

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201501024

尹立伟, 杨春成, 朱玉, 等. 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 基因克隆与蛋白结构预测[J]. 广西植物, 2015, 35(3): 393–400Yin LW, Yang CC, Zhu Y, et al. Cloning and protein structure prediction of *Ps-mnp1* from *Pleurotus sapidus*[J]. Guihaia, 2015, 35(3): 393–400

紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 基因克隆与蛋白结构预测

尹立伟^{1*}, 杨春成¹, 朱玉¹, 伦志明², 张静²

(1. 安庆师范学院 生命科学学院, 安徽 安庆 246011; 2. 黑龙江农业经济职业学院, 黑龙江 牡丹江 157041)

摘要: 克隆紫孢侧耳 PS1 菌株锰过氧化物酶基因 *Ps-mnp1*, 具有生物降解木质素的活性, 可用于分析锰过氧化物酶的蛋白功能与结构, 并对深入了解紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 基因功能和转录调控具有重要意义。基于 ITS 序列分析, 明确了该菌株的分类地位。根据 GenBank 中白腐菌 MnPs 保守序列设计引物, 采用染色体步移法和逆转录 PCR 法获得 *Ps-mnp1* 基因, GenBank 登录号为 (KP189358.1)。在克隆 *Ps-mnp1* 基因并分析蛋白结构时, 采用多种现代生物信息学技术, 经染色体步移法克隆的 DNA 全长序列后, 利用 contigexpress 拼接软件预测 *Ps-mnp1* 基因的 cDNA 全长序列; 使用 BioEdit 分析软件对 DNA 和 cDNA 核苷酸序列比对; 通过 Augustus 网站预测 RNA 的剪接位点并在 NCBI 上进行同源序列比对校正; 采用基因结构软件对比了解白腐菌 MnPs 基因的内含子/外显子的组成。序列分析表明 *Ps-mnp1* 的 DNA 全长序列 1 854 bp, 具有外显子 14 条和内含子 13 条。从 *Ps-mnp1* 与其它白腐菌 MnPs 基因的内含子/外显子组成分析来看, 紫孢侧耳和糙皮侧耳同属于侧耳属, 但它们之间的 MnPs 基因结构完全不同。*Ps-mnp1* 开放阅读框为 1 095 bp, 起始密码子 ATG, 终止密码子 TAA, 编码 364 aa, 含有 20 aa 残基构成的信号肽序列。采用 MEGA 5.1 软件构建的蛋白系统进化树表明 *Ps-mnp1* 与 6 株白腐菌蛋白聚类在短枝 MnPs, 区分了含有 5 个二硫键组成的长枝 MnPs 组群; 此外, 构建的蛋白同源模型表明, 与刺芹侧耳多功能过氧化物酶相似度为 72.51%, 蛋白配体中结合位点有 1 个含铁血红素、2 个钙离子、1 个锰离子等, 这些结合位点为不守恒。该研究为紫孢侧耳锰过氧化物酶的结构, 蛋白功能 *Ps-mnp1* 奠定了基础, 并进一步为 *Ps-mnp1* 的蛋白质工程改造提供借鉴作用。

关键词: 紫孢侧耳; 锰过氧化物酶; 蛋白结构; 生物信息学; 同源建模

中图分类号: S718.81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0393-08

Cloning and protein structure prediction of *Ps-mnp1* from *Pleurotus sapidus*

YIN Li-Wei^{1*}, YANG Chun-Cheng¹, ZHU Yu¹, LUN Zhi-Ming², ZHANG Jing²

(1. School of Life Sciences, Anqing Teachers College, Anqing 246011, China; 2. Heilong Jiang

Agricultural Economy Vocational College, Mudanjiang 157041, China)

Abstract: To clone the manganese peroxidase gene *Ps-mnp1* from *Pleurotus sapidus* PS1 contributing a lot to the lignin biodegradation activity is important for the analysis of protein structure and functions of MnP and the understanding of manganese peroxidase gene function and transcriptional regulation of *Pleurotus sapidus*. Based on the analysis of ribosomal rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences, the classification status of the strain PS1 was defined. *Ps-mnp1* was cloned by using the methods of Genome Walking-PCR and Reverse transcription-PCR with primers designed from some white-rot fungi which contains the conserved sequences of the known manganese peroxidase genes (GenBank No. KP189358.1). We used a variety of modern bioinformatics technology softwares to

收稿日期: 2015-01-20 修回日期: 2015-03-26

基金项目: 安徽省自然科学基金(AQKJ2014B008); 安庆师范学院科研启动项目(044-K05000130030)。

作者简介: 尹立伟(1981-), 女, 黑龙江双鸭山人, 博士, 讲师, 主要从事植物病理学, 分子真菌学等教学与研究, (E-mail)kaixinliwei@163.com。

* 通讯作者

clone the manganese peroxidase gene and analyze the protein structure of *Ps-mnp1*. For example, after the cloning full length DNA sequence of genome walking method, prediction of the full cDNA sequence of manganese peroxidase gene by using contigexpress splicing software; comparison the DNA and cDNA nucleotide sequences alignment analysis by using BioEdit software; prediction the RNA splice site through Augustus website, following the comparison and correction of *Ps-mnp1* sequences by using the the NCBI database; understanding the compositions of the intron and exon by using online software Gene Structure Display Server contrast of white rot fungus manganese peroxidase gene. The results obtained in the sequence analysis of *Ps-mnp1* from *Pleurotus sapidus* indicated that the full length of the DNA was 1 854 bp containing 14 exons and 13 introns. Meanwhile, exons and introns composition analysis of the genes *Ps-mnp1* from *Pleurotus sapidus*, compared to other white-rot fungi manganese peroxidase genes, suggested that *P. ostreatus* and *P. sapidus* belonged to the same genus *Pleurotus*, but the manganese peroxidase gene structures between them were entirely different. The *Ps-mnp1* gene included a signal peptide of 20 amino acids and held Open Reading Frame of 1 095 bp, with start codon ATG and stop codon TAA, encoding 364 amino acids. The results of protein phylogenetic analysis by MEGA 5.1 software revealed that *Ps-mnp1* and 6 strains of white rot fungus protein clustered on short branches MnPs, and differentiated 5 long branches of MnPs group formed by disulphide bond. In addition, the 3D structures of *Ps-mnp1* were built using homology modelling technique, and the results showed that the binding sites of the protein ligand included 1 Fe heme, 2 Ca ions and 1 Mn(II), and the those sites were non-conservation. The results also suggested that the modelling similarity was 72.51% compared with *P. eryngii* VPs. This paper could establish the basis of the study in the structure and function of the *Ps-mnp1*. It is further helpful to offer reference on the variation of protein engineering of the *Ps-mnp1*.

Key words: *Pleurotus sapidus*; manganese peroxidase; protein structure; bioinformatics; homology modeling

锰过氧化物酶(Manganese peroxidases/MnPs; EC1.11.1.13)通过高效的降解木质素中芳香高分子聚合物,以多种复合的形式产生含亚铁血红素的糖蛋白,广泛应用于纸浆漂白与生物降解,以及污水处理行业的染料脱色工艺等。锰过氧化物酶(MnPs)基因家族在弯孢拟蜡孔菌(*Ceriporiopsis subvermispore*)中最多可分泌 11 种的 MnPs 同工酶(Urzúa *et al.*, 1995; Ryu *et al.*, 2013)。侧耳属隶属于担子菌门(Basidiomycota)、蘑菇目(Agaricales)、侧耳科(Pleurotaceae),侧耳属中紫孢侧耳(*Pleurotus sapidus*),又是人们所俗名的美味侧耳,为一类适应性强、栽培广泛且具有食、药用价值的木腐真菌(Thorn *et al.*, 2000)。在其属内种的鉴定存在严重的同物异名或异物同名现象(刘宇等, 2012; 王呈玉等, 2006),尤其是形态相近品种之间,常给科学研究带来诸多不便。

白腐菌(White rot fungi)分泌的胞外降解木质素系统除锰过氧化物酶(MnPs)外,还包括漆酶(Laccases)和木质素过氧化物酶(Lignin peroxidases/LiPs)和多功能过氧化物酶(Versatile peroxidases /VPs)等(董秀芹等, 2014),由于木质素降解酶的协同作用,使白腐菌对木质素具有很强的降解能力,但 MnPs 在降解木质素的非特异性胞

外氧化还原酶过程中,起着至关重要的作用(Nou-siainen *et al.*, 2014)。Janusza *et al.* (2013)的研究实现了真菌 MnP、Laccase 和 LiP 基因功能和转录表达调控。Cohen *et al.* (2001)研究了平菇侧耳(*P. ostreatus*)木质素降解酶的 MnP 和 VPs 受 Mn^{2+} 的影响,分析了降解木质素酶活性和转录水平。Ruiz-Dueñas *et al.* (1999)的研究克隆了刺芹侧耳(*P. eryngii*) MnPL1 和 MnPL2 的核苷酸和氨基酸序列,建立了蛋白质 MnPL1 和 MnPL2 的分子模型,与真菌黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) LiP(Du *et al.*, 1992)和 *P. chrysosporium* MnP(Johnson *et al.*, 1994)进行同源建模,揭示了木质素降解酶之间多价的催化性能、结构和氨基酸残基的空间排列。目前,关于紫孢侧耳 MnP1 蛋白酶基因克隆和蛋白质结构的预测还未见报道,侧耳属下种间不同菌株间 MnPs 酶基因是否存在差异,且这种差异是否与其降解木质素有相互关系还有待进一步的研究。

本研究克隆了紫孢侧耳 PS1 菌株的 *Ps-mnp1* 基因并进行了蛋白序列的同源性分析以及系统进化树的构建,并在此基础上,建立了 *Ps-mnp1* 成熟蛋白的三维结构模型,本研究结果为今后解析 *Ps-mnp1* 蛋白的功能提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

紫孢侧耳菌株 PS1 (*Pleurotus sapidus* PS1), 购自河北省微生物研究所, 现保藏于安庆师范学院生命科学学院微生物实验室。

1.2 菌丝体制备及 DNA 的提取

切取紫孢侧耳菌落边缘菌丝 5 mm² 的小块, 将菌丝接种在马铃薯 (PDA) 加富平皿培养基中央进行纯培养, 24 °C 黑暗培养 5 d 左右, 待菌丝接近生长到培养皿边缘, 刮取菌落边缘的新鲜菌丝用于基因组 DNA 的提取, 采用 TIANGEN 公司的 DNA 基因组提取试剂盒提取总 DNA。

1.3 紫孢侧耳 ITS 序列扩增

采用真菌 ITS 区域扩增的通用引物 ITS1/ITS4 进行 PCR 的扩增 (郑和斌等, 2006; Gardes *et al.*, 1993)。ITS-PCR 反应体系 (50 μ L): 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L, ITS1-F 和 ITS4-R 引物 (10 μ mol $\cdot$ L⁻¹) 各 1 μ L, rTaq DNA 聚合酶 (5 U $\cdot$ μ L⁻¹) 0.25 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 补充 37.75 μ L。PCR 扩增程序如下: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.2 % 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并回收产物测序送往上海生工。

1.4 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的基因克隆

根据 GenBank 中白腐菌 MnPs 保守序列设计引物用于 PCR 扩增, 上游引物 PS1-F 为 5'-CGCT-TGACATTCCACGACGCTAT-3', 下游引物 PS1-R 为 5'-GATCGGCTGCAGCGATCGTGTG-3'。利用试剂盒分别提取紫孢侧耳的基因组总 DNA 和 RNA, 以提取的该基因组 DNA 和反转录获得的 cDNA 为模板进行 *Ps-mnp1* DNA 与 cDNA 序列的 PCR 扩增。*Ps-mnp1* 基因 cDNA 全长序列利用两步法逆转录 (RT-PCR) 试剂盒; *Ps-mnp1* 基因 DNA 全长序列, 采用染色体步移法 (Genome Walking-PCR) 扩增基因的侧翼序列 (吴书景等, 2012), 是克隆新基因最为简便快捷的一种方法。根据目的片段设计 5' 端区域和 3' 端区域各三条引物, 染色体步移经过三次套式 PCR 的扩增体系、温度条件、循环数、凝胶、回收目的片段并测序等, 以上具体操作步骤, 参照各试剂说明书或克隆技术操作程序进行。

1.5 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的生物信息学分析

在克隆 *Ps-mnp1* 基因并分析其蛋白结构时, 采用多种现代生物信息学技术 (尹立伟, 2013; Yang *et al.*, 2012), 经染色体步移法克隆的 DNA 全长序列后, 利用 contigexpress 拼接软件, 预测 *Ps-mnp1* 基因的 cDNA 全长序列; 使用 BioEdit 分析软件对 DNA 和 cDNA 核苷酸序列比对; 通过 RNA 剪接位点 (内含子/外显子) Augustus 预测网站 (<http://augustus.gobics.de/>) 预测内含子和外显子的位置和数量, 并在 NCBI 上进行同源比对并校正序列。采用 ORF Finder 软件查找该基因的 ORF, 分析起始密码子和终止密码子的正确位置; 采用 Gene Structure Display Server 2.0 在线软件对比白腐菌 *MnPs* 基因的内含子和外显子各组成分析; 与其它白腐菌木质素降解酶之间的差异, 采用 NJ 法构建出紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的蛋白系统进化树。使用 SignalP 4.1 Server 软件 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对 *Ps-mnp1* 的信号肽进行预测并利用在线软件 SWISS-MODEL 数据库 (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行同源三维结构开展模型构建工作。

2 结果与分析

2.1 紫孢侧耳 ITS 序列扩增及分析

紫孢侧耳的 ITS 区域 PCR 扩增产物经测序获得 679 bp 的核苷酸序列。将该序列提交到 GenBank 登录号为 KP189359 的鉴定结果表明, 1~31 bp 为 18S rDNA 基因序列, 32~263 bp 为内转录间隔区 (ITS1) 序列, 264~421 bp 为 5.8S rDNA 编码序列, 422~619 bp 为内转录间隔区 (ITS2) 序列, 620~679 bp 为 28S rDNA 序列。在 GenBank 中, 菌株 PS1 与 1 株来自中国科学院提交的紫孢侧耳 (*Pleurotus sapidus*) 菌株 S047 亲缘关系最为密切, 二者提交的 ITS 序列覆盖率 (query coverage) 为 100%, 相似性达 99%。与 102 个菌株的 BLAST 比对结果表明, 与 30 株糙皮侧耳 (*P. ostreatus*) 不同地域菌株, 提交的 ITS 序列覆盖率为 97%~99%, 相似性为 98%~99%; 与其 12 株紫孢侧耳, 12 株白灵侧耳 (*P. nebrodensis*); 7 株佛洲侧耳 (*P. floridae*); 15 株阿魏侧耳 (*P. eryngii*); 4 株花脸香蘑 (*Lepista sordida*); 9 株侧耳属中不确定种 (*Pleurotus* sp.) 和 5 株未经培养纯化的真菌 (*Un-*

cultured fungus) 相似性都为 98%~99% 之间。与其它单一菌株白黄侧耳 (*Pleurotus cornucopiae*)、杨侧耳 (*P. populinus*)、哥伦比亚侧耳 (*P. columbinus*)、漏斗状侧耳 (*P. sajor-caju*)、长柄侧耳 (*P. spodoleucus*)、麻盖菌属雷丸 (*Laccoccephalum mylittae*) 和大伏革菌 (*Phlebiopsis gigantea*) 相似性都为 99%。从上述 ITS 转录间区的鉴定表明紫孢侧耳菌株 PS1 位于侧耳属的分子系统关系,但从侧耳属同源性搜索来看,侧耳属下种及其种间亲缘关系十分密切,极易发生变异变种。

2.2 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的基因克隆结果与分析

以提取的侧耳基因组 DNA 为模板,以 Ps1-F 和 Ps1-R 引物进行 PCR 扩增,设置空白对照 CK, (图 1 中第 1 泳道),经测序获得 *Ps-mnp1* 的 DNA 基因片段为 639 bp, (图 1 中第 2~3 泳道)。在已获得的目的基因序列上,利用 Genome Walking-PCR 扩增 *Ps-mnp1* 的 5' 端区域序列和 3' 端区域序列,经过三次套式 PCR 的三条 *Ps-mnp1* 5' 和 3' Walking PCR 引物扩增, *Ps-mnp1* 5' 端区域序列在第三次 PCR 扩增中 *Ps-mnp1*-5' SP3-AP2 经回收测序得到 926 bp (图 1 中第 4~5 泳道), *Ps-mnp1* 3' 端区域序列在第二次 PCR 扩增中 *Ps-mnp1*-3' SP2-AP3 经测序得到 1 221 bp (图 1 中第 6~7 泳道),利用 contigexpress 拼接软件进行数据分析,重新以提取的紫孢侧耳的基因组总 DNA 和反转录 cDNA 为模板,进行 *Ps-mnp1* DNA 与 cDNA 全长序列的 PCR 扩增,经测序获得 *Ps-mnp1* DNA 全长序列 1 854 bp, *Ps-mnp1* cDNA 全长序列 1 095 bp。 (图 1 中第 8~9 和 10~11 泳道) 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 基因的起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA, 5' 端非翻译区有 58 个核苷酸, 3' 端非翻译区有 125 个核苷酸,编码蛋白 359 氨基酸。经 BLAST 序列比对,结果显示不同木腐真菌降解木质素锰过氧化物酶的核苷酸序列具有一定的同源性,紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的 DNA 和 cDNA 全长序列与其它木腐菌核苷酸同源性分别为 84% 和 92%,紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的 DNA 全长序列与糙皮侧耳的 Mnp2 基因同源性最高,序列相似性达到 84%,与 2 株阿魏侧耳的 Mnp3 序列相似性达到 80%~84%,与其它木腐菌 *MnPs* 基因的相似性也达到 66% 以上,确定紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 为新基因序列,GenBank 注册新基因登录号为 KP189358.1。



图 1 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的基因克隆

Fig. 1 Clone of the *Ps-mnp1* gene from *P. sapidus*

2.3 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 基因的外显子和内含子组成分析

利用 Gene Structure Display Server 2.0 在线软件对紫孢侧耳 (*Pleurotus sapidus*) *Ps-mnp1* KP189358 基因与其它白腐真菌 *MnPs* 基因,包括糙皮侧耳 PC9 (MnP3) FJ594280; 弯孢拟蜡孔菌 (*Ceriporiopsis subvermispora*) (MnP1) AF013257; 香菇 (*Lentinula edodes*) (MnP2) AB306944; 黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) (MnP2) L29039; 变色栓菌 (*Trametes versicolor*) MnP2 (Z30668); 图中名称均为缩写 (如 *Trametes versicolor* MnP2 基因缩写为 Tv-MnP2), 结果见图 2, 表明 6 种白腐菌 *MnPs* 基因均以起始密码子 ATG 开始,不等碱基数的终止密码子 TAA 结束, 变色栓菌 Tv-MnP2 基因中外显子有 6 条,内含子数为 5 条; 黄孢原毛平革菌 Pc-MnP2 基因中有外显子 8 条,内含子数为 7 条; Le-MnP2 基因中外显子 14 条,内含子数为 13 条; 弯孢拟蜡孔菌 Cs-MnP1 基因中有外显子 8 条,内含子数为 7 条; 糙皮侧耳 Po-MnP3 外显子 11 条,内含子数为 10 条,而图中紫孢侧耳 *Ps-Mnp1* 基因中有外显子 14 条,内含子数为 13 条,虽然紫孢侧耳和糙皮侧耳同属于侧耳属,但它们之间的 *MnPs* 基因结构完全不同,紫孢侧耳与其它白腐真菌 *MnPs* 基因的外显子数和内含子数相比,它们在外显子/内含子的排列及碱基数都互不相同,同时暗示它们可能来自不同的祖先。

2.4 白腐菌木质素降解酶的氨基酸序列同源性分析

根据已克隆的紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 基因编码序列 364aa, GenBank 中登录号为 KP189358.1。在 NCBI 网站中检索 19 株白腐菌木质素过氧化物酶基因所编码的全长氨基酸序列,包括糙皮侧耳 Po-

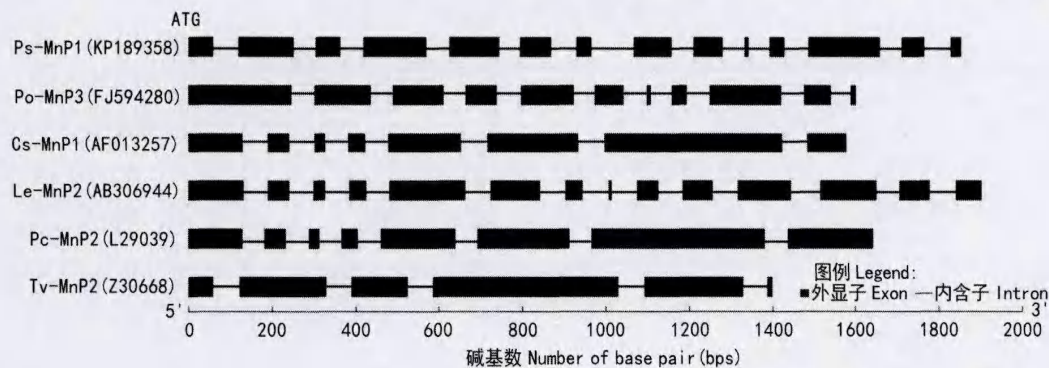


图 2 紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 与其它菌株 *MnPs* 基因相对比的外显子和内含子结构分析
Fig. 2 Intron-exon structure analysis of the genes *Ps-mnp1* from *P. sapidus* compared to other fungal *MnPs* genes

MnP3;香菇 *Le-MnP2*;3 株变色栓菌 *Tv-MnP1*; *Tv-MnP2*; *Tv-MnP3*;3 株黄孢原毛平革菌 *Pc-MnP1*; *Pc-MnP2*; *Pc-MnP3*;4 株弯孢拟蜡孔菌 *Cs-MnP1*; *Cs-MnP2a*; *Cs-MnP2b*; *Cs-MnP3*;地中海嗜蓝孢孔菌 (*Fomitiporia mediterranea*) *Fm-MnP2*;台湾灵芝 (*Ganoderma formosanum*) *Gf-MnP*;脉射菌 (*Phlebia radiata*) *Pr-MnP3*;污叉丝孔菌 (*Dichomitus squalens*) *Ds-MnP*;黄孢原毛平革菌 *Pc-LiPA*;2 株变色栓菌 *Tv-Lac1*; *Tv-Lac2*。构成白腐菌木质素降解酶系统由锰过氧化物酶(*MnPs*)、漆酶(*Laccases*)和木质素过氧化物酶(*LiPs*)这三种酶占有重要地位。对比发现大多数白腐菌 *MnPs* 蛋白规模都在 364~390 aa 之间,而 *Laccases* 蛋白大于 500 aa, *LiPs* 蛋白长度与 *MnPs* 相似(表 1)。

2.5 白腐菌木质素降解酶的氨基酸序列同源性分析

利用 NCBI 中 blastp 软件分析,17 条 *MnPs*、1 条 *LiP* 和 2 条 *Laccases* 蛋白序列,从白腐菌总的木质素降解酶蛋白序列同源性分析来看(表 2)。*Ps-mnp1* 与其它白腐菌 *MnPs* 蛋白序列之间的相似性都在 50% 以上, *Ps-MnP1* 与 *Pc-LiPA* 也存在 53% 的相似性,结果显示 *MnP* 与 *LiP* 都是含有血红素辅基的同功酶过氧化物酶系组成的降解木质素的主要成分。在分析变色栓菌 *Tv-MnP1*、*Tv-MnP2*、*Tv-MnP3* 同工酶蛋白之间同源性在 64% 以上;黄孢原毛平革菌 *Pc-MnP1*; *Pc-MnP2*; *Pc-MnP3* 同工酶蛋白之间同源性在 82% 以上;弯孢拟蜡孔菌 *Cs-MnP1*; *Cs-MnP2a*; *Cs-MnP2b*; *Cs-MnP3* 同工酶蛋白之间同源性达 74% 以上;白腐菌 *MnPs*、*LiP* 与两个外源菌 *Tv-Lacs* 同工酶蛋白相比,最高相似达 37%。结合表 1 和表 2 来看,编码蛋白 *MnPs* 基因

表 1 白腐菌木质素降解酶系统
(锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶)
Table 1 Ligninolytic enzymes of white rot fungi
(*MnPs*, *Laccases* and *LiPs*)

序号 Sequence	菌株名称 Genus/ species	名称缩写 Abbr.	蛋白质 规模 Protein size	蛋白 登录号 Protein No.
1	紫孢侧耳(<i>Pleurotus sapidus</i>) <i>MnP1</i>	<i>Ps-MnP1</i>	364	KP189358.1
2	糙皮侧耳(<i>P. ostreatus</i>) <i>MnP3</i>	<i>Po-MnP3</i>	364	Q6KB26
3	香菇(<i>Lentinula edodes</i>) <i>MnP2</i>	<i>Le-MnP2</i>	376	BAG72080.1
4	变色栓菌(<i>Trametes versicolor</i>) <i>MnP1</i>	<i>Tv-MnP1</i>	364	AAT90348.1
5	变色栓菌(<i>T. versicolor</i>) <i>MnP2</i>	<i>Tv-MnP2</i>	365	CAA83148.1
6	变色栓菌(<i>T. versicolor</i>) <i>MnP3</i>	<i>Tv-MnP3</i>	364	AAT90350.1
7	黄孢原毛平革菌 (<i>Phanerochaete chrysosporium</i>) <i>MnP1</i>	<i>Pc-MnP 1</i>	382	AAA33745.1
8	黄孢原毛平革菌 (<i>P. chrysosporium</i>) <i>MnP2</i>	<i>Pc-MnP 2</i>	382	AAB30859.1
9	黄孢原毛平革菌 (<i>P. chrysosporium</i>) <i>MnP3</i>	<i>Pc-MnP 3</i>	382	AAB39652.1
10	弯孢拟蜡孔菌 (<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>) <i>MnP1</i>	<i>Cs-MnP 1</i>	388	AAC05222.1
11	弯孢拟蜡孔菌 (<i>C. subvermispora</i>) <i>MnP2a</i>	<i>Cs-MnP2a</i>	387	AAD43581.1
12	弯孢拟蜡孔菌 (<i>C. subvermispora</i>) <i>MnP2b</i>	<i>Cs-MnP 2b</i>	387	AAD45724.1
13	弯孢拟蜡孔菌 (<i>C. subvermispora</i>) <i>MnP3</i>	<i>Cs-MnP 3</i>	389	AAD45725.1
14	地中海嗜蓝孢孔菌 (<i>Fomitiporia mediterranea</i>) <i>MnP2</i>	<i>Fm-MnP2</i>	369	ADK60890.1
15	台湾灵芝 (<i>Ganoderma formosanum</i>) <i>MnP</i>	<i>Gf-MnP</i>	364	ABB77243.1
16	脉射菌(<i>Phlebia radiata</i>) <i>MnP3</i>	<i>Pr-MnP3</i>	362	Q96TS6.1
17	污叉丝孔菌 (<i>Dichomitus squalens</i>) <i>MnP1</i>	<i>Ds-MnP1</i>	395	AAF31329.1
18	黄孢原毛平革菌 (<i>P. chrysosporium</i>) <i>LiPA</i>	<i>Pc-LiPA</i>	373	CAA68373
19	变色栓菌 (<i>Trametes versicolor</i>) <i>Laccase 1</i>	<i>Tv-Lac1</i>	520	BAD98305
20	变色栓菌(<i>T. versicolor</i>) <i>Laccase 2</i>	<i>Tv-Lac2</i>	527	BAD98308

长度相近,它们为白腐菌同一菌种 *MnPs* 的同工酶或等位基因的同源性也很高。但可以看出紫孢侧耳

表 2 已知木质素降解酶的蛋白序列同源性分析
Table 2 Percent identity of amino acid sequences among known Ligninolytic enzymes

序号 Sequence	名称缩写 Abbr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	Ps-MnP1		58	51	57	63	62	53	53	51	46	51	50	48	54	58	60	50	55	47	41
2	Po-MnP3			43	52	54	52	48	48	46	43	44	44	45	48	77	54	43	56	50	30
3	Le-MnP 2				47	49	47	65	65	64	66	68	68	66	51	45	47	67	45	37	41
4	Tv-MnP 1					66	64	52	52	54	48	54	54	49	51	52	66	51	55	35	43
5	Tv-MnP2						76	50	50	52	45	51	51	44	55	55	81	50	57	32	33
6	Tv-MnP3							52	52	52	47	49	49	47	49	52	74	49	56	33	70
7	Pc-MnP 1								100	82	70	78	78	72	52	46	50	70	47	49	43
8	Pc-MnP 2									82	70	78	78	72	52	46	50	70	47	49	43
9	Pc-MnP 3										72	76	76	73	53	46	50	74	48	25	50
10	Cs-MnP 1											75	74	92	52	42	44	73	41	28	35
11	Cs-MnP2a													99	75	53	44	50	73	46	33
12	Cs-MnP 2b														74	53	44	50	73	47	33
13	Cs-MnP 3															52	43	45	73	44	38
14	Fm-MnP2																51	51	52	45	36
15	Gf-MnP																	51	45	52	33
16	Pr-MnP3																		50	56	22
17	Ds-MnP1																			53	34
18	Pc-LiPA																				25
19	Tv-Lac1																				
20	Tv-Lac2																				61

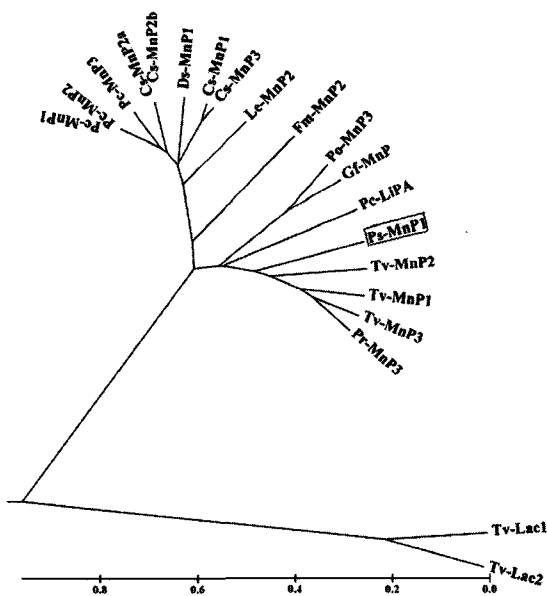
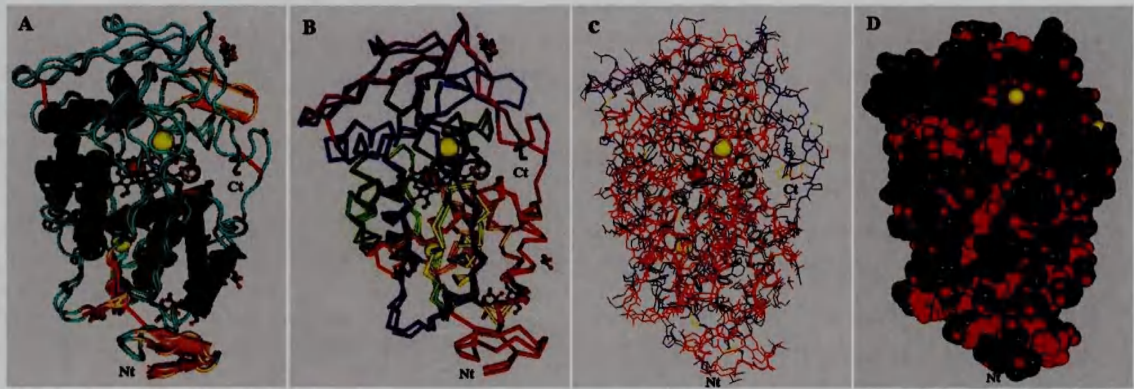


图 3 系统树基于不同白腐菌锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶的蛋白遗传距离
Fig. 3 Phylogenetic tree based on the genetic distances among protein sequences of MnPs, LiPs and Laccases from white rot fungus

与糙皮侧耳,虽然位于同一属中两个菌种,所携带的MnP蛋白长度相同,但它们之间同源性较低,为58%。

2.6 构建紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 蛋白系统发育树

利用上述 20 个白腐菌木质素降解酶蛋白序列,首先在 ClustalX 2.0 软件中进行蛋白序列的完全比对,将其结果转入 MEGA 5.1 软件中,采用 Neighbor-Jioning 法构建紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 蛋白系统发育树。基于 MnPs、LiP 和 Laccases 的氨基酸序列之间遗传距离的远近,树枝状的分支类型更能体现出白腐菌木质素降解酶蛋白之间的亲缘关系。图 3 结果表明,紫孢侧耳 *Ps-MnP1* 与白腐菌 *Po-MnP3*、*Gf-MnP*、*Pr-MnP3*、3 个 *Tv-MnPs* 和 *Pc-LiPA* 聚类接近为一组,此组蛋白主要原因是由 4 个二硫键的 8 半胱氨酸组成的短枝 MnPs。另外,明显分支较远的白腐菌 *Fm-MnP2*、*Le-MnP2*、*Ds-MnP*、4 个 *Cs-MnPs*、3 个 *Pc-MnPs*,此组蛋白聚类有 5 个二硫键组成的长枝 MnPs 为一组,并且发现白腐菌同一菌种 MnPs 的同工酶或等位基因会较为接近的聚类在一起。此外,2 个变色栓菌 *Tv-Lacs* 同工酶蛋白明显远离于 MnPs 和 LiPs 蛋白,作为外源群组。构建的蛋白系统发育树,同时也揭示了白腐菌分泌木质素降解酶系统中 MnPs、LiP 和 Laccases 之间的遗传距离。从此发育树中来看,黄孢原毛平革菌 3 个 *Pc-MnPs* 和 *Pc-LiPA*;变色栓菌 3 个 *Tv-MnPs* 和 2 个 *Tv-Lacs* 同工酶蛋白之间,发

图 4 *Ps-mnp1* 三维结构模型的构建Fig. 4 3D structure model constructions of protein *Ps-mnp1*

生着密切的遗传关系。因此推测,木质素降解过程中是由多种木素降解酶协同作用的结果。

2.7 构建紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 的三维结构模型

采用 SignalP 4.1 Server 系统对紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 氨基酸序列的信号肽进行了预测,使用 Nature Methods 方法预测最可能的信号肽切割位点位于 20~21 aa 之间;ALG-AP, *Ps-mnp1* 前 20 个氨基酸残基为信号肽序列(MAFAKLSALVLALGATVALG),成熟蛋白中 N 末端(N-terminal, Nt)序列:8(APSLNKR_V);C 末端(C-terminal, Ct)序列:343(PS),如图 4 所示位置。

利用在线软件 SWISS-MODEL 三维结构预测工具开展模型构建工作,将紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 作为预测结构蛋白,按照生物学理论,如果两种蛋白质在连续 100 个氨基酸范围内有约 40% 的一致性,那么它们在结构上则具有较为显著的相似性。预测结果显示与刺芹侧耳(*P. eryngii*)多功能过氧化物酶(VPL2)模型最为相似(72.51%);x 射线衍射为 2.80 Å,最终总能量为 11 662.02 kJ · mol⁻¹。蛋白配体中 1 个血红素结合位点含铁原卟啉 IX;2 个钙结合位点;1 个锰结合位点;1 个 N-乙酰葡萄糖胺;翻译后修饰的 3 个(α-甘露糖),这些结合位点为不守恒。

三维结构模型有不同的结构表示形式,图 4 中所示 *Ps-mnp1* 四种不同形状模型包括 A 螺旋模型、B 管状模型、C 线性模型、D 空间模型,它们之间蛋白结构位置是相同的。图 4:A 所示 *Ps-mnp1* 二级蛋白骨架系统中用管柱状、螺旋状、箭头、绳索等连接各结构,显示 1 个 Fe 血红素用红球表示,2 个 Ca 离子用黄球表示,1 个 Mn 离子的结合位点用灰球表示等;虚拟的二硫桥显示 4 处用红色绳索表示;在

空间结构中蛋白的异型差别有 4 处球棍状,在构建的 CSP 循环中存在亮氨酸(Leu)⁶³甘氨酸(Gly)⁷⁰。

3 讨论与结论

该文研究了紫孢侧耳 PS1 菌株 ITS 转录间区的鉴定,明确了该菌种的分类地位,区分侧耳属下种及其种间的亲缘关系,避免菌种混淆,为接下来的研究奠定基础。采用 Genome Walking-PCR 和 RT-PCR 首次克隆出 *Ps-mnp1* 基因,Blast 序列比对结果表明,紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 与其它木腐菌 *MnP*s 基因的核苷酸同源性最高为 84%,确定紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 为新基因序列。*Ps-mnp1* 基因以起始密码子 ATG 开始,终止密码子 TAA 结束,其中有外显子 14 条,内含子数为 13 条,内含子与外显子的连接都是以 GT 开始 AG 结束,符合 GT-AG 法则。推测这些内含子可能是其它基因的外显子,那么一个物种中庞大基因组同时含有几种酶基因也应该是存在的,从中也推导出 *Ps-mnp1* 基因中降解木质素胞外酶系统除 *MnP*s 基因外、可能还有 LiP、Laccase 和 VPs 等其它基因的存在,它们同时具有降解木质素的协同效应。从 6 种白腐菌 *MnP*s 基因的外显子和内含子组成分析来看,白腐菌 *MnP*s 基因的编码序列(外显子)在 DNA 分子上是不连续排列的,由不编码的(内含子)隔开,*MnP* 基因含 n 个内含子,则就会有 n+1 个外显子存在,另外在其 ATG 上游还会有增强子、启动子、5'端非翻译区(5' UTR)及终止子 TAA 下游会有 3'端非翻译区(3' UTR)等结构存在,后续试验将会继续研究。本研究采用的染色体步移法克隆 *Ps-mnp1* 基因的优点

是特异性强,易快速克隆出新基因,但缺点在于测序样品多,造成资金浪费。

从生物信息学角度分析,以紫孢侧耳 *Ps-mnp1* 为主要研究对象, *Ps-mnp1* 全长 cDNA 序列翻译成 364 aa。从侧耳属转录间区同源性搜索来看,侧耳属下种及其种间亲缘关系密切,易发生变种,但从锰过氧化物酶蛋白同源性搜索来看,侧耳属中紫孢侧耳与糙皮侧耳相比,其所携带的 MnP 基因同源性很低,结合两者来看,揭示了属下种间易发生变异,但种内所携带的酶基因变异却很少。若受其诱导条件的影响,能否对基因的内部结构发生改变,为基因的遗传变异带来新的挑战。在构建 *Ps-mnp1* 三维模型时,有三个相似 VPs 蛋白模型同源性分别为 72.51%、72.21% 和 70.5%, 与其相似性最高的 *P. eryngii* VPL2 蛋白模型相比, *Ps-mnp1* 功能位点模拟显示除了包含一个血红素结合位点、两个钙结合位点;还有一个独特表征的 Mn(II)结合位点,成熟蛋白配体所构成的动力学特性表现于 E 43, E 47, 侧链羧酸 D 188, 血红素丙酸 C 13 和 2 个水分子的存在来实现。相对比同源模型的不同之处除增加 Mn(II)离子结合位点外, *Ps-mnp1* 模型中还缺少侧链,但增加了极性分子 H。通过白腐菌木质素降解酶蛋白系统发育树的构建,了解 *Ps-mnp1* 与其它白腐菌遗传距离的远近和亲缘关系,为紫孢侧耳锰过氧化物酶的蛋白结构和功能研究奠定了坚实基础,同时为锰过氧化物酶的蛋白质工程研究提供了一定的理论基础。

参考文献:

- Bai Y, He SY, Zhao GH, *et al.* 2012. Toxoplasma gondii: Bioinformatics analysis, cloning and expression of a novel protein TgIMP1[J]. *Exp Parasitol*, **132**(4):458—464
- Cohen R, Hadar Y, Yarden O. 2001. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn^{2+} [J]. *Environ Microbiol*, **3**(5):312—322
- Dong XQ(董秀芹), Yuan HL(袁红莉), Gao TG(高同国). 2014. Progress in studies of ligninolytic enzymes and genes(木质素降解酶及相关基因研究进展)[J]. *Biotechnol Bull*(生物技术通报), **11**:62—72
- Du P, Collins JR, Loew GH. 1992. Homology modeling of a heme protein, lignin peroxidase, from the crystal structure of cytochrome c peroxidase[J]. *Prot Eng*, **5**(7):679—691
- Gardesm, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. *Mol Ecol*, **2**(2):115—120
- Janusza G, Katarzyna KH, Pawlik A, *et al.* 2013. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation[J]. *Enzyme & Micro Technol*, **52**(1):1—12
- Johnson F, Loew GH, Du P. 1994. Homology models of two isozymes of manganese peroxidase: prediction of a Mn (II) binding site[J]. *Prot-Struct Funct Genet*, **20**(4):312—319
- Liu Y(刘宇), Tolgor(图力古尔). 2012. Molecular phylogeny of Several pleurotoid fungi collected in China(中国侧耳型真菌六个属的分子系统学研究)[J]. *Acta Edulis Fung*(食用菌学报), **19**(3):21—28
- Nousiainen P, Kontro J, Manner H, *et al.* 2014. Phenolic mediators enhance the manganese peroxidase catalyzed oxidation of recalcitrant lignin model compounds and synthetic lignin[J]. *Fung Genet & Biol*, **2**(2):137—149
- Ruiz-Dueñas FJ, Martínez MJ, Martínez AT. 1999. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* [J]. *Mol Microbiol*, **31**(1):223—235
- Ryu SH, Kim B, Kim M, *et al.* 2014. Molecular characterization of manganese peroxidases from white-rot fungus *Polyporus brumalis* [J]. *Biopr & Biosyst Eng*, **37**(3):393—400
- Thorn RG, Moncalvo JM, Reddy CA, *et al.* 2000. Phylogenetic analyses and the distribution of nematophagy support a monophyletic Pleurotaceae within the polyphyletic pleurotoid-lentinoid fungi[J]. *Mycologia*, **92**(2):241—252
- Urzúa U, Larrondo LF, Lobos S, *et al.* 1995. Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispota* [J]. *FEBS Lett*, **371**(2):132—136
- Wang CY(王呈玉), Tolgor(图力古尔), Li Y(李玉). 2006. Review of studies on systematic taxonomy in the genus *pleurotus*(侧耳属真菌系统分类研究概况)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学), **28**(2):158—163
- Wu SJ(吴书景), Chi YJ(池玉杰), Yan HB(闫洪波). 2012. Cloning of Lg-mnp1 Gene Promoter from Basidiomycete *Lenzites gibbosa* (*Lenzites gibbosa* 锰过氧化物酶 1 基因启动子序列的克隆)[J]. *J Northeast For Univ*(东北林业大学学报), **40**(9):107—127
- Yin LW(尹立伟). 2013. Cloning and heterologous expression in *Aspergillus nidulans* of genes encoding manganese peroxidase from *Hericium erinaceum*(猴头菌锰过氧化物酶的基因克隆及构巢曲霉中的表达)[D]. Haerbin(哈尔滨): Dissertation for the Degree of Doctor(东北林业大学博士学位论文)
- Zheng HB(郑和斌), Ma ZG(马志刚), Lü ZZ(吕作舟), *et al.* 2006. Identification and evaluation of main cultivated species of *Pleurotus* in China based on ITS sequence analysis(基于 ITS 序列分析对我国主要栽培的侧耳品种的鉴定及评价)[J]. *Mycosystema*(菌物学报), **25**(3):398—407