

# 草菇葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因及其可变剪接体的克隆与表达量分析

陶永新<sup>1,2</sup> 张磊<sup>2</sup> 郭丽璇<sup>2</sup> 陈仁良<sup>2</sup> 连玲丹<sup>2</sup> 谢宝贵<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 福建农林大学园艺学院 福建 福州 350002

<sup>2</sup> 福建农林大学菌物研究中心 福建 福州 350002

**摘要:** 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是戊糖磷酸途径的限速酶,影响着细胞生命活动所需要的 NADPH 的产生。本研究从草菇中克隆到该基因的 2 个转录本,并测定了它们在两个同核体和形成的异核体菌株中的表达量。结果表明,草菇葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 (*g6pdh*) 的 gDNA 序列长 1 954bp,有 7 个内含子,可产生两个转录本:一个是内含子全部剪切的转录本 (*g6pdhID*),编码 515 个氨基酸且有完整结构域的蛋白质;另一个是第 5 个内含子保留的可变剪接变体 (*g6pdhIR*),预测编码 316 个氨基酸但没有完整结构域的蛋白质。定量 PCR 结果显示,可变剪接变体 *g6pdhIR* 在草菇同核体与异核体中的表达量均很低,因此转录本 *g6pdhID* 为 *g6pdh* 基因的主要剪接体;并且 *g6pdh* 基因在生长旺盛的异核体中的表达量远远高于在生长较弱的两个同核体中的任何一个。研究结论说明,糖代谢活动的强弱与食用真菌的生长与发育有密切关系。

**关键词:** 食用真菌, 戊糖磷酸途径, 基因克隆, 定量 PCR

## Cloning and expression analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene and alternative splicing variant in *Volvariella volvacea*

TAO Yong-Xin<sup>1,2</sup> ZHANG Lei<sup>2</sup> GUO Li-Xian<sup>2</sup> CHEN Ren-Liang<sup>2</sup> LIAN Ling-Dan<sup>2</sup> XIE Bao-Gui<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Horticulture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

<sup>2</sup> Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

**Abstract:** Glucose-6-phosphate dehydrogenase as rate-limiting enzyme in pentose phosphate pathway plays an important role in the production of NADPH being necessary to vital activities of cell. In this study, two transcripts of glucose-6-phosphate dehydrogenase encoding gene were cloned, and their expression levels were determined in homokaryon and heterokaryon strains of *Volvariella volvacea*, respectively. The results showed that gDNA sequence of *g6pdh* spanning 1 954bp contains seven introns, the fifth of them exists intron retention. Therefore, gene *g6pdh* can produce two transcripts: one in which all introns

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (2014CB138302); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS24); 福建农林大学优秀博士学位论文资助基金 (YB2013007)

\*Corresponding author. E-mail: mrcfafu@163.com

收稿日期: 2015-02-09, 接受日期: 2015-05-06

were removed (*g6pdhID*), encoding 515aa glucose-6-phosphate dehydrogenase with integral conserved domain; another is alternative splicing variant with the fifth intron retention (*g6pdhIR*), encoding 316aa presumptive protein without integral domain. The results of quantitative PCR showed that the expression levels of *g6pdhIR* were extremely low in both homokaryon and heterokaryon strains, suggesting that *g6pdhID* was the main transcript of *g6pdh* gene. The expression level of *g6pdh* gene in rapid-growing heterokaryon strain was much higher than that in both of two slow-growing homokaryon strains. It is suggested that activity of glycometabolism may be involved in the growth and development of mushroom.

**Key words:** edible fungi, pentose phosphate pathway, gene clone, quantitative PCR

戊糖磷酸途径 (pentose phosphate pathway, PPP) 是除糖酵解之外的糖分解代谢的重要途径, 其主要的生理功能是产生 NADPH, 作为还原力以供生物合成利用。此外, 戊糖磷酸途径的中间产物还为合成代谢提供多种原料, 如可供核酸代谢的磷酸戊糖 (Kruger & Schaewen 2003), 这些原料参与生物体氨基酸和脂肪酸的合成等。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH, EC.1.1.1.49) 和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6-phosphogluconate dehydrogenase, 6PGDH, EC.1.1.1.44) 是戊糖磷酸途径的两个关键酶、限速酶 (Hou *et al.* 2007)。其中, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化戊糖磷酸途径的第一步反应, 即将 6-磷酸葡萄糖氧化为 6-磷酸葡萄糖内酯, 同时还原  $\text{NADP}^+$  为 NADPH, 这步反应不可逆, 是整个戊糖磷酸途径的限速反应 (Salati & Amir-Ahmady 2001)。

已有研究表明, 戊糖磷酸途径与生物体的生长发育和各种环境胁迫等密切相关 (Esposito *et al.* 2003; Hou *et al.* 2007)。冯作山等 (2014) 发现白灵侧耳 *Pleurotus nebrodensis* 在后熟期后期、温差刺激以及子实体生长期时, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的酶活性都会显著升高。在双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* 子实体的形成初期, 发现葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的表达量也出现显著增加 (Minamide & Hammond 1985)。本研究物种草菇 *Volvariella volvacea* (Bull.) Singer 是我国南方重要的栽培食用菌 (戴玉成等 2010), 然而在草菇杂交育种时, 分离的单孢菌株多数生长速度缓慢, 若将两个不能出

菇的同核体菌株配对形成异核体后, 发现可以出菇的异核体菌丝生长旺盛、速度变快。异核体比同核体生长旺盛以及异核体可以出菇的这种优势, 必然与糖代谢有密切关系。前期研究发现, 草菇糖酵解途径的重要参与基因磷酸果糖激酶基因 *pfk* 等在异核体中的表达量比在相应的两个同核体中要上调表达很多倍 (刘朋虎等 2011, 2012, 2013)。陈志宏等 (2014) 也研究发现糖代谢的另一个重要途径戊糖磷酸途径中, 草菇 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 (*6pgdh*) 在生长速度较快的异核体菌丝中比对应的两个同核体菌丝中表达量要显著升高。而本文将着重研究戊糖磷酸途径的另一个限速酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的编码基因, 以期进一步深入了解草菇异核体优势与糖代谢的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源及生长条件

草菇两个同核体菌株 PYd21 (ACCC52632)、PYd15 (ACCC52631) 以及两者质配后形成的异核体菌株 H1521 (ACCC52633), 均来源于福建食用菌种质资源保藏与管理中心, 并定期转接到 PDA 培养基中 20℃ 下保藏。将 3 个菌株接种于液体 PDA 培养基中, 33℃、120r/min 转速下, 摇瓶培养 5d, 收集菌丝并立即保存在液氮中, 用于 RNA 提取。固体平板培养时, 取 3 个菌株相同大小的接种块, 同时接种于平板 PDA 上, 并于 33℃ 下倒置培养 4d 后取出, 观察其菌落形态与生长速度。出菇试验时采用稻草基质 (Chen *et al.* 2004) 进行栽培, 并观

察其在栽培料中的生长情况。

### 1.2 草菇中戊糖磷酸途径的基因注释及鉴定

根据草菇 PYd21 (GenBank: PRJNA171553) 全基因组序列, 在 KEGG 数据库中进行 KEGG pathway 注释, 然后找出草菇中戊糖磷酸代谢途径中参与的酶分子所对应的基因, 同时对通路中注释到的基因通过 Blast 进行验证和鉴定。

### 1.3 总 RNA 提取和 cDNA 合成

草菇菌丝体总 RNA 采用 RNeasy Pure Plant Kit (天根, 中国) 进行提取。使用 RNA LA PCR KIT Ver1.1 (TaKaRa, 日本) 合成全长 cDNA 第一链进行基因克隆。使用 PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa, 日本) 合成 cDNA 进行定量 PCR 试验。试验方法按照试剂盒说明书进行。

### 1.4 *g6pdh* 基因转录本的克隆测序

根据草菇 PYd21 基因组中注释到的戊糖磷酸代谢途径中的基因 *g6pdh* 对应序列的预测 CDS, 在其基因组位置的上、下游各延长一小段来进行引物设计, 分别在菌丝体 PYd21、PYd15 中克隆 *g6pdh* 基因的转录本。引物序列为: F: 5'-TCCTCATCCTCTCA TCTCAACAAT-3'; R: 5'-AAACCCCAAGTCGCTTATAG-3'。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s、57℃ 退火 30s、72℃ 延伸 120s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10min。将 PCR 产物回收纯化后, 连接 pMD18-T 载体转化到大肠杆菌 DH5α 中。挑取单克隆进行菌落 PCR, 并从中选取有插入目标大小片段的若干单克隆进行测序。

### 1.5 *g6pdh* 基因编码蛋白的生物信息学分析

基本理化性质采用 ExPASy 程序 (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) 进行分析; 蛋白质亚细胞定位预测采用 PSORT 程序 (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 分析; 磷酸化位点预测采用 NetPhos 2.0 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 进行。系统进化树则选用 21 个物种[包括担子菌 7 个目 (order) 19 个物种和子囊菌的 2 个物种]的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的氨基酸序列利用 MEGA5 软件构

建。具体参数: 采用最大似然 (maximum likelihood, ML) 法, 选择泊松修正 (Poisson Correction) 模型; Bootstrap 检验值为 1 000。

### 1.6 *g6pdh* 基因不同转录本的荧光定量 PCR

根据 *g6pdh* 基因克隆得到的两个不同转录本 (*g6pdhID* 和 *g6pdhIR*) 分别设计定量 PCR 的引物: *g6pdhIDF*: 5'-GTCAACAGAATCATCGTCGAA-3'; *g6pdhIDR*: 5'-TCTCATCTTCCGTCCAGTATTG-3'。 *g6pdhIRF*: 5'-CAAGGCTAGATTAATACCACTCC-3'; *g6pdhIRR*: 5'-GTTTCATTACGAGCGATGTCTT-3'。定量 PCR 采用 *gapdh* 基因作为内参 (Tao *et al.* 2014), 仪器使用 CFX96 实时定量 PCR 仪 (伯乐, 美国), 所用试剂为 SsoAdvanced SYBR Green Supermix (伯乐, 美国), 反应体系为: 0.7μL 引物 (10mmol/L), 10μL Supermix, 1.0μL 模板 cDNA, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20μL。定量 PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 3min, 95℃ 变性 5s, 57℃ 退火加延伸 30s, 40 个循环。融解曲线的程序温度为 65–95℃。相对表达量计算采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法处理。

### 1.7 表达谱分析 *g6pdh* 基因表达量

将草菇以上 3 个菌株菌丝体表达谱 (GEO database: GSM1055162, GSM1055163, GSM1055164) 的原始测序标签 (Tag) 运用 Zoom 软件 (Zhang *et al.* 2010) 定位到 *g6pdh* 基因 (*g6pdhID*) 序列上, 并统计正向的且唯一一定位在 *g6pdh* 上的标签数, 然后根据表达量标准化公式: TPM(transcripts per million clean tags)=唯一一定位在 *g6pdh* 基因上的正向 Clean Tag 数×1 000 000/该样本中总 Clean Tag 数, 进行标准化处理, 最后得到 *g6pdh* 基因在 3 个菌株中的表达量 (Tao *et al.* 2013)。

## 2 结果与分析

### 2.1 草菇戊糖磷酸途径

根据草菇 PYd21 基因组序列的预测编码基因, 在 KEGG 数据库中进行注释, 得到草菇中戊糖磷酸途径对应的编码基因 (图 1)。NADPH 的产生主要

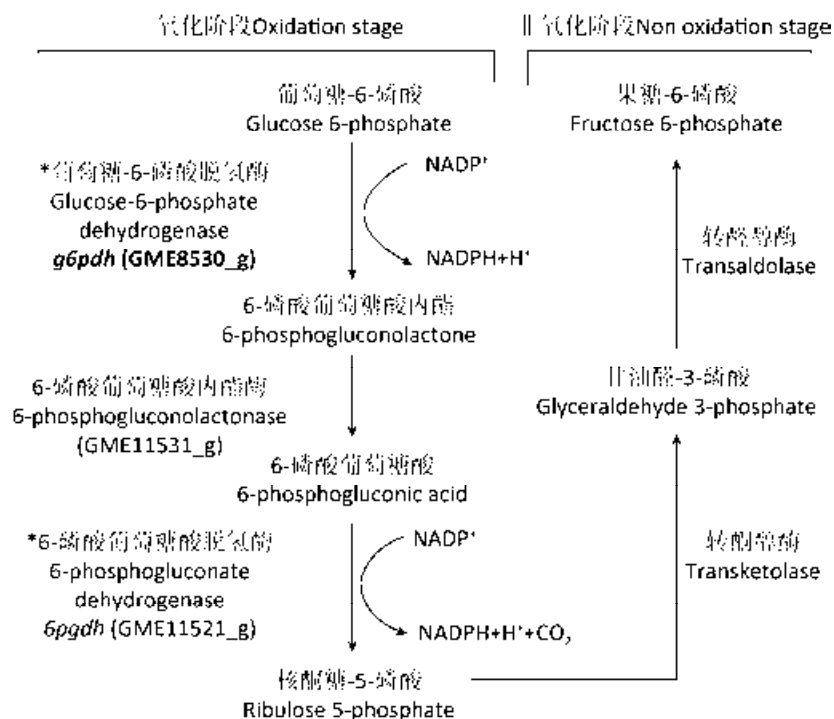


图 1 草菇戊糖磷酸途径代谢通路的注释 括号内为草菇中该基因的 ID 号, 星号表示关键限速酶, 粗体表示本文研究基因。  
Fig. 1 Annotation of pentose phosphate pathway in *Volvariella volvacea*. ID numbers of the genes were indicated in bracket; two rate-limiting enzymes were indicated by asterisk and the gene investigated in this paper was indicated by bold.

发生在氧化阶段的第一步和第三步, 而这两步的催化酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (G6PDH) 和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6PGDH) 都是戊糖磷酸途径的限速酶。6-磷酸葡萄糖经过这两个不可逆的脱氢反应生成 5-磷酸核酮酸, 再经过差向异构酶可生成核酮糖-5-磷酸。5-磷酸核糖是核酸和核苷酸的组成成分, 是嘌呤核苷酸合成的原料。而在非氧化阶段, 核酮糖-5-磷酸在多种转酮醇酶和转醛醇酶的作用又可生成果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸, 可重新进入糖酵解途径进行代谢。其中, 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶是戊糖磷酸途径起始步的关键酶, 它在草菇中对应的基因 ID 编号为 GME8530\_g (图 1)。

## 2.2 *g6pdh* 基因 gDNA 的验证和 cDNA 序列

根据草菇 PYd21 基因组序列的注释和同源比对, 我们得到草菇 *g6pdh* 基因长 1 954bp 的 gDNA

序列片断 (GenBank: KF975669)。通过对同核体 PYd15 重测序基因组进行 Blast, 草菇 *g6pdh* 基因在 PYd15 中的 gDNA 序列与 PYd21 中的完全相同, 说明该基因在异核体 H1521 中的序列无多态性, 来源于两种不同核的该基因序列只有一种。分别在同核体 PYd15 和 PYd21 中, 对草菇 *g6pdh* 基因的全长 ORF 进行克隆, 其中 PYd21 中挑取 6 个阳性单克隆测序, PYd15 中挑取 5 个阳性单克隆测序。测序结果表明: PYd21 和 PYd15 都存在 2 种转录本, 它们的序列长度相差 54bp。较长的转录本序列长度为 1 602bp (*g6pdhIR*, GenBank: KP747452); 而较短的转录本序列长度为 1 548bp (*g6pdhID*, GenBank: KP747451)。通过将 *g6pdh* 基因的 gDNA 序列与上述克隆得到的两个转录本进行比对, 得到该基因的基因结构 (图 2)。



通过上述比对结果分析可知: 草菇 *g6pdhID* 含有 8 个外显子, 7 个内含子, 编码 515 个氨基酸 (GenBank: AHL26985)。通过在 NCBI 中比对发现, 草菇 *g6pdhID* 预测编码的蛋白质 (G6PDHID) 序列与其他物种的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶长度较为相近, 且含有两个完整的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶保守结构域: N 端的 NAD 结合结构域和 C 端结构域 (图 3)。而草菇 *g6pdhIR* 只含有 7 个外显子, 6 个内含子, 与 *g6pdhID* 相比, 在 *g6pdhID* 基因的第 5 个内含子位点同样进行了正常的转录。通过对其进行 ORF 预测, 发现 *g6pdhIR* 的开放阅读框在 *g6pdh* 基因的第 5 个内含子中提前遇到终止密码子, 因此仅编码 361 个氨基酸。预测其编码的氨基酸 (G6PDHIR) 序列比其他物种的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶长度较短, 且只有一个完整的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 N 端的 NAD 结合结构域, C 端的结构域则显示不完整 (图 3)。三级结构预测也显示: G6PDHID 的三维结构由近乎对称的两部分区域组成; 而

G6PDHIR 则比 G6PDHID 缺失了一大块区域 (图 3)。因此, *g6pdhID* 是草菇葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的正常转录本, 而 *g6pdhIR* 则为草菇葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的可变剪接体, 在第 5 个内含子位置发生内含子保留的可变剪接方式, 编码不完整的蛋白质, 推测可能为无义的可变剪接。

### 2.3 *g6pdhID* 基因编码蛋白质的生物信息学分析

通过生物信息学分析, *g6pdhID* 基因编码的蛋白质 (G6PDHID) 分子量约为 58kDa, 等电点为 6.63, 无信号肽。亚细胞定位发现, 该蛋白作用于细胞质中或者胞质中的一些微小体中, 与戊糖磷酸代谢途径在细胞胞液中进行相符合。在酶数据库中预测, 该蛋白确实是葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, EC 编号为 1.1.1.49。由于蛋白质的磷酸化修饰对调节基因的转录及改变蛋白质的功能方面有重要作用, 预测显示草菇 G6PDHID 存在多个磷酸化位点, 包括: 丝氨酸 (Ser) 位点 13 个, 苏氨酸 (Thr) 位点 9 个, 酪氨酸 (Tyr) 位点 9 个, 且分存于整个氨基酸序列中 (图 4)。

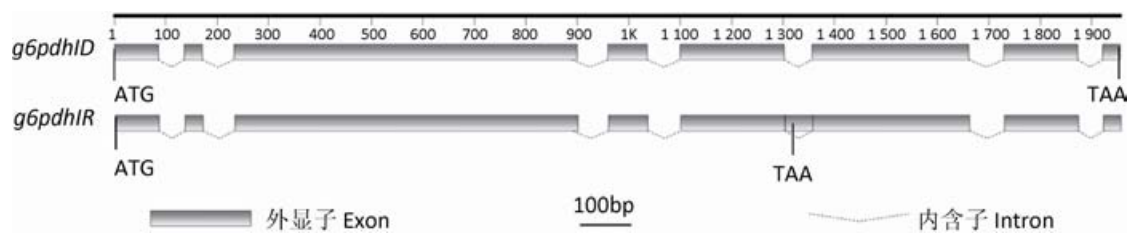


图 2 草菇 *g6pdh* 基因的结构示意图

Fig. 2 Structure diagram of *Volvariella volvacea g6pdh* gene model.

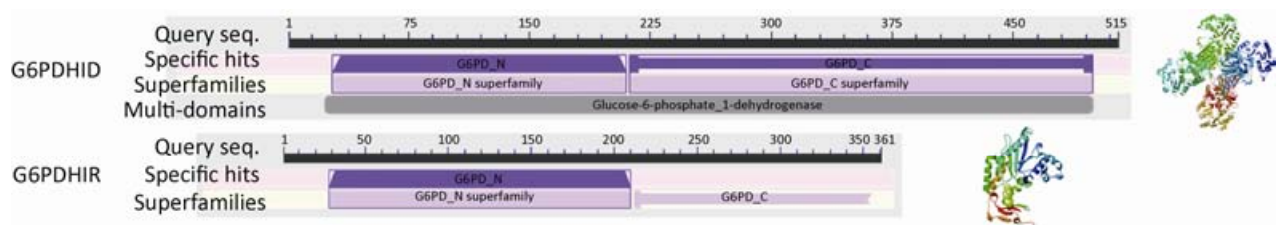


图 3 G6PDH 两个转录本的预测蛋白质及保守结构域分析

Fig. 3 Protein prediction and conserved domain analysis of two transcripts of *g6pdh* gene.

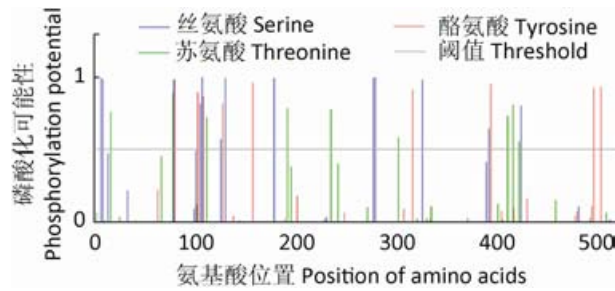


图 4 G6PDHID 的磷酸化位点预测

Fig. 4 Prediction of phosphorylation sites of *Volvariella volvacea* G6PDHID.

系统发育分析结果表明 (图 5): 真菌葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因进化比较保守, 该基因氨基酸序列的聚类结果与物种目 (order) 级别的分类基本一致。草菇 G6PDH 序列与伞菌目中的双孢蘑菇

*Agaricus bisporus*、腐生菌灰盖鬼伞 *Coprinopsis cinerea* 和菌根菌双色蜡蘑 *Laccaria bicolor* 聚在一起, 而草菇、双孢蘑菇和灰盖鬼伞三者的生态地位较为相近, 均属于草腐生菌类。

#### 2.4 *g6pdh* 基因及其两种剪接体的表达量分析

分别针对 *g6pdh* 基因设计的两对引物进行荧光定量 PCR, 由于 *g6pdhIR* 比 *g6pdhID* 转录本多一个 54bp 的内含子, 因此, 在此内含子中设计 *g6pdhIRF*, 定量 PCR 的结果代表 *g6pdhIR* 转录本的表达量。在 *g6pdhIR* 和 *g6pdhID* 转录本的公共外显子区设计引物 (*g6pdhIDF* 和 *g6pdhIDR*) 的定量 PCR 结果代表两个转录本表达量之和, 减去前面 *g6pdhIRF* 和 *g6pdhIRR* 引物定量 PCR 的结果后, 则为 *g6pdhID* 转录本的真实表达量。因此得出 *g6pdhIR* 和 *g6pdhID* 在草菇同核体与异核体 3 种菌

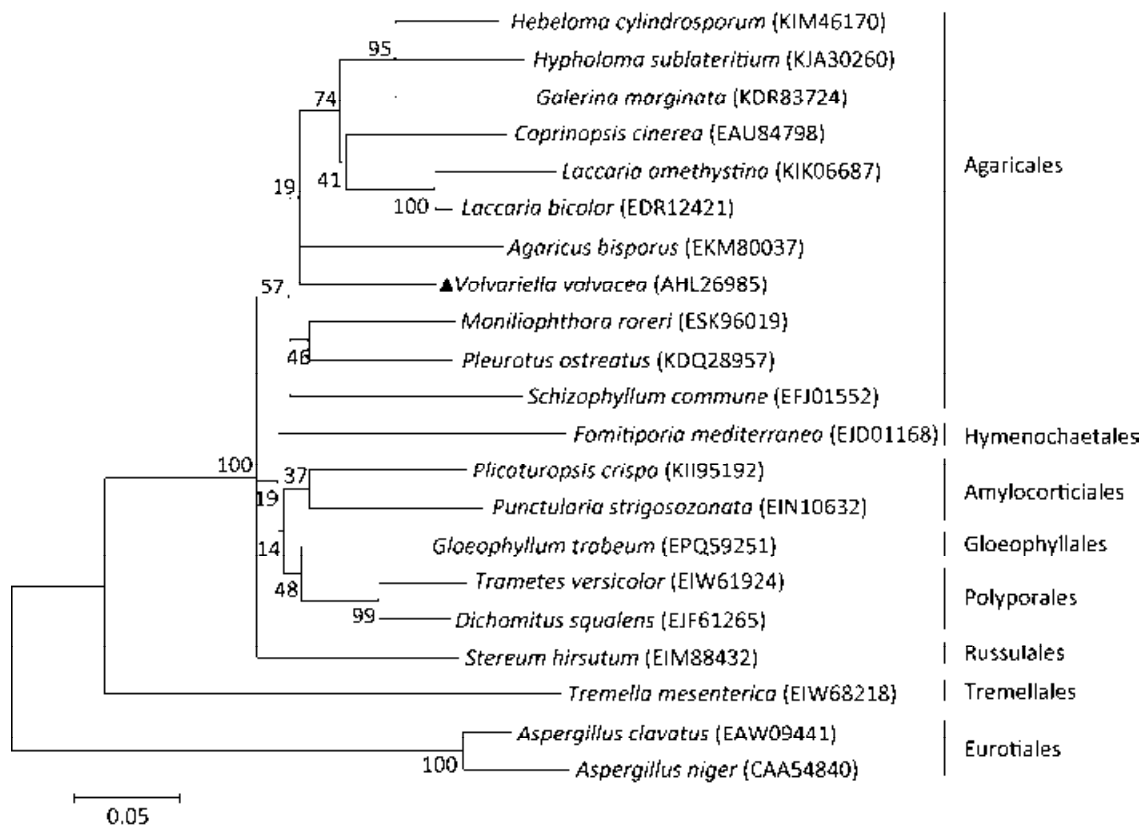


图 5 G6PDH 蛋白质序列的系统进化树 (括号内为蛋白序列在 GenBank 的登录号)

Fig. 5 Phylogenetic tree of G6PDH protein (GenBank accessions numbers of G6PDH were indicated in bracket).

丝体中的表达量, 结果表明: *g6pdhID* 在 3 个菌株中有显著的差异表达, 且在异核体 H1521 中的表达量最高, 在同核体 PYd15 中较低, 在同核体 PYd21 中最低; 而 *g6pdhIR* 的表达量在 3 个菌株中都处于非常低的水平, 并且在 3 个菌株中都没有显著差异 (图 6)。

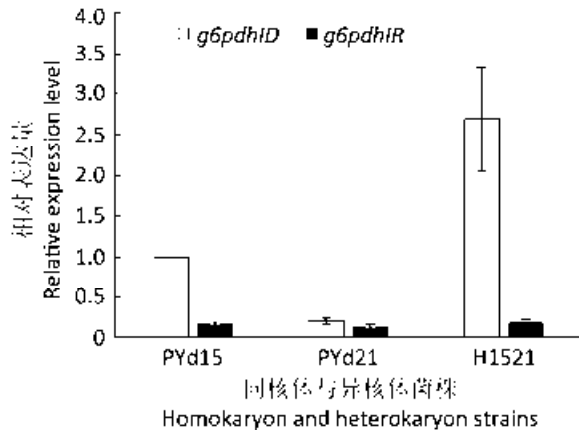


图 6 荧光定量 PCR 检测 *g6pdhID* 和 *g6pdhIR* 转录本在草菇同核体与异核体菌株的表达量

Fig. 6 Relative expression levels of two transcripts of *Volvariella volvacea g6pdh* gene in homokaryon and heterokaryon strains by Q-PCR.

另外, 根据草菇 3 个菌株菌丝体的数字基因表达谱数据计算的 TPM 值也显示出 *g6pdh* 基因 (*g6pdhID* 和 *g6pdhIR* 综合表达量) 在草菇同核体与异核体 3 个菌株中的表达量 (图 7)。表达谱结果表明: 草菇 *g6pdh* 基因 (*g6pdh* 基因表达量为 *g6pdhID* 和 *g6pdhIR* 表达量之和) 在异核体 H1521 中的表达量不仅远远高于两个同核体菌株的任何一个, 也高于两个同核体菌株表达量之和, 这与荧光定量 PCR 的检测结果一致。

### 2.5 草菇同核体与异核体菌株的生长情况

此外, 对草菇以上同核体与异核体 3 个菌株在平板 PDA 培养基中的菌落形态与生长情况进行观察, 结果显示异核体 H1521 的菌丝生长速度最快 (图 8B), 同核体 PYd15 略慢 (图 8A), 同核体 PYd21 最慢 (图 8C)。同时在以稻草为主的栽培料中培养,

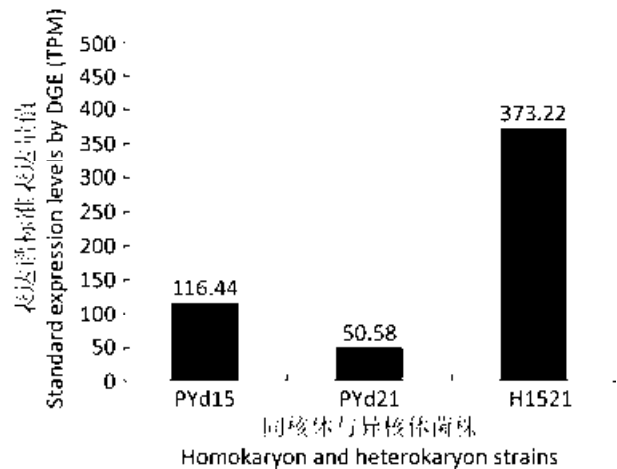


图 7 表达谱分析 *g6pdh* 基因在草菇同核体与异核体菌株的表达量

Fig. 7 Expression levels of *Volvariella volvacea g6pdh* gene in homokaryon and heterokaryon strains by digital gene expression profile (DGE).

结果也显示出异核体 H1521 的菌丝生长速度快、长势旺、可以出菇 (图 8E); 而同核体 PYd15 菌丝在栽培料中略有生长、不能出菇 (图 8D); 同核体 PYd21 菌丝几乎不长、不能出菇 (图 8F)。三者在 PDA 培养基和栽培料上的生长情况均与 *g6pdh* 基因的表达量变化趋势相似。

## 3 讨论

前体 mRNA 的可变剪接是真核基因转录后重要的加工环节, 通过对外显子或内含子有选择性的去除或保留, 从而使一个基因产生多个成熟的 mRNA, 进而产生结构和功能不同的蛋白质, 增加蛋白质的多样性, 参与不同的生物过程 (Aaronson & Meshorer 2013; Moore *et al.* 2010)。在对草菇 *g6pdh* 基因转录本的克隆中得到它的两个转录本: *g6pdhID* (内含子全部剪切) 和 *g6pdhIR* (第 5 个内含子保留), 且在草菇两个同核体中同时都克隆到草菇 *g6pdh* 基因的这两个不同的可变剪接体。除此之外, *g6pdh* 基因发生在其他位点的可变剪接

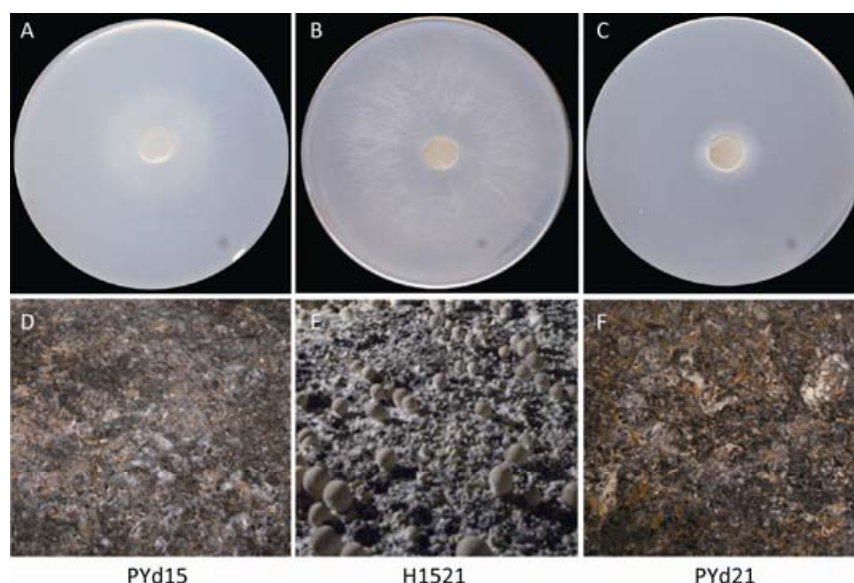


图 8 草菇同核体与异核体菌株在平板 PDA 培养基 (A、B、C) 和稻草栽培料中 (D、E、F) 的生长情况

Fig. 8 *Volvariella volvacea* homokaryon and heterokaryon strains grown on both PDA medium (A, B, C) and straw substrate (D, E, F).

体形式,目前在本试验的两个草菇菌株中均没有被检测到。参与戊糖磷酸途径的两个关键酶存在可变剪接现象在其他生物中也有报道:在人体中发现葡萄糖-6-磷酸脱氢酶存在内含子保留的可变剪接体,它们主要分存在精子和粒性白细胞中(Hirano & Beutler 1988, 1989)。另外,在白色念珠菌 *Candida albicans* 中也发现 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶存在两个不同的可变剪接体,它们分别定位在不同的亚细胞器上(Strijbis *et al.* 2012)。它们可能与调节戊糖磷酸途径的代谢活性有关。分析草菇 *g6pdh* 基因的两个可变剪接体: *g6pdhID* 可以编码完整的蛋白质,而 *g6pdhIR* 则在第 5 个内含子中提前终止翻译,导致编码的蛋白质 C 端结构域不完整。同时定量 PCR 针对内含子保留的可变剪接体 *g6pdhIR* 设计引物,定量结果也显示 *g6pdhIR* 在草菇同核体与异核体 3 个菌株中都有表达且基本一致,但表达量都比较低。由此推断, *g6pdhIR* 可能不编码蛋白质或编码无葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性的蛋白质,推测其可能属于无义介导的 mRNA 降解形式。真

核细胞的许多基因通过形成 mRNA 质量监控机制以实现基因的准确表达,其中无义介导的 mRNA 降解就是通过识别含有提前终止密码子的异常 mRNA 来对其进行降解,有效避免截短蛋白的积累,在真核生物基因表达的监控方面扮演重要角色(Modrek & Lee 2002)。至于这种 *g6pdhIR* 的可变剪接受到的调控机理以及它又是如何来调控草菇中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶蛋白质的表达量的,还需要进一步研究。

草菇 *g6pdh* 基因在同核体与异核体 3 个菌株中的表达量分别通过定量 PCR 和表达谱测序两种不同的方法检测,结果均显示在异核体菌株中的表达量要显著高于两个同核体菌株中各自的表达量,以及两个同核体表达量之和。由于 *g6pdh* 基因的可变剪接体 *g6pdhIR* 在 3 个菌株中的表达量都较一致且比较低,因此,能编码完整结构域蛋白质的 *g6pdhID* 转录本的表达量可以反映出葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的表达情况。另外,之前对草菇戊糖磷酸途径中的另一个关键酶 6-磷酸葡萄糖酸脱氢



酶基因 (*6pgdh*) 的研究, 同样显示 *6pgdh* 基因在草菇异核体菌株中的表达量要远远超过两个同核体 (陈志宏等 2014)。由此推断草菇戊糖磷酸途径的代谢活性在异核体中要远远大于对应的两个同核体。对草菇糖酵解的研究也得出了类似的结果: 草菇异核体中的糖酵解参与基因的表达量要远远高于两个同核体 (刘朋虎等 2011, 2012, 2013)。糖酵解和戊糖磷酸途径都是生物机体中葡萄糖的分解代谢主要途径, 糖酵解为生命活动提供能量 ATP, 而戊糖磷酸途径则主要为生物合成提供还原力 NADPH (Esposito *et al.* 2003)。草菇异核体的糖分解代谢的活性, 远远高于形成它的两个同核体, 说明异核体要比同核体更加具有优势, 生命活动更加旺盛。这一点也从草菇异核体和同核体菌丝的菌落形态和生长速度上体现出来 (图 8)。

戊糖磷酸途径的关键酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶以及糖酵解等糖代谢过程的其他几个关键酶, 在食用真菌的生长和发育过程中起着重要作用。冯作山等 (2014) 检测到葡萄糖-6-脱氢酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶酶活在白灵侧耳 *Pleurotus nebrodensis* 后熟期、温差刺激下以及子实体生长期出现 3 个峰值。在双孢蘑菇 *Agaricus bisporus* 中, 发现子实体形成初期葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的表达量开始迅速增加 (Minamide & Hammond 1985)。综合分析, 食用真菌在由同核体配对形成异核体、再由异核体发育成子实体的过程中, 需要大量能量以及合成大量物质, 这些过程都需要糖代谢, 包括糖酵解和戊糖磷酸途径来提供大量 ATP 和还原力 NADPH, 以及合成中间产物。是否糖代谢的活性的减弱会影响甚至阻碍食用真菌子实体的形成与发育, 还需下一步的基因缺失或抑制等研究。

## [REFERENCES]

- Aaronson Y, Meshorer E, 2013. Stem cells: regulation by alternative splicing. *Nature*, 498(7453): 176-177
- Chen S, Ge W, Buswell JA, 2004. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiology Letters*, 230: 171-176
- Chen ZH, Fu MP, Li YF, Tao YX, Jiang YJ, Xie BG, 2013. Cloning and expression of 6-phosphogluconate dehydrogenase alternative splicing in *Volvariella volvacea*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 20(4): 584-589 (in Chinese)
- Dai YC, Zhou LW, Yang ZL, Wen HA, Bau T, Li TH, 2010. A revised checklist of edible fungi in China. *Mycosystema*, 29: 1-21 (in Chinese)
- Esposito S, Massaro G, Vona V, Rigano VDM, Carfagna S, 2003. Glutamate synthesis in barley roots: the role of the plastidial glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta*, 216: 639-647
- Feng ZS, Zou YJ, Hu QX, 2014. Activities of ectoenzymes and respiratory enzymes and ionic flux of *Pleurotus nebrodensis* throughout cultivation process. *Mycosystema*, 33(2): 341-354 (in Chinese)
- Hirono A, Beutler E, 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A (-). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(11): 3951-3954
- Hirono A, Beutler E, 1989. Alternative splicing of human glucose-6-phosphate dehydrogenase messenger RNA in different tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 83(1): 343-346
- Hou FY, Huang J, Yu SL, Zhang HS, 2007. The 6-phosphogluconate dehydrogenase genes are responsive to abiotic stresses in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(5): 655-663
- Kruger NJ, von Schaewen A, 2003. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3): 236-246
- Liu PH, Deng YJ, Jiang YJ, Xie BG, 2012. Cloning and structural analysis of phosphoglycerate mutase gene and its expression levels in homokaryon and heterokaryon of *Volvariella volvacea*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 27(3): 252-256 (in Chinese)
- Liu PH, Xie BG, Deng YJ, Chen BZ, Gui F, Zhu J, Jiang YJ, Liu XR, 2011. *Volvariella volvacea* glucose-6-phosphate

- isomerase gene (*gpi*) model and synergistic gene expression in a hybrid heterokaryon. *Acta Edulis Fungi*, 18(4): 1-5 (in Chinese)
- Liu PH, Xie BG, Deng YJ, Jiang YJ, 2013. Cloning, structural analyses and expression levels of phosphofructokinase gene in different strains of *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 32(2): 253-260 (in Chinese)
- Minamide T, Hammond JBW, 1985. Evidence for stimulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis during initiation of periodic fruit body growth in *Agaricus bisporus*. *Experimental Mycology*, 9(2): 116-121
- Modrek B, Lee C, 2002. A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics*, 30(1): 13-19
- Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, Silver PA, 2010. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*, 142(4): 625-636
- Salati LM, Amir-Ahmady B, 2001. Dietary regulation of expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Annual Review of Nutrition*, 21(1): 121-140
- Strijbis K, den Burg J, Visser WF, den Berg M, Distel B, 2012. Alternative splicing directs dual localization of *Candida albicans* 6-phosphogluconate dehydrogenase to cytosol and peroxisomes. *FEMS Yeast Research*, 12(1): 61-68
- Tao YX, van Peer AF, Chen BZ, Chen ZH, Zhu J, Deng YJ, Jiang YJ, Li SJ, Wu TJ, Xie BG, 2014. Gene expression profiling reveals large regulatory switches between succeeding stipe stages in *Volvariella volvacea*. *PLoS One*, 9(5): e97789
- Tao YX, Xie BG, Yang ZY, Chen ZH, Chen BZ, Deng YJ, Jiang YJ, van Peer AF, 2013. Identification and expression analysis of a new glycoside hydrolase family 55 exo- $\beta$ -1,3-glucanase-encoding gene in *Volvariella volvacea* suggests a role in fruiting body development. *Gene*, 527: 154-160
- Zhang ZF, Lin H, Ma B, 2010. Zoom Lite: next-generation sequencing data mapping and visualization software. *Nucleic Acids Research*, 38: 743-748
- [附中文参考文献]
- 陈志宏, 傅梅萍, 李远峰, 陶永新, 江玉姬, 谢宝贵, 2014. 草菇 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因可变剪接体克隆与表达分析. 应用与环境生物学报, 20(4): 584-589
- 戴玉成, 周丽伟, 杨祝良, 文华安, 图力古尔, 李泰辉, 2010. 中国食用菌名录. 菌物学报, 29: 1-21
- 冯作山, 邹亚杰, 胡清秀, 2014. 白灵侧耳栽培过程中胞外酶和呼吸酶活及离子流速的研究. 菌物学报, 33(2): 341-354
- 刘朋虎, 邓优锦, 江玉姬, 谢宝贵, 2012. 草菇 *pgam* 基因克隆、结构及其在同核、异核菌株中的表达量分析. 福建农业学报, 27(3): 252-256
- 刘朋虎, 谢宝贵, 邓优锦, 陈炳智, 贵甫, 朱坚, 江玉姬, 刘新锐, 2011. 草菇 *gpi* 基因结构及其异核体表达协同增效作用. 食用菌学报, 18(4): 1-5
- 刘朋虎, 谢宝贵, 邓优锦, 江玉姬, 2013. 草菇磷酸果糖激酶 (PFK) 基因克隆、结构及不同菌株中表达量分析. 菌物学报, 32(2): 253-260