

金针菇漆酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达研究

张银波<sup>1,2</sup> 姜 琼<sup>1</sup> 江木兰<sup>2</sup> 马立新<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 湖北大学 分子微生物学与基因工程研究室 武汉 430062)  
(<sup>2</sup> 中国农业科学院油料作物研究所 农业部油料作物遗传改良重点开放实验室 武汉 430062)

**摘 要** 综合运用 cDNA 末端快速扩增(Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)和基因组步行等技术克隆到一个金针菇(*Flammulina velutipes*)的漆酶结构基因和其对应的全长 cDNA,经测序和 BLAST 比对分析表明该基因属于多铜氧化酶基因家族,与已发表的漆酶基因(AF176230)的同源性最高,在氨基酸水平为 72%。该结构基因命名为 *gl-ccFv*, cDNA 命名为 *lccFv*,其序列提交 GenBank,登录号分别为 AY485826 和 AY450406。将 *lccFv* 的开放阅读框克隆到毕赤酵母表达载体 pHBM906,转化毕赤酵母 GS115 且实现了分泌表达。将重组毕赤酵母 GS115(pHBM565)诱导产酶,在培养温度 20℃、甲醇流加量为 1.0%(V/V)的情况下,其分泌表达的 LCCFv 的最高酶活为 0.1070 U/mL,最适反应温度为 45℃,最适反应 pH 值为 3.9,在最适反应条件下其热稳定性和 pH 值稳定性均较好。

**关键词**: cDNA 末端快速扩增,基因组步行,漆酶基因,毕赤酵母,分泌表达

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)06-0775-05

漆酶(Laccase EC1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶<sup>[1]</sup>,自从 1883 年被发现以来,一直是生物学、化学和环境科学等领域十分活跃的研究热点,近年来的研究表明,它具有广泛的底物作用范围,在很多方面有较大的应用价值,如造纸工业中纸浆的去木质素化和生物漂白<sup>[2]</sup>、酚类化合物和氧分子的生物检测<sup>[3]</sup>、稠环芳烃类化合物的降解<sup>[4]</sup>、生物燃料电池的阴极反应<sup>[5]</sup>及其他潜在的应用。我国是生漆的发源地,漆树分布于全国 10 多个省区,又具有十分丰富的真菌资源,但我国对漆酶的研究与日、美、意等发达国家相比还十分落后,对于漆酶基因的克隆与异源表达研究尤显不足。本文首次报道了综合运用 RACE 和基因组步行等分子生物学技术克隆到一个金针菇的漆酶基因,通过测序和 BLAST 比对对其进行了分析鉴定,并阐明了其在毕赤酵母中分泌表达的产酶曲线和所产酶的酶学性质,为今后漆酶基因的克隆开辟了新途径,为漆酶的实际应用奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

**1.1.1 酶和试剂**:限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq DNA 聚合酶、4 种 dNTP 和

One Step RT-PCR Kit 等均购自 TaKaRa 公司,TRIzol 试剂和 Superscript II 反转录酶购自 Invitrogen 公司, Oligotex mRNA Mini Kit 购自 Qiagen 公司, DNA 纯化试剂盒购自 Vitagen 公司, ABTS[2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)]购自上海 Sangon 公司,其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

**1.1.2 培养基**:LB 培养基配制见文献[6],YEPD、MD、BMGY、BMMY 等培养基配制见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

**1.1.3 菌株和质粒**:表 1 为所用菌株和质粒。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work		
Strains/Plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>SupE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> ,	From Stratagene
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>endA1</i> , <i>his4</i>	From Invitrogen
GS115 (pHBM557)		This work
pMD18-T	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>puc ori</i>	From TaKaRa
pHBM501	<i>glccFv</i> cloned in pMD18-T	This work
pHBM502	<i>lccFv</i> cloned in pMD18-T	This work
pHBM906	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>Kan<sup>r</sup></i> , <i>puc ori</i> , <i>P<sub>AOX1</sub></i> , <i>T<sub>AOX1</sub></i>	Stored in this lab
pHBM557	<i>lccFv</i> cloned in pHBM906	This work

1.2 金针菇菌丝体的培养、诱导和预处理

用接种环挑一环金针菇试管种接入盛有 25mL PDA 液体培养基的 250mL 三角瓶,置恒温摇床中,

基金项目:国家“863 计划”(2001AA214161, 2002AA227011)  
\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-27-88666349; E-mail: malixin9@hotmail.com  
作者简介:张银波(1974-),男,湖北应城人,助理研究员,硕士研究生,从事微生物基因工程方面的研究。E-mail: ybzhang04@yahoo.com  
收稿日期:2004-04-23,修回日期:2004-06-04  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

28℃, 240r/min 振荡培养约 4d, 菌丝体足量后加入 250 $\mu$ L 100mmol/L 2,5-二甲苯胺诱导漆酶基因的表达 24h 后收集菌体, 用 DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 配制的 PBS 缓冲液清洗 3 次, 滤干后迅速置于液氮中冻存 10min, 备抽总 RNA。

### 1.3 总 RNA 的抽提和 mRNA 的纯化

试验方法分别见 TRIzol 试剂和 Oligotex mRNA Mini Kit 的操作手册。

### 1.4 RACE、基因组步行和 RT-PCR

漆酶一般都含有 500 个左右的氨基酸残基, 且都含有用来指导其有效分泌的信号肽。同一来源的漆酶显示出较高的相似性, 而不同来源的漆酶其氨基酸序列的相似性并不高。但很重要的一点是, 这些漆酶在铜离子结合的组氨酸周围都有严格保守的氨基酸残基。Suresh 等<sup>[9]</sup>对 100 多个真菌漆酶的氨基酸序列进行比对分析后得到 4 个真菌漆酶的氨基酸指纹序列, 根据其中最为保守的氨基酸序列 HPF-HLHGH, 设计了简并引物 primer2。其余操作分别参照 SMART RACE cDNA Amplification Kit User Manual、Universal Genome Walker Kit User Manual 和 One Step RT-PCR Kit User Manual 进行。

扩增引物分别为: primer2 5'-CACCQ (G/C) TTC-CAC (C/T) TGCACGG-3' primerCDS III 5'-ATTCTAGG-GCCGAGCGCGCCGACATG-( $\Delta$ T)<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3' (N = A, G, C, T; N-1 = A, G, C); primerAPI 5'-GTAATACGACT-CACTATAGGGC-3'; primerAP2 5'-ACTATAGGGCCAC-GCGTGCT-3'; primer13 5'-GCGCGTCGTAAACAGGGC-ACAAG-3'; primer14 5'-CGCGCCAGACGGGGTTGC-3'; primer18 5'-GTCATGGTCAGATTCCAATCATTC-3'; primer20 5'-GGCCAGTCTACTGGTCCTTCGGCGC-3'。

### 1.5 DNA 操作

DNA 回收、消化、连接和转化参见相应试剂盒手册和文献 [6] 进行。毕赤酵母感受态细胞制备、转化参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行。

### 1.6 重组毕赤酵母表达载体 pHBM557 构建和鉴定

回收 RT-PCR 扩增约 1.6kb 的产物, 经 T4 DNA 聚合酶处理后与用 *Cpo* I 和 *Not* I 消化好的毕赤酵母表达载体 pHBM906 连接, 转化大肠杆菌 XL10-Gold, 得重组质粒命名为 pHBM557, 利用 PCR 方法鉴定重组子。

### 1.7 重组毕赤酵母在底物平板上的诱导表达

将 MD 平板上生长的毕赤酵母 GS115 转化子转接适量到 BMGY 平板上, 30℃ 培养 2d, 再分别转接适量菌落到 MM 加 0.2mmol/L ABTS 和 0.1mmol/L

CuSO<sub>4</sub> 底物平板上, 每 12h 添加适量甲醇进行诱导, 20℃ 培养, 观察其表达情况。

### 1.8 外源基因在毕赤酵母中的高密度诱导表达<sup>[7]</sup>

挑取待表达的重组毕赤酵母单菌落于 BMGY 液体培养基(按  $\leq 10\%$  装瓶), 28~30℃, 280~300r/min 摇床培养至对数期( $OD_{600}$  为 2~6)。转接 1mL 培养液至 100mL BMGY 液体培养基(按  $\leq 10\%$  装瓶), 28~30℃, 280~300r/min 摇床培养至对数中期( $OD_{600}$  为 20~30)。室温 4000r/min 离心 5min, 收集菌体, 去上清, 细胞沉淀全部转移至 100mL BMMY 液体培养基中, 25℃ 280~300r/min 摇床培养。每隔 12h 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 24h 取样 1mL 粗酶液分析表达水平。

### 1.9 蚀刻-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  $\beta$ -巯基乙醇, 蛋白样品不煮沸变性。电泳完毕后, 将蛋白质分子量标记切下单独用考马斯亮蓝染色, 蛋白胶则置于含有漆酶底物 ABTS 的磷酸缓冲液中反应显色。

### 1.10 漆酶酶活力单位的定义<sup>[8]</sup>

用 0.02mol/L 最适反应 pH 值的磷酸缓冲液制备 0.2mmol/L ABTS 溶液, 取 490 $\mu$ L 加入 10 $\mu$ L 粗酶液, 在最适反应温度反应 10min, 迅速转入冰水中终止反应。稀释成 2mL, 在 420nm 波长下快速测定其吸光值。以 1min 氧化 1 $\mu$ mol ABTS 的酶量作为 1 个酶活力单位(U)。 $OD_{420}$  值与酶活单位的换算公式如下: 酶活单位/mL 酶液(U/mL) =  $OD_{420}$  值  $\times 2000 \times 1000 \div 36000 \div 10 \div$  加入酶液体积 =  $OD_{420}$  值  $\div 1.8$ 。

## 2 结果

### 2.1 漆酶基因 *lccFv* 的克隆和序列分析

抽提经 2,5-二甲苯胺诱导培养的金针菇总 RNA, 甲醛琼脂糖变性胶电泳鉴定其质量(图 1), 符合要求后纯化其 mRNA 利用引物 primer2 和 CDS III

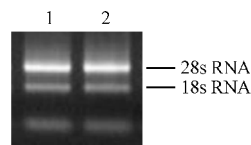


图 1 甲醛变性胶分析检测金针菇总 RNA 质量

Fig. 1 Analysing the quality of total RNA by formaldehyde denaturalization agarose gel

进行 3'RACE,结果得到约 0.5kb 的扩增产物,与预期结果相符,纯化后克隆到 pMD18-T 上,由上海博亚公司测序。测序结果经 NCBI 的 BLAST 比对正确后,设计两条引物 primer13 与 primer14 进行基因组步行得到其结构基因的 5'端 DNA 序列,结合经 3'RACE 所得 cDNA 的 3'端序列设计引物 primer18 和 primer20,以金针菇总 DNA 为模板进行 PCR 得到其完整的结构基因(命名为 *glccFv*)。利用 primer18、primer20 以金针菇总 RNA 为模板进行 RT-PCR,扩增到其对应的全长 cDNA(命名为 *lccFv*)。将结构基因和其对应的全长 cDNA 分别克隆到载体 pMD18-T 上(重组质粒分别命名为 pHBM501 和 pHBM502),由上海博亚公司测序验证。

经测序和 BLAST 比对分析表明该 cDNA 编码区序列全长为 1563bp,编码 21 个氨基酸残基组成的信号肽和 500 个氨基酸残基组成的成熟肽,属于多铜氧化酶家族,与该序列一致性最高的为 Schnee 等发表的漆酶基因 *lcc3-1*(GenBank 登录号为 AF176230),在氨基酸水平的一致性为 72%,相似性为 80%。该 cDNA 命名为 *lccFv*,其序列提交 GenBank,登录号为 AY450406。

质粒 pHBM501 所携带的漆酶结构基因的编码区序列全长为 2110bp,包括 9 个内含子,其长度从 56~69bp 不等,所有内含子序列都符合 5'-GT.....AG-3'规则。在起始密码子处有 Kozak 样序列 5'-GCGCCCATGG-3',分别在起始密码子上游 275 bp 和 64 bp 处有 CAAT 框和 TATA 框,终止密码子下游 204 bp 处有 polyA 加尾信号 ACTAAA。分析它所编码的氨基酸序列,发现其中含有 7 个 N-糖基化位点(Asn-Xaa-Thr/Ser),并且具备真菌漆酶的所有 4 个氨基酸指纹序列<sup>[9]</sup>。将该结构基因序列提交 GenBank,登录号为 AY485826。

## 2.2 重组毕赤酵母表达载体 pHBM557 的构建

回收 RT-PCR 扩增出的目的片段,在 12℃,有 dTTP 存在的情况下用 T4 DNA 聚合酶处理,纯化后与经 *Cpo* I 和 *Not* I 消化的毕赤酵母表达载体 pHBM906 连接,转化大肠杆菌 XL10-Gold,提取质粒,得到的重组质粒命名为 pHBM557。以 pHBM557 质粒 DNA 为模板,利用引物 primer18 和 primer20 进行 PCR 扩增,得到与正对照 pHBM502 质粒 DNA 作为模板结果一致的扩增产物,而以空载体 pHBM906 的质粒 DNA 为模板,利用相同引物则未扩增出相应的产物,由此可判断质粒 pHBM557 即为 *lccFv* 在毕赤酵母中的表达载体。

## 2.3 重组毕赤酵母的筛选

将质粒 pHBM557 用 *Sal* I 部分酶切,转化毕赤酵母 GS115。分别挑取 30~60 个转化子点接至 BMGY 培养基平板上,28℃ 培养 1~2d 后,转接至含有 ABTS-CuSO<sub>4</sub> 的 MM 培养基平板上,加适量甲醇诱导(每 12h 补加一次)48h 后,部分菌落周围有明显的墨绿色晕圈出现。于毕赤酵母转化平板上,分别挑取周围出现晕圈的单菌落,在 YPD 液体培养基中培养到适当浓度后,收集菌体,抽提总 DNA 作为模板,利用引物 primer18、primer20 进行 PCR 扩增,得到与正对照(pHBM502 质粒 DNA 作为模板)一致的扩增产物,说明 *lccFv* 基因已转入到受体菌。将重组菌株命名为 GS115(pHBM557)。

## 2.4 重组毕赤酵母的诱导表达

将 GS115(pHBM557)按高密度摇瓶方式在 20℃、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(pHBM906)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(pHBM557)在诱导的第 11 天产酶达最高值 0.1070U/mL。又将诱导所产酶的粗酶液经蚀刻-PAGE 分析表明有明显表达的具有漆酶活性的蛋白带(图 2)。

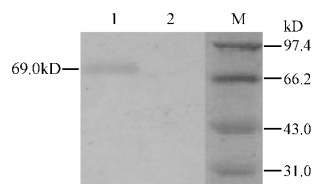


图 2 重组毕赤酵母 PAGE-ABTS 检测

Fig.2 Test of recombinant *P. pastoris* by PAGE-ABTS

1.LCCFv secreted by GS115(pHBM557); 2.No LCCFv secreted by GS115(pHBM906) M.Low range protein molecular weight marker.

## 2.5 重组漆酶的酶学性质分析

分别用 pH2.2、pH3.0、pH4.0、pH5.0、pH6.0、pH7.0 的磷酸缓冲液配制漆酶的 ABTS 底物,在 37℃ 反应温度下,测定重组毕赤酵母经诱导所产酶粗酶液的酶活力,测得最适反应 pH 值为 3.9。用 pH3.9 的磷酸缓冲液配制漆酶的 ABTS 反应底物,分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 测定酶活力,测得最适反应温度为 45℃。

取两种重组毕赤酵母经诱导产生的粗酶液,分成若干等份,并分别调节 pH 值为 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、10.6 在 4℃ 保存,同时保存自然 pH 值的粗酶液作参照,60h 后调节 pH 值到自

然 pH 值,在其最适反应条件下分别测定酶活,测得在 pH4.0~11.0 的范围内 GS115(pHBM557)所产酶的稳定性较好,酶活基本都在 90% 以上,其中在 pH9.0 的缓冲条件下所保存的酶液其酶活均超过自然 pH 值条件下所保存的酶液(图 3)。将 3 种重组毕赤酵母经诱导产生的粗酶液,在其最适反应温度 45℃ 温浴,每隔 30min 取样,在其最适反应条件下测定其酶活,测得 GS115(pHBM557)所产酶在其最适反应温度 45℃ 温浴 3h 时,相对酶活达到最高(160%),随后酶急剧慢下降到 88% 后又缓慢上升,在 330min 时出现小峰(124%)后又下降(图 4)。

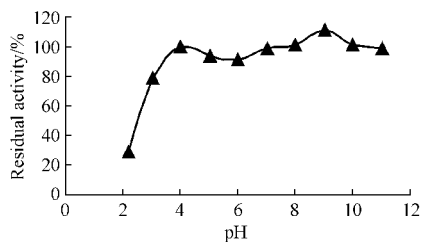


图 3 重组毕赤酵母所产酶的 pH 值稳定性

Fig.3 pH value stability of the enzyme produced by GS115(pHBM557)

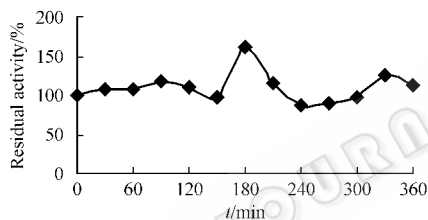


图 4 重组毕赤酵母所产酶的热稳定性

Fig.4 Thermostability of the enzyme produced by GS115(pHBM557)

### 3 讨论

相对于目前国际上所采用的漆酶基因的克隆方法而言,本研究所采用的方法具有较大优势。传统的漆酶基因克隆大多采用探针杂交来获得其全长的 cDNA(或结构基因)序列<sup>[10,11]</sup>,也可利用免疫学方法筛选 cDNA 表达文库获得全长的 cDNA 序列<sup>[12]</sup>,以上克隆方法都不同程度的存在操作复杂、工作强度大、工作周期更长和假阳性克隆概率高等缺点,而且同时对于不表达的基因则无能为力。另外,功能筛选也是一种有效的克隆方法,即构建基因组或者 cDNA 表达文库,然后利用漆酶特有的活性反应来进行功能筛选<sup>[13]</sup>,但该方法受到表达宿主的限制,如果该基因在所选定的宿主里面不能表达,则通过功能筛选根本得不到目的基因。如本研究中所克隆的漆酶基因 *lccFv* 和 *lccAa*,在啤酒酵母中无论是利

用自身信号肽 DNA 序列还是  $\alpha$ -因子信号肽 DNA 序列都不表达,因此该方法对于漆酶基因的筛选克隆来说不合适。

RACE 技术的运用则巧妙克服了上述几种克隆方法的弊端,直接将目标锁定在漆酶基因的 cDNA 序列上,省却了探针杂交、抗体免疫、文库筛选等复杂操作,具有简单快捷的优点。如 Ulrike 等<sup>[14]</sup>利用 RACE 技术从一种降解木质素的担子菌 *Pycnoporus cinnabarinus* 中克隆到了两个全新的漆酶基因;最近 Liu 等<sup>[15]</sup>又利用该技术从 *Fomes lignosus* 中克隆到一个全新的漆酶基因。可见,由于漆酶在氨基酸结构序列上具有特殊的保守性,RACE 技术正成为漆酶基因分离克隆中一种重要而有效的技术手段。但由于 RACE 技术是在 RNA 水平的分子操作,RNA 极易受到 RNase 的降解,而 Genome-Walking 技术则不然,是 RACE 技术的有益补充,本研究中将 Genome-Walking 技术成功应用于漆酶基因的克隆,在国内外尚未见报道。

就重组毕赤酵母 GS115(pHBM557)所产酶的酶学性质来看,pH 值对该酶的反应活性有很大影响。首先,该酶的反应 pH 值范围非常窄,在其最适反应 pH 值(pH3.9)上下移动一个单位会导致其反应活性的急剧下降,分别下降约 60% 和 50%,可见该酶对 pH 值高度敏感。另外,该酶的 pH 值稳定性很好,在 pH4.0~11 的范围内 4℃ 储存 60h 后仍保持 90% 以上的活性。另外从温度对该酶反应活性的影响来看,该酶的最适反应温度为 45℃,在 30~55℃ 的温度范围内,该酶的反应活性没有太大波动,相对活性都保持在 75% 以上。从热稳定性特性来看,该酶是一个热稳定性非常高的重组酶,在 45℃ 下温浴 360min 后其反应活性竟然丝毫未减,这种高度热稳定的特性非常适合于其在纸浆漂白、环境污染物的降解及生物检测等方面的应用。

本实验的研究结果表明与传统的漆酶基因克隆方法相比,RACE 结合基因组步行技术有效克服了其不足,并由此建立了漆酶基因及其它真核微生物基因克隆的技术平台。同时本研究所表达的重组漆酶具有良好的热稳定性和 pH 值稳定性,为漆酶的实际应用奠定了一定的基础。

### 参考文献

- [1] Bajpai P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol Prog*, 1999, 15: 147-157.

- [ 2 ] Bourbonnais R, Paice M G, Freiermuth B, *et al.* Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl Environ Microbiol*, 1997 **63** :4627 – 4632.
- [ 3 ] Ghindilis A. Direct electron transfer catalysed by enzymes : application for biosensor development. *Biochem Soc Trans*, 2000 **28** :84 – 89.
- [ 4 ] Johannes C, Majcherczyk A, Huttermann A. Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase mediator system. *J Biotechnol*, 1998 **61** :151 – 156.
- [ 5 ] Katz E, Filanovsky B, Willner I. A biofuel cell based on two miscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer functionalized electrodes. *New J Chem*, 1999 **23** :481 – 487.
- [ 6 ] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- [ 7 ] Li A, Crimmins D L, 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.
- [ 8 ] Brian S W, Robin L W. Radical-cations as Reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions : pulse radiolysis studies of 2, 2'-Azinobis( 3-ethylbenz-thiazoline-6- sulphate ). *J Chem Soc Perkin Trans*, II, 1982 **805** – 812.
- [ 9 ] Suresh Kumar S V, Prachant S Phale, Durani S, *et al.* Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003 **83** ( 4 ) :386 – 394.
- [ 10 ] Eggert C, LaFayette P R, Temp U, *et al.* Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Environ Microbiol*, 1998 **64** ( 5 ) :1766 – 1772.
- [ 11 ] Kim S, Leem Y, Kim K, *et al.* Cloning of an acidic laccase gene ( lac2 ) from *Coprinus congregatus* and its expression by external pH. *FEMS Microbiol Lett*, 2001 **195** ( 2 ) :151 – 156.
- [ 12 ] Perry C R, Smith M, Britnell C H, *et al.* Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J Gen Microbiol*, 1993 **139** ( Pt6 ) :1209 – 1218.
- [ 13 ] Gouka R J, van der Heiden M, Swarthoff T, *et al.* Cloning of a phenol oxidase gene from *Acremonium murorum* and its expression in *Aspergillus awamori*. *Appl Environ Microbiol*, 2001 **67** ( 6 ) :2610 – 2616.
- [ 14 ] Ulrike Temp, Uwe Zierold, Claudia Eggert. Cloning and characterization of a second laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pycnoporus cinnabarinus*. *Gene*, 1999 **236** :169 – 177.
- [ 15 ] Liu W, Chao Y, Liu S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the basidiomycete *Fomes lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003 **63** ( 2 ) :174 – 81.

## Cloning of A Laccase Gene from *Flammulina velutipes* and Study on Its Expression in *Pichia pastoris*

ZHANG Yin-Bo<sup>1 2</sup> JIANG Qiong<sup>1</sup> JIANG Mu-Lan<sup>2</sup> MA Li-Xin<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Molecular Microbiology Lab Hubei University, Hubei 430062, China)

(<sup>2</sup> Oil Crops Research Institute, CAAS, Hubei 430062, China)

**Abstract** : Laccase( EC1.10.3.2 ) can be used for enzymatic detoxification of lignocellulosic hydrolysates. By using molecular techniques such as RACE( rapid amplification of cDNA ends ) and Genome-Walking, a laccase gene and its corresponding full-length cDNA were cloned from *Flammulina velutipes* and designated as *glccFv* and *lccFv*. The sequences were submitted to GenBank, and the accession numbers obtained were AY485826 and AY450406, respectively. Analysis of amino acids sequence suggested that one laccase from *Polyporus ciliatus* possessed the highest homology with the protein encoded by *lccFv* showing for 72%. The ORF( open reading frame ) of *lccFv* was transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 through the *P. pastoris* expression vector pHBM906, which contains both the promoter and transcription terminator of the *AOX1* gene. The recombinant laccase LCCFv was detected from the engineering strain GS115 ( pHBM557 ) which was fermented with BMMY liquid medium and induced by 1.0%( V/V ) methanol at 20℃ with the highest expression level ( 0.1070 U/mL ). The optimal reaction temperature of LCCFv that secreted from *P. pastoris* GS115 ( pHBM557 ) was 45℃, the optimal reaction pH value was pH3.9 and the thermostability and pH stability were very well under the optimal conditions.

**Key words** : Laccase gene, RT-PCR, *Pichia pastoris*

Foundation item : Chinese National High Technology Research and Development ( 2001AA214161 ; 2002AA227011 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-27-88666349 ; E-mail : malixin9@hotmail.com

Received date : 04-23-2004