

# 金针菇菌柄特异性蛋白质Flammutoxin的表达\*

查美铃 吴福庆 王舒 付鸣佳\*\*

(江西师范大学生命科学院 南昌 330027)

**摘要** 通过地高辛标记的Flammutoxin基因特异性探针与金针菇 (*Flammulina velutipes*) 菌丝体、菌柄和菌盖中的mRNA进行杂交, 结果表明在金针菇的菌柄中有该蛋白质的表达, 而在菌丝体和菌盖中均无该蛋白质的表达. 此外在检测的平菇 (*Pleurotus ostreatus*)、香菇 (*Lentinus edodes*)、杏鲍菇 (*P. eryngii*) 和双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*) 中也无该蛋白质基因的表达. 图2 参8

**关键词** Flammutoxin; 特异性蛋白; 金针菇菌柄; northern杂交; 食用菌

CLC Q344+13

## A Specific Protein, Flammutoxin Expressed in the *Flammulina velutipes* Stipe\*

ZHA Meiling, WU Fuqing, WANG Shu & FU Mingjia\*\*

(College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, Jiangxi, China)

**Abstract** Flammutoxin gene probe labeled by digoxigenin was hybridized with mRNA of mycelium, stipe and pileus of *Flammulina velutipes*, respectively. The result showed that flammutoxin was expressed in the stipe of *F. velutipes*, but not in its mycelium and pileus. Furthermore, no expression of flammutoxin gene was detected in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *P. eryngii*, and *Agaricus bisporus* by the Northern blotting hybridization with the flammutoxin gene probe labeled by digoxigenin. Fig 2, Ref 8

**Keywords** flammutoxin; specific protein; *Flammulina velutipes* stipe; Northern blotting; edible mushroom

CLC Q344+13

Flammutoxin是金针菇 (*Flammulina velutipes*) 子实体的一种蛋白质. Lin等首先从金针菇中分离获得一种具心脏毒性和溶细胞特性的相对分子质量 ( $M_r$ ) 为 $22 \times 10^3$ 的蛋白质, 并将此蛋白质命名为Flammutoxin<sup>[1]</sup>. Bernheimer等从金针菇中纯化的一个具溶血特性的蛋白质也被称为Flammutoxin<sup>[2]</sup>, 但是蛋白质的 $M_r$  ( $32 \times 10^3$ ) 比Lin等所描述的要大很多. Tomita等分离得到的Flammutoxin为一个 $M_r$ 为 $31 \times 10^3$ 的溶血素蛋白 (Hemolysin), 并指出该蛋白质具成孔特性, 在所作用的细胞上可组装成一个环形的低聚物, 该环形物外部和内部直径分别为10 nm和5 nm, 并测定了该蛋白质的N-端28氨基酸残基<sup>[3]</sup>. Tadjibaeva等研究了Flammutoxin在细胞膜上形成通道的电生理特性, 认为Flammutoxin可形成两种类型中等程度阳离子选择性的电压门通道<sup>[4]</sup>.

Watanabe等获得一种跨上皮电阻 (Trans epithelial electrical resistance, TEER) 减弱蛋白 (TEER-decreasing protein, TDP), 并克隆了TDP基因的cDNA, 它编码一个272氨基酸残基的蛋白质 (GenBank accession No. AB012289)<sup>[5]</sup>. Tomita等也克隆了Flammutoxin的cDNA (GenBank accession No. AB015948)<sup>[6]</sup>并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行了表达, 但不能获得具溶血活性的重组蛋白<sup>[6]</sup>. Narai等证明TDP就是Flammutoxin<sup>[7]</sup>.

Flammutoxin是存在于金针菇中具有多种生理功能的蛋白质, 但目前对该蛋白质的功能研究还局限在它对其他生物的影响, 该蛋白质对金针菇本身的影响还不太清楚. 本研究

根据已报道的Flammutoxin基因的序列, 设计特异性引物制备杂交探针, 以进一步确定Flammutoxin基因在金针菇发育过程中的表达部位.

## 1 材料与方法

### 1.1 培养基

金针菇菌丝体的分离和培养在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 上进行.

### 1.2 金针菇子实体与菌丝体的获得

金针菇子实体购于大型超市, 为白色品种. 金针菇菌丝体的分离采用孢子弹射方法, 从所购买的金针菇子实体上分离获得, 并进行出菇实验验证. 菌丝体的培养和保存均在PDA培养基上进行.

### 1.3 其他食用菌子实体的获得

平菇 (*Pleurotus ostreatus*)、香菇 (*Lentinus edodes*)、杏鲍菇 (*P. eryngii*)、双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)、白玉菇 (商品名, 未鉴定) 子实体均购于大型商场, 蛹虫草菌丝体和子实体由本实验室培养.

### 1.4 总RNA提取

用TRIZOL (上海生工生物技术有限公司产品) 按产品说明书从所用食用菌菌丝体、菌柄和菌盖中分别提取总RNA, 电泳检测所提取RNA的纯度.

### 1.5 探针 (DIG-DNA) 制备及检测

Northern杂交用的探针以地高辛进行标记 (标记试剂盒购于深圳莱伯克生物科技有限公司), 根据已经公布的Flammutoxin基因序列 (GenBank accession No. AB015948)<sup>[6]</sup>设计特异性PCR引物, 分别为: ATGCCTCAAGTCAAGACAAG和

收稿日期: 2009-11-19 接受日期: 2009-12-31

\*江西省自然科学基金项目 (No. 0630075) 资助 Supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi, China (No. 0630075)

\*\*通讯作者 Corresponding author (E-mail: mingjiafu@yahoo.com.cn)

TCACTCAGGACCAGGAACCA (引物由上海生工生物工程有限公司合成), 底物为人工合成质粒pBinFTX (测序结果表明该质粒中带有完整的Flammutoxin基因序列)。在探针制备的PCR反应过程中, 褪火温度为53℃, PCR结束后电泳检测所扩增DNA分子的大小。

### 1.6 Northern杂交

所提取的金针菇菌丝体、菌柄和菌盖总RNA在含有1.8 mol L<sup>-1</sup>甲醛的1.2%琼脂糖凝胶上电泳, 而后溴化乙锭(EB)染色来确定RNA的完整性。RNA被转移到尼龙膜(PerkinElmer, USA)上, 而后进行预杂交、杂交和洗膜, 杂交试剂盒购于深圳莱伯克生物科技有限公司, 按产品说明书进行操作。

## 2 结果

### 2.1 Northern杂交用探针的合成

Flammutoxin的基因已经构建在质粒载体pBinFTX, 表明这是特异性的底物, 经PCR扩增以后可获得特异性的产物。本研究根据已经发表的Flammutoxin基因序列, 设计了特异性的引物, 经PCR扩增以后, 电泳检测到一条830 bp的DNA条带(图1), 这表明合成了可用于Northern杂交检测的探针。扩增过程中目标DNA条带已经标记上地高辛。

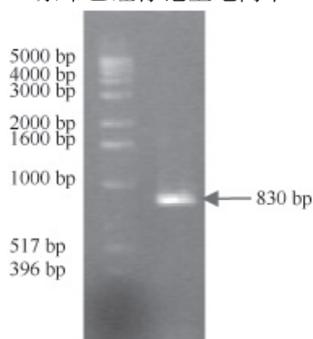


图1 通过PCR扩增获得的地高辛标记探针的金针菇Flammutoxin基因  
Fig. 1 *Flammutoxin* gene probe labeled by digoxigenin was obtained by PCR  
1: DNA分子标记; 2: 地高辛标记的Flammutoxin基因探针  
1: DNA marker; 2: *Flammutoxin* gene probe labeled by digoxigenin

### 2.2 金针菇总RNA的Northern杂交检测

将获得的金针菇的菌丝体、菌柄和菌盖分别提取总RNA, 变性琼脂糖凝胶电泳检测表明已经获得了金针菇这3个部分的总RNA。在金针菇菌丝体、菌柄和菌盖的总RNA进行变性电泳以后, 转尼龙膜, 再用地高辛标记的Flammutoxin基因探针与金针菇这3个部分的RNA进行杂交, 结果表明只有金针菇的菌柄总RNA电泳泳道上显现出杂交带。由此可以确定, 只有金针菇菌柄中转录产生了Flammutoxin基因的mRNA, Flammutoxin在菌柄中得到了表达。而在菌丝体和菌盖中无Flammutoxin蛋白质的表达。

### 2.3 其他食用菌总RNA的Northern杂交检测

在本研究中提取了平菇、香菇、杏鲍菇、双孢蘑菇和白玉菇菌柄和菌盖的总RNA, 获得平菇和杏鲍菇的菌丝体总RNA。而蛹虫草子实体无菌柄和菌盖之分, 但分别也提取了它的菌丝体和子实体的总RNA。将所获得的这几种食用菌菌柄、菌盖和菌丝体总RNA电泳以后, 转膜, 再用合成的Flammutoxin基因探针进行Northern杂交, 结果表明所检测的

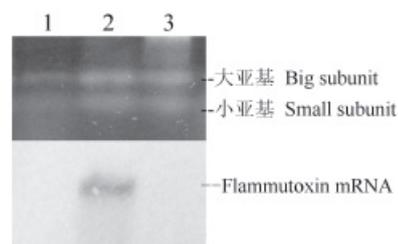


图2 金针菇菌丝体、菌柄及菌盖总RNA的northern杂交  
Fig. 2 Northern blotting from the total RNA of mycelium, stipe and pileus of *F. velutipes*, respectively

1: 菌体总RNA; 2: 菌柄总RNA; 3: 菌盖总RNA  
1: Total RNA of mycelium; 2: Total RNA of stipe; 3: Total RNA of pileus

几种食用菌的菌柄、菌盖和菌丝体均无杂交带出现。

## 3 讨论

现有研究表明, 在金针菇中Flammutoxin蛋白质有大量的表达, 且表达量会有一些的变化<sup>[8]</sup>。在本研究中, 通过提取金针菇生长发育过程中的菌丝体或子实体的菌柄和菌盖中的总RNA, 通过地高辛标记的Flammutoxin基因作为探针进行Northern杂交, 结果仅在金针菇子实体的菌柄中检测到有Flammutoxin基因的表达。这表明Flammutoxin只在金针菇菌柄的生长发育过程中才会出现, 而在菌丝体和菌盖中均未见有该蛋白质的表达, 这无疑也暗示该蛋白质对金针菇菌柄的生长发育有促进作用。

由于初生菌丝经质配以后可形成次生菌丝, 而子实体是由成熟的次生菌丝进一步扭结分化而成。既然Flammutoxin只在金针菇菌柄上出现, 表明Flammutoxin对次生菌丝的形成或进一步的扭结分化可能会有一定的作用, 这种对次生菌丝的作用只局限在对菌柄上的次生菌丝的作用, 而对菌盖上的次生菌丝却没有这种作用。目前还不清楚Flammutoxin对次生菌丝的细胞有何作用, 还有待进一步研究。尽管现有研究已经清楚Flammutoxin可以形成六聚体的环状结构<sup>[9]</sup>, 但这种研究结果只在作用于动物细胞的细胞膜时发现, 而在金针菇菌柄细胞中是否也会形成这种结构, 也有待进一步研究。

对数种食用菌的研究表明, Flammutoxin并不存在这些真菌中, 因此可以初步推测该蛋白质是金针菇所特有的, 后续将通过更多食用菌检测来验证。

### References

- 1 Lin JY, Lin YJ, Chen CC, Wu HL, Shi GY, Jeng TW. Cardiotoxic protein from edible mushrooms. *Nature*, 1974, **252**: 235~237
- 2 Bernheimer AW, Oppenheim JD. Some properties of FTX from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Toxicon*, 1987, **25**: 1145~1152
- 3 Tomita T, Ishikawa D, Noguchi T, Katayama E, Hashimoto Y. Assembly of FTX, a cytolytic protein from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, into a pore-forming ring-shaped oligomer on the target cell. *Biochem J*, 1998, **333**: 129~137
- 4 Tadjibaeva G, Sabirov R, Tomita T. Flammutoxin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, forms two different types of voltage-gated channels in lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1467**: 431~443

- 5 Watanabe H, Narai A, Shimizu M. Purification and cDNA cloning of a protein derived from *Flammulina velutipes* that increases the permeability of the intestinal Caco-2 cell monolayer. *Eur J Biochem*, 1999, **262**: 850~857
- 6 Tomita T, Mizumachi Y, Chong K, Ogawa K, Konishi N, Sugawara-Tomita N, Dohmae N, Hashimoto Y, Takio K. Protein sequence analysis, cloning, and expression of FTX, a pore-forming cytolysin from *Flammulina velutipes*. Maturation of dimeric precursor to monomeric active form by carboxyl-terminal truncation. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 54161~54172
- 7 Narai A, Watanabe H, Iwanaga T, Tomita T, Shimizu M. Effect of a pore-forming protein derived from *Flammulina velutipes* on the Caco-2 intestinal epithelial cell monolayer. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**: 2230~2238
- 8 Fu MJ (付鸣佳), Wu ZJ (吴祖建), Lin QY (林奇英), Xie LH (谢联辉). Change of protein content in *Flammulina velutipes* and biological activities of a protein from it. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11**: 40~44



## 海南岛热带天然林主要功能群保护与恢复生态学基础

臧润国 丁易 张志东 邓福英 毛培利 著 科学出版社出版(2010年8月) 978-7-03-028445-6 ¥98.00

### 内容简介

本书以海南岛典型的热带天然林为对象,在概述热带天然林及其相关理论研究进展的基础上,对其主要功能群进行了辨识;探讨了主要功能群对变化生境的适应性;分析了退化天然林恢复过程中不同功能群的动态变化规律;应用野外公里网格调查与“3S”技术相结合的方法,对典型区域内的植被斑块进行了类型划分,比较了主要功能群在不同生境中的适宜性,建立了以功能群为基础的景观动态模型。在对研究理论成果综合的基础上,探讨了热带天然林保护、恢复与经营的对策。本书所表达的成果不仅发展和完善了天然林生态系统保育和退化生态系统恢复的理论体系,同时也为我国复杂(物种丰富)林区天然林保护等生态建设工程提供了科学依据。

本书可供植物学、动物学、生态学、林学、地理学和环境科学等方向的科研人员、高等学校师生及生物多样性和生态旅游爱好者参考,也可政府部门、自然保护管理部门的工作人员提供参考。

## 中国红树林区鸟类

周放 等著 科学出版社出版(2010年8月) 978-7-03-028515-7 ¥98.00

### 内容简介

本书是国内第一部比较系统、完整地对中国红树林区鸟类进行研究和探讨的专著。共分十章,系统介绍了中国东南沿海五省(自治区)红树林分布概况、红树林区的鸟类概况、鸟类的时空分布、红树林区珍稀保护鸟类、红树林区管理和保护现状及科学研究情况;首次提出了基于鸟类的“红树林区”概念,把红树林区作为鸟类的一种复合生境进行整体性的研究;对红树林空间异质性与鸟类多样性的关系、红树林消长对鸟类群落的影响、红树林区鸟类多样性的梯度分布、鸟类对红树林的影响、鸟类在红树林区食物链中的作用、红树林区鸟类的集群、海岸带人工设施对红树林区鸟类的影响等方面作了较为深入的研究和探讨。

本书可作为生态学研究、鸟类学研究、自然保护区管理、高等教育(农、林、师范、综合性)、科研、野生动物保护等单位教学及科研人员的参考书。

欢迎邮购各类图书 欢迎致电索要书目

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇 电话: 010-64031535 E-mail: zhouwenyu@mail.sciencep.com

网上订购: www.dangdang.com www.amazon.cn

科学出版中心生物分社 电话: 010-64012501 网址: www.lifescience.com.cn E-mail: lifescience@mail.sciencep.com