

毛木耳漆酶基因的克隆、序列分析及其鉴定

杨建明¹ 孟鑫¹ 徐鑫¹ 张磊¹ 李强¹ 咸漠^{1*} 潘迎捷²

(1. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所 青岛 266071)

(2. 农业部食用菌遗传育种重点开放实验室 上海市农业科学院食用菌研究所 上海 201106)

摘要: 本文利用 PCR 和 RACE 技术首次从毛木耳 AP4 菌株中获得编码漆酶基因的 cDNA 及其基因组全长序列, 基因组大小为 2514 bp。通过比较该漆酶基因的 cDNA 和基因组 DNA 的全长序列, 发现该基因包含 14 个外显子和 13 个内含子。cDNA 序列的全长为 1972 bp, 其包含一个完整的 ORF, 长度为 1860 bp, 编码 619 氨基酸, 推测的分子量大小为 68 kD, 等电点 pI 为 5.15。在氨基酸序列的氨基末端存在一个信号肽序列, 同时该基因还包括含铜氧化酶的三个功能结构域 KOG1263、Suf1 和 pfam00394。氨基酸序列与 GenBank 中登录的真菌漆酶蛋白序列比对表明: 该氨基酸序列与其它真菌漆酶蛋白序列有较高的同源性, 氨基酸序列相同性最高达 41%, 相似性为 58%, 并且含有真菌漆酶四个保守的 Cu-bind 结构域。将获得的漆酶基因 *lac1* 与毕赤酵母表达载体 pPIC9K 连接, 构建重组质粒 pYH3660, 将其转化到毕赤酵母中, 经甲醇诱导该基因在第 10 天产酶高达 123 IU/L, 并通过 Native SDS-PAGE 电泳获得预期大小的漆酶蛋白条带。结构分析和功能验证均表明: 本研究获得的基因 *lac1* 为漆酶基因。

关键词: 毛木耳, 漆酶基因, RACE, 结构域

Cloning, Sequence Analysis and Characterization of Laccase Gene in *Auricularia polytrica*

YANG Jian-Ming¹ MENG Xin¹ XU Xin¹ ZHANG Lei¹
LI Qiang¹ XIAN Mo^{1*} PAN Ying-Jie²

(1. Qingdao Institute of Biomass Energy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(2. Key Laboratory of Edible Fungus Genetic and Breeding, Ministry of Agriculture, Edible Fungi Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106)

Abstract: Using PCR and RACE technique, We obtain the cDNA and genomic DNA sequence of the *lac1* gene from *Auricularia polytrica*. The length of genomic DNA is 2514 bp, which contains 14 exons and 13 introns based on the comparison of cDNA and genomic DNA sequence. The length of the *lac1* cDNA sequence is 1972 bp, which includes a complete Open Reading Frame (ORF) of 1860 bp, from No.33 to No.1890, encoding 619 amino acids, the molecular weight is about 68 kD, and isoelectric point is about 5.15. A signal peptide sequence exists in the N-terminal of the deduced amino acids, which also contains three multi-copper oxidase domains: KOG1263, Suf1 and pfam00394. We blasted the deduced amino acids with the fungal laccases protein sequences on the GenBank and observed that there is higher homologous

similarity: the highest identity is 41% and positive is 58% respectively, and it also includes four conserved Cu-bind domains. The full length cDNA sequence of *A. polytricha lac1* gene was ligated to the pPIC9K to construct expression vector pYH3660, the recombinant plasmid pYH3660 was transformed into *Pichia pastoris*, laccase activity was detected from the engineering strain which was induced by methanol with the highest expression level(123 IU/L). At same time, we get the anticipative protein using the Native SDS-PAGE. Based on the analysis of the sequence structure and expression characterization, we can conclude that the *lac1* gene obtained from *Auricularia polytricha* is laccase gene.

Keywords: *Auricularia polytricha*, Laccase gene, RACE, Function domain

漆酶(ρ -diphenol oxidase EC1.10.3.2)是一类含铜的多酚氧化酶。1883年日本学者吉田(Yoshida)首次从漆树漆液中发现漆酶^[1], 随后人们发现某些高等真菌也能分泌这种酶^[2], 其中最重要的产生菌是担子菌中的白腐真菌(white-rot fungi)。100多年来, 漆酶一直是生物学、化学和环境科学等领域中十分活跃的研究热点^[3]。

对于漆酶的研究已深入到其分子水平进入基因工程阶段。现已对许多重要的漆酶基因进行cDNA克隆和测序, 并开始采用重组技术研究漆酶基因的同源、异源表达和调控机制^[4]。

200多个漆酶基因组DNA和cDNA序列已从真菌和植物中得到分离和鉴定, 其中真菌涉及20多个属^[5]。而且许多漆酶基因已成功地在 *Pichia pastoris*^[6]、*Saccharomyces cerevisiae*^[7]、*Trichoderma reesei*^[8]、*Aspergillus oryzae*^[9]和 *Aspergillus niger*^[10]中高效异源表达。在获得真菌漆酶基因序列后进行比较发现: 总体的漆酶和其它蓝色过氧化物酶的氨基酸序列的同源性不高, 然而在铜结合域中的一个Cys和10个His残基却十分保守^[6]; Kumer等对60多个真菌漆酶序列比较发现, 漆酶包含4个保守的区域^[5]。本文根据真菌漆酶基因的4个保守Cu-bind结构域的氨基酸序列设计简并引物, 利用RACE技术首次在毛木耳上获得了一个漆酶基因的cDNA全长序列和其基因组全长序列, 它们在GenBank上的登录号分别为: AY615304和AY616035。通过将其转入毕赤酵母真核表达系统中表达验证了该基因的漆酶功能。关于毛木耳漆酶基因的研究在国内尚属首次报道。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

毛木耳AP₄来自上海农科院食用菌研究所菌种

保藏中心。

毕赤酵母菌株 [*Pichia pastoris*(His⁻Mut⁺)] 购自美国种质保藏中心(ATCC)。大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 、质粒pMD18-T等为Promega公司产品。质粒pPIC9K为Invitrogen公司产品。

1.2 主要生化试剂

PCR引物由上海博亚生物技术有限公司合成, 限制性内切酶、T4连接酶和L-A Taq polymerase为TaKaRa公司产品。G418购自Sigma公司。

PCR扩增的Taq酶、Buffer采用Promega公司产品; 总RNA提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。

RACE试剂盒: BD Biosciences Clontech SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit。

1.3 基因组DNA的提取

参照精编分子生物学实验指南中的CTAB法^[11]。

1.4 总RNA的提取

参照上海华舜生物工程有限公司总RNA提取试剂盒中RNAex System IV步骤。

1.5 漆酶基因的克隆

漆酶包含4个保守的区域, 且这4个保守区域已被确定作为漆酶的特征序列, 根据其中最为保守的结构域和 设计克隆漆酶基因片段的简并引物, 其余操作均参照SMART[™] RACE cDNA Amplification Kit进行。

根据3'-RACE和5'-RACE技术分别获得漆酶基因的3'-和5'-末端序列, 设计引物F和R, 以基因组DNA为模板进行PCR扩增获得lac1基因组序列。

根据lac1 cDNA序列设计引物lac1F和lac1R, 并且引入BamH和NotI酶切位点, 以总RNA的反转录cDNA为模板扩增获得lac1基因的cDNA序列。设计的引物序列如表1和表2所示。

表1 扩增漆酶基因片段引物
Table 1 Primers for amplifying the *lacI* gene fragment

Conserved domain	Corresponding amino acid sequence	Nucleotide sequence
III	PFHLHGH	5'-CC(AGCT)(AT)T(AGCT)CA(CT)(CT)T(AGCT)CA(CT)GG(ACGT)CA-3'
IV	WFLHCHID	5'-(AG)TC(AGT)AT(AG)CA(AG)TGGA(AG)(AG)AACCA-3'

表2 扩增漆酶 cDNA 序列和基因组序列引物
Table 2 Primers for amplifying the *lacI* cDNA and genomic DNA

Primers	Sequences	Purpose
3'Gsp	5'-CAATACATTTGCATGGGCACAAGTTCC-3'	3'-末端快速扩增(3'-RACE)
5'Gsp	5'-GGAACCAGGCGCCAGGGTTGTCCGCG-3'	5'-末端快速扩增(5'-RACE)
lac1F	5'-AGGATCCAAACGATGGCTCTTCTCCTTTGCTTCTTAGCTGCCTA C-3' (<i>Bam</i> H I)	
lac1R	5'-AGCGGCCGCTTAATTCTTTTTCATCCGCGAAAAG-3' (<i>Not</i> I)	漆酶 cDNA 克隆
F:	5'-ATGGCGCTCCTGCCATGTCTCCTCC-3'	
R:	5'-TTAATCTTTTTCATCCGCGAAAAGATGCTC-3'	漆酶基因组 DNA 的克隆

1.6 漆酶基因结构分析

将 3' RACE 片段和 5' RACE 片段经 V-gene 核酸纯化试剂盒回收后送交上海博亚生物技术有限公司进行 T-A 克隆测序。应用相关生物学软件对获得的漆酶 cDNA 序列进行相似性比较及结构特点分析。

1.7 真核表达载体的构建及鉴定

含有漆酶基因 pMD18-T-lacI 载体与酵母表达载体 pPIC9K 经过相同限制性酶 *Bam*H I 和 *Not* I 的酶切后, 将 *lacI* 基因与 pPIC9K 连接后构建成重组表达载体 pYH3660, 其含有基因 *lacI* 的自身的信号肽序列和 AOX1(醇氧化酶)的启动子。

将该表达载体 pYH3660 转化入 *E. coli* DH5 α 中, 通过蓝白斑筛选阳性重组子, 利用 PCR 和酶切方法验证 pYH3660 正确性。

1.8 重组毕赤酵母在底物平板上的诱导表达

将通过 40 孔板筛选获得的阳性克隆和对照的阴性克隆(空载体)同时划线涂布到含有 0.2 mmol/L ABTS 的 2 SD 平板上, 于 28°C 条件下, 向平板的内盖上滴加少许 1% 的甲醇进行诱导培养。

1.9 外源基因在毕赤酵母中的诱导表达^[12]

挑取待表达的重组毕赤酵母单菌落于 BMGY 液体培养基(按 10% 装瓶), 28°C~30°C、260 r/min~280 r/min 摇床培养至对数期(OD_{600} 为 2~6), 转接 1 mL 培养液至 100 mL BMGY 液体培养基, 28°C~30°C、260 r/min~300 r/min 摇床培养至对数中期

(OD_{600} 为 20~30)。室温 4000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 去上清, 细胞沉淀全部转移至 100 mL BMMY 液体培养基中, 25°C、260 r/min~280 r/min 摇床培养, 每隔 12 h 补加 100% 甲醇至适当浓度。从细胞沉淀转至 BMMY 液体培养基诱导开始, 每隔 24 h 取样 1 mL 粗酶液分析表达水平。

1.10 Native SDS-PAGE

参照 BIO-RAD 实验手册稍有改动, 在浓缩胶、分离胶、上样缓冲液和电泳缓冲液中均除去 SDS, 上样缓冲液中还不加 β -巯基乙醇, 蛋白样品不煮沸变性。电泳完毕后, 将胶放入用 3%(w/v) ABTS 溶液(用 0.2 mmol/L 醋酸缓冲液溶解)中, 室温缓慢摇动 10 min~15 min 即可看到绿色条带出现, 即漆酶条带。

1.11 漆酶活力测定^[13]

1 mL 反应混合液中, 含 5 mmol/L ABTS 100 μ L, 醋酸缓冲液(pH 3.0) 800 μ L, 粗酶液 100 μ L, 以 1 min 内催化氧化 1 μ mol/L ABTS 的酶量为 1 个酶活单位 (IU)。已知 420 nm 处 ABTS 的摩尔消光系数为 3.6×10^4 L/(mol·cm)。

2 结果和分析

2.1 漆酶基因的克隆与序列分析

根据真菌漆酶基因保守的 Cu-bind 结构域和氨基酸序列设计的简并引物扩增漆酶的基因组 DNA, 获得一条约 200 bp 基因片段, 将其进行 T-A

克隆测序, 结果得到大小为 204 bp 的基因片段, 其序列与 GenBank 中序列 Blastn 比对后得知其为漆酶基因片段。根据获得的漆酶基因片段的 5'端保守区域设计特异性的正向引物: 3' Gsp, 以此引物扩增反转录的 3' RACE cDNA, 获得一大约 700 bp 条带, 将其纯化后进行测序, 获得基因片段为 664 bp, 其 3'端有典型的 PolyA 尾巴, 在 PolyA 尾前有一加尾信号(AATAAA)。将该序列输入到 GenBank 中 Blastx 比对后确认其与漆酶基因具有很高的同源性。根据获得的漆酶基因片段 3'端保守区域设计特异性反向互补引物: 5' Gsp, 以此引物扩增反转录的 5' RACE cDNA, 获得一大约 1600 bp, 将其纯化后测序, 获得片段为 1497 bp, 5'端有一非编码区(1 bp~32 bp), 编码区的长度为 1465 bp, 该序列与 3' RACE 扩增的片段有重复区域, 且将该序列输入到 GenBank 中 Blastx 比对后发现其与漆酶基因具有很高的同源性。

根据漆酶基因 cDNA 的 3'端和 5'端的重复区域, 剪切拼接后得到一全长为 1972 bp 的漆酶基因, 命名为 *lac1*。该漆酶基因 cDNA 序列在 GenBank 上的登录号为 AY615304。*lac1* 具有真核基因的一般特征: 在其 5'端有一非编码区, 长度为 32 bp; 3'端有一个典型的 PolyA 尾巴和一加尾信号(AATAAA)。运用 PCgene 软件分析可知它包括一个 1860 bp 的完整阅读框(ORF), 从 33 至 1892 核苷酸, 分子量大小约为 68 kD, 等电点 pI 约为 5.15, 限制性酶切位点有 12 个, 其编码 619 个氨基酸。利用 SignalP V2.0 软件分析编码的氨基酸序列发现其 N 端包括一典型信号肽序列(1~18 aa), 剪切位点为(GLG - AL)。通过应用 Scanprosite 程序可得出在 *lac1* 基因编码的氨基酸序列中含有 8 个 N-糖基化位点(N-X-S/T), 天冬酰胺残基分别位于氨基酸序列的第 46、59、84、214、231、281、308、373 处, 它们都是潜在的糖基化位点(如图 1)。应用 RPS-Blast 进行保守结构域分析表明, 该蛋白有 3 个保守的结构域: 即 KOG1263、SufI 和 pfam00394。其中 KOG1263 和 SufI 是多铜氧化酶中与次级代谢物生物合成、运输和分解代谢相关的结构域; 第 3 个 pfam00394 是 Cu-oxidase 的保守结构域。将 *lac1* 编码的氨基酸序列与 GenBank 中登录的蛋白序列进行 Blastp 比对后发现, 它与其它真菌漆酶基因编码的氨基酸序列具有较高的同源性。其中与 *Fusarium proliferatum* 的 Laccase 氨基酸

一致性达到 41%, 相似性达到 58%; 与 *Pleurotus ostreatus* 的 Laccase 氨基酸一致性达到 35%, 相似性达到 48%; 与 *Pleurotus sajor-caju* laccase 3 氨基酸一致性达到 35%, 相似性达到 48%; 与 *Panorbis viscosus* laccase 氨基酸一致性达到 39%, 相似性达到 57%; 与 *Agaricus bisporus* laccase 氨基酸一致性达到 34%, 相似性达到 47%; 与 *Phlebia radiata* laccase 氨基酸一致性达到 32%, 相似性达到 47%; 与 *Flammulina velutipes* laccase 氨基酸一致性达到 33%, 相似性达到 48%等。

2.2 漆酶基因组全长的获得与结构分析

根据 *lac1* cDNA 的全长序列, 设计一对特异性引物, 以基因组 DNA 为模板通过 PCR 扩增获得该漆酶基因组的全长序列, 长度大小为 2514 bp。该序列在 GenBank 中登录号为: AY616035。通过比较漆酶基因的 cDNA 和基因组 DNA 的全长序列, 发现该漆酶基因包含 14 个外显子和 13 个内含子。内含子的长度分别为 51 bp、53 bp、50 bp、59 bp、51 bp、57 bp、50 bp、51 bp、50 bp、48 bp、50 bp、54 bp 和 59 bp, 是典型的真菌内含子的长度(49 bp~85 bp)^[14]。内含子中剪切位点的特征序列(5'GT...AG-3')存在于大多数的内含子中, 除了内含子 4、10 和 13 外。

2.3 表达载体 YH3660 酶切、测序验证

含有漆酶基因 pMD18-T-*lac1* 载体与酵母表达载体 pPIC9K 经过相同限制性酶 *Bam*H 和 *Not* 的酶切后, 将 *lac1* 基因与 pPIC9K 连接后构建成重组表达载体: pYH3660(11.17 kb), 含有基因 *lac1* 的自身的信号肽序列和 AOX1(醇氧化酶)的启动子。

将该表达载体 pYH3660 转化到 *E. coli* DH5 α 中, 接种到含有 X-Gal 的平板上通过蓝白斑筛选阳性重组子, 通过限制性酶切和测序验证 pYH3660 正确性。

2.4 阳性重组克隆的筛选

将表达载体 pYH3660 经 *Bgl*I 单酶切线性化后, 用乙醇纯化后进行电击转化入毕赤酵母中。将转化液直接涂布到 2SD 平板上, 28°C 培养 2 d, 然后将长出的菌落划线接入含有 G418 抗性平板上, 28°C 培养 3 d, 挑选阳性克隆以进一步筛选。

将在含有 G418 抗性平板上生长的菌落在 40 孔板上进行甲醇诱导培养 2 d 后, 在 40 孔板上用漆酶

<i>P. sajor-caju</i>	-MVLSTKLVALVASLPF--VFAVTKKLDHFH RNDVVSPDGFERRA TVNGIFPGTPVILQ 57
<i>Agaricus</i>	-MRLSNALVLAACISS--VVAKTRTFDFDLVNTRLAPDGFERDVTV INGEFPGLT IQVN 57
<i>P. ostreatus</i>	MAVAFVALVSLALALVR--VEAS GPRGTLN ANKV QPDGFYRSTVLAGGSYPG LIK GK 59
<i>Flammulina</i>	MVRFQSFPLPYLALFFAASAYAA GPVADLV SNADVTPDGFTRAAVVVNEAFSP LITGY 60
<i>Fusarium</i>	-----
<i>Auricularia</i>	---MALLPLLLLAAYA <u>APGLGAL</u> VEKWWD TFVNANPDGLFERRVVG <u>NGS</u> WPPPP IELT 57
	↑
<i>P. sajor-caju</i>	KNDKQV KT NELTDPGMRRSTS HWHGLFQHKTS GMDGSPFVNQCP PPNTTFLYDFDT 117
<i>Agaricus</i>	KGDSVR PLHNKLTSPMRRSVS HWHGFFQARTSGQDGPSPFVNQCP PPNTTFTYEFSV 117
<i>P. ostreatus</i>	TGDRFQ INVNKLADTSMPVDS HWHGLFVKGNWADGPAMVTQCP VPGHSLYDFEV 119
<i>Flammulina</i>	KGDHFR LNV NRMTNHTMLKTT HWHGLFQRGTNWADGPAFVTQCP ASGDSFLYDFRV 120
<i>Fusarium</i>	-----ASVHWHGMYQNGTNFMDGPAMVTQCN PTGAS TYNFTV 39
<i>Auricularia</i>	<u>VNDTLRVHATNKLDKP</u> -----TTLHHHGMFF <u>NGT</u> SYFDGAAGVSQCG PPGETFTYDVV 112
	.:* **:. . **:. *.** .. :.*:.
<i>P. sajor-caju</i>	AGQT-- <u>GNYWYHSHLSTQYCDGLRGSF</u> VYDPNDPLKHLVDVDEST I TLADWYHDLAP 175
<i>Agaricus</i>	AEQS-- <u>GTFWYHSHLSTQYCDGLRGAF</u> VYDPRDPLRHLVDVDESTV TLAEWYH LAP 175
<i>P. ostreatus</i>	PDQA-- <u>GTFWYHSHLSTQYCDGLRGLV</u> VYSKNDPHKRLVDVDESTLV TGDWYHAPSL 177
<i>Flammulina</i>	PGQA-- <u>GTFWYHSHLSTQYCDGLRGS</u> VVYDPLDPLGWLVDVDDSTV TLADWYHFAAR 178
<i>Fusarium</i>	DQVG-- <u>TYWYHSHTRSQYDGLRQAL</u> IQDPKNPYEGEY--HEERV TSDWYHDEMP 93
<i>Auricularia</i>	ANSQWGTYWVHSHASGHYVDGLRAPV IHN--VPETHVY--DDEFTV IGDWYHDQHE 167
	.:* *** :* **** . :. . * * . :. :.:***
<i>P. sajor-caju</i>	-QV ILPANKL EVS PG----AGAHPFHLHGHTFD IVRVSN-----SDVVNL 440
<i>Agaricus</i>	-Q IFFVPKNSL EVN PG----EGAHPFHLHGHNFDVVLASN-----DDTFNF 439
<i>P. ostreatus</i>	-S YD IKLGDVVE TMPALVFA--GPHP IHLHGHTFAVRSAG-----SSTYNY 436
<i>Flammulina</i>	-SVYALPSHSS E TFPATARAPGGPHPFHMHGHVFAVRSAG-----SSTYNY 439
<i>Fusarium</i>	TNSFVLKHGE VE ILNDD--SGRHPFHLHGQNFQVVRSEENAG--HYNASWTN ITYP 368
<i>Auricularia</i>	PTSFVLNQFDVVE KVVNFD--AGKHP IHLHGKFKQ VHKSTDFTSDDPTLNPLMEGQ 458
	: . :.*: . * **:*:**: * * * :
<i>P. sajor-caju</i>	VNPPRRDVLPIN----GGNTTFRFFSGNSGAWFLHCH DWHLEAGLAVVFAERPAEVNEG 496
<i>Agaricus</i>	KNPPRRDVYPIN----GGNTTFRFFTDNPGAWFLHCH DWHLEAGL VFAEAPEDNVSG 495
<i>P. ostreatus</i>	ENPVRDVS IGDDPT-DNVT RFVADNAGPWFLHCH DWHLDLGFVAVFAEG--VNQT 492
<i>Flammulina</i>	RNPVWRDVTSTGSAANDNVT RFRTDNPGPWFLHCH DFHLQAGFA ALAE--IPRI 496
<i>Fusarium</i>	SVPMRRDILLVYP--QGNFV RFPATNPGVWFLHCH AC----- 405
<i>Auricularia</i>	LNPVRRDVTQVPS--MGSASLRFVADNPGAWFLHCH EWHLEAGLAVTFFEAPEAQK 515
	* ** . . :** : * * * :****

图1 Lac1 推断氨基酸序列与担子菌和子囊菌漆酶序列的比较

Fig. 1 Alignment of the deduced Lac1 amino acid sequence with other basidiomycete and ascomycete laccase

Note: Stars represent identical amino acid; colons and dots represent conservative and semi-conservative amino acid substitution. The signal peptide is shown with italic text. Cleavage site is (GLG-AL) shown by the arrow. Eight possible N-glycosylation sites are underlined. Four potential copper-binding domains are shaded. Gaps have been introduced for optimal alignment and are indicated by dashes. Accession numbers of sequences are as follows: *P. ostreatus*: CAA06292; *P. sajor-caju* lac3: CAD45379; *A. bisporus*: AAC18877; *F. proliferatum*: AAK72903; *F. velutipes*: AAR82931. Alignment was done with CLUSTALW software

的特异性底物 ABTS 进行筛选阳性克隆。其在 1% 甲醇诱导下漆酶基因 *lac1* 表达了漆酶的活性。再将阳性克隆在 YPD 液体培养基中培养, 收集菌体, 抽提总基因组 DNA, 以 *lac1F* 和 *lac1R* 为引物进行 PCR 扩增, 得到与正对照(pYH3660 质粒 DNA 作为模板)一致的扩增产物, 说明 *lac1* 基因已转入受体菌。将

重组菌株命名为: GS115(pYH3660)。

2.5 重组毕赤酵母的诱导表达

将 GS115(pYH3660)按高密度摇瓶方式在 20°C、1.0%(V/V)甲醇流加量条件下诱导产酶, 并将不携带漆酶基因的重组毕赤酵母菌株 GS115 宿主菌同步诱导作为产酶的本底对照, 与对应的重组菌株同时取

样分析, 经 ABTS 法测定所产漆酶酶活。GS115 (pYH3660)在诱导的第 10 天产酶达最高值 123 IU/L。又将诱导所产酶的粗酶液经 Native SDS-PAGE 分析表明有明显表达的具有漆酶活性的蛋白带 (图 2)。

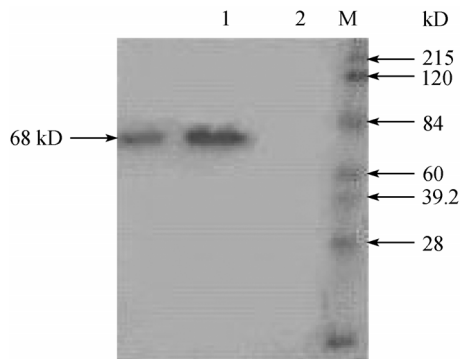


图 2 重组毕赤酵母 Native SDS-PAGE 电泳
 Fig. 2 Native-SDS-PAGE of laccase from recombinant *P. pastoris*
 L: Laccase secreted by GS115(pYH3660); 2: No laccase secreted by GS115; M: Protein molecular weight marker

3 讨论

漆酶作为一个具有重要的生物学功能的酶, 其在植物和真菌生长过程中起着不可忽视的作用。因此根据它的氨基酸变异情况可在一定程度上了解物种进化的规律。通过运用 ClustalW 程序对毛木耳漆酶和其它真菌漆酶、植物漆酶及植物抗坏血酸氧化酶的氨基酸序列建立了系统进化树(如图 3)。从进化树图中可发现: 宏观上可看出植物漆酶和植物抗坏血酸氧化酶分属一大类, 真菌漆酶分为一大类, 这符合物种进化的一般的规律性。在微观上, 我们发现一个有趣的现象: 属于担子菌纲的毛木耳漆酶在亲缘关系上更接近于子囊菌纲的 *Fusarium proliferatum* 和 *Panordis viscosus*, 而与其它担子菌的真菌漆酶关系较远。这在一定程度上也反应了物种进化过程中某个基因变异的非一致性。

本文所获得的 *lac1* 被认为是漆酶基因的证据如下: (1)*lac1* 编码的氨基酸序列中含有 2 个 multi-copper oxidase 的保守结构域(KOG1263 和 SufI)和 1

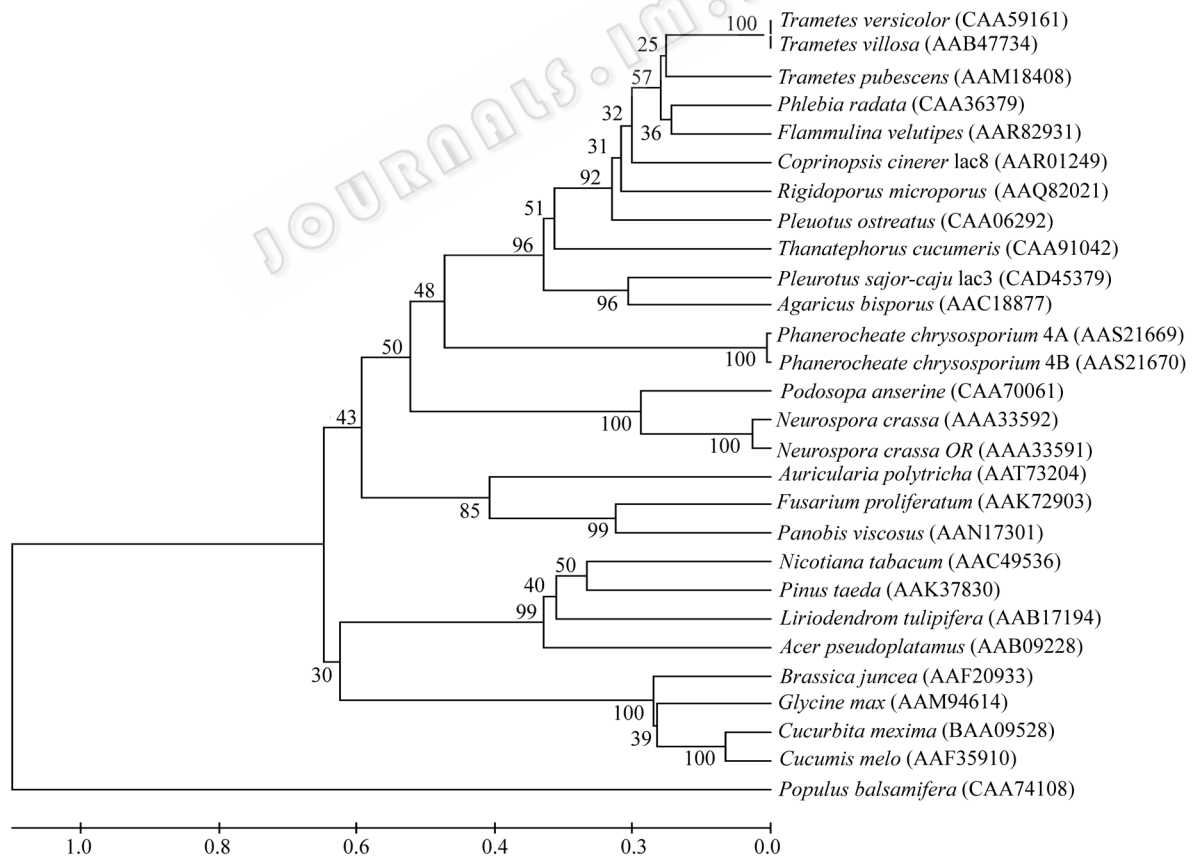


图 3 真菌漆酶、植物漆酶和植物抗坏血酸氧化酶间的系统发育关系
 Fig. 3 Phylogenetic relationships among fungal laccases, plant laccases and plant ascorbate oxidases

个Cu-oxidase 的保守结构域(pfam00394), 因此该基因编码的氨基酸是一种铜氧化酶。(2)在序列的比较中发现, 不同真菌漆酶的整个氨基酸序列之间的同源性并不高, 然而在铜结合域中的 1 个Cys和 10 个His残基却十分保守, 在真菌漆酶中它们被认为是漆酶的看家残基^[11]; 本实验所获得的*lac1* 编码的氨基酸完整序列与其它真菌漆酶蛋白序列一致性达到 41%, 相似性达到 58%。且漆酶基因*lac1* 的cDNA编码的氨基酸序列中同样也含有漆酶的活性位点中必须的 10 个组氨酸残基和 1 个半胱氨酸残基(如图 1)。(3)Kumer等对 60 多个真菌漆酶序列比较发现, 漆酶包含 4 个保守的区域, 且这 4 个保守区域已被确定作为漆酶的特征序列^[5]。根据与GenBank中登录的漆酶蛋白序列比较后发现*lac1* 所编码的氨基酸序列中也含有 4 个保守的Cu-bind结构域(如图 1)。(4)基因表达验证—基因*lac1* 的cDNA序列在毕赤酵母中的成功表达, 通过ABTS法测得在诱导的第 10 天产酶达最高值 123 IU/L, 且将诱导所产酶的粗酶液经Native SDS-PAGE分析表明:粗酶液中含有明显表达的具有漆酶活性的蛋白带(图 2)。

综上所述, 本文利用 PCR 和 RACE 技术在毛木耳菌株中首次获得一个新的漆酶基因的 cDNA 和 Genomic DNA 的全长序列, 并且在毕赤酵母中得到表达验证。这对于今后研究漆酶基因在木耳生长发育过程中所起的生物学功能和进行基因遗传操作无疑都有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Yoshida H. Chemistry of Lacquer(Urusht)part 1. *J Chem Soc*, 1883, **43**: 472-486.
[2] Reinhammar B. In "Copper Proteins and Cooper En-

- zymes"(Lontie R Ed) CRC Press, Boca Raton, 1984, **2**: 1-3.
[3] Christopher F. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*, 1994, **140**(1): 19.
[4] 李慧容. 白腐真菌研究进展. 环境科学进展, 1996, **12**: 69-77.
[5] Kumar SV, Phale PS, Durani S, *et al.* Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biothehnol Bioeng*, 2003, **83**: 386-394.
[6] Zang YB, Jiang Q, Jiang ML, *et al.* Cloning of a laccase gene from *Flammulina velutipes* and study on its expression in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, **44**(6): 775-779.
[7] Cassland P, Jonsson LJ. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 393-400.
[8] Saloheimo M, Niku-Paavola ML. Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology*, 1991, **9**: 987-990.
[9] Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, *et al.* Purification, characterization, molecular cloning, and expressin of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl Environ microbial*, 1996, **62**: 834-841.
[10] Record E, Punt PJ, Chamkha M, *et al.* Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Eur J Biochem*, 2002, **269**: 602-609.
[11] F 奥斯伯, RE 金斯顿, R 布伦特等著. 颜子疑, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, pp.37-38.
[12] Li A, Crimmins DL, Luo Q, *et al.* Expression of a novel regenerating gene product, Reg IV, by high density fermentation in *Pichia pastoris*: production, purification, and characterization. *Protein Expr Purif*, 2003, **31**(2): 197-206.
[13] Bourbonnais R, Paice MG. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* in the presence of 2,2'-azinobis(3-ethylbenthiiazoline-6-sulfonate). *Appl Environ microbial*, 1992, **36**: 823-827.
[14] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, **30**: 215-242.