

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (10) :1284 - 1290; 4 September 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150009

## 药用真菌猪苓 2 种氧化应激相关基因的克隆和序列分析

刘蒙蒙, 宋超, 邢咏梅, 郭顺星\*

北京协和医学院, 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193

**摘要:**【目的】克隆药用真菌猪苓 NADPH 氧化酶及乙二醛氧化酶基因并进行生物信息学分析。【方法】利用 RACE 技术取得基因 cDNA 全长;利用生物信息学在线工具预测蛋白的理化性质、结构域等分子特征;用 Bioeditor 和 MEGA 5.0 分别对氨基酸进行多序列比对和进化关系分析。【结果】克隆到 *PuNOX* (JX035912) 及 *PuGLOX* (JX035913)。它们 cDNA 全长分别为 1674 bp、1723 bp;分别编码 557、515 个氨基酸,相对分子质量分别为 63.845 kDa、55.891 kDa,等电点分别为 5.58、4.82。*PuNOX* 与真菌 NADH 蛋白的一致性为 74% - 80%,系统进化树分析结果显示猪苓 *PuNOX* 与糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 亲缘关系较近;*PuGLOX* 与真菌乙二醛氧化酶同源性较高,均大于 50%;其系统进化树分析表明猪苓 *PuGLOX* 与黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 进化上最保守。【结论】药用真菌猪苓 NADPH 基因 *PuNOX* 以及乙二醛氧化酶基因 *PuGLOX* 的分子特征为进一步研究其在猪苓菌核生长发育过程中的作用奠定理论基础。

**关键词:**猪苓,氧化应激,基因克隆,序列分析

**中图分类号:**Q786 **文章编号:**0001-6209(2015)10-1284-07

生物体内的氧化代谢会产生少量的自由基,体内的抗氧化系统能及时清除以维持自由基的代谢平衡。但是在特定时期,体内大量自由基的堆积,细胞中抗氧化保护机制不足时,使活性氧堆积形成氧化和抗氧化的不平衡状态,这种状态称为氧化应激。活性氧的堆积对细胞产生毒性,破坏细胞膜影响细胞结构甚至导致细胞死亡。同时活性氧也是细胞中的活性分子,可以作为第二信使参与信号传递,在细胞发育、分化过程中活性氧扮演了重要的角色<sup>[1-2]</sup>。

菌核是由菌丝纽结而形成的休眠结构,研究发现菌核分化与氧化应激相关连,氧化应激启动了齐整小菌核菌 (*Sclerotinia rolfii*) 的菌丝进行分化产生菌核,而菌核的形成又反过来消除了这种氧化应激

反应<sup>[3]</sup>。

猪苓是一种药用真菌,其菌核是我国重要的中药资源。近些年猪苓菌核遭到灭绝性开采,导致其野生资源濒临灭绝,由于人工栽培菌核产量低,质量差,不能有效缓解猪苓菌核资源匮乏的现状。猪苓菌丝形成菌核是缓解该资源问题的有效方案之一。目前对于猪苓菌核的研究主要集中于其药理活性,以及中药化学方面,对于其菌核形成的分子机制的研究尚属空白。依据本实验室先前的抑制差减文库分析,获得了两个与氧化应激相关的表达序列标签 (EST),并且这两个基因在菌丝形成菌核的过程中呈现出显著高表达<sup>[4]</sup>。因此,本研究通过 RACE 技术从猪苓菌核中克隆到这两个与氧化应激相关的基

基金项目:国家自然科学基金(30830117,31201666)

\* 通信作者。E-mail: sxguo1986@163.com

作者简介:刘蒙蒙(1987-),男,河北任丘人,博士研究生,药用真菌学。E-mail: liuermengmeng@hotmail.com

收稿日期:2015-01-09;修回日期:2015-02-13

因并进行生物信息学分析,旨在为深入研究该基因在猪苓菌丝形成菌核的分子调控作用提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌种:**猪苓纯培养种由药用植物研究所真菌室提供。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**M-MLV Reverse Transcriptase Kit 购于 Promega 公司, SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 购于 Clotech 公司,胶回收试剂盒购于天根公司, pMD18-T 载体,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞均购于 TaKaRa 公司, NanoDrop™ 2000 分光光度计购于 Thermo Fisher 公司。

### 1.2 猪苓菌核培养

按照文献 [4] 中报道的方法,猪苓菌丝培养 40 d 形成菌核,取菌核样品液氮速冻后置于 -80 °C 中以备提取 RNA。

### 1.3 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 CTAB 法<sup>[5]</sup>提取猪苓菌核的总 RNA。用 NanoDrop™ 2000 分光光度计 (Thermo Fisher, USA) 检测 RNA 质量、纯度,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。采用 M-MLV Reverse Transcriptase kit (Promega, USA),按照操作手册,逆转录合成第一链 cDNA, -20 °C 保存备用。

### 1.4 cDNA 末端快速扩增 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 克隆

根据原始的核心 EST 序列,设计 2 对特异引物 (表 1),按照 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clotech, Japan) 操作手册,分别与 Nested UniversalPrimer A (NUP) 引物组合进行 2 次巢式 5'-RACE。2 次 PCR 反应体系包括 2.5 μL 10 × Advantage® 2PCR 缓冲液,0.5 μL dNTPs (10 mmol/L), 引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 0.5 μL 10 × NUP, 5'-RACE ready cDNA (第 1 次 PCR 模板) 或第 1 次 PCR 产物 (第 2 次 PCR 模板) 各 1.0 μL, 0.5 μL 50 × Advatange® 2 Polymerase Mix (5 U/L), 19.5 μL ddH<sub>2</sub>O, 共 25 μL。PCR 程序为:95 °C 3 min;95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 32 个循环;72 °C 7 min。PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳后得到目的条带,经 TianGen 胶回收试剂盒 (TianGen,

China) 纯化目的条带,连接至 pMD18-T 载体上 (TaKaRa, China),转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 (TaKaRa, China) 感受态细胞,阳性克隆由北京金唯智生物科技有限公司进行测序。

表 1. 2 个氧化应激基因的引物序列

Table 1. Primer sequences of the two oxidative stress genes

Gene name	Sequence RACE PCR (5'→3')
NADPH oxidase	TCCTCCACCCCTCTTGTTCCTCTC
	CGAATGGCGTGACACCAATACCG
Glyoxal oxidase	CAGGCTGATCCCAACTTCTCCGTAT
	CGGCACTGTCGCTCTTTACTT

### 1.5 序列分析

使用以下在线工具对获得的 2 种氧化应激相关基因的 cDNA 序列进行分析:BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>)、CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>)、ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)。利用 TMHMM 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对蛋白跨膜区进行预测。采用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan/>) 预测基因编码蛋白的保守结构域和基序。采用 Bioeditor v7.0.0 对氨基酸序列进行比对分析;借助 MEGA 5.0 程序包<sup>[6]</sup>构建系统进化树。

## 2 结果和分析

### 2.1 氧化应激相关基因的克隆和序列分析

**2.1.1 猪苓 NADPH 氧化酶基因的克隆:**经过 2 次 RACE 扩增,获得长度为 1004 bp 的 3' cDNA,与 EST 核心序列拼接后获得一条 2010 bp 的猪苓 NADPH 氧化酶全长 cDNA,暂命名为 *PuNOX*,提交 GenBank 获得登录号为 JK035912。ORF Finder 分析显示,猪苓 NADPH 氧化酶基因 (*PuNOX*) 的 ORF 区共 1674 bp。编码 557 个氨基酸,推测分子量为 63.845 kDa,理论等电点为 5.58。

**2.1.2 猪苓乙二醛氧化酶基因的克隆:**经过 2 次巢式 3'-RACE 反应,扩增产生目标条带,经克隆、测序获得 1024 bp 的序列,聚类拼接后获得了 1723 bp 的猪苓乙二醛氧化酶全长 cDNA。GenBank 登录号为 JX035913,定名为 *PuGLOX*。猪苓乙二醛氧化酶基因 (*PuGLOX*) 的 ORF 区共 1548 bp,编码 515 个氨基

酸,推测分子量为 55.891 kDa,理论等电点为 4.82。

## 2.2 氧化应激相关基因编码蛋白结构域的预测

### 2.2.1 猪苓 NADPH 氧化酶基因编码蛋白结构域预测

NOX (NADPH 氧化酶) 分子大致可以分为两个大的结构域: N 端的疏水跨膜区和 C 端的黄素蛋白结合区,具有六个跨膜片段,一些保守的区段可能与 NADPH、FAD 的结合有关。InterProScan 软件对猪苓 NADPH 氧化酶 (PuNOX) 进行结构域分析,如

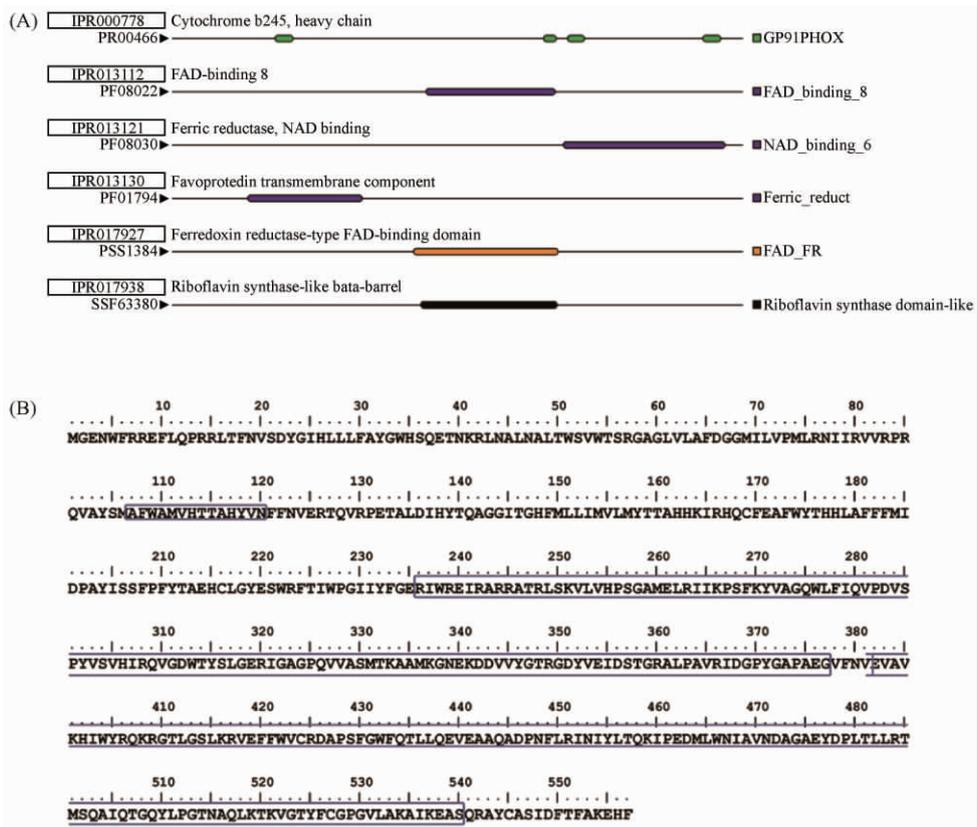


图 1. InterProScan 分析 PuNOX 蛋白的保守结构域

Figure 1. Analysis of conserved domains of deduced PuNOX protein by InterProScan (A) and the conserved domain of amino acid sequence in the blue box (B).

### 2.2.2 猪苓乙二醛氧化酶基因编码蛋白结构域预测

乙二醛氧化酶 (GLOX) 是一个铜基氧化酶 (Radial-copper oxidase), 拥有两个完全不同的氧化还原中心, 一个金属离子和一个稳态的蛋白自由基, 同时还含有一个不寻常的由 7 个  $\beta$  折叠组成的桶状结构——超桶折叠。InterProScan 软件对猪苓乙二醛氧化酶 (PuGLOX) 进行结构域分析, 如图 2 所示, PuGLOX 具有乙二醛氧化酶 N 端。TargetP 软件对 PuGLOX 细胞定位进行预测, 推测其位于膜上。TMHMM 软件分析 PuGLOX 的跨膜结构域, 其在 N

图 1 所示, PuNOX 有黄素蛋白结合区, 2 个 FAD 结合区和一个 NAD 结合区, 还包括细胞色素 b245 重链。TMHMM 软件分析 PuNOX 的跨膜结构域, PuNOX 是跨膜蛋白, 在 N 端具有 6 个跨膜片段。以上结果均表明本研究克隆得到的 PuNOX 其推定的氨基酸序列具有 NOX 结构域, PuNOX 为一个新的编码 NADPH 氧化酶基因。

端具有跨膜区。SignalP 软件分析发现 PuGLOX 推定氨基酸序列的 N 端有一段信号肽, 分裂位点是 P26/27。根据分析结果推测 PuGLOX 为一新的编码乙二醛氧化酶的基因。

## 2.3 氧化应激相关基因编码蛋白的多序列比对分析

### 2.3.1 猪苓 NADPH 氧化酶基因编码蛋白的多序列比对分析

运用 Bioeditor 程序包中的 MegAlign 程序对 PuNOX 推定的氨基酸序列和其他 NADPH 氧化酶进行多序列比对, 结果表明猪苓 NADPH 氧化酶与其他来源于担子菌 NADPH 氧化酶高度同源。

PuNOX 与灰盖鬼伞 (*Coprinopsis cinerea*)、糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*)、裂褶菌 (*Schizophyllum commune*) 和干腐菌 (*Serpula lacrymans*) 同源性均高

达 80%, 与双色蜡蘑 (*Laccaria bicolor*) 同源性为 77%, 与印度梨形孢 (*Piriformospora indica*) 的同源性为 74%。

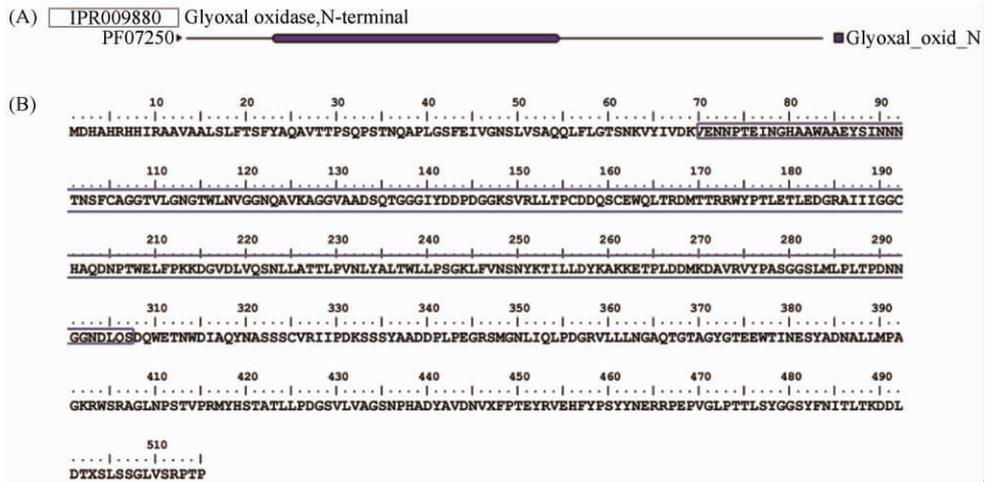


图 2. InterProScan 分析 PuGLOX 蛋白的保守结构域

Figure 2. Analysis of conserved domains of deduced PuGLOX protein by InterProScan (A) and the conserved domain of amino acid sequence in the blue box (B).

**2.3.2 猪苓乙二醛氧化酶基因编码蛋白的多序列比对分析:**运用 Bioeditor 程序中的 MegAlign 程序对 PuGLOX 推定的氨基酸序列和其他乙二醛氧化酶进行多序列比对,结果表明猪苓 PuGLOX 与真菌乙二醛氧化酶同源性较高,均大于 50%,其中 PuNOX 与黄孢平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) (ABD61572) 同源性为 61%。PuNOX 与植物拟南芥有 35% 的同源性。

## 2.4 氧化应激相关基因编码蛋白的系统进化树分析

**2.4.1 PuNOX (Puctg110. pro) 基因编码蛋白的系统进化树分析:**通过 NCBI 检索选取高等真菌中的 NOX 序列利用 MEGA 5.0 构建了包括 PuNOX 在内共 13 个 NADPH 氧化酶的系统进化树(图 3)。序列包括干腐菌 (*S. lacrymans*)、*S. commune*、*P. ostreatus*、*L. bicolor*、*C. cinerea*、灰葡萄孢霉 (*Botryotinia fuckeliana*)、马毛癣菌 (*Trichophyton equinum*)、*Ajellomyces capsulatus*、马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium mameffei*) 和禾柄锈菌 (*Puccinia graminis*)。除锈菌 (*P. graminis*) 外,其他所有序列分为两个分支:担子菌类群和子囊菌类群,支持度均为 100。担子菌类群中,*P. indica* 与其他担子菌进

化关系较远,为一单独分支,所有其他担子菌进化上一致为同一单系群。在该单系群中又分为两个姐妹类群,*S. lacrymans*、*S. commune*、*P. ostreatus* 和猪苓 *PuNOX* (Puctg110) 聚类成一个类群,为平行分支,*L. bicolor* 和 *C. cinerea* 为另一类群。该结果与分类上的亲缘关系一致。

## 2.4.2 PuGLOX 基因编码蛋白的系统进化树分析:

通过 NCBI 检索选取 GLOX 序列利用 MEGA 5.0 构建了包括 PuGLOX 在内共 9 个乙二醛氧化酶的系统进化树(图 4)。序列包括 *C. cinerea*、新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、*Laccaria bicolor*、青杨叶锈病菌 (*Melampsora larici*)、*Phanerochaete chrysosporium*、*Piriformospora indica*、禾柄锈菌 (*Puccinia graminis*)、玉米丝黑穗病菌 (*Sporisorium reilianum*) 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)。拟南芥 GLOX 分支最早,其余全部真菌类乙二醛氧化酶形成单一群系。丝黑穗菌 *S. reilianum* 与其他真菌进化关系较远,为单一分支。在其他真菌群系中分为 3 平行分支:担子菌类、子囊菌类和 *P. indica*,锈菌聚类在子囊菌类群。猪苓 PuGLOX 与 *P. chrysosporium* 进化上最保守。

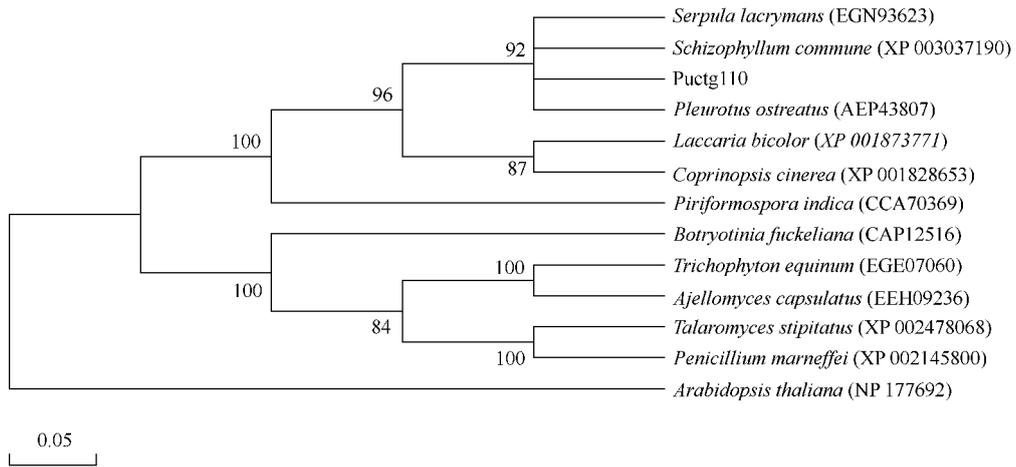


图 3. 猪苓及相关真菌 NADPH 氧化酶的系统进化树

Figure 3. Phylogenetic tree of related fungi inferred from NOX proteins. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

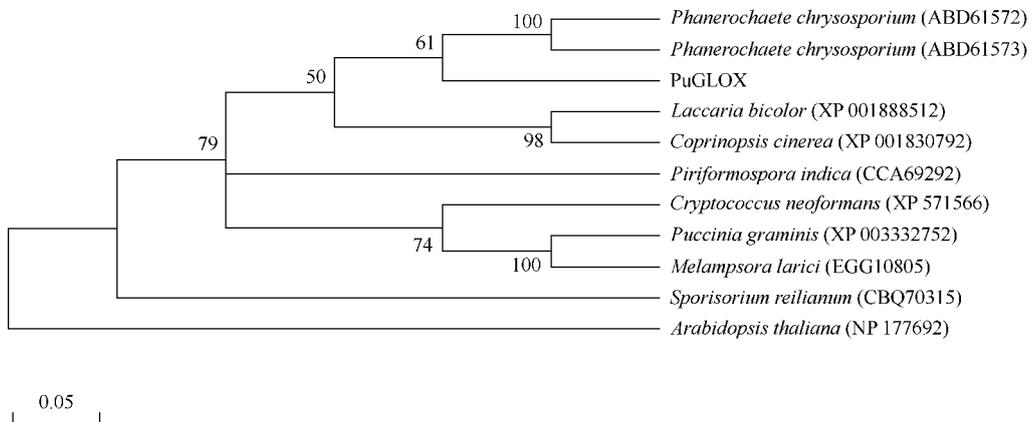


图 4. 猪苓乙二醛氧化酶的系统进化树

Figure 4. Phylogenetic tree of related fungi inferred from GLOX proteins. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

### 3 讨论

本研究利用 RACE-PCR 方法首次从猪苓中克隆得到 NADPH 氧化酶、乙二醛氧化酶的全长 cDNA。分析结果显示 PuNOX 具有黄素蛋白结合区、2 个 FAD 结合区、1 个 NAD 结合区和 N 端 6 个跨膜片段,表明本研究克隆得到的 PuNOX 为一新的编码 NADPH 氧化酶的基因。NOX 是细胞内最重要的 ROS 产生酶,不仅能诱导细胞的氧化应激反应,还能作为第二信号分子参与细胞的分化。Kim 在核盘菌中克隆得到 NADPH 氧化酶基因,发现该基因

的突变株不能形成菌核,也不再具有致病性<sup>[7]</sup>。经比对 *SsNox1* 与 *PuNOX* 的同源性高达 67%。由此推测,NADPH 氧化酶可能同样也参与了猪苓菌核的形成。PuGLOX 具有乙二醛氧化酶 N 端,N 端具有跨膜区和一段信号肽,分析结果显示 PuGLOX 为一新的编码乙二醛氧化酶的基因。乙二醛氧化酶催化醇醛类化合物和甘油生成相应的酸类,同时伴随着过氧化氢的生成<sup>[8]</sup>。研究发现,乙二醛氧化酶作为过氧化氢生成酶同样能诱导氧化应激反应,这种反应通常发生在菌丝顶端和菌丝细胞壁<sup>[9]</sup>。过氧化氢、超氧化物自由基等引起的氧化应激反应均能启动菌核发育<sup>[3]</sup>。因此推论,PuGLOX 可能参与了猪苓菌

丝形成菌核的过程。猪苓菌丝和菌核中存在活性氧分子,发现猪苓菌核的产生与其菌丝内产生的活性氧有密切的联系,即猪苓菌核发育过程中会伴随着氧化应激生物过程<sup>[10]</sup>。本研究后续将利用 RNAi 研究 PuNOX 和 PuGLOX 基因在猪苓菌核生长发育中的生物学功能,为猪苓菌丝形成菌核的分子机制研究提供理论基础。

## 参考文献

- [1] Bloomfield G, Pears C. Superoxide signalling required for multicellular development of *Dictyostelium*. *Journal of Cell Science*, 2003, 116 (16) : 3387-3397.
- [2] Heller J, Tudzynski P. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development and disease. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49: 369-390.
- [3] Georgiou CD, Patsoukis N, Papapostolou I, Zervoudakis G. Sclerotial metamorphosis in filamentous fungi is induced by oxidative stress. *Integrative and Comparative Biology*, 2006, 46 (6) : 691-712.
- [4] Song C, Liu M, Xing Y, Guo S. ESTs analysis of putative genes engaged in *Polyporus umbellatus* sclerotial development. *International Journal of Molecular sciences*, 2014, 15 (9) : 15951-15962.
- [5] Liu YY, Guo S. Nutritional factors determining sclerotial formation of *Polyporus umbellatus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, 49 (2) : 283-288.
- [6] Iandolino A, da Silva FG, Lim H, Choi H, Williams L, Cook D. High-quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22 (3) : 269-278.
- [7] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5.0: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10) : 2731-2739.
- [8] Kim H, Chen C, Kabbage M, Dickman MB. Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77 (21) : 7721-7729.
- [9] Roncal T, Muñoz C, Lorenzo L, Maestro B, Díaz de Guereñu MdM. Two-step oxidation of glycerol to glyceric acid catalyzed by the *Phanerochaete chrysosporium* glyoxal oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50 (2) : 143-150.
- [10] Takano M, Nakamura M, Yamaguchi M. Glyoxal oxidase supplies hydrogen peroxide at hyphal tips and on hyphal wall to manganese peroxidase of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. *Journal of Wood Science*, 2010, 56 (4) : 307-313.
- [11] Xing YM, Chen J, Song C, Liu YY, Guo SX, Wang CL. Nox gene expression and cytochemical localization of hydrogen peroxide in *Polyporus umbellatus* sclerotial formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14 (11) : 22967-22981.

# Molecular cloning and characterization of two oxidative stress related genes from medicinal fungus *Polyporus umbellatus*

Mengmeng Liu, Chao Song, Yongmei Xing, Shunxing Guo\*

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract:** [Objective] To clone the NADPH gene (PuNOX) and Glyoxal oxidase gene (PuGLOX) from a medicinal fungus *Polyporus umbellatus*, and to carry out the bioinformatic analysis. [Methods] We used the Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) technique to obtain the full length cDNA of these two genes. We used a series of bioinformatic tools to characterize physiochemical properties of the two deduced protein. The analyses of multiple alignment and phylogenetic trees were performed using Bioeditor and MEGA 5.0 softwares. [Results] The entire cDNA of *PuNOX* and *PuGLOX* were 1674 bp, 1723 bp in length and encoded a 557-amino acid protein and 515-amino acid protein with a molecular weight of 63.845 kDa and 55.891 kDa and the isoelectric point of 5.58 and 4.82, respectively. PuNOX had high identities (74 to 80%) with NADPH peroxidase from other fungus. From the evolutionary tree, PuNOX was closely related to that of *Pleurotus ostreatus*. PuGLOX had high identities (>50%) with Glyoxal oxidases from various fungus. Phylogenetic tree analysis suggested that PuGLOX was closely related to that of *Phanerochaete chrysosporium*. [Conclusion] Molecular characterization of the two oxidative stress related genes will be useful for further functional determination of the genes involved in the sclerotium development of *Polyporus umbellatus*.

**Keywords:** *Polyporus umbellatus*, oxidative stress, molecular cloning, sequence analysis

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30830117, 31201666)

\* Corresponding author. E-mail: sxguo1986@163.com

Received: 9 January 2015 / Revised: 13 February 2015