

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(10):1171-1177; 4 October 2014  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.10.009

## 草菇谷胱甘肽 S-转移酶编码基因 (*vv-gto1*) 的序列分析及其差异表达

严俊杰, 郭丽礚, 赵静静, 谢宝贵\*

福建农林大学菌物研究中心, 福建 福州 350002

**摘要:**【目的】通过对草菇组学数据的分析, 获得一个谷胱甘肽 S-转移酶 (GSTs) 编码基因 (*vv-gto1*), 对其基因结构、序列特征及表达情况进行分析, 探索 GSTs 在食用菌生长发育过程中的作用机制, 并为其他食用菌 GSTs 编码基因的发现提供依据。【方法】应用 ZOOM 软件将基因组与转录组的测序读段 (reads) 与基因组拼接序列进行定位确定基因全长及其序列准确性, 并对基因结构进行可视化分析。采用 MEGA 5.1 进行多序列比对及进化树分析, 对草菇 GTO1 进行功能归类及同其他真菌的亲缘关系分析。结合表达谱、蛋白质组数据分析该基因在草菇不同生长时期的差异表达, 并应用荧光定量 PCR 进行验证。【结果】*vv-gto1* 全长 2083bp, 含有 11 个外显子、10 个内含子, 编码 356 个氨基酸; 5' 端非翻译区长度为 305bp、包含 1 个内含子区域, 3' 端非翻译区为 86bp; RNA 加工过程中有两个内含子存在保留现象, 由内含子保留所形成的转录本均无法翻译形成正确的保守功能域。*vv-gto1* 全长序列都获得超过 50 个 reads 的准确定位, 证明该区段的基因组测序及组装结果正确可靠。进化树结果显示, 草菇 GTO1 属于 Omega 类第 I 小类谷胱甘肽 S-转移酶, 与黄孢原毛平革菌的 GTO1、GTO2 亲缘关系最近。数字基因表达谱、荧光定量 PCR 及蛋白质组的分析结果表明, *vv-gto1* 在异核体菌丝 H1521 的表达量最高。【结论】本研究首次在草菇中获得一个 Omega 类谷胱甘肽 S-转移酶编码基因, 该基因在异核体菌丝生物学功能的行使过程中可能起到重要作用, 同时也暗示草菇异核体菌丝具备较强的抗逆性。另外, *vv-gto1* 可以通过形成不同的可变剪接体来调节基因的转录和翻译, 最终影响蛋白质的功能行使。

**关键词:** 异核体, 谷胱甘肽 S-转移酶编码基因, 表达谱, 定量 PCR, 蛋白质组

**中图分类号:** Q814      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 10-1171-07

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferases, GSTs, E. C. 2.5.1.18) 广泛存在于动植物及微生物的各种组织中, 是一类多功能超家族酶, 参与细胞解

毒和对机体有害物质的防御等生物学过程, 尤其在应激低温、干旱等非生物胁迫方面发挥关键作用, 成为了研究的热点<sup>[1-3]</sup>。

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS24); 国家“973 项目” (2014CB138302)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-591-83789277; E-mail: mrefafu@163.com

作者简介: 严俊杰 (1989 -), 男, 福建莆田人, 硕士研究生, 主要从事食用菌子实体形态发育及抗逆性机制研究。E-mail: junjie017@163.com

收稿日期: 2014-01-07; 修回日期: 2014-04-04

真菌 GSTs 的研究相对较晚,虽然在许多真菌中都有发现 GSTs 基因,但对于 GSTs 在真菌细胞中的功能及作用机制仍不清楚<sup>[4]</sup>。Morel 等<sup>[5]</sup>利用已有的基因组数据,通过同源比对及进化分析等方法将 19 种子囊菌、8 种担子菌以及 2 种接合菌的 GSTs 超家族蛋白分为 Omega、GTT1、GTT2、Ure2p、MAK16、EFB $\gamma$  和 GTE 等七大类。其中 *Schizosaccharomyces pombe* 仅发现 7 个 GSTs,而在褐腐菌 *Postia placenta* 中发现 46 个分属于所有 7 类。

草菇 *Volvariella volvacea* 作为一种重要的热带亚热带菇类,是世界上第三大栽培食用菌,具有很高的营养价值和经济价值<sup>[6]</sup>。但是草菇为高温型真菌,低温条件下无法正常生长结实,甚至会出现低温自溶现象,这对草菇产业的推广及后期保鲜造成很大的障碍。对草菇 GSTs 的研究将为探索草菇低温自溶机制及耐低温菌种的选育提供重要的理论依据。

本实验室在测得草菇 PYd21 (从头测序)及 PYd15 (重测序)的基因组序列之后,对 PYd15、PYd21、H1521 (PYd15 与 PYd21 的杂交菌株)的菌丝体及 H1521 出菇后形成的原基 (PR)、钮扣期菌柄 (BU)、蛋形期菌柄 (EG)、伸长期菌柄 (EL) 和成熟期菌柄 (MA) 8 个组织样本进行了转录组 (混合测序)、数字基因表达谱 (Digital gene expression profiling, DGE) 及蛋白质组 (iTRAQ) 测定,这为草菇 GSTs 的深入研究提供了充足的基础数据。本研究在对草菇基因组进行注释时共获得 20 个 GSTs 编码基因,进一步对各个基因的表达量进行分析发现 *vv-gto1* 在异核体时期呈现特异表达,为更好的了解其生物学功能,本文通过生物信息学方法及实时荧光定量 PCR 对该基因的序列特征及其在草菇不同生长阶段的差异表达进行了系统的分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

SPX-250B-Z 型生化培养箱,上海博讯实业有限公司;离心机,美国 Thermo 公司;CFX96<sup>TM</sup> 型荧光定量 PCR 仪,美国 BIO-RAD 公司;E. Z. N. A. <sup>TM</sup> Plant RNA Kit 试剂盒,美国 Omega Bio-Tek 公司;TransScript All-in-one First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One Step gDNA Removal) 试剂

盒,北京全式金公司;TransStart Top Green qPCR SuperMix,北京全式金公司。

### 1.2 供试菌株及培养方法

PYd15、PYd21 为福建主栽品种“屏优一号”分离获得的 2 个无法正常出菇的单孢菌株,两者的杂交菌株 H1521 可正常出菇,以上菌种均由福建省食用菌种质资源保藏与管理中心提供。

PYd15、PYd21 及 H1521 的菌丝定量接种于液体 PDA 培养基上,35℃ 避光静置培养,待菌丝长满液体表层后收集并置于液氮中保藏。H1521 按照 Chen<sup>[7]</sup>的方法进行出菇试验,并按照 Tao<sup>[8]</sup>的方法采集原基、钮扣期菌柄、蛋形期菌柄、伸长期菌柄和成熟期菌柄置于液氮中保藏。

### 1.3 *vv-gto1* 序列的准确性验证及结构分析

**1.3.1 *vv-gto1* 全长序列的获取:**本实验室委托深圳华大基因研究院采用 Solexa 测序法对 PYd21 进行基因组从头测序 (De novo sequencing),通过基因预测及注释获得 *vv-gto1* 序列。以 *vv-gto1* 序列及其上下游各 2000bp 作为参考序列 (reference sequence),用 ZOOM 软件<sup>[9]</sup>将转录组测序所得的读段 (reads) 采用双末端 (paired end) 的方法与之进行定位,确定基因的转录起始及终止位点,则该片段即为验证后的基因全长序列。软件参数设置如下:相邻 paired reads 距离设为 1 - 2000bp,数据格式设为 Illumina type,允许错配碱基数设为 40,其他参数采用默认值。

**1.3.2 *vv-gto1* 全长序列的准确性验证:**以验证后的基因全长序列及其上下游各 500bp 为模板 (reference),采用 ZOOM 软件将基因组测所得 500bp reads 库中的 reads 采用 paired end 的方法与之对应,软件参数设定如下:相邻 paired reads 距离设为 1 - 1000bp,数据格式设为 Illumina type,允许错配碱基数设为 0,其他参数采用默认值。如果该基因全长均得到 reads 覆盖则证明序列是准确的。如出现部分参考序列没有 reads 匹配,则需要进行 Sanger 法测序验证。

**1.3.3 *vv-gto1* 序列结构分析:**参照刘朋虎等<sup>[10]</sup>的方法,以 *vv-gto1* 序列及其上下游各 2000bp 作为参考序列,通过 ZOOM 软件将转录组测序所得的 reads 采用 paired end 的方法与之进行定位,并结合 GT-AG 原则确定内含子、外显子及可变剪接位点,软件参数设置同 1.3.1。将去除全部内含子后的 *vv-gto1*

序列提交 ORF Finder, 确定基因的开放阅读框 (ORF)、5' 端非翻译区 (5' UTR)、3' 端非翻译区 (3' UTR)。

#### 1.4 草菇 GTO1 的序列比对及进化分析

将草菇 GTO1 的氨基酸序列提交到 NCBI 进行比对, 搜索其所含有的保守功能域, 并下载相关序列应用 MEGA 5.1<sup>[11]</sup> 进行多序列比对及进化树分析。

#### 1.5 *vv-gto1* 转录水平的差异表达分析

基于草菇数字基因表达谱数据, 应用 ZOOM 软件将 8 个样品的 Clean Tag 与 *vv-gto1* 进行定位, 参照刘朋虎等<sup>[10]</sup> 进行表达量标准化及差异表达分析, 获得 *vv-gto1* 在不同生长阶段的表达模式。

为了验证表达谱数据, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测基因的相对表达量。样品总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成分别采用 E. Z. N. A.™ Plant RNA Kit 试剂盒和 TransScript All-in-one First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (One Step gDNA Removeal) 试剂盒, 操作均按照说明书进行。

以草菇甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 为内参基因, 应用 Primer 6.0 设计定量 PCR 引物并委托上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。实时荧光 PCR 采用定量试剂 TransStart Top Green qPCR SuperMix, 在 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 反应体系及程序按照定量荧光定量试剂盒的说明书进行, qPCR 采用两步法进行, 以提高扩增的特异性, 退火温度设为 60℃, 循环数设为 40。每个反应做 3 个平行试验, 用 H1521 的基因表达量为参比, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法<sup>[12]</sup> 计算基因的相对表达量。

表 1. 荧光实时定量 PCR 所使用的引物

Table 1. Primers used for qRT-PCR in this study

Primer	Sequence (5'→3')
GAPDH-F	ATTGGCGTGGTGGTCGTAG
GAPDH-R	ACGGAAACATCAAGGGTAGGG
GTO1-F	TGTACTGGACTAACGACGCATTC
GTO1-R	GCCGACAGGAACAATTTGAGTG

#### 1.6 *vv-gto1* 翻译水平的差异表达分析

草菇蛋白质组数据采用 iTRAQ 结合 2D LC-MS/MS 技术进行测定, 具体过程参照刘靖宇等<sup>[13]</sup> 的方法。以草菇基因组序列预测及翻译获得的氨基酸序列为模板, 应用 PEAKS studio6.0 软件<sup>[14]</sup>, 将带有不同 iTRAQ 标记的肽段进行匹配, 并获得可视化的蛋白相对表达量。具体参数设置如下: Parent

Mass Error Tolerance: 20.0 ppm, Fragment Mass Error Tolerance: 0.5 Da, Precursor Mass Search Type: monoisotopic, Enzyme: Trypsin, Max Missed Cleavages: 3, Non-specific Cleavage: one, Fixed Modifications: iTRAQ 8plex (K, N-term), Variable Modifications: Oxidation (M), Max variable PTM per peptide: 3, peptides FDR ≤ 0.05, protein -logP ≥ 20, De Novo TLC ≥ 3, De Novo ALC ≥ 50%。

## 2 结果和分析

### 2.1 *vv-gto1* 序列准确性验证及结构分析

**2.1.1 *vv-gto1* 序列的完整性验证:** 根据基因注释结果, PYd21 的 *vv-gto1* 序列位于 scaffold 67 上 4454 - 5923bp 之间, 全长 1470bp。经过转录组 reads 定位后获得 *vv-gto1* 序列的实际全长为 2083bp, 位于 scaffold 67 上 3926 - 6008bp 之间, 与预测序列相比长 513bp。但差异片段主要为 5' UTR 区域, 对表达谱及蛋白质组的定位结果影响较小, 将表达谱 Tag 及蛋白质组的肽段与校正后的序列进行重新定位, 发现表达模式与预测结果相一致。

**2.1.2 *vv-gto1* 序列的准确性验证:** ZOOM 软件定位结果显示 (图 1), *vv-gto1* 全长序列均为获得基因组 reads 的覆盖, 最低覆盖 reads 数为 53 条。说明该区段的基因组测序及组装结果正确可靠, 序列可以用于下一步的相关分析。将验证后的核酸序列提交到 GenBank, 获得登录号为 KF996272。

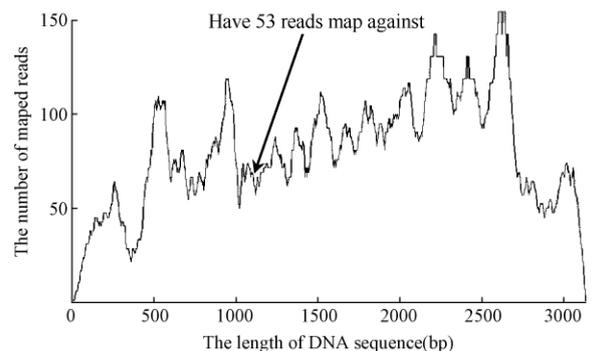


图 1. 利用 ZOOM 软件将基因组 reads 与 *vv-gto1* 序列的匹配情况

Figure 1. The mapping result of Genome sequence raw reads and *vv-gto1* sequence by ZOOM software.

**2.1.3 *vv-gto1* 的基因结构分析:** 如图 2 所示, *vv-gto1* 有 11 个外显子, 编号为 E1-E11; 10 个内含子,

编号为 II-110, 长度分别为 52、54、54、77、51、61、53、98、57、116, 其中内含子 18 和 19 在 RNA 加工过程中存在保留的可变剪接方式。将 *vv-gto1* 序列去除所有内含子后提交 NCBI 进行 ORF Finder。结果表

明:*vv-gto1* 开放阅读框 (ORF) 全长 1071bp, 编码 356 个氨基酸; 5' 端非翻译区 (5' UTR) 长度为 305bp, 包含 1 个内含子区域; 3' 端非翻译区 (3' UTR) 全长 86bp。

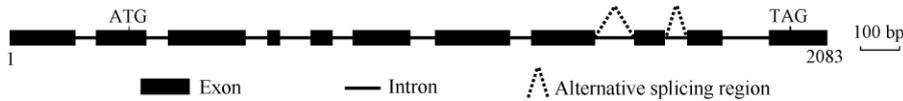


图 2. 草菇 *vv-gto1* 基因结构示意图

Figure 2. Schematic map of the *vv-gto1* gene of *Volvariella volvacea*.

## 2.2 草菇 GTO1 氨基酸序列和系统进化分析

将翻译获得的草菇 GTO1 氨基酸序列提交到 NCBI 数据库, 应用 Blastp 程序进行同源性比对, 发现该序列含有 GST\_N\_2 和 GST\_C\_Omega\_like 的保守结构域, 与植物内生病原真菌 *Moniliophthora roeri* 的谷胱甘肽 S-转移酶 ESK92436 相似度最高, 具有 68% 的相似性, e-value 为  $2e-154$ ; 与灰盖鬼伞 *Coprinus cinereus* 的谷胱甘肽 S-转移酶 XP\_001832456 具有 67% 相似性, e-value 为  $2e-150$ ; 其中 N 端除保守的 GST\_N\_2 结构域外还有一段 60-70 个氨基酸残基保守性较差的独特扩展区域, 这与 Omega 类谷胱甘肽 S-转移酶的序列特征相一致<sup>[15]</sup>。

参照 Morel 等<sup>[5]</sup>对 GSTs 超家族的分类方法, 下载酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、灰盖鬼伞 (*C. cinereus*)、黑粉菌 (*Ustilago maydis*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 等的谷胱甘肽 S-转移酶氨基酸序列与草菇 GTO1 采用最大似然法 (Maximum Likelihood) 构建系统进化树。(图 3)

进化树共有 3 个进化分支, 分别为 GTOI、GTOII 和 GTOIII 3 个亚类, 草菇 GTO1 被归到 GTOI 分支上, 与黄孢原毛平革菌的 GTO1 (Phchr126388) 和 GTO2 (EU791894) 亲缘关系最近。暗示它们可能具备相似的生物学功能。

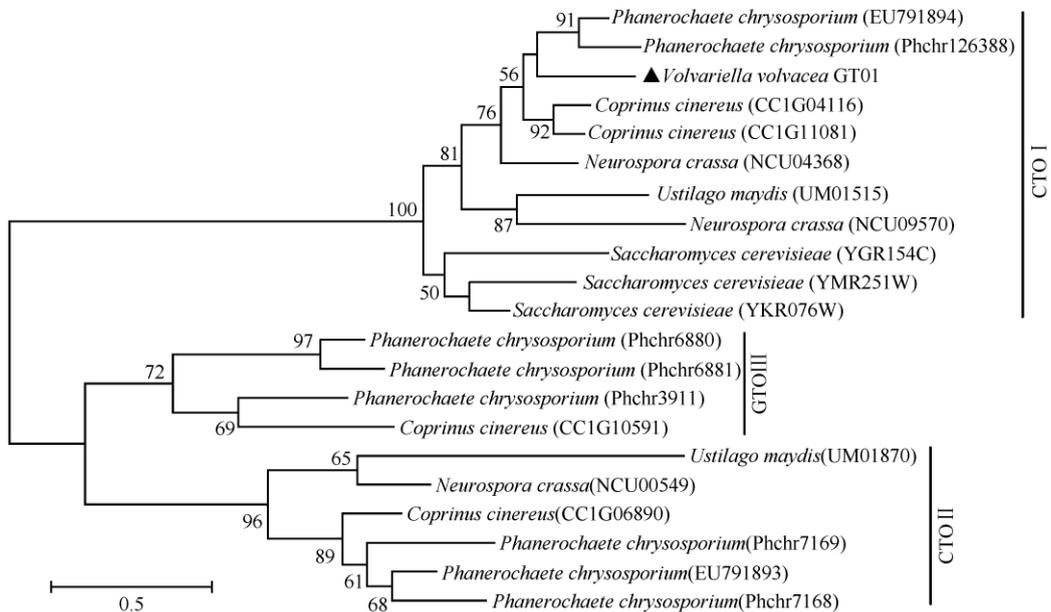


图 3. 部分 Omega 类真菌谷胱甘肽 S-转移酶的进化分析

Figure 3. Phylogenetic analysis of some Omega classes GSTs in fungi. Numbers in parentheses represent the sequences ID number. In detail: EU791893 and EU791894 are the ID numbers of GenBank, and the others are that of Genome. *Phanerochaete chrysosporium* Genome sequences were downloaded from JGI (<http://genomeportal.jgi-psf.org>), the others were downloaded from Broad institute (<http://www.broad.mit.edu/annotation/cgi>). (Scale bar indicates evolutionary distance. Values above branches indicate the degree of bootstrap support from a 1000 replicate analysis)

### 2.3 *vv-gto1* 在草菇中的差异表达分析

如图 4 所示, 数字基因表达谱、蛋白质组及荧光定量 PCR 的结果均显示 *vv-gto1* 在草菇异核体菌丝 H1521 的表达量显著高于另外两个同核体菌丝表达量之和, 呈现出协同增效作用。图 5 的结果也显示, *vv-gto1* 在草菇异核体菌株 H1521 的菌丝期表达量最高。

*vv-gto1* 在转录和翻译水平都表现出异核体菌丝高表达的现象, 这说明 *vv-gto1* 在异核体菌丝生物学功能的行使过程中起到重要作用, 同时也暗示草菇异核体菌丝具备较强的抗逆性。

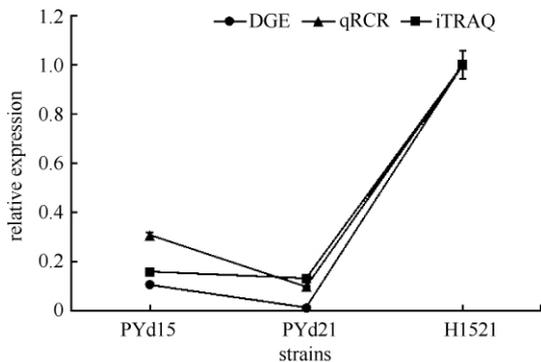


图 4. *vv-gto1* 在草菇同异核菌丝中的差异表达分析

Figure 4. Differential expression of *vv-gto1* between homokaryotic and heterokaryotic strains of *Volvariella volvacea*. PYd15 and PYd21 are homokaryotic strains. H1521 is a heterokaryotic strain which was generated by cross between PYd15 and PYd21.

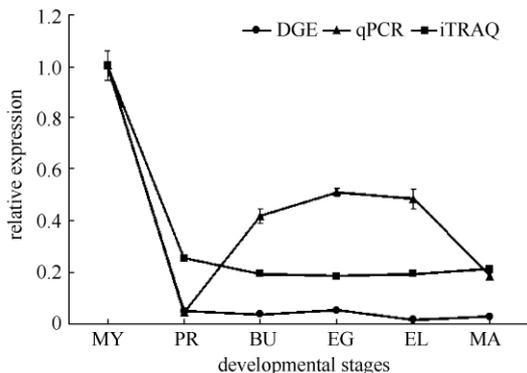


图 5. *vv-gto1* 在草菇 H1521 菌株 6 个不同生长时期中的差异表达分析

Figure 5. Differential expression pattern of *vv-gto1* during different developmental stages of H1521. MY = mycelium, PR = primordia, BU = the stipe of button stage, EG = the stipe of egg stage, EL = the stipe of elongation stage, MA = the stipe of maturation stage.

## 3 讨论

随着微生物分子生物学和遗传工程的飞速发展, 越来越多的丝状真菌基因组被解析和公布, 但是由于基因组测序、拼接、预测过程产生的误差会对基因序列的准确性产生影响<sup>[16]</sup>, 通常对单基因的分析不能够完全依赖于基因组序列, 而需要对目的片段重新进行测序, 这在时间和成本上造成了很大的浪费。本研究结合基因组、转录组的原始 reads, 通过 ZOOM 软件定位, 可以较好的判断序列的准确性, 避免了重复测序带来的麻烦, 同时也拓展了 ZOOM 软件在组学数据分析中的新用法。

根据转录组定位结果显示, *vv-gto1* 在整个草菇生活史中存在两个内含子保留的可变剪接位点, 按照是否保留进行随机组合得到 4 种可能的 mRNA 序列, 分别提交 ORF Finder 进行开放阅读框的预测与翻译, 可获得 3 种不同长度的氨基酸编码序列, 分别为 375aa (仅保留第 8 个内含子, 编号为 VvGTO1-1)、356aa (都不保留, 编号为 VvGTO1-2) 和 305aa (仅保留第 7 个内含子或两个内含子都保留, 编号为 VvGTO1-3)。将上述氨基酸序列与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 第 I 亚型的 GTO 序列<sup>[5]</sup> 进行比对 (图 6), 发现 3 种不同长度的 VvGTO1 中仅 VvGTO1-2 具备完整准确的碳端结构域, VvGTO1-1 的 GST\_C\_ECM4 domain 区域虽然还在但是比其他序列多出 19 个氨基酸残基, 这种变化可能对蛋白的折叠及空间构型产生影响, 从而影响酶活效力; VvGTO1-3 的氨基酸序列缺少了 GST\_C\_ECM4 功能域, 很可能直接导致功能的缺失。

可变剪接被认为是真核生物中调控基因表达, 引起蛋白质功能多样性的重要原因之一<sup>[17-18]</sup>。对草菇 *vv-gto1* 表达量的分析结果显示, 不同生长期草菇 *vv-gto1* 在转录水平和翻译水平上的表达量都存在显著的差异, 推测草菇 *vv-gto1* 可以通过形成不同的可变剪接体调节基因的转录和翻译, 最终影响蛋白质的功能行使。

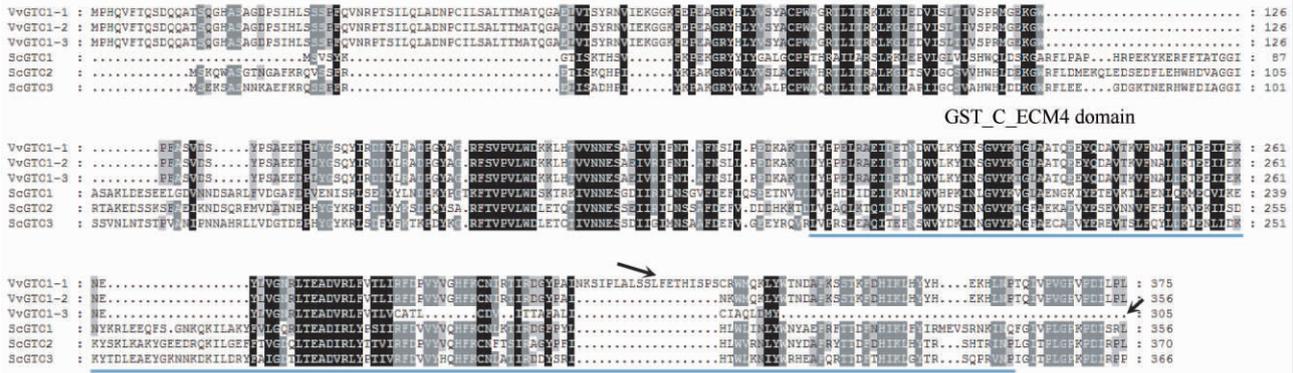


图 6. 可变剪接导致草菇 GTO1 保守结构域的缺失

Figure 6. The lack of conservative structure domain caused by alternative splicing. The positions with missed or increased amino acids caused by alternative splicing were arrowed. The transverse line localizes GST\_C\_ECM4 domain.

致谢:感谢国家食用菌品种改良中心福建分中心、福建省食用菌工程技术研究中心为本研究提供了试验条件。

## 参考文献

- [1] Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*, 2001, 360: 1-16.
- [2] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey LR. Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2005, 45: 51-88.
- [3] Chen X, Wang Z, Li X, Zhu Y, Liu L, Chen W, Chen Q. Research progress on glutathione S-transferases. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2013, 44 (1): 149-153. (in Chinese)  
陈秀华, 王臻昱, 李先平, 朱延明, 刘丽, 陈威, 陈勤. 谷胱甘肽 S-转移酶的研究进展. *东北农业大学学报*, 2013, 44 (1): 149-153.
- [4] Burns C, Geraghty R, Neville C, Murphy A, Kavanagh K, Doyle S. Identification, cloning, and functional expression of three glutathione transferase genes from *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42 (4): 319-327.
- [5] Morel M, Ngadin AA, Droux M, Jacquot JP, Gelhaye E. The fungal glutathione S-transferase system. Evidence of new classes in the wood-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009, 66 (23): 3711-3725.
- [6] Lin N, Mao W, Wang H, Feng A, Bao D. Cloning and expression analysis of a polyketide synthase gene *vv-alb* from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 2012, 31 (1): 142-149. (in Chinese)  
林楠, 茅文俊, 汪虹, 冯爱萍, 鲍大鹏. 草菇聚酮合酶编码基因 *vv-alb* 的克隆及其表达的初步分析. *菌物学报*, 2012, 31 (1): 142-149.
- [7] Chen S, Ge W, Buswell JA. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMs Microbiology Letters*, 2004, 230 (2): 171-176.
- [8] Tao Y, Xie B, Yang Z, Chen Z, Chen B, Deng Y, Jiang Y, van Peer AF. Identification and expression analysis of a new glycoside hydrolase family 55 exo- $\beta$ -1, 3-glucanase-encoding gene in *Volvariella volvacea* suggests a role in fruiting body development. *Gene*, 2013, 527 (1): 154-160.
- [9] Zhang Z, Lin H, Ma B. ZOOM Lite: next-generation sequencing data mapping and visualization software. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38: W743-W748.
- [10] Liu P, Xie B, Deng Y, Jiang Y. Cloning, structural analyses and expression levels of phosphofructokinase gene in different strains of *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 2013, 32 (2): 253-260. (in Chinese)  
刘朋虎, 谢宝贵, 邓优锦, 江玉姬. 草菇磷酸果糖激酶(PFK)基因克隆、结构及不同菌株中表达量分析. *菌物学报*, 2013, 32 (2): 253-260.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10): 2731-2739.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [13] Liu J, Jiang Y, Xie B, Chen B, Liao W, Deng Y. Comparative analysis of proteomic profile at different development stages of *Volvariella volvacea* by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS. *Microbiology China*, 2012, 39 (6): 853-864. (in Chinese)  
刘靖宇, 江玉姬, 谢宝贵, 陈炳智, 廖伟, 邓优锦. iTRAQ 结合 2D LC-MS/MS 技术在草菇不同生长发育时期蛋白质组分析中的应用. *微生物学通报*, 2012, 39 (6): 853-864.
- [14] Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-

Kirby A, Lajoie G. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by MS/MS. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17 (20) : 2337-2342.

- [15] Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Easteal S, Jermiin LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffor MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (32) : 24798-24806.
- [16] Chen X, Shen W, Fan Y, Wang Z. Genomics and metabolic engineering of filamentous fungi in the post-genomics era. *Hereditas*, 2011, 33 (10) : 1067-1078.

(in Chinese)

陈献忠, 沈微, 樊游, 王正祥. 后基因组时代的丝状真菌基因组学与代谢工程. *遗传*, 2011, 33 (10) : 1067-1078.

- [17] Keren H, Lev-Maor G, Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11 (5) : 345-355.
- [18] Kalyna M, Simpson CG, Syed NH, Lewandowska D, Marquez Y, Kusenda B, Marshall J, Fuller J, Cardle L, McNicol J, Dinh HQ, Barta A, Brown JWS. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40 (6) : 2454-2469.

## Sequence characterization and differential expression of a glutathione S-transferase gene *vv-gto1* from *Volvariella volvacea*

Junjie Yan, Lixian Guo, Jingjing Zhao, Baogui Xie\*

Mycological Research Center of Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

**Abstract:** [Objective] Based on the analysis of omics data of *Volvariella volvacea*, a gene encoding glutathione S-transferase (GSTs) named *vv-gto1* was obtained. To reveal the role of GSTs in the growth and development in edible fungi, the structure, the sequence characters and the expression profile of a GST gene *vv-gto1* of *Volvariella volvacea* were analyzed.

[Methods] ZOOM software was used to map sequencing read (reads) from genome and transcriptome against the splicing sequence of genome, to confirm the complete length and the accuracy of the gene sequence, and to visualize gene structure. The MEGA 5.1 was used to do the multiple sequence alignment and phylogenetic tree analysis. Real time fluorescent quantitative PCR was used to determine the expression levels of *vv-gto1* at different growth periods of *Volvariella volvacea*.

[Results] The full sequence of *vv-gto1* covered 2083bp, containing 11 exons and 10 introns, and encoded a protein with 356 amino acids. 5'UTR was 305bp which contains one intron region, and 3'UTR was 86bp. Two intron retentions could be recognized during RNA processing, and the transcripts formed by the intron retention could not translate the correct conservative functional domains. The full-length of *vv-gto1* had more than 50 accurate positioning genome sequencing reads, suggesting that genome sequencing and assembly results are accurate and reliable. The phylogenetic tree showed that GTO1 of *Volvariella volvacea* belonged to the subclass I of the Omega class of glutathione S-transferase superfamily, and had the closest relationship with GTO1 and GTO2 in *Phanerochaete chrysosporium*. The analysis of digital gene expression profiling, fluorescence quantitative PCR and proteomics showed that *vv-gto1* had the highest expression level in the heterokaryotic hyphae. [Conclusions] This is the first time to obtain a gene encoding glutathione S-transferase from *Volvariella volvacea* which belongs to Omega class. Our study showed that the gene may play an important role during the special biological functions of heterokaryotic hyphae. This study also suggested that *Volvariella volvacea* heterokaryotic hyphae in H1521 had stronger resistance ability than other samples. In addition, *vv-gto1* could form different alternative splicesome to regulate gene transcription and translation, and ultimately affect the function of the protein.

**Keywords:** heterokaryon, Glutathione S-transferase encoding gene, expression profile, quantitative PCR, proteome

(本文责编:王晋芳)

Supported by the China Agriculture Research System (CARS 24) and by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2014CB138302)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-591-83789277; E-mail: mrcfafu@163.com

Received: 7 January 2014 / Revised: 4 April 2014