

• 药材与资源 •

基于转录组测序的冬虫夏草虫草素生物合成研究

黄羽琪¹, 童铎芯^{1#}, 陶 向², 王玉贤¹, 彭 成¹, 汪松虎^{2*}, 国锦琳^{1*}

1. 成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室 中药资源系统研究与开发利用国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137

2. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041

摘要: 目的 对冬虫夏草进行转录组测序, 为虫草素生物合成提供依据。方法 利用 Illumina/Solexa HiSeq 2500 高通量测序平台对冬虫夏草菌丝体和子实体转录组进行测序、数据组装, 分析并预测虫草素生物合成途径、相关基因及差异表达量, 发现代谢途径中多数酶在菌丝体发育阶段的表达水平较高。采用 cDNA 克隆技术从新鲜冬虫夏草子实体中克隆到核糖核苷酸还原酶(RNR)基因亚基。结果 其中 RNR 是腺苷代谢的关键酶, 从转录组数据中挖掘到 RNR 大、小亚基各 1 条, 及 4 条 RNR 同源序列。RNR 大亚基(RNRL) cDNA 全长 2 733 bp, 编码 910 aa, RNR 小亚基(RNRM) cDNA 全长 1 257 bp, 编码 418 aa。通过保守区域和功能结构域分析发现主要催化活性位点位于 RNRL, RNRM 含有铁结合蛋白保守位点, 大小亚基均含有二聚体和亚基结合区域。结论 基于转录组测序预测, 以 RNR 为切入点研究虫草素合成途径, 为最终揭示虫草素生物合成机制提供数据支持。

关键词: 冬虫夏草; 转录组; 虫草素; 核糖核苷酸还原酶; cDNA 克隆

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)19-4044-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.022

Study on bio-synthesis of cordycepin in *Ophiocordyceps sinensis* based on RNA-seqHUANG Yu-qi¹, TONG Xin-xin¹, TAO Xiang², WANG Yu-xian¹, PENG Cheng¹, WANG Song-hu², GUO Jin-lin¹

1. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine/The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Chengdu 611137, China

2. Chengdu Institute of biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective Recent years, some studies have been studied on the biosynthesis of cordycepin, but it is not clear. To sequence the transcriptomes of the *Ophiocordyceps sinensis* which could provide the basis for revealing the bio-synthesis mechanism of cordycepin. **Methods** In this study, by Illumina/Solexa HiSeq 2500 technology, the transcriptomes of the *O. sinensis* fungus (anamorph) and the fruiting body (teleomorph) was sequenced, assembled and analyzed. By RT-PCR, the full lengths of RNRL (RNR large subunit) and RNRM (RNR small subunit) cDNA were cloned from the fresh *O. sinensis* fruit body. **Results** The pathway and the genes involved in cordycepin biosynthesis were predicted. Among of them, RNR was the critical enzyme in the metabolism of adenosine, also predicted to play an important role in the biosynthesis of cordycepin. From the transcriptome data, one large, one small subunits, and four similar sequences of RNR were found. RNRL mRNA was 2 733 bp, encoding 910 aa and RNRM mRNA 1 257 bp, encoding 418 aa. The analysis of the conserved and functional regions showed that catalytic site and binding site mainly lied in RNRL, RNRM contained a ferritin-like conserved sequence. **Conclusion** This study would be established for revealing the bio-synthesis mechanism of cordycepin.

Key words: *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; transcriptomes; cordycepin; RNR enzyme; cDNA clone

冬虫夏草为麦角菌科真菌冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座和幼虫尸体的干燥复合体^[1], 是传统名贵中药, 具有补肾益肺、止血化痰的功效^[2-3]。

收稿日期: 2017-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30801522, 81373920); 四川省中医药管理局项目(2016Q056); 成都市科技局项目资助

作者简介: 黄羽琪(1989—), 男, 在读硕士, 研究方向为中药资源与鉴定。Tel: 13550191367 E-mail: 759059597@qq.com

*通信作者 国锦琳(1976—), 男, 硕士生导师, 教授, 研究方向为名贵中药资源与鉴定。Tel: 13981938406 E-mail: guo596@163.com

汪松虎, 研究员, 研究方向为植物分子生物学。

#并列第一作者, 童铎芯, 博士, 讲师, 研究方向为中药资源与鉴定。

虫草素,即3'-脱氧腺苷,属嘌呤类生物碱,是脱氧腺苷的结构类似物,也是第一个从真菌中分离出来的核苷类抗菌素^[4],具有很强的抗菌、抗肿瘤、免疫调节及抗炎等作用^[5-6],有着良好的临床应用前景。一直以来,国内外学者对虫草素的药理作用和产品开发研究表现出极高的兴趣,但是分离提纯非常不易,化学合成也存在很多问题,因此,虫草素生物合成研究成为近几年的研究热点。

虫草素主要由虫草属的一些菌产生,包括蛹虫草和冬虫夏草菌^[7]。虫草素生物合成涉及多基因的表达与调控,有研究通过诱变筛选蛹虫草菌虫草素高表达菌株,采用抑制消减杂交技术分析克隆虫草素合成相关基因序列^[8],但功能尚未鉴定,而且 SSH 技术难以检测到低丰度的差异表达基因,假阳性率高,目前在 GenBank 数据库也尚未能检索到虫草素合成基因序列。在蛹虫草液体发酵过程中添加腺嘌呤能明显提高虫草素量^[9-10],Lennon 等^[11]研究发现虫草素 3'-羟基有类似于脱氧核苷 2'-羟基的还原机制,但是还原酶尚未阐明,因此,其代谢变化依然得不到合理解释。目前大量研究表明虫草素生物合成与脱氧腺苷合成途径类似^[4,12],核糖核酸还原酶(ribonucleotide reductase, RNR)是 DNA 合成和修复的关键酶^[12],也是唯一的核糖核酸还原酶^[13],因此, RNR 极有可能也与虫草素合成密切相关。

本实验采用先进的 Illumina/Solexa HiSeq 2500 高通量测序平台对冬虫夏草菌和子实体转录组进行测序分析,结合腺苷代谢途径预测虫草素合成相关基因及代谢途径,并对关键候选基因 RNR 进行 cDNA 克隆和序列分析,为最终揭示虫草素生物合成机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

样本由四川藏宝虫草生物科技有限公司提供,经成都中医药大学国锦琳教授鉴定为冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 的菌丝体和子实体。对照品虫草素(批号 110858-201503)购自中国食品药品检定研究院,质量分数大于 98%。

1.2 试剂及设备

TransStart FastPru Fly DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司, pUC-T Simple TA 克隆试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司, RNA 提取试剂盒购自美国 Ambion 公司, 反转录试剂盒购自日本 Takara 公司; 2×Taq PCR Master Mix 和琼

脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司; 转录组高通量测序由北京百迈克生物技术有限公司完成; 引物合成和 DNA 测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成; Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司, 包括四元泵, 自动进样器, DAD 紫外检测器); 甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司), 流动相用水为双蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 冬虫夏草子实体虫草素测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱 GL WondaSil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇(A)-水(B), 梯度洗脱, 0~20 min, 5%~10% A; 20~25 min, 10%~40% A; 25~30 min, 40% A, 体积流量 1 mL/min; 进样体积 20 μL; 检测波长 260 nm, 柱温 25 °C。

2.1.2 对照品溶液的制备 取对照品虫草素适量, 精密称定, 加水制成 85 mg/mL 对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取冬虫夏草子实体粉末(液氮研磨)约 0.10 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入超纯水 10 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用超纯水补足失质量。转移至 50 mL 离心管中, 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。方法学考察按照课题组前期实验方法操作^[14]。

2.2 转录组测序及虫草素生物合成途径预测

收集冬虫夏草菌丝体(FB)、冬虫夏草子实体(CM)样品, 称取样品 100 mg, 通过 Ambion RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 每个样品设 2 个生物学重复。残留的 gDNA 以 DNase I (Thermo) 降解后以 TruseqTM RNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, 美国) 构建片段化 cDNA 文库, 并提交 Illumina/Solexa 的 HiSeq 2500 高通量测序平台进行双端测序。测序所得 Clean reads 以 Trinity^[15] 进行 *de novo* 组装、虫草素生物合成途径、相关基因预测及差异表达分析等。Trinity 组装得到的 Contig 导入 Blast2 GO^[16] 进行序列比对及功能注释。

RNR 基因的挖掘采用 2 种方法: (1) 根据注释结果, 搜索注释为 RNR 的序列, 并将序列提交 NCBI 进行 BlastX 比对, 分析序列的编码区及注释结果的可靠性; (2) 从 NCBI 下载 RNR 序列并以此与转录组组装结果进行比对, 搜索相似度高的序列。

2.3 RNR 基因的 cDNA 克隆

采用 Trizol 法提取新鲜冬虫夏草子实体 RNA,

采用 Nanodrop 2000 及 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 保证 RNA 样品质量浓度 ≥ 400 ng/ μ L, $A_{260}/A_{280} > 1.8$; 用 Takara 试剂盒 RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行反转录生成 cDNA, 根据转录组数据获得的 RNR 大亚基(RNRL)、小亚基(RNRM) mRNA 序列, 利用 primer 5.0 软件设计 RNR 大、小亚基引物: RNRL-F: 5'-CCTCTTCCCTCGTCTCGCAT-3', RNRL-R: 5'-CACTCACTTCCACTCCTCCGTC-3'; RNRM-F: 5'-CGTCATCCTTGCCCTCATCAGTCTT-3', RNRM-R: 5'-AGGGTATGTACGAAGAAGGGTTGAG-3'。PCR 以反转录的 cDNA 为模板, RNRL 程序进行反应为: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、2 min, 35 个循环后, 加入 1 μ L Taq 酶, 72 °C、5 min。RNRM 的反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C、30 s, 55 °C、30 s, 72 °C、1 min, 35 个循环后, 加入 1 μ L Taq 酶, 72 °C、5 min。取 25 μ L PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶上电泳, 置自动凝胶成像仪上检测结果, 并通过琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收目的片段。

2.4 阳性克隆的筛选、鉴定、序列测定及分析

将回收后的片段通过 T/A 克隆法连接到 pUC-T simple TA 载体上, 22 °C, 4 h, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 涂板于 Car 抗性 LB 固体培养基, 37 °C 静置培养过夜。次日, 挑取单菌落于相同浓度 Car 抗性 LB 液体培养基中, 于 37 °C, 200 r/min 震荡

培养 4 h 后, 进行菌液 PCR 鉴定并将其中 3 个阳性菌液送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。将获得的 cDNA 序列登陆网址 <http://us.expasy.org/tools/> 翻译成相应的氨基酸序列, 采用 NCBI 数据库中的 Blast 软件进行核苷酸和氨基酸序列同源性比较; 同时利用 NCBI 结构分析服务系统和 EMBL-EBI 的 ProScan 序列搜索工具进行保守位点及结构域分析。

3 结果与分析

3.1 冬虫夏草子实体虫草素测定结果

以峰面积为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 进行线性回归。得到虫草素对照品的回归方程为 $Y=57.364X+15.874$, $R^2=0.9991$, 在 0.31~80.40 μ g/mL 线性关系良好。测定冬虫夏草子实体中虫草素质量分数为 75 μ g/g。

3.2 冬虫夏草菌丝体和子实体转录组序列分析

3.2.1 转录组高通量测序及质量评估 收集 FB 和 CM 样品并提取 total RNA 进行转录组测序, 每个样品设定 2 个重复。4 个样品分别获得 16 375 610、18 148 418、17 564 252、18 394 096 条 PE 125 的 Clean reads, 数据量均达到 4 G。以 FastQC 软件评估 4 个样本的测序 read 质量、GC 量等, 发现 4 个样本 RNA-Seq 质量较高, 可用于进一步的 *de novo* 组装、功能注释及差异表达基因分析等 (图 1)。

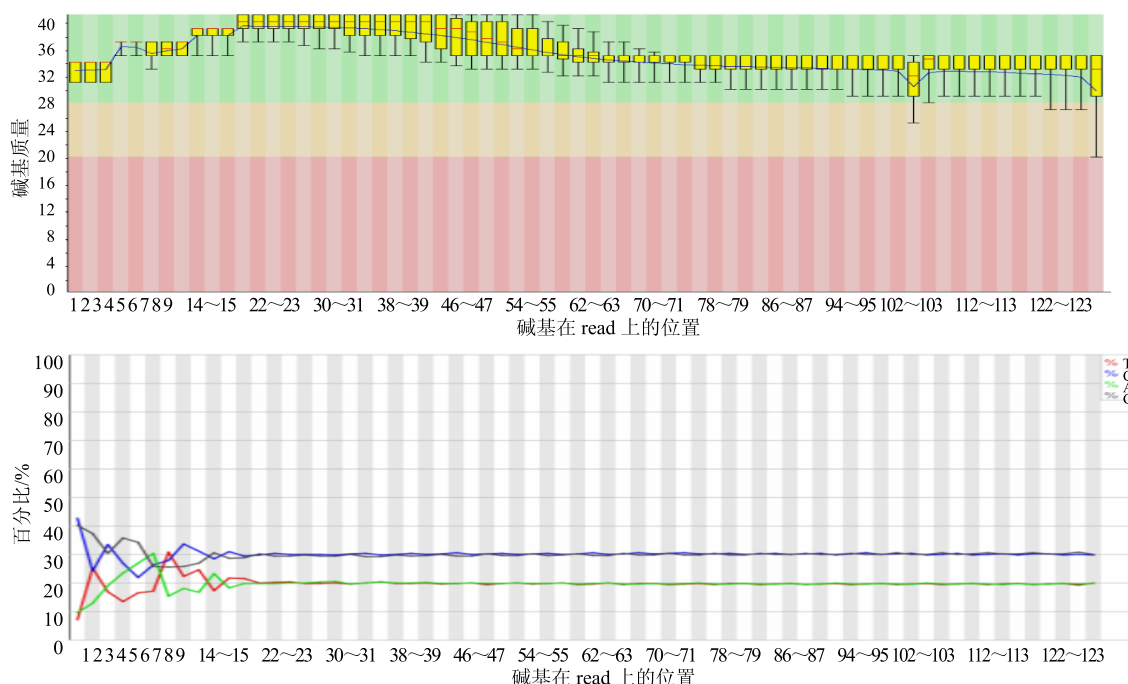


图1 FastQC 质量评估结果

Fig. 1 Results of FastQC Quality assessment

3.2.2 Reads 的 *de novo* 组装 实验的 4 个样品分别来源于 FB 和 CM, 4 个样品的 reads 数据是否适合组装到一起需先做评估, 因此, 先将 2 组样品的 Clean reads 以 Trinity 从头组装软件默认参数进行单独组装 (表 1), 以 BLAT 软件进行全局 Blast 比对分析 (表 2), 分析 2 组样品单独组装结果间的全局相似度。FB 和 CM 组装的序列相似度高, 当同源性 (Identity) 取 95% 时, 二者之间相似序列的比例仍有 89.4% (22 703/25 394), 这表明 2 组样品的 reads 可合并组装。因为将 2 组样品的 clean reads 进行合并组装, 合并组装的结果中的 “mixed”: 共获得 34 152 条 Contig, 平均长度、N50 及最大长度分别为

表 1 不同样品单独 *de novo* 组装结果
Table 1 *De novo* assemble of different samples

指标	FB/条	CM/条	mixed/条
总重叠群	22 524	25 394	34 152
总长度/bp	57 967 882	65 378 329	81 028 887
平均长度/bp	2 574	2 574	2 373
最大长度/bp	21 992	21 395	25 058
N50 长度/bp	4 622	4 764	5 606
199 bp < 长度 < 250 bp	867	1 365	2 856
249 bp < 长度 < 300 bp	1 683	1 907	4 170
299 bp < 长度 < 350 bp	1 096	1 231	2 470
349 bp < 长度 < 400 bp	849	957	1 675
399 bp < 长度 < 450 bp	640	745	1 349
449 bp < 长度 < 500 bp	512	606	975
499 bp < 长度 < 550 bp	455	501	774
549 bp < 长度 < 600 bp	411	435	694
599 bp < 长度 < 650 bp	362	386	527
649 bp < 长度 < 700 bp	314	356	524
699 bp < 长度 < 750 bp	270	335	375
749 bp < 长度 < 800 bp	256	298	396
799 bp < 长度 < 850 bp	238	258	352
849 bp < 长度 < 900 bp	223	293	296
899 bp < 长度 < 950 bp	238	249	254
949 bp < 长度 < 1 000 bp	197	243	278
长度 ≥ 1 000 bp	13 913	15 229	16 187

表 2 不同样品单独 *de novo* 组装结果的比对分析

Table 2 Comparison analysis of *de novo* assemble results

样本	FB 同源性					CM 同源性					SRA 同源性				
	99	95	90	80	70	99	95	90	80	70	99	95	90	80	70
FB	22 524	22 524	22 524	22 524	22 524	21 500	22 703	23 039	23 159	23 167	23 078	24 466	24 862	25 006	25 035
CM						25 394	25 394	25 394	25 394	25 394	23 939	25 225	25 555	25 679	25 730
SRA											30 132	30 132	30 132	30 132	30 132

2 372.6、5 606.0、25 058 bp, 长度 ≥ 1 000 bp 的序列有 16 187 条, 组装质量较高。

3.2.3 Contig 功能注释 将 NCBI 的 Blast 程序本地化后, 通过 BlastX 将 Contig 序列与 NR 数据库比对, 比对结果导入 Blast2 GO 功能注释软件进行 GO、KEGG、InterProScan 等注释, 结果显示共有 23 821 (69.7%) 条序列获得功能注释信息。其中长度 < 500 bp 的 13 495 条 Contig 仅有 6 508 条成功注释, 注释比例为 48.2%, 而 > 1 000 bp 的序列中成功获得注释信息的有 14 837 条, 注释比例高达 91.7% (图 2)。

3.2.4 虫草素生物合成途径预测 目前虫草素生物合成研究结果表明虫草素是以腺苷为前体合成, 与腺苷代谢途径类似^[4,11-12], 基于以上分析, 利用转录组数据, 预测虫草素生物合成途径 (图 3) 及相关基因 (表 3), 包括腺苷激酶 (ADK)、腺苷酸激酶 (ADEK)、RNR、RNR 同源序列及 5'-核苷酸酶 (5'-NT)。再进行基因表达水平差异分析, 结果表明多数基因在菌丝体阶段表达量高于子实体, 如 RNRL、ADEK、5'-NT、而 ADK、RNRL 和 4 条 RNR 同源序列表达量差异不大。

从冬虫夏草转录组数据库中挖掘到 RNR 大、小亚基编码序列各 1 条, 4 条 RNR 相似蛋白编码序列, 确定 RNRL 基因 mRNA 全长为 2 733 bp, 编码 910 aa, RNRM 基因 mRNA 全长 1 257 bp, 编码 418 aa, 为 RNRL、RNRM cDNA 克隆提供数据支持。

3.3 RNRL 和 RNRM cDNA 克隆及序列分析

以 cDNA 为模版进行 PCR 反应, 凝胶电泳结果如图 4 所示, RNRL 和 RNRM cDNA 全长分别约为 3 000 bp 和 1 300 bp, 经 Blast 2 进行氨基酸序列比对, 与转录组测序结果完全一致, 确定为 RNRL、RNRM, GenBank 注册编号分别为 KY435930 和 KY435931。分别与 NCBI 数据库公布的 *O.sinensis*

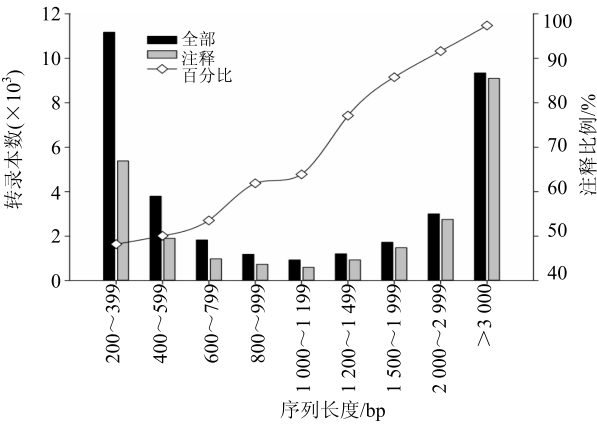


图 2 重叠群功能注释
Fig. 2 Contig function annotation

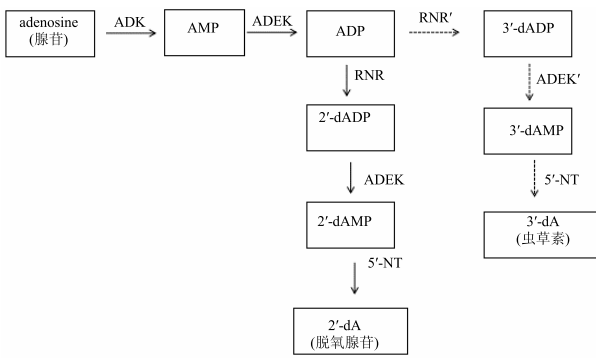


图 3 虫草素生物合成途径预测
Fig. 3 Putative biosynthesis pathway for cordycepin in *O. sinensis*

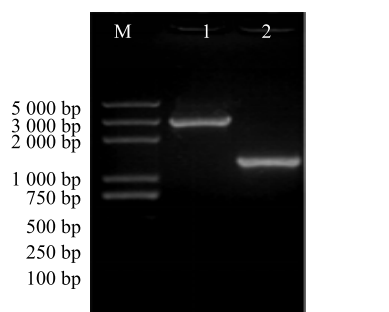
表 3 虫草素合成基因预测

Table 3 The putative enzymes involved in Cordycepin biosynthesis

基因名称	Transcript ID	FB-T03	FB-T04	CM-T05	CM-T06
ADK	TR4857 c2_g2_i46	3.91	3.21	2.05	1.82
	TR4857 c2_g2_i45	3.82	3.53	2.00	2.26
	TR4227 c1_g1_i8	1.19	0.43	3.13	2.26
	TR4227 c1_g1_i13	1.55	1.53	2.47	2.47
	TR1320 c5_g1_i1	24.84	20.85	26.53	25.33
	TR1320 c5_g1_i2	26.50	23.17	28.06	26.98
ADEK	TR4227 c1_g1_i13	1.55	1.53	2.47	2.47
	TR1320 c5_g1_i2	26.50	23.17	28.06	26.98
	TR2498 c16_g2_i4	1.45	1.10	7.76	6.66
	TR2498 c16_g2_i3	1.93	0.98	7.71	7.13
	TR2498 c16_g2_i2	1.95	1.47	8.98	8.07
	TR2498 c16_g2_i1	2.20	1.50	9.31	7.93
5'-NT	TR9945 c0_g2_i1	16.69	9.05	7.62	9.24
	TR9945 c0_g1_i1	17.39	9.37	7.54	10.78
	TR14073 c0_g2_i1	33.96	17.97	48.15	57.41
RNR 同源序列	TR217 c1_g1_i3	35.12	27.59	21.59	19.03
	TR217 c1_g1_i2	29.22	25.23	24.95	20.17
	TR7378 c0_g1_i2	3.90	3.94	3.89	4.38
	TR7378 c0_g1_i1	4.28	4.51	5.17	4.91
RNRM	TR6235 c1_g1_i1	58.22	34.81	62.33	85.12
RNRL	TR4942 c3_g1_i3	3.46	1.95	2.48	2.64

CO18 RNRL (GI: 531864625) 和 RNRM (GI: 531859135) 氨基酸序列进行比对, 相似率分别为 99%和 97%。与蛹虫草菌 RNRL (GI: 573978269) 和 RNRM (GI: 573986094) 氨基酸序列比对, 相似率分别为 99%和 97%。可见, 冬虫夏草和蛹虫草 RNR 亚基序列高度保守, 是 Ia 类 RNR, 亚基结构为 $\alpha 2\beta 2$ ^[13]。

根据 NCBI 结构分析服务系统和 EMBL-EBI 的 ProScan 序列搜索, 结果如图 5 所示, RNRL 含有 RNR-PFL 保守序列, 序列中含亚基结合区域和二聚体结合区域, 还含有催化活性位点 (202~203、217~218、247、427、429、431、446、603~608 aa), 以及效应物结合位点。RNRM 含有铁调节蛋白保守序列, 序列中含有二聚体结合区域, 亚铁氧化酶活



M-Marker 1-RNRL cDNA 全长 2-RNRM cDNA 全长
M-Marker 1-RNRL cDNA full length 2-RNRM cDNA full length

图 4 冬虫夏草 RNRL、RNRM cDNA 全长 1%琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 1% Agar gel electrophoresis map of the full length of *O. sinensis* RNR subunits cDNA

性中心,该序列具有高度保守性,其中铁调节蛋白区域对外界应激及病害感染时还可起到细胞防御作用^[13]。

4 讨论

本研究利用冬虫夏草菌丝体和子实体不同发育阶段转录组数据,基于虫草素合成与腺苷代谢途径类似,具有与腺苷类似的还原机制,预测冬虫夏草虫草素合成途径及相关基因,结果表明虫草素生物合成途径中多数基因在菌丝体阶段表达水平较高,故推测冬虫夏草菌丝体中虫草素的量应高于子实体,与蛹虫草中虫草素研究结果一致^[17]。由此可见,虫草素在冬虫夏草菌丝体阶段代谢相对活跃,可通过优化菌丝体培养条件来提高虫草素产量。

为进一步研究虫草素合成途径中的关键调控基

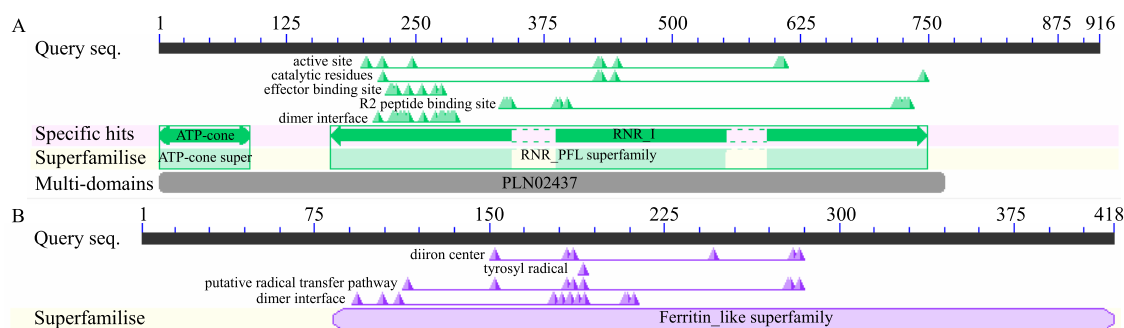


图 5 RNRL (A) 和 RNRM (B) 保守区域和功能结构域分析

Fig. 5 Analysis of the conserved regions and functional domains of RNRL (A) and RNRM (B)

因,本实验以 RNR 为切入点展开研究,已从转录本数据中挖掘到冬虫夏草 RNR 大、小亚基各一条及 4 条同源序列,不同生物 RNR 酶具类型不一,不同类型 RNRs 之间的氨基酸序列相似性很低,但有十分相似的三级结构的活性中心,都具有还原 ADP 生成脱氧腺苷的催化功能^[13]。RNR 酶有与 4 种 NDP 底物结合的位点,具有变构调节机制,与不同效应物结合后改变酶的活性或底物特异性^[13],通过对冬虫夏草 RNR 保守区域和功能结构域分析发现主要催化活性位点位于 RNRL, RNRM 含有铁调节蛋白保守位点,推测若 RNR 参与虫草素生物合成可能与某些调节因子有关。另外,冬虫夏草 RNR 酶与人、拟南芥、酵母和曲霉同属于 Ia^[12], Ia 型 RNR 亚基之间序列保守性高,从转录组数据中挖掘的 4 个 RNR 相似序列可能是 RNR 未知亚基,待进一步鉴定。人类 RNR 由大亚基 RNRMI 与小亚基 RNRMZ 或 RNRMZB 组成,2 种 RNR 及其 3 种亚基蛋白在肿瘤发病不同阶段中发挥不

同生物活性^[18], RNR 单个亚基或不同亚基的组合具有不同生物活性和作用机制,推测冬虫夏草 RNR 也有可能在同源序列或未知亚基参与下发挥还原虫草素 3'-羟基的生物活性。Masuda 等^[19]发现去膜的蛹虫草菌细胞提取物可以合成脱氧腺苷,但不能生成虫草素,Lennon 等^[11]研究认为虫草素还原酶可能需要整合到膜上或与膜上调控因子结合才能发挥活性,为虫草素 3'-羟基还原机制的研究提供依据。综上所述,本研究基于转录组测序分析预测虫草素合成相关基因及合成通路,并以 RNR 为切入点,展开虫草素生物合成研究,为揭示虫草素生物合成机制,最终提高虫草素产量奠定基础。

参考文献

- [1] 张 姝, 张永杰, Shrestha B, 等. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望 [J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 577-597.
- [2] 黄 彪, 程元柳, 曹秀君, 等. 冬虫夏草及其混淆品 HPLC 指纹图谱研究及共有成分鉴定 [J]. 中草药,

- 2017, 48(5): 991-996.
- [3] 蔡友华, 刘学铭. 虫草素的研究与开发进展 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1269-1272.
- [4] Xiang L, Li Y, Zhu Y, *et al.* Transcriptome analysis of the *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body reveals putative genes involved in fruiting body development and cordycepin biosynthesis [J]. *Genomics*, 2014, 103(1): 154-159.
- [5] Liao Y, Ling J, Zhang G, *et al.* Cordycepin induces cell cycle arrest and apoptosis by inducing DNA damage and up-regulation of p53 in Leukemia cells [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(5): 761-771.
- [6] Wu W C, Hsiao J R, Lian Y Y, *et al.* The apoptotic effect of cordycepin on human OEC-M1 oral cancer cell line [J]. *Cancer Chem Pharm*, 2007, 60(1): 103-111.
- [7] 杨 涛, 董彩虹. 虫草素的研究开发现状与思考 [J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 180-190.
- [8] 莫红丽, 叶小舟, 吴继明, 等. 蛹虫草中虫草素差异表达基因 cDNA 的克隆 [J]. 广东蚕业, 2010(2): 38-46.
- [9] Chassy B M, Suhadolnik R J. Nucleoside antibiotics IV. Metabolic fate of adenosine and cordycepin by *Cordyceps militaris* during cordycepin biosynthesis. *biochemica et biophysica Acta (BBA)-Nucleic acids and protein synthesis* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1969, 182(2): 307-315.
- [10] 康 超, 文庭池, 康冀川, 等. 不同培养条件和前体对蛹虫草液体发酵产虫草素的影响 [J]. 菌物学报, 2012, 31(3): 389-397.
- [11] Lennon M B, Suhadolnik R J. Biosynthesis of 3'-deoxyadenosine by *Cordyceps militaris*: Mechanism of reduction, *biochim. biophys. acta, nucleic acids* [J]. *Protein Synth*, 1976, 425: 532-536.
- [12] Yin Y L, Yu G J, Chen Y J, *et al.* Genome-wide transcriptome and proteome analysis on different developmental stages of *cordyceps militaris* [J]. *PLoS One*, 2012, 12(7): e5.
- [13] 倪 贺, 李海航, 黄 文, 等. 核糖核苷酸还原酶研究 [J]. 科技导报, 2008(8): 79-83.
- [14] 程元柳. 基于核苷类指标性成分的冬虫夏草质量控制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2015.
- [15] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, *et al.* Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome [J]. *Nature Biot*, 2011, 29(7): 130-644.
- [16] 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.
- [17] Peng Z, Xia Y, Xiao G, *et al.* Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine [J]. *Geno Biol*, 2011, 12(11): 287-302.
- [18] 田 华, 李 红, 张立行, 等. 核糖核苷酸还原酶亚基 RRM1、RRM2 和 RRM2B 表达对肝细胞癌患者预后的影响 [J]. 肿瘤, 2014, 34(5): 458-463.
- [19] Masuda T, Goto F, Yoshihara T, *et al.* Construction of homo-and heteropolymers of plant ferritin subunits using an *in vitro* protein expression system [J]. *Prot Expr Andpurif*, 2007, 56(2): 237-246.