虎奶菇多功能过氧化物酶的基因克隆和表达分析

田云恒，杨加亮，马爱民

（华中农业大学食品科学技术学院，湖北武汉 430070）

摘要：根据白腐菌多功能过氧化物酶（Versatile peroxidase，VPs）基因序列的保守区域设计引物，利用简并 PCR、cDNA 末端的快速扩增（RACE）和融合引物巢式结合 PCR（FPNI-PCR）等方法，扩增得到虎奶菇多功能过氧化物酶基因（GenBank 登录号 MN701764），命名为 Pt-vp1。该基因 DNA 全长 1833 bp，含有 15 个外显子和 14 个内含子，cDNA 和完整开放阅读框 1077 bp，编码 358 个氨基酸。多种白腐菌 VPs 氨基酸序列的系统发育结果表明，Pt-vp1 蛋白与平菇 VP（GenBank 登录号 ASU87523.1）亲缘关系最近。在发酵培养基中静止培养 4 d 后虎奶菇 VP 达到最大酶活，为 43.83 U/L。在发酵培养基中加入不同浓度 Mn^{2+}，当其浓度为 200 μmol/L 时，虎奶菇 VP 酶活达到最大值，为 91.98 U/L，表明 Mn^{2+}不是虎奶菇产生 VP 的必要因子，但可以显著提高产酶量。利用实时荧光定量 qRT-PCR 技术检测不同浓度 Mn^{2+}对 Pt-vp1 基因转录水平的影响，结果显示 Mn^{2+}对 Pt-vp1 蛋白的表达具有促进作用，当 Mn^{2+}浓度为 300 μmol/L 时，其转录水平增加了 5.79 倍。本研究结果为研究虎奶菇 VP 基因的表达机制及功能研究提供了重要信息。

关键词：虎奶菇；多功能过氧化物酶；基因克隆；生物信息学

文章篇号：1673-9078(2020)06-121-127 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1127

Cloning and Expression Analysis of Versatile Peroxidase from *Pleurotus tuber-regium*

TIAN Yun-heng, YANG Jia-liang, MA Ai-min

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Primers were designed according to the conserved domain of versatile peroxidase gene cDNA sequences of white-rot fungi, and the gene of versatile peroxidase from *Pleurotus tuber-regium* (termed *Pt-vp1*; GenBank accession number: MN701764) was obtained *via* amplification using degenerate PCR, rapid amplification of cDNA end (RACE), and fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR). The full-length DNA of *Pt-vp1* was 1833 bp, with 15 exons and 14 introns. The length of cDNA and open reading frame were both 1077 bp and encoded 358 amino acids. Phylogenetic analysis of the amino acid sequences of VPs from various white-rot fungi showed that Pt-vp1 protein was the closest to *Pleurotus ostreatus* VP (GenBank accession number: ASU87523.1). The VP activity of *P. tuber-regium* reached the highest to 43.83 U/L after 4 days of stationary culture in the fermentation medium. Mn^{2+} was added at different concentrations. When its concentration was 200 μmol/L, the VP activity was the highest 91.98 U/L. The results indicated that Mn^{2+} was not the necessary factor for producing VP in *Pleurotus tuber-regium*, but could increase significantly the enzyme production. The effect of Mn^{2+} at different concentrations on the transcription level of *Pt-vp1* was examined using quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the results showed that Mn^{2+} promoted the expression of *Pt-vp1*. When the concentration of Mn^{2+} was 300 μmol/L, the transcription level of *Pt-vp1* increased 5.79 times. This study provides important information for investigating the expression mechanism and function of the VP gene from *P. tuber-regium*.

Key words: *Pleurotus tuber-regium*; versatile peroxidase; gene cloning; bioinformatics

引文格式：

田云恒,杨加亮,马爱民.虎奶菇多功能过氧化物酶的基因克隆和表达分析[J].现代食品科技,2020,36(6):121-127

TIAN Yun-heng, YANG Jia-liang, MA Ai-min. Cloning and expression analysis of versatile peroxidase from *Pleurotus tuber-regium* [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 121-127

收稿日期：2019-11-20

基金项目：国家自然科学基金项目（31772375）

作者简介：田云恒（1994-），男，硕士，研究方向：食品生物技术

通讯作者：马爱民（1965-），男，博士，教授，研究方向：食品生物技术

白腐菌木质素降解酶包括漆酶（Laccase，Lac）、多功能过氧化物酶（versatile peroxidase，VP）、锰过氧化物酶（manganese peroxidase，MnP）和木质素过氧化物酶（lignin peroxidase，LiP）等酶系。VP 于上世纪九十年代首次在侧耳属杏鲍菇（*Pleurotus eryngii*）中被发现，是发现较晚的一类木质素降解过氧化物酶[1]。目前，已经在白腐真菌的侧耳属（*Pleurotus*）、烟管菌属（*Bjerkandera*）、栓菌属（*Trametes*）等菌属中发现 VP[2,3]。VP 是含亚铁血红素的一类糖蛋白，分子量 38~45 ku，最适 pH 3~5，等电点偏酸性[4]。研究表明 VP 是 MnP 和 LiP 的综合体，既具有 MnP 特有的 Mn2+结合位点，又具有 LiP 特有的 Trp 催化位点和远程电子传递通路[5,6]。

到目前为止，国内外已开展对 VPs 的基因克隆[7]、转录表达[8]等研究。Ruiz-Dueñas 等[7]克隆了一个含 15 个内含子，编码 361 个氨基酸的杏鲍菇 *VPL* 基因。在胞外酶水平，王力生等[9]的研究表明 Mn^{2+}可促进平菇分泌 MnP，Ruiz-Dueñas 等[10]研究发现 Mn^{2+}对杏鲍菇胞外 VP 产量无明显作用；但是由于白腐菌胞外含有众多 VP 等木质素过氧化物酶及其同工酶，难以确定 Mn^{2+}对某一 VP 的准确影响。在基因转录水平，Cohen 等[11]发现 Mn^{2+}对平菇 VP 有抑制作用。在基因结构水平，通常认为 Mn^{2+}对木质素降解过氧化物酶基因的表达调控与其启动子区域的 MRE（金属响应元件）有关[12]，此外，Singh 等人[13]在 *Phanerochaete chrysosporium mnp*1~3 的启动区域发现一个长 33 bp 的锰离子反应元件，推测 Mn^{2+}可能在转录水平影响木质素过氧化物酶的表达。因此，研究 Mn^{2+}对 VP 及其他木质素过氧化物酶表达的影响是十分必要的。

虎奶菇（*Pleurotus tuber-regium*），是一种生长在多种阔叶树上的热带白腐菌[14]。目前国内外对虎奶菇 VP 基因的克隆及表达研究尚未见报道。本研究以虎奶菇为材料，克隆了其 VP 基因（*Pt-vp1*），同时对该基因进行了生物信息学分析，并对其基因表达进行了初步研究。这些工作为今后研究 *Pt-vp1* 基因功能、转录调控和进一步构建优良工程菌株提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

虎奶菇（*P. tuber-regium*）菌株，由华中农业大学食品科学技术学院微生物实验室保存；大肠杆菌（DH5*α*）菌株，购自全式金生物技术有限公司。

1.1.2 试剂和仪器

主要试剂：pMD18-T 克隆载体、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit，Takara 公司；凝胶纯化试剂盒、回收试剂盒、质粒提取试剂盒，Axygen 公司；SYBR® Select Master Mix (2X)试剂盒，ABI 公司；硫酸锰、琥珀酸、琥珀酸钠、30% H_2O_2，均购自国药集团化学试剂有限公司。

仪器：DYY-8C 型电泳仪，北京六一仪器厂；Centrifuge 5415R 冷冻高速离心机，eppendorf；GEL LOGICAL 200 凝胶成像系统，Koda（USA）；DU2640 型核酸分析仪，Beckman Coulte；超净工作台，哈尔滨市东联电子技术开发有限公司；HH-4 型数显恒温水浴锅，上海力辰邦西有限公司；恒温摇床，天津市欧诺仪器仪表有限公司；生化培养箱，天津市泰斯特仪器有限公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基（g/L）：胰蛋白胨 10 g，酵母抽提物 5 g，氯化钠 10 g，琼脂粉 15 g。

PDA 培养基（g/L）：马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂粉 15 g。

发酵培养基（g/L）：葡萄糖 10 g，天冬酰胺 0.54 g，醋酸缓冲溶液 10 mmol/L（pH 4.5），吐温 80 1 g，KH_2PO_4 2 g，VB_1 0.001 g，微量元素混合液（Glycine 0.5 g，$MgSO_4·7H_2O$ 3 g，NaCl 1 g，$FeSO_4·7H_2O$ 0.1 g，$CoSO_4$ 0.1 g，$CaCl_2·2H_2O$ 0.1 g，$ZnSO_4·7H_2O$ 0.19 g，$CuSO_4·5H_2O$ 0.01 g，$AlK(SO_4)_2·12H_2O$ 0.01 g，H_3BO_3 0.01 g，$Na_2MoO_4·2H_2O$ 0.01 g，$MnSO_4·H_2O$ 0.01 g）70 mL。

1.2 方法

1.2.1 *Pt-vp1* 基因克隆

1.2.1.1 简并引物扩增 *Pt-vp1* 中间序列

将虎奶菇接种在 PDA 平板上，32 ℃培养 7 d，当菌丝长满平板时，收集菌丝。采用 CTAB 法[15]提取总 DNA，采用 RNAiso Plus 法[16]提取总 RNA，提取后的总 DNA 和 RNA 分别用核酸测定仪及 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测其纯度、浓度及完整性。随即，使用 Takara 公司的 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。根据 NCBI 数据库已报道的多个白腐菌 VP 基因序列的保守区，设计简并引物 Deg-vF/Deg-vR（表 1），以虎奶菇 cDNA 为模板，PCR 扩增 VP 的保守序列。20 μL PCR 反应体系为：10×PCR 缓冲液 2 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）0.8 μL，Deg-vF/Deg-vR（10 μmol/L）各 1 μL，*Taq* DNA 聚合酶（5 U/μL）0.2 μL，cDNA 1 μL，ddH_2O 14 μL。PCR 反应条件：95 ℃ 5 min；95 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，

72 ℃ 1 min，35 个循环；72 ℃ 5 min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测确定目的条带后，对目的条带进行回收、将回收产物与 pMD18-T 克隆载体连接后，转化到大肠杆菌 DH5*α* 感受态细胞中，菌落 PCR 后选取阳性转化子送往天一辉远有限公司测序。

表 1 基因克隆及表达分析引物列表

Table 1 Primers used in cloning and expression analysis of genes

引物名称	引物序列（5'→3'）	用途
Deg-vF	GGAGGTGCACGAGTCCCTGCGGCTGACNTTYCAYGA	保守序列的扩增
Deg-vR	GGATCTTCGCCTGGTTGTTCACCATNSWYTGCCAYTC	
3'Vp-F	GGTGAACAACCAGGCGAAGATCC	3'RACE 的扩增
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
Part-geneF	GATGCCATTGGTTTCTCTCCTAC	部分 DNA 的扩增
Part-geneR	CACCGCTTAGGAAGGAGGG	
Sp1	CGCTGAATCCTGCGTCACCCAT	FPNI-PCR 5'端的扩增
Sp2	GCGGAGATGTTGTGCTTGGCGAT	
Sp3	GATGGTATCGAATGTGATGATC	
Pt-vp1F	ATGGCCTTTAACAAGCTCTCTGC	基因全长扩增
Pt-vp1R	TTATCACCGCTTAGGAAGGAGGG	
Pt-vp1qF	GAATCGCCATTGAGAGGAGAG	qRT-PCR
Pt-vp1qR	GAATCACGTCGGAGCAGTC	
Tubulin-F	CCTGTTCCACCACCAAACGA	
Tubulin-R	CCGAGACACTGATAACCGGC	

1.2.1.2 *Pt-vp1* 全长基因的克隆和生物信息学分析

利用 DNAMAN 对 1.2.1.1 中获得的 *Pt-vp1* 保守序列进行比对、分析，在该序列中设计 1 条 3'RACE 上游引物（3'Vp-F）（表 1）和 1 条锚定下游引物 AUAP（表 1），以虎奶菇 cDNA 为模板，以 3'Vp-F 和 AUAP 为引物，扩增 *Pt-vp1*cDNA 3'端未知序列，扩增产物使用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后进行序列片段的回收、测序、序列比对分析。将 3'RACE 产物序列和 1.2.1.1 中得到的 *Pt-vp1* 保守序列比对拼接后，在其拼接序列 5'和 3'端设计一对引物 Part-geneF/Part-geneR（表 1），以虎奶菇 DNA 为模板，扩增 *Pt-vp1* 部分 DNA 序列，扩增结果电泳检测后，进行回收、测序、序列分析，接着在该序列中设计 3 条 5'端巢式特异性引物（5'SP1、5'SP2、5'SP3）（表 1），以虎奶菇 DNA 为模板，利用融合引物巢式结合 PCR（Fusion Primer and Nested Integrated PCR，FPNI-PCR）[17]扩增 *Pt-vp1* DNA 5'端未知序列，扩增结果电泳检测后，对目的片段进行回收、测序、序列比对分析。根据扩增序列分别在其 5'端起始密码子处和 3'端终止密码子处设计一对引物 Pt-vpF/Pt-vpR（表 1），分别以虎奶菇总 DNA 和 cDNA 为模板扩增 *Pt-vp1* 的 DNA 和 cDNA 全长片段，序列扩增结果经电泳检测后回收纯化，将回收产物与 pMD18-T 克隆载体连接后，转化到大肠 DH5*α* 感受态细胞中，菌落 PCR 后挑取阳性转化子测序。利用 ExPASy 数据库（http://www.Expasy.org/）中的 ProtParam 在线程序，预测该基因编码蛋白的基本理化性质；利用 NCBI 中 CDD 分析 Pt-vp1 序列保守结构域；利用 SOPMA 在线程序预测蛋白质的二级结构；利用 SWISS-MODEL 在线软件，对该编码蛋白的三维结构进行同源建模[18]；在 NCBI 数据库中查找其他白腐菌多功能氧化酶氨基酸序列与 Pt-vp1 蛋白进行比对，并用 MEGA-X 软件中 Neighbor-Joining 算法进行分子系统学分析，进行 1000 次 bootstrap 统计学检验，构建系统发生树。

1.2.2 虎奶菇 VP 酶活检测

将虎奶菇接种至 PDA 培养基，32 ℃培养 7 d 后打孔（直径 0.5 cm），将 5 个菌丝块接种至装有 20 mL 液体发酵培养基中，于 32 ℃静置培养，培养至 2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 后吸取 1 mL 发酵液经 10000 r/min 离心 5 min，取上清液。使用 Mn^{2+}氧化法测定 VP 的活性，酶活测定方法如下：取 50 mmol/L 的琥珀酸钠缓冲液（pH 4.5）2 mL，15 mmol/L 的 $MnSO_4$ 溶液 0.5 mL，0.4 mL 培养基滤出液，放在 10 mL EP 管中，振荡混匀加入 10 mmol/L 的 H_2O_2 溶液 0.1 mL 启动反应，37 ℃反应，3 min，测 λ=240 nm 处吸光度变化。利用 SPSS 20 对数据进行分析，检验差异显著性。

1.2.3 Mn^{2+}对虎奶菇 VP 活力的影响

为了研究 Mn^{2+}对虎奶菇产 VP 规律的影响，本实验在发酵培养基中加入不同浓度的 Mn^{2+}，分别为 0 μmol/L（对照组）、50 μmol/L、100 μmol/L、150 μmol/L、200 μmol/L、250 μmol/L 和 300 μmol/L，每个浓度设 3 个重复。将虎奶菇培养 4 d 后吸取 1 mL 发酵液，利用 1.2.2 中方法测定酶活，绘制 Mn^{2+}浓度对 VP 活力影响折线图。

1.2.4 Mn^{2+}对 *Pt-vp1* 基因转录影响

为了研究 Mn^{2+}对 *Pt-vp1* 转录水平的影响，本实验利用实时荧光定量 PCR（quantitative real-time PCR，qRT-PCR）技术，通过在发酵培养基中加入不同浓度的 Mn^{2+}（0 μmol/L（对照组）、200 μmol/L、300 μmol/L 和 500 μmol/L），在培养 7 d 后取样，对不同样品 *Pt-vp1* 基因的表达情况进行检测。以虎奶菇 *α*-微管蛋白（*α*-tubulin）基因为内参基因，*Pt-vp1* 基因和内参基因引物分别为 Pt-vp1qF/Pt-vp1qR 和 Tubulin-F/Tubulin-R（表 1）。qRT-PCR 反应试剂采用 ABI 公司 SYBR® Select Master Mix (2X)试剂盒，反应程序为 95 ℃ 10 min，95 ℃ 15 s，60℃ 60 s，95 ℃ 15 s，60 ℃ 60 s，95 ℃ 15 s，40 个循环。反应体系为 20 μL，cDNA 模板 2 μL，Vp-qRT-F 和 Vp-qRT-R 各 1 μL，12 x qRT-PCRmix 10 μL，ddH_2O 6 μL。

1.2.5 数据处理

每项试验均重复三次，利用 SPSS 20 对数据进行处理，检验其差异显著性；利用 Origin 8 软件作图，数据以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 *Pt-vp1* 基因克隆

2.1.1 *Pt-vp1* 基因保守序列的获得

以虎奶菇 cDNA 为模板，利用简并引物 Deg-vF/Deg-vR 进行 PCR 扩增，得到长 657 bp 的目的片段。将该序列进行 BLAST 同源比对后发现该序列与多种白腐真菌 VP 基因一致度在 74.06%~80.67%之间，具有较高的同源性。于是推测该序列为 VP 基因片段，将其命名为 *Pt-vp1*。

2.1.2 *Pt-vp1* 全长基因的获得

RACE 方法扩增 *Pt-vp1* 3'端 cDNA 片段的电泳检测结果见图 1-b，该片段纯化回收、测序、序列分析后，得到长为 872 bp 的序列，与 1.2.1.1 扩增的 *Pt-vp1* 部分序列有 241 bp 重叠区域，将两段序列拼接后，得到 861 bp 的 *Pt-vp1* cDNA 部分序列。序列分析显示，该序列包含 3'端的终止密码子 TAA 和一段明显的 polyA 序列，确定该序列为 3'端完整的 *Pt-vp1* cDNA 部分序列。以 Part-geneF/Part-geneR 扩增的 *Pt-vp1* 部分 DNA 序列电泳结果见图 1-c，将其纯化回收、测序、序列分析，得到长为 1487 bp 的序列。FPNI-PCR 扩增 *Pt-vp1* 5'端未知序列的电泳检测结果见图 1-d，分析后发现该序列长 1528 bp，包含 5'端起始密码子 ATG。序列拼接后，以 Pt-vpF/Pt-vpR 为引物，以虎奶菇总 DNA 为模板，扩增 *Pt-vp1* 全长 DNA 和 cDNA（图 1-e 第 1-2 泳道分别为：cDNA 和 DNA），经测序分析后发现 *Pt-vp1* DNA 全长序列 1833 bp，cDNA 长 1077 bp。该基因含有 14 个内含子，15 个外显子，所有内含子剪切位点均符合 GT-AG 规则。将测序得到的 *Pt-vp1* cDNA 序列提交至 NCBI 数据库进行 BLAST 后显示，发现该序列与多种多功能过氧化物酶编码基因具有较高同源性，确定 *Pt-vp1* 为多功能过氧化物酶家族新基因序列。

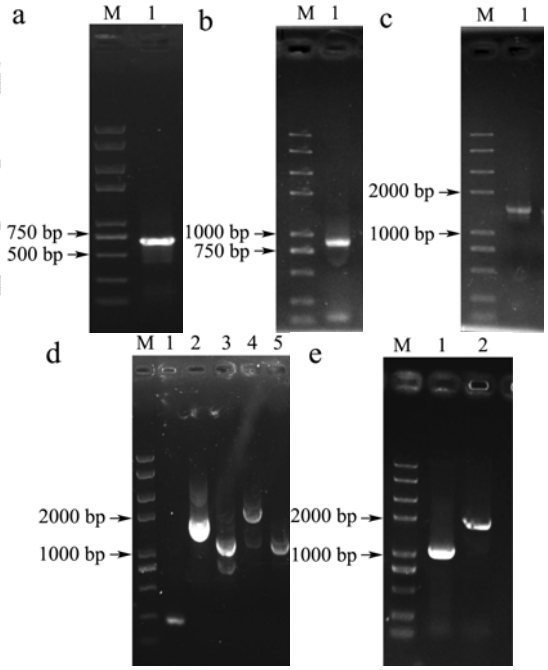


图 1 *Pt-vp1* 基因克隆

Fig.1 Cloning of full-length DNA and cDNA of *Pt-vp1*

注：M: DNA Marker: Trans2k Plus Ⅱ；a. *Pt-vp1* 保守序列扩增产物，泳道 1：引物 Deg-vF/Deg-Vr；b. 3'RACE PCR 产物，泳道 1：引物 3'Vp-F/ AUAP；c. *Pt-vp1* DNA 部分序列产物，泳道 1：Part-geneF/Part-geneR；d. FPNI-PCR 扩增 *Pt-vp1* 5'端未知序列产物，泳道 1: SP3/FP1，泳道 2: SP3/FP2，泳道 3: SP3/FP3，泳道 4：SP3/FP4，泳道 5：SP3/FP5；e. *Pt-vp1* cDNA 和 DNA 全长序列扩增产物，泳道 1-2：Pt-vpF/Pt-vpR。

2.1.3 *Pt-vp1* 编码蛋白的特征和系统发生树的构建

利用 ProtParam 在线程序，预测该基因编码蛋白的基本理化性质，Pt-vp1 蛋白中丙氨酸（Ala）含量最

高，占全部氨基酸的 2.80%；带负电氨基酸（Asp+Glu）、带正电氨基酸（Arg+Lys）残基的数量分别为 42 和 21 个，不稳定指数为 51.61，分子式为 $C_{1664}H_{2584}N_{452}O_{514}S_{14}$，原子总数为 5228，相对分子质量为 37.59 ku，理论等电点为 4.65，是酸性蛋白，脂肪族氨基酸指数为 82.15，总平均疏水性 0.013。利用 NCBI 中 CDD 分析 Pt-vp1 蛋白保守结构域发现，Pt-vp1 与其它真菌 VP 相同，也存在 1 个保守域（图 2），该域内有 Mn^{2+}结合位点、血红素结合位点、Ca^{2+}结合位点。

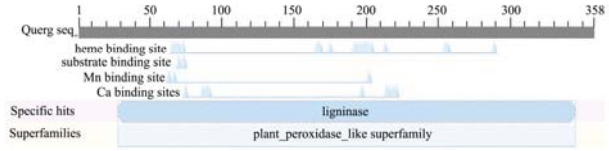


图 2 Pt-vp1 蛋白保守结构域

Fig.2 Conserved domain of Pt-vp1

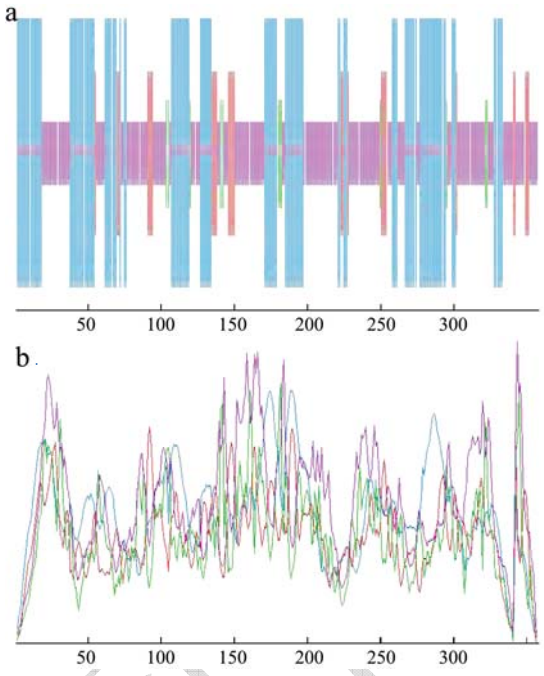


图 3 Pt-vp1 Pt-vp1 蛋白折叠盘绕方式

Fig.3 The folded and coiled ways of Pt-vp1 protein

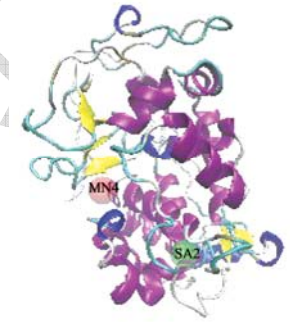


图 4 Pt-vp1 三维结构模型的构建

Fig.4 Construction of the three-dimensional structure model of Pt-vp1

利用 SOPMA 在线程序对 Pt-vp1 蛋白二级结构进行预测，结果如图 3 所示，该蛋白中存在 183 个无规则卷曲（51.12%）、134 个 α-螺旋（37.43%）、12 个 β 转角（3.35%）和 29 个伸展链（8.10%）。使用 SWISS-MODEL 在线工具预测虎奶菇 Pt-vp1 蛋白三维结构模型，如图 4 所示，Pt-vp1 蛋白三维结构模型中显示该蛋白有 1 个 Ca^{2+}和 1 个 Mn^{2+}的结合位点。利用 Verify3D 和 ERRAT 对预测模型质量进行评估，Verify3D 中 3D-1D score≥0.2 的值为 97.58%，ERRAT 综合质量因素为 86.2069，说明预测的三维模型可信。

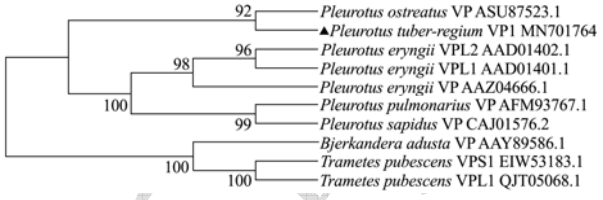


图 5 Pt-vp1 蛋白系统发育树分析

Fig.5 Phylogenetic tree analysis of Pt-vp1 protein

利用 MEGA-X 构建系统发育树，如图 5 所示，发现 Pt-vp1 与其他 9 种多功能过氧化物酶氨基酸序列形成两个大的聚簇，侧耳属（*Pleurotus*）VP 为一个聚簇，绒毛栓菌（*Trametes pubescens*）VPL1（QJT05068.1）、变色栓菌（*Trametes versicolor*）VPS1（EIW53183.1）和烟管菌（*Bjerkandera adusta*）VP（AAY89586.1）为另一个聚簇。Pt-vp1 属于第一聚簇，与平菇（*Pleurotus ostreatus*）VP（ASU877523.1）亲缘关系最近，推测 Pt-vp1 可能具有类似于平菇 VP 的功能，具体功能需进一步研究。

2.2 虎奶菇 VP 酶活的检测

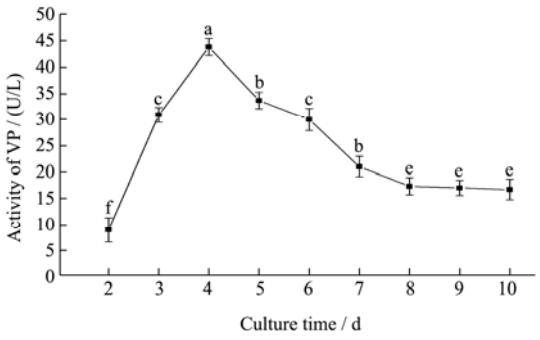


图 6 虎奶菇 VP 酶活力曲线

Fig.6 VP activity of *P. tuber-regium*

注：不同字母表示不同培养时间下差异显著（p<0.05）。

如图 6 所示，随着培养时间的延长，VP 酶活呈现先升高后下降的，再趋于平稳的趋势。VP 酶活于第 4 d 到最大值，为 43.83 U/L，由此确定第 4 d 是研究培养条件改变对 VP 酶活影响最适时间。尹立伟等[19]研究结果显示灰树花 MnP 活性 13 d 达到最高；

Isikhuemhen 等[20]研究结果表明菌核侧耳培养至 9 d 时 MnP 达到最高活性；张姝[21]等研究了亚卧孔菌属 *Physisporinus* sp. P18 菌株 VP 活性随时间变化，结果显示培养至 11 d 时 VP 活性达到最高。与其他研究相比，虎奶菇 VP 最大酶活分泌时间提前，推测原因可能与发酵培养基种类、培养方式和虎奶菇菌丝生长速度较快等有关。

2.3 Mn^{2+}浓度对 VP 活力的影响

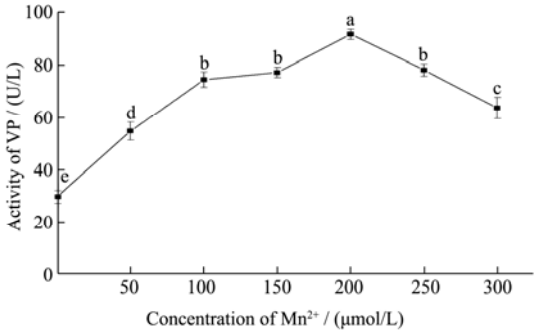


图 7 Mn^{2+}对虎奶菇 VP 酶活力的影响

Fig.7 Effect of Mn^{2+} on VP activity of *P. tuber-regium*

注：不同字母表示不同 Mn^{2+}浓度下差异显著（p<0.05）。

如图 7 所示，随着 Mn^{2+}浓度增加，虎奶菇 VP 酶活先增加后降低，在 Mn^{2+}浓度≤200 μmol/L 时，VP 的活力随 Mn^{2+}浓度的增加而提高，在 Mn^{2+}浓度为 200 μmol/L 时 VP 达到最大酶活 91.98 U/L，是对照组 29.63 U/L 的 3.1 倍，在 Mn^{2+}浓度>200 μmol/L 时，VP 的活力随 Mn^{2+}浓度的增加而减小。本研究结果表明 Mn^{2+}对虎奶菇胞外 VP 酶活有显著的促进作用，推测这可能与 VP 蛋白中存在 Mn^{2+}结合位点有关。

2.4 Mn^{2+}对 *Pt-vp1* 基因转录的影响

据文献报道[22]，胞外 VP 多是以同工酶的形式存在，因此，本实验又利用 qRT-PCR 技术检测了不同浓度 Mn^{2+}对 *Pt-vp1* 的转录水平。结果如图 8 所示，在 Mn^{2+}浓度为 200~500 μmol/L 时，其对 *Pt-vp1* 的转录具有显著促进作用，且 Mn^{2+}浓度为 300 μmol/L 时，转录达到最大值，是对照组的 5.79 倍。

目前 Mn^{2+}对白腐菌木质素降解酶系的调控研究大多集中于 MnP 和 Lac，对 VP 的研究少有报道。大多数研究表明，Mn^{2+}对多功能过氧化物酶基因转录水平的影响在不同同工酶基因之间有较大差异，Knop 等[23]研究发现，在缺乏 Mn^{2+}条件下，VP 在木质素过氧化物酶中占主导地位；Ruiz-Dueñas 等[10]研究表明 Mn^{2+}对 VP 转录没有明显影响；Cohen 等[11]研究发现 Mn^{2+}对平菇 VP 转录有抑制作用。而本研究首次发现 Mn^{2+}对 *Pt-vp1* 基因的转录有显著促进作用。有研究表明，Mn^{2+}对 MnP 表达调控的影响与 MnP 启动子区域的 MRE 或 Mn^{2+}调控元件有关[24]，根据本研究的结果，推测 *Pt-vp1* 可能具有类似于 MnP 启动子区域的 Mn^{2+}反应元件，这还有待进一步研究。上述实验结果表明，Mn^{2+}可显著促进虎奶菇产 VP 酶和 *Pt-vp1* 转录，但最佳浓度稍有差别，促进酶活的最佳浓度为 200 μmol/L，促进转录的最佳浓度为 300 μmol/L，推测这可能与虎奶菇胞外含有的多种 Mn^{2+}依赖性过氧化物酶及其同工酶有关。

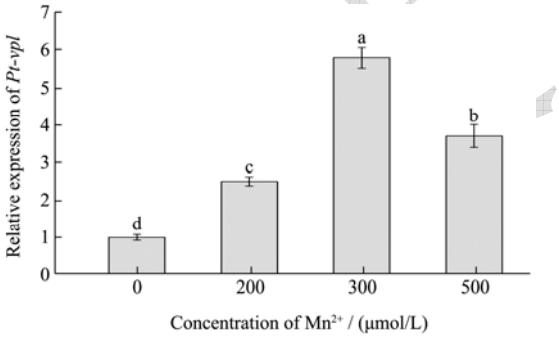


图 8 Mn^{2+}对 *Pt-vp1* 基因转录影响

Fig.8 The effect of Mn^{2+} on the transcription of *Pt-vp1* gene

注：不同字母表示不同 Mn^{2+}浓度下差异显著（p<0.05）。

3 结论

本研究克隆了虎奶菇 VP1 全长基因 *Pt-vp1*，同时利用发酵培养基并对虎奶菇 VP 酶活进行检测，在此基础上，分别研究了 Mn^{2+}对虎奶菇胞外 VP 酶活和 *Pt-vp1* 转录的影响。得出以下结论：*Pt-vp1* 基因全长 1833 bp，cDNA 1077 bp，完整开放阅读框 1077 bp，编码 358 个氨基酸，Pt-vp1 蛋白呈疏水性，与平菇 VP 亲缘关系最近，高级结构以无规则卷曲为主；虎奶菇在发酵培养基中静止培养 4 d 后，VP 酶活达到最大值 43.83 U/L；在发酵培养基添加 0~300 μmol/L Mn^{2+}后，虎奶菇胞外 VP 等 Mn^{2+}依赖性过氧化物酶酶活明显升高，当 Mn^{2+}添加量为 200 μmol/L 时，达到最大酶活 91.98 U/L，是对照组的 3.1 倍；Mn^{2+}浓度为 200~500 μmol/L 时，对 *Pt-vp1* 基因转录有显著促进作用，且在 300 μmol/L 的浓度时促进作用最大，为对照组的 5.79 倍。

参考文献

[1] Martinez M J, Böckle B, Camarero S, et al. MnP isoenzymes produced by two *Pleurotus* species in liquid culture and during wheat-straw solid-state fermentation [J]. ACS Symposium Series, 1996, 655: 183-196

[2] Wang Y, Vazquez-Duhalt R, Pickard M A. Manganese lignin peroxidase hybrid from *Bjerkandera adusta*, oxidizes

polycyclic aromatic hydro carbons more actively in the absence of manganese [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(11): 675-682

[3] Kameshwar A K S, Qin W. Lignin degrading fungal enzymes. Production of Biofuels and Chemicals from Lignin. Singapore [M]. Springer, 2016: 81-130

[4] Manavalan T, Manavalan A, Heese K. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi [J]. Current Microbiology, 2015, 70(4): 485-498

[5] Perez-Boada M, Ruiz-Duenas F J, Pogni R, et al. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways [J]. Journal of Molecular Biology, 2005, 354(2): 385-402

[6] Mester, T. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(25): 15412-15417

[7] Ruiz-Dueñas F J, Martínez M J, Martínez A T. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* [J]. Molecular Microbiology, 1999, 31(1): 223-235

[8] Coconi-Linares N, Magana-Ortiz D, Guzman-Ortiz D A, et al. High-yield production of manganese peroxidase, lignin peroxidase, and versatile peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(22): 9283-9294

[9] 王力生,程建波,朱洪龙,等.Mn^{2+}对平菇发酵油菜秸秆木质纤维素酶活性及组织结构的影响[J].农业生物技术学报, 2012,20(6):663-668
WANG Li-sheng, CHENG Jian-bo, ZHU Hong-long, et al. Effect of different Mn^{2+} levels on Activity of lignocellulolytic enzymes and tissue structure in rape straw fermented by *Pleurotus ostreatus* [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(6): 663-668

[10] Ruiz-Dueñas F J, Guillén F, Camarero S, et al. Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4458-4463

[11] Cohen R, Hadar Y, Yarden O. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn^{2+} [J]. Environmental Microbiology, 2010, 3(5): 312-322

[12] 朱刚,吴林,陈明杰,等.草菇锰过氧化物酶编码基因生物信息学分析及其转录水平和酶活性的测定[J].菌物学报,2013, 32(5):919-927
ZHU Gang, WU Lin, CHEN Ming-jie, et al. Bioinformatic, gene expression and enzyme activity analyses of manganese peroxidases in *Volvariella volvacea* [J]. Mycosystema, 2013, 32(5): 919-927

[13] Ma B, Mayfield M B, Godfrey B J, et al. Novel promoter sequence required for manganese regulation of manganese peroxidase isozyme 1 gene expression in *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3(3): 579-588

[14] Okhuoya J A, Etugo J E. Studies of the cultivation of *Pleurotus tuber-regium*, (Fr) Sing. An edible mushroom [J]. Bioresource Technology, 1993, 44(1): 1-3

[15] Romano N, Macino G. Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences [J]. Molecular Microbiology, 1992, 6(22): 3343-3353

[16] Yin C, Zheng L, Zhu J, et al. Enhancing stress tolerance by overexpression of a methionine sulfoxide reductase A (*MsrA*) gene in *Pleurotus ostreatus* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(7): 3115-3126

[17] Wang Z, Ye S F, Li J J, et al. Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): a new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning [J]. BMC Biotechnology, 2011, 11(1): 109-109

[18] Canales M, Lobos S. Molecular modeling of manganese peroxidase from the lignin-degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispora* and structural comparison with other peroxidases [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 1998, 1(2): 85-96

[19] 尹立伟,池玉杰,王雪童,等.灰树花的系统发育分析和主要木质素降解酶的测定[J].林业科学研究,2010,23(4):574-580
YIN Li-wei, CHI Yu-jie, WANG Xue-tong. et al. Phylogenetic analysis and detection on the major ligninolytic enzymes system of *Grifola frondosa* [J]. Forest Research, 2010, 23(4): 574-580

[20] Isikhuemhen O S, Nerud F. Preliminary studies on the ligninolytic enzymes produced by the tropical fungus *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1999, 75(3): 257-260

（下转第 234 页）