

灵芝染料脱色过氧化物酶基因 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的克隆及表达分析

刁文彤^{1,2}, 刘冬梅², 亓希武², 房海灵², 于盱², 李莉², 柏杨², 刘群², 陈泽群², 梁呈元^{1,2}

(1. 南京中医药大学, 江苏南京 210023)

(2. 江苏省中国科学院植物研究所, 江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要: 该研究以灵芝 (*Ganoderma lucidum*) ZJ-1 菌株为研究对象, 通过生物信息学分析和表达分析, 探究灵芝染料脱色过氧化物酶 (Dye-decolorizing Peroxidase, DyP) 基因潜在的作用。该研究克隆得到了灵芝 DyP 基因 *GIDyP1* 和 *GIDyP2*, 编码框长度分别为 1 488 bp 和 1 461 bp, 分别编码 495 和 486 个氨基酸。通过 qRT-PCR 分析, *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 在菌丝阶段的表达量均显著高于其它时期, 表明这两个基因有可能在菌丝阶段参与木质纤维素的降解。在不同基质培养和不同染料诱导的条件下, 对灵芝 *GIDyP* 酶活进行了测定, 同时对 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 进行了表达模式分析。结果显示: 在不同基质中培养, 木屑中酶活最高, 达到 7 330 U/L; 经不同染料诱导, 在甲基橙染料诱导下酶活最高, 达到 1 466 U/L; *GIDyP1* 在花生壳中的表达量最高, 是木屑的 6.5 倍; *GIDyP2* 在木屑中的表达量最高, 是其余基质的 2 倍左右; *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 分别在活性黑 5 和台盼蓝中的表达水平最高, 与对照相比, 分别提高了 4.8 倍和 3.7 倍。以上结果表明 *GIDyP* 可参与灵芝对木质纤维素和染料的降解, 为探究灵芝 *GIDyP* 的生理功能和开发 *GIDyP* 的应用奠定基础。

关键词: 灵芝; 染料脱色过氧化物酶; 基因克隆; 生物信息学; 表达分析

文章编号: 1673-9078(2024)08-140-149

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.0913

Cloning and Expression Analysis of Dye-decolorization Peroxidase Gene in *Ganoderma lucidum*

DIAO Wentong^{1,2}, LIU Dongmei², QI Xiwu², FANG Hailing², YU Xu², LI Li², BAI Yang², LIU Qun², CHEN Zequn², LIANG Chengyuan^{1,2}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To elucidate the potential role of dye-decolorizing peroxidase (DyP) gene in *Ganoderma lucidum*, *G. lucidum* ZJ-1 was evaluated using bioinformatics and expression analysis. To this end, the dye-decolorizing peroxidase genes

引文格式:

刁文彤, 刘冬梅, 亓希武, 等. 灵芝染料脱色过氧化物酶基因 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的克隆及表达分析[J]. 现代食品科技, 2024, 40(8): 140-149.

DIAO Wentong, LIU Dongmei, QI Xiwu, et al. Cloning and expression analysis of dye-decolorization peroxidase gene in *Ganoderma lucidum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 140-149.

收稿日期: 2023-07-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (32102457)

作者简介: 刁文彤 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药食同源真菌功能基因研究, E-mail: diaowentong0726@163.com

通讯作者: 梁呈元 (1972-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药用植物功能基因研究, E-mail: liangcy618@cnbg.net

GIDyP1 and *GIDyP2* were cloned. The coding frame lengths were 1 488 bp and 1 461 bp, encoding 495 and 486 amino acids, respectively. The results of qRT-PCR analysis indicated that the expression levels of the two genes in the mycelium stage were significantly higher than in other stages, suggesting that *GIDyP1* and *GIDyP2* may be involved in the degradation of lignocellulose in the mycelium stage. The activity of GIDyP in *G. lucidum* was determined under different substrate cultures and dye induction conditions, and then the expression patterns of *GIDyP1* and *GIDyP2* were analyzed. The results attributed the highest enzyme activity of 7 330 U/L and 1,466 U/L to wood chips cultured in different substrates and methyl orange dye when induced by different dyes, respectively. *GIDyP1* expression was highest in peanut shells, 6.5 times higher than that in sawdust. By contrast, *GIDyP2* expression was highest in sawdust, 2 times higher than that in the other substrates. Compared with the control, the *GIDyP1* and *GIDyP2* genes showed the highest expression levels in reactive black 5 and trypan blue, with a 4.8-fold and 3.7-fold increase, respectively. These results indicate that GIDyP may participate in the degradation of lignocellulose and dyes by *G. lucidum*. These findings provide a foundation for exploring the physiological function of GIDyP in degrading lignin and dyes, and development of applications for GIDyP.

Key words: *Ganoderma lucidum*; dye-decolorizing peroxidase; gene cloning; bioinformatics; expression analysis

染料脱色过氧化物酶 (Dye-decolorizing Peroxidase, DyP) 是一种新型的血红素过氧化物酶^[1], 其远端血红素区域不同于其它血红素过氧化物酶, 最先在烟管菌 (*Bjerkandera adusta*) 中发现^[2]。在 RedoxiBase 数据库 (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) 中, 根据氨基酸序列的相似性将 DyP 分为四类: A、B、C 和 D 类, A、B 和 C 类主要属于细菌和古生菌, D 类则是来源于真菌^[3], 后 Yoshida 等将 C 类和 D 类合并为新的 V 类, 而 A 类和 B 类分别归类于 I 类和 P 类^[4]。

DyP 具有广泛的底物特异性, 不仅能降解一些典型的过氧化物酶底物, 还能够降解各种类型的染料。Kim 等^[5]发现纯化后的白地霉 (*Geotrichum candidum*) Dec 1 中的 DyP 能使 7 种含偶氮和蒽醌基团的染料脱色, 以及 3 种 RB5 的模型化合物脱色。Sugawara 等^[6]异源表达了阿维菌链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*) 中的 SavDyPrx03-1, 命名为 SaDyP1, 研究发现其对蒽醌类染料酸蓝 324 有脱色作用。Liers 等^[7]从黑木耳 (*Auricularia auricula-judae*) 中纯化了两个 DyP 酶: AjP I 和 AjP II, 发现它们能使蒽醌染料活性蓝 5 和偶氮染料活性黑 5 脱色。近年来, 研究发现 DyP 也具有降解木质素的能力。DyP 已在原核生物中被证实有此方面的生理功能, 例如, 约氏红球菌 (*Rhodococcus jostii*) RHA1 中 DyPB 基因的突变使得其木质素降解活性大大降低^[8]; 弯曲热单胞菌 (*Thermomonospora curvata*) 中的 TcDyP 对木质素底物展示出较高的活性^[9]。文献报道 DyP 也是白腐真菌木质素分解系统的一个重要部分。Salvachúa 等^[10]研究发现来自白囊耙齿菌 (*Irpex lacteus*) 中的

DyP 能够协同纤维素酶降解小麦秸秆。Liers 等^[11]选取了五种来自不同真菌的 DyP, 发现它们均能氧化木质素底物。目前为止关于真菌 DyP 的研究内容还较少, 我们对其具体的功能与应用也知之甚少, 因此越来越受研究者所关注。

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 为多孔菌科 (Polyporales) 灵芝属 (*Ganoderma*) 的药食两用真菌, 作为我国传统的名贵中药材, 已有 2 000 多年的历史, 素有“仙草”“瑞草”“还魂草”之称^[12]。灵芝富含多糖、三萜等多种活性成分, 具有抗肿瘤、免疫调节、降血脂等作用^[13]。作为一种典型的白腐真菌, 灵芝具有降解木质素和使染料脱色的能力^[14]。目前尚未见对灵芝 *GIDyP* 基因的克隆及表达研究的报道。

本研究通过克隆灵芝中的 *GIDyP* 基因 (命名为 *GIDyP1* 和 *GIDyP2*), 并对这两个基因进行生物信息学分析, 测定灵芝菌株在不同培养条件下 *GIDyP* 的活性及 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 基因的表达量水平。这些工作为进一步研究灵芝中 *GIDyP* 的生理功能和开发 *GIDyP* 的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试灵芝菌株 ZJ-1 为本实验室前期分离鉴定^[15]。保藏于江苏省中国科学院植物研究所药食同源课题组。

1.2 培养基

PDA 培养基 (g/L): 39 g 马铃薯葡萄糖琼脂粉末。

PDB 培养基 (g/L): 25 g 马铃薯葡萄糖粉末。

基础培养基 (g/L): 蛋白胨 2 g、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g^[16]。

不同基质培养基 (g/L): 木屑、棉籽壳、花生壳、玉米芯和玉米秸秆五种基质打成粉末后各加 20 g 于基础培养基。固体和液体培养基组分相同, 固体培养基配制时加入 15 g 的琼脂。

不同染料培养基 (mg/L): 在灭菌后的 PDB 中分别加入 50 mg 的甲基橙、12.5 mg 的台盼蓝、25 mg 的活性黑 5 和 50 mg 的活性蓝 19。固体和液体培养基组分相同, 固体培养基配制时换成 PDA。

栽培培养基 (m/m): 木屑 20%、棉籽壳 58%、麸皮 20%、蔗糖 1%、石膏 1%, 含水量 60% 左右, 分装约 750 g 湿料于每个菌袋中, 封口后于 121 °C 高压灭菌 3 h^[15]。

1.3 主要仪器与试剂

主要仪器: ABI SimpliAmp™ Thermal Cycler PCR 仪, 赛默飞世尔科技有限公司; D3024R 低温离心机, 美国 SCIOLOGEX; JY300C 电泳仪和 JY04S-3E 凝胶成像系统, 北京君意东方电泳设备有限公司; SW-CJ-1FD 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; GI54DS 高压蒸汽灭菌锅, 致微仪器有限公司; DNP-9082 恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; QTOWER 2.2 荧光定量 PCR 仪, 德国 Analytik Jena; KYC-100B 恒温摇床, 上海新苗医疗器械制造有限公司。

主要试剂: PhantaMaxsuper-Fidelity、5×TA/Blunt-ZeroCloningMix、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 及 HiS-cript III RT SuperMixforqPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒和 ChamQ SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、氯仿、无水乙醇、CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)、PDA 和 PDB 培养基, 南京寿德生物科技有限公司; 甲基橙、台盼蓝、活性黑 5、活性蓝 19 和 DNA 纯化试剂盒, 上海生工生物工程股份有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 基因的克隆

将灵芝菌丝接种于 PDA 培养基平板上, 28 °C 培养一周, 收集菌丝。采用 CTAB 法提取灵芝菌丝的基因组 DNA^[17], 采用 KK 超快植物总 RNA

提取试剂盒提取 RNA。检测 RNA 浓度后, 使用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 于 -80 °C 保存备用。

根据灵芝转录组数据库中检索到的 *DyP* 基因的 cDNA 序列, 用 Primer Premier 5 软件设计引物, 引物序列分别为 *GIDyP1-F* (5'-ATGGCCTCCACTCTCCCT-3') 和 *GIDyP1-R* (5'-TCACGCCAAGGAGAAAGTG-3'); *GIDyP2-F* (5'-ATGGCTCCCACCGTAGCAC-3') 和 *GIDyP2-R* (5'-TCATGCTAACGCGAAAGTAC-3'), 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 进行 35 个循环; 72 °C 7 min; 16 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 DNA 纯化回收试剂盒回收目的片段, 连接至 5×TA/Blunt-Zero Cloning Mix, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.4.2 生物信息学分析

利用 NCBI 的 Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的 cDNA 序列进行开放阅读框分析, 并将其翻译为氨基酸序列; 利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 对氨基酸序列的理化性质和等电点进行分析; 利用 NCBI 的 CD-Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析基因的保守结构域; 利用 SOPMA (<https://npsa-prabi.ibcp.fr>) 预测蛋白质二级结构; 利用 Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>) 和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线预测软件进行蛋白三级结构预测。通过 NCBI 的 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对氨基酸序列进行相似性分析, 利用 DNAMAN 进行多序列比对, 利用 MEGA 11.0 的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树, Bootstrap 设置为 1 000 次重复。

1.4.3 *GIDyP1*和*GIDyP2*在灵芝不同发育时期的表达模式分析

参照刘等的方法进行灵芝的栽培^[15], 分别于灵芝的菌丝、原基、小菇和大菇阶段取样, 加入液氮将其磨成粉末, 使用 KK 超快植物总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, 使用 HiS-cript III RT SuperMixforqPCR (+gDNA wiper) 反转录试剂盒

反转录成 cDNA 并稀释 5 倍后进行实时荧光定量 PCR。扩增程序为：98 °C 预变性 2 min；98 °C 变性 10 s、58 °C 退火 10 s、72 °C 延伸 15 s，共 39 个循环；72 °C 采集荧光信号。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因的相对表达量，以 β -tubulin 为内参^[18,19]，其引物序列分别是 qBTU-F (5'-CAGTTCACGGCGATGTTCA-3') 和 qBTU-R (5'-CGACGGTAGCATCCTGGTA-3')。GIDyP1 基因的引物序列是 qDyP1-F (5'-GGAGTTCCACGGCTTCTTGA-3') 和 qDyP1-R (5'-CCAAAGGGAAGACGTCGACA-3')；GIDyP2 基因的引物序列是 qDyP2-F (5'-GATTCACGACATTGGCG-3') 和 qDyP2-R (5'-AAGGCGTGTATCCAGTTGGG-3')。

1.4.4 不同条件下 GIDyP 酶活的测定

在 150 mL 的三角瓶中加入 50 mL 含有不同基质和不同染料的液体培养基，灭菌冷却后接种，用打孔器取 7 mm 直径的活化后菌丝块，每瓶接种 8 块，置于 28 °C 摇床内振荡 (180 r/min) 培养一周。每组设置 3 次重复。将摇瓶培养一周后的培养液转移至离心管中，12 000 r/min 离心 10 min，上清液即为粗酶液。

采用活性蓝 19 法^[20]测定粗酶液的染料脱色过氧化物酶酶活。将 100 μ L 样品与 32.5 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 值 3.5)、30 μ mol/L H_2O_2 和 50 μ mol/L 活性蓝 19 混合，总体积为 2 mL，40 °C 水浴加热 10 min，在 595 nm 处测定 OD 值。灭活酶液作为对照。酶活定义为每毫升液体每分钟氧化 1 nmol 底物活性蓝 19 所需的酶量为一个酶活力单位。计算公式：

$$C = \frac{\Delta A \times V_1 \times 10^9}{\varepsilon \times d \times V_2 \times T} = 2 \times 10^5 \times \Delta A \quad (1)$$

式中：

C——酶活，U/L；

V_1 ——反应总体积，mL；

V_2 ——反应中样本体积，mL；

ε ——活性蓝 19 的摩尔消光系数，10 000 L/(mol·cm)；

d ——比色皿光径，cm；

T ——反应时间，min；

ΔA ——反应前后测得吸光度的差值。

1.4.5 GIDyP1 和 GIDyP2 在不同基质和不同染料条件下的表达模式分析

用打孔器取 7 mm 直径的活化后菌丝块，接种

于含有不同基质 (分别是木屑、棉籽壳、花生壳、玉米芯和玉米秸秆) 及不同染料 (分别是甲基橙、台盼蓝、活性黑 5 和活性蓝 19 染料) 的固体培养基中心处，置于 28 °C 培养箱内恒温避光培养一周。提取 RNA，其余同 1.4.3。

1.4.6 数据处理与统计分析

所有实验重复 3 次，结果以平均值标准差表示。用 SPSS 27 软件对数据进行处理，分析其差异显著性， $P < 0.05$ 表示差异显著。利用 GraphPadPrism 9 软件绘制图形。

2 结果与讨论

2.1 基因克隆和生物信息学分析

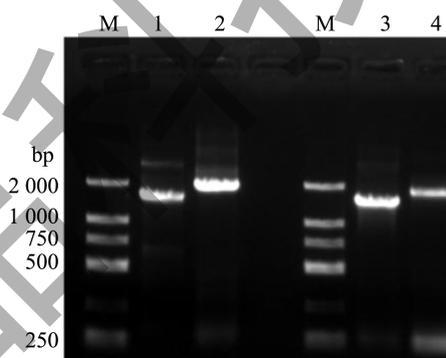


图 1 GIDyP1 和 GIDyP2 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis gels of PCR products of GIDyP1 and GIDyP2

注：1：GIDyP1 cDNA 全长；2：GIDyP1 DNA 全长；3：GIDyP2 cDNA 全长；4：GIDyP2 DNA 全长。

分别以灵芝 cDNA 和基因组 DNA 为模板扩增片段，电泳结果发现均可以得到一条清晰明亮的条带 (图 1)。经测序分析，目的条带与测序结果一致。GIDyP1 和 GIDyP2 均含有 6 个内含子，7 个外显子，所有内含子的剪切位点均符合 GT-AG 规律。GIDyP1 的 cDNA 扩增长度为 1 488 bp，DNA 扩增的片段长度为 1 831 bp，共编码 495 个氨基酸 (图 2a)，所编码的蛋白质相对分子质量为 55.66 ku，等电点为 8.53；GIDyP2 的 cDNA 扩增的片段长度为 1 461 bp，DNA 扩增的片段长度为 1 799 bp，共编码 486 个氨基酸 (图 2b)，所编码的蛋白质相对分子质量为 52.41 ku，等电点为 8.69。根据已有研究发现，真菌 DyP 的氨基酸数量基本在 456~526 之间^[11,21,22]，而本研究克隆得到的 GIDyP1 和 GIDyP2 分别编码 495 和 486 个氨基酸，均符合真菌中 DyP 的报道。

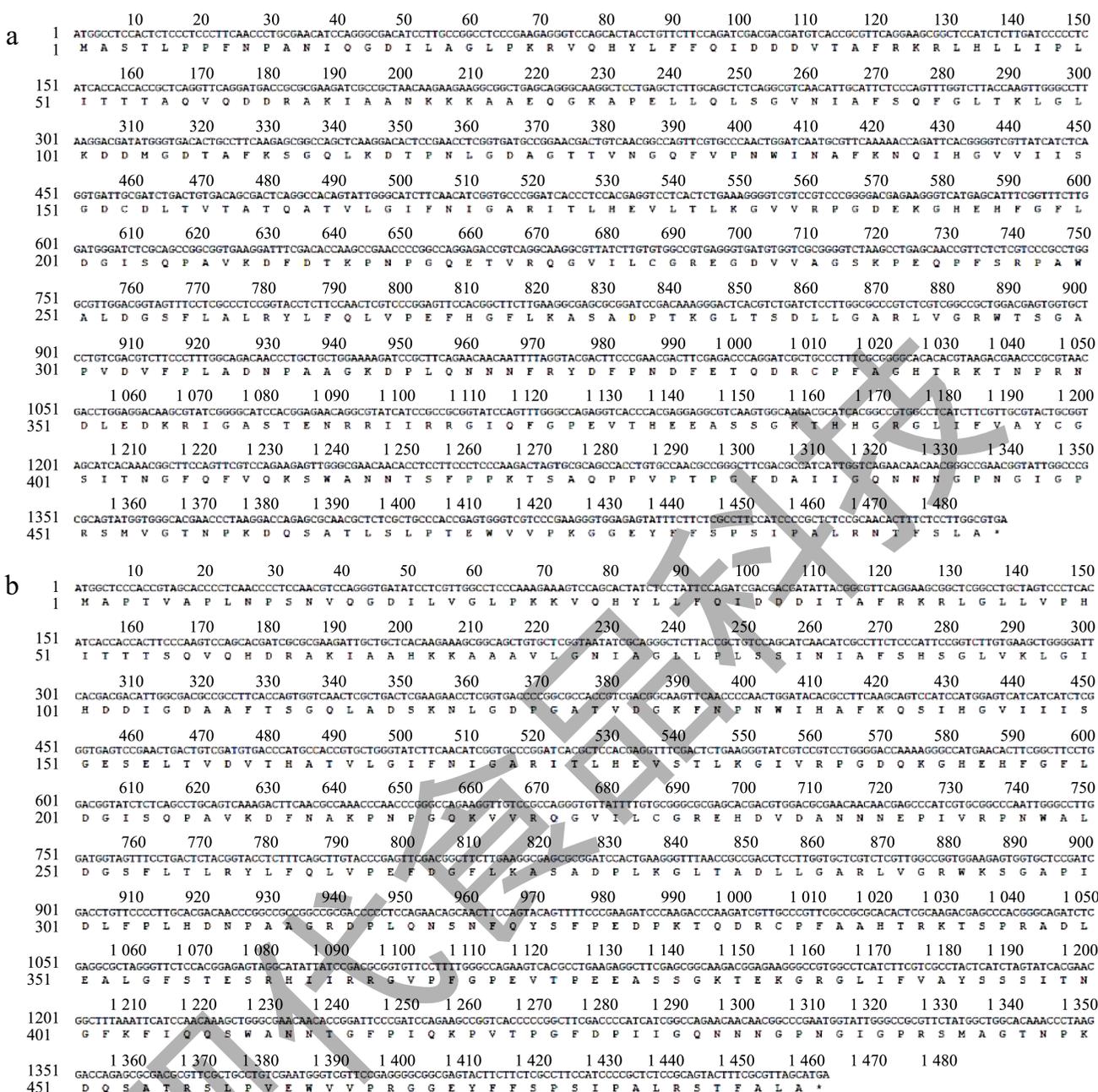


图2 GIDyP1 (a) 和 GIDyP2 (b) 的核苷酸及其氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and amino acid sequences of GIDyP1 (a) and GIDyP2 (b)

利用 NCBI 的 CD-Search 分析 GIDyP1 和 GIDyP2 的保守结构域 (图 3), 发现它们均属于 DyP 过氧化物酶超家族。利用在线程序 SOPMA 对灵芝 GIDyP1 和 GIDyP2 蛋白二级结构进行预测 (图 4a), 它们的二级结构组成较为接近, 主要由无规则卷曲和 α -螺旋组成。GIDyP1 的二级结构中具有无规则卷曲 (Cc) 285 个, 占比 (57.58%) 最高, 其次是 α -螺旋 (Hh) 118 个, 占比 23.84%, 少部分是延伸链 (Ee) 72 个, 占比 14.55%, 还有极少数的 β -折叠 (Tt) 20 个, 占比 4.04%; GIDyP2 的

二级结构中具有无规则卷曲 (Cc) 274 个, 占比 (56.38%) 最高, 其次是 α -螺旋 (Hh) 121 个, 占比 24.90%, 少部分是延伸链 (Ee) 72 个, 占比 14.81%, 还有极少数的 β -折叠 (Tt) 19 个, 占比 3.91%。使用在线工具 Phyre 预测灵芝 GIDyP1 和 GIDyP2 蛋白三级结构模型 (图 4b), GIDyP1 的三级结构可信度为 100.0%, 有 455 个残基, 覆盖率为 92%; GIDyP2 的三级结构可信度为 100.0%, 有 453 个残基, 覆盖率为 93%。一般过氧化物酶中存在远端组氨酸 (H), 而不同的是, DyP 中缺乏远端

H, 取而代之的是天冬氨酸 (D), 因此形成独特的保守区域——GXXDG 基序^[2,22]。本试验通过在线软件 SWISS-MODEL 预测灵芝 GIDyP1 和 GIDyP2 蛋白三级结构, 找到其中 GFLDG 基序中存在的 D (图 b), 符合目前已有的对 DyP 结构的研究。从系统进化树 (图 5) 可看出 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 与同属于多孔菌科的污叉丝孔菌 (*Dichomitus squalens*) 的四个 *DyP* 基因聚为一枝。

2.2 GIDyP1和GIDyP2在灵芝不同发育时期的表达模式分析

广义上来说, 灵芝的生长可以分为营养生长和

其后的生殖生长。营养生长阶段指菌丝生长时期, 菌丝从外部摄取营养, 在菌丝体内积蓄营养成分; 生殖生长阶段指使用积蓄在菌丝体中的营养源, 双核菌丝形成扭结的原基 (子实体分化期), 原基进一步发育成子实体 (生长发育期)^[19]。本研究采用 qRT-PCR 技术检测灵芝在不同发育时期下 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的基因表达水平。由图 6 可知, 在菌丝阶段, *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的表达量均显著高于其它时期。因灵芝的营养生长是生殖生长的前提基础, 定量结果表明 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 基因有可能在菌丝阶段参与木质纤维素的降解。

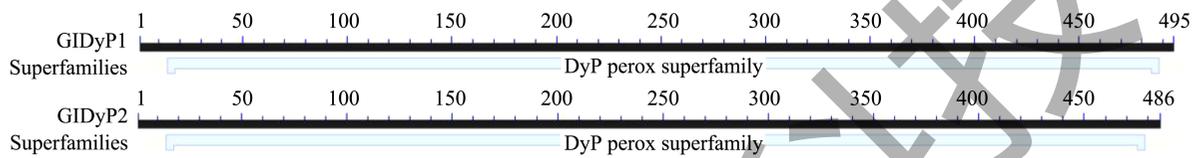


图 3 GIDyP1 和 GIDyP2 的保守结构域

Fig.3 Conserved structural domains of GIDyP1 and GIDyP2

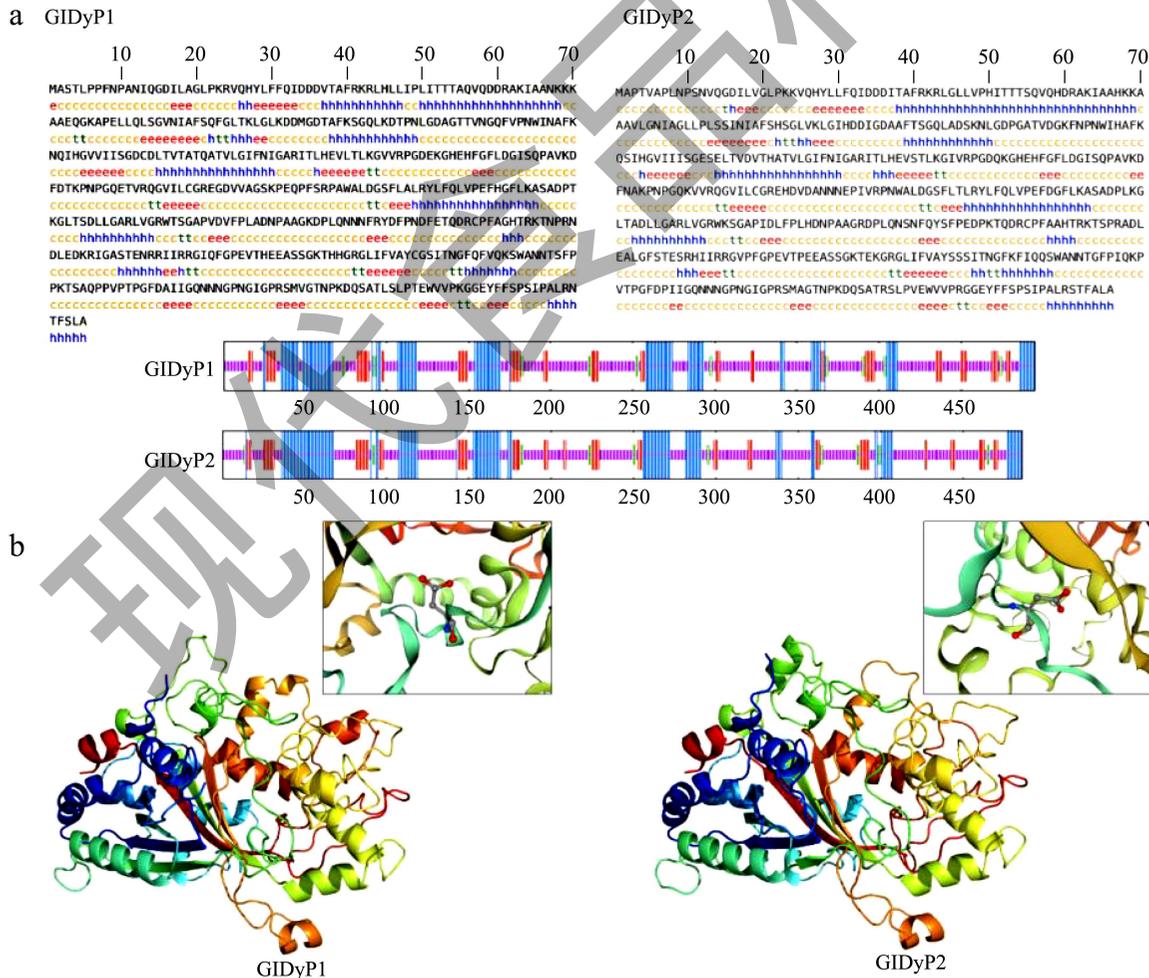


图 4 GIDyP1 和 GIDyP2 二级结构 (a) 及三级结构 (b) 预测

Fig.4 Secondary (a) and tertiary (b) structure predictions for GIDyP1 and GIDyP2

注: b 图两蛋白右上角小图为天冬氨酸 (D) 所在位置。

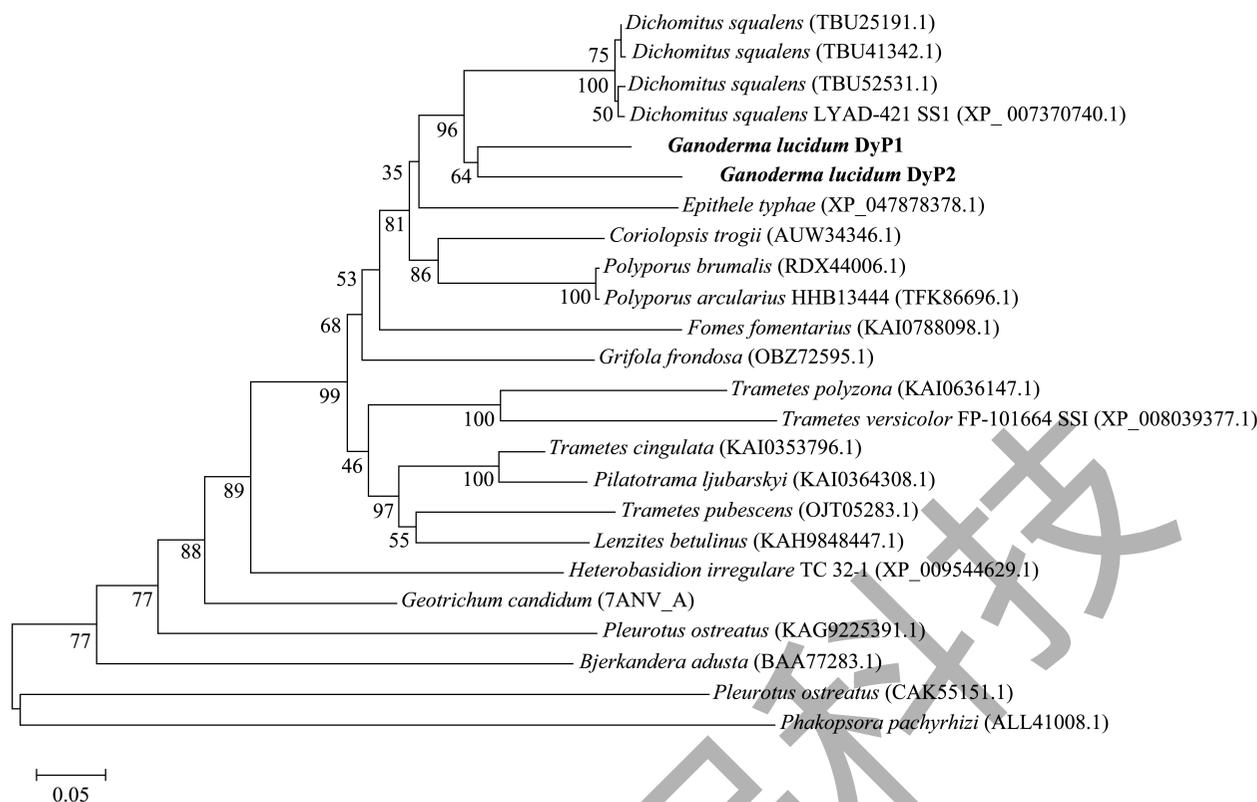


图 5 灵芝 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 与其它物种同源蛋白构建的系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree of *GIDyP1* and *GIDyP2* and homologous proteins from other species

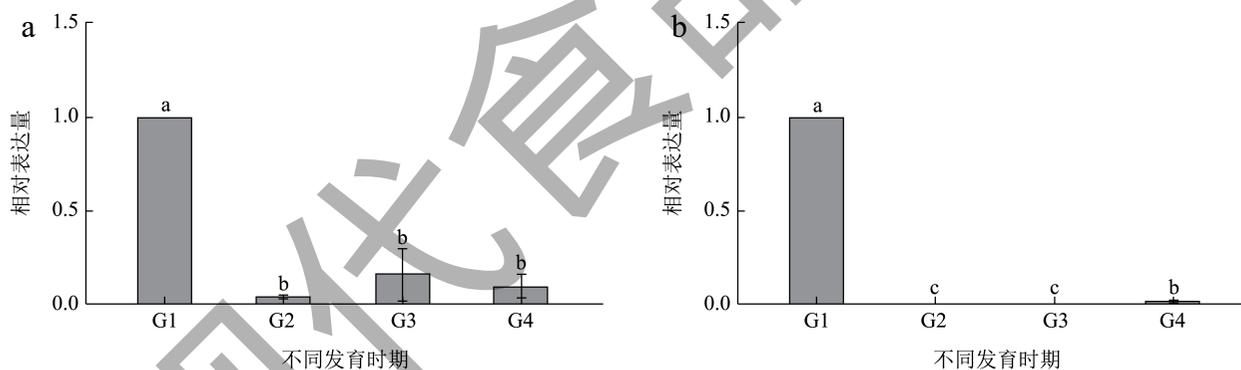


图 6 *GIDyP1* (a) 和 *GIDyP2* (b) 在灵芝不同发育时期中的相对表达量

Fig.6 Relative expression level of *GIDyP1* (a) and *GIDyP2* (b) in *Ganoderma lucidum* at different developmental stages

注: 柱形图上方不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。G1: 菌丝; G2: 原基; G3: 幼嫩子实体; G4: 成熟子实体。

2.3 不同基质诱导下酶活的测定及 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 表达量分析

在不同基质培养下的 *GIDyP* 酶活性有显著的差异, 由表 1 可知, 木屑、棉籽壳、花生壳、玉米芯和玉米秸秆都能诱导产生 *GIDyP*。在木屑、花生壳和玉米秸秆中培养, *GIDyP* 酶活较高, 在木屑中培养产生的 *GIDyP* 酶活高达 7 330 U/L, 花生壳中培养产生的 *GIDyP* 酶活 (6 131 U/L) 仅次于木屑, 差异不显著。在棉籽壳和玉米芯培养中 *GIDyP* 酶活较低, 在棉籽壳中的酶活有 2 132 U/L, 在玉米芯中培

养产生酶活仅有 1 866 U/L。其中在花生壳和玉米秸秆中的 *GIDyP* 酶活无显著差异, 在棉籽壳和玉米芯中的 *GIDyP* 酶活差异也不显著。由此可见, 不同培养基质对 *GIDyP* 酶的活力有明显影响。以上结果表明 *GIDyP* 参与灵芝对木质纤维素的降解。

目前, 许多富含木质纤维素的农林废弃物被开发用于食药菌的栽培, 其中木屑、棉籽壳、玉米芯等是培养灵芝较为常见的基质^[23]。食药菌可以通过自身分泌的木质素降解酶来分解基质中的木质素。参与木质素降解的酶有漆酶 (Laccase, Lac)、

锰过氧化物酶 (Manganese Peroxidase, MnP)、木质素过氧化物酶 (Lignin Peroxidase, LiP)、多功能过氧化物酶 (Versatile Peroxidase, VP) 和 DyP^[24]。在刺芹侧耳中, 不同培养基液体发酵液中的 Lac 活性在花生壳中最高, LiP 的活性在玉米芯基质中最高^[16]。赵风云等^[25]在研究棉籽壳和蔗渣对灵芝中 Lac 的影响时发现, 棉籽壳基质培育下的 Lac 活性比蔗渣高。胡越等^[26]研究 Mn²⁺ 对糙皮侧耳木质素降解酶活性的影响时发现, 加入 Mn²⁺ 对 MnP 和 Lac 均有促进作用, 对 LiP 有抑制作用。田云恒等^[27]研究发现加入 Mn²⁺ 可以显著提高虎奶菇 (*Pleurotus tuberregium*) VP 酶产量, 且能促进 Pt-vp1 蛋白表达。目前对木质素降解酶的研究主要集中在 Lac、MnP、LiP 和 VP, 对 DyP 酶的研究较少。DyP 作为一种新型的血红素过氧化物酶, 其生理作用和功能有待研究。

表 1 不同基质对 GIDyP 酶活的影响

Table 1 The effects of different substrates on GIDyP activity

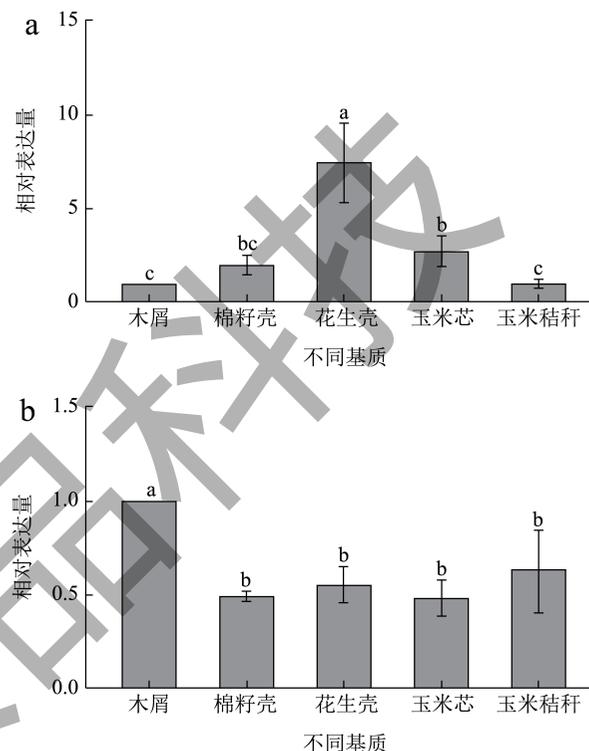
编号	基质	酶活/(U/L)
1	木屑	7 330 ± 832.3 ^a
2	棉籽壳	2 132 ± 807.9 ^c
3	花生壳	6 131 ± 944.9 ^{ab}
4	玉米芯	1 866 ± 230.8 ^c
5	玉米秸秆	4 931 ± 305.3 ^b

注: 第 3 列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

采用 qRT-PCR 技术检测灵芝菌丝在不同基质生长下 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的基因表达水平。由图 7 可知, *GIDyP1* 基因在花生壳中的表达量最高, 比在木屑中培养高出 6.5 倍左右, 在棉籽壳、木屑和玉米芯中的表达量较低, 差异不显著, 在玉米秸秆中的表达量最低。*GIDyP2* 基因在木屑中的表达量最高, 是其余四种基质的 2 倍左右, 在其余四种基质中的表达量较低, 差异不显著。李军平^[28]发现香菇 (*Lentinula edodes*) 中的 6 个木质素降解酶基因在木屑和稻草这两种基质中的表达水平也有明显差异。这与本试验结果相似, 不同的基质对 *GIDyP* 的表达水平影响有差异。

其中, *GIDyP1* 的表达量与酶活趋势并不一致, 而 *GIDyP2* 的表达量与酶活趋势相似。可能是由于所测的酶活是总的 *GIDyP* 酶活性, 是受到灵芝中所有 *GIDyP* 共同作用的结果。当分别对 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的相对表达量进行分析时, 无法将其中之一代表总体的 *GIDyP* 表达量。杨焕玲等^[29]在研究高

温胁迫对香菇锰过氧化物酶基因 *LeMnP1* 基因表达量及酶活性的影响时发现, 基因表达量与酶活性并不一致。艾柳英等^[30]研究发现松杉灵芝在加了 Cu²⁺ 的培养基中生长 Lac 活性比在不加 Cu²⁺ 的培养基中高, 但其相对表达量却没有提高, 推测是该试验克隆的 *Lac* 基因表达量不能代表 *Lac* 的整体表达量, 且基因可能没有翻译成蛋白质。

图 7 *GIDyP1* (a) 和 *GIDyP2* (b) 在不同基质培养的菌丝中的相对表达量Fig.7 Relative expression levels of *GIDyP1* (a) and *GIDyP2* (b) in mycelium cultured in different substrates

注: 柱形图上方不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

2.4 不同染料诱导下酶活的测定及表达量分析

不同染料诱导下的 *GIDyP* 酶活性有差异, 具体结果见表 2。经甲基橙染料诱导下 *GIDyP* 的酶活最高, 可达 1 466 U/L, 其余依次是台盼蓝、活性黑 5、活性蓝 19, 四者差异均不显著。显然与不加染料的空白对照相比, 灵芝菌丝在四种加了染料的培养基中生长, 都能产生较高的 *GIDyP* 酶活, 因此, 可以说明染料能够诱导 *GIDyP* 酶的产生。以上结果表明 *GIDyP* 可参与灵芝对染料的降解。

采用 qRT-PCR 技术检测灵芝菌丝在不同染料诱导下 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的基因表达水平。由图 8 可知, *GIDyP1* 在活性黑 5 中的表达量最高,

比空白组提高了 4.8 倍左右, 然后是活性蓝 19、甲基橙, 在台盼蓝中表达量最低。而 *GIDyP2* 基因在台盼蓝中的表达量最高, 比空白组提高了 3.7 倍左右。其它依次为甲基橙、活性黑 5 和活性蓝 19, 其中甲基橙和活性黑 5 的表达量差异不显著。

表 2 不同染料对 *GIDyP* 酶活的影响Table 2 The effects of different dyes on *GIDyP* activity

编号	基质	酶活/(U/L)
1	空	266.5 ± 115.4 ^b
2	甲基橙	1 466 ± 115.4 ^a
3	台盼蓝	1 400 ± 346.4 ^a
4	活性黑 5	1 333 ± 115.5 ^a
5	活性蓝 19	1 100 ± 141.4 ^a

注: 第 3 列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

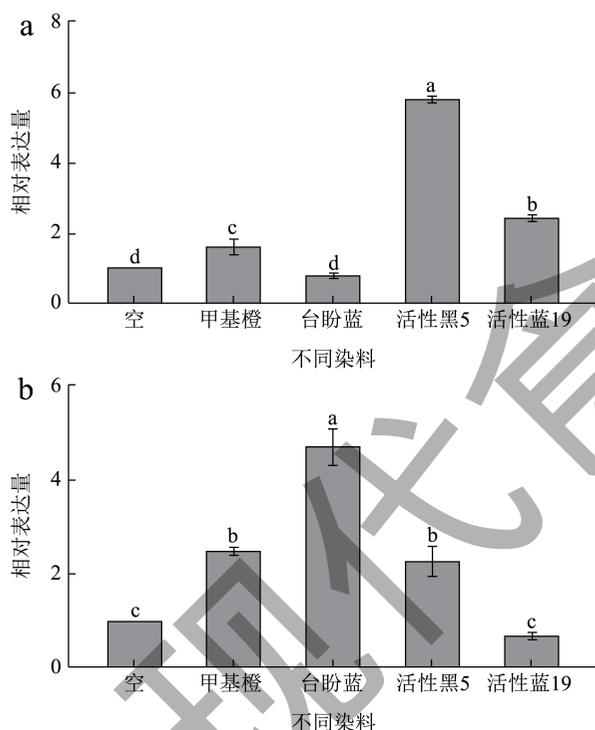


图 8 *GIDyP1* (a) 和 *GIDyP2* (b) 在不同染料培养的菌丝中的相对表达量

Fig.8 Relative expression levelsof *GIDyP1* (a) and *GIDyP2* (b) in mycelium cultured with different dyes

注: 柱形图上方不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$)。

DyP 的特点是能够有效地使染料脱色, 本试验选取了四种染料, 其中甲基橙、台盼蓝、活性黑 5 属于偶氮染料, 活性蓝 19 属于蒽醌染料, 发现它们均能诱导 *GIDyP* 酶的产生。Cuamatzi-Flores 等^[31]将平菇菌丝接种于添加乙酰黄 G (AYG)、雷

玛唑亮蓝 R (RBBR) 和酸性蓝 129 (AB129) 染料的培养基中, 研究了不同染料对平菇 *DyP* 活性以及 4 个 *Pleos-DyP* 基因表达的影响, 其中 AYG 是偶氮染料, RBBR 和 AB129 是蒽醌染料。该研究发现添加染料能明显地诱导 *DyP* 酶活, 加入 RBBR、AYG 和 AB129 诱导, 分别在 240、288 和 360 h 时测得最高酶活, 分别为 3 298、2 828 和 1 744 U/L, 均比对照组的最高酶活 1 550 U/L (312 h 时) 要高。本研究中, 在培养基中添加甲基橙、台盼蓝、活性黑 5 和活性蓝 19 诱导 168 h (7 d) 后测得的 *GIDyP* 酶活分别是 1 466、1 400、1 333 和 1 100 U/L, 同样均显著高于对照组的酶活 (266.5 U/L)。还有研究发现在 AYG 和 AB129 染料诱导下, *Pleos-DyP2* 和 *Pleos-DyP4* 的相对表达量比不加染料的表达量提高了 14 倍, 在 RBBR 染料诱导下, *Pleos-DyP1* 的相对表达量提高了 10.37 倍。此结果与本试验结果基本相似。本试验中, 在活性黑 5 染料诱导下, *GIDyP1* 的相对表达量提高了 4.8 倍, *GIDyP2* 的相对表达量提高了 1.3 倍; 加入甲基橙染料诱导分别使 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的相对表达量提高了 0.6 和 1.5 倍; 在台盼蓝染料诱导下, *GIDyP2* 的相对表达量提高了 3.7 倍; 在活性蓝 19 染料诱导下, *GIDyP1* 的相对表达量提高了 1.4 倍。在不同的染料诱导下, 基因的表达量并不一致, 但基本高于不加染料的对照组。

3 结论

本研究克隆了灵芝中 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 基因, 分别编码 495 和 486 个氨基酸, 同时对灵芝 *GIDyP* 酶活进行检测, 并对 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 基因进行了不同条件下的表达模式分析。*GIDyP1* 和 *GIDyP2* 在菌丝阶段的表达量均远远高于其它时期, 表明这两个基因有可能在菌丝阶段参与木质纤维素的降解; 不同基质及多种染料均能诱导 *GIDyP* 的产生, 在木屑基质中培养 *GIDyP* 酶活最高, 其余依次为花生壳、玉米秸秆、棉籽壳和玉米芯; 甲基橙、台盼蓝、活性黑 5 和活性蓝 19 均可诱导 *GIDyP* 的产生; *GIDyP1* 基因在花生壳中的表达量最高, 与木屑相比, 提高了 6.5 倍; *GIDyP2* 基因在木屑中的表达量最高, 比其它基质高了 1 倍左右。*GIDyP1* 在活性黑 5 中的表达量最高, 高出空白组 4.8 倍; *GIDyP2* 基因在台盼蓝中的表达量最高, 比空白组提高了 3.7 倍。以上结果表明 *GIDyP* 可参与灵芝对木质纤维素和染料的降解。在本研究的基础上, 今后将进行 *GIDyP1* 和 *GIDyP2* 的生理功能研究、蛋白表达及其

性质研究,进一步解析 GIDyP 的功能。

参考文献

- [1] SUGANO Y, MURAMATSU R, ICHIYANAGI A, et al. DyP, a unique dye-decolorizing peroxidase, represents a novel heme peroxidase family ASP₁₇₁, replaces the distal histidine of classical peroxidases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(50): 36652-36658.
- [2] GOMI N, YOSHIDA S, MATSUMOTO K, et al. Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products [J]. *Biodegradation*, 2011, 22(6): 1239-1245.
- [3] NIZAR F, QIANG L, BRUNO S, et al. Peroxi Base: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013(D1): 441-444.
- [4] YOSHIDA T, SUGANO Y. A structural and functional perspective of DyP-type peroxidase family [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2015, 574: 49-55.
- [5] KIM S J, SHODA M. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(3): 1029-1035.
- [6] SUGAWARA K, YOSHIDA T, HIRASHIMA R, et al. Characterization of class V DyP-type peroxidase SaDyP1 from *Streptomyces avermitilis* and evaluation of SaDyPs expression in mycelium [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8683.
- [7] LIERS C, BOBETH C, PECYNA M, et al. DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricular-judae* oxidize non phenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85(6): 1869-1879.
- [8] AHMAD M, ROBERTS J N, HARDIMAN E M, et al. Identification of DyPB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase [J]. *Biochemistry*, 2011, 50(23): 5096-5107.
- [9] CHEN C, SHRESTHA R, JIA K, et al. Characterization of dye-decolorizing peroxidase (DyP) from *Thermomonospora curvata* reveals unique catalytic properties of A-type DyPs [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(38): 23447-23463.
- [10] SALVACHUA D, PRIETO A, ANGEL T, et al. Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(14): 4316-4324.
- [11] LIERS C, PECYNA M J, KELLNER H, et al. Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(13): 5839-5849.
- [12] 戴玉成,曹云,周丽伟,等.中国灵芝学名之管见[J].*菌物学报*,2013,32(6):947-952.
- [13] 谢怡琼,王琪瑞,孙思雅,等.灵芝的药理作用和临床应用研究进展[J].*临床医学研究与实践*,2020,5(10):191-193.
- [14] 王茂成,李勇,李世忠,等.食用菌木质素降解菌的筛选及产酶条件优化[J].*贵州农业科学*,2013,41(5):83-86.
- [15] 刘冬梅,孙雪言,严碧云,等.1株野生灵芝的分离鉴定及生物学特性分析[J].*中国食用菌*,2022,41(11):18-23.
- [16] 赵翠敏,杜芳,邹亚杰,等.基于不同基质刺芹侧耳菌丝生长与木质素降解酶的相关性研究[J].*中国食用菌*,2020, 39(11):109-114.
- [17] 殷朝敏.基于DGE技术的糙皮侧耳生长发育相关基因的鉴定及功能研究[D].武汉:华中农业大学,2015.
- [18] XU J, XU Z, ZHU Y, et al. Identification and evaluation of reference genes for qRT-PCR normalization in *Ganoderma lucidum* [J]. *Current Microbiology*, 2014, 68(1): 120-126.
- [19] LIU D, SUN X, DIAO W, et al. Comparative transcriptome analysis revealed candidate genes involved in fruiting body development and sporulation in *Ganoderma lucidum* [J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(8): 514.
- [20] KRAHE N K, BERGER R G, ERSOY F. A DyP-type peroxidase of *Pleurotus sapidus* with alkene cleaving activity [J]. *Molecules*, 2020, 25(7): 1536.
- [21] SUGAWARA K, NISHIHASHI Y, NARIOKA T, et al. Characterization of a novel DyP-type peroxidase from *Streptomyces avermitilis* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2017, 123(4):425-430.
- [22] SUGANO Y, YOSHIDA T. DyP-type peroxidases: recent advances and perspectives [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11):5556.
- [23] 韩嘉钰,魏巍,余梦瑶,等.不同栽培基质对灵芝基质营养物质及胞外酶活的影响[J].*时珍国医国药*,2016,27(3): 715-719.
- [24] ABDEL-HAMID AM, SOLBIATI JO, CANN IK. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications [J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2013, 82: 1-28.
- [25] 赵风云,杨鑫,黄淑君,等.以蔗渣和棉籽壳为基质的灵芝酶活性及其营养对比研究[J].*现代食品科技*,2015,31(1): 84-89.
- [26] 胡越,安运平,郭恒,等.锰离子Mn(II)对糙皮侧耳木质素降解酶活性和原基形成的影响[J].*菌物学报*,2019, 38(1):98-106.
- [27] 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):121-127,234.
- [28] 李军平.香菇木质素降解酶基因在不同基质中表达差异及*lcc12*和*glax*基因功能分析[D].武汉:华中农业大学,2018.
- [29] 杨焕玲,全宗军,赵妍,等.香菇锰过氧化物酶基因(*LeMnPI*)生物信息学分析及高温胁迫下的表达[J].*菌物学报*,2020,39(6):1056-1064.
- [30] 艾柳英,柯萍萍,赖春芬,等.两种食用菌漆酶基因克隆及表达分析[J].*基因组学与应用生物学*,2017,36(10):4197-4205.
- [31] CUAMATZI-FLORES J, ESQUIVEL-NARANJO E, NAVA-GALICIA S, et al. Differential regulation of *Pleurotus ostreatus* dye peroxidases gene expression in response to dyes and potential application of recombinant *Pleos-DyP1* in decolorization [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0209711.