

茯苓鲨烯环氧酶基因克隆与表达分析

刘晓柳^{1,2}, 谢珍妮², 钟灿², 谢景², 张水寒^{1,2}, 金剑^{1,2*}

(1. 湖南中医药大学 研究生院, 长沙 410208;

2. 湖南省中医药研究院 中药资源研究所, 长沙 410013)

[摘要] 目的:从茯苓中克隆参与茯苓三萜合成路径中的潜在关键限速酶鲨烯环氧酶(SE),并对其进行生物信息学及表达分析。方法:采用试剂盒提取总RNA,反转录为cDNA,设计特异性引物,以cDNA为模板,进行SE基因的克隆,对该基因进行生物信息学分析。通过实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检查茯苓鲨烯环氧酶基因(*PcSE*)在茯苓神舟10号、湘靖28、5.78菌株中的表达。结果:*PcSE*的基因全长为1 571 bp,包含4个外显子,3个内含子。获得编码区域(CDS)序列长为1 413 bp,编码470个氨基酸。该蛋白为疏水性蛋白,无信号肽,有2个跨膜结构域,具有FAD/NAD(P)结合域和鲨烯环氧酶结构域,定位于线粒体或质膜上。与多孔菌科真菌的同源序列比对一致性为80.92%;系统进化树显示PcSE蛋白与美国茯苓的亲缘关系最近。Real-time PCR结果显示,*PcSE*基因在3个菌株中均有表达,在5.78菌株中的表达量最高,3个菌株的*PcSE*表达差异不存在统计学意义。结论:首次从茯苓中克隆并分析茯苓*PcSE*基因,为进一步研究茯苓*PcSE*的功能及解析茯苓三萜生物合成途径提供了基础。

[关键词] 茯苓; 鲨烯环氧酶(SE)基因; 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0144-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230111

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221128.1823.005.html>

[网络出版日期] 2022-11-29 09:36:54

Cloning and Expression Analysis of Squalene Epoxidase Gene in *Poria cocos*

LIU Xiaoliu^{1,2}, XIE Zhenni², ZHONG Can², XIE Jing², ZHANG Shuihan^{1,2}, JIN Jian^{1,2*}

(1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Institute of Chinese Medicine Resources, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective:** To clone squalene epoxidase (SE), a potential key rate-limiting enzyme involved in the synthesis pathway of *Poria cocos* triterpenes, from *P. cocos* and analyze for bioinformatics and expression. **Method:** The total RNA was extracted by the kit and reverse-transcribed to cDNA. Specific primers were designed, and the cDNA was used as a template for cloning the SE gene, which was analyzed for bioinformatics. The expression of *P. cocos* squalene epoxidase (*PcSE*) was examined by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) in *P. coco* Shenzhou No. 10, Xiangjing 28, and 5.78 strains. **Result:** The full length of *PcSE* is 1 571 bp, containing four exons and three introns. The obtained CDS sequence is 1 413 bp, encoding 470 amino acids. This protein is a hydrophobic protein with no signal peptide structure and has two transmembrane structural domains with a FAD/NAD (P) binding domain and SE structural domain localized to the mitochondrial membrane and the plasma membrane. The homologous sequence alignment with fungi of the

[收稿日期] 2022-08-15

[基金项目] 湖南创新型省份建设专项(2020SK2029, 2022NK2005, 2021JJ30420);长沙市杰出创新青年培养计划(kq2106084);湖南省药学一流学科

[第一作者] 刘晓柳,在读硕士,从事中药活性成分调控与分子生药学研究,E-mail:liu992482176@163.com

[通信作者] *金剑,博士,副研究员,从事中药生物技术与中药资源综合利用开发研究,E-mail:jinjian2016@163.com

Poriferae family is 80.92%, and the phylogenetic tree shows that *PcSE* protein is most closely related to *P. cocos* from the US. The results of Real-time PCR showed that the *PcSE* was expressed in all three strains, with the highest expression in 5.78 strain, and there was no significant difference in *PcSE* expression among the three strains. **Conclusion:** For the first time, the *PcSE* gene was cloned and analyzed from *P. cocos*, providing a basis for further research on the function of *PcSE* and the analysis of *P. cocos* triterpene biosynthesis pathway.

[Keywords] *Poria cocos*; squalene epoxidase (SE) gene; gene cloning; bioinformatics analysis; gene expression

茯苓为多孔菌科卧孔属腐生真菌,最早出自于《神农本草经》,已有两千余年历史,菌核供药用,通常寄生于马尾松或赤松根部,是我国大宗中药材^[1]。在我国湖南、湖北、河南、河北、安徽、浙江、云南、四川、福建、广东、广西、贵州等地均有生产,是我国传统药食两用中药材之一^[2]。具有渗湿利水,健脾益胃,宁心安神等功效,具有不可取代的医药价值,在常见中药组方中的配伍率高达70%以上,因此有“十方九苓”之称^[3]。三萜类化合物是茯苓菌核的主要药用活性成分之一,该成分复杂,种类多,目前在茯苓中已检测到121个羊毛甾烷型三萜类化合物^[4],这些化合物从化学结构上主要分为4类,羊毛甾-8-烯型三萜酸、羊毛甾烷-7,9(11)-二烯型三萜酸、3,4-开环-羊毛甾-7,9(11)-二烯型三萜酸、3,4-开环-羊毛甾-8-烯型三萜酸^[5-6]。SHU等^[7]基于转录组测序,对茯苓三萜合成关键酶基因进行了分析,预测茯苓三萜类合成途径与细菌、藻类和植物的磷酸甲基赤藓醇途径(MEP)不同^[8],茯苓三萜类合成途径为甲羟戊酸途径(MVA),该途径中的关键基因的表达能影响茯苓三萜的含量,利用分子生物学技术对茯苓三萜类化合物的生物合成途径中关键基因进行克隆和分析,是目前获得结构复杂的活性次生代谢产物的可行办法。

鲨烯环氧酶(SE),又称角鲨烯单加氧酶,是一种胆固醇合成的调控酶,位于3-羟基-3-甲基戊二酸辅酶 α 还原酶(HMGCR)的下游,催化鲨烯氧化生成2,3-环氧鲨烯,是三萜类化合物的共同前体,被认为是三萜类化合物合成中一个公认的关键限速酶^[9]。麦角甾醇是真菌细胞重要的膜成分,对确保细胞膜的完整性、细胞活力及细胞物质运输等起着重要作用^[10]。SE也是细胞膜组成物质麦角甾醇合成的关键酶,SE的沉默或缺失,将影响茯苓的生存,同时对茯苓三萜的合成起着举足轻重的作用^[11]。研究表明,SE基因已在大量植物、真菌中得到分离和克隆,如野三七^[12]、罗汉果^[13]、滇重楼^[14]、金龙胆草^[15]等。少数植物中还含有几种不同的SE,如人参

中至少含有2种^[16],雷公藤含有4种^[17]。茯苓独特的药用价值使其在临床用药得到广泛应用,通过现代科研技术研究茯苓三萜生物合成途径中的关键基因,使其资源得到最大化利用成为茯苓主要成分的研究热点。在茯苓中法尼基二磷酸合成酶^[18]、角鲨烯合酶^[19]、磷酸甲羟戊酸激酶^[20]、细胞色素P450还原酶^[21]、甾醇C-24甲基转移酶^[22]、羊毛甾醇合酶^[23]等基因均已成功获得克隆和分离,而目前茯苓鲨烯环氧酶(*PcSE*)基因的研究一直未有相关报道。因此,本研究从茯苓中克隆*PcSE*基因,对其进行序列生物信息学及表达分析。为全面实现科研工作者从分子水平上利用基因工程手段实现茯苓三萜类化合物生物合成的调控奠定基础。

1 材料

茯苓神舟10号、湘靖28、5.78菌株采自湖南怀化靖州补天药业太阳坪种植基地,经湖南中医药大学中药研究院刘浩副研究员鉴定为多孔菌科真菌茯苓*Poria cocos*的菌核。先用软毛刷去除菌核表面残留泥土,在实验室进行分离纯化于固体真菌培养基上,置于28℃下人工气候培养箱中培养。7d后用打孔器定量直径9.0mm菌块于ZJ液体培养基中培养7d,收集茯苓菌球,立即用液氮速冻置于-80℃保存备用。

ScanDrop 100型超微量紫外-可见分光光度计(德国Analytikjena公司);AG 22331 Hamburg型聚合酶链式反应(PCR)仪(德国Eppendorf公司);型号实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);Multifuge X1R型冷冻高速离心机(美国Thermo Fisher Scientific公司);ChemiDoc XRS⁺ Image LabTM型高灵敏度化学发光凝胶成像系统(武汉佰蕾真生物科技有限公司);RXZ-380型智能人工气候箱(宁波江南仪器厂)。2×T5 Super PCR Mix (Colony)、DL2 000 DNA Marker、GoldenstarTM II RT6 cDNA Synthesis Kit、RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒、2×T5 Fast qPCR Mix(SYBR Green I)[北京擎科生物科技(长

沙)有限公司,批号分别为1BI21B01、0GD21301、0EA21B01、1AK21A01、1FB21C02];引物合成及测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

2 方法

2.1 茯苓总RNA提取及cDNA合成 取茯苓菌球在液氮中研磨成细粉,依据RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒说明书提取茯苓总RNA。用ScanDrop 100型超微量紫外-可见分光光度计检测RNA浓度和纯度,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA条带完整性,置于-80℃备用。按照Goldenstar™ II RT6 cDNA Synthesis Kit反转录试剂盒说明,以总RNA 1 μL为模板反转录合成第一链cDNA,-20℃保存备用。

2.2 PcSE基因的全长克隆及测序 根据茯苓的全

基因组测序数据,对茯苓的基因组数据库进行分析,获得茯苓PcSE基因的完整开放阅读框(ORF),利用NCBI软件在线设计PcSE的全长引物,利用PrimerPremier 5.0设计特异性cDNA反转录上下游引物,见表1。以茯苓cDNA为模板进行PCR扩增,PCR体系为98℃预变性2 min;98℃变性10 s,60℃退火15 s,72℃延伸15 s,30个循环;72℃最后延伸5 min,4℃保存。将所得PCR的目的基因经1%的琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收扩增目的片段并利用凝胶回收试剂盒纯化,在25℃与T载体连接5 min,将连接产物转化至大肠埃希菌Trans1-T1感受态细胞中,涂布于含氨苄青霉素(100 mg·L⁻¹)的LB平板上37℃培养12~16 h。通过菌落PCR检测选取阳性克隆送擎科生物科技有限公司测序。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

类型	名称	引物序列(5'-3')
全长克隆	SE	上游 CTCTCTCCCGCATTCAAAA
		下游 GTGCAAGGTATCCACATCCA
cDNA 逆转录	PcSE	上游 ATGTCGCCCTACGACGTGCTCAT
		下游 TCACCACCATCGGATCTCCGTCC
TA 克隆	M13F(-47)	上游 CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
	M13R(-48)	下游 AGCGGATAACAATTTACACAGGA
Real-time PCR	SE-F1	上游 CCGAGATTGTCCACAACCTTCC
	SE-R1	下游 ACGAGTCGCCAGCAGGAAG
内参基因	细胞色素酶(CYP)	上游 CATGGCTTCGGCTACAAGG
		下游 TTGGTGT GCTTGAGCTTGAA

2.3 茯苓PcSE基因的生物信息学分析 将茯苓PcSE基因完整开放阅读框用DNAMAN软件翻译成蛋白序列,在线blast其全长序列,搜索PcSE的同源序列。使用在线软件Protpara(<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)分析PcSE理化参数;TMHMM Server v.2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析跨膜区;SOPMA(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)在线预测蛋白质的二级结构,利用SWISS-MOEL(<https://www.Swissmodel.expasy.org/>)在线软件预测获得PcSE蛋白三级结构。利用SignalP 4.1 Server(<http://www.Cbs.Dtu.dk/services/SignalP/>)进行信号肽分析;进入NCBI网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)使用其CDD工具进行单条蛋白结构域预测;使用ProtCompv. 9.0(<http://linux1.softberry.com/berry>

[phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc](http://linux1.softberry.com/berry/phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc))工具进行亚细胞定位预测;使用DNAMAN软件进行氨基酸序列多重序列比对;使用MEGA6.0软件构建系统进化树,bootstrap为500。

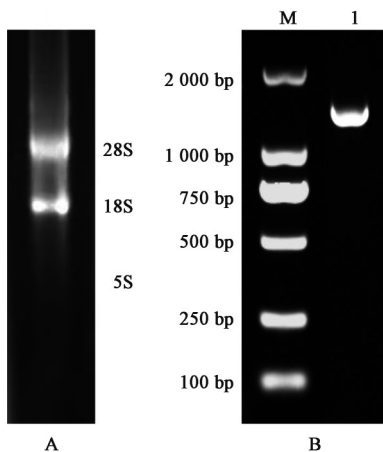
2.4 茯苓PcSE基因的表达分析 采用试剂盒提取法提取茯苓神舟10号、湘靖28、5.78菌株的菌核RNA。以湘靖28菌株为对照,CYP作为内参基因^[24],茯苓各菌株的cDNA稀释2倍作为Real-time PCR反应模板,引物序列见表1。利用Real-time PCR检测在3个不同菌株中的相对表达量,反应体系为20 μL,2×T5 Fast qPCR Mix(SYBR Green I) 10 μL,引物各0.8 μL,cDNA模板2 μL,ddH₂O 8.4 μL,3步法Real-time PCR反应条件为95℃反应1 min;40个循环95℃变性10 s,57℃退火5 s,72℃延伸15 s。以ddH₂O代替cDNA为模板作阴性对照,采用相对定量2^{-ΔΔC_t}进行计算^[25],即实验组目的

基因的表达式相对对照组的变化倍数。每个反应3个重复。所得实验数据用统计分析软件SPSS 26.0进行单因素方差分析,以湘靖28菌株的 C_i 值的平均数设为1,进行PcSE基因的菌株特异性分析。

3 结果与分析

3.1 茯苓总RNA的提取和PcSE基因全长cDNA结果 茯苓总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳后在28S、18S和5S RNA各一条条带,5S条带稍不清晰。经检测,总RNA的吸光度 A_{260}/A_{280} 为2.16,介于2.0~2.4,表明样品纯净,无蛋白质或者DNA污染,可见RNA未发生降解,总RNA基本完整,可用于反转录和PCR全长扩增。以逆转录获得的茯苓PcSE的cDNA为模板进行PCR扩增,克隆获得的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,在1 000~2 000 bp有单一且明亮的条带,条带大小符合预期,对PCR产物进行测序,扩增得到的目的基因序列长度为1 413 bp,编码470个氨基酸,即为PcSE。见图1。

3.2 PcSE蛋白理化性质分析 利用在线软件Wrotparam分析PcSE编码蛋白的理化性质,结果显示该蛋白的分子式为 $C_{2342}H_{3709}N_{641}O_{651}S_{17}$,相对分子质量为51 807.14 Da,理论等电点(PI)为6.95,带负电荷的残基总数(Asp+Glu)为48,带正电荷的残基总数(Arg+Lys)为47,计算得出的不稳定性指数(II)为49.63,将蛋白质分类为不稳定蛋白。脂肪指数为103.43,亲水性的平均值(GRAVY)为0.120。通过在线工具ProtScale对PcSE蛋白的疏水性进行分析,结果显示,在7~15、421~423、456~467 aa有3个典型的疏水区域,故预测该蛋白为疏水性蛋白。见图2。



注:M,DL 2 000 Marker;I,PCR产物
图1 茯苓总RNA(A)及扩增产物(B)琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA (A) and PCR amplification products (B) *Poria cocos*

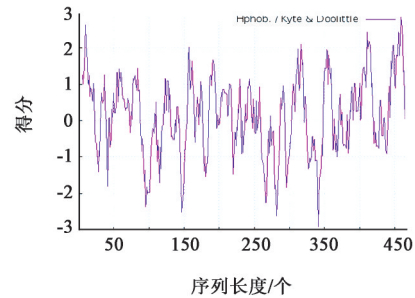


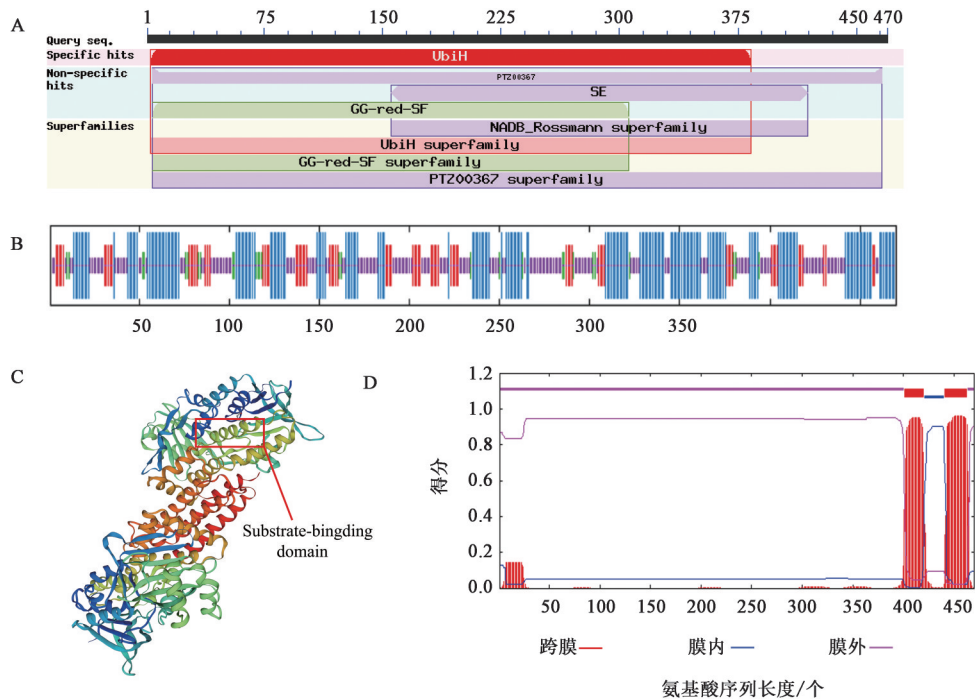
图2 PcSE蛋白的疏水性
Fig. 2 Hydrophobic of squalene epoxidase of *Poria cocos*

3.3 PcSE蛋白保守结构域预测 利用NCBI中的CDD数据库对PcSE的保守结构域预测,结果见图3A。如图所示,PcSE基因预测编码蛋白在4~466、155~419、3~383、4~306位氨基酸各有1个超家族;其中4~466位氨基酸的PTZOO367 superfamily和4~306位氨基酸的GG-red-FF superfamily位于非特异性结构域;蛋白N端3-380位氨基酸特定匹配在UbiH,属于UbiH还原酶超家族(UbiH superfamily),是黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)依赖性氧化还原酶,因此预测此区域含有1个与FAD结合的结构域;蛋白第155~419位有1个SE结构域,此区域属于NADB_Rossmann超家族,是含有氧化型辅酶I结合位点的特性域,显示出和其他SE蛋白所共有活性特异域,可能是SE和相关蛋白质发挥酶活性的必需序列。

3.4 PcSE蛋白二级和三级结构预测分析 利用SOPMA在线软件对PcSE蛋白的二级结构进行预测分析。结果显示该蛋白二级结构元件中 α -螺旋和无规卷曲所占的比例最高,分别为39.79%和38.09%,包含187和179个氨基酸;占总二级结构5.96%的 β -转角和占16.17%的延伸链,延伸链包含76个氨基酸,见图3B。然后利用SWISS-MODEL对PcSE蛋白进行同源建模,预测获得的PcSE蛋白三级结构,见图3C。

3.5 PcSE蛋白跨膜区域、信号肽预测 利用在线工具TMHMM Server v. 2.0预测SE蛋白的跨膜区域,结果显示为PcSE在403~419、445~467位氨基酸有两段跨膜结构,蛋白的N末端位于膜内,并预测152~173、346~363、401~422、445~467个氨基酸链是由内向外跨膜;73~93个氨基酸是由内外向内跨膜,见图3D。本研究采用SignalP4.0 Server预测分析PcSE蛋白的信号肽,使用默认参数,结果发现该蛋白不含信号肽,推测PcSE为非分泌蛋白。

3.6 PcSE蛋白亚细胞定位 ProtComp v.9.0是基



注:A.PcSE保守结构域;B.PcSE二级结构,蓝色代表 α -螺旋,红色代表延伸链,紫色代表无规则卷曲,绿色代表 β -转角;C.PcSE三级结构,红色方框为底物催化结构域;D.PcSE跨膜结构域

图3 PcSE的保守结构域、二级和三级结构、跨膜结构域预测

Fig. 3 Prediction of conserved domain, secondary and tertiary structure, transmembrane domains of squalene epoxidase of *Poria cocos*

于神经网络结合多种蛋白,与已知位置的亚细胞同源蛋白直接比较的预测软件。通过ProtComp v.9.0在线服务网站,进行PcSE序列预测,其结果显示亚细胞定位于质膜或线粒体。蛋白质亚细胞位置的整体预测结果显示,质膜得分4.98分,线粒体得分4.83分;基于查询蛋白与已知定位蛋白质同源性进行评分得到LocDB分值;基于与蛋白质的同源性进行评分得到PotLocDB总分值5分;基于神经网络进行评分得到Neural Nets总分值2.99分;基于对数据

库序列计算的无聚体分布比较得到Pentamers总分值5.31分;最后将分数重新归一化,得到Integral总分值10分。根据结果表明,PcSE蛋白预测位于质膜或线粒体。见表2。

3.7 PcSE蛋白序列比对及进化分析 在线软件blast比对结果显示,PcSE蛋白与美国茯苓MD-104 SS10 SE(PCH34782.1)同源性最高,为99.57%,与台湾牛樟芝的同源性为76.05%,与灵芝SE的同源性为75.37%与虎皮香菇SE同源性为68.99%,与冬生

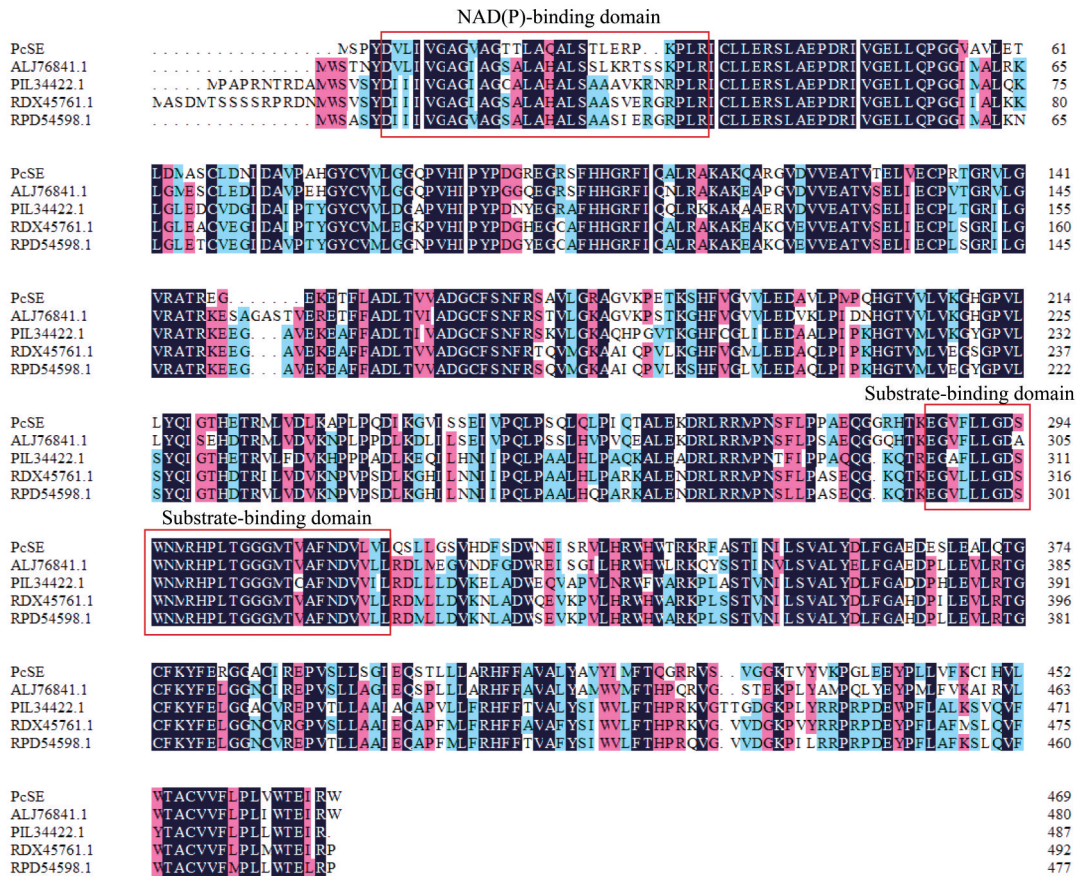
表2 PcSE的亚细胞定位预测

Table 2 Sub-cellular location prediction squalene epoxidase of *Poria cocos*

亚细胞	分值/分				
	LocDB	PotLocDB	Neural Nets	Pentamers	Integral
细胞核	0.0	0.0	0.00	0.00	0.00
质膜	0.0	2.5	0.92	0.21	4.98
胞外	0.0	0.0	0.92	0.63	0.00
细胞质	0.0	0.0	0.00	1.28	0.00
线粒体	0.0	2.5	0.00	2.17	4.83
内质网	0.0	0.0	0.00	0.88	0.00
过氧化物酶体	0.0	0.0	0.92	0.00	0.00
高尔基体	0.0	0.0	0.23	0.13	0.00
叶绿体	0.0	0.0	0.00	0.20	0.00
液泡	0.0	0.0	0.00	0.01	0.19

多孔菌SE同源率为67.37%;利用DNAMAN软件将PcSE蛋白序列与多孔菌科真菌的台湾牛樟芝(ALJ76841.1)、冬生多孔菌(RDX45761.1)、虎皮香菇(RPD54598.1)、灵芝(PIL34422.1)的SE蛋白序列进行比对,见图4。结果显示,整体系列比对一致性为80.92%。选取其他物种中SE功能蛋白序列及茯苓中的SE蛋白序列,利用MEGA6.0软件构建系统

发育树,见图5。结果显示,PcSE蛋白与美国茯苓中该蛋白亲缘关系最近,同时与大型真菌聚为一大支;在大型真菌中,灵芝中SE已经鉴定出具有与拟南芥SQL1相似的功能,即拟南芥SQL1突变会影响还原型辅酶II(NADPH)分布及活性^[26]。初步预测茯苓中的PcSE蛋白具有SE的功能催化角鲨烯生成2,3-环氧角鲨烯,进而参与茯苓三萜的合成。



注:NAD(P)-binding domain,结合结构域;Substrate-binding domain,底物结合结构域

图4 不同真菌SE氨基酸序列比对

Fig. 4 Results of multiple amino acid sequences alignment of squalene epoxidase in different fungus species

3.8 PcSE基因的表达分析 采用Realt-ime PCR检测3个菌株中PcSE表达差异,以CYP作为内参基因。结果表明,PcSE在3个菌株中均有表达,在5.78菌株中的表达量最高,以湘靖28菌株为对照组,5.78菌株的表达量约是湘靖28的3倍。对3个菌株的PcSE的表达进行相关性分析,结果表明3个菌株中的PcSE表达不存在显著差异,见图6。

4 讨论

三萜类化合物结构复杂、种类繁多,大部分由30个碳原子或27个碳原子组成的萜类物质,目前已在200余种物种中发现含有三萜类化合物^[27]。茯苓三萜是茯苓的主要活性成分,具有防止肾小管纤维

化、抑制酪氨酸酶、抗炎、抗肿瘤、老年痴呆、免疫调节等多种药理作用^[28-32]。SE作为茯苓三萜合成途径中的关键酶对三萜类化合物的合成起着重要的作用,而SE基因的表达量可能直接关联三萜化合物生成量^[33]。目前,通过生物工程调控次生代谢产物生物合成成为重要资源深度开发发展的新方向,从分子水平研究生物合成的关键基因,并对其进行调控,从而提高次生代谢产物生成量,已成为解决次生代谢产物生成含量低的有效方法。近些年,SE基因在拟南芥^[34]、柴胡^[35]、芒柄花^[36]、蒺藜苜蓿^[37]等药用植物中已有验证,证明SE具有催化角鲨烯生成2,3-环氧角鲨烯的功能。因此在茯苓中开展该基因

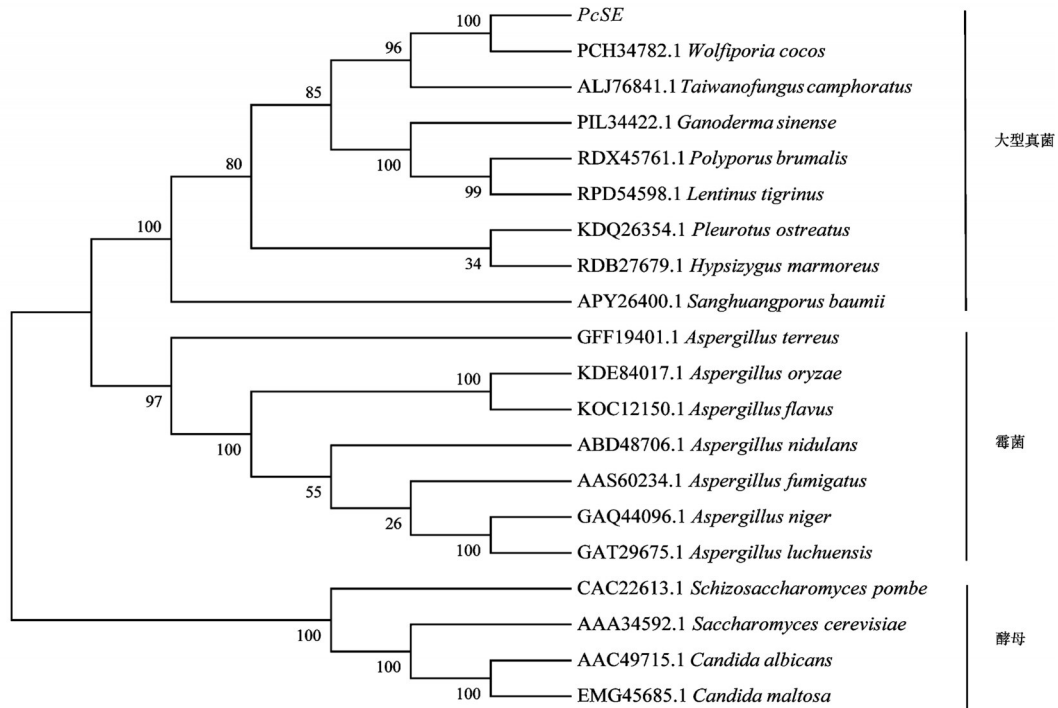


图5 PcSE蛋白与其他真菌SE蛋白序列系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree of squalene epoxidase protein sequences of *Poria cocos* and some other fungus

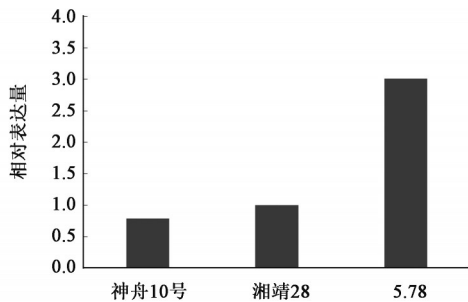


图6 PcSE基因在不同菌株中的相对表达分析

Fig. 6 Relative expression analysis of squalene epoxidase in different *Poria cocos* strains

的研究,对最大化开发利用茯苓三萜的药用价值及保护茯苓资源具有重要意义。

PcSE作为茯苓三萜合成的关键酶,研究其表达对茯苓三萜合成的影响,进而通过基因工程技术进行分子育种,培育出高含量茯苓三萜的优质茯苓菌株,可作为茯苓遗传育种研究的出发点。近年,许多药用植物中早已开展SE基因的研究^[38],而药用真菌相对于较少。从以往的研究来看,不同的物种中,克隆得到的SE基因个数不一,如已在野三七^[12]、金龙胆草^[15]、蓝莓^[39]、牛樟芝^[40]、中各克隆到1个SE基因,已在罗汉果^[13]、滇重楼^[14]、人参^[16]各克隆到2个SE基因,已在雷公藤^[17]中已克隆到4个SE基因。本研究从茯苓中成功克隆得到1个PcSE基因,并利用生物信息学分析发现PcSE蛋白包含

NAD(P)结合结构域,底物结合结构域,与其他真菌SE具有较高的相似性^[26],可推测该蛋白具有鲨烯环氧化酶催化鲨烯生成2,3-环氧角鲨烯的功能。通过多序列比对发现与美国茯苓相似度高达99.57%,推测可能由共同的祖先进化而来。

有研究表明,角鲨烯环氧化酶基因的转录水平在不同组织中的表达可能与次生代谢产物的合成部位有关,如三七PnSE1和PnSE2在根、茎、叶、花中均虽表达模式不同,但均在花中表达量最高^[41];蓝莓VcSQE在叶、花、紫果、青果、芽、根中均有表达,但在叶中表达量最高^[39];牛樟芝在子实体和不同培养时间菌丝体中AcSE均有表达差异,但与AcSE在子实体中表达量对比,培养时间为7d的菌丝体中表达量最高^[40]。SE基因在三七、蓝莓、牛樟芝等物种中的不同表达,表明角鲨烯环氧化酶基因的表达不仅存在不同组织部位间差异性,同时也存在一定的个体差异性。综上所述,相关于SE基因的研究,大部分趋向于分析其不同组织部位的表达差异,而在同一物种不同菌株中的表达研究相对较少。本研究初步分析了茯苓PcSE的序列特征和在不同菌株中的表达,为茯苓三萜合成关键酶的进一步研究提供了基础。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 金剑,刘浩,钟灿,等. 茯苓的生物学认识与生产方式历史沿革[J]. 中国现代中药, 2020, 22(11): 1888-1895, 1932.
- [2] 陈卫东,彭慧,王妍妍,等. 茯苓药材的历史沿革与变迁[J]. 中草药, 2017, 48(23): 5032-5038.
- [3] 金剑,钟灿,谢景,等. 我国茯苓炮制加工和产品研发现状与展望[J]. 中国现代中药, 2020, 22(9): 1441-1446.
- [4] FENG G F, ZHENG Y, SUN Y, et al. A targeted strategy for analyzing untargeted mass spectral data to identify lanostane-type triterpene acids in *Poria cocos* by integrating a scientific information system and liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with ion mobility spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2018, 1033: 87-99.
- [5] ZHANG G, WANG H, XIE W, et al. Comparison of triterpene compounds of four botanical parts from *Poria cocos* (Schw.) wolf using simultaneous qualitative and quantitative method and metabolomics approach[J]. Food Res Int, 2019, 121: 666-677.
- [6] WANG W, DONG H, YAN R, et al. Comparative study of lanostane-type triterpene acids in different parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf by UHPLC-fourier transform MS and UHPLC-triple quadruple MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 102: 203-214.
- [7] SHU S, CHEN B, ZHOU M, et al. De novo sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporia cocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71350.
- [8] JIN J, DUPRE C, YONEDA K, et al. Characteristics of extracellular hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* for biofuels production: Recent advances and opportunities [J]. Process Biochem, 2015, 26(1): 1-9.
- [9] LIU Y, ZHOU J, HU T, et al. Identification and functional characterization of squalene epoxidases and oxidosqualene cyclases from *Tripterygium wilfordii* [J]. Plant Cell Rep, 2020, 39(3): 409-418.
- [10] 于忠洋,姜洋,翟明霞,等. 桑黄麦角甾醇生物合成关键酶PIERG24基因克隆与表达分析[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5825-5832.
- [11] POLLIER J, VANCAESTER E, KUZHIUMPARAMBIL U, et al. A widespread alternative squalene epoxidase participates in eukaryote steroid biosynthesis [J]. Nat Microbiol, 2019, 4(2): 226-233.
- [12] 王宝婕,朱灵英,周青青,等. 野三七鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(22): 147-153.
- [13] 赵欢,郭娟,唐其,等. 罗汉果角鲨烯环氧酶基因的克隆及表达分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3255-3262.
- [14] 许燕,赵爽,董栩,等. 滇重楼鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达研究[J]. 中草药, 2017, 48(9): 1839-1844.
- [15] 孙蓉,罗吉,刘姗,等. 金龙胆草鲨烯环氧酶基因的克隆及原核表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(11): 3141-3146.
- [16] 张艳敬,候志芳,梁韶,等. 人参属药用植物三萜皂苷合成途径关键酶的研究进展[J]. 特产研究, 2016, 38(2): 53-57, 70.
- [17] 祝传书,刘艳,蒲时,等. 雷公藤4个环氧角鲨烯环化酶基因克隆与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(2): 237-247.
- [18] WANG J, LI Y, LIU D. Cloning and characterization of farnesyl diphosphate synthase gene involved in triterpenoids biosynthesis from *Poria cocos* [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(12): 22188-22202.
- [19] WANG J R, LIN J F, GUO L Q, et al. Cloning and characterization of squalene synthase gene from *Poria cocos* and its up-regulation by methyl jasmonate [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(2): 613-620.
- [20] 何海. 茯苓磷酸甲羟戊酸激酶基因克隆及功能分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2016.
- [21] 何海,郭继云,舒少华,等. 茯苓细胞色素P450还原酶基因的克隆与生物信息学分析[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2909-2915.
- [22] 郭继云. 茯苓甾醇C-24甲基转移酶基因克隆与功能验证[D]. 武汉:华中农业大学, 2017.
- [23] 周振. 茯苓羊毛甾醇合酶基因PcLSS克隆及其功能验证[D]. 武汉:华中农业大学, 2017.
- [24] ZHANG X, XU Z C, XU J, et al. Selection and validation of reference genes for normalization of quantitative real-time reverse transcription PCR analysis in *Poria cocos* (Schw.) Wolf (Fuling) [J]. Chin Med, 2016, 11: 8.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2-DDCt method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] 林龙. 灵芝鲨烯环氧酶和八氢番茄红素合酶基因沉默对灵芝三萜合成及活性氧物质的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2013.
- [27] XU R, FAZIO G C, MATSUDA S P. On the origins of triterpenoid skeletal diversity [J]. Phytochemistry, 2013, 94: 1-11.

- 2004,65(3):261-291.
- [28] WANG M, CHEN D Q, WANG M C, et al. Poricoic acid ZA, a novel RAS inhibitor, attenuates tubulo-interstitial fibrosis and podocyte injury by inhibiting TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2017,36:243-253.
- [29] HU S H, ZHOU G, WANG Y W, et al. Tyrosinase inhibitory activity of total triterpenes and poricoic acid A isolated from *Poria cocos* [J]. *Chin Herbal Med*, 2017,9(4):321-328.
- [30] LEE S R, LEE S, MOON E, et al. Bioactivity-guided isolation of anti-inflammatory triterpenoids from the sclerotia of *Poria cocos* using LPS-stimulated Raw264.7 cells[J]. *Bioorg Chem*, 2017,70:94-99.
- [31] WEN H, WU Z, HU H, et al. The anti-tumor effect of pachymic acid on osteosarcoma cells by inducing PTEN and Caspase 3/7-dependent apoptosis[J]. *J Nat Med*, 2018,72(1):57-63.
- [32] FENG G, LI S, LIU S, et al. Targeted screening approach to systematically identify the absorbed effect substances of *Poria cocos* *in vivo* using ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2018,66(31):8319-8327.
- [33] POLLIER J, VANCAESTER E, KUZHIUMPARAMBIL U, et al. A widespread alternative squalene epoxidase participates in eukaryote steroid biosynthesis [J]. *Nat Microbiol*, 2019,4(2):226-233.
- [34] LARANJEIRA S, AMORIM-SILVA V, ESTEBAN A, et al. Arabidopsis Squalene Epoxidase 3 (SQE3) Complements SQE1 and Is Important for Embryo Development and Bulk Squalene Epoxidase Activity [J]. *Mol Plant*, 2015,8(7):1090-1102.
- [35] GAO K, XU J S, SUN J, et al. Molecular cloning and expression of squalene epoxidase from a medicinal plant, *Bupleurum chinense* [J]. *Chin Herb Med*, 2016,8(1):67-74.
- [36] ALMEIDA A, DONG L, KHAKIMOV B, et al. A single oxidosqualene cyclase produces the seco-triterpenoid α -onocerin [J]. *Plant Physiol*, 2018,176(2):1469-1484.
- [37] SUZUKI H, ACHNINE L, XU R, et al. A genomics approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula* [J]. *Plant J*, 2002,32(6):1033-1048.
- [38] 李彤,李剑超,王晨,等. 药用植物鲨烯环氧酶基因研究进展[J]. *中国现代中药*, 2021,23(10):1837-1841.
- [39] 陈新,徐丽,张力思,等. 蓝莓角鲨烯环氧酶基因的克隆与表达分析[J]. *山东农业科学*, 2019,51(10):1-7.
- [40] 李晶,林雄杰,王泽辉,等. 牛樟芝鲨烯环氧酶基因的克隆、生物信息学及表达分析[J]. *中草药*, 2018,49(10):2440-2446.
- [41] 牛云云,朱孝轩,罗红梅,等. 三萜皂苷合成生物学元件的初步开发:三七鲨烯环氧酶编码基因克隆及表达模式分析[J]. *药学报*, 2013,48(2):211-218.

[责任编辑 顾雪竹]