

文章编号: 1006-3080(2026)03-0347-11

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20250909002

S-亚硝基谷胱甘肽提高曲霉孢子抗氧化能力

王 景¹, 高 滢¹, 禹冰姿¹, 周胜敏^{1,2}

(1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 2. 北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

摘要: NO 和 H_2O_2 是免疫系统产生的两类活性抗菌分子, 各自具有不同的细胞毒性。虽然通常认为它们的共同存在会增强抗菌效应, 但已有证据表明, 某些动物细胞、植物细胞以及细菌能够利用 NO 快速缓解氧化损伤, 从而抵消这种效应。然而, 在丝状真菌中, NO 在 H_2O_2 耐受性调控中的作用尚未得到广泛研究。本研究探讨了 NO 供体 S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)对构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)分生孢子 H_2O_2 耐受性的影响。结果表明, GSNO 预处理显著提高了休眠分生孢子在 2 mmol/L H_2O_2 压力下的存活率, 而对膨润孢子和菌丝无显著作用; 通过关键氧化应激抗性基因的敲除与表型分析, 鉴定出过氧还蛋白(PrxA)是该增强效应的核心介导因子; GSNO 预处理促进了 PrxA 二聚体中二硫键的还原, 导致 H_2O_2 压力下胞内 PrxA 二聚体水平下降, 这一修饰降低了 PrxA 催化分解 H_2O_2 的能力, 从而节约胞内还原力, 并将细胞资源重新分配至蛋白质和 DNA 的氧化损伤修复。此研究结果为真菌分生孢子抵御氧化压力的保护机制提供了新的见解, 并揭示了 NO 在真菌应激中新的作用。

关键词: NO; H_2O_2 ; 构巢曲霉; 过氧还蛋白; 氧化压力; S-亚硝基谷胱甘肽

中图分类号: Q78

文献标志码: A

在免疫应答过程中, 吞噬细胞 NAD(P)H 氧化酶(phox)通过超氧化物产生 H_2O_2 , 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)则产生 NO, 二者在杀灭微生物过程中发挥关键作用。然而, 这两种免疫分子是否在同时存在时产生双重的免疫杀伤效应仍不确定。例如, 在中国仓鼠成纤维细胞中, NO 暴露可增强谷胱甘肽合成相关酶的活性, 诱导细胞对 H_2O_2 介导的氧化压力产生适应性反应^[1]。同样, NO 通过抑制半胱氨酸还原, 防止游离半胱氨酸为 Fenton 反应提供底物, 并减轻半胱氨酸对过氧化氢酶活性的抑制, 从而保护枯草芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌免受 H_2O_2 诱导的氧化毒性^[2]。此外, 在拟南芥中, 细胞内 NO 供体 S-亚硝基谷胱甘肽(GSNO)的升高会增加 S-亚硝基硫醇和谷胱甘肽的水平, 从而减少氧化损伤^[3]。近期研究还表明, 在成年小鼠成纤维细胞中, H_2O_2 可激活 GSNO 还原酶, 从而降低与线粒体动力学和线粒体自噬相关

的蛋白质 S-亚硝基化水平, 促进持续的线粒体自噬并增强对氧化压力的耐受性^[4]。然而, 也存在相反的例子。在大肠杆菌中, NO 会抑制过氧化氢酶和呼吸酶的活性, 导致 H_2O_2 和 Fe(II) 水平升高, 进一步驱动 Fenton 反应, 从而持续产生羟基自由基并引起不可修复的染色体损伤^[5]。因此, NO 是否与 H_2O_2 协同发挥杀菌作用, 取决于细胞类型及其分子机制^[6]。

真菌分生孢子是多种真菌产生的无性繁殖单位, 具有显著的环境耐受性, 在真菌的传播、繁殖和致病过程中起着至关重要的作用^[7-10]。分生孢子可在休眠状态下长期存活, 直至遇到适宜条件才会萌发^[10-11]。值得注意的是, 即使在休眠阶段, 分生孢子仍保持转录活性, 并合成能够影响其后续适应性和生存能力的 mRNA^[12-14]。分生孢子的转录在萌发后的多种功能中发挥关键作用, 包括抗逆性、抗真菌药物(如唑类)耐受性、次级代谢产物和毒素的产生, 以及毒力

收稿日期: 2025-09-09

基金项目: 国家自然科学基金(22077032; 21672065); 天然药物及仿生药物国家重点实验室(K202415)

作者简介: 王 景(1997—), 女, 山东临沂人, 硕士生, 主要研究方向为曲霉氧化应激。E-mail: y30210466@mail.ecust.edu.cn

通信联系人: 周胜敏, E-mail: zhoushengmin@ecust.edu.cn

引用本文: 王 景, 高 滢, 禹冰姿, 等. S-亚硝基谷胱甘肽提高曲霉孢子抗氧化能力[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2026, 52(3): 347-357.

Citation: WANG Jing, GAO Yan, YU Bingzi, et al. S-Nitrosoglutathione Enhances the Antioxidant Capacity of *Aspergillus nidulans* Conidia[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2026, 52(3): 347-357.

的形成^[15], 这表明分生孢子在适应环境挑战时会经历一个准备阶段^[12]。分生孢子还会显著促进食品腐败和宿主感染, 因此理解其应激耐受机制对于减少其不利影响至关重要。已有研究表明, NO 和 H₂O₂ 均能抑制真菌分生孢子的生长^[16-18], 然而, 这些分子是否具有协调的孢子杀灭效应尚不明确。进一步探索二者的联合效应, 有助于揭示控制真菌分生孢子的潜在机制。

GSNO 在多种生物的多种生理过程中被认为是 NO 的主要储存与信号分子^[19-21], 但其在真菌分生孢子氧化胁迫耐受中是否具有作用尚不清楚。本文以模式真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)分生孢子为模型, 系统探讨 GSNO 对其 H₂O₂ 耐受性的影响。结果显示, GSNO 预处理显著增强了分生孢子对 H₂O₂ 的耐受性, 主要的过氧还蛋白(PrxA)在这一过程中发挥核心作用; GSNO 通过失活 PrxA 是分生孢子抵御 H₂O₂ 氧化压力的关键机制。

1 实验部分

1.1 原料和试剂

1.1.1 实验菌株 构巢曲霉菌株的遗传表型见表 1, 大肠杆菌 DH5 α 用于基因克隆。

表 1 本文所用构巢曲霉菌株的遗传表型

Table 1 Genetic phenotype of *A. nidulans* strains used in this study

Strain	Genotype	Source
Wild type	<i>biA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i> ; <i>pyroA4</i>	Our lab
ABPUN	<i>biA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i>	Our lab
FGSC A6	<i>nicA2</i> (<i>veA</i> ⁺)	FGSC
Δ <i>prxA</i>	<i>biA1</i> ; <i>wA3</i> ; <i>pyroA4</i>	This work
Δ <i>catA</i>	<i>biA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i> ; <i>pyroA4</i>	This work
<i>prxA</i> -Flag	<i>biA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i>	This work
<i>niaD</i> .P- <i>prxA</i> -Flag	<i>biA1</i> ; <i>pyrG89</i> ; <i>wA3</i>	This work
<i>gpdA</i> .P- <i>prxA</i> -Flag	<i>biA1</i> ; <i>wA3</i>	This work

1.1.2 实验试剂 葡萄糖: 分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司; NaNO₃、KH₂PO₄、MgSO₄、ZnSO₄·7H₂O、H₃BO₃、MnCl₂·4H₂O、FeSO₄·7H₂O、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O、CoCl₂·6H₂O、CuSO₄·5H₂O: 分析纯, 凌峰化学试剂有限公司; 尿嘧啶、尿苷、生物素、吡哆醇、精氨酸: 分析纯, 上海生工生物工程股份有限公司; GSNO: 分析纯, 上海凯为化学科技有限公司。

1.1.3 培养基

(1) 构巢曲霉培养基: 10 g/L 葡萄糖、50 mmol/L NaNO₃、1 g/L KH₂PO₄、0.5 g/L MgSO₄ 以及微量元素^[22]; 必要时分别补加 0.5 g/L 尿嘧啶、0.6 g/L 尿苷、0.4 mg/L 生物素、0.4 mg/L 吡哆醇或 0.5 g/L 精氨酸。

(2) 大肠杆菌培养基: Luria-Bertani (LB) 培养基。

1.2 重组菌株的构建

本文所用引物见表 2。

为了构建 PrxA 缺失株, 本文使用 *A. nidulans* 的 *pyrG* 基因作为筛选标记。敲除盒由 *pyrG* 基因以及位于 *prxA* 基因两侧的各 1.0 kb 非翻译区 (UTR) 组成。分别用特异引物对 Δ *prxA*-1/ Δ *prxA*-2 和 Δ *prxA*-3/ Δ *prxA*-4 扩增 *prxA* 的 5' 与 3' 侧翼序列; *pyrG* 片段使用引物 *pyrG*-F 和 *pyrG*-R 扩增。所有片段均以 *A. nidulans* A6 的基因组 DNA 为模板扩增。将所得 3 段 DNA 混合后, 通过重叠延伸 PCR (Polymerase Chain Reaction) 进行融合, 并使用嵌套引物 Δ *prxA*-nest-F 和 Δ *prxA*-nest-R 进行扩增。采用试剂盒 Gene ArtTM Precision gRNA Synthesis Kit (美国 Invitrogen 公司) 和引物 sg-*prxA*-F/sg-*prxA*-R 合成 sgRNA-*prxA* (靶向 *prxA* 基因的单向导 RNA)。最终 PCR 产物与相应的 sgRNA 以及 1 μ g Cas9 采用 PEG/CaCl₂ 介导的转化方法, 共转化至 *A. nidulans* 野生型菌株的原生质体中, 从而按已有方法构建 Δ *prxA*^[23]。转化子依据 *pyrG* 营养型进行筛选, 并使用引物 check-*prxA*-F/check-*pyrG*.U-R 与 check-*pyrG*-F/check-*prxA*.D-R 进行 PCR 复核。*CatA* 缺失株 (Δ *catA*) 的构建采用相同方法与相应引物, 筛选标记为 *argB* 基因, 转化宿主为 ABPUN (缺失 *argB* 基因的 *A. nidulans* 亲本菌株)。

为了构建 *prxA*-Flag 菌株 (在 PrxA 原位位点表达 C 端带 Flag 标签的 PrxA), 本文首先设计了一个 DNA 盒, 依次包含: 约 1.0 kb 的 *prxA* 5' UTR、PrxA-Flag 编码序列、*TrpC* 终止子、*pyroA* 筛选基因以及约 1.0 kb 的 *prxA* 3' UTR。其中, 第 1 段 DNA 以约 1.0 kb 的 *prxA* 5' UTR 与 *prxA* ORF (Open Reading Frame) 以 *A. nidulans* A6 的基因组 DNA 为模板, 通过引物 *prxA*-Flag-1/*prxA*-Flag-2 扩增 (Flag 的编码序列包含在引物 *prxA*-Flag-2 中); 第 2 段 DNA (含 *TrpC* 终止子与 *pyroA* 筛选基因) 以本实验室重组质粒 pUC19-*TrpC*.T-*pyroA* 为模板, 使用引物 *prxA*-Flag-3/*prxA*-Flag-4 扩增; 第 3 段 DNA (约 1.0 kb 的 *prxA* 3' 侧翼序列) 以 FGSC A6 的基因组 DNA 为模板, 使用引物 *prxA*-Flag-5/*prxA*-Flag-6 扩增。随后使用引物 fusion-*prxA*-flag-F/fusion-*prxA*-flag-R 进行融合 PCR。针对筛选标记基因 *pyrG* 的 sgRNA 使用引物 sg-

表2 本文所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence	Primer	Nucleotide sequence
ΔprxA-1	ATCACCAGGTACGCCATCA	prxA-Flag-6	GCCTCTGTCCCTTGAAGCTG
ΔprxA-2	TTCGACAGGTATCGAATTCTATCCGAAGCA GAAGGATGCC	fusion-prxA-Flag-F	CGGCGATGTGACAAACAGAC
ΔprxA-3	TCTGGTAGACAAGCACTGATCGTTCCACCGG TGAGGTAAT	fusion-prxA-Flag-R	GTCATATGGGCACGTTTCGC
ΔprxA-4	GCCTCTGTCCCTTGAAGCTG	sg-PyrG-F	TAATACGACTCACTATAGTCGCGCTAT CTTATCGGGC
pyrG-F	GGCATCCTTCTGCTTCGGATAGAATTCTG ATACCTGTCGAA	sg-PyrG-R	TTCTAGCTCTAAAACGCCCCGATAAGA TAGGCGCAG
pyrG-R	ATTACCTCACCAGGTGGAACGATCAGTG CTTGCTACCAGA	check-prxA.U-F	CTATTAATACCCCCGTTCCT
ΔprxA-nest-F	CGTCCGTTGATAGACTGCGA	check-TrpC.3-R	GGCGTATTGGGTGTTACGGA
ΔprxA-nest-R	GTCATATGGGCACGTTTCGC	pyroA-check.5-F	GAGGCTCCATTGGTGGCGGC
sg-prxA-F	TAATACGACTCACTATAGAAGGGCG AGATCACCTC	prxA-u-F	CATATTGGGCACTGCCTGAC
sg-prxA-R	TTCTAGCTCTAAAACCAAGAGGTGATC TCGCCCTT	prxA.U-pyroA-R	GCTTTCGCGCACTTCTGCAGGTAAAGTGTA GAGAAGTAGG
check-prxA-F	CAGGTACGCCATCAGGTCTTT	prxA.U-pyroA-F	CCTACTTCTCTACACTTTACCTGCAGAA GTGCGCGAAAGC
check-pyrG.U-R	ACCGAGCCGGATAACTAATGA	niaD.P-prxA-R	CCGGCCTTAAGTCCAGACATTGTGAGA GTATGGGATAGGA
check-pyrG-F	CGTTACTACTTCCGCCGAGC	niaD.P-prxA-F	TCCTATCCCATACTCTCACAATGTCTGG ACTTAAGGCCGG
check-prxA.D-R	GAACGAGGAGAACGCTTGGA	prxA-Flag-R	GTCAATAGTTCGTCAAATTACTTATCGTCATCG TCCTTATAGTCCAGGTGCTTGATGACAGTCTC
ΔcatA-1	GGCTGCGGCTGGGGACGAAC	prxA-Flag-F	GAGACTGTCATCAAGCACCTGGACTATAAGGA CGATGACGATAAGTAATTTGACGAACATTGAC
ΔcatA-2	GACGGTATTATGCGGCCTCCGAGG ATCGATCAGATTGTTT	prxA.D-R	GAGCTCCATTGGGAAATTGG
ΔcatA-3	CGCAATGGCTGTAGGTCGACTCTCAC TGCCTCGGTACTTG	sgRNA-prxA.U-F	TAATACGACTCACTATAGGTAAGATAG TGGTTGTTGGT
ΔcatA-4	CCGATACAAAGAACAAATCG	sgRNA-prxA.U-R	TTCTAGCTCTAAAACACCAACAACCACTATC
argB-F	AAACAATCTGATCGATCCTCGGAGGCC GCATAATACCGTC	CK-prxA.U-pyroA-F	TACTGAGAGCAATTGGCGGG
argB-R	CAAGTACCGAGGCAGTGAGAGTCGAC CTACAGCCATTGGC	pyroA-check.R	CCGCAGCAGATCTTTCACG
ΔcatA-nest-F	GCTCAGAGAGCGTGCTCATG	CK-PniaD-prxA-F	GAGATGGAGCCCTGAAGTGG
ΔcatA-nest-R	ACACCACCGACATCGAAGTG	prxA-u-F	CATATTGGGCACTGCCTGAC
sg-catA-F	TAATACGACTCACTATAGCAGGAGCAG CGAACAGATT	prxA.U-pyroA-R	ATCTGGTAGACAAGCACTGATGTGTAA GATAGTGGTTGTT
sg-catA-R	TTCTAGCTCTAAAACAAATCTGTTCG CTGCTCCTG	prxA.U-pyrG-F	CCTACTTCTCTACACTTTACTCAGTG CTTGCTACCAGAT
argB-check-5R	AAGTGTCTTCGGAGTCAACC	PgpdA-prxA-R	ATCTGGTAGACAAGCACTGAGTAAA GTGTAGAGAAGTAGG
argB-check-3F	AGTCGTCTTAGCCAAGGTAG	PgpdA-prxA-F	CCGCTTGAGCAGACATCACAATGT CTGGACTTAAGGCCGG
prxA-Flag-1	CATATTGGGCACTGCCTGAC	TrpC-R	GGCTTGAGAGTTCAAGGAAG
prxA-Flag-2	ATGGAGCTATTAAATCACTATTACTTATCGTCATC GTCCTTATAGTCCAGGTGCTTGATGACAGTCT	PgpdA-PF-nest-F	CGGCGATGTGACAAACAGAC
prxA-Flag-3	AGACTGTCATCAAGCACCTGGACTATAAGGACGAT GACGATAAGTAATAGTGATTTAATAGCTCCAT	PgpdA-PF-nest-R	GTCCAGGTGCTTGATGACAG
prxA-Flag-4	GGTCTGTCAATAGTTCGTCAAACCTGCAGAA GTGCGCGAAAGC	CK-pyrG-R	AGCTGGGGCAGCAGTATCAG
prxA-Flag-5	GCTTTCGCGCACTTCTGCAGTTTGACGAA CTATTGACAGACC	Check-gpdA-F	CTACATCCATACTCCATCCT
SR-F	GGAGCAGGTACAGGTTGAAC	SLR-F	CTACACGCGAGGCTCCATTA
SR-R	TTGGCCCACTGTGTGATTGT	SLR-R	GGATCACCACCACAGCTAC

pyrG-F/sg-pyrG-R 及 GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit 合成。将 prxA-Flag-TrpC.T-pyroA 盒、sgRNA-PyrG 与 Cas9 共转化入 $\Delta prxA$ 菌株中以获得 *prxA-Flag* 菌株。

本文构建 *prxA* 启动子替换菌株 *niaD.P-prxA-Flag* 与 *gpdA.P-prxA-Flag* 的方法: 首先, 构建重组质粒 pUC19-5'prxA-pyroA-niaD.P-prxA-Flag-3'prxA。*prxA* 的 5'与 3' UTR 以及 PrxA-Flag 编码序列, 均以 *A. nidulans* A6 的基因组 DNA 为模板并使用相应引物通过 PCR 获得; *pyroA* 筛选基因与 *niaD* 启动子则以本实验室重组质粒 pUC19-pyroA-niaD 为模板, 使用引物 prxA.U-pyroA-F 与 niaD.P-prxA-R 扩增。其次, 使用 ClonExpress MultiS 一步克隆试剂盒(中国 Vazyme 公司)将上述片段克隆入 pUC19 质粒, 得到 niaD.P-prxA-Flag 表达质粒。再次, 将 sgRNA-prxA.U、pUC19-5'prxA-pyroA-niaD.P-prxA-Flag-3'prxA 克隆得到的 DNA 盒与 Cas9 共转化至 *A. nidulans* 野生型菌株。构建 *gpdA.P-prxA-Flag* 时, 以本实验室重组质粒 pUC19-pyrG-gpdA.P 为模板, 使用引物 prxA.U-pyrG-F 与 P-gpdA-prxA-R 扩增获得 *pyrG*、*gpdA* 启动子, 通过融合 PCR(引物 P-gpdA-PF-nest-F 与 P-gpdA-PF-nest-R)使 *pyrG*-*gpdA.P* 序列与 *prxA* 基因 5'UTR 及 PrxA-Flag 片段相邻。最后, 将最终 PCR 产物与 sgRNA-prxA.U 及 1 μ g Cas9 共转化入 *prxA-Flag* 菌株, 获得 *gpdA.P-prxA-Flag* 菌株。

1.3 H₂O₂ 耐受性表型分析

(1) 休眠分生孢子: 取 10⁷ 个孢子, 用含指定浓度的 NO 供体 (GSNO 或 MAHMA NONOate(美国 APEXBI0 公司)) 的 1 mL 溶液预处理 1 h, 随后分别转入 100 mL、浓度分别为 0、2 mmol/L H₂O₂ 的 MM (Minimal Medium) 培养基中, 于 37 °C、220 r/min 条件下培养 16 h 后观察表型。

(2) 膨润孢子: 萌发 4 h 后的膨大孢子采用与休眠分生孢子相同的处理流程。

(3) 菌丝: 先将 10⁷ 个孢子在 100 mL MM 培养基中培养 12 h 以获得菌丝; 收集菌丝并转入 10 mL、含指定浓度 GSNO 的溶液处理 1 h; 再次过滤收集菌丝后, 转入 100 mL、浓度分别为 0、1.2 mmol/L H₂O₂ 的 MM 培养基, 在 37 °C、220 r/min 条件下继续培养 16 h 后观察表型。

1.4 定量实时 PCR(qPCR)分析

将构巢曲霉孢子置于 2 mL 灭菌离心管中, 重悬于 1 mL 培养基; 采用 5 mmol/L GSNO 预处理或不处理, 随后离心去除上清。将孢子重悬于 1 mL 培养基中, 在 37 °C、220 r/min 条件下分别加入 0、2 mmol/L

H₂O₂ 处理 30 min。离心去上清后, 用 ddH₂O 清洗沉淀, 转入 1.5 mL 离心管, 重悬于 350 μ L EZ-10 DNAaway RNA Mini-Preps Kit(生工生物工程(上海)有限公司)的裂解液中, 并加入适量研磨珠。在自动样品冷冻研磨仪(JXFSTPRP-CL 型, 上海净信实业发展有限公司)上于 4 °C、70 Hz 条件下研磨 500 s, 随后于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。将上清转入新管中用于提取 RNA。总 RNA 使用试剂盒 EZ-10 DNAaway RNA Mini-Preps Kit 提取; cDNA 合成使用预混液 ABScript III RT Master Mix with gDNARemover(武汉爱博克生物科技公司)。qPCR 在 CFX-96 Real-Time PCR 系统(美国 Bio-Rad 公司)上进行: 采用 qPCR SYBR Green Master Mix(No Rox)(翌圣生物科技(上海)有限公司), 20 μ L 反应体系包含每种引物 0.5 μ mol/L 及 10 ng cDNA。循环条件为: 95 °C 预变性 3 min; 随后 40 个循环: 95 °C 10 s、60 °C 30 s、72 °C 20 s。Q-prxA-F/Q-prxA-R 引物用于定量 *prxA* 基因的表达, Q-actA-F/Q-actA-R 引物用于以参考基因 *actA* 进行归一化。qPCR 所用全部引物序列载于表 1。基因表达量采用 $\Delta\Delta C_t$ 法计算。

1.5 SDS-PAGE 与 Western blot 分析

采用自动样品冷冻研磨仪在 4 °C、70 Hz 条件下加入磷酸盐缓冲液(PBS)与研磨珠裂解细胞 500 s。于 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清并再次离心澄清。蛋白浓度采用 Bradford 法(生工生物工程(上海)有限公司)测定。SDS-PAGE 分析(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis): 取 20 μ g 总蛋白, 与还原或非还原型 SDS 上样缓冲液混匀, 于 98 °C 变性 10 min, 电泳分离并转膜至 PVDF 膜。Western blot 分析: PVDF 膜于室温用 50 g/L 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 1 h, 4 °C 孵育一抗过夜, 室温孵育 HRP 标记二抗 1 h。Flag 标记的 PrxA 使用抗 Flag 抗体(1:2 000, 北京全式生物技术有限公司)检测, 二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:5 000, 北京全式生物技术有限公司)。蛋白氧化损伤通过检测甲硫氨酸亚砷(MetO)评估, 使用 Methionine Sulfoxide 多克隆抗体(1:200, 美国 Cayman 公司)。蛋白条带采用化学发光显色系统 ECL(上海天能科技有限公司)成像。

1.6 通过 qPCR 测定 DNA 损伤

qPCR 在 CFX-96 Real-Time PCR 系统(美国 Bio-Rad 公司)上进行。选择位于线粒体内的细胞色素 c 氧化酶基因为检测靶标, 并选用特异性较高的特异引物。使用试剂盒 Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega)从 *A. nidulans* 野生型提取总 DNA, 并稀

释至 100 ng/μL 备用。通过对未处理样品(对照)进行系列稀释(DNA 模板质量浓度为 25、6.25、1.5625、0.390625 ng/μL)建立标准曲线,以实现目标定量。短片 qPCR 使用引物 SR-F/R 定量目标 DNA;半长片段 qPCR 使用引物 SLR-F/R 评估 DNA 损伤频率。每个样品均以 3 次技术复孔进行分析。

短片 qPCR 反应总体积为 20 μL,包含 10 μL SYBR Green Master Mix(No Rox)(中国 Yeasen 公司)、每种引物 0.5 μmol/L,以及 2 μL 不同质量浓度的 DNA 模板。扩增条件为:95 ℃ 预变性 3 min;随后 40 个循环:95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 20 s。半长片段 qPCR 采用聚合酶为 PrimeSTAR® HS DNA Polymerase(日本 Takara 公司),反应体系包含 1× Evagreen(美国 Biotium 公司)染料、每种引物 0.5 μmol/L,以及小于 10 ng 的 DNA 模板。扩增条件为:94 ℃ 预变性 30 s;随后 25 个循环:98 ℃ 10 s、55 ℃ 15 s、72 ℃ 2 min。所得结果按泊松分布换算为每 10 kb DNA 的相对损伤频率: $N=[-\ln(A_i/A_0)] \times 10000(\text{bp})/L$,其中 A_i 表示处理样品的扩增量, A_0 表示未处理对照的扩增量^[24-25], N 为损伤数, L 为半长片段长度(bp)。

2 结果与讨论

2.1 GSNO 预处理对分生孢子的 H₂O₂ 耐受性的影响

当构巢曲霉分生孢子在含有 2.0 mmol/L H₂O₂ 的液

体培养基中培养 12 h 后,其生长受到显著抑制(图 1)。先用 NO 供体 MAHMA NONOate(0.5、1.0 mmol/L)预处理 1 h,再暴露于 2.0 mmol/L H₂O₂ 12 h,并未改善真菌对 H₂O₂ 的耐受性(图 1)。由于 MAHMA NONOate 在 37 ℃ 下的半衰期仅为数分钟^[26],其 NO 释放速度过快,可能限制了其信号作用。因此,我们改用 GSNO,其能够在胞内持续、缓慢释放 NO,甚至可通过其 S-亚硝基硫醇基团直接传递 NO 信号^[19]。结果显示,1.0、5.0、8.0 mmol/L GSNO 预处理均增强了分生孢子对 H₂O₂ 的耐受性,其中以 5.0 mmol/L 效果最显著(图 2(a))。

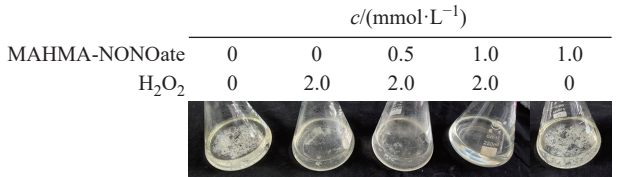


图 1 MAHMA-NONOate 对孢子 H₂O₂ 耐受的影响

Fig. 1 Effect of the MAHMA-NONOate on H₂O₂ resistance in conidia

为评估 GSNO 在真菌不同生长阶段对 H₂O₂ 耐受性的影响,对萌发 4 h(膨大孢子阶段)和培养 12 h(成熟菌丝阶段)的样品进行了 1 h GSNO 处理,且同时探讨了菌株对氧化压力的耐受情况(图 2)。不同菌株及生长阶段对 H₂O₂ 的基线耐受范围不同,实验中所用 H₂O₂ 浓度均为相应条件下可存活且可比较的

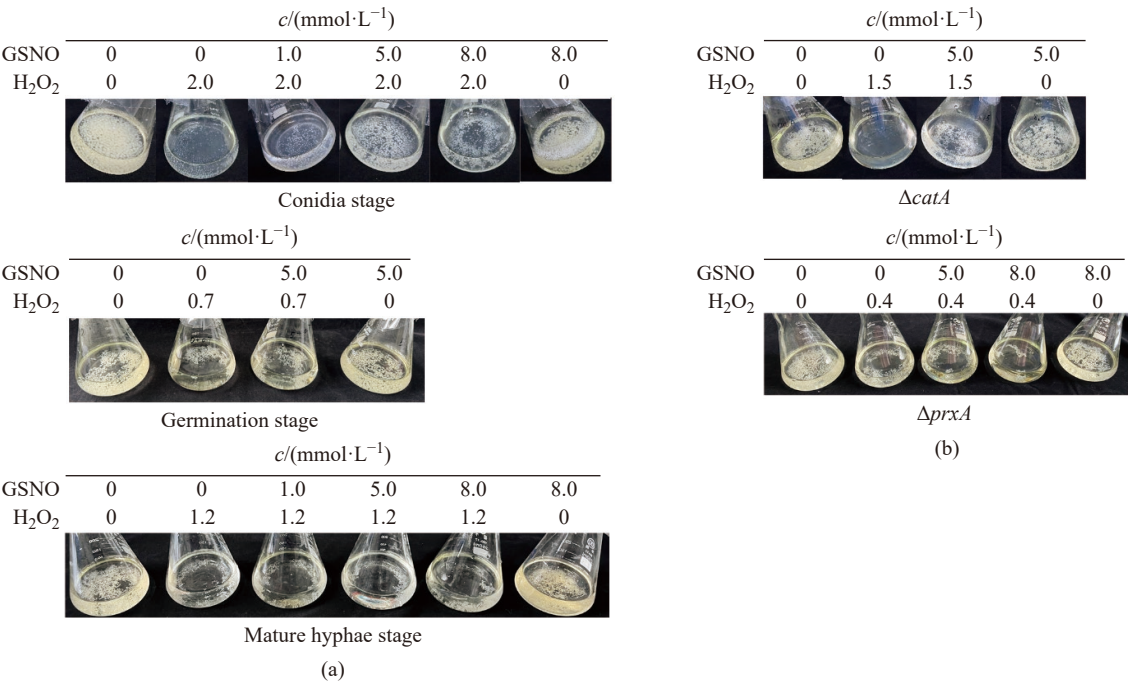


图 2 GSNO 预处理后构巢曲霉休眠孢子、膨润期、长菌丝时期(a)以及 $\Delta catA$ 、 $\Delta prxA$ 菌株 (b) 的氧化压力耐受情况

Fig. 2 Oxidative stress tolerance of *Aspergillus nidulans* during conidia stage, germination stage and mature hyphae stage(a), as well as in $\Delta catA$ and $\Delta prxA$ mutant strains (b) after GSNO pretreatment

区间,以确保等强度评估 GSNO 的作用。结果表明,在这两个阶段,GSNO 并未提高其对 H_2O_2 的耐受性(图 2(a))。这些结果表明,GSNO 特异性地增强了分生孢子对 H_2O_2 的耐受性,而对萌发细胞或成熟菌丝无显著作用。

2.2 PrxA 对 GSNO 介导的 H_2O_2 耐受性的影响

PrxA 和 CatA 是参与真菌分生孢子 H_2O_2 耐受性的两种关键酶^[18,27]。PrxA 属于 2-Cys 过氧还蛋白,依赖 TrxA、TrxR 和 NADPH 分解 H_2O_2 ;而 CatA 是一种分生孢子特异性的过氧化氢酶。为确定 PrxA 和 CatA 是否参与 GSNO 介导的 H_2O_2 耐受性增强,我们分析了 $\Delta catA$ (CatA 缺失)和 $\Delta prxA$ (PrxA 缺失)菌株的表型。为保证在可比条件下评估 GSNO 对不同菌株的作用,我们为各基因型设置了其可耐受范围内的 H_2O_2 浓度梯度。结果显示,5.0 mmol/L GSNO 预处理显著提高了 $\Delta catA$ 分生孢子对 H_2O_2 的耐受性(图 2(b))。 $\Delta prxA$ 对 H_2O_2 极为敏感,难以在高浓度氧化胁迫下存活^[28-29],因此,为保证 $\Delta prxA$ 菌株在氧化压力下的细胞存活率,将 H_2O_2 处理浓度降低至 0.4 mmol/L,然而 5.0 mmol/L GSNO 预处理未改善其耐受性(图 2(b))。5.0 mmol/L GSNO 对野生型与 $\Delta catA$ 均表现出明显保护效应,而 $\Delta prxA$ 即便在 8.0 mmol/L GSNO 下亦无改善,说明 GSNO 的保护作用依赖于 PrxA 的存在。此外,RT-PCR 分析结果表明,GSNO 预处理在非压力条件($H_2O_2^-$)或 H_2O_2 压力下($H_2O_2^+$)均未显著改变 PrxA 的转录水平(图 3)。这些结果表明,PrxA 对 GSNO 介导的 H_2O_2 耐受性增强不可或缺,且这一过程与 PrxA 转录水平的变化无关。

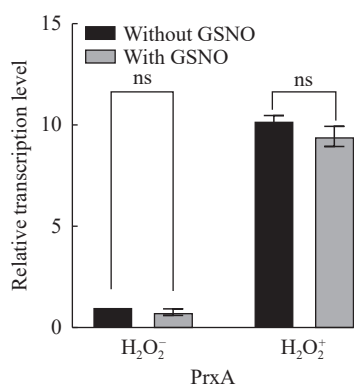


图 3 定量 PCR 检测抗氧化酶基因 *prxA* 的转录水平

Fig. 3 Quantitative PCR analysis of the transcription levels of antioxidant enzyme genes *prxA*

2.3 GSNO 预处理对 H_2O_2 压力下的 PrxA 二聚体水平的影响

我们利用表达 FLAG 标签的 *prxA-Flag* 菌株研究 GSNO 对胞内 PrxA 蛋白水平的影响,借助 Western

blot 分析追踪 H_2O_2 压力下 PrxA 的变化(图 4)。结果显示,大部分 PrxA 以 36 kDa 的同源二聚体形式存在,且无论是否 GSNO 预处理,总蛋白水平均无显著差异,DTT(Dithiothreitol)还原后单体条带强度一致(图 4(a))。然而,GSNO 预处理导致出现两条不同迁移率的 PrxA 二聚体条带(图 4(a)),提示部分 PrxA 二聚体的二硫键断裂,由环状构象转变为线性构象。根据 PAGE 的迁移模式,上下条带分别代表线性和环状 PrxA 二聚体^[30]。在 H_2O_2 处理 5 min 后,无论是否 GSNO 预处理,胞内 PrxA 二聚体水平均迅速下降,并伴随少量 18 kDa 单体增加。值得注意的是,GSNO 预处理加剧了 PrxA 二聚体的下降(图 4(a))。随着处理延长至 10 min,PrxA 二聚体进一步下降;在 30 min 后出现恢复趋势,但恢复程度取决于是否 GSNO 预处理(图 4(a))。在 30 min 时,对照组二聚体水平恢复至基线的 80%,而 GSNO 组仅恢复至 30%;至 60 min 时,两组均几乎恢复至初始水平。整个过程中,总 PrxA 蛋白水平保持稳定(图 4(a))。结果表明, H_2O_2 压力导致胞内 PrxA 二聚体解离,而 GSNO 预处理增强了这一解离效应。

已有研究提示,GSNO 可破坏 PrxA 二聚体的二硫键,可能生成-SNO、-S-SG 或-SH 修饰,与其

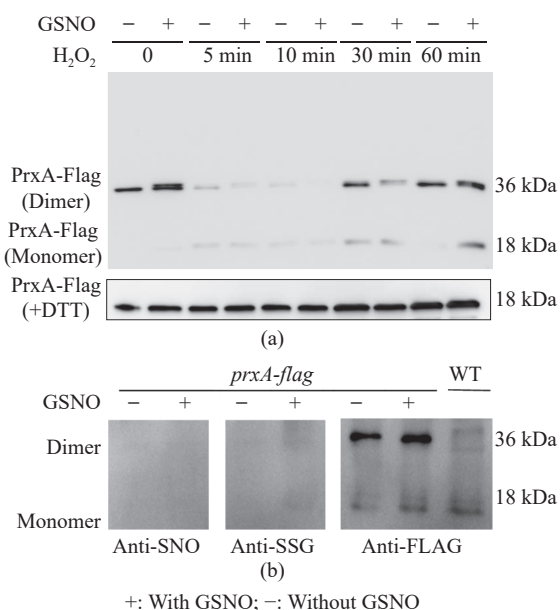


图 4 (a)变性非还原电泳后 Western blot 检测 GSNO 预处理前后构巢曲霉胞内 PrxA 的水平与结构;(b) Anti-FLAG 磁珠富集后 Western blot 检测 PrxA 的谷胱甘肽化修饰与亚硝基化修饰

Fig. 4 (a) Western blot analysis of the levels and structure of intracellular PrxA in *A. nidulans* before and after GSNO pretreatment following denaturing non-reducing gel electrophoresis; (b) Detection of glutathionylation and nitrosylation modifications of PrxA by Western blot following enrichment with Anti-FLAG magnetic beads

在其他蛋白质中引发的类似修饰一致^[31-35]。为验证这一点,我们使用抗 FLAG 琼脂糖珠富集胞内 PrxA-FLAG 蛋白,并用抗-SNO 和抗-GSH 抗体检测修饰情况。结果表明,无论是否经过 GSNO 预处理,PrxA 的二聚体或单体形式均未检测到显著的 PrxA-SNO 或 PrxA-GSSG 信号(图 4(b))。体外实验中,GSNO 处理的重组 PrxA 蛋白可检测到相应修饰(图 5),验证了检测方法的有效性。这些结果表明,GSNO 处理后分生孢子中 PrxA 二聚体断裂的二硫键更可能生成—SH,而非—SNO 或—S—SG。在 H₂O₂ 压力下,具有还原—SH 的 PrxA 二聚体更易被氧化并形成其他聚合结构。

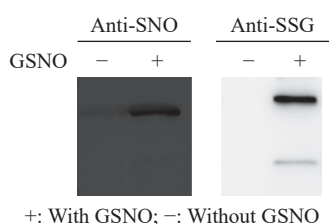


图 5 Western blot 检测 PrxA 重组蛋白的谷胱甘肽化和亚硝基化修饰

Fig. 5 Detection of glutathionylation and nitrosylation modifications of recombinant PrxA protein via Western blot

2.4 GSNO 缓解 H₂O₂ 毒性的机制探讨

基于上述结果,我们假设 GSNO 通过降低胞内 H₂O₂ 分解的关键酶 PrxA 的二聚体水平从而减轻 H₂O₂ 的细胞毒性。为验证该假设,我们通过替换 *prxA* 启动子,构建了 *niaD.P-prxA-Flag* 与 *gpdA.P-prxA-Flag* 两个菌株,以改变其表达模式,探究 GSNO 增强 H₂O₂ 耐受是否依赖 PrxA 二聚体水平的下降。在 *niaD.P-prxA-Flag* 中,*prxA.P* 被硝酸还原酶基因启动子(*niaD.P*)替代,*niaD.P* 可被 NO₃⁻ 诱导,使 PrxA 长期处于极高转录水平;在 *gpdA.P-prxA-Flag* 中,则由启动子 *gpdA.P* 替代^[36-37]。我们期望通过两个强度不同的外源启动子改变 PrxA 的表达,使其维持在不同的恒定水平,再比较其对氧化胁迫的响应。结果表明,在 1.5 mmol/L H₂O₂ 暴露下,两个菌株的生长均受到显著抑制(图 6(a)、6(b))。然而,GSNO 预处理的效果不同:在 *niaD.P-prxA-Flag* 中未增强其 H₂O₂ 耐受性,而在 *gpdA.P-prxA-Flag* 中则显著提高(图 6(a)、6(b))。

进一步检测发现,在 *niaD.P-prxA-Flag* 中, H₂O₂ 暴露 1 h 内,无论是否 GSNO 预处理,胞内 PrxA 二聚体水平均保持稳定(图 6(c))。相比之下,在 *gpdA.P-prxA-Flag* 分生孢子中, PrxA 二聚体的动态变化不同:未预处理时, H₂O₂ 处理 5 min 内二聚体水平未显著下降,随后基本不变;而 GSNO 预处理导致 PrxA

二聚体水平显著降低,并在 30 min 时出现轻微恢复。总体上,在整个 H₂O₂ 暴露过程中,GSNO 预处理的 *gpdA.P-prxA-Flag* 分生孢子胞内 PrxA 二聚体水平始终低于对照,趋势与野生型相似(图 6(d))。这些结果表明,GSNO 可促进 *gpdA.P-prxA-Flag* 中 PrxA 二聚体下降,而对 *niaD.P-prxA-Flag* 无影响。这一差异的根本原因在于两种启动子对 PrxA 表达强度的差异,qPCR 结果表明,在相同硝酸盐培养条件下培养 60 min 后,*niaD.P* 诱导的 PrxA 转录水平约为原始启动子的 10 倍,而 *gpdA.P-prxA-Flag* 的表达强度略低,其 PrxA 转录水平约为原始启动子的 2 倍(图 6(e))。因此,在 *niaD.P-prxA-Flag* 菌株中,PrxA 蛋白持续高表达并以二聚体形式稳定存在,GSNO 无法进一步改变其比例;而在 *gpdA.P-prxA-Flag* 菌株中,PrxA 水平较低,仍处于可受 GSNO 调控的范围内,因此在 H₂O₂ 处理下表现出明显的二聚体动态变化。该结果说明,GSNO 对 PrxA 二聚体的影响依赖于 PrxA 在细胞内的相对丰度和二聚体形成的饱和程度。结合两者的 H₂O₂ 耐受性表型(图 6(a)、6(b))得到,GSNO 通过降低 PrxA 二聚体水平来缓解 H₂O₂ 毒性。

已有研究报道,在高浓度 H₂O₂ 下,裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)通过失活 PrxA 来节约胞内还原力,从而减轻氧化损伤^[38-39]。我们推测,真菌分生孢子中可能存在类似机制。为验证这一点,检测了 GSNO 预处理对 H₂O₂ 所致氧化损伤的影响,包括蛋白质甲硫氨酸氧化和线粒体 DNA 损伤,这两者均是氧化压力的经典标志^[24-25, 40]。Western blot 检测结果表明,GSNO 预处理前后,野生型分生孢子的蛋白氧化水平无显著差异(图 7(a))。然而,在 H₂O₂ 暴露 20 min 后,两组样品的蛋白氧化水平均升高,但 GSNO 预处理组显著低于对照组(图 7(a))。线粒体 DNA 损伤结果与之类似。在基础条件下,GSNO 预处理未导致 DNA 损伤;而 H₂O₂ 暴露 20 min 后,GSNO 预处理组的 DNA 损伤率为 1.5%,对照组则为 2.5%(图 7(b))。结合图 4(a)的 PrxA 二聚体变化趋势,表明 PrxA 二聚体水平的下降可能与分生孢子氧化损伤程度的减轻存在一定关联。

值得注意的是,PrxA 二聚体在氧化应激早期出现的暂时性解聚现象,可能代表一种保护性调节,有助于短期内缓冲氧化负荷并节约 NADPH 等还原资源。随着氧化还原稳态逐步恢复,PrxA 可能重新形成二聚体以恢复其过氧化物酶活性,从而协助清除残余 H₂O₂。因此,我们推测,图 4(a)所示的约 30 min 后观察到的二聚体回升,可能反映了分生孢子在氧化应激后的自我修复与稳态重建过程。该现象提示

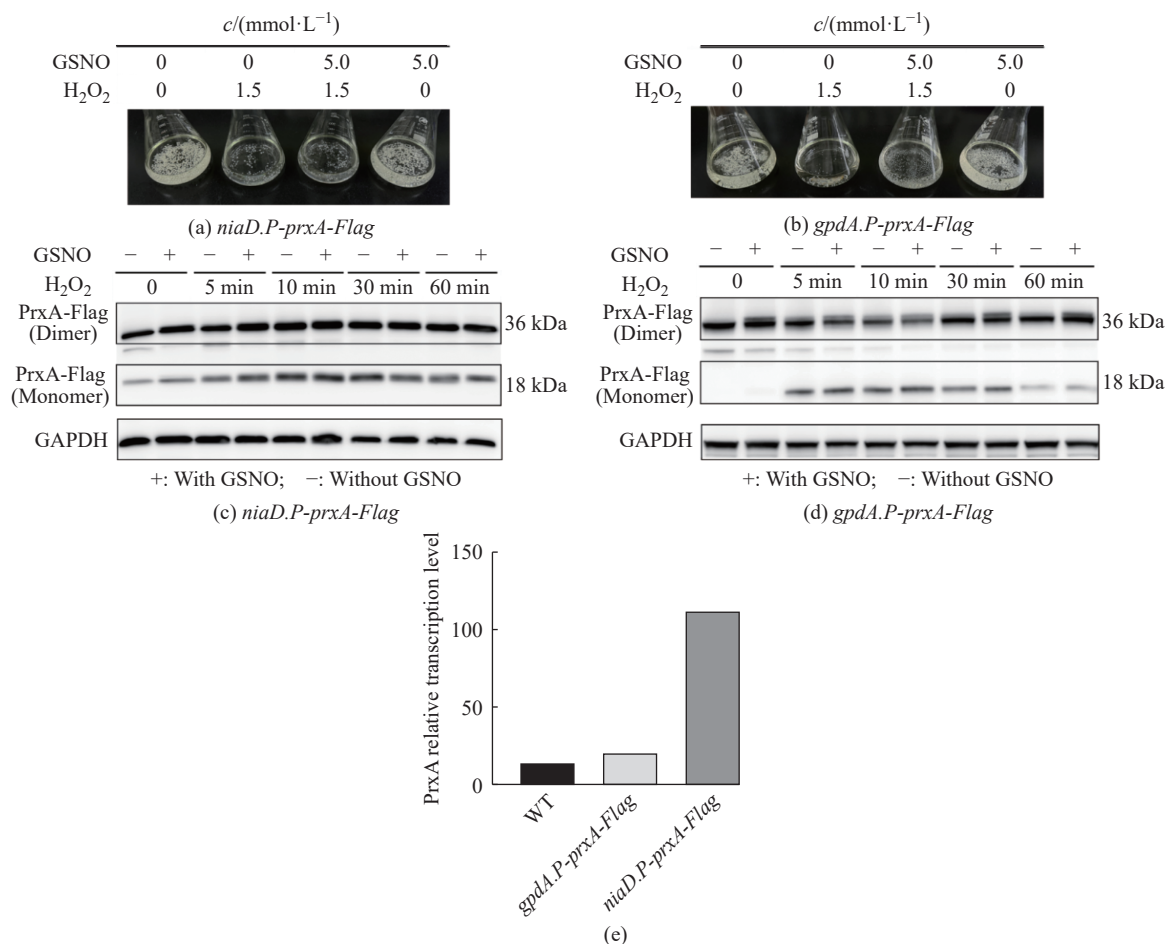


图 6 GSNO 预处理后 *niaD.P-prxA-flag* 和 *gpdA.P-prxA-flag* 的氧化压力耐受表型(a, b)以及胞内 PrxA 的蛋白表达水平变化(c, d)以及菌株相对转录水平(e)

Fig. 6 Oxidative stress tolerance phenotypes of *niaD.P-prxA-flag* and *gpdA.P-prxA-flag* after GSNO pretreatment (a,b), along with changes in intracellular PrxA protein expression levels (c, d), and relative transcription levels of *prxA* in strains

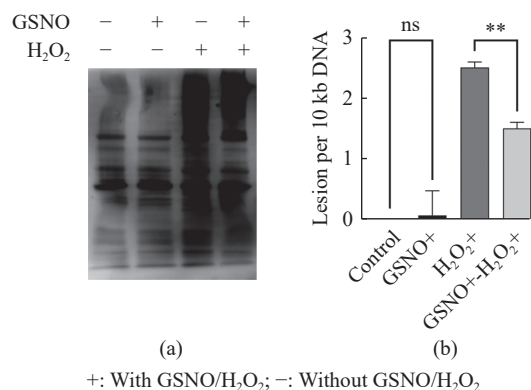


图 7 (a)氧化损伤的测定: Western blot 检测蛋白质甲硫氨酸氧化损伤; (b)定量 PCR 检测线粒体 DNA 损伤

Fig. 7 (a) Measurement of oxidative damage: Detection of protein methionine oxidation damage by Western blot; (b) Quantitative PCR detection of mitochondrial DNA damage

真菌或可通过可逆调控 PrxA 构象, 在防御与修复之间实现动态平衡。

3 讨论

本研究表明, GSNO 预处理通过调控 PrxA 二聚体的稳定性和功能, 增强了真菌分生孢子对 H_2O_2 的耐受性。GSNO 可破坏 PrxA 二聚体中的二硫键, 促进其结构重排, 并在 H_2O_2 暴露下形成非催化性的替代聚合状态。这种修饰加速了胞内 PrxA 的失活, 并延缓二聚体水平的恢复, 使 PrxA 活性维持在持续较低的状态。这种自限性机制节约了用于损伤修复的胞内还原力, 使真菌分生孢子能够在 H_2O_2 压力下适应并存活。这些结果揭示了 NO 及其供体在调控真菌分生孢子氧化应激反应中的一个此前未被认识到的作用, 通过阐明 GSNO 诱导的 PrxA 调控的分子机制, 本研究为真菌应激适应策略提供了新的见解。

NO 及其供体在不同物种中通过多种机制对抗活性氧引起的损伤, 包括酶活性调控、代谢适应以及直接清除活性氧。例如, 在裂殖酵母中, NO 通过抑制 Fe^{3+} 向 Fe^{2+} 转化、上调 H_2O_2 解毒酶、抑制与线粒

体呼吸链相关的基因等途径,促进 H_2O_2 耐受性^[41]。在沙门氏菌(*Salmonella*)中,NO通过抑制呼吸作用触发对氧化压力的适应反应,导致NADH水平升高。积累的NADH既可为过氧还蛋白的过氧化物还原活性提供能量,又能直接清除羟基自由基($\text{OH}\cdot$),从而增强 H_2O_2 耐受性^[42]。类似地,在灵芝(*Ganoderma lucidum*)中,GSNO在Cys401位点对过氧化氢酶进行S-亚硝基化,提升其活性80%,降低胞内 H_2O_2 水平并增强氧化应激耐受性^[43]。在哺乳动物细胞中,NO通过调控巯基代谢并增强谷氨酰半胱氨酸合成酶(GCL)的活性,提高了对 H_2O_2 的耐受性^[1]。在植物中,NO通过对胞质抗坏血酸过氧化物酶APX1的Cys-32进行S-亚硝基化,正向调控其活性,从而增强 H_2O_2 清除并整合NO与ROS信号通路^[41]。虽然NO介导的氧化应激耐受性在不同物种间存在差异,但本研究结果揭示了真菌分生孢子中一种独特的机制:GSNO通过调控PrxA的过氧化物酶活性而增强 H_2O_2 耐受性,且这一过程独立于S-亚硝基化。这一机制通过限制NADPH的过度消耗来节约胞内还原力,从而优化了应激适应。

尽管真菌分生孢子固有的环境耐受性背后的分子机制仍不清楚,但显然这种天然的韧性对其生存至关重要。作为NO供体,GSNO可能表现出一定的细胞毒性,使分生孢子进入休眠状态,从而提高其对 H_2O_2 诱导的氧化压力的耐受性。然而,GSNO预处理并未在 $\text{niaD}::P\text{-prxA-Flag}$ 过表达菌株或 ΔprxA 突变株中增强 H_2O_2 耐受性(图6(a)和图2(b)),提示这一效应与胞内PrxA水平直接相关。因此,尽管GSNO诱导的休眠可能有助于长期的氧化压力耐受性,但可以确定的是,PrxA是GSNO介导的 H_2O_2 耐受性增强的关键靶点。

本文数据表明,GSNO介导的 H_2O_2 耐受性增强仅在分生孢子休眠阶段具有特异性。这一限制可能源于休眠分生孢子的节能状态。PrxA的氧化还原活性需要大量还原力,特别是NADPH或其电子传递蛋白硫氧还蛋白(Trx)^[38]。过度消耗NADPH或Trx来还原PrxA,可能会耗尽用于修复大分子损伤和合成必需化合物的资源。此外,PrxA二聚体还可激活转录因子NapA^[44]。PrxA二聚体过多可能会上调NapA调控的靶基因,其中可能包括消耗还原力或能量的基因^[38, 45]。这种代谢需求可能会阻碍分生孢子的适应。相比之下,代谢活跃的菌丝细胞更容易应对这些挑战。因此,GSNO介导的PrxA二聚体解聚在分生孢子阶段具有增强 H_2O_2 耐受性的独特优势,而在代谢活跃的菌丝中,其作用可能受限于氧化还

原稳态和能量代谢的差异。未来研究应探索GSNO是否会影响菌丝中其他与氧化应激相关的途径。

4 结束语

本研究系统揭示了GSNO在真菌分生孢子氧化应激中的新型调控机制。GSNO预处理通过调节过氧还蛋白PrxA的二聚体稳定性,使其在 H_2O_2 胁迫下发生可逆性解聚,暂时抑制其过氧化物酶活性,从而降低 H_2O_2 的过度分解、节约胞内NADPH等还原资源,并减轻蛋白质与线粒体DNA的氧化损伤。启动子替换实验进一步表明,GSNO的保护效应可能依赖于PrxA二聚体比例的动态调控,而非其绝对表达量。该机制反映出真菌分生孢子通过精细调节抗氧化酶构象,在防御与修复之间实现能量与还原力的最优分配,为理解真菌在极端环境下的生存策略提供了新的分子基础。

参考文献:

- [1] RIDNOUR L A, SIM J E, CHOI J, *et al.* Nitric oxide-induced resistance to hydrogen peroxide stress is a glutamate cysteine ligase activity-dependent process[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, 38(10): 1361-1371.
- [2] GUSAROV I, NUDLER E. NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(39): 13855-13860.
- [3] BORROWMAN S, KAPUGANTI J G, LOAKE G J. Expanding roles for S-nitrosylation in the regulation of plant immunity[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2023, 194: 357-368.
- [4] CIROTTI C, RIZZA S, GIGLIO P, *et al.* Redox activation of ATM enhances GSNOR translation to sustain mitophagy and tolerance to oxidative stress[J]. *EMBO Reports*, 2021, 22(1): e50500.
- [5] AGASHE P, KUZMINOV A. Catalase inhibition by nitric oxide potentiates hydrogen peroxide to trigger catastrophic chromosome fragmentation in *Escherichia coli*[J]. *Genetics*, 2021, 218(2): iyab057.
- [6] 丁伟东,周宏磊,孙佳敏,等.薯蓣皂苷元衍生物ML5激活NRF2信号通路改善AD的机制研究[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2024, 50(4): 534-542.
- [7] DIJKSTERHUIS J. Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage[J]. *Food Microbiology*, 2019, 81: 2-11.
- [8] SEEKLES S J, VAN DEN BRULE T, PUNT M, *et al.* Compatible solutes determine the heat resistance of conidia[J]. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2023, 10(1): 21.

- [9] WYATT T T, WÖSTEN H A, DIJKSTERHUIS J. Fungal spores for dispersion in space and time[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2013, 85: 43-91.
- [10] BALTUSSEN T J H, ZOLL J, VERWEIJ P E, *et al.* Molecular mechanisms of conidial germination in *Aspergillus* spp.[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2019, 84(1): e00049.
- [11] HAGIWARA D, SUZUKI S, KAMEI K, *et al.* The role of AtfA and HOG MAPK pathway in stress tolerance in conidia of *Aspergillus fumigatus*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 73: 138-149.
- [12] WANG F, SETHIYA P, HU X, *et al.* Transcription in fungal conidia before dormancy produces phenotypically variable conidia that maximize survival in different environments[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(8): 1066-1081.
- [13] 李宝意, 周胜敏. 一种新型的曲霉属洁净可逆性诱导表达系统[J]. *华东理工大学学报(自然科学版)*, 2023, 49(4): 536-545.
- [14] VAN LEEUWEN M R, KRIJGSHELD P, BLEICHRODT R, *et al.* Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles[J]. *Studies in Mycology*, 2013, 74(1): 59-70.
- [15] IJADPANAH SARAVI M, WÖSTEN H A B. Germination strategies of stress-resistant *Aspergillus* conidia[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2024, 57: 101169.
- [16] ZHOU S, NARUKAMI T, NAMEKI M, *et al.* Heme-biosynthetic porphobilinogen deaminase protects *Aspergillus nidulans* from nitrosative stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(1): 103-109.
- [17] ZHOU S, NARUKAMI T, MASUO S, *et al.* NO-inducible nitrosothionein mediates NO removal in tandem with thioredoxin[J]. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(10): 657-663.
- [18] YAN Y, HUANG X, ZHOU Y, *et al.* Cytosol peroxiredoxin and cell surface catalase differentially respond to H₂O₂ stress in *Aspergillus nidulans*[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(7): 1333.
- [19] FRUNGILLO L, SKELLY M J, LOAKE G J, *et al.* S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 5401.
- [20] LIU L, YAN Y, ZENG M, *et al.* Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock[J]. *Cell*, 2004, 116(4): 617-628.
- [21] BRONIOWSKA K A, HOGG N. The chemical biology of S-nitrosothiols[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(7): 969-980.
- [22] KADOOKA C, ONITSUKA S, UZAWA M, *et al.* Marker recycling system using the *sC* gene in the white koji mold, *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2016, 62(3): 160-163.
- [23] POHL C, KIEL J A, DRIESSEN A J, *et al.* CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2016, 5(7): 754-764.
- [24] HUNTER S E, JUNG D, di GIULIO R T, *et al.* The QPCR assay for analysis of mitochondrial DNA damage, repair, and relative copy number[J]. *Methods*, 2010, 51(4): 444-451.
- [25] ZHU S, COFFMAN J A. Simple and fast quantification of DNA damage by real-time PCR, and its application to nuclear and mitochondrial DNA from multiple tissues of aging zebrafish[J]. *BMC Research Notes*, 2017, 10(1): 269.
- [26] KOZLOWSKI J A, STIEGLMEIER M, SCHLEPER C, *et al.* Pathways and key intermediates required for obligate aerobic ammonia-dependent chemolithotrophy in bacteria and Thaumarchaeota[J]. *ISME Journal*, 2016, 10(8): 1836-1845.
- [27] KAWASAKI L, AGUIRRE J. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(4): 1434-1440.
- [28] ZHOU Y, LV H, LI H, *et al.* Nitroreductase increases menadione-mediated oxidative stress in *Aspergillus nidulans*[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2021, 87(24): e0175821.
- [29] LIU F, GUO L, LUO Y, *et al.* Peroxiredoxin PrxA and thioredoxin TrxA mediate the redox signal to the transcription factor NapA in the fungus *Aspergillus nidulans*[J]. *International Journal Biological Macromolecules*, 2025, 310(Pt 4): 143434.
- [30] XIA Y, YU H, ZHOU Z, *et al.* Peroxiredoxin system of *Aspergillus nidulans* resists inactivation by high concentration of hydrogen peroxide-mediated oxidative stress[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 28(1): 145-156.
- [31] MATTIOLI E J, ROSSI J, MELONI M, *et al.* Structural snapshots of nitrosogluthathione binding and reactivity underlying S-nitrosylation of photosynthetic GAPDH[J]. *Redox Biology*, 2022, 54: 102387.
- [32] ZHANG Y, SUN C, XIAO G, *et al.* S-nitrosylation of the Peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosogluthathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(5): 329.
- [33] JIA M, CHAI L, WANG J, *et al.* S-nitrosothiol homeostasis is maintained by ADH5 facilitates STING-dependent host defense against pathogens[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 1750.
- [34] MOHR S, HALLAK H, DE BOITTE A, *et al.* Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(14): 9427-9430.
- [35] SCHILDKNECHT S, VON KRIEGSHEIM A, VUJACIC-MIRSKI K, *et al.* Recovery of reduced thiol groups by superoxide-mediated denitrosation of nitrosothiols[J]. *Redox Biology*, 2022, 56: 102439.
- [36] YAN Q, HAN L, LIU X, *et al.* Development of an auto-inducible expression system by nitrogen sources switching

- based on the nitrogen catabolite repression regulation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2022, 21(1): 73.
- [37] PUNT P J, DINGEMANSE M A, KUYVENHOVEN A, *et al.* Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. *Gene*, 1990, 93(1): 101-109.
- [38] DAY A M, BROWN J D, TAYLOR S R, *et al.* Inactivation of a peroxiredoxin by hydrogen peroxide is critical for thioredoxin-mediated repair of oxidized proteins and cell survival[J]. *Molecular Cell*, 2012, 45(3): 398-408.
- [39] BROWN J D, DAY A M, TAYLOR S R, *et al.* A peroxiredoxin promotes H₂O₂ signaling and oxidative stress resistance by oxidizing a thioredoxin family protein[J]. *Cell Reports*, 2013, 5(5): 1425-1435.
- [40] KEHM R, BALDENSPERGER T, RAUPBACH J, *et al.* Protein oxidation-Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases[J]. *Redox Biology*, 2021, 42: 101901.
- [41] YANG H, MU J, CHEN L, *et al.* S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses[J]. *Plant Physiology*, 2015, 167(4): 1604-1615.
- [42] ASTUTI R I, WATANABE D, TAKAGI H. Nitric oxide signaling and its role in oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*[J]. *Nitric Oxide*, 2016, 52: 29-40.
- [43] LIU R, ZHU T, CHEN X, *et al.* GSNOR regulates ganoderic acid content in *Ganoderma lucidum* under heat stress through S-nitrosylation of catalase[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 32.
- [44] MENDOZA-MARTÍNEZ A E, LARA-ROJAS F, SÁNCHEZ O, *et al.* NapA mediates a redox regulation of the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 516.
- [45] MENDOZA-MARTÍNEZ A E, SÁNCHEZ O, AGUIRRE J. The role of peroxiredoxins PrxA and PrxB in the antioxidant response, carbon utilization and development in *Aspergillus nidulans*[J]. *Fungal Biology*, 2023, 127(7/8): 1198-1208.

S-Nitrosoglutathione Enhances the Antioxidant Capacity of *Aspergillus nidulans* Conidia

WANG Jing¹, GAO Yan¹, YU Bingzi¹, ZHOU Shengmin^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: Nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H₂O₂) are two reactive antimicrobial molecules produced by the immune system, each possessing distinct cytotoxic properties. While their combined presence is generally believed to enhance antimicrobial efficacy, evidence suggests that certain animal and plant cells, as well as bacteria, can counteract this effect by utilizing NO to rapidly mitigate oxidative damage. However, the role of NO in modulating H₂O₂ resistance in filamentous fungi has not been extensively studied. In this study, we investigated the effect of the NO donor S-nitrosoglutathione (GSNO) on H₂O₂ resistance of *Aspergillus nidulans* conidia. We found that GSNO pre-treatment significantly enhanced the survival rate of dormant conidia exposed to 2 mmol/L H₂O₂, while having no effect on swollen conidia or hyphae. Through knockout and phenotypic analysis of key oxidative stress resistance genes, we identified peroxiredoxin (PrxA) as a critical mediator of this enhanced resistance. Further biochemical analyses revealed that GSNO pre-treatment promoted the reduction of disulfide bonds in PrxA dimers, leading to decreased intracellular PrxA dimer levels under H₂O₂ stress. This modification reduced PrxA-mediated H₂O₂ decomposition, thereby conserving intracellular reducing power and redirecting cellular resources toward the repair of oxidative damage to proteins and DNA. Our findings provide novel insights into the protective mechanisms employed by fungal conidia to withstand oxidative stress and highlight a previously unrecognized role of NO in fungal stress adaptation.

Key words: NO; H₂O₂; *Aspergillus nidulans*; peroxiredoxin (PrxA); oxidative stress; S-nitrosoglutathione (GSNO)

(责任编辑: 王晓丽)