

# 北冬虫夏草角鲨烯单氧酶基因的类胡萝卜素生物合成功能解析

赵逸<sup>1</sup>, 陈海盈<sup>1</sup>, 李舒丽<sup>1</sup>, 许玮竣<sup>1</sup>, 郭丽琼<sup>1,2</sup>, 林俊芳<sup>1,2</sup>, 叶志伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 华南农业大学食品学院, 食品生物技术研究, 广东广州 510642)

(2. 广东省微生物生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510642)

**摘要:** 以转录组数据为依据推测北冬虫夏草 *erg1* 基因可能参与其类胡萝卜素合成过程, 进一步检测和分析 *erg1* 基因在添加不同胁迫因子高锰酸钾和氯化钠之后 mRNA 的相对表达量, 探究其在类胡萝卜素合成途径中的调控作用。为了验证 *erg1* 基因的功能, 该论文构建了 *erg1* 基因过表达载体 pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1*, 通过根瘤农杆菌侵染北冬虫夏草孢子的方式将 *erg1* 基因表达框导入北冬虫夏草基因组中, 测定类胡萝卜素生物合成量及 *erg1* 基因的表达水平。结果表明, 高锰酸钾(氧化)和氯化钠(渗透)胁迫下的重组 C*erg1* 菌株的类胡萝卜素产量分别为 6757.17 μg/g 和 6363.93 μg/g, 依次是对照组的 1.22 倍和 1.20 倍。因此, *erg1* 基因的过表达引起了北冬虫夏草 C*erg1* 菌株的类胡萝卜素累积能力的提升, 也即说明角鲨烯单氧酶基因参与北冬虫夏草类胡萝卜素的合成过程。研究结果为北冬虫夏草类胡萝卜素生物合成的研究和利用奠定了实验基础。

**关键词:** 北冬虫夏草; 角鲨烯单氧酶; 过表达; 转录调控

文章编号: 1673-9078(2021)09-37-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.9.0086

## Functional Analysis of Squalene Monooxygenase Gene for the Carotenoid Biosynthesis in *Cordyceps militaris*

ZHAO Yi<sup>1</sup>, CHEN Hai-ying<sup>1</sup>, LI Shu-li<sup>1</sup>, XU Wei-jun<sup>1</sup>, GUO Li-qiong<sup>1,2</sup>, LIN Jun-fang<sup>1,2</sup>, YE Zhi-wei<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Food Science, Institute of Food Biotechnology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China) (2. Research Center for Micro-ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Based on transcriptome data, it was speculated that *erg1* gene may be involved in carotenoid synthesis in *Cordyceps militaris*. Under the stress factors of KMnO<sub>4</sub> and NaCl, the mRNA relative expression level of *erg1* gene was further detected and analyzed to explore its regulatory role in carotenoid synthesis pathway. In order to verify *erg1* gene function, an over-expressing vector pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* of the *erg1* gene was constructed. Subsequently, the expression cassette was introduced into the *C. militaris* by *Agrobacterium tumefaciens*. Finally, the expression level of *erg1* gene and the amount of carotenoid biosynthesis were determined. The results indicated that the carotenoid production of recombinant strain C*erg1* under KMnO<sub>4</sub> (oxidative) and NaCl (osmotic) stress reached 6757.17 μg/g and 6363.93 μg/g respectively, which were 1.22 and 1.20 times of the control strain CM10, respectively. In conclusion, the overexpression of *erg1* gene caused the increase of carotenoid production of C*erg1* strain. In other words, the squalene monooxygenase gene is involved in the carotenoid synthesis of *C. militaris*. The results laid the experimental foundation for the research and utilization of carotenoid biosynthesis in *C. militaris*.

引文格式:

赵逸, 陈海盈, 李舒丽, 等. 北冬虫夏草角鲨烯单氧酶基因的类胡萝卜素生物合成功能解析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(9): 37-42, +278

ZHAO Yi, CHEN Hai-ying, LI Shu-li, et al. Functional analysis of squalene monooxygenase gene for the carotenoid biosynthesis in *Cordyceps militaris* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(9): 37-42, +278

收稿日期: 2021-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801918); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目(食用菌)(2020KJ103; 2021KJ103); 广东省自然科学基金(2016A030313404)

作者简介: 赵逸(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物工程, E-mail: 530079206@qq.com

通讯作者: 叶志伟(1984-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 天然产物与微生物工程, E-mail: zhwy@scau.edu.cn

**Key words:** *Cordyceps militaris*; squalene monooxygenase; overexpression; transcriptional regulation

北冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) 是具有珍贵食药两用价值的子囊菌<sup>[1]</sup>, 作为冬虫夏草的人工栽培替代品, 2009 年被我国卫生部批准为新资源食品<sup>[2]</sup>。药理研究表明, 北冬虫夏草含有抗衰老、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等生物活性的多种化学成分<sup>[3,4]</sup>, 如类胡萝卜素、核苷类化合物、虫草多糖、多种矿物质等<sup>[5]</sup>。类胡萝卜素是由异戊二烯单元组成的含脂肪族多烯链的萜类化合物, 其中异戊二烯单元的数目和化学修饰决定了结构多样性<sup>[6,7]</sup>。研究表明, 光照通过影响新陈代谢进程而调节北冬虫夏草类胡萝卜素的生物合成<sup>[8]</sup>。此外, 微生物在盐、高温等非生物因素胁迫下会选择性地合成类胡萝卜素等萜类物质以抵御不利的环境条件<sup>[9,10]</sup>。北冬虫夏草含有多种类胡萝卜素<sup>[11-13]</sup>, 但其生物合成途径尚未被阐明, 八氢番茄红素脱氢酶 (PDS) 和  $\zeta$ -胡萝卜素脱氢酶 (ZDS) 等类胡萝卜素合成功能酶亦未在北冬虫夏草中发现。因此, 探究北冬虫夏草类胡萝卜素合成相关基因在解析其新型类胡萝卜素合成通路上具有重要的研究意义。

角鲨烯单氧酶 (squalene monooxygenase), 又称为角鲨烯环氧酶 (squalene epoxidase), 是萜类化合物合成的关键限速酶<sup>[14,15]</sup>。Furubayashi 等<sup>[16,17]</sup>推测 C30 类胡萝卜素合成过程中存在“角鲨烯路线”, 即催化法尼基焦磷酸 (Farnesyl pyrophosphate, FPP) 生成脱氢角鲨烯用于合成类胡萝卜素色素。项目组前期研究(北冬虫夏草 CM10 菌株接种在 PDA 培养基作为对照组, 分别在培养基中添加  $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{NaCl}$  胁迫因子作为实验组进行转录组测序)表明, 在  $\text{KMnO}_4$  和  $\text{NaCl}$  等因子胁迫下北冬虫夏草类胡萝卜素累积量和角鲨烯单氧酶基因 *erg1* 的转录水平均有上升, 推测北冬虫夏草通过萜类化合物的形成以抵御环境胁迫因子引起活性氧

积累而造成生物膜氧化、核酸和蛋白质变性等应激损伤<sup>[18]</sup>。

为了进一步分析 *erg1* 基因与北冬虫夏草萜类化合物类胡萝卜素合成的关系, 本研究通过构建 *erg1* 基因的过表达载体, 用根瘤农杆菌侵染的方式将核酸片段插入到北冬虫夏草基因组中, 然后通过 3 轮传代筛选 *erg1* 基因过表达稳定遗传菌株<sup>[19]</sup>, 测定类胡萝卜素生物合成量并进行 *erg1* 基因的功能验证, 为北冬虫夏草萜类化合物生物合成机制及功能基因的分析研究奠定实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

北冬虫夏草 (*Cordyceps militaris*) CM10 菌株购于山东省宁阳县海鑫生物科技有限公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL-1 购于上海唯地生物技术有限公司; 质粒 pCambia0390-blpR-Pcmgpd 为所在研究组实验室保存。

#### 1.1.2 主要实验仪器

5804R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; FRESCO21 微量台式冷冻离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; CFX96 Real-Time PCR Detection System、MJ Mini PCR、GelDoC<sup>TM</sup>XR+凝胶快速成像系统, BIO-RAD 公司。

#### 1.1.3 引物

本文所用引物如表 1 所示。

表 1 基因扩增的引物序列

Table 1 Primer sequences for gene amplification

引物名称	引物序列 (5'-3')
erg1-1F	AACAAAGGGGAGGGGTGATG
erg1-1R	GCAGCAGCAGTAGGGGAAAA
erg1-2F	CTCTCACCTCACTTTTCTAATCAAGAACATGTACAATGGCTGGAATCTGCCGATTGAC
erg1-2R	TGGTGGTGGCTAGCGTTAACTAGTCCGAAATCCCTCCCTCCAAATCAG
tef1-F	GTCAAGGAAATCCGTCGTGGTAA
tef1-R	GCAGGCGATGTGAGCAGTGTG
erg1-F	GGCCTACCACTTCTTCTCCG
erg1-R	CAAAAACACCACACACGCCT
check-F	CCATCTACCACGCTCTACCC
check-R	CGGCAGGTGATACTGTCAATGTTC

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 *erg1* 基因全长克隆

北冬虫夏草基因组 DNA 按照 Omega 真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (Omega) 说明书进行提取。根据北冬虫夏草 *erg1* 基因 (GenBank: NW\_006271973.1) 的上下游序列, 设计引物 *erg1*-1F/1R 并对目的基因进行扩增。以 PCR 产物为模板, 利用引物 *erg1*-2F/2R, 在 *erg1* 片段上游下游分别引入限制性酶切位点和同源臂序列。阴性对照以超纯水作为模板进行 PCR 扩增。反应体系 (50  $\mu$ L): 模板 1  $\mu$ L (<200 ng), 上下游引物各 1.5  $\mu$ L (0.3  $\mu$ M), KOD FX 1  $\mu$ L (1 U), dNTPs 10  $\mu$ L (0.4 mM),  $2\times$ PCR buffer 25  $\mu$ L, 加超纯水至 50  $\mu$ L。PCR 条件为: 94  $^{\circ}$ C 2 min, 98  $^{\circ}$ C 10 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 切下目的条带并使用琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒 (MAGEN) 回收目的片段和进行测序比对。

### 1.2.2 *erg1* 基因过表达载体的构建

利用 *Bsp*1407 I 和 *Bcu* I 对纯化的目的片段和 pCambia0390-blpR-Pcmgpd 质粒进行双酶切处理并纯化回收。利用 Seamless Assembly Cloning Kit (Taihe) 将线性化的 pCambia0390-blpR-Pcmgpd 质粒和目的基因片段进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞并于含卡那霉素的 LB (10 g 胰蛋白胨, 5 g 酵母提取物, 10 g 氯化钠, 1 L 超纯水, pH 7.0) 平板中 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。挑选拟转化子并扩大培养, 提取质粒进行测序鉴定, 将正确的重组质粒命名为 pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* (图 1)。

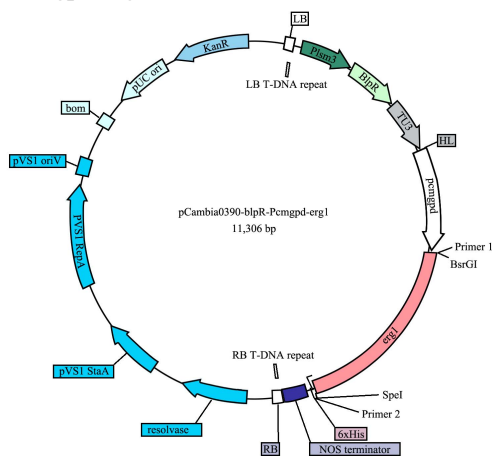


图 1 重组载体 pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* 质粒图谱

Fig.1 The plasmid profile of recombinant vector pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1*

### 1.2.3 质粒电转化根瘤农杆菌

将重组质粒与 100  $\mu$ L 根瘤农杆菌 AGL-1 菌株感

受态细胞在冰浴中混合, 转移至冷冻电击杯中并置于电转仪。在电压 1.8 kV, 1 pulse 条件下进行电击处理, 结束后加入 1 mL LB 培养基, 30  $^{\circ}$ C 震荡培养 2~3 h 并涂布于含有卡那霉素和羧苄青霉素的 LB 平板, 30  $^{\circ}$ C 培养 2~3 d 至菌落形成。

### 1.2.4 根瘤农杆菌侵染北冬虫夏草孢子

将北冬虫夏草菌株接种到 PPDA (200 g 马铃薯, 20 g 葡萄糖, 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 g  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 g 蛋白胨, 15 g 琼脂, 10 mg 维生素 B<sub>1</sub>, 加超纯水至 1 L) 平板, 25  $^{\circ}$ C 暗培养 14~21 d, 光照 5~7 d。用 0.05% 吐温 80 溶液润洗平板表面菌丝, 收集孢子, 使孢子浓度为每毫升  $10^4\sim 10^6$  个/mL, 于无菌离心管中备用。

挑取携带重组质粒的根瘤农杆菌转化子单菌落扩大培养后接种到含乙酰丁香酮的 IM 培养基 (1.45 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.05 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.15 g NaCl、0.5 g  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、66 mg  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、2.48 mg  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1.8 g 葡萄糖、5 mL 甘油, 用超纯水定容至 1 L, pH 5.5) 中, 起始浓度 OD<sub>600</sub> 为 0.15, 震荡培养 12 h 左右至 OD<sub>600</sub> 为 0.8。与北冬虫夏草孢子悬浮液按照一定比例混合均匀, 涂布在贴有玻璃纸的 IMA 培养基平板 (含乙酰丁香酮), 25  $^{\circ}$ C 黑暗培养 2~3 d。待玻璃纸有白点冒出时, 将玻璃纸转移至 PDA 培养基 (含有羧苄青霉素和 Basta) 上, 25  $^{\circ}$ C 黑暗培养 5~7 d 至转化子出现。

挑取拟转化子至 PDA 培养基, 待菌落长至直径为 2 cm 提取基因组并用引物 check-F/check-R 进行 PCR 验证, 将正确的北冬虫夏草转化子命名为 Cmerg1。

### 1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测基因表达水平

取北冬虫夏草菌丝球在液氮中充分研磨, 利用真菌 RNA 提取试剂盒 (Omega) 提取总 RNA。使用 TransScript<sup>®</sup> One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 反转录合成 cDNA。采用 SYBRGreen II 嵌合荧光法, 以 cDNA 为 qRT-PCR 的模板, *tefl* 为内参基因<sup>[20]</sup>, 检测 *erg1* 基因在空白组、胁迫因子  $\text{KMnO}_4$  组、胁迫因子 NaCl 组中的表达差异水平。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 30 s, 94  $^{\circ}$ C 5 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 10 s, 40 个循环。用 Excel 统计内参基因与目的基因 *erg1* 的 Ct 值, 计算  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  显示表达水平<sup>[21]</sup>。

### 1.2.6 类胡萝卜素的测定

接种 CM10 菌株、Cmerg1 菌株于 PDA 液体培养基, 25  $^{\circ}$ C、150 r/min 黑暗培养 6 d, 后分别加入胁迫因子高锰酸钾 (0.4 g/L) 和氯化钠 (2 g/L) 再光照培养 5 d。菌丝体进行冷冻干燥后, 用酸加热法测定菌丝体的类胡萝卜素含量<sup>[22]</sup>。

### 1.2.7 数据处理

每个样品设置 3 个平行，实验数据采用“mean±SD”表示。应用 GraphPad Prism 8 软件进行数据分析和柱形图的绘制，当  $p < 0.05$  时显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *erg1* 基因克隆及纯化

以北冬虫夏草 CM10 菌株基因组 DNA 为模板，*erg1*-1F/1R 为引物进行扩增，再以 *erg1*-2F/2R 为引物进行二次 PCR 得到 *erg1* 上下游同源臂。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，发现在 2000 bp 处都有明显的单一条带，与预计大小一致（图 2）。目的基因的测序结果表明，*erg1* 上下游同源臂已经成功克隆。

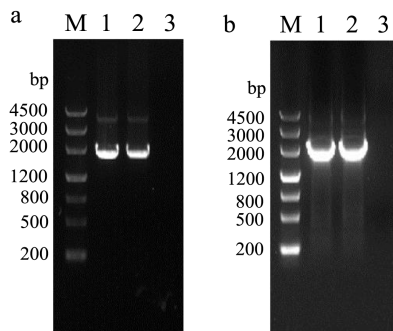


图 2 *erg1* 的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification for *erg1* gene

注：(a) 目的基因 *erg1* 上下游延伸序列的 PCR 扩增 (M: DNA marker; 1 和 2: 目的基因 *erg1* 上下游延伸序列; 3: 阴性对照); (b) 目的基因 *erg1* 上下游同源臂的 PCR 扩增 (M: DNA marker; 1 和 2: 目的基因 *erg1* 上下游同源臂; 3: 阴性对照)。

### 2.2 重组载体 pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* 的构建及转化

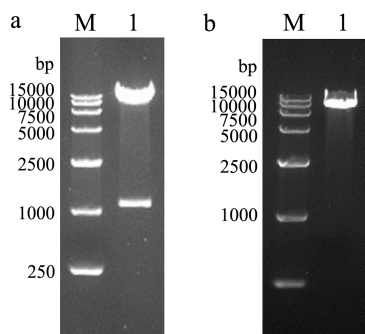


图 3 质粒的酶切与重组质粒的鉴定

Fig.3 Enzymatic digestion and identification of recombinant plasmids

注：a: 质粒 pCambia0390-blpR-Pcmgpd 双酶切处理 (M:

DNA marker; 1: pCambia0390-blpR-Pcmgpd 质粒双酶切电泳结果); b: 重组质粒 pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* 的鉴定 (M: DNA marker; 1: pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* 质粒电泳结果)。

对 pCambia0390-blpR-Pcmgpd 质粒进行双酶切处理，切胶回收 9410 bp 的线性载体（图 3a）。将目的基因 *erg1* 上下游同源臂与线性载体连接后转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ，接着进行菌液 PCR 鉴定及质粒 *Bsp*1407 I 和 *Bcu* I 双酶切鉴定。对重组载体进行提取（图 3b），测序分析进一步验证重组载体 pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* 被成功构建。利用电转化方式将载体转至根瘤农杆菌 AGL-1 内，菌液 PCR 鉴定拟转化子，结果表明根瘤农杆菌 AGL\_pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* 被成功构建。

### 2.3 北冬虫夏草重组转化子的检验

用根瘤农杆菌 AGL\_pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1* 对北冬虫夏草 CM10（图 4）孢子进行侵染，在无抗的平板上培养 3 d 后，将玻璃纸转移至含相应抗生素的培养基平板上继续暗培养，待开始萌发白色菌丝点时，将拟转化子挑至含有 Basta 抗生素的平板上培养。菌落形成后（图 5），刮取拟转化子菌丝进行 PCR 鉴定。将获得的抗性转化菌株连续传代，并进行 PCR 鉴定（图 6），在 845 bp 大小处有目的条带的即为稳定菌株，选取 3 代传代的稳定菌株进行后续实验。

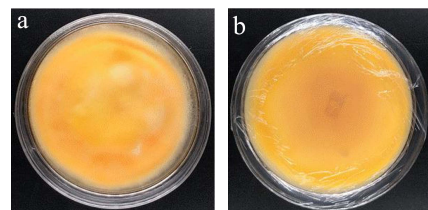


图 4 北冬虫夏草 CM10 的菌落

Fig.4 Colony of *C. militaris* CM10

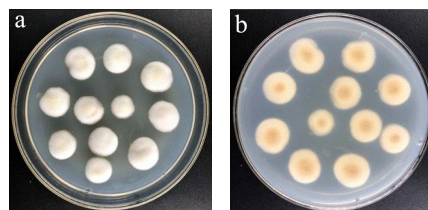
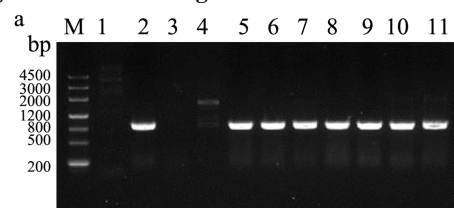


图 5 *C.erg1* 重组转化子的菌落

Fig.5 Colonies of *C.erg1* recombinant transformation



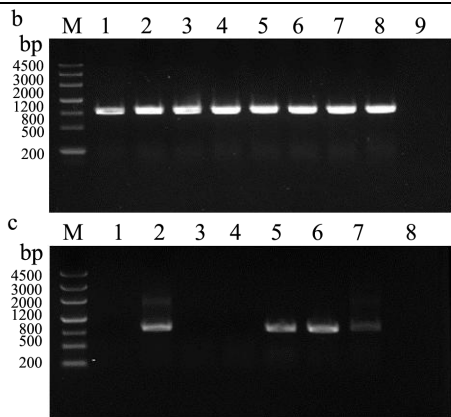


图6 Cmerg1 拟转化子菌丝 PCR 的鉴定

Fig.6 Colony-PCR verification of Cmerg1 transformation candidates

注：(a) Cmerg1 拟转化子第一轮菌丝 PCR 验证结果 (M: DNA marker; 1: 阴性对照; 2-11: 拟转化子 PCR 鉴定); (b) Cmerg1 拟转化子第二轮菌丝 PCR 验证结果 (M: DNA marker; 1-8: 转化子 PCR 鉴定; 9: 阴性对照); (c) Cmerg1 拟转化子第三轮菌丝 PCR 验证结果 (M: DNA marker; 1: 阴性对照; 2-8: 转化子 PCR 鉴定)。

2.4 qRT-PCR 检测基因相对表达量

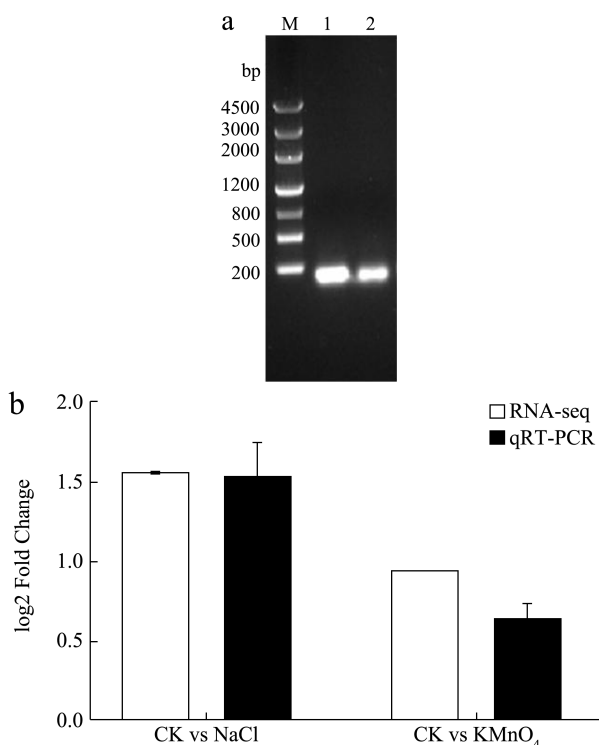


图7 *erg1* 引物鉴定及 qRT-PCR 表达量验证

Fig.7 Primer identification of *erg1* gene and qRT-PCR expression verification

以北冬虫夏草 cDNA 为模板，分别以 *tef1*-F/R、*erg1*-F/R 为引物，进行 PCR 扩增检验引物特异性 (图 7a)。样品分为 3 组不同处理的北冬虫夏草菌株，每组

样品 3 个平行，每个样品 3 个重复，比较各样品 (空白组、胁迫因子  $KMnO_4$  组、胁迫因子  $NaCl$  组) 中 *erg1* 基因的相对表达量的差异 (图 7b)。结果显示，添加  $KMnO_4$  环境因子后  $log_2FC$  是 0.65 (RNA-seq 中  $log_2FC$  是 0.95)，添加  $NaCl$  环境因子后  $log_2FC$  是 1.54 (RNA-seq 中  $log_2FC$  是 1.56)，*erg1* 基因的表达水平与 RNA-seq 的结果一致，表明转录组的数据是准确的。实时荧光定量 PCR 分析表明，*erg1* 基因表达量在添加  $KMnO_4$  和  $NaCl$  环境因子后上升，推测 *erg1* 基因与类胡萝卜素的生物合成有关，其具体的调控机制有待于进一步研究。

2.5 转化子中类胡萝卜素含量的测定

对稳定遗传的第四代重组转化株 Cmerg1 进行类胡萝卜素含量分析，结果表明高锰酸钾、氯化钠胁迫处理引起重组转化株 Cmerg1 的类胡萝卜素的累积量增加 (图 8)。不添加任何胁迫的对照菌株类胡萝卜素累积量是  $3139.10 \mu g/g$ 。高锰酸钾胁迫下，CM10 菌株、Cmerg1 菌株的类胡萝卜素累积量分别是  $5523.92 \mu g/g$ 、 $6757.17 \mu g/g$ ，Cmerg1 菌株是对照菌株 CM10 的 1.22 倍；氯化钠胁迫使 CM10 菌株、Cmerg1 菌株类胡萝卜素含量分别是  $5309.74 \mu g/g$ 、 $6363.93 \mu g/g$ ，Cmerg1 菌株是对照菌株 CM10 的 1.20 倍。先前有研究表明，*Erg1* (单氧酶) 催化 FPP 生成脱氢角鲨烯，促进 C30 类胡萝卜素的合成<sup>[23]</sup>，本文与其研究结果一致。在添加高锰酸钾、氯化钠胁迫因子后重组转化株 Cmerg1 类胡萝卜素的含量均发生了增加，与对照组菌株相比有显著性的差异变化，表明 *erg1* 基因过表达后北冬虫夏草 Cmerg1 菌株产类胡萝卜素的能力有上升，推测 *erg1* 基因促进类胡萝卜素的合成。

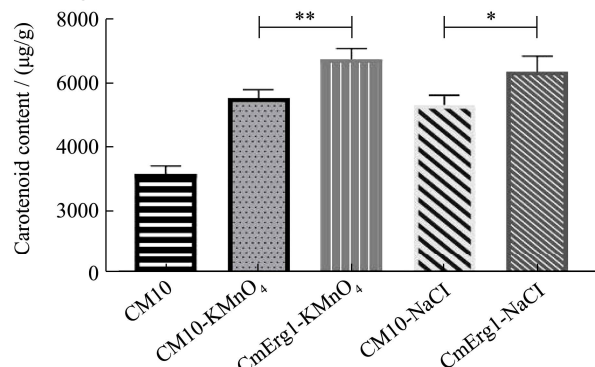


图8 北冬虫夏草 CM10 和重组转化株 Cmerg1 类胡萝卜素含量

Fig.8 Carotenoid production in mycelium of the *C. militaris* CM10 and Cmerg1

注：采用 *t* 检验进行统计学分析 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )。

### 3 结论

3.1 基于前期转录组的数据分析,获得了参与北冬虫夏草类胡萝卜素合成的潜在基因 *erg1*。本论文构建了 *erg1* 基因过表达载体 pCambia0390-blpR-Pcmgpd-*erg1*, 通过农杆菌侵染的方式在北冬虫夏草中进行表达, 然后摇瓶发酵测定北冬虫夏草类胡萝卜素生物合成量进行 *erg1* 的功能验证。结果表明, 添加高锰酸钾、氯化钠胁迫因子后重组转化株 C*merg1* 类胡萝卜素的含量均有显著增加, 推测角鲨烯单氧酶 Erg1 催化形成脱氢角鲨烯用于类胡萝卜素合成, 该酶参与了北冬虫夏草类胡萝卜素的合成过程。

3.2 本研究构建的 *erg1* 基因的北冬虫夏草过表达载体及其突变株, 为北冬虫夏草的基因过表研究提供了实验基础, 有利于推进北冬虫夏草类胡萝卜素的生物合成机制研究和开发利用。

### 参考文献

- [1] Cui J D. Biotechnological production and applications of *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2015, 35(4): 475-484
- [2] Lou H W, Zhao Y, Tang H B, et al. Transcriptome analysis of *Cordyceps militaris* reveals genes associated with carotenoid synthesis and identification of the function of the *Cmtns* gene [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1664-302X
- [3] Jeong M H, Lee C M, Lee S W, et al. Cordycepin-enriched *Cordyceps militaris* induces immunomodulation and tumor growth delay in mouse-derived breast cancer [J]. Oncology Reports, 2013, 30(4): 1996-2002
- [4] 涂俊铭,王碧,夏险. 蛹虫草生物活性成分及药理作用研究进展[J]. 食用菌, 2020, 42(6): 4-7
- [5] TU Jun-ming, WANG Bi, XIA Xian. Research progress on bioactive components and pharmacological effects of *Cordyceps militaris* [J]. China Academic Journal Electronic Publishing House, 2020, 42(6): 4-7
- [5] Kim H G, Shrestha B, Lim S Y, et al. Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- $\kappa$ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells [J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 545(2-3): 192-199
- [6] Zhang J, Wang F, Yang Y, et al. CmVVD is involved in fruiting body development and carotenoid production and the transcriptional linkage among three blue-light receptors in edible fungus *Cordyceps militaris* [J]. Environmental Microbiology, 2019, 22(1): 466-482
- [7] 李栋,林俊芳,刘聪,等. 蛹虫草类胡萝卜素双加氧裂解酶基因的克隆及表达分析[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 215-220
- [7] LI Dong, LIN Jun-fang, LIU Cong. Cloning and expression analysis of carotenoid cleavage dioxygenase gene from *Cordyceps militaris* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019 19(7): 215-220
- [8] Jiaojiao Z, Fen W, Kuanbo L, et al. Heat and light stresses affect metabolite production in the fruit body of the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(10): 4523-4533
- [9] Kot A M, Błażej S, Kieliszek M, et al. Effect of exogenous stress factors on the biosynthesis of carotenoids and lipids by *Rhodotorula* yeast strains in media containing agro-industrial waste [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(10): 157
- [10] 袁越,何伟俊,谭国燊,等. 北冬虫夏草抗氧化系统对金属离子和氧化物的响应分析[J]. 现代食品科技, 2020, 36(10): 1-7
- [10] YUAN Yue, HE Wei-jun, TAN Guo-shen. Response of antioxidant system of *Cordyceps militaris* to metal ions and oxidizing agents [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(10): 1-7
- [11] 付鸣佳. 蛹虫草产类胡萝卜素的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5): 107-110
- [11] FU Ming-jia. Study on the carotenoid produced from *Cordyceps militaris* L [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 24(5): 107-110
- [12] Tang H, Chen C, Zou Y, et al. Purification and structural characterization of a novel natural pigment: cordycepine from edible and medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(19): 7943-7952
- [13] Dong J Z, Wang S H, Ai X R, et al. Composition and characterization of cordyxanthins from *Cordyceps militaris* fruit bodies [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(3): 1450-1455
- [14] 徐慧,陈蕾蕾,赵双芝,等. 灵芝菌丝体的三萜类化合物及其抗肿瘤活性研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报(自然科学版), 2016, 30(4): 26-29
- [14] XU Hui, CHEN Lei-lei, ZHAO Shuang-zhi. Recent progress in anti-tumor activities of *Ganoderma* triterpene from the mycelia of liquid-cultured *Ganoderma lucidum* [J]. Journal of Qilu University of Technology, 2016, 30(4): 26-29

(下转第278页)