

• 药材与资源 •

桑黄鲨烯环氧酶基因克隆与序列分析

孙婷婷, 邹莉*, 张林芳, 张国权, 杨苑艺, 李晶莹

东北林业大学, 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鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE) 进行基因全长克隆和生物信息学分析。方法 以桑黄总 RNA 为模板, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术克隆桑黄 SE 基因的全长 cDNA 和 DNA 序列, 并通过 ExPASy 在线分析等方法对其进行生物信息学分析。结果 序列分析表明, SE 基因全长 2 145 bp, 包含 6 个外显子和 5 个内含子; 所克隆的 cDNA 全长为 1 856 bp, 包含 1 个 1 452 bp 的开放阅读框, 编码 483 个氨基酸的蛋白, 命名为 IbSE1, 预测该蛋白的相对分子质量为 5.3×10^4 , 等电点 (pI) 为 8.41, 无信号肽。结论 首次克隆并获得桑黄鲨烯环氧酶基因全长序列, 为进一步阐明桑黄三萜代谢途径和改善中药材品质奠定基础。

关键词: 桑黄; 鲨烯环氧酶; RACE; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)18-2768-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.18.018

Cloning and sequence analysis of squalene epoxidase gene from *Inonotus baumii*

SUN Ting-ting, ZOU Li, ZHANG Lin-fang, ZHANG Guo-quan, YANG Yuan-yi, LI Jing-ying

Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNA encoding squalene epoxidase (SE), which is the key enzyme involved in the triterpenoid biosynthesis pathway in *Inonotus baumii*, and analyze its bioinformatics. **Methods** Taking total RNA as template, the full length cDNA and DNA of SE in *I. baumii* was cloned through RT-PCR and the rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. The bioinformatics of SE gene were analyzed by ExPASy on line. **Results** Sequence analysis showed that it consisted of 2145 bp with an open reading frame (ORF) of 1 452 bp, encoding 483 amino acid polypeptides. SE gene contained six exons and five introns. The relative molecular mass of SE calculated was 5.3×10^4 , the isoelectric point (pI) was 8.41, and there was no signal peptide in SE. **Conclusion** It is the first report that the cDNA encoding SE from *I. baumii* is cloned. This work provides a scientific basis for exploring the triterpenoid biosynthesis pathway of the medicinal ingredient and improving its quality in *I. baumii*.

Key words: *Inonotus baumii* Pilát; squalene epoxidase; RACE; gene cloning; sequence analysis

鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase, SE), 又称鲨烯单加氧酶 (squalene monooxygenases), 催化鲨烯双键发生环氧化反应, 生成 2,3-氧化鲨烯, 该反应是三萜皂苷合成途径中的第一步氧化反应^[1], 进而经过一系列反应最终生成三萜类、甾醇、胆固醇等重要萜烯类物质, 其量和活性决定了后续产物的产量^[2], 因此 SE 是此类物质合成中一个关键限速酶^[3]。迄今为止, 已有很多生物 SE 基因被克隆和分析, 如酵母 *Saccharomyces cerevisiae*^[4]、人^[5]、大鼠^[6]、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.^[7]、五加科人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer^[8]、三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen^[9] 和刺五加

Eleutherococcus senticosus (Rupér. et Maxim.) Maxim.^[10]等。然而有关药用真菌 SE 基因的研究还未见报道。

桑黄 *Inonotus baumii* Pilát 作为一种名贵的药用真菌, 在我国医药领域有着悠久的历史, 据《中药大辞典》记载, 桑黄可治内科多种疾病, 其子实体入药, 味微苦, 能利五脏宣肠气等。现代医学研究表明, 桑黄对于治疗肝炎及癌症有着显著的治疗效果, 是目前国际公认的生物抗癌领域中最有效的大型药用真菌之一^[11]。桑黄含有丰富的活性成分, 其中多糖和三萜是主要药效成分, 具有抗氧化、抗病毒、降血压和抗肿瘤等多种活性^[12-14]。近年来,

收稿日期: 2015-03-24

基金项目: 博士研究生自主创新基金项目 (2572015AA07)

作者简介: 孙婷婷 (1988—), 女, 黑龙江鹤岗人, 在读博士研究生, 主要从事资源微生物研究。

*通信作者 邹莉 Tel: (0451)82190384 E-mail: zouli6616@yahoo.com.cn

尽管对于桑黄化学成分及药理活性的研究已有了很大进展,但有关桑黄分子生物学方面的研究还处于起步阶段,尤其是桑黄药用成分合成的分子机制鲜有报道。鉴于此,本研究首次克隆桑黄三萜合成关键酶 SE 基因 cDNA 的全长,将为进一步揭示桑黄三萜生物合成机制提供理论依据,并为利用基因工程改善中药材品质奠定基础。

1 材料

桑黄采摘自大兴安岭,由东北林业大学林学院潘学仁教授和邹莉教授鉴定为寄生于暴马丁香 *Syringa reticulata* (Blume) H. Hara var. *mandshurica* (Maxim.) Hara 的鲍氏层孔菌,后经分子生物学 ITS 鉴定为桑黄 *Inonotus baumii*, GenBank 登录号为 KP974834,分离纯化后保存于东北林业大学森林保护实验室。

2 方法

2.1 桑黄总 RNA 提取

采用 Trizol 法提取桑黄总 RNA,按照试剂说明书进行。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 SE 基因片段的克隆

搜索网上已知数据库中 SE 基因,与本实验室测得的桑黄转录组数据进行比对,找到转录组数据中与 SE 相似性最高的片段,并据此设计引物 P1: 5'-GCATTGAGGAAGAAGGCTCTCGCGG-3' 和 P2: 5'-CGGGCAAACCCTGTCCAGTAC-3',以反转录后 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,50 μ L 反应体系: ddH₂O 35.75 μ L、10 \times PCR 缓冲液 5 μ L、dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L、P1 (10 μ mol/L) 2 μ L、P2 (10 μ mol/L) 2 μ L、cDNA 模板 1 μ L 和 Taq DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.25 μ L。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 65 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 30 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 (Takara),转化大肠杆菌 DH5 α ,并进行蓝白斑筛选,将获得带有目的产物的阳性克隆质粒进行测序,测序由哈尔滨博仕公司完成。

2.3 5'RACE 和 3'RACE 的扩增

根据 SE 基因片段的测序结果,在序列内部设计 5'RACE 和 3'RACE 特异性引物 GSP1: 5'-AAGTTCTCCTTCGTTTCAGTCCCCG-3'和 GSP2: 5'-GCTCCCGCGCTCGAAGGAATTGAAG-3' 引物

由哈尔滨博仕公司合成。采用 Clontech 公司 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒分别扩增该基因 cDNA 的 5'端和 3'端。5'RACE 以 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 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。3'RACE 以 3'RACE-ready first-strand cDNA 为模板,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 68 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。PCR 产物克隆及测序等方法同“2.2”项。

2.4 桑黄 SE 基因 cDNA 全长和 DNA 全长的克隆

用 DNAMAN 对 5'RACE 和 3'RACE 所得序列进行拼接得到 cDNA 全长,根据 SE 基因全长 cDNA 设计引物:上游引物 5'-TACCCTTCATTTCCTCA-CCC-3';下游引物 5'-CTCGGTCCATCGACTGGG-ATTTC-3',引物由哈尔滨博仕公司合成。分别以桑黄基因组 DNA 和 cDNA 为模板,PCR 扩增 SE 基因的 DNA 和 cDNA,反应条件为 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;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ 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

序列的处理、翻译使用序列处理在线工具包进行。通过 NCBI 的 ORF Finder 查找该基因的开放阅读框 (ORF),分析起始密码子和终止密码子。相对分子质量与理论等电点 (pI) 预测等采用 ExPASy 在线服务器的 Compute Pi/Mw 工具,PSORT 服务器预测蛋白质的亚细胞定位;二级结构预测使用 ExPASy 在线服务器的 GOR 软件 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html),三级结构预测使用 SWISS-MODEL 服务器。通过 Blastx 寻找相似性序列,选择与 IbSE1 氨基酸序列相似性较高的 5 种不同 SE 氨基酸序列,利用 ClustalW2 软件对 6 个氨基酸序列进行多序列比对。

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 1-A 所示。图中 5.8 S、18 S、28 S 3 条带都较清晰,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 核酸蛋白检测仪检测,计算 A_{260}/A_{280} 平均值为 1.94,表明 RNA 纯度较高,可用于后续实验。

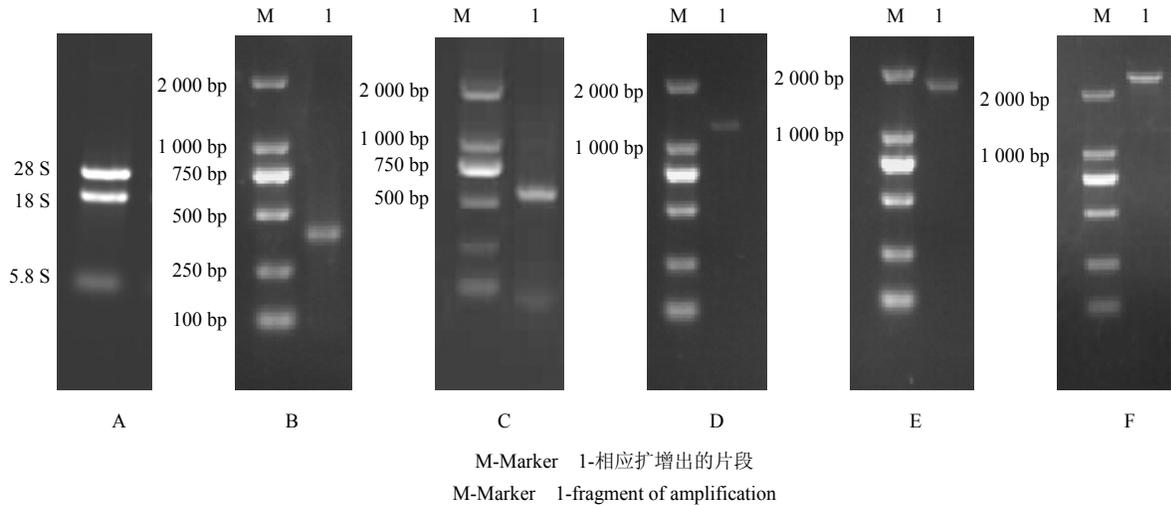


图 1 桑黄总 RNA 提取产物 (A)、SE 基因片段扩增产物 (B)、5'RACE 扩增产物 (C)、3'RACE 扩增产物 (D)、cDNA 全长扩增 (E) 和 DNA 全长扩增 (F) 凝胶电泳图

Fig. 1 Electropherograms of total RNA (A), amplification fragment in SE gene (B), 5'RACE amplification product (C), 3'RACE amplification product (D), full-length cDNA (E), and full-length DNA (F) of *I. baumii*

3.2 SE 基因片段扩增结果

以桑黄总 RNA 反转录得到的 cDNA 第一链为模板, 用所设计的引物在 250~500 bp 扩增到 1 条 SE 基因的特异片段 (图 1-B), 与推测的目的片段大小一致。PCR 片段纯化、克隆, 经测序后得到其序列, 长度为 428 bp。

3.3 RACE 和 SE 全长序列分析

根据已获得的桑黄 SE 基因片段设计特异引物, 通过 RACE-PCR 技术获得 5'端序列为 566 bp (图 1-C) 和 3'末端序列为 1405 bp (图 1-D)。将 5'RACE 和 3'RACE 扩增片段克隆测序结果拼接得到全长 cDNA 为 1856 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 和基因组 DNA 为模板, 扩增桑黄 SE 全长序列并测序, 扩增结果见图 1-E、F, 在推断的位置得到单一清晰的条带, 测序结果与拼接结果一致。

3.4 SE 全长序列生物信息学分析

序列分析结果表明 SE 基因全长 2145 bp, 包含 6 个外显子和 5 个内含子, 平均每个内含子长度为 118 bp。SE cDNA 序列分析可得: 5'端存在 21 bp 的非翻译区 (UTR), 中间为 1452 bp 的 ORF, 编码 483 个氨基酸, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 3'端非翻译区 (UTR) 长度为 383 bp, 其中含有 27 bp 的 poly A 尾 (图 2)。

利用 ExPASy Proteomics Server 在线软件 ProtParam 对 SE 基因编码蛋白的理化性质进行预测

分析。推测 SE 的分子式为 $C_{2422}H_{3804}N_{658}O_{665}S_{18}$, 相对分子质量为 5.3×10^4 , pI 为 8.41, 为疏水蛋白; 在线软件 SignalP4.0 Server 分析结果表明 SE 无信号肽; 通过 PSORT 服务器的分析, 初步判断 SE 蛋白定位于细胞质中。运用 GOR 软件预测 SE 蛋白的二级结构, 结果显示该蛋白含有 119 个 α 螺旋, 占 24.64%; 127 个延伸链, 占 26.29%; 237 个无规卷曲, 占 49.07%。SE 基因编码蛋白质的三维结构见图 3。将推测的桑黄的 SE 基因的氨基酸序列片段和其他物种 SE 基因的氨基酸序列进行多重比较 (图 4), 结果发现它的保守氨基酸多达 204 个。

4 讨论

近年来, 随着生物技术的不断发展, 基因组^[15]、转录组^[16]、蛋白质组学^[17]及合成生物学^[18]的综合应用, 对挖掘基因、阐明次生代谢途径及调控机制、实现药用真菌次生代谢产物异源表达, 提供了强有力的研究手段^[19]。SE 在三萜皂苷生物合成途径中起着重要的作用, 它催化鲨烯生成的 2,3-氧化鲨烯, 是甾体、皂苷、倍半萜等许多萜类衍生物合成的前体。2,3-氧化鲨烯再经过一系列的质子化作用、环化、重排和去质子化作用形成三萜皂苷元^[20]。

已有的研究表明, SE 基因在其他物种中常存在基因家族现象, SE 基因家族中的不同成员对三萜皂苷的生物合成贡献不同。本研究基于前期桑黄转录组测序结果, 从 30051 条 Unigene 中经过序列比对、

```

1  taccccttcatttcactcaccacATGGGACCACTGCGCAACTCTTACGACGTTCTCATTGTGCGGGTGGTTCGCGCGGGTGTGCT
1  M A T S R N S Y D V L I V G G G V A G C A
85  CTTGCGTAGGGTCTCGCGACCATTACCTCCAAGCAGCTCCAAGCAACTCCGTATCGGTCTCATTGAAGCTCTTTTCGCGAGAA
22  L A Y G L A T I T S K A R P K Q L R I G L I E R S F A E
169  CCAGACCGCAT TGTGGGAACTTCTTACGCGCGCGGGTGAATGCACCTCGTAAACTTGATTAAAGCGATTGCCTAGAAGGC
50  P D R I V G E L L Q P G G C N A L R K L G L S D C L E G
253  ATAGATGCACTGGCGGTGGTGGCTATTGTGTGTCAACGACGGGAAGCAAGTCCATATCCATATCCTAACGGCCAAAGAGGGA
78  I D A V A V R G Y C V V N D G K Q V H I P Y P N G Q E G
337  CGGGCTTTCCATCATGGCAAATTTATCATGGCATTGAGGAAGAAGGCTCTCGCGGCTCCGCGGTGGAAGGAATTGAAGCTACA
106  R A F H H G K F I M A L R K K A L A A P G V E G I E A T
421  GTCACGTGCGTCTTACCGCAGACGGCGAGCAGCGGTCTACGGTGTTCGCGGACCGTGAAGAAGTCCGGGACTGAAACGAAAG
134  V T S L L T A D G E H R V Y G V C A T R K N S G T E T K
505  GAGAAGTCTACGACCCCTCAGCTCGTGGTGGCTGCTTCTCCAATTTCCGAGCAGAGGCTTTGAGCGAAGCCTTTGAA
162  E N F Y A P L T F V A D G C F S N F R A E V L S E A F E
589  AAACCGTCACGCGCAGCTACTTCGTGGTGGGATTCTCAAGGACGTAATAATTCGGATCGACAAACATGGAACCGTGGCTCTT
190  K P V T R S Y F V G A I L K D V K L P I D K H G T V A L
673  GTTCGTGGTTC TGGTCTGTGCTGTACCAAATTTGGCGAACATGACACAGTATACTCATCGATGTGAAAGCACCCCTTGCCA
218  V R G S G P V L L Y Q I G E H D T R I L I D V K A P L P
757  TCTGACTCAAACAATTGCTACTGACAGGGTTTTTCCCGAACTCCGAGAAAGTTCAGCCTGCTCTGATAGTCTCTCAAC
246  S D L K Q F V L D R V L P E L P E S V Q P A L V D A L N
841  AGGAGCGGCTAGTGGTATGCCAAATTTCTTCCCTTCCCTTATGAACAAGGCGGAGAGCAGTCCAAGGAGGGTCTATTCTT
274  R E R L R R M P N S F L P P I E Q G G E Q S K E G A I L
925  GTCGGGACTC GTGGAATATGGGATCCCTTACC GGAGGTGGAATGACCGTGGCTTCAACGATATTGTCATACTTACGGAT
302  V G D S W N M R H P L T G G G M T V A F N D I V I L T D
1 009  CTTCTTCGCACTGACCGAACTTCGAGGACTGGGCATGGGTATCGCAGATCCTTCATGCATGGCATTGGTCCGGTAAGCCGCTT
330  L L R T V P N F E D W A C V S Q I L H A W H W S R K P L
1 093  GGCTCGACAATCAATATTCTTAGTATCGCGCTTACGACCTCTTCGGCGCCGAGGAGCAATGTCTCGAGGTACTTCGCGTGGCC
358  G S T I N I L S I A L Y D L F G A E D E C L E V L R V G
1 177  TGTTTTAAATATTTCCAGCTCGGGGCGAGTGCAT TCGGGAGCCAGTCTCCTTATTAGCCGGTATTCCAATCGGAGGTTCCTC
386  C F K Y F Q L G G S C I R E P V S L L A G I S N R R F L
1 261  CTCTCTGGCACTTCTTGGCGGTGGCTTCTATGCACCTCTGGGTGATGTTTACACATCCTCGCCCGTTCGAGTACGGAAAGGGT
414  L F W H F F A V A F Y A L W V M F T H P R P V A V R K G
1 345  GGTATAGAGAAGCAAGTAATGAGACGCCCGGATTGAGGAATACCCGTTGTTACTCGTTAAAGCAGTCCGAGTGTCTGGACC
442  G I E K Q V M R R P G I E E Y P W L L V K A V R V F W T
1429  GCTTGCATGTTGCGGCTCCACTCTGGAGTGAATAACAATAAgtaatcgtagccgctctgctccctgtcttgggattatgt
470  A C I V F G P P L W S E L Q *
1 513  cgagaggctcgcgtgtccttgcctccgctgctacccgctcctcagatctcgtactcaacaaaactcgtcaatact
1 597  cccggctcgttctgttcttaaacctctcacagtgcoctattgtactcttattcctattcaatttaccagggtgcactaatatctc
1 681  ggcggatgttctctttctttgcaactttacgctgatttttctttacagtaagctaacgttcacggattgtcgcctttgta
1 765  gacaagaacatctgtcttttggattttcttcggtagcttgaattccagtcgatggaccgagacgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1 849  aaaaaaaaa
    
```

图 2 桑黄 SE 基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleic acid and deduced amino acid sequences of SE gene from *I. baumii*

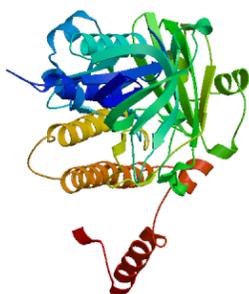


图 3 桑黄 SE 三级结构预测

Fig. 3 Predicted tertiary structures of SE from *I. baumii*

功能注释等手段，筛选到参与三萜类化合物代谢合成途径的鲨烯环氧酶基因片段序列 1 条，经过 RT-PCR 与 RACE 技术相结合最终获得桑黄 SE 基因的全长序列，目前并没有发现存在基因家族的现象，而对于该基因在桑黄三萜生物合成中的作用将是今后研究的重点。一方面，可利用 RNA 干扰技术进一步研究桑黄 SE 基因编码区与调控序列；另一方面，可以构建表达载体对其功能进行深入分析，以阐明桑黄三萜生物合成的分子基础，探索提高桑黄三萜量的有效方法。

```

毛茛菀菌 (XP_007311636)  --MYSTHYDVVIVGAGVAGSALAHALTASPIASSSRHKPLRIALLERSLAQFDRIVGELL 58
粉孢菀菌 (XP_007762949)  --MVQKHVDVIVGAGIAGATLAYALST--ITSKTRPAPLSTIALLERSLAEFDRIVGELL 56
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  MAKAENHYDVVIVGAGIAGCALAHGLST----LPYRSKRLRIALLERSLAQFDRIVGELL 56
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  MSKRSNSYDVIIVGAGIAGCALAHGLST----LSRATPLRIAIVERS LAEFDRIVGELL 55
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    MAPSRHSYDVLIVGAGVAGCALAHGLAT--ITSSTRSKQLRIGLLERSFAEPDRIVGELL 58
桑黄                      MATSRNSYDVLIVGGVAGCALAYGLAT--ITSKARPKQLRIGLIERSFAEPDRIVGELL 58
                        ***:***.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  QPGVLALRELGMEDCLDGDVAVPVKGYCAKEGETVQIPYPKHEGRSFHHGPFPIQRLR 118
粉孢菀菌 (XP_007762949)  QPSGVALQAIGMEQCLEGDVAVPVKGYCAKSGELVHIPYDAREGRSFHHGKFKVQSLR 116
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  QPGGVIALKQLGLESTVEGIDVAVPVKGYCVLKGQSVQIPYPSGFEGRSFHHGRFINNLR 116
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  QPGVMALQRLGMEQCLEGDVAVKVGHCYVVEGTSVHIPYGVHEGRSFHHGRFIMKLR 115
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    QPGGCNALRKLGMEDCLEGDVAVPVRYGVVNDGKQVHIPYNNQEGRSFHHGKFKIMSLR 118
桑黄                      QPGGCNALRKLGLSDCLEGDVAVAVRYGVVNDGKQVHIPYNGQEGRAFHHGKFKIMALR 118
                        ***.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  EKALAAPGVDTIEATVSELTIECPLTG--RILGVKAT----RKDGPE-----K 160
粉孢菀菌 (XP_007762949)  AKARQGPVETIEATVTDLVECEHTG--RVIGVRPANQASRDGEEGTAEKKGDEEK 175
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  KAAKQAKGVVIEATVIDLIQEEGNPKHIIGVTAS----RKEEGST-----EAVK 162
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  EAARAARGVELVEATVTEIPREGGK--GIAGVRVAR---KGDGEE-----DTT 160
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    KKALAAPGVGIEATVTSLIMADGEN--RVHGVRAV----RKSENG-----EK 161
桑黄                      KKALAAPGVGIEATVTSLLTADGEH--RVYGVCAV----RKNSGTE-----TK 161
                        *.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  EPFYGLVVVADGCFNSFRTKVMGRAGIESETKSYFVGVAVLEDAKLPHPHGTVALVQGG 220
粉孢菀菌 (XP_007762949)  DAYFADLVVADGCFNSFRTSVM--RAARKSSTRSHFVGVVLDNAHLPMPHGTVALVKGH 234
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  VQYHADLVVADGCFNSFRTSVMGSGFKPTTRSHFVGVAVLEDIRLPIPHGTVALVQNS 222
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  EALGAALVVVADGCFNSFRAAVMGAAVKPKTSHFVGAALKDARLPIPHGTVALVKGF 220
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    ESFFAPLVFIADGCFNSFRAEVMGEVFEKPVTRSYFVGAALKDVNLPIDKHGTVALVRS 221
桑黄                      ENFYAPLTVFVADGCFNSFRAEVLSEAFKPVTRSYFVGAALKDVKLPIDKHGTVALVRS 221
                        .*.:***:***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  GPVLLYQIGEHDTMLVDVKKPLPSDLK---HHILTNIVFQLPSSLHLPIITNALEKERL 276
粉孢菀菌 (XP_007762949)  GPVLLYQIGEHDTMLVDIKAPLPSNLK---AHILHEIVPSPSSLHVPVHEALERDRL 290
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  GPVLFYQIGQRETMLADVKAPLPKDLK---GHILTHIAPQLPSTIQKAVETALHKDRL 278
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  GPVLLYQISEHDTMLVDVKAPLPADLVC---AHILSNIVFQLPAALHLPIQRALDAERL 278
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    GPVLLYQISEHDTMLVDVKPLPADLKSSEKEYIINIVVPELPELQPAIVDALARDRL 281
桑黄                      GPVLLYQIGEHDTMLVDVKAPLPSDLK---QFVLDRLVPELPEVSVQPALVDALNRERL 277
                        ***:***.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  RQMPNSWLPFAEQGTKHSKEGVILIGDSWNRHPLTGGGMTVAFNDVVILSKLLQINDF 336
粉孢菀菌 (XP_007762949)  RRMFNSFLPVEQGHSSSKEGVILIGDAWNRHPLTGGGMTVALNDVVILSRMLGGTLDY 350
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  RQMPNSFLPAVDQNGPGCKNGVVILIGDAWNRHPLTGGGMTVALSDVVILRDLIGTIPDL 338
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  RRMFNSFLPVEQGG---ATRGAVLVGDWNRHPLTGGGMTVALNDVVILRDLIGSVGDL 335
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    RRMFNSFLPVEQGGQSKKEGVILVGDWNRHPLTGGGMTVAFNDVVILDLRLRSVSHF 341
桑黄                      RRMFNSFLPVEQGGQSKKEGAILVGDWNRHPLTGGGMTVAFNDIVILTDLLRTPVNF 337
                        *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  SDWDAMSHALHQWHWSRKSLSSTVNILSVALYDLFGADDEYLAVLRNGCFKYFERGGCV 396
粉孢菀菌 (XP_007762949)  KNWDRMSDMLHQWHWARKPLSATVNILSVALYDLFGADDEALAVLQRCFKYFECGGDCV 410
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  SDVPRVSKVLNTWFWNRKPLASTVNILSFALYDLFGADDDNLEVLRTGCFKYFERGGECI 398
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  GDWR-----QVASTVNILSVALYDLFGADG--ELQVLRGCFKYFERGGDCI 380
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    DDWACVSQLHAWHWSRKLPGSTINILSIALYDLFGAEDENLEVLRVGCFKYFQLGGNCI 401
桑黄                      EDWACVSQLHAWHWSRKLPGSTINILSIALYDLFGAEDCLEVLRVCGCFKYFQLGGSCI 397
                        :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  NGPVSLLSAVAQDPFLFRHFFAVAFYSIWMFTHPRVVS----SSTDKLVLAAPGLD 451
粉孢菀菌 (XP_007762949)  RGPVSLLSGIAPSPSLLAYHFFSVAFYAIWVMFTHPRVPG----ASSLEKPLVAVPSVL 465
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  NGPVSLLSGIAPSPVLLFNHFFSVAFYSIWMFTHPRPIAPSP--YANGDAKPTLAAPRLY 457
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  DGPVSLLSGIAPSPMLLAYHFFSVAFYSIYVIAVG-----AQNSAKQVLAVPGAL 431
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    MEPVSLLAGISHRFRLLFYHFFSVAFYAIWIMFTHVQPIAAVNGGGGSGKVVMRPRPVE 461
桑黄                      REPVSLLAGISNRRFLLFWHFFAVAFYALWVMFTHPRPVAVRK---GGIEKQVMRRPGIE 454
                        ***:***.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
毛茛菀菌 (XP_007311636)  EYPALFVKAFVWFVWACVVFGLMWT482
粉孢菀菌 (XP_007762949)  EYPGLFLKSFQVWFVWACVVFGLLWTE496
灰盖鬼伞 (XP_001831096)  EYPGLLIKSFVWFVWACVVFGLLWTE517
砖红韧黑伞 (XP_007269752)  QYPALCVKGLRVFVWACVVFGLLWTE461
嗜蓝孢孔菌 (ABU55002)    EYPWLLVKALRVFVWACVVFGLLWTE490
桑黄                      EYPWLLVKAVRVFVWACVVFGLLWTE483
                        ***.*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

图 4 桑黄 SE 氨基酸序列与其他物种 SE 氨基酸序列多重比较

Fig. 4 Multiple comparison on amino acid sequence of SE from *I. baumii* and other species

参考文献

- [1] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, 75: 31-49.
- [2] Goldstein J L, Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature*, 1990, 343(1): 425-430.
- [3] Ryder N S. Squalene epoxidase as a target for the allylamines [J]. *Biochem Soc Trans*, 1991, 19(3): 774-777.
- [4] Jandrositz A, Turnowsky F, Hogenauer G. The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization [J]. *Gene*, 1991, 107(1): 155-160.
- [5] Laden B P, Tang Y, Porter T D. Cloning, heterologous expression, and enzymological characterization of human squalene monooxygenase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374(2): 381-388.
- [6] Sakakibara J, Watanabe R, Kanai Y, et al. Molecular cloning and expression of rat squalene epoxidase [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(1): 17-20.
- [7] Rasbery J M, Shan H, LeClair R J, et al. Arabidopsis thaliana squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(23): 17002-17013.
- [8] Han J Y, In J G, Kwon Y S, et al. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng* [J]. *Phytochemistry*, 2010, 71(1): 36-46.
- [9] 赵瑞强. 三七 SE 基因克隆及转化烟草、绞股蓝的初步研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2007.
- [10] 邢朝斌, 劳凤云, 龙月红, 等. 刺五加鲨烯合酶和鲨烯环氧酶基因单核苷酸多态性及其与总皂苷量的相关性研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(10): 2020-2024.
- [11] 吕英华, 王建芳, 李玉平, 等. 药用真菌桑黄的研究进展 [J]. *蚕业科学*, 2009, 35(1): 204.
- [12] Shon M Y, Kim T H, Sung N J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts [J]. *Food Chem*, 2003, 82(4): 593-597.
- [13] Jang B S, Kim J C, Bae J S, et al. Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26(1): 31-33.
- [14] 谢江宁, 宋素芬, 李 香, 等. 桑黄总三萜的提取及其体外抗脑胶质瘤 U251 活性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(5): 24-26.
- [15] Chen S L, Xiang L, Guo X, et al. An introduction to the medicinal plant genome project [J]. *Front Med*, 2011, 5(2): 178-184.
- [16] Goossens A, Hakkinen S T, Laakso I, et al. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(14): 8595-8600.
- [17] Agrawal K G, Job D, Zivy M, et al. Time to articulate a vision for the future of plant proteomics a global perspective: An initiative for establishing the International Plant Proteomics Organization (INPPO) [J]. *Proteomics*, 2011, 11(9): 1559-1568.
- [18] Keasling J D. Synthetic biology for synthetic chemistry [J]. *ACS Chem Biol*, 2008, 3(5): 64-76.
- [19] 牛云云, 朱孝轩, 罗红梅, 等. 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发: 三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析 [J]. *药学报*, 2013, 48(2): 211-218.
- [20] 明乾良, 韩 婷, 黄 芳, 等. 人参皂苷生物合成途径及其相关酶的研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(11): 1913-1917.