

• 药材与资源 •

桑黄鲨烯环氧酶基因原核表达及过表达载体的构建

孙婷婷¹, 孙煦茵², 王旭彤², 王世新², 刘增才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 构建桑黄三萜生物合成途径中的关键酶——鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)基因的原核表达和过表达载体。方法 将克隆到的桑黄 SE 基因构建到原核表达载体 pET-32a(+) 上, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 使用异丙基硫代- β -D-呋喃半乳糖苷(IPTG)诱导表达 2~10 h 后, 通过 SDS-PAGE 进行检测。根据 GenBank 中提交的香菇 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(gpd)启动子序列设计引物, 利用 PCR 技术克隆获得香菇 gpd 启动子片段, 以植物双元表达载体 pCambia1301 为基础载体, 通过酶切、连接等方法将其中的 35 S 启动子替换为香菇 gpd 启动子, 再将 SE 基因编码区序列构建到 gpd 启动子下游, 构建桑黄 SE 基因的过表达载体。结果 成功构建了 SE 基因的原核表达载体 pET-32a-SE, SDS-PAGE 结果显示该蛋白的大小约为 55 000, 与预测的蛋白相对分子质量基本一致。PCR 检测、酶切鉴定和测序分析可知, 成功构建了适宜食用菌遗传转化的中间载体 pCambia1301-gpd-gpd 及 SE 基因的过表达载体 pCambia1301-gpd-gpd-SE。结论 为后期研究 SE 基因在桑黄三萜生物合成方面所发挥的功能奠定基础。

关键词: 桑黄; 鲨烯环氧酶; 原核表达; 载体构建; PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)11-2632-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.11.023

Construction of prokaryotic expression and over-expression vectors of squalene epoxidase gene from *Sanghuangporus baumii*SUN Ting-ting¹, SUN Xu-yin², WANG Xu-tong², WANG Shi-xin², LIU Zeng-cai², 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 obtain prokaryotic expression and over-expression vectors of squalene epoxidase (SE) gene from *Sanghuangporus baumii*. **Methods** The entire protein-coding cDNA of SE was cloned into the expression vector pET-32a(+). Then the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. SDS-PAGE was used to investigate the situation of expression after IPTG induction for 2—10 h. Additionally, primers were designed according to the gpd promoter sequence of *Lentinula edodes* in GenBank, and the gpd promoter fragment was obtained by PCR. Subsequently, the plant binary expression vector pCambia1301 was selected as the basic vector, and then the 35 S promoter replaced with *L. edodes* gpd promoter through enzyme digestion and connection. Finally, the coding region of SE was cloned to the downstream of the gpd promoter to construct over-expression vectors. **Results** The prokaryotic expression vector pET-32a-SE was successfully obtained. SDS-PAGE results showed a significant protein band was found in the vicinity of the relative molecular weight of approximately 55 000, consistent with molecular weight of the predicted protein. Moreover, the over-expression vector pCambia1301-gpd-gpd-SE was constructed successfully through different detection ways. **Conclusion** These results lay the foundation for the further study of SE in triterpenoid biosynthesis pathway of *S. baumii*. **Key words:** *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai; squalene epoxidase; prokaryotic expression; vector construction; PCR

桑黄 *Sanghuangporus 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,《神农本草经》描述其为“久

服轻身不老延年”;《中药大辞典》叙述其可治内科多种疾病,利五脏宣肠气等;《本草纲目》记载其能治血崩、血淋、经闭等症。现代医学研究表明桑黄

收稿日期: 2018-01-22

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2572017CF01); 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

具有抗肿瘤、保护肝脏、降血糖、抗炎、抗衰老及增强机体免疫力等多种功效^[1-6],是目前国际公认的生物抗癌领域中药效最好的大型真菌之一。在日本和韩国,桑黄被广泛用于治疗各期癌症以及预防术后癌症的转移及复发。桑黄中含有丰富的活性成分,其中三萜类化合物(简称桑黄三萜)因具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、提高免疫力等显著的生物活性被认为是桑黄的主要药效成分之一^[7-10]。近年来,尽管对于桑黄化学成分及药理活性的研究已取得了很大进展,但有关桑黄分子生物学方面的研究仍处于起步阶段,尤其是桑黄三萜生物合成的分子机制鲜见报道。

鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE 或 SQE)是多数药用植物、药用菌中三萜合成途径中的限速酶^[11],催化鲨烯生成 2,3-氧化鲨烯,该反应是三萜生物合成途径中的第一步氧化反应^[12],再经过一系列反应最终生成三萜类、甾醇类等重要萜烯类物质,其含量和活性决定了后续产物的产量^[13]。作为三萜中甾环骨架生物合成途径中的关键酶之一,近年来,已有很多中药 SE 基因被克隆和分析,如人参^[14]、三七^[15]、刺五加^[16]和滇重楼^[17]等。笔者多年来一直对桑黄三萜的药理活性及其合成途径进行研究,前期已克隆并分析了桑黄 SE 基因,研究表明该基因 cDNA 全长为 1 856 bp, 包含一个 1 452 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码 483 个氨基酸,预测蛋白的相对分子质量约为 53 360^[18]。因此,本研究在前期基础上,将 SE 基因全长 CDS 序列分别构建到原核表达和过表达载体上,为进一步研究 SE 基因在桑黄三萜生物合成过程中所发挥的功能奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

桑黄菌株 DL101 由东北林业大学邹莉教授鉴定为桑黄 *Sanghuangporus baumii* (Pilát) L. W. Zhou & Y. C. Dai (GenBank 登录号: KP974834),保存于东北林业大学林学院森林保护学科实验室;香菇 *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler 子实体购自哈尔滨大发市场;大肠杆菌克隆菌株 DH5 α 、表达菌株 BL21 (DE3) 由实验室保存,克隆载体 pMD18-T vector 购于(大连)TaKaRa 公司;原核表达载体 pET-32a (+)、真核表达载体 pCambia1301 由实验室保存。

1.2 试剂

T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶均购自大连 TaKaRa 公司;限制性内切酶购于美国 NEB 公司;快捷型植物基因组 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;质粒提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司;蛋白质 Marker 购于北京 TransGen 生物技术有限公司;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒购自北京 Solarbio 生物科技有限公司;其余试剂均为国产或进口分析纯试剂。

2 方法

2.1 桑黄菌丝体总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒提取桑黄菌丝体总 RNA,检测纯度和浓度合格后,使用 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H) 试剂盒进行 cDNA 第一链的合成,反应产物置于 -20 °C 保存备用。

2.2 重组质粒 pMD18-T-SE 的构建

根据实验室前期获得的 SE 基因 ORF 序列,使用 Primer Premier 5.0 进行分析,设计引物 ORF-F-B: 5'-CGCGGATCCATGGCGACCAGTCGCAACTCT-T3'和 ORF-R-H: 5'-CCCAAGCTTTTATTGTAGTTCACTCCAGAGTGGA-3',上下游引物分别引入 BamH I、Hind III 的酶切位点。以反转录合成的 cDNA 第一链为模板,进行 PCR 扩增。扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °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。

2.3 桑黄 SE 基因原核表达载体的构建

将测序正确的 pMD18-T-SE 和 pET-32a (+)质粒分别用 BamH I 和 Hind III 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, BamH I、Hind III 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 *Escherichia 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。

2.4 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,剩余的菌液中加异丙基硫代- β -D-呋喃半乳糖苷(IPTG)(终浓度为 1 mmol/L)进行诱导表达,28 °C,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。

表 1 桑黄 SE 基因过表达载体构建中所用引物序列

Table 1 Primers used for construction of SE over-expression vector

引物名称	引物序列 (5'→3')	引入酶切位点
Gpd-F-E	CGgaattcCGAAGTTTGAGGTGGTTGCGAATAC	EcoR I
Gpd-R-X	CCctcgagTCAAGCAGTCAATGGATTGGAGTGT	Xho I
Le-gpdF	CGAAGTTTGAGGTGGTTGCGAATAC	
HygR	GCCATTTATTATTTCCTTCC	
Gpd-F-H	CCCaaagcttCGAAGTTTGAGGTGGTTGCGAATAC	Hind III
Gpd-R-B	GGAagatctTCAAGCAGTCAATGGATTGGAGTGT	Bgl II
SE-B	GGAagatct ATGGCGACCAGTCGCAACTCTT	Bgl II
SE-b	GGAagatct TTATTGTAGTTCACTCCAGAGTGGA	Bgl II
1301R	GAGAAAAGGGTCCTAACCAAG	

2.5.1 香菇 gpd 启动子的克隆 使用 DNA 提取试剂盒提取香菇子实体基因组 DNA,根据已报道的香菇 gpd 启动子序列(GenBank 登录号: KF972468)设计引物 Gpd-F-E 和 Gpd-R-X,分别引入了 EcoR I 和 Xho I 酶切位点(表 1),以香菇基因组 DNA 为模板,进行 gpd 启动子的 PCR 扩增,扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s, 60 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min, 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。

2.5.2 重组质粒 pCAMBIA 1301-gpd 的构建 使用限制性内切酶 EcoR I、Xho I 对 pCAMBIA 1301 质粒进行部分双酶切,双酶切反应体系为 50 μ L: 含 5 μ L 10 $\times$ Cutsmart Buffer, 5 μ L pCAMBIA 1301 质粒, EcoR I、Xho I 限制性内切酶各 1 μ L, 38 μ L ddH₂O, 反应条件为 37 °C 酶切 5 min, 65 °C 灭活 20 min 后采用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。将电泳检测正确的质粒大片段回收纯化,与同样经过双酶切的香菇 gpd 启动子纯化片段连接,转化 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性转化子,以菌液为模板,使用引物

2.5 桑黄 SE 基因过表达载体的构建

在植物双元表达载体 pCAMBIA 1301 的基础上,将其中的 2 个 35 S 启动子替换为已报道的香菇 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(gpd)启动子,再将 SE 基因 ORF 全长克隆到 gpd 启动子下游,构建 SE 基因的过表达载体,构建过程中所用到的引物如表 1 所示。

Le-gpdF 和 HygR(表 1)进行 PCR 扩增检测,将检测正确的阳性克隆菌液送至哈尔滨博仕生物公司进行测序。

2.5.3 重组质粒 pCAMBIA 1301-gpd-gpd 的构建 将“2.5.2”项中构建好的 pCAMBIA 1301-gpd 重组质粒先用限制性内切酶 Bgl II 进行单酶切,酶切体系为 100 μ L,含 10 μ L 10 $\times$ NEB Buffer, 12 μ L 重组质粒 pCAMBIA 1301-gpd, 10 μ L Bgl II 限制性内切酶, 68 μ L ddH₂O, 反应条件为 37 °C 酶切 3 h,采用 1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。将电泳检测正确的质粒大片段回收纯化后再用限制性内切酶 Hind III 进行单酶切,酶切体系为 100 μ L,含 10 μ L 10 $\times$ Green FD Buffer, 40 μ L 上一步酶切回收产物, 10 μ L Hind III 限制性内切酶, 40 μ L ddH₂O, 反应条件为 37 °C, 酶切 3.5 h, 酶切产物采用 1%的琼脂糖凝胶进行检测。将电泳检测正确的质粒大片段回收纯化后与同样经过双酶切的香菇 gpd 启动子纯化片段进行连接,转化 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性转化子,以菌液为模板,使用引物 Le-gpdF 和 1301R(表 1)进行 PCR 扩增检测,将检测正确的阳性克隆菌液送至哈尔滨博仕生物公司进行测序。

2.5.4 SE 过表达载体的构建 对 SE 基因编码区

进行克隆,以桑黄 cDNA 为模板,根据 SE 编码区设计引物 SE-B 和 SE-b 并分别引入 Bgl II 酶切位点(表 1)。将“2.5.3”项中构建好的 pCambia 1301-gpd-gpd 重组质粒用限制性内切酶 Bgl II 进行单酶切,酶切体系为 100 μ L,含 10 μ L 10 $\times$ NEB Buffer, 20 μ L 重组质粒 pCambia 1301-gpd-gpd, 5 μ L Bgl II 限制性内切酶, 40 μ L ddH₂O,反应条件为 37 $^{\circ}$ C,酶切 45 min,酶切产物采用 1%的琼脂糖凝胶进行检测。将检测正确的质粒大片段回收纯化,与同样经过 Bgl II 单酶切的 SE 基因编码区的纯化产物连接,转化 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性转化子,以菌液为模板,使用引物 SE-B 和 1301R(表 1)进行 PCR 扩增检测,将检测正确的阳性克隆菌液送至哈尔滨博仕生物公司进行测序。

3 结果与分析

3.1 重组质粒 pMD18-T-SE 的获得

通过设计特异性引物将酶切位点 BamH I 和 Hind III 引入到 SE 基因的 ORF 两端,通过 PCR 扩增出约 1 500 bp 的目的条带(SE ORF 大小为 1 452 bp),如图 1 所示。PCR 纯化产物与 pMD18-T vector 经连接、转化、克隆后,挑选阳性克隆做菌液 PCR 检测,结果如图 2 所示,目的条带约为 1 500 bp,与 ORF 全长大小一致。此外,为了进一步验证重组质粒 pMD18-T-SE 的准确性,将重组质粒进行 BamH I 和 Hind III 双酶切,结果如图 3 所示,酶切出 2 条带,一条与 pMD18-T vector 质粒大小一致(2 500 bp 左右),另一条与目的片段大小一致(1 500 bp 左右),综合以上结果表明,成功获得了重组质粒 pMD18-T-SE。

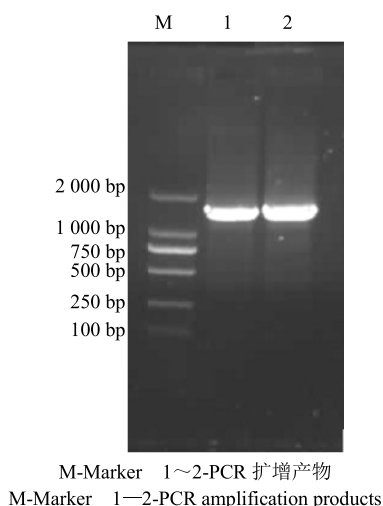


图 1 SE ORF PCR 扩增

Fig. 1 Electropherograms of SE ORF amplified by PCR

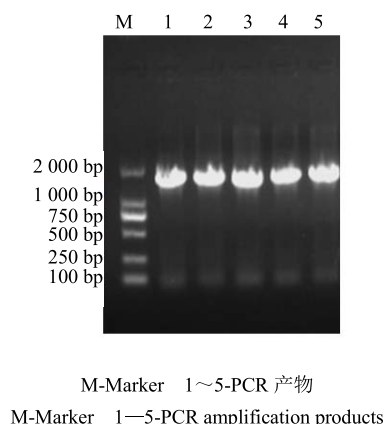


图 2 菌液 PCR 产物检测

Fig. 2 Electropherograms of products amplified by PCR

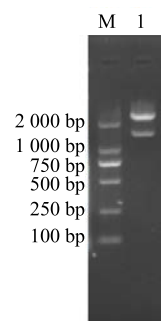


图 3 重组质粒 pMD18-T-SE 双酶切检测

Fig. 3 Determination of recombinant plasmid pMD18-T-SE by double-enzyme digestion

3.2 桑黄 SE 基因原核表达载体的构建

将经过菌液 PCR 和双酶切验证正确的重组质粒 pMD18-T-SE,以及本研究所选用的原核表达载体 pET-32a (+) 分别使用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切,回收目的条带,连接,转化到大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 感受态细胞中,在含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 固体平板培养基上进行涂布培养,随机挑取 3 个单菌落,分别接种到含氨苄的 LB 液体培养基中进行振荡培养,菌液 PCR 检测结果如图 4 所示,PCR 扩增产物条带大小约为 1 500 bp,与 ORF 全长大小吻合。此外,将重组质粒 pET-32a (+)-SE 进行 BamH I 和 Hind III 双酶切检测,获得 2 条目的条带,如图 5 所示,相对分子质量较小的为 SE 基因条带,约为 1 500 bp,与 ORF 全长大小一致,表明 pET-32a (+)-SE 已经成功转入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 中。

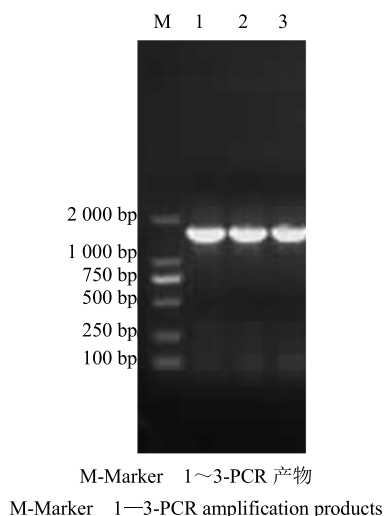


图 4 阳性克隆菌液 PCR 检测

Fig. 4 Electropherograms of products amplified by PCR

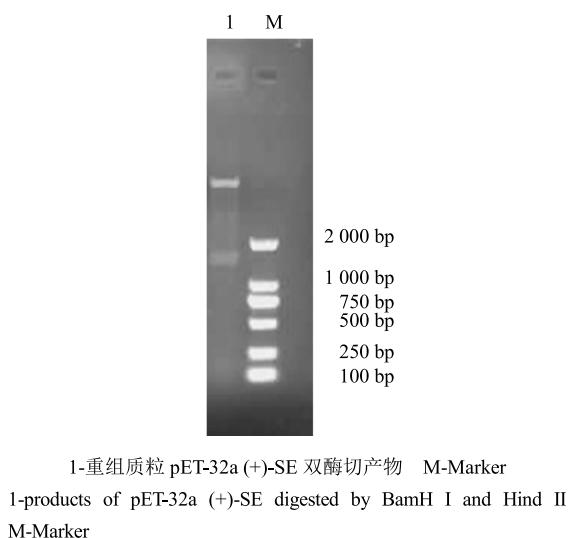


图 5 重组质粒 pET-32a (+)-SE 双酶切检测

Fig. 5 Determination of recombinant plasmid pET-32a (+)-SE by double-enzyme digestion

3.3 桑黄 SE 基因原核表达载体的诱导表达

将重组质粒 pET-32a (+)-SE 转化感受态细胞 BL21 (DE3) 宿主菌后, 用 IPTG 诱导重组蛋白的表达, 结果如图 6 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, 而转入重组质粒 pET-32a (+)-SE 的菌体经 IPTG 分别诱导 2、4、6、8、10 h 后, 均出现一条与预期大小 (53 360) 相符的特异性条带。此外, 本课题组还发现蛋白的表达量受诱导时间影响并不大, 但总体来看其表达量处于较高水平。由此说明原核表达载体 pET-32a-SE 构建成功, 并通过 IPTG 的诱导成功表达了目的蛋白。

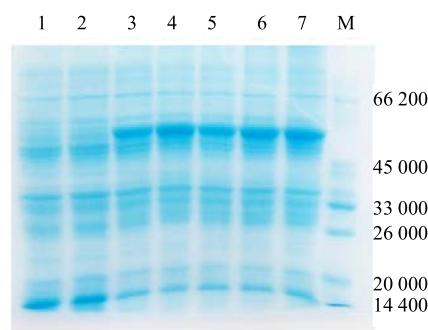
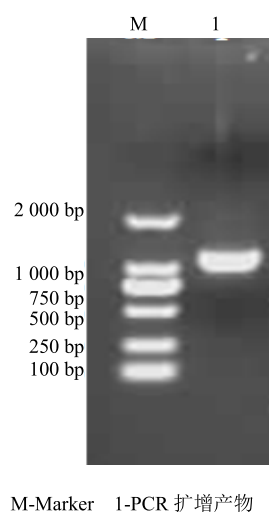


图 6 SE 基因诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 Heterologous protein expression in *E. coli* with IPTG induction

3.4 香菇 *gpd* 启动子克隆

以香菇子实体基因组 DNA 为模板, 引物 Gpd-F-E 和 Gpd-R-X 进行 PCR 扩增, 结果如图 7 所示, 出现 1 条大小约为 1 000 bp 的特异性条带, 与预测的 1 069 bp 大小一致。经测序分析, *gpd* 启动子片段大小为 1 040 bp, 与已报道的香菇启动子序列进行 BLAST 对比, 相似性高达 99%。对启动子进一步分析可知, 香菇 *gpd* 启动子片段富含真核启动子的一些常见顺式作用元件, 如 TATA 框、CAAT 框等 (图 8)。

图 7 香菇 *gpd* 启动子 PCR 扩增结果Fig. 7 PCR amplification of *gpd* promoter region from *L. edodes*

```

1   CGAAGTTTGAGGTGGTTGCGAATACGCTCATAAGTTGCAGCATAACTGATATATCTTGTG
61  ACAAGCCATATCGGGCATATCCCCGGTCACATGACATCAGTTGCACTGAATTTTTATGAT
121 TTCGTCGAGCGGAATCTTTTCTCTTCCAGACTGAGAGTGAGATGCGACTCTTGTCTGAC
181 TAGCTTAGTGAAACAATGACCAAGAAAGCTCGTGAAGAGGCCGGTCCGGTCGCGCTAATG
241 TACAGGATGGCCTTAGCTGGAGTATAGCAGTTAACTCGGGAGTGATTATACATCGGTTGA
301 GAGGTATTTCTGTTTCAGGCCTTGCCCTCTAATCCCTTGCTCTGCATATGCACCAGATAAAT
361 CCGTTTTGTCTGATGCGAGAGTTTCAAGTTTTACGCCAAACCGAAAAGAGTTGCATGAG
421 CATCCCTTTATGCTGGTTATCTGAGCGGGCCCGTATCCTATCGGCGTTAGAGTGACGTCG
481 GAGAGCCGCATGTATCACGGAAGGACTCGAACAGGGAGTTTTATCTATTTTTATTGGTC
541 GATATCAGTCAGATTGTCTAGTGGTCAAAGTTGCATCCATAAGGCTACTACGGTGAAACC
601 GGTGTATCCTGGGATATCATGAAATGGTTGTATGCAGAAGATAAGAATGAGAGTAGTTCT
661 AGAACAACAAACCCAGGCCAGGGAGGAAGCTGTAGCATTTCGAAGACTTTGCAGGGCCTT
721 TCAAAGGCACTTCCATCCAAAGCTCGAGCACGGTTCAGGCAACCTTAGTCATGGGGCGA
781 TAGAACTGAAGAACGTTTCGCTGATTGGCAGTCCATCCCAAAGGACTCGGGCAATAAATCC
841 TACCCAATCGCAGGTCCGAGGTACTAAAGTGTTTTAAGGTCTAGACTTTTAGGGCTATTG
901 TCGAAGTCACAACATCACGCAATCAAGATTGACTGAAGCGCGATTATCTTATAAAAGGAT
961 CAGTTGTGTTTATCGTCCGCATCTTTTCTTGTTCACAACCTTCGATTCTAAATACACT
1021 CCAATCCATTGACTGCTTGA
    
```

划线为 CAAT 框和 TATA 框
lineation indicate CAAT box and TATA box

图 8 香菇 *gpd* 启动子片段核酸序列

Fig. 8 Nucleotide sequence of the promoter region of *gpd* gene from *L. edodes*

3.5 重组质粒 pCAMBIA1301-*gpd* 的检测

随机挑取重组质粒 pCAMBIA1301-*gpd* 转化 DH5 α 感受态后长出的 5 个单菌落进行摇菌，菌液 PCR 检测 *gpd*-HYG 片段，结果如图 9 所示，只有 3 号胶孔跑出的条带与预期片段大小一致(约为 2 800 bp)，将阳性菌液送至生物公司测序，结果表明香菇 *gpd* 启动子片段以正确的方向连接且 HYG 抗性基因片段仍在载体上。由此表明，重组质粒 pCAMBIA1301-*gpd* 构建成功。

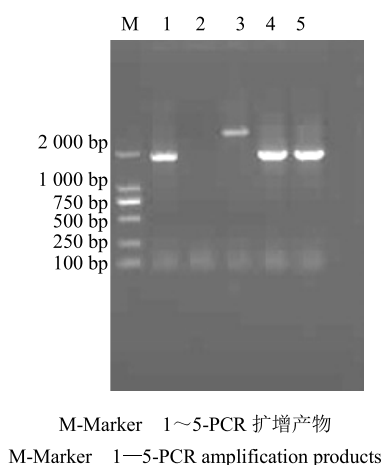


图 9 pCAMBIA1301-*gpd* 菌液 PCR 检测

Fig. 9 Electropherograms of products amplified by PCR

3.6 重组质粒 pCAMBIA1301-*gpd*-*gpd* 的检测

随机挑取重组质粒 pCAMBIA1301-*gpd*-*gpd* 转化 DH5 α 感受态后长出的 4 个单菌落进行摇菌，菌液 PCR 检测。虽然该重组质粒上有 2 个 *gpd* 启动子片段，但是由于引物的方向性而只能检测到第 2 个连接到载体上的香菇启动子 *gpd* 片段，结果如图 10 所示，只有 2 号胶孔跑出的条带与目的片段大小一致(约为 1 100 bp)。为了进一步验证所构建重组质粒的准确性，将重组质粒进行 Bgl II 和 Hind III 双酶切检测，结果出现了 2 条带，一条为质粒大片段，另一条为目的条带(图 11)。综合以上 2 种检测结果表明，重组质粒 pCAMBIA1301-*gpd*-*gpd* 构建成功。

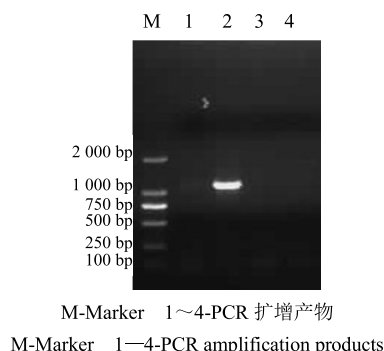


图 10 pCAMBIA1301-*gpd*-*gpd* 菌液 PCR 检测

Fig. 10 Electropherograms of products amplified by PCR

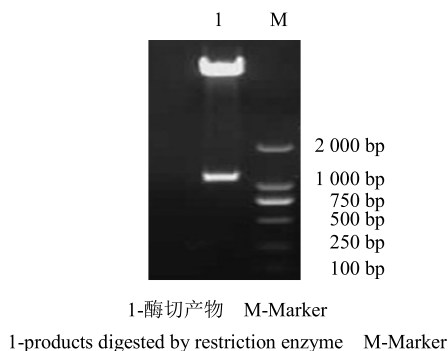


图 11 pCAMBIA1301-gpd-gpd 重组质粒 Bgl II 和 Hind III 双酶切检测

Fig. 11 Determination of recombinant plasmid digested by Bgl II and Hind III

3.7 SE 过表达载体的检测

随机挑取重组质粒 pCAMBIA1301-gpd-gpd-SE 转化 DH5 α 感受态后长出的 5 个单菌落进行摇菌，菌液 PCR 检测。因为是单酶切连接，所以 SE 编码区可以正向或者反向连接到载体上，但是由于引物的方向性而只能检测到正向连接的 SE 编码区序列，结果如图 12 所示，4、5 号胶孔跑出的条带均与目的片段大小一致（约为 1 500 bp）。为了进一步验证所构建重组质粒的准确性，将重组质粒进行 Bgl II 单酶切检测，结果出现了 2 条带，一条为质粒大片段，另一条为目的条带（图 13）。综合以上 2 种检测结果表明，SE 过表达载体构建成功。

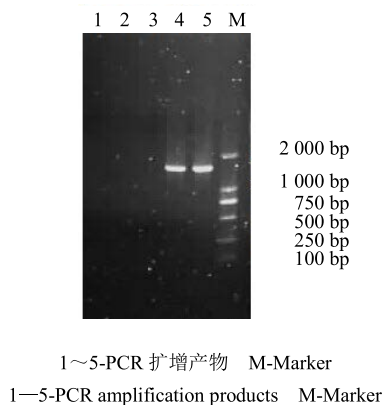


图 12 pCAMBIA1301-gpd-gpd-SE 菌液 PCR 检测
Fig. 12 Electropherograms of pCAMBIA1301-gpd-gpd-SE amplified by PCR

4 讨论

在自然界中，很多具有重要价值的三萜化合物产量较低，利用栽培措施大幅度提高产量或利用化学合成药用活性成分难度都很大。如果从分子水平上对其生物合成途径中的关键酶基因进行调控研究，

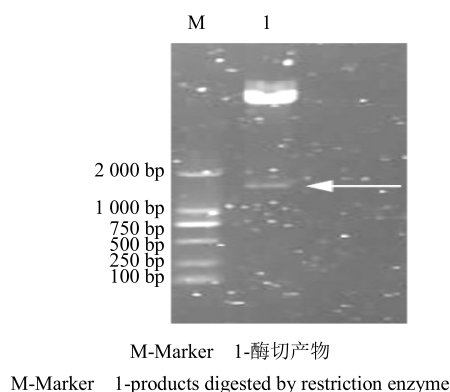


图 13 pCAMBIA1301-gpd-gpd-SE 重组质粒 Bgl II 单酶切检测
Fig. 13 Determination of recombinant plasmid digested by Bgl II

促进表达，进而提高目标产物的量，也不失为一种很好的技术手段。近年来，在获取外源蛋白的研究中，大肠杆菌表达系统因具有遗传背景清楚、易操作、成本低、蛋白表达量高、易纯化等诸多优点已成为一种较为常用的外源蛋白表达系统。SE 是三萜皂苷生物合成途径中形成三萜环碳环之前的一个关键酶，通过调控 SE 的活性能够直接影响到环氧化鲨烯的生物合成，继而影响到以环氧化鲨烯作为前体的各类三萜、甾体、甾醇等化合物的生物合成，因此鲨烯环氧酶被认为是甾体及萜类生物合成途径中的一个非常重要的调控酶。目前，SE 基因已在多种植物中成功进行了原核表达，包括滇重楼^[17]、人参^[19]、金铁锁^[20]等。本研究基于前期获得的 SE 基因全长，构建了原核表达载体 pET-32a (+)-SE，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 SE 表达量的影响，结果发现 IPTG 诱导 2~10 h，SE 表达量无显著变化。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 SE 在此系统中具有良好的表达效果。

为进一步研究桑黄 SE 基因的功能，本课题组对 SE 基因进行过表达载体的构建。在二元表达载体系统中，一般通过改造质粒，构建适合于受体物种的表达载体。启动子是表达载体中重要的组成元件，也是常被改造的元件。目前植物表达载体中使用最广泛的启动子为花椰菜花叶病毒 35 S 启动子，然而该启动子在食用菌中的表达效率并不高^[21-22]，因此研究者们开始利用食用菌的内源启动子以提高转化效率。常用于食用菌遗传转化的启动子主要有 2 种：gpd 启动子和 ras 启动子。Hirano 等^[23]从

香菇中分离得到了 *gpd* 基因, 并对 *gpd* 启动子的转录有效区进行了分析研究, 结果表明, 当 *gpd* 启动子大于 442 bp 时, 转录就能正常进行, 由此表明香菇 *gpd* 启动子是一个强启动子。目前香菇 *gpd* 启动子已在灵芝^[24]、草菇^[25]、灰盖鬼伞^[26]等多种大型真菌中成功驱动外源基因的表达。本研究在植物双元表达载体 pCAMBIA1301 的基础上, 将其中的 35 S 启动子替换为已报道的香菇 *gpd* 启动子, 通过 PCR 检测、酶切鉴定和测序分析等方法, 获得了适宜桑黄遗传转化的中间载体 pCAMBIA1301-*gpd-gpd* 及 SE 基因的过表达载体 pCAMBIA1301-*gpd-gpd-SE*。目前已将构建好的载体转到根癌农杆菌 EHA105 和 GV3101 中, 食用菌的转化工作正在进行中。

参考文献

- [1] Xue Q, Sun J, Zhao M W, *et al*. Immunostimulatory and anti-tumor activity of a water-soluble polysaccharide from *Phellinus baumii* mycelia [J]. *World J Microb Biot*, 2011, 27(5): 1017-1023.
- [2] Ge Q, Mao J W, Zhang A Q, *et al*. Purification, chemical characterization, and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of sanghuang mushroom (*Phellinus baumii*) [J]. *Food Sci Biot*, 2013, 22(2): 301-307.
- [3] Hwang H J, Kim S W, Lim J M, *et al*. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Life Sci*, 2005, 76(26): 3069-3080.
- [4] 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]. *Biot Lett*, 2004, 26(1): 31-33.
- [5] Yayeh T, Lee W M, Ko D, *et al*. *Phellinus baumii* ethyl acetate extract alleviated collagen type II induced arthritis in DBA/1 mice [J]. *J Nat Med*, 2013, 67(4): 807-813.
- [6] Hwang B S, Lee I K, Choi H J, *et al*. Anti-influenza activities of polyphenols from the medicinal mushroom *Phellinus baumii* [J]. *Bioor Med Chem Lett*, 2015, 25(16): 3256-3260.
- [7] Wang G J, Tsai T H, Chang T T, *et al*. Lanostanes from *Phellinus igniarius* and their NOS inhibitory activities [J]. *Planta Med*, 2009, 75(15): 1602-1604.
- [8] 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.
- [9] 张林芳, 孙婷婷, 邹 莉. 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.
- [10] 张林芳, 邹 莉, 孙婷婷. 大孔树脂分离纯化桑黄总三萜的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(4): 1486-1489.
- [11] Ryder N S. Squalene epoxidase as a target for the allylamines [J]. *Biochem Soc Trans*, 1991, 19(3): 774-777.
- [12] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn A E. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. *Adv Bioch Eng Biot*, 2002, 75(75): 31-49.
- [13] Goldstein J L, Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway [J]. *Nature*, 1990, 343(1): 425-430.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 邢朝斌, 劳风云, 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.
- [17] 许 燕, 赵 爽, 董 栩, 等. 滇重楼鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1839-1844.
- [18] 孙婷婷, 邹 莉, 张林芳, 等. 桑黄鲨烯环氧酶基因克隆与序列分析 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2768-2773.
- [19] 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, 40(10): 207-212.
- [20] 李国栋, 韩丽君, 刘小莉, 等. 金铁锁鲨烯环氧酶基因 (SE) 的克隆与表达 [J]. 中药材, 2016, 39(10): 2210-2216.
- [21] Chen X, Stone M, Schlagnhauser C, *et al*. A fruiting body tissue method for efficient agrobacterium-mediated transformation of *Agaricus bisporus* [J]. *Appl Envir Microb*, 2000, 66(10): 4510-4513.
- [22] Bums C, Leach K, Elliott T, *et al*. Evaluation of Agrobacterium-mediated transformation of *Agricus bisporus* using a range of promoters linked to hygromycin resistance [J]. *Mol Biot*, 2006, 32(2): 129-138.
- [23] Hirano T, Sato T, Yaegashi K, *et al*. Efficient transformation of the edible basidiomycete *Lentinus edodes* with a vector using a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter to hygromycin B resistance [J]. *Mol Gener Genet*, 2000, 263(6): 1047-1052.
- [24] 师 亮. 根癌农杆菌介导的灵芝遗传转化体系的建立及其在灵芝三萜生物合成研究中的应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [25] 于晓玲, 林俊芳, 郭丽琼, 等. 香菇 *ras* 和 *gpd* 启动子的克隆与功能鉴定 [J]. 食用菌学报, 2005, 12(3): 15-20.
- [26] 郭丽琼, 王秀旭, 柳 永, 等. 香菇 *gpd-Le* 和 *ras-Le* 启动子的功能分析 [J]. 菌物学报, 2007, 26(2): 249-256.