



## 研究报告

## 灵芝多糖糖供体合成途径中关键酶的异源表达及其酶学性质

李阳<sup>1,2</sup> 赵丽婷<sup>2</sup> 顾正华<sup>2</sup> 李由然<sup>2</sup> 石贵阳<sup>1,2</sup> 丁重阳<sup>\*1,2</sup>

1 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122

2 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122

**摘要:**【背景】灵芝多糖(*Ganoderma lucidum* polysaccharide, GLP)是一种具有多种生物活性的大分子物质,已有研究者通过发酵调控优化或菌种改良使灵芝多糖产量得到一定的提高。但由于灵芝多糖糖供体合成途径并未完全明晰,其中关键酶特性解析也不完善,使得灵芝多糖产量的大幅度提高仍存在瓶颈。【目的】通过异源表达大量制备灵芝中含量较少的磷酸葡萄糖变位酶(Phosphoglucosmutase, PGM)、UDP-葡萄糖焦磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPG)和磷酸甘露糖异构酶(Phosphomannose isomerase, PMI),并分别探究和比较其酶学性质,深入了解灵芝多糖的糖供体合成途径中关键酶的特性信息,为灵芝多糖合成发酵策略的高效制定提供依据。【方法】以灵芝菌株 CGMCC 5.26 的 cDNA 为模板,克隆得到关键酶基因 *gl-pgm*、*gl-ugpg* 和 *gl-pmi*,分别在 *E. coli* BL21(DE3) 中诱导表达,产物通过 Co-NTA 树脂纯化后进行酶学性质研究。【结果】纯化酶 GLpgm、GLugpg 和 GLpmi 均在 *E. coli* 中实现大量表达。GLpgm 的最适反应 pH 为 8.5, GLugpg 和 GLpmi 的最适 pH 同为 7.5; GLpgm、GLugpg 和 GLpmi 最适反应温度依次为 35、40 和 30 °C; 1 mmol/L 的 Ag<sup>+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对 3 种酶均具有强烈抑制作用, Mn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 对 GLpgm 和 GLpmi 均有激活作用,其中 Mn<sup>2+</sup> 对 GLpgm 的激活作用高达 2.7 倍。GLpgm、GLugpg 和 GLpmi 的  $k_{cat}/K_m$  值分别为 196.08、818.60 和 1 105.22 mmol/(L·s)。【结论】在最适反应 pH、温度及金属离子作用方面, GLpgm、GLugpg 和 GLpmi 与植物及真菌来源的这 3 种酶较为相似,对底物的催化效率相对其他来源的酶高,为基于灵芝多糖合成途径的调控提供了更完善的信息。

**关键词:** 磷酸葡萄糖变位酶, UDP-葡萄糖焦磷酸化酶, 磷酸甘露糖异构酶, 异源表达, 酶学性质

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31271918)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-510-85918221; E-mail: bioding@163.com

**Received:** 28-01-2019; **Accepted:** 14-05-2019; **Published online:** 31-05-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31271918)

**\*通信作者:** Tel: 0510-85918221; E-mail: bioding@163.com

收稿日期: 2019-01-28; 接受日期: 2019-05-14; 网络首发日期: 2019-05-31

## Heterologous expression and characterization of the key enzymes involved in sugar donor synthesis of polysaccharide in *Ganoderma lucidum*

LI Yang<sup>1,2</sup> ZHAO Li-Ting<sup>2</sup> GU Zheng-Hua<sup>2</sup> LI You-Ran<sup>2</sup> SHI Gui-Yang<sup>1,2</sup>  
DING Zhong-Yang<sup>\*1,2</sup>

1 Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

2 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

**Abstract:** [Background] *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP), as a macromolecular substance with various biological activities, has attracted a lot of attention in recent years. Some researchers have improved the yield of GLP through optimization of fermentation regulation or strain improvement for *G. lucidum*. However, it is a fact that the biosynthesis pathway of GLP is still unclear completely, and the understanding about characteristics of key enzymes involved in GLP synthesis are insufficient. Thus, there is a bottleneck on substantially improving the yield of GLP. [Objective] Through heterologous expression of the genes of phosphoglucomutase (PGM), UDP-glucose pyrophosphorylase (UGPG), and phosphomannose isomerase (PMI) cloned from *G. lucidum* in *E. coli*, decent amounts of the purified enzymes were obtained. We characterized their enzymatic properties and compared them with other sources, to provide insights into the characteristic information of them, and build an efficient strategy for the synthetic of GLP on fermentation. [Methods] Genes of *gl-pgm*, *gl-ugpg* and *gl-pmi* were cloned from *G. lucidum* strain CGMCC 5.26 and expressed in *E. coli*, the recombinases were purified with Co-NTA resin respectively. Then, the enzymatic properties of the purified enzymes were studied. [Results] GLpgm, GLugpg and GLpmi, were successfully expressed in *E. coli*. The optimum reaction pH of GLpgm was 8.5, and it was 7.5 for GLugpg and GLpmi. The optimum reaction temperature of GLpgm, GLugpg and GLpmi were 35, 40 and 30 °C, respectively. For them, 1 mmol/L of Ag<sup>+</sup> and Cu<sup>2+</sup> had strong inhibitory effects, while Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> had activation effects on GLpgm and GLpmi, especially the use of Mn<sup>2+</sup> could increase the GLpgm activity by 2.7 times. The  $k_{cat}/K_m$  values of GLpgm, GLugpg and GLpmi were 196.08, 818.60 and 1 105.22 mmol/(L·s), respectively. [Conclusion] GLpgm, GLugpg and GLpmi were similar to the sources of plant and other fungi in terms of optimum pH, temperature and metal ions action, while the catalytic efficiency was relatively higher than them. Their properties could provide more information for the regulation of GLP based on its pathway.

**Keywords:** Phosphoglucomutase, UDP-glucose pyrophosphorylase, Phosphomannose isomerase, Heterologous expression, Enzymatic characterization

灵芝多糖是一类结构复杂的天然大分子物质，也是灵芝发酵过程中的主要活性产物，具有抗肿瘤、降血糖血脂等功效。近年来，随着 *G. lucidum* CGMCC 5.26 菌株全基因组序列公布<sup>[1]</sup>，通过发酵调控优化或菌种改良以促进多糖产量提高取得了一定的效果<sup>[2-3]</sup>。但由于灵芝多糖合成的代谢途径复杂且不清晰，其中涉及到的关键酶数量众多且特性不明，使得灵芝多糖产量在发酵水平的大幅提高仍存在障碍。因此需要全面清晰地了解灵芝多糖的生物合成过程，解析其中关键酶的性质与催化特点。

灵芝多糖的合成是一个极为复杂的生物过程，

主要分为 3 个阶段，即糖供体(NDP-单糖)的合成、糖链的连接和多糖的胞外输出。目前灵芝中糖供体合成途径已基本清晰<sup>[4-6]</sup>，且研究表明 PGM、UGPG 及 PMI 是其中的关键酶<sup>[7-9]</sup>。如图 1 所示，PGM 催化葡萄糖-6-磷酸生成葡萄糖-1-磷酸，进而在 UGPG 的作用下生成 UDP-葡萄糖参与糖链的连接；PMI 催化果糖-6-磷酸生成甘露糖-6-磷酸，再经过一系列转化最终也生成 GDP-甘露糖参与糖链的连接。由于灵芝本体中提取这 3 种酶的工艺较为繁琐，而且提取率不高。因此，本研究基于灵芝全基因组序列，通过 KEGG 注释和 BLAST 注释分析获取目的基因

片段, 利用基因工程手段对 PGM、UGPG 和 PMI 进行异源表达并大量制备。首次对灵芝来源的三类酶的酶学性质展开探究, 完善灵芝多糖糖供体合成途径关键酶酶学特性信息, 不仅填补了灵芝中相关研究的空白, 也为大幅促进灵芝多糖合成发酵策略的制定提供有效的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种、质粒和引物

大肠杆菌 BL21(DE3)、大肠杆菌 JM109 和大肠

杆菌质粒 pET-28a(+) 由中国高校工业微生物资源和信息中心(CICIM)保藏。实验涉及的菌株和质粒见表 1。

研究中所用的引物及其序列见表 2。引物设计使用 Clone manager 8.0 软件。引物由金唯智生物科技有限公司(苏州)合成。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

LB 培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, 氯化钠 10.0, 固体培养基另加琼脂粉 20.0 g/L。抗性筛选时添加终浓度为 100 mg/L 的氨苄青霉素或 30 mg/L 的卡那霉素。

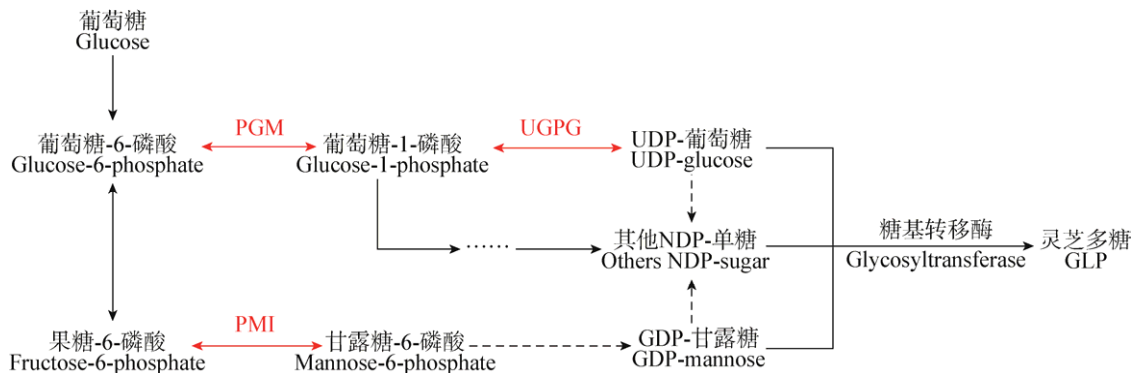


图 1 灵芝多糖的糖供体合成途径

Figure 1 The biosynthetic pathway of sugar donors about polysaccharides in *Ganoderma lucidum*

注: PGM: 磷酸葡萄糖变位酶; UGPG: UDP-葡萄糖焦磷酸化酶; PMI: 磷酸甘露糖异构酶。

Note: PGM: Phosphoglucosmutase; UGPG: UDP-glucose pyrophosphorylase; PMI: Phosphomannose isomerase.

表 1 本研究所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids generated and used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特性 Characteristics	来源 Sources
Strains		
DCQC-pgm	<i>E. coli</i> BL21(DE3), $\Delta$ pgm	This study
DCQC-ugpg	<i>E. coli</i> BL21(DE3), $\Delta$ ugpg	This study
DCQC-pmi	<i>E. coli</i> BL21(DE3), $\Delta$ pmi	This study
GLpgm-DCQC	DCQC-pgm harboring GLpgm-pET-28a(+)	This study
GLugpg-DCQC	DCQC-ugpg harboring GLugpg-pET-28a(+)	This study
GLpmi-DCQC	DCQC-pmi harboring GLpmi-pET-28a(+)	This study
Plasmids		
pKD46	Amp <sup>R</sup> , $\lambda$ Red recombinase expression plasmid, ara-inducible expression, temperature sensitive replication	Laboratory stock
pKD13	Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , oriR plasmid containing an Frt-Kan-Frt cassette	Laboratory stock
pCP20	Amp <sup>R</sup> , Cam <sup>R</sup> , repA (Ts), pSC101 based vector expressing the yeast Flp recombinase, temperature sensitive replication	Laboratory stock
GLpgm-pET-28a(+)	pET-28a(+) carrying <i>pgm</i> of GL	This study
GLugpg-pET-28a(+)	pET-28a(+) carrying <i>ugpg</i> of GL	This study
GLpmi-pET-28a(+)	pET-28a(+) carrying <i>pmi</i> of GL	This study

注: GL: 灵芝 CGMCC 5.26 菌株; Kan: 卡那霉素; Amp: 氨苄青霉素; Cam: 氯霉素; R: 抗性。

Note: GL: *G. lucidum* strain CGMCC 5.26; Kan: Kanamycin; Amp: Ampicillin; Cam: Chloramphenicol; R: Resistance.

表 2 本研究所用引物

Table 2 List of primers used in this study

引物名称 Primers	引物序列 Primers sequence (5'→3')	长度 Size (bp)
QCpgm-F	<u>ATGGCAATCCACAATCGTGCAGGCCAACCTGCACAACAGAGTGATTTGATTAACGTC</u> <u>GCCATCCGTCGACCTGCAGTTC</u>	79
QCpgm-R	<u>TCAGAACTTCGCTAACAATCTCAACCGCTTCTTCTCAATCTGCTTGCGATGTTCTTCA</u> <u>GTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>	78
QCpmi-F	<u>AAGCAGTTCACGAGTGCAGAATGCCGCCGGAGACATCGTTTTACTGCGTGATGTGAT</u> <u>TGGATCCGTCGACCTGCAGTTC</u>	79
QCpmi-R	<u>TTACAGCTTGTGTAAACACGCGCTAAACGGCCGTGGCCCTTTGACAGTCACCGGTGAT</u> <u>TCTAGGCTGGAGCTGCTTCG</u>	79
QCugpg-F	<u>GCCGTTATCCCCGTTGCGGGATTAGGAACCAGGATGTTGCCGGCGACGAAAGCCATA</u> <u>TCCGTCGACCTGCAGTTC</u>	75
QCugpg-R	<u>TTACTTCTTAATGCCCATCTCTTCTTCAAGCCAGGCTTTAAATTCCTGCGCAAGGTAG</u> <u>GCTGGAGCTGCTTCG</u>	73
Vpgm-up	CTATCGTCGAAGCGAAACC	19
Vpgm-down	GTAGCGCATCAGGCAATTC	19
Vpmi-up	GCGCCAATAGAGTTAACGC	19
Vpmi-down	TACGCCTAGCGCAACAATG	19
Vugpg-up	CTGCTAATGTCGGCTGGTG	19
Vugpg-down	GATCGCTGACGGTATTGAC	19
K1	AGGCTATTCGGCTATGACTG <sup>[10]</sup>	20
K2	GGACAGGTCGGTCTTGACAA <sup>[10]</sup>	20
Kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC <sup>[11]</sup>	20
pKD46-F	TTGAGTTGTGGGTATCTGT <sup>[11]</sup>	20
pKD46-R	CTTGATTATGGGTAGTTTC <sup>[11]</sup>	21
GLpgm-F	GGAATTC <u>CATATG</u> TTCGTACCAGGTCAAGGAG ( <i>Nde</i> I)	31
GLpgm-R	<u>CGGAATTC</u> CCTACGTGATGACGGTCGGC ( <i>EcoR</i> I)	27
GLpmi-F	GGAATTC <u>CATATG</u> ACGGCTGTCTTCAAGATC ( <i>Nde</i> I)	31
GLpmi-R	<u>CGGAATTC</u> TCAATTCACCTCGACAAATGC ( <i>EcoR</i> I)	29
GLugpg-F	GGAATTC <u>CATATG</u> CCCTCCGACTCCCTCATG ( <i>Nde</i> I)	31
GLugpg-R	<u>CGGAATTC</u> TACAACCTCAATGAGGTTC ( <i>EcoR</i> I)	27

注: QCgene 用于敲除基因的引物, 下划线表示同源臂序列; Vgene 用于验证的引物; GLgene 用于扩增目的片段, 下划线表示酶切位点序列。

Note: Primers of "QCgene" are used for gene knockout, the underlined represents homologous arm sequences; Primers of "Vgene" are used for verifying inactivation of target genes; Primers of "GLgene" are used for amplification of the gene of interest, the underlined indicates restriction sites.

2×*Taq* PCR Master Mix, 杭州宝赛生物科技有限公司; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Nde* I 及 *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶, Thermo Fisher Scientific 公司; 卡那霉素、氨苄青霉素与 L-阿拉伯糖, 以及酶活测定相关试剂, Sigma 公司; PCR 产物纯化试剂盒、质粒小量提取试剂盒和胶回收试剂盒, 康宁生命科学(吴江)有限公司; 2×*Phanta* Max Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; IPTG, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

核酸定量仪、电转仪, Eppendorf 公司; 酶标仪, TECAN 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 Red 两步同源重组法敲除基因

Datsenko 等<sup>[12]</sup>提供的 Red 两步同源重组系统, 借助质粒 pKD46、pKD13 和 pCP20 进行大肠杆菌相关基因的敲除, 最终在敲除的目的基因位置留下 100 bp 左右的片段<sup>[13]</sup>。

根据 NCBI 提供的 *E. coli* BL21(DE3)基因组信息, 设计敲除盒片段引物 QCpgm-F/QCpgm-R、QCugpg-F/QCugpg-R、QCpmi-F/QCpmi-R, 以 pKD13 质粒为模板, 分别用 2×*Taq* 酶扩增得到大肠杆菌中 *pgm*、*ugpg*、*pmi* 三个基因的敲除盒片段。扩增产

物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 电转化入含有 pKD46 质粒的 *E. coli* BL21(DE3) 中, 挑取转化子进行 PCR 验证。验证引物 Vpgm-up/Vpgm-down、Vugpg-up/Vugpg-down、Vpmi-up/Vpmi-down 的设计分别取自基因 *pgm*、*ugpg*、*pmi* 的上下游区域, 同时利用 K1/down、K2/up 进行交叉验证<sup>[10]</sup>, 验证成功后, 用引物 V-up/V-down 扩增目的条带, 送金唯智生物科技有限公司(苏州)进行测序验证。pKD46-F/pKD46-R 用于验证质粒 pKD46 的导入和丢失<sup>[11]</sup>。

### 1.2.2 基因克隆与序列分析

以 *G. lucidum* CGMCC 5.26 菌株的 cDNA 为模板, 用引物 GLpgm-F/GLpgm-R、GLugpg-F/GLugpg-R、GLpmi-F/GLpmi-R 分别扩增目的基因 *gl-pgm* (GenBank 登录号为 GL24280)、*gl-ugpg* (GenBank 登录号为 GL25739)、*gl-pmi* (GenBank 登录号为 GL22193) 的序列。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min, 16 °C 保温。PCR 反应体系(100 μL): 模板(100 ng/μL) 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, 2×Phanta Max Master Mix 50 μL, ddH<sub>2</sub>O 45 μL。将扩增片段两端加 dATP 后胶回收获得纯化产物。纯化产物与 pMD18-T 载体连接并转化至 *E. coli* JM109。挑取的阳性转化子, 经 *EcoR* I、*Nde* I 双酶切验证正确后, 将相应的重组质粒分别命名为 pMD18-GLpgm、pMD18-GLpmi 和 pMD18-GLugpg, 并送往金唯智生物科技有限公司(苏州)测序。将 3 个酶基因的测序结果运用 ExPasy 中的 ProtParam 预测酶的蛋白质分子量及等电点等。

### 1.2.3 重组载体构建

将测序无误的 3 个目的基因片段分别与表达载体 pET-28a(+) 构建重组载体: GLpgm-pET-28a(+), GLugpg-pET-28a(+) 和 GLpmi-pET-28a(+), 并分别转化至相应的 *E. coli* BL21(DE3) 缺失菌株感受态细胞中, 将阳性菌株分别命名为 GLpgm-QCDC、GLugpg-QCDC、GLpmi-QCDC。同时将 pET-28a(+) 空载体质粒导入 3 个缺失菌株感受态细胞中, 重组菌株分别命名为 28a-DCQCpgm、28a-DCQCugpg 和 28a-DCQCpmi。

### 1.2.4 酶的诱导表达与分离纯化

接种重组菌株 GLpgm-QCDC、GLugpg-QCDC 和 GLpmi-QCDC 至含有 30 mg/L 卡那霉素的液体 LB 培养基中, 以菌株 28a-DCQCpgm、28a-DCQCugpg、28a-DCQCpmi 为对照。37 °C、220 r/min 培养过夜后以 1% 的接种量接种至新鲜无菌的 LB 培养基中, 在 *OD*<sub>600</sub> 达到 0.6–0.8 时, 加入诱导剂 IPTG 使其终浓度为 0.5 mmol/L, 25 °C、150 r/min 培养 10 h。12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 1×PBS 溶液洗涤 3 次并重悬菌体, 进行超声波破碎, 破碎条件: 300 W, 超声 1 s, 间隔 2 s, 循环 300 次。破碎液在 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集的上清液即为粗酶液。

将粗酶液利用 Co-NTA 重力亲和层析柱进行纯化。结合缓冲液: 1×PBS, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 7.4。洗脱缓冲液: 1×PBS, 0.5 mol/L NaCl, 300 mmol/L 咪唑, pH 7.4。收集酶液, 利用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度及分子量大小。用 2 L 的 1×PBS 缓冲液低温透析 3 次后获得纯化后酶液。

### 1.2.5 酶活力检测、蛋白测定和电泳分析

酶活测定: 在 30 °C 下, 将酶活测定体系(220 μL) 预热 10 min 后, 加入 30 μL 的酶液开始反应, 340 nm 下测定反应体系中每分钟增加或减少 1 μmol 的 NAD(P)H 所需要的酶量定义为 1 个酶活单位 U。

PGM 酶活测定体系<sup>[14]</sup>: 50 mmol/L 三乙醇胺缓冲液(pH 7.2), 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 μmol/L 葡萄糖-1,6-二磷酸, 0.4 mmol/L NADP<sup>+</sup>, 4 U 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 1.4 mmol/L α-葡萄糖-1-磷酸。UGPG 酶活测定体系<sup>[15]</sup>: 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.8), 16 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mmol/L UDP-葡萄糖, 0.4 mmol/L NADP<sup>+</sup>, 4 U 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 2.1 U α-磷酸葡萄糖变位酶, 4 mmol/L 焦磷酸。PMI 酶活测定体系<sup>[16]</sup>: 50 mmol/L MOPS 缓冲液(pH 7.0), 1 mmol/L CoCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L 甘露糖-6-磷酸, 1 mmol/L NADP<sup>+</sup>, 4 U 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 4 U 磷酸葡萄糖异构酶。

蛋白质浓度测定采用 Bradford 法<sup>[17]</sup>。SDS-PAGE 电泳参照 Schägger 等的方法<sup>[18]</sup>。

### 1.2.6 纯化酶的酶性质研究

(1) 最适反应 pH 及其稳定性的研究: 在 30 °C 下, 分别测定不同 pH (5.0–10.5) 条件下的纯化酶活力, 以最高酶活力为 100% 计算相对酶活力, 确定最适反应 pH。在 30 °C 下, 将酶液置于不同 pH 缓冲液中保温 2 h, 在最适 pH 下测定纯化酶活力, 以最初酶活力为 100% 计算相对酶活力, 考察纯化酶的 pH 稳定性。(2) 最适反应温度及其稳定性的研究: 在最适 pH 下, 分别测定不同温度 (20–70 °C) 下纯化酶活力, 以最高酶活力为 100% 计算相对酶活力, 确定最适反应温度。在最适 pH 下, 将酶液置于不同温度中保温 2 h, 并在最适反应条件下测定纯化酶活力, 以最初酶活力为 100% 计算相对酶活力, 考察纯化酶的温度稳定性。(3) 金属离子对纯化酶的影响: 酶活反应体系中分别加入终浓度 1 mmol/L 金属离子 (Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>、Al<sup>3+</sup>、Ni<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Cd<sup>2+</sup>、Ag<sup>+</sup>), 最适反应条件下测定纯化酶活力, 以未处理情况下的酶活力为 100% 计算相对酶活力, 考察金

属离子对纯化酶的激活或抑制作用。(4) 酶动力学常数的测定: 配制不同浓度的反应底物, 在最适反应条件下测定纯化酶活力, 重复 3 次, 利用双倒数法求得  $V_{\max}$  和  $K_m$  值<sup>[19]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 靶标基因缺失菌株的构建

为了避免原始大肠杆菌宿主菌株内相关酶的酶活对纯化酶活力的检测存在影响, 构建了 3 株相关基因缺失的菌株 DCQC-pgm、DCQC-ugpg 和 DCQC-pmi, 并且通过摇瓶试验证实了靶标基因缺失菌株与原始菌株生长特性上没有明显差异。

以 pKD13 质粒为模板, 扩增并胶回收得到敲除盒片段 *pgm*、*ugpg* 和 *pmi* 的纯化产物, 大小均约为 1 400 bp (图 2)。将敲除盒片段分别电转 *E. coli* BL21(DE3)(pKD46) 的感受态细胞中, 转化子分别经 Vpgm-up/Vpgm-down、Vugpg-up/Vugpg-down 和 Vpmi-up/Vpmi-down 菌落 PCR 验证, 分别得到 1 900、1 952 和 1 912 bp 的条带(图 2)。而以 *E. coli*

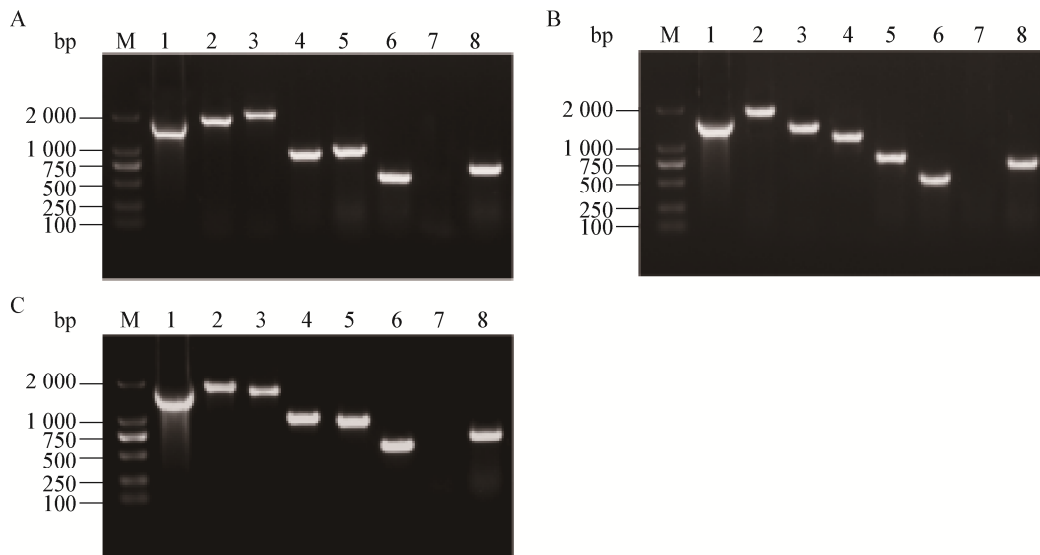


图 2 *E. coli* BL21(DE3) 中 *pgm* (A)、*ugpg* (B)、*pmi* (C) 的基因敲除 PCR 鉴定电泳图谱

Figure 2 PCR identification of *pgm* (A)、*ugpg* (B)、*pmi* (C) gene knockout in *E. coli* BL21(DE3)

注: M: 核酸标准分子质量; 1: QCgene-F/QCgene-R 扩增产物; 2: Frt-Kan-Frt 片段整合到靶基因位点, Vgene-up/Vgene-down 验证; 3: *E. coli* BL21(DE3) 为对照; 4, 5, 6: 分别由引物 K1/down、K2/up、K1/Kt 验证; 7: pKD46-F/pKD46-R 验证; 8: 导入 pCP20 后抗性片段丢失, Vgene-up/Vgene-down 验证。

Note: M: DNA Marker; 1: PCR product of primer "QCgene-F/QCgene-R"; 2: The fragment Frt-Kan-Frt is integrated into the target gene locus, verification by primer "Vgene-up/Vgene-down"; 3: *E. coli* BL21(DE3) is used for control; 4, 5, 6: Verification by primers "K1/down", "K2/up", "K1/Kt", respectively; 7: Verification by primer "pKD46-F/pKD46-R"; 8: Resistance fragment is lost after introduction of pCP20, verification by primer "Vgene-up/Vgene-down".

BL21(DE3)(pKD46)为对照, 分别得到 2 128、1 441 和 1 675 bp 的片段(图 2); 同时用 K1/down、K2/up、K1/Kt 三组引物进行交叉验证, 其中 K1/down 分别得到长度为 957、1 243、1 028 bp, K2/up 分别得到 1 050、811、994 bp 的核酸条带, K1/Kt 均得到 581 bp 的条带(图 2), 该结果表明 Frt-Kan-Frt 敲除盒片段正确整合到靶基因位置。pKD46 质粒丢失后用 pKD46-F/pKD46-R 引物进行菌落 PCR, 无产物表明质粒 pKD46 丢失成功(图 2)。再将质粒 pCP20 导入含 Frt-Kan-Frt 敲除盒片段的菌株中, 转化子经 Vpgm-up/Vpgm-down、Vugpg-up/Vugpg-down、Vpmi-up/Vpmi-down 分别菌落 PCR 后, 得到长度为 490、640、600 bp 的片段(图 2), 结果表明相应菌株中的抗性基因被敲除, 测序结果也证实了相应基因的缺失, 即成功构建了基因缺失菌株 DCQC-pgm、DCQC-ugpg 和 DCQC-pmi。

## 2.2 基因克隆与分析

以灵芝的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 *gl-pgm*、*gl-ugpg* 和 *gl-pmi* 片段大小分别约为 1 701、1 515 和 1 284 bp (图 3)。经过 ProtParam 预测, *gl-pgm* 编码 566 个氨基酸, 分子量为 61.4 kD, 理论 pI 为 6.21; *gl-ugpg* 编码 504 个氨基酸, 分子量为 56.8 kD,

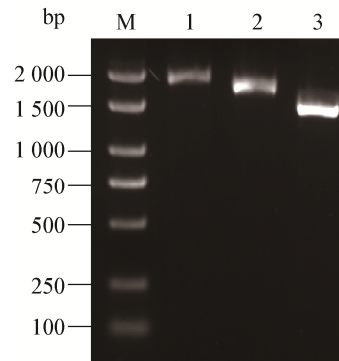


图 3 片段 *gl-pgm*、*gl-ugpg*、*gl-pmi* 的琼脂糖凝胶电泳分析  
Figure 3 Agarose gel electrophoresis of the cloned *gl-pgm*, *gl-ugpg* and *gl-pmi* gene fragments

注: M: 核酸标准分子质量; 1: *gl-pgm* 扩增产物; 2: *gl-ugpg* 扩增产物; 3: *gl-pmi* 扩增产物。

Note: M: DNA Marker; 1: PCR product of *gl-pgm*; 2: PCR product of *gl-ugpg*; 3: PCR product of *gl-pmi*.

理论 pI 为 6.98; *gl-pmi* 编码 427 个氨基酸, 分子量为 46.1 kD, 理论 pI 为 5.29。

## 2.3 重组质粒的构建

将测序无误的片段分别从 pMD18-GLpgm、pMD18-GLugpg、pMD18-GLpmi 上酶切回收得到纯化片段, 分别与线性化大肠杆菌的线性化载体 pET-28a(+)连接, 获得的重组质粒用 *EcoR* I、*Nde* I 双酶切得到 5 369 bp 的 pET-28a(+)载体片段和相应大小的目的片段(图 4)。

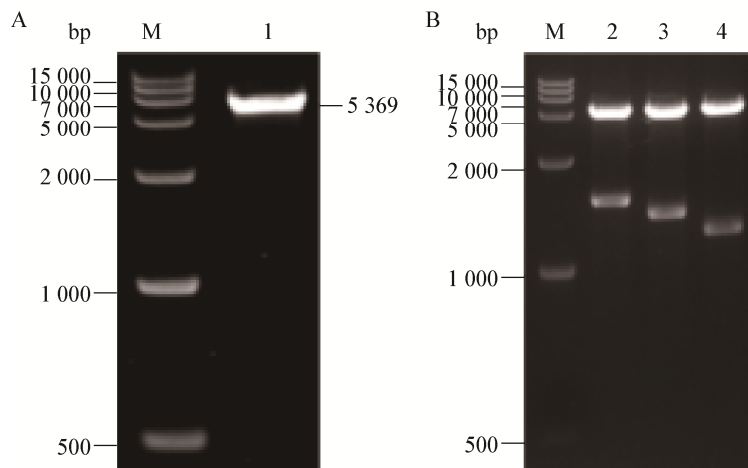


图 4 pET-28a(+) (A)和重组载体(B)经 *EcoR* I、*Nde* I 双酶切后琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 4 Agarose gel electrophoresis of pET-28a(+) and recombinant plasmids were digested by *EcoR* I and *Nde* I

注: M: 核酸标准分子质量; 1: pET-28a(+)质粒; 2: pET-28a(+)-GLpgm 重组质粒; 3: pET-28a(+)-GLugpg 重组质粒; 4: pET-28a(+)-GLpmi 重组质粒。

Note: M: DNA Marker; 1: pET-28a(+); 2: Recombinant plasmids pET-28a(+)-GLpgm; 3: Recombinant plasmids pET-28a(+)-GLugpg; 4: Recombinant plasmids pET-28a(+)-GLpmi.



## 2.4 酶的异源表达

以基因缺失菌株 DCQC-pgm、DCQC-ugpg 和 DCQC-pmi 为对照, 将重组菌株 GLpgm-DCQC、GLpmi-DCQC 和 GLugpg-DCQC 经 IPTG 诱导结束后, 取破碎菌体上清测定目的酶活力并进行 SDS-PAGE 电泳(图 5)。发现含有目的基因重组载体的重组菌株出现了较空载体明显的蛋白条带, 其分子量大小分别如图 5 中的 A2、B4、C6, 与预测的理论分子量大小接近, 说明目的酶均在相应靶标基因缺失的菌株中实现表达。

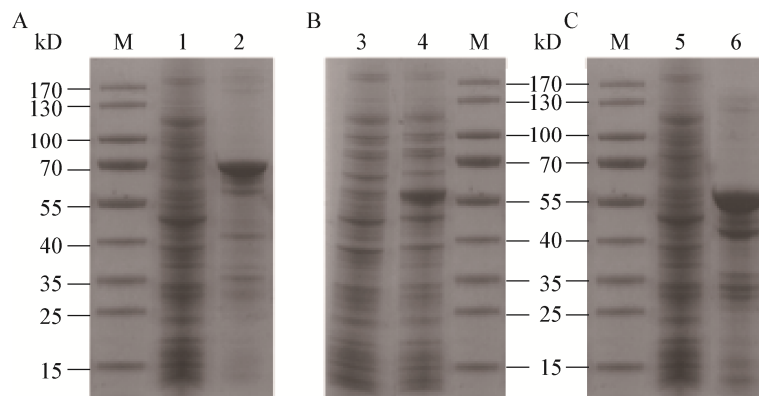


图 5 重组菌株表达产物 SDS-PAGE 电泳图

### Figure 5 SDS-PAGE analysis of proteins expressed in recombinant strains

注: M: 标准蛋白 Marker; 1、3、5: 缺陷菌株 DCQC-pgm、DCQC-ugpg、DCQC-pmi 细胞破碎上清; 2、4、6: 重组菌株 GLpgm-DCQC、GLugpg-DCQC、GLpmi-DCQC 细胞破碎上清。

Note: M: Standard protein marker; 1, 3, 5: The supernatant of the deficient strains DCQC-pgm, DCQC-ugpg and DCQC-pmi, respectively; 2, 4, 6: The supernatant of the recombinant strains GLpgm-DCQC, GLugpg-DCQC and GLpmi-DCQC, respectively.

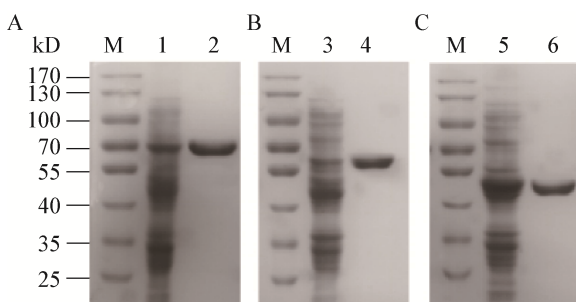


图 6 纯化酶的 SDS-PAGE 电泳图

### Figure 6 SDS-PAGE analysis of purified enzymes

注: M: 标准蛋白 Marker; 1、3、5: 重组菌株 GLpgm-DCQC、GLugpg-DCQC、GLpmi-DCQC 粗酶液; 2、4、6: GLpgm、GLugpg、GLpmi 纯化酶液。

Note: M: Standard protein marker; 1, 3, 5: The crude mixtures containing the GLpgm, GLugpg and GLpmi, respectively; 2, 4, 6: The purified enzymes of GLpgm, GLugpg and GLpmi, respectively.

## 2.5 酶的纯化

将 3 个目的酶的粗酶液经过 Co-NTA 纯化后均得到单一的条带(图 6), 表明获得纯化的酶, 可用于进一步的酶学性质研究。纯化酶在常规酶活测定条件下, GLpgm、GLugpg、GLpmi 比酶活分别为 4.75、6.26、13.68 U/mg。

## 2.6 酶学性质分析

### 2.6.1 最适反应 pH 和 pH 稳定性

将纯化后的 GLpgm、GLugpg 和 GLpmi 置于不同 pH 缓冲液中测定酶活力, 得到 pH-酶活力关系(图 7)。

GLpgm 最适反应 pH 为 8.5, 当  $10.0 < \text{pH} < 6.5$  时, 酶活力基本丧失。将 GLpgm 置于不同 pH 缓冲溶液中于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 2 h, 结果表明该酶在 pH 6.5–8.0 间稳定性较好, 均能保持 80% 以上的酶活力; 在 pH 高于 9.0 的条件下, GLpgm 基本失活。

GLugpg 的最适 pH 为 7.5, 当  $9.5 < \text{pH} < 6.0$  时, 酶活力基本丧失。将 GLugpg 置于不同缓冲溶液中  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 2 h, 结果表明该酶在 pH 7.0–8.0 间稳定性较好, 能保持以上 70% 的酶活力。

GLpmi 的最适 pH 为 7.5, 当  $10.0 < \text{pH} < 5.0$  时, 酶活力基本丧失。将 GLpmi 置于不同缓冲溶液中  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  保温 2 h, 结果表明该酶在 pH 6.0–9.0 间稳定性较好, 2 h 以后仍能保持 60% 以上的酶活力。



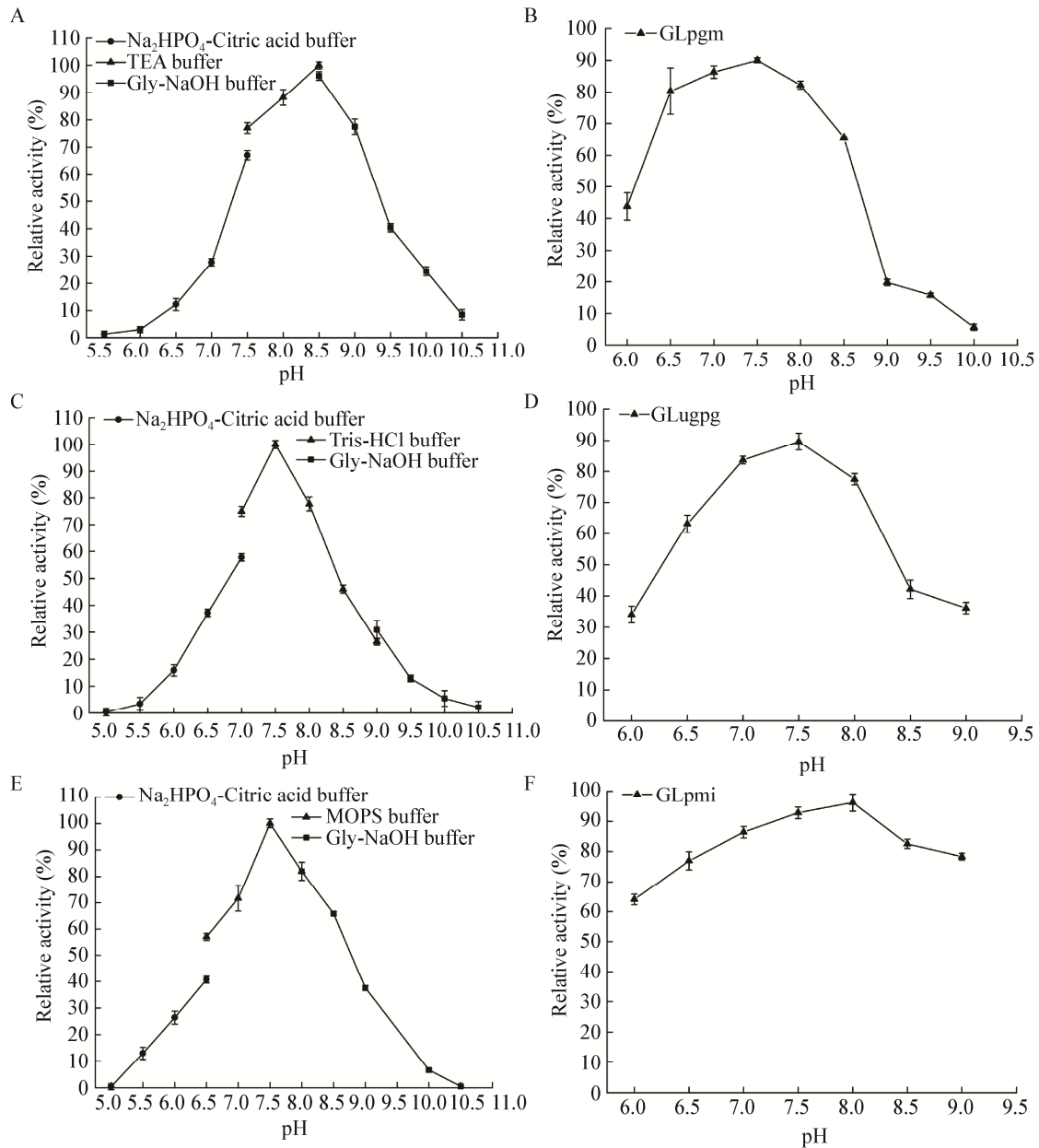


图7 pH对酶活力及其稳定性的影响

Figure 7 Effects of pH on activities and stabilities of purified enzymes

注: A、B: pH-GLp gm 酶活力、稳定性; C、D: pH-GLug pg 酶活力、稳定性; E、F: pH-GLp mi 酶活力、稳定性。

Note: A, B: pH-Enzyme of GLp gm activity and stability; C, D: pH-Enzyme of GLug pg activity and stability; E, F: pH-Enzyme of GLp mi activity and stability.

### 2.6.2 最适反应温度和热稳定性

将纯化后的 GLp gm、GLug pg 和 GLp mi 置于不同温度条件下测定酶活力, 得到温度-酶活力关系(图 8)。

GLp gm 的最适反应温度为 35 °C, 反应温度高于 60 °C 时酶活力大大下降。将 GLp gm 置于不同温度下保温 2 h 后, 在 20 °C 时酶活力保持 90% 以上,

稳定性良好, 但高于 45 °C 时, 酶活力下降到 20% 以下。

GLug pg 的最适反应温度为 40 °C, 当温度高于 60 °C 时, 酶活力基本丧失。将 GLug pg 置于不同温度保温 2 h, 温度低于 30 °C 时残余酶活保留 80%–90%, 即 30 °C 以下热稳定性较好。

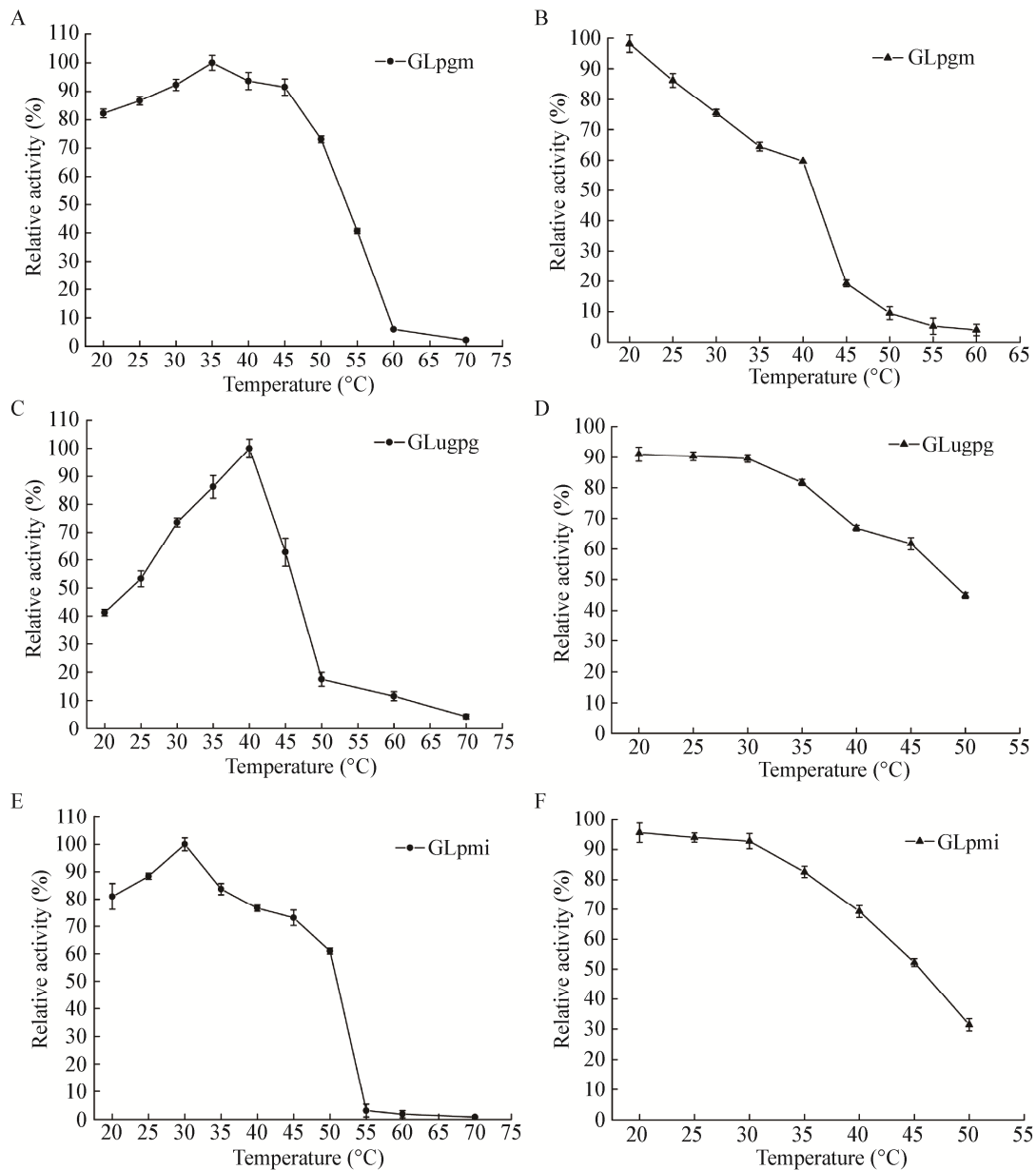


图 8 温度对酶活力及其稳定性的影响

Figure 8 Effects of temperature on activities and stabilities of purified enzymes

注: A、B: 温度-GLp gm 酶活力、稳定性; C、D: 温度-GLugpg 酶活力、稳定性; E、F: 温度-GLpmi 酶活力、稳定性。

Note: A, B: Temperature-Enzyme of GLp gm activity and stability; C, D: Temperature-Enzyme of GLugpg activity and stability; E, F: Temperature-Enzyme of GLpmi activity and stability.

GLpmi 的最适反应温度为 30 °C, 当温度高于 55 °C 时, 酶活力基本丧失。将 GLpmi 置于不同温度保温 2 h, 温度在 30 °C 以下时, 残余酶活均保留 90% 以上, 具有良好的稳定性。

### 2.6.3 金属离子对酶活力的影响

测定 14 种金属离子在浓度为 1 mmol/L 下对

不同酶活力的影响(图 9)。对于 3 种纯化酶,  $Ag^+$  和  $Cu^{2+}$  均具有较强的抑制作用;  $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  对 GLp gm 和 GLpmi 均有促进作用, 尤其是  $Mn^{2+}$  对 GLp gm 的促激活作用最强。另外,  $Ni^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  对 GLp gm 的抑制作用也较强; 而各种金属离子对 GLugpg 均没有明显的激活作用;

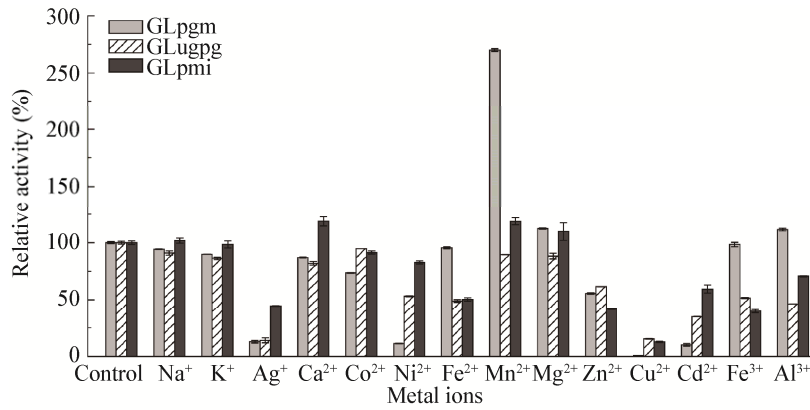


图 9 金属离子对酶活力的影响

Figure 9 Effects of metal ions on the stability of purified enzymes

金属离子 Na<sup>+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>对 GLpmi 的酶活力均有激活作用。

GLugpg 以底物 UDP-葡萄糖(0.1–5.0 mmol/L)和 GLpmi 以底物甘露糖-6-磷酸(1–10 mmol/L), 在最适反应条件下测定酶活力, 分别采用 Lineweaver-Burk 双倒数进行作图(图 10), 计算得到的酶促动力学参数见表 3。

2.6.4 酶促反应动力学参数测定

GLp gm 以底物 α-葡萄糖-1-磷酸(0.1–5.0 mmol/L)、

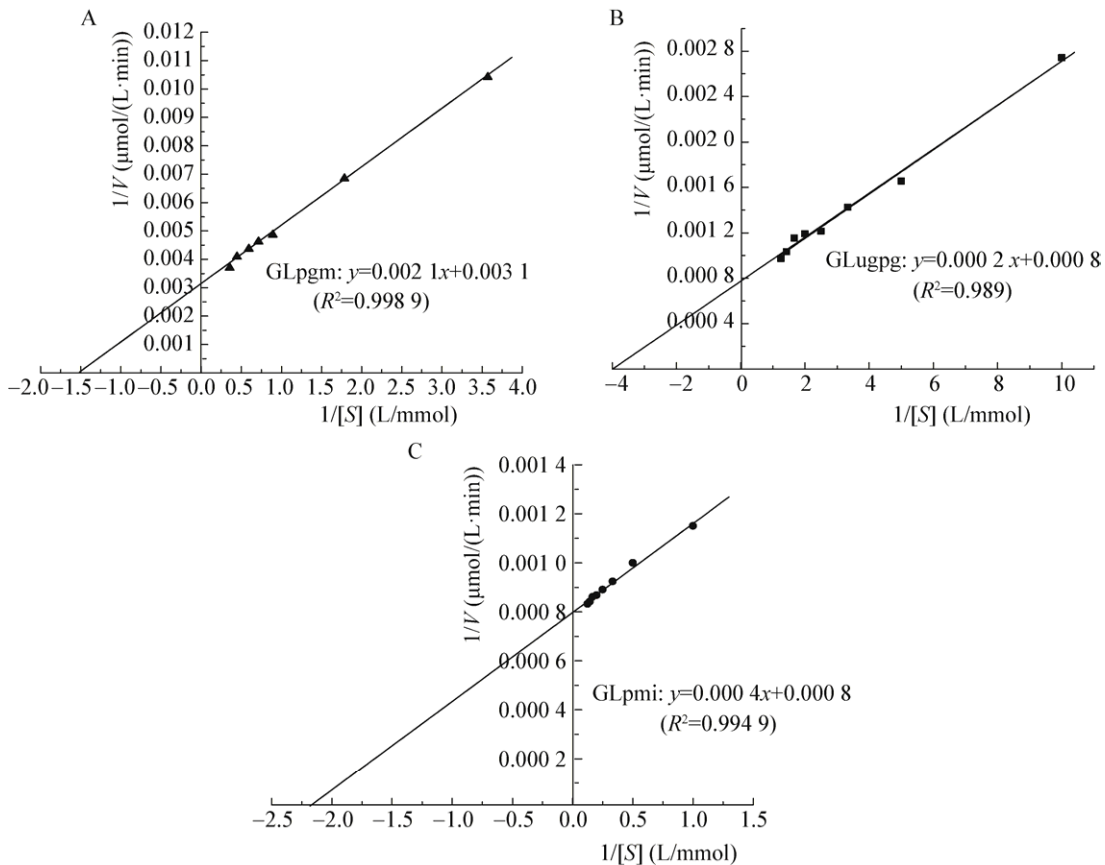


图 10 纯化酶的 Lineweaver-Burk 作图

Figure 10 Lineweaver-Burk plot of purified enzymes

注: 图 A、B、C 分别为 GLp gm、GLugpg 和 GLpmi 的 Lineweaver-Burk 双倒数图。

Note: Figure A, B and C are the Lineweaver-Burk plot of GLp gm, GLugpg and GLpmi, respectively.

表 3 酶促反应动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of enzymatic reaction

酶 Enzymes	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/(\text{L}\cdot\text{min})$ )	$K_m$ ( $\text{mmol}/\text{L}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{s})$ )
GLpgm	322.58	0.68	196.08
GLugpg	1 250.00	0.25	818.60
GLpmi	1 250.00	0.50	1 105.22

### 3 讨论与结论

目前关于 PGM、UGPG 和 PMI 酶学性质的研究多集中在细菌与植物来源,在食用真菌中的相关报道较少。从表 4 中可知,不同来源的 PGM、UGPG 和 PMI 其最适反应 pH 基本上在 7.0–8.0 内,最适

表 4 不同来源 PGM、UGPG 及 PMI 酶学性质

Table 4 The enzymatic properties of PGM, UGPG and PMI from different sources

酶 Enzymes	来源 Sources	生物体 Organisms	最适 pH Optimum pH	最适温度 Optimum temperature	促进剂 Activators	抑制剂 Inhibitors	$K_m$ ( $\text{mmol}/\text{L}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{s})$ )
PGM	Bacteria	<i>E. coli</i> <sup>[20]</sup>	9.0				0.05	54
		<i>P. mucilaginosus</i> <sup>[21]</sup>	7.5	40	$\text{Mg}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$		0.24	47.5
		<i>S. sanxanigenens</i> <sup>[22]</sup>	7.6/8.0	35			0.2–1.0	10–52
		<i>F. oxysporum</i> <sup>[23]</sup>	7.0	45	$\text{Ca}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Ni}^{2+}/\text{Mn}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$		0.1	7.38
		<i>L. lactis</i> <sup>[24]</sup>	7.2	30		$\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$	0.016 8	
	Fungi	<i>S. cerevisiae</i> <sup>[25]</sup>	7.5	30	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$	0.060/0.026/0.120	
	Plants	<i>S. oleracea</i> <sup>[26]</sup>	7.8–7.9					
		<i>S. tuberosum</i> <sup>[27]</sup>	7.5/7.9					
		<i>Zea mays</i> L. <sup>[28]</sup>	8.0	35	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	0.02	
		<i>Pisum sativum</i> L. <sup>[29]</sup>	7.9	35	$\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	0.018	
Animals		<i>O. cuniculus</i> <sup>[30]</sup>	7.5		$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ag}^{+}/\text{Cu}^{2+}$	0.063	
	<i>Homo sapiens</i> <sup>[31]</sup>	7.4–7.6				0.016–0.020		
UGPG	Bacteria	<i>E. coli</i> <sup>[32]</sup>	7.6–7.8	37	$\text{Co}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$			
		<i>B. bifidum</i> <sup>[33]</sup>	6.5	37	$\text{Mg}^{2+}$			
		<i>S. paucimobilis</i> <sup>[34]</sup>					0.007 5	
		<i>A. xylinum</i> <sup>[35]</sup>					3.22	
		Fungi	<i>S. cerevisiae</i> <sup>[36]</sup>	8.0	30	$\text{Co}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$		0.035
	Plants	<i>G. lucidum</i> <sup>[3]</sup>	7.5				0.774	273
		<i>G. chouae</i> <sup>[37]</sup>	7.5	40		$\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$	0.001 67	11 980
		<i>S. japonica</i> <sup>[37]</sup>	8.0	37		$\text{Ca}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$	0.004 33	4 610
		<i>S. tuberosum</i> <sup>[38-39]</sup>	8.0/8.5	30/37			0.18/0.12	
		<i>S. vulgare</i> <sup>[40]</sup>	9.0	37	$\text{Co}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$	0.05	
	<i>Nostoc</i> sp. <sup>[41]</sup>	7.5	37			3.04	2.09	
	<i>Apocynaceae</i> <sup>[42]</sup>	7.2	37	$\text{Mg}^{2+}$		773.8	0.211	
Animals	<i>Homo sapiens</i> <sup>[43]</sup>	7.8	37	$\text{Co}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$		0.14/0.18		
	<i>G. gallus</i> <sup>[44]</sup>	7.6	25	$\text{Co}^{2+}/\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$		0.050–0.066		
PMI	Bacteria	<i>E. coli</i> <sup>[45-46]</sup>	7.4/7.1	22/25			1.210/0.354	
		<i>B. cepacia</i> <sup>[47]</sup>	7.6	32	$\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}/\text{Co}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	12.4	
		<i>P. aeruginosa</i> <sup>[48]</sup>	7.0	25	$\text{Ca}^{2+}/\text{Co}^{2+}$		1.18	
		<i>B. cereus</i> <sup>[49]</sup>	7.0	35	$\text{Ni}^{2+}/\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$			
		<i>S. chungbukense</i> <sup>[50]</sup>	8	37	$\text{Ca}^{2+}/\text{Co}^{2+}$			
	Fungi	<i>C. albicans</i> <sup>[51]</sup>				$\text{Ag}^{+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$	0.2/0.8/1.0/4.0	
		<i>S. cerevisiae</i> <sup>[52]</sup>	7.1	25	$\text{Ca}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	0.121	
		<i>A. fumigatus</i> <sup>[53]</sup>	7.6	37				
	Plants	<i>A. thaliana</i> <sup>[54]</sup>	7.5	25		$\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$	0.041 3/0.372 0	
		<i>A. konjac</i> <sup>[55]</sup>	6.5–7.0			$\text{Co}^{2+}$	0.73	
<i>S. japonica</i> <sup>[56]</sup>		8.5	15					
Animals	<i>P. magellanicus</i> <sup>[57]</sup>	7.6						
	<i>Homo sapiens</i> <sup>[58]</sup>					0.23/0.25		

反应温度在 30–40 °C 之间, 物种间差异并不明显。本研究结果基本在此范围内, 但 GLp<sub>gm</sub> 的最适反应 pH 为 8.5, 稍高于其他来源的 PGM, 在碱性环境下具备良好的催化特性, 在一定程度上为拓宽该酶的应用提供指导意义。

Mn<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>对多种来源的 PGM 和 PMI 酶活均有一定的促进作用, 本研究中 GLp<sub>gm</sub> 和 GLp<sub>mi</sub> 的酶活也受到这两种金属离子的激活; Turnquist 等<sup>[59]</sup>研究了多种来源的 UGPG, 发现其活性也会受到 Mn<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>的促进作用, 而本研究中金属离子均对 GLu<sub>pgg</sub> 表现出抑制作用, 推测 GLu<sub>pgg</sub> 对金属离子的依赖性并不高, 可能是其特殊的酶活性结合位点造成的。从表 4 中可看出, 细菌来源的 PMI 酶活会受到 Ni<sup>2+</sup>和 Co<sup>2+</sup>的促进, 而真菌和植物来源的 PMI 酶活却受到 Ni<sup>2+</sup>和 Co<sup>2+</sup>抑制, 同样的, 本实验中灵芝来源的 GLp<sub>mi</sub> 酶活也受到这两种金属离子的抑制。

不同来源的 PGM、UGPG 和 PMI 的 K<sub>m</sub> 值存在较大差异, 本研究中 GLp<sub>gm</sub> 的 K<sub>m</sub> 值为 0.68 mmol/L, 高于细菌、真菌、植物和动物来源的 PGM; 有研究<sup>[3]</sup>显示灵芝来源的 UGPG 的 K<sub>m</sub> 值为 0.774 mmol/L, 而本研究中的 GLu<sub>pgg</sub> 的 K<sub>m</sub> 值仅为 0.25 mmol/L, 且催化效率也优于同属其他菌株, 但其 K<sub>m</sub> 值普遍比植物来源的酶高; 从表 4 可看出, 细菌中 PMI 的 K<sub>m</sub> 值普遍高于真菌、植物和动物来源的 PMI, 本研究中 GLp<sub>mi</sub> 的 K<sub>m</sub> 值为 0.50 mmol/L, 与真菌 *C. albicans*<sup>[51]</sup>和植物 *A. konjac*<sup>[54]</sup>中的 PMI 相近。另外, 本研究中 GLp<sub>gm</sub>、GLu<sub>pgg</sub> 和 GLp<sub>mi</sub> 均具有较高的催化效率, 其中 GLp<sub>gm</sub> 的催化效率优于大多数细菌来源的 PGM。

本研究对灵芝多糖前体合成途径中关键酶 PGM、UGPG 和 PMI 的酶学性质研究结果显示, 在反应 pH、温度、金属离子作用方面, 其与植物和真菌来源的这 3 种酶较为相似, 且催化效率上表现更为优异。本研究对灵芝多糖糖供体合成途径关键酶酶学特性进行了完善, 将有利于全面清晰地了解

灵芝多糖的合成过程, 并进一步为高效发酵调控策略的制定提供理论依据。

## REFERENCES

- [1] Chen S, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*[J]. Nature Communications, 2012, 3: 9913
- [2] Xu JW, Ji SL, Li HJ, et al. Increased polysaccharide production and biosynthetic gene expressions in a submerged culture of *Ganoderma lucidum* by the overexpression of the homologous  $\alpha$ -phosphoglucosyltransferase gene[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2015, 38(2): 399-405
- [3] Li MJ, Chen TX, Gao T, et al. UDP-glucose pyrophosphorylase influences polysaccharide synthesis, cell wall components, and hyphal branching in *Ganoderma lucidum* via regulation of the balance between glucose-1-phosphate and UDP-glucose[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 82: 251-263
- [4] Liu GQ, Zhao Y, Wang XL, et al. Biosynthesis and fermentation control of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*[J]. Mycosystema, 2011, 30(2): 198-205 (in Chinese)  
刘高强, 赵艳, 王晓玲, 等. 灵芝多糖的生物合成和发酵调控[J]. 菌物学报, 2011, 30(2): 198-205
- [5] Wang Q. Effect of polysaccharides composition and the related enzymatic analysis in *Ganoderma lucidum* submerged culture[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2013 (in Chinese)  
王琼. 灵芝菌丝体培养中多糖组分的变化与相关酶活性分析[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2013
- [6] Ma ZB, Ye C, Deng WW, et al. Reconstruction and analysis of a genome-scale metabolic model of *Ganoderma lucidum* for improved extracellular polysaccharide production[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3076-3089
- [7] Qiao SK. The effect of fermentation conditions on mycelium morphology and polysaccharides biosynthesis of *Ganoderma lucidum* in submerged culture[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2014 (in Chinese)  
乔双逵. 液态发酵过程发酵条件对灵芝形态及灵芝多糖合成影响的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2014
- [8] Li J. The effect of three monosaccharide carbon sources on polysaccharides synthesis of *Ganoderma lucidum*[D]. Wuxi: Master's Thesis of Jiangnan University, 2015 (in Chinese)  
李洁. 三种单糖碳源对灵芝多糖合成影响的研究[D]. 无锡: 江南大学硕士学位论文, 2015
- [9] Tang YJ, Zhong JJ. Exopolysaccharide biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus, *Ganoderma lucidum*, grown on lactose in a bioreactor[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(12): 1023-1026
- [10] Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, et al. Use of the lambda red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes[J]. BMC Molecular Biology, 2006, 7: 31
- [11] Li X, Li YX, Dai JJ. Usage of two-step red homologous recombination method to knockout the gene of *Escherichia coli*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017,

- 44(7): 1934-1940 (in Chinese)  
李鑫, 李亚芯, 戴建君. Red 两步同源重组法在大肠杆菌基因敲除中的应用[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(7): 1934-1940
- [12] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(12): 6640-6645
- [13] Baba T, Ara T, Hasegawa M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection[J]. Molecular Systems Biology, 2006, 2: 2006.0008
- [14] Qian N, Stanley GA, Hahn-Hagerdal B, et al. Purification and characterization of two phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and their regulation in maltose- and glucose-utilizing cells[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(17): 5304-5311
- [15] Bernstein RL, Robbins PW. Control aspects of uridine 5'-diphosphate glucose and thymidine 5'-diphosphate glucose synthesis by microbial enzymes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1965, 240: 391-397
- [16] Shinabarger D, Berry A, May TB, et al. Purification and characterization of phosphomannose isomerase-guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase. A bifunctional enzyme in the alginate biosynthetic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(4): 2080-2088
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [18] Schagger H, von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kD[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 368-379
- [19] Dixon M, Webb EC. Enzymes[M]. 3rd ed. New York: Academic Press, 1979
- [20] Joshi JG, Handler P. Phosphoglucomutase. I. Purification and properties of phosphoglucomutase from *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1964, 239: 2741-2751
- [21] Tang JY, Lan DM, Wang YH, et al. Cloning, expression, and characterization of a phosphoglucomutase from *Paenibacillus mucilaginosus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(3): 38-42 (in Chinese)  
唐家毅, 蓝东明, 王永华, 等. 胶质芽孢杆菌葡萄糖磷酸变位酶基因的克隆、表达与酶学性质研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(3): 38-42
- [22] Huang HD, Li XY, Wu M, et al. Cloning, expression and characterization of a phosphoglucomutase/phosphomannomutase from sphingane-producing *Sphingomonas sanxanigenens*[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(8): 1265-1270
- [23] Kourtoglou E, Anasontzis GE, Mamma D, et al. Constitutive expression, purification and characterization of a phosphoglucomutase from *Fusarium oxysporum*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(3): 217-224
- [24] Neves AR, Pool WA, Castro R, et al. The  $\alpha$ -phosphoglucomutase of *Lactococcus lactis* is unrelated to the  $\alpha$ -D-phosphohexomutase superfamily and is encoded by the essential gene *pgmH*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(48): 36864-36873
- [25] Thomas W, Baylac A, Alkim C, et al. The *PGM3* gene encodes the major phosphoribomutase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 2012, 586(23): 4114-4118
- [26] Mühlbach H, Schnarrenberger C. Properties and intracellular distribution of two phosphoglucomutases from spinach leaves[J]. Planta, 1978, 141(1): 65-70
- [27] Takamiya S, Fukui T. Phosphoglucomutase from potato tubers: chemical and catalytic properties[J]. The Journal of Biochemistry, 1978, 84(3): 569-574
- [28] Popova TN, Matasova LV, Lapotko AA. Purification, separation and characterization of phosphoglucomutase and phosphomannomutase from maize leaves[J]. IUBMB Life, 1998, 46(3): 461-470
- [29] Matasova LV, Popova TN. Catalytic properties of phosphoglucomutase from pea chloroplasts[J]. Biochemistry, 1999, 64(7): 774-779
- [30] Hirose M, Sugimoto E, Chiba H. Studies on crystalline yeast phosphoglucomutase: fundamental properties and chemical modification[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 1971, 250(3): 515-521
- [31] Fazi A, Piacentini MP, Piatti E, et al. Purification and partial characterization of the phosphoglucomutase isozymes from human placenta[J]. Preparative Biochemistry, 1990, 20(3/4): 219-240
- [32] Weissborn AC, Liu Q, Rumley MK, et al. UTP:  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate uridylyltransferase of *Escherichia coli*: isolation and DNA sequence of the *galU* gene and purification of the enzyme[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(9): 2611-2618
- [33] de Bruyn F, Beauprez J, Maertens J, et al. Unraveling the Leloir pathway of *Bifidobacterium bifidum*: significance of the uridylyltransferases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(22): 7028-7035
- [34] Marques AR, Ferreira PB, Sá-Correia I, et al. Characterization of the *ugpG* gene encoding a UDP-glucose pyrophosphorylase from the gellan gum producer *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2003, 268(6): 816-824
- [35] Koo HM, Yim SW, Lee CS, et al. Cloning, sequencing and expression of UDP-glucose pyrophosphorylase gene from *Acetobacter xylinum* BRC5[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2000, 64(3): 523-529
- [36] Guranowski A, de Diego A, Sillero A, et al. Uridine 5'-polyphosphates ( $p_4U$  and  $p_5U$ ) and uridine(5') polyphospho(5')nucleosides( $U_{p_n}Ns$ ) can be synthesized by UTP: glucose-1-phosphate uridylyltransferase from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEBS Letters, 2004, 561(1/2): 83-88
- [37] Chi S, Feng YJ, Liu T. Molecular cloning, characterization, and comparison of UDP-glucose pyrophosphorylase from *Gracilaria chouae* and *Saccharina japonica*[J]. Journal of Applied Phycology, 2016, 28(3): 2051-2059
- [38] Katsube T, Kazuta Y, Mori H, et al. UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing[J]. Journal of Biochemistry, 1990, 108(2): 321-326
- [39] Sowokinos JR, Spychalla JP, Desborough SL. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum*. IV. Purification, tissue localization, and physicochemical properties of UDP-glucose pyrophosphorylase[J]. Plant Physiology, 1993,



- 101(3): 1073-1080
- [40] Gustafson GL, Gander JE. Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase from *Sorghum vulgare*. Purification and kinetic properties[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1972, 247(5): 1387-1397
- [41] Kawano Y, Sekine M, Ihara M. Identification and characterization of UDP-glucose pyrophosphorylase in cyanobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014, 117(5): 531-538
- [42] Qi C. Purification and characterization of UDPase[J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2004, 21(3): 345-351 (in Chinese)  
祁超. Apocynaceae 系细胞尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶的纯化和表征[J]. 中国科学院研究生院学报, 2004, 21(3): 345-351
- [43] Chacko CM, McCrone L, Nadler HL. Uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase and uridine diphosphogalactose pyrophosphorylase in human skin fibroblasts derived from normal and galactosemic individuals[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology, 1972, 268(1): 113-120
- [44] Magee C, Nurminskaya M, Linsenmayer TF. UDP-glucose pyrophosphorylase: up-regulation in hypertrophic cartilage and role in hyaluronan synthesis[J]. Biochemical Journal, 2001, 360(3): 667-674
- [45] Gao H, Chen Y, Leary JA. Kinetic measurements of phosphoglucose isomerase and phosphomannose isomerase by direct analysis of phosphorylated aldose-ketose isomers using tandem mass spectrometry[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2005, 240(3): 291-299
- [46] Desvergnès S, Courtiol-Legourd S, Daher R, et al. Synthesis and evaluation of malonate-based inhibitors of phosphosugar-metabolizing enzymes: class II fructose-1, 6-bis-phosphate aldolases, type I phosphomannose isomerase, and phosphoglucose isomerase[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20(4): 1511-1520
- [47] Sousa SA, Moreira LM, Wopperer J, et al. The *Burkholderia cepacia bceA* gene encodes a protein with phosphomannose isomerase and GDP-D-mannose pyrophosphorylase activities[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 353(1): 200-206
- [48] Lee HJ, Chang HY, Venkatesan N, et al. Identification of amino acid residues important for the phosphomannose isomerase activity of PslB in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. FEBS Letters, 2008, 582(23/24): 3479-3483
- [49] Zhang Y, Cui TB, Song Y. Gene cloning and expression of a phosphomannose isomerase from *Bacillus cereus* CZ and characterization of the recombinant enzyme[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(6): 195-200 (in Chinese)  
张瑶, 崔堂兵, 宋妍. 蜡状芽孢杆菌 CZ 磷酸甘露糖异构酶基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(6): 195-200
- [50] Tran ST, Le DT, Kim YC, et al. Cloning and characterization of phosphomannose isomerase from *Sphingomonas chungbukensis* DJ77[J]. BMB Reports, 2009, 42(8): 523-528
- [51] Bernard AR, Wells TNC, Cleasby A, et al. Selenomethionine labelling of phosphomannose isomerase changes its kinetic properties[J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 230(1): 111-118
- [52] Roux C, Lee JH, Jeffery CJ, et al. Inhibition of type I and type II phosphomannose isomerases by the reaction intermediate analogue 5-phospho-D-arabinonohydroxamic acid supports a catalytic role for the metal cofactor[J]. Biochemistry, 2004, 43(10): 2926-2934
- [53] Fang WX, Yu XY, Wang B, et al. Characterization of the *Aspergillus fumigatus* phosphomannose isomerase Pmi1 and its impact on cell wall synthesis and morphogenesis[J]. Microbiology, 2009, 155(10): 3281-3293
- [54] Maruta T, Yonemitsu M, Yabuta Y, et al. *Arabidopsis* phosphomannose isomerase 1, but not phosphomannose isomerase 2, is essential for ascorbic acid biosynthesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(43): 28842-28851
- [55] Murata T. Studies on the phosphomannose isomerase of *Amorphophallus konjac* C. koch. I. Its isolation and some enzymic properties[J]. Plant and Cell Physiology, 1975, 16(6): 953-961
- [56] Zhang YL. Cloning, analysis and expression of phosphomannose isomerase gene (*PMI*) from kelp[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2013 (in Chinese)  
张亚兰. 海带磷酸甘露糖异构酶基因(PMI)的克隆、分析及表达[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2013
- [57] Pichaud N, Briatte S, Desrosiers V, et al. Metabolic capacities and immunocompetence of sea scallops (*Placopecten magellanicus*, gmelin) at different ages and life stages[J]. Journal of Shellfish Research, 1943, 28(4): 865-876
- [58] Proudfoot AEI, Turcatti G, Wells TNC, et al. Purification, cDNA cloning and heterologous expression of human phosphomannose isomerase[J]. European Journal of Biochemistry, 1994, 219(1/2): 415-423
- [59] Turnquist RL, Hansen RG. 2 Uridine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase[J]. The Enzymes, 1973, 8: 51-71