

• 食品生物技术 •

## 钙离子调控樟芝深层发酵无性产孢及其分子机制

李华祥<sup>1</sup>, 陆震鸣<sup>1</sup>, 朱青<sup>1</sup>, 耿燕<sup>1</sup>, 史劲松<sup>1</sup>, 许正宏<sup>1,2</sup>, 马延和<sup>2</sup>

1 江南大学药学院 工业生物技术教育部重点实验室 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室, 天津 300308

李华祥, 陆震鸣, 朱青, 等. 钙离子调控樟芝深层发酵无性产孢及其分子机制. 生物工程学报, 2017, 33(7): 1124–1135.

Li HX, Lu ZM, Zhu Q, et al. Effect of calcium on sporulation of *Taiwanofungus camphoratus* in submerged fermentation. Chin J Biotech, 2017, 33(7): 1124–1135.

**摘要:** 樟芝是原产于台湾的珍稀药用真菌, 具有保肝、抗癌等活性。樟芝在深层发酵过程中能够产生大量无性孢子, 但是目前对樟芝无性产孢的影响因素及其分子机制尚不明确。本研究报道了樟芝发酵培养基中  $\text{Ca}^{2+}$  浓度能够有效调控樟芝无性产孢的现象; 采用双向电泳 (2-DE) 技术, 对不添加  $\text{Ca}^{2+}$  培养 (对照) 的菌丝体、添加 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  培养 (促进产孢) 的菌丝体及添加 200 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  培养 (抑制产孢) 的菌丝体进行差异蛋白质组学分析, 鉴定了参与  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路的 CaM 蛋白和 HSP90 蛋白, 以及参与 FluG 调控产孢信号通路的 AbaA 蛋白; 进一步通过生物信息学分析, 预测了  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素和 FluG 介导的樟芝无性产孢信号通路模型图; 采用实时定量 PCR (RT-qPCR) 技术, 对该通路上 23 个功能基因的转录水平进行了分析, 发现了受  $\text{Ca}^{2+}$  调控最为灵敏的 7 个产孢相关功能基因: *crz1*、*hsp90*、*flbB*、*brlA*、*abaA*、*wetA* 及 *fadA*。本研究结果为解析樟芝无性产孢机制提供了实验依据。

**关键词:** 樟芝, 无性产孢, 分子机制, 钙离子, 钙调蛋白

**Received:** January 3, 2017; **Accepted:** February 24, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31401931).

**Corresponding authors:** Zhenghong Xu. Tel/Fax: +86-510-85918206; E-mail: zhenghxu@jiangnan.edu.cn  
Yanhe Ma. E-mail: ma\_yh@tib.cas.cn

国家自然科学基金 (No. 31401931) 资助。

网络出版时间: 2017-03-29

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170329.1026.002.html>

# Effect of calcium on sporulation of *Taiwanofungus camphoratus* in submerged fermentation

Huaxiang Li<sup>1</sup>, Zhenming Lu<sup>1</sup>, Qing Zhu<sup>1</sup>, Yan Geng<sup>1</sup>, Jinsong Shi<sup>1</sup>, Zhenghong Xu<sup>1,2</sup>, and Yanhe Ma<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Pharmaceutical Science, National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** *Taiwanofungus camphoratus* is a valuable and rare medicinal mushroom with various bioactivities, such as liver protection and anti-cancer. *T. camphoratus* can produce many arthroconidia at the end of submerged fermentation, but molecular mechanism underlying this submerged conidiation remains unknown. In this study, we found that Ca<sup>2+</sup> concentration in culture medium significantly affected the arthroconidium production of *T. camphoratus*. Then, we identified two proteins (CaM and HSP90) involved in Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signaling pathway and one protein (AbaA) involved in FluG-mediated conidiation pathway by two-dimensional electrophoresis analyses. Furthermore, we proposed a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- and FluG-mediated signaling pathway by bioinformatics analysis. By real-time quantitative PCR analyses of 23 key genes in the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin- and FluG-mediated conidiation pathway, we found that expression levels of 7 genes (*crz1*, *hsp90*, *flbB*, *brlA*, *abaA*, *wetA* and *fadA*) showed significant responses to Ca<sup>2+</sup> concentration in fermentation medium. Our research is beneficial for elucidating the underlying mechanism of submerged fermentation conidiation for *T. camphoratus*.

**Keywords:** *Taiwanofungus camphoratus*, conidiation, molecular mechanism, calcium ion, calmodulin

樟芝 *Taiwanofungus camphoratus* 又名牛樟芝、牛樟菇，是一种原产于台湾地区的药用真菌，具有保肝护肝、抗炎症、抗癌症、抗乙肝病毒等多种生物活性<sup>[1]</sup>。由于野生数量少、生长缓慢等原因，樟孢子实体长期供不应求。目前，深层发酵技术由于其周期短、效率高、成本低、易于规模化等优点，已成为樟芝规模化生产的重要方式<sup>[1]</sup>。已有研究通过培养基组成优化<sup>[2-3]</sup>、环境因素优化<sup>[4-5]</sup>、发酵工艺优化<sup>[6-7]</sup>或添加前体物质<sup>[8-9]</sup>等提高深层发酵樟芝活性物质的产量。

本课题组报道了樟芝在深层发酵后期合适的环境条件下会大量产生无性节孢子的现象<sup>[10]</sup>，并发现以樟芝无性节孢子作为接种物，可有效

缩短樟芝发酵周期，节约种子制备的时间及成本，提高发酵过程可控性与批次稳定性<sup>[11]</sup>。随后，建立了基于无性繁殖过程的樟芝循环发酵工艺，有利于樟芝活性代谢产物的高效稳定生产，同时可免去不同发酵批次种子制备的步骤<sup>[12]</sup>。但是目前对于樟芝无性产孢的分子机制尚不明确，对樟芝无性产孢过程无法实现有效控制。

真菌无性产孢受诸多环境因素的影响，包括碳源、氮源、碳氮比、光照、溶氧、钙离子 (Ca<sup>2+</sup>) 及 pH 等<sup>[13]</sup>，其中 Ca<sup>2+</sup>对丝状真菌无性产孢具有显著调控作用，且具有明显的浓度依赖性<sup>[14]</sup>。Roncal 等<sup>[15]</sup>报道，培养基中添加 1–10 mmol/L 的 Ca<sup>2+</sup>时，能显著促进多种青霉 *Penicillium* 深

层发酵无性产孢; Li 等<sup>[16]</sup>报道, 50 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$  对白僵菌 *Beauveria bassiana* 的生长有抑制作用; Soriani 等<sup>[17]</sup>用 200 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  对烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 进行 10 min 的短脉冲处理, 发现 *fluG* 及 *flbA* 等无性产孢相关基因的表达量受到显著影响; Schumacher 等<sup>[18]</sup>发现当  $\text{CaCl}_2$  浓度大于 300 mmol/L 时, 对灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 突变株有毒性作用。但目前对于  $\text{Ca}^{2+}$  调控丝状真菌无性产孢的分子机制尚缺乏深入研究。本文首先考察  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对樟芝深层发酵过程中无性产孢的影响; 其次, 通过双向电泳 (2-DE) 技术, 鉴定与樟芝无性产孢过程相关的功能基因, 预测樟芝无性产孢信号通路; 进一步通过实时定量 PCR (RT-qPCR) 技术评价不同  $\text{Ca}^{2+}$  浓度调控下产孢信号通路中相关基因的转录水平差异, 探究  $\text{Ca}^{2+}$  促进樟芝无性产孢的分子机制, 以期为解析樟芝无性产孢分子机制提供实验依据, 同时为实现发酵过程中可控产孢奠定研究基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 主要试剂及仪器

葡萄糖、酵母粉、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ 、HCl、丙酮、三氯乙酸 (TCA)、甘油及磷酸等购自国药集团 (上海); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、尿素、十二烷基硫酸钠 (SDS)、二硫苏糖醇 (DTT)、碘乙酰胺 (IAM)、IPG 胶条 (24 cm, pH 3–10)、两性电解液 (pH 3–10)、低熔点覆盖琼脂糖、甘氨酸、过硫酸铵 (APS) 及四甲基乙二胺 (TEMED) 等购自美国伯乐公司 (Bio-Rad); 考马斯亮蓝 R-250、溴酚蓝、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、30% (w/v) 丙烯酰胺/甲叉双丙稀酰胺

溶液 (29:1)、2D 电泳样品提取液 III、改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒、M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒及引物合成等均购自生工生物工程 (上海) 有限公司; A-氨基-4 羟基肉桂酸、三氟乙酸及乙腈等质谱分析所用购置于 Sigma 公司; SYBR 荧光染料购自 Life Technologies 公司; 等电聚焦仪 (Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit)、垂直电泳设备 (Ettan DALSix Electrophoresis Unit) 及扫描仪 (ImagingScanner) 购自 GE Healthcare 公司; 质谱分析仪 (Ultraflex MALDI-TOF/TOF mass spectrometer) 购自 Bruker-Daltonics 公司; NanoDrop 2000C 分光光度计购自 Thermo Scientific 公司; RT-qPCR 仪 (CFX Connect Optics Module Real-Time System) 购自 Bio-Rad 公司。

#### 1.1.2 菌株

樟芝菌株来自美国模式菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, USA), 保藏编号为 ATCC 200183。

#### 1.1.3 培养基

斜面培养基: PDA 培养基;

种子培养基 (w/v): 葡萄糖 2%、酵母粉 0.1%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4$  0.15%, pH 4.5;

发酵培养基 (w/v): 葡萄糖 2%、酵母粉 0.4%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%、 $\text{MgSO}_4$  0.15%, pH 4.5。

## 1.2 方法

### 1.2.1 樟芝发酵培养

将 PDA 斜面上的樟芝菌丝接种到种子培养基中, 于 26 °C、150 r/min 条件下振荡培养 13 d, 再将发酵液于无菌条件下用 4 层纱布过滤, 所得滤液 (即孢子悬浮液) 作为种子以  $1.0 \times 10^6$  孢子/mL 的接种量接种到装有 100 mL 发酵培养基

的 500 mL 锥形瓶中, 26 °C、150 r/min 振荡培养 11 d。

**Ca<sup>2+</sup>影响产孢实验:**于发酵培养基中分别添加 1、5、10、50 及 200 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>, 并将培养基初始 pH 调为 4.5, 振荡培养 8 d, 其余条件及操作同上。

### 1.2.2 产孢量及生物量检测

将培养一定时间的发酵液用 4 层纱布过滤, 所得滤液用血球计数板于光学显微镜下进行孢子计数并计算产孢量; 所得菌丝体用去离子水清洗 3 遍后, 烘干称重并计算生物量。每组实验设 3 个生物学重复。

### 1.2.3 总蛋白及 RNA 提取

将发酵 8 d 的樟芝发酵液经 4 层纱布过滤, 收集樟芝菌丝体, 用 TE 缓冲液 (pH 8.0) 洗涤至滤液澄清后, 保存于液氮中待用。

参照相关文献<sup>[19-20]</sup>采用 TCA/丙酮沉淀法提取樟芝菌丝体中的总蛋白, 用改良型 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒对总蛋白进行定量。用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取樟芝菌丝体中的总 RNA, 用 NanoDrop 2000C 分光光度计对总 RNA 进行浓度及质量检测。

### 1.2.4 双向电泳及质谱分析

每个样品的蛋白上样量为 600 μg, 2-DE 操作条件根据文献方法<sup>[19-20]</sup>略作修改: 1) 胶条主动水化 12 h 后进行等电聚焦, 程序为: 0-50 V 30 min, 50-100 V 30 min, 100-250 V 1 h, 250-500 V 1 h, 500-1 000 V 1.5 h, 1 000-5 000 V 2 h, 5 000-10 000 V 2 h, 维持 10 000 V 9.5 h; 2) 依次用平衡液 I (尿素 36%, SDS 2%, 30%甘油 20%, DTT 2%, pH 8.8 的 Tris-HCl 50 mmol/L) 和平衡液 II (尿素 36%, SDS 2%, 30%甘油 20%, IAM 2.5%,

pH 8.8 的 Tris-HCl 50 mmol/L) 分别平衡 15 min; 3) 将胶条转移到 12% 的 SDS-PAGE 凝胶上, 用低熔点覆盖琼脂糖覆盖后进行恒功率垂直电泳分离, 程序为: 2 W/gel 1 h, 14 W/gel 5 h。每个样品做 3 个生物学重复, 电泳实验重复 5 次。

电泳结束后, 凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色处理后用扫描仪采集图像。每个样品选择分离效果较好的 3 张图像, 并用 PDQuest 8.0 软件进行蛋白点定量及比较分析, 将差异蛋白点 (表达量较对照组上调或下调 2 倍以上的点) 从凝胶上切下后, 参照文献<sup>[19-20]</sup>进行相应的处理及质谱分析。获得的肽段信息分别与樟芝基因组数据库<sup>[21]</sup>及下载自 NCBI 的樟芝 EST 序列数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/>) 进行匹配, 蛋白得分≥30 被认为匹配成功。

### 1.2.5 生物信息学分析

通过文献调研及 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索等方式, 收集与丝状真菌无性产孢相关的蛋白并构建本地蛋白数据库。将 2-DE 分析所得的差异蛋白序列与该本地蛋白数据库进行比对, 以验证 Ca<sup>2+</sup>诱导樟芝无性产孢的相关信号通路。进一步将文献报道的樟芝基因组蛋白序列<sup>[21]</sup>分别与本地蛋白数据库进行比对, 获得樟芝无性产孢及 Ca<sup>2+</sup>/钙调素信号通路相关的蛋白或基因, E value 值≤10<sup>-6</sup> 被认为匹配成功。选择所预测的樟芝 Ca<sup>2+</sup>/钙调素信号通路及 FluG 介导产孢信号通路上 23 个功能基因, 通过 NCBI 数据库上的樟芝 EST 序列及文献报道的樟芝全基因组序列和氨基酸序列<sup>[21]</sup>, 获得相应的 cDNA 序列并采用 Beacon Designer 7.0 软件设计对应的 RT-qPCR 引物, 各引物序列详见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物列表

Table 1 List of the primers for RT-qPCR

Gene name	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Size (bp)
<i>caM</i>	AAGGAGGCGTTCAAGGTATTCG	ACCGTCACCATCAACATCAGC	147
<i>cch1</i>	CGACACCGCCTTCCTCAAC	GTGCTGACATCACTTGTTCTCC	178
<i>cnaA</i>	TCTCCTTCCTCTCCCACATCC	CCTGCCATCCACTGCTTCC	165
<i>cnaB</i>	CGAGAAGAGAACTACGCTTTGC	CCCGTCACCGTCCCTATCC	177
<i>crz1</i>	ACGCACCATCTTGACCTTCTG	GTCTGCCTTACCTGCTCTG	127
<i>hsp90</i>	GACGACTGCGAGGACCTTATC	ACGATGTTCTTGCGGATGACC	137
<i>mid1</i>	CTTCCTCAGCACTCGCATCAC	TCGTAGCCAGAGACCTTCGC	110
<i>fluG</i>	CCAAACCTATCACCGTCAACAATG	CGCCACCAGCCAGAAGATTATC	114
<i>flbA</i>	TGGCGACTGACTCTGTTCCC	CACCGATGGCGTAGATGTTCC	134
<i>flbB</i>	CACGCAGGATGAGCCGATG	CCGCCGTTGCCGTTACC	168
<i>flbC</i>	GACAACCCAAGCAAACCGAAG	TCCTCCCAGCCATTATATCACG	158
<i>flbD</i>	AATGTCTGAAGGTCGTGATGCC	GCCGTATCGTTAGCCGTATGG	126
<i>abaA</i>	TGTGCGAGTGCGGAGACC	GTAGACGACGGACAGGAGGAC	116
<i>brlA</i>	ACCCGTGTGAAGGATGTAAGAAG	ACCGTGGCTGGAGAGAGTTC	118
<i>wetA</i>	TTTCCTGTTCCGTCGTAAGC	GTGGTTGAGGTAGGGATTGATGG	112
<i>ganB</i>	GGACAGAAGAGCGAGCGTAG	TGAACCACTGCGAATGACATATTG	172
<i>fadA</i>	TCGGGCAAGGCAAAGATACTC	TAGGTAGCACGGAGGACAGC	146
<i>sfaD</i>	ACCTGTGCCTACTCACCATCC	CTTGACATTGTTGCCTTCCTTCG	102
<i>pkaA</i>	AGCACTCAATCCTCAGCGAATAG	TCTTGGTTACGAATGGAGCGATAG	123
<i>stuA</i>	GGTTGAATGCGACACAGATTTTG	TGATATTTCCATAACCACCTTGC	123
<i>veA</i>	CTCGCAGTATGACAGGGATAGG	GTCGGCGGTCGGCTTTAC	101
<i>velB</i>	AATCGTTCTGGTCGGCATAGC	GGATAGACTTGAGCAGGATAGGC	128
<i>vosA</i>	GAACGCAAGAGACGCAAGAAG	CGACAGTGAAGTAGATGAAACG	127
18S rRNA	GCTGGTCGCTGGCTTCTTAG	CGCTGGCTCTGTCAGTGTAG	123

### 1.2.6 RT-qPCR 分析

通过 NanoDrop 分光光度计检测, 选择质量较佳 ( $2.0 < A_{260}/A_{280} < 2.1$ ) 的总 RNA, 稀释到 50 ng/ $\mu$ L 后用 M-MuLV 第一链 cDNA 合成试剂盒进行反转录, 获得 cDNA 模板。RT-qPCR 反应体系如下: SYBR 染料 8.5  $\mu$ L, 正向引物 0.425  $\mu$ L, 反向引物 0.425  $\mu$ L, cDNA 模板 1.25  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.4  $\mu$ L; 反应程序如下: 50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s, 45 个循环。以樟芝 18 rRNA 序列为内参, 不添加 CaCl<sub>2</sub> 的樟芝菌丝体样品为对照, 用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  算法<sup>[22]</sup>对

基因的转录水平进行定量。每组设 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度 Ca<sup>2+</sup>对樟芝无性产孢的影响

首先对樟芝产孢量及生物量在该发酵过程中随发酵时间的变化情况进行了考察 (图 1A)。结果表明: 0-3 d 为适应期, 生物量较低; 4-8 d 为对数生长期, 菌体快速生长, 生物量快速增加; 9 d 为稳定期, 生物量达到最大值; 10 d 之后为衰亡期, 菌体自溶, 生物量下降。发酵 0-5 d 不产孢; 发酵 6 d 开始产孢; 7-9 d 为快速产孢

期,大量产孢(图1B);发酵10 d产孢量达到最大值( $4.29 \times 10^6$  spores/mL)。由于发酵8 d的樟芝菌丝体处于快速产孢期,产孢速度最快,同时发酵8 d尚处于对数生长期末期及稳定期前期,菌体活性较强,因此,后续实验均以发酵8 d的菌丝体作为研究对象。

参考相关文献<sup>[15-18]</sup>,我们选择在培养基中添加0–200 mmol/L的CaCl<sub>2</sub>,并在发酵8 d时取样进行产孢量检测,来考察Ca<sup>2+</sup>对樟芝深层发酵无性产孢的影响,结果如表2所示。在

0–50 mmol/L范围内, Ca<sup>2+</sup>浓度对樟芝发酵生物量及pH没有显著影响( $P > 0.05$ )。但是低浓度的Ca<sup>2+</sup>(1–10 mmol/L)能够显著促进樟芝无性产孢,而高浓度的Ca<sup>2+</sup>(>50 mmol/L)则显著抑制樟芝产孢( $P < 0.05$ )。当Ca<sup>2+</sup>添加浓度为1 mmol/L时,促进产孢效果最为显著,发酵8 d时产孢量与对照组相比提高了4倍以上;当Ca<sup>2+</sup>添加浓度为200 mmol/L时,抑制产孢效果最为显著,发酵8 d时尚未产孢。该实验结果与文献报道一致<sup>[15-18]</sup>。

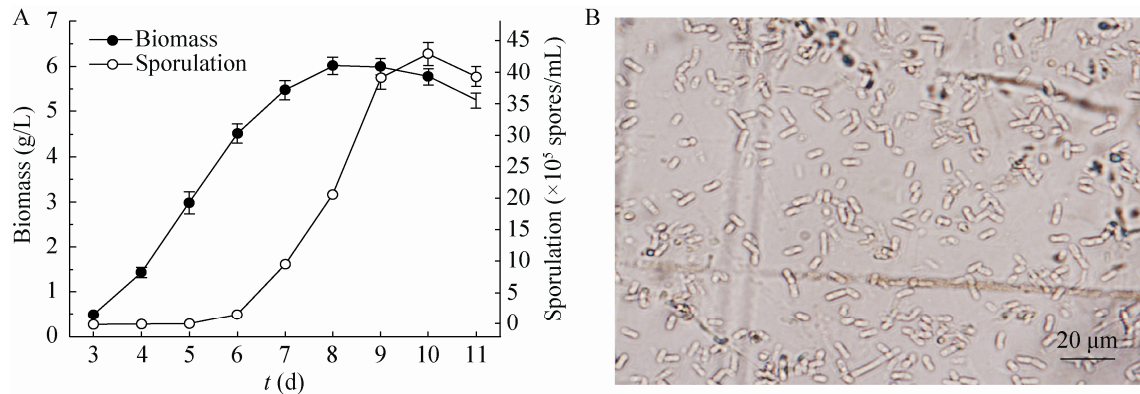


图1 樟芝产孢量和生物量随发酵时间变化曲线(A)及节孢子形态(B)

Fig. 1 Time courses of sporulation and biomass in submerged fermentation (A), and arthroconidia (B) of *T. camphoratus*.

表2 不同浓度Ca<sup>2+</sup>对樟芝无性产孢的影响

Table 2 Effect of the Ca<sup>2+</sup> concentrations on conidiation of *T. camphoratus*

Ca <sup>2+</sup> concentration (mmol/L)	Biomass (g/L)	Sporulation ( $\times 10^6$ spores/mL)	pH
0 (Control)	5.88 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup>	2.05 $\pm$ 0.11 <sup>c</sup>	3.11 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
1	6.24 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	8.45 $\pm$ 0.41 <sup>e</sup>	3.13 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
5	6.19 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	5.65 $\pm$ 0.28 <sup>d</sup>	3.04 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
10	6.15 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	5.07 $\pm$ 0.31 <sup>d</sup>	3.01 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
50	6.11 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	2.93 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>
200	5.14 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	2.91 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>

Note: the cultivations were conducted in 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of fermentation medium, which was composed of 20 g/L of glucose, 4 g/L of yeast extract, 3.0 g/L of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 g/L of MgSO<sub>4</sub>, with initial pH of 4.5 and inoculum size of  $1.0 \times 10^6$  spores/mL, then incubated for 8 d at 26 °C by shaking at 150 r/min. Means in a column followed by different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ) by ANOVA test.

## 2.2 双向电泳及蛋白鉴定

为了解  $\text{Ca}^{2+}$  促进樟芝无性产孢可能的调控基因或蛋白, 本实验选择不添加  $\text{Ca}^{2+}$  培养 8 d 的菌丝体 (对照样品, 记为“CK”)、添加 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  培养 8 d 的菌丝体 (促进产孢效果最显著样品, 记为“1 mmol/L”) 及添加 200 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  培养 8 d 的菌丝体 (抑制产孢效果最显著样品, 记为“200 mmol/L”) 进行 2-DE 分析, 结果如图 2 所示。“CK”样品共分离到 316 个蛋白点, “1 mmol/L”样品共分离到 366 个蛋白点, “200 mmol/L”样品共分离到 293 个蛋白点。通过图像分析, 挖取了 28 个表达量差异的蛋白点 (图 2, 箭头所示) 进行质谱鉴定。

将质谱分析获得的肽段信息分别与樟芝基因组序列<sup>[21]</sup>及下载自 NCBI 的樟芝 EST 序列数据库进行匹配, 结果 28 个蛋白点全部鉴定成功。进一步采用本地蛋白数据库进行比对, 发现了 3 个与产孢功能相关的蛋白 (6 832、2 249 和 1 813)。其中, 蛋白点 6 832 匹配上的 EST 序列

(DR027428.1) 与迷孔菌属 *Daedalea quercina* L-15 889 的热休克蛋白 HSP90 高度同源 (E value 值为  $7\text{E}-146$ , 同源性 87%, 覆盖率 99%), 蛋白点 2 249 是  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路上的关键蛋白 CaM, 而蛋白点 1 813 则是 FluG 介导产孢信号通路上的关键蛋白 AbaA。CaM 是钙调蛋白 (又名钙调素), 通过与  $\text{Ca}^{2+}$  结合而被激活, 进而激活钙调磷酸酶<sup>[23]</sup>; AbaA 是 FluG 介导的产孢信号通路上的关键蛋白之一, 它与 BrlA 和 WetA 构成了该信号通路中的中心调控途径<sup>[24]</sup>。据此结果, 我们推测  $\text{Ca}^{2+}$  影响樟芝无性产孢主要是通过  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路以及 FluG 介导的产孢信号通路实现的。

## 2.3 RT-qPCR 分析

根据文献报道的  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路图<sup>[14]</sup>及 FluG 介导的产孢信号通路图<sup>[24]</sup>, 我们将樟芝基因组蛋白库<sup>[21]</sup>与利用丝状真菌无性产孢相关蛋白构建的本地蛋白数据库进行比对, 在樟芝中获得了目前文献报道的参与上述两条信号通路

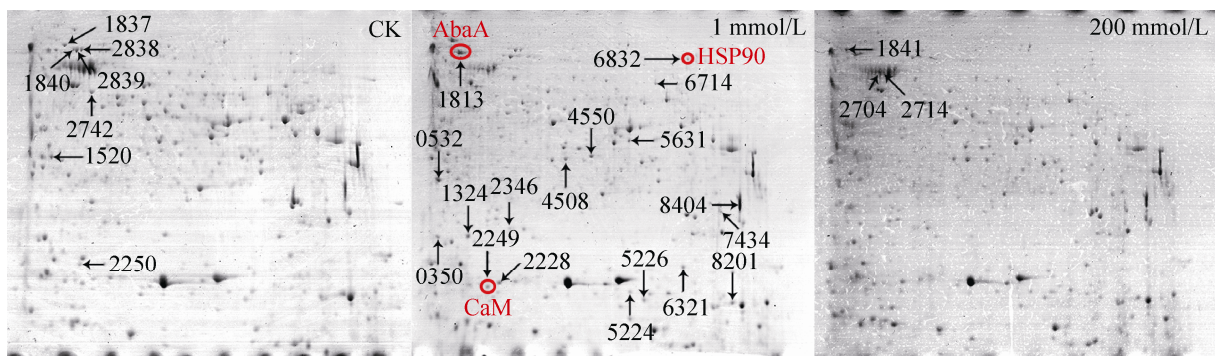


图 2 添加不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  培养的樟芝菌丝体蛋白 2-DE 分离结果及鉴定点

Fig. 2 2-DE maps and identification spots of the proteins extracted from the mycelia which treated with different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ . “CK” means the sample which did not add any  $\text{Ca}^{2+}$ , “1 mmol/L” means the sample which added 1 mmol/L of  $\text{Ca}^{2+}$ , “200 mmol/L” means the sample which added 200 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ . The arrows indicate the total 28 spots selected to identify, and the cycles indicate the proteins involved in the calcineurin signaling pathway (CaM and HSP90) and FluG-mediated conidiation pathway (AbaA).

中除 FlbE 和 GpgA 外的所有蛋白。于是, 我们选择在  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路和 FluG 介导的产孢信号通路中较为关键的 23 个基因 (*cchl1*、*mid1*、*caM*、*cnaA*、*cnaB*、*crz1*、*hsp90*、*fluG*、*flbA*、*flbB*、*flbC*、*flbD*、*ganB*、*fada*、*sfaD*、*pkaA*、*brlA*、*abaA*、*wetA*、*stuA*、*veA*、*velB* 及 *vosA*) 进行转录水平分析。

将菌丝体样品“CK”、“1 mmol/L”和“200 mmol/L”中的总 RNA 反转录后, 以 18S rRNA 为内参, 样品“CK”为对照, 分析上述 23 个基因在样品“1 mmol/L”和“200 mmol/L”中的表达情况 (图 3)。结果表明, 除了基因 *caM* 和 *ganB* 在添加低浓度  $\text{Ca}^{2+}$  (1 mmol/L) 和高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  (200 mmol/L) 时表达量较对照上调外, 其余 21 个基因均呈现出在添加低浓度  $\text{Ca}^{2+}$  (促进产孢) 的菌丝体样品中表达量上调, 添加高浓度  $\text{Ca}^{2+}$  (抑制产孢) 的菌丝体样品中表达量下调的

趋势。其中, 以 *crz1*、*hsp90*、*flbB*、*brlA*、*abaA*、*wetA* 及 *fada* 7 个基因的表达量变化最为显著: 在促进产孢的菌丝体中表达量上调约 3–9 倍, 在抑制产孢的菌丝体样品中表达量下调约 25–80 倍。因此, 可以推测这 7 个基因在  $\text{Ca}^{2+}$  影响樟芝深层发酵无性产孢的过程中起到了关键作用。

*Crz1* 是一个钙调磷酸酶响应的锌指蛋白, 含有一个  $\text{C}_2\text{H}_2$  锌指结构, 可以通过结合在钙调磷酸酶依赖基因的启动子区域来激活处于  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路下游的基因, 是  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路中极其重要的 1 个转录因子<sup>[16]</sup>; 热激蛋白是生物体在胁迫条件下大量合成的一类蛋白, HSP90 是其中一员, 其序列高度保守, 是真菌中 1 种重要的分子伴侣, 参与真菌细胞壁成分合成、无性产孢及侵染等<sup>[14,25]</sup>; *FlbB* 是 1 个 bZip (Basic leucine zipper) 类转录因子, 也是

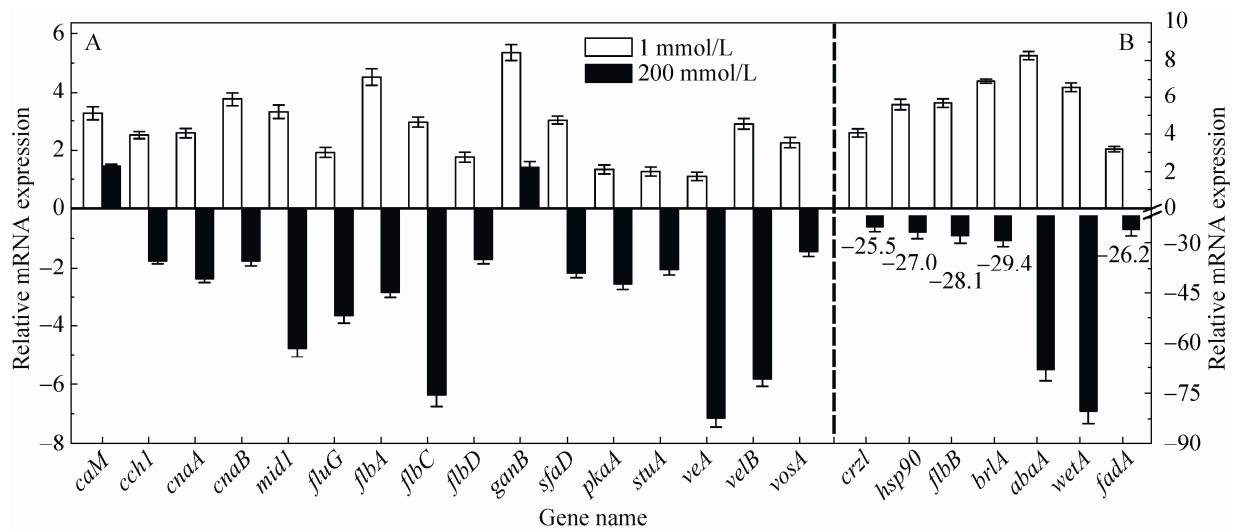


图 3 添加不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  对相关基因表达量的影响

Fig. 3 Different concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  effect on the expressions of the related genes. (A) The genes change less than 8 fold, corresponding to the left vertical axis. (B) The genes change more than 25 fold, corresponding to the right vertical axis; 18S rDNA gene of *T. camphoratus* was used as an internal reference. The gene expression levels in sample of “CK” were used as control, and it is meaningless to compare the expression levels of different genes in this figure.



FluG 介导的产孢信号通路中的上游调节因子之一,其主要作用是激活 *flbD* 基因,而 FlbD 为激活 *brlA* 所必需<sup>[26]</sup>; FadA 是 G 蛋白三聚体中的  $\alpha$  亚基,其主要作用是通过 *pkaA* 抑制 *brlA* 的表达<sup>[24]</sup>; *brlA* 基因编码一个转录因子,是 FluG 介导的产孢信号通路中心调控途径的第一个基因,它主要编码两个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构,并通过该锌指结构激活 *abaA*<sup>[24]</sup>; *abaA* 基因也编码一个转录因子,由 BrlA 所激活,其编码的蛋白 AbaA 含有一个 ATTS/TEA DNA 结合域,为激活 *wetA* 所必需<sup>[27]</sup>; *wetA* 是 FluG 介导的产孢信号通路中心调控途径中的最后一个基因,由 AbaA 所激活,直接诱导产孢行为的发生,并参与细胞壁中海藻糖的合成,促进孢子成熟<sup>[24]</sup>。

#### 2.4 樟芝无性产孢信号通路模型图的预测

Ca<sup>2+</sup>/钙调素信号通路在真菌的应激反应、抗药性、营养生长、形态控制、无性产孢及侵染等过程中起着重要作用<sup>[14]</sup>。Ca<sup>2+</sup>/钙调素信号通路主要包括钙通道蛋白 (Cch1 和 Mid1)、钙调素/钙调蛋白 (Calmodulin, CaM)、钙调磷酸酶 (Calcineurin)、热激蛋白 (如 HSP90) 及转录因子 (如 Crz1) 等<sup>[14,17]</sup>。其中,钙调蛋白会与细胞质中的 Ca<sup>2+</sup> 结合形成复合体,它是主要的 Ca<sup>2+</sup> 信号传感器<sup>[23]</sup>; 钙调磷酸酶是 1 个高度保守的蛋白,也是目前真菌中唯一被鉴定的受 Ca<sup>2+</sup> 和 CaM 调控的磷酸化酶,其主要受体是 Crz1。当细胞质中的 Ca<sup>2+</sup> 浓度增加时,钙调磷酸酶被 Ca<sup>2+</sup>/CaM 复合体激活<sup>[14,28]</sup>。钙调磷酸酶被激活时,调节亚基 CnaB 参与激活催化亚基 CnaA,而催化亚基 CnaA 是钙调蛋白 CaM 的结合位点<sup>[17]</sup>。

FluG 介导的产孢信号通路是真菌中一条常见的产孢信号通路,该通路主要由两部分组成,即上游调控途径 (FluG、FlbA、FlbB、FlbC、

FlbD 及 FlbE 等) 和中心调控途径 (BrlA、AbaA 及 WetA) 组成<sup>[24]</sup>。FluG 在营养生长阶段逐渐积累,当积累到一定浓度或受产孢信号诱导时,便通过移除阻遏因子 SfgA 的形式来激活上游调节因子 FlbA、FlbB 或 FlbC<sup>[29]</sup>。随后,FlbA 通过抑制 G 蛋白调控信号通路间接促进 *brlA* 表达,而 FlbB 进一步激活 *flbD*, FlbD 和 FlbC 共同作用激活 *brlA*,从而进入 FluG 介导的产孢信号通路中心调控途径并最终导致产孢<sup>[24]</sup>。

根据上述 2-DE 和 RT-qPCR 实验结果以及相关文献报道<sup>[14,17-18,23-24,26,29-30]</sup>,我们预测了樟芝 Ca<sup>2+</sup>/钙调素和 FluG 介导的樟芝无性产孢信号通路模型图,如图 4 所示。环境中的 Ca<sup>2+</sup> 通过钙通道蛋白 (Cch1 和 Mid1) 进入细胞质与钙调蛋白 (CaM) 结合形成 Ca<sup>2+</sup>-CaM 复合体后激活钙调磷酸酶,同时热休克蛋白大量合成。后续作用机制可由 RT-qPCR 分析结果推测:1) 基因 *abaA* 的表达量变化极为显著 (上调 8 倍以上或下调 70 倍以上),激活 *abaA* 的上游基因 *brlA* 编码 2 个 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 锌指结构,而转录因子 *crz1* 也编码 1 个锌指结构,因此,我们认为 *crz1* 的作用与 *brlA* 类似,可直接激活 *abaA*; 2) 基因 *flbB* 和 *brlA* 的表达量变化也较为显著 (上调 6 倍以上或下调 28 倍以上),据文献报道<sup>[16-17]</sup>, *flbA*、*flbB* 和 *flbC* 都是 *cnaA* 或 *crz1* 的下游基因,因此,我们认为钙调磷酸酶直接或间接地作用于 *flbA*、*flbB* 和 *flbC* 并促进其表达,进而达到促进 *brlA* 表达的目的。因此,我们认为 *brlA* 表达量的显著变化不是钙调磷酸酶直接作用的结果,而是由 *flbB/flbC/flbD* 表达量的变化所致; 3) G 蛋白  $\alpha$  亚基基因 *fadA* 表达量变化亦较为显著 (上调 3 倍以上或下调 25 倍以上)。因为 *flbA* 和 *fadA* 的作用是相反的,因此,我们认为钙调磷

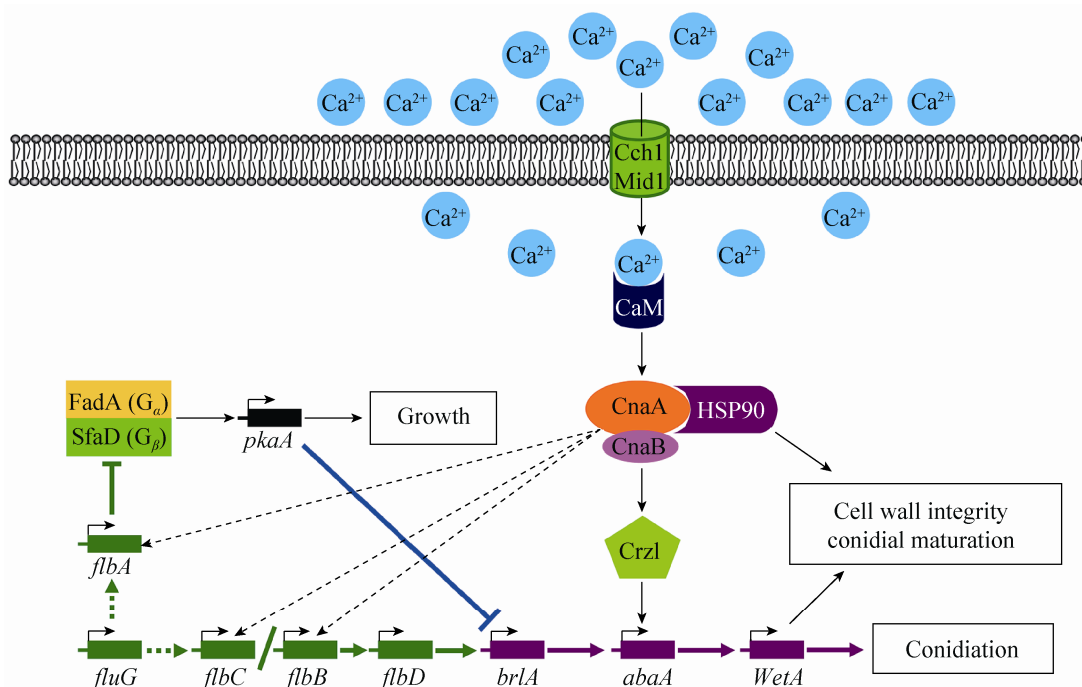


图 4  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素和 FluG 介导的樟芝无性产孢信号通路模型图

Fig. 4 Proposed model for  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin- and FluG-mediated submerged conidiation in *T. camphoratus*.

酸酶是通过促进 *flbA* 表达来抑制 G 蛋白调节信号通路，最终减弱该通路抑制产孢的作用而达到促进产孢的效果；4) 基因 *wetA* 的表达量变化也极为显著（上调 6 倍以上或下调 80 倍以上），但由于 *wetA* 直接受 *abaA* 调控，因此，我们认为 *wetA* 基因表达量的显著变化是由 *abaA* 表达量的变化引起的。此外，WetA 参与合成细胞壁组成成分且与孢子成熟有关，HSP90 也与细胞壁的完整性有关，因此，我们认为 HSP90 和 WetA 一样，也起到促进孢子成熟的作用。

### 3 结论

本文报道了  $\text{Ca}^{2+}$  浓度显著影响樟芝深层发酵无性产孢的现象，且具有明显的浓度依赖性，当添加浓度为 1 mmol/L 时，发酵 8 d 产孢量较

对照提高 4 倍以上。通过对添加不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  培养的樟芝菌丝体进行 2-DE 分析，获得了 HSP90、CaM 及 AbaA 3 个产孢功能相关蛋白；采用 RT-qPCR 技术，对  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调素信号通路及 FluG 介导无性产孢信号通路上 23 个功能基因的转录水平进行了分析，发现了受  $\text{Ca}^{2+}$  调控最为灵敏的 7 个产孢相关功能基因：*crz1*、*hsp90*、*flbB*、*brlA*、*abaA*、*wetA* 及 *fadA*。进而预测了  $\text{Ca}^{2+}$  促进樟芝无性产孢的信号通路模型：环境中的  $\text{Ca}^{2+}$  通过钙通道蛋白 (Cch1 和 Mid1) 进入细胞质与钙调蛋白 (CaM) 结合形成  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM 复合体并激活钙调磷酸酶，同时热休克蛋白大量合成。转录因子编码基因 *crz1* 被钙调磷酸酶激活后直接作用于 *abaA* 基因并促进其表达；钙调磷酸酶或 HSP90 直接或间接地促进产孢上游调控途

径中的 *flbA*、*flbB* 和 *flbC* 基因表达, 进而促进 *brlA* 基因表达或抑制 G 蛋白介导的信号通路, 最终达到促进产孢的效果; HSP90 和 WetA 参与细胞壁组分的合成, 都能促进孢子成熟。本研究结果为解析樟芝无性产孢机制提供了实验依据。

## REFERENCES

- [1] Lu MC, El-Shazly M, Wu TY, et al. Recent research and development of *Antrodia cinnamomea*. *Pharmacol Therapeut*, 2013, 139(2): 124–156.
- [2] Chang CY, Lee CL, Pan TM. Statistical optimization of medium components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(4): 654–661.
- [3] Lu ZM, Lei JY, Xu HY, et al. Optimization of fermentation medium for triterpenoid production from *Antrodia camphorata* ATCC 200183 using artificial intelligence-based techniques. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92(2): 371–379.
- [4] Yang FC, Huang HC, Yang MJ. The influence of environmental conditions on the mycelial growth of *Antrodia cinnamomea* in submerged cultures. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33(4): 395–402.
- [5] Lin ES, Wang CC, Sung SC. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(1): 98–102.
- [6] Liu CJ, Chiang CC, Chiang BH. The elicited two-stage submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* for enhancing triterpenoids production and antitumor activity. *Biochem Eng J*, 2012, 64: 48–54.
- [7] Zhang H, Hu YD, Lu RQ, et al. Integrated strategy of pH-shift and glucose feeding for enhanced production of bioactive Antrodin C in submerged fermentation of *Antrodia camphorata*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(8): 1305–1310.
- [8] Hu YD, Zhang H, Lu RQ, et al. Enabling the biosynthesis of Antroquinonol in submerged fermentation of *Antrodia camphorata*. *Biochem Eng J*, 2014, 91: 157–162.
- [9] Ma TW, Lai YT, Chen LT, et al. The cultivation strategy of enhancing triterpenoid production in submerged cultures of *Antrodia cinnamomea* by adding monoterpenes. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2016, 58: 210–218.
- [10] Geng Y, He Z, Lu ZM, et al. *Antrodia camphorata* ATCC 200183 sporulates asexually in submerged culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(7): 2851–2858.
- [11] Lu ZM, He Z, Li HX, et al. Modified arthroconidial inoculation method for the efficient fermentation of *Antrodia camphorata* ATCC 200183. *Biochem Eng J*, 2014, 87: 41–49.
- [12] Li HX, Lu ZM, Geng Y, et al. Efficient production of bioactive metabolites from *Antrodia camphorata* ATCC 200183 by asexual reproduction-based repeated batch fermentation. *Bioresour Technol*, 2015, 194: 334–343.
- [13] Steyaert JM, Weld RJ, Mendoza-Mendoza A, et al. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 2010, 156(10): 2887–2900.
- [14] Juvvadi PR, Lamoth F, Steinbach WJ. Calcineurin as a multifunctional regulator: unraveling novel functions in fungal stress responses, hyphal growth, drug resistance, and pathogenesis. *Fungal Biol Rev*, 2014, 28(2): 56–69.
- [15] Roncal T, Ugalde U. Conidiation induction in *Penicillium*. *Res Microbiol*, 2003, 154(8): 539–546.
- [16] Li F, Wang ZL, Zhang LB, et al. The role of three calcineurin subunits and a related transcription factor (Crz1) in conidiation, multistress tolerance and virulence in *Beauveria bassiana*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(2): 827–840.
- [17] Soriani FM, Malavazi I, da Silva Ferreira ME, et al. Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Mol Microbiol*, 2008, 67(6): 1274–1291.

- [18] Schumacher J, de Larrinoa IF, Tudzynski B. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. *Eukaryot Cell*, 2008, 7(4): 584–601.
- [19] Lin YL, Wen TN, Chang ST, et al. Proteomic analysis of differently cultured endemic medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang et W.N. Chou from Taiwan. *Int J Med Mushrooms*, 2011, 13(5): 473–482.
- [20] Xu WN, Wang JJ, Li Q. Comparative proteome and transcriptome analysis of lager brewer's yeast in the autolysis process. *FEMS Yeast Res*, 2014, 14(8): 1273–1285.
- [21] Lu MY, Fan WL, Wang WF, et al. Genomic and transcriptomic analyses of the medicinal fungus *Antrodia cinnamomea* for its metabolite biosynthesis and sexual development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(44): 4743–4752.
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [23] Chen YL, Kozubowski L, Cardenas ME, et al. On the roles of calcineurin in fungal growth and pathogenesis. *Curr Fungal Infect Rep*, 2010, 4(4): 244–255.
- [24] Park HS, Yu JH. Developmental regulators in *Aspergillus fumigatus*. *J Microbiol*, 2016, 54(3): 223–231.
- [25] Bui DC, Lee Y, Lim JY, et al. Heat shock protein 90 is required for sexual and asexual development, virulence, and heat shock response in *Fusarium graminearum*. *Sci Rep*, 2016, 6: 28154.
- [26] Oiarzabal-Arango E, Perez-de-Nanclares-Arregi E, Espeso EA, et al. Apical control of conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*, 2016, 62(2): 371–377.
- [27] Tao L, Yu JH. AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. *Microbiology*, 2011, 157(2): 313–326.
- [28] Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Gene Dev*, 1999, 13(7): 798–803.
- [29] Lee MK, Kwon NJ, Lee IS, et al. Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*. *Sci Rep*, 2016, 6: 28874.
- [30] Park HS, Yu JH. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15(6): 669–677.

(本文责编 陈宏宇)