



## 双向电泳和质谱技术分析樟芝无性孢子萌发相关蛋白

朱青, 陆震鸣\*, 李华祥, 史劲松, 许正宏\*

江南大学药学院, 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

**摘要:**【目的】采用双向电泳(2DE)、质谱技术和实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术分析樟芝无性孢子萌发相关蛋白。【方法】分别提取培养 0 h 和 24 h 的樟芝孢子总蛋白并进行双向电泳分离, 再用 PDQuest 软件进行差异蛋白分析, 并用 MALDI-TOF-MS 技术对差异蛋白进行鉴定; 其次将鉴定成功的蛋白与孢子萌发相关蛋白的本地数据库进行比对, 获得樟芝中的孢子萌发相关蛋白信息, 最后用 RT-qPCR 技术对相关基因的转录水平进行分析。【结果】两组样品共有 32 个差异蛋白点, 其中在 24 h 表达量上调的蛋白 25 个, 下调的蛋白 7 个。将 32 个差异蛋白点挖取鉴定, 成功鉴定 24 个。其中, 与孢子萌发相关的蛋白有 10 个, 分别为 GerO、Ubc1、Cat-1、Snf1、Cas2、SfaD、Chaperonin、Fad5、Tyrosine-P 和 ChiA。【结论】该研究结果为进一步解析樟芝无性孢子萌发的分子机制提供了理论依据。

**关键词:** 樟芝, 孢子萌发, 双向电泳, 荧光定量 PCR

樟芝(*Antrodia camphorata*)是生长于台湾地区特有牛樟树腐朽树干内壁的一种药食用真菌, 传统用于解酒保肝、治疗腹泻等。樟芝含有包括三萜、多糖及甾体在内的多种有效成分<sup>[1]</sup>, 具有抗肿瘤、抗炎及抗氧化活性等药理活性<sup>[2-3]</sup>。樟芝具有宿主专一性, 野生子实体数量稀少且生长速度缓慢, 因此樟芝市场价格昂贵。深层发酵技术由于具有生产周期短、产品质量及批次稳定性好等优点, 已成为目前规模化生产樟芝的主要方式之一<sup>[4]</sup>。

樟芝深层发酵后期在适宜的营养条件下可产生大量无性孢子<sup>[5]</sup>。樟芝无性孢子作为发酵接种

物, 能够在培养基中快速萌发<sup>[6]</sup>。进一步根据樟芝的无性繁殖过程(孢子→菌丝→菌球→孢子)建立了液体深层循环发酵工艺, 该工艺可以免除樟芝发酵过程中的种子制备步骤, 缩短生产周期, 高效生产活性代谢产物<sup>[7]</sup>。虽然采用新一代测序技术破译了樟芝的全基因组序列, 但对樟芝孢子在发酵过程中快速萌发的分子机制尚缺少深入研究<sup>[8]</sup>。

本研究采用双向电泳技术分析孢子萌发不同时期的蛋白表达水平差异, 鉴定与孢子萌发相关的功能基因, 并进一步采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术对功能基因的转录水平进行检测,

基金项目: 国家自然科学基金(31401931)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: 陆震鸣, zmlu@jiangnan.edu.cn; 许正宏, zhenghxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2017-02-27; 修回日期: 2017-03-29; 网络出版日期: 2017-05-12

为解析孢子萌发的分子机制提供理论基础, 也为樟芝的发酵生产提供理论指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 主要材料:** 樟芝菌株购买于美国模式菌种保藏中心, 保藏编号为 ATCC200183。磷酸、丙三醇、丙酮、三氯乙酸及培养基成分均来源于国药集团; 溴酚蓝、苯甲基磺酰氟(PMSF)、考马斯亮蓝 G-250、2D 电泳样品提取液 III、30% (W/V) 丙烯酰胺/甲叉双丙稀酰胺溶液(29 : 1)、改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒及引物合成等均为上海生工生物工程产品; 尿素、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(IAM)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、甘氨酸、两性电解液、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、低熔点覆盖琼脂糖及 IPG 胶条(24 cm, pH 3-10)、等购自美国伯乐公司(Bio-Rad); SYBR 荧光染料购自 Life Technologies 公司。

**1.1.2 实验仪器:** NanoDrop 2000C 分光光度计购自 Thermo Scientific 公司; 等电聚焦仪(Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit)、垂直电泳设备(Ettan DALTsix Electrophoresis Unit)及扫描仪购自 GE Healthcare 公司; RT-qPCR 仪(CFX Connect Optics Module Real-Time System)购自 Bio-Rad 公司。

**1.1.3 培养基及溶液配制:** PDA 斜面培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 自然。种子培养基(g/L): 葡萄糖 20, 酵母粉 1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0,  $\text{MgSO}_4$  1.5, pH 4.5。发酵培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母粉 2.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.0,  $\text{MgSO}_4$  1.5, pH 4.5。平衡液母液: 尿素 36 g, SDS 2 g, 甘油 20 mL,

1.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.8) 25 mL, 以 ddH<sub>2</sub>O 定容至 100 mL, 于 -20 °C 保存。平衡液 I: 临用加入 0.2 g DTT; 平衡液 II: 临用加入 0.25 g 碘乙酰胺。

### 1.2 樟芝孢子萌发率测定

将 PDA 斜面培养樟芝菌株菌丝块接种于种子培养基, 于 26 °C、150 r/min 培养 15 d, 获得樟芝种子液。将孢子以  $1.0 \times 10^6$  个/mL 终浓度接种于发酵培养基, 于 26 °C、150 r/min 培养 9 d, 获得含无性孢子的樟芝发酵液。发酵液以四层无菌纱布及三层无菌擦镜纸过滤, 获得樟芝孢子悬浮液。樟芝孢子液以 0.9% 生理盐水洗涤 2 次, 以血球计数器计数孢子浓度。将孢子接种到发酵培养基, 使孢子终浓度为  $1.0 \times 10^6$  个/mL, 培养 24 h。每个样品设置 3 个平行, 采集 0 h 未萌发孢子及培养 24 h 孢子样品显微拍照, 以 Image J 软件测量孢子长度并计算孢子萌发率。当孢子长度大于其初始长度 2 倍时视为已萌发<sup>[6]</sup>。萌发率(%)=(已萌发孢子数/孢子总数)×100%。

### 1.3 总蛋白及 RNA 提取

采集的樟芝孢子样品, 用 pH 8.0 的 TE 缓冲液洗涤至上清液澄清后, 液氮研磨成细粉。根据文献[9-10]采用 TCA/丙酮沉淀法提取樟芝孢子的总蛋白, 以 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。利用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取樟芝孢子中的总 RNA, 并以 NanoDrop 2000C 分光光度计对总 RNA 浓度及质量进行检测。

### 1.4 双向电泳及质谱鉴定

参照文献[9-10]的操作方法, 每个样品的蛋白上样量为 450 μg, 胶条被动水化 16 h, 设置聚焦程序为: 100 V 40 min, 250 V 1.0 h, 500 V 1.2 h, 1000 V 1.5 h, 5000 V 2.0 h, 10000 V 2.0 h, 10000 V 8.5 h, 聚焦完毕, 依次用平衡液 I 及平衡液 II 平

衡 15 min。将 IPG 胶条转移至 SDS 胶面上,以琼脂糖覆盖,进行第二向 SDS-PAGE 电泳。程序为: 2 W/gel 2 h; 16 W/gel 4 h。每个样品 3 个生物学重复,电泳实验重复 3 次。将凝胶以固定液固定 2 h,清洗固定液,加入适量 G-250 染色液,过夜染色,用 ddH<sub>2</sub>O 漂洗至蛋白点清晰,用扫描仪采集图像。每个样品分离效果较好的 3 张图像用 PDQuest 8.0 软件进行蛋白点分析,将差异蛋白点(较对照组变化 2 倍以上的点)从凝胶上切下后进行质谱分析。获得的肽段信息分别与樟芝基因组数据库<sup>[8]</sup>及 NCBI 的樟芝 EST 序列数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>)进行匹配,蛋白得分 $\geq 35$ 被认为匹配成功。

### 1.5 生物信息学分析

采用查阅文献和检索 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的方式,收集与孢子萌发功能相关的蛋白序列,以孢子萌发功能相关蛋白的 FASTA 序列建立本地数据库。运用 BioEdit 将本地数据库与双向电泳鉴定得到蛋白序列进行比对, $E$  值 $\leq 10^{-8}$ 被认为匹配成功,获得樟芝孢子萌发相关蛋白点信息。未匹配上孢子萌发相关蛋白的序列进行 BLASTp 分析,从而获得蛋白功能信

息。选取与孢子萌发相关的差异蛋白点,根据 NCBI 的樟芝 EST 序列及樟芝全基因组和氨基酸序列获得对应的 cDNA 序列,运用 Beacon Designer 7 设计 RT-qPCR 引物,引物序列见表 1。

### 1.6 RT-qPCR

通过分光光度计检测总 RNA 浓度和质量( $1.8 < OD_{260}/OD_{280} < 2.0$ )并稀释到适宜浓度,用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行逆转录,获得 cDNA 模板。RT-qPCR 反应体系为: SYBR 染料 8.5  $\mu$ L, 正向引物 0.5  $\mu$ L, 反向引物 0.5  $\mu$ L, cDNA 模板 1.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.0  $\mu$ L; 反应程序为: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 45 个循环。以樟芝 18 rRNA 基因序列为内参,未萌发的樟芝孢子样品为对照组,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因的转录水平,每个样品做 3 个重复。

## 2 结果和分析

### 2.1 樟芝节孢子萌发率测定

摇瓶培养 0 h 及 24 h 樟芝孢子如图 1 所示。未萌发节孢子呈短棒状,大小约为  $\Phi 3 \mu\text{m} \times (4-10) \mu\text{m}$ 。随着萌发的进行,孢子长度逐渐增加。培养 24 h 樟芝孢子样品萌发率为 36.17%。

表 1. 实时荧光定量 PCR 引物  
Table 1. Primers used for RT-qPCR

Gene names	Forwards (5'→3')	Reverses (5'→3')	Sizes/bp
<i>gerO</i>	AGAAGTTGAGGAGCAGAT	CACATTGAGCAGTTAGCA	92
<i>ubc1</i>	TTCGCACTGACTCTTATC	GCTCGTTCTCCTTGATG	99
<i>cat-1</i>	GCAGATTCATTCATCAAG	TACCATAGTCAGGATTATCAC	89
<i>chaperonin</i>	GAATCGTCGGTCATTGT	TTGCTCGCATCATATCC	80
<i>tyrosine-p</i>	ATGCTATCCTGCGTATTG	GTGGTGTGGAAGTGGTA	91
<i>snf1</i>	CACCTCCGAAGCAACTC	TTCTCCACACCCTCCAT	100
<i>chiA</i>	CAGAGCACCGAGCAATG	GCGAATGAGCACGATGT	90
<i>cas2</i>	GCAGACGACAACATCCT	GTTCTCCTCGACGAGCT	228
<i>sfaD</i>	ACCTGTGCCTACTCACCATCC	CTTGACATTGTTGCCTTCCTCG	102
<i>fad5</i>	GTCCAGGTCAAGAAGAAG	GATAACAGGTCCGTATGC	117
18S rRNA	GCTGGCTCGCTGGCTTCTTAG	CGCTGGCTCTGTCAAGTGTAG	123

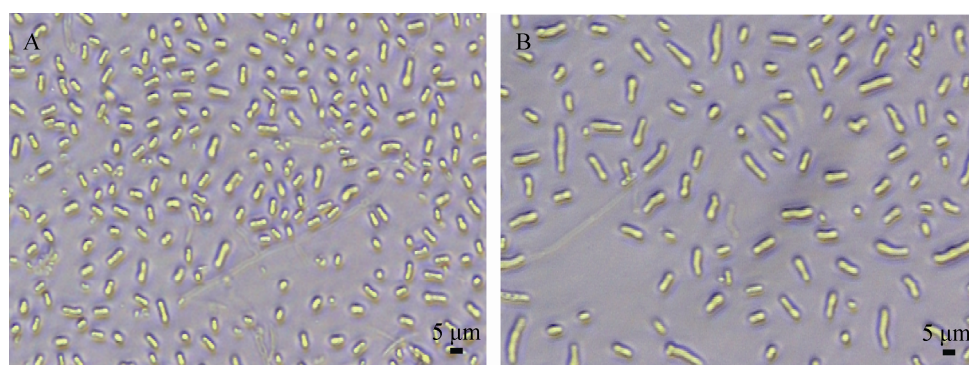


图 1. 培养 0 h (A) 和 24 h (B) 的樟芝孢子形态

Figure 1. Morphology of *Antrodia camphorata* arthroconidia after 0 h (A) and 24 h (B) of incubation.

## 2.2 双向电泳图

双向电泳结束, 获得不同萌发状态下的樟芝孢子总蛋白分离图谱(图 2)。其中, 0 h 樟芝孢子样品分离得到 466 个蛋白点, 培养 24 h 樟芝孢子样品分离得到 535 个蛋白点, 以 0 h 樟芝孢子样品为对照组, 分析得到 32 个差异蛋白点, 其中培养 24 h 孢子样品中有 25 个蛋白上调, 7 个蛋白下调, 对差异蛋白点进行质谱鉴定, 其中 24 个蛋白点鉴定成功。

将质谱获得肽段信息用 Mascot 软件在樟芝全

基因组序列及 NCBI 提供的全部樟芝 EST 序列进行搜库, 获得 24 个蛋白点氨基酸序列信息。运用 BioEdit 软件将获得蛋白点氨基酸序列与建立的本地数据库进行比对, 获得樟芝孢子萌发相关基因 10 个, 分别为: *gerO*、*ubc1*、*cat-1*、*snf1*、*cas2*、*sfaD*、*chaperonin*、*fad5*、*tyrosine-P* 及 *chiA* (表 2)。通过 BLASTp 分析获得其余 14 个蛋白点的功能信息(表 2), 主要涉及能量代谢和遗传物质传递, 包含酶类, 如丙酮酸脱羧酶、烯醇化酶、锰超氧化

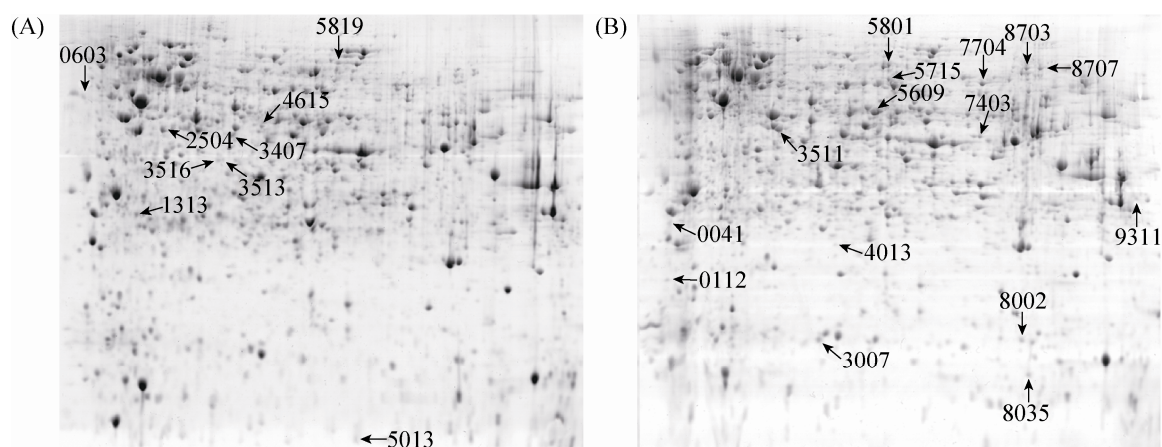


图 2. 培养 0 h (A) 和 24 h (B) 樟芝孢子蛋白双向电泳分离图谱

Figure 2. 2-DE maps and identification spots of the proteins extracted from arthroconidia after 0 h (A) and 24 h (B) of incubation.

表 2. 差异蛋白的质谱分析结果

Table 2. Mass spectrometric analysis of differentially expressed proteins

Gene name	Protein ID	Genome ID	Accession No.	Gene description	E-value
<i>gerO</i>	3513	ACg007192	CAC17476.1	Alpha tubulin	1e-102
<i>ubc1</i>	3007	ACg007554	CAA39812.1	Ubiquitin-conjugating enzyme	2e-032
<i>cat-1</i>	7704	ACg008952	XP_956234.1	Catalase-1	2e-089
<i>chaperonin</i>	3511	ACg005546	XP_007371274.1	Chaperonin GroL	0
<i>tyrosine-p</i>	4013	ACg000101	O13632.1	Tyrosine-protein phosphatase	1e-094
<i>snf1</i>	3516	ACg008567	XP_011318803.1	Carbon catabolite derepressing	1e-019
<i>chiA</i>	7403	ACg003863	BAA36223.1	Chitinase	1e-008
<i>cas2</i>	0112	ACg002103	CAT00781.1	Beta class carbonic anhydrase	2e-027
<i>sfaD</i>	5715	ACg002995	AAC33436.1	G-protein beta subunit	1e-157
<i>fad5</i>	8707	ACg003460	AAC72755.1	Delta-5 fatty acid desaturase	1e-011
-	0041	ACg001210	KZT54586.1	Galactose-1-phosphate uridyl transferase	8e-23
-	0603	ACg000543	OCH88307.1	RNA-binding domain-containing protein	7e-152
-	1313	ACg006078	OJT10567.1	Ran-specific GTPase-activating protein	1e-098
-	2504	ACg000216	EMD41187.1	Acyl-CoA dehydrogenase mitochondrial	0
-	3407	ACg008919	KYQ38588.1	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	0
-	4615	ACg004531	KZT73975.1	Pyruvate decarboxylase	0
-	5013	ACg008396	KZT65455.1	Nucleoside diphosphate kinase	7e-104
-	5609	ACg003161	KZT01185.1	Enolase	0
-	5801	ACg002270	KZT07582.1	Thiamin diphosphate-binding protein	0
-	5819	ACg006349	EMD34998.1	Aconitate hydratase	0
-	8002	ACg003890	OKY66263.1	Cytochrome c oxidase polypeptide 5	1e-83
-	8035	ACg006010	AAK82369.1	Manganese superoxide dismutase	2e-128
-	8703	ACg000739	KZT07931.1	ATP-dependent DNA helicase	0
-	9311	ACg007343	OCH93422.1	Polyadenylate binding protein	0

物歧化酶、ATP依赖的DNA解旋酶及磷酸激酶等，其次包含一些结合蛋白，如RNA结构域结合蛋白和多聚腺苷酸结合蛋白等。

### 2.3 RT-qPCR 分析

根据蛋白序列及功能分析结果，将与樟芝孢子萌发相关的10个基因，根据其cDNA序列设计引物进行RT-qPCR，验证萌发相关基因的转录表达水平在孢子萌发过程中的变化(图3)。结果表明，6个萌发相关基因(*gerO*、*ubc1*、*cat-1*、*chaperonin*、*fad5*、*chiA*)在24 h mRNA表达水平显著上调，而基因*snf1*、*cas2*、*sfaD*及*tyrosine-p*的表达水平下调。

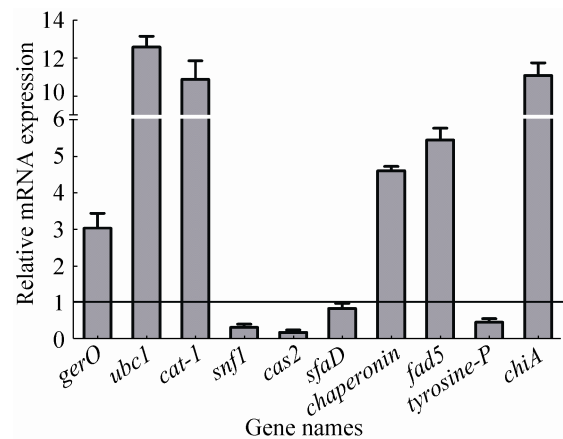


图 3. 培养 24 h 樟芝孢子萌发相关基因表达量

Figure 3. The expression levels of the relative genes of *Antrodia camphorata* arthroconidia at 24 h. Expression levels of germination-related genes in the control group (*Antrodia camphorata* arthroconidia at 0 h) is 1.

### 3 讨论

本实验将不同萌发状态下的樟芝孢子进行双向电泳及生物信息学分析, 获得 10 个樟芝孢子萌发相关功能基因(*gerO*、*ubc1*、*cat-1*、*snf1*、*cas2*、*sfaD*、*chaperonin*、*fad5*、*tyrosine-P*、*chiA*)。其中, SfaD 为 G 蛋白  $\beta$  亚基, 与 GanB(G $\alpha$ )及 GpgA(G $\gamma$ )亚基组成三聚体, 能应答葡萄糖信号, 并通过 cAMP/PKA 信号通路控制构巢曲霉分生孢子萌发, 且 SfaD、GpgA 亚基对 GanB 的活化至关重要<sup>[11]</sup>。基因 *gerO* 编码  $\alpha$ -微管蛋白, 在萌发状态蛋白表达量升高。据 Hu 等报道<sup>[12]</sup>, 同源基因 FaTUA1 及 FaTUA2 编码  $\alpha$ -微管蛋白, FaTUA2 突变体孢子萌发率下降, 在 FaTUA2 突变体过表达 FaTUA1 基因能部分恢复孢子萌发率, 说明此对同源基因具有部分功能互换并与孢子萌发息息相关。Tyrosine-p 能对粘菌肌动蛋白的酪氨酸进行磷酸化, 并影响肌动蛋白在细胞内的定位, 而休眠包囊萌发和肌动蛋白磷酸化之间具有一定的关联性<sup>[13]</sup>。同时, 本实验检测到分子伴侣 Chaperonin GroL, 据 Keiko Saegusa 等报道, 分子伴侣为微管蛋白和肌动蛋白的折叠负责<sup>[14]</sup>。另外, 检测到的基因 *snf1*、*fad5* 及 *cas2* 与能量代谢相关。 $\Delta$ -5 脂肪酸脱氢酶基因在高山被孢霉孢子萌发期间大量表达, 为花生四烯酸的利用提供物质基础<sup>[15]</sup>。Snf1 在调节葡萄糖阻遏基因转录方面发挥着重要作用, 该基因突变体对碳源利用率降低并延迟孢子萌发进程<sup>[16]</sup>。Cas2 在真菌中为线粒体碳酸酐酶, 可催化二氧化碳和碳酸氢盐互变, 调节细胞器内 pH, 辅助能量代谢正常进行, 在大孢粪壳菌中 Cas2 突变体导致孢子萌发延迟<sup>[17]</sup>。在构巢曲霉中, 几丁质酶 (Chitinase)在孢子萌发期间大量表达, 通过锚定在菌丝的顶点、分支点和孢子萌发管并合成几丁质使真菌细胞壁重构或成熟<sup>[18]</sup>。Cat-1 为过氧化氢解

毒酶, 其缺失突变体孢子萌发率降低, 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的敏感性高于野生型<sup>[19]</sup>。Ubc1 泛素结合酶也在大豆疫霉游动孢子萌发期间表达量上调<sup>[20]</sup>。

针对 10 个孢子萌发相关功能基因, 采用 RT-qPCR 技术对其转录水平进行了分析, 发现其中 8 个基因的表达水平(*gerO*、*ubc1*、*cat-1*、*cas2*、*chaperonin*、*fad5*、*tyrosine-P*、*chiA*)在萌发 24 h 时上调, 而 *snf1* 和 *sfaD* 的表达水平在萌发 24 h 时下调。*gerO*、*ubc1*、*cat-1*、*chaperonin*、*fad5* 及 *chiA* 的蛋白及 mRNA 表达量在孢子萌发期间表达量均上调, 这与文献报道一致<sup>[12,14-15,18-20]</sup>。另外, *cas2* 及 *tyrosine-P* 蛋白表达水平上调, 但 mRNA 表达水平却下调。据文献报道, RNA 的转录与蛋白的翻译不一定同时到达峰值, 其关联性甚至低于 50%<sup>[21]</sup>, 蛋白质到达峰值时, 可能 RNA 的转录达到谷底(存在 auto feedback loop)。根据本研究蛋白及转录数据结果, 推测外界营养条件改变可刺激受体偶联的 GanB(G $\alpha$ )、SfaD(G $\beta$ )及 GpgA(G $\gamma$ )组成三聚体, 并通过 cAMP/PKA 途径调节孢子萌发。脂肪酸脱氢酶 *fad5* 可利用预存的脂肪酸为孢子萌发提供能量, 而线粒体中的碳酸酐酶可调节能量代谢产生的细胞器 pH 异常, 过氧化氢酶可确保各种代谢反应产生的过氧化氢的清除, 从而确保萌发过程顺利进行。在孢子萌发过程中, 参与运动的微管蛋白和构成细胞成分的蛋白大量表达, 如 *gerO* 编码的微管蛋白、负责微管蛋白折叠的分子伴侣及 *chiA* 编码的用于构成细胞壁的几丁质酶, 这些蛋白的表达为萌发过程中孢子增长及孢子结构的变化奠定了物质基础。

### 参考文献

- [1] Ao ZH, Xu ZH, Lu ZM, Xu HY, Zhang XJ, Dou WF. Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and its potential in



- treating liver diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 2009, 121(2): 194–212.
- [2] Wu H, Pan CL, Yao YC, Chang SS, Li SL, Wu TF. Proteomic analysis of the effect of *Antrodia camphorata* extract on human lung cancer A549 cell. *Proteomics*, 2006, 6(3): 826–835.
- [3] Geethangili M, Tzeng YM. Review of pharmacological effects of *Antrodia camphorata* and its bioactive compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 2011: Article ID 212641.
- [4] Lu MC, El-Shazly M, Wu TY, Du YC, Chang TT, Chen CF, Hsu YM, Lai KH, Chiu CP, Chang FR, Wu YC. Recent research and development of *Antrodia cinnamomea*. *Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 139(2): 124–156.
- [5] Geng Y, He Z, Lu ZM, Xu HY, Xu GH, Shi JS, Xu ZH. *Antrodia camphorata* ATCC 200183 sporulates asexually in submerged culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(7): 2851–2858.
- [6] Lu ZM, He Z, Li HX, Gong JS, Geng Y, Xu HY, Xu GH, Shi JS, Xu ZH. Modified arthroconidial inoculation method for the efficient fermentation of *Antrodia camphorata* ATCC 200183. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 87: 41–49.
- [7] Li HX, Lu ZM, Geng Y, Gong JS, Zhang XJ, Shi JS, Xu ZH, Ma YH. Efficient production of bioactive metabolites from *Antrodia camphorata* ATCC 200183 by asexual reproduction-based repeated batch fermentation. *Bioresource Technology*, 2015, 194: 334–343.
- [8] Lu MYJ, Fan WL, Wang WF, Chen T, Tang YC, Chu FH, Chang TT, Wang SY, Li MY, Chen YH, Lin ZS, Yang KJ, Chen SM, Teng YC, Lin YL, Shaw JF, Wang TF, Li WH. Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(44): E4743–E4752.
- [9] Lin YL, Wen TN, Chang ST, Chu FH. Proteomic analysis of differently cultured endemic medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang et W.N. Chou from Taiwan. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2011, 13(5): 473–481.
- [10] Xu WN, Wang JJ, Li Q. Comparative proteome and transcriptome analysis of lager brewer's yeast in the autolysis process. *FEMS Yeast Research*, 2014, 14(8): 1273–1285.
- [11] Lafon A, Seo JA, Han KH, Yu JH, D'Enfert C. The heterotrimeric G-protein GanB( $\alpha$ )-SfaD( $\beta$ )-GpgA( $\gamma$ ) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 2005, 171(1): 71–80.
- [12] Hu WQ, Zhang XP, Chen X, Zheng JW, Yin YY, Ma ZH.  $\alpha$ 1-Tubulin FaTuA1 plays crucial roles in vegetative growth and conidiation in *Fusarium asiaticum*. *Research in Microbiology*, 2015, 166(3): 132–142.
- [13] Budniak A, O'Daya DH. Tyrosine phosphorylation of actin during microcyst formation and germination in *Polysphondylium pallidum*. *Protist*, 2011, 162(3): 490–502.
- [14] Saegusa K, Sato M, Sato K, Nakajima-Shimada J, Harada A, Sato K. *Caenorhabditis elegans* chaperonin CCT/TRiC is required for actin and tubulin biogenesis and microvillus formation in intestinal epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2014, 25(20): 3095–3104.
- [15] Lounds C, Eagles J, Carter AT, MacKenzie DA, Archer DB. Spore germination in *Mortierella alpina* is associated with a transient depletion of arachidonic acid and induction of fatty acid desaturase gene expression. *Archives of Microbiology*, 2007, 188(4): 299–305.
- [16] Lee SH, Lee J, Lee S, Park EH, Kim KW, Kim MD, Yun SH, Lee YW. *GzSNF1* is required for normal sexual and asexual development in the ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryotic Cell*, 2009, 8(1): 116–127.
- [17] Elleuche S, Pöggeler S.  $\beta$ -Carbonic anhydrases play a role in fruiting body development and ascospore germination in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*. *PLoS ONE*, 2009, 4(4): e5177.
- [18] Yamazaki H, Tanaka A, Kaneko J, Ohta A, Horiuchi H. *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(6): 963–972.
- [19] Wang NY, Yoshida Y, Hasunuma K. Loss of Catalase-1 (Cat-1) results in decreased conidial viability enhanced by exposure to light in *Neurospora crassa*. *Molecular Genetics and Genomics*, 2007, 277(1): 13–22.
- [20] Li YG, Yang MX, Li Y, Liu WW, Wen JZ, Li YH. Differential gene and protein expression in soybean at early stages of incompatible interaction with *Phytophthora sojae*. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(6): 902–910.
- [21] King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 2001, 286(18): 2280–2288.

# Analysis of germination-related proteins in *Antrodia camphorata* arthroconidia by two-dimensional electrophoresis and mass spectrum

Qing Zhu, Zhenming Lu<sup>\*</sup>, Huaxiang Li, Jinsong Shi, Zhenghong Xu<sup>\*</sup>

National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Germination-related proteins in *Antrodia camphorata* arthroconidia were analyzed by two-dimensional gel electrophoresis (2DE), mass spectrum, and real time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR). [Methods] We used 2DE to analyze total proteins of *Antrodia camphorata* arthroconidia after 0 h and 24 h of incubation. We identified differential proteins by PDQuest software and MALDI-TOF-MS. Then, we obtained germination-related proteins in *Antrodia camphorata* arthroconidia by matching the amino acid sequences of identified proteins to a local protein database. Finally, we used RT-qPCR to quantify relative expression levels of germination-related genes. [Results] A total of 32 differential expressed proteins, of which 25 up-regulated and 7 down-regulated, existed between non-germinated (0 h) and germinated (24 h) arthroconidia. Among these differential proteins, 24 proteins were successfully identified, and 10 proteins were involved in arthroconidial germination including GerO, Ubc1, Cat-1, Snf1, Cas2, SfaD, Chaperonin, Fad5, Tyrosine-P, and ChiA. [Conclusion] The results provide a theoretical basis for understanding of molecular mechanisms of arthroconial germination of *Antrodia camphorata*.

**Keywords:** *Antrodia camphorata*, arthroconidial germination, 2D gel electrophoresis, RT-qPCR

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31401931)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: Zhenming Lu, zmlu@jiangnan.edu.cn; Zhenghong Xu, zhenghxu@jiangnan.edu.cn

Received: 27 February 2017; Revised: 29 March 2017; Published online: 12 May 2017