

Trametes sp. AH28-2 漆酶 A 的诱导合成及其基因 5'-端调控区的克隆与分析

Inducing Synthesis of LacA from *Trametes* sp. AH28-2 and Cloning & Analysis of 5'-terminal Sequence of Transcription Control of the Gene

洪宇植, 肖亚中*, 房伟, 张书祥, 查向东, 李剑凤, 周宏敏

HONG Yu-Zhi, XIAO Ya-Zhong*, FANG Wei, ZHANG Shu-Xiang, CHA Xiang-Dong, LI Jian-Feng and ZHOU Hong-Min

安徽大学生命科学学院, 合肥 230039

安徽省生态工程与生物技术省级重点实验室, 合肥 230039

School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China

Anhui Key Laboratory of Eco-engineering & Bio-technique, Hefei 230039, China

摘要 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶同工酶的合成需要铜离子的存在, 较高浓度的 Cu^{2+} 有利于漆酶合成。在以葡萄糖为碳源补加 0.5mmol/L Cu^{2+} 的培养基中生长时, 发酵液漆酶活性为 44.3u/L, 同时补加 4.0mmol/L 邻甲苯胺时, 漆酶酶活提高到 71.0u/L; 而在补加 Cu^{2+} 和邻甲苯胺的纤维二糖培养基中, 酶活上升至 2584u/L, 为葡萄糖培养基的 36.4 倍。邻甲苯胺和铜离子诱导产生的漆酶同工酶组分, 均为漆酶 A (LacA)。竞争性 RT-PCR 分析表明, 漆酶 A 基因 (*lacA*) 转录本的累积伴随有发酵液漆酶活性的增加, 邻甲苯胺对 *lacA* 的调控发生在转录水平。*lacA* 结构基因长 2110bp, 含有 10 个内含子; *lacA* 的 cDNA 序列为 1560bp, 编码 520aa 的漆酶蛋白, 其氨基酸序列与其它真菌漆酶具有较高的相似性。采用改进的反向 PCR 技术, 扩增得到的 *lacA* 5'-端调控区长 1881bp, 分析表明, 该区域上分布有 1 个 TATA 框、7 个 CAAT 框和多个潜在的顺式作用元件序列位点, 包括 5 个 MRE 元件、9 个 CreA 结合位点、4 个 XRE 元件、2 个 STRE 元件和 7 个氮因子调控位点等。这些序列位点的存在部分地对应了菌株摇瓶发酵条件下 *lacA* 的表达规律。

关键词 真菌漆酶, 定量 RT-PCR, 长距离反向 PCR, 顺式作用元件

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0547-06

Abstract Copper ion was necessary for the transcription of all laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2, with higher concentrations of Cu^{2+} (1 ~ 2 mmol/L) being more favorable to the synthesis of laccase. In the glucose media containing 0.5 mmol/L Cu^{2+} , the laccase activity of the supernate was rather low (44.3 u/L) and had an increase of 60.3% (71.0 u/L) when 4.0 mmol/L *o*-toluidine was added. Moreover, the activity reached up to 2584 u/L as the glucose was replaced by cellobiose.

Received: February 22, 2005; Accepted: April 13, 2005.

This work was supported by the grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30370045 and No. 30470056), the Key Programs for Science and Technology of Chinese Ministry of Education (No. 204064), the Science & Technology Foundation of Distinguished Young Scholars of Anhui Province (No. 04043048) and the Innovative Research Team of 211 Engineering Project of Anhui University.

* Corresponding author. Tel: 86-551-5108509; E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30370045, 30470056) 教育部科技重点课题(No. 204064) 安徽省优秀青年科技基金(No. 04043048) 和安徽大学 211 工程学术创新团队资助。
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

And Native-PAGE showed that LacA was the main laccase component if fungus was induced by *o*-toluidine or copper ions. It had been demonstrated by quantitative RT-PCR that the regulation of *lacA* expression, induced by *o*-toluidine, occurred at the transcriptional level, with the accumulation of mRNA transcripts being accompanied by the increase of laccase activity of the culture fluid. In addition, the structural gene of *lacA* interrupted by 10 introns was 2110 bp in length and the corresponding cDNA sequence was 1560 bp encoding a 520 aa protein, which had high similarities with other laccases from basidiomycetes. Furthermore, a length of 1881 bp of 5'-terminal sequence of transcription control of *lacA*, amplified by the improved inverse PCR, contained a TATA box, seven CAAT boxes as well as a number of putative *cis*-acting elements important for its expression, including five MREs, nine CreA-binding sites, four XREs, two STREs and seven nitrogen factor binding sites. The existence of these elements was well in agreement with the data obtained from *Trametes* sp. AH28-2 shaken-flask cultures.

Key words fungal laccase, quantitative RT-PCR, long-distance inverse PCR, *cis*-acting element

真菌漆酶(Fungal laccase)是一类主要来源于高等丝状真菌的多酚氧化酶,它能催化多种酚型和非酚型底物氧化,同时伴随有分子氧还原成水^[1]。由于在纸浆废水处理、酚类化合物脱毒、工业纺织染料转化和新型生物传感器研制等领域有重要潜在应用价值而被广泛关注,近年来成为国际上酶工程和环境科学交叉领域研究的热点^[2-5]。

真菌漆酶多以同工酶形式存在,其表达因菌株的生长环境或生理状态不同而不同^[6-8]。多项研究表明,真菌漆酶的合成明显受营养元素、金属离子和小分子芳香化合物影响,这些因素诱导漆酶上调表达发生在基因转录水平^[9-12]。由于转录本的增加主要是由转录模板上游的启动子及其相关顺式作用元件发挥作用后直接引发的。因此,研究真菌漆酶基因转录控制区的结构与功能对于提高漆酶蛋白的表达产量至关重要。

前期研究表明,栓菌 AH28-2(*Trametes* sp. AH28-2)在简单人工培养基上能合成漆酶同工酶 A(LacA)和同工酶 B(LacB)两种组分^[12,13],但该菌株高效合成漆酶的遗传机制并不清楚。本文对 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶 A 诱导合成和 *lacA* 克隆的研究结果进行了报道,并初步探讨了 *lacA* 5'-端转录控制区的结构与漆酶表达规律的内在关系。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

Trametes sp. AH28-2 菌株由本室保藏,于 PDA 培养基斜面上 4℃ 传代。大肠杆菌 *E. coli* JM109 和克隆载体 pMD18-T 分别购于 Stratagene 和 TaKaRa 公司。

1.2 培养基和试剂

液体发酵基本培养基(1L):15g 葡萄糖或纤维二糖, 1.0g tryptone, 1.5g 天冬酰胺, 0.5g

MgSO₄·7H₂O, 0.1g Na₂HPO₄·12H₂O, 0.01g CaCl₂, 0.01g FeSO₄·7H₂O, 0.0275g 腺嘌呤和 50μg 维生素 B1。限制酶 *Pst* I 和 *Taq* DNA 聚合酶购自 SABC 公司, *TAKARA LA Taq*TM 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, DNA 纯化试剂盒和质粒抽提试剂盒为 V-gene 公司产品。其余试剂为进口或国产分析纯。

1.3 酶活分析和 native-PAGE

以愈创木酚为底物,进行漆酶活力测定和 native-PAGE 分析同工酶组分,方法参照 Xiao 等^[12,13]。

1.4 基因组 DNA 和总 RNA 的制备

真菌的培养按照 Xiao 等^[13]的方法进行,用邻甲苯胺或(和)CuSO₄作为酶合成的诱导剂。总基因组 DNA 制备:收集菌丝体,无菌水洗涤后用液氮冷冻,并研磨成粉末状。按每 0.2~0.4mg 菌体加入 2mL 抽提液[200 mmol/L Tris-HCl(pH8.5), 250 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA 和 1.0% (W/V) SDS],室温静置 10min,然后按常规方法进行酚:氯仿抽提和乙醇沉淀。RNA 制备:收集高酶活时的菌丝体,按 RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) 使用程序制备总 RNA。

1.5 *lacA* cDNA 的克隆

使用 oligo(dT)₈ 引物和 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链。根据 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶 LacA 的已知基因组 DNA 序列(gDNA X AF388910),设计两个 PCR 引物 P(5'-GCCATTGGGCCACCGCTGA)和 Pa(5'-CTGGTCGTTGACATCGAGCG),用于扩增 *lacA* cDNA 序列。50μL 的 RT-PCR 体系含有 1μL 逆转录产物,1×PCR 缓冲液,1.5mmol/L MgCl₂, 0.8mmol/L dNTPs, 0.4μmol/L Ps 和 Pa, 1.5u *Taq* DNA 聚合酶。循环反应参数为:94℃ 2min;94℃ 35s, 55℃ 35s, 72℃ 100s, 共 30 循环。目标 PCR 产物从琼脂糖凝

胶中纯化回收, 亚克隆到 pMD18-T 载体上, 再转化 *E. coli* JM109 感受态细胞。筛选转化子细胞, 抽提重组质粒, 进行克隆序列测定。

1.6 定量 RT-PCR

在真菌漆酶合成达到峰值前的不同诱导时间, 取不同酶活力梯度的菌丝样品, 抽提总 RNA, 作为定量 RT-PCR 分析的模板。将 *lacA* gDNA 片段连接到 pMD18-T 载体上, 该重组质粒($\sim 3.99 \times 10^8$ 分子/ng) 作为定量 RT-PCR 的竞争模板。基于 *LacA* 的 gDNA 和 cDNA 序列, 设计竞争性引物对 CPr (5'-GCCTCGTCTCCCTGTCTGTGT) 和 CPf (5'-GGAGAAGATCCTGGCGTTTT)。结构基因中内含子序列的存在使得同一引物对扩增出的 gDNA 与相应 cDNA 片段容易区分。50 μ L 定量 RT-PCR 反应体系中包括一系列梯度稀释的外源竞争模板。PCR 循环反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 2min; 94 $^{\circ}$ C 35s, 55 $^{\circ}$ C 35s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 共 24 循环。扩增产物在凝胶中进行电泳分离, 其相对含量用 Bandscan 4.0 软件分析计算。

1.7 基因组 DNA 的酶切与连接

选用在已知 *LacA* gDNA 内部没有切割位点的内切酶 *Pst* I 充分酶解基因组 DNA, 酚: 氯仿抽提和乙醇沉淀后, 用 T4 DNA 连接酶自身环化连接。再次进行酚: 氯仿抽提和乙醇沉淀, 连接物用作长距离反向 PCR (LD-IPCR) 的模板。

1.8 LD-IPCR

根据 *LacA* gDNA 序列设计引物 Ips (5'-CTTCCCTCTATTCACATCGCATACCAGC) 和 Ipa (5'-ACAGGAACGAATGCCAGACGAGATAG), 建立如下 LD-IPCR 扩增体系: ~ 400 ng 的基因组酶切自连产物, 5 μ L 10 \times LA PCRTM buffer II (Mg²⁺ plus) 0.8mmol/L dNTPs, 0.2 μ mol/L IPs 和 Ipa, 2u TaKaRa LA TaqTM 酶, 用无菌水补体积至 50 μ L。PCR 循环反应参数如下: 94 $^{\circ}$ C 2min, 94 $^{\circ}$ C 40s, 70 $^{\circ}$ C 13min, 共 32 循环。目标 PCR 产物亚克隆到 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌感受态细胞, 选择两个目标转化子进行克隆序列的分析。

2 结果

2.1 漆酶的诱导合成

营养源和诱导剂对 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶合成有重要影响。在以葡萄糖为唯一碳源的基本培养基中培养真菌, Cu²⁺ 诱导漆酶合成在添加后的第 3 天达到高峰(图 1) 2mmol/L Cu²⁺ 诱导产生的酶活是 0.5mmol/L Cu²⁺ 的 4.3 倍。在不添加 Cu²⁺ 的培养物

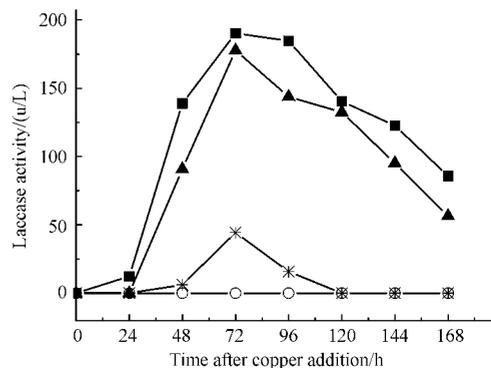


图 1 Cu²⁺ 对 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶合成的影响

Fig. 1 Effect of copper ion on the formation of secreted laccase activity by *Trametes* sp. AH28-2.

Different concentrations of copper ions were added to glucose media. ○, 0 mmol/L; *, 0.5 mmol/L; ▲, 1.0 mmol/L; ■, 2.0 mmol/L.

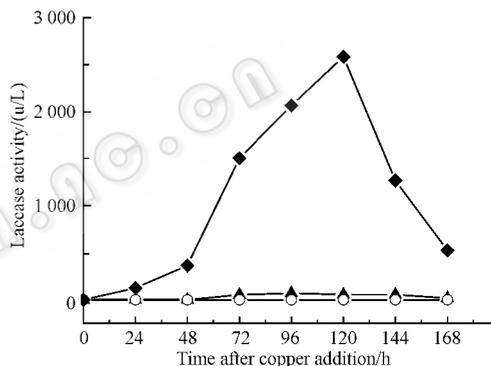


图 2 Cu²⁺、邻甲苯胺和碳源对真菌漆酶合成的影响

Fig. 2 Effects of copper ion, *o*-toluidine and carbon sources on the synthesis of laccase by *Trametes* sp. AH28-2

The concentrations of Cu²⁺ and *o*-toluidine were 0.5 mmol/L and 4 mmol/L, respectively. ○, cellobiose and *o*-toluidine; ▲, glucose, Cu²⁺ and *o*-toluidine; ◆, cellobiose, Cu²⁺ and *o*-toluidine.

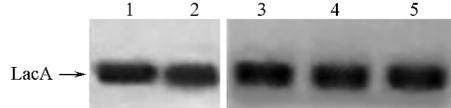


图 3 漆酶样品的活性电泳图谱

Fig. 3 Native-PAGE of laccase samples

Lanes 1 and 2 are the samples induced by 1 and 2 mmol/L Cu²⁺, respectively. Lanes 3, 4 and 5 are the parallel samples with different laccase activities induced by 4 mmol/L *o*-toluidine and 0.5 mmol/L Cu²⁺ and were sampled at different time of induction before peak activities, with individual activity being shown in Table 1.

中未检测到漆酶活性。图 2 是不同浓度的 Cu²⁺ 和邻甲苯胺以及不同的碳源对漆酶合成的综合影响结果。当以 4.0mmol/L 邻甲苯胺为诱导剂时, 在不添加铜的纤维二糖培养基中没有检测到漆酶活性; 在其上清液中补加微量 CuSO₄ 也未能检测到酶活, 说

明分泌性漆酶蛋白没有被合成。在 0.5mmol/L Cu^{2+} 存在条件下,葡萄糖培养基中的最高酶活为 44.3u/L (图 1),同时添加 4.0mmol/L 邻甲苯胺后,漆酶酶活增加了 60.3%,达到 71.0u/L,若改为以纤维二糖为碳源,则发酵液的最高酶活高达 2584u/L,是相同条件下葡萄糖培养基的 36.4 倍(图 2)。native-PAGE 电泳分析表明,邻甲苯胺诱导 *Trametes* sp. AH28-2 产生的同工酶组分为 LacA^[12],铜离子诱导生成的漆酶组分与其相同(图 3)。

2.2 定量 RT-PCR 分析

在漆酶合成达到峰值前的不同诱导时间选取活力不同的 3 个菌丝体样品,活性电泳酶谱表明(图 3:lanes 3, 4 and 5)由其合成的同工酶组分均为 LacA。用这 3 个样品分别制备总 RNA,以 10 倍梯度稀释的带有 LacA 完整结构基因的质粒为竞争性模板,进行竞争性 RT-PCR。引物对 CPF 和 CPr 扩增出的 gDNA 和 cDNA 片段分别长 677bp 与 504bp(图 4)。定量分析计算结果列于表 1。研究表明,随着 *lacA* mRNA 转录本的累积,发酵液的漆酶活力相应增加,两者呈非线性正比关系,真菌 LacA 的合成调控主要发生在基因转录水平。



图 4 定量 RT-PCR

Fig.4 Quantitative RT-PCR

The products of 677bp and 504bp were the corresponding fragments of *lacA* gDNA and cDNA amplified by PCR using primers CPF and CPr. The lanes from the left to the right were the PCR products of the sample 3 (Table 1) using the plasmid containing the entire *lacA* gDNA as the competitive templates whose concentrations were the 10-fold increase by degrees.

表 1 不同酶活力样品 *lacA* 转录本的定量分析

Table 1 Quantification of transcript levels of *lacA* under various enzyme activities

Samples	3	4	5
Enzyme activity(u/L)	2.78×10^2	6.95×10^2	1.04×10^3
No. of molecules per ng total RNA	9.85×10^3	6.73×10^4	4.84×10^5

2.3 *lacA* cDNA 分析

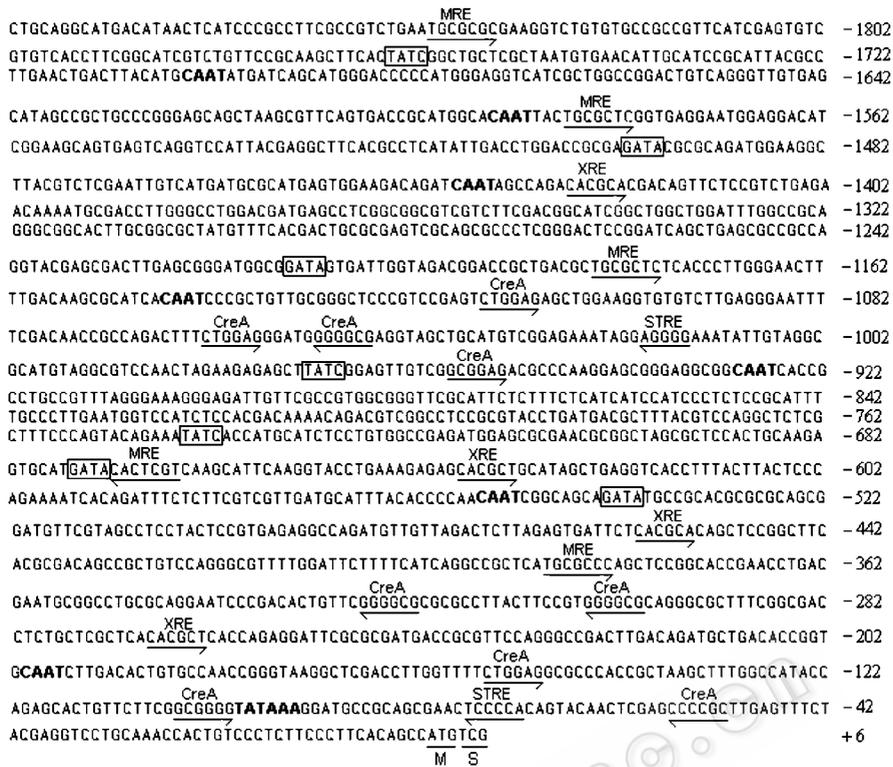
以 Ps 和 Pa 为引物对通过 RT-PCR 方法扩增出的 *lacA* cDNA 序列长 1497bp,与相应的 gDNA 序列(2047bp)进行比对,表明 *lacA* 结构基因内部拥有 10 个内含子,且剪接位点全部遵循 GT-AG 规则^[14]。结合 LD-IPCR 获得的基因序列,可知 *lacA* 的完整

cDNA 长 1560bp,编码 520aa 的单一肽链,其中包括 21aa 的信号肽序列。推导的漆酶蛋白氨基酸序列中含有 5 个 Cys 残基和 10 个保守的 His 残基。与已报道的其它漆酶蛋白相比较,推测 Cys-106 和 Cys-509 之间形成了一个二硫键,Cys-138 和 Cys-226 形成另一个二硫键,而保守的 Cys-474 则参与了 I 型铜原子的连接,距离该保守 Cys 下游第 10 个氨基酸残基为 Phe。另外,在推导的蛋白序列中存在 9 个 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)^[15]。与 GenBank 库中的数据进行搜索比对的结果表明,*Trametes* sp. AH28-2 LacA 的氨基酸序列与 *Trametes hirsuta* 漆酶具有高达 98.7% 的相似性,其次与 *Trametes versicolor* lac III 和 *Trametes pubescens* lac2 的相似性分别为 90.8% 和 90.4%。

2.4 LD-IPCR 和 5'-端调控序列分析

Trametes sp. AH28-2 基因组 DNA 经 Pst I 充分酶解并自身环状连接后,LD-IPCR 扩增,获得长 3507bp 的专一产物。序列分析表明,该片段与已知的 *lacA* 片段(AF388910)在 5'-端与 3'-端各有 390bp 和 1158bp 的一致序列,证明该片段即为 *lacA* 的部分结构基因及其相邻的侧翼序列。将该序列与 *lacA* 的已知片段进行拼接,获得 4009bp 的完整序列,包括 *lacA* 的 5'-端调控区 1881bp、结构基因区 2110bp 和 3'-端非编码区 18bp 的序列。该基因序列已经递交 GenBank(A Y839936)。

图 5 显示了 *lacA* 5'-端调控区几个潜在的顺式作用元件分布位点。TATA 框(TATAAA)位于起始密码子上游第 -99 位,7 个 CAAT 框分别位于第 -199、-554、-929、-1145、-1437、-1593 和 -1703 位,另外,在 TATA 框上游存在几个较长的 GC 富含区。分析表明,TATA 框与起始密码子之间 93bp 片段的 GC 含量与整个启动子区(1881bp)的平均 GC 含量相同,均为 59.1%。9 个潜在的 CreA 结合位点(SYGGRG)^[16]分布在启动子的 -56 ~ -326 和 -957 ~ -1114 两个区域,4 个异生物响应元件(XRE)一致序列(CACGCW)^[17]的位点分别在第 -267、-459、-636 和 -1426 位,5 个遵循 TGCRCNC^[18]序列的金属响应元件(MRE)也存在于该区内,分别位于 -388、-670、-1183、-1586 和 -1836 位。两个潜在的压力响应元件(STRE)(CCCCT 或 GGGGA)^[21]的反向序列分别位于 -76 与 -1018 位。此外,在 *lacA* 5'-端的 -542 ~ -1763 区域还分布有 7 个潜在的氮因子结合位点(GATA)^[20]或其互补序列(TATC)。

图5 潜在的顺式作用元件在 *lacA* 上游调控区的分布Fig.5 Distribution of putative *cis*-acting elements in the *lacA* upstream region

The putative CAAT boxes as well as a TATA box are indicated by boldface. The inferred nitrogen response elements are signed with frames and the directions of these elements are shown with arrows.

3 讨论

铜离子能显著增强绒毛栓菌(*T. pubescens*)漆酶合成的效率^[10],提高 *T. versicolor* 和 糙皮侧耳(*P. ostreatus*)漆酶基因的转录水平^[11]。Faraco 等人证实,只有在去除 Cu^{2+} 的条件下,反式作用因子才能结合到 *P. ostreatus* 漆酶基因启动子的 MRE 序列上^[21]。*Trametes* sp. AH28-2 生长在不含 Cu^{2+} 的培养基中,无论添加芳香化合物诱导剂与否,发酵液都不能检测到漆酶活性,即使添加 Cu^{2+} 到发酵上清液中也是如此。定量 PCR 分析显示,漆酶合成在转录水平上受到了调控。因而,铜离子的存在对于 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶同工酶的转录表达是必须的,高浓度的 Cu^{2+} ($1 \sim 2 \text{mmol/L}$)有利于漆酶的合成,其诱导产生的同工酶组分为 LacA。据报道,高等生物金属硫蛋白基因启动子序列中存在多个金属离子效应位点(TGCRNC)^[22],通过与金属结合的反式作用因子对许多重金属离子产生应答。*Trametes* sp. AH28-2 只有在有 Cu^{2+} 存在时才合成漆酶 LacA,其可能原因是 *lacA* 5'-端调控区存在有 5 个潜在的 MRE 序列位点,使得该基因表达受到金属铜离子

调控。

碳源的种类对于 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶的合成有重要影响。在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中,邻甲苯胺仅诱导产生很低的漆酶活性(图 2),且酶活出现在碳源基本消耗殆尽的菌体生长后期,而当真菌在非抑制性碳源纤维二糖培养基中生长时,发酵液的漆酶合成效率显著提高,为葡萄糖培养基的 36.4 倍。在真菌和酵母细胞中,葡萄糖对基因的表达抑制现象普遍存在^[23],如在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中,Cys2-His2 锌指 DNA 结合蛋白 CreA 参与了葡萄糖抑制效应^[16],其识别位点的序列为 SYGGRG。在 *Trametes* sp. AH28-2 中 9 个可能的 CreA 结合位点丛集在 *lacA* 5'-端的 -56 ~ -326 和 -957 ~ -1114 两个区域,其中的某些位点可能参与 *lacA* 的转录抑制作用。

小分子芳香类化合物能够诱导真菌漆酶同工酶组分进行差异表达。先前研究表明,邻甲苯胺是 *Trametes* sp. AH28-2 漆酶合成的最适诱导剂,其诱导表达的漆酶同工酶组分为 LacA^[13]。竞争性 RT-PCR 分析表明,mRNA 转录本的累积对应了发酵液漆酶活力的增加(表 1),因此,邻甲苯胺对漆酶 *lacA*

表达的调控也发生在转录水平。有报道表明,芳香化合物受体蛋白和另一核因子(Arnt)相结合形成与DNA结合的转录因子,能够识别CYP1A启动子上的异生物响应元件(XRE)^[24]。Galhaup等人研究显示,*T. pubescens*漆酶基因*lap2*启动子内不存在XRE一致序列,因而不能被芳香化合物诱导表达^[10]。与*lap2*不同,在*Trametes* sp. AH28-2 *lacA* 5'-端调控区内存在4个XRE序列位点,使得*lacA*的转录表达可能容易受到小分子芳香化合物的调控。同时,该序列中还分布有两个反向的压力因子响应元件(STRE),也可能对漆酶LacA的胁迫合成有一定促进作用。在*Saccharomyces cerevisiae*中,在不同的环境和生理压力下,正反向的STRE(5'-CCCCT或5'-AGGGG)元件足以引起基因表达的转录激活^[19]。另外,*lacA* 5'-端调控区还存在多个潜在的氮因子调控序列位点GATA框,暗示*lacA*的表达可能还受到氮源的调控。

总之,*Trametes* sp. AH28-2漆酶LacA基因5'-端调控区中多个重要顺式作用元件的存在对应了摇瓶发酵的漆酶表达规律,本研究为进一步揭示漆酶表达调控的分子机制奠定了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, **140**: 19 - 26

[2] Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem J*, 1999, **3**: 1 - 25

[3] Peralta-Zamora P, Pereira CM, Tiburtius ERL *et al.* Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. *Appl Catal B: Environ*, 2003, **42**: 131 - 144

[4] Nicotra S, Cramarossa MR, Mucci A *et al.* Biotransformation of resveratrol: synthesis of *trans*-dehydrodimers catalyzed by laccases from *Myceliophthora thermophyla* and from *Trametes pubescens*. *Tetrahedron*, 2004, **60**: 595 - 600

[5] Quan D, Kim Y, Shin W. Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *J Electroanal Chem*, 2004, **561**: 181 - 189

[6] Mansur M, Su rez T, Gonz lez AE. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 771 - 774

[7] Soden DM and Dobson ADW. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology*, 2001, **147**: 1755 - 1763

[8] Bollag JM and Leonowicz A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol*, 1984, **48**: 849 - 854

[9] Collins PJ, Dobson ADW. Regulation of laccase gene transcription

in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 3444 - 3450

[10] Galhaup C, Goller S, Peterbauer CK *et al.* Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*, 2002, **148**: 2159 - 2169

[11] Baldrian P, Gabriel J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **206**: 69 - 74

[12] Xiao YZ, Chen Q, Wu J *et al.* Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*, 2004, **96**: 26 - 35

[13] Xiao YZ, Tu XM, Wang J *et al.* Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Appl Microbiol Biotech*, 2003, **60**: 700 - 707

[14] Padgett RA, Konarska MM, Grabowski PJ *et al.* Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science*, 1984, **255**: 898 - 903

[15] Gavel Y, von Heijine G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Ser/Thr acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng*, 1990, **3**: 433 - 442

[16] Kulmborg P, Mathieu M, Dowzer CEA *et al.* Specific binding sites in the alcR and alcA promoters of the ethanol regulon for the CreA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol*, 1993, **7**: 847 - 857

[17] Rushmore TH, King RG, Paulson KE *et al.* Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic compounds. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 3826 - 3830

[18] Thiele DJ. Metal regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 1183 - 1191

[19] Treger JM, Magee TR and McEntee K. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **243**: 13 - 19

[20] Marzuluf GA. Genetic Regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Micro Mol Biol Rev*, 1997, **61**: 17 - 32

[21] Faraco V, Giardina P and Sannia G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. *Microbiology*, 2003, **149**: 2155 - 2162

[22] Culotta VC and Hamer DH. Fine mapping of a mouse metallothionein gene metal response element. *Mol Cell Biol*, 1989, **9**: 1376 - 1380

[23] Ronne H. Glucose repression in fungi. *Trends Genet*, 1995, **11**: 12 - 17

[24] Whitlock JP Jr, Okino ST, Dong L *et al.* Induction of cytochrome P4501A1: a model for analysing mammalian gene transcription. *FASEB J*, 1996, **10**: 809 - 818