

关键 NRPS 基因对紫芝活性肽 DLAP 合成的影响

肖珍艳^{1,2} 伍 强^{1,2,3} 王晓玲^{1,2} 黄 佳^{1,2} 王浩锦^{1,2} 刘高强^{1,2}

(1. 中南林业科技大学林业生物技术湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410004; 2. 中南林业科技大学森林资源生物技术湖南省国际科技创新合作基地, 湖南 长沙 410004; 3. 邵阳学院生态酿酒技术与应用湖南省重点实验室, 湖南 邵阳 422000)

摘要: [目的] 探究从紫芝发酵菌丝体中鉴定出的具有抑制血管紧张素转化酶的活性肽 Asp-Leu-Ala-Pro (DLAP) 的关键非核糖体肽合成酶 (non-ribosomal peptide synthetase, NRPS) 基因。 [方法] 采用 PEG 介导遗传转化试验, qRT-PCR 和 HPLC 分析关键 NRPS 基因对紫芝合成活性肽 DLAP 的影响。 [结果] qRT-PCR 分析阳性转化子菌株内的基因表达量显示, 与野生型相比较, 基因 *GSI_00900* 的 3 个沉默转化子的基因表达量分别下调了 44.99%, 68.88%, 66.17%, 基因 *GSI_10299* 的 3 个沉默转化子的基因表达量分别下调了 74.11%, 78.01%, 75.76%, 基因 *GSI_10830* 的 2 个沉默转化子的基因表达量分别下调了 30.55% 和 76.99%, 基因 *GSI_11441* 的 8 个沉默转化子的基因表达量下调范围为 19.43%~84.80%; HPLC 对阳性转化子的表型进行初探, 发现筛选到的每个阳性转化子内 DLAP 的含量均比野生型低 ($P < 0.05$)。 [结论] *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830*、*GSI_11441* 4 种 NRPS 基因是合成活性肽 DLAP 的关键基因。

关键词: 紫芝; 基因沉默; 活性肽; 非核糖体肽合成酶

Effect of key NRPS genes on synthesis of the active peptide DLAP in *Ganoderma sinense*

XIAO Zhenyan^{1,2} WU Qiang^{1,2,3} WANG Xiaoling^{1,2} HUANG Jia^{1,2} WANG Haojin^{1,2} LIU Gaoqiang^{1,2}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Forestry Biotechnology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 2. International Cooperation Base of Science and Technology Innovation on Forest Resource Biotechnology of Hunan Province, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China; 3. Hunan Key Laboratory of Ecological Winemaking Technology and Application, Shaoyang University, Shaoyang, Hunan 422000, China)

Abstract: [Objective] To explore the key non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) genes of the active peptide Asp-Leu-Ala-Pro (DLAP) with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity identified from the mycelia of *Ganoderma sinense*. [Methods] The effects of key NRPS genes on the synthesis of DLAP are analyzed by PEG-mediated genetic transformation experiment, real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), and high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] qRT-PCR results reveal that compared with the wild type, the silenced transformants of *GSI_00900* have the reductions of 44.99%, 68.88%, and 66.17% in the expression level of this gene. The three silenced transformants of *GSI_10299* show the reductions of 74.11%, 78.01%, and 75.76% in the expression level of this gene. The two silenced transformants of *GSI_10830* present reductions of 30.55% and 76.99%, and those of *GSI_11441* exhibit the expression declines ranging from 19.43% to 84.80%. HPLC results indicate that the DLAP content in each positive transformant was lower than that in the wild type ($P < 0.05$). [Conclusion] These four NRPS genes (*GSI_00900*, *GSI_10299*, *GSI_10830*, and *GSI_11441*) play a crucial role in the synthesis of DLAP.

Keywords: *Ganoderma sinense*; gene silencing; active peptide; non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (编号: 32202573); 湖南省自然科学基金项目 (编号: 2025JJ60140); 中南林业科技大学研究生创新项目 (编号: 2024CX02071)

通信作者: 伍强 (1989—), 女, 邵阳学院副教授, 博士。E-mail: qiangwusmile@163.com

收稿日期: 2025-02-21 **改回日期:** 2025-08-26

引用格式: 肖珍艳, 伍强, 王晓玲, 等. 关键 NRPS 基因对紫芝活性肽 DLAP 合成的影响[J]. 食品与机械, 2026, 42(1): 111-119.

Citation: XIAO Zhenyan, WU Qiang, WANG Xiaoling, et al. Effect of key NRPS genes on synthesis of the active peptide DLAP in *Ganoderma sinense*[J]. Food & Machinery, 2026, 42(1): 111-119.

紫芝(*Ganoderma sinense*)是中国著名的食药两用大型真菌,在东亚地区被广泛用于传统医学中,具有促进健康和长寿的作用^[1]。现代药理学研究表明,从紫芝中提取到的多糖、三萜类化合物、核苷酸、活性肽等多种活性成分,具有抗肿瘤^[2-3]、抗氧化^[4]、抗炎^[5-6]、降血压、抗癌^[7-8]等生理功能。活性肽是一类对生物机体的生命活动有益或具有生理作用的肽类化合物,由 2~20 个氨基酸以不同组成和排列方式构成,其相对分子质量小,部分活性肽结构复杂,具有磷酸化、糖基化或酰基化等修饰^[9]。截至目前,紫芝多糖、三萜类化合物的研究颇多,而关于活性肽方面的报道相对较少。

据估计,全世界超过 20% 的成年人患有高血压,并且至少有 45% 的心血管疾病死亡和 51% 的中风死亡是由高血压引起的,严重威胁着人类的生命健康,使得寻找安全有效的降血压药物成为了研究热点^[10]。食用菌是一类能够满足膳食需求的功能性食品,其活性成分丰富,从食药两用真菌的子实体中提取的血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽主要包括 LSMGSASLSP^[11]、AHEPVK^[12]、KIGSRSRFDVT^[13]和 GEP^[14]等,这些 ACE 抑制肽的相对分子质量均小于 3 000,无副作用且 IC₅₀ 值低,具有潜在的降血压功效。Wu 等^[15]从灵芝发酵菌丝体中提取到 3 种具有显著降血压活性的 ACE 抑制肽,即 QLVP、QDVL 和 QLDL。因此,从食药两用真菌中制备的天然 ACE 抑制肽能够成为临床上治疗高血压患者的候选药物。血管紧张素转化酶抑制肽的来源主要分为蛋白酶解、微生物发酵和非核糖体肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS) 3 种方式。NRPS 介导肽的生成是不需要模板 RNA 的参与,而是以蛋白质结构域的身份和排序在 NRPS 中构成模块,而且每个模块都由 3 个核心功能结构域构成,即腺苷酸化结构域(adenylation domain, A domain)、肽酰载体蛋白结构域(peptidyl carrier protein domain, PCP domain)和缩合结构域(condensation domain, C domain),其中 A domain 负责从底物池中特异性选择氨基酸,在 ATP 作用下活化底物生成相应的氨基酰-AMP;接着活化的氨基酰-AMP 与 PCP domain 上的巯基结合,形成氨基酰-S-载体复合物;再通过 C domain 催化氨基酸之间形成肽键^[16-18]。Zhu 等^[19]解析了紫芝的全基因组图谱,发现了能够参与紫芝体内非核糖体肽合成的 NRPS 基因簇。在此基础上,课题组在紫芝发酵菌丝体中分离纯化到一种新型的 ACE 抑制肽——Asp-Leu-Ala-Pro(DLAP),并证明此肽是由非核糖体肽合成酶途径合成。研究拟采用基因沉默技术解析 NRPS 基因对 DLAP 合成的影响,以期为进一步研究大型真菌内源性寡肽的合成及调控机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设备

电子天平:FA2004 型,上海舜宇恒平科学仪器有限

公司;

高效液相色谱仪:LC-6A 型,日本 Shimadzu 公司;

真空冷冻干燥机:SCIENTZ-18 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

荧光定量 PCR 仪:7500 型,美国 Applied Biosystems 公司;

多功能水平电泳槽:HE-120 型,上海天能科技有限公司;

台式恒温振荡器:HZQ-F280 型,太仓市华美生化仪器厂。

1.2 菌株与质粒

紫芝菌株(CGMCC5.0069):中国普通微生物菌株保藏管理中心(北京);

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、pTriExTM-4:北京擎科生物科技有限公司;

真菌沉默载体 pCambia1300T(含有 CaMV 35S 和 CmGPD 双启动子):实验室构建。

1.3 主要试剂与培养基

三氟乙酸、乙腈:色谱纯,上海阿拉丁生化科技有限公司;

溶壁酶:200 U/mg,广东省科学院微生物研究所;

氨基青霉素、卡那霉素、潮霉素:分析纯,上海麦克林生物科技有限公司;

异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG):分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司;

焦磷酸盐试剂盒(MAK168 型):美国 Sigma-Aldrich 公司;

DNA 凝胶回收试剂盒(N1073 型)、质粒小量提取试剂盒(N1013 型):广州东盛生物科技有限公司;

RNA 提取试剂盒(TCH020 型):日本 TaKaRa Bio 公司;

LB 液体培养基:氯化钠 10.0 g,蛋白胨 10.0 g,酵母粉 5.0 g,先加 800 mL 蒸馏水溶解后,用 NaOH 调 pH 值至 7.2~7.4,并定容至 1 000 mL,121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min;

种子培养基:沙氏葡萄糖液体培养基(SDB),海博生物技术有限公司;

发酵培养基:可溶性淀粉 41.0 g, NH₄Cl 5.0 g, 维生素 B₁ 0.05 g, K₂HPO₄ 1.5 g, 溶解于 800 mL 蒸馏水,充分搅拌均匀后, pH 调至 5.8~6.0, 定容至 1 000 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min;

MYG 液体培养基:称取麦芽糖 10.0 g, 葡萄糖 4.0 g, 酵母粉 4.0 g, 溶于 800 mL 含 0.6 mol/L 甘露醇渗透压稳定剂中,充分溶解后定容至 1 000 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min;

MYG 固体培养基:称取麦芽糖 10.0 g, 葡萄糖 4.0 g, 酵母粉 4.0 g, 琼脂粉 15.0 g, 溶于 800 mL 含 0.6 mol/L 甘露醇渗透压稳定剂中,充分溶解后定容至 1 000 mL, 121 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min。

1.4 紫芝合成 DLAP 的关键 NRPS 基因的筛选

下载 NCBI 上的紫芝(CGMCC5.0069)全基因组序

列,导入至 anti-SMASH 次级代谢产物数据库识别 NRPS 基因。NRPS 基因的 A domain 能够识别和激活底物氨基酸,对次级代谢产物的结构起着决定性作用,因此,将 A domain 作为一个切入点来筛选关键 NRPS 基因。采用 NRPS predictor 2 软件对所有的 NRPS 基因 A domain 进行底物氨基酸倾向性预测。

根据预测的结果进行 A domain 重组蛋白诱导表达及纯化,具体步骤为:利用高保真聚合酶(ApexHF HS DNA Polymerase FL)扩增 A domain 片段,PCR 程序结束后,进行琼脂糖凝胶验证并进行胶回收,以带有 His 标签的 pTriEx™-4 为载体,使用 Sac I 和 Kpn I 进行双酶切,胶回收后保存备用,将获得的 A domain 片段和线性化载体通过同源臂连接酶进行连接,并将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,将阳性克隆子送至检测机构测序并保存菌种,将测序正确的菌种质粒导入至大肠杆菌 BL21 细胞中,菌落检测后,在含有氨苄抗性的 LB 液体培养基中培养菌液至 OD 值为 0.6~0.8,再加入诱导剂 IPTG,使其终浓度为 0.5 mmol/L,28 °C、200 r/min 诱导 12 h,诱导结束后,使用镍柱亲和层析方法纯化 A domain 重组蛋白。

根据文献[20]的方法和焦磷酸盐试剂盒(MAK168 型)的说明书配制好反应液后,使用荧光酶标仪在 $\lambda_{ex}=316$ nm 和 $\lambda_{em}=456$ nm 下测量荧光吸收强度,再根据焦磷酸盐(PPi)的标准曲线计算出每个反应混合物中生成 PPi 的浓度,并将产生最大 PPi 浓度的氨基酸视为最佳底物,相对活性为 100%。

1.5 紫芝的关键 NRPS 基因沉默载体的构建

以公布在 NCBI 上的紫芝(CGMCC5.0069)基因组序列为依据, SnapGene 设计 NRPS 基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 沉默片段(250 bp)的上下游 PCR 扩增引物。以紫芝 DNA 为模板,按照高保真酶的说明书配制反应体系及 PCR 反应程序扩增目的条带,分别回收 4 种基因的单一目的条带(250 bp)并保存至 4 °C 冰箱备用。使用 BamH I 和 Xba I 限制性内切酶对质粒 pCambia1300T 进行双酶切,酶切产物经琼脂糖核酸电泳后,使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收线性化 pCambia1300T 载体。将上述获得的 4 种基因的沉默片段(250 bp)和线性化载体分别按 1:1 混匀后,采用同源臂连接酶在 37 °C 连接 30 min,获得 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 4 种 NRPS 基因的沉默重组质粒。然后,将酶连产物转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,再通过 PCR 扩增和 DNA 测序进行验证。

1.6 紫芝原生质体的制备

参照张银萍等^[21]的方法制备紫芝原生质体,并稍作调整。将原始菌种先于 SDA 固体培养基上活化 5~7 d (28 °C)后,再使用高温灭菌的接种刀切取 3~5 块均匀大小的菌块至 SDB 液体培养基中,静置培养 5~7 d,每隔 12 h 剧烈振荡 1 次。培养结束后,已知初重的 50 mL 无菌离心

管收集菌丝体,使用 0.6 mol/L 的甘露醇溶液清洗 3 次并称重,按比例加入溶壁酶(300 mg/mL),于 30 °C 酶解 2.5 h。酶解完成后,立即将酶解液转移至棉花针管过滤除掉细胞壁,并分装到 2 mL 无菌离心管中,4 °C、4 000 r/min 离心 10 min,收集原生质体,继续使用 1 mL 的 0.6 mol/L 甘露醇清洗 3~5 次,即可获得高纯度的原生质体。

1.7 PEG 介导遗传转化

参照辛燕花等^[22]的转化方法,并进行改良:将制备好的新鲜紫芝原生质体悬浮于 1 mL STC 缓冲液(100 mL STC 缓冲液中含有 0.74 g CaCl₂, 21.86 g 山梨醇, 1 mol/L Tris-HCl, pH 为 7.5),使其终浓度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 个/mL,然后各加入 4 种沉默重组质粒 1.0 μ g,另设一管不加质粒作为对照,加入 50 μ L 的 PEG 溶液(100 mL PEG 缓冲液中含有 0.74 g CaCl₂, 25.0 g PEG 4000, 0.6 mol/L 甘露醇, 1 mol/L Tris-HCl, pH 为 7.5),充分混匀后,冰浴 30 min,再加入 1 mL 的 PEG 溶液,室温下放置 25 min 后,4 °C、4 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,加入 5 mL MYG 液体再生培养基,28 °C 静置培养 3 d 后,涂布于含 50 μ g/mL Hyg 的 MYG 固体再生平板上,28 °C 培养 10 d,待长出菌落后,挑取单菌落在含 50 μ g/mL Hyg 的 SDA 培养基上进行筛选。

1.8 碱裂解法提取紫芝 DNA

参照王茜等^[23]的 DNA 提取方法,并作适当调整:在 1.5 mL EP 管中加入 50 μ L 50 mmol/L 的 NaOH 溶液,挑取每个拟转化子的菌丝体(尽量避免培养基)与碱溶液充分混合,98 °C 加热 10 min,冷却后加入 2.5 μ L 的 1 mol/L Tris-HCl(pH 7.5)缓冲溶液中和,12 000 \times g 离心 5 min,收集上清液,即为转化子 DNA 模板。

1.9 遗传转化子的鉴定

根据载体 pCambia1300T 的潮霉素序列,设计上下游引物分别为:5'-ATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3', 5'-TTTCTTTGCCCTCGGACGAGTG-3',以上述提取的 DNA 为模板,根据 Taq 酶的说明书配制反应体系,PCR 扩增程序为:变性温度 94 °C,退火温度 56 °C,延伸温度 72 °C,总共 35 个循环,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将阳性转化子和野生型接种于 SDB 液体培养基中,28 °C 恒温振荡培养 7 d 后,以接种量为 10% 的比例将种子液移至发酵培养基中深层发酵 6 d,收集菌丝体,分别提取阳性转化子和野生型菌丝体的总 RNA,用反转录试剂盒逆转录为 cDNA,通过 qRT-PCR 法检测转化子和野生型菌株中基因的相对表达量。紫芝 NRPS 基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 的 qRT-PCR 扩增上下游引物见表 1,内参基因 *BTU* 的扩增上下游引物为 5'-CTATTTCTTTGCCCTCGGAC-3', 5'-ATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3',反应体系和参数设置按 qPCR SYBR Green Pro Taq HS Mix(含 Rox)说明书(湖南艾科瑞生物工程有限公司)进行设置,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量^[24]。

表 1 4 种 NRPS 基因的 qRT-PCR 引物序列
Table 1 qRT-PCR primer sequences of four NRPS genes

引物名称	序列	碱基数
<i>GSI_00900</i> -F	CGCTGGAGGAAGTAGATGG	19
<i>GSI_00900</i> -R	CTTGTCAAAGGTCGTGGG	18
<i>GSI_10299</i> -F	CTTGTCAAAGGTCGTGGG	18
<i>GSI_10299</i> -R	ATGTGGAAGCAAGGTGT	18
<i>GSI_10830</i> -F	GGTCAAGGGACGGCACTA	18
<i>GSI_10830</i> -R	GGCTCCGAAGAACAAAGG	18
<i>GSI_11441</i> -F	AGATGATTACGGCGTCCCA	20
<i>GSI_11441</i> -R	CGGTCTCCGATTGCTTGTT	20

1.10 活性肽 DLAP 的固相合成

DLAP 的标准品是由赛默飞世尔科技(中国)有限公司固相合成,具体操作步骤为:称取 0.3 g 的 2-氯三苯甲基氯树脂(2-chlorotrityl chloride resin),放入反应容器中,加入二氯甲烷(dichloromethane, DCM)使树脂膨胀,保持 15 min,然后过滤除去 DCM,用 *N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)洗涤树脂 4 次,最后除去 DMF,备用。称取 3 倍摩尔质量的 Fmoc-L-Pro-OH、1-羟基苯并三唑(1-hydroxybenzotriazole, HOBt)、1,3-二异丙基碳二亚胺(*N,N*-diisopropylcarbodiimide, DIC)加入到反应容器中,继续加入 3 倍摩尔质量的 *N,N*-二异丙基乙胺(*N,N*-diisopropylethylamine, DIPEA)、DMF 和 DCM,持续搅拌 6 h 后,将上层溶液除去,再加入等体积的二异丙基乙胺与甲醇的混合液,静置 30 min 后,清除所有液体并用 DMF 溶液清洗 3 次。接着,加入含有 20% 哌啶(piperidine, PIP)的 DMF 溶液充分混合后静置 20 min,以解除与树脂结合的保护基团(Fmoc),倒出上层溶剂后,先用 DMF 洗涤 2 次,再用甲醇洗涤 2 次,整个过程重复一次,得到 Fmoc-L-Pro-Resin。重复上述操作,依次进行 Fmoc-L-Phe-OH 和 Fmoc-L-Ala-OH 与树脂的偶联过程,待所有偶联过程结束后,用 DMF 洗涤树脂 5 次,甲醇洗涤 2 次,三氟乙酸处理树脂,即获得 DLAP 粗品,最后用 HPLC 纯化 DLAP

直至纯度达到 95% 以上。

1.11 转基因紫芝表达产物的 HPLC 分析

发酵结束后,用蒸馏水冲洗 3~5 次,50 mL 离心管收集菌丝体,真空冷冻干燥机冻干(−80 ℃, 100 Pa, 48 h),称取 100 mg 冻干菌丝体,加入 1.5 mL 预冷的蒸馏水充分研磨,4 ℃、12 000×*g* 离心 20 min 后,收集上清液,即为紫芝多肽粗提取液。根据文献[15]所报道的多肽分离方法并作适当调整,进一步用 Symmetry-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm, Waters, Elstree, 137 U.K.)分离菌丝体中的目标肽,色谱条件为:流量 0.8 mL/min,检测波长 220 nm,流动相为乙腈(含 0.03% 三氟乙酸)和超纯水(含 0.04% 三氟乙酸),总时间 25 min,注射量 20 μL,洗脱程序:0~5 min,0% 乙腈;5~20 min,乙腈比例从 0% 线性增加至 90%;20~25 min,100% 乙腈。以固相合成的 DLAP 为标准品,比较野生型和阳性转化子中 DLAP 的峰强度和面积。

2 结果与分析

2.1 紫芝合成 DLAP 的关键 NRPS 基因的筛选

为筛选出紫芝合成活性肽 DLAP 的关键 NRPS 基因,首先利用 NRPS predictor 2 网站对紫芝所有 NRPS 基因的 A domain 进行底物氨基酸倾向性预测,预测结果显示,基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 的 A 结构域对组成活性肽 DLAP 的氨基酸(Asp、Leu、Ala 和 Pro)具有一定的倾向性,如表 2 所示,但预测结果的准确性还需通过试验进一步验证。如图 1 和图 2 所示,根据预测结果,通过构建原核表达体系,成功表达并纯化出 4 种

表 2 4 种 NRPS 基因 A 结构域的底物倾向性
Table 2 Substrate preference of A domains of four NRPS genes

NRPS 基因的 A 结构域	NRPS predictor 2 预测的底物
<i>GSI_00900</i>	Gly、Ala、Val、Leu、Ile
<i>GSI_10299</i>	Gly、Ala、Val、Leu、Ile
<i>GSI_10830</i>	Asp、Asn、Glu、Gln、Pro
<i>GSI_11441</i>	Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro

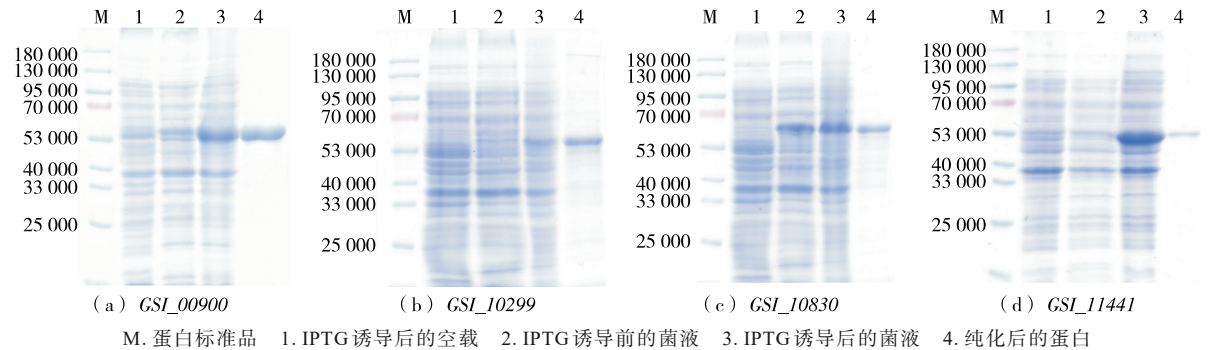


图 1 4 种 NRPS 基因 A 结构域的蛋白纯化

Figure 1 Protein purification of the A domains of four NRPS genes

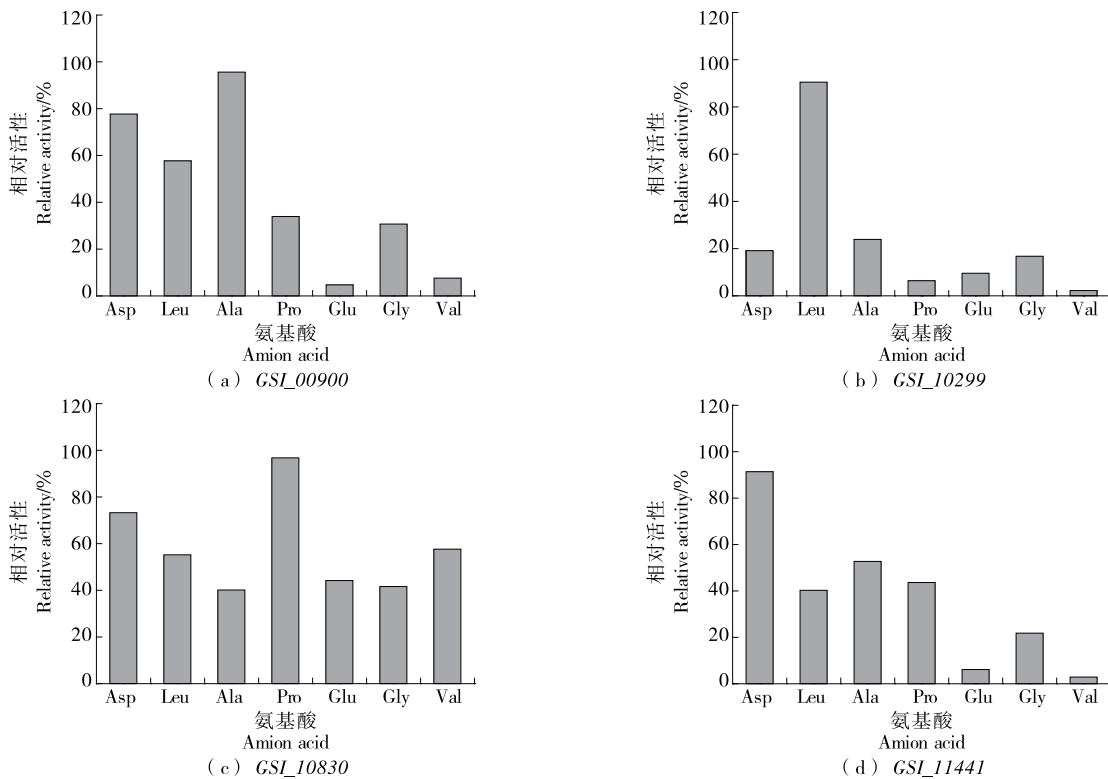


图2 4种NRPS基因A结构域的底物倾向性

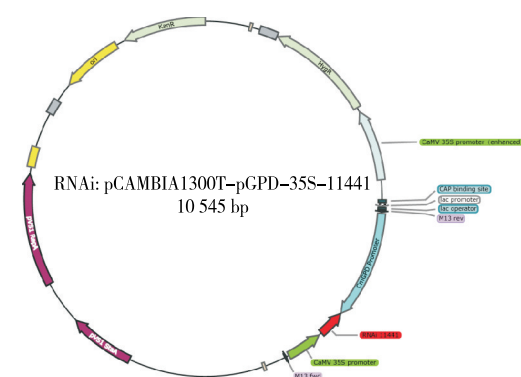
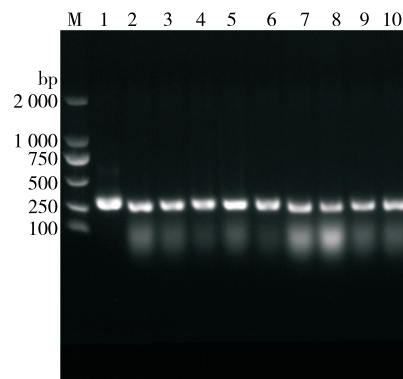
Figure 2 Substrate preference of the A domains of four NRPS genes

NRPS 基因 A 结构域的蛋白,利用焦磷酸盐试剂盒检测 A 结构域的蛋白对底物氨基酸的倾向性,结果显示,基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 的最佳氨基酸底物为 Ala、Leu、Pro 和 Asp。先前的研究^[20]报道 NRPS predictor 2 预测的结果会与试验结果存在差异,可能是因为 NRPS predictor 2 主要依赖 A 结构域中 10 个关键位点组成典型的 Stachelhaus 代码来预测底物倾向性,但并不是所有 A 结构域都严格遵循这套代码,有些底物

识别依赖于其他非典型位点或更复杂的三维结构,单靠 Stachelhaus 代码来推断最佳底物具有一定的局限性。

2.2 紫芝沉默重组质粒的构建

采用同源臂连接酶将紫芝 NRPS 基因的沉默片段和线性化质粒载体连接,并将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,用基因克隆的引物对大肠杆菌单菌落进行 PCR 验证,将筛选的阳性克隆子送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果与预期相符,证明紫

(a) 基因 *GSI_11441* 的沉默重组质粒图谱(b) 基因 *GSI_11441* 单克隆子的菌落PCR检测

M. DNA 分子的大小位置 1. 阳性对照 2. 第 1 个单菌落 3. 第 2 个单菌落 4. 第 3 个单菌落 5. 第 4 个单菌落 6. 第 5 个单菌落 7. 第 6 个单菌落 8. 第 7 个单菌落 9. 第 8 个单菌落 10. 第 9 个单菌落

图3 基因 *GSI_11441* 的沉默重组质粒图谱及 PCR 验证Figure 3 Silenced recombinant plasmid map and PCR validation of *GSI_11441*

芝 NRPS 基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 沉默重组质粒构建成功,如图 3 所示(以 *GSI_11441* 基因为例),并将阳性克隆子保种。

2.3 沉默阳性转化子的筛选

以 PEG 介导的方法进行遗传转化,野生型菌株在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ Hyg 的 SDA 培养基上无法生长,而拟转化子能够继续生长,证明拟转化子中可能存在潮霉素抗性基因(图 4),但还需进一步验证。通过潮霉素抗性基因筛选到基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 的沉默拟转化子数分别为 11, 17, 13, 20。碱裂解法提取所有拟转化子的 DNA,以上述的潮霉素扩增引物对这些转化子进行 PCR 扩增,发现基因 *GSI_00900* 的 3 个转化子,基因 *GSI_10299* 的 3 个转化子,基因 *GSI_10830* 的 2 个转化子和基因 *GSI_11441* 的 8 个转化子的扩增产物中存在大小约为 1 026 bp 的潮霉素序列(图 5),

说明携带目标和潮霉素抗性基因的质粒已转入这些转化子中。

2.4 阳性转化子的基因相对表达量

培养 PCR 筛选后的所有阳性沉默转化子以及野生型菌株,发酵结束后提取总 RNA 反转录成 cDNA,进行 qRT-PCR 检测,比较野生型和阳性转化子中相关基因的表达水平,发现阳性沉默转化子的基因表达量均显著低于野生型($P < 0.05$)。基因 *GSI_00900* 的 3 个沉默转化子分别下调了 44.99%, 68.88%, 66.17%; 基因 *GSI_10299* 的 3 个沉默转化子分别下调了 74.11%, 78.01%, 75.76%; 基因 *GSI_10830* 的 2 个沉默转化子分别下调了 30.55%, 76.99%; *GSI_11441* 的 8 个沉默转化子表达量的下调范围为 19.43%~84.80%,进一步说明这 4 种基因已实现沉默表达(图 6)。

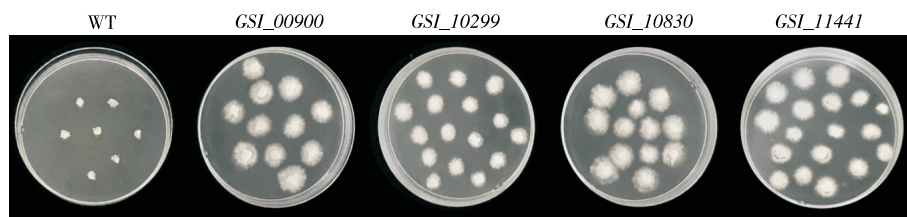
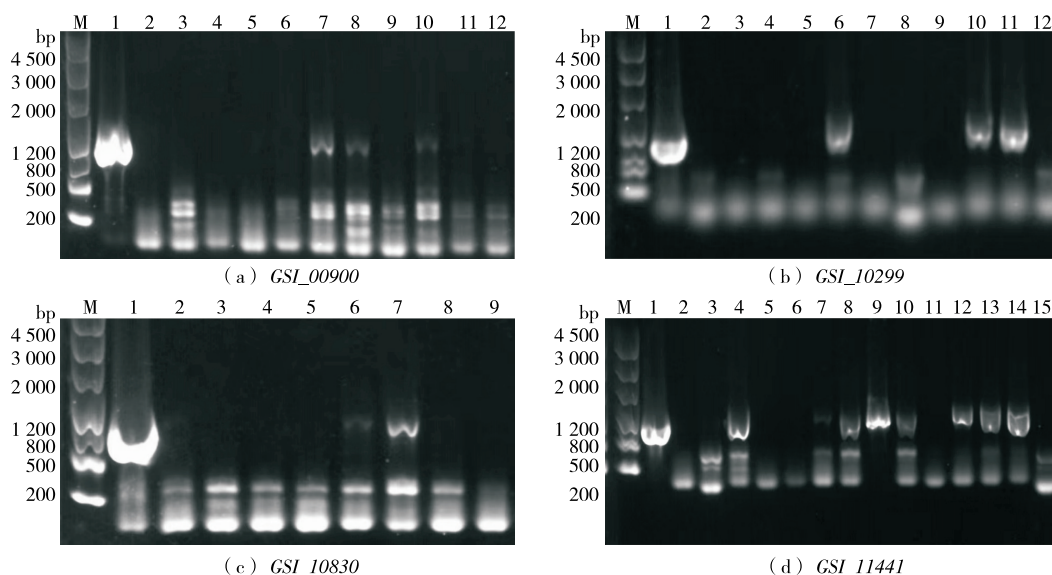


图 4 紫芝转化子在含有潮霉素抗性平板上的生长情况

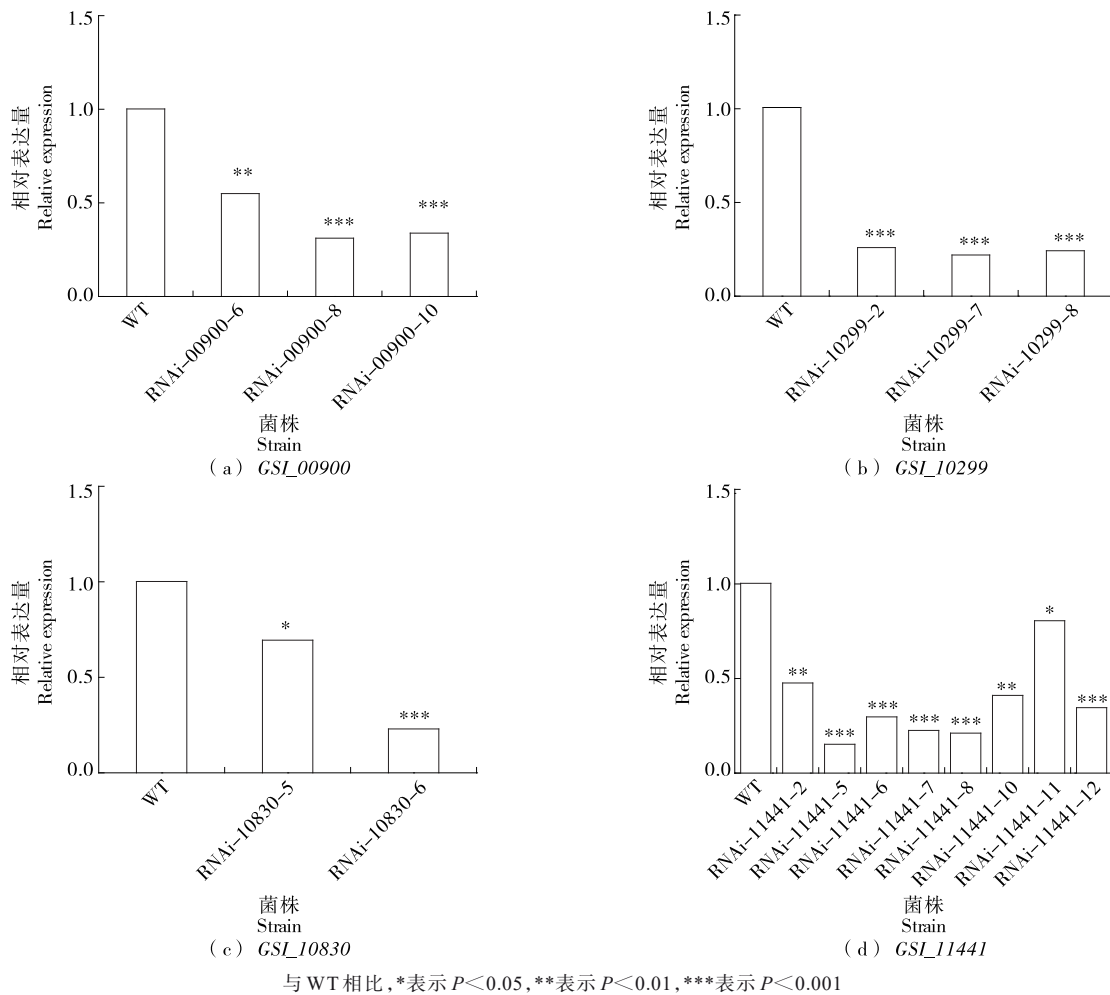
Figure 4 Growth of transformants on the plates containing hygromycin



M. DNA 分子的大小位置 1. 阳性对照 2. 阴性对照 3. 第 1 个候选转化子 4. 第 2 个候选转化子 5. 第 3 个候选转化子 6. 第 4 个候选转化子 7. 第 5 个候选转化子 8. 第 6 个候选转化子 9. 第 7 个候选转化子 10. 第 8 个候选转化子 11. 第 9 个候选转化子 12. 第 10 个候选转化子 13. 第 11 个候选转化子 14. 第 12 个候选转化子 15. 第 13 个候选转化子

图 5 紫芝 4 种 NRPS 基因转化子的 PCR 扩增结果

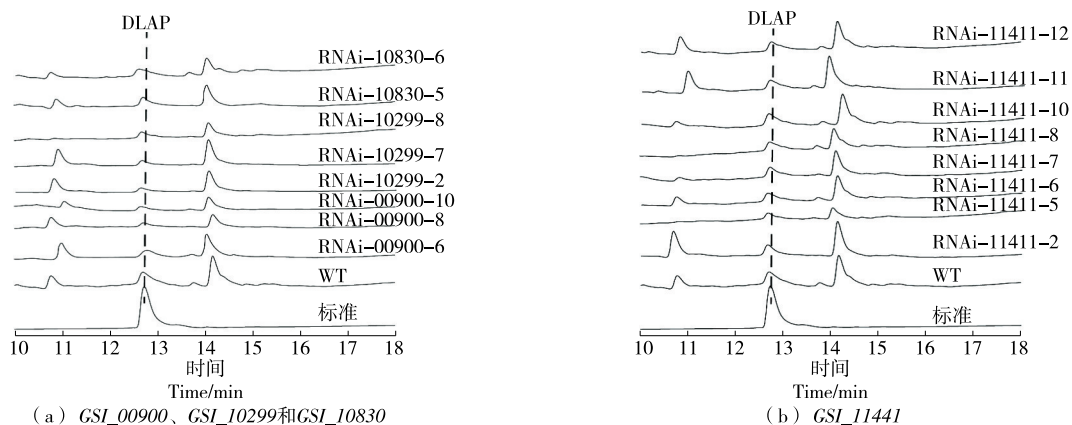
Figure 5 Results of PCR amplification of *G. sinense* transformants of four NRPS genes

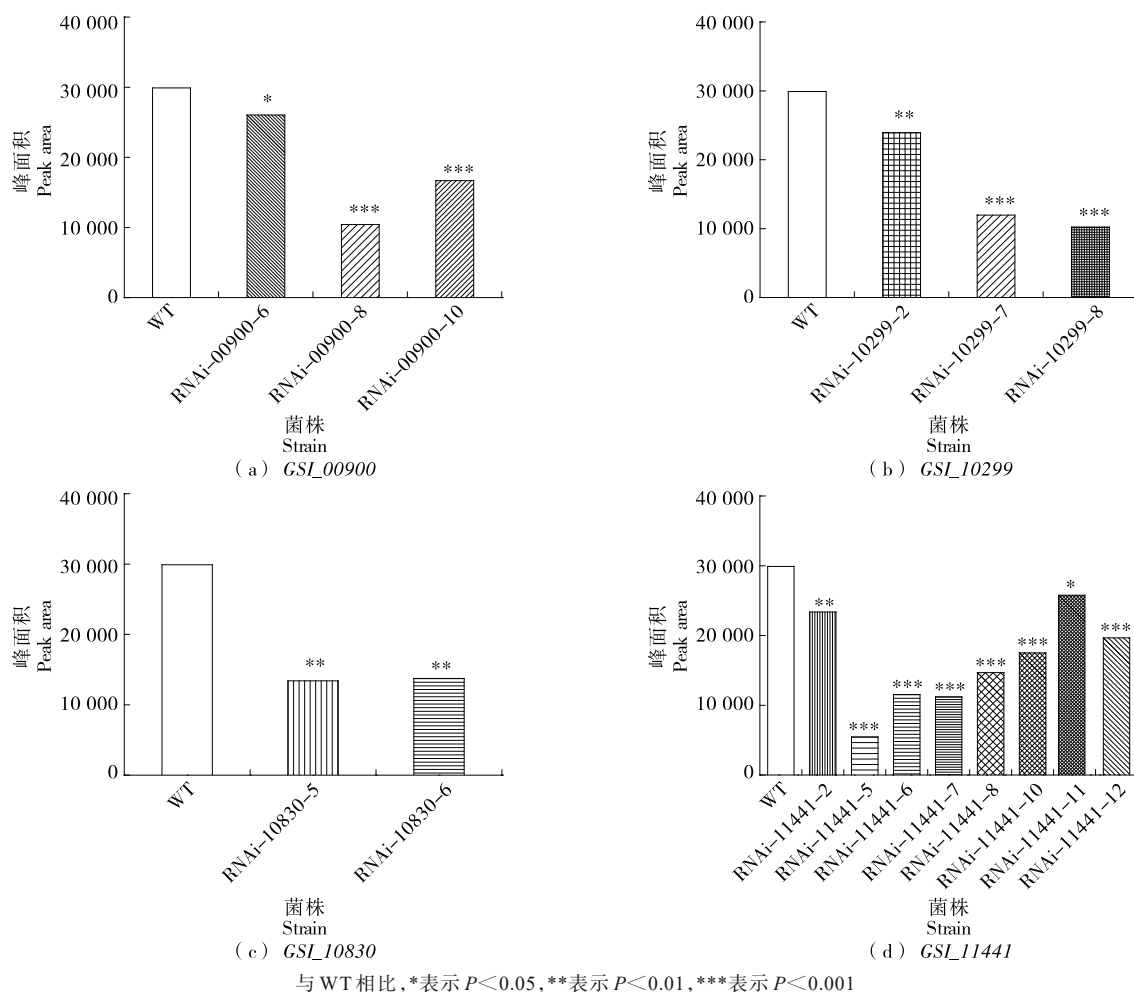
图 6 基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 阳性转化子的相对基因表达量Figure 6 Relative expression levels of *GSI_00900*, *GSI_10299*, *GSI_10830*, and *GSI_11441* in positive transformants

2.5 转基因紫芝表达产物的 HPLC 分析

经 HPLC 分析,与未转化的紫芝菌株比较,观察到阳性沉默转化子中 DLAP 的峰强度和面积均显著降低 ($P <$

0.05) (图 7 和图 8),说明 NRPS 基因 (*GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441*) 沉默能直接影响紫芝胞内合成 DLAP,因此,这 4 种 NRPS 基因是合成活性肽

图 7 基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 阳性转化子内 DLAP 的峰强度变化Figure 7 Changes in peak intensity of DLAP in positive transformants of *GSI_00900*, *GSI_10299*, *GSI_10830*, and *GSI_11441*

图 8 基因 *GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441* 阳性转化子内 DLAP 的峰面积变化Figure 8 Changes in peak area of DLAP in positive transformants of *GSI_00900*, *GSI_10299*, *GSI_10830*, and *GSI_11441*

DLAP 的关键基因。

3 结论

该研究系统解析了紫芝 (*Ganoderma sinense*) 中关键非核糖体肽合成酶基因对活性肽 Asp-Leu-Ala-Pro (DLAP) 合成的影响。通过基因沉默技术,成功构建了 4 个非核糖体肽合成酶基因 (*GSI_00900*、*GSI_10299*、*GSI_10830* 和 *GSI_11441*) 的沉默突变体,并对其生理效应进行了深入研究。qRT-PCR 分析结果表明,这些基因在沉默转化子中的表达水平显著降低,HPLC 分析进一步证实,沉默非核糖体肽合成酶基因后 DLAP 的产量明显减少,表明这 4 个基因在 DLAP 的合成过程中发挥着关键作用。后续可进一步探索这些非核糖体肽合成酶基因的调控机制,并结合代谢工程手段提高 DLAP 的产量,为高效生产天然血管紧张素转化酶抑制肽提供新策略。

参考文献

- [1] NGUYEN L T, LE V V, NGUYEN B T T, et al. Optimization of mycelial growth and cultivation of wild *Ganoderma sinense*[J]. Biotechnologia, 2023, 104(1): 65-74.
- [2] HAN W, CHEN H J, ZHOU L, et al. Polysaccharides from *Ganoderma sinense* - rice bran fermentation products and their anti-tumor activities on non-small-cell lung cancer[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2021, 21(1): 169.
- [3] XIE Y K, SU Y F, WANG Y R, et al. Structural clarification of mannoglucan GSBP-2 from *Ganoderma sinense* and its effects on triple-negative breast cancer migration and invasion[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 269: 131903.
- [4] GAO S Y, ZHANG P, ZHANG C Y, et al. Meroterpenoids from *Ganoderma sinense* protect hepatocytes and cardiomyocytes from oxidative stress induced injuries[J]. Fitoterapia, 2018, 131: 73-79.

- [5] 陈炳智, 李凌, 陈天赐, 等. 草菇 MADS-box 转录因子 *Vvrin1* 基因过表达转化菌株的构建及其生长速度的初步差异分析[J]. 菌物学报, 2020, 39(6): 1 049-1 055.
- CHEN B Z, LI L, CHEN T C, et al. Construction of the overexpression transformant strains with MADS-box transcription factor *Vvrin1* gene and analysis on differential growth rate of *Volvariella volvacea*[J]. Mycosystema, 2020, 39(6): 1 049-1 055.
- [6] TENG L M, WANG C, CUI B K, et al. Lanostane triterpenoids from mycelia-associated *Ganoderma sinense* and their anti-inflammatory activity[J]. Phytochemistry, 2023, 215: 113870.
- [7] LIN W M, GU L, ZHU L Y, et al. Extract of *Ganoderma sinensis* spores induces cell cycle arrest of hepatoma cell via endoplasmic reticulum stress[J]. Pharmaceutical Biology, 2021, 59(1): 704-714.
- [8] YIN Y J, ZHOU H, ZHANG J J, et al. Isolation and characterization of trans-p-hydroxycinnamoyl meroterpenoids from *Ganoderma sinensis*[J]. Chemistry & Biodiversity, 2023, 20(4): e202300022.
- [9] 黄佳, 王浩锦, 伍强, 等. 灵芝活性蛋白和多肽研究进展及展望[J]. 菌物研究, 2022, 20(2): 79-86, 76.
- HUANG J, WANG H J, WU Q, et al. Research progress and prospect of active proteins and peptides of *Ganoderma*[J]. Journal of Fungal Research, 2022, 20(2): 79-86, 76.
- [10] DEOLIVERIRA M R, SILVA T J, BARROS E, et al. Anti-hypertensive peptides derived from caseins: mechanism of physiological action, production bioprocesses and challenges for food applications[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2018, 185(4): 884-908.
- [11] KANG M G, KIM Y H, BOLORMAA Z, et al. Characterization of an antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus*[J]. BioMed Research International, 2013, 2 013(1): 283964.
- [12] LAU C C, ABDULLAH N, SHUIB A S, et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from edible mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach identified by LC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2014, 148: 396-401.
- [13] PAISANSACK S, SANGTANOO P, SRIMONGKOL P, et al. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) [J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 58(1): 85-97.
- [14] HYOUNG LEE D, HO KIM J, SIK PARK J, et al. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*[J]. Peptides, 2004, 25(4): 621-627.
- [15] WU Q, LI Y, PENG K, et al. Isolation and characterization of three antihypertension peptides from the mycelia of *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(29): 8 149-8 159.
- [16] FISCHBACH M A, WALSH C T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: logic, machinery and mechanisms[J]. Chemical Reviews, 2006, 106(8): 3 468-3 496.
- [17] IZORE T, CANDACE HO Y T, KACZMARSKI J A, et al. Structures of a non-ribosomal peptide synthetase condensation domain suggest the basis of substrate selectivity[J]. Nature Communications, 2021, 12(1): 2 511.
- [18] ZHANG K Y, NELSON K M, BHURIPANYO K, et al. Engineering the substrate specificity of the *DhbE* adenylation domain by yeast cell surface display[J]. Chemistry & Biology, 2013, 20(1): 92-101.
- [19] ZHU Y J, XU J, SUN C, et al. Chromosome-level genome map provides insights into diverse defense mechanisms in the medicinal fungus *Ganoderma sinense*[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 11087.
- [20] TERLOUW B R, HUANG C, MEIJER D, et al. PARAS: high-accuracy machine-learning of substrate specificities in nonribosomal peptide synthetases[J/OL]. BioRxiv. (2025-01-08) [2025-02-18]. <https://doi.org/10.1101/2025.01.08.631717>.
- [21] 张银萍, 张舒, 汪洋, 等. 灵芝原生质体的高效制备及诱变[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(25): 12 379-12 381.
- ZHANG Y P, ZHANG S, WANG Y, et al. High preparation and mutagenesis of protoplast of *Ganoderma lucidum*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(25): 12 379-12 381.
- [22] 辛燕花, 肖招燕, 尤琳烽, 等. 紫杉二烯合酶基因在灵芝中的表达[J]. 中国农业科学, 2014, 47(3): 546-552.
- XIN Y H, XIAO Z Y, YOU L F, et al. Heterologous expression of taxadiene synthase gene in *Ganoderma lucidum*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(3): 546-552.
- [23] 王茜, 侯飞侠, 王艺璇, 等. 碱裂解法快速提取虫草属真菌 DNA 研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(4): 995-997.
- WANG X, HOU F X, WANG Y X, et al. Rapid extraction of DNA from *Cordyceps* by alkaline lysis[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2016, 27(4): 995-997.
- [24] SULISTYO H, NUSA A P, POERNOMO M A P D, et al. Circulating mRNA expression of VEGF, PTEN and SOCS1 as potential prognostic predictor for nasopharyngeal carcinoma progression[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2024, 25(9): 2 999-3 006.