

白囊耙齿菌腐朽木材相关cDNA片段的 序列克隆与分析*

孟凡娟 刘欣 闫绍鹏 王秋玉**

(东北林业大学生命科学学院 哈尔滨 150040)

摘要 为了解白囊耙齿菌腐朽木材的分子机制,利用基因差异显示技术(Differential display reverse transcriptase, PCR DDRT-PCR)研究了白囊耙齿菌腐朽白桦木材前后基因表达的差异。共分离出5个腐朽后在菌丝体中特异表达的cDNA片段,分别命名为A2、A7、C6、B8和B3。序列同源性比对发现:片段A2、A7和C6分别与编码漆酶(Laccase)、纤维素酶A(Cellulase A)和麦芽糊精磷酸化酶(Maltodextrin phosphorylase)等3个基因具有高度同源性;B8与一个编码响应调节蛋白的基因具有高度同源性。研究结果显示,所筛选的差异表达基因A2、A7和C6等与木材降解有密切关系。图2 表2 参22

关键词 白囊耙齿菌;白桦;木材腐朽;mRNA差异显示

CLC S782.33 : Q78

Cloning and Analysis of Decay-related Genes of *Irpex lacteus**

MENG Fanjuan, LIU Xin, YAN Shaopeng & WANG Qiuyu**

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract In order to know molecular mechanism of wood decayed by *Irpex lacteus*, the expression of the decay-related genes of *I. lacteus* were analyzed after inoculated with *Betula platyphylla* Suk wood, by the method of differential display reverse transcriptase PCR (DDRT-PCR). Five special expressed cDNA segments of the mycelium of *I. lacteus* were obtained from the decayed wood, which were named as A2, A7, C6, B8 and B3. Among them, A2, A7 and C6 were highly homologous to known genes including laccase, cellulase A and maltodextrin phosphorylase, respectively. B8 was highly homologous to responding regulated protein. This study suggested that A2, A7 and C6 had a close relationship with wood decay. Fig 2, Tab 2, Ref 22

Keywords *Irpex lacteus*; *Betula platyphylla* Suk; wood decay; mRNA differential display

CLC S782.33 : Q78

木材是一种具有多种用途的可再生资源,但是木材腐朽的广泛发生给木材生产带来了巨大损失^[1]。因此木材腐朽机理一直都是国内外研究的重点,例如有关木材腐朽过程中的显微特性及酶学方面已经做了大量研究工作^[2-3]。真菌的寄生是导致木材腐朽的主要原因,因此对真菌腐朽木材过程中相关基因的分离和鉴定工作也显得至关重要。白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)是一种担子菌,生长于阔叶或针叶树的活立木、枯立木或倒木上,引起木材的白色腐朽^[4]。有关白囊耙齿菌腐朽木材的分子机理方面的研究还未见报道。

一般来说,在木材腐朽过程中会发生一系列的生理生化改变,从而诱导一些木材寄生菌基因的特异表达^[5-6]。其中mRNA差异显示反转录PCR技术(Differential display reverse transcriptase-PCR, DDRT-PCR)自创立以来,已经被广泛用于差异表达基因的鉴定,该技术具有灵敏度高、速度快、操作简单等优点^[7-10]。通常高等真核生物的基因较多,这些基因在生物整个生长发育过程中具有阶段性表达的特点,或者在某种特殊条件下实施表达,这些不同时间、不同组织的基因

表达方式一般被称作基因的差别表达^[11]。研究不同时间、不同组织基因表达的差异对于研究生物生长发育的调控机制具有重大的理论与实践意义。在本研究中,为了了解白囊耙齿菌在木材腐朽过程中的作用机制,以接种白桦木材的白囊耙齿菌菌丝体为研究对象,同时以未接种白桦木材的白囊耙齿菌菌丝体为对照,提取二者的总RNA。利用DDRT-PCR技术对差异表达基因进行分析,发现片段A2、A7、C6和B8分别与漆酶、纤维素酶A、麦芽糊精磷酸化酶以及响应调节蛋白基因具有高度的核苷酸一致性。为了降低假阳性的出现,采用反向Northern技术对差异表达基因进行了进一步分析鉴定。反向Northern杂交是Zhang等人在1996年首次提出的,这种方法与传统的Northern技术相比,只需制备两个cDNA探针,既可以减少工作量,又可以节省经费和时间^[12-13]。在本研究中,从白囊耙齿菌中分离到5个在腐朽木材后的真菌菌丝中特异表达的cDNA差异片段,这将为从分子水平上阐明白囊耙齿菌腐朽木材的机制提供新依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 真菌分离和培养 2005年8月,在黑龙江省尚志地区东北林业大学帽儿山实验林场的白桦天然成熟林(20年以上)内采集白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)子实体。根据菌体的形态、

收稿日期: 2010-12-21 接受日期: 2011-05-05

*国家自然科学基金项目(No. 31170568)和中央高校基本科研业务费专项资金项目(No. DL11CA02)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31170568) and the Fundamental Research Fund for the Central Universities of China (No. DL11CA02)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: wqy11@sina.com)

表1 在本研究中所有的随机引物和锚定引物
Table 1 Sequences of the anchor primers and arbitrary primers in this study

随机引物 Arbitrary primer	序列 Sequence (5'-3')	随机引物 Arbitrary primer	序列 Sequence (5'-3')	随机引物 Arbitrary primer	序列 Sequence (5'-3')
S1	TACAACGAGG	S11	TACCTAAGCG	S21	GATCTAACCG
S2	TGGATTGGTC	S12	CTGCTTGATG	S22	GATCGCATTG
S3	CTTTCTACCC	S13	GTTTTTCGAG	S23	GATCTGACTG
S4	TTTTGGCTCC	S14	GATCAAGTCC	S24	GATCATGGTC
S5	GGAACCAATC	S15	GATCCAGTAC	S25	GATCATAGCG
S6	AAACTCCGTC	S16	GATCACGTAC	S26	GATCTAAGGC
S7	TCGATACAGG	S17	TCGGTCATAG	锚定引物 Anchor primer	序列 Sequence (5'-3')
S8	TGGTAAAGGG	S18	GATCTCAGAC	M1	AAGCTTTTTTTTTTC
S9	GATCTGACAC	S19	GATCATAGCC	M2	AAGCTTTTTTTTTTA
S10	GGTACATTGG	S20	GATCAATCGC	M3	AAGCTTTTTTTTTTG

菌落性状以及菌丝直径和类型来鉴别和获得白囊耙齿菌纯菌丝,在木屑培养基中培养,4℃保存^[14-15]。为了获得丰富的菌丝,在28℃条件下培养30 d。

1.1.2 木材获得及接种 在白桦天然成熟林内选择优树,并在大约胸高的位置钻取木材(直径5 mm),于-20℃保存备用。接种时将其切割成3 mm×1 mm×2 mm体积的薄片,并在120℃条件下高压灭菌20 min。然后将其转移到具有丰富菌丝的培养皿(90 mm)内,同时以未接种木块的菌丝为对照。在28℃黑暗条件下培养60 d后,分别提取两种菌丝体的总RNA。

1.2 方法

1.2.1 总RNA提取 参照钱程等(2006)的方法^[16]提取菌丝体总RNA,同时经DNA酶消化除去基因组DNA。提取后的RNA样品,用0.8%的琼脂糖凝胶(含1 μg/mL溴化乙锭)电泳检测,在紫外灯下观察。分别在260 nm和280 nm处测定OD值,当OD的比值介于1.8~2.0之间时表明RNA的纯度较好。将提取质量较好的总RNA存于-80℃条件下备用。

1.2.2 DDRT-PCR分析 在本研究中利用78对引物组合对样本进行PCR扩增,包括3种锚定引物(M1, M2, M3)和26种随机引物(S1, S2.....S26),引物序列见表1。在cDNA第一条链的合成中采用20 μL的反应体系:4 μL M-MLV10×buffer;2 μL 10 mmol/L的dNTPs;8 μg RNA模板,2 μL 20 mmol/L的锚定引物,40 U的RNA酶抑制剂,1 μL的AMV反转录酶(200 U/μL)。然后分别在42℃,75 min;45℃,10 min;70℃,10 min;95℃,5 min条件下进行温育。

在cDNA第二条链的合成中仍采用20 μL的反应体系:2 μL 10×PCR buffer;2 μL 2 μmol/L的dNTPs;2 μL 25 mmol/L的MgCl₂,12 μg cDNA模板,2 μL 20 μmol/L的随机引物,1.25 U的Tag DNA聚合酶。PCR反应条件为:94℃,3 min;94℃,30 s;36℃,1 min;72℃,50 s;35个循环后72℃延伸7 min;4℃,保存。

取10 μL PCR产物与5 μL的凝胶染色液混合后在95℃条件下保温5 min,然后在6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上进行垂直电泳,400 V电压条件下电泳6 h,银染后显色。为了减少假阳性的发生进行了5次重复性实验。

1.2.3 反向Northern杂交验证 为了进一步降低假阳性结果的产生,本实验采用了反向Northern技术杂交对差异片段进行进一步验证。探针采用地高辛生物素进行标记。其中各差异条带PCR产物10 μL于96孔PCR板上,并加入110 μL 0.2 mol/L的NaOH溶液,充分混匀,并放置5 min,同时剪取适当大小的GE公司生产尼龙膜,并放置于96孔转移器中,用抽真空的方法进行转移,在50℃条件下保温30 min。然后分别以对照和接种木材菌丝体的cDNA为探针与其进行杂交。探针标记、洗膜和显色方法参照Roche公司的DIG Labeling Kit说明书进行。与对照探针无杂交信号、与接种木材菌丝体的cDNA探针有杂交信号的差异片段为阳性差异片段。

1.2.4 差异表达片段的回收、测序和比对 对于表达差异的条带利用美国Omega公司生产的聚丙烯酰胺凝胶回收试剂盒进行回收,然后用pGEM-T-Easy载体(Promega公司生产)进行连接,测序由上海生工完成。在GenBank和EMBL数据库中进行序列的同源比对。

2 结果与分析

2.1 差异表达片段的显示

使用78对引物组合进行PCR扩增,通过筛选利用22对引物组合对cDNA进行PCR扩增,扩增产物在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳,银染后可以显现出较清晰的条带。图1为M3和S24以及M2和S4两对引物组合扩增后的电泳图。扩增条带总数为440条,平均每对引物扩增20条带,条带大小为50~1 500 bp,选取100~800 bp的差异片段进一步分析,其中25个片段在腐朽木材后的菌丝体中出现特异表达。

2.2 差异表达片段的反向Northern鉴定

为了进一步防止假阳性的出现,将所获得的差异表达片段进行反向Northern杂交鉴定。在所获得差异表达的25个基因片段中,21个表现为阳性表达(84%)(图2)。分别命名为:A1、A4、A8、B5、B9、C7、A2、A3、A5、A7、B1、B3、B4、B8、C3和C6。其中在以对照菌丝cDNA为探针的杂交膜上共出现6个杂交信号,分别为:A1、A4、A8、B5、B9和C7。而在以接种木材的菌丝cDNA为探针的杂交膜上共出现15个杂交信号,分别为A1、A2、A3、A4、A5、A7、A8、B1、B3、B4、B5、B8、C3、C6和C7。其中与以接种木材菌丝cDNA探针有杂交信号而与对照菌丝探针无杂交信号的共10个,分别为:A2、A3、A5、A7、B1、B3、B4、B8、C3和C6,因此这些片段可能是白囊耙齿菌腐朽木材的相关基因。另外,B9仅与未腐朽木材的菌丝探针有杂交信号,而A1、A4、A8、B5和C7这5个点与两种探针均出现杂交信号,同时从杂交信号的强度来看,杂交信号都表现为增强,表明这些片段代表一些高丰度表达的mRNA。

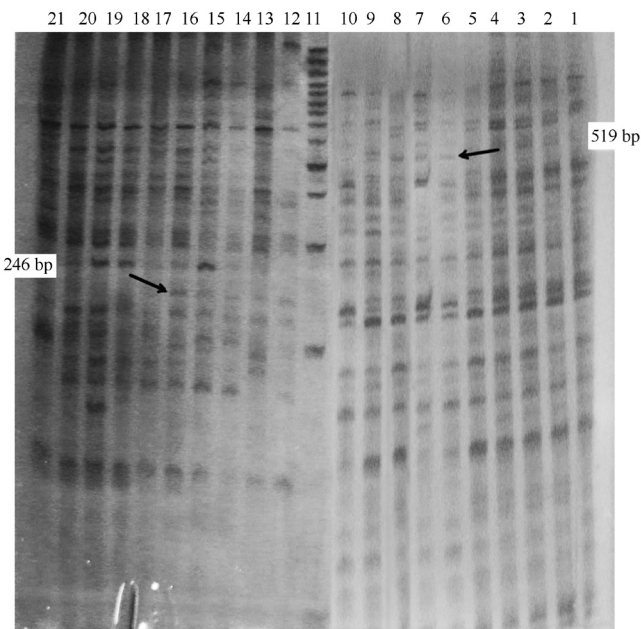


图1 利用引物对M3-S23和M2-S4扩增的cDNA差异图
Fig. 1 Differently displayed profile of cDNA by primers M3-S23 and M2-S4
箭头指的是表达差异的cDNA片段; 1~5和6~10泳道分别是利用M3-S24引物扩增的处理和对照样品; 12~16和17~21泳道是利用M2-S4引物扩增的处理和对照样品; 11泳道是100 bp的Marker
Arrows indicate differentially expressed cDNA fragments; Lanes 1~5 and lanes 6~10 represent treatments and controls by M3-S24, respectively; Lanes 12~16 and lanes 17~21 represent treatments and controls by M2-S4, respectively. Lane 11 is 100 bp DNA Ladder Marker

2.3 序列测定与同源性比较

利用NCBI和EMBL数据库进行序列同源性比对, 结果表明, 在与以接种木材菌丝cDNA探针有杂交信号而与对照菌丝探针无杂交信号的10个克隆中, 其中5个克隆与已知序列无同源性, 而另外5个片段与已知序列具有高度的同源性, 主要是漆酶、纤维素酶A、麦芽糊精磷酸化酶等(表2)。

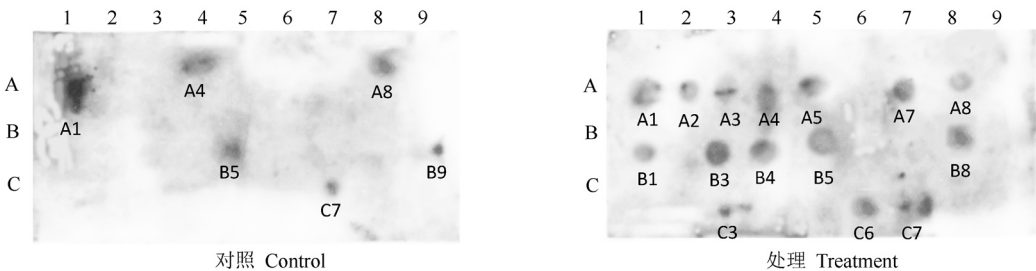


图2 反向Northern杂交鉴定结果
Fig 2 Identification results of reverse northern blot

表2 利用NCBI和EMBL数据库进行的序列同源性比对结果

Table 2 Results identified by sequence homologies found in the NCBI and EMBL databases

编号 Number	同源基因序列号 Serial No.of homology genes	长度 Length (bp)	同源性 Homology	一致性 Identity (r/%)	功能 General function
A2	AB201157	519	漆酶 Laccase	89	降解木质素 Degradating lignin ^[19]
A7	U63837.1	246	纤维素酶A Cellulase A	75	分解纤维素 Decomposing cellulose ^[20]
B3	AY376688	217	假定蛋白 Hypothetical protein	81	未知 Unknown
C6	AJ318499	189	麦芽糊精磷酸化酶 Maltodextrin phosphorylase	78	分解半纤维素 Decomposing hemicellulose ^[21]
B8	AJ318385	179	响应调节蛋白 Responding regulated protein	87	信号转导 Signal transduction ^[22]

3 讨论

大多数白腐菌可以通过降解木材中的纤维素、半纤维素和木质素等, 从而达到降解木材的目的^[17]. 因此, 尽管由于白腐菌的寄生会给木材生产带来巨大损失, 但是正因为白腐菌对木材的易腐性特点, 使其具有较强的应用前景, 即用作木材降解微生物. 通过利用微生物降解木材不但可以节约源量, 还可以防止由于大量化学药品使用所造成的环境污染^[18]. 所以利用微生物对木材进行降解具有能耗低、操作简单、不污染环境等优点, 已日益受到人们的重视. 但是目前利用白腐菌对木材腐朽的研究主要集中在腐朽过程中的酶系变化、化学物质改变以及利用效率等方面, 而有关白腐菌腐朽木材的分子机制研究还鲜有报道.

本研究利用DDRT-PCR技术对白囊耙齿菌腐朽木材前后的基因表达情况进行了分析, 发现白囊耙齿菌在腐朽木材后所特异表达的基因主要与已知降解纤维素、木质素和半纤维素的功能基因具有高度同源性. 例如白囊耙齿菌的A2基因测序后与编码漆酶(Accase)的基因具有高度同源性, 而漆酶在植物和真菌中广泛存在, 并且已有961种漆酶的cDNA克隆在植物和真菌中被分离鉴定, 这些酶均属于多酚多铜氧化酶, 参与木质素和黄酮类化合物的生物降解^[19]. 同时, A7和C6分别与编码纤维素酶A(Cellulase A)和麦芽糊精磷酸化酶(Maltodextrin phosphorylase)的基因具有高度的同源性, 而二者分别属于内切葡聚糖酶和葡聚糖磷酸化酶, 参与纤维素的降解^[20-21]. 所以从分子生物学的角度来看, 白囊耙齿菌在木材腐朽过程中参与木材纤维素降解的有关基因高度表达, 可以考虑对这些基因进一步分离鉴定, 进而克隆其全长进行基因功能的全面分析鉴定, 并进行遗传转化, 以达到提高木材降解能力的目的.

总之, 本研究中分别克隆到的白囊耙齿菌的4个片段在真菌腐朽白桦木材后的菌丝中特异表达, 说明它们可能参与了真菌对白桦木材的腐朽过程. 对这些cDNA片段结构、功能

的进一步研究可能会找到它们对木材中具体成分结构上进行降解的新证据,从而为揭示木材腐朽菌腐朽木材过程的机制提供新的理论依据.

References

- Goodell B. Brown-rot fungal degradation of wood: Our evolving view. In: Goodell B, Nicholas D, Schultz T eds. Wood deterioration and preservation: Advances in our changing world, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 2003. 97~118
- Preston F. Wood preservation: Trends of today will influence the industry tomorrow. *For Prod J*, 2000, **50**: 12~19
- Ho Lee K, Wi SG, Singh AP, Kim YS. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *J Wood Sci*, 2004, **50**: 281~284
- Wang HX (王宏勋), Du FY (杜甫佑), Zhang XY (张晓昱). Selective degradation of corn straw lignocellulose by white-rot fungi. *J Huazhong Univ Sci & Technol Nat Sci Ed* (华中科技大学学报自然科学版), 2006, **34** (3): 97~100
- Kerem Z, Jensen KA, Hammel KE. Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gleophyllum trabeum*: Evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS Lett*, 1999, **446**: 49~54
- Yoon JJ, Cha CJ, Kim YS, Kim W. Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**: 1373~1378
- Basse CW. Dissecting defense-related and developmental transcriptional responses of maize during *Ustilago maydis* infection and subsequent tumor formation. *Plant Physiol*, 2005, **138**: 1774~1784
- Lang P C, Zhang CK, Ebel R C, Dane F, Dozier W. Identification of cold acclimated genes in leaves of *Citrus unshiu* mRNA differential display. *Gene*, 2005, **10**: 111~118
- Zhang J, Turley RB, Stewart JM. Comparative analysis of gene expression between CMS-D8 restored plants and normal non-restoring fertile plants in cotton by differential display. *Plant Cell Rep*, 2008, **27**: 553~561
- Wang X, Chang L, Sun Z, Ma H. Characterization of genes expressed in response to cadmium exposure in the earthworm *Eisenia fetida* using DDRT-PCR. *Ecotox Environ Safe*, 2010, **73**: 1214~1220
- Wu NH (吴乃虎). Principle of Gene Engineering. Beijing, China: Science Press (北京: 科学出版社), 1998.
- Zhang H, Zhang R, Liang P. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucl Acids Res*, 1996, **24** (12): 24~54
- Tang MJ (唐明娟), Guo SX (郭顺星), Shen Y (申业), Hu YL (胡鸢雷). Optimization of mRNA differential display. *Lett Biotechnol* (生物技术通讯), 2003, **14** (5): 191~193
- Shao LP (邵力平). Taxonomy on fungi. Beijing, China: Beijing Forest Publishing House (北京: 北京林业出版社), 1984. 23~98
- Guo XF (郭晓帆), Chen YQ (陈艳秋). Morphological study on anatomy characteristics of pelvis bone for selenarctos. *J Agric Sci Yanbian Univ* (延边大学学报), 2005, **27** (4): 265~288
- Qian C (钱程), Zhao M (赵敏), Sun LN (孙立娜), Wang KM (王开敏). A method for rapid isolation of total RNA from *Irpex lacteus*. *J Harbin Inst Technol* (哈尔滨工业大学学报), 2006, **38**: 1389~1391
- Hatakka. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot Fungi: Production and role in lignin degradation. *FEMS Microb Rev*, 1994, **13** (2/3): 125~135
- Lü SX (吕世翔), Wang QY (王秋玉). Application progress of white rot fungi in lignocellulose degradation. *For Engin* (森林工程), 2009, **25** (4): 26~31
- Liu X (刘欣), Wang QY (王秋玉), Yang CP (杨传平). Comparison of the decaying ability to white birch wood among four wood rot fungi. *Sci Silv Sin* (林业科学), 2009, **45**: 179~182
- Li XL, Chen H, Ljungdahl LG. Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (12): 4721~4728
- Campagnolo M, Campa C, Zorzi RD, Wuerges J, Geremia S. X-ray studies on ternary complexes of maltodextrin phosphorylase. *Arch Biochem & Biophys*, 2008, **471** (1): 11~19
- Wang W, Gao J, Chiao J, Zhao G, Jiang W. A novel two-component system amrB-amkB involved in the regulation of central carbohydrate metabolism in rifamycin SV-producing *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Curr Microbiol*, 2004, **48**: 14~19