

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201708037

引文格式: 原晓龙, 华梅, 陈剑, 等. 牛樟芝中一个新型还原型聚酮合酶基因的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(9): 1146–1154
YUAN XL, HUA M, CHEN J, et al. Cloning and expression analysis of a new reducing polyketide synthase gene in *Antrodia camphorata* [J].
Guihaia, 2018, 38(9): 1146–1154

牛樟芝中一个新型还原型聚酮合酶基因的克隆及表达分析

原晓龙, 华梅, 陈剑, 王娟, 杨宇明, 王毅*

(云南省林业科学院, 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 国家林业局

云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室, 昆明 650204)

摘要: 为了研究牛樟芝中 *PKS* 基因与化合物之间的关系, 该研究通过对牛樟芝基因组分析获得牛樟芝聚酮合酶基因, 以此序列为模板设计含有起始密码子和终止密码子的特异引物并以牛樟芝 cDNA 为模板克隆获得一个高度还原型 *PKS* (HR-*PKS*) 基因全长, 命名为 *AcPKS2*; 对 *AcPKS2* 基因进行生物信息学分析, 并比较该基因在不同培养基上的表达量。结果表明: *AcPKS2* 全长 7 842 bp, 有 24 个内含子, 其外显子共编码 2 613 个氨基酸, 该蛋白的相对分子质量为 293.5 kDa, 理论等电点 pI 为 5.78。用 CDD 分析其结构域显示, 该基因属于 HR-*PKS*, 其结构域组织排列为 KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP-TE, 8 个结构域其活性位点分别为 β -酮基合成酶 (DTACSSSL)、酰基转移酶 (GHSIGETA)、脱水酶 (RNDGSTSPL)、甲基转移酶 (SFDIITAFDV)、烯酰还原酶 (HAGVSSPAA)、酮基还原酶 (GSPGQANYTAA)、酰基转移酶 (YGLDSLTSVRL)、硫酸酯酶 (KQPNGPY)。系统发育树显示 *AcPKS2* 与其他化合物未知的 HR-*PKS* 蛋白聚为一支, 结构域和系统进化树分析显示该基因可能编码一种新的含 TE 结构域高度还原型聚酮合酶; 表达分析结果显示葡萄糖和果糖能够诱导该基因的表达。

关键词: 牛樟芝, 高度还原型 *PKS*, 生物信息学分析, 基因表达

中图分类号: Q939.92 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2018)09-1146-09

Cloning and expression analysis of a new reducing polyketide synthase gene in *Antrodia camphorata*

YUAN Xiaolong, HUA Mei, CHEN Jian, WANG Juan, Yang Yuming, Wang Yi*

(Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation and Exploitation of Forest Plants, Key Laboratory for Conservation of Rare, Endanger & Endemic Forest Plants, State Forestry Administration, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, China)

Abstract: We isolated the polyketide synthase gene with analyzing the genome of *Antrodia camphorata*, designed special primers including initial codon and stop codon according to the DNA sequence of this gene. Then, we cloned the full length of a *PKS* gene using the cDNA of *A. camphorata*, it is a part of HR-*PKS* and named as *AcPKS2*. We used bioinformatic methods to analyze *AcPKS2* gene and its proteinic sequence, and compared the expression level of *AcPKS2* gene culturing in

收稿日期: 2018-01-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31860177); 云南省对外科技合作计划项目 (2015IA004); 云南省应用基础研究计划面上项目 (2016FB055) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31860177); Foreign Science and Technology Cooperation Plan of Yunnan Province (2015IA004); Applied Basic Research Plan in Yunnan Province (2016FB055)]。

作者简介: 原晓龙 (1986-), 男, 陕西蒲城人, 硕士, 助理研究员, 主要从事林木分子生物学研究, (E-mail) xiaolony@126.com。

*通信作者: 王毅, 博士, 助理研究员, 主要从事植物学和分子生物学研究, (E-mail) 22825818@qq.com。

different media. The results showed that the gene *AcPKS2* had 7 842 bp including 24 introns, all the exons encoded 2 613 amino acids; and its relative molecular weight was 293.5 kDa, the theoretical isoelectric point(pI) was 5.78. The result of conserved domain database (CDD) analysis revealed that the organization domain of *AcPKS2* was KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP-TE, the active sites of eight domains were β -ketosynthase (DTACSSSL), acyltransferase (GHSIGETA), dehydratase (RNDGSTSPL), methyl-transferase (SFDIITAFDV), enoyl reductase (HAGVSSPAA), ketoreductase (GSPGQANYTAA), acyl carrier protein (YGLDSLTSVRL), thioesterase (KQPNGPY), respectively. Phylogenetic analysis clarified that *AcPKS2* and another HR-PKS that their products had not identified clustered together, the domain and phylogenetic tree analysis could authenticated that *AcPKS2* gene encoded a new HR-PKS that includes TE domain. The gene expression analysis showed glucose and fructose could improve the ability of *AcPKS2* gene expression.

Key words: *Antrodia camphorata*, highly reducing polyketide synthase, bioinformatics, gene expression

聚酮化合物(polyketides, PK)是一类最重要的次生代谢产物,现已明晰的结构已超过7 000种,市场上聚酮类药物已超20种(Cox, 2007; Hertweck, 2009)。聚酮化合物的合成依赖于聚酮合酶(polyketides synthase, PKS),其催化过程类似于脂肪酸合酶(fatty acid synthase, FAS)合成脂肪酸,即通过脂酰基-CoA活化底物,并在不同的底物之间不断重复脱羧缩合形成数量庞大、结构丰富的次生代谢产物(Seshime et al, 2005; Shen, 2003),从结构相对简单的芳香类(如苔色酸、6-methylsalicylic acid等)到结构复杂的高度还原型聚酮类(如T-毒素、洛伐他汀等)(Hideki et al, 2010)。真菌PKS主要属于I型聚酮合酶,根据其所拥有结构域的不同可将真菌I型PKS分为非还原型PKS(Non-reducing PKS)、部分还原型PKS(Partial-reducing PKS)、高度还原型PKS(Highly-reducing PKS)(Kroken et al, 2003; Sato et al, 2017)。像洛伐他汀(Lovastatin)(Ma et al, 2009)、细胞松弛素(Cytochalasins)(Scherlach et al, 2010)等源自真菌的聚酮类化合物的碳骨架主要由高度还原型PKS催化合成的(Liu et al, 2017)。

高度还原型PKS是由功能相对独立的且可重复使用的不同酶结构域组成的巨型合酶(Khosla et al, 2007),不同的结构域组合方式可产生不同的还原型聚酮类化合物(Halo et al, 2008)。如源自土曲霉(*Aspergillus terreus*)具降胆固醇活性的药物洛伐他汀(Ma et al, 2009);对哺乳动物鲨烯合酶具潜在抑制效应、可有效治疗朊病毒感染的神经元的聚酮类化合物萨拉哥酸A(Zaragozic acid A)

[又名角鲨抑素S1(Squalestatin S1)](Bonsch et al, 2016; Liu et al, 2017);均属高度还原型聚酮类化合物。HR-PKS除具有 β -酮基合成酶(KS)、酰基转移酶(AT)、酰基载体蛋白(ACP)这三个PKS最基本的结构域外,还具有与 β -酮加工合成相关的酮基还原酶(KR)、脱水酶(DH)和烯酰还原酶(ER),将新合成的 β -酮基还原成为 β -醇、脱水成为 α - β 不饱和烯酰基、还原双键成为亚甲基等(Cox, 2007; Hertweck, 2009; Kroken et al, 2003; Sato et al, 2017)。Cox & Simpson(2009)根据产物结构和催化方式的不同,将HR-PKS分成两类:一类为合成大环内酯类如洛伐他汀;另一类为与NRPS结合形成肽酯类如镰菌素等。聚酮合酶与化合物之间相关关系的研究已有初步进展, Cox et al(2004)通过MT(甲基转移酶)单元保守序列设计特异引物克隆得到与他汀类药物角鲨抑素类生物合成相关的PKS基因。为了研究牛樟芝中PKS基因与化合物之间的关系,本研究在对其基因组数据分析的基础上,分离并克隆得到牛樟芝中的聚酮合酶基因(*AcPKS2*)全长cDNA,采用生物信息学的方法对*AcPKS2*基因进行分析,测定*AcPKS2*基因在添加了不同碳氮源的培养基上的表达量,以期为进一步研究牛樟芝聚酮合酶基因的异源表达、*AcPKS2*基因和具体化合物的联系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

牛樟芝菌株由从台湾地区购买的段木上的牛

樟芝子实体分离获得,经形态及 ITS 鉴定为牛樟芝,菌种编号为 LKYAC01。在 25 ℃ 恒温培养箱中用麦芽糖酵母提取物培养基(malt yeast extract,美国 BD)进行扩繁培养。

1.2 方法

1.2.1 牛樟芝 *AcPKS2* 基因全长的克隆 收集于 25 ℃ 恒温条件下培养 30 d 的牛樟芝菌丝体,用植物 RNA 提取试剂盒(康为世纪)提取牛樟芝菌丝体总 RNA,使用 NanoDrop™ 2000 紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher)测定 RNA 的浓度和质量,并将 RNA 反转录成 cDNA,保存于-80 ℃ 冰箱。

通过对已测序的牛樟芝基因组数据搜索获得一个与聚酮化合物生物合成相关的基因 *AcPKS2* 的全长 cDNA 序列,利用在线程序 GENE Fisher 分别设计含有起始密码子(*AcPKSF0*)和终止密码子(*AcPKSR0*)的一对特异引物(表 1)进行 cDNA 克隆。以 *AcPKSF0* 和 *AcPKSR0* 为引物,利用高保真聚合酶(HiFi-DNA polymerase)进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的片段与克隆载体连接,筛选得到阳性克隆并进行测序。

1.2.2 *AcPKS2* 基因及蛋白质生物信息学分析 利用 NCBI 上的在线程序 ORF Finder 对 *AcPKS2* 基因进行开放阅读框预测,BLAST 程序进行序列同源性比较,ProtParam 进行蛋白质理化性质(等电点、分子量)分析,用 SignalP 4.1 server 预测信号肽的有无,用 Target P 预测其亚细胞定位,用 NCBI 中的 Conserved Domain Database 数据库搜索 *AcPKS2* 蛋白的结构功能域。选取与牛樟芝 *AcPKS* 蛋白质序列同源性较高的其他真菌的 PKS 蛋白序列一起,用 MEGA 6.0 软件进行氨基酸序列同源性分析及系统发育分析,进行 Clustal W 程序比对后,采用 Neighbor-Joining 程序构建进化树,1 000 次重复,其他参数选用默认值。生物信息学所用在线工具及其网址见表 2。

1.2.3 牛樟芝 *AcPKS2* 基因在不同培养基上的表达分析 项目组之前的研究表明,不同碳氮源及配方的培养基对牛樟芝生长速度有显著影响(赵能等,2016)。在前期研究结果的基础上,先选取适合牛樟芝菌丝体快速生长的 1-11 号培养基应用于 *AcPKS2* 基因表达实验,具体配方见表 3;再用商

表 1 克隆反应中所用引物序列

Table 1 Primer sequences in the PCR of cloning

引物名称 Primer name	序列 Sequence	目的 Objective
AcPKS2R0	5'-TACATATAACTTCAATGTGCT-3'	cDNA 全长克隆 Cloning the full length of cDNA
AcPKS2F0	5'-ATGAGATGTATAGAAGACACT-3'	
TacPKS2F	5'-AGATGTCGTAGCATATGT-3'	RT-PCR 检测 Detecting by RT-PCR
TacPKS2R	5'-CGTACGATAGATACGTTC-3'	

表 2 生物信息学在线工具及其网址

Table 2 Software online of bioinformatics and its websites

在线工具 Software online	网址 Website
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
ORF Finder	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/
ProParam	http://web.expasy.org/protparam/
SignalP 4.1 server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Target P	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/output.php
CDD	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/

业培养基 MEB(麦芽浸粉 13 g · L⁻¹)、PDA(马铃薯浸粉 5 g · L⁻¹,葡萄糖 20 g · L⁻¹)、WB(麦芽浸粉 15 g · L⁻¹,麦芽糖 12.75 g · L⁻¹)、SA(葡萄糖 20 g · L⁻¹)和 TMG(番茄浸粉 10 g · L⁻¹,麦芽糖 5 g · L⁻¹,葡萄糖 10 g · L⁻¹)验证其 *AcPKS2* 基因的表达情况。按照所选的培养基配方配置,并接种牛樟芝菌丝体,置于 25 ℃ 恒温培养箱中培养 40 d 后,从每种培养基上各获取 0.5 g 牛樟芝真菌菌丝体,重复 3 次取样,并依据真菌 RNA 提取试剂盒(康为世纪)的说明提取总 RNA。牛樟芝总 RNA 参照反转录试剂盒(Transgen)说明书合成第一条链 cDNA,并于-20 ℃ 冰箱保存备用。然后,以特异引物 *TacPKS1F*、*TacPKS1R*(表 1)检测生长于不同培养基上的牛樟芝 *AcPKS2* 基因具体表达情况,进行琼脂糖凝胶电泳检测后,利用图像分析软件 GENE-SNAPS 分析其积分光密度,并进行相对定量表达分析。

表 3 不同培养基配方
Table 3 Formula of different media

编号 Serial number	基础培养基 Basal medium (g · L ⁻¹)	添加物 Additive (g · L ⁻¹)
1	麦芽糖 6 Maltose 6	无 None
2	酵母提取物 3 Yeast extract 3	甘露糖 4 Mannose 4
3		乳糖 4 Lactose 4
4		葡萄糖 4 Glucose 4
5		果糖 4 Fructose 4
6	麦芽糖 1.8 Maltose 1.8	牛肉浸粉 4 Beef extract powder 4
7	葡萄糖 6 Glucose 6	胰蛋白胨 4 Tryptone 4
8		酵母提取物 4 Yeast extract 4
9		番茄浸粉 4 Tomato extract 4
10		酪蛋白胨 4 Casein 4
11		土豆蛋白胨 4 Potato peptone 4

2 结果与分析

2.1 牛樟芝 AcPKS2 基因全长的获得

以牛樟芝真菌菌丝体总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,以 AcPKSF0 和 AcPKSR0 为引物,利用高保真聚合酶 (HiFi-DNA polymerase) 进行 PCR 扩增的方法获得一条长度约为 7.5 kb 的片段,琼脂糖凝胶电泳检测后回收、克隆并测序后获得7 842 bp 的 cDNA 序列。BLASTP 比对分析显示该基因的 cDNA 与密褐褶孔菌 (*Gloeophyllum trabeum*, XM_007871656.1)、根状索孔菌 (*Fibroporia radiculosa*, XM_012328483.1)、荚果腐病菌 (*Moniliophthora roreri*, XM_007857385.1) 等真菌的聚酮合酶 DNA 序列分别具有 70%、72% 和 73% 的一致性,并将该基因命名为 AcPKS2。通过比对 AcPKS2 cDNA 和 DNA 序列,显示该基因有 24 个内含子,其外显子共编码2 613个氨基酸。

2.2 AcPKS2 蛋白序列的生物信息学分析

用在线软件 ProtParam 预测 AcPKS2 蛋白质序列的理化性质,相对分子质量为 293.5 kDa,理论等电点 pI 为 5.78 ,结构式为 C₁₃₁₃₃H₂₀₅₂₆N₃₅₃₄O₃₈₉₅

S₁₀₁,不稳定系数为 39.66,为稳定蛋白,脂肪系数 91.54,平均亲水性值为 0.013,亲水性较弱;SignalP 4.1 server 分析结果显示,该蛋白不存在信号肽,为非分泌蛋白;采用 Target P 在线软件预测其亚细胞定位,存在线粒体的可能性为 0.216、分泌途径为 0.050,其他位置为 0.788,可靠性为 3,结合 SignalP 4.1 server 分析结果,推测该蛋白位于细胞质基质的可能性最大。用 CDD 预测该蛋白序列的结构域,结果显示该蛋白含有 KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP-TE 等结构域 (图 1)。将牛樟芝 AcPKS2 与其他高度还原型聚酮合酶对应的结构域进行比对发现 AcPKS2 的 8 个结构域其活性位点分别为 β-酮基合成酶 (DTACSSSL)、酰基转移酶 (GHSIGE-TA)、脱水酶 (RNDGSTSPL)、甲基转移酶 (SFDI-ITAFDV)、烯酰还原酶 (HAGVSSPAA)、酮基还原酶 (GSPGQANYTAA)、酰基转移酶 (YGLDSLTS-VRL)、硫酯酶 (KQPNGPY) (图 2)。

2.3 AcPKS2 蛋白的分子系统进化分析

利用 MEGA 6.0 中的 Clustal W 程序对 AcPKS2 蛋白序列和其他真菌的 31 条 I 型 PKS 的蛋白序列进行多序列比对后,用邻位相接法构建分子系统进化树,1 000次重复,其他参数选用默认值。分析结果显示 (图 3):以非还原型 PKS 作为外接参照组,高度还原型 PKS 可分为 5 组,牛樟芝 AcPKS2 蛋白序列与密褐褶孔菌 (*Gloeophyllum trabeum*, XP_007869847.1)、毛韧革菌 (*Stereum hirsutum*, XP_007309121.1) 和孢荚腐病菌 (*Moniliophthora roreri*, XP_007849738.1) 聚为一支,合成产物目前不明确。另外 Clade I 分为 I A、I B 两个亚组,I A 组的结构域 KS-AT-DH-ER-KR-ACP-(ACP),合成 T-toxin 母核;I B 组结构域为 KS-AT-DH-MT-ER-KR-ACP,合成单环类毒素母核 (如 2-吡咯烷酮)。Clade II 组的结构域为 KS-AT-DH-MT-SDR-ER-KR-(AMP-ACP),生成洛伐他汀类母核。Clade III 的结构域为 KS-AT-DH-MT-(SDR)-ER-KR-ACP,合成大环内酯类聚酮化合物。Clade IV 的结构域为 KS-AT-DH-(MT)-ER-KR-ACP,合成伏马菌素类母核。与牛樟芝 AcPKS2 蛋白序列所在的第 V 组进行比较,仅该组存在结构域 TE,可推测其合成产物为一种新的聚酮类化合物。

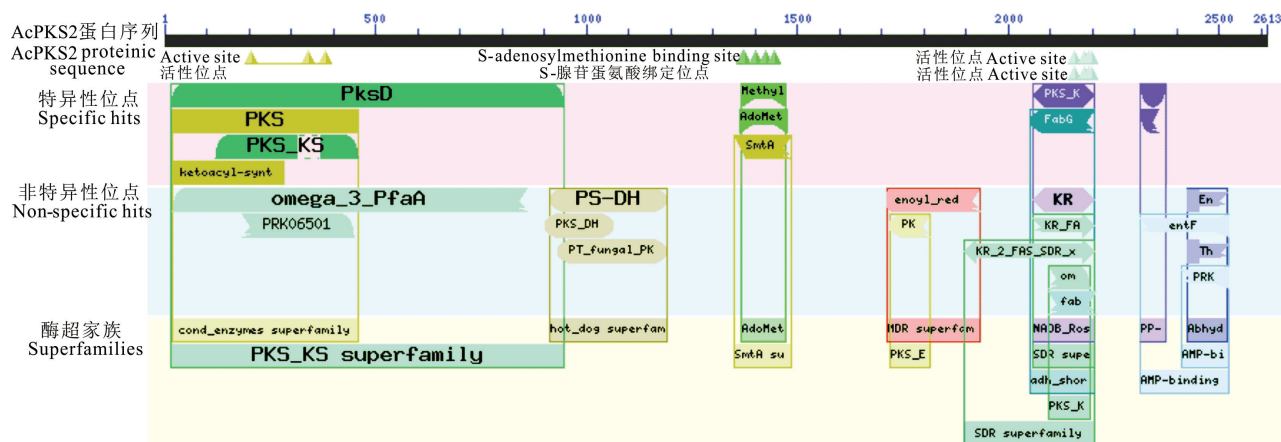


图 1 用 CDD 分析 AcPKS2 蛋白保守结构域的结果

Fig. 1 Conserved domains of AcPKS2 proteinic sequence by CDD analysis

2.4 不同碳氮源添加物对牛樟芝 *AcPKS2* 基因表达的影响

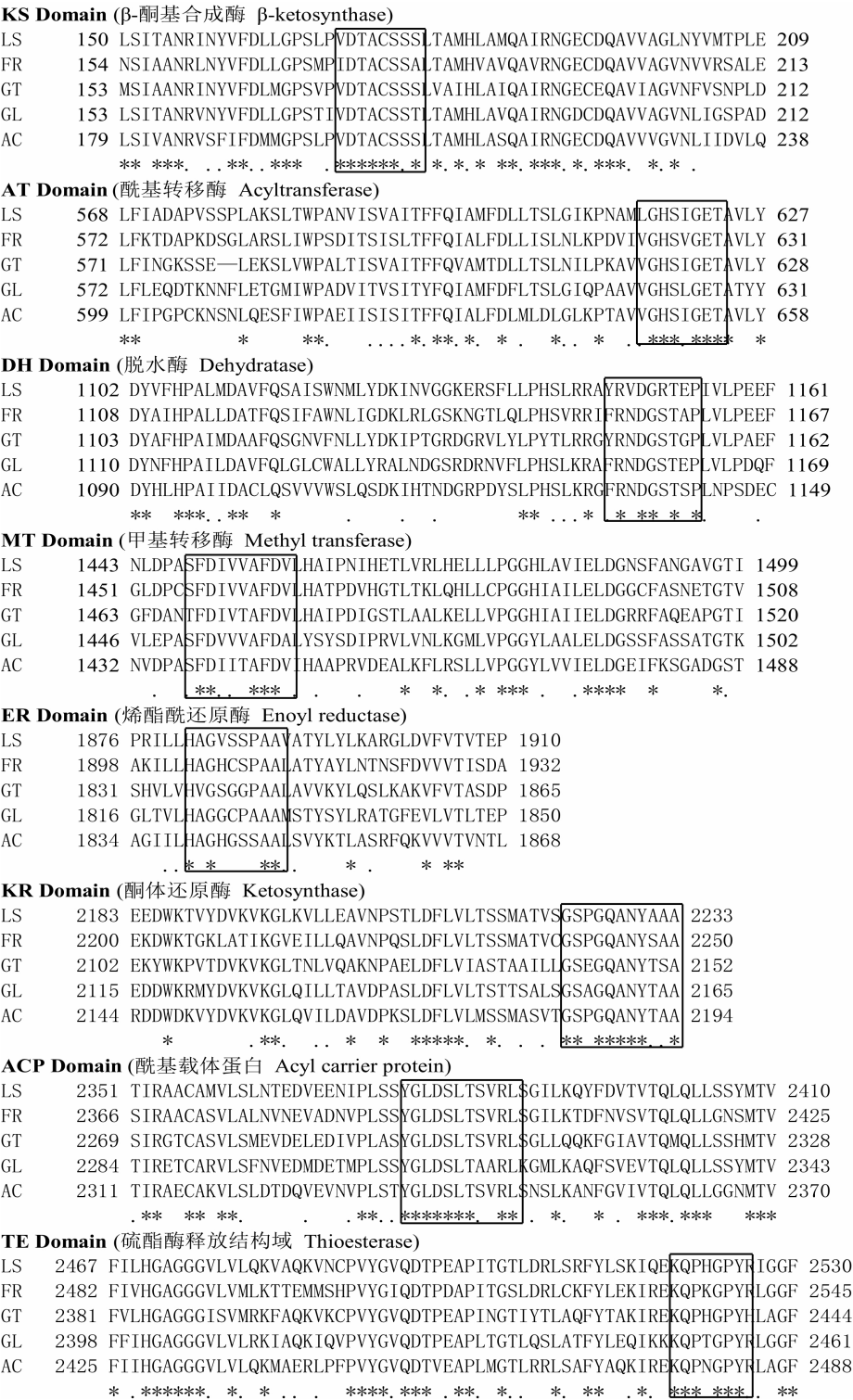
根据项目组之前的研究,牛樟芝菌丝体在不同的培养基上生长速度差异较大(赵能等, 2016)。将牛樟芝菌丝体培育在 17 种不同的培养基上, 25 ℃ 恒温培养箱中培养 40 d 后, 提取 RNA 反转录成 cDNA, 并用特异引物(表 1) 检测其表达情况。结果显示(图 4:A): 在不同碳源添加物的分析试验中, 果糖(fru) 和葡萄糖(glu) 能够诱导 *AcPKS2* 基因的表达, 而在基本培养基(none)、添加甘露糖(man) 和乳糖(lac) 的培养基上不表达, 其中添加了葡萄糖的培养基上该基因的表达量最高; 在不同氮源添加物的分析试验中(图 4:B), 以麦芽糖和葡萄糖作为碳源的前提下, 不同氮源均可诱导该基因表达, 但其表达量存在显著差异, 其诱导表达量从高到低依次为 酵母提取物(MFY2)、土豆蛋白胨(MFS)、牛肉浸粉(MFB)、酪蛋白胨(MFL)、胰蛋白胨(MFY1)、番茄浸粉(MFT); 其中诱导表达量最高的培养基 MFY2 与最低的 MFT 之间相差 5 倍之多。同时采用不同的商业培养基测试该基因的表达情况, 结果显示(图 4:C): TMG 诱导表达量最高, 从高到低依次为 YMB、WB、PDA、MEB、SA。

3 讨论

牛樟芝 (*Antrodia camphorata*) 属于多孔菌科

(Polyporaceae) 薄孔菌属 (*Antrodia*) 真菌, 是我国台湾地区所特有的珍贵食药两用真菌 (Lu et al, 2014; Wu et al, 2004)。牛樟芝中含有丰富的具生理活性的次生代谢产物, 如牛樟芝子实体中特有的聚酮化合物 安卓凯因 A (antrocaphin A) (Hsieh et al, 2010; Lee et al, 2011)。依据牛樟芝基因组测序结果, 研究者发现牛樟芝基因组中存在 14 个可能为 *PKS* 的基因片段, 其中有 4 个 *PKS* 基因编码的氨基酸数量超过了 2 000 个 (Lu et al, 2014), 本项目组通过对牛樟芝基因组的分析, 获得 1 条高度还原型 *PKS* 基因 *AcPKS2* 基因。尚未有关于聚酮合酶基因与化合物之间联系的报道, 本研究的目的是从牛樟芝基因组中分离聚酮合酶基因, 并研究其在不同培养条件下的表达状况, 最终目的为确定基因与化合物之间的联系。

本研究通过对 *AcPKS2* 基因和其蛋白序列进行生物信息学分析,通过结构域分析获知 *AcPKS2* 蛋白含有 HR-PKS 特有结构域 β -酮基还原酶(KR)和烯酰还原酶(ER),可推断该基因属于 HR-PKS;结构域分析显示 *AcPKS2* 蛋白中含有硫酯酶释放结构域(TE)。TE 结构域通常位于 C-末端,许多真菌的非还原型聚酮合酶的 TE 结构域负责催化环化反应形成大环内酯(Du & Lou, 2010)并释放聚酮化合物,但目前尚未有 TE 结构域存在于 HR-PKS 中的报道。在非还原型聚酮合酶中,与 TE 结构域功能类似的结构域还有 C-末端还原酶释放结构域(R)



注：LS. 硫磺多孔菌 (KZT06920.1)；FR. 褐腐真菌 (XP_012183873.1)；GT. 密褐褶菌 (XP_007871281.1)；GL. 裸脚菇 (KIK63350.1)；AC. 牛樟芝。

Note: LS. *Laetiporus sulphureus* (KZT06920.1)；FR. *Fibroporia radiculosa* (XP_012183873.1)；GT. *Gloeophyllum trabeum* (XP_007871281.1)；GL. *Gymnopus luxurians* (KIK63350.1)；AC. *Antrodia camphorata*.

图 2 AcPKS2 不同结构域活性位点分析
Fig. 2 Analysis of active sites in different domains of AcPKS2

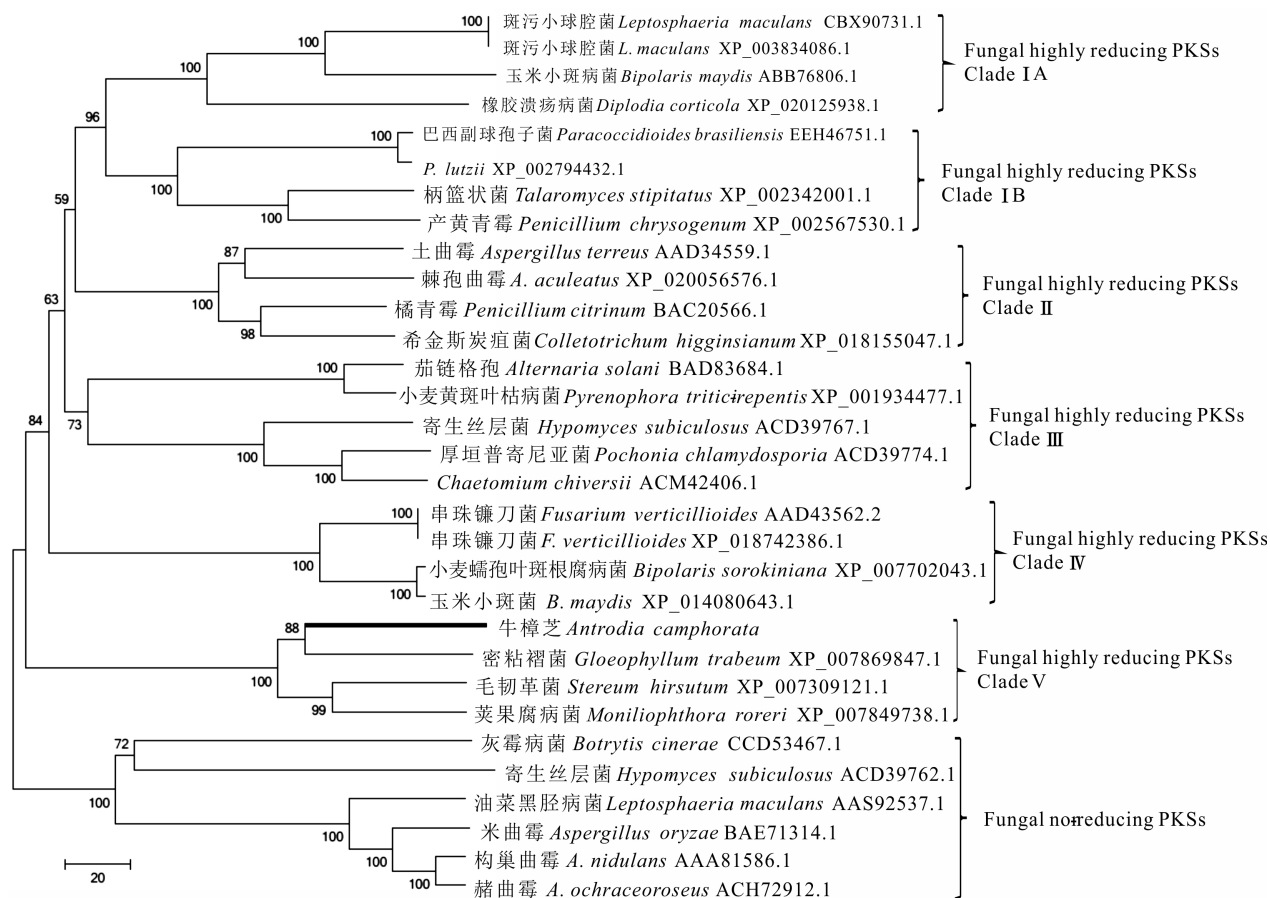


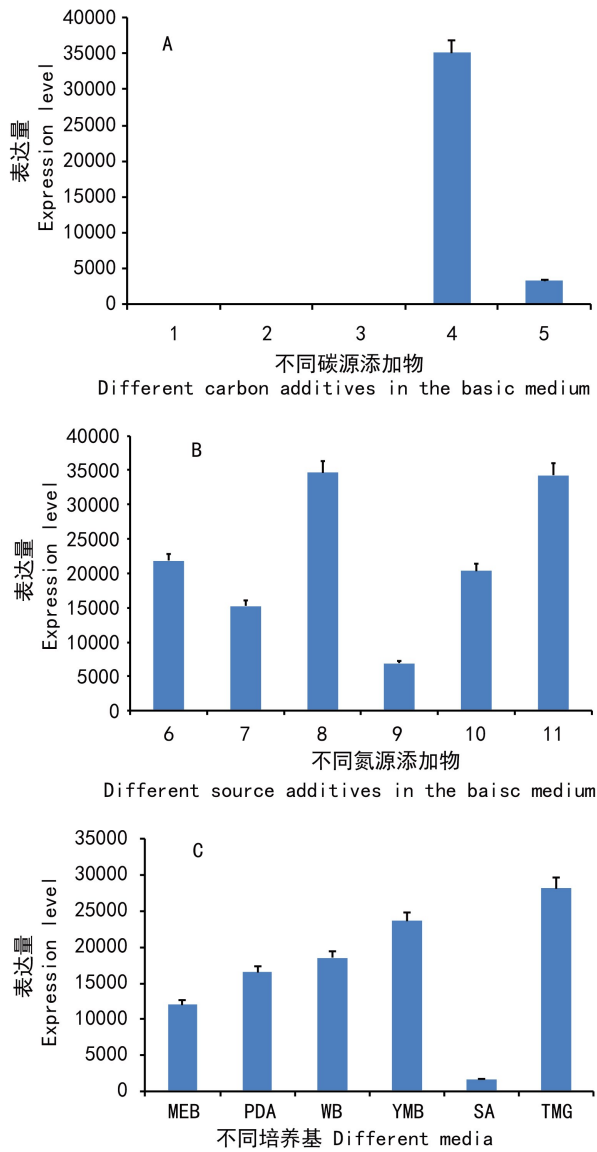
图 3 牛樟芝 *AcPKS2* 蛋白与其他真菌 PKS 蛋白的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of *AcPKS2* in *Antrodia camphorata* with other related fungal proteins

(Kroken et al, 2003)、C-末端酯酶/类脂肪酶 (EST) 结构域 (Ishiuchi et al, 2012), 类金属- β -内酰胺酶 (M β L) 水解酶 (Scherlach et al, 2010) 等。这些酶结构域的功能已通过试验得到证明, 如 Fujii et al (2001) 通过异源过量表达 *wa-PKS* 基因修饰过的 C-末端首次证明 TE 结构域参与克莱森环化反应, 该结构域又被命名为克莱森式环化酶结构域 (CLC), 参与构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 中 WA 聚酮合酶催化萘并吡喃酮 (naphthopyrone) 第二个芳香环的克莱森式环化; R 结构域催化还原释放的作用通过异源表达得到确认 (Bailey et al, 2007); EST 结构域略大于 TE/CLC 结构域, 属丝氨酸水解酶家族 (Ishiuchi et al, 2012); 通过基因敲除的方式证明 M β L 结构域参与构巢曲霉中 AptA (asperthecin PKS) 聚酮产物的释放 (Szewczyk et al, 2008)。

AcPKS2 TE 结构域的蛋白序列与密褐褶孔菌 (XP_007869847.1) (Floudas et al, 2012) TE 结构域的同源性为 56.49%, 且其保守活性位点均为 KQPXGPY。聚类分析可将功能相似的基因或蛋白聚为一支, 本研究中 *AcPKS2* 蛋白与其他 3 种功能和化合物未知的 PKS 蛋白聚为一支, 可推断 *AcPKS2* 基因是一种含 TE 结构域的新型 HR-PKS。

不同培养基和培养方式对牛樟芝生长速度及其活性组分均有显著的影响 (赵能等, 2016; 周璇等, 2017), 同时同一基因在不同培养条件下, 其基因表达会出现差异, 且可能产生不同的化合物, 这一现象可通过“一菌多产物” (one strain many compounds, OSMAC) 来解释。Hemphill et al (2017) 利用“一菌多产物”策略成功地从内生真菌三线镰刀菌 (*Fusarium tricinctum*) 中获得 5 种化合物, 2 种新



注：1-5. 添加不同碳源。1. 不添加；2. 添加甘露糖 4 g · L⁻¹；3. 添加乳糖 4 g · L⁻¹；4. 添加葡萄糖 4 g · L⁻¹；5. 添加果糖 4 g · L⁻¹。6-11. 添加不同氮源。6. 添加牛肉浸粉 4 g · L⁻¹；7. 添加胰蛋白胍 4 g · L⁻¹；8. 添加酵母提取物 4 g · L⁻¹；9. 添加番茄浸粉 4 g · L⁻¹；10. 添加酪蛋白胍 4 g · L⁻¹；11. 添加土豆蛋白胍 4 g · L⁻¹。

Note: 1-5. Expression medium added different carbon sources. 1. Added nothing; 2. Added mannose 4 g · L⁻¹; 3. Added lactose 4 g · L⁻¹; 4. Added glucose 4 g · L⁻¹; 5. Added fructose 4 g · L⁻¹. 6-11. Expression medium added different nitrogen sources. 6. Added beef extract powder 4 g · L⁻¹; 7. Added tryptone 4 g · L⁻¹; 8. Added yeast extract 4 g · L⁻¹; 9. Added tomato extract 4 g · L⁻¹; 10. Added casein 4 g · L⁻¹; 11. Added potato peptone 4 g · L⁻¹.

图 4 不同培养基条件下牛樟芝 *AcPKS2* 基因的表达量

Fig. 4 Expression levels of gene *AcPKS2* with different media

化合物 fusarilelin K 和 fusarilelin L 及 2 种已知化合物 fusarilelin A 和 fusarilelin B,并将化合物 fusarilelin J 的量增加了 80 倍。本研究应用含不同碳氮源添加物和商业培养基诱导 *AcPKS2* 基因的表达,不同碳源添加物试验表明葡萄糖和果糖能诱导 *AcPKS2* 基因的表达,不同氮源添加物的试验表明在碳源一致的前提下,酵母提取物的表达量最高,番茄浸粉表达量最低;不同商业培养基测试显示 TMG 表达量最高、SA 最低。该结果说明牛樟芝 *AcPKS2* 基因在不同培养条件下,其表达水平具较大的差异,能够为下一步通过大规模发酵的方式获取牛樟芝聚酮化合物提供最佳培养基。本研究结果有助于牛樟芝聚酮类化合物的异源表达,为提高牛樟芝聚酮化合物的合成效率及基因调控分析奠定基础。

参考文献:

BAILEY AM, COX RJ, HARLEY K, et al, 2007. Characterisation of 3-methylorcinolaldehyde synthase (MOS) in *Acremonium strictum*: first observation of a reductive release mechanism during polyketide biosynthesis [J]. Chem Comm, (39):4053-4055.

BONSCH B, BELT V, BARTEL C, et al, 2016. Identification of genes encoding squalastatin S1 biosynthesis and *in vitro* production of new squalastatin analogues [J]. Chem Comm, 52(41): 6777-6780.

COX RJ, 2007. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets [J]. Org Biomol Chem, 5(13):2010-2026.

COX RJ, GLOD F, HURLEY D, et al, 2004. Rapid cloning and expression of a fungal polyketide synthase gene involved in squalastatin biosynthesis [J]. Chem Comm, 10(20): 2260-2261.

COX RJ, SIMPSON TJ, 2009. Fungal type I polyketide synthases [J]. Meth Enzymol, 459:49-78.

DU L, LOU L, 2010. PKS and NRPS release mechanisms [J]. Nat Prod Rep, 27(2): 255-278.

FLOUDAS D, BINDER M, RILEY R, et al, 2012. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes [J]. Science, 336(6089):1715-1719.

FUJII I, WATANABE A, SANKAWA U, et al, 2001. Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans* [J]. Chem Biol, 8(2):189-197.

HALO LM, MARSHALL JW, YAKASAI AA, et al, 2008. Authentic heterologous expression of the tenellin iterative polyketide synthase nonribosomal peptide synthetase requires

- coexpression with an enoyl reductase [J]. *Chembiochem*, 9(4): 585–594.
- HEMPHILL CF, SUREECHATCHAIYAN P, KASSACK MU, et al, 2017. OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum* [J]. *J Antibiot*, 70(6):726–732.
- HERTWECK C, 2009. The biosynthetic logic of polyketide diversity [J]. *Angew Chem Int Ed*, 48(26):4688–4716.
- HIDEKI S, NAOYUKI I, TSUYOSHI S, 2010. Functional analysis of fungal polyketide biosynthesis genes [J]. *J Antibiot*, 63(5):207–218.
- HSIEH YH, CHU FH, WANG YS, et al, 2010. Antrocamphin A, an anti-inflammatory principal from the fruiting body of *Taiwanofungus camphoratus*, and its mechanisms [J]. *J Agric Food Chem*, 58(5): 3153–3158.
- ISHIUCHI K, NAKAZAWA T, OOKUMA T, et al, 2012. Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics [J]. *Chembiochem*, 13(6): 846–854.
- KHOSLA C, TANG Y, CHEN AY, et al, 2007. Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide B synthase [J]. *Ann Rev Biochem*, 76(1):195–221.
- KROKEN S, GLASS NL, TAYLOR JW, et al, 2003. Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(26):15670–15675.
- LEE CL, HUANG CH, WANG HC, et al, 2011. First total synthesis of antrocamphin A and its analogs as anti-inflammatory and anti-platelet aggregation agents [J]. *Org Biomol Chem*, 9(1):70–73.
- LIU N, HUNG YS, GAO SS, et al, 2017. Identification and heterologous production of a benzoyl-primed tricarboxylic acid polyketide intermediate from the zaragozic acid A biosynthetic pathway [J]. *Org Lett*, 19(13):3560–3563.
- LU MY, FAN WL, WANG WF, et al, 2014. Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 111(44):E4743–4752.
- MA SM, LI JW, CHOI JW, et al, 2009. Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase [J]. *Science*, 326(5952):589–592.
- SATO M, DANDER JE, SATO C, et al, 2017. Collaborative biosynthesis of maleimide- and succinimide-containing natural products by fungal polyketide megasynthases [J]. *J Am Chem Soc*, 139(15):5317–5320.
- SCHERLACH K, BOETTGER D, REMME N, et al, 2010. The chemistry and biology of cytochalasans [J]. *Nat Prod Rep*, 27(6):869–886.
- SESHIME Y, JUVVADI PR, FUJII I, et al, 2005. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae* [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 331(1):253–260.
- SHEN B, 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 7(2): 285–295.
- SZEWCZYK E, CHIANG YM, OAKLEY CE, et al, 2008. Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 74(24):7607–7612.
- WU SH, YU ZH, DAI YC, et al, 2004. *Taiwanofungus*, a polypore new genus [J]. *Fungal Sci*, 19(3–4):109–116.
- ZHAO N, YUAN XL, CHEN J, et al, 2016. Effect of different carbon and nitrogen sources on mycelia growth of *Antrodia cinnamomea* [J]. *J W Chin For Sci*, 45(4):7–12. [赵能, 原晓龙, 陈剑, 等, 2016. 不同碳氮源对牛樟芝菌丝体生长的影响 [J]. *西部林业科学*, 45(4):7–12.]
- ZHOU X, XIA YJ, LIU SN, et al, 2017. Influences of cultivation methods on active components of *Antrodia camphorata* [J]. *Ind Microbiol*, 47(2):18–23. [周璇, 夏永军, 刘胜男, 等, 2017. 不同培养方式对牛樟芝活性组分的影响 [J]. *工业微生物*, 47(2):18–23.]