

# 过表达腺苷生物合成正相关基因 *GIPNP* 提高灵芝腺苷的含量

朱亚婷<sup>1,2</sup>, 肖郑鹏<sup>1,2</sup>, 周佳丽<sup>1,2</sup>, 余贞<sup>1,2</sup>, 刘腾<sup>1,2</sup>, 袁姣<sup>1,2</sup>, 康信聪<sup>\*1,2,3</sup>, 刘东波<sup>\*1,2,3,4</sup>

1 湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128

2 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128

3 湖南作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128

4 植物功能成分利用省部共建协同创新中心, 湖南 长沙 410128

朱亚婷, 肖郑鹏, 周佳丽, 余贞, 刘腾, 袁姣, 康信聪, 刘东波. 过表达腺苷生物合成正相关基因 *GIPNP* 提高灵芝腺苷的含量[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4401-4412.

ZHU Yating, XIAO Zhengpeng, ZHOU Jiali, YU Zhen, LIU Teng, KANG Xincong, YUAN Jiao, LIU Dongbo. Overexpression of *GIPNP*, a gene positively correlated with adenosine biosynthesis, increases the adenosine content of *Ganoderma lucidum*[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4401-4412.

**摘要:** 【背景】灵芝被纳入我国“药食同源”试点名单, 腺苷作为其主要活性物质之一, 在免疫调节、抗炎、抗癌等方面发挥着重要作用。【目的】调控腺苷生物合成关键酶基因的表达来提高灵芝腺苷产量。【方法】将不同培养时间阶段腺苷合成酶基因(包括 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸甲酰转移酶 *GIATIC*、嘌呤核苷磷酸化酶 *GIPNP*、腺苷激酶 *GIADK*)的表达量与腺苷含量相关联, 筛选出与灵芝腺苷含量呈正相关的关键酶基因。克隆关键酶基因并在灵芝中过表达, 探究关键酶基因过表达对灵芝腺苷积累的影响。【结果】*GIPNP* 的表达与灵芝腺苷含量呈正相关。*GIPNP* 的 cDNA 全长为 969 bp, 预测 *GIPNP* 蛋白的相对分子量为 34.6 kDa, 呈三聚体的四元结构。研究表明, 过表达菌株中 *GIPNP* 的表达量在第 4 天比野生型菌株(WT)上调了 2.9–3.9 倍, 与含空载体的菌株(CK)相比, 腺苷含量分别提高了 78%和 63%。【结论】过表达嘌呤核苷磷酸化酶是提高灵芝腺苷产量的一种有效手段。

**关键词:** 灵芝; 腺苷; 嘌呤核苷磷酸化酶; 过表达

资助项目: 湖南省自然科学基金(2020JJ5266); 国家自然科学基金(81773850)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ5266) and the National Natural Science Foundation of China (81773850).

\*Corresponding authors. E-mail: KANG Xincong, kangxincong@163.com; LIU Dongbo, liudongbo@hunau.net

Received: 2023-02-16; Accepted: 2023-03-23; Published online: 2023-05-15

# Overexpression of *GIPNP*, a gene positively correlated with adenosine biosynthesis, increases the adenosine content of *Ganoderma lucidum*

ZHU Yating<sup>1,2</sup>, XIAO Zhengpeng<sup>1,2</sup>, ZHOU Jiali<sup>1,2</sup>, YU Zhen<sup>1,2</sup>, LIU Teng<sup>1,2</sup>, YUAN Jiao<sup>1,2</sup>, KANG Xincong<sup>\*1,2,3</sup>, LIU Dongbo<sup>\*1,2,3,4</sup>

1 College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, Hunan, China

3 Hunan Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, Hunan, China

4 Hunan Co-innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, Hunan, China

**Abstract:** **[Background]** *Ganoderma lucidum* is a precious Chinese medicinal herb with both medicinal and edible values. Adenosine, one of the active components, endows the herb with immunomodulatory, anti-inflammatory, and anti-tumor activities. **[Objective]** To regulate the expression of key genes involved in adenosine biosynthesis to increase the adenosine production of *G. lucidum*. **[Methods]** We studied the correlations of the expression of adenosine synthase genes (*GIATIC*, *GIPNP*, and *GLADK*) with the adenosine content. The key enzyme genes that were positively correlated with the adenosine content of *G. lucidum* were screened out. The key enzyme genes in *G. lucidum* were cloned and overexpressed to investigate the effect of key enzyme gene overexpression on adenosine accumulation. **[Results]** The expression of *GIPNP* was positively correlated with adenosine content. The key gene *GIPNP* was cloned and overexpressed in *G. lucidum*. The cDNA of *GIPNP* was 969 bp in length. *GIPNP* displayed a trimeric quaternary structure, with a predicted molecular weight of 34.6 kDa. The expression levels of *GIPNP* in the transformants were 2.9–3.9 folds higher than that of the wild type on day 4. The adenosine content in the transformants increased by 78% and 63%, respectively, compared with that in the strain transformed with the blank vector. **[Conclusion]** Overexpression of *GIPNP* is an effective strategy to increase the production of adenosine.

**Keywords:** *Ganoderma lucidum*; adenosine; purine nucleoside phosphorylase; overexpression

灵芝 [*Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.] 是担子菌纲多孔科灵芝属真菌, 被纳入我国药食同源试点名单, 几千年来在中国被用于治疗 and 预防多种疾病, 具有抗肿瘤、保肝和抗衰老等作用<sup>[1]</sup>。灵芝含有多种活性物质, 其中灵芝酸和灵芝多糖被认为是主要活性成分<sup>[2]</sup>。此外, 灵芝腺苷及其衍生物也是灵芝中重要的活性成分<sup>[3]</sup>。腺苷作为一种普遍存在的细胞外信号分子, 通过

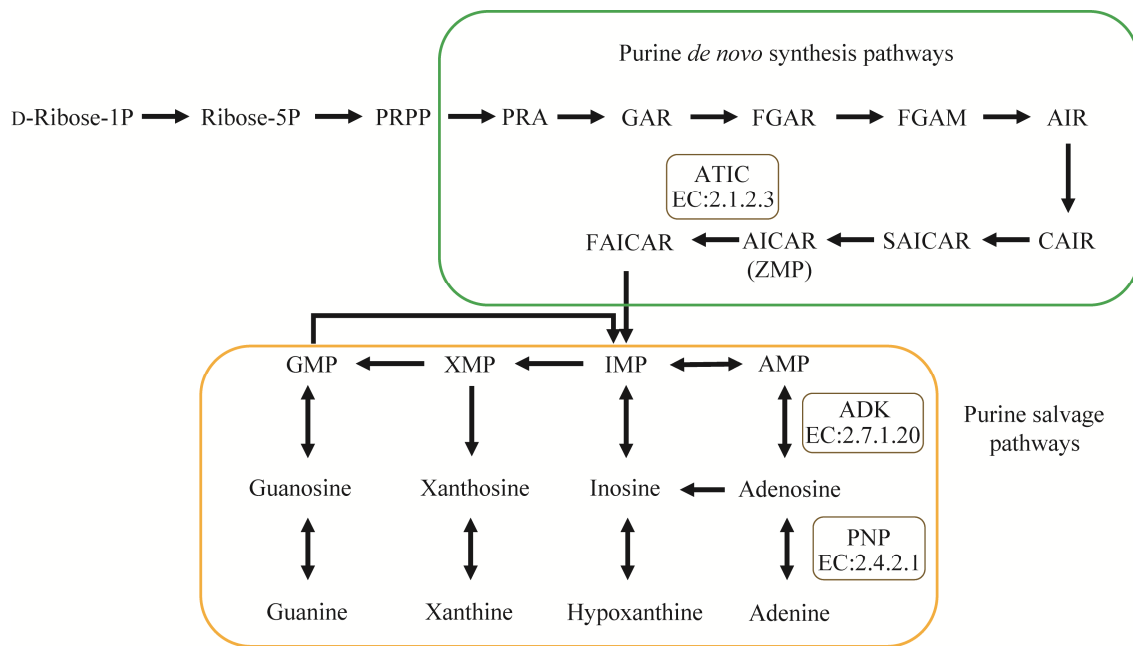
激活腺苷受体在调节冠状动脉微循环中起到重要作用, 并在免疫调节、抗炎和抗癌等方面也发挥着积极作用<sup>[4]</sup>。最新的研究表明, 高腺苷灵芝提取物具有降脂和抗动脉粥样硬化作用<sup>[5]</sup>。

目前, 灵芝腺苷主要来源于灵芝的子实体和菌丝体<sup>[6]</sup>, 产量低下严重限制了其广泛应用<sup>[7-8]</sup>。深层发酵培养质量稳定、成本效益高, 被看作是一种比子实体培养更具有前景的腺苷生产替代

方案<sup>[9-11]</sup>。然而,随着真菌遗传转化技术的发展,传统的发酵优化方法已难以满足腺苷产量的需求。利用分子生物学技术和基因工程技术来调控腺苷生物合成关键酶基因的表达是提高灵芝腺苷产量的有效手段。

腺苷代谢调节机制复杂,主要通过嘌呤核苷酸的从头合成和补救合成途径进行生物合成(图1)<sup>[12]</sup>。嘌呤核苷酸的从头合成途径,以焦磷酸核糖(phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP)为起始

原料经过多步反应合成核苷<sup>[13]</sup>。在这些酶促反应中,限速酶 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸甲酰转移酶(ATIC, EC:2.1.2.3)催化 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸(又名 Z-核苷酸单磷酸酯, ZMP)转化为 5-甲酰胺-4-咪唑甲酰胺核糖核苷酸(FAICAR),进而转化为 5'-单磷酸肌苷(IMP)、5'-单磷酸腺苷(AMP),然后去磷酸化生成腺苷<sup>[14]</sup>(图1)。此外,腺苷还可以通过补救途径合成,以体内已有的游离嘌呤碱基或核苷为底物合成核苷



**图1 腺苷的生物合成途径** PRPP: 焦磷酸核糖; PRA: 5-磷酸核糖胺; GAR: 甘氨酸核糖核苷酸; FGAR: 甲酰甘氨酸核糖核苷酸; FGAM: 甲酰谷氨酸核糖核苷酸; AIR: 氨基咪唑核糖核苷酸; CAIR: 4-羧基-5-氨基咪唑核糖核苷酸; SAICAR: 4-(N-琥珀酰氨基)-5-氨基咪唑核糖核苷酸; AICAR: 氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸; ATIC: 5-氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸甲酰转移酶; FAICAR: 甲酰氨基咪唑-4-甲酰胺核糖核苷酸; IMP: 5'-单磷酸肌苷; AMP: 5'-单磷酸腺苷; ADK: 腺苷激酶; PNP: 嘌呤核苷磷酸化酶; XMP: 5'-单磷酸黄苷; GMP: 5'-单磷酸鸟苷

Figure 1 The biosynthetic pathways of adenosine. PRPP: Phosphoribosyl pyrophosphate; PRA: 5-phosphoribosylamine; GAR: Glycinamide ribonucleotide; FGAR: Formylglycinamide ribonucleotide; FGAM: Formylglycinamide ribonucleotide; AIR: Aminoimidazole ribonucleotide; CAIR: 4-carboxy-5-aminoimidazole ribonucleotide; SAICAR: 4-(N-succinylcarboxamide)-5-aminoimidazole ribonucleotide; AICAR: Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide; ATIC: 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase; FAICAR: Formylaminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide; IMP: Inosine 5'-monophosphate; AMP: Adenosine 5'-monophosphate; ADK: Adenosine kinase; PNP: Purine nucleoside phosphorylase; XMP: Xanthosine 5'-monophosphate; GMP: Guanosine 5'-monophosphate.

酸<sup>[15]</sup>(图 1)。嘌呤核苷磷酸化酶(PNP, EC:2.4.2.1)和腺苷激酶(ADK, EC:2.7.1.20)催化最后一步反应生成腺苷<sup>[16]</sup>。PNP 催化核苷和脱氧核苷的可逆性磷酸化生成腺苷或腺嘌呤<sup>[17]</sup>。ADK 是腺苷的关键调节因子,催化腺苷到 AMP 的可逆代谢<sup>[18]</sup>(图 1)。目前,哺乳动物和植物中腺苷的生物合成途径和关键基因已被报道<sup>[19-22]</sup>,但真菌腺苷的生物合成途径并不清晰。

本研究通过灵芝不同培养时间腺苷合成酶基因(*GIATIC*、*GIPNP* 和 *GIADK*)的表达量与菌丝体中腺苷含量的关联分析,获得灵芝腺苷生物合成的关键基因 *GIPNP*, 克隆与过表达关键基因 *GIPNP*, 检测灵芝生长特性和腺苷的合成量,从而研究 *GIPNP* 基因过表达对腺苷合成的影响,以期有助于阐明真菌中腺苷合成的生物途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

湘赤芝 1 号灵芝菌株由湖南农业大学国家中医药管理局亚健康干预技术实验室保存,大肠杆菌(*Escherichia coli*) HST08 购自大连 TaKaRa 公司,质粒 pCAMBIA1302 由湖南农业大学园艺学院国家柑橘改良中心长沙分中心馈赠。

#### 1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0; 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 20.0; MYG 培养基(g/L): 麦芽糖 10.0, 葡萄糖 4.0, 酵母粉 4.0, 琼脂 18.0。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Noc* I, Thermo Fisher 科技公司; PrimeSTAR<sup>®</sup> Max DNA Polymerase、PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒、TB Green<sup>®</sup> Premix *Ex Taq*<sup>™</sup>试剂盒、In-Fusion 克隆试剂盒、*E. coli* HST08 Premium Competent Cells, 宝日医生物技术有限公司; SteadyPure 植物 RNA 提取试剂盒, 湖南艾科瑞生物工程有限公司; EasyPure<sup>®</sup> Plasmid MiniPrep Kit 和 EasyPure<sup>®</sup> PCR Purification Kit, 北京全式金生物技术有限公司; 溶壁酶, 广东省微生物研究所; 崩溃酶, Sigma 公司; 金牌 Mix ver.2, 北京擎科生物有限公司; 潮霉素 B, Roche 公司; 腺苷标准品, 上海源叶生物科技有限公司。

凝胶成像系统, BioRad 公司; 电泳仪, 北京六一生物技术有限公司; 荧光定量基因扩增仪, Roche 公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 腺苷含量与酶基因表达水平的关联分析

湘赤芝 1 号菌种活化后接种于 PDB 培养基, 28 °C、160 r/min 振荡培养 4–12 d, 收集 4、6、8、10 和 12 d 的菌丝体用来检测腺苷含量和基因表达量。将菌丝体置于 60 °C 烘箱中烘至恒重, 研磨成粉末状。称取 0.01 g 样品加入 1 mL 10% 甲醇溶解, 经 200 W 超声仪持续超声提取 60 min。4 °C、3 000 r/min 离心 6 min, 取上清液, 利用 HPLC 检测腺苷含量。HPLC 条件: 色谱柱为 Agilent Microsorb C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 20 mmol/L 乙酸钾+0.52 mmol/L 正戊烷磺酸钠(pH 4.0) (A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0–15 min, 5%–7% B; 15–17 min, 7%–5% B; 17–22 min, 5% B), 流速 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 20 μL。

收集 4、8 和 12 d 的菌丝体, 经液氮研磨成

粉末状, 使用植物 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后反转录成 cDNA, 根据本课题组湘赤芝 1 号中 *GIATIC*、*GIPNP* 和 *GIADK* 的基因序列<sup>[23]</sup>设计荧光定量 PCR 引物 (表 1)。利用 RT-qPCR 检测不同时间阶段的酶基因表达量, RT-qPCR 反应体系 (20  $\mu$ L): TB Green Premix *Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ) 10  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.8  $\mu$ L, cDNA 模板 (100 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, 灭菌水 6.4  $\mu$ L。RT-qPCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 20 s, 40 个循环。

基于 SPSS 25.0, 采用双因素相关分析方法分析腺苷含量与腺苷合成酶基因表达之间的 Pearson 相关系数。利用 TBtools 进行层次聚类分析, 绘制热图。

### 1.2.2 *GIPNP* 基因过表达载体的构建及 *GIPNP* 蛋白结构的预测

以灵芝 cDNA 为模板, 使用引物 *GIPNP*-F (5'-GGACTCTTGACCATGATGGCACTCCTCG ACATCGACC-3') 和 *GIPNP*-R (5'-GTCAGATCT ACCATGTTAGGCGGCGCTGGCCGG-3') 通过 PCR 扩增得到 *GIPNP* 目的片段, 用于构建过表达载体。PCR 反应体系 (50  $\mu$ L): PrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) 25  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 模板 DNA (200 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 灭菌水 22  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 5 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s,

35 个循环。以 pCAMBIA1302 为基础表达载体, 选择其酶切位点 *Nco* I 进行单酶切。采用 In-Fusion 克隆将扩增产物与质粒 pCAMBIA1302 进行连接, 得到重组质粒 p-*GIPNP* (图 2)。该重组载体含有卡那霉素抗性基因, 可作为 *E. coli* HST08 菌株的选择标记。将重组载体转化到 *E. coli* HST08 感受态细胞中, 在含有 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上进行筛选。使用引物 *GIPNP*-F (5'-GG ACTCTTGACCATGATGGCACTCCTCGACATC GACC-3') 和 *GIPNP*-R (5'-GTCAGATCTACCAT GTTAGGCGGCGCTGGCCGG-3') 通过菌落 PCR 检测 CaMV 35S 启动子和 *GIPNP* 基因的融合片段来筛选阳性转化子, 菌落 PCR 反应体系 (25  $\mu$ L): 1.1 $\times$ 金牌 Mix Ver.2<sup>a</sup> 22  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, 菌液 1  $\mu$ L。菌落 PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 2 min; 98  $^{\circ}$ C 2 s, 56  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。提取阳性转化子的质粒 DNA, 通过测序进一步确认目的基因是否与线性化载体成功连接。

使用在线网站 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) 模拟 *GIPNP* 蛋白的三级结构。使用在线网站 ExPASy-ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 *GIPNP* 的相对分子量和等电点。

### 1.2.3 过表达菌株的构建

取灵芝菌块接种于 PDB 培养基中活化, 28  $^{\circ}$ C、160 r/min 培养 7 d 作为种子液。将种子液按 15% (体积分数) 的接种量接种至 100 mL PDB 培养基中, 28  $^{\circ}$ C、100 r/min 培养 1 d。将菌龄为 1 d 的灵芝菌丝培养液过滤菌丝, 并用 0.6 mol/L 甘露醇冲洗至团状, 每 1 g 菌丝体加入 1.5 mL 混合酶液 (1 mL 溶壁酶+0.5 mL 崩溃酶), 用移液枪吹打混匀后, 30  $^{\circ}$ C、100 r/min 酶解 4 h, 制备原生质体。参照文献<sup>[24]</sup>利用 PEG 介导的原生质体转化将 p-*GIPNP* 导入灵芝原生质体中。在含有

表 1 荧光定量引物序列

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>GIPNP</i> -qF	AGGTCCTCGTGCTCAGTCTG	20
<i>GIPNP</i> -qR	ACTTCCTCCTTGATGCTCCTGTA	23
<i>GIADK</i> -qF	AGTCCAACGACGCCATCCT	19
<i>GIADK</i> -qR	CCACCAGCGACATATACGATCTT	23
<i>GIATIC</i> -qF	ATTCACGGACACAATCGCCAAG	22
<i>GIATIC</i> -qR	AGGAACTCTGCGTAGTCGGATG	22
<i>GAPDH</i> -F	CGCTCAACAAGAAGTTCGTCAA	22
<i>GAPDH</i> -R	CGTAGACAAGGAGGTCACAGA	21

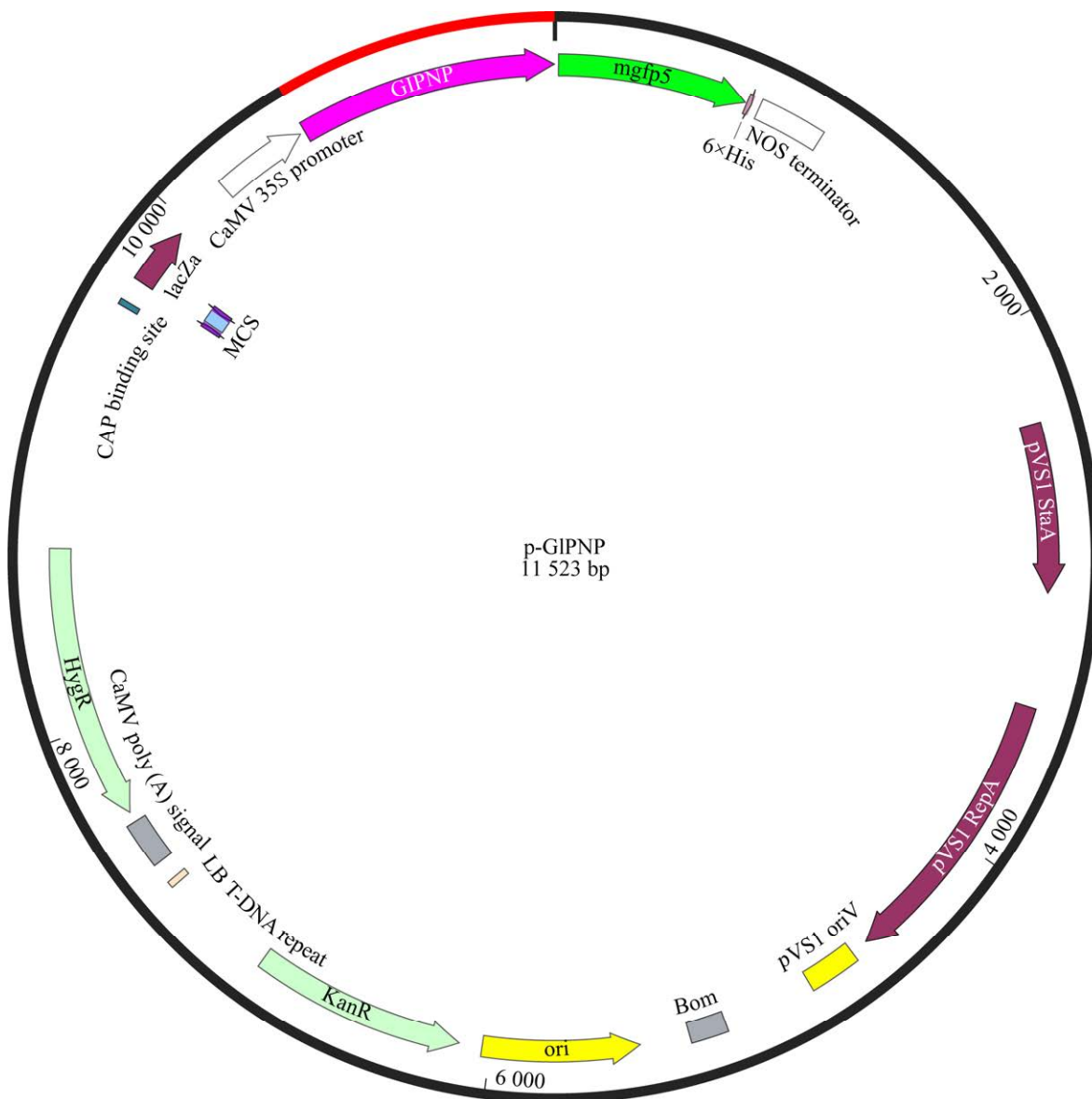


图 2 重组质粒图谱

Figure 2 Recombinant plasmid map.

150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的 MYG 平板上筛选转化子, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 15–20 d 后, 将萌发的转化菌落转移到含有 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素 B 的 PDA 平板上进行第 2 轮筛选。利用 CTAB 法提取转化子 DNA, 使用引物 *GIPNP*-DF (5'-TTGAGGAGACCTGACAC-3') 和 *GIPNP*-DR (5'-GCATTGAACACCA TAAGAGA-3') 通过 PCR 检测 pCAMBIA1302 载体和 *GIPNP* 基因的融合片段, 筛选过表达菌株, PCR 反应体系和反应条件同 1.2.2 菌落 PCR。通

过 3 次传代培养获得稳定且具有遗传潜力的转化菌株, 提取转化菌株总 RNA, 反转录为 cDNA 后, RT-qPCR 分析转化菌株与 WT 菌株的基因相对转录水平, RT-qPCR 引物序列见表 1, 反应体系和反应条件同 1.2.1。

#### 1.2.4 菌丝体生物量、生长速度和腺苷含量的测定

转化菌株接种于 100 mL PDB 培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 4、8 和 12 d。用 200 目试验筛过滤收集菌丝体并用蒸馏水清洗 3 次, 置 60  $^{\circ}\text{C}$

烘箱中烘至恒重, 期间称量并记录其重量, 重量法测定其生物量。将直径约 0.8 cm 的菌丝块接种到 PDA 培养基上, 于 28 °C 恒温培养箱中培养 4 d, 测量菌落的生长速度。将转化菌株接种于 150 mL PDB 培养基中, 28 °C、160 r/min 培养 7 d 作为母种, 取菌球接种于 100 mL 培养基中, 28 °C、160 r/min 培养 5 d, 收集菌丝体, 用 10% 甲醇溶解, 200 W 持续超声工作 60 min 提取腺苷, HPLC 检测腺苷含量。

### 1.2.5 数据分析

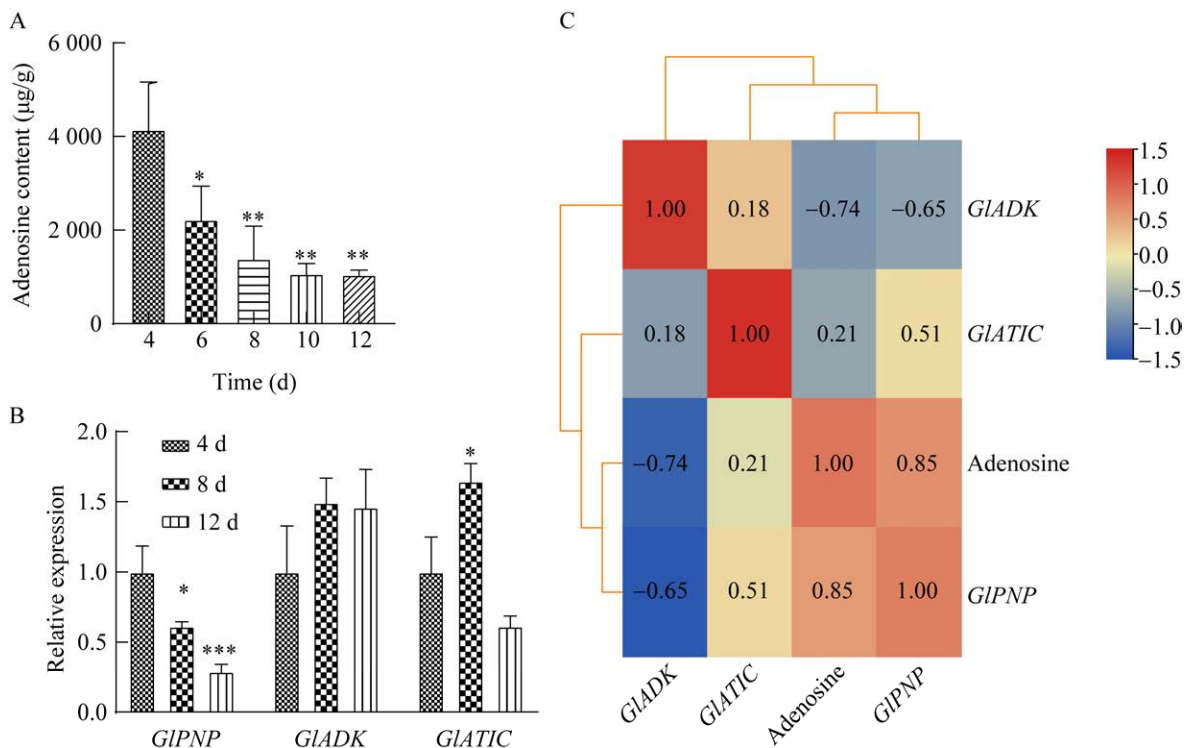
所有的试验进行 3 次重复, 误差条表示 3 次重复平均值的标准偏差。相关分析采用双因

素相关分析, 比较 Pearson 相关系数。使用 SPSS 25.0 进行统计分析, 在双尾分析中, 当  $P < 0.05$  时具有显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同时间阶段腺苷含量与相关酶基因表达水平的相关性分析

菌丝体中腺苷含量变化如图 3A 所示, 在第 4 天最高, 达到 4 154  $\mu\text{g/g}$ , 然后下降。鉴于 *GIPNP*、*GIADK* 和 *GIATIC* 在腺苷生物合成途径中的关键作用, 分析了其在灵芝整个发酵过程中的表达情况。在



**图 3 腺苷含量与基因表达量的 Pearson 相关分析** A: 不同时间阶段 WT 菌株的腺苷含量. B: WT 中 *GIPNP*、*GIADK* 和 *GIATIC* 基因的相对转录水平. C: 腺苷含量与基因(*GIPNP*、*GIADK*、*GIATIC*)表达的 Pearson 相关分析. 误差条表示 3 个独立样本的标准偏差(SD). WT: 野生型菌株; \*表示与第 4 天相比有显著差异, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

Figure 3 Pearson correlation analysis between adenosine content and gene expression. A: The content of adenosine in WT at different fermentation time points. B: Relative transcriptional levels of the *GIPNP*, *GIADK* and *GIATIC* genes in WT. C: Pearson correlation analysis between adenosine content and gene expression (*GIPNP*, *GIADK*, *GIATIC*). The error bars indicate the standard deviations (SDs) of three independent samples. WT: Wild-type strain; \* indicates significant differences vs the 4<sup>th</sup> day; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

第4天观察到 *GIPNP* 基因达到最高表达水平(图3B); *GIADK* 基因表达水平从第4–12天无显著差异; *GIATIC* 基因表达水平从第4–8天呈先升高后下降的趋势。对腺苷含量与基因表达进行了 Pearson 相关分析(图3C), 结果表明, *GIPNP* 基因表达与腺苷含量呈正相关( $r=0.848$ ,  $P<0.01$ ), 而 *GIADK* 基因表达与腺苷含量呈负相关( $r=-0.742$ ,  $P<0.05$ )。因此对 *GIPNP* 基因进行了过表达, 以探讨其对腺苷积累的影响。

## 2.2 *GIPNP* 过表达菌株的构建

为了研究真菌中 *GIPNP* 基因在腺苷生物合成中的作用, 我们在灵芝中克隆(图4A)并构建了 *GIPNP* 过表达菌株。在 *GIPNP* 阳性转化子的泳道中检测到一条清晰的 999 bp 的条带, 与上下游带有 15 bp 同源臂的 *GIPNP* 基因片段的理论大小一致(图4B)。序列分析表明, *GIPNP* 基因的全长为 969 bp, 与预测的 323 个氨基酸残基对应。*GIPNP* 显示出三聚四元结构, 如图5A所示。预测其相对分子质量为 34.6 kDa, 等电点为 5.89。

将构建成功的重组载体转入灵芝原生质体中, 在 *GIPNP* 转化子(OE::*GIPNP*-5, OE::*GIPNP*-7)和 p-*GIPNP* 质粒中检测到一条代表 CaMV-35S 启动子和 *GIPNP* 基因融合片段的 1 110 bp 的目的条带(图4C), 而在 WT 株中未检测到相应的条带。RT-qPCR 结果表明, 在第4天 *GIPNP* 转化子(OE::*GIPNP*-5, OE::*GIPNP*-7)的转录水平是 WT 菌株的 2.9–3.9 倍(图5B)。

## 2.3 *GIPNP* 基因过表达对灵芝生长速度、生物量和腺苷含量的影响

为了确定 *GIPNP* 基因的过表达是否有助于灵芝中腺苷的积累, 对 WT、CK 和 2 个 *GIPNP* 过表达菌株(OE::*GIPNP*-5, OE::*GIPNP*-7)的腺苷含量、生长速度和生物量进行了分析。与 WT 菌株相比, CK 和 *GIPNP* 菌株在 PDA 平板上的菌落生长速度显著降低(图6A), 生物量(图6B)显著减少。如图6C所示, OE::*GIPNP*-5 和 OE::*GIPNP*-7 菌株的腺苷含量分别为 4 946  $\mu\text{g/g}$  和 4 520  $\mu\text{g/g}$ , 比 CK 菌株分别提高 78% 和 63%。

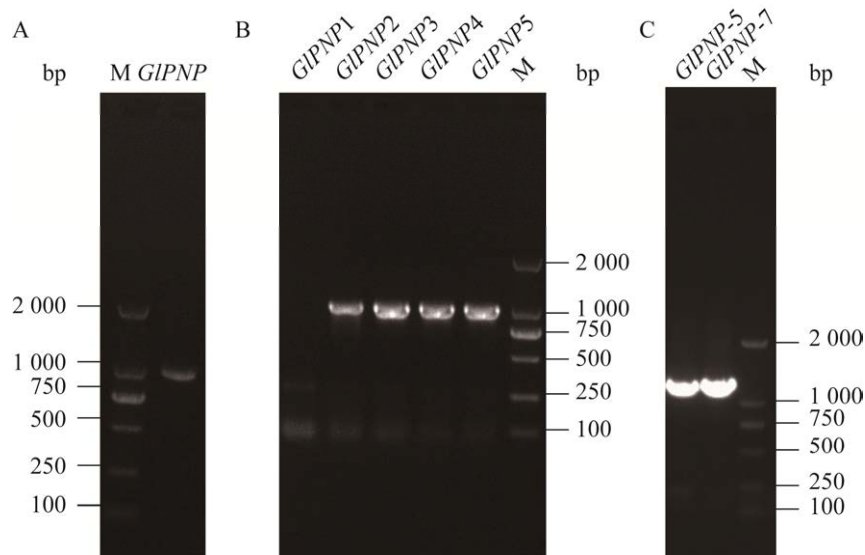


图4 *GIPNP* 过表达菌株的构建 A: *GIPNP* 基因的 PCR 扩增. B: *E. coli* HST08 阳性转化子的 PCR 鉴定(每个载体选择 5 个 *E. coli* HST08 转化子). C: 转化子 gDNA 中扩增载体与 *GIPNP* 的融合片段. M: *GL* DNA Marker 2000

Figure 4 Construction of *GIPNP* overexpression strains. A: Amplification patterns of genomic PCR obtained *GIPNP*. B: PCR identification of *E. coli* HST08-positive transformants (Five *E. coli* HST08 transformants were selected for each vector). C: Amplification patterns obtained with primers for the fusion vector-*GIPNP* in genomic DNA isolated from different strains. M: *GL* DNA Marker 2000.



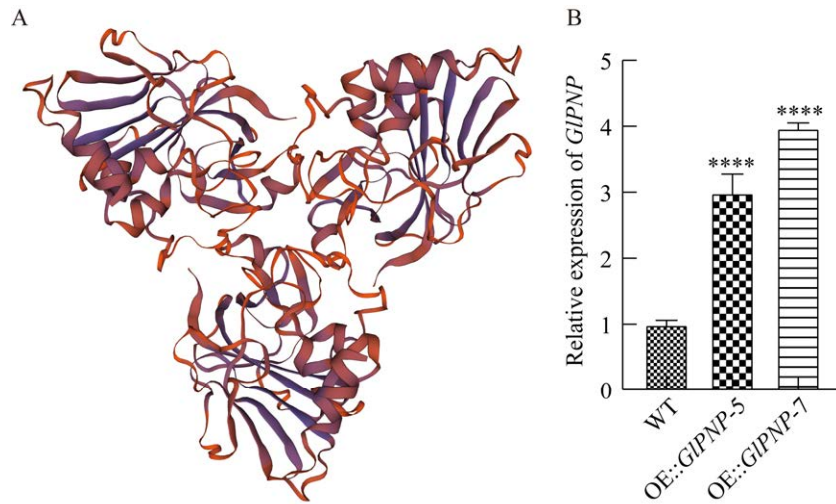


图5 *GIPNP* 蛋白结构预测与表达量分析 A: *GIPNP* 蛋白的三级结构预测. B: *GIPNP* 基因在 WT 菌株和 *GIPNP* 转化菌株中的相对表达量

Figure 5 Structure prediction and expression analysis of *GIPNP* protein. A: Predicted tertiary structure of *GIPNP* protein. B: Relative expression of the *GIPNP* gene in WT strain and *GIPNP* transformants. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

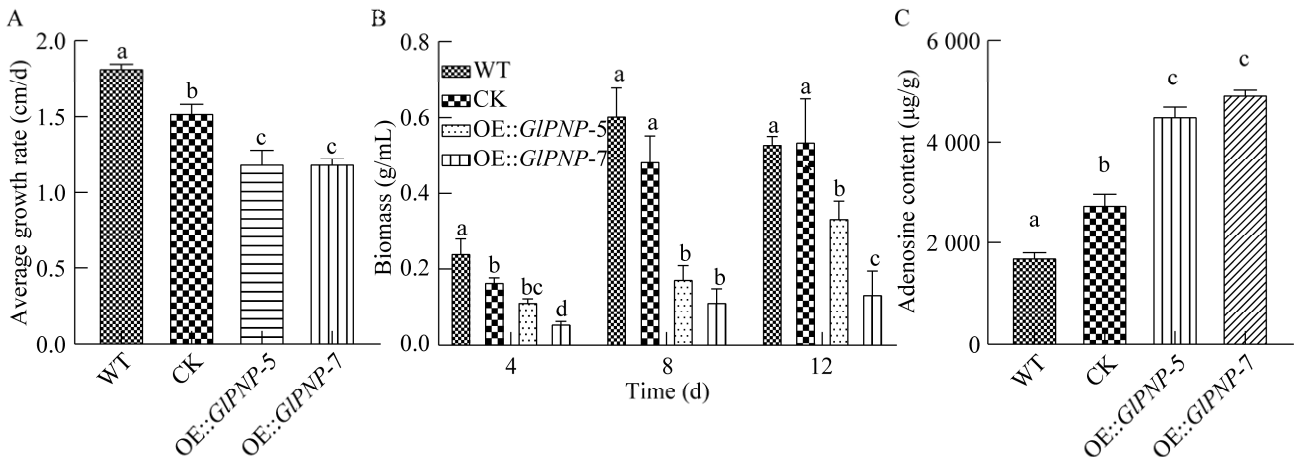


图6 *GIPNP* 转化菌株的生长速度(A)、生物量(B)和腺苷含量(C) 不同小写字母表示不同菌株之间差异显著( $P < 0.05$ ). 采用 Tukey's post-hoc test 进行单因素方差分析

Figure 6 Growth rate (A), biomass (B) and adenosine content (C) of the *GIPNP* transformants. Different lowercase letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between different strains (by one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test).

### 3 讨论与结论

腺苷的生物合成途径在哺乳动物、细菌和植物中已有研究报道,但在真菌特别是药食用

真菌中尚无相关报道。本研究通过检测不同时间阶段灵芝菌丝体的腺苷含量,发现灵芝 *GIPNP* 基因的转录水平与腺苷含量呈正相关关系。因此,本研究克隆了 *GIPNP* 基因并构建了灵芝的

*GIPNP* 过表达菌株。研究表明, *GIPNP* 基因的过表达增加了灵芝腺苷的产量, 是一种有效生产灵芝腺苷的方法。

嘌呤核苷磷酸化酶 (purine nucleoside phosphorylase, PNP) 是嘌呤补救合成途径中的关键酶, 其催化核苷和脱氧核苷的 C-N 糖苷键可逆磷酸化生成嘌呤碱和核糖(脱氧核糖)-1-磷酸<sup>[17]</sup>。在热力学上, 该反应的平衡偏向于核苷的合成。然而, 由于与释放的嘌呤碱基的氧化和磷酸核糖基化相耦合, 体内往往会趋向于磷酸化<sup>[25-27]</sup>。在本研究中, *GIPNP* 过表达后, 反应平衡倾向于核苷的合成, 导致腺苷的合成量上升。

PNP 的底物识别表现出高度的混杂性, 它可以催化基于许多不同碱基和核苷类似物的反应。一般来说, 低分子质量的 PNP (聚体) 其天然底物是 6-氧嘌呤(guanine, hypoxanthine) 及其核苷和 2'-脱氧核苷, 而高分子质量的 PNP (六聚体) 则主要作用于 6-氨基嘌呤(腺嘌呤) 及其核苷。虽然目前还不清楚灵芝中的 *GIPNP* 是否具有广泛的底物, 但与常规底物不同的是, *GIPNP* 作为一种低分子量(34.6 kDa) 的三聚体 PNP, 却可用于腺苷的合成。类似的现象也出现在 *Thermus thermophilus* HB8 中, TtPNP 类似于三聚体 PNP (例如来自 *E. coli* 的 PNP), 对腺苷表现出专一的活性<sup>[28]</sup>。

在灵芝中, *GIPNP* 过表达菌株的腺苷含量增加, 而菌丝生长受到抑制, 生物量下降。在其他基因过表达菌株中也观察到了类似的现象。枯草芽孢杆菌中 *PNP* 的过表达导致菌株干重下降<sup>[29]</sup>; 腺苷产生菌中过表达 *purA* 使腺苷的产量增加 10.8%, 但抑制了菌株的生长<sup>[30]</sup>; 在酿酒酵母中过表达 *ADK* 导致生长抑制, 转化菌株的  $OD_{600}$  值低于对照菌株<sup>[31]</sup>; 在灵芝中过表达葡萄糖基转移酶基因 *GL24971* 提高了胞外多糖产量, 然而生物量分别降低了 50.2% 和 37.5%<sup>[32]</sup>。原因

可能是: (1) 质粒的添加对菌丝自身的新陈代谢造成了额外的负担; (2) 一个基因的高表达不利于菌丝的存活<sup>[33]</sup>。单独过表达某个基因可能导致细胞内代谢通量的比例失衡, 导致终产物合成途径中的某种中间产物过度积累而对细胞造成毒性<sup>[34-36]</sup>。

在本研究中, *GIPNP* 基因的表达与灵芝中的腺苷含量呈正相关。*GIPNP* 基因的过表达成功提高了胞内腺苷含量。结果表明, *GIPNP* 基因的过表达是提高灵芝腺苷产量的有效策略, 对于探索灵芝腺苷合成途径中的关键酶基因, 培育腺苷高产菌株具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] AHMAD R, RIAZ M, KHAN A, ALJAMEA A, ALGHERYAFI M, SEWAKET D, ALQATHAMA A. *Ganoderma lucidum* (Reishi) an edible mushroom; a comprehensive and critical review of its nutritional, cosmeceutical, mycochemical, pharmacological, clinical, and toxicological properties[J]. *Phytotherapy Research: PTR*, 2021, 35(11): 6030-6062.
- [2] 颜梦秋, 刘艳芳, 周帅, 唐传红, 冯杰, 张劲松. 食药菌液体发酵及功能活性成分研究现状与展望[J]. *微生物学通报*, 2023. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.220981  
YAN MQ, LIU YF, ZHOU S, TANG CH, FENG J, ZHANG JS. Liquid fermentation technology and functional components of edible and medicinal fungi[J]. *Microbiology China*, 2023. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.220981 (in Chinese).
- [3] 师小凡, 刘艳芳, 唐传红, 冯杰, 唐庆九, 王金艳, 韩伟, 张劲松. 沪农系列灵芝新品种活性成分及免疫活性对比研究[J]. *食用菌学报*, 2023, 30(1): 64-72.  
SHI XF, LIU YF, TANG CH, FENG J, TANG QJ, WANG JY, HAN W, ZHANG JS. Comparative study on active components and immune activity of new varieties of *Ganoderma lucidum* in Shanghai-Nong series[J]. *Acta Edulis Fungi*, 2023, 30(1): 64-72 (in Chinese).
- [4] BOISON D, YEGUTKIN GG. Adenosine metabolism: emerging concepts for cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2019, 36(6): 582-596.
- [5] LI H, DU YW, JI HR, YANG YN, XU CC, LI QD, RAN LK, WU CM, ZHOU QL, WU SX. Adenosine-rich

- extract of *Ganoderma lucidum*: a safe and effective lipid-lowering substance[J]. *iScience*, 2022, 25(11): 105214.
- [6] SOLAKOV N, KOSTOVA M, LOGINOVSKA K, MARKOV Z, de OLIVEIRA AC, MUHOVSKI Y. Investigation of adenosine precursors and biologically active peptides in cultured fresh mycelium of wild medicinal mushrooms[J]. *Applied Sciences*, 2022, 12(20): 10618.
- [7] GAO JL, LEUNG KSY, WANG YT, LAI CM, LI SP, HU LF, LU GH, JIANG ZH, YU ZL. Qualitative and quantitative analyses of nucleosides and nucleobases in *Ganoderma* spp. by HPLC-DAD-MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007, 44(3): 807-811.
- [8] QIAN ZM, LI WQ, WANG CX, ZHOU MX, SUN MT, GAO H, LI WJ. Quantitative analysis of nucleosides in four *Cordyceps* genus by HPLC[J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2016, 41(13): 2493-2499.
- [9] KE BJ, LEE CL. Using submerged fermentation to fast increase N6-(2-hydroxyethyl)-adenosine, adenosine and polysaccharide productions of *Cordyceps cicadae* NTTU 868[J]. *AMB Express*, 2019, 9(1): 1-9.
- [10] LI B, YAN ZY, LIU XN, ZHOU J, WU XY, WEI P, JIA HH, YONG XY. Increased fermentative adenosine production by gene-targeted *Bacillus subtilis* mutation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2019, 298: 1-4.
- [11] ZHANG JY, JIAN TT, ZHANG Y, ZHANG GY, LING JY. Dynamic content changes of cordycepin and adenosine and transcriptome in *Cordyceps kyushuensis* Kob at different fermentation stages[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2021, 44(8): 1793-1803.
- [12] CAMICI M, ALLEGRINI S, TOZZI MG. Interplay between adenylate metabolizing enzymes and AMP-activated protein kinase[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(18): 3337-3352.
- [13] HOVE-JENSEN B, ANDERSEN KR, KILSTRUP M, MARTINUSSEN J, SWITZER RL, WILLEMOËS M. Phosphoribosyl diphosphate (PRPP): biosynthesis, enzymology, utilization, and metabolic significance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2017, 81(1): e00040-16.
- [14] DEWULF JP, MARIE S, NASSOGNE MC. Disorders of purine biosynthesis metabolism[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2022, 136(3): 190-198.
- [15] ASHIHARA H, STASOLLA C, FUJIMURA T, CROZIER A. Purine salvage in plants[J]. *Phytochemistry*, 2018, 147: 89-124.
- [16] LIECHTI G, GOLDBERG JB. *Helicobacter pylori* relies primarily on the purine salvage pathway for purine nucleotide biosynthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(4): 839-854.
- [17] BZOWSKA A, KULIKOWSKA E, SHUGAR D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2000, 88(3): 349-425.
- [18] BOISON D, JARVIS MF. Adenosine kinase: a key regulator of purinergic physiology[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2021, 187: 114321.
- [19] HE JX, ZOU LN, PAREEK V, BENKOVIC SJ. Multienzyme interactions of the *de novo* purine biosynthetic protein PAICS facilitate purinosome formation and metabolic channeling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(5): 101853.
- [20] KROPOTOV A, KULIKOVA V, SOLOVJEVA L, YAKIMOV A, NERINOVSKI K, SVETLOVA M, SUDNITSYNA J, PLUSNINA A, ANTIPOVA M, KHODORKOVSKIY M, MIGAUD ME, GAMBARYAN S, ZIEGLER M, NIKIFOROV A. Purine nucleoside phosphorylase controls nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(12): 102615.
- [21] HEINEMANN KJ, YANG SY, STRAUBE H, MEDINA-ESCOBAR N, VARBANOVA-HERDE M, HERDE M, RHEE S, WITTE CP. Initiation of cytosolic plant purine nucleotide catabolism involves a monospecific xanthosine monophosphate phosphatase[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 6846.
- [22] ZHU YX, ZHANG SS, YU JJ. ZmAdSS1 encodes adenylosuccinate synthetase and plays a critical role in maize seed development and the accumulation of nutrients[J]. *Plant Science*, 2023, 330: 111644.
- [23] LIU DB, GONG J, DAI WK, KANG XC, HUANG Z, ZHANG HM, LIU W, LIU L, MA JP, XIA ZL, CHEN YX, CHEN YW, WANG DP, NI PX, GUO AY, XIONG XY. The genome of *Ganoderma lucidum* provides insights into triterpenes biosynthesis and wood degradation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36146.
- [24] KANG XC, LIU CC, SHEN PY, HU LQ, LIN RM, LING J, XIONG XY, XIE BY, LIU DB. Genomic characterization provides new insights into the biosynthesis of the secondary metabolite huperzine A in the endophyte *Colletotrichum gloeosporioides* Cg01[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 3237.
- [25] LIU GF, CHENG TT, CHU JL, LI S, HE BF. Efficient synthesis of purine nucleoside analogs by a new trimeric

- purine nucleoside phosphorylase from *Aneurinibacillus migulanus* AM007[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 25(1): 100.
- [26] ZHOU XR, YAN WZ, ZHANG C, YANG ZY, NEUBAUER P, MIKHAILOPULO IA, HUANG Z. Biocatalytic synthesis of seleno-, thio- and chloro-nucleobase modified nucleosides by thermostable nucleoside phosphorylases[J]. *Catalysis Communications*, 2019, 121: 32-37.
- [27] ZHU SZ, SONG DW, GONG CY, TANG P, LI XZ, WANG JJ, ZHENG GJ. Biosynthesis of nucleoside analogues via thermostable nucleoside phosphorylase[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(15): 6769-6778.
- [28] TOMOIKE F, KURAMITSU S, MASUI R. Unique substrate specificity of purine nucleoside phosphorylases from *Thermus thermophilus*[J]. *Extremophiles*, 2013, 17(3): 505-514.
- [29] 杨书尧, 刘莉, 马跃超, 陈宁, 谢希贤. 过表达 PNP 对肌苷生产菌合成利巴韦林的影响[J]. *天津科技大学学报*, 2015, 30(3): 14-18.  
YANG SY, LIU L, MA YC, CHEN N, XIE XX. Effect of overexpression of purine nucleoside phosphorylase on ribavirin production from inosine producing strain[J]. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2015, 30(3): 14-18 (in Chinese).
- [30] 张洋, 杜姗姗, 谢希贤, 徐庆阳, 陈宁. 过表达 *purA* 基因对腺苷积累的影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2011, 31(12): 22-26.  
ZHANG Y, DU SS, XIE XX, XU QY, CHEN N. Effect of *purA* gene overexpression on adenosine accumulation[J]. *China Biotechnology*, 2011, 31(12): 22-26 (in Chinese).
- [31] 王凯, 姬晓兵, 徐欢欢, 仇申坤, 邹少兰. 整合过表达嘌呤代谢途径关键酶基因提高酿酒酵母菌株环磷酸腺苷产量[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(8): 25-30.  
WANG K, JI XB, XU HH, QIU SS, ZOU SL. Over-expressing key enzyme genes in the purine synthesis pathway by integrating into genome improves cyclic adenosine monophosphate production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2016, 42(8): 25-30 (in Chinese).
- [32] 陈云, 赵丽婷, 顾正华, 李由然, 石贵阳, 丁重阳. 糖基转移酶 GL24971 对灵芝多糖合成的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(23): 1-7.  
CHEN Y, ZHAO LT, GU ZH, LI YR, SHI GY, DING ZY. Effect of glycosyltransferase GL24971 on polysaccharide synthesis in *Ganoderma lucidum*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(23): 1-7 (in Chinese).
- [33] BAILEY JE. Lessons from metabolic engineering for functional genomics and drug discovery[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(7): 616-618.
- [34] MANZANO D, FERNÁNDEZ-BUSQUETS X, SCHALLER H, GONZÁLEZ V, BORONAT A, ARRÓ M, FERRER A. The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity[J]. *Planta*, 2004, 219(6): 982-992.
- [35] SAINT-MARC C, CESCHIN J, ALMYRE C, PINSON B, DAIGNAN-FORNIER B. Genetic investigation of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Current Genetics*, 2020, 66(6): 1163-1177.
- [36] ZHANG DH, JIANG LX, LI N, YU XY, ZHAO P, LI T, XU JW. Overexpression of the squalene epoxidase gene alone and in combination with the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A gene increases ganoderic acid production in *Ganoderma lingzhi*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(23): 4683-4690.