

虎奶菇 Mn-SOD 提取、 鉴定及基因的克隆

杨加亮, 田云恒, 马爱民*

(华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070)

摘要:以虎奶菇菌丝为材料,提取、鉴定了虎奶菇锰超氧化物歧化酶,克隆虎奶菇锰超氧化物歧化酶基因。用液氮研磨、超声、硫酸铵沉淀和透析等方法提取虎奶菇 Mn-SOD;WST-8 法测定虎奶菇 Mn-SOD 酶活力; H_2O_2 鉴定虎奶菇 SOD 的类型;用同源克隆、cDNA 末端快速扩增技术和融合引物与巢式 PCR 等方法从虎奶菇中克隆锰超氧化物歧化酶基因。结果表明,虎奶菇 Mn-SOD 酶活力为 1.66 个酶活力单位。酶经过 H_2O_2 处理后仍然有活性,与未处理无明显差异,表明虎奶菇中 SOD 主要是 Mn-SOD。克隆获得了虎奶菇锰超氧化物歧化酶基因 *PtMn-SOD*,其 DNA 序列全长 1025 bp,开放阅读框全长为 663 bp,编码 220 个氨基酸。序列分析与系统进化树表明,*PtMn-SOD* 与属于侧耳属的糙皮侧耳(登录号:MH645359.1)关系较近。预测该蛋白质分子量为 24.54 kDa,蛋白等电点为 7.86。*PtMn-SOD* 蛋白定位于线粒体,在线粒体中发挥功效。

关键词:虎奶菇,锰超氧化物歧化酶,酶活,同源克隆,融合引物与巢式 PCR

Extraction, Identification and Gene Cloning of Mn-SOD from *Pleurotus tuber-regium*

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

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

Abstract: The manganese superoxide dismutase of *Pleurotus tuber-regium* was extracted and identified. The manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) gene of *P.tuber-regium* was cloned from the mycelium of *P.tuber-regium*. Mn-SOD of *P.tuber-regium* was extracted by liquid nitrogen grinding, ultrasound, ammonium sulfate precipitation and dialysis. Mn-SOD activity of *P.tuber-regium* was determined by WST-8 method. SOD type of *P.tuber-regium* was identified by H_2O_2 . Mn-SOD gene was cloned from *P.tuber-regium* by homologous cloning, rapid amplification of cDNA ends, fusion primers and nested PCR. Results showed that the activity of Mn-SOD of *P.tuber-regium* was 1.66 U. There was no significant difference between the enzyme treated with H_2O_2 and untreated, indicating that the main SOD in *P.tuber-regium* was Mn-SOD. *PtMn-SOD* was cloned and obtained. Its DNA sequence was 1025 bp in total, 663 bp in open reading frame and 220 amino acids were encoded. Sequence analysis and phylogenetic tree showed that *PtMn-SOD* was closely related to *Pleurotus ostreatus* (accession number: MH645359.1). It was predicted that the molecular weight of the protein was 24.54 kDa and the isoelectric point of the protein was 7.86. *PtMn-SOD* protein located in mitochondria and played a role in mitochondria.

Key words: *Pleurotus tuber-regium*; manganese superoxide dismutase; enzyme activity; homologous cloning; fusion primer and nested integrated PCR

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2020)15-0150-08

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.15.024

引文格式: 杨加亮, 田云恒, 马爱民. 虎奶菇 Mn-SOD 提取、鉴定及基因的克隆[J]. 食品工业科技, 2020, 41(15): 150-157.

虎奶菇 (*Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing) 属于担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、侧耳科、侧耳属, 又称菌核侧耳, 是热带地区一种珍贵的食药真菌^[1], 主要分布在我国云南省以及缅甸和非洲的尼日利亚等地^[2]。

虎奶菇营养价值丰富, 含有真菌多糖、矿物质及生物活性酶等多种具有抗氧化功能的活性成分^[3]。虎奶菇抗氧化方面的研究主要集中在对虎奶菇多糖的研究^[4-6], 对于同样具有抗氧化作用的生物活性酶的研究

收稿日期: 2019-11-20

作者简介: 杨加亮 (1995-), 男, 硕士, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: zyismq@126.com。

* 通讯作者: 马爱民 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: aiminma@mail.hzau.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31772375)。

究不多。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutases, SOD)是具有生物活性的一种抗氧化酶^[7-8]。SOD属于金属酶类,根据底物结合金属离子的不同,分为Cu/Zn-SOD、Fe-SOD、Mn-SOD和Ni-SOD^[9]。SOD主要作用是清除生物体氧化产生的超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$), $O_2^- \cdot$ 被转化成 H_2O 和 O_2 ^[10],平衡机体的氧化还原稳态^[11]。SOD主要在植物中被研究,就是其与植物抗逆性之间的关系。Jiang等^[12]通过对花椰菜油萝卜中SOD基因的过表达提高了花椰菜油萝卜对霜霉病的抗性。Zhang等^[13]通过干涉烟草中Fe-SOD基因的表达,转基因烟草对光高度敏感。食用菌中对SOD的研究集中在提取分离和性质特性^[14-16],对SOD进行基因克隆表达的研究较少。Yin等^[17]对糙皮侧耳的Mn-SOD基因进行了克隆和鉴定。严俊杰等^[18]对草菇基因组中SOD家族基因进行了分析,SOD基因参与草菇的低温应答。对于珍贵食药真菌虎奶菇中SOD的研究基本没有。

本研究提取了虎奶菇Mn-SOD,通过酶活测定和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳活性染色等方法鉴定虎奶菇Mn-SOD。通过同源克隆、cDNA末端快速扩增技术和融合引物与巢式PCR等方法从虎奶菇中克隆获得一个虎奶菇Mn-SOD基因,利用在线工具进行生物信息学分析,同时采用邻接法构建系统进化树,从基因及其编码的蛋白来研究虎奶菇Mn-SOD的理化性质和结构特点。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

虎奶菇菌株(*Pleurotus tuber-regium*(Fr.)Sing)华中农业大学食品微生物实验室提供,32℃保存于PDA斜面培养基上;大肠杆菌感受态DH5 α 北京全式金生物技术有限公司;pMD18-T质粒、DNA ligation kit ver. 2.1、RNAiso plus、PrimeScript™ RT reagent Kit、M-MLV RTase cDNA synthesis kit TaKaRa公司;E.Z. N.A™ Cycle-pure Kit、Gel Extraction Kit、Plasmid DNA Mini Kit I Omega公司;氨苄青霉素 Sigma-Aldrich;Trans2K Plus DNA Marker、Trans2K Plus II DNA Marker、Taq DNA polymerase 北京全式金生物技术有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等分析纯,国药集团化学试剂有限公司;SDS-PAGE凝胶制备试剂盒武汉谷歌生物科技有限公司;核黄素、氮蓝四唑(NBT) Sigma-Aldrich;CuZn/Mn-SOD活性检测试剂盒(WST-8法)碧云天生物技术公司;引物的合成和序列的测定武汉天一辉远有限公司。

梯度PCR仪 BioRad;DYY-8C型电泳仪、DYCP-31DN型水平电泳槽北京六一仪器厂;Centrifuge 5415R冷冻高速离心机德国Eppendorf公司;热电FC酶标仪美国Thermo scientific公司;STUART SA8漩涡振荡混合器vedgen;GEL LOGICAL 200凝胶成像系统美国Kodak公司;VcX500超声破碎仪美国Sonics公司。

1.2 实验方法

1.2.1 虎奶菇Mn-SOD的提取及鉴定

1.2.1.1 虎奶菇Mn-SOD的提取方法参照高建华等^[19]方法,取3g虎奶菇菌丝用液氮研磨,按每1g虎奶菇菌丝加入4mL磷酸缓冲液(50mmol/L, pH7.8,含0.1mmol/L EDTA),放在振荡器上洗涤30min,4000r/min离心20min,收集上清液与沉淀,上清液备用,沉淀为菌丝体;每克沉淀加入1mL磷酸缓冲液悬浮,100W超声波破壁5min,静置提取30min,4000r/min离心20min,收集上清液,与原上清液混合,此即SOD粗提液。粗提液加硫酸铵至30%饱和度,冰浴、搅拌2h后,4℃、10000r/min离心10min。取上清液并再加硫酸铵至85%饱和度,冰浴、搅拌2h后,4℃、10000r/min离心10min,收集沉淀,计算回收率,公式如下:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{m_1}{m} \times 100$$

式中:m表示虎奶菇菌丝加入量,g;m₁表示处理回收得到的沉淀,g。

沉淀用少量的磷酸缓冲液溶解,即得盐析液。将盐析液放入透析袋用磷酸缓冲液透析过夜。每隔1h换一次缓冲液,透析过程中充分搅拌,即得透析液。

1.2.1.2 虎奶菇Mn-SOD的酶活力测定用WST-8法测定虎奶菇Mn-SOD的酶活力。按照碧云天公司CuZn/Mn-SOD活性检测试剂盒(WST-8法)^[20]推荐步骤处理。在37℃环境中反应30min,测定在波长450nm下的吸光值。由空白对照组和样品的吸光值可计算出抑制百分率,公式如下:

$$\text{抑制百分率}(\%) = \frac{A_{\text{空白对照1}} - A_{\text{空白对照2}} - A_{\text{样品}}}{A_{\text{空白对照1}} - A_{\text{空白对照2}}} \times 100$$

当抑制百分率为50%时,反应体系中的SOD酶活力定义为1个酶活力单位(U)。根据抑制百分率可计算出酶活力单位,公式如下:

$$\text{酶活力单位} = \frac{\text{抑制百分率}}{1 - \text{抑制百分率}}$$

1.2.1.3 虎奶菇Mn-SOD的鉴定采用抑制剂敏感性实验鉴定酶的种类。所采用的抑制剂为H₂O₂。取两份透析液,一份加入H₂O₂溶液;一份不加入H₂O₂溶液。混匀后取相同体积样品进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,参照Yin等^[21]方法。凝胶采用12%分离胶和5%浓缩胶。样品进行非变性电泳后,凝胶取出洗净,放入25mL NBT(2.45mmol/L)溶液中浸泡45min,简单洗后在黑暗环境中再放入30mL磷酸缓冲液(50mmol/L、pH=7.8、含28mmol/L四甲基乙二胺(TEMED)和0.028mmol/L核黄素)中浸泡30min。染色完成后,胶放入磷酸缓冲液(50mmol/L、pH=7.8、含0.1mmol/L EDTA)中,4×8W日光灯下光照30min,直至背景上有清晰透明的SOD活性谱带。

1.2.2 虎奶菇Mn-SOD基因的克隆

1.2.2.1 基因组DNA的提取虎奶菇基因组的提取采用改进的CTAB法^[22],将培养的虎奶菇菌丝体用液氮研磨成粉末,取20mg左右至1.5mL离心管中;取700μL Extraction Buffer至离心管,70℃水浴30min,每10min颠倒一次;加等体积PCA,混匀,12000r/min,室温离心15min;上清转管,加等体

表1 引物序列
Table 1 The primer sequences

引物名称	引物序列(5'→3')	引物用途
MnSod1-F	GCACCACCAGAAGCACCACCAGACCTAYGTNAAYGG	保守区域扩增
MnSod1-R	CGGGCTTCACGTTCTTGTACTGCAGRTARAANGCRTG	
AP	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT	
SOD-RF	AATACCACCACGCTGCCATCCAAG	3'端 cDNA 片段扩增
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	
SODF	CACCACCAGAAGCACCACCAGACCT	3'端 DNA 片段扩增
SOD-R	TTATATTCCGGAGTCGTCCTG	
SP1	GATACAGATAGTGTGAACGAGGAGC	
SP2	TCAAGCTTCTTTGTCGTCGCTG	
SP3	TAGATGACTACGTACATGTTCCAG	5'端 DNA 片段扩增
FP2	GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTNGTCGASWGANAWGAA	
FSP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	
FSP2	ACTATAGGGCAGCGTGGT	
SOD-F	ATGTTTCGCTATCGTCAAACCT	基因扩增

积-20℃预冷的异丙醇,混匀,室温沉淀10 min,12000 r/min,4℃离心10 min,弃上清;加入1 mL 75%乙醇清洗沉淀,12000 r/min,4℃离心3 min,室温干燥;加入20 μL 1×TE Buffer溶解DNA,样品于-20℃保存备用。

1.2.2.2 总RNA的提取和cDNA第一条链的合成 虎奶菇菌丝总RNA的提取采用Trizol法,以提取的总RNA为模板采用PrimeScript™ RT reagent Kit反转录成cDNA,操作参照试剂盒说明书,合成的cDNA用于基因克隆。采用M-MLV RTase cDNA synthesis kit,使用锚定引物AP(表1)将RNA转录成cDNA,命名为cDNA 1,合成的cDNA 1用于克隆虎奶菇Mn-SOD基因3'端cDNA片段。RNA和cDNA样品保存于-80℃备用。

1.2.2.3 虎奶菇Mn-SOD基因cDNA保守片段的克隆 根据NCBI和JGI数据库中糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、晶粒鬼伞(*Coprinellus micaceus*)、茯苓(*Wolfiporia cocos*)、灰光柄菇(*Pluteus cervinus*)和香菇(*Lentinula edodes*)等担子菌的Mn-SOD氨基酸序列,分析保守区域,设计简并引物MnSod1-F和MnSod1-R(表1)扩增Mn-SOD基因cDNA保守片段。以cDNA为模板进行PCR扩增,条件如下:预变性94℃,5 min;变性94℃,1 min;退火54℃,30 s;延伸72℃,1 min;循环数30;72℃延伸10 min;4℃保存。取50 μL PCR产物用2.0%琼脂糖凝胶电泳,切下与目的条带位置大小接近的条带,用E.Z.N.A™ Gel Extraction kit胶回收试剂盒的方法进行回收。回收片段与pMD18-T载体连接后转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,经氨苄青霉素(100 μg/mL)抗性筛选及菌落PCR验证后,选择阳性克隆,送武汉天一辉远公司进行测序,获得虎奶菇Mn-SOD基因的保守片段cDNA序列。

1.2.2.4 虎奶菇Mn-SOD基因3'端cDNA片段的克隆 用RACE技术(Rapid amplification of cDNA end, cDNA末端快速扩增技术)克隆虎奶菇Mn-SOD基

因3'端cDNA片段。根据1.2.2.3中获得的虎奶菇Mn-SOD基因保守区域cDNA序列,设计3'RACE引物SOD-RF与合成的引物AUAP(表1),以1.2.2.2中cDNA 1为模板,进行PCR扩增,条件如下:预变性94℃,5 min;变性94℃,1 min;退火58℃,30 s;延伸72℃,1 min;循环数30;72℃延伸10 min;4℃保存。PCR产物进行同1.2.2.3处理,挑选阳性克隆,进行测序。拼接3'端cDNA序列与保守片段cDNA序列,得到包含保守片段的3'端cDNA片段。

1.2.2.5 虎奶菇Mn-SOD基因5'端DNA片段的克隆 利用FPNI-PCR(Fusion primer and nested integrated PCR,融合引物与巢式PCR)技术克隆虎奶菇锰超氧化物歧化酶基因5'端DNA片段。根据1.2.2.4中包含保守片段的3'端cDNA片段,设计引物SODF和SOD-R(表1),以DNA为模板,扩增出虎奶菇Mn-SOD基因3'端DNA片段,测序得到DNA序列。按照FPNI-PCR引物设计要求,设计三个由近及远的下游特异引物SP1、SP2和SP3(表1)。以虎奶菇DNA为模板,以SP3、SP2、SP1分别与合成的FP2、FSP1、FSP2(表1)组成引物对,进行三轮PCR^[23]。第二轮和第三轮PCR产物进行同1.2.2.3处理,挑选阳性克隆,进行测序,获得虎奶菇Mn-SOD基因5'端DNA序列。

1.2.2.6 虎奶菇Mn-SOD基因的克隆 将1.2.2.5中获得的虎奶菇Mn-SOD基因5'端DNA序列和3'端DNA序列通过软件DNAMAN 6.0进行拼接,剔除重叠部分。把拼接结果通过NCBI数据库进行BLASTx比对,设计引物SOD-F(表1)与SOD-R分别以DNA和cDNA为模板扩增虎奶菇Mn-SOD基因全长的DNA和cDNA片段,PCR扩增,条件如下:预变性94℃,5 min;变性94℃,1 min;退火58℃,30 s;延伸72℃,1 min;循环数30;72℃延伸10 min;4℃保存。PCR产物进行同1.2.2.3处理,挑选阳性克隆,进行测序,获得虎奶菇Mn-SOD基因的DNA和cDNA序列。

1.2.3 虎奶菇 Mn-SOD 基因的生物信息学分析

1.2.3.1 虎奶菇 Mn-SOD 基因序列的生物信息学分析 用 NCBI 数据库中 BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行基因序列比对; 利用软件 Editseq 对拼接结果进行分析, 寻找开放阅读框 (ORF); 用软件 DNAMAN 6.0 对得到的基因 DNA 序列和 cDNA 序列进行比对, 预测内含子情况, 并将 cDNA 序列翻译成氨基酸序列, 便于对编码的蛋白进行分析。

1.2.3.2 虎奶菇 Mn-SOD 基因编码蛋白的生物信息学分析 用在线 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸基本理化性质; 利用在线 Prosite (<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>) 分析蛋白的功能位点; 利用在线 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 对不同物种间 Mn-SOD 蛋白进行多序列比对; 利用软件 MEGA 5.1, 采用邻接法构建系统进化树; 用在线软件 DAS-TMfilter (<http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS/DAS.html>) 进行跨膜结构预测; 用 SignalP 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/>) 分析蛋白的信号肽情况; 用软件 PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) 进行亚细胞定位; 利用在线分析工具 SOMPA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 预测蛋白的二级结构; 借助 Swiss-model (<http://swissmodel.expasy.org/interactive>) 对 Mn-SOD 蛋白进行三维结构预测并构建 3D 模型。

2 结果与分析

2.1 虎奶菇 Mn-SOD 提取及鉴定

2.1.1 虎奶菇 Mn-SOD 提取 将 3 g 虎奶菇菌丝体,

经研磨、超声、硫酸铵沉淀, 收集到沉淀 0.45 g。回收率为 15%。透析处理之后, 得到酶液。

2.1.2 虎奶菇 Mn-SOD 酶活的测定 用 WST-8 法测定 Mn-SOD 酶活, 结果表明酶液能有效抑制甲臌染料的生成, 表现出明显的抗氧化活性。抑制百分率分别为 62.3%, 计算出虎奶菇 Mn-SOD 酶活力为 1.66 个酶活力单位。

2.1.3 虎奶菇 Mn-SOD 的鉴定 由于 Mn-SOD 对 H₂O₂ 具有一定的抗性^[16], 因此可以用 H₂O₂ 鉴定虎奶菇 SOD 的类型, 非变性 PAGE 胶活性染色结果如图 1 所示。由图 1 可知, 酶经过 H₂O₂ 处理后仍然有一定的活性, 与未处理无明显差异, 表明虎奶菇中 SOD 主要是 Mn-SOD。



图 1 虎奶菇 Mn-SOD 鉴定

Fig.1 Identification of Mn-SOD from *P.tuber-regium*
注: 1: 未添加 H₂O₂ 的透析液; 2: 添加 H₂O₂ 的透析液。

2.2 虎奶菇 Mn-SOD 基因的克隆

图 2(A、B) 分别是提取的 DNA 和 RNA 电泳检测图。利用简并引物 MnSod1-F 和 MnSod1-R 扩增获得了 373 bp 的保守区域 cDNA 片段(图 2C)。3' RACE 反应获得了约 339 bp 的 3' 端 cDNA 序列(图 2D), 与保守序列拼接, 得到含有 564 bp 的 3' 端 cDNA 序列。使用引物 SODF 和 SOD-R 扩增, 得到含有 792 bp 的 3' 端 DNA 序列(图 2E)。FPNI-PCR

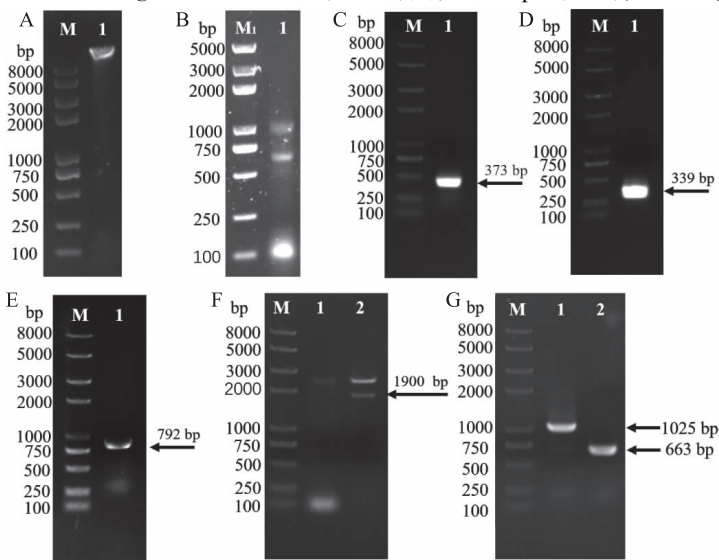


图 2 PtMn-SOD 基因的克隆

Fig.2 Cloning of PtMn-SOD gene

注: M; Trans2K Plus II DNA Marker; M₁; Trans2K Plus DNA Marker; A: 虎奶菇菌丝体 DNA 提取电泳检测结果, 其中泳道 1 是虎奶菇菌丝体 DNA; B: 虎奶菇菌丝 RNA 提取电泳检测结果, 其中泳道 1 是虎奶菇菌丝体 RNA; C: PtMn-SOD 基因保守区域 cDNA 片段 PCR 结果, 其中泳道 1 是保守区域 cDNA 片段扩增产物; D: PtMn-SOD 基因 3' RACE PCR 结果, 其中泳道 1 是 3' 端 cDNA 片段扩增产物; E: PtMn-SOD 基因 3' 端片段 PCR 结果, 其中泳道 1 是 3' 端 DNA 片段扩增产物; F: PtMn-SOD 基因 5' 端 FPNI-PCR 结果, 其中泳道 1 是 FPNI-PCR 第二轮扩增产物, 泳道 2 是 FPNI-PCR 第三轮扩增产物; G: PtMn-SOD 基因全长 DNA 和 cDNA PCR 结果, 其中泳道 1 是 DNA 扩增产物, 泳道 2 是 cDNA 扩增产物。

反应获得了约 1900 bp 的 5' 端 DNA 序列(图 2F)。将 5' 端和 3' 端序列进行拼接。用引物 SOD-F 与 SOD-R 扩增虎奶菇 Mn-SOD 基因的 DNA 及 cDNA (图 2G), 测序结果与相应拼接序列完全一致, 命名该基因为 PtMn-SOD。

2.3 虎奶菇 Mn-SOD 基因的生物信息学分析

2.3.1 虎奶菇 Mn-SOD 基因序列的生物信息学分析

经过 NCBI 数据库中 BLASTx 比对, 发现与糙皮侧耳(登录号: MH645359.1) 的 Mn-SOD 基因序列同源性达到 79%, 初步确认已成功获得虎奶菇 Mn-SOD 基因。使用软件 Editseq 对序列起始密码子、终止密码子的位置进行预测。虎奶菇 PtMn-SOD 基因的 DNA 序列全长 1025 bp 和 cDNA 序列全长 747 bp。其中开放阅读框(ORF)长为 663 bp, 编码 220 个氨基酸(图 3)。

使用 DNAMAN 6.0 软件对得到的 PtMn-SOD 基因 DNA 序列和 cDNA 序列进行分析, 发现 PtMn-SOD 具有 7 个内含子(图 4), 这七个内含子的序列长度分别为 50、50、51、52、54、54 和 51 bp。第一、第二和第五个内含子的剪切规则为 TA-GG, 第三个内含子的剪切规则为 TG-GG, 第四、第六和第七个内含子的剪切规则为 GT-AG。

2.3.2 虎奶菇 Mn-SOD 基因编码蛋白的生物信息学分析 经 ProtParam 软件分析可知 PtMn-SOD 基因所编码蛋白质的分子式是 C₁₁₁₂H₁₇₀₆N₃₀₀O₃₂₃S₃, 分子量为 24.54 kDa, 理论等电点为 7.86, 属于碱性蛋白。负电荷残基(Asp + Glu)数为 22 个, 正电荷残基(Arg + Lys)数为 23 个。不稳定系数为 34.09, 属于稳定蛋白

```

1 ATGTTTCGCTATCGTCAAACACTGCACTCAGACCAGCCATCGCCAGGCATTTCGGTTCGTCGCA
M F A I V K T A L R P A I A R H S V V A
61 ACAACATGCCGCTCCAAGCACACCTTGCCAGATTTACCGTATGACTACAACGTACGCAAT
T C R S K H T L P D L P Y D Y N A L E
121 CCCTACATCTCAGAGAAATGAAGCTACATCACCAGAAGCATCACCACAACTATGTC
P Y I S E E I M K L
41 P Y I S E E I M K L
181 AATGGCTTAATGCTGCCGAGGAATCGTATGCTCAGCGAAGACAACCAAGGAACAGATT
N G L N A A E E S Y A S A K T T K E Q I
61 N G L N A A E E S Y A S A K T T K E Q I
241 GCTTCAATCCGCTCAAGTTAACGGAGGTGGCCATATAATCAITCCCTTCTCGG
G C T T C A A T C C G C C T C A A G T T A A C G G A G G T G G C C A T A T A A T C A I T C C C T T C T G G
81 A L Q S A L K F N G G G H I N H S L F W
A A G A A C C T T G C C C C C G A A T G G A G A T G G C G T A A A T T A C C G A C G G T C C G T G A A G A A
301 A A G A A C C T T G C C C C C G A A T G G A G A T G G C G T A A A T T A C C G A C G G T C C G T G A A G A A
101 K N L A P A N G D G G K L S D G P L K K
G C C A T C G A C G C T G A C T T C G G T C G G T C G G A C T T C A A A A A A A A A T T C A A T C C C A C C A C C
361 G C C A T C G A C G C T G A C T T C G G T C G G T C G G A C T T C A A A A A A A A A T T C A A T C C C A C C A C C
121 A I E R D F G S V E D F K N K F N T T T
421 GCTCCATCCAAGGAGTGGTGGGGCTGGTGGTTTCAACAGCAGACAAGAAAGCCTT
A A I Q G S G W G W V G F N T T T K K L
141 A A I Q G S G W G W V G F N T T T K K L
481 GAAATCGTAACAGGCCAACAGGACCAATGATTCACAGCTTCTATCATCCGGTGT
E I V T T A N Q D P L I S H V P I I G V
161 E I V T T A N Q D P L I S H V P I I G V
541 GATATCGGGAAACATCTTACCTCCAAATCAAAAACAGCCAGATTACCTCAAT
D I W E H A F Y
181 D I W E H A F Y
601 GCCATCGGAATGCATCAATTTCAAGGAGCTGAAGCCGCTTCTGAAGCCCTTCT
A I W N V I N F K E A E A R F L E A S S
201 A I W N V I N F K E A E A R F L E A S S
661 TAAATCACTTACATATCATCTAGAGACACAATATGATTTGGTTGAAAATGACAATC
*
721 CACTGACTAGCAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 3 基因 PtMn-SOD 的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列
Fig.3 Nucleotide and amino acid sequence of PtMn-SOD gene
注:阴影部分为 Mn-SOD 蛋白的保守区域。

质;脂肪系数为 81.68。总平均亲水性为-0.366, 预测该蛋白是亲水性蛋白。

对蛋白质进行功能位点分析, 发现在第 181~188 位氨基酸之间有 Mn-SOD 蛋白特征位点, 即 DIWEHAFY。把 Mn-SOD 蛋白氨基酸序列与茯苓、晶粒鬼伞、香菇、草菇、糙皮侧耳、奥氏蜜环菌(Armillaria solidipes)、高卢蜜环菌(Armillaria gallica)、乳白鸟巢菌(Crucibulum laeve)和灰光柄菇等九种真菌的 Mn-SOD 蛋白进行多序列比对, 发现 PtMn-SOD 蛋白与九种真菌的 Mn-SOD 蛋白具有高度的相似性(75% 以上)(图 5), 进一步证明已成功获得虎奶菇 Mn-SOD 基因 PtMn-SOD。

```

DNA ATGTTTCGCTATCGTCAAACACTGCACTCAGACCAGCCATCGCCAGGCATTTCGGTTCGTCGCA 60
cDNA ATGTTTCGCTATCGTCAAACACTGCACTCAGACCAGCCATCGCCAGGCATTTCGGTTCGTCGCA 60
DNA ACAACATGCCGCTCCAAGCACACCTTGCCAGATTTACCGTATGACTACAACGTACGCAAT 120
cDNA ACAACATGCCGCTCCAAGCACACCTTGCCAGATTTACCGTATGACTACAACG..... 112
DNA TACCGAGTTCCTCCGATCCAGCTGCTCACATGGAACCTCAGGCTCTGGAAACCTACATCT 180
cDNA .....CTCTGGAACCTACATCT 130
DNA CAGAGGAAATAATGAAGCTACATCACCAGAAGCATCACCACAACTTATGTCGAATGGGCTTA 240
cDNA CAGAGGAAATAATGAAGCTACATCACCAGAAGCATCACCACAACTTATGTCGAATGGGCTTA 190
DNA ATGCTGCCGAGGAATCGTATGCTTCAGCGAAGACAAACAAGGAACAGATTGCTTCAAT 300
cDNA ATGCTGCCGAGGAATCGTATGCTTCAGCGAAGACAAACAAGGAACAGATTGCTTCAAT 250
DNA CCGCCCTCAAGTTAACGGAGTGGTACGTAGATGGAATGTACAGAGTACCACCCCATG 360
cDNA CCGCCCTCAAGTTAACGGAGTGG..... 275
DNA GCTCACCCCTTTAGGCCATATAAATCATTCCCTCTTCTGGAAGAACCTTGCCCCCGCGAA 420
cDNA .....CCATATAAATCATTCCCTCTTCTGGAAGAACCTTGCCCCCGCGAA 320
DNA TGGAGATGGCGGTAAATTTATCCGACGCTCCGTTGAAAGAAAGCCATCGAGCGTGACTTCGG 480
cDNA TGGAGATGGCGGTAAATTTATCCGACGCTCCGTTGAAAGAAAGCCATCGAGCGTGACTTCGG 380
DNA TTCGGTTCGAGGACTTCAAATAAATTTCAATACCACCCGCTGCCATCCAAGGGAGTGG 540
cDNA TTCGGTTCGAGGACTTCAAATAAATTTCAATACCACCCGCTGCCATCCAAGGGAGTGG 440
DNA TTGGGGCTGGGTTGTGCGTATCTTGCTCCTCGTTTCACTATCTGTATCTCACTTGGGAT 600
cDNA TTGGGGCTGGGTTG..... 454
DNA ATAGGGTTTCAACACGACGACAAGAAGCTTGAATCGTAACACGGCCAACCAGGACCC 660
cDNA ....GTTTCAACACGACGACAAGAAGCTTGAATCGTAACACGGCCAACCAGGACCC 509
DNA ATTGATTTGTACGCATCAGCGTTGATATTCCTCTAGTGCTTCATTAAGTGGCATGTTTCA 720
cDNA ATTGATTT..... 517
DNA CACACGTTCCCTATCATCGGTGTTGATATCTGGGAACATGTACGTAGTCTACTACTGCAA 780
cDNA CACACGTTCCCTATCATCGGTGTTGATATCTGGGAACATG..... 556
DNA GTGACGTCATTGATACTGACTTTTCCCTCACAGGCTTCTACCTACCAAGTACGTCCATFCA 840
cDNA .....CTTCTACCTACCA..... 570
DNA TACTAACATGACACTGTCTCTCACATAGCATCTGTCTGTAGTACAAAACGTGAAGCCAG 900
cDNA .....TACAAAACGTGAAGCCAG 589
DNA ATGTGAGTATCACTCTCTTATGTCTATATTTCTGTGTAACCCGTTAATAGTACCTCA 960
cDNA AT.....TACCTCA 598
DNA ATGCCATCTGGAATGTCATCAATTTCAAGGAGGCTGAAGCGCGTTTCCCTTGAAGCCCTTT 1020
cDNA ATGCCATCTGGAATGTCATCAATTTCAAGGAGGCTGAAGCGCGTTTCCCTTGAAGCCCTTT 658
DNA CTTAA 1025
cDNA CTTAA 663
    
```

图 4 基因 PtMn-SOD 内含子序列结构图
Fig.4 The intron positions in the PtMn-SOD gene

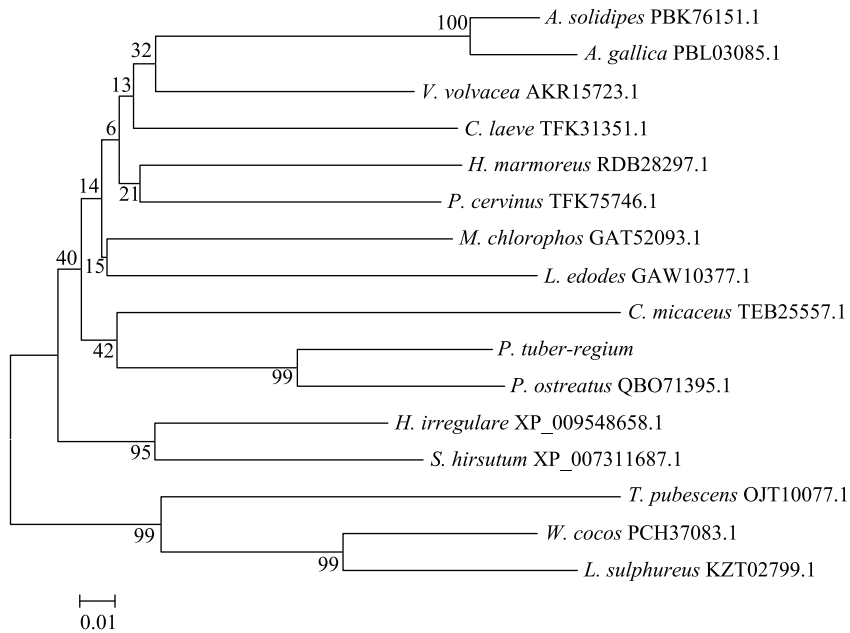


图6 基于16种真菌Mn-SOD蛋白氨基酸序列的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic trees based on the amino acid sequences of Mn-SOD protein from 16 kinds of fungi

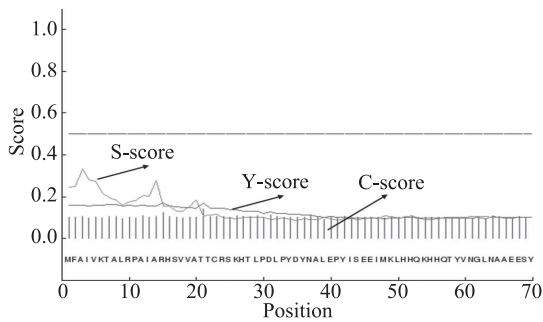


图7 信号肽预测

Fig.7 The prediction of signal peptide

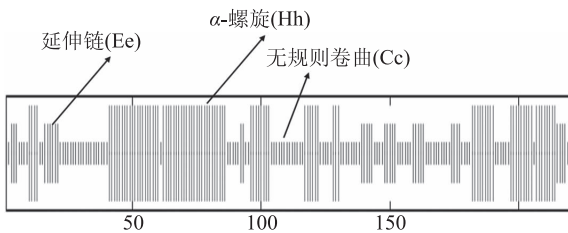


图8 二级结构预测

Fig.8 Secondary structure prediction

PtMn-SOD 蛋白序列相同部分超过 60.85%，因此该线虫的 Mn-SOD 蛋白可以作为同源建模的模板。依据同源建模的方法，借助 Swiss-model，以该线虫的 Mn-SOD 蛋白为模板，对 PtMn-SOD 蛋白进行三维结构预测并构建 3D 模型（图 9）。蛋白的三维结构很可能主要是由 α -螺旋、延伸链和无规卷曲组成，与二级结构预测分析结果一致。该蛋白以同源四聚体的形式存在，可结合 4 个锰离子。蛋白的三维结构更进一步证明已成功获得虎奶菇 Mn-SOD 基因 PtMn-SOD。

3 结论

以虎奶菇菌丝体为材料，通过研磨、超声、硫酸铵沉淀和透析，提取 Mn-SOD。用 WST-8 法测 Mn-

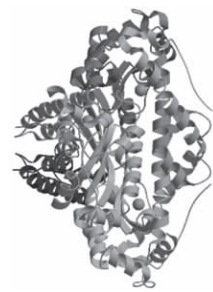


图9 PtMn-SOD 蛋白的三维立体结构

Fig.9 3-D structure of the deduced protein of PtMn-SOD

SOD 酶活力虎奶菇 Mn-SOD 酶活力为 1.66 个酶活力单位。用 H_2O_2 鉴定虎奶菇 SOD 的类型，酶经过 H_2O_2 处理后仍然有一定的活性，与未处理无明显差异，表明虎奶菇中 SOD 主要是 Mn-SOD。通过同源克隆、RACE 技术和 FPN1-PCR 等方法从虎奶菇中克隆获得一个 PtMn-SOD 基因，进行生物信息学分析。分别从基因序列、编码蛋白的功能位点和编码蛋白三维结构等方面，证明获得的是 SOD 基因中的 Mn-SOD 基因。通过生物信息学，研究了 PtMn-SOD 的理化性质和结构特征。PtMn-SOD 基因序列可以用于构建重组质粒，转移到大肠杆菌等目标菌体中表达，为构建产 Mn-SOD 基因工程菌奠定基础，从而进一步研究 Mn-SOD 的理化性质，增加 Mn-SOD 产量。虎奶菇 Mn-SOD 的提取鉴定与基因的克隆为 Mn-SOD 产品的深入开发和利用提供了帮助。

参考文献

- [1] 黄年来. 珍稀食用菌——虎奶菇的开发[J]. 江苏食用菌, 1995, 16(4): 2-3.
- [2] 黄年来, 郭美英, 黄黎红. 虎奶菇及其栽培[J]. 农技服务, 2002, 12: 24-25.
- [3] 王衍霖. 虎奶菇发酵液抑菌物质提取分离与鉴定[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.

- [4]张鹏,张静.碱提虎奶菇菌核多糖的分离纯化及结构分析[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2013,41(4):105-108.
- [5]刘阿娟,张静,张化朋,等.虎奶菇菌核多糖的化学修饰及活性研究[J].陕西师范大学学报:自然科学版,2014,42(1):105-108.
- [6]巫光宏,王玉琪,何典路,等.虎奶菇菌核水提多糖对糖尿病小鼠的抗氧化作用[J].天然产物研究与开发,2009,21(2):334-338.
- [7]朱华玲,班立桐,徐晓萍.食用菌菌糠中的生物活性酶及其再利用[J].园艺与种苗,2011(1):80-82,86.
- [8]Case A J. On the origin of superoxide dismutase: An evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling[J].Antioxidants,2017,6(4):82.
- [9]Zeinali F, Homaei A, Kamrani E. Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 79: 627-637.
- [10]邹媛媛.耐热超氧化物歧化酶基因的克隆表达及蛋白的纯化.相关酶学性质研究[D].苏州:苏州大学,2008.
- [11]秦松,何雨峰,况嘉铀,等.Mn-SOD的提取及其应用研究进展[J].食品工业科技,2019,40(15):363-367.
- [12]Jiang M, Miao L X, He C M. Overexpression of an oil radish superoxide dismutase gene in broccoli confers resistance to downy mildew[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30: 966-972.
- [13]Zhang Y, Ding S H, Lu Q T, et al. Characterization of photosystem II in transgenic tobacco plants with decreased iron superoxide dismutase[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2011, 1807: 391-403.
- [14]高建华,郭艳翔,刘佳宾,等.杏鲍菇菌丝体中SOD提取方法研究[J].食用菌,2007(2):50-51.
- [15]侯玉艳,吴素蕊,张丽,等.黑脉羊肚菌SOD的纯化及特性研究[J].食品工业科技,2015,36(15):147-151.
- [16]吴国荣,邹玉珍,程光宇,等.猴头子实体锰型超氧化物歧

(上接第149页)

- [9]:105-109.
- [29]郑宇,赵翠梅,吴亚楠,等.山西老陈醋风味物质组成特征及风味轮分析[J].食品科学技术学报,2019,37(4):24-34.
- [30]Pino J A, Márquez E, Castro D. Volatile and non-volatile acids of noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(7): 1247-1249.
- [31]J Yang R P, S Janke-Stedronsky F Abawi. Free-radical-scavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage [J]. Food Chemistry, 2007, 5(20): 302-308.
- [32]Chu S-C, Chen C. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha [J]. Food Chemistry, 2006, 98(3): 502-507.
- [33]Yang J, Gadi R, Paulino R, et al. Total phenolics, ascorbic acid, and antioxidant capacity of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder as affected by illumination during storage [J]. Food

- Chemistry, 2010, 122(3): 627-632.
- 化酶的纯化及其性质鉴定[J].植物资源与环境,1996(2):9-14.
- [17]Yin C M, Zhao W X, Zhu J H, et al. Cloning and characterization of a differentially expressed mitochondrial manganese superoxide dismutase gene from *Pleurotus ostreatus* [J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(3): 1597-1606.
- [18]严俊杰,王瑞清,谢斌,等.草菇超氧化物歧化酶家族基因的组成、结构及其表达的特殊性[C].中国菌物学会学术年会论文摘要,2016:83.
- [19]高建华,郭艳翔,刘佳宾,等.杏鲍菇菌丝体中SOD提取方法研究[J].食用菌,2007(2):50-51.
- [20]Wang M, Zhao X, Xiao Z, et al. A wheat superoxide dismutase gene TaSOD2 enhances salt resistance through modulating redox homeostasis by promoting NADPH oxidase activity [J]. Plant Molecular Biology, 2016, 91(1-2): 115-130.
- [21]Yin C M, Zhao W X, Zheng L S, et al. High-level expression of a manganese superoxide dismutase (PoMn-SOD) from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(1): 259-269.
- [22]Yin C M, Zheng L S, Zhu J H, 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.
- [23]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: 109.
- [24]Hunter G J, Trinh C H, Bonetta R, et al. The structure of the *Caenorhabditis elegans* manganese superoxide dismutase MnSOD-3-azide complex [J]. Protein Science, 2015, 24(11): 1777-1788.

- [34]Deng S, West B J, Jensen C J. A quantitative comparison of phytochemical components in global noni fruits and their commercial products [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 267-270.
- [35]朱丽华,蒋国强,杨水新.高效液相色谱法测定菟丝子中芦丁、槲皮素及山柰酚的含量[J].浙江中医学院学报,2001,5(4):65-66.
- [36]夏虹,彭茂民.高效液相色谱法同时测定槐花中芦丁、槲皮素和山柰酚的含量[J].应用化工,2014,43(10):1919-1921.
- [37]高陪,苏建,沈竟,等.微生物发酵转化芦丁制备槲皮素的研究[J].四川大学学报:自然科学版,2010,47(6):1429-1433.
- [38]魏朝治,辛雪,陈蕾蕾,等.乳酸菌在黄酮类化合物生物转化中的应用[J].中国酿造,2016,35(10):13-17.
- [39]林金莺,刘鹏,方韵婷,等.诺丽酵素长效抗自由基的探究[J].食品工业,2017,38(4):222-225.