

核糖核酸还原酶基因对虫草素的转录调控作用

刘玟妍¹, 王天添¹, 陈思秀¹, 翟英南¹, 李明成^{1,2}, 孙丽媛¹

(1. 北华大学医学技术学院, 吉林吉林 132013) (2. 吉林省中药 DNA 指纹检测技术科技创新中心, 吉林吉林 132013)

摘要: 检测和分析核糖核酸还原酶大亚基 (*RNR-LC*) 基因、小亚基 (*RNR-M2*) 基因在不同蛹虫草菌株中 mRNA 的相对表达量与虫草素含量的变化关系, 探究核糖核酸还原酶在虫草素合成途径中的转录调控作用。检测不同蛹虫草菌株虫草素含量, 采用荧光 PCR 技术对蛹虫草 *RNR-LC* 基因、*RNR-M2* 基因表达的 mRNA 进行定量分析, 并应用双内参基因对试验数据进行校正。以虫草素含量最低的野生蛹虫草组为对照, 米基虫草组 *RNR-LC*、*RNR-M2* 基因的 mRNA 表达量分别是野生蛹虫草组的 1.28 倍和 1.47 倍, 蚕蛹虫草组分别是其 2.35 倍和 3.84 倍。与对照组相比, *RNR-M2* mRNA 表达随虫草素的增加总体呈现升高的变化规律。两种基因在不同蛹虫草菌株中的相对表达量存在显著性差异 ($p < 0.05$)。 *RNR-M2* 基因在高虫草素菌株中存在明显的表达优势, 而 *RNR-LC* 基因表达量与虫草素含量无明显变化关系, 二者不存在协同调控作用。推测 *RNR-M2* 基因在虫草素合成途径中起着重要的正向调控作用。

关键词: 蛹虫草; 虫草素; 核糖核苷酸还原酶; 转录调控

文章编号: 1673-9078(2020)09-41-46

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.9.0276

Transcriptional Regulation of Cordycepin by a Ribonucleotide Reductase Gene

LIU Wen-yan¹, WANG Tian-tian¹, CHEN Si-xiu¹, ZHAI Ying-nan¹, LI Ming-cheng^{1,2}, SUN Li-yuan¹

(1. School of Medical Technology, Beihua University, Jilin 132013, China) (2. Jilin Province Traditional Chinese Medicine DNA Fingerprint Detection Technology Innovation Center, Jilin 132013, China)

Abstract: The relationships between relative mRNA expression levels of the large ribonuclease reductase subunit (*RNR-LC*) and small subunit (*RNR-M2*) genes and cordycepin content in different *Cordyceps militaris* strains were determined and analyzed to investigate the transcriptional regulation of the cordycepin synthesis pathway by RNR. Cordycepin content in various *C. militaris* strains was measured, and quantitative analysis of mRNA expressed by the *RNR-LC* and *RNR-M2* genes was performed by quantitative fluorescent PCR with the use of two internal control genes for experimental data correction. Wild *C. militaris*, which had the lowest cordycepin content, was used as control. Results indicated that mRNA expression levels of the *RNR-LC* and *RNR-M2* genes in the rice-cultivated *C. militaris* group were 1.28 and 1.47 times that of the control group, respectively. The corresponding mRNA expression levels of the silkworm chrysalis-cultivated *C. militaris* group were 2.35 and 3.84 times that of the control group, respectively. Compared with the control group, the mRNA expression level of *RNR-M2* generally increased with an increase in cordycepin content. There were significant differences in the relative expression levels of both genes among different *C. militaris* strains ($p < 0.05$). Obvious dominant expression of the *RNR-M2* gene was observed in strains with high cordycepin content, while the expression level of the *RNR-LC* gene did not change significantly with cordycepin content. Therefore, a synergistic regulatory role does not exist between the two genes. It can be deduced that the *RNR-M2* gene plays a key role in the positive regulation of the cordycepin synthesis pathway.

引文格式:

刘玟妍,王天添,陈思秀,等.核糖核酸还原酶基因对虫草素的转录调控作用[J].现代食品科技,2020,36(9):41-46

LIU Wen-yan, WANG Tian-tian, CHEN Si-xiu, et al. Transcriptional regulation of cordycepin by a ribonucleotide reductase gene [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(9): 41-46

收稿日期: 2020-03-23

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20190301014NY; 20190304101YY; 20190902018TC); 北华大学研究生创新计划(北华研创合字[2018]040; 北华研创合字[2018]037)

作者简介: 刘玟妍(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品及中药 DNA 指纹技术研究与应用

通讯作者: 孙丽媛(1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 微生物及食品及中药 DNA 指纹技术研究与应用

Key words: *Cordyceps militaris*; cordycepin; ribonucleotide reductase; transcriptional regulation

昆虫病原真菌属于子囊菌的肉座菌目,广泛分布于自然环境中,虫草是其中的一个大属。蛹虫草作为传统中药市场中主要的物种之一,具有产生大量虫草素的潜力^[1],被广泛应用于传统中药、保健食品甚至化妆品中^[2]。

虫草素(Cordycepin)即3'-脱氧腺苷是蛹虫草(*Cordyceps militaris*)重要药用成分之一,也是第一个从真菌里发现的核苷类抗菌素,具有广泛的生物活性,包括抗炎、抗肿瘤、抗病毒和免疫调节等^[3]。此外,虫草素也被证明是癌症治疗和预防酒精肝的潜在候选药物。王成树^[4]团队揭示了蛹虫草能够合成具有抗癌活性的喷司他丁,可作为保护分子与虫草素伴随生成,为其抗癌活性提供了分子依据。由于蛹虫草野生资源已经无法满足消费者的市场需求,现多采用人工培养的方式对蛹虫草进行规模化生产,包括蚕蛹接种培养和人工固体培养基(大米、小麦等)培养,积极推动了虫草素等有价值的次级代谢物的生物制造与开发^[5]。但目前虫草素的分离纯化技术不成熟,提取率较低;化学合成的虫草素合成效率低,无法实现大规模生产;通过发酵得到的菌丝体虫草素含量低,工业化生产成本高。因此,了解虫草素生物合成的基因和相关代谢功能,采用合成生物学方法获得虫草素成为了当下的研究热点。

虫草素的特殊功效被发掘以来,国内外学者对其不断进行深入探索。Zheng^[6]等利用鸟枪测序法对蛹虫草基因组进行测序,并对其物种基因进行了分析,发现蛹虫草含有大量与腺嘌呤和腺苷代谢相关的基因。鉴于目前虫草素的合成途径尚不清楚,一些学者提出了假说:Li等^[7]研究表明在2'-脱氧腺苷的代谢途径中,核糖核苷酸还原酶(Ribonucleotide reductase, RNR)可以将ADP还原成dADP;Glenna等^[8]认为,虫草素的生物合成机制依赖于还原步骤,可被RNR催化;Wanwipa等^[9]比较了蛹虫草、罗伯茨虫草、冬虫夏草等十一种虫草基因,发现仅蛹虫草不含有编码RNR抑制剂的序列,推断这可能是导致其产生大量虫草素的原因。本研究以人工培养蛹虫草(蚕蛹虫草、米基虫草)及野生蛹虫草作为试验对象,通过对比虫草素含量与RNR大亚基LC和小亚基M2基因相对表达量的关系,判断RNR的大小亚基基因表达在虫草素合成途径中的转录调控作用,为深入研究蛹虫草虫草素生物合成机制提供一定的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

虫草素对照品(批号:110858-201704,规格:20 mg)购自中国食品药品检定研究院。人工培养蛹虫草(蚕蛹虫草(J1-J6)、米基虫草(M1-M6))由吉林市食品药品监督管理局提供。野生蛹虫草分别采自吉林市搜登站镇(SD1-SD3)、吉林市永吉县(YY1-YY3)、长春市土门岭(TY1-TY3)、沈阳市于洪区(LY1-LY3)。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要仪器

Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪(DAD 检测器, OpenLAB 色谱工作站),美国 Agilent Technologies; 5100 Real-time Thermal Cycler, 美国 Thermo Fisher Scientific; Q6000 核酸蛋白分析仪, 美国 Quawell; KQ3200DE 型数控超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司; BHC-1300IIA2 生物安全柜, 苏州阿尔泰实验室设备有限公司; SZ-93 自动双重纯水蒸馏器, 上海亚荣生化仪器厂; GL-20G-II 型变速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; JA 5002 电子天平, 上海皓庄仪器有限公司。

1.2.2 主要试剂

TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit, 日本 TaKaRa; PrimeScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser, 日本 TaKaRa; 2×RealStar Green Power Mixture, 北京康润诚业生物科技有限公司; 6×loading buffer, 天根生化科技有限公司; 甲醇、乙醇均为色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司; 水为超纯水。

1.3 方法

1.3.1 虫草素标准曲线与含量测定

对虫草素的质量浓度进行线性回归分析,得回归方程为 $Y=33.06 X+1.39$, $R^2=0.99$ 。依照 NT/Y 2116-2012《中华人民共和国农业行业标准》^[10]规定的虫草制品中虫草素高效液相色谱检测方法进行测定。

1.3.2 RNR 基因相对表达量测定

1.3.2.1 引物的设计与合成

以 β -Actin、18S rRNA 作为内参基因,根据 GenBank 提供的蛹虫草 RNR-LC mRNA、RNR-M2 mRNA 及内参基因 β -Actin 和 18S rRNA mRNA 基因序列,Primer Premier 5.0 软件设计引物,Blast 同源性分析筛选特异性引物,荧光定量 PCR 引物序列见表 1。引物合成由深圳华大基因科技服务有限公司完成。

表 1 蛹虫草内参基因与候选基因引物序列

Table 1 Primer sequence of internal controls and target genes of *Cordyceps militaris*

基因	引物序列 (5'→3')	扩增长度/bp
β -Actin	F:TGCAAAGGAGTTGACTGGC	161
	R:GCCAGCCTCATCATACTCCT	
18s rRNA	F:CATTTC AACCCCTCGACGTCC	180
	R:TGATCCGAGGTCAACGTTCA	
<i>RNR-LC</i>	F:CCTAAGGTCCTTGCCACTGA	135
	R:AACGACGGCCTCAGAGATAAA	
<i>RNR-M2</i>	F:CTGCTATCGAGGGCATCT	162
	R:GGTTGTTCAAGTGGGAGTG	

1.3.2.2 总 RNA 的提取和反转录

取-80 °C冰箱中保存的蛹虫草样品，将子实体在液氮中充分研磨至细小粉末状，按照 TaKaRa 公司的植物 RNA 提取试剂盒提取子实体总 RNA，每个样品进行 3 次重复。使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 去除总 RNA 中掺杂的基因组 DNA 后，反转录合成 cDNA，-20 °C 冰箱保存以备后续实验使用。

1.3.2.3 荧光定量 PCR 反应体系及条件

采用 SYBRGreen II 嵌合荧光法，以反转录的 cDNA 样品作为实时荧光定量 PCR 的模板， β -Actin、18S rRNA 为内参基因，荧光定量 PCR 检测 *RNR-LC*、*RNR-M2* 基因表达。反应在 PikoReal 实时定量 PCR 仪上进行，每个样品做三次平行实验。荧光定量 PCR 反应程序如下：94 °C 预变性 10 min；95 °C 变性 15 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，40 个循环，并绘制熔解曲线，反应体系见表 2。

表 2 荧光定量 PCR 反应体系

Table 2 Reaction system of fluorescence quantitative PCR

反应试剂	使用量/ μ L
2×RealStar Green Power Mixture	10
反转录 cDNA	0.4
PCR Forward Primer(10 ng/ μ L)	0.4
PCR Reverse Primer(10 ng/ μ L)	0.4
dd H ₂ O	0.8
Total	8.8

1.3.3 数据统计分析

每个样品设置 3 个平行组，采用 Excel 统计目的基因与内参基因的 Ct 值，双内参基因相对 mRNA 水平采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测。利用 SPSS 19 统计软件中的 ANOVA 程序分析目的基因的相对表达量，试验数据采用“mean±SD”表示。应用 GraphPad Prism6 软件绘制柱形图，当 $p < 0.05$ 时，存在显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 虫草素含量测定

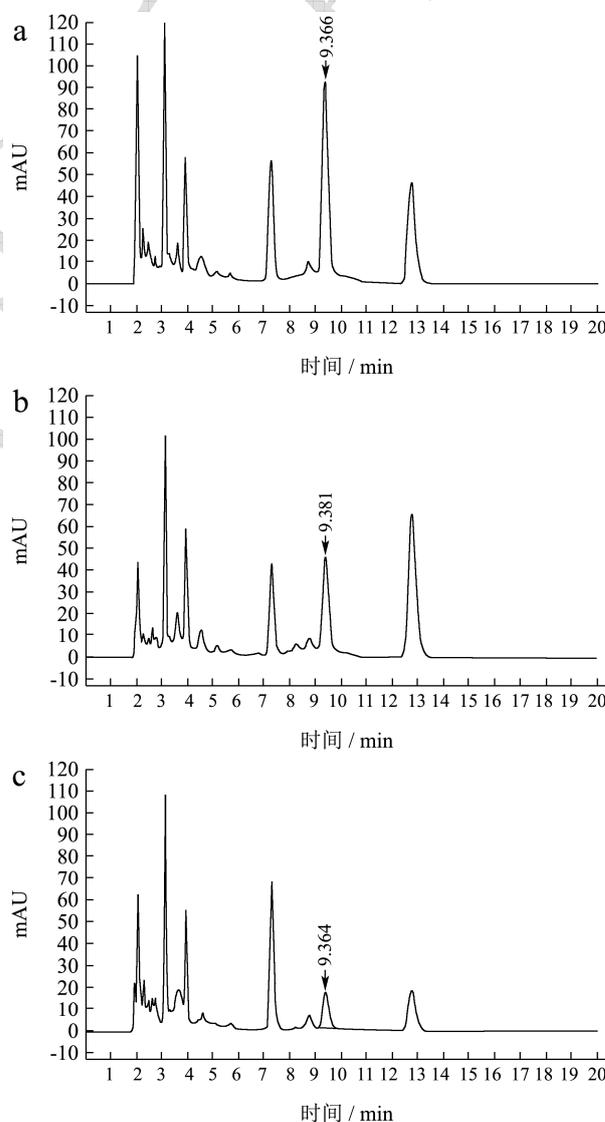


图 1 虫草素高效液相色谱图

Fig.1 HPLC of cordycepin

注: a: 蚕蛹虫草 (J01); b: 米基虫草 (M01); c: 野生蛹虫草 (SD1)。

虫草素高效液相色谱图见图 1, 将得到的峰面积代入标准曲线中, 计算得到各样品的虫草素含量, 换算为以每 g 蛹虫草含有虫草素量的百分数表示。测定结果见表 3。人工培养的蛹虫草菌株虫草素含量差异较大, 蚕蛹虫草的虫草素含量为 0.34%, 而米基虫草的虫草素含量为 0.19%, 仅为蚕蛹虫草的二分之一。野生蛹虫草对生长环境要求较低, 分布地区广, 各地区因环境条件不同导致野生蛹虫草的虫草素含量呈现地域差异。检测的长春土门岭、吉林搜登站镇、吉林永吉县和沈阳于洪区四个地域的蛹虫草, 总体虫草素含量在 0.06%~0.23%之间。野生菌株总体含量均低于蚕蛹虫草, 该结论与康丽娜^[11]关于野生与人工培养蛹虫草主要成分对比分析一文的结论相同。

表 3 虫草素含量测定结果

Table 3 Results of cordycepin content		
虫草类别	样品编号	平均含量/%
搜登站野生蛹虫草	SD1-SD3	0.09±0.01
永吉县野生蛹虫草	YY1-YY3	0.12±0.02
土门岭野生蛹虫草	TY1-TY3	0.08±0.01
于洪区野生蛹虫草	LY1-LY3	0.20±0.02
米基虫草	M1-M6	0.19±0.01
蚕蛹虫草	J1-J6	0.34±0.04

2.2 RNR-LC、RNR-M2 基因在蛹虫草中的表达

变化

在基因表达水平的研究中, 使用单内参基因会出现一定误差, OLIVEIRA 等^[12]研究发现, 应用不同内参基因计算可能出现 3~6.4 倍的差异, 个别或高达 20 倍, 根据单内参基因计算出的目标基因表达量变化存在一定的局限性, 不如双内参基因的分析精确。使用双内参基因可以消除极值, 使实验结果出现的范围缩小, 整体数值集中, 数据更为准确。

2.2.1 相对表达量检测效果比较

样本分为 3 组不同来源蛹虫草菌株, 每组样本设置 3 个平行, 每个样品设置 3 个重复。以各样品的 RNR-M2 基因对 RNR-LC 基因进行归一化处理, 比较各样品之间二者 mRNA 的相对表达量差异。不同内参基因标准化 mRNA 的相对表达量见图 2。结果表明, β -Actin 与 18S rRNA 单独作为内参基因计算 RNR-M2 基因相对 RNR-LC 基因 mRNA 的相对表达量总体趋势较一致, 但有极值出现, 如 β -Actin 组在 YY1 处出现极大值, M1 处出现极小值; 18S rRNA 组在 M1 处出

现极大值, YY1 处出现极小值。 β -Actin 和 18S rRNA 同时作为内参基因, 计算结果与单内参基因基本一致, 但相对表达量介于二者之间。

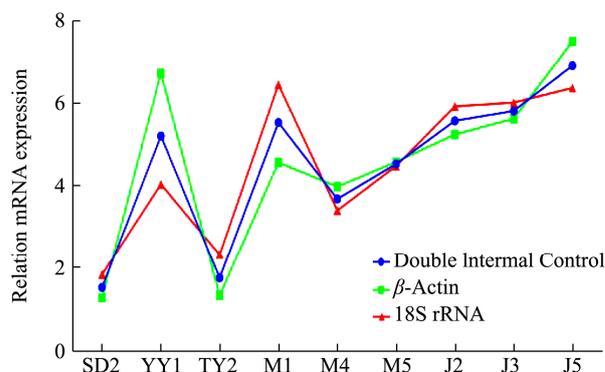


图 2 不同内参基因标准化 mRNA 的相对表达

Fig.2 Standardized mRNA relative expression under different internal controls

2.2.2 检测结果变异程度比较

变异系数 (coefficient of variation, CV) 是用来描述不同测量值均数相差较大时的离散程度, 统计学中用 SD 与 \bar{x} 之比表示。计算 β -Actin、18S rRNA 双内参基因和单内参基因时不同蛹虫草样品 RNR-M2 基因相对 RNR-LC 基因表达量的变异系数, 结果见图 3。结果显示, 双内参基因计算标准化 mRNA 相对表达量在大多数样品中变异系数较小, 且未出现极值; 而单内参基因计算, 样品 TY2、M5、J3 离散程度较大, 结果不可靠。

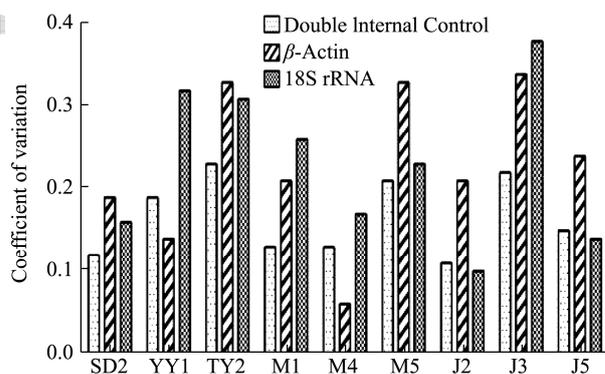


图 3 不同内参基因标准化 mRNA 相对表达量的变异系数

Fig.3 Coefficient of variation of relative expression of standardized mRNA under different internal controls

2.2.3 双内参基因 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测目的基因相对表达量

应用双内参基因计算, 即分别计算每个内参基因与目的基因的相对表达量, 取二者的几何平均数。以 RNR-LC、RNR-M2 基因在野生组的平均 Ct 值为对照, 计算米基组、蚕蛹组中目的基因的相对表达量差异; 分别以每组中虫草素含量最低样品 RNR-LC、RNR-M2 基因的平均 Ct 值为对照, 计算其余 2 个样品中目的基

因的相对表达量差异, 每个样品设置 3 个重复。根据组内差异与组间差异判断 *RNR-LC*、*RNR-M2* 基因 mRNA 相对表达量与虫草素含量的变化关系。

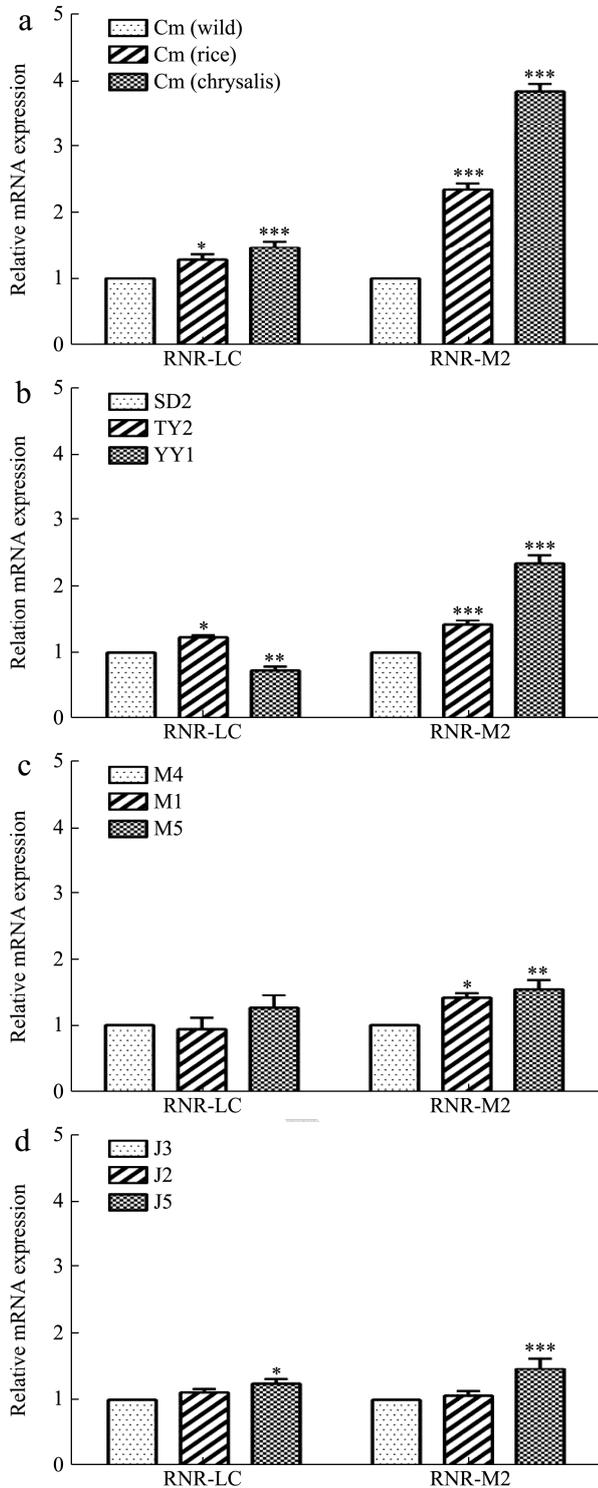


图 4 不同蛹虫草菌株 *RNR-LC*、*RNR-M2* 基因的 mRNA 表达量比较

Fig.4 Comparison of mRNA expression levels of different strains of *Cordyceps militaris* *RNR-LC* and *RNR-M2*

注: a: 野生组、米基组、蚕蛹组; b: 野生组 (SD2、TY2、YY1); c: 米基组 (M4、M1、M5); d: 蚕蛹组 (J3、J2、J5); 图 5 同。星号数量表示差异显著(*表示 $p < 0.05$ 、**表示 $p < 0.01$ 、

***表示 $p < 0.005$)。

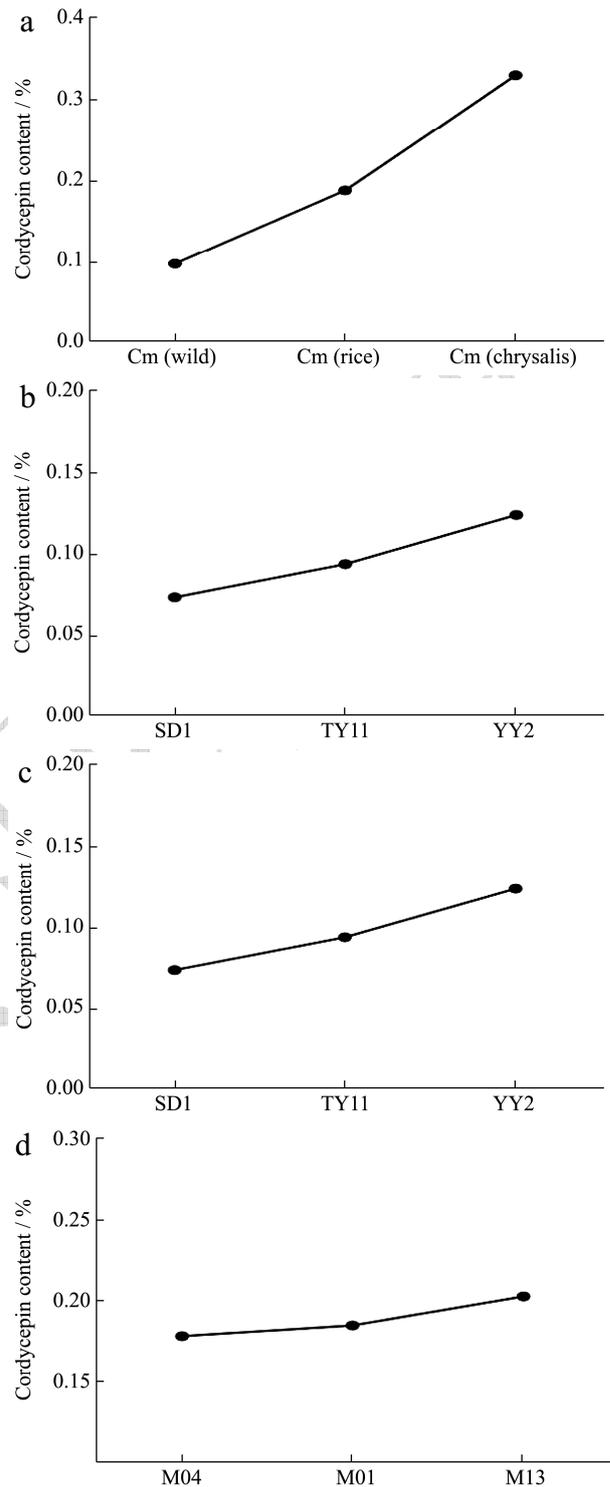


图 5 不同蛹虫草菌株虫草素含量变化

Fig.5 Changes of cordycepin content in different strains of *Cordyceps militaris*

RNR-LC、*RNR-M2* 基因在不同蛹虫草组别中的相对表达量差异见图 4a, *RNR-M2* 基因相对表达量变化趋势与图 5a 所示的虫草素含量呈正相关。以虫草素含量最低的野生蛹虫草组为对照, 米基虫草组 *RNR-LC*、*RNR-M2* 基因的 mRNA 表达量分别是野生蛹虫草组的

1.28 倍和 1.47 倍, 蚕蛹虫草组分别是其 2.35 倍和 3.84 倍。由图 4、5 可知, 与对照组相比, *RNR-M2* mRNA 表达随虫草素的增加总体呈现升高的变化规律, 而 *RNR-LC* mRNA 表达与虫草素含量无明显变化关系。两种基因在不同蛹虫草菌株中的相对表达量存在显著性差异 ($p < 0.05$)。王玉贤^[13]等将 *RNR* 大小亚基分别转入蛹虫草菌株中, 通过 HPLC 检测重组菌株虫草素含量, 结果显示, *RNR* 对虫草素合成具有一定地影响, 其中小亚基 *M2* 对虫草素的合成表现出促进作用, 而大亚基 *LC* 未发现明显作用, 与本研究结论相同。

3 结论

本研究分析了 *RNR* 的大小亚基基因在不同蛹虫草菌株中的相对表达量及其与虫草素含量的关联。利用 HPLC 法检测蛹虫草菌株虫草素含量, 利用荧光定量 PCR 法对蛹虫草中的 *RNR* 大小亚基基因进行转录组分析。以虫草素含量最低的野生蛹虫草组为对照, *RNR-LC*、*RNR-M2* 基因相对表达量均呈野生组最低、蚕蛹组最高。而以虫草素含量最低样品为对照做组内比较时, *RNR-M2* mRNA 表达随虫草素的增加总体呈现升高的变化规律, *RNR-LC* 基因表达量与虫草素含量无明显变化关系。结果表明, 蛹虫草 *RNR-M2* 基因在高虫草素菌株中存在明显的表达优势, 与虫草素的生物合成有关, 推测 *RNR-M2* 基因可能在虫草素合成途径中起着重要的正向调控作用。由于本试验只涉及了 *RNR* 基因转录水平上的表达, 且 *RNR-LC* 与 *RNR-M2* 基因在不同蛹虫草菌株间 mRNA 表达量存在显著差异, 差异原因及具体作用机制有待进一步深入探究。

参考文献

- [1] Wongs Boontariga, Raethong Nachon, Chumnanpuen Pramote, et al. Alternative metabolic routes in channeling xylose to cordycepin production of *Cordyceps militaris* identified by comparative transcriptome analysis [J]. Genomics, 2019, 112(1): 629-636
- [2] J M Park, J S Lee, K R Lee, et al. *Cordyceps militaris* extract protects human dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis and premature senescence [J]. Nutrients, 2014, 6: 3711-3726
- [3] 孙恩江, 刘琪, 黄志毅, 等. 虫草素的药理作用及其应用前景 [J]. 广东饲料, 2018, 27(5): 28-29
- [4] XIA Yong-liang, LUO Fei-fei, SHANG Yan-fang, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin [J]. Cell Chemical Biology, 2017, 24(12): 1479-1489
- [5] YIN Juan, XIN Xiang-dong, WENG Yu-jie, et al. Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration [J]. PLoS One, 2017, 12: E0186279
- [6] ZHENG Peng, XIA Yong-liang, XIAO Guo-hua, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine [J]. Genome Biology, 2011, 12(11): 1-21
- [7] LI Xiang, LI Ying, ZHU Ying-jie, et al. Transcriptome analysis of the *Ophiocordyceps sinensis* fruiting body reveals putative genes involved in fruiting body development and cordycepin biosynthesis [J]. Genomics, 2014, 103(1): 154-159
- [8] Glenna J, Kramer, Justin R Nodwell. Chromosome level assembly and secondary metabolite potential of the parasitic fungus *Cordyceps militaris* [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 912
- [9] Wanwipa Vongsangnaka, Nachon Raethongc, Warasinee Mujchariyakula, et al. Genome-scale metabolic network of *Cordyceps militaris* useful for comparative analysis of entomopathogenic fungi [J]. Gene, 2017, 626: 132-139
- [10] NT/Y 2116-2012 中华人民共和国农业行业标准[S] NT/Y 2116-2012 Agricultural Industry Standard of the People's Republic of China [S]
- [11] 康丽娜. 野生与人工培养蛹虫草主要成分对比分析[J]. 新农业, 2013, 3: 48-49
- [12] KANG Li-na. Comparative analysis of the main components of *Cordyceps militaris* in wild and artificial culture [J]. New Agriculture, 2013, 3: 48-49
- [13] Oliveira S R, Vieira H L, Duarte C B. Effect of carbon monoxide on gene expression in cerebrocortical astrocytes: validation of reference genes for quantitative real-time PCR [J]. Nitric Oxide, 2015, 49: 80-89
- [13] 王玉贤. 虫草素生物合成相关基因 *RNR* 的克隆及功能验证研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018
- [13] WANG Yu-xian. Research on cloning and functional verification of *RNR* related genes of cordycepin biosynthesis [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2018