



中国农业科学院

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

# 草菇海藻糖-6-磷酸合成酶基因 克隆鉴定与表达分析

---

Reporter: 廉晓博

Date: 1.10



中国农业科学院

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES



实验结果与分析

研究目的



研究背景



具体研究方法



讨论

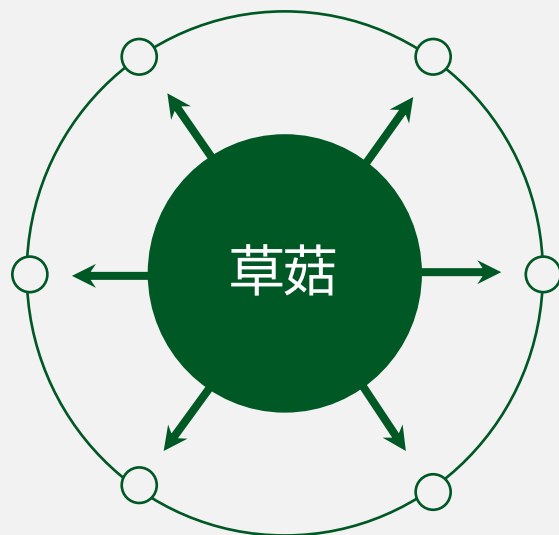
明德格物 博学笃行



Part 1

# 研究背景

富含抗氧化酶、萜烯、多肽、多糖和黄酮类等生物活性物质



高温型食用菌，对温度敏感，低温会对其生长发育、运输和储存造成严重的负面影响

- 海藻糖是一种稳定的非还原性二糖，广泛存在于细菌、真菌、无脊椎动物和一些耐旱植物中
- 合成主要由海藻糖-6-磷酸合酶 (Trehalose-6-Phosphate Synthase, TPS) 和海藻糖-6-磷酸磷酸酶 (Trehalose-6-Phosphate Phosphatase, TPP) 催化
- 其中TPS是真菌海藻糖生物合成途径中的**关键酶**，发挥限速酶作用。



Part **2**

# 研究目的

- 在4 °C低温时，草菇子实体会自溶，这不利于采后保鲜，影响其市场流通。
- 海藻糖 (trehalose) 累积通常可增强真菌对热胁迫和冷胁迫的耐受性，常用作草菇和其他真菌在低温胁迫时的保护剂。

- 多项研究通过添加海藻糖提升草菇保鲜效果。
- 针对草菇内源海藻糖的研究中，相关基因功能研究较少，同源基因功能分化不明确，响应的胁迫类型多集中于低温胁迫，具体的调控机制尚不清晰。

通过克隆草菇菌株V34的TPS编码基因VvTPS，对其进行生物信息学分析，探究不同温度（20、25、30、35、40 °C）对VvTPS表达及VvTPS活性的影响，以期揭示VvTPS在温度胁迫响应中的功能。



Part **3**

# 具体研究方法

A

## 基因克隆

以草菇gDNA和cDNA为模板，通过PCR扩增获得目标基因的DNA和cDNA序列，将扩增产物连接至空载体，并转化大肠杆菌，通过测序验证序列准确性。

B

## 基因表达量测定

设计引物，将微管蛋白基因 (tubulin) 作为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算VvTPS表达量

C

## 酶活测定

测定菌丝海藻糖-6-磷酸酯酶 (TPS) 活性



- ① NovoPro将cDNA序列翻译为氨基酸序列
- ② NCBI BLAST进行氨基酸序列相似性比对
- ③ MEGA11.0构建系统发育树
- ④ ExPasy ProtParam分析蛋白的理化性质
- ⑤ TMHMM 2.0预测跨膜结构域
- ⑥ SignalP 6.0预测信号肽
- ⑦ Euk-mPLoc 2.0进行亚细胞定位分析
- ⑧ InterPro预测蛋白结构域
- ⑨ NovoPro预测蛋白二级结构
- ⑩ SWISS-MODEL构建蛋白三级结构模型
- ⑪ PlantCARE软件分析VvTPS家族基因启动子顺式作用元件



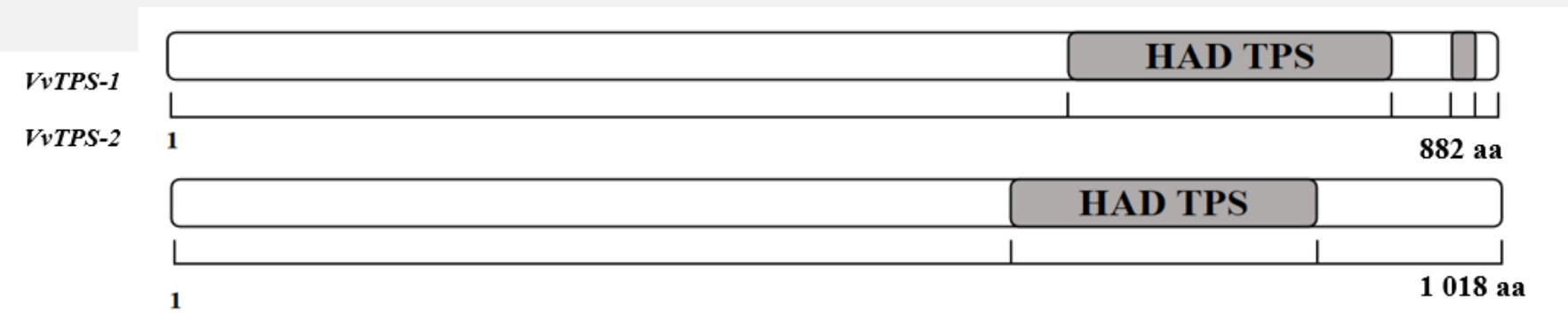
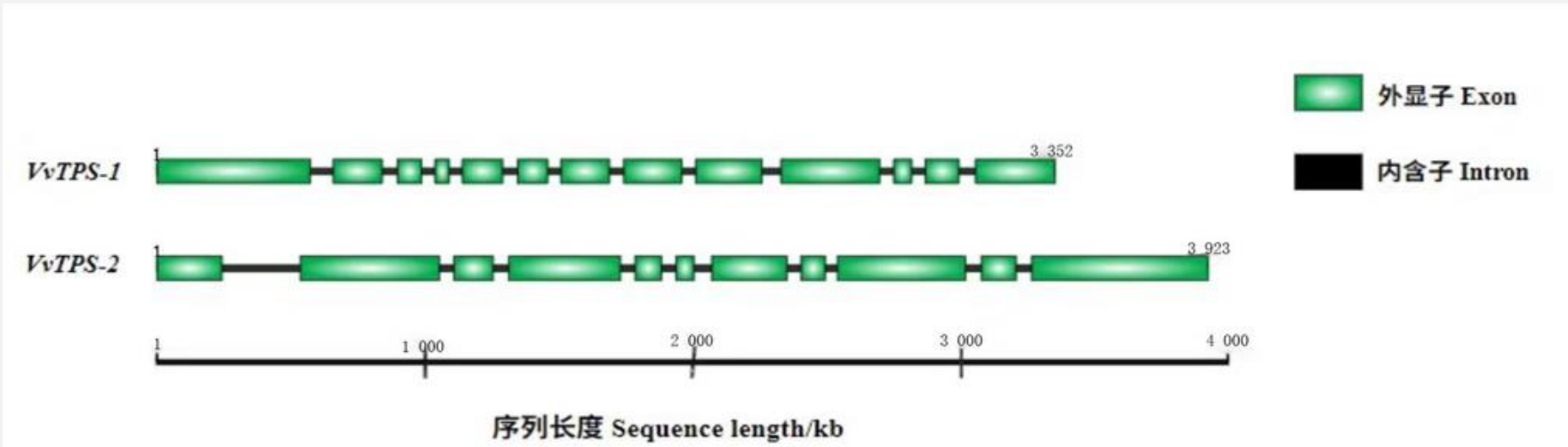
Part **4**

# 实验结果与分析

# 1、VvTPS序列与VvTPS分析结果

VvTPS1 DNA长度是3352 bp，包含12个内含子和13个外显子，编码蛋白长度882 aa，为无信号肽的非跨膜蛋白，定位于细胞质，含有两个HAD TPS保守结构域；

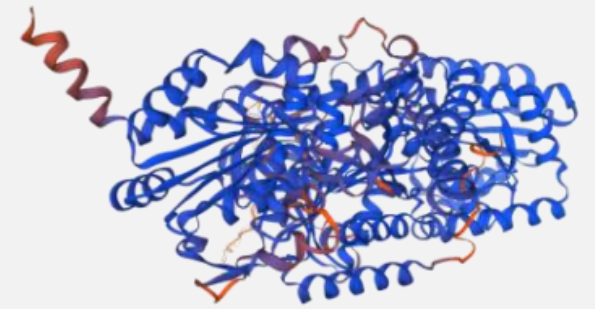
VvTPS2 DNA长度是2649 bp，包含11个内含子和12个外显子，编码蛋白长度1018 aa，为有一个信号肽的非跨膜蛋白，定位于细胞质，含有一个HAD TPS保守结构域。



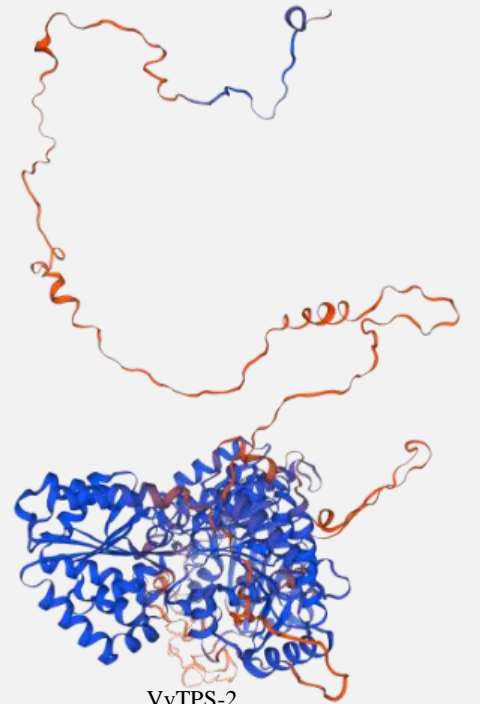
# 1、VvTPS序列与VvTPS分析结果

两个蛋白的脂肪系数都比较高，较高的脂肪系数通常表示更高的热稳定性；理论等电点数据表明**VvTPS1为弱酸性蛋白**，**VvTPS2为碱性蛋白**；

两个蛋白的不稳定系数略高于40，说明不稳定；平均亲水系数为负值，表明两个基因对应的蛋白都是亲水性蛋白。



VvTPS-1



VvTPS-2

蛋白	相对分子质量	结构式	脂肪系数	理论等电点	不稳定系数	平均亲水系数
VvTPS1	$9.80 \times 10^4$	$C_{4392}H_{6838}N_{1200}O_{1298}S_{26}$	87.32	6.00	40.49	-0.262
VvTPS2	$1.12 \times 10^5$	$C_{4970}H_{7840}N_{1436}O_{1476}S_{30}$	83.94	8.44	40.21	-0.325

# 2、VvTPS启动子

## 顺式作用元件分析

启动子上中存在多个参与生理代谢和环境胁迫的顺式作用元件，如核心启动元件

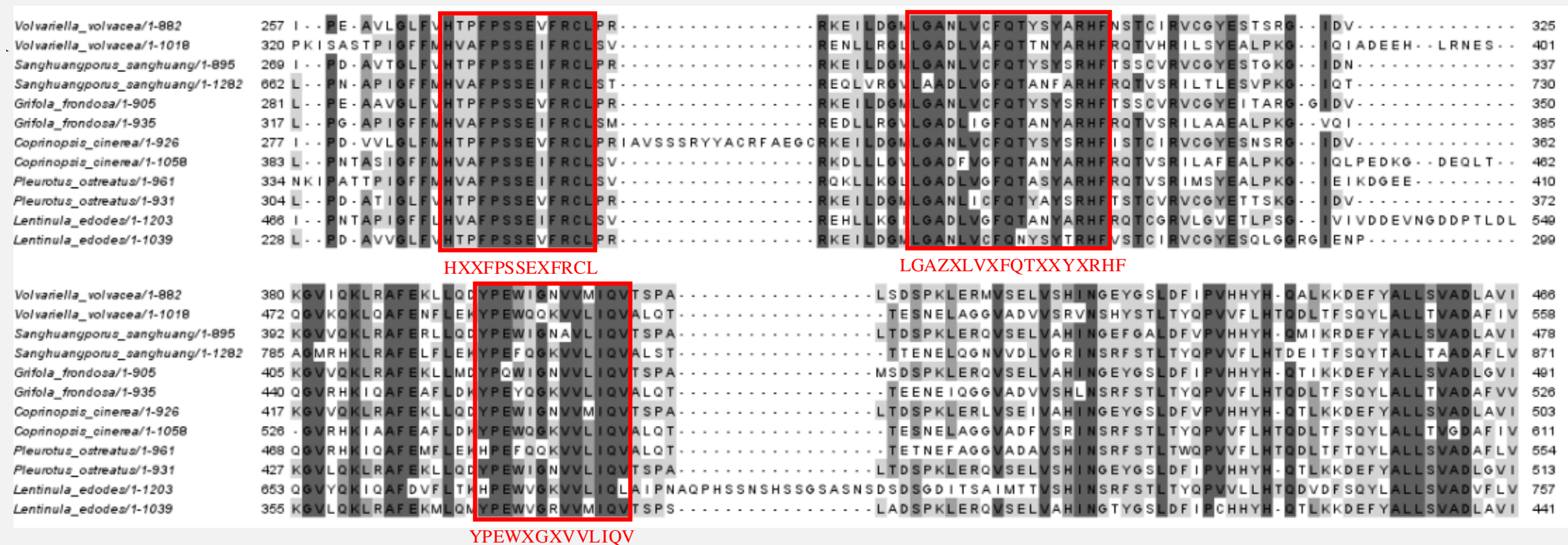
(TATA-box、CAAT-box)、ABA响应元件(ABRE)、MeJA响应元件(TGACGmotif、CGTCA-motif)、光响应元件(G-box)、分生组织表达响应元件(CAT-box)，推测VvTPS1和VvTPS2在调控草菇生长发育和抵御非生物胁迫中发挥重要作用。

元件名称 Component Name	序列 Sequence (5'→3')	数量 Quantity		功能 Function
		VvTPS1	VvTPS2	
				启动子和增强子区域共有元件
CAAT-box	CAAAT	31	10	(Common elements in promoter and enhancer regions)
				转录起始-30 区的核心启动子元件
TATA-box	TATATAAATC	7	5	(Core promoter element of transcription start-30)
ABRE(Abscisic Acid Responsive Element)	ACGTG	3	4	ABA 响应 (ABA respond)
TGACG-motif/CGTCA-motif				
(Jasmonic Acid Responsive Element)	CGTCA	12	10	MeJA 响应 (MeJA respond)
MBS(MYB Binding Site)	CAACTG	2	0	MYB 结合位点参与干旱诱导(MYB binding sites are involved in drought-induced responses)
G-box	CACGTT	3	1	光响应 (Light response)
CAT-box	GCCACT	1	1	参与分生组织表达 (Participate in secondary tissue expression)
Circadian (Circadian Control Element)	CAAAGATATC	0	1	参与昼夜节律控制的顺式调控元件 (Cis regulatory elements involved in circadian rhythm control)

# 3、氨基酸序列比对结果和系统发育树

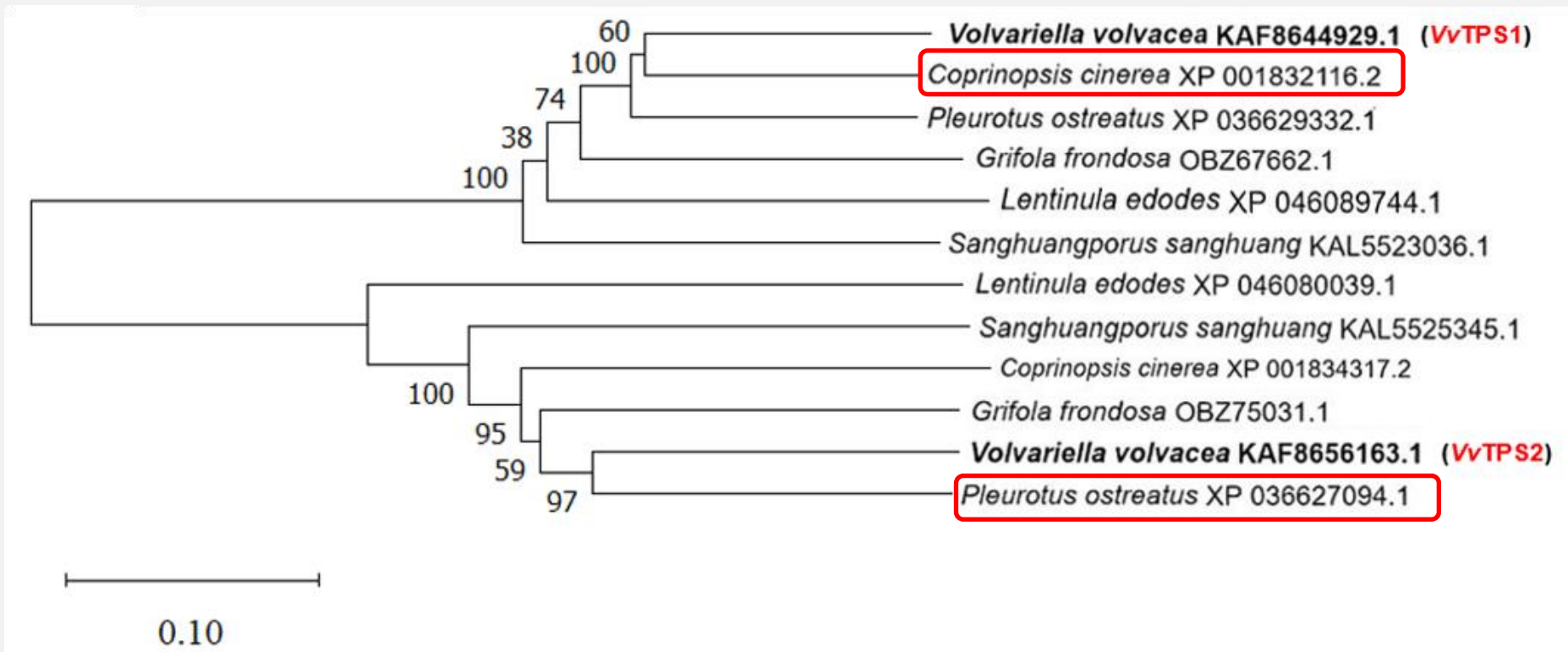
不同真菌的TPS氨基酸序列之间具有较高的保守性和相似的保守结构域

(HXXFPSSEXFRCL、LGAZXLVXFQTXXYXRHF和YPEWXGXVVLIQV)



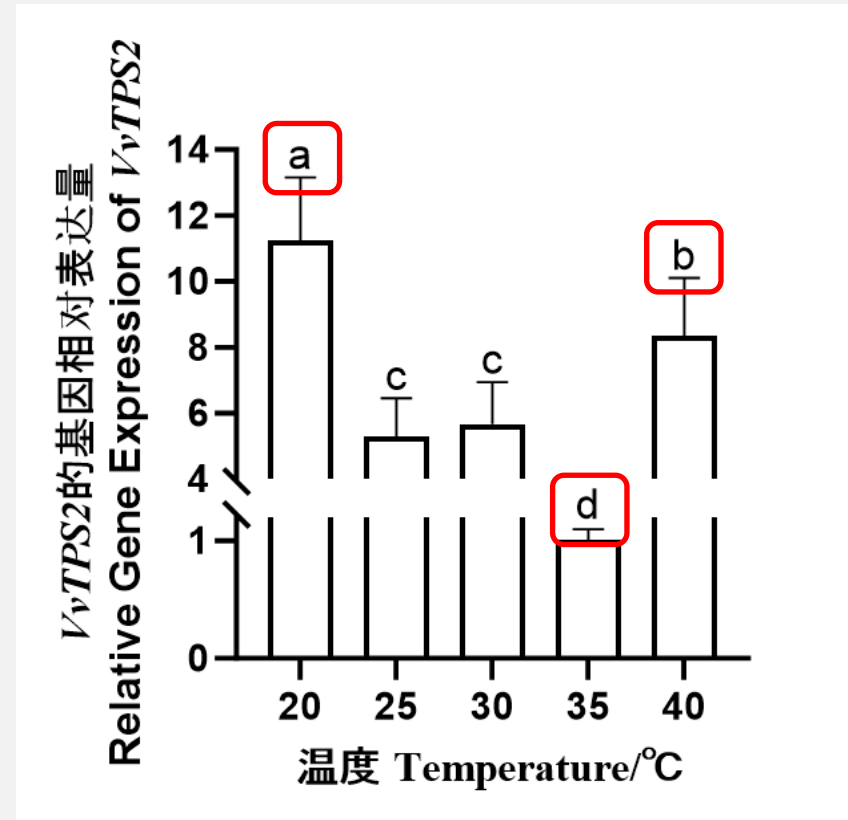
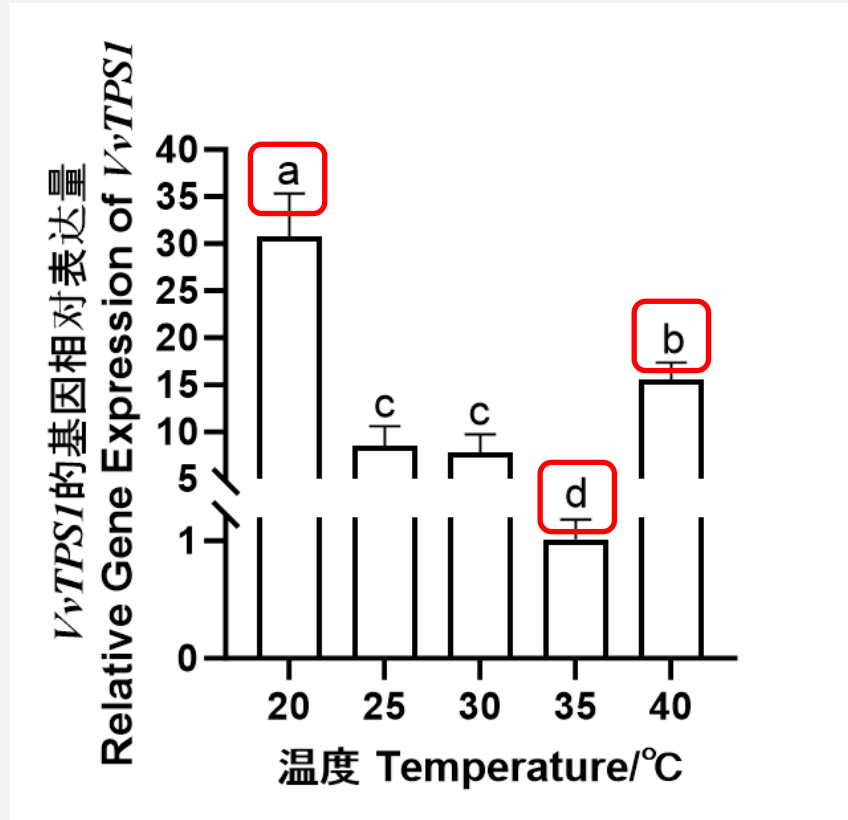
### 3、氨基酸序列比对结果和系统发育树

VvTPS1、VvTPS2氨基酸序列分别与灰盖鬼伞（*Coprinopsis cinerea*）、糙皮侧耳（*P. ostreatus*）的聚在一个分支。



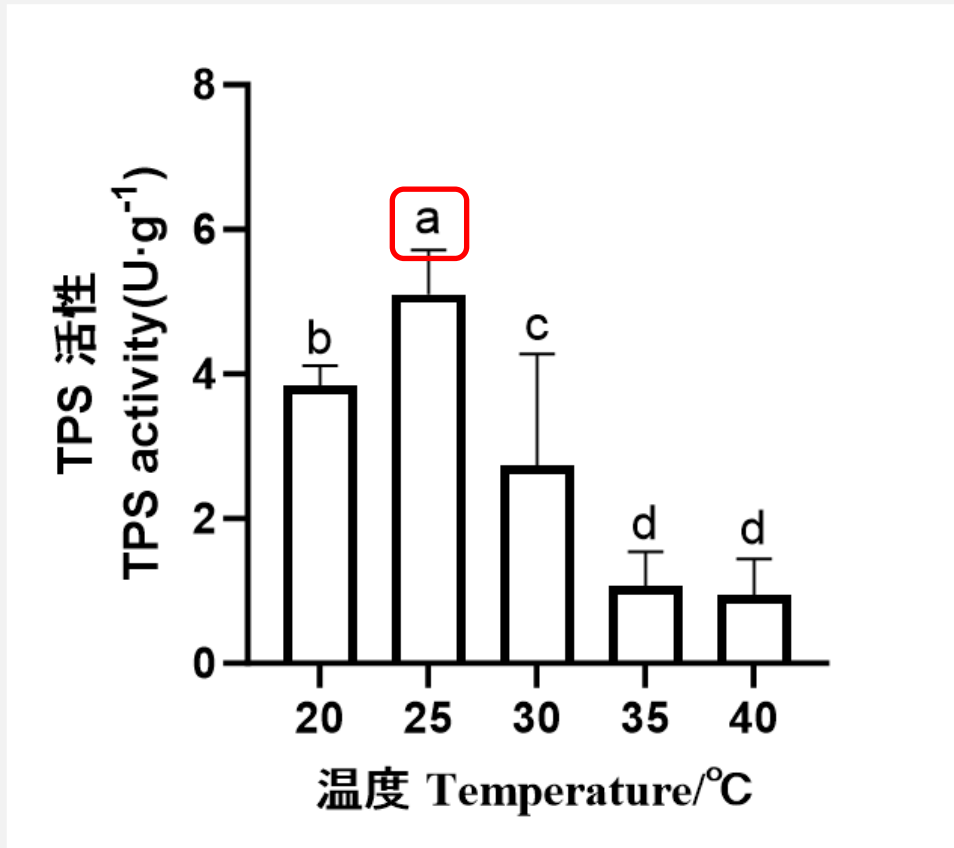
## 4、不同温度VvTPS的表达情况

在不同温度VvTPS1和VvTPS2表达量的变化趋势相似，  
在实验范围内，表达量在20 °C时最高，在40 °C时较高，在35 °C时最低。



## 5、不同温度对VvTPS活性的影响

在实验范围内，VvTPS活性在25 °C时最高，为  $(5.11 \pm 0.61) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ；在20 °C时较高，为  $(3.85 \pm 0.27) \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ，在35、40 °C时较低。





Part 5

讨论

# VvTPS1和VvTPS2的结构特征



中国农业科学院

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

## 保守结构与功能特性

- 结构特征: VvTPS1和VvTPS2均含有典型的HAD家族保守结构域
- 进化关系: 与其他真菌TPS蛋白具有序列同源性和较高的结构相似性
- 亚细胞定位: VvTPS2含有信号肽, 可能被导向不同的亚细胞区域
- 理化性质: VvTPS1是弱酸性蛋白, VvTPS2是碱性蛋白, 二者在不同pH环境中的活性可能不同

## 调控元件差异

- 特有元件: VvTPS1含有MBS元件 (干旱诱导)
- 节律调控: VvTPS2含有昼夜节律元件
- 功能分化: 说明二者可能响应不同的上游信号通路

进化关系

- 亲缘关系: VvTPS1、VvTPS2分别与灰盖鬼伞、糙皮侧耳聚在一个分支
- 功能分化: 表明二者在进化过程中功能可能发生分化

温度响应特性

- 表达模式: 两个基因在最适生长温度35°C时表达量最低
- 协同表达: 与草菇海藻糖合成途径另一个关键基因VvTPP表达趋势一致
- 胁迫响应: VvTPS1和VvTPS2表达量在20°C时最高, 在40°C时较高

1

## 生理适应策略

- 能量分配: 在35°C草菇将能量优先用于菌丝生长等基本生命活动
- 胁迫响应: 在20、40°C时通过合成海藻糖应对温度胁迫

2

## 酶活性调控机制

表达-活性差异: 不同温度VvTPS表达量和VvTPS活性变化趋势不相同

原因:

- 蛋白质合成效率: 酶蛋白在胁迫条件下合成效率和正确折叠的稳定性会下降
- 反馈抑制: 累积的海藻糖-6-磷酸会抑制TPS活性
- 翻译后修饰: TPS活性还受到翻译后修饰的调控, 可能在25°C才能被最大程度激活

合照



中国农业科学院

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES





中国农业科学院

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

# 演示完毕 感谢倾听!

**第四组 分工**

**孙仪 查找资料，信息分析**

**孙瑜彤 整理信息分析部分，制作PPT**

**兰欣 整理背景目的及讨论部分，制作PPT**

**廉晓博 汇总整理，汇报PPT**