基于紫芝基因组的倍半萜合酶基因的发掘与功能鉴定

王丽芝¹, 王海英¹, 浦香东², 孙思杰¹, 魏建和², 孙超^{2*}

1. 天津中医药大学中药学院, 天津 300193;

2. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

* 联系人, E-mail: csun@implad.ac.cn

收稿日期: 2017-09-16; 接受日期: 2017-11-07; 网络版发表日期: 2018-03-27

中国医学科学院医学与健康科技创新工程(批准号: 2016-I2M-2-003-016)、国家自然科学基金(批准号: 81603221, 81573704)、天津市自然科学基金(批准号: 16JCQNJC09700)和天津市高等学校科技发展基金计划(批准号: 20120202/20140209)资助

摘要 灵芝(*Ganoderma lucidum*)是目前研究最深入的药用真菌之一,也是作为研究天然产物生物合成的理想模式真菌. 本研究通过对担子菌亚门灵芝属紫芝(*Ganoderma sinense*)基因组的数据挖掘发现两个倍半萜合酶基因. 利用RT-PCR方法从紫芝菌丝体总RNA中扩增出两者的全长cDNA序列,将两个倍半萜合酶的编码序列克隆到表达载体中在大肠杆菌中进行异源表达,变性蛋白电泳显示两者都可以可溶性的形式在大肠杆菌中表达. 顶空固相微萃取-气相色谱质谱法分析显示,重组紫芝萜类合酶具有明显的催化活性,可合成多个倍半萜类产物. 本研究为进一步揭示真菌倍半萜合酶的结构与功能的相关性及其产物多样性形成机制奠定了基础.

关键词 紫芝, 倍半萜合酶, 生物合成

萜类化合物是小分子天然产物中种类最多,结构最具多样性的一类化合物,至今已鉴定出超过60000种,接近400个结构家族^[1]. 其中许多萜类化合物在生命体内扮演重要角色,如增强抗病能力、维系植物与其他生物类群的互惠关系以及具有化感作用等^[2]. 萜类化合物在医药领域也发挥着重要作用,如治疗疟疾的倍半萜类衍生物青蒿素,治疗癌症的二萜类衍生物紫杉醇等^[3]都属于萜类化合物.

萜类合酶(terpene synthase, TPS)是萜类化合物生物合成过程中的关键酶,负责对不同的底物如牻牛儿醇焦磷酸酯(geranyl pyrophosphate, GPP)、基焦磷

酸(farnesyl diphosphate, FPP)和焦磷酸牻牛儿基牻牛儿醇酯(geranylgeranyl pyrophosphate, GGPP)等进行一次或多次环化,分别生成单萜、倍半萜、二萜等化合物. 因此,探索萜类合酶的结构和功能是解析萜类生物合成途径非常重要的一步. 传统研究萜类合酶的方法一般先分离化合物,确定结构和活性,然后从总蛋白中分离纯化负责该化合物合成的酶,分析其序列,设计引物得到完整的基因和蛋白序列^[4]. 随着大规模测序技术的发展,大量物种基因组先后被测序,基因组挖掘这一方法也被应用到萜类化合物的研究中,研究者开始从基因组中筛选可能的萜类合酶,通过实验

引用格式: 王丽芝, 王海英, 浦香东, 等. 基于紫芝基因组的倍半萜合酶基因的发掘与功能鉴定. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 447–454
Wang L Z, Wang H Y, Pu X D, et al. Cloning and characterization of sesquiterpene synthase genes from the *Ganoderma sinense* genome (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 447–454, doi: 10.1360/N052017-00190

确定其底物和产物^[5,6]。

担子菌作为萜类化合物的主产者之一, 其萜类化合物的生物合成研究一直备受关注。目前完成基因组测序的担子菌真菌并不多, 仅包括*Coprinus cinereus*等少数物种^[6-9]。灵芝是其中最具药用价值的一个真菌, 素有“仙草”之美誉, 是公认的治疗癌症、慢性肝炎和糖尿病的替代佐药^[10]。灵芝含有多糖、三萜、挥发油等多种生物活性成分^[11]。倍半萜作为其挥发油的成分之一, 其含量较低^[12], 成为进一步开发的瓶颈^[13-16]。本实验从已完成测序的灵芝属真菌紫芝(*Ganoderma sinense*)的基因组中挖掘倍半萜合酶基因并对其克隆表达和功能验证, 不但为探索真菌萜类合酶的催化机制及通过代谢工程或合成生物学技术生成灵芝倍半萜奠定了基础, 也为进一步完善灵芝作为模式药用真菌^[17]的研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

紫芝菌株CGMCC5.00购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。转接至PDA培养基上活化, 取含有菌丝的培养基2~3块(<0.5 cm)接至液体培养基(每升溶液含蔗糖35 g、蛋白胨5 g、酵母浸膏2.5 g, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, vitamin B 0.05 g, pH 5.5)中振荡培养6~7天(28℃, 160 r/min), 收集菌丝, 液氮速冻, -80℃保存。

1.2 紫芝倍半萜合酶基因的克隆

利用QiaGen RNeasy[®] Mini试剂盒(德国)提取紫芝总RNA。依据TaKaRa PrimeScript[®] 1st Strand cDNA说明书(日本)合成cDNA。利用Primer premier 6引物设计软件根据前期基因组测序获得的候选萜类合酶基因序列设计特异性引物, 并在两端分别引入限制性内切酶酶切位点, 引物序列分别为*GS11330*-F/R: 5'-CAT-ATGTTATCTACCCCTTCCCCCT-3'/5'-GGATCCT-TAAGCTTGGTATCCCAGCTC-3'; *GS14272*-F/R: 5'-CATATGGCCATTGCAGCGTCC-3'/5'-AAGCTTC-TATGCACTGACAGGTATACGTT-3'。以上述获得的cDNA为模板, 采用Pyrobest DNA Polymerase进行PCR扩增, PCR扩增程序为: 94℃预变性3 min; 94℃变

性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸90 s, 共40个循环, 72℃延伸5 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳回收目的条带后连接到PGEM-Teasy载体上, 并转化*E. coli*5α感受态细胞, 结合蓝白斑和菌落PCR挑选阳性转化子进行测序, 挑选测序正确的克隆酶切并回收含外源基因片段, 克隆入表达载体PET28a, 菌落PCR挑选阳性克隆。

1.3 紫芝倍半萜合酶基因的比对和系统进化分析

将倍半萜合酶(SesTPS)基因翻译成氨基酸序列, 利用BLASTp与NCBI蛋白数据库(Nr)进行比对, 获得相似度高的序列; 使用DNAMAN软件将本文中的氨基酸序列与在NCBI比对相似度高的6条序列(相似度>60%)进行多序列比对分析。采用MEGA5软件中的邻接法(neighbor-joining, NJ)对本文中的2条氨基酸序列与GenBank上其他序列进行系统进化分析, 并构建进化树, 其中校验参数bootstrap设为2000, 用于检测系统进化树各部分置信度^[7,18]。

1.4 紫芝萜类合酶的诱导表达和SDS-PAGE检测

将含外源基因的表达载体PET28a转化大肠杆菌BL21(DE3), 挑选单克隆接种于LB培养基(含有50 mg/L的卡那霉素)中振荡培养(220 r/min)。取过夜培养的菌液按照5%的量接种于5 mL的LB培养液(含有50 mg/L的卡那霉素)中, 37℃下振荡培养至 A_{600} 为0.4~0.6, 取出加IPTG至终浓度5 mmol/L诱导, 18℃诱导20 h, 取出500 μL 菌液(12000 r/min, 2 min), 加ddH₂O重悬, 制备成全菌液备用。其余菌液通过超声波细胞破碎仪破碎后离心(13400×g, 2 min)取上清。然后分别向全菌液和上清液中加入上样缓冲液, 100℃水浴20 min, 最大转速(17000×g)离心10 min, 分别取10 μL 全菌液, 20 μL 上清液进行SDS-PAGE电泳(蛋白电泳浓缩胶为12%, 分离胶为6%, 配置方法参照分子克隆附录)。

1.5 紫芝萜类合酶合成产物分析

将携带含外源基因质粒的大肠杆菌BL21(DE3)单克隆接种至50 mL LB培养基(含有50 mg/L的卡那霉素)中, 37℃下振荡培养至 A_{600} 为0.4~0.6, 加入终浓度0.5 mmol/L的IPTG, 在18℃下诱导20 h。首先, 利用顶空固相微萃取法萃取样品中的倍半萜10 min, 然后进行GC-MS分析。分析条件为: 采用HP-1柱(30 m×0.25 mm×1.5 μm)进行分离, 以氦气为载气, 进样口温

度设置为250℃, 将顶空固相微萃取的纤维头放入进样口, 保持5 min. 柱温以8℃/min的速率由60℃升至250℃, 在250℃保持3 min, 扫描质量数范围设为30~300.

2 结果与分析

2.1 *GS11330*和*GS14272*基因全长cDNA的获得

根据试剂盒说明书提取紫芝总RNA, 结果显示28S, 18S两条带比较清晰明亮, 前者亮度约为后者的2倍, 表明RNA较为完整. 经Nano Drop 2000分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 为2.03, A_{260}/A_{230} 为2.23, 表明RNA纯度较高, 可以用于合成一链cDNA. 根据预测的序列设计特异性引物进行PCR扩增, 分别获得两条与目的基因大小一致的序列. 将目的基因连接至PGEM-Teasy进行测序, 结果获得长度分别为969和1080 bp的两条cDNA, 推测2个倍半萜合酶分别含322个和359个氨基酸, 分别命名为*GS11330*和*GS14272*.

2.2 *GS11330*和*GS14272*蛋白质的相似性和系统进化分析

将*GS11330*和*GS14272*酶的氨基酸序列在NCBI上进行BLASTp比对, 发现二者均与多条来源于担子菌的倍半萜合酶有很高的同源性. 其中二者均与*Dichomitus squalens* (XP_007366315.1)的倍半萜合酶基因有很高的相似性, 分别为76%和87%. 与*Trametes versicolor*, *Pycnoporus coccineus*的倍半萜合酶也有很高的同源性, *GS11330*与*Trametes versicolor* (XP_008037946.1)和*Pycnoporus coccineus* (OSD07404.1)的同源性分别为54%和53%, *GS14272*与*Trametes versicolor* (XP_008045349.1)和*Pycnoporus coccineus* (OSD08313.1)的同源性分别为79%和75%. *GS14272*与*Grifola frondosa* (OBZ69189.1)和*Trametes pubescens* (OJT10931.1)的 α -muurolene酶的同源性分别为71%和72%. *GS11330*和*GS14272*二者之间的同源性为42%. 运用DNAMAN8.0软件将*GS11330*和*GS14272*的氨基酸序列与NCBI中同源性较高的5条氨基酸序列进行多序列比对(图1), 发现*GS11330*和*GS14272*都含有倍半萜合酶家族独具的保守序列DXXX(D/E)^[7,19]. *GS11330*的氨基酸序列还有一个保守的结构域NDXXSXXKE与细菌的倍半萜合酶保守结

构域(N/D)DXX(S/T)XX(K/R)(D/E)一致^[20]. 将*GS11330*和*GS14272*的氨基酸序列与GenBank上下载的其他担子菌亚门真菌倍半萜合酶的氨基酸进行系统进化分析, 利用MEGA5.0软件中的NJ法构建系统进化树, 发现*GS11330*和*GS14272*分别与*Dichomitus squalens*的不同倍半萜合酶聚为一支, 相较于其他担子菌亚门真菌, 二者的同源性较高. 其中萜类合酶*GS14272*与伞菌目白环蘑 α -muurolene合成酶有较高的同源性(图2).

2.3 紫芝倍半萜合酶*GS11330*和*GS14272*基因的外源表达

采用载体pET28a构建原核表达载体, 分别将*GS11330*和*GS14272*的重组质粒和pET28a的空载体质粒(对照组)转化至BL(DE3)表达感受态细胞. 加入IPTG 18℃诱导表达20 h, 进行细胞破碎, 分别取全菌液和上清液进行SDS-PAGE分析, 结果显示*GS11330*和*GS14272*分别在29.0和44.3 kD之间出现了特异性的蛋白条带(图3), 条带大小与理论预测值(在线软件ExPASy ProtParam tool预测分别为36和41 kD)接近, 且上清液中同一位置出现了大小一致的条带, 表明重组的紫芝倍半萜合酶*GS11330*和*GS14272*以可溶的形式在大肠杆菌中异源表达.

2.4 紫芝倍半萜合酶*GS11330*和*GS14272*基因的功能验证

采用终浓度0.5 mmol/L的IPTG对紫芝倍半萜合酶*GS11330*和*GS14272*的重组菌进行诱导表达, 18℃下培养20 h, 采用顶空固相微萃取-气相色谱质谱法测定样品中的倍半萜. 为保证样品中的倍半萜能够挥发, 本实验将样品至于50℃水域中保温10 min, 然后按照1.4中的条件进行对样品进行处理和分析, 所获得的样品质谱总离子流图见图4. pET28a空载体的对照组未出现峰, 从*GS11330*的重组菌液中分离到5个丰度比较高的峰, 经气相-质谱鉴定, 其分子量均为204, 与已发表的文献比对, 只有一个峰(图4A中标记的峰)的保留时间和质谱图与已发表的化合物一致^[7], 初步确定倍半萜合酶*GS11330*催化生成了 α -Cuprenene. 从*GS14272*的重组菌液中分离到4个丰度比较高的峰, 经气相-质谱鉴定, 前3个峰的分子量均为204, 与已发表的文献比对, 也只有一个峰(图4C中标记的峰)的保留时间和质谱图与已发表的化合物 α -Muurolene一致(主要的碎

GS11330-R1_ (Ganoderma sinense_)	MLSTLPPASGVHPLITTTKETEDPLSEVKVLSFLDRSNYKSPQSCDLELRKKITEELSTWPSDINETAISKIDG	80
GS14272-R1_ (Ganoderma sinense_)	MAIAASKPKPTPDHFVLPDLVSHCNFLAYHFGDDIAAESVWRLDEGCPELSPRGKALYGL	63
XP_007361578.1_ (Dichomitus squalens_)	MPVFVPKTPDPDHFILPDLVSHCNFLAYHFGDDTVAAESVWRLDEGCPELSPKRAKALYGL	63
OBZ69189.1_ (Grifola frondosa)	MSIATS.....TSSPDQFILGLIGHCHFFLAYHFGDDTIVRSSACWLDHGCPELTPKKRAALYGL	61
OJT10931.1_ (Trametes pubescens)	MLQASSSTPSQPTFELPDLVSHCTFPLTYHFGDDAFAAESIRWLDDEGCPELSPKARTALYGL	63
XP_008045349.1_ Trametes versicolor_	MLQASSSTRSQPTQFILPDLVSHCTFPLTYHFGDDAFAAESVWRLDEGCPELSPKARTALYGL	63
XP_007366315.1_ Dichomitus squalens_	MDG	3
DXXX(D/E)		
GS11330-R1_ (Ganoderma sinense_)	..CCVFVETAGHTTHEHRCFI AFYIAFCYI LDGLRDLDAIKLFTSRVLVKGETPPILRRLA.....EHLGC	148
GS14272-R1_ (Ganoderma sinense_)	QAGELTAYCYPCSTERLRVVSDFMNYLFHLDNISDGMKRGTEELADSVMNALWPPDRYMPPTACDGKEQPADEVSAAGL	143
XP_007361578.1_ (Dichomitus squalens_)	QAGELTAYCYPCSTERLRVVSDFMNYLFHLDNISDGMKRGTEELADSVMNALWPPDRYMPPTACDGKQPMEEVSAGKL	143
OBZ69189.1_ (Grifola frondosa)	KAGELSAICYPHCNDERLRVVSDFMNYLFHLDNISDGLMKGTEKLSDEVVNNAVWPPDRYMPPTCPDKVQPFEEVSAGKL	141
OJT10931.1_ (Trametes pubescens)	QAGELTAYCYPHCSAPRLRVVSDFMNYLFHLDNISDGMHSGTEALSDVMNNAWPPDRYVPTAR....QPAAEASAGAM	139
XP_008045349.1_ Trametes versicolor_	QAGELTAYCYPHCSAPRLRVVSDFMNYLFHLDNISDGMHSGTEALSDVMNNAWPPDRYVPTAR....QPAAEASAGTM	139
XP_007366315.1_ Dichomitus squalens_	..SCVYAEETTYGHTTHEHRYFIATYACINMYLDGLRDLDAVMRFTGRFARGEKPPRIQLRLA.....QLLGS	71
GS11330-R1_ (Ganoderma sinense_)	VYILWTFPGAIIAGTLDAITATYILFTTQEMVVKPSATRF....YYLRTAGLIPFAIHFIEMKDRATPESYLQI	223
GS14272-R1_ (Ganoderma sinense_)	ARDYWRCTROAKPGPGARFKENLELFEAVYQQARDRDKLIPDLDSYISVRRTDSCGKPVFDLIEYAMDIDLPEHVVR	223
XP_007361578.1_ (Dichomitus squalens_)	ARDYWRCTROAKPGPGARFKENLELFEAVHQQARDRDKLIPDLDSYISVRRTDSCGKPVFDLIEYAMDIDLPEHVVR	223
OBZ69189.1_ (Grifola frondosa)	ARDYWRCTROAKPGPGARFKENLELFEAVVQQARDREAGVLPDLESYIMRRTDSCGKPVFDLIEYAMGIDLPEFVVT	221
OJT10931.1_ (Trametes pubescens)	ARDYWRCTROAKPGPGARFKENLELFEAVHQQARDRDAVIPDLESYINVRRTDSCGKPMFDLIEYSMDIDLDFVVE	219
XP_008045349.1_ Trametes versicolor_	ARDYWRCTROAKPGPGARFKENLELFEAVHQQARDRDAVIPDLESYISVRRTDSCGKPVFDLIEYAMDIDLDFVVE	219
XP_007366315.1_ Dichomitus squalens_	ABILWTFPGAIIISGTLDAVTAMYIFFTKDMVVKPSATRF....YYLRTAGLIPFYIHFIEMKEWRATPESYLQV	146
(N/D)DXX(S/T)XX(K/R)(D/E)		
GS11330-R1_ (Ganoderma sinense_)	IFDMEHWTLCGNDILSFYK.....EELAGERNYVHLRASAEGSSAANVLRQLVEEVLESAAKIDAL	285
GS14272-R1_ (Ganoderma sinense_)	HEVIQALNCGANDLVTWSN....DIFSYNVEQARGDTHNMIVILMELRGFDLQTSVDFVGLCKQCTIDTFMENQCNVPSF	299
XP_007361578.1_ (Dichomitus squalens_)	HEVIQALNCGANDLVTVPHTIQDIFSYNVEQARGDTHNMIVILMELRGCDLQTAIDFVGLCKQCTIDTFMENQCNVPSF	303
OBZ69189.1_ (Grifola frondosa)	HEVIKALNCGANDLVTWSN....DIFSYNVEQARGDTHNMIVILMKYHGLGLQDAIDFVGLCKQCTIDTFMEHMRNVPSF	297
OJT10931.1_ (Trametes pubescens)	HEVIKALNCGANDLVTWSN....NMIAILMNLRLDLQSAVDVFGDLCKQCTIDTFMENQCNVPSF	279
XP_008045349.1_ Trametes versicolor_	HEVIKALNCGANDLVTWSN....DIFSYNVEQSGDTHNMIALMNLRLGLDLQSAVDVFGDLCKQCTIDTFMEHMRNVPSF	295
XP_007366315.1_ Dichomitus squalens_	IFDMEHWTLCGNDILSFYK.....EELAGETNNYVHLRASAERTSTEEVLRRLIVEEVLSARRMDAL	208
GS11330-R1_ (Ganoderma sinense_)	TSEDPELALWKR....YQCYLFEFSLEKARLRRLAELGYQA.....	322
GS14272-R1_ (Ganoderma sinense_)	GPRLDRLVLYVQGLQDWIGSLHWSFMTERFEGKSGAEVKKHRIVRLLPRRPKRIPVSA.....	359
XP_007361578.1_ (Dichomitus squalens_)	GPRLDRLVLYVQGLQDWIGSLHWSFMTERFEGKSGAAVKKHRIVRLLPRRPKRIPVSA.....	363
OBZ69189.1_ (Grifola frondosa)	GPQLDKDVLVYVQGLQDWIGSLHWSFMTERFEGKEAAEVKKHRIVRLLARRAGAPCQIDYSECKENKKGATKAFLEGAQ	377
OJT10931.1_ (Trametes pubescens)	GPQLDKDVLVYVQGLQDWIGSLHWSFMTERFEGDAGADVKKHRIVRLLPRRPDRDRTQVHIQRFRALA.....	346
XP_008045349.1_ Trametes versicolor_	GPQLDKDVLVYVQGLQDWIGSLHWSFMTERFEGDAGADVKKHRIVRLLPRRPDRDRTQVHAQVQVPEVAAAPSRDVPAP	375
XP_007366315.1_ Dichomitus squalens_	TYEDSKLTLPLRT....YMQCYLFEFSLEKARLRRLAELGYQP.....	245
GS11330-R1_ (Ganoderma sinense_)		322
GS14272-R1_ (Ganoderma sinense_)		359
XP_007361578.1_ (Dichomitus squalens_)		363
OBZ69189.1_ (Grifola frondosa)	KGSVAQ.....	383
OJT10931.1_ (Trametes pubescens)		346
XP_008045349.1_ Trametes versicolor_	PRKKAQKTFAFHSIFTYIPILAFMFLGVPSLLHVFSTRYAGIFT	419
XP_007366315.1_ Dichomitus squalens_		245

图1 紫芝倍半萜合酶与其他担子菌倍半萜合酶的多重序列比对(网络版彩图)

片离子峰为204, 161, 105)^[21], 初步判断GS14272可能催化FPP环化成了 α -Muuroleone.

3 讨论

随着越来越多有价值的倍半萜化合物如抗疟疾的青蒿素、显著抗癌活性的土荆芥内酯等^[22,23]先后被发现, 倍半萜的生物合成途径的研究日渐深入. 倍半萜合酶在倍半萜的生物合成过程中起着至关重要的作用, 有实验证明, 通过过量表达倍半萜合酶基因可以提高倍半萜化合物含量^[13,16]. 因此充分了解倍半萜合酶的基因信息、蛋白结构和环化机制等有助于对倍半萜合酶的进一步开发.

担子菌常含有丰富的结构独特的倍半萜类化合物. 而灵芝是担子菌中最具药用价值的一种, 也是目前

最有可能成为药用模式真菌的物种之一. 其作为模式生物研究工作的推进必然推动包括次生代谢产物多样性形成机制等多方面研究工作的深入. 对骨架合成酶多样性的进一步研究可能揭示出灵芝挥发性成分多样性的原因^[17]. 紫芝基因组测序的完成改变了传统先分离鉴定化合物, 然后从总蛋白中分离纯化负责该化合物合成的酶, 再得到完整的基因和蛋白序列的模式^[4], 利用基因挖掘先从基因组中筛选可能的倍半萜合酶, 再通过实验确定其底物和产物, 这种思路已经在许多植物或真菌中得到验证, 如丹参、*Pycnoporus coccineus*等^[8,24]. 本研究利用基因挖掘从紫芝(*G. sinense*)基因组序列中筛选出编码倍半萜合酶的基因, 并克隆到2个倍半萜合酶基因的全长, 成功转入大肠杆菌中进行异源表达, 为揭示倍半萜合成的分子机制奠定基础.

图 2 GS11330和GS14272与其他担子菌来源的系统进化关系分析

图 3 重组GS11330和GS14272的SDS-PAGE分析(网络版彩图)

M: marker; 1: pET28a对照组的全菌液; 2: pET28a对照组的上清液; 3: 重组GS14272的全菌液; 4: IP重组GS14272的上清液; 5: 重组GS11330的全菌液; 6: 重组GS11330的上清液

研究表明,紫芝的倍半萜合酶在氨基酸序列上有一个倍半萜合酶典型的富含天冬氨酸的DXXX(D/E)保守结构域^[19],而GL11330还含有一个细菌倍半萜合酶的保守结构域(N/D)DXX(S/T)XX(K/R)(D/E)^[20]. DXXX(D/E)保守区域与催化所需要的二价镁离子结合负责脱去底物末端的焦磷酸基团,是严格保守的,定位在活性位点的入口处,是催化丙烯基底物反应的活性位点,催化聚异戊烯基链的延长,而DXXXD和DXXXE对产物的链长有一定影响^[25].保守结构域是判断一个蛋白是否属于倍半萜合酶的基本依据,其基序的突变会导致酶的催化活性降低或者产生异常的产物^[16].同源性分析表明,本文中的两个倍半萜合酶在保守区域以外的氨基酸序列同源性并不高,这可能是倍半萜化合物多样性的原因之一。

研究发现,紫芝倍半萜化合物常存在于挥发油中,且含量较低,常规的分离方法比较麻烦^[12],本文采用快

图4 重组GS11330和GS14272酶催化产物的GC-MS结果(网络版彩图)

A: GS11330催化产物的总离子流图; B: 化合物1的质谱图; C: GS14272催化产物的总离子流图; D: 化合物2的质谱图

速、简便的固相微萃取-气相-质谱联用的方法富集倍半萜化合物, 使用峰面积归一化法对匹配度大于80%的可检索组分进行统计分析。结果发现, 本文中的两个倍半萜合酶的产物均非一种。这些化合物除主产物外可能还有未被完全催化的中间产物或是合成机制与

主产物不同的其他化合物, 为通过基因工程手段发现和改造新化合物提供了理论依据。本研究结果将为灵芝萜类合酶之间的共性和特征性差异研究提供依据, 并为进一步研究灵芝次生代谢产物的多样性形成机制提供参考。

参考文献

- 1 Guan Z, Xue D, Abdallah I I, et al. Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for terpenoid production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99: 9395–9406
- 2 Sharma E, Anand G, Kapoor R. Terpenoids in plant and arbuscular mycorrhiza-reinforced defence against herbivorous insects. *Ann Bot*, 2017,

119: 791

- 3 Ajikumar P K, Tyo K, Carlsen S, et al. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Mol Pharm*, 2008, 5: 167–190
- 4 Cane D E, Sohng J K, Lamberson C R, et al. Pentalenene synthase. Purification, molecular cloning, sequencing, and high-level expression in *Escherichia coli* of a terpenoid cyclase from streptomyces UC5319. *Biochemistry*, 1994, 33: 5846–5857
- 5 Gust B, Challis G L, Fowler K, et al. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1541–1546
- 6 Wawrzyn G T, Quin M B, Choudhary S, et al. Draft genome of *Omphalotus olearius* provides a predictive framework for sesquiterpenoid natural product biosynthesis in basidiomycota. *Chem Biol*, 2012, 19: 772–783
- 7 Agger S, Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C. Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Mol Microbiol*, 2009, 72: 1181–1195
- 8 Chen S, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nat Commun*, 2012, 3: 177–180
- 9 Zhu Y, Xu J, Sun C, et al. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*. *Sci Rep*, 2015, 5: 11087
- 10 Sanodiya B, Thakur G, Baghel R, et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10: 717–742
- 11 Shiao M S, Lee K R, Lin L J, et al. Natural products and biological activities of the Chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Cheminform*, 2015, 25: 168–172
- 12 Binh P T, Descoutures D, Dang N H, et al. A new cytotoxic gymnomitrane sesquiterpene from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies. *Nat Prod Commun*, 2015, 10: 1911–1912
- 13 Nagegowda D A. Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS Lett*, 2010, 584: 2965–2973
- 14 Facchini P J, Chappell J. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 11088–11092
- 15 Sallaud C, Rontein D, Onillon S, et al. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z,Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *solanum habrochaites*. *Plant Cell*, 2009, 21: 301–317
- 16 Degenhardt J, Köllner T G, Gershenzon J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 2009, 70: 1621–1637
- 17 孙超, 胡鸢雷, 徐江, 等. 灵芝: 一种研究天然药物合成的模式真菌. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43: 447–456
- 18 Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596–1599
- 19 原晓龙, 赵能, 陈剑, 等. 牛樟萜烯合成酶基因的克隆与鉴定. *西北植物学报*, 2016, 36: 2398–2404
- 20 薛娇, 赵明侠, 李微, 等. 细菌中倍半萜生物合成的研究进展. *微生物学通报*, 2016, 43: 1800–1813
- 21 Lopez-Gallego F, Agger S A, Abate-Pella D, et al. Sesquiterpene synthases Cop4 and Cop6 from *Coprinus cinereus*: catalytic promiscuity and cyclization of farnesyl pyrophosphate geometric isomers. *Chem Eur J Chem Biol*, 2010, 11: 1093–1106
- 22 Farhi M, Kozin M, Duchin S, et al. Metabolic engineering of plants for artemisinin synthesis. *Biotech Genet Eng Rev*, 2013, 29: 135–148
- 23 Dilshad E, Cusido R M, Palazon J, et al. Enhanced artemisinin yield by expression of rol genes in *Artemisia annua*. *Malar J*, 2015, 14: 424
- 24 Ma Y, Yuan L, Wu B, et al. Genome-wide identification and characterization of novel genes involved in terpenoid biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza*. *J Exp Bot*, 2012, 63: 2809–2823
- 25 Tarshis L C, Proteau P J, Kellogg B A, et al. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 15018–15023

Cloning and characterization of sesquiterpene synthase genes from the *Ganoderma sinense* genome

WANG LiZhi¹, WANG HaiYing¹, PU XiangDong², SUN SiJie¹, WEI JianHe² & SUN Chao²

¹ School of Traditional Chinese Pharmacy, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

² Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

The Chinese medicine “Lingzhi”, one of the well-studied medicinal fungi, is an ideal medicinal model fungus for studying the biosynthesis of secondary metabolites. In this study, two candidate genes encoding sesquiterpene synthases were obtained from *Ganoderma sinense* genome database. The full-length cDNAs of these two genes were amplified from the total RNA of *Ganoderma sinense* by reverse transcription-PCR (RT-PCR). Then the sesquiterpene synthase genes were cloned into pET28a vector and transferred into *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21(DE3). SDS-PAGE analysis showed that these recombinant sesquiterpene synthases were successfully expressed in soluble form in *E. coli* BL21(DE3). The results of solid-phase micro-extraction and GC-MS(SPME-GC-MS) revealed that recombinant sesquiterpene synthases yielded sesquiterpene compounds. This paper will establish a foundation for future studies on the relationship between the structure and function of fungal sesquiterpene synthases and the molecular mechanisms underlying the diversity of their products.

***Ganoderma sinense*, sesquiterpene synthases, characterization**

doi: [10.1360/N052017-00190](https://doi.org/10.1360/N052017-00190)