建

以上面得到的质粒为模板, 用两端加入了酶切位点的上下游引物扩增amiRNA/amiRNA*序列; 经纯化后用*Bst*EII和*Bg*II进行双酶切, 植物表达载体pCambia1302也用*Bst*EII和*Bg*II进行双酶切(图5-A)。片段经回收、连接、转化后挑取阳性克隆, 进行PCR鉴定(图5-B)。测序结果显示, 重组植物表达载体上不仅含有amiRNA/amiRNA*茎环结构序列, 而且插入位点准确的位于CaMV35S启动子后, 命名为pCambia1302-amiRNA-*SmMYC*。

3 转基因丹参株系DNA水平的PCR检测

将筛选所得到的20个独立转化株系分别提取基因组DNA进行PCR检测。检测结果显示, 再生得到的20个独立转化株系中均扩增得到了750 bp的目的条带(图6), 与预期大小一致, 说明这些转化株系中amiRNAs前体已经成功整合到丹参基因组中。从图中可以看出, 不同泳道的扩增条带亮度并不一致。导致这种结果的原因, 一方面可能与每一个株系所提的DNA纯度不一所导致PCR扩增

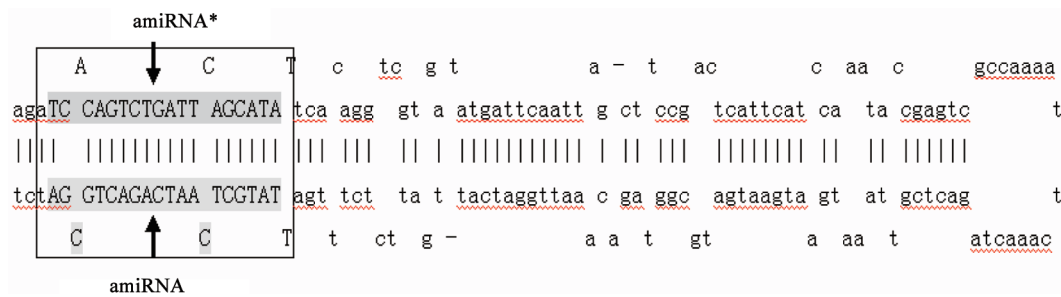


图4 *SmMYC*-amiRNA前体序列折叠后的茎环结构

Fig.4 The representative fold-back structure of *SmMYC*-amiRNA stem-loop
方框内为amiRNA-amiRNA*。

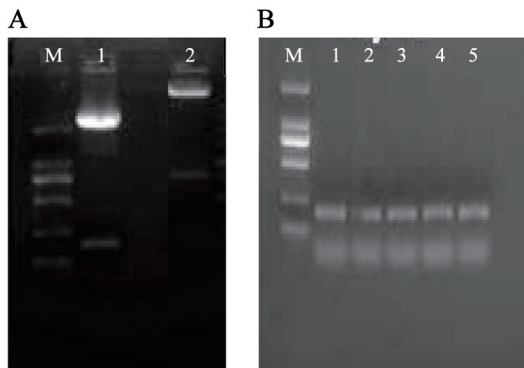


图5 amiRNA植物表达载体的构建

Fig.5 construction of amiRNA plant expression vector

A: *Bst*EII和*Bgl*II进行双酶切, 1: amiRNA/amiRNA* PCR扩增产物双酶切, 2: pCAMBIA1302双酶切; B: pCAMBIA1302-amiRNA-*SmMYC*菌落PCR验证, 泳道1~5: 随机挑选的菌落PCR扩增。

效率的差异, 另一方面可能是amiRNAs前体的插入位点的拷贝数不一样。

4 转基因株系amiRNA及靶基因*SmMYC*的表达分析

我们随机选取上述PCR检测结果显示为阳性

的6个独立转化株系进行Real-time PCR (依次标记为1#~6#)。结果显示, 与对照(未转化野生丹参)相比, 转化株系中amiRNA都呈现不同程度的过表达(图7-A, 其中, 除5#转化株外(可能与cDNA质量不好有关), 其他转化株均能较好的说明amiRNA对靶基因的切割效果: 1#株系中amiRNA的表达水平最高, 其次是4#、2#、3#, 而6#中amiRNA基本无表达。靶基因*SmMYC*的结果显示, 1#表达量最低, 其次是4#、2#、3#, 而6#中*smMYC*表达水平基本与野生丹参一致(图7-B)。以上结果说明, 本实验构建的amiRNA前体序列能够在丹参细胞内能被正确地加工成成熟的amiRNA, 进而介导对*SmMYC* mRNA的剪切, 从而对*SmMYC*进行基因沉默。

5 酚酸代谢途径中酶基因的表达变化

为了进一步探究*SmMYC*对丹参体内水溶性酚酸代谢途径的调控作用, 我们选取*SmMYC*沉默效果较好的的1#和4#株系, 分别对*PAL1*、*4CL*、*TAT*、*HPPR*以及*RAS*酶基因的表达水平进行Real-time PCR检测。结果如图8所示, 与对照株系相比, 转化株系中上述酶基因的表达均表现为不同程度

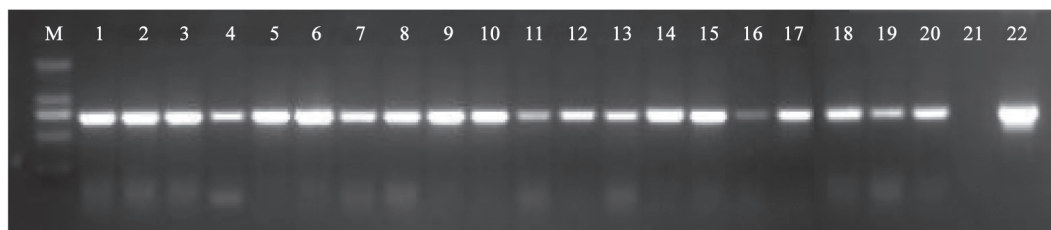


图6 转化株的PCR验证

Fig.6 PCR identification of the transgenic plantlets

1~20泳道: 各独立转化株系; 21泳道: 野生型植株(阴性对照); 22泳道: pCambia1302-amiRNA-*SmMYC*质粒(阳性对照)。

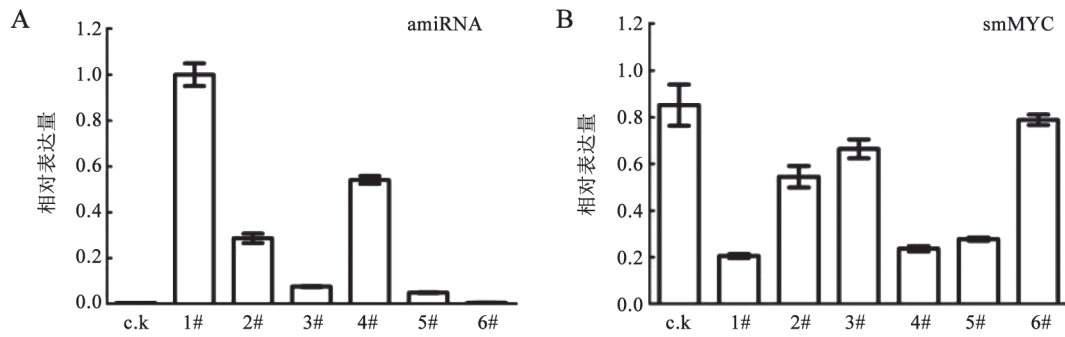


图7 amiRNA及SmMYC的Real-time PCR检测

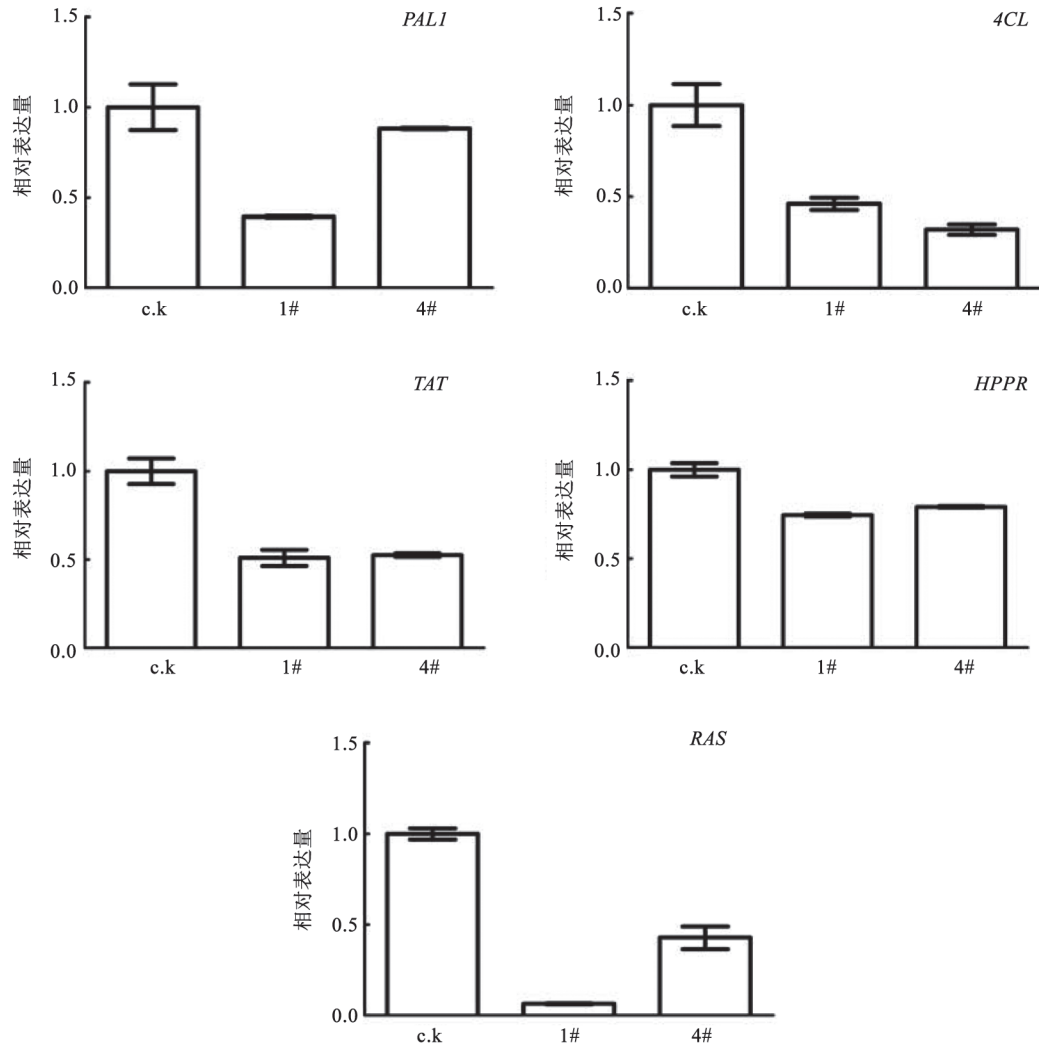
Fig.7 The Real-time PCR assay for expression level of the both amiRNA and *SmMYC*A: amiRNA在不同转化株系中的表达水平; B: *SmMYC*在不同转化株系中的表达水平; c.k: 野生型丹参。

图8 丹参酚酸合成途径相关酶基因的表达水平

Fig.8 The relative expression level of the enzyme genes involved in the phenolic acid biosynthesis of *Salvia miltiorrhiza**PAL1*: 苯丙氨酸解氨酶基因1; *4CL*: 4-香豆酰CoA连接酶基因; *TAT*: 酪氨酸氨基转移酶基因; *HPPR*: 羟苯基丙酮酸还原酶基因; *RAS*: 迷迭香酸合酶基因; c.k: 野生型丹参。

地降低, 其中, *RAS*的下调效果最为显著。同时, 除*4CL*基因外(可能由于加样误差导致), 1#中相应的酶基因的表达均低于4#, 与*SmMYC*的表达丰度呈现出一定的正相关性。上述结果初步显示, *SmMYC*可能作为丹参酚酸代谢途径中的一个重要转录因子参与对相关酶基因的表达调控。

6 总酚含量分析

以没食子酸为标准品, 采用Folin-Ciocalteu法, 在5~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内, 以平均吸光度值为横坐标, 以没食子酸浓度为纵坐标制作标准曲线, 进行线性回归并考察线性关系, 得到标准品的回归方程为 $y=0.1415x-0.0171$ ($R^2=0.9998$)。检测结果如图9所示, 阳性转化株系1#和4#中总酚酸含量分别只有对照株系的17.24%和18.79%, 显著低于对照野生型丹参, 而且1#和4#总酚酸含量减少值与*SmMYC*的下调幅度也呈现正相关性, 进一步显示*SmMYC*可能在丹参酚酸类成分合成中具有重要的作用。

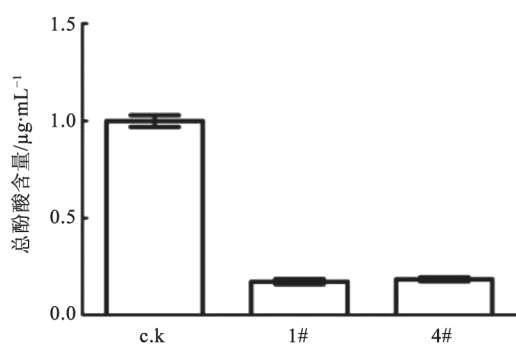


图9 阳性转化株系和野生型对照的总酚酸含量比较
Fig.9 Total phenolic content comparison between positive transgenic lines and control

讨 论

与常规的RNAi相比, amiRNA策略具有多个优势, RNAi策略中的茎环结构会产生多种不同siRNA, 而miRNA的前体一般只产生一种有效的miRNA, 这就使得amiRNA能够较为精确的实现靶基因的切割; 在本实验中, 为了提高靶基因沉默的特异性, 我们设计amiRNA时严格遵循其设计原则(Schwab等2006)。但鉴于丹参的基因组序列还未知, 加之*SmMYC*所属的bHLH是一个较大的

基因家族, 所以我们在对*SmMYC*设计amiRNA时, 尽量选择*SmMYC*的基因非保守区域来进行。同时考虑到设计出的amiRNA前体序列能够在丹参体内被正确的识别和切割, 因此amiRNA和amiRNA序列之间的碱基配对模式也完全模仿拟南芥miR319a前体序列中miRNA和miRNA*的序列结构特征。另外Park等(2009)发现, amiRNA与靶标基因完全配对反而能增强基因沉默的效果, 而且并未造成明显的脱靶现象。因此, 我们在成熟amiRNA和目标基因*SmMYC*间引入1~2个不配对的碱基。鉴于丹参中bHLH基因家族序列信息的限制, 本实验中amiRNA是否具有脱靶问题, 我们无法检测, 下一步将用modified 5'RACE进一步来鉴定amiRNA对*SmMYC*的确切切割位点。

大量研究表明, amiRNA过表达能介导大多数靶基因转录后水平的大幅下调, 同时在表达水平上amiRNA与其靶基因呈现明显的负相关性。然而amiRNA所靶定的基因在mRNA水平虽然都可被下调, 但下调程度却不尽相同。在本实验中, 我们发现虽然大部分转化株系中*SmMYC*表达水平与amiRNA的表达量呈现明显的负相关, 但是2#与5#相比, 虽然这两个株系中*SmMYC*都表现为下调的趋势, 2# amiRNA水平明显高于5#, *SmMYC*的下调幅度却不及5#。造成这种现象的原因可能与2#株系中T-DNA的插入位点有关, 由于影响*SmMYC*表达水平的并非只有miRNA一个, 可能T-DNA的插入影响了调控*SmMYC*的其他蛋白因子的表达; 另外一种情况可能是丹参体内内源miRNA与amiRNA两者在与RISC复合体结合时存在竞争, 因而导致不同株系中amiRNA对其靶基因的调控程度不一。

本研究通过构建人工microRNA植物表达载体对丹参*SmMYC*基因进行特异性沉默, 获得了*SmMYC*表达量不同程度下调的阳性转化株系, 分析发现*SmMYC*的下调不仅导致酚酸合成途径中相关酶基因表达量的降低, 而且进而影响了酚酸类成分的积累。初步推断*SmMYC*可能作为一个重要的转录因子参与了丹参酚酸类次生代谢产物的调控, 为进一步深入进行*SmMYC*转录因子的功能研究奠定了基础。

参考文献

国家药典委员会(2010). 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科

- 技出版社, 70~71
- 李国樟, 曹庸, 卜晓英(2010). 丹参活性成分的药效药理作用. 农技术服务, 27 (7): 889~890
- Höfgen R, Willmitzer L (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. Nucl Acids Res, 16 (20): 9877
- Li YG, Song L, Liu M, Hu ZB, Wang ZT (2009). Advancement in analysis of *Salviae miltiorrhizae* Radix et Rhizoma (Danshen). Chromatogr A, 1216: 1941~1953
- Liu AH, Guo H, Ye M, Lin YH, Sun JH, Xu M, Guo DA (2007). Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. Chromatogr A, 1161: 170~182
- Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, Schwach F, Karkare S, Ossowski S, Weigel D, Baulcombe D (2009). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J, 58 (1): 165~174
- Park W, Zhai J, Lee JY (2009). Highly efficient gene silencing using perfect complementary artificial miRNA targeting *API* or heteromeric artificial miRNA targeting *API* and *CAL* genes. Plant Cell Rep, 28: 469~480
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18 (5): 1121~1133
- Shi R, Yang C, Lu S, Sederoff R, Chiang VL (2010). Specific down-regulation of *PAL* genes by artificial microRNAs in *Populus trichocarpa*. Planta, 232 (6): 1281~1288
- Xiong Y, Liu T, Tian C, Sun S, Li J, Chen M (2005). Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. Plant Mol Biol, 59: 191~203
- Yan Q, Shi M, Ng J, Wu HY (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Sci, 170: 853~858
- Yan YP, Wang ZZ (2007). Genetic transformation of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. Plant Cell Tissue Organ Cult, 88: 175~184
- Zhang Y, Yan YP, Wang ZZ (2010). The *Arabidopsis* PAP1 transcription factor plays an important role in the enrichment of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza*. J Agric Food Chem, 58: 12168~12175