

• 药材与资源 •

桑黄麦角甾醇生物合成关键酶 PIERG24 基因克隆与表达分析

于忠洋, 姜 洋, 翟明霞, 詹亚光, 范桂枝*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要:目的 克隆桑黄菌丝甾醇 C14 还原酶(ERG24)基因全长, 并进行生物信息学及表达模式的初步分析。方法 基于桑黄菌丝转录组数据设计 PIERG24 基因引物, 采用 PCR 技术获得其 cDNA 全长序列, 并通过 Ex PASy 等在线分析软件对其进行生物信息学分析, 同时利用实时荧光定量 PCR 技术分析该基因的表达模式。结果 从桑黄菌丝中克隆到 1 412 bp 的 PIERG24 基因, 开放阅读框长度为 1 326 bp, 编码 441 个氨基酸, 理论相对分子质量为 49 358.61, 等电点为 5.28, 为不含信号肽的疏水性蛋白, 推测定位于质膜, 具有 6 个磷酸化位点; 系统进化树分析表明, 该序列与暴马桑黄的 ERG24 基因同源性最高。表达模式分析表明, 在桑黄菌丝生长的一个周期内, PIERG24 基因表达在 25 d 时达到最高 6.36。结论 获得了 PIERG24 基因全长序列, 为进一步研究该基因的功能以及利用基因工程等手段改良麦角甾醇生物合成途径奠定基础。

关键词: 桑黄; 甾醇 C14 还原酶; 基因克隆; 生物信息学分析; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)22-5825-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.020

Cloning and expression analysis of PIERG24 gene in ergosterol biosynthesis of *Phellinus linteus*

YU Zhong-yang, JIANG Yang, ZHAI Ming-xia, ZHAN Ya-guang, FAN Gui-zhi

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To clone the gene full length of ergosterol C14 reductase (ERG24) in *Phellinus linteus* and analyze its bioinformatics and expression pattern. **Methods** The primers of PIERG24 were designed according to the transcription sequence of *P. linteus*, the cDNA full-length sequence of PIERG24 was obtained by PCR, its bioinformatics was analyzed by Ex PASy and other online analysis software, and its expression pattern in mycelia of *P. linteus* was analyzed by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The full-length cDNA of PIERG24 gene was 1 412 bp, which encoding a protein of 441 amino acids with a predicted molecular weight of 49 358.61 and isoelectric point of 5.28; ERG24 protein was a hydrophobic protein without signal peptide, which was presumably located in the plasma membrane with six phosphorylation sites. Phylogenetic tree analysis indicated that amino acid sequences of ERG24 in *P. linteus* were genetically closely related to ERG24 in *Sanghuangporus baumii*. The qRT-PCR results showed that gene expression of PIERG24 reached the highest level of 6.36 at 25d during the growth cycle of mycelia in *P. linteus*. **Conclusion** The full length of PIERG24 gene was obtained, which lays a foundation for further studies on gene function and genetic regulatory mechanism of ergosterol biosynthesis.

Key words: *Phellinus linteus* (L. ex Fr.) Quel.; sterol C14 reductase; gene cloning; bioinformatics analysis; qRT-PCR

桑黄 *Phellinus linteus* (L. ex Fr.) Quel. 隶属担子菌亚门、层菌纲、非褶菌目、多孔菌科、针层孔菌属^[1], 是一类具有重要药用价值的大型真菌, 有“森林黄金”的美称^[2]。桑黄主要寄生于杨树、桑树、山楂等阔叶树的树干及树桩上或者倒木上, 主要分布在韩国、日本、俄罗斯远东地区、菲律宾、澳大利亚、北美和中南美等地, 在国内主要分布于黑龙江省东部乌苏里江与兴凯湖之间、西北地区陕西与

甘肃交界处的“子午岭”自然保护区。近年来的研究发现, 桑黄药效成分有多糖类、黄酮类、三萜类、甾类、多酚类、吡喃酮类及生物碱等^[3], 其具有抗氧化、抗炎、免疫调控、抗衰老等多种药用功能^[4]。因此, 桑黄具有极高的开发利用价值^[5]。

近年来桑黄菌的相关药用成分也被逐渐提取出来, 且纯化工艺也不断得到改进^[6]。孙德立等^[7]采用硅胶和 Sephadex LH20 柱色谱法, 从桑黄菌子实

收稿日期: 2020-03-06

基金项目: 中央高校基本科研业务专项资金项目(2572020DY17); 荒漠与绿洲生态国家重点实验室开放基金资助项目(G2018-02-07)

作者简介: 于忠洋, 硕士研究生, 现从事生物工程领域的研究。E-mail: 271521684@qq.com

*通信作者 范桂枝, 博士, 教授, 现从事生物工程领域的研究。E-mail: gzf325@126.com

体的提取物中分离得到 8 种化合物, 其中分离得到了 4 个甾体类化合物。刘金荣等^[8]从桑黄子实体中提取并鉴定出麦角甾醇。麦角甾醇是真菌类的特征甾体化合物^[9]。它是一种类异戊二烯衍生物, 能够作为生产维生素 D₂ 的前体。具有调节新陈代谢、调节激素水平、预防心血管疾病等功能以及抗肿瘤活^[10]。同时麦角甾醇还是真菌细胞重要的膜成分, 对确保细胞膜的完整性、细胞活力以及细胞物质运输等起着重要作用^[11]。此外, 麦角甾醇合成途径中某些关键酶又是许多抗真菌药物的主要结合位点, 如常见的多烯类、唑类、烯丙胺类抗真菌药物均以麦角甾醇或其中间体作为靶点发挥其杀菌或抑菌作用^[12]。

鉴于麦角甾醇的良好药用价值, 许多研究致力于提高麦角甾醇的产量。如张博润等^[13]对 167 株不同种、属酵母菌的麦角甾醇含量分析发现高产菌株最高可达细胞干重的 6%。王纪等^[14]通过离子束诱变筛选到麦角甾醇含量达 3.3% 的酵母菌。同时培养条件对麦角甾醇产量的影响也不容忽视, 不同碳源、氮源、培养时间、溶氧量等条件都是影响真菌麦角甾醇产量的重要因素^[15]。此外, 从生物合成途径入手来调节麦角甾醇的合成和积累也是一个重要的研究方向。麦角甾醇的生物合成一般主要分为 4 个步骤, 首先是甲羟戊酸的生物合成, 其次是甲羟戊酸转化为角鲨烯, 接着角鲨烯环化形成羊毛甾醇; 最后羊毛甾醇转化为麦角甾醇^[16]。麦角甾醇的生物合成是一条多酶参与的复杂过程, 其合成涉及多种称为 Erg 蛋白的酶。途径中涉及的基因主要分为 2 类: 必需基因和非必需基因, 在合成途径前期的一些基因如 ERG1、ERG7、ERG9、ERG11、ERG24、ERG25、ERG26、ERG27 被称作是必需基因, 而其他基因则被称为非必需基因^[17]。临床上许多以麦角甾醇生物合成为目标的抗真菌药物都是通过抑制 ERG 酶的活性从而改变原有的代谢途径来实现抗菌效果的^[18]。

目前, 麦角甾醇在桑黄中的代谢研究鲜有报道, 尤其其基因背景不清楚。因此, 本实验以桑黄为研究材料, 克隆桑黄麦角甾醇生物合成途径上游编码甾醇 C₁₄ 还原酶的 PIERG24 基因, 并对其进行序列及表达的初步分析。该研究将为进一步研究该基因的功能以及利用基因工程等手段改良麦角甾醇生物合成途径奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

本实验采用桑黄菌为取自东北林业大学生命科

学院森林生物工程学科的桑树桑黄 *Phellinus linteus* (L. ex Fr.) Quel. 菌株, 该菌株已由东北林业大学生命科学学院范桂枝教授从形态和分子水平鉴定^[19]。

1.2 试剂

PrimeScript TM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒、LA Taq 高保真酶、SYBR Green Master mix 均购自大连宝生物科技公司; T5 载体、DNA 凝胶纯化回收试剂盒、大肠杆菌感受态、购自北京全式金生物技术有限公司; 测序技术和引物合成服务均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。

2 方法

2.1 转录组基因注释

以液体培养 8 d 的桑黄菌丝体为材料并送往深圳华大基因科技服务有限公司进行转录组测序。测序采用 Illumina 高通量测序技术进行。将桑黄转录组测序得到的所有 Unigene 同 Nr (NCBI non-redundant protein sequences) 数据库进行比对, 以 E 值 $< 1 \times 10^{-5}$ 为阈值, 利用 BLAST 算法对基因功能进行注释。同时, 将 Unigene 分别与 KEGG、GO、Pfam、Swiss-Prot、COG 数据库比对, 分析预测基因的功能分类和参与的生物学途径。

2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

运用 CTAB 法提取桑黄菌的总 RNA, 经过琼脂糖凝胶电泳和 RNA 浓度检测 RNA 完整性及浓度。按照 PrimeScript TM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录体系进行 cDNA 的合成, 具体步骤及反应体系参见说明书。

2.3 桑黄 PIERG24 基因全长的克隆

根据课题组前期桑黄转录组数据获得的 PIERG24 基因序列 (基因编号 Unigene3189), 使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物, 将 PIERG24 基因引物命名为 ERG24-F 和 ERG24-R, 引物序列见表 1。基因克隆采用同源扩增的方法, PCR 扩增目的基因 (PCR 反应程序为分别为 94 °C、5 min; 94 °C、30 s, 53 °C、30 s, 72 °C、1 min, 35 个循环; 72 °C、10 min。94 °C、5 min; 94 °C、30 s, 56 °C、30 s, 72 °C、45 s, 35 个循环; 72 °C、10 min) 产物经电泳检测后, 进行切胶回收, 将目的片段连接到 T 载体并转化到大肠杆菌感受态细胞中, 涂板、筛选阳性克隆, 送至上海生工生物工程有限公司进行测序。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列 (5'-3')
ERG24-F	GTACGACATTATCATCCGCAG
ERG24-R	CCACAGCCGCTCAATACAC
Ac-F	GGCATCATACATTCTACAACGA
Ac-R	CTTCCCGCCAGGTCCATAC
Q-ERG24-F	TTTAGGAACGGCAGGAATC
Q-ERG24-R	TCGCCAAAGTAGTTAGGATGT

2.4 目的基因的生物信息学分析

利用 NCBI 在线软件 BLAST 对桑黄 PIERG24 基因序列进行相似性搜索；利用 DANMAN 软件搜索开放阅读框 (ORF)，并对其氨基酸序列进行蛋白同源性分析；利用在线分析软件 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 对蛋白的理化性质进行分析；利用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) 预测蛋白的糖基化位点；利用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点和蛋白激酶结合位点；采用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 预测信号肽；利用 ExPasy-ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白亲/疏水性；蛋白跨膜结构域的预测采用 TMPred (https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)；利用 PSORT (<https://www.genscript.com/psort.html>) 预测蛋白的亚细胞定位；以及利用 GOR4 (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 分别进行蛋白的二、三级结构预测；利用 MEGAX 的 Neighbor-Joining 算法构建系统发育树。

2.5 桑黄菌 ERG24 基因的表达模式分析

选取良好生长状态的桑黄菌丝，每 50 毫升土豆培养基中接种 5 g 鲜质量的桑黄菌丝，放于摇床培养，培养温度为 25~27 °C。每隔 5 天进行取材共获得 5 个时间梯度的样品（每次取样取 3 次重复）。将上述所取样品均用滤纸吸去多余水分并放于 -80 °C 冰箱保存备用。

取上述处理后材料按照“2.2”项方法得到 cDNA。以稀释 10 倍的上述所得桑黄 cDNA 为模板，以桑黄肌动蛋白基因 (actin, Ac) 作为内参基因，引物见表 1。运用 PrimerPremier5 软件设计荧光定量引物，分别命名为 Q-ERG24-F、Q-ERG24-R，预

期产物长度为 114 bp。采用宝生物工程（大连）有限公司的荧光定量试剂盒进行实时荧光定量 PCR。反应体系：模板 cDNA 2 μL，SYBR10 μL，上下引物各 0.8 μL，ROXII 0.4 μL，用 ddH₂O 补足至总体积为 20 μL。反应程序：95 °C、30 s；95 °C、5 s，60 °C、34 s，40 个循环，做溶解曲线。基因表达量的计算方法参照 Livak 等方法，基因的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 来表示。

3 结果与分析

3.1 基于转录组数据筛选麦角甾醇生物合成关键酶基因

利用 Pathway 富集性分析表明，桑黄菌丝 RNA-seq 数据中共有 28 个 Unigene 可被富集于甾醇生物合成途径。在 KEGG 数据库中检索发现，28 个 Unigene 序列分别对应于 14 个甾醇生物合成关键酶基因（表 2 和图 1）。

3.2 PIERG24 全长 cDNA 克隆及序列分析

如图 1 所示，甾醇 C14 还原酶 (ERG24) 为桑黄麦角甾醇生物合成途径的上游关键酶之一^[27-28]。基于转录组基因序列信息，以桑黄菌丝 cDNA 为模板，利用 PCR 技术获得 PIERG24 cDNA 全长序列。该序列全长 1 412 bp（图 2），其中开放阅读框 (ORF) 为 1 326 bp，编码 441 个氨基酸（图 3）。

3.3 PIERG24 基因编码蛋白的生物信息学分析

ProtParam tool 预测 PIERG24 基因编码蛋白质的相对分子质量为 49 358.61，等电点 (pI) 为 5.28，不稳定指数为 32.58，脂溶性系数 89.39，总平均亲水系数为 0.141，说明该蛋白为脂溶性疏水蛋白。如图 4 所示，Net NGlyc 1.0 Server 软件预测发现，PIERG24 基因编码蛋白不具有糖基化位点（图 4-A）；NetPhos 3.1 Server 预测该蛋白具有 6 个磷酸化位点（图 4-B），其中丝氨酸 4 个，苏氨酸 1 个，酪氨酸 1 个，并存在酪蛋白激酶 II (CKII)、细胞分裂周期激酶 2 (cdc2)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKI)、蛋白激酶 B (PKB)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 等多种特异性蛋白激酶结合位点；SignalP 信号肽预测发现，该蛋白没有信号肽，为非分泌蛋白（图 4-C）；ProtScale 亲水/疏水性分析结构显示，该蛋白为疏水性蛋白（图 4-D）。

TMPred 跨膜结构分析表明，PIERG24 基因编码蛋白在 N 末端有 7 个跨膜区，从外向内的跨膜区有 4 个，从内向外的跨膜区有 3 个。PSORT 的亚细胞定位预测发现该蛋白定位于质膜、内质网膜、线

表 2 桑黄麦角甾醇生物合成关键酶基因

Table 2 Key enzyme genes of ergosterol in *P. linteus*

KEGG 编号	EC 编号	基因名	蛋白名称
K01852	5.4.99.7	ERG7	羊毛甾醇合酶 lanosterol synthase
K05917	1.14.13.70	CYP51	羊毛甾醇 14- α 去甲基化酶 lanosterol 14- α demethylase
K00222	1.3.1.70	ERG24	甾醇 C14 还原酶 C14-sterol reductase
K07750	1.14.18.9	ERG25	甲基甾醇单加氧酶 methylsterol monooxygenase
K07748	1.1.1.170	ERG26	甾醇-4 α -羧酸 3-脱氢酶 sterol-4 α -carboxylate 3-dehydrogenase
K09827	1.1.1.270	ERG27	3-酮-甾醇还原酶 3-keto steroid reductase
K00559	2.1.1.41	ERG6	甾醇 C24 甲基转移酶 sterol 24-C-methyltransferase
K09829	5.-.-.-	ERG2	甾醇 C8 异构酶 C-8 sterol isomerase
K00227	1.14.19.20	ERG3	甾醇 C5 脱氢酶 Delta7-sterol 5-desaturase
K09831	1.14.19.41	ERG5	甾醇 C22 脱氢酶 sterol 22-desaturase
K00223	1.3.1.71	ERG4	甾醇 C24(28)还原酶 Delta24(24(1))-sterol reductase
K01052	3.1.1.13	LIPA	胆固醇酯水解酶 cholesteryl ester hydrolase
K00637	2.3.1.26	SOAT	甾醇 O-酰基转移酶 sterol O-acyltransferase
K01824	5.3.3.5	EBP	胆固醇 δ 异构酶 cholestenol Delta-isomerase

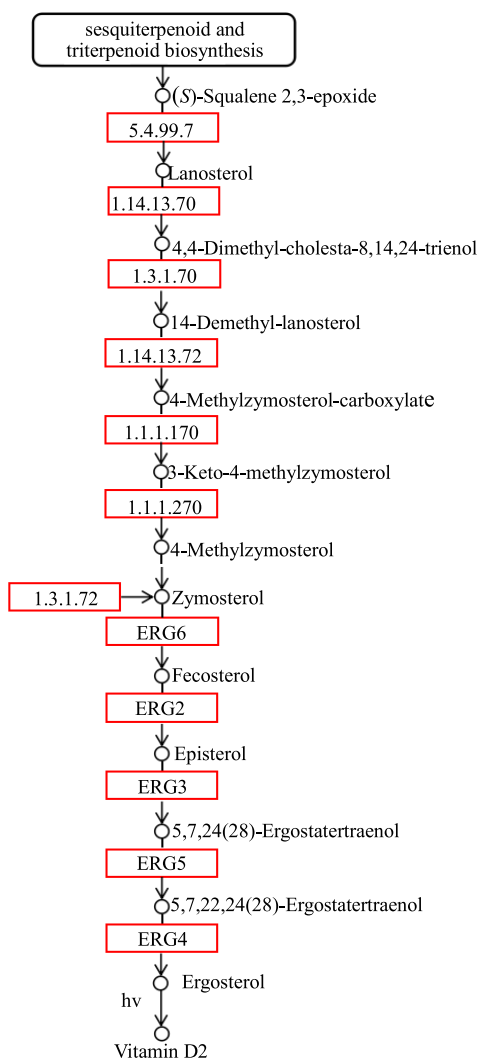


图 1 桑黄麦角甾醇生物合成图

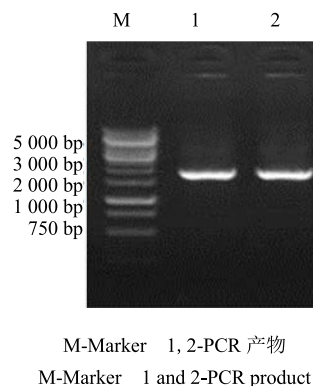
Fig. 1 Pathway of ergosterol biosynthesis in *P. linteus*

图 2 PIERG24 基因的 PCR 产物

Fig. 2 PCR products of PIERG24 gene

粒体的平均得分分别为 21、3、1。说明该蛋白可能定位在质膜上。

PIERG24 基因编码蛋白的二级结构的预测和分析表明, 该蛋白是由 α -螺旋 (Alpha helix)、延伸链 (Extended strand)、无规则卷曲 (Random coil) 所组成的, 并且分布于整个蛋白。其中含有 23.81% 的 α -螺旋、26.98% 的无规则卷曲和 49.21% 延伸链 (图 5); Swiss-Model 对该蛋白三级结构的预测模型见图 6。

3.4 PIERG24 基因编码蛋白的同源性及其系统进化树分析

如图 7、8 所示, PIERG24 基因编码的蛋白主要聚为 4 类, 其中桑树桑黄 ERG24 与暴马桑黄 *Sanghuangporus Baumii*. (OCB87985.1)、嗜蓝孢孔菌属 *Fomitiporia Mediterranea* (XP_007264907.1)、小木层孔菌属 *Phellinidium Pouzarii*. (THH06496.1)、红皮孔菌属 *Pyrroderma Noxium*. (PAV15595.1)、裂孔菌属 *Schizopora*

[illegible]

绿色-基因克隆引物 红色-荧光定量 PCR 引物

Green-primer of gene cloning Red-primer of real-time PCR

图 3 PIERG24 基因的 ORF 序列及对应的氨基酸序列

Fig. 3 ORF sequences and their deduced amino acid sequences of PIERG24 gene

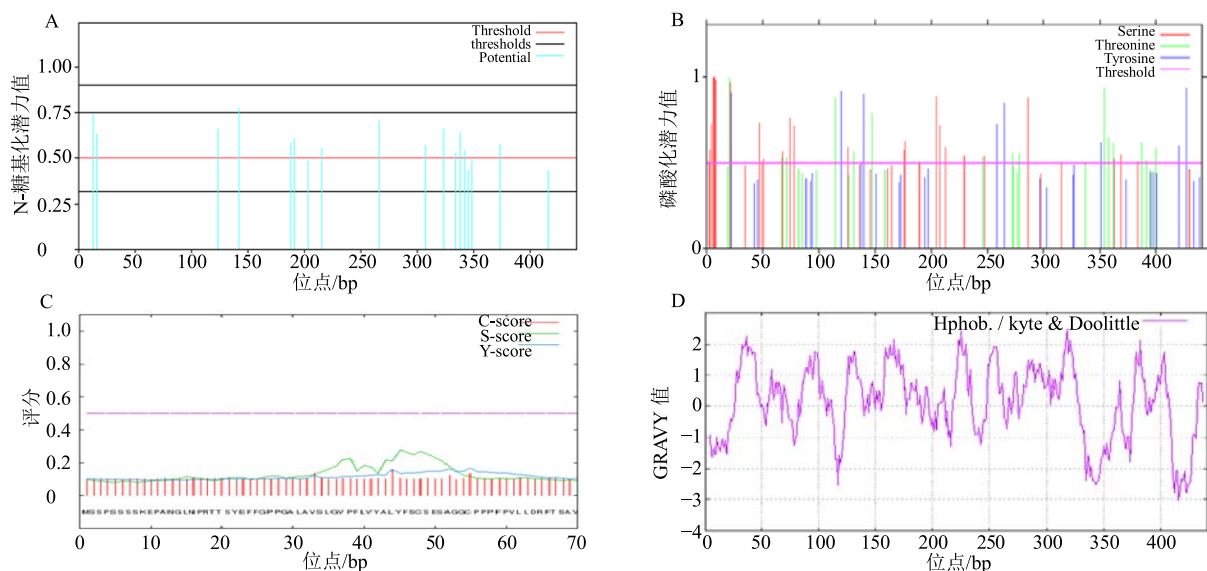


图 4 PIERG24 基因编码蛋白糖基化位点 (A)、蛋白磷酸化位点 (B)、蛋白信号肽 (C)、蛋白亲水性/疏水性 (D) 预测
Fig. 4 Prediction of glycosylation site (A), protein phosphorylation site (B), protein signal peptide (C) and protein hydrophilicity/hydrophobicity (D) of PIERG24 protein

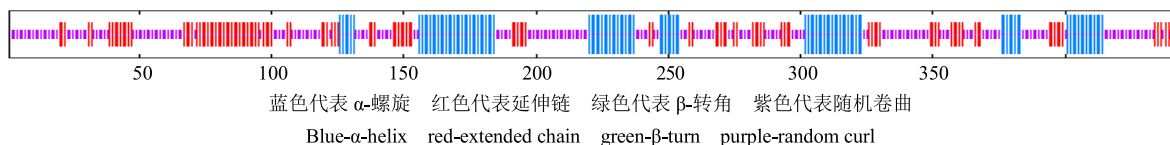


图 5 PIERG24 基因编码蛋白的二级结构预测

Fig. 5 Prediction of secondary structure of PIERG24 protein

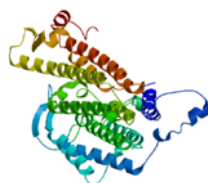


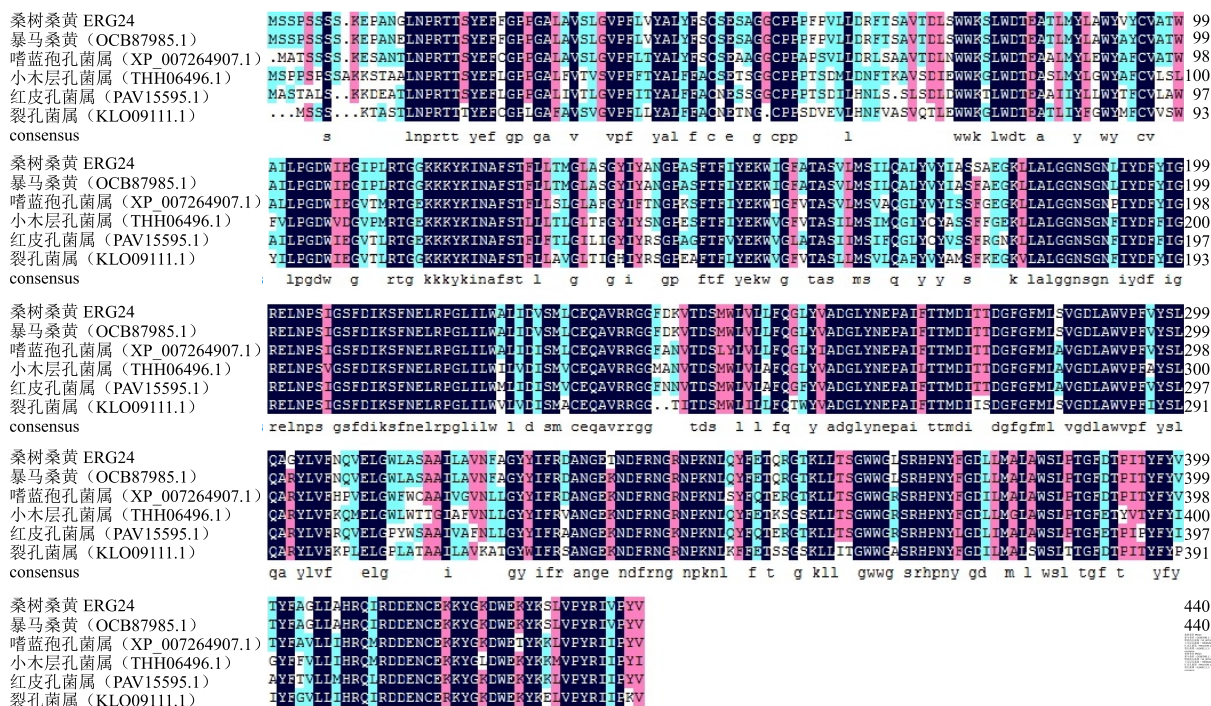
图 6 PIERG24 基因编码蛋白的三级结构预测

Fig. 6 Prediction of tertiary structure of PIERG24 protein

Parodoxa. (KLO09111.1) 具有较高的同源性, 分别为 98.64%、84.16%、75.34%、76.47%、74.21%。

3.5 PIERG24 基因表达模式分析

利用 qRT-PCR 检测 PIERG24 基因在桑黄菌丝一个培养周期内的表达发现, 在培养的 5~20 d 期间, PIERG24 基因表达量维持在 1 左右, 而在收获期 25 d 时达到最大值 6.4 (图 9)。



不同颜色表示序列相似性：深蓝色 100%，粉色 ≥75%，浅蓝色 ≥50%
Different colors indicate sequence similarity: dark blue 100%, pink ≥75%, light blue ≥50%

图 7 桑黄 ERG24 蛋白与其他菌类 ERG24 蛋白的多序列比对分析

Fig. 7 Multiple sequence comparison analysis of ERG24 protein between *P. linteus* and other fungi

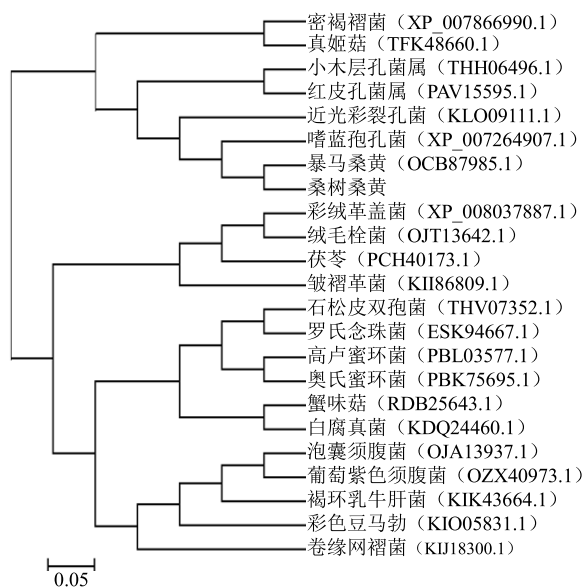
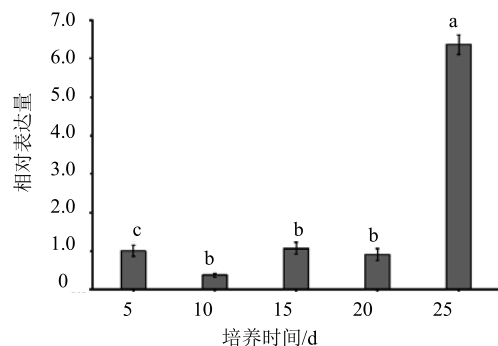


图 8 PIERG24 蛋白的 NJ 系统进化树

Fig. 8 Neighbor-joining phylogenetic tree of ERG24 proteins

4 讨论

桑黄是目前公认的具有良好抗癌和提高免疫力作用的药用真菌^[20]。其化学成分主要有多糖、黄酮、多种氨基酸、麦角甾醇等^[21]。相较之下桑黄菌多糖的研究进展更多的受到关注^[22]。而具有多种药用功



不同字母表示差异显著, $P < 0.05$
Different letters indicate significant differences, $P < 0.05$

图 9 培养周期内 PIERG24 基因的相对表达量

Fig. 9 Relative gene expression of PIERG24 during culture cycle

效的麦角甾醇同样具有很高的研究价值。甾醇在真菌细胞内的合成是一个多酶参与的复杂过程, 目前对麦角甾醇代谢途径研究相对较多的是在酵母中。其中 ERG6 基因高表达的重组酵母菌, 不但可以补偿 ERG2 基因高表达对甾醇合成的负效应, 而且进一步提高了麦角甾醇含量^[23]。酵母 ERG24 基因结合突变 ERG6 基因或 ERG28 基因可以致死^[24]。在对白色念珠菌中的研究中发现, ERG4 的突变影响了膜中甾醇的正常合成, 从而大大降低了该菌的致

病性^[25]。同时 ERG2 和 ERG24 基因是吗啉抗真菌化合物的目标。在桑黄麦角甾醇生物合成途径中 PIERG24 是上游的一个关键酶基因,它编码完成羊毛甾醇的 C-14 去甲基化所需的 C-14 还原酶。有文献表明 ERG24 在真菌对抗杀菌剂反应中起到重要作用。前人研究发现小麦枯萎病的致病因子禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 的 FgERG24B 缺失突变体显示出对胺类杀菌剂的敏感性显著增加^[26]。而在白色念珠藻中的研究发现氨基嘧啶衍生物靶向作用于 ERG24 编码的甾醇 C14 还原酶进而抑制麦角甾醇的合成使真菌致死从而起到抑菌作用^[27]。刘馨^[28]的研究还发现在酿酒酵母中,ERG24 基因缺失会积累麦角甾二稀醇,而麦角甾醇的产量降低。可见 ERG24 基因在麦角甾醇代谢以及维持细胞生存能力中起到至关重要的作用。Lorenz 等^[29]从酿酒酵母中克隆出 EGR24 基因,发现其含有 1 412 bp 的 ORF,编码 438 个氨基酸所组成的蛋白。并对其进行突变后发现甾醇生物合成途径下游代谢产物含量发生变化。本研究从桑黄菌中克隆得到了桑黄 PIERG24 基因,该基因全长 1 608 bp,包含一个长度为 1 326 bp 的开放阅读框,编码由 441 个氨基酸所组成的蛋白。氨基酸同源性及系统发育树分析发现,桑树桑黄与其他真菌序列相似性高,其中与暴马桑黄的同源性可达 98.64%。氨基酸序列预测分析还发现其可能定位于细胞质膜上,并且具有多个特异性蛋白激酶结合位点,这与其功能及参与的代谢过程相吻合。

为探究桑树桑黄中 PIERG24 基因的表达规律,本课题组运用 qRT-PCR 对不同培养时间后桑黄 PIERG24 基因表达模式进行分析发现其表达受到培养时间的影响,其相对表达量在 25 d 的生长周期内呈现双峰趋势,并在培养 25 d 后表达量明显升高。在培养后期,由于培养基中次生代谢物的含量的大量累积,并且培养基中的营养成分减少,导致细胞受到损害,细胞的形态也从开始的浅黄色变成黄褐色甚至深褐色。而甾醇类物质作为细胞膜的重要组成部分具有维持细胞形态、维持膜的完整性的重要作用。所以推测 PIERG24 基因在这一时期的高表达可能与细胞的自我保护有关。

本研究从基因水平对桑黄 PIERG24 基因进行了全长克隆。并借助生物信息学的方法初步分析其编码的蛋白的基本特性。此前,前人对 ERG24 基因的研究多集中于真菌抗药性,其编码的甾醇 C14 还

原酶蛋白为多种抗真菌药物的作用靶点,如多烯和唑类等^[30]。而对于 ERG24 基因在桑黄中麦角甾醇的累积方面的作用研究还鲜有报道。该基因的成功克隆为深入研究桑黄中 PIERG24 基因功能与麦角甾醇合成积累的调控机制等方面的研究提供基础。

参考文献

- [1] 曹红妹,胡桂萍,石旭平,等.药用真菌桑黄的研究进展[J].蚕业科学,2019,45(2):285-292.
- [2] 张悦,郑凯,王茹,等.促进桑黄次生代谢物累积的碳氮比及碳氮源优化研究[J].黑龙江农业科学,2019(7):109-114.
- [3] 刘帅,莫俊恺,潘丹阳,等.桑黄多糖的药理作用及提取方法研究进展[J].生物技术通报,2018,34(12):63-67.
- [4] 王一菲,于晓丹,田雪梅,等.栎生桑黄和忍冬桑黄液体培养过程中发酵液抗氧化能力[J].菌物学报,2019,38(6):938-950.
- [5] 王伟科,宋吉玲,巫优良,等.药用真菌桑黄分子鉴定及遗传多样性分析[J].浙江农业学报,2019,31(2):307-314.
- [6] 张维博,王家国,李正阔,等.药用真菌桑黄的研究进展[J].中国中药杂志,2014,35(15):2838-2845.
- [7] 孙德立,包海鹰,图力古尔.鲍氏层孔菌子实体的化学成分研究[J].菌物学报,2011,30(2):361-365.
- [8] 刘金荣,江发寿,李艳,等.药用真菌桑黄甾类成分的提取和鉴定[J].农垦医学,1998,20(3):141.
- [9] Maertens J A. History of the development of azole derivatives[J]. *Clinical Microb Infect*, 2004, 10(1): 1-10.
- [10] 张晓杰.戴氏绿僵菌抗肿瘤活性及其次生代谢产物的测定与分离纯化[D].遵义:遵义医学院,2012.
- [11] 韩庆雪.麦角固醇提取工艺的中试放大研究[D].天津:天津大学,2007.
- [12] 徐孝苓.烟曲霉麦角固醇合成相关基因 *erg4* 的功能性研究[D].南京:南京师范大学,2017.
- [13] 张博润,何秀萍.麦角甾醇高产菌株的构建及其培养条件优化的研究[J].生物工程学报,1999,15(1):46-51.
- [14] 王纪,薛小莉.离子注入麦角甾醇酵母选育及发酵工艺[J].微生物学杂志,1998(4):73.
- [15] 邓玉清,王纪,虞龙.微生物麦角甾醇的研究进展[J].微生物学杂志,2001,21(3):45-47.
- [16] 曹龙辉,李晓琨,赵文红,等.麦角甾醇的研究进展[J].中国酿造,2014,33(4):9-12.
- [17] 林晓珊,江宏文,张毅.酵母麦角固醇生物合成及其基因调控的研究[J].生物学杂志,2010,27(6):83-86.
- [18] 韩叙,廖国建.白色念珠菌麦角甾醇的储存、调节和功能[J].国外医药:抗生素分册,2018,39(5):72-77.

- [19] 黄丽洋, 石 卉, 王晓婷, 等. 野生桑黄菌株的分离、鉴定和次生代谢物分析 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3394-3399.
- [20] 李庆杰. 桑黄类真菌活性物质及质量标准研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2017.
- [21] 秦春华, 武 玲, 汪鋈植, 等. 9 种桑黄子实体中两种酚类活性成分的 HPLC 含量测定 [J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(3): 36-39.
- [22] 冯 源. 我国桑黄菌研究现状及应用 [J]. 现代农村科技, 2019, 5: 60-61.
- [23] Zhang Z, He X, Li W, *et al.* Regulation role of sterol C-24 methyltransferase and sterol C-8 isomerase in the ergosterol biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Acta Microbiol Sinica*, 2009, 49(8): 1063-1068.
- [24] Bhuiyan M S A, Eckstein J, Barbuch R, *et al.* Synthetically lethal interactions involving loss of the YeastERG24: The Sterol C-14 reductase gene [J]. *Lipids*, 2007, 42(1): 69-76.
- [25] Jia N, Arthingtonskaggs B, Lee W, *et al.* *Candida albicans* sterol C-14 reductase, encoded by the ERG24 gene, as a potential antifungal target site. [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(4): 947-957.
- [26] Liu X, Fu, J, Yun, Y, *et al.* A sterol C-14 reductase encoded by FgERG24B is responsible for the intrinsic resistance of *Fusarium graminearum* to amine fungicides [J]. *Microbiology*, 2011, 157(6): 1665-1671.
- [27] Hata M, Ishii Y, Watanabe E, *et al.* Inhibition of ergosterol synthesis by novel antifungal compounds targeting C-14 reductase [J]. *Med Mycol*, 2010, 48(4): 613-621.
- [28] 刘 馨. 小麦赤霉病菌麦角甾醇生物合成途径中关键基因的功能研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012.
- [29] Lorenz R T, Parks L W. Cloning, sequencing, and disruption of the gene encoding sterol C-14 reductase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *DNA Cell Biol*, 1992, 11(9): 685-692.
- [30] Jia N, Arthingtonskaggs B, Lee W, *et al.* *Candida albicans* sterol C-14 reductase, encoded by the ERG24 gene, as a potential antifungal target site. [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(4): 947-957.