

# 刺五加内生青霉鲨烯合酶基因的克隆与序列分析

邢朝斌\* 何闪 朱金丽 龙月红 梁能松 李宝财

(河北联合大学 生命科学学院 河北 唐山 063000)

**摘要:** 【目的】克隆刺五加内生青霉 *Penicillium minioluteum* P116-1a 的鲨烯合酶 (Squalene synthase, SS) 基因。【方法】采用 cDNA 5' 末端快速扩增 (Rapid Amplification of cDNA 5' Ends, 5' RACE) 技术扩增 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的全长 cDNA 序列和 DNA 序列; 运用生物信息学方法对该基因进行分析, 预测其编码蛋白的结构与功能; 并通过 RT-PCR 法和 SDS-PAGE 法检测 SS 的表达情况。【结果】*P. minioluteum* P116-1a 的 SS 基因含有 4 个外显子和 3 个内含子, 开放阅读框长 1 416 bp, 编码 471 个氨基酸, 预测蛋白含 67.73% 的  $\alpha$  螺旋, 5.31% 的延伸链, 2.97% 的  $\beta$  折叠, 23.99% 的无规则卷曲, 含有鲨烯合酶和八氢番茄红素合成酶的特异性识别区域, 定位于内质网膜。与 *P. marneffeii* 和 *Talaromyces stipitatus* 中 SS 蛋白的氨基酸同源性达 90% 以上。不同温度下 SS 的表达情况不同。【结论】首次在刺五加内生青霉 *P. minioluteum* P116-1a 中克隆到 SS 基因, 为进一步研究 *P. minioluteum* P116-1a 提高刺五加皂苷含量的机制奠定基础。

**关键词:** *Penicillium minioluteum* P116-1a, 鲨烯合酶, 克隆, 5' RACE 技术

## Cloning and sequence analyzing of squalene synthase gene from *Eleutherococcus senticosus* endogenetic *Penicillium minioluteum* P116-1a

XING Zhao-Bin\* HE Shan ZHU Jin-Li LONG Yue-Hong  
LIANG Neng-Song LI Bao-Cai

(College of Life Science, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract: [Objective]** To clone squalene synthase (SS) gene from *Penicillium minioluteum*

基金项目: 河北省自然科学基金项目(No. C2009001252); 河北省自然科学基金-石药集团医药联合研究基金项目(No. H2012401006)

\*通讯作者: Tel: 86-315-3726238; 信箱: xingzhaobin@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-11-24; 接受日期: 2012-01-19

P116-1a isolated from *Eleutherococcus senticosus*. **[Methods]** Using rapid amplification of cDNA 5' ends (5' RACE) method, we isolated completed cDNA and DNA sequence of SS from *P. minioluteum*. The gene was analyzed and corresponding structure and functions were predicted by the bioinformatic method. Expression of SS was detected by RT-PCR and SDS-PAGE. **[Results]** The results showed that SS gene had 4 exons and 3 introns. The open reading frame was 1 416 bp encoding a protein of 471 amino acid residues. The predicted secondary structure composition for the protein contained about 67.73%  $\alpha$  helixes, 5.31% extended strand, 2.97%  $\beta$  turns and 23.99% random coil. SS had conserved binding regions of squalene synthase and phytoene synthase and located in endoplasmic reticulum membrane. The SS amino acid sequence of *P. minioluteum* showed more than 90% homology with that of *P. marneffeii* and *Talaromyces stipitatus*. Expression of *P. minioluteum* P116-1a SS gene varied in different temperature. **[Conclusion]** The SS gene of *P. minioluteum* from *E. senticosus* was successfully cloned for the first time, providing a stable foundation for studying on mechanism of improving eleutheroside content by *P. minioluteum* P116-1a.

**Keywords:** *Penicillium minioluteum* P116-1a, Squalene synthase, Clone, 5' RACE method

刺五加是我国传统的珍贵药用植物, 具有明显的镇静、耐缺氧抗疲劳、抗肿瘤、抗辐射、提高机体免疫力、抗炎、抗过敏等多种生理活性及药理作用, 三萜皂苷类化合物是其主要活性成分之一<sup>[1]</sup>。三萜皂苷类化合物由三萜类苷元和糖组成, 各种三萜类苷元均通过依赖甲羟戊酸的类异戊二烯途径合成, 鲨烯是其共同的前体物质<sup>[2-4]</sup>。鲨烯合酶(Squalene synthase, SS)催化两分子的法呢酰基二磷酸(Farnesyl diphosphate, FPP)缩合成为一分子鲨烯, 完成类异戊二烯途径的第一步酶促反应<sup>[3-5]</sup>, 其过表达能促进三萜皂苷的大量合成<sup>[6-7]</sup>, 因此 SS 是三萜皂苷类化合物生物合成的一个关键酶<sup>[2-7]</sup>。

植物内生菌为长期生活在植物组织内的正常菌群。其在进化过程中与寄主协同进化, 或能产生与宿主相同或相似的次生代谢物质, 或调节宿主植物的次生代谢<sup>[8]</sup>。从刺五加中分离到的内生真菌菌株 *Penicillium minioluteum* P116-1a 在显著提高刺五加皂苷含量的同时对宿主的正常生长发育也无不良影响, 单独培养时也不能合成刺五

加皂苷, 因此其作用方式应为调节了宿主次生代谢的类型<sup>[9]</sup>。而微生物产生的酶类可将宿主植物的底物转化为特定类型的产物已被众多实验所证实。如 *Zygorhynchus moelleri* 和 *Absidia glauca* 合成的  $\beta$ -葡萄糖苷水解酶可水解人参皂苷 RB<sub>1</sub> 20 位 C 上的  $\beta$ -(1-6)葡萄糖基而将其专一的转化为人参皂苷 Rd<sup>[10]</sup>。但已有的研究多集中在微生物对人参皂苷的转化方面<sup>[10-11]</sup>, 加之这些微生物的相关基因多数未被克隆, 导致难于从分子水平阐明其作用机制。鉴于 SS 在三萜皂苷生物合成中的重要作用, 我们首次克隆了刺五加内生青霉 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的 cDNA 和 DNA 序列, 并对其进行了生物信息学和表达分析, 为进一步从分子水平研究 *P. minioluteum* P116-1a SS 对刺五加皂苷生物合成的影响奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种: 刺五加内生青霉菌种 *Penicillium*

*minioluteum* P116-1a, 由本实验室分离、鉴定, 甘油冻存保存法存于 $-70^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用, 使用之前接种在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上,  $28^{\circ}\text{C}$ 活化培养 7 d。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit、Dream Taq DNA 聚合酶、Fermentas 公司; LA Taq DNA 聚合酶、PrimeScript 逆转录酶、TdT、RNase H、TaKaRa 公司; DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PGM-T 克隆试剂盒、TOP-10 感受态细胞、dCTP、dNTPs, 天根生化科技有限公司; PCR 产物纯化试剂盒和质粒提取试剂盒, Biomiga 公司; 真菌蛋白提取试剂盒, KeyGEN 公司。引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成, PAGE 纯化。

## 1.2 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的克隆

**1.2.1 *P. minioluteum* P116-1a RNA 的提取:** 采用改良的 CTAB 法提取总 RNA。①液氮研磨 0.1 g 菌体, 将粉末转入  $65^{\circ}\text{C}$  预热的 2 mL CTAB 抽提液(2% CTAB, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L 亚精胺。用前加入 0.1%  $\beta$ -巯基乙醇)中, 混匀,  $65^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min。②加入等体积氯仿/异戊醇(24:1, V/V), 涡旋混合, 12 000 r/min、 $4^{\circ}\text{C}$  离心 5 min, 取上清。重复抽提 2 次。③取上清, 加入 1/4 体积 8 mol/L LiCl,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 1 h, 12 000 r/min、 $4^{\circ}\text{C}$  离心 30 min。④弃上清, 加入 80  $\mu\text{L}$  DNase I 工作液, 室温放置 15 min, 12 000 r/min 离心 1 min。⑤弃上清, 200  $\mu\text{L}$  0.5% SDS 溶解沉淀, 加入等体积氯仿/异戊醇振荡 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min。⑥取上清, 加入 2 倍体积无水乙醇 $-20^{\circ}\text{C}$  放置 2 h。  $4^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 弃上清。⑦沉淀用 75% 乙醇漂洗 2 次, 晾干。⑧加入 20  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解沉淀,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

**1.2.2 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因保守区段的获得:** 利用 DNAMAN 6.0 软件分析 *P. marneffei*、

*Talaromyces stipitatus* 和 *Aspergillus oryzae* 的 SS 基因的核苷酸序列, 在保守区域设计一对寡核苷酸简并引物。上游引物 QSS2: 5'-ACTGATAAG ATGGGCAATGG-3'; 下游引物 QSS4: 5'-CTGAT GCTGT(A/G)GTTGTTAG-3'。取总 RNA 3  $\mu\text{L}$ , 以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物, 根据 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit 的说明进行逆转录反应。以逆转录获得的 cDNA 为模板 PCR 扩增 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因保守片段。反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 其中引物 QSS2 和 QSS4 各 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ LA Taq Buffer (含 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 模板 cDNA 1  $\mu\text{L}$ , LA Taq 酶 1  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  1 min,  $51^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min 20 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收纯化, 克隆至 PGM-T vector 载体, 转化大肠杆菌 TOP10 后提取重组质粒并测序, 测序工作由 TaKaRa 公司完成。

**1.2.3 5'RACE 技术获取 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因 cDNA 全序列:** 参照文献[12]的方法进行 5'RACE 扩增。根据所获得的 SS 基因片段的 cDNA 序列, 应用 Primer premier 5.0 设计 RACE 特异性引物 PSSd2 (5'-AGACACTCTGTTCCCGGAGAC CG-3')和 PSSd1 (5'-CCCTCAGTTTCGGCCTTTC GGAC-3')。锚定引物 AP 长: 5'-AAGCAGTGGTA TCAACGCAGAGTACGCGGGGGGGGG-3', 通用上游接头引物 AP 短: 5'-AAGCAGTGGTATCA ACGCAGAGT-3'。取总 RNA 3  $\mu\text{L}$ , 采用 PrimeScript 逆转录酶, 以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物, 根据 PrimeScript 逆转录酶的说明进行逆转录反应, 合成 cDNA 第 1 链。同时逆转录 2 管, 反应体系 25  $\mu\text{L}$ 。逆转录完成后, 按照说明书要求用 RNase H 处理 1 h。然后, 用 PCR 产物纯化试剂盒将 RNase H 产物合并纯化。纯化后的产物根据 TdT 说明书的要求, 以

50  $\mu\text{L}$  体系进行 TdT 末端加尾, 加尾时间延长至 3 h。加尾完成后用 PCR 纯化试剂盒纯化加尾产物, 用 30  $\mu\text{L}$  洗脱液进行洗脱, 获得加尾的 cDNA。应用巢式 PCR 和降落 PCR 技术进行 RACE 扩增。第 1 轮 PCR 的引物为 AP 长和 PSSd2。反应体系为: 加尾产物 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10 mmol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , Dream *Taq* 酶 0.15  $\mu\text{L}$ , Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 补 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 62  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  150 s, 2 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  150 s, 2 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  150 s, 2 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  150 s, 2 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  150 s, 27 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。将第 1 轮产物稀释 40 倍后, 取 1  $\mu\text{L}$  为第 2 轮 PCR 的模板, 以 AP 短和 PSSd1 为引物, PCR 扩增 5'末端 cDNA 序列, 反应体系和反应条件同第 1 轮 PCR。利用 DNAMAN 6.0 软件将 3'末端保守序列和 5'末端序列进行拼接, 获得全长 cDNA 序列。利用 Primer premier 5.0 设计扩增包含起始密码子和终止密码子的特异性引物 PS2 (5'-GCCAAGATGGGTTTA CTGTGG-3') 和 PX1 (5'-GGGAGGCAGGAGGAATACAT-3'), 以 1.2.2 中逆转录的 cDNA 为模板, PCR 扩增 SS cDNA 的全长序列。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 其中引物 PS2 和 PX1 各 1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ LA *Taq* Buffer (含 15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 2.5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 模板 cDNA 1.5  $\mu\text{L}$ , LA *Taq* 酶 1  $\mu\text{L}$ , 补 dd H<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  100 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 产物经 1.2%的琼脂糖凝胶后, 参照 1.2.2 中的方法回收、克隆测序。

**1.2.4 *P. minioluteum* P116-1a DNA 的提取与 SS 基因 DNA 序列的扩增:** 按照 DNA 提取试剂盒的要求, 提取 *P. minioluteum* P116-1a 的基因组

DNA。以此为模板, 利用引物 PS2 和 PX1 进行 PCR 扩增。反应体系、反应条件与 PCR 扩增 cDNA 相同。参照 1.2.2 中的方法回收、克隆测序。

### 1.3 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因结构及预测蛋白的生物信息学分析

通过 DNAMAN 6.0 将测序获得的 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因 cDNA 全长序列翻译成氨基酸序列; 在线工具 <http://web.expasy.org/protparam/> 预测蛋白质的基本理化性质; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> 进行蛋白质序列的跨膜区分析; [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 进行蛋白质二级结构分析; <http://prosite.expasy.org/> 进行蛋白质功能结构域分析。使用 MEGA 5.05 软件中的 Neighbor-Joining (邻位相连法, NJ) 法构建系统发育树。使用 SWISS-MODEL 进行蛋白质的三维结构预测。

### 1.4 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的表达分析

将 *P. minioluteum* P116-1a 接种于 PDA 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$  活化培养 7 d 后, 分别置于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、16  $^{\circ}\text{C}$ 、28  $^{\circ}\text{C}$  和 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 7 d。利用 1.2.1 中的方法提取等量菌体的 RNA, 并按照 1.2.2 中的方法逆转录为 cDNA。以此为模板, 根据 1.2.3 中的条件, 利用 PS2 和 PX1 引物 PCR 扩增 SS 基因。根据是否具有目的条带, 判断 SS 基因的表达情况。同时取各时间点的菌体 1 g, 液氮中研成粉末后, 按照真菌蛋白提取试剂盒说明的要求, 提取总蛋白。采用浓缩胶 5% (pH 6.8), 分离胶 10% (pH 8.8) 的 SDS-PAGE 电泳, 鉴定蛋白表达情况。电泳缓冲液为 1 $\times$ Tris-Gly 缓冲液(pH 8.3)。以溴酚蓝为指示剂, 指示剂在浓缩胶中时电压为 70 V, 进入分离胶后电压增至 105 V。取 10  $\mu\text{L}$  蛋白质样品, 加 1 倍体积的 2 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸 3 min, 冰上冷却后上样电泳。电泳结束后, 考马斯亮蓝染色并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因保守区段的获得

利用简并引物 QSS2 和 QSS4 对 *P. minioluteum* P116-1a 的 cDNA 进行 PCR 扩增, 获得一条约为 1 100 bp 的条带(图 1), 测序得到 1 114 bp 的片段, 经 NCBI 的 BLAST 比对, 确定该片段为 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因 cDNA 的部分片段, 且该片段中包含终止密码子 TAA。以 cDNA 的加尾产物为模板, 利用引物对 AP 长-PSSd2 和 AP 短-PSSd1 进行巢式 PCR 和降落 PCR 技术相结合的 5'RACE 扩增, 获得长 900 bp 的片段(图 1)。将所获得的 5'端 cDNA 序列和保守区段进行拼接, 应用 NCBI 的 ORF finder 软件对该 cDNA 序列进行开放阅读框(ORF)分析, 发现该序列包含 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的完整 ORF。以 *P. minioluteum* P116-1a 的 cDNA 为模板, 用引物 PS2 和 PX1 扩增获得 1 464 bp 的一产物(图 1), 与预期大小相符。将该片段回收、克隆和测序后, 与 5'端 cDNA 序列和保守区段拼接获得的序列进行比对, 两者序列完全相同。用引物 PS2 和 PX1 扩

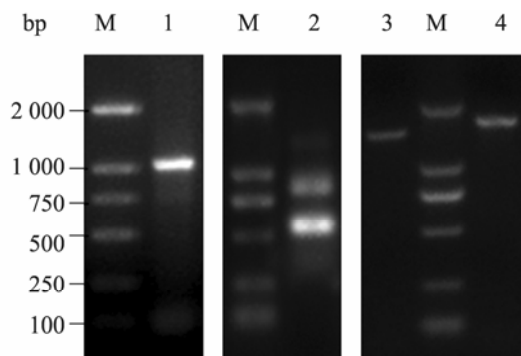


图 1 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的克隆  
Fig. 1 The clone of SS from *P. minioluteum* P116-1a

注: 1: SS 基因保守区的 PCR 扩增; 2: SS 基因的 5'RACE; 3: SS 基因 cDNA 全长的 PCR 扩增; 4: SS 基因 DNA 全长的 PCR 扩增; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1: PCR amplified of SS conserved sequence; 2: 5'RACE of SS gene; 3: Full sequence of SS cDNA; 4: Full sequence of SS DNA; M: DL2000 DNA marker.

增 *P. minioluteum* P116-1a 的基因组 DNA, 得到大小为 1 629 bp 的条带(图 1)。

### 2.2 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因结构分析

*P. minioluteum* P116-1a SS 基因全长 1 881 bp (GenBank 登录号 JN853774), 其中 5'端非翻译区(5'UTR)长 317 bp, 3'端非翻译区(3'UTR)长 148 bp, ORF 长 1 416 bp, 编码 471 个氨基酸。起始密码子 ATG 附近符合 Kozak 规则(ANNATGG)<sup>[13]</sup>。预测的蛋白质分子质量为 54.688 kD, 理论等电点(pI)为 5.62。*P. minioluteum* P116-1a SS 基因 DNA 序列全长 1 629 bp (GenBank 登录号 JN853775), 包含 4 个外显子和 3 个分别为 61、55 和 49 bp 的内含子。

### 2.3 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因编码蛋白的分析

利用 ScanProsite 软件预测功能结构域的结果表明, 该基因编码的氨基酸序列含有 Trans\_IPPS\_HH 的保守区域, 且该蛋白的 181-196 和 217-242 位氨基酸为鲨烯合酶和八氢番茄红素合成酶特异性识别区域。在 PSORT 服务器对 *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白进行亚细胞定位分析, 初步判断定位于内质网膜。

通过 NCBI 的 BLAST 比对发现, *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白与已知的蛋白质结构功能数据库中其他物种的鲨烯合酶具有相似的结构功能域。通过 TMHMM 软件分析得知, SS 蛋白第 424-446 位氨基酸处具有 1 个跨膜区域。运用 SOPMA 软件预测 *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白的二级结构(图 2), 表明该蛋白含有 319 个  $\alpha$  螺旋(Alpha helix), 占 67.73%; 25 个延伸链(Extended strand), 占 5.31%; 14 个  $\beta$  折叠(Beta turn), 占 2.97%; 113 个无规则卷曲(Random coil), 占 23.99%。在 SWISS-MODEL 数据库中进行蛋白质三维结构分析, 得到该蛋白的三维结构图(图 3)。

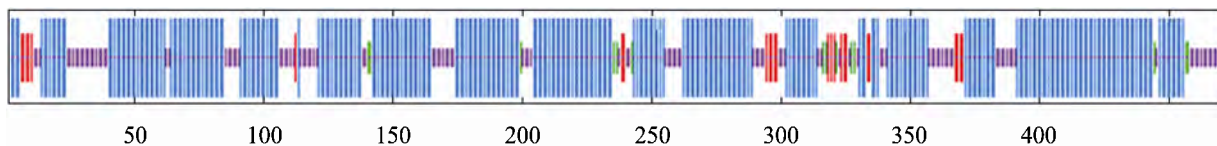


图 2 *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白二级结构的预测

Fig. 2 Predicted secondary structure for SS protein from *P. minioluteum* P116-1a

注:  $\alpha$  螺旋: 蓝色; 延伸链: 红色;  $\beta$  折叠: 绿色; 无规则卷曲: 紫色.

Note: Alpha helix: Blue; Extended strand: Red; Beta turn: Green; Random coil: Purple.

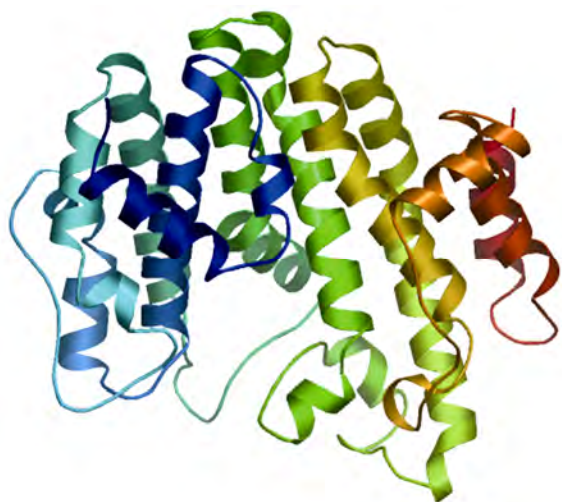


图 3 *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白三级结构同源建模

Fig. 3 The SS 3D structure predicted by Swiss-model

注: 模型覆盖范围: 37–379; 模型样本: [1ezfB] (2.15 Å); 序列一致性(%): 38.78; Evalue: 0.00e-1.

Note: Modeled residue range: 37 to 379; Based on template: [1ezfB] (2.15 Å); Sequence Identity (%): 38.78; Evalue: 0.00e-1.

#### 2.4 *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白的同源性分析

利用 NCBI 数据库的 BLAST 软件对 SS 基因的预测蛋白进行同源性序列对比, 结果发现, 该蛋白与多种真菌 SS 的同源性大于 80%。其中与 *P. marneffeii* 和 *T. stipitatus* 的同源性达 90% 以上。运用 MEGA 5.05 软件进行多序列比对, 构建系统发育树(图 4), 结果表明, *P. minioluteum* P116-1a 与同属的 *P. mameffeii* 首先聚为一支, 同源性高达

91.42%, 可信度为 99%, 之后和其他真菌的 SS 聚为一个大的分支。*P. minioluteum* P116-1a 的宿主植物刺五加的 2 个 SS、哺乳类动物的 SS 分别聚为一支后与酵母的 SS 聚为一个大的分支, 植物、动物和微生物间的遗传距离较大, 这与传统的分类结果相符。这表明 *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白与其他物种的 SS 蛋白是从同一共同祖先进化而来, 具有相似的催化功能。

#### 2.5 不同温度下 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的表达分析

RT-PCR 分析结果表明, *P. minioluteum* P116-1a SS 的 mRNA 在 16 °C–37 °C 时均有转录, 其中 28 °C 和 37 °C 时转录量最高, 在 4 °C 时不能转录(图 5)。SDS-PAGE 分析结果表明, *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白在 4 °C 时仅有少量表达, 16 °C–37 °C 时表达量较高, 最大值出现在 37 °C 时(图 6)。

### 3 讨论

对于仅知部分序列的基因而言, RACE 技术是获取基因全长有效方法。本研究应用罗聪等<sup>[12]</sup>优化改良的“末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)加尾的锚定 RACE 技术”, 结合巢式 PCR 和降落 PCR 技术, 获得了 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的 5'端, 通过拼接首次克隆出药用植物内生真菌与宿主植物次生代谢产物生物合成关键酶同源催化酶基因。

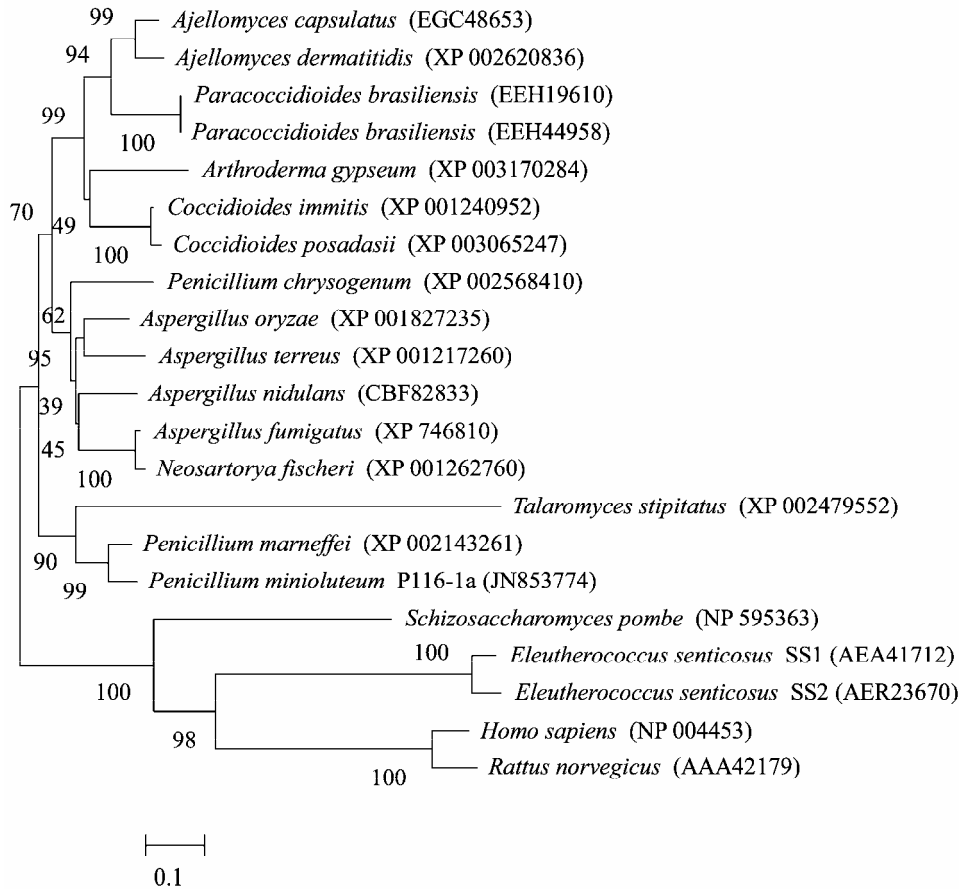


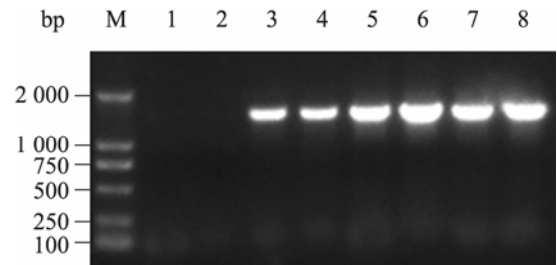
图 4 SS 蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of SS protein

注: 括号中数字为 GenBank ID; 分支上的数字为可信度(%).

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

目前对 SS 已有较多的研究, 但主要局限在几种模式生物及药用植物, 真菌中仅啤酒酵母<sup>[13]</sup>和裂殖壶菌<sup>[14]</sup> (*Schizochytrium limacinum*) 等少数物种的 SS 被克隆。本研究克隆的刺五加内生青霉 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因与已报道的其他真菌的同一基因相比, 编码区基本一致。在大部分真菌基因中, cDNA 的第一个起始密码子为 ATG, 而且在起始密码子上游的第 3 位往往是 A, 83% 的真菌与此特点相符<sup>[15]</sup>。本研究克隆的基因符合上述两个特点。 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因中的 3 个内含子均符合真菌内含子的 GT-AG 法则<sup>[16]</sup>。不同物种 SS 氨基酸序列比较的结果表明,

图 5 不同温度下 *P. minioluteum* P116-1a SS 基因的表达变化Fig. 5 Expression variations of *P. minioluteum* P116-1a SS gene in different temperature

注: 1, 2: 4 °C; 3, 4: 16 °C; 5, 6: 28 °C; 7, 8: 37 °C; M: DL2000 DNA marker.

Note: 1, 2: 4 °C; 3, 4: 16 °C; 5, 6: 28 °C; 7, 8: 37 °C; M: DL2000 DNA marker.

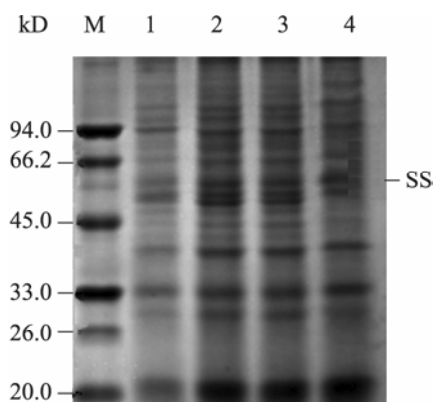


图 6 不同温度下 *P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白的表达变化

Fig. 6 Expression variations of *P. minioluteum* P116-1a SS protein in different temperature

注: 1: 4 °C; 2: 16 °C; 3: 28 °C; 4: 37 °C; M: 蛋白质 marker.

Note: 1: 4 °C; 2: 16 °C; 3: 28 °C; 4: 37 °C; M: Protein marker.

*P. minioluteum* P116-1a 与 *P. mameffei* 的亲缘关系最近, *T. stipitatus* 次之, 因而三者首先聚为一个分支。其宿主植物刺五加与其亲缘关系较远, 说明本研究克隆的基因为 *P. minioluteum* P116-1a 的固有基因。

一般认为蛋白质的  $\alpha$  螺旋和  $\beta$  折叠结构规则, 主要起稳定蛋白质分子结构的作用, 延伸链和无规则卷曲往往突出于蛋白质表面, 构成蛋白质的功能区域<sup>[17]</sup>。*P. minioluteum* P116-1a SS 基因编码的蛋白主要由  $\alpha$  螺旋和无规则卷曲构成,  $\beta$  折叠和延伸链数量较少, 散布于整个蛋白质中。已知物种的 SS 核心结构都由 5 个螺旋以富含天冬氨酸的序列为中心共同围绕成一个高疏水性的中央激活位点空穴, 其天冬氨酸的侧链与  $Mg^{2+}$  结合, 而  $Mg^{2+}$  再与底物的二磷酸集团结合, 形成该酶的活性中心, 同时在蛋白 N 端的第 1 个和第 2 个螺旋间的 5 个氨基酸覆盖于空穴上方的开口处形成“FLAP”构造, FLAP 之后的 N 端第 2 个螺旋为酶活性抑制剂的结合位点<sup>[18]</sup>。*P. minioluteum* P116-1a SS 蛋白的三维结构预测表明, 该蛋白与其他物种 SS 的核心结构完全相符, 这说明 *P.*

*minioluteum* P116-1a SS 同样具有催化两分子 FPP 缩合成为一分子鲨烯的能力。

在刺五加的三萜皂苷生物合成所必需的类异戊二烯途径中, 因 *P. minioluteum* P116-1a 不能独立合成三萜类化合物<sup>[9]</sup>, 且甾醇类化合物为细胞的必需组分, 因此, 从甲羟戊酸至鲨烯的酶促反应步骤共存于 *P. minioluteum* P116-1a 和其宿主刺五加中, 而此后的三萜类合成过程为刺五加所特有。在这些共有的催化酶类中, SS 是公认的三萜皂苷合成的限速酶。冯丽玲等发现酿酒酵母的 SS 可利用青蒿的 FPP 合成甾醇, 抑制其表达后则可促使 FPP 进入青蒿素合成途径<sup>[13]</sup>, 即一个物种的 SS 可以催化另一物种的 FPP。*P. minioluteum* P116-1a SS 表达分析的结果表明, 28 °C–37 °C 时 *P. minioluteum* P116-1a 的 SS 基因表达量最高, 温度较低时表达量也较低, 4 °C 时停止转录, 而刺五加总皂苷在温度接近 28 °C–37 °C 的 6 月底和 8 月底合成量最高<sup>[19]</sup>。因此, 研究结果为分析两者间是否存在因果关系, 即 *P. minioluteum* P116-1a 的 SS 是否也能催化其宿主刺五加的底物, 参与刺五加的次生代谢, 及阐明其提高刺五加中皂苷含量的机制奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 张宝香, 姜英, 张雅凤. 刺五加叶研究新进展[J]. 特产研究, 2009, 31(4): 69–70, 77.
- [2] Yendo AC, de Costa F, Gosmann G, et al. Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields[J]. Molecular Biotechnology, 2010, 46(1): 94–104.
- [3] Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants[J]. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 2002, 75: 31–49.
- [4] Kim TD, Han JY, Huh GH, et al. Expression and functional characterization of three squalene



- synthase genes associated with saponin biosynthesis in *Panax ginseng*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(1): 125–137.
- [5] Busquets A, Keim V, Closa M, et al. *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase[J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 67(1/2): 25–36.
- [6] Seo JW, Jeong JH, Shin CG, et al. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation[J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(8): 869–877.
- [7] Kim YS, Cho JH, Park S, et al. Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in *Bupleurum falcatum*[J]. *Planta*, 2011, 233(2): 343–355.
- [8] 陈美兰, 黄璐琦, 欧阳少华, 等. 植物内生菌对道地药材形成的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(9): 40–42.
- [9] 邢朝斌, 熊亚南, 劳凤云, 等. 刺五加内生真菌对刺五加苷 B 和 E 含量的影响[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(25): 12010–12011.
- [10] Son JW, Kim HJ, Oh DK. Ginsenoside Rd production from the major ginsenoside Rb<sub>1</sub> by  $\beta$ -glucosidase from *Thermus caldophilus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2008, 30(4): 713–716.
- [11] 吴秀丽, 王艳, 赵文倩, 等. 一种真菌对人参皂苷 Rg<sub>3</sub>的转化[J]. *微生物学报*, 2008, 48(9): 1181–1185.
- [12] 罗聪, 何新华, 陈虎, 等. 一种高效获取基因5'末端的 RACE 方法[J]. *植物生理学报*, 2011, 47(4): 409–414.
- [13] 冯丽玲, 卢文婕, 曾庆平. 啤酒酵母鲨烯合酶基因的克隆及其基因表达载体的构建[J]. *广州中医药大学学报*, 2009, 26(4): 394–397.
- [14] 朱路英, 朱清华, 张学成. 裂殖壶菌鲨烯合酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *食品科学*, 2010, 31(19): 263–267.
- [15] Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(30): 19867–19870.
- [16] Juvvadi PR, Arioka M, Nakajima H, et al. Cloning and sequence analysis of *cnaA* gene encoding the catalytic subunit of calcineurin from *Aspergillus oryzae*[J]. *Federation of European Microbiological Societies*, 2001, 204(1): 169–174.
- [17] 刘艳梅, 韩建民, 董金皋. 玉米大斑病菌钙调磷酸酶 B 亚基基因的克隆与生物信息学分析[J]. *微生物学报*, 2008, 48(9): 1175–1180.
- [18] Pandit J, Danley DE, Schulte GK, et al. Crystal structure of human squalene synthase. A key enzyme in cholesterol biosynthesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(39): 30610–30617.
- [19] 孟祥才, 颜丙鹏, 孙晖, 等. 不同性别类型刺五加叶有效成分含量季节积累规律研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(1): 88–90.