

# 香叶基香叶基焦磷酸合成酶在银耳芽孢中的表达及代谢调节

辛燕花<sup>1,2</sup>, 郭丽琼<sup>2</sup>, 林俊芳<sup>2\*</sup>

1 忻州师范学院生物系, 山西 忻州 034000

2 华南农业大学食品学院, 广东 广州 510640

**摘要:** 香叶基香叶基焦磷酸合成酶(GGPPS)是植物二萜类次生代谢物合成过程中的关键酶, 通过在银耳芽孢中表达红豆杉 GGPPS, 探讨外源 GGPPS 基因对银耳芽孢萜类代谢途径及其营养、活性代谢物的调节, 为利用银耳芽孢作为生物反应器表达萜类化合物提供科学理论依据。采用醋酸锂转化法对外源基因 GGPPS 进行异源表达, 首次对工程菌株银耳芽孢生产萜类化合物香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)进行了分析, 并对外源基因 GGPPS 调节工程菌株中的萜类代谢途径以及营养、活性代谢物进行了分析。在工程菌株银耳芽孢中检测到了二萜化合物前体 GGPP, 与对照菌株相比, 工程菌株银耳芽孢萜类代谢途径上的异戊烯基焦磷酸、二甲丙烯基焦磷酸、法尼基焦磷酸、鲨烯和麦角甾醇含量明显下降, 总二萜含量增加; 营养组分(总蛋白、氨基酸组成、微量元素、碳水化合物)和活性物质(总多糖、还原性糖、可溶性糖)等代谢物含量发生改变。外源基因 GGPPS 可以利用银耳芽孢萜类代谢途径上的底物生成二萜化合物前体 GGPP, 进而调节了萜类代谢途径上的甲羟戊酸途径代谢流以及营养组分和活性物质多种代谢物的变化。

**关键词:** 银耳芽孢; 香叶基香叶基焦磷酸合成酶; 香叶基香叶基焦磷酸; 萜类代谢; 营养成分

## [引用本文]

辛燕花, 郭丽琼, 林俊芳, 2025. 香叶基香叶基焦磷酸合成酶在银耳芽孢中的表达及代谢调节. 菌物学报, 44(8): 250032  
Xin YH, Guo LQ, Lin JF, 2025. Expression and metabolic regulation of geranylgeranyl diphosphate synthase in the yeast-like conidia of *Tremella fuciformis*. Mycosystema, 44(8): 250032

资助项目: 国家自然科学基金(31071837); 广东省粤港联合创新领域项目(2014B050505018); 山西省科技厅项目(20210302124375); 忻州市科技局重点研发项目(20220212)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31071837), the Guangdong Hong Kong Joint Innovation Field Project (2014B050505018), the Fundamental Research Program of Shanxi Province (20210302124375), and the Key Research & Development Project of Xinzhou Science and Technology Bureau (20220212).

\*Corresponding author. E-mail: linjf@scau.edu.cn

Received: 2025-02-18; Accepted: 2025-05-04

# Expression and metabolic regulation of geranylgeranyl diphosphate synthase in the yeast-like conidia of *Tremella fuciformis*

XIN Yanhua<sup>1,2</sup>, GUO Liqiong<sup>2</sup>, LIN Junfang<sup>2\*</sup>

1 Department of Biology, Xinzhou Normal University, Xinzhou 034000, Shanxi, China

2 College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, Guangdong, China

**Abstract:** Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase (GGPPS) is a key enzyme in the synthesis of secondary metabolites of plant diterpenes. By expressing GGPPS of *Taxus chinensis* in yeast-like conidia (YLC) of *Tremella fuciformis*, the regulation of exogenous GGPPS genes on terpene metabolism pathway, nutrition and active metabolites of YLC of *T. fuciformis* was investigated for the purpose of providing scientific theoretical basis for the expression of terpene compounds by using YLC of *T. fuciformis* as biological reactors. The exogenous gene GGPPS was heterologously expressed using lithium acetate conversion method. The production of terpenoid geranyl geranyl pyrophosphate (GGPP) from engineered YLC of *T. fuciformis* was analyzed for the first time, and the regulation of terpenoid metabolism pathway, nutrition and active metabolites by exogenous genes GGPPS in engineered strains were analyzed. The diterpene compound precursor GGPP was detected in the engineered strain YLC of *T. fuciformis*. Compared with the control strain, the content of isopentenyl pyrophosphate (IPP), dimethylallyl pyrophosphate (DMPP), farnesyl pyrophosphate (FPP), squalene and ergosterol in the terpenoid metabolic pathway of the engineered strain YLC of *T. fuciformis* were significantly decreased, while the total diterpene content was increased. The content of metabolites such as nutrient components (total protein, amino acid composition, trace elements, carbohydrates) and active substances (total polysaccharide, reducing sugar, soluble sugar) were changed. The exogenous gene GGPPS can utilize substrates in the terpenoid metabolic pathway of YLC of *T. fuciformis* to generate the diterpene compound precursor GGPP, thereby regulating the metabolic flux of the mevalonate pathway in the terpenoid metabolic pathway, as well as changes in various metabolites of nutritional components and active substances.

**Keywords:** YLC of *Tremella fuciformis*; geranylgeranyl pyrophosphate synthase; geranylgeranyl pyrophosphate; terpenoid metabolism; nutrients

香叶基香叶基焦磷酸合成酶(GGPPS)在生物体内萜类化合物合成中扮演着至关重要的角色(郭霄和史硕博 2024)。在生物体内, GGPPS 能够催化法尼基焦磷酸(FPP)与异戊烯基焦磷酸(IPP)发生缩合反应, 生成香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)(刘旭平等 2024)。GGPP 是一种二萜类前体化合物, 是植物光合作用分子类胡萝卜素和叶绿素合成所必需的物质, 也是合成赤霉素、独

脚金内酯和脱落酸等植物激素的关键前体(谭洪虎等 2024), 同时还是临床常用抗癌药物紫杉醇合成的起始底物之一(尤琳烽等 2015)。另外, GGPP 是甲戊二羟酸(MVA)途径中的一个重要中间体, MVA 途径是合成萜类途径中的一条途径, 它是由 2 个碳的化合物乙酰辅酶 A 开始, 经乙酰辅酶转移酶缩合成 4 碳的乙酰乙酰辅酶 A, 开始进入 MVA 途径(Vishwakarma *et al.* 2013)。因

此,植物里的 GGPPS 在调控代谢流分配以及二萜产物合成的调节方面,扮演着举足轻重的角色。然而,植物中的次级代谢产物 GGPP 以及其他的萜类化合物积累都比较少,严重阻碍了对其分子靶点和潜在药物用途的进一步研究,并且植物基因组中通常编码不止一个 GGPPS,而这些 GGPPS 的亚细胞定位也不尽相同(Vaccaro *et al.* 2020),因此,解析这些 GGPPS 的物种特异性及分子互作机理对于理解植物代谢调控及萜类代谢基因工程改良有着重要意义。基于代谢工程与组合生物合成策略,利用微生物作为细胞工厂,实现萜类化合物的异源表达,已从理论设想逐步转化为可实现的技术路径。这一新兴领域的研究成果,不仅为萜类化合物的大规模生产提供了新的思路,也为拓展萜类化合物的应用范围奠定了坚实的基础(石士涛 2023)。

大型真菌是理想的外源宿主,自身能合成丰富萜类次生代谢物,具备完善的萜类代谢网络。这为外源构建的萜类生物合成网络,提供了丰富的代谢底物,给网络中的复杂生化反应与中间产物转化,奠定了充足且多样的物质基础(马紫芹等 2016; 李洪涛等 2023; 周一鸣等 2023)。近年间,大型真菌食用菌因其独特的经济价值、营养价值以及在生态系统中的特殊地位,成为了众多科研人员关注的焦点。越来越多的研究者投身于大型真菌食用菌基因工程的研究领域。将食用菌作为全新的基因工程受体,食用菌能够高效地将外源蛋白分泌至细胞外,这不仅提高了蛋白的产出效率,也为后续的分离纯化工作提供了便利,并且食用菌基因组结构较小,简化了复杂的基因操作流程,无论是基因的导入、编辑还是表达调控,都能更精准、高效地实现,为利用基因工程手段大规模生产特定外源蛋白开辟了新路径(王丕武等 2001; 赵姝娴等 2007)。

银耳 *Tremella fuciformis* Berk., 俗称白木耳,富含多种多糖类物质,这些成分在刺激免疫细胞活性、调节免疫系统功能(许欢怡等 2023),抗肿瘤、抗炎等(韩英等 2011)方面发挥着关键作用,银耳对降低血糖,延缓衰老也有很明显的作用(Tsa *et al.* 2003)。此外,银耳还具有补肾润肺,

退热免疫调节、保护酒精性肝损伤等作用(Wu *et al.* 2019)。银耳的营养生长方式有一种为出芽增殖方式,在这种生长方式下,银耳的担孢子具备与酵母相似的特性,能够长出芽体,通过出芽增殖的方式,大量产生单核单细胞的酵母状芽孢子(郭丽琼等 2008)。因此,银耳芽孢既具有原核细胞快速繁殖的优点,又有完善的自我加工体制,且作为食药同源的食用真菌,作为外源表达宿主,有着天然的优势。银耳芽孢的遗传转化基础研究已经比较成熟,有研究者采用限制性内切酶介导的 DNA 转化法将人胰岛素基因成功转化银耳芽孢(谢宝贵等 2005),Zhu *et al.* (2006)采用此方法将粪透明颤菌血红蛋白基因 *VHb* 成功转化银耳芽孢。本课题组利用电击法对银耳芽孢的完整细胞进行目的基因转化获得成功(郭丽琼等 2008)。近年来,萜类代谢产物在大型食药真菌中进行表达,为萜类化合物的生物合成提供了新途径。本课题组对来自红豆杉的紫杉二烯合酶基因(*TS*)与 *GGPPS* 开展研究,构建出多种不同类型的表达载体,运用 PEG 介导法,把它们共同导入灰盖鬼伞原生质体,证实这 2 个基因成功在灰盖鬼伞中实现了外源表达(尤琳烽等 2015)。

有研究证实,银耳中含有萜类代谢化合物(Liu *et al.* 2019),林兴生等(2021)通过优化不同的工厂化栽培方式,发现银耳的萜类化合物含量不同,通过对银耳芽孢培养物的化学成分分析,已经鉴定出了多种萜类化合物。近年来,He *et al.* (2023)对担子菌全基因组测序和分析发现含有多个与萜类合成相关的基因。这些研究成果说明银耳具有较为完整的萜类合成代谢途径,从基因到代谢产物等多个层面都显示出其具有良好的萜类合成潜力。研究 *GGPPS* 在银耳芽孢中的表达及代谢调节,不仅有助于深入了解银耳芽孢的代谢机制,还有望为提升银耳内萜类化合物的产量夯实理论根基。然而,目前关于该酶在银耳芽孢中的具体表达模式及代谢调节机制仍不清楚。鉴于课题组前期已成功克隆红豆杉中包括 *GGPPS* 在内的二萜化合物紫杉醇合成的全部关键基因(黄仕杰等 2010; 程抒劼等 2011; 韩飞

等 2011), 并在多个食用菌物种中实现这些基因的异源表达(康林芝等 2013; 辛燕花等 2014; 尤琳烽等 2015), 取得了阶段性研究进展。基于前期成果, 本研究选取红豆杉来源的 *GGPPS* 基因作为研究靶点。通过在银耳芽孢体系中开展 *GGPPS* 基因的表达研究, 深入解析其对萜类代谢途径的调控机制。旨在借此探讨银耳芽孢作为生物反应器, 用于高效表达萜类化合物的技术可行性, 为拓宽萜类化合物的生物合成途径提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

银耳 Tr01 菌株, PDA 固体斜面芽孢种购于福建古田; *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  菌株由本实验室保存。表达载体 pgLes-ggpps 含香菇 *gpd-Les* 启动子(613 bp), 香叶基香叶基焦磷酸合成酶基因 *GGPPS* (1 231 bp); 表达载体 pBgGl-hph 中包含灵芝 *gpd-Gl* 启动子与潮霉素抗性基因 *HPH*。这些载体均为本实验室自主构建(图 1)。

#### 1.1.2 试剂和培养基

Geranylgeraniol 标准品购自 Sigma 公司, 真菌 RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒以及质粒小提试剂盒, 均从天根生化科技有限公司购入; RT-PCR 试剂盒 PrimeScript™ RT-PCR Kit 购自

TaKaRa 公司; 引物合成委托上海捷瑞生物工程有限公司完成, 测序任务由华大基因科技有限公司承担, 实验中使用的常规试剂均为国产分析纯。PDSA 培养基: 马铃薯(去皮) 200 g, 磷酸氢二钾 3 g, 硫酸镁 1.5 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 30 min 后备用。PDSB 培养基: 上述 PDSA 培养基中不加琼脂, 121 °C 灭菌 30 min 后备用。RM 培养基: PDSA/PDSB 培养基中加入终浓度为 0.6 mol/L 的蔗糖, 121 °C 灭菌 30 min 后备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 醋酸锂转化银耳芽孢

无菌条件下, 将挑取的芽孢单克隆接种于 50 mL PDSB 液体培养基中, 于 25 °C、180 r/min 振荡培养 3–4 d。待 *OD* 值达到 10.0 时, 离心收集菌体, 以 0.1 mol/L LiAc 预处理液洗涤 2 次, 离心收集细胞, 重悬于 20 mL 0.1 mol/L LiAc 预处理液, 25 °C 水浴 30 min; 4 000 r/min、10 min, 收集菌体, 重悬于含 15% 甘油的 0.1 mol/L LiAc 预处理液中, 终浓度调至  $1.0 \times 10^7$  个/mL, 80  $\mu$ L/管分装。在银耳芽孢预处理液中分别加入表达质粒 pgLes-ggpps 和 pBgGl-hph 各 1.0  $\mu$ g, 加入 20  $\mu$ L PEG/S 混匀, 冰浴 5 min; 加入 1.0 mL PEG/S 混匀, 25 °C 水浴 60 min; 40 °C 热激处理 20 min, 2 000 r/min 离心收集菌体; 加入 1.0 mL RM 液体培养基重悬菌体, 以 200  $\mu$ L 涂布于含

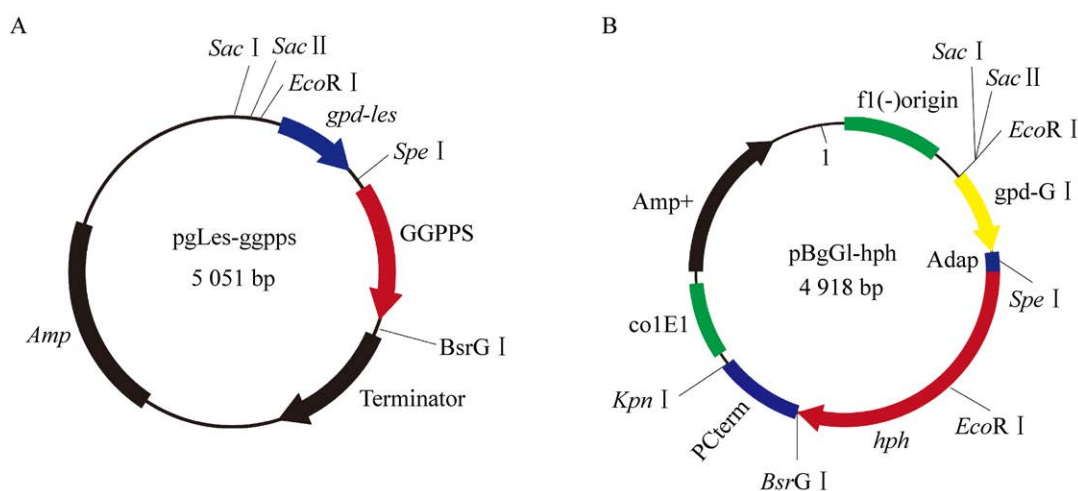


图 1 表达载体结构图 A: 表达载体 pgLes-ggpps; B: 表达载体 pBgGl-hph

Fig. 1 Expression vector structure diagram. A: Expression vector pgLes-ggpps; B: Expression vector pBgGl-hph.

有终浓度 50  $\mu\text{g/mL}$  HmB 的 RM 固体培养基进行筛选;将拟转化子接种于不含抗性的 PDSA 平板培养基上,2 代转接后,进行鉴定。

### 1.2.2 银耳芽孢总 DNA 和 RNA 的提取

参照李刚等(2004)的方法,提取银耳芽孢总 DNA 和 RNA。

### 1.2.3 转化子鉴定

基于 *GGPPS* 基因的核苷酸序列,设计引物,其预期扩增的片段长度为 1 000 bp。引物为: Primer *GGPPS*-R: 5'-CATGTACATCAGTTTTG CCTGAATGCAATGTAATC-3', Primer *GGPPS*-F: 5'-GACTAGTCATGGCTTACACGGCAATGGC AG-3'。基于 *HPH* 基因的核苷酸序列,设计引物,其预期扩增的片段长度为 1 026 bp,引物为: Primer *HPH*-R: 5'-ACGTCCTCGGAGGAGGCCA TCT CTATTCCTTTGCCCTCGG-3', Primer *HPH*-F: 5'-ATAAGCTTGATATCGAATTCGGAGGT CAACACATCATGC-3'。

### 1.2.4 表达产物鉴定

GGPP 由于含有 2 个高能磷酸键,在较高温度下不稳定,不能直接做 GC-FID 分析。利用 CAIP 使其酶解变成性质稳定的 GGOH,参考 Vallon *et al.* (2008)的方法对产物进行提取及 GC 测定分析。仪器采用天美 GC7890 II, ZB-5ms (Phenomenex), 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  毛细管柱分离样品。进样口温度: 250  $^{\circ}\text{C}$ ; FID 检测器温度: 260  $^{\circ}\text{C}$ ; 无分流进样; 1  $\mu\text{L}$  进样。

### 1.2.5 萜类代谢产物测定

鲨烯的提取与测定参照 Anterola *et al.* (2009)的方法,采用 HPLC 测定,仪器采用天美 LC2000, 色谱柱: Phenomenex luna C<sub>18</sub> 250 mm  $\times$  4.6 mm。流动相为甲醇-水(98:2, 体积比),流速 1.0 mL/min, 波长设定为 208 nm。参照 Vallon *et al.* (2008)的方法提取异戊烯基焦磷酸(IPP)、二甲丙烯焦磷酸(DMAPP)和法尼基焦磷酸(FPP)并进行 GC 测定。仪器采用天美 GC7890 II, ZB-5ms (Phenomenex), 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  毛细管柱分离样品。进样口温度: 250  $^{\circ}\text{C}$ ; FID 检测器温度: 260  $^{\circ}\text{C}$ ; 无分流进样; 1  $\mu\text{L}$  进样。IPP: 50  $^{\circ}\text{C}$  保留 1 min, 以 35  $^{\circ}\text{C/min}$  的速度提高到 150  $^{\circ}\text{C}$ ; 以 15  $^{\circ}\text{C/min}$  的速度提高到 270  $^{\circ}\text{C}$ , 保

留 5 min。DMPP: 50  $^{\circ}\text{C}$  保留 1 min, 以 30  $^{\circ}\text{C/min}$  的速度提高到 150  $^{\circ}\text{C}$ ; 以 15  $^{\circ}\text{C/min}$  提高到 270  $^{\circ}\text{C}$ , 保留 5 min。FPP: 50  $^{\circ}\text{C}$  保留 2 min, 以 30  $^{\circ}\text{C/min}$  的速度提高到 150  $^{\circ}\text{C}$ ; 以 10  $^{\circ}\text{C/min}$  的速度提高到 270  $^{\circ}\text{C}$ , 保留 5 min。总二萜化合物的提取参考 Zhou *et al.* (2007)的方法。

### 1.2.6 营养、活性成分测定

近似组分的测定参考 Cheung (2010)的方法。糖类的提取参考 Negrulescu *et al.* (2012)的报道。氨基酸的提取参照 Guo *et al.* (2007)的方法,采用氨基酸自动分析仪对样品进行分析检测,进样 1  $\mu\text{L}$ 。微量元素的提取与测定参照王土金(2011)的方法进行。

## 1.3 数据统计

采用 SPSS 11.5 软件对数据进行处理和统计分析,采用 Duncan's Multiple Range Test 对均值之间的差异显著性进行检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 转化子的筛选

表达质粒 pgLes-ggpps 与 pBgG1-hph 经醋酸锂介导的方法共转化银耳芽孢,仅当成功转入包含质粒 pgLes-ggpps 和 pBgG1-hph 的共转化子,或者仅含有 pBgG1-hph 的单转化子之时,这些转化子才能正常生长,进而获得拟转化子(图 2)。

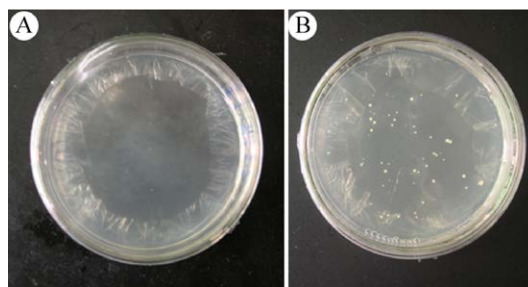


图 2 银耳芽孢拟转化子的再生 A: 阴性对照; B: 转化银耳芽孢后获得的拟转化子

Fig. 2 The putative transformants of yeast-like conidia of *Tremella fuciformis* on regeneration medium. A: Negative control (non-transformed promoplasts); B: Putative transformants.

### 2.2 PCR 及 RT-PCR 鉴定转化子

随机挑取的 pgLes-ggpps 转化子进行 *HPH*



和 *GGPPS* 基因 PCR 鉴定(图 3)。拟转化子扩增出一条特异的条带,与阳性质粒 *HPH* 基因扩增得到的约 1 026 bp 的条带一致,且与预期的 *HPH* 基因片段(1 026 bp)相符(图 3A),同时拟转化子扩增出的另一条特异的条带,与阳性质粒 *GGPPS* 扩增得到的约 1 000 bp 的条带一致,且与预期的 *GGPPS* 基因片段(1 000 bp)相符(图 3B),因此,初步推断 *HPH* 和 *GGPPS* 基因已成功整合至这些转化子的基因组之中。在挑取的 20 个 *pgLes-ggpps* 转化子中,18 个转化子基因组中整合了 *GGPPS* 基因和 *HPH* 基因,共转化率为 90%。进一步经 PCR 鉴定的转化子提取总 RNA 进行 RT-PCR 检测,部分拟转化子扩增出一条与阳性对照质粒所产生的条带大小一致的条带,经切胶回收测序,序列比对结果显示该条带序列与目的基因 *GGPPS* 基因序列完全一致(图 3C)。基于此结果,初步可以判定 *GGPPS* 基因已经成功在转基因银耳芽孢菌株中实现转录,初步说明外源基因 *GGPPS* 的成功表达未破坏银耳芽孢基因的转录起始与延伸过程,启动子等调

控元件可以正常发挥作用。

### 2.3 表达产物的 GGPP 测定

对提取水解的 GGOH 进行测定(图 4),与未转化 *GGPPS* 基因的银耳芽孢原种比较,银耳芽孢工程菌株在 17–18 min 之间出现了一个明显的差异峰,经 GC-FID 鉴定,该峰为目标产物 GGOH。各个转化子之间的含量无显著差异,结果表明:通过代谢工程, *GGPPS* 基因首次成功地在银耳芽孢中进行表达,并催化银耳芽孢自身的底物生成 GGOH。

### 2.4 萜类化合物测定

为了揭示 *GGPPS* 基因对萜类代谢途径的影响,对工程菌株和对照菌株提取物中的萜类代谢途径上的甲羟戊酸途径代谢产物进行了测定分析。工程菌株 TTf 的直接底物 FPP 的含量急剧减少,与对照菌株相比,含量下降了 91.98%; IPP、DMPP 和鲨烯的含量分别下降了 45.19%, 42.16% 和 28.01% (图 5)。工程菌株 TTf 的总二萜含量却有所增加,说明 *GGPPS* 直接或间接利用了 FPP 以及其他底物生成了二萜化合物 GGPP,

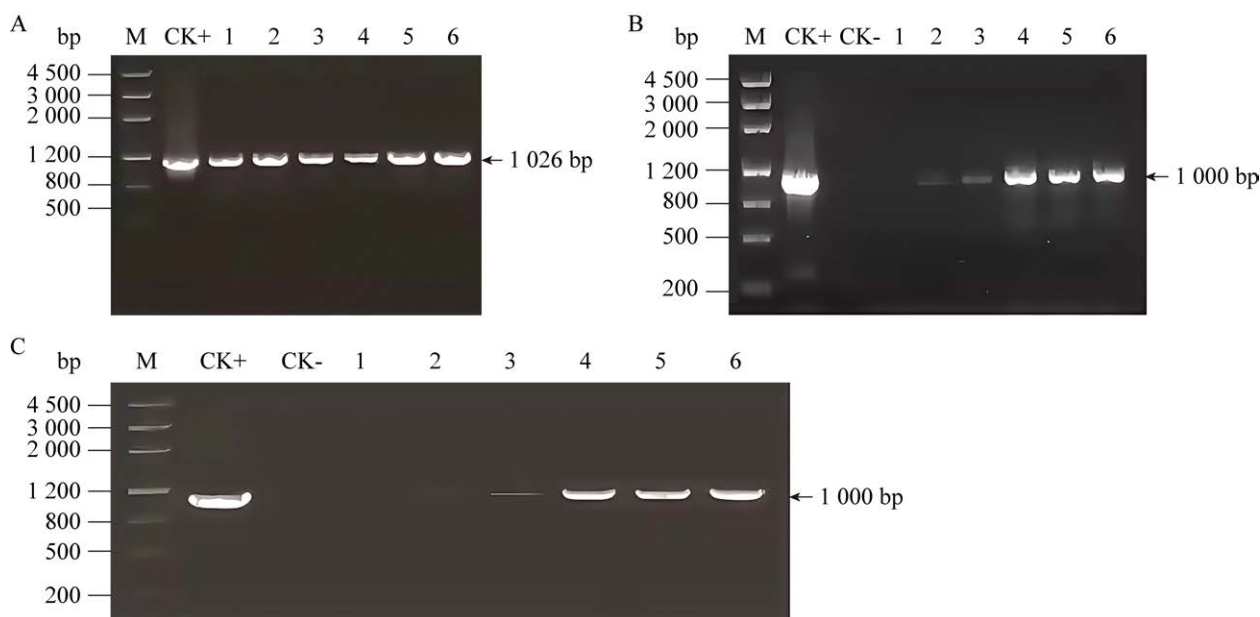
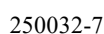


图3 表达载体 *pgLes-ggpps* PCR 和 RT-PCR 鉴定 A: *HPH* 基因 PCR 结果. B: *GGPPS* 基因 PCR 结果. C: *GGPPS* 基因 RT-PCR 结果. M: DL5000 DNA marker. CK+: 阳性对照. CK-: 阴性对照. 1–6: 拟转化子  
Fig. 3 PCR and RT-PCR analysis of putative yeast-like conidia of *Tremella fuciformis* transformants. A: PCR pattern of the *HPH* gene. B: PCR pattern of the *GGPPS* gene. C: RT-PCR pattern of the *GGPPS* gene. M: DL5000 DNA marker. CK+: Plasmid *pgLes-ggpps*. CK-: Non-transformed host yeast-like conidia of *T. fuciformis*. Lanes 1–6, the putative transformants.



工程菌株中的钙和锌的含量减少, 镁、铁和钾的含量呈现出显著增长态势, 其中镁含量的增长幅度最为突出, 与之前相比, 提升了 130.25% (表 1)。氨基酸在两种菌株之间也有变化, 其中有 6 种氨基酸无显著性差异(缬氨酸、甲硫氨酸、胱氨酸、亮氨酸、羟赖氨酸、苯丙氨酸); 7 种氨基酸含量下降(磷酸丝氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、丝氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、赖氨酸), 半胱氨酸含量减少较多, 降低了 93.04%; 11 种氨基酸含量增加(牛磺酸、甘氨酸、丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、 $\gamma$ -氨基丁酸、鸟氨酸、组氨酸、精氨酸、鹅肌肽),  $\gamma$ -氨基丁酸含量涨幅最大, 含量增加了 323.53%。除了这些氨基酸之外, 工程菌种的提取物中检测到了对照菌株中没有的  $\beta$ -氨基异丁酸。对氨基酸的组成含量比例进一步分析发现, 对照菌株和工程菌株的必需氨基酸/非必需氨基酸(E/N)的值分别为 0.61 和 0.65, 必需氨基酸/总氨基酸(E/T)的值分别为 34.69%和 34.84%, 与对照菌种相比, 工程菌株的 E/N 和 E/T 值都明显高于对照(表 2)。PLS-DA 分析发现, 工程菌种与对照菌株的组成成分有明显的区别, 差异比较大的主要集中在糖类、氨基酸及微量元素上(图 6)。说明 GGPPS 在银耳芽

孢中的成功表达, 调控了银耳芽孢的糖代谢, 氨基酸代谢以及微量元素的合成。

3 讨论

本研究选取了银耳芽孢作为外源表达系统, 在研究过程中, 发现银耳芽孢有较为明显的优势。经醋酸锂转化法转化银耳芽孢, 省时快速, 省去了制备原生质体等过程, 只需经醋酸锂处理细胞就可进行遗传转化, 经醋酸锂预处理的细胞可以冷冻保存, 随用随取, 简化了一般宿主细胞转化过程中遇到的原生质体制备浓度太低, 酶解不彻底(沈慧敏等 2017), 以及转化后容易染菌, 筛选标记难以选择等问题(乐易林等 2016), 且遗传转化效率高, 达到 90%以上。工程菌株传代培养 22 代后, 经 PCR 鉴定, 包括筛选标记潮霉素基因在内的所有目标基因条带清晰, 经 GC 检测, 均可检测到目标产物, 说明外源基因在银耳芽孢中遗传转化后稳定性较高。本课题组之前经 PEG 和电击法遗传转化银耳芽孢, 转化效率和稳定性也较高(郭丽琼等 2008; Guo *et al.* 2009), 经醋酸锂转化法遗传转化多功能纤维素酶于银耳芽孢中, 纯化的多功能纤维素酶蛋白分子量大小与天然的多功能纤维素酶蛋白一样, 说

表 1 工程菌株和对照菌株成分测定  
Table 1 Component of the yeast-like conidia of *Tremella fuciformis* transgenic and control strains

| 组成成分<br>Component  | 对照<br>CK                             | 工程菌株<br>Transgenic strain TTf        |
|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 水分 Moisture        | 95.42±0.87 <sup>a</sup> g/100 g      | 95.49±0.83 <sup>b</sup> g/100 g      |
| 粗蛋白 Crude protein  | 9.08±0.64 <sup>a</sup> g/100 g       | 9.33±0.66 <sup>b</sup> g/100 g       |
| 粗纤维 Crude fibre    | 1.57±0.93 <sup>b</sup> g/100 g       | 1.56±0.87 <sup>a</sup> g/100 g       |
| 粗脂肪 Crude fat      | 0.76±0.47 <sup>a</sup> g/100 g       | 0.78±0.55 <sup>b</sup> g/100 g       |
| 碳水化合物 Carbohydrate | 78.10±0.94 <sup>b</sup> g/100 g      | 74.91±0.86 <sup>a</sup> g/100 g      |
| 灰分 Ash             | 5.91±0.19 <sup>b</sup> g/100 g       | 5.87±0.23 <sup>a</sup> g/100 g       |
| 钙 Calcium          | 11.68±0.21 <sup>b</sup> mg/100 g     | 10.05±0.24 <sup>a</sup> mg/100 g     |
| 镁 Magnesium        | 250.00±0.08 <sup>a</sup> mg/100 g    | 575.63±0.32 <sup>b</sup> mg/100 g    |
| 铁 Iron             | 4.10±0.16 <sup>a</sup> mg/100 g      | 6.17±0.17 <sup>b</sup> mg/100 g      |
| 锌 Zinc             | 5.31±0.319 <sup>b</sup> mg/100 g     | 2.47±0.419 <sup>a</sup> mg/100 g     |
| 钾 Potassium        | 2 421.00±421.0 <sup>a</sup> mg/100 g | 2 587.23±587.2 <sup>b</sup> mg/100 g |
| 多糖 Polysaccharide  | 3.57±0.75 <sup>a</sup> mg/g          | 12.37±0.77 <sup>b</sup> mg/g         |
| 还原糖 Reducing sugar | 87.73±1.07 <sup>a</sup> mg/g         | 89.40±0.91 <sup>b</sup> mg/g         |
| 可溶性糖 Soluble sugar | 20.64±0.72 <sup>a</sup> mg/g         | 24.31±0.74 <sup>b</sup> mg/g         |

Note: Each value is expressed as mean ± standard error of three replicate analyses. Values with different small letters in same row are significantly different at the level of 0.05. <sup>a, b</sup>: Significant difference ( $P<0.05$ ).



表 2 工程菌株和对照菌株氨基酸测定  
Table 2 Amino acid content of yeast-like conidia of *Tremella fuciformis* transgenic and control strains

| 氨基酸<br>Amino acid                                       | 含量<br>Content (g/kg dry weight) |                         |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
|                                                         | 对照                              | 工程菌株                    |
|                                                         | CK                              | Transgenic strain TTf   |
| 磷酸丝氨酸 P-ser                                             | 0.2±0.23 <sup>b</sup>           | 0.16±0.22 <sup>a</sup>  |
| 牛磺酸 Tau                                                 | 0.08±0.24 <sup>a</sup>          | 0.64±0.27 <sup>b</sup>  |
| 天冬氨酸 Asp                                                | 4.48±0.26 <sup>b</sup>          | 4.36±0.24 <sup>a</sup>  |
| 苏氨酸 Thr                                                 | 2.71±0.21 <sup>b</sup>          | 2.66±0.23 <sup>a</sup>  |
| 丝氨酸 Ser                                                 | 3.45±0.21 <sup>b</sup>          | 3.35±0.25 <sup>a</sup>  |
| 谷氨酸 Glu                                                 | 9.15±0.23 <sup>b</sup>          | 8.2±0.21 <sup>a</sup>   |
| α-AAA                                                   | 0.02±0.21 <sup>a</sup>          | 0.07±0.23 <sup>b</sup>  |
| 甘氨酸 Gly                                                 | 3.04±0.23 <sup>a</sup>          | 3.07±0.24 <sup>b</sup>  |
| 丙氨酸 Ala                                                 | 4.79±0.21 <sup>a</sup>          | 5.13±0.23 <sup>b</sup>  |
| 缬氨酸 Val                                                 | 2.02±0.22 <sup>a</sup>          | 2.01±0.23 <sup>a</sup>  |
| 半胱氨酸 Cys                                                | 1.58±0.22 <sup>b</sup>          | 0.11±0.21 <sup>a</sup>  |
| 甲硫氨酸 Met                                                | 1.03±0.31 <sup>a</sup>          | 1.03±0.33 <sup>a</sup>  |
| 胱硫醚 Cysthi                                              | 0.04±0.13 <sup>a</sup>          | 0.05±0.15 <sup>a</sup>  |
| 异亮氨酸 Ile                                                | 1.53±0.19 <sup>a</sup>          | 1.58±0.17 <sup>b</sup>  |
| 亮氨酸 Leu                                                 | 4.15±0.21 <sup>a</sup>          | 4.17±0.19 <sup>a</sup>  |
| 酪氨酸 Tyr                                                 | 1.09±0.13 <sup>a</sup>          | 1.20±0.13 <sup>b</sup>  |
| 苯丙氨酸 Phe                                                | 2.11±0.16 <sup>b</sup>          | 2.12±0.15 <sup>b</sup>  |
| β-氨基异丁酸 β-AiBA                                          | ND                              | 0.01±0.13 <sup>a</sup>  |
| γ-氨基丁酸 γ-ABA                                            | 0.17±0.14 <sup>a</sup>          | 0.72±0.15 <sup>b</sup>  |
| 羟赖氨酸 Hyl                                                | 0.03±0.19 <sup>a</sup>          | 0.03±0.17 <sup>a</sup>  |
| 鸟氨酸 Orn                                                 | 0.02±0.21 <sup>a</sup>          | 0.09±0.19 <sup>b</sup>  |
| 赖氨酸 Lys                                                 | 3.64±0.13 <sup>b</sup>          | 3.60±0.13 <sup>a</sup>  |
| 组氨酸 His                                                 | 1.24±0.13 <sup>a</sup>          | 1.42±0.13 <sup>b</sup>  |
| 鹅肌肽 Ans                                                 | 0.52±0.18 <sup>a</sup>          | 0.70±0.17 <sup>b</sup>  |
| 精氨酸 Arg                                                 | 2.47±0.19 <sup>a</sup>          | 2.80±0.19 <sup>b</sup>  |
| 总氨基酸含量 Total amino acid content (T)                     | 49.56±0.17 <sup>b</sup>         | 49.28±0.15 <sup>a</sup> |
| 必需氨基酸含量 Essential amino acid content (E)                | 17.19±0.21 <sup>a</sup>         | 17.17±0.23 <sup>a</sup> |
| 儿童必需氨基酸含量 Essential amino acid content in children (CE) | 3.71±0.19 <sup>a</sup>          | 4.22±0.21 <sup>b</sup>  |
| 非必需氨基酸含量 Non-essential amino acid content (N)           | 28.04±0.23 <sup>a</sup>         | 26.45±0.21 <sup>a</sup> |
| 必需氨基酸/非必需氨基酸 E/N                                        | 0.61                            | 0.65                    |
| 必需氨基酸/总氨基酸 E/T                                          | 34.69%                          | 34.84%                  |
| 儿童必需氨基酸/总氨基酸 CE/T                                       | 7.49%                           | 8.56%                   |

Note: Each value is expressed as mean ± standard error of three replicate analyses. Values with different small letters in same row are significantly different at the level of 0.05. ND: Not detected.

明在银耳芽孢中表达的外源基因多功能纤维素酶不像在原核细胞中一样以包涵体的形式存在，也没有被过度的糖基化。银耳芽孢既具有原核细胞快速繁殖的优点，又有完善的自我加工体系，银耳本身又是可食用的食药真菌，与其他表达系统相比，更加安全，加上其可以大规模地深层发酵，是一个有潜力的外源表达系统(Cho *et al.*

2006)，银耳芽孢有望成为工业生产过程中的优势表达系统。

近年来，随着代谢工程的快速发展，GGPPS 合酶在许多宿主中都有表达，有研究者将来源于鼠尾草和巴西橡胶中的 GGPPS 合酶在大肠杆菌中成功表达(Takaya *et al.* 2003； Kai *et al.* 2010)，将来源于蔓地亚红豆杉的 GGPPS 合酶在酵母中

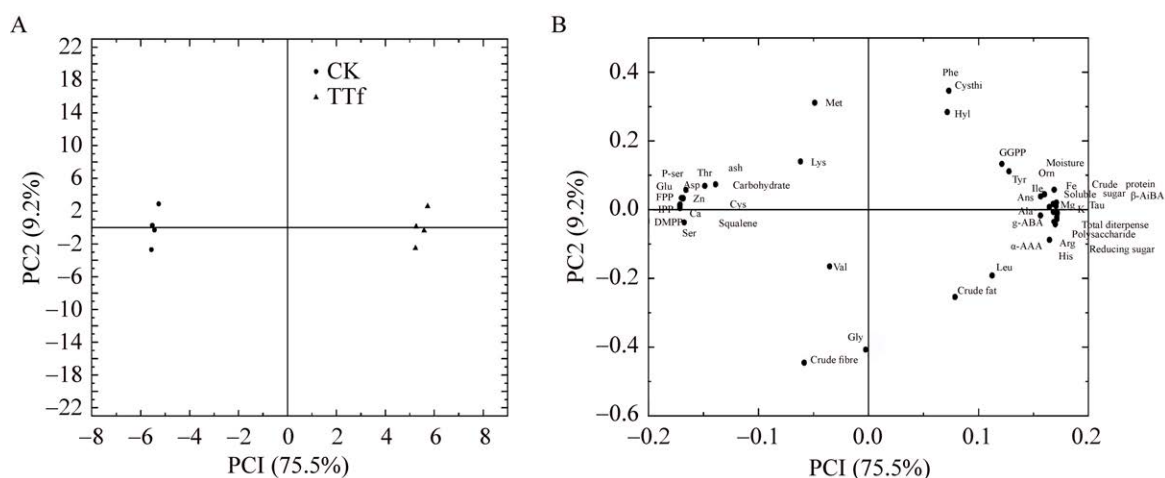


图 6 PLS-DA 分析代谢物 A: 不同菌株分布. B: 代谢物分布

Fig. 6 PLS-DA analysis of metabolite. A: Distribution of different strains. B: Metabolite distribution.

表达(Liao *et al.* 2005),但是这些研究对目标产物 GGPP 的表达水平和表达量都没有进行深入的研究。在本研究中,银耳芽孢作为外源表达宿主,能够成功表达 *GGPPS* 合酶基因,并能得到目标产物 GGPP,表达量为  $0.26 \mu\text{g/g}$ ,与其他 *GGPPS* 合酶基因在大肠杆菌和酵母中表达的产量相比,GGPP 的含量比较低。推测原因,在银耳芽孢中,GGPPS 合成 GGPP 的底物 FPP 含量较低,实验前期,我们通过 GC 检测到,FPP 的含量在银耳芽孢中的含量比较低( $1\ 627.58 \mu\text{g/g}$ ),FPP 作为合成各种萜类物质的交叉点,在合成二萜类的过程中,GGPPS 利用到 FPP 的含量比较低,导致目标产物 GGPP 的含量比较低。另外,采用随机插入法将 *GGPPS* 单基因导入银耳芽孢,由于插入位点和拷贝数均不可控,无法确定导入的外源基因拷贝数,致使目标产物含量偏低。当前,代谢工程领域的研究重点聚焦于借助优化代谢途径提升目标产物的产量水平,可以通过找到来源不同的基因缩短代谢途径,或者是通过优化上游代谢途径来提高目标基因的底物,从而达到提高目标产物的目的。在本研究中,我们拟考虑将来源于其他物种的 *GGPPS* 合酶遗传转化银耳芽孢,提高其与其他酶竞争底物的能力,从而达到目的。

到目前为止,通过代谢工程来提高萜类化合物的研究已经取得了一定的进展(Pitera *et al.*

2007; Leonard *et al.* 2010),然而这些类异戊二烯的前体物质都是无色的,它们在不同的极性和亲脂性溶液中,有一定的吸附趋势,导致这些庞大的代谢物如何进行检测和鉴定是一个比较棘手的问题(Beyer *et al.* 1985)。目前针对这些化合物(如 IPP、DMPP、FPP、GGPP)的提取和检测都是基于放射性标记的方法(Song 2003)。本研究参考了 Vallon *et al.* (2008)提出的一种更快速的、非放射标记的方法来检测这些化合物,该方法是经溶剂正己烷对这些萜类化合物进行提取,再经碱性去磷酸化酶去磷酸变成相应的醇,经 GC-MS 进行检测。本研究在萜类化合物的提取检测时发现,1 mmol/L 的标准品 GGOH 经 GC-MS 检测的响应值远远高于 1 mmol/L 的标准品 GGPP 加去磷酸化酶后水解为 GGOH 后的响应值。换言之,GGPP 经去磷酸化酶水解后,生成 GGOH 的含量较低。因此,对工程菌株中的 GGPP 经磷酸化水解后的产物 GGOH 进行检测,得到的结果并不能真实反映银耳芽孢作为宿主细胞生成的 GGOH,该方法得到的数据要远远低于实际的结果。因此,在研究过程中我们尝试在去磷酸化的过程中加大用酶量,延长反应时间,希望得到更多的水解产物,但是效果不显著。萜类化合物是一个很庞大的化合物体系,我们在今后的研究过程中,能够找到一种更快速、高效、方便的方法来检测这些萜类骨架前体。

各种新陈代谢过程互相联系构成一个复杂的生物系统,越来越多的证据表明外源基因的表达有可能导致其他代谢的变化(Manetti *et al.* 2006; Chen *et al.* 2011; Trienens & Rohlf 2012)。因此,这些基因对于萜类代谢途径上的代谢物是否有影响,是值得探讨的一个问题。*GGPPS* 作为二萜类代谢途径及紫杉醇合成途径的关键酶基因,它的表达水平是否会对其上下游基因表达产物合成产生影响。进一步对 *GGPPS* 转基因银耳芽孢工程菌株萜类代谢物的合成进行分析,发现与原种对照相比,萜类代谢的合成前体物 IPP 和 DMPP,其含量均出现了不同程度的降低;萜类代谢途径的重要交叉点 FPP 的含量也明显的降低;鲨烯的含量也呈现下降的趋势;而总二萜的含量明显增加。我们推测,*GGPPS* 合酶基因在银耳芽孢体内的表达,打乱了银耳芽孢本身萜类化合物的代谢,IPP 和 DMPP 作为前期底物,被大量地利用,FPP 在用于倍半萜、二萜和四萜的合成后,还用于一些固醇类(麦角甾醇)的合成;FPP 含量减少,总二萜含量增加,说明作为底物被 *GGPPS* 利用,合成了二萜类化合物,鲨烯作为合成麦角甾醇的第一个前体物质,含量显著下降,说明 *GGPPS* 合酶的表达和合成鲨烯的鲨烯合酶竞争了同一底物 FPP,导致了鲨烯的含量减少,使合成代谢朝着有利于二萜类合成的方向移动。因此,外源基因 *GGPPS* 的表达,影响了银耳芽孢中萜类代谢物的变化,导致银耳芽孢中总二萜类含量的增加。

本研究结果表明,工程菌株中的营养成分与原种银耳芽孢之间有很大的差异,尤其是常见的氨基酸。在与原种对照比较后发现,工程菌株中含量明显下降的 7 种氨基酸都是可以参与乙酰辅酶 A 的代谢途径的氨基酸,乙酰辅酶 A 是各种代谢途径中的一个重要的分子起始模块(Vishwakarma *et al.* 2013),参与在原核生物中聚- $\beta$ -羟基丁酸酯(PHB)的合成,真核生物中的 MVA 途径(Slater *et al.* 1988)。当在银耳芽孢体内引入一个外源基因 *GGPPS* 时,*GGPPS* 的成功表达,影响了乙酰辅酶 A 的代谢途径,使乙酰辅酶 A 向着二萜类的方向流动,从而导致这些

参与乙酰辅酶 A 代谢的氨基酸含量降低。*GGPPS* 表达可能激活或抑制与氨基酸代谢相关的酶或调节因子,进而影响氨基酸的合成、转化和利用。有研究证实,外源基因的表达,通过影响转氨酶、脱羧酶等的活性,从而改变氨基酸的代谢途径和速率(Pan *et al.* 2003)。氨基酸是蛋白质的基本组成单位,而蛋白质在萜类代谢中发挥着重要作用。因此,宿主氨基酸的变化可能影响萜类代谢相关酶的合成和活性,从而影响萜类化合物的合成。*GGPPS* 表达后,宿主细胞内的代谢平衡被打破,可能通过信号转导途径调节萜类代谢相关基因的表达,进而影响萜类代谢的进程。某些氨基酸的变化可能激活或抑制萜类合成途径中的关键酶基因的表达,从而影响萜类化合物的产量。同时,氨基酸的变化可能影响细胞内的能量代谢和物质运输,进而影响萜类代谢的流量。氨基酸的缺乏可能导致细胞内能量供应不足,从而影响萜类化合物的合成。其次,萜类代谢途径中的一些中间产物可能参与氨基酸的合成。丙酮酸是萜类代谢途径的重要中间产物,它可以通过一系列反应转化为丙氨酸等氨基酸(Babekov *et al.* 2000)。因此,萜类代谢途径的变化可能会影响氨基酸合成的前体供应,从而间接影响氨基酸的含量。萜类化合物对植物的生长发育和生理过程具有重要调节作用(Hasanuzzaman *et al.* 2010)。当萜类代谢途径发生变化时,可能会影响生物体的整体生理状态,进而影响氮代谢等与氨基酸合成和代谢相关的过程。微量元素对细胞的生长、代谢和生理功能具有广泛的影响。有研究指出,微量元素对红豆杉生长及萜类化合物紫杉醇含量有明显的影响(杨秀利 2012)。微量元素是许多酶的组成成分或激活剂,对萜类代谢途径中关键酶的活性至关重要。有研究证实,镁离子是多种激酶的激活剂,参与调控萜类代谢途径中磷酸化反应相关酶的激活,缺乏镁离子会影响这些酶的活性,进而影响萜类代谢(Xie *et al.* 2010)。铁元素参与一些氧化还原酶的组成,影响萜类合成过程中的氧化还原反应,缺铁可能导致萜类代谢途径受阻(Zhang *et al.* 2015)。微量元素含量变化可影响细胞内的生理和代谢环境,从

而影响外源基因的表达。当微量元素缺乏或过量时,会引起植物体内一系列应激反应,激活或抑制某些转录因子的活性(Yamasaki *et al.* 2007),这些转录因子可能作用于外源基因的启动子区域,影响其表达。萜类代谢途径的中间产物或终产物可能参与微量元素的螯合、转运或调节微量元素相关酶的活性(Noushahi *et al.* 2022)。另外,萜类代谢途径变化影响植物生长发育和生理状态,也会间接影响微量元素的吸收、运输和利用。外源基因的表达、萜类代谢途径的变化和氨基酸、微量元素含量变化相互作用、互相影响,共同构成了一个复杂的网络,精细地调控着生物体的生长发育、代谢平衡和对环境的适应等过程。在不同的生物体系和环境条件下,它们之间的具体关系和作用机制可能有所不同,有待进一步的研究。

在本研究中,我们采用的基因转化策略使 *GGPPS* 基因和 *HPH* 基因随机插入到银耳基因组中。这种随机插入方式虽然实现了外源基因的导入,但也带来了诸多不确定性。外源基因的随机整合极有可能干扰银耳正常的生长情况。一方面,基因插入可能会破坏基因组中关键的功能区域,如插入到编码重要生长调控蛋白的基因内部,导致该基因功能丧失(Zarka *et al.* 2010),进而影响银耳细胞的分裂、分化以及营养物质的吸收和代谢等基本生理过程,最终对其生长速度、形态特征等产生负面效应。另一方面,即使外源基因插入到非编码区域,也可能会影响附近基因的表达调控,通过改变染色质结构或影响转录因子与调控元件的结合(Juho *et al.* 2023),间接干扰银耳正常的生长发育。银耳芽孢中的营养、活性成分的改变不能充分证明是由于 *GGPPS* 基因表达所引起的,这种变化可能受到多种因素的影响。部分表型变化或许并非源于 *GGPPS* 基因本身的表达,而是基因随机插入过程中对其他未知基因功能的破坏或干扰所引起的。同时,*HPH* 基因作为筛选标记基因,其存在和表达也有可能对银耳的生理过程产生一定影响。为进一步明确 *GGPPS* 基因表达所产生的特异性影响,后续的研究过程中我们拟设置多组对照实验,包括仅转入 *HPH* 基因的对照组以及野生

型银耳对照组,通过对比分析不同组别的生长特征、代谢物含量以及基因表达谱等数据,排除其他因素的干扰,从而探讨 *GGPPS* 基因表达所产生的独特效应。

## 4 结论

在本研究中,我们选用银耳芽孢作为生物反应器,通过基因工程引入红豆杉的 *GGPPS* 基因并实现异源表达,成功获取了二萜化合物的关键前体 GGPP。外源 *GGPPS* 基因的成功表达,对银耳芽孢内部代谢网络产生了一定影响。银耳芽孢的总二萜化合物及 MVA 途径中的主要代谢物含量发生了显著的变化;与此同时,其营养成分、活性成分以及参与乙酰 CoA 代谢途径的氨基酸含量也均发生了明显改变。此次研究结果证实,银耳芽孢作为工程菌株具有一定的潜力,异源表达外源 *GGPPS* 后,引发的萜类代谢流重塑、营养成分的改变以及 MVA 途径中乙酰 CoA 代谢的动态变化,为深入开发和高效利用银耳芽孢提供了重要的理论基础。

## 作者贡献

辛燕花: 论文构思及撰写、数据审核;郭丽琼: 实验指导、提供实验平台、数据审核;林俊芳: 实验指导、提供实验平台和经费支持。

## 利益冲突

作者声明,该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

## [REFERENCES]

- Anterola A, Shanle E, Perroud PF, Quatrano R, 2009. Production of taxadiene, taxadiene-4(5),11(12)-diene by transgenic *Physcomitrella patens*. *Transgenic Research*, 18(4): 655-660
- Babekov AU, Saidkhodzhaev AI, Keneshov BM, 2000. Terpenoid coumarins from *Ferula kokanica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 36(2): 220
- Beyer P, Kreuz K, Kleinig H, 1985. Separation of mevalonate phosphates and isopentenyl pyrophosphate by thin-layer chromatography and of short-chain prenyl phosphates by ion-pair chromatography on a high-performance liquid chromatography column. *Methods in Enzymology*, 111:

- 248-252
- Chen F, Zhang J, Song X, Yang J, Li H, Tang H, Liao YC, 2011. Combined metabonomic and quantitative real-time PCR analyses reveal systems metabolic changes of *Fusarium graminearum* induced by Tri5 gene deletion. *Journal of Proteome Research*, 10(5): 2273-2285
- Cheng SJ, Huang SJ, Guo LQ, Han F, Lin JF, 2011. Cloning and bioinformatics analysis of the 10 deacetylbaconin III-10 acetyltransferase gene in southern *Taxus chinensis*. *Biotechnology Bulletin*, 1: 107-112 (in Chinese)
- Cheung PCK, 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35(4): 292-299
- Cho EJ, Oh JY, Chang HY, Yun JW, 2006. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom *Tremella fuciformis*. *Journal of Biotechnology*, 127(1): 129-140
- Guo LQ, Lin JY, Lin JF, 2007. Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China. *Food Chemistry*, 100(2): 643-649
- Guo LQ, Liu EX, Wang J, 2009. Development of highly efficient transformation system of yeast-like conidia of *Tremella fuciformis*. *Chinese Agricultural Science*, 3: 268-275
- Guo LQ, Liu Y, Zhao SX, Lin JF, 2008. Establishment of an efficient transformation system for intact cells of *Tremella fuciformis* spores. *Science in China Series (C)*, 38(10): 974-981 (in Chinese)
- Guo X, Shi SB, 2024. Isolation and gene knockout of the autogenous reproduction sequence of *Rhodotorula* sp. using free plasmids. *Acta Microbiologica Sinica*, 64(3): 882-893 (in Chinese)
- Han F, Kang LZ, Guo LQ, Chen XY, Lin JF, 2011. Cloning and bioinformatics analysis of gpp synthase gene in southern *Taxus chinensis*. *Journal of Food and Biotechnology*, 30(5): 728-733 (in Chinese)
- Han Y, Xu WQ, Yang FJ, Shen X, Hong G, Huang J, Zhou ZW, 2011. The anti-tumor effect and mechanism of *Tremella fuciformis* polysaccharides. *Herald of Medicine*, 30(7): 849-852 (in Chinese)
- Hasanuzzaman M, Hossain MA, Fujita M, 2010. Selenium in higher plants: physiological role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Sciences*, 5(4): 354-375
- He J, Du JX, Tao JK, 2023. Biochemical and genetic basis of guanacastane diterpene biosynthesis in *Basidiomycete* fungi. *Organic Letters*, 25(28): 5345-5349
- Huang SJ, Cheng SJ, Guo XY, Guo LQ, Lin JF, 2010. Cloning and sequence analysis of the 3'-n-dehenzoyl-2-deoxypaclitaxel benzoyl transferase gene in *Taxus cuspidata*. *Biotechnology Bulletin*, 12: 191-195 (in Chinese)
- Juho M, Mari T, Marjo M, Bharadwaja V, Einari N, Anna-Liisa L, Anna-Kaisa R, Sami H, 2023. Genetic variation is a key determinant of chromatin accessibility and drives differences in the regulatory landscape of C57BL/6J and 129S1/SvImJ mice. *Nucleic Acids Research*, 52(6): 2904-2923
- Kai G, Liao P, Zhang T, Zhou W, Wang J, Xu H, 2010. Characterization, expression profiling, and functional identification of a gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Salvia miltiorrhiza*. *Biotechnology & Bioengineering*, 15(2): 236-245
- Kang LZ, Lin JF, Huang XQ, Guo LQ, Liang K, 2013. Research on genetic transformation of paclitaxel synthase gene into *Flammulina velutipes*. *Food Industry Technology*, 34(2): 190-193 (in Chinese)
- Le YL, Sun Y, Wang HC, Shao WL, 2016. Research progress on screening markers for microbial genetic transformation and their biosafety. *Microbiology China*, 43(8): 1814-1821 (in Chinese)
- Leonard E, Ajikumar RK, Thayer R, Xiao WH, Mo JD, Tidor B, Stephanopoulos G, Prattler KLG, 2010. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31): 13654-13659
- Li G, Wang Q, Liu QY, Li BJ, 2004. Establishing a transformation system for medicinal fungus *Ganoderma lucidum* using PEG method. *Mycosystema*, 23(2): 255-261 (in Chinese)
- Li HT, Zhou H, Ding ZT, 2023. Research progress on novel active secondary metabolites produced by microbial co-culture. *Journal of Yunnan University (Natural Science Edition)*, 45(2): 493-512 (in Chinese)
- Liao ZH, Gong YF, Kai GY, Zuo K, Chen M, 2005. An intron-free methyl jasmonate inducible geranylgeranyl diphosphate-synthase gene from *Taxus media* and its functional identification in yeast. *Molecular Biology*, 39(1): 11-17
- Lin XS, Wang ZH, Ma YL, Lin ZX, Lin H, Lin DM, Luo HL, 2021. Study on the transformation characteristics of *Tremella fuciformis* in factory cultivation of fresh mushroom grass. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 58(5): 132-139 (in Chinese)
- Liu W, Tang QJ, Wei YT, Han L, Han W, Feng N, Zhang JS, 2019. Chemical compounds and antioxidant activity of volatile oil from the white jelly mushroom, *Tremella fuciformis* (Tremellomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 21(3): 207-214
- Liu XP, Wang HN, Zhang X, Leng PS, Hu ZH, 2024. Cloning, expression, and functional analysis of LiGGPPS large subunit genes related to terpene synthesis in lily. *Northwest Agricultural Journal*, 33(3): 503-510 (in Chinese)
- Ma ZH, Li W, Yi WB, 2016. Research progress on heterologous production of fungal natural products. *Acta Microbiologica Sinica*, 56(3): 429-440 (in Chinese)
- Manetti C, Bianchetti C, Casciani L, Cecilia C, Di CME,



- Alfredo M, Mario M, Filippo C, 2006. A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *Journal of Experimental Botany*, 57(11): 2613-2625
- Negrulescu A, Patrula V, Mincea MM, Ionascu C, Vlad-Oros BA, Ostafe V, 2012. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(12): 2176-2182
- Noushahi HA, Khan AH, Noushahi UF, Hussain M, Javed T, Zafar M, Batool M, Ahmed U, Liu K, Harrison MT, Saud S, Fahad S, Shu SH, 2022. Biosynthetic pathways of triterpenoids and strategies to improve their biosynthetic efficiency. *Plant Growth Regulation*, 97(3): 439-454
- Pan YX, Chen H, Siu F, Kilberg MS, 2003. Amino acid deprivation and endoplasmic reticulum stress induce expression of multiple activating transcription factor-3 mrna species that, when overexpressed in hepg2 cells, modulate transcription by the human asparagine synthetase promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40): 38402
- Pitera DJ, Paddon CJ, Newman JD, Keasling JD, 2007. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 9(2): 193-207
- Shen HM, Li C, Gao L, Gao L, Liu TG, Liu B, Chen WQ, 2017. Research progress on fungal genetic transformation mediated by protoplast method. *Plant Protection*, 43(2): 25-30 (in Chinese)
- Shi ST, 2023. Mining of fatty acid and terpenoid synthesis genes and construction of cell factories in *Aurantiochytrium limacinum* MYA-138. PhD Dissertation, Shandong University, Jinan. 1-105 (in Chinese)
- Slater SC, Voige WH, Dennis DE, 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *Journal of Bacteriology*, 170(10): 4431-4436
- Song LS, 2003. Detection of farnesyl diphosphate accumulation in yeast ERG9 mutants. *Analytical Biochemistry*, 317(2): 180-185
- Takaya A, Zhang YW, Asawatreratanakul K, Wititsuwannakul D, Wititsuwannakul R, Takahashi S, Koyama T, 2003. Cloning, expression and characterization of a functional cDNA clone encoding geranylgeranyl diphosphate synthase of *Hevea brasiliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1625(2): 214-220
- Tan HH, Xia M, Su P, Huang LQ, 2024. Functional characterization of sesquiterpene synthase in the shell of wolfberry venom from rui xiang. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 49(9): 2410-2421 (in Chinese)
- Trienens M, Rohlf M, 2012. Insect-fungus interference competition - the potential role of global secondary metabolite regulation, pathway-specific mycotoxin expression and formation of oxylipins. *Fungal Ecology*, 5(2): 191-199
- Tsa CH, Chang RC, Chiou JF, Liu TZ, 2003. Improved superoxide-generating system suitable for the assessment of the superoxide-scavenging ability of aqueous extracts of food constituents using ultraweak chemiluminescence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1): 58-62
- Vaccaro MC, Alfieri M, Tommasi ND, Moses T, Goossens A, Leone A, 2020. Boosting the synthesis of pharmaceutically active abietane diterpenes in *S. sclarea* hairy roots by engineering the GGPPS and CPPS genes. *Frontiers*, 11: 924
- Vallon T, Ghanegaonkar S, Vielhauer O, Müller A, Albermann C, Sprenger G, Reuss M, Lemuth K, 2008. Quantitative analysis of isoprenoid diphosphate intermediates in recombinant and wild-type *Escherichia coli* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(1): 175-182
- Vishwakarma RK, Ruby, Singh S, Sonawane PD, Srivastava S, Kumari U, Santosh Kumar RJ, Khan BM, 2013. Molecular cloning, biochemical characterization, and differential expression of an acetyl-CoA C-acetyltransferase gene (*AACT*) of brahmi (*Bacopa monniera*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 31(3): 547-557
- Wang PW, Wang DC, Li Y, 2001. Progress in genetic engineering of edible fungi. *Journal of Jilin Agricultural University*, 23(3): 23-27 (in Chinese)
- Wang TJ, 2011. Detection and analysis of trace elements in six edible fungi. *Edible Fungi*, 2011(6): 59, 64 (in Chinese)
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Xie BG, Rao YB, Zheng JG, 2005. Ultrasonic mediated conversion of *Tremella fuciformis*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13(1): 42-45 (in Chinese)
- Xie Z, Kapteyn J, Gang DR, 2010. A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. *Plant Journal*, 54(3): 349-361
- Xin YH, Xiao ZY, You LF, Guo LQ, Lin JF, 2014. Expression of taxadiene synthase gene in *Ganoderma lucidum*. *Chinese Agricultural Science*, 47(3): 546-552 (in Chinese)
- Xu HY, Li QC, Zheng MF, Liu B, Lü F, Zeng F, 2023. Research progress on the structure, functionality, and application of *Tremella fuciformis* polysaccharides. *Science and Technology of Food Industry*, 45(4): 362-370 (in Chinese)
- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T, 2007. Zinc is a novel intracellular second messenger. *Journal of Cell Biology*, 177(4): 637-645
- Yang XL, 2012. The effect of trace elements on the growth and secondary metabolite paclitaxel content of *Taxus*

- media. MS Thesis, Sichuan Agricultural University, Ya'an. 1-87 (in Chinese)
- You LF, Yang HX, Lin JF, Liu Y, Ye ZW, Guo LQ, Xin YH, 2015. Combination expression of geranyl geranyl pyrophosphate synthase and paclitaxel synthase genes in the *Coprinopsis cinerea*. Chinese Journal of Biotechnology, 31(3): 375-383 (in Chinese)
- Zarka K, Greyling R, Gazendam I, Olefse D, 2010. Insertion and characterization of the cryIIa1 gene in the potato cultivar Spunta for resistance to potato tuber moth. Journal of the American Society for Horticultural Science, 135: 317-324
- Zhang X, Guan H, Dai Z, Guo J, Huang L, 2015. Functional analysis of the isopentenyl diphosphate isomerase of *Salvia miltiorrhiza* via color complementation and RNA interference. Molecules, 20(11): 20206-20218
- Zhao SX, Lin JF, Wang J, Guo LQ, 2007. Research progress on genetically modified edible fungi with safety selection markers. Acta Edulis Fungi, 14(1): 55-61 (in Chinese)
- Zhou GB, Kang H, Wang L, Gao L, Liu P, Xie J, Zhang FX, Weng XQ, Shen ZX, Chen J, Gu LJ, Yan M, Zhang DE, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z, 2007. Oridonin, a diterpenoid extracted from medicinal herbs, targets AML1-ETO fusion protein and shows potent antitumor activity with low adverse effects on t (8;21) leukemia *in vitro* and *in vivo*. Blood, 109(8): 3441-3450
- Zhou YM, Qi JZ, Duan YC, Zhao M, Liu CW, 2023. Research progress on biosynthesis of diterpenoid compounds in large basidiomycetes. Mycosystema, 42(1): 101-117 (in Chinese)
- Zhu H, Wang TW, Sun SJ, Shen YL, Wei DZ, 2006. Chromosomal integration of the vitreoscilla hemoglobin gene and its physiological actions in *Tremella fuciformis*. Applied Microbiology & Biotechnology, 72(4): 770-776
- [附中文参考文献]
- 程抒劼, 黄仕杰, 郭丽琼, 韩飞, 林俊芳, 2011. 南方红豆杉 10-去乙酰巴卡亭III-10-乙酰转移酶基因的克隆与生物信息学分析. 生物技术通报, 1: 107-112
- 郭丽琼, 柳永, 赵姝嫻, 林俊芳, 2008. 银耳芽孢完整细胞高效转化体系的建立. 中国科学(C 辑), 38(10): 974-981
- 郭霄, 史硕博, 2024. 圆红冬孢酵母自主复制序列分离和利用游离型质粒进行基因敲除. 微生物学报, 64(3): 882-893
- 韩飞, 康林芝, 郭丽琼, 陈晓阳, 林俊芳, 2011. 南方红豆杉 ggpp 合酶基因的克隆与生物信息学分析. 食品与生物技术学报, 30(5): 728-733
- 韩英, 徐文清, 杨福军, 沈秀, 洪阁, 黄洁, 周则卫, 2011. 银耳多糖的抗肿瘤作用及其机制. 医药导报, 30(7): 849-852
- 黄仕杰, 程抒劼, 郭心悦, 郭丽琼, 林俊芳, 2010. 蔓地亚红豆杉 3'-n-去苯甲酰-2-脱氧紫杉醇苯甲酰转移酶基因的克隆与序列分析. 生物技术通报, 12: 191-195
- 康林芝, 林俊芳, 黄秀琴, 郭丽琼, 梁科, 2013. 紫杉烯合酶基因遗传转化金针菇的研究. 食品工业科技, 34(2): 190-193
- 乐易林, 孙宇, 王洪成, 邵蔚蓝, 2016. 微生物遗传转化筛选标记及其生物安全性的研究进展. 微生物学通报, 43(8): 1814-1821
- 李刚, 王强, 刘秋云, 李宝健, 2004. 利用 PEG 法建立药用真菌灵芝的转化系统. 菌物学报, 23(2): 255-261
- 李洪涛, 周皓, 丁中涛, 2023. 微生物共培养产生新颖活性次生代谢产物的研究进展. 云南大学学报(自然科学版), 45(2): 493-512
- 林兴生, 王泽辉, 马运龙, 林占熿, 林辉, 林冬梅, 罗海凌, 2021. 鲜菌草工厂化栽培银耳物质转化特性研究. 四川大学学报(自然科学版), 58(5): 132-139
- 刘旭平, 王浩楠, 张茜, 冷平生, 胡增辉, 2024. 百合蒎烯合成相关基因 LiGGPPS 大小亚基基因的克隆, 表达及功能分析. 西北农业学报, 33(3): 503-510
- 马紫卉, 李伟, 尹文兵, 2016. 真菌天然产物异源生产研究进展. 微生物学报, 56(3): 429-440
- 沈慧敏, 李超, 高利, 刘太国, 刘博, 陈万权, 2017. 原生质体法介导真菌遗传转化的研究进展. 植物保护, 43(2): 25-30
- 石士涛, 2023. 破囊壶菌 *Aurantiochytrium limacinum* MYA-1381 脂肪酸和萜类合成基因的挖掘及细胞工厂的构建. 山东大学博士论文, 济南. 1-105
- 谭洪虎, 夏梦, 苏平, 黄璐琦, 2024. 瑞香狼毒贝壳杉烷型二萜类合成酶功能表征. 中国中药杂志, 49(9): 2410-2421
- 王丕武, 王东昌, 李玉, 2001. 食用菌基因工程研究进展. 吉林农业大学学报, 23(3): 23-27
- 王士金, 2011. 六种食用菌中微量元素的检测分析. 食用菌, 2011(6): 59, 64
- 谢宝贵, 饶永斌, 郑金贵, 2005. 银耳的超声波介导转化. 农业生物技术学报, 13(1): 42-45
- 辛燕花, 肖招燕, 尤琳烽, 郭丽琼, 林俊芳, 2014. 紫杉二烯合酶基因在灵芝中的表达. 中国农业科学, 47(3): 546-552
- 许欢怡, 李泉岑, 郑明锋, 刘斌, 吕峰, 曾峰, 2023. 银耳多糖的结构, 功能性及应用研究进展. 食品工业科技, 45(4): 362-370
- 杨秀丽, 2012. 微量元素对蔓地亚红豆杉生长及次级代谢产物紫杉醇含量的影响. 四川农业大学硕士论文, 雅安. 1-87
- 尤琳烽, 杨海星, 林俊芳, 柳永, 叶志伟, 郭丽琼, 辛燕花, 2015. 牻牛儿苗牻牛儿苗基焦磷酸合酶和紫杉二烯合酶基因在灰盖鬼伞中的组合表达. 生物工程学报, 31(3): 375-383
- 赵姝嫻, 林俊芳, 王杰, 郭丽琼, 2007. 安全选择标记的转基因食用菌研究进展. 食用菌学报, 14(1): 55-61
- 周一鸣, 祁建钊, 段应策, 赵敏, 刘成伟, 2023. 大型担子菌中二萜化合物生物合成研究进展. 菌物学报, 42(1): 101-117