

灵芝疏水蛋白编码基因 *Unigene0004454* 的克隆和异源表达

陈虹^{1,2}, 刘冬梅², 齐希武², 梁呈元^{1,2*}

(1. 南京中医药大学, 江苏南京 210023)

(2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏省植物资源保护与利用重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要: 为探究灵芝 (*Ganoderma lucidum*) ZJ-1 菌株疏水蛋白编码基因 *Unigene0004454* 的潜在功能, 该研究通过基因克隆、生物信息学分析、启动子元件分析和基因异源表达对该基因展开研究。结果表明, *Unigene0004454* 的 DNA 序列长度为 436 bp, cDNA 序列长度为 330 bp, 编码 109 个氨基酸。氨基酸序列分析结果表明其具有疏水蛋白典型的半胱氨酸结构特点; 在进化上与白肉灵芝 (*Ganoderma leucocontextum*)、紫芝 (*Ganoderma sinense*) 的疏水蛋白亲缘关系较近。*Unigene0004454* 的启动子区域含有核心启动子元件 (如 TATA-BOX)、多个激素响应元件 (如 ABRE) 及环境胁迫响应元件 (如 MBS), 推测 *Unigene0004454* 的生理功能可能与菌株生长发育有关。构建 pET-32a-*Unigene0004454* 重组质粒并转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞进行表达, 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 验证, 结果表明在 BL21 菌株中成功表达了分子量约为 27 kDa 的重组蛋白, 验证了 *Unigene0004454* 基因异源表达的可行性。该研究为进一步阐明 *Unigene0004454* 基因的生理功能及开发疏水蛋白的应用奠定了基础。

关键词: 灵芝; 基因克隆; 疏水蛋白; 异源表达

文章编号: 1673-9078(2026)05-72-79

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.5.0399

Cloning and Heterologous Expression of the Hydrophobin-encoding Gene *Unigene0004454* from *Ganoderma lucidum*

CHEN Hong^{1,2}, LIU Dongmei², QI Xiwu², LIANG Chengyuan^{1,2*}

(1.Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

(2.Jiangsu Key Laboratory for Conservation and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To investigate the potential functions of the hydrophobin-encoding gene *Unigene0004454* from *Ganoderma lucidum* strain ZJ-1, gene cloning, bioinformatic analysis, promoter element prediction, and heterologous expression were performed. The results showed that the full-length genomic sequence of *Unigene0004454* was 436 bp, with a cDNA length of 330 bp encoding a protein of 109 amino acids. Amino acid sequence analysis revealed the presence of the conserved cysteine pattern characteristic of hydrophobins and indicated a close evolutionary relationship with hydrophobins from *Ganoderma leucocontextum* and *Ganoderma sinense*. Promoter analysis demonstrated that the upstream regulatory region of *Unigene0004454* contains core promoter elements

引文格式:

陈虹,刘冬梅,齐希武,等.灵芝疏水蛋白编码基因*Unigene0004454*的克隆和异源表达[J].现代食品科技,2026,42(5):72-79.

CHEN Hong, LIU Dongmei, QI Xiwu, et al. Cloning and heterologous expression of the hydrophobin-encoding gene *Unigene0004454* from *Ganoderma lucidum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(5): 72-79.

收稿日期: 2025-03-20; 修回日期: 2025-06-20; 接受日期: 2025-06-23

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32102457)

作者简介: 陈虹 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 药食同源真菌功能基因研究, E-mail: 13647040898@163.com

通讯作者: 梁呈元 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药用植物功能基因研究, E-mail: liangcy618@cnbg.net

(e.g., TATA box), multiple hormone-responsive elements (e.g., ABRE), and stress-responsive cis-elements (e.g., MBS), suggesting that this gene may be involved in strain growth, development, and stress responses. For heterologous expression, the recombinant plasmid pET-32a-*Unigene0004454* was successfully constructed and transformed into *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE and western blot analyses confirmed the expression of a recombinant protein with an apparent molecular weight of approximately 27 kDa, demonstrating the feasibility of heterologous expression of *Unigene0004454*. These findings provide a molecular basis for further investigation of the biological functions of *Unigene0004454* and support the potential development of hydrophobin-based functional applications.

Key words: *Ganoderma lucidum*; gene cloning; hydrophobin; heterologous expression

真菌疏水蛋白是由丝状真菌分泌的小分子蛋白质,具有双亲性(含亲水和疏水区域),其相对分子量约 10 kDa,约含 100 个氨基酸。这类蛋白质可在两相界面处自组装成膜,调控界面的亲疏水特性^[1,2]。它们富含疏水性氨基酸,通常含有 8 个半胱氨酸残基(Cys),可形成 4 个二硫键^[3,4]。然而,也存在例外,例如在硬毛粗盖孔菌(*Coriopsis trogii*)的 36 个疏水蛋白中,有 14 个蛋白仅包含 6 个 Cys 残基^[5];在蛹虫草(*Cordyceps militaris*)的 4 个疏水蛋白中,也有一个蛋白仅含有 6 个 Cys 残基^[6]。疏水蛋白分为 I 类和 II 类两种。在两相界面处自组装时, I 类疏水蛋白可形成牢固的淀粉样膜,需用甲酸或三氟乙酸(TFA)进行溶解。II 类疏水蛋白无法自组装成淀粉样原纤维,可在 60% (ϕ) 乙醇、2 wt.% SDS 或通过施加压力时溶解。I 类疏水蛋白在子囊菌与担子菌中均有分布,而 II 类疏水蛋白只存在于子囊菌中^[7]。疏水蛋白在丝状真菌中具有多种重要生理功能,如影响原基分化^[8]、子实体发育^[9,10]、胁迫反应^[11,12]、木质素降解^[13]及病原真菌的致病性^[14]等。此外,疏水蛋白因稳定的乳化性和高表面活性,具有广泛的应用潜力。例如,可提高药物溶解性以及制备出优于传统的生物传感器^[15,16]。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属于多孔菌科(Polyporaceae)灵芝属(*Ganoderma*)^[17]。该物种在世界各大洲均有分布,而在中国主要集中于山东、吉林、江苏、浙江、福建、江西、安徽等地区。作为一种珍贵的药食两用真菌,灵芝含有多种化学成分,包括灵芝三萜和多糖等活性成分,展现出免疫调节、抗肿瘤等多方面的药理作用^[18,19]。此外,灵芝在食用方面可加工为灵芝药膳、破壁孢子粉及灵芝孢子油等形式。关于灵芝疏水蛋白的相关报道较少。基于本课题组前期对灵芝不同发育阶段转录组数据(BioProject: PRJNA822528)的分析结果,发现疏水蛋白编码基因 *Unigene0004454* 在菌丝阶段呈现显著高表达,而在其它发育阶段表达水平极低^[20]。由此推测,该基因可能在菌丝生长过程中发挥关键作用。本研究成功克隆了灵芝 *Unigene0004454* 基因,并对其序列特征、蛋白质

结构、系统进化关系、启动子顺式元件等进行了分析,同时进行了原核表达研究,为揭示该基因的生物學功能及开发疏水蛋白的应用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

灵芝菌株 ZJ-1, 由本实验室前期分离鉴定^[21], 现保藏于江苏省中国科学院植物研究所药食同源课题组; 5×TA/Blunt-Zero Cloning Mix 试剂, 反转录试剂盒 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper), 高保真扩增酶 Phanta Max super-Fidelity, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 及 BL21 (DE3) 感受态细胞, 上海唯地生物技术有限公司; 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基, 南京寿德生物科技股份有限公司; 雅酶 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(15 wt.%), 上海雅酶生物医药技术有限公司; 胰蛋白胨、氯化钠、酵母提取物、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 主要仪器与设备

ZQZY-78BE 恒温摇床, 上海知楚仪器有限公司; DNP-9082 恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; Velocity 18R Pro 低温离心机, 英国 Dynamica; GI54DS 高压蒸汽灭菌锅, 致微仪器有限公司; ABI SimpliAmp™ Thermal Cycler PCR 仪, 赛默飞世尔科技有限公司; JY300C 电泳仪、JY04S-3E 凝胶成像系统, 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 灵芝 DNA、RNA 的提取与 cDNA 的合成

在铺有灭菌玻璃纸的 PDA 培养基平板上接种灵芝菌丝, 在 28 °C 恒温培养箱中倒置培养。培养 7 d 后收集菌丝体。采用 CTAB 法, 提取基因组 DNA^[22], 同时用 KK 超快植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。测定

RNA 的浓度和完整性，并据此计算出反转录所需的 RNA 量。随后，使用 HiScript III 第一链 cDNA 合成试剂盒（含 gDNA 去除模块）进行反转录反应，合成的 cDNA 保存在 -80°C 备用。

1.3.2 *Unigene0004454*基因的克隆

基于 *Unigene0004454* 基因的 cDNA 序列, 用 Premier 5.0 软件设计扩增引物。上游引物为 *Unigene0004454-F* (5'-ATGTTCTGCTCGCGTTGCT-3'), 下游引物为 *Unigene0004454-R* (5'-TTAGAGCTGGATG GGGAC-3')。采用 Phanta Max super-Fidelity 高保真酶, 分别以 DNA 和 cDNA 作为模板, 进行 PCR 扩增反应。其 PCR 扩增程序设定如下: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s、52 °C 退火 30 s 及 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。采用 1 wt.% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 并回收目标片段, 并将其与 5×TA/Blunt-Zero 克隆载体连接, 连接产物转入至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。筛选出的阳性克隆由上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

1.3.3 生物信息学分析

利用 DNAMAN 7.0 软件将 *Unigene0004454* 基因的 cDNA 序列翻译为氨基酸序列。随后, 分别采用在线工具 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)、SignalP 5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)、SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)、Phyre 2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>) 对其基本理化性质、信号肽、保守结构域和三级结构进行预测分析。通过 NCBI 网站中的 Blast 工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 获得同源疏水蛋白序列, 通过软件 MEGA 11.0 的邻接算法 (neighbor-joining method, NJ) 来构建系统进化树。

1.3.4 启动子的克隆及功能元件分析

以灵芝基因组中 *Unigene0004454* 基因的上游序列为参考, 使用 Primer 5.0 软件设计引物, 其上游引物为 Pro-*Unigene0004454*-F (5'-CGTGCTTTCCATCTAGGG-3'), 下游引物为 Pro-*Unigene0004454*-R (5'-AGCAACGCGAGCGAACAT-3')。用灵芝基因组 DNA 作为模板, 按照 1.3.2 节描述的方法, 扩增并克隆 *Unigene0004454* 基因启动子区域的 2000 bp 序列。随后, 使用 PlantCARE 网站 (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对其作用元件进行预测与分析, 借助 TBtools 2.11 软件实现预测结果的可视化。

1.3.5 原核表达载体构建

根据 *Unigene0004454* 基因的 cDNA 序列和 pET-32a(+) 载体序列 (大小为 5 900 bp) 设计含有同源臂的引物, 上游引物为 pET-32a-*Unigene0004454*-F (5'-GC

TGATATCGGATCCGAATTCACCTCCCACTGCTCCCTCCGTCG-3'), 下游引物为 pET-32a-Unigene0004454-R (5'-GTGGTGGTGGTGGTGGTCTCGAGTTAGAGCTGGATGGGGACGC-3')。对 *Unigene0004454* 进行克隆, 获得带有同源臂的 *Unigene0004454* 片段。采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 两种限制性核酸内切酶, 对 pET-32a(+) 质粒实施双酶切处理, 回收目的条带。利用同源重组技术, 将 *Unigene0004454* 基因片段与其进行连接, 随后将所得重组产物转化至大肠杆菌 DH5 α 内, 选取阳性菌落送至上海生工生物工程有限公司进行序列测定。经测序确认后, 对携带重组质粒 pET-32a-Unigene0004454 的菌落进行扩大培养, 并提取该质粒。为进一步确保重组质粒的正确性, 对其进行酶切验证。确认无误后, 将其转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中。

1.3.6 Unigene0004454蛋白的诱导表达及纯化

将构建好的 BL21 菌株接种于 20 mL LB 培养基（酵母提取物 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、氯化钠 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、胰蛋白酶 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）中，于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下过夜培养。随后，将 1% (φ) 的菌液接种至 50 mL LB 培养基中，在相同条件下培养，直至菌液 OD_{600} 值达到 0.4~0.6。加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷至终浓度为 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，于 $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下诱导表达 $20\text{ h}^{[23]}$ 。诱导结束后，将菌液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $8\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min。沉淀用磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬后再次离心。向沉淀中加入 10 mL 缓冲液 ($0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ 、 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ ，pH 值 7.4) 重悬，再加入苯甲基磺酰氟使其最终浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，混匀，于冰浴中破碎。将破碎的菌液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min，分别收集上清和沉淀。以相同方法处理含有 pET-32a(+) 空载的菌株，获得其上清和沉淀，并备用。最后，通过 SDS-PAGE 对样品进行检测。对破碎后的大肠杆菌 Unigene0004454 上清液进行纯化。使用含不同浓度咪唑 (20、50、100、200 和 $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的缓冲液依次洗脱，收集 $250\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑缓冲液洗脱后的流出液，并用超滤管浓缩。

1.3.7 Western blotting验证*Unigene0004454*基因表达

在 80 V、300 mA 条件下, 使用转膜缓冲液 (200 mmol·L⁻¹ Tris, 27 mmol·L⁻¹ 甘氨酸, 10 % (φ) 甲醇), 将未染色凝胶中的蛋白质电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 转移时间为 90 min。在室温下, 使用含 5 wt.% 脱脂奶粉的 PBST 溶液 (PBS 含 0.05 % (φ) Tween 20) 封闭 PVDF 膜 1 h。接着, 将膜浸入含 5 wt.% 脱脂奶粉 PBST 稀释的兔抗 His 标签多克隆抗体溶液 (稀释比例 1:2 000) 中, 孵育 2 h。用 PBST 多次洗涤后, 把膜浸入含 5 wt.% 脱脂奶粉 PBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体溶液 (稀释

比例 1:5 000) 中, 孵育 2 h。随后用 PBST 洗涤, 加 ECL 试剂显色并通过 X 射线扫描显示结果。

1.3.8 数据分析

通过 Microsoft Excel 2019 对 PlantCARE 网站预测的数据进行分析处理, 将处理后的数据导入 TBtools 2.11 生成可视化图表; 利用 PyMoL 3.1 对 Phyre 2.0 网站预测的蛋白三级结构进行分析。

2 结果与讨论

2.1 灵芝 *Unigene0004454* 基因的克隆及生物信息学分析

以灵芝基因组 DNA 和 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 凝胶电泳显示均获得一条清晰特异性的条带 (图 1a)。*Unigene0004454* 基因的 DNA 扩增片段长度为 436 bp, 包含 2 个内含子, 3 个外显子。cDNA 扩增片段长度为 330 bp, 编码 109 个氨基酸, 含 8 个 Cys

残基 (图 1b)。*Unigene0004454* 基因序列已提交到 NCBI GenBank, 登录号为 PV580075。分析显示, 该蛋白具有信号肽, 且其剪切位点位于第 19 与第 20 位氨基酸之间。分析 *Unigene0004454* 蛋白的保守结构域发现, 第 5~21 位氨基酸为低复杂度区域 (简单重复的氨基酸片段), 而第 29~104 位氨基酸属于疏水蛋白的保守结构域 (图 1c)。对氨基酸序列分析, 结果显示其相对分子质量为 11 068.77 Da, 等电点为 4.68, 一级结构式为 $X_{28}-C-X_6-C-C-X_{32}-C-X_{13}-C-X_5-C-C-X_{12}-C-X_5$ (C 表示半胱氨酸, X 表示其它任意氨基酸)。研究表明, 真菌疏水蛋白均为小分子蛋白, 通常含约 100 个氨基酸和 8 个 Cys, I 类疏水蛋白的 Cys 模式为 $C-X_{5-7}-C-C-X_{19-39}-C-X_{8-23}-C-X_{5-7}-C-C-X_{6-18}-C^{[24]}$, 本研究中 *Unigene0004454* 蛋白的 Cys 构型符合 I 类真菌疏水蛋白的特征。根据系统进化树 (图 1d) 可知, *Unigene0004454* 与来自白肉灵芝 (*Ganoderma leucocontextum*)、紫芝 (*Ganoderma sinense*) 的疏水蛋白聚为一枝。

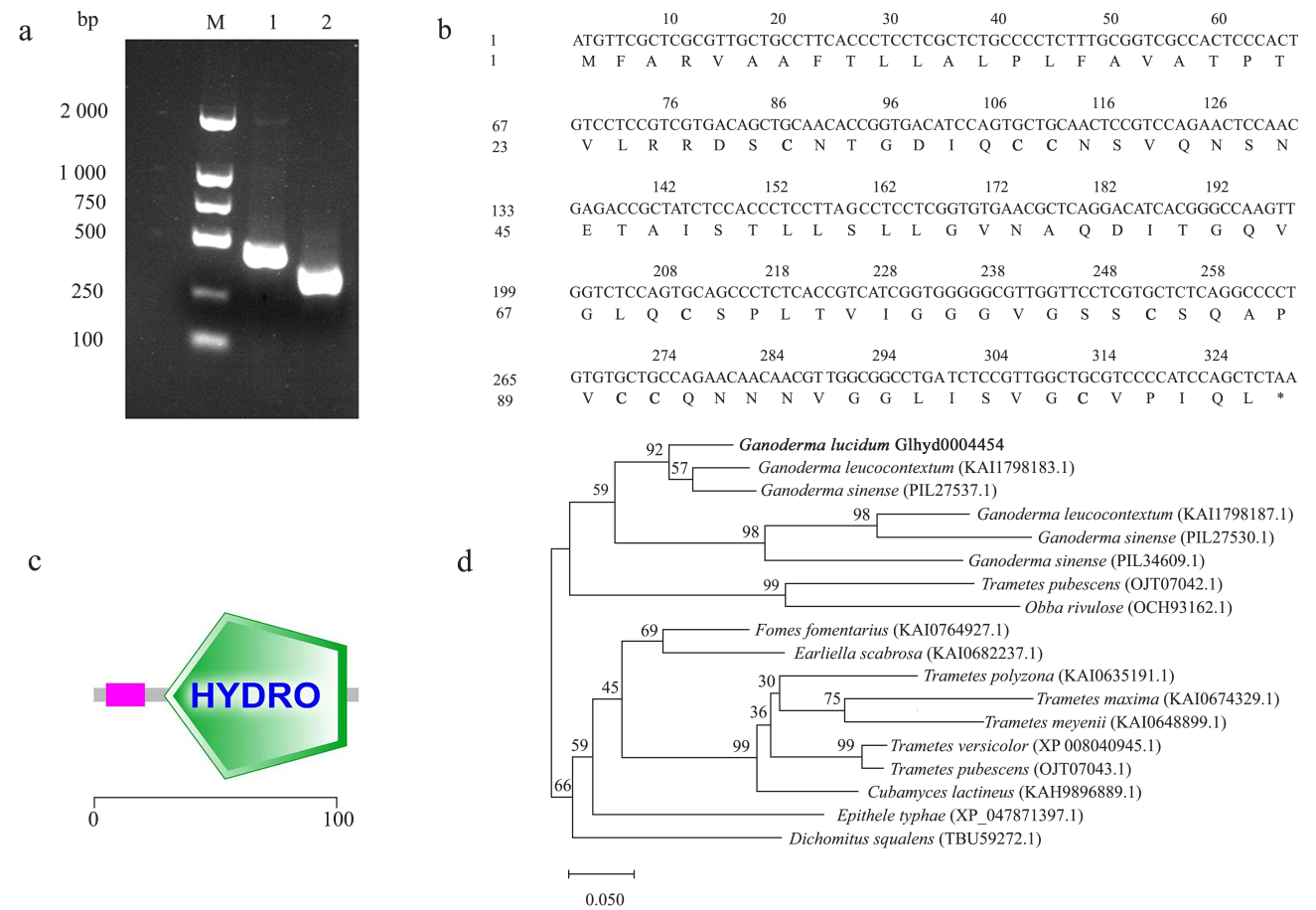


图 1 *Unigene0004454* 基因的克隆及生物信息学分析

Fig.1 Cloning and bioinformatics analysis of *Unigene0004454* gene

注: a: *Unigene0004454* 基因的扩增。泳道 1: 以基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物 (436 bp); 泳道 2: 以 cDNA 为模板的 PCR 扩增产物 (330 bp); M: DNA Marker (100~2 000 bp)。b: *Unigene0004454* 基因的核苷酸与氨基酸序列。c: *Unigene0004454* 蛋白的保守结构域分析。红色部分为低复杂度区域, 绿色部分为疏水蛋白保守结构域。d: *Unigene0004454* 蛋白与其它物种同源蛋白的系统进化树。括号中为同源蛋白的序列登录号。

对三维结构的预测分析有助于理解蛋白质的功能。将 Unigene0004454 蛋白的氨基酸序列提交至 Phyre 2.0 服务中,通过 Intensive mode 法获得其三维结构模型(图 2a)。其参考模板为裂褶菌(*Schizophyllum commune*) I 类疏水蛋白 hyd1、肉原毛平革菌(*Phanerochaete carnosus*) I 类疏水蛋白和伏果干腐菌(*Serpula lacrymans*) I 类疏水蛋白,与其同源相似性分别为 43%、44% 和 35%。在残基覆盖率为 100% 的情况下,预测的蛋白质三级结构可信度大于 90%。在其三级结构中,含有 α -螺旋结构,两个相邻的 β 折叠链通过二硫键连接,形成一个四链 β 桶核心,二硫键被桶状结构束缚,形成结构致密的蛋白分子,这种结构特征与疏水蛋白的基本结构一致^[25,26]。

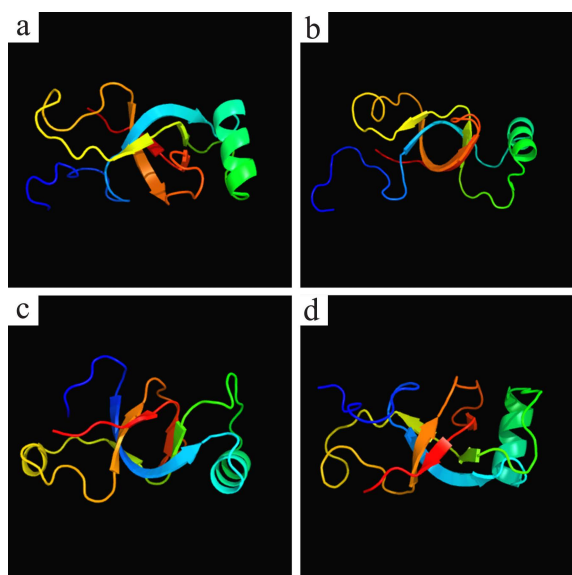


图 2 Unigene0004454 蛋白的三维结构预测结果

Fig.2 The predicted three-dimensional structure of the Unigene0004454 protein

注:(a) 预测的 Unigene0004454 蛋白三维结构,(b) 裂褶菌 I 类疏水蛋白 hyd1 三维结构,(c) 肉原毛平革菌 I 类疏水蛋白三维结构,(d) 伏果干腐菌 I 类疏水蛋白三维结构。

2.2 Unigene0004454 基因的启动子克隆与功能元件分析

研究表明,疏水蛋白基因在真菌生长调控中发挥重要作用^[24,27],推测其启动子可能含有响应多种信号的顺式作用元件。本研究成功克隆了灵芝 Unigene0004454 基因启动子区域的 2 000 bp 序列。对该序列进行分析,并进行了图像化展示(图 3)。研究结果揭示,该启动子不仅包含多个保守元件(如 TATA-BOX 和 CAAT-BOX),还包含多种激素响应元件,例如响应水杨酸的 TCA-element 元件,响应茉莉酸甲酯的 CGTCA-motif 元件和 TGACG-motif

元件,响应脱落酸的 ABRE 元件,响应生长素的 AuxRR-core 元件和 TGA-element 元件。这表明灵芝 Unigene0004454 基因启动子可能受这些激素的调控,从而激活该基因的功能。此外,Unigene0004454 基因启动子也包含多种非生物胁迫的响应元件,如低温响应相关的 LTR 元件、干旱诱导的 MBS 元件以及缺氧诱导的 GC-motif 元件,表明该基因可能对多种环境信号都作出响应,从而增强其适应胁迫的能力。另外,该基因启动子还包含与光照响应有关的元件(G-box、TCT-motif、GT1-motif 和 Sp1),表明该基因在光照条件下可能发挥某些特定功能。陈仁良^[26]研究金针菇(*Flammulina filiformis*)疏水蛋白基因 *FV-Hyd1* 时发现,其上游调控序列包含多种顺式作用元件,如环境胁迫响应元件(光照、低温、干旱等),以及激素信号响应元件(茉莉酸甲酯、脱落酸等),表明该基因表达受多种信号影响,进而参与调控金针菇的形态发育及对复杂环境条件的适应性。Soanes 等^[28]研究稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)疏水蛋白基因 *MPG1* 时发现,其启动子区域含环境 pH 值响应元件、氮代谢调控元件、AbaA 结合位点和胁迫应答元件等,影响菌株致病性及分生孢子和附着胞形成。

2.3 原核表达菌株 pET-32a-Unigene0004454 的构建

异源表达重组蛋白的宿主主要包括酵母和大肠杆菌。大肠杆菌因其生长快速且易于遗传操作,成为最常用的异源蛋白表达宿主^[29]。本研究选择以大肠杆菌为宿主进行 Unigene0004454 蛋白的异源表达。对 Unigene0004454 基因的 cDNA 序列进行扩增,将获得的片段(图 4a)插入载体构建重组质粒。对经测序验证无误的重组质粒进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切处理,结果显示出预期的小条带(图 4b),确认成功构建了目标重组质粒 pET-32a-Unigene0004454,进而成功构建表达菌株。

2.4 重组 Unigene0004454 蛋白的诱导表达及 Western blotting 分析

对提取的重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,与空白对照相比,目的蛋白在上清液和沉淀物中均存在大小约为 27 kDa 的明显条带,这一结果与预测的重组 Unigene0004454 蛋白大小一致;根据结果可看出重组蛋白 Unigene0004454 在上清液中有明显存在(图 5a)。进一步通过 Western blotting 实验验证其是否表达成功。结果显示,与空白对照相比,在约 27 kDa 处有明显蛋白条带,该结果与 SDS-PAGE 检测所得结果相同,证明了重组蛋白 Unigene0004454 在大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞中成功表达(图 5b)。

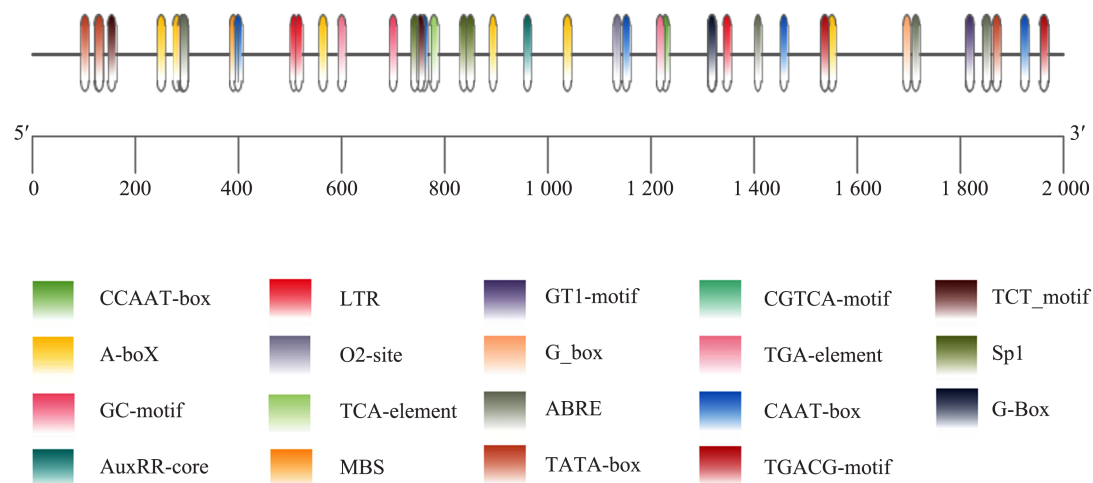


图 3 *Unigene0004454* 启动子功能元件分析

Fig.3 Analysis of functional elements in the *Unigene0004454* promoter

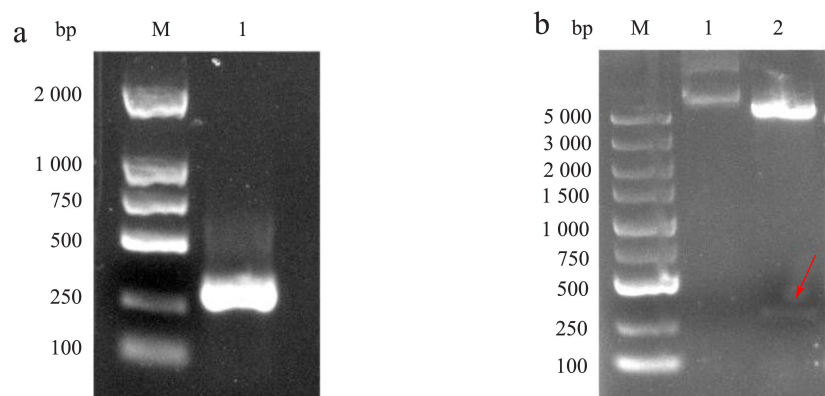


图 4 *Unigene0004454* 基因片段扩增 (a) 和重组质粒双酶切验证 (b)

Fig.4 Amplification of the *Unigene0004454* gene fragment (a) and double enzyme digestion verification of the recombinant plasmid (b)

注: (a) 泳道 1: 带有同源臂的 *Unigene0004454* 基因片段, 大小为 315 bp。M: DNA Marker (100~2 000 bp)。(b) 泳道 1: 完整重组质粒, 大小为 6 145 bp; 泳道 2: 酶切后重组质粒, 大小分别为 5 866 bp、279 bp。M: DNA Marker (100~5 000 bp)。

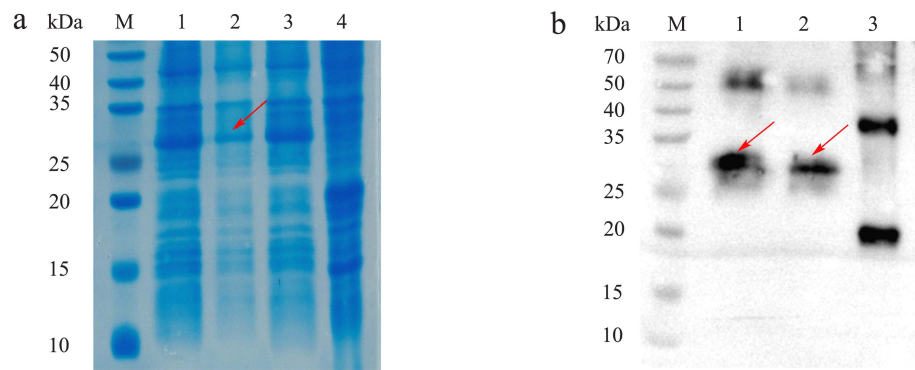


图 5 重组 *Unigene0004454* 蛋白的 SDS-PAGE (a) 和蛋白质印迹分析 (b) 结果

Fig.5 Results of SDS-PAGE (a) and Western blotting analysis (b) of the recombinant *Unigene0004454* protein

注: (a) 泳道 1: 破碎前的总重组蛋白 *Unigene0004454*; 泳道 2~3: 破碎后重组蛋白 *Unigene0004454* 的上清液和沉淀物; 泳道 4: 破碎后 pET-32a 的总蛋白。(b) 泳道 1: 250 mmol·L⁻¹ 咪唑缓冲液洗脱后的重组蛋白 *Unigene0004454*; 泳道 2: 纯化浓缩后的 *Unigene0004454*; 泳道 3: 破碎后 pET-32a 的上清液。M: TureColor Pre-stained Protein Marker。

研究表明,食药用真菌的疏水蛋白基因在酵母中表达较为成功,而针对其在大肠杆菌中表达的相关研究则相对较少。例如,平菇(*Pleurotus ostreatus*)疏水蛋白基因 *Po.hyd1* 与香菇(*Lentinula edodes*)疏水蛋白基因 *Le.hyd* 的融合疏水蛋白在毕赤酵母中成功表达,其起泡性和乳化性优于从平菇菌丝中提取的天然疏水蛋白^[30]。宋东民等^[31]利用酿酒酵母实现了灰树花(*Grifola frondosa*)疏水蛋白 HGF1 的分泌型表达;灰树花疏水蛋白 HGFII 成功在毕赤酵母中表达,并表现出良好的自组装能力^[32]。然而, Wang 等^[33]将灰树花中的 *hgf1* 基因通过大肠杆菌 BL21 进行表达,发现重组蛋白主要以包涵体形式存在。在其它丝状真菌中,已有疏水蛋白基因在大肠杆菌中成功表达的报道。黄佩^[34]利用原核表达系统对哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)中的 5 个疏水蛋白进行异源表达,成功获得了 2 个重组蛋白,并在上清中检测到,这两个重组蛋白能够诱导烟草产生早期防御反应。Ahn 等^[35]以构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中的 I 类疏水蛋白 DewA 为研究对象,选择大肠杆菌为宿主进行异源表达,研究发现不含信号肽序列的重组疏水蛋白主要以可溶性形式存在。王记圆等^[36]采用 pET-32a 载体对橡胶树炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)疏水蛋白基因进行了原核表达研究。结果显示,不含信号肽的重组疏水蛋白在菌体和培养液中均可被检测到,而含信号肽的重组蛋白则未被检测到。这表明,在原核表达系统中,信号肽的存在可能会对疏水蛋白的表达结果产生影响。本实验通过将去除信号肽的 *Unigene0004454* 基因的 cDNA 克隆到 pET-32a 载体进行诱导表达,在上清中成功检测到重组蛋白,从而避免了信号肽对表达的影响,并实现了重组蛋白 *Unigene0004454* 的部分可溶性表达。后续研究将进一步优化诱导表达条件并改进纯化策略,以提升重组蛋白的产量。

3 结论

本研究基于课题组前期对灵芝转录组的系统分析,选取疏水蛋白基因 *Unigene0004454* 为研究对象,并成功克隆该基因。序列分析结果显示, *Unigene0004454* 基因编码一个由 109 个氨基酸组成的蛋白,包含 8 个保守的 Cys 残基,属于 I 型真菌疏水蛋白。三级结构建模显示, *Unigene0004454* 蛋白形成以 β 桶为核心的结构框架。此外,对 *Unigene0004454* 基因启动子区域(2 000 bp)的研究,鉴定出多个潜在的功能元件,推测该基因可能受到多个信号通路的调控。通过构建 pET-32a-*Unigene0004454* 重组质粒,实现了该疏水蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的可溶性表达。鉴于灵

芝中疏水蛋白的研究相对较少,其功能及作用机制尚不明确,本研究为后续深入探讨 *Unigene0004454* 的生物学功能及开展疏水蛋白性质研究奠定基础。

参考文献

- [1] BAYRY J, AIMANIAND V, Guijarro J I, et al. Hydrophobins--unique fungal proteins [J]. Plos Pathogens, 2012, 8(5): e1002700.
- [2] CHENG Y Y, WANG B, WANG Y Y, et al. Soluble hydrophobin mutants produced in *Escherichia coli* can self-assemble at various interfaces [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2020, 573: 384-395.
- [3] 王斌.二硫键在疏水蛋白自组装过程中的功能研究[D].天津:天津大学,2018.
- [4] JEROEN V, TIM T, FLORIAN W, et al. Liquid storage stability of the class II hydrophobin HfbI: effect of pH on functional properties [J]. Process Biochemistry, 2023, 130: 455-463.
- [5] WANG L, LU C, FAN M, et al. *Coriopsis troglodytes* hydrophobin genes favor a clustering distribution and are widely involved in mycelial growth and primordia formation [J]. Gene, 2021, 802: 145863.
- [6] LI X, WANG F, XU Y, et al. Cysteine-rich hydrophobin gene family: genome wide analysis, phylogeny and transcript profiling in *Cordyceps militaris* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(2): 643.
- [7] QUARANTIN A, HADELER B, KRÖGER C, et al. Different hydrophobins of *Fusarium graminearum* are involved in hyphal growth, attachment, water-air interface penetration and plant infection [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 751.
- [8] TAO Y, CHEN R, YAN J, et al. A hydrophobin gene, *Hyd9*, plays an important role in the formation of aerial hyphae and primordia in *Flammulina filiformis* [J]. Gene, 2019, 706: 84-90.
- [9] SONG H Y, KIM D H, KIM J M. Comparative transcriptome analysis of dikaryotic mycelia and mature fruiting bodies in the edible mushroom *Lentinula edodes* [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8 983.
- [10] LI X, LIU M, DONG C. Hydrophobin gene *Cmhyd4* negatively regulates fruiting body development in edible fungi *Cordyceps militaris* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(5): 4586.
- [11] QIAO J, LIU H, XUE P, et al. Function of a hydrophobin in growth and development, nitrogen regulation, and abiotic stress resistance of *Ganoderma lucidum* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2023, 370: 1-10.
- [12] HAN J, KAWAUCHI M, SCHIPHOF K, et al. Features of disruption mutants of genes encoding for hydrophobin Vmh2 and Vmh3 in mycelial formation and resistance to environmental stress in *Pleurotus ostreatus* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2023, 370: 1-7.
- [13] HAN J, KAWAUCHI M, TERAUCHI Y, et al. Physiological function of hydrophobin Vmh3 in lignin degradation by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2023, 76(4): 048.
- [14] 王丽芳,彭耀,党向利,等.蝉拟青霉疏水蛋白 *PChyd* 基因表达模式

- 分析及敲除载体构建[J].热带作物学报,2020,41(7):1313-1320.
- [15] BARANI M, MIRZAEI M, TORKZADEH-MAHANI M, et al. A new formulation of hydrophobin-coated noisome as a drug carrier to cancer cells [J]. Materials Science and Engineering:C, 2020, 113: 110975.
- [16] DÖRING J, RETTKE D, RÖDEL G, et al. Surface functionalization by hydrophobin-epsps fusion protein allows for the fast and simple detection of glyphosate [J]. Biosensors, 2019, 9(3): 104.
- [17] 叶鹏飞,张美萍,王康宇,等.灵芝主要成分及其药理作用的研究进展综述[J].食药菌,2013,21(3):158-161.
- [18] 吕晶雪,郎岩,吴庆红,等.灵芝的主要活性成分及生物活性研究进展[J].山东化工,2024,53(5):54-56.
- [19] LIU C, SONG X, LI Y, et al. A comprehensive review on the chemical composition, pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2023, 51(8): 1983-2040.
- [20] LIU D, SUN X, DIAO W, et al. Comparative transcriptome analysis revealed candidate genes involved in fruiting body development and sporulation in *Ganoderma lucidum* [J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(8): 514.
- [21] 刘冬梅,孙雪言,严碧云,等.1株野生灵芝的分离鉴定及生物学特性分析[J].中国食用菌,2022,41(11):18-23.
- [22] 刁文彤,刘冬梅,亓希武,等.灵芝染料脱色过氧化物酶基因 GlDyP1和GlDyP2的克隆及表达分析[J].现代食品科技,2024, 40(8):140-149.
- [23] LIU D, DIAO W, CHEN H, et al. Heterologous expression and characterization of a dye-decolorizing peroxidase from *Ganoderma lucidum*, and its application in decolorization and detoxification of different types of dyes [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2024, 40(10): 303.
- [24] XU D, WANG Y, KEERIO A A, et al. Identification of hydrophobin genes and their physiological functions related to growth and development in *Pleurotus ostreatus* [J]. Microbiological Research, 2021, 247: 126723.
- [25] WÖSTEN H A, SCHOLTMEIJER K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(4): 1587-1597.
- [26] 陈仁良.金针菇疏水蛋白Hyd1和Jalalin凝集素mJRL1基因功能验证[D].福州:福建农林大学,2016.
- [27] XIAO L, FEN W, MENGQIAN L, et al. Hydrophobin Cmhyd1 is involved in conidiation, infection and primordium formation, and regulated by GATA transcription factor CmAreA in edible fungus, *Cordyceps militaris* [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(8): 674.
- [28] SOANES D M, KERSHAW M J, COOLEY R N, et al. Regulation of the *MPG1* hydrophobin gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 5(12): 1253-1267.
- [29] ZHANG J J, TANG X Y, MOORE B S. Genetic platforms for heterologous expression of microbial natural products [J]. Natural Product Reports, 2019, 36(9): 1313-1332.
- [30] 许丹云,王维,马爱民.融合疏水蛋白在毕赤酵母中的表达及其性质研究[J].轻工学报,2018,33(6):71-81.
- [31] 宋东民,王翔翔,高振东,等.真菌疏水蛋白HGF1在酿酒酵母中的表达、纯化和性质测定[J].南开大学学报(自然科学版),2018, 51(4):100-107.
- [32] YANG J, GE L, SONG B, et al. A novel hydrophobin encoded by *hgfII* from *Grifola frondosa* exhibiting excellent self-assembly ability [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 990231.
- [33] WANG Z, FENG S, HUANG Y, et al. Prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody production of a hydrophobin from *Grifola frondosa* [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2010, 42:388-395.
- [34] 黄佩.哈茨木霉TH33疏水蛋白的异源表达及诱导烟草防御反应[D].北京:中国农业科学院,2020.
- [35] AHN S O, LIM H D, YOU S H, et al. Soluble expression and efficient purification of recombinant class I hydrophobin DewA [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 22(15): 7843.
- [36] 王记圆,方思齐,廖小森,等.橡胶树炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)疏水蛋白Hydr基因的克隆与原核表达[J].基因组学与应用生物学,2021,40(1):258-263.