

• 药材与资源 •

桑黄 HMGS 基因克隆、分子特性及差异表达分析

孙婷婷¹, 刘增才², 王世新², 王旭彤², 邹莉^{2*}

1. 哈尔滨学院食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150086

2. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 对参与桑黄三萜合成途径的关键酶羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase, HMGS) 进行基因全长克隆、分子特性及差异表达分析研究。方法 采用 RACE 技术克隆 HMGS 基因全长, 并对其序列进行生物信息学分析; 构建桑黄 HMGS 基因到表达载体 pET-32a (+) 上, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达后 SDS-PAGE 检测; 用荧光定量 PCR 的方法分析其不同发育阶段表达特性。结果 HMGS 基因 cDNA 全长为 1 930 bp, 包含 1 个 1 458 bp 的完整开放阅读框, 编码 485 个氨基酸。该基因编码蛋白的相对分子质量约为 52 750, 理论等电点是 5.60, 为亲水性蛋白, 不具有跨膜结构, 不含信号肽序列; 系统发育分析表明, 桑黄 HMGS 与地中海拟层孔菌 *Fomitiporia mediterranea* 中的 HMGS 同源性最高, 属于一个分支。SDS-PAGE 结果显示该蛋白的大小与预测的蛋白相对分子质量基本一致。HMGS 基因的转录水平在桑黄不同发育阶段呈动态变化, 该基因在菌丝体阶段的转录水平要高于原基及子实体阶段的转录水平。HMGS 基因的最高转录水平出现在第 14 天, 为对照第 5 天的 2.33 倍。结论 HMGS 基因的分子鉴定为进一步解析该基因在桑黄三萜类物质合成代谢途径中的分子调控作用奠定基础。

关键词: 桑黄; HMGS 基因; 三萜化合物; 表达分析; RACE

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5823-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.025

Cloning, molecular properties and differential expression analysis of HMGS gene from *Sanghuangporus baumii*SUN Ting-ting¹, LIU Zeng-cai², WANG Shi-xin², WANG Xu-tong², ZOU Li²

1. Department of Food Engineering, Harbin University, Harbin 150086, China

2. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To clone and characterize a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS) gene which involved in the triterpenoid biosynthesis pathway in *Sanghuangporus baumii*. **Methods** The HMGS gene cDNA full-length sequence was cloned by RACE technology. Characteristics including the physicochemical properties and conserved domain of the deduced HMGS protein were determined by a series of bioinformatics tools. The entire protein-coding cDNA of HMGS was cloned into the expression vector pET-32a (+). Then the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells. With IPTG induction, SDS-PAGE was used to investigate the situation of expression. Additionally, qRT-PCR technology was performed to measure the transcript levels of HMGS gene in the triterpenoid pathway during different developmental stages of *S. baumii*. **Results** The full-length nucleotide sequence of HMGS was 1 930 bp, containing a complete open reading frame of 1 458 bp which encoded a polypeptide of 485 amino acids. Bioinformatics analysis of the amino acid sequence showed that the molecular weight of encoded protein was 52 750, and theoretical isoelectric point was 5.60. This protein was a hydrophilic protein, without transmembrane and signal peptide sequence. The constructed phylogenetic tree showed that HMGS from *S. baumii* had the highest similarity with HMGS from *Fomitiporia mediterranea*. The prokaryotic expression vector pET-32a-HMGS was successfully obtained. SDS-PAGE results showed that a significant protein band was in consistent with molecular weight of the predicted protein. Moreover, the results showed that the transcript levels of HMGS gene were in dynamic change. The transcript levels in the mycelium stage were higher than that in the fruiting body stage. For instance, the highest transcript level of HMGS was at 14 d and was 2.33-fold higher than the 5 d. **Conclusion** Molecular characterization of HMGS

收稿日期: 2019-02-03

基金项目: 哈尔滨学院青年博士科研启动基金项目 (HUDF2018105)

作者简介: 孙婷婷 (1988—), 女, 博士, 讲师, 主要从事资源微生物研究。E-mail: stt_fighting@126.com

*通信作者 邹莉 (1966—), 女, 博士, 教授, 主要从事食用菌技术研究。E-mail: 13903650896@163.com

will be useful for further functional elucidation of the gene involving in triterpenoid biosynthesis pathway in *S. baumii*.

Key words: *Sanguangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai; HMGS gene; triterpenoids; expression analysis; RACE

桑黄 *Sanguangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai 是一种十分珍贵的大型药用真菌,在我国有着悠久的药用历史,具有抗肿瘤、保护肝脏、降血糖、治疗炎症、抗衰老及增强机体免疫力等多种功效^[1-3]。根据其功能成分以及药理药效方面的研究报道表明,桑黄的主要活性成分是三萜、多糖、黄酮类等化合物^[4-6]。药用真菌中活性成分的含量与生物合成途径中相关功能基因的表达式有着紧密的相关性,随着分子生物学技术的不断发展,通过现代生物技术开发药用真菌功能基因的研究已成为当前研究的重点。

药用植物三萜生物合成主要通过存在于细胞质和内质网中的甲羟戊酸 (MVA) 途径合成。羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase, HMGS) 是 MVA 途径中的第一个合成酶,催化乙酰 CoA 与乙酰乙酰 CoA 缩合生成羟甲基戊二酰 CoA (HMG-CoA),该化合物可继续被羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, HMGR) 催化成甲羟戊酸,即萜类 5 碳单位异戊烯焦磷酸 (isopentenyl diphosphate, IPP) 的前体^[7]。自从 HMGS 第 1 次被 Rudney 纯化和证明其功能后^[8],目前已从多种药用植物和真菌中分离、克隆到 HMGS 基因,如丹参^[9]、洋常春藤^[10]、陆英^[11]、灵芝^[12]等。研究表明, HMGS 的活性与植物细胞中的类异戊二烯化合物如橡胶、树胶、乳干胶等的含量呈正相关^[13];过量表达 HMGS 基因,灵芝三萜、印度芥菜的甾醇含量及其抗逆性可显著提高^[12,14],可见, HMGS 基因对植物细胞类萜物质合成及生长发育至关重要。桑黄中类萜合成关键酶 HMGS 可能在桑黄三萜合成过程中起作用。本研究以桑黄转录组数据为依据,通过 RACE 技术克隆到桑黄 HMGS 基因的 cDNA 全长序列并进行生物信息学分析。对桑黄 HMGS 基因进行原核表达及采用实时荧光定量 PCR 技术对其在不同发育阶段的表达特性分析研究,旨在为深入研究该基因在桑黄三萜合成途径中的分子调控作用奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

桑黄菌株 DL101 由本实验室分离,东北林业大

学邹莉教授鉴定为桑黄 *Sanguangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai, 该菌株 ITS 序列 GenBank 登录号 KP974834。菌株保存于东北林业大学林学院森林保护学科实验室。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、cDNA 反转录试剂盒 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H)、克隆载体 pMD18-T vector、DLMarker 2000、大肠杆菌 DH5 α 均购自大连宝生物工程有限公司;RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 提取试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自北京天根公司;质粒提取试剂盒 (Omega 公司, 美国);SMARTerTM RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech 公司, 美国);限制性内切酶 (NEB 公司, 美国);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒 (Solarbio 公司, 北京);蛋白质 Marker (TransGen 公司, 北京);2 $\times$ RealStar Green Power Mixture (Genstar 公司, 深圳);其余药品均为国产分析纯。本实验中所用引物序列如表 1 所示。

2 方法

2.1 桑黄总 RNA 提取

使用 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取桑黄菌丝体总 RNA,按照试剂盒说明书进行。将提取到的总 RNA 消化 DNA 后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,并用 Eppendorf 核酸分析仪检测 RNA 的纯度和浓度。

2.2 桑黄 HMGS 基因片段的克隆

搜索网上已知数据库中 HMGS 基因,与本实验室测得的桑黄转录组数据进行比对,仅检测到 1 个 HMGS 基因片段,Unigene28750^[15],根据其设计引物 HF1 和 HR1 (表 1);以反转录后 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,50 μ L 反应体系: ddH₂O 34.5 μ L、10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L、引物 HF1、HR1 (10 μ mol/L) 各 2 μ L、cDNA 模板 2 μ L 和 Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s、58 $^{\circ}$ C、30 s、72 $^{\circ}$ C、40 s, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 结束。将获得的 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收,连入 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态,并进行蓝白斑筛选,将获得带有目的产物的阳性克

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列 (5'→3')
HF1	GACTCCAAGAACGCCTGCTACGG
HR1	GCGCAATGCATAGATGGGAGG
3' GSP-H	TGCATCTCAGAGGAGGACCTTGAAGTGT
5' GSP-H	AGGCATTGTCGAGAGCAGTGATGTAGG
HF2	TGTCGCTGTTGTATCGCTTC
HR2	GAATGGAGAGGGAGAAGTAACA
ORF-F-N	CATGCCATGGATGGTTGCTGCGCCCAATTCTGT
ORF-R-B	CGCGGATCCTTATGCTATCGGAGCACGGGCGTAT
HF-qRT	CGAGAAGACTGCGAGGCGATAC
HR-qRT	TGGGACTTGAGGGATTGGAGAGG
α -tubulin-F	CCAGCAAGCGTTACCGATT
α -tubulin-R	TCCACGACGTCCATCGTTC
β -tubulin-F	GCTGAATATCGTTCGTGCC
β -tubulin-R	ATCCGCCTTCCTCCTTACAGT

隆质粒进行测序，测序由哈尔滨博仕公司完成。

2.3 3'RACE 和 5'RACE 的扩增

根据 HMGS 基因片段的测序结果，在序列内部设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物 3'GSP-H 和 5'GSP-H (表 1)。采用 SMARTerTM RACE cDNA Amp-lification Kit 分别扩增该基因 cDNA 的 3'端和 5'端。3'RACE 和 5'RACE 分别以 3'/5'RACE-ready first-strand cDNA 为模板，按照 Advantage 2 PCR Kit 说明操作，反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C、30 s, 65 °C、30 s, 72 °C、40 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 终止反应。PCR 产物克隆及测序等方法同“2.2”项。

2.4 桑黄 HMGS 基因全长 cDNA 的克隆

用 DNAMAN 对 3'RACE 和 5'RACE 所得序列进行拼接得到 HMGS 基因 cDNA 全长，根据全长 cDNA 序列设计引物 HF2 和 HR2 (表 1)，引物由哈尔滨博仕公司合成。以 cDNA 为模板，反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C、30 s, 58 °C、30 s, 72 °C、1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 终止反应。PCR 产物克隆及测序等方法同“2.2”项。

2.5 生物信息学分析

采用 ExPASy 服务器上的 ProtParam tool 软件 (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) 对 ORF 编码的氨基酸序列进行分析。根据 ExPASy 服务器上的 ProtScale 软件 (<http://web.expasy.org/protscale/>)

对氨基酸的亲/疏水性分析。使用在线工具 TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对蛋白的跨膜区进行分析。使用 SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.1/>) 对蛋白的信号肽进行分析。运用多变量线性回归组合预测法 (multivariable linear regression combination, MLRC, 网址 https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_mlr.pl) 对蛋白的二级结构进行预测。采用比较建模法，运用 SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>) 对蛋白的三级结构进行预测。下载与目标序列相似性较高的氨基酸序列，用 Clustal X 和 MEGA5.0 软件构建系统进化树。

2.6 桑黄 HMGS 基因原核表达

2.6.1 重组质粒 pMD18-T-HMGS 的构建 根据前期获得的 HMGS 基因 ORF 序列，使用 Primer Premier 5.0 进行分析，设计引物 ORF-F-N 和 ORF-R-B (表 1)，上下游引物分别引入 *Nco* I 和 *Bam*HI 酶切位点。以反转录合成的 cDNA 第 1 链为模板，进行 PCR 扩增。扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 35 个循环; 最后再 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经电泳检测后用 DNA 凝胶回收试剂盒进行目的条带回收。回收产物与 pMD18-T vector 进行连接，转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，筛选阳性克隆，进一步扩大培养后提取质粒并送至哈尔滨博仕生物公司测序。

2.6.2 桑黄 HMGS 基因原核表达载体的构建 将测序阳性的 pMD18-T-HMGS 和 pET-32a 质粒分别用 *Nco* I 和 *Bam*HI 限制性内切酶进行双酶切，双酶切反应体系为 100 μ L: 含 10 μ L 10 $\times$ Fast Digest Green Buffer, 30 μ L 质粒 DNA, *Nco* I、*Bam*HI 限制性内切酶各 5 μ L, 50 μ L ddH₂O, 反应条件为 37 °C 水浴锅中酶切 30 min。酶切产物经电泳检测回收后用 T4 连接酶进行连接。连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞，筛选阳性转化子，进一步扩大培养后提取质粒，进行酶切验证，将验证后的菌液保存备用。

2.6.3 重组载体的诱导表达 获得的阳性克隆接种至含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中，37 °C 培养 12~14 h。取 500 μ L 菌液接种至 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中，37 °C, 200 r/min 振荡培养至 A_{600} 为 0.5~0.8 时，取出 1 mL 菌液作为阴性

对照,同时设立未经诱导的空载体(只含 pET-32a)作对照,剩余的菌液中加 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)进行诱导表达,28 ℃,200 r/min 振荡培养,每隔 2 h 吸取 1 mL 菌液,取到 10 h 截止,将取到的菌液 10 000 r/min 离心 10 min.,弃上清,收集菌体,进行 SDS-PAGE 鉴定。

2.7 HMGS 基因在不同发育阶段的表达特性分析

2.7.1 桑黄菌丝体的发酵培养

待桑黄菌丝长满整个 PDA 平板培养基后,用灭过菌的打孔器($d=1$ cm)在平板边缘打孔,将菌龄一致的菌饼接种到 500 mL 摇瓶装 300 mL 的 PD 液体培养基中,每个摇瓶接种 10 块菌饼。25 ℃,180 r/min 振荡培养 5~14 d。分别收集培养 5、8、11、14 d 的桑黄菌丝体,置于-80 ℃保藏备用。

2.7.2 桑黄原种及栽培种培养

桑黄原种及栽培种培养方法参照杜萍等方法^[16]。将桑黄母种接入麦粒培养基后移入培养室,温度控制在 25~28 ℃,湿度为 65%~70%,遮光培养,15 d 左右获得原种。将桑黄原种接入栽培种培养料,温度控制在 25~28 ℃,空气相对湿度 70%以下。当桑黄菌丝达到生理成熟,可见突起的颜色稍深的瘤状子实体原基,继续培养 40 d 左右可见幼嫩子实体(图 1)。分别收集原基和幼嫩子实体并置于-80 ℃保藏备用。

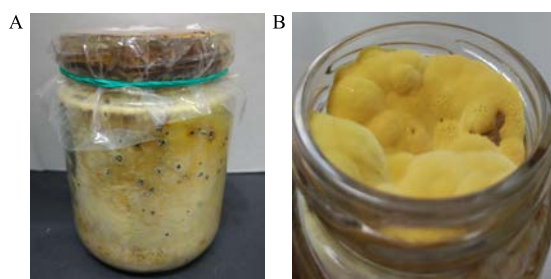


图 1 桑黄原基 (A) 和幼嫩子实体 (B)

Fig. 1 Primordium (A) and young fruiting body (B) of *S. baumii*

2.7.3 实时荧光定量 PCR 反应

将收集到的菌丝体、原基及幼嫩子实体从-80 ℃冰箱取出,置于液氮下快速研磨成粉末,使用 RNeasy Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取桑黄不同发育时期的总 RNA。采用 TaKaRa 的反转录试剂盒合成 cDNA 第一链,qRT-PCR 反应在 Agilent Mx3000P 型核酸扩增荧光检测仪上完成,反应体系如下:10 μmol/L 正、反向引物 HF-qRT 和 HR-qRT(表 1)均为 0.4 μL,cDNA 模板 1 μL,2×RealStar Green Power Mixture 10 μL,ddH₂O 8.2 μL,总体积 20 μL;反应程序:

95 ℃、3 min;95 ℃、30 s,60 ℃、30 s,72 ℃、1 min,40 个循环;95 ℃、10 s,55 ℃、30 s,95 ℃ 30 s。每个反应重复 3 次。qRT-PCR 反应以 α -tubulin 和 β -tubulin 基因为内参(表 1)。扩增完成后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行计算^[17],分别计算每个内参基因与目的基因的相对表达量,并将二者做几何平均数^[18]作为双内参基因标准化结果。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 的提取及检测

以桑黄菌丝体为材料提取的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳结果如图 2-A 所示,有 2 条明显的条带,分别为 18 S rRNA 和 28 S rRNA,且 28 S 的亮度大约是 18 S 的 2 倍,说明所提取的 RNA 完整性较好;经 Eppendorf 核酸蛋白检测仪测得 A_{260}/A_{280} 平均值为 1.94,介于 1.8~2.1, $A_{260}/A_{230}=2.15>2$,表明提取的桑黄菌丝体总 RNA 纯度较高,无蛋白及盐离子污染,可用于后续实验。

3.2 HMGS 基因片段的获得

以桑黄总 RNA 反转录得到的 cDNA 第 1 链为模板,用所设计的引物在 500~750 bp 扩增到 1 条 HMGS 基因的特异片段(图 2-B),与预测结果相符。PCR 产物经纯化、测序后得到其序列,长度为 688 bp。

3.3 RACE 和 HMGS 全长 cDNA 序列分析

根据已获得的桑黄 HMGS 基因片段设计特异引物,通过 RACE-PCR 技术获得 3'端序列 1 887 bp(图 2-C)和 5'末端序列为 881 bp(图 2-D)。将 3'RACE 和 5'RACE 扩增片段克隆测序结果拼接得到全长 cDNA 为 1 946 bp。为了验证全长结果,根据拼接得到的全长序列设计引物,以 cDNA 第 1 链为模板,扩增桑黄 HMGS 基因全长序列并测序,扩增结果见图 2-E,在推断的位置得到单一清晰条带,测序结果与拼接结果一致。

根据 HMGS 全长基因测序结果,利用 NCBI 网站上的 ORF Finder 进行开放阅读框(open reading frame,ORF)查找,发现该序列包括 30 bp 的 5'UTR、442 bp 的 3'UTR 和长为 1 458 bp 的 ORF,共编码 485 个氨基酸。

3.4 HMGS 基因全长序列生物信息学分析

3.4.1 理化性质分析

ProtParam tool 分析结果表明 HMGS 基因编码蛋白的分子量约为 52 750,理论等电点 5.60,负电荷残基(Asp+Glu)总数为 60,正电荷残基(Arg+Lys)总数 53,总共包括 7 373 个原子,分子式为 C₂₃₄₀H₃₆₆₈N₆₂₆O₇₁₇S₂₂,脂肪指数为 81.94,

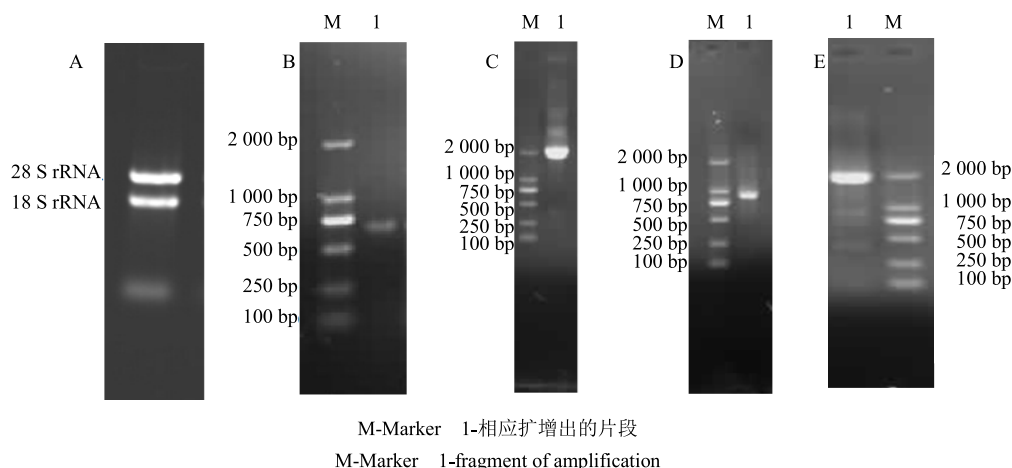


图 2 桑黄总 RNA (A)、HMGS 基因片段 (B)、3'RACE (C)、5'RACE (D) 和全长 (E) 凝胶电泳图
Fig. 2 Electropherograms of total RNA (A), fragment of HMGS gene (B), 3'RACE (C), 5'RACE (D), and full-length cDNA (E) of *S. baumii*

不稳定指数为 46.96, 表明该酶是一个不稳定的蛋白。ProtScale 分析显示蛋白亲水性氨基酸分布多于疏水性氨基酸, 推测蛋白为亲水性蛋白。TMHMM 2.0 分析显示 HMGS 蛋白的 1~485 位氨基酸全部位于细胞膜外, 不具有跨膜结构, 表明该蛋白为膜外蛋白。SignalP 4.1 分析结果表明该蛋白不含信号肽序列。

3.4.2 蛋白质二级、三级结构的预测 GOR 对 HMGS 蛋白进行二级结构预测, 结果表明该蛋白含有 α -螺旋 (alpha-helix) 136 个, 占 28.04%, 延伸链 (extended strand) 87 个, 占 17.94%, 无规卷曲 (random coil) 262 个, 占 54.02%。在该蛋白的整体结构中, α -螺旋和无规卷曲是桑黄 HMGS 蛋白主要的结构元件, 而并未发现 β -转角 (β -turn) 的存在。

SWISS-MODEL 分析结果表明 HMGS 蛋白三级结构预测图是以 HMG-CoA synthase (SMTL id: 2fa3.1) 的蛋白结构图模板得到的, 建模残基范围是第 28 位氨基酸到第 481 位氨基酸, 序列相似度为 51.15% (图 3)。

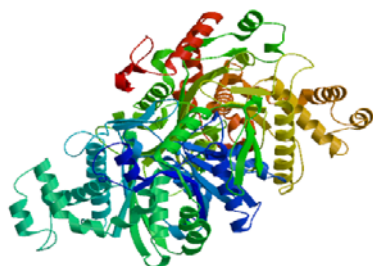


图 3 HMGS 蛋白三级结构预测
Fig. 3 Tertiary structures prediction of HMGS protein

3.4.3 HMGS 氨基酸序列的系统进化分析 将桑黄 HMGS 基因编码的蛋白序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对后, 发现 HMGS 序列与其中不同物种的羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶同源性最高达到 87%, 挑选与其具有较高同源性的 16 个其他物种的 HMGS 氨基酸序列, 用 Clustal X 软件进行同源性比后再用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树, 结果见图 4。从系统进化树上可以看出, 桑黄 HMGS 与地中海拟层孔菌 *Fomitiporia mediterranea* 中 HMGS 同源性较高, 属于一个分支。

3.5 桑黄 HMGS 基因原核表达载体的诱导表达

将重组质粒 pET-32a-HMGS 转化感受态细胞 BL21 (DE3) 后, 用 IPTG 诱导重组蛋白的表达, 结果如图 5 所示, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 空白对照菌体和阴性对照菌体都没有目的蛋白条带, 而转入

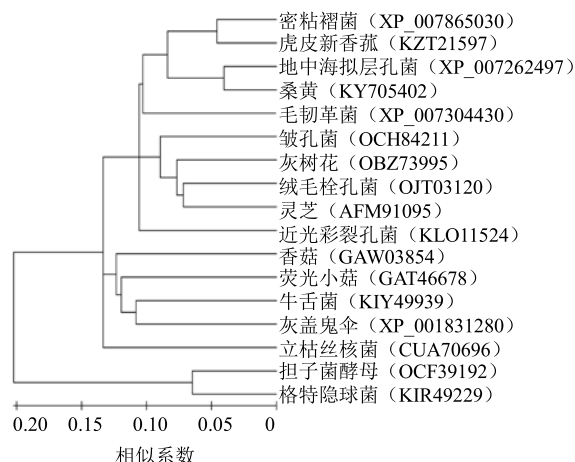


图 4 HMGS 系统进化分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of HMGS

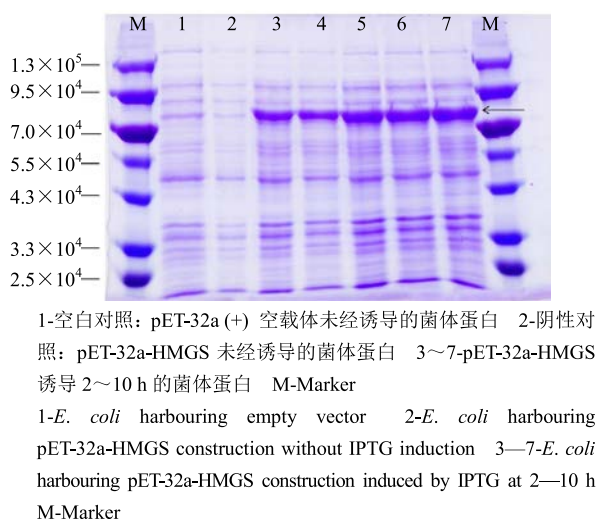


图 5 HMGS 基因诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 Heterologous protein expression in *E. coli* with IPTG induction

重组质粒 pET-32a-HMGS 的菌体经 IPTG 分别诱导 2、4、6、8、10 h 后, 在 70 000 上端有清晰蛋白条带 (箭头所示位置), 该蛋白相对分子质量大小与目的蛋白相似 (HMGS 全长蛋白相对分子质量约为 53 000, 与 HMGS 蛋白融合的 pET-32a 质粒标签蛋白约为 18 000, 目的蛋白大小为 71 000)。此外, 蛋白的表达量随着诱导时间的延长而增大, 且总体处于较高表达水平。

3.6 HMGS 基因在不同发育阶段的表达分析

分别收集桑黄 5、8、11、14 d 的菌丝体, 以及桑黄原基和幼嫩子实体, 提取它们的总 RNA 反转录成 cDNA, 采用 qRT-PCR 技术检测桑黄 HMGS 基因表达量。由图 6 可以看出该基因的转录水平在桑黄不同发育阶段呈动态变化。在菌丝体阶段的转录水平 (11 d 和 14 d) 要高于原基及子实体阶段的转录水平。菌丝体阶段, HMGS 基因的转录水平从第 5 天到第 14 天的变化趋势是先降低后升高, 从第 11 天开始增加, 到 14 d 达到最高值, 为第 5 天的 2.33 倍。

4 讨论

HMGS 基因在很多植物中已被成功克隆, 研究发现, 许多植物的 HMGS 基因存在多个拷贝的现象, 如芥菜 *Brassica juncea* (L.) Czern. et Coss. 中有 4 个 HMGS 基因 (BjHMGS1~BjHMGS4)^[19], 巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg. 中有 2 个 HMGS 基因, 分别为 HbHMGS1 和 HbHMGS2^[20]。在桑黄转录组中, 只检测到一个

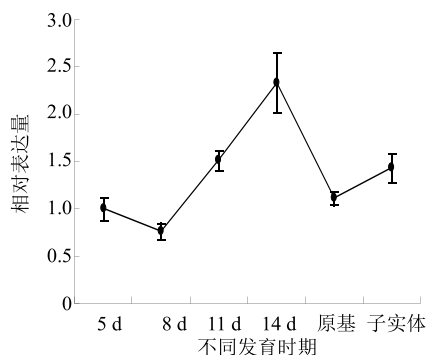


图 6 桑黄 HMGS 基因在不同发育阶段表达特性分析

Fig. 6 Expression profiles of HMGS gene at different developmental stages of *S. baumii*

HMGS 基因片段 Unigene28750^[15], 根据该基因片段, 本研究首次克隆获得了桑黄 HMGS 基因全长, 并进行了生物信息学分析。结果显示, 该基因编码的氨基酸具有典型的 HMGS 酶作用位点、模序和结构域, 这些结构都是 HMGS 行使功能时不可缺少的组成单位。基于桑黄 HMGS 基因 cDNA 全长, 进一步构建了原核表达载体 pET-32a-HMGS, 将重组质粒转化到 BL21 (DE3) 中, 成功诱导蛋白表达, 此外, 还考察了不同诱导时间对 HMGS 表达量的影响, 结果发现 HMGS 表达量随着 IPTG 诱导时间的延长而增大, 且总体处于较高表达水平。通过 SDS-PAGE 结果可以看出目的蛋白的含量明显高于杂蛋白, 说明 HMGS 在此系统中具有良好的表达效果。

目前有关药用植物三萜合成途径关键酶基因的研究报道较多, 研究者通常会对三萜合成途径中的一个或者多个关键酶基因在植物不同组织部位的表达特性进行分析。如姚元枝等^[11]利用 qRT-PCR 技术检测 HMGS 基因在陆英根状茎、地上茎、叶、花等器官中的表达特异性, 结果表明该基因主要在根状茎和花中表达, 在叶中的表达相对较低; 朱昀昊等^[21]通过测定荧光定量 PCR 表明, HMGS 基因在冬凌草组培苗叶和根中的表达量显著高于在组培苗花、茎和愈伤组织中的表达量。相比药用植物, 有关药用真菌三萜合成途径关键酶基因的研究报道最多的是灵芝。2013 年, 任昂等^[12]利用 Real Time RT-PCR 技术, 检测了灵芝不同发育阶段中 HMGS 在 mRNA 水平的表达差异。结果表明, HMGS 的转录水平以灵芝发育初期的菌丝体阶段最高, 而在三萜含量最高的原基时期较低, 作者认为 HMGS 可能同时受到了发育调节和甾醇的反馈抑制。

本研究在桑黄生长发育的不同阶段, 考察了

HMGS 基因的转录水平, 该基因的最高转录水平出现在菌丝体阶段, 而在原基和子实体阶段相对较低, 这与我们前期测得的桑黄菌丝体三萜量高于子实体三萜量的变化规律一致^[1]。桑黄 HMGS 基因功能的研究需要借助良好的转化体系, 桑黄遗传转化体系鲜有报道, 本实验室已初步构建了根癌农杆菌介导的桑黄遗传转化体系, 桑黄的转化工作正在进行。

参考文献

- [1] 张林芳, 孙婷婷, 邹莉, 等. 鲍姆纤孔菌总三萜的提取及其体外抗乳腺癌细胞 (MCF-7) 活性 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(5): 497-502.
- [2] Jeon T I, Hwang S G, Lim B O, et al. Extracts of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppress liver damage induced by carbon tetrachloride in rats [J]. *Biot Let*, 2003, 25(24): 2093-2096.
- [3] Kim D H, Yang B K, Jeong S C, et al. Production of a hypoglycemic, extracellular Polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus* [J]. *Biot Let*, 2001, 23(7): 513-517.
- [4] Yang Y, Ye L, Zhang J, et al. Structural analysis of a bioactive polysaccharide, PISP1, from the medicinal mushroom *Phellinus igniarius* [J]. *Biosc Biot Bioch*, 2009, 73(1): 134-139.
- [5] Wang G J, Tsai T H, Chang T T, et al. Lanostanes from *Phellinus igniarius* and their iNOS inhibitory activities [J]. *Planta Med*, 2009, 75(15): 1602-1607.
- [6] Park I H, Jeon S Y, Lee H J, et al. A β -secretase (BACE1) inhibitor hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus* [J]. *Planta Med*, 2004, 70(2): 143-146.
- [7] Liao P. Past achievements, current status and future perspectives of studies on 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase (HMGS) in the mevalonate (MVA) pathway [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(7): 1005-1022.
- [8] Rudney H and Ferguson Jr J J. The biosynthesis of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A in yeast: II. The formation of hydroxymethylglutaryl coenzyme A via the condensation of acetyl coenzyme A and acetoacetyl coenzyme A [J]. *J Biol Chem*, 1959, 234(5): 1076-1080.
- [9] Zhang L, Yan X M, Wang J, et al. Molecular cloning and expression analysis of a new putative gene encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Acta Physiol Plant*, 2011, 33(3): 953-961.
- [10] 孙化鹏, 钟晓红, 徐子健, 等. 洋常春藤 HMGS 基因克隆与表达分析 [J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(8): 3453-3459.
- [11] 姚元枝, 黎晓英, 郭文博, 等. 陆英 HMGS 基因 cDNA 克隆、不同器官中的差异表达及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1578-1582.
- [12] 任昂, 欧阳翔, 师亮, 等. 灵芝羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶基因的克隆及其表达特性 [J]. 菌物研究, 2013, 11(2): 142.
- [13] Suwanmanee P, Sirinupong N. *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms* [M]. New York: Springer, 2012.
- [14] Hui W, Nagegowda D A, Reetika R, et al. Overexpression of *Brassica juncea* wild-type and mutant HMG-CoA synthase 1 in Arabidopsis up-regulates genes in sterol biosynthesis and enhances sterol production and stress tolerance [J]. *Plant Biot J*, 2011, 10(1): 31-42.
- [15] Zou L, Sun T T, Li D L, et al. *De novo* transcriptome analysis of *Inonotus baumii* by RNA-seq [J]. *J Bios Bioengin*, 2016, 121(4): 380-384.
- [16] 杜萍, 张春风, 崔宝凯, 等. 药用真菌桑黄的人工栽培技术研究 [J]. 中国食用菌, 2009, 28(3): 35-37.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [18] Gharbi S, Shamsara M, Khateri S, et al. Identification of reliable reference genes for quantification of microRNAs in serum samples of sulfur mustard-exposed veterans [J]. *Cell J*, 2015, 17(3): 494-501.
- [19] Alex D, Bach T J, Chye M L. Expression of *Brassica juncea* 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase is developmentally regulated and stress-responsive [J]. *Plant J*, 2000, 22(5): 415-426.
- [20] Sirinupong N, Suwanmanee P, Doolittle R F, et al. Molecular cloning of a new cDNA and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase gene from *Hevea brasiliensis* [J]. *Planta*, 2005, 221(4): 502-512.
- [21] 朱昀昊, 昝梦航, 苏秀红, 等. 冬凌草 HMGS 基因的克隆与表达分析 [J]. 作物杂志, 2016(5): 25-30.