

牛樟芝鲨烯环氧酶基因的克隆、生物信息学及表达分析

李晶¹, 林雄杰², 王泽辉^{1,3}, 刘艳玲¹, 林占熿^{1*}

1. 国家菌草工程技术研究中心, 福建 福州 350002

2. 福建省农业科学研究所果树研究所, 福建 福州 350013

3. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002

摘要: 目的 克隆牛樟芝三萜合成途径中鲨烯环氧酶基因 (AcSE), 并进行生物信息学和表达差异分析。方法 以牛樟芝菌丝体 cDNA 为模板, 利用快速末端扩增 (RACE) 进行 AcSE 序列扩增, 利用生物信息学分析 AcSE 基因的理化性质并预测其蛋白二级结构、三级结构及其功能; 同时利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 测定不同培养时间的液体牛樟芝菌丝体及子实体中 AcSE 基因的表达情况。结果 AcSE 的 cDNA 全长 1 446 bp (GenBank 编号: KT070558), 编码 481 个氨基酸, 相对分子质量为 53 300, 等电点为 6.36。结构域分析表明 AcSE 内含 3 个跨膜的结构域, 无卷曲螺旋结构, 且疏水区和亲水区交替存在。AcSE 的 gDNA 全长为 1 607 bp, 含 4 个外显子和 3 个内含子。AcSE 在液体培养 7 d 的牛樟芝菌丝体中表达量最高, 为子实体的 7.89 倍, 且随着培养时间的延长逐渐下降。结论 首次从牛樟芝中克隆了 AcSE 基因, 为进一步阐明该基因在牛樟芝三萜合成途径中的作用奠定基础。

关键词: 牛樟芝; 鲨烯环氧酶; 生物信息学; 实时荧光定量 PCR; RACE

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2440-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.028

Cloning, bioinformatics, and expression analysis of squalene epoxidase in *Antrodia cinnamomea*

LI Jing¹, LIN Xiong-jie², WANG Ze-hui^{1,3}, LIU Yan-ling¹, LIN Zhan-xi¹

1. China National Engineering Research Center of JUNCAO Technology, Fuzhou 350002, China

2. Fruit Research Institute of Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China

3. College of Life Science Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective To clone the squalene epoxidase gene of *Antrodia cinnamomea* (AcSE) and analyze the bioinformatics and expression of the gene. **Methods** AcSE was cloned by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) from cDNA of *A. cinnamomea*. The physical and chemical properties of AcSE protein were analyzed, and its secondary structure, tertiary structure, and function were predicted by using bioinformatics analysis. The expression of AcSE in mycelium and fruit body of *A. cinnamomea* at different culture time was detected by using quantitative real-time PCR (qRT-PCR). **Results** The full-length cDNA sequence of AcSE were 1 446 bp (Genbank: KT070558), encoding a 481-amino-acid polypeptide. The molecular weight of AcSE was 53 300 and pI was 6.36. Domain analysis results showed that AcSE had three transmembrane domains without coiled-coil structure, and hydrophobic and hydrophilic regions existed alternately. The gDNA sequence of AcSE was 1 607 bp, contained four exons and three introns. A gene expression analysis by relative qRT-PCR showed that the highest expression level of AcSE was in mycelia incubated for 7 d of *A. cinnamomea*, and it was 7.89 times than that in fruiting body, and a gradual decline was observed with the extension of the culture time. **Conclusion** Gene AcSE was firstly cloned from *A. cinnamomea*, and it would lay a foundation for exploring the mechanism of terpenoid biosynthesis in *A. cinnamomea*.

Key words: *Antrodia cinnamomea* T. T. Chang & W. N. Chou; squalene epoxidase; bioinformation; quantitative real-time PCR; RACE

牛樟芝 *Antrodia cinnamomea* T. T. Chang & W. N. Chou 是我国台湾省特有的珍稀药用菌品种, 生长在腐烂、空心的牛樟树 *Cinnamomum kanehirai* Hay 内壁, 野生子实体生长速度慢、产量低, 但常

收稿日期: 2017-11-23

基金项目: 福建农林大学发展研究基金“牛樟芝三萜合成关键酶 SE 互作蛋白筛选及功能分析”(KF2015111); 福建省 2011 计划“菌草生态产业协同创新中心”(K80ND8002)

作者简介: 李晶 (1985—), 女, 博士, 研究方向为食药菌研究。Tel: 13959197195 E-mail: 13959197195@163.com

*通信作者 林占熿 (1943—), 男, 研究员, 研究方向为菌草技术研究。Tel: 13705039961 E-mail: lzjuncao@163.com

被用于解毒、止痛,具有抗氧化和抗肿瘤等活性,因此被誉为“森林中的红宝石”^[1]。牛樟芝子实体和菌丝体中的主要药用成分物质为三萜类化合物,且种类多、成分复杂,目前已分离鉴定出多种萜类化合物^[2-3]。Lu 等^[4]发现牛樟芝三萜合成途径与灵芝三萜合成途径类似,为甲羟戊酸途径(MVA),且该途径中关键基因能影响三萜含量。Zhao 等^[5]在灵芝中获得了鲨烯合酶基因(Sqs),将灵芝 Sqs cDNA 序列克隆到酵母表达载体 PYF1845 中,转入因缺失 Sqs 活性而依赖麦角甾醇的酵母突变株 2C1 中,结果该转化子可以在不含麦角甾醇的培养基上生长,从而证实了所获得 Sqs 的功能。Shang 等^[6]从灵芝中克隆到羊毛甾醇合酶基因(Ls),将其 cDNA 序列插入到酵母表达载体 pYES2 中,转到酵母突变株 *oscA* 中,该菌株原本由于缺失 Ls 活性而依赖麦角甾醇才能生存,Ls 转入灵芝 cDNA 序列后可在 28 °C 不添加麦角甾醇的培养基上生长,而原来的突变体不能生长,从而证实该基因的功能。鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)是牛樟芝三萜合成途径中的重要酶,包括甲羟戊酸经一系列反应在鲨烯合酶(SQS)的作用下合成鲨烯,经 SE 催化变成 2,3-氧化鲨烯,在不同的氧化鲨烯环氧酶(OSCs)作用下,2,3-氧化鲨烯环化形成三萜的前体物质,其多种环化的结构是形成三萜骨架的根源^[7]。

SE 不仅能促进三萜皂苷的释放,还可有效增加三萜皂苷的合成量^[8]。研究证实 SE 在植物、真菌的三萜类皂苷合成中起到重要作用。Jandrositz 等^[9]最早从酿酒酵母基因文库中分离得到 SE 基因(ERG1),编码 496 个氨基酸,Southern 杂交表明其定位在第 15 号染色体上。刘宁等^[10]、胡薇等^[11]从人参克隆得到 SE 基因的 cDNA 全长为 1 611 bp,编码 537 个氨基酸,通过检测玛烯二醇含量变化证明 SE 的含量与人参皂苷生成量相关。邢朝斌等^[12]从刺五加中克隆获得 2 个序列不同的 SE 基因,cDNA 全长分别为 1 665 bp 和 1 629 bp,分别编码 554 和 542 个氨基酸,推测它们在植物体内可能参与不同的反应途径,存在不同的表达模式。目前关于牛樟芝鲨烯环氧酶基因(AcSE)相关研究尚未见相关报道,鉴于 SE 在 MVA 途径中的重要作用,本研究通过末端快速扩增技术(rapid-amplification of cDNA ends, RACE)获得 AcSE 基因序列,利用荧光定量 PCR (quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)检测不同培养时间牛樟芝菌丝体中基因表达水平,

从而为牛樟芝三萜生物合成途径调控机制和蛋白纯化等提供理论依据。

1 材料

台湾牛樟芝菌株 *Antrodia cinnamomea* T. T. Chang & W. N. Chou AC001 (GenBank 号: KM925002)、牛樟木栽培牛樟芝 AC001 子实体均由台湾神农真菌生物技术有限公司惠赠。

2×Taq Master Mix、D2000 (plus) Marker 购于天根生化科技(北京)有限公司; TRIzol 试剂和 5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends 试剂盒购于 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购于 Toyobo 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购于 Omeag 公司; Easy Dilution、3' full RACE Core Set with PrimeScriptTM RTase、SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒、*E. coli* DH5α 感受态细胞和 pMDTM18-T 载体购于 Takara 公司。本研究中引物合成与测序工作均由铂尚生物技术(上海)有限公司完成。

2 方法

2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成

参照 TRIzol 试剂说明书操作提取新鲜的牛樟芝菌丝体与子实体总 RNA,用 NanoDrop 2000c 检测其浓度和纯度后置于 -80 °C 备用。按照 Toyobo 反转录试剂盒操作说明合成 cDNA,产物置于 -20 °C 备用。

2.2 AcSE 蛋白质编码区(CDS)克隆

从 NCBI 数据库中获得灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leys. Ex Fr.) Karst、云芝 *Coriolus versicolor* L.、平菇 *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Kummer 等 20 余种真菌的 SE 序列,根据序列比对结果为上下游引物确定 2 个合适的保守区域,在线设计简并引物 se-1 和 se-2 (表 1),以牛樟芝菌丝体 cDNA 为模板扩增其保守区片段,25 μL 反应体系为 2×Taq Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL,cDNA 模板 1 μL,ddH₂O 9.5 μL。反应条件:95 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,62.7 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 80 s,共 32 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min。所得产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收并纯化,克隆至 pMDTM18-T 载体后测序。

2.3 5'和 3'RACE 扩增^[13]

将克隆到的 SE 基因片段在 NCBI 中进行 BLASTX 比对,所比对的序列结果用于设计 RACE 的引物序列,5'RACE SE 的扩增以 cDNA 为模板并

与特异性引物 se-3、se-4 (表 1) 按 5'RACE 扩增试剂盒操作进行反应; 3'-RACE SE 的扩增以 cDNA 为模板并与特异性引物 se-5、se-6 (表 1) 按 TaKaRa LA Taq with GC Buffer 试剂盒操作进行反应。

对 AcSE CDS 克隆产物, 3'和 5'RACE 扩增产物分别进行电泳及切胶回收、纯化和测序, 将所测序得到的片段进行拼接, 获得 cDNA 全长序列, 设计引物 se-7、se-8 (表 1) 以牛樟芝菌丝体 gDNA 为模板, 扩增 AcSE 全长。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	引物序列 (5'-3')
se-1 (F)	GATCGTGGGCGAGCTGYTNCARCCNGG
se-2(R)	GGTGCCGCATGTTCCANSHRTC
se-3	GAGCACGACGCAGTAGCC
se-4	AGACACGACTCCATCCCC
se-5	ACGGTTGTGCTCGTAAAGGGTC
se-6	CTCAAGGACCTCATTCTTTCGG
se-7 (F)	CCAGCAGAAATGTGGTCAA
se-8 (R)	GTCCGCATATCTCGCAA

N=A, G, C, T R=A, G Y=C, T S=G, C H=A, C, T

2.4 AcSE 生物信息学分析

将所得的基因全长序列提交到 NCBI 中用 BLASTP 中进行比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 利用 Clustal X 2.0 进行多重序列比对分析, 通过 MEGA 5.1 软件最大似然法(maximum likelihood method, ML) 构建系统发育树^[14], 同时以 1 000 次自举分析(Bootstrap) 检测各分支的置信度。将所得的 AcSE 核酸序列翻译为蛋白序列, 利用 ExPASy 数据库预测其相对分子质量、等电点及疏水性分 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>); 利用 SignalP 4.1 Sever 进行信号肽预测; 利用 TMHMM Server 2.0 进行蛋白质跨膜区预测; 利用 PORTER、SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>), InterPro protein (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 和 PyMOL 软件预测其二级和三级结构。

2.5 AcSE 在牛樟芝子实体与菌丝体中的相对表达

本课题组之前的研究表明牛樟芝子实体中三萜含量最高且在菌丝体不同生长阶段三萜含量差异较大^[15], 因此以牛樟芝子实体为对照, 用 β -actin 作为内参基因, 引物序列为 5'-TATTCTCGTCTCATGGCCTTTC-3', 5'-GTCGC-

AGCTGGAGTTGATTA-3'。利用 qRT-PCR 测定 AcSE 在液体培养 7、14、21、28、35 和 42 d 的菌丝体中的相对表达量。扩增引物序列分别为 5'-ATGGGCCGGTGTGTTTATAC-3'和 5'-CCGAA-AGAATGAGGTCCTTGAG-3', 反应体系 20 μ L: 2 \times SYBR qPCR Mix 10 μ L, 引物各 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7 μ L, 2 步法 qRT-PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C、3 min; 39 个循环 95 $^{\circ}$ C、10 s, 58.2 $^{\circ}$ C、40 s。以 ddH₂O 代替 cDNA 为模板作阴性对照, 采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算, 即实验组目的基因的表达量相对对照组的变化倍数。每个反应 3 个重复。

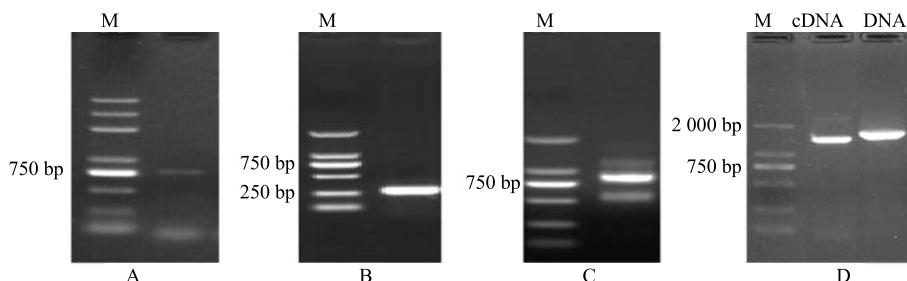
3 结果与分析

3.1 AcSE 基因克隆

以牛樟芝菌丝体 cDNA 为模板, 用引物 se-1/se-2 扩增获得 AcSE CDS 片段长度为 784 bp, 经 BLAST 分析其与根状索孔菌 *Fibroporia radiculosa* Peck、云芝 *Trametes versicolor* L.、肉质显丝菌 *Phanerochaete carnosus* Burt、污叉丝孔菌 *Dichomitus squalens* Karst 和双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* Lange 的相似度分别为 72%、67%、67%、68%和 64%。所得 CDS 片段的 3'RACE 产物为 703 bp (含 Ploy A), 5'RACE 产物为 283 bp, 以 se-7 和 se-8 进行 AcSE 全长扩增, 获 gDNA 全长为 1 607 bp, 其开放阅读框编码 481 个氨基酸, 包括 3 个大小分别为 52、55、54 bp 的内含子, 各扩增电泳图和内含子见图 1、2。

3.2 AcSE 生物信息学分析

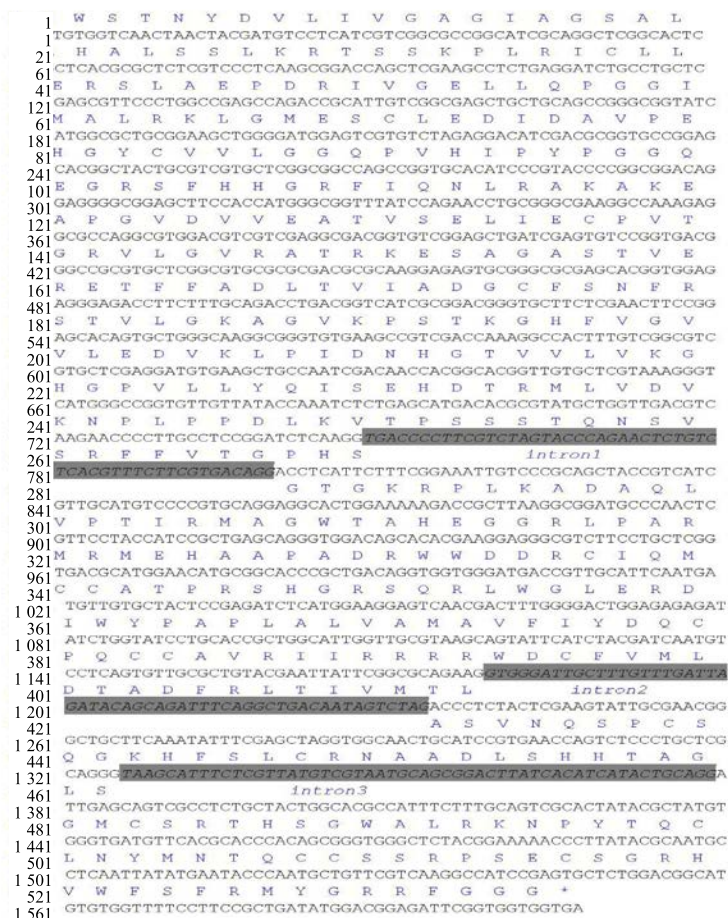
通过对 AcSE CDS 及其 3'和 5'RACE 进行全长扩增, 将目的片段回收纯化后的测序结果与拼接得到的全长序列一致, 该 cDNA 全长为 1 446 bp (GenBank Accession 编号: KT070558), 编码 481 个氨基酸的多肽 (图 2)。利用 ML 法构建 AcSE 系统发育树, 由图 3 可知, 其与污叉丝孔菌 *Dichomitus squalens* (XM007365269)、云芝 *Trametes versicolor* (XM008045850) 和根状索孔菌 *Fibroporia radiculosa* (XM012326949) 等都具有较高的同源性。通过 ExPASy ProtParam tool 预测其相对分子质量为 53 300, 等电点 (pI) 为 6.36, 分子式为 C₂₄₁₇H₃₈₀₂N₆₅₀O₆₇₀S₂₀。信号肽分析结果表明 AcSE 序列中无明显的信号肽序列 (图 4)。跨膜结构域的预测结果表明 AcSE 定位于细胞膜表面的可能性最大, 内部含 3 个典型的跨膜结构域 (图 5)。使用 COILS servers 在 3 种不同的窗口宽度下均检测到 AcSE 蛋白



A-AcSE CDS 片段 B-AcSE 5'RACE 片段 C-AcSE 3'RACE 片段 D-AcSE cDNA 和 DNA 全长 M-Marker
A-AcSE sequence coding for amino acids in protein B-AcSE 5'RACE sequence C-AcSE 3'RACE sequence D-full-length of AcSE in cDNA and DNA M-Marker

图 1 AcSE 基因克隆 1%凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of cloning AcSE in 1% gel



灰色部分为 3 个内含子

Grey parts were three introns

图 2 AcSE gDNA 全长序列及编码氨基酸序列

Fig. 2 Full length gDNA and encoded amino acid sequences of AcSE

无卷曲螺旋结构 (图 6)。利用 ExPASy ProtScale tool 预测 AcSE 蛋白的疏水性, 并采用 Kyte-Doolittle 方法算出其疏水性最大值为 4.50, 最小值为 -4.50, 疏水区和亲水区相互交替存在 (图 7)。采用 PORTER 软件对 SE 的二级结构分析结果见图 8, 发现蛋白中以 α -螺旋和无规卷曲

为主, 其中 α -螺旋占总二级结构的 34.51%, 无规卷曲占总二级结构的 45.95%; 延伸链 85 个, 占总二级结构的 17.67%。利用 SWISS-MODEL 在线软件 (<http://swissmodel.expasy.org/>)、InterPro protein (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 和 PyMOL 软件进行分析 (图 9)。

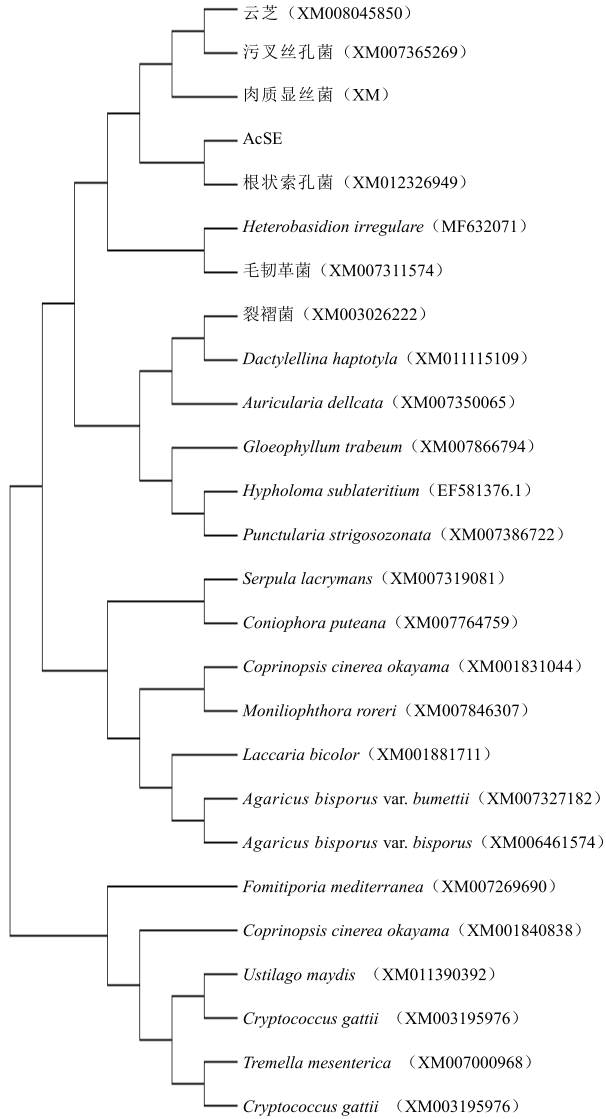


图 3 利用 ML 法建立的 AcSE 系统发育分析
Fig. 3 Phylogenetic analysis of AcSE constructed with ML method

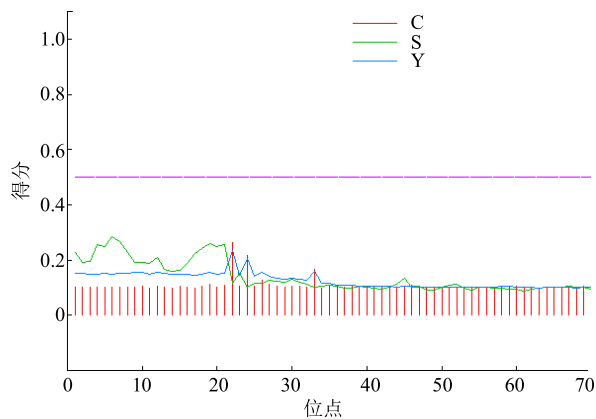


图 4 SignalP 软件预测 AcSE 蛋白信号肽
Fig. 4 Signal peptide of AcSE predicted by SignalP

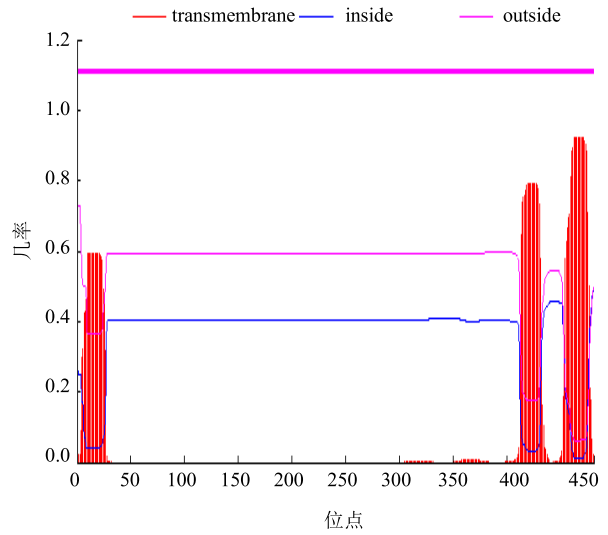


图 5 AcSE 蛋白跨膜结构域分析
Fig. 5 Transmembrane domain analysis of AcSE

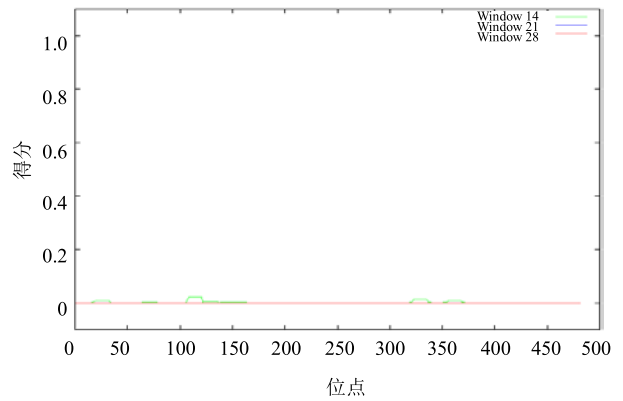


图 6 AcSE 蛋白卷曲螺旋预测分析
Fig. 6 Coil forecasting analysis of AcSE protein

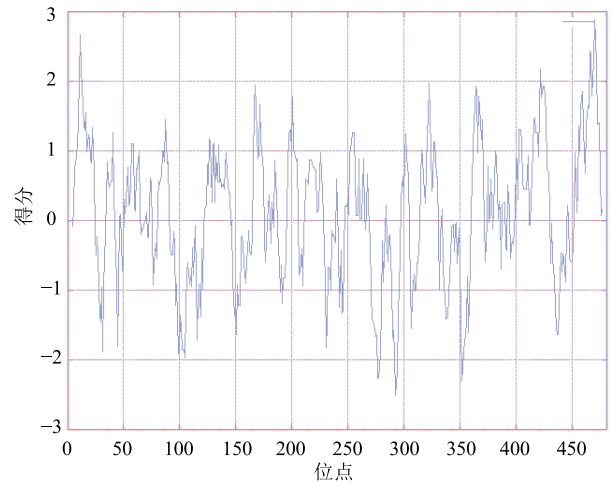


图 7 SE 蛋白疏水性预测分析
Fig. 7 Hydrophobicity prediction analysis of AcSE protein (Kyte-Doolittle)

```

MWSTNYDVLIVGAGIAGSALAHALSSLRKRTSSKPLRICKLLERSLAEPDRIVGELLQPGGI
CCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
MALRKLGMESCLEIDIDAVPEHGVCVVLGGQPVHIPYPGGQEGRSFHHGRFIQNLRAKAKE
HHHHHHCHHHHHHHCCCCCEEEEEEECCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCECHHHHHHHHHHHHH
APGVDVVEATVSELIIECPVTGRVLGVRATRKEASAGASTVERETFFADLTVIADGCFSNFR
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
STVLGKAGVKPSTKGFVGVVLELVKLPIDNHGTIVLVKGGHGPVLLYQISEHDTMRLVDV
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
KNPLPPDLKDLILSEIVPQLPSSSLHVPVQEALEKDRLLRRMPNSFLPSAEQGGQHTKEGVF
CCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
LLGDAWNMRHPLTGGGMTVAFNDVVLLRDLMEGVNDFGDWREISGILHRWHWLKQYSST
EECCCCCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCHHH
INVL SVALYELFGAEDPLLEVLRTGCFKYFELGGNCIREPVSLLAGIEQSPLLLARHFFA
HHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
VALYAMWVMFTHPQRVGVSTKPLYAMPQLYEYPMFLVKAIRVLWTACVVFLPLIWTETRW
HHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
W
C
    
```

C-无规卷曲 H-α-螺旋 E-延伸链
C-random coil H-alpha helix E-extended strand

图 8 AcSE 蛋白二级结构预测

Fig. 8 Secondary structure prediction of AcSE protein



图 9 AcSE 蛋白三级结构预测

Fig. 9 3D structure prediction of amino acid sequences of AcSE protein

3.3 AcSE 相对表达分析

采用 qRT-PCR 检测牛樟芝子实体和不同培养时间菌丝体中 AcSE 表达差异，以 β-actin 作内参基因。结果表明，AcSE 在培养 7 d 的牛樟芝菌丝体中表达量最高，随着培养时间的延长呈下降趋势，且培养 7 d 的菌丝体中 AcSE 的表达量为子实体的 7.89 倍，培养 14、21 d 的表达量分别是子实体的 3.4 倍和 2.7 倍，而其他培养时间与牛樟芝子实体的表达量的差异不显著（图 10），表明不同培养时间菌丝体具有一定组织特异性。

4 讨论

三萜类化合物在牛樟芝中具有重要药用价值，可用于抗过敏、抗氧化、抗肿瘤等^[16]。牛樟芝三萜合成途径中 SE 催化生成的 2,3-环氧鲨烯是最终生成三萜化合物的重要底物，SE 在三萜类化合物合成途径中发挥重要作用，因此研究该基因对开发牛樟芝三萜的药用价值具有极其重要的意义。目前其在苜蓿^[17]、人参^[18]等药用植物中较常见。邢朝

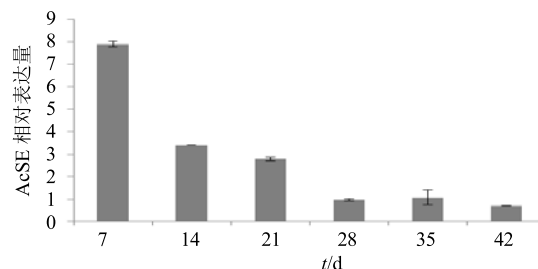


图 10 不同培养时间牛樟芝菌丝体中 AcSE 的相对表达量
Fig. 10 Relative expression amount of AcSE in *A. cinnamonome* mycelium at different culture time

斌等^[19]对刺五加 SE 基因存在错义突变和同义突变的位点与刺五加总皂苷含量存在显著相关 ($P < 0.05$)；牛云云等^[20]在三七中克隆到 2 个鲨烯环氧酶基因，研究表明两者在根、茎、叶和花中表达模式不同，推测它们分别与三萜皂苷和甾醇的合成有关；而相似的结论在人参中也有研究^[21]。李惠华等^[22]也在枇杷中发现了类似的结果，枇杷中鲨烯环氧酶基因的表达量与枇杷悬浮培养细胞中的熊果酸含量呈正相关 ($P < 0.05$)。蒋世翠等^[23]通过对西洋参的不同器官中鲨烯环氧酶和鲨烯环氧酶的研究也表明这 2 种基因与总皂苷的量呈正相关。许多研究证明在药用植物研究中 SE 作为萜类化合物合成途径中的关键酶，其表达量的高低能影响萜类化合物含量；但相关研究在微生物中较少，牛樟芝三萜合成途径中 SE 催化生成 2,3-环氧鲨烯是最终生成三萜化合物的重要底物，因此 SE 在三萜类化合物合成途径中发挥重要作用，因此本研究的结果将为

后续相关研究奠定基础。

本研究中利用 RACE 扩增 AcSE, 获得 cDNA 全长为 1 446 bp, 编码 481 个氨基酸; gDNA 序列中含 3 个内含子, 其编码蛋白与云芝等同源性较高, 具有一定的保守型, 推测该蛋白在不同物种间所发挥的作用基本相似。对牛樟芝三萜合成途径中关键基因的研究鲜见报道, 本研究首次从牛樟芝中克隆了编码 AcSE, 并对其进行生物信息学表达分析, 发现其表达量在不同培养阶段菌丝体中具有较大差异。本实验结果将为利用次生代谢工程技术来提高珍稀药用菌品种有效成分含量提供理论依据, 通过现代生物技术实现对甾醇皂苷等三萜类物质生物合成进行人工调控, 可缓解由于牛樟芝子实体生长缓慢、成本高、过度采伐等瓶颈问题, 是解决牛樟芝大规模生产和提升子实体或菌丝体三萜量有效可行的办法之一, 其结果对于增加有效成分量, 提高经济效益具有重要意义。

参考文献

- [1] Chang T, Chou W. *Antrodia cinnamomea* sp. Nov. On *cinnamomum kanchirai* in taiwan [J]. *Mycol Res*, 1995, 99(6): 756-758.
- [2] Chen C C, Chyau C C, Hseu T H. Production of a cox-2 inhibitor, 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde, with submerged cultured *Antrodia camphorata* [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, 44(4): 387-392.
- [3] Liu H, Jia W, Zhang J, et al. Gc-ms and gc-olfactometry analysis of aroma compounds extracted from culture fluids of *Antrodia camphorata* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, 24(8): 1599-1602.
- [4] Lu M Y J, Fan W L, Wang W F, et al. Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2014, 111(44): E4743-E4752.
- [5] Zhao M, Liang W, Zhang D, et al. Cloning and characterization of squalene synthase (sqs) gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, 17(7): 1106-1112.
- [6] Shang C H, Shi L, Ren A, et al. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a lanosterol synthase gene from *Ganoderma lucidum* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(5): 974-978.
- [7] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants, in history and trends in bioprocessing and biotransformation [J]. *Springer*, 2002, 75(75): 31-49.
- [8] Xu X, Hu X, Neill S J, et al. Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* c. A. Meyer [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(6): 947-954.
- [9] Jandrositz A, Turnowsky F, Högenauer G. The gene encoding squalene epoxidase from *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization [J]. *Gene*, 1991, 107(107): 155-160.
- [10] 刘宁, 田玉华, 孟星宇, 等. 鲨烯环氧酶基因的克隆及其在人参根组织中的表达 [J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(1): 40-45.
- [11] 胡薇, 刘宁, 田玉华, 等. 人参鲨烯环氧酶基因的克隆与原核表达 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2012(10): 207-212.
- [12] 邢朝斌, 曹蕾, 陈龙, 等. 刺五加鲨烯环氧酶基因 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(2): 172-175.
- [13] Frohman M A. Race: Rapid amplification of cDNA ends-PCR protocols-4 [J]. *Proc Protocols Appl*, 1990, 39(1): 28-38.
- [14] Jagerschmidt A, Guillaume N, Roques B P, et al. Binding sites and transduction process of the cholecystokinin receptor: Involvement of highly conserved aromatic residues of the transmembrane domains evidenced by site-directed mutagenesis [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, 53(5): 878-885.
- [15] 李晶. 牛樟芝 MVA 途径中基因克隆及转录组、代谢组研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016.
- [16] Lu M C, El-Shazly M, Wu T Y, et al. Recent research and development of *Antrodia cinnamomea* [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2013, 139(2): 124-156.
- [17] Suzuki H, Achnine L, Xu R, et al. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2002, 32(6): 1033-1048.
- [18] Choi D W, Jung J, Im Ha Y, et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 557-566.
- [19] 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.
- [20] 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]. *药学学报*, 2013, 48(2): 211-218.
- [21] Kim O T, Bang K H, Kim Y C, et al. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2009, 98(1): 25-33.
- [22] 李惠华, 徐剑, 刘小英, 等. 鲨烯环氧酶基因 (sqs) 的克隆及其在温度胁迫下与枇杷悬浮培养细胞中熊果酸 (ua) 含量的相关性 [J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(4): 481-491.
- [23] 蒋世翠, 刘伟灿, 王义, 等. 西洋参不同器官中皂苷量与鲨烯合酶和鲨烯环氧酶基因表达的相关性 [J]. *中草药*, 2011, 42(3): 579-584.