

阿魏酸诱导污叉丝孔菌漆酶活性提升

吴洁^{1#}, 李静^{1#}, 罗锋^{1,2*}, 常鹏^{1,2*}

1 西南大学 资源环境学院, 基因技术创新应用重庆市重点实验室, 重庆

2 浦洛通基因医学研究院有限公司, 重庆

吴洁, 李静, 罗锋, 常鹏. 阿魏酸诱导污叉丝孔菌漆酶活性提升[J]. 微生物学报, 2025, 65(9): 4088-4100.

WU Jie, LI Jing, LUO Feng, CHANG Peng. Ferulic acid enhances the laccase activity of *Dichomitus squalens*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 4088-4100.

摘要:【目的】探究阿魏酸对污叉丝孔菌漆酶活性的影响及其分子机制, 为微生物降解芳香族化合物提供理论依据。【方法】通过在合成培养基中添加不同浓度的阿魏酸, 观察其对污叉丝孔菌生长和漆酶活性的影响; 利用转录组和蛋白组技术分析阿魏酸诱导下漆酶的转录和蛋白表达水平变化; 通过 RNAi 技术敲降 *lcc3* 基因, 检测其对漆酶活性及降解多种芳香族化合物能力的影响; 利用自建的基于高斯荧光素酶和 Nano 荧光素酶的双荧光素酶系统鉴定 *lcc3* 基因的核心启动子区。【结果】适量添加阿魏酸可显著提高污叉丝孔菌的漆酶活性。转录组和蛋白组分析发现, *lcc3* 基因在阿魏酸诱导下转录水平和表达水平均显著上调。*lcc3* 基因敲降菌株的漆酶活性及降解多种芳香族化合物的活性均显著下降, 证实 *lcc3* 是污叉丝孔菌降解芳香族化合物相关的漆酶活性的关键基因。此外, 通过双荧光素酶系统成功鉴定出 *lcc3* 基因的核心启动子区。【结论】本研究揭示了阿魏酸对污叉丝孔菌漆酶活性的诱导作用及其分子机制, 证明 *lcc3* 基因是阿魏酸诱导的漆酶活性及降解芳香族化合物的关键基因。鉴定 *lcc3* 基因核心启动子区为进一步地基因表达调控研究提供了基础, 并为微生物漆酶降解芳香族化合物的应用提供了理论支持。

关键词: 污叉丝孔菌; 阿魏酸; 漆酶; *lcc3*; RNAi; 双荧光素酶

资助项目: 国家自然科学基金(32070105, 32100092); 重庆市自然科学基金(cstc2021jcyj-msxmX0392)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070105, 32100092) and the Chongqing Natural Science Foundation (cstc2021jcyj-msxmX0392).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: CHANG Peng, chang1986@swu.edu.cn; LUO Feng, vanlott@hotmail.com

Received: 2025-02-28; Accepted: 2025-04-03; Published online: 2025-06-13

Ferulic acid enhances the laccase activity of *Dichomitus squalens*

WU Jie^{1#}, LI Jing^{1#}, LUO Feng^{1,2*}, CHANG Peng^{1,2*}

1 Chongqing Key Laboratory for Innovative Application of Gene Technology, School of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing, China

2 PUROTON Gene Medical Institute Co., Ltd., Chongqing, China

Abstract: [Objective] To study the effect of ferulic acid on the laccase activity of *Dichomitus squalens* and its molecular mechanism, providing a theoretical basis for microbial degradation of aromatic compounds. [Methods] Ferulic acid was added to the synthetic medium at different concentrations to investigate its effects on the growth of *D. squalens* and laccase activity. Transcriptomic and proteomic analyses were performed to examine the changes in laccase transcription and protein expression levels induced by ferulic acid. The *lcc3* gene was knocked down using RNAi technology, and the impact on laccase activity and the ability to degrade various aromatic compounds was assessed. A self-constructed dual-luciferase system based on *Gaussia* luciferase and Nano luciferase was employed to identify the core promoter region of the *lcc3* gene. [Results] An appropriate concentration of ferulic acid can significantly enhance laccase activity in *D. squalens*. Transcriptomic and proteomic analyses revealed that the transcription and expression levels of the *lcc3* gene were markedly up-regulated under ferulic acid induction. In the *lcc3*-gene-knocked-down strain, both laccase activity and the ability to degrade various aromatic compounds decreased significantly, confirming that *lcc3* is a key gene for laccase-related activities in degrading aromatic compounds in *D. squalens*. Moreover, the dual-luciferase system successfully identified the core promoter region of the *lcc3* gene. [Conclusion] This study first revealed that ferulic acid can induce *D. squalens* laccase activity and clarified the molecular mechanism. It was also proved that *lcc3* is a key gene for ferulic acid-induced laccase activity and degradation of aromatic compounds in *D. squalens*. Identifying the core promoter region of *lcc3* lays a foundation for gene expression regulation research, and these findings offer theoretical support for using microbial laccases to degrade aromatic compounds.

Keywords: *Dichomitus squalens*; ferulic acid; laccase; *lcc3*; RNAi; dual luciferases

在环境过程和工业应用的广阔领域中，芳香族化合物的降解已成为备受关注的议题。深入研究表明，利用木质素降解型白腐菌来降解具有4个或更多缩合芳香环的多环芳烃展现出了极为高效的性能^[1]。木质纤维素，这一复杂有机物质广泛存在于木材和植物生物质之中。其中，木质素因其极为复杂的化学结构而难以降解，无疑成为了木质纤维素生物质转化过程中最具挑战性的组分之一。污叉丝孔菌

(*Dichomitus squalens*)作为一种白腐菌，在木质素降解过程中发挥着重要的生态作用。其基因组中蕴含着多个编码木质素降解酶和纤维素酶的基因^[2]。这些酶系的协同作用赋予了该菌在自然生态系统中强大的分解能力，能够有效促进森林生态系统的物质循环和能量流动。因此，污叉丝孔菌在木质素的生物预处理、生物转化和生物降解方面具有巨大潜力，成为开发新型木质素转化生物技术工具的有力候选者。系统

研究污叉丝孔菌木质素降解酶和纤维素酶的特性,深入探究其表达调控机制,对于构建污叉丝孔菌代谢工程菌株以及优化工业生产过程具有极为重要的意义。

白腐真菌漆酶在木质素降解和芳香族环境污染物的过程中起着至关重要的作用。例如偶氮染料、苯并芘、黄曲霉毒素、有机磷化合物、卤代农药和多环芳烃^[3-4]。此外,漆酶可以由真菌在木质素或其他有机污染物存在的条件下诱导产生。例如,向培养基中添加木质素可以增加真菌产生漆酶的量,从而增加木质素和污染物的降解^[4]。特定的芳香族化合物可以诱发污叉丝孔菌的不同转录响应^[5]。

在白腐真菌中,芳香族化合物的代谢受到多种转录因子和启动子元件的调控。研究发现某些基因的启动子区域存在激活蛋白 AP-2 识别序列,这些序列可能参与调控木质素降解相关酶(如漆酶、过氧化物酶)的表达^[6]。锌指结构域转录因子^[7](如 TH8421 和 TH4300)和热休克因子^[8](如 *ThhspA1*)被发现能够协同调控漆酶和 P450 单加氧酶的表达,从而参与芳香族化合物的代谢。因此白腐真菌中漆酶和其他木质素相关芳香族化合物降解酶编码基因的各种转录因子和启动子元件构成了一个复杂的调控网络,需要进一步研究以阐明这些基因表达调控背后的分子机制。

阿魏酸是一种广泛存在的酚类化合物,存在于种子和叶片中,既以游离形式存在,也与植物细胞壁中的多糖、碳水化合物、糖蛋白和木质素结合^[9]。阿魏酸以及几种其他酚类化合物,如对香豆酸、对羟基苯甲酸、香草醛和香草酸,已经可以通过化学氧化或热解从木质素中产生^[10]。研究表明,阿魏酸可以调节蛋白酶体的功能,可能导致真菌中漆酶的积累,特别是白腐菌如 *Trametes versicolor* 和 *Phlebia radiata*^[11]。然而,阿魏酸诱导漆酶表达的相关分子机制尚未阐明。

启动子与转录因子的相互作用是调控基因

表达的主要机制。基于萤火虫萤光素酶和海肾萤光素酶的双萤光素酶系统常用于研究启动子活性^[12]。然而,这 2 种萤光素酶是非分泌型的,需要提取总蛋白进行检测。以高斯萤光素酶(*Gaussia luciferase*)和 NanoLuc 为代表的分泌型萤光素酶则因其高灵敏度、高信号强度、低背景信号以及无需裂解细胞的特性而越来越受欢迎^[13]。此外,高斯萤光素酶和 NanoLuc 分子量较小,在丝状真菌中表达更加容易,其分泌特性也使得样品检测更加简便快捷。因此,在真菌中利用高斯萤光素酶和 NanoLuc 进行启动子分析是一种极具潜力的方法。

虽然已有研究证实白腐真菌对木质素衍生芳香族化合物的代谢响应,但目前仍存在一个关键科学问题亟待阐明,即芳香族化合物如何诱导了特定漆酶同工酶的特异性响应表达。因此,本研究通过建立污叉丝孔菌 DSM9615 的阿魏酸应激模型(1.5 mmol/L),整合转录组、蛋白组数据与漆酶降解活性检测,鉴定了阿魏酸作用下诱导高表达的漆酶基因 *lcc3*,并进一步利用 RNA 干扰技术(RNAi)证实了其在污叉丝孔菌降解芳香族化合物的漆酶活性中的贡献;最后借助双萤光素酶报告系统鉴定了 *lcc3* 基因在阿魏酸诱导时的核心启动子区,以期为污叉丝孔菌降解芳香族化合物的特定漆酶表达活性改造或酶的定向进化提供理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒构建

污叉丝孔菌(*D. squalens*)DSM 9615,购自 DSMZ 公司。基因克隆所用大肠杆菌 Top10 感受态购自北京博迈德基因技术有限公司。

本研究用到的质粒见表 1。所有的质粒构建均采用 2×Seamless Cloning Mix (北京博迈德生物技术有限公司)。

表1 本研究使用的主要质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmid	Feature	Usage	Source
pDsV53	P_{ijf1} - <i>DsIcc3</i> CDS partial- P_{tub} , G418R	<i>lcc3</i> RNAi	Lab stock
pCDS8b	$P_{lcc3p(-1--1909)}$ -NLuc- T_{gpd} , P_{gpd} -GLuc-G418R- T_{camv}	<i>lcc3</i> promoter analysis	This study
pCDS8b1	$P_{lcc3p(-1--1339)}$ -NLuc- T_{gpd} , P_{gpd} -GLuc-G418R- T_{camv}		
pCDS8b2	$P_{lcc3p(-1--1101)}$ -NLuc- T_{gpd} , P_{gpd} -GLuc-G418R- T_{camv}		
pCDS8b3	$P_{lcc3p(-1--539)}$ -NLuc- T_{gpd} , P_{gpd} -GLuc-G418R- T_{camv}		
pCDS8b4	$P_{lcc3p(-1--342)}$ -NLuc- T_{gpd} , P_{gpd} -GLuc-G418R- T_{camv}		
pCDS8b5	$P_{lcc3p(-1--273)}$ -NLuc- T_{gpd} , P_{gpd} -GLuc-G418R- T_{camv}		

1.2 培养基

污叉丝孔菌常规培养用 YMA 和 YMB 培养基(g/L): 酵母提取物 3.00, 麦芽提取物 3.00, 右旋葡萄糖 10.00, 蛋白胨 5.00, 琼脂 15.00 (YMB 液体培养基不需要加), 加水定容至 1.00 L。灭菌条件为 115 °C、15 min, 室温储存。

污叉丝孔菌诱导培养使用 SC 合成培养基: 右旋葡萄糖 10.00 g, L-天冬酰胺 1.50 g, 维生素 B1 0.12 mg, KH_2PO_4 0.46 g, K_2HPO_4 1.00 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50 g, 1 000×Trace elements 2 μ L, 琼脂 20.00 g, 调整 pH 至 6.0, 加水定容至 1.00 L。灭菌条件为 115 °C、15 min, 室温储存。

1 000×Trace elements (mg/L): $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 5.00, HBO_3 0.06, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.04, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.20, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.00, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.10, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.40, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ 1.20, 加水定容至 1.00 L。灭菌条件为 115 °C、15 min, 室温储存。

大肠杆菌培养使用 LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.00, 酵母提取物 5.00, 氯化钠 10.00, 琼脂 15.00 (液体培养基不需要加), 加水定容至 1.00 L。灭菌条件为 121 °C、15 min, 室温储存。

1.3 主要试剂

阿魏酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; G418 购自北京酷来博科技有限公司; 氟苄青霉素、硫酸卡那霉素、氯霉素、利福平等

抗生素以及右旋葡萄糖、酵母提取物、麦芽提取物、胰蛋白胨、蛋白胨、琼脂糖、L-天冬酰胺、维生素 B1、DMSO、EDTA、ABTS、醋酸钠、4-羟基肉桂酸、香草酸及无机盐等均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; FastRNA™ Pro Red Kit 购自 MP Biomedicals 公司; GoScript™ Reverse Transcription Mix、Oligo(dT) 反转录试剂盒、*GoTaq*® qPCR Master Mix 试剂盒和 Nano-Glo® Luciferase 检测试剂盒均购自 Promega 公司; 2×Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 高斯萤光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 多功能 DNA 纯化回收试剂盒、高纯度质粒小量快速提取试剂盒、DNA marker 等均购自北京博迈德基因技术有限公司。

1.4 阿魏酸诱导培养

将冻存管中的野生型菌丝接种到 YMA 培养基上, 28 °C 活化 5 d, 再将最外圈新鲜的污叉丝孔菌接种至含终浓度分别为 0.0、1.0、1.5、2.0 和 2.5 mmol/L 阿魏酸的 SC 合成培养基(预铺玻璃纸)上进行诱导培养。以未添加阿魏酸的 SC 合成培养基作为对照, 每组各有 3 个生物学重复, 28 °C 静置培养 5 d。

1.5 漆酶活性检测

菌丝诱导培养 5 d 后取整块菌丝浸泡于 1 mL 醋酸缓冲液(pH 4.5)中, 4 °C、120×g 振荡

培养 4 h, 然后于 4 °C、12 000×g 离心 10 min, 取上清酶液通过 ABTS 法^[14]测定漆酶活性。在室温条件下, 取 2.4 mL 的醋酸钠缓冲液(pH 4.5)与 0.3 mL 的上清酶液混合得到粗酶液。测定漆酶活性时, 取 0.3 mL 5.0 mmol/L ABTS 溶液与粗酶液充分混合后, 使用紫外分光光度计在波长 420 nm 测定 1 min 之内 OD_{420} 值的变化。漆酶活力计算方式见公式(1)。

$$\text{酶活力(U)} = \frac{10^7 \times (A_1 - A_0)}{\varepsilon \times \Delta t} \quad (1)$$

式中: ε 为吸光系数 36 000, A_0 、 A_1 为测量起止时刻的吸光度, Δt 为测量的时间范围。

1.6 转录组和蛋白组

在铺有玻璃纸的未加阿魏酸的 SC 合成培养基(60 mm 培养皿)和含有 1.5 mmol/L 阿魏酸的平板上分别接种一个直径 5 mm 的污叉丝孔菌菌块, 每组各有 3 个生物学重复, 28 °C 培养 5 d 后刮取玻璃纸上的菌丝(约 100 mg)放入 1.5 mL 的无 RNase 离心管中, 液氮速冻 30 min 后, -80 °C 保存, 用于总 RNA 提取和转录组送样。刮取玻璃纸上的菌丝(约为 100 mg)放入 50 mL 的离心管中, 用 10 mL PBS 溶液洗涤 3 次, 转移至 1.5 mL 的无 RNase 离心管中, 液氮速冻 5 min 以上, -80 °C 保存用于蛋白组送样。转录组和蛋白组均由上海美吉生物医药科技有限公司完成检测和分析。转录组和蛋白组数据已经上传至国家微生物科学数据中心(<http://nmdc.cn>), 编号分别为 NMDCM0000870、NMDCM0000871。

1.7 *lcc3*-RNAi 菌株的构建

以污叉丝孔菌 cDNA 为 PCR 模板, 扩增 *lcc3* 基因 CDS 区的 19–321 区域(303 bp), 然后在其上游插入污叉丝孔菌组成型 β -actin 基因启动子(559 bp), 在其下游插入反向的组成型 *tif1* 基因启动子, 形成 2 个启动子反向控制同一个目标基因部分 cDNA 序列的 RNAi 结构, 然后插入带有 G418 抗性基因表达盒的质粒骨架, 得到 *lcc3*-RNAi 质粒 pDsV53。然后通过根癌农杆菌介导转化污叉丝孔菌, 通过 G418 筛选转化子

并进行基因组的 PCR 鉴定。质粒序列见附件信息已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDCX0001782。

1.8 实时荧光定量 PCR

使用 FastRNATM Pro Red Kit 提取未诱导的野生型菌丝和添加 1.5 mmol/L 阿魏酸诱导的菌丝总 RNA, 通过微量分光光度计检测 RNA 浓度和纯度。使用 GoScriptTM Reverse Transcription Mix、Oligo(dT)试剂盒将 2 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA, 置于 -80 °C 保存。使用 *GoTaq*[®] qPCR Master Mix, 配制 RT-qPCR 反应体系, 上机运行后采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相应漆酶基因的 mRNA 的相对表达量。以 *gpd* 基因作为内参基因, 实验所用特异性引物详见表 2。引物设计使用的软件为 IDT 的 PrimerQuestTM Tool。

1.9 芳香族化合物的漆酶降解

将 *lcc3* 基因敲降菌株(*lcc3*-RNAi)和野生型菌株(WT)分别接种在 YMA 培养基上, 28 °C 静置培养 5 d。分别取最外圈新鲜菌块接种至含终浓度为 1.5 mmol/L 阿魏酸的 SC 合成培养基平板(铺有玻璃纸)上, 以不添加阿魏酸的 SC 合成培

表2 实时定量PCR所使用的引物

Table 2 Primers used for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequences (5'→3')
<i>lcc2</i>	F: ACCACAGTCATCTTTCCACG R: TGAGGGTAATCACGGTCGAG
<i>lcc3</i>	F: ATGTCGTCGACCAGTTAACCA R: GGTACCAGTAGGTGCCAGAC
<i>lcc4</i>	F: CATTCTCTCTGACGGCTACTC R: TCGATGACGTTGAGTTGGAAG
<i>lcc5</i>	F: AGCTCAATGTCATCGACCAG R: TCTGCCAGTTTGTACCATG
<i>lcc7</i>	F: CTTGTACGACTTCCATGTCCC R: CCGTCACAATACTGGGTAGATAG
<i>lcc10</i>	F: CAAACAAGGACATTTCCGCC R: AGCATGGTCTCGTTCTCAAG
<i>lcc11</i>	F: ACTGCGACCAGTATCCATTG R: TGGTCAGGGACGTTGAAATTA
<i>gpd</i>	F: ACCCTGCCAACATCAAGTG R: GGGCGGAAATGACTACCTTC

培养基平板作为对照, 每组各有 3 个生物学重复, 28 °C 静置培养 5 d。取整块菌丝浸泡于 1.5 mL 醋酸缓冲液(pH 4.5)中, 在 4 °C 条件下振荡培养 4 h, 4 °C、12 000×g 离心 10 min 后取上清漆酶酶液通过 ABTS 法测定漆酶活性并将漆酶酶液置于 4 °C 保存。

用蒸馏水配制 50.0 mg/L 中性红(neutral red)、100.0 mg/L 甲基橙(methyl orange)和 100.0 mg/L 苋菜红(amaranth); 用 40% 的 DMSO 配制 20.0 mmol/L 的色氨酸(L-tryptophan)、香草酸(vanillic acid)和 4-羟基肉桂酸(*trans*-4-hydroxycinnamic acid)。将配制好的芳香族化合物溶液在波长为 200–600 nm 的范围内进行全波长扫描, 确定各溶液的最大吸收波长。

在 1.5 mL 降解反应体系中加入 5 μL 5.0 mmol/L ABTS、750 μL 粗漆酶酶液, 再分别加入 750 μL 的溶液(50.0 mg/L 中性红、100.0 mg/L 甲基橙、100.0 mg/L 苋菜红、20.0 mmol/L 色氨酸、香草酸和 4-羟基肉桂酸)。以水代替粗酶液作为对照组, 每组各有 3 个生物学重复。将反应体系混合后在 40 °C 水浴中进行降解反应。每个反应设置 3 个重复。分别在 12、24、36、48 h 这 4 个时间点定时取样, 测定各芳香族化合物在其最大吸收波长处的吸光度。芳香族化合物降解率计算如公式(2)所示。

$$\text{降解率} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_1 为对照组的吸光度, A_2 为实验组的吸光度。

1.10 *lcc3* 基因启动子活性分析

通过污叉丝孔菌农杆菌介导转化法^[15]获得 *lcc3* 启动子不同截短体的转化子。将所有转化子接种到含有 10 μg/mL G418 的 6 cm YMA 平板(铺有玻璃纸)上, 28 °C 培养 3–5 d 后取整块玻璃纸上的菌丝于 1.5 mL 的醋酸钠缓冲液中, 4 °C、30 r/min 条件下振荡培养 4 h, 4 °C、12 000×g 离心 10 min 后取上清。分别使用 Nano-Glo[®] Luciferase 检测试剂盒和高斯荧光素酶报告基因检测试剂

盒测量相同体积上清液的荧光强度。

2 结果与分析

2.1 阿魏酸可有效诱导污叉丝孔菌漆酶活性升高

为了探究固体培养条件下阿魏酸对污叉丝孔菌漆酶的诱导作用, 开展了平板诱导实验。将污叉丝孔菌菌丝接种于含有不同浓度阿魏酸(0.0、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L)的 SC 合成培养基平板(铺有玻璃纸)上, 培养 5 d 后观察菌丝生长情况(图 1A)。结果显示, 随着阿魏酸浓度的增加菌丝生长受到显著抑制。进一步检测菌丝的总漆酶活性(图 1B), 发现 1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L 阿魏酸处理显著提高了漆酶活性, 而过高浓度的阿魏酸(2.0 mmol/L 和 2.5 mmol/L)则降低了这种诱导效果。这表明阿魏酸在一定浓度范围内对漆酶活性具有促进作用。综合考虑菌丝生长和漆酶活性, 选择 1.5 mmol/L 阿魏酸用于后续研究。

2.2 污叉丝孔菌 *lcc3* 基因在阿魏酸诱导时表达显著上调

污叉丝孔菌中的漆酶家族包含 12 个同工酶基因。漆酶活性的提升可能源于酶的单位活性增加, 或漆酶基因表达水平的上升。先前的研究表明, 芳香族化合物诱导漆酶活性上升是由于漆酶基因表达水平的提高, 且不同的化合物可能导致不同的漆酶基因响应^[5]。为了确定响应阿魏酸诱导的具体漆酶基因, 开展了固体培养条件下阿魏酸诱导菌丝与未诱导菌丝的比较转录组学和比较蛋白组学研究。

如表 3 所示, 比较转录组学分析表明, 阿魏酸诱导使漆酶基因 *lcc1*、*lcc3*、*lcc5*、*lcc7*、*lcc8*、*lcc9*、*lcc10*、*lcc11* 和 *lcc12* 的表达水平上升, 而 *lcc2*、*lcc4* 和 *lcc6* 的表达水平下降。选取转录水平变化显著的漆酶基因 *lcc2*、*lcc3*、*lcc4*、*lcc7*、*lcc10* 和 *lcc11*, 通过 RT-qPCR 对其转录水平进行验证。*lcc2* 和 *lcc11* 未检测到明显

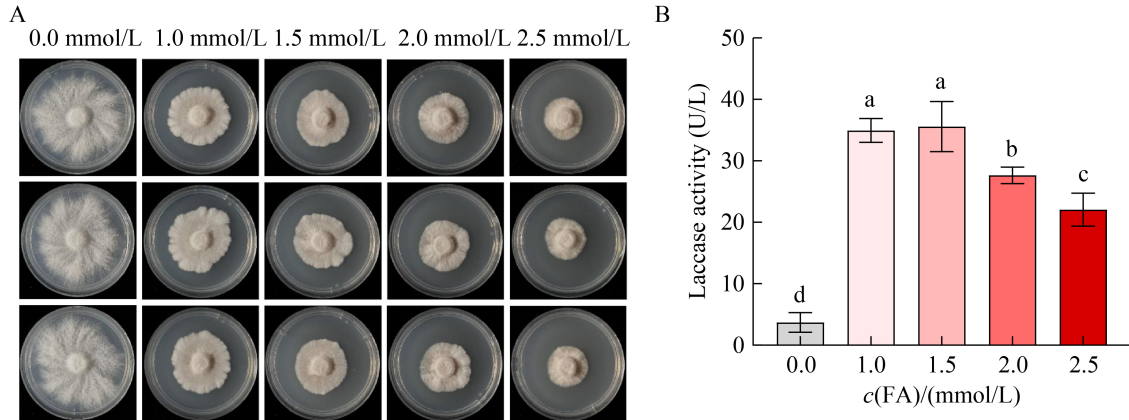


图1 阿魏酸对污叉丝孔菌菌丝生长和胞外漆酶产量的影响。A: 不同浓度(0.0、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L)阿魏酸对污叉丝孔菌菌丝生长的影响; B: 不同浓度(0.0、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L)阿魏酸对污叉丝孔菌胞外漆酶产量的影响。菌丝在含有不同浓度(0.0、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L)的阿魏酸且覆盖玻璃纸的SC合成培养基平板上培养5 d后进行拍照和胞外漆酶活性测定。a、b、c、d表示不同阿魏酸浓度组之间在统计学上存在显著差异($P<0.05$)。采用ANOVA单因素方差分析进行数据分析。

Figure 1 Effects of ferulic acid on mycelial growth and extracellular laccase production in *Dichomitus squalens*. A: Mycelial growth of *D. squalens* under varying ferulic acid concentrations (0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L); B: Extracellular laccase production by *D. squalens* under the same ferulic acid concentrations. Mycelia were cultured on cellophane-overlaid SC synthetic medium plates supplemented with 0.0–2.5 mmol/L ferulic acid for 5 days, followed by photographic documentation and extracellular laccase activity assay. a, b, c, d indicate significant differences among different ferulic acid concentration groups statistically ($P<0.05$). Data were analyzed using one-way ANOVA.

表3 转录组和蛋白质组研究揭示阿魏酸诱导下差异表达的漆酶基因

Table 3 Differentially expressed laccase genes under ferulic acid induction revealed by both transcriptomic and proteomic study

Transcriptome						Proteome			
Gene ID	Gene	FA-tpm	CK-tpm	FA/CK	Regulate	FA	CK	FA/CK	Regulate
177001	<i>lcc1</i>	14.41	13.28	1.09	Up	239.84	0	2454	Up
142773	<i>lcc2</i>	2.38	4.05	0.59	Down	ND	ND	ND	ND
176907	<i>lcc3</i>	20.82	13.47	1.55	Up	12 685.80	1 525.23	8.32	Up
201365	<i>lcc4</i>	19.79	29.85	0.66	Down	11 767.24	9.5876	1227	Up
169869	<i>lcc5</i>	8.08	7.76	1.04	Up	ND	ND	ND	ND
180464	<i>lcc6</i>	4.81	5.45	0.88	Down	ND	ND	ND	ND
179829	<i>lcc7</i>	24.56	10.09	2.44	Up	480.18	186.87	2.57	Up
67925	<i>lcc8</i>	15.13	12.85	1.18	Up	757.44	1 682.96	0.45	Down
105748	<i>lcc9</i>	15.08	13.15	1.15	Up	ND	ND	ND	ND
173305	<i>lcc10</i>	16.86	9.81	1.72	Up	ND	ND	ND	ND
110823	<i>lcc11</i>	10.87	5.58	1.95	Up	ND	ND	ND	ND
62489	<i>lcc12</i>	4.02	3.13	1.29	Up	ND	ND	ND	ND

FA: The ferulic acid induction group (Sample names DsFA_1/2/3/4 in the transcriptome and DsFA_5/6/7/8 in the proteome); tpm: Transcripts per million; CK: The control group without ferulic acid (Sample names DsCK_1/2/3/4 in the transcriptome and DsCK_5/6/7/8 in the proteome). ND: Not detected.

的转录水平变化, 与转录组数据不符。 *lcc3*、*lcc7* 和 *lcc10* 的转录水平在阿魏酸诱导下显著上升, 与转录组数据一致(编号为 NMDCX0001782)。 *lcc4* 的转录水平在阿魏酸诱导下显著上升, 与转录组数据相反。

蛋白组学分析仅检测到 5 个漆酶蛋白 LCC1、LCC3、LCC4、LCC7 和 LCC8 (表 3)。其中, LCC1、LCC3、LCC4 和 LCC7 的蛋白水平在阿魏酸诱导下显著上升, 但 LCC1 和 LCC7 的蛋白水平远低于 LCC3 和 LCC4。LCC8 蛋白水平在阿魏酸诱导下显著下降, 与转录组数据相反。上述结果表明, *lcc3* 和 *lcc4* 基因可能是响应阿魏酸诱导的主要漆酶基因。鉴于 *lcc3* 基

因的转录水平和蛋白水平变化的一致性, 选择 *lcc3* 基因作为下一步的研究对象。

为了进一步探究 *lcc3* 基因在阿魏酸诱导的漆酶活性中的作用, 构建了 *lcc3* 基因的 RNAi 菌株, 并检测了其在阿魏酸诱导后的漆酶活性。如图 2A 所示, 当 *lcc3* 基因被敲降后, 阿魏酸不能诱导菌丝的漆酶活性上升。为了排除其他漆酶基因同时被敲降的可能性, 选择了在阿魏酸诱导时表达水平较高且显著上升的 *lcc3*、*lcc4*、*lcc7* 和 *lcc10* 作为靶标基因, 在 *lcc3*-RNAi 菌株中检测了这 4 个基因的转录水平。结果表明, 在 *lcc3*-RNAi 菌株中即使在阿魏酸诱导下, *lcc3* 基因的转录水平也未

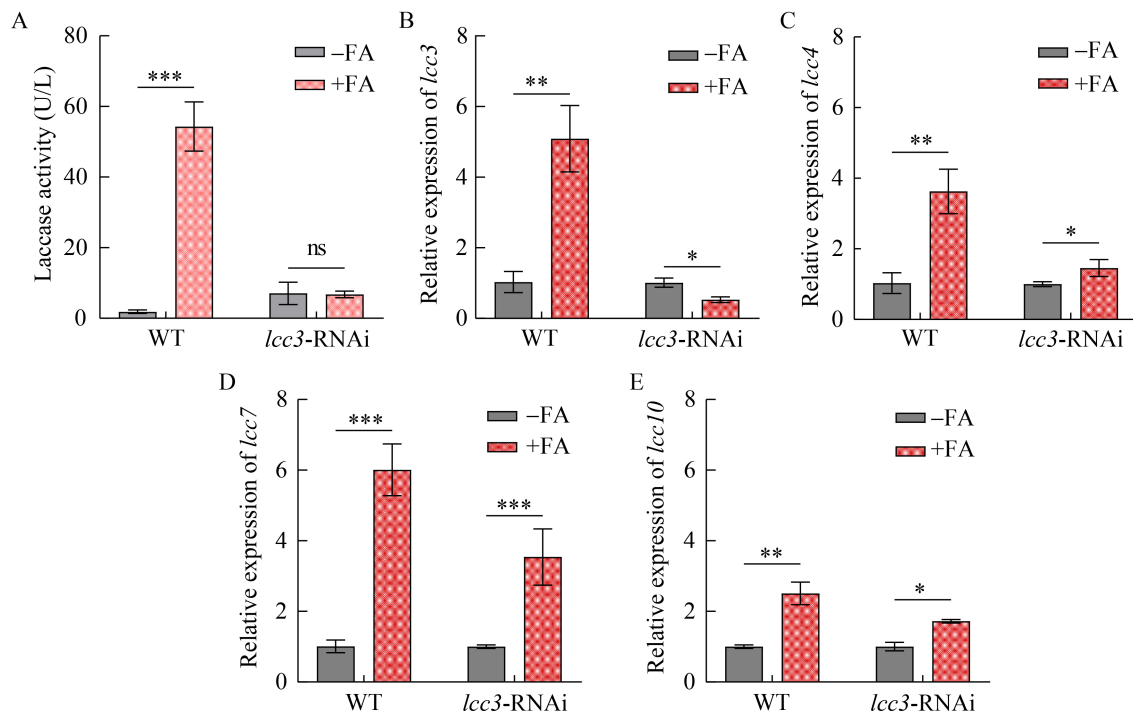


图2 *lcc3*基因敲降菌株中*lcc3*基因表达下调导致漆酶活性降低。A: 野生型(WT)和*lcc3*-RNAi菌株中的总漆酶活性; B-E: 通过RT-qPCR对*lcc3* (B)、*lcc4* (C)、*lcc7* (D)和*lcc10* (E)的mRNA水平进行定量, 转录水平以*gpd*参考基因为标准进行归一化。

Figure 2 Down-regulation of *lcc3* gene expression in the *lcc3* knockdown strain resulted in decreased laccase activity. A: Total laccase activities were measured in the wild-type (WT) and *lcc3*-RNAi strains; B-E: The mRNA levels of *lcc3* (B), *lcc4* (C), *lcc7* (D), and *lcc10* (E) were quantified by RT-qPCR, with transcription levels normalized to the *gpd* reference gene. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA and is indicated as follows: ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

显著上升(图 2B), 而 *lcc4*、*lcc7* 和 *lcc10* 的转录水平在阿魏酸诱导下仍然显著上升(图 2C–2E)。这些结果表明, *lcc3* 基因是阿魏酸诱导的漆酶活性的主要贡献者。

2.3 *lcc3* 是污叉丝孔菌漆酶降解芳香族化合物的关键基因

进一步研究了 *lcc3* 基因沉默对污叉丝孔菌降解芳香族化合物能力的影响。在 48 h 内, 测试了野生型菌株和 *lcc3*-RNAi 菌株在阿魏酸诱导和未诱导条件下产生的 4 种漆酶液对 6 种芳香族化合物的降解效果。所有 6 种芳香族化合物的化学结构和最大吸收波长信息存储在微生物科学数据中心(编号为 NMDCX0001782)。

对于色氨酸(Trp, 图 3A), 未诱导的野生型

菌株(WT-FA)组在 48 h 内的降解率为(2.67±0.68)%, 阿魏酸诱导的野生型菌株(WT+FA)组的降解率为(7.14±1.3)%, 而未诱导的 *lcc3*-RNAi 菌株(*lcc3*-RNAi-FA)组和阿魏酸诱导的 *lcc3*-RNAi 菌株(*lcc3*-RNAi+FA)组的降解率分别为(2.43±0.98)%和(3.46±0.49)%。

对于香草酸(VA, 图 3B), WT-FA 组的降解率为(2.10±0.38)%, WT+FA 组的降解率为(13.00±1.31)%, *lcc3*-RNAi-FA 组和 *lcc3*-RNAi+FA 组的降解率分别为(1.89±0.63)%和(3.56±0.73)%。

对于 4-羟基肉桂酸(CA, 图 3C), WT-FA 组的降解率为(3.28±0.42)%, WT+FA 组的降解率为(28.28±1.18)%, *lcc3*-RNAi-FA 组和 *lcc3*-RNAi+FA 组的降解率分别为(3.07±0.76)%和

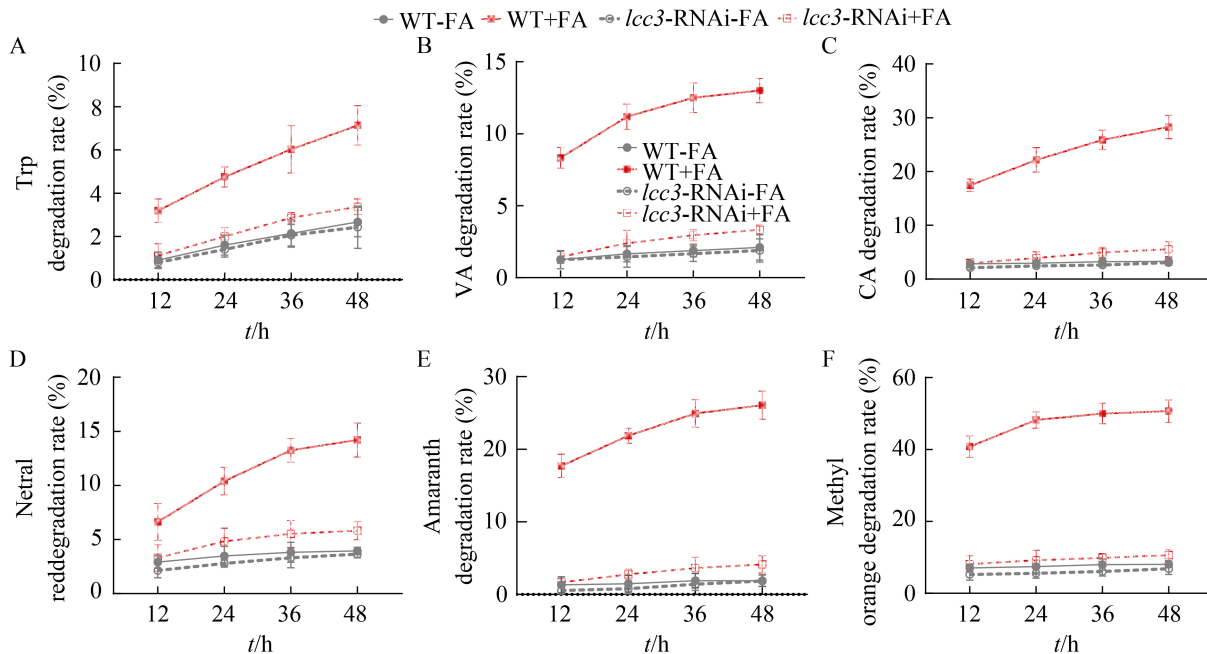


图3 阿魏酸诱导对污叉丝孔菌粗漆酶溶液降解多种芳香族化合物的影响。粗漆酶溶液由 *lcc3*-RNAi 和野生型(WT)菌株在有或无阿魏酸诱导(+/-FA)的条件下制备。A: L-色氨酸(Trp); B: 香草酸(VA); C: 反式-4-羟基肉桂酸(CA); D: 中性红; E: 苋菜红; F: 甲基橙。

Figure 3 Effect of ferulic acid induction on the degradation of various aromatic compounds by crude laccase solutions from *Dichomitus squalens*. Crude laccase solutions were prepared from the *lcc3*-RNAi and the wild-type (WT) strain under conditions with or without ferulic acid induction (+/-FA). A: L-tryptophan (Trp); B: Vanillic acid (VA); C: *Trans*-4-hydroxycinnamic acid (CA); D: Neutral red; E: Amaranth; F: Methyl orange.

(5.15±0.76)%。

对于中性红(neutral red, 图 3D), WT-FA 组的降解率为(3.94±0.34)%, WT+FA 组的降解率为(14.20±1.57)%, *lcc3*-RNAi-FA 组和 *lcc3*-RNAi+FA 组的降解率分别为(3.75±0.34)%和(5.92±0.59)%。

对于苋菜红(amaranth, 图 3E), WT-FA 组的降解率为(2.90±0.79)%, WT+FA 组的降解率为(26.89±1.94)%, *lcc3*-RNAi-FA 组和 *lcc3*-RNAi+FA 组的降解率分别为(2.85±0.29)%和(4.09±0.95)%。

对于甲基橙(methyl orange, 图 3F), WT-FA 组的降解率为(9.05±0.77)%, WT+FA 组的降解率为(50.67±3.13)%, *lcc3*-RNAi-FA 组和 *lcc3*-RNAi+FA 组的降解率分别为(7.31±0.92)%和(10.17±1.24)%。

综上所述, 阿魏酸诱导野生型菌株产生的漆酶对 6 种芳香族化合物的降解率显著高于未诱导野生型菌株。对于 *lcc3*-RNAi 菌株, 无论是否加入阿魏酸, *lcc3*-RNAi 菌株产生的粗漆酶液对这 6 种芳香族化合物的降解率均很低, 但阿魏酸的加入仍能在一定程度上提高降解率。这些结果表明, *lcc3* 在污叉丝孔菌漆酶降解芳香族化合物过程中发挥了关键作用。

2.4 *lcc3* 基因启动子顺式作用元件的鉴定

尝试鉴定 *lcc3* 基因启动子的顺式作用元件区域, 以助力后续的诱导调控分子机制研究。为此, 构建了一个基于高斯萤光素酶和 NanoLuc 萤光素酶的报告基因系统(图 4A)。该系统中 NanoLuc 受不同截短的 *lcc3* 启动子片段控制, 而高斯萤光素酶则受污叉丝孔菌组成型 *gpd* 启动子(P_{gpd})控制。这些质粒转入污叉丝孔菌野生型菌丝, 并检测多个截短体转化子的 2 种萤光素酶信号。2 种信号的比值(coelenterazine/furimazine)反映了截短部分对启动子活性的影响: 比值越大表明 NanoLuc 信号越弱, 即截短体启动子的活性越低。

加入阿魏酸诱导后, pCDS8b、pCDS8b1、pCDS8b2 和 pCDS8b3 转化子的萤光素酶信号比

值下降(图 4B), 表明这 4 个质粒的截短体 *lcc3* 基因启动子活性显著增强。相比之下, pCDS8b4 和 pCDS8b5 转化子的萤光素酶信号比值在阿魏酸诱导和未诱导条件下无明显差异。这一结果表明, *lcc3* 基因启动子区域中响应阿魏酸诱导的顺式作用元件位于-343--539 bp 区间。利用转录因子结合预测软件 TFinder^[16], 采用 individual motif 和 PWM 2 种结合基序类型, 对上述核心启动子区域进行了分析, 结果预测到该 DNA 区域内存在 5 个显著的结合基序可供后续的深入分析验证(表 4)。

3 讨论

本研究系统地探讨了阿魏酸对污叉丝孔菌漆酶活性的提升及其分子机制。本研究发现, 适量的阿魏酸能够显著提高污叉丝孔菌的漆酶活性, 这一结果与先前的研究^[11]一致, 即酚类化合物能够诱导白腐菌产生漆酶。然而, 过高的阿魏酸浓度则抑制了菌丝生长和漆酶活性, 这可能是由于高浓度的阿魏酸对细胞产生了毒性作用。因此在实际应用中需要优化体系中阿魏酸的浓度以达到最佳的漆酶诱导效果。

通过转录组和蛋白组分析发现, *lcc3* 基因在阿魏酸诱导下显著上调, 其转录水平和蛋白表达水平均显著增加。RNAi 实验表明, 敲降 *lcc3* 基因后漆酶活性显著下降, 且菌株降解芳香族化合物的能力大幅减弱。上述结果表明, *lcc3* 基因是污叉丝孔菌漆酶活性及降解芳香族化合物的关键基因。这一发现与先前的研究^[5]一致, 即特定的漆酶基因在不同诱导条件下表现出显著的响应。需要注意的是, 虽然转录组数据显示 *lcc4* 的转录水平下降, 但 RT-qPCR 验证数据和蛋白组学数据表明 *lcc4* 也是响应阿魏酸诱导的重要基因。此外, *lcc4* 的转录水平在 *lcc3*-RNAi 菌株中虽然可以被显著诱导上调, 但上调的倍数相对于野生型菌株有所下降。这表明 *lcc4* 的表达水平可能受到了 *lcc3* 基因沉默的影响。因此, *lcc4* 在阿魏酸诱导污叉丝孔菌漆酶表达过程

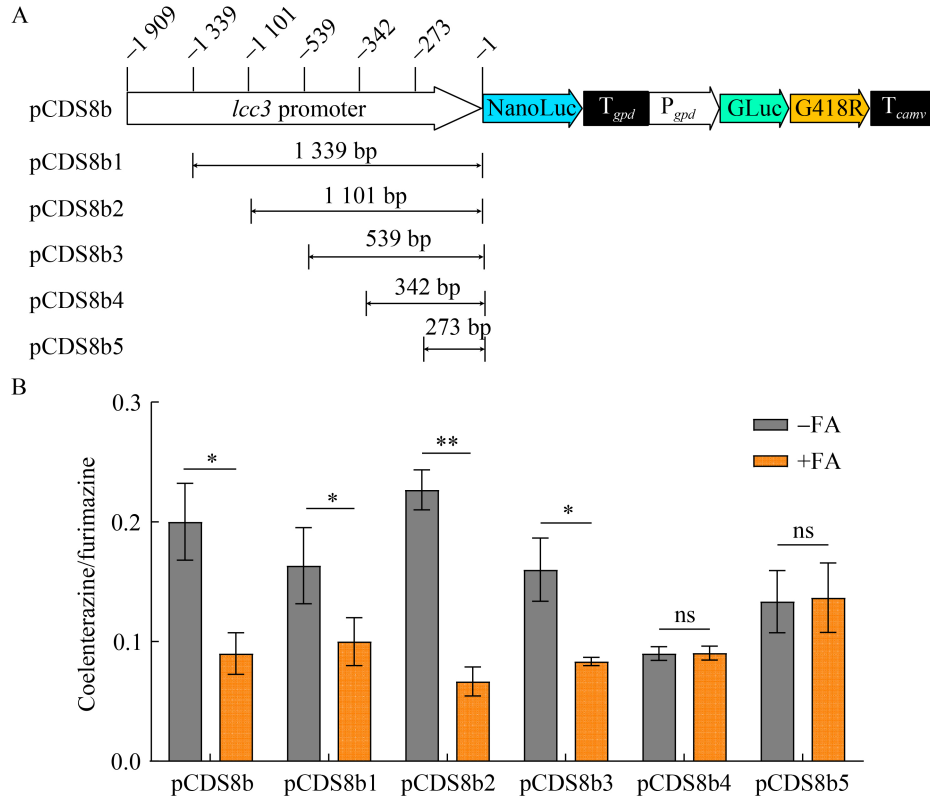


图4 基于双萤光素酶系统的*lcc3*核心启动子分析。A: 包含*lcc3*基因启动子及其截短体与高斯萤光素酶和NanoLuc萤光素酶的质粒核心区域示意图[NanoLuc: 以furimazine为底物的纳米萤光素酶; T_{gpd} : 污叉丝孔菌*gpd*基因的终止子; P_{gpd} : 污叉丝孔菌*gpd*基因的启动子; 高斯萤光素酶(GLuc): 以coelenterazine为底物的高斯萤光素酶; G418R: 新霉素磷酸转移酶II基因(G418抗性); T_{camv} : 花椰菜花叶病毒35S终止子。该图未按比例绘制]; B: 不同长度*lcc3*启动子的活性, 以coelenterazine与furimazine的比值表示(FA: 阿魏酸)。

Figure 4 Analysis of the core promoter of *lcc3* based on the dual luciferase system. A: Schematic diagram of the core regions of plasmids containing the *lcc3* promoter and its truncants with *Gaussia* luciferase and NanoLuc luciferase (NanoLuc: NanoLuc luciferase using furimazine as its substrate; T_{gpd} : The terminator of *D. squalens gpd* gene; P_{gpd} : The promoter of *D. squalens gpd* gene; GLuc: *Gaussia* luciferase using coelenterazine as its substrate; G418R: The *NPTII* gene (G418 resistance); T_{camv} : The terminator of CaMV 35S. The figure is not scaled); B: Activities of different lengths of the *lcc3* promoter, expressed as the ratio of coelenterazine to furimazine (FA: Ferulic acid. Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$).

中的作用需要更深入地探究。

漆酶已被证明能有效降解各种芳香族化合物, 包括酚类、多酚类和多环芳烃, 且其降解效率受化合物的电离电位及其分子结构的影响^[17]。同样地, 芳香族化合物诱导漆酶活性也

是一个复杂的过程, 这些化合物对漆酶表达产生的影响也因生物体和特定芳香族化合物而异^[18]。藜芦醇已被证明在一些真菌中增加漆酶产生, 而愈创木酚被证明对其他真菌中的漆酶活性有更显著的影响^[19]。漆酶功能的分化进化

表4 TFinder预测的*lcc3*核心启动子DNA结合基序Table 4 The DNA binding motif of *lcc3* core promoter region predicted by TFinder

Motif type	Motif sequence	Predicted sequence	Score adjusted	<i>P</i> -value
Individual motif	GGGRNYYYCC	aatGGATGTTTCCgcg	4.219 275	$8.086 0 \times 10^{-3}$
		tgtGCAGATTCCAgat	3.329 458	$1.453 3 \times 10^{-2}$
PWM	HBGCCGGAGRM	cgaTCCACCAGCGGaat	3.492 111	$3.354 0 \times 10^{-3}$
		tgtTTCCGCGGCATgca	2.834 332	$4.059 0 \times 10^{-3}$
		tttCCGCGGCATGCatc	-0.946 578	$9.804 0 \times 10^{-3}$
		agcTTGACGCGCAGCcgt	0.201 673	$9.804 0 \times 10^{-3}$

是真菌适应木质素异质性的关键策略。因此研究特定芳香族化合物和对应的特定漆酶的相互关系有助于提高特定芳香族化合物的降解效率。本研究分析了阿魏酸诱导后污叉丝孔菌产生的漆酶在降解多种芳香族化合物中的潜力。实验发现阿魏酸诱导后的野生型菌株产生的漆酶对6种芳香族化合物(色氨酸、香草酸、4-羟基肉桂酸、中性红、苋菜红和甲基橙)的降解率显著高于未诱导的野生型菌株产生的漆酶。*lcc3*基因敲降菌株产生的漆酶降解能力显著下降,这进一步证实了*lcc3*基因在漆酶降解芳香族化合物中的关键作用。这些结果表明,通过调控*lcc3*基因的表达可以提高污叉丝孔菌特异性降解芳香族化合物的能力。*lcc3*基因的这种特异性诱导模式可能代表污叉丝孔菌在针叶林腐生生态位中形成的独特适应性特征。

为了深入理解*lcc3*基因在阿魏酸诱导下的表达调控机制,利用双荧光素酶系统鉴定了*lcc3*基因的核心启动子区。结果表明,*lcc3*基因启动子区域中响应阿魏酸诱导的顺式作用元件位于-343--539 bp区间。通过转录因子结合预测软件TFinder预测了该区域内可能的转录因子结合位点,也用其他软件进行了预测,发现转录因子可能的结合位点预测结果差异非常大,预测到的基序非常多。这是由于丝状真菌的转录因子研究极不充分,这些转录因子结合预测软件采用的数据库大多是哺乳动物细胞或酵母。因此这些预测的位点必须通过Dnase I footprinting

等实验进行验证。这些发现为后续研究*lcc3*基因的表达调控机制提供了基础,并为进一步优化漆酶的表达调控提供了潜在的靶点。

本研究虽然鉴定了*lcc3*基因的核心启动子区,但具体的转录因子及其精准的结合位点和转录起始位点尚需进一步验证。本研究主要集中在*lcc3*基因的调控机制上,但阿魏酸诱导信号究竟如何传导到*lcc3*基因启动子区仍需进一步研究。未来的研究还可以进一步通过基因工程手段改造*lcc3*基因的启动子以优化*lcc3*基因的调控表达或进行LCC3蛋白的定向改造,提高漆酶的产量和活性,进一步探索其在环境污染治理和工业生产中的应用潜力。

4 结论

本研究系统地探讨了阿魏酸对污叉丝孔菌漆酶活性的促进作用及其分子机制。通过一系列实验揭示了阿魏酸在诱导漆酶活性方面的显著效果,并明确了*lcc3*基因在这一过程中的关键作用。本研究鉴定了*lcc3*基因响应阿魏酸诱导的核心启动子区。这些发现不仅为白腐菌漆酶在降解芳香族化合物中的应用提供了理论支持,也为进一步优化漆酶的表达和应用提供了重要的分子基础。未来的研究可以进一步探索阿魏酸诱导*lcc3*基因表达的具体转录因子及其分子机制,同时可以通过基因工程手段提高漆酶的产量和活性,以更好地应用于环境污染治理和工业生产中。

作者贡献声明

吴洁：实验操作，数据收集和结果处理，论文撰写，讨论与修改；李静：实验操作；罗锋：研究构思和设计，论文讨论与修改；常鹏：研究构思和设计，实验设计，论文撰写，修改和投稿。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] POZDNYAKOVA NN. Involvement of the ligninolytic system of white-rot and litter-decomposing fungi in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Biotechnology Research International*, 2012, 2012: 243217.
- [2] RYTIOJA J, HILDÉN K, MÄKINEN S, VEHEMAANPERÄ J, HATAKKA A, MÄKELÄ MR. Saccharification of lignocelluloses by carbohydrate active enzymes of the white rot fungus *Dichomitus squalens*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145166.
- [3] WANG XL, YAO B, SU XY. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3373.
- [4] SUN S, LIU PY, ULLAH M. Efficient azo dye biodecolorization system using lignin-co-cultured white-rot fungus[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(1): 91.
- [5] KOWALCZYK JE, PENG M, PAWLOWSKI M, LIPZEN A, NG V, SINGAN V, WANG M, GRIGORIEV IV, MÄKELÄ MR. The white-rot basidiomycete *Dichomitus squalens* shows highly specific transcriptional response to lignocellulose-related aromatic compounds[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 229.
- [6] MA B, MAYFIELD MB, GODFREY BJ, GOLD MH. Novel promoter sequence required for manganese regulation of manganese peroxidase isozyme 1 gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(3): 579-588.
- [7] WANG CK, ZHANG XL, WU K, LIU SL, LI X, ZHU CN, XIAO YZ, FANG ZM, LIU JJ. Two Zn₂Cys₆-type transcription factors respond to aromatic compounds and regulate the expression of laccases in the white-rot fungus *Trametes hirsuta*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(7): e0054524.
- [8] ZHANG YF, ZHANG XL, ZHANG XP, ZHAO WM, LIU JJ, WANG XT, XIAO YZ, FANG ZM. ThhspA1 is involved in lacA transcriptional regulation of *Trametes hirsuta* AH28-2 exposed to o-toluidine[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2022, 161: 103716.
- [9] CHANDRASEKHARAIAH M, THULASI A, BAGATH M, KUMAR DP, SANTOSH SS, PALANIVEL C, JOSE VL, SAMPATH KT. Molecular cloning, expression and characterization of a novel feruloyl esterase enzyme from the symbionts of termite (*Coptotermes formosanus*) gut[J]. *BMB Reports*, 2011, 44(1): 52-57.
- [10] LI CZ, ZHAO XC, WANG AQ, HUBER GW, ZHANG T. Catalytic transformation of lignin for the production of chemicals and fuels[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(21): 11559-11624.
- [11] SWATEK A, STASZCZAK M. Effect of ferulic acid, a phenolic inducer of fungal laccase, on 26S proteasome activities *in vitro*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2463.
- [12] ROUTLEDGE SE, PROUDFOOT NJ. Definition of transcriptional promoters in the human beta globin locus control region[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 323(4): 601-611.
- [13] HEISE K, OPPERMAN H, MEIXENSBERGER J, GEBHARDT R, GAUNITZ F. Dual luciferase assay for secreted luciferases based on *Gaussia* and NanoLuc[J]. *Assay and Drug Development Technologies*, 2013, 11(4): 244-252.
- [14] 张鹏. 以 ABTS 为底物测定漆酶活力的方法[J]. *印染助剂*, 2007, 24(1): 43-45.
ZHANG P. Test method for the laccase activity with ABTS as the substrate[J]. *Textile Auxiliaries*, 2007, 24(1): 43-45 (in Chinese).
- [15] LI J, WU M, IGARASHI Y, LUO F, CHANG P. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the white-rot fungus *Dichomitus squalens*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2023, 214: 106842.
- [16] MINNITI J, CHECLER F, DUPLAN E, ALVES Da COSTA C. TFinder: a Python web tool for predicting transcription factor binding sites[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2025, 437(3): 168921.
- [17] XU AM, ZHANG XX, WU SL, XU N, HUANG Y, YAN X, ZHOU J, CUI ZL, DONG WL. Pollutant degrading enzyme: catalytic mechanisms and their expanded applications[J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 4751.
- [18] PISCITELLI A, GIARDINA P, LETTERA V, PEZZELLA C, SANNIA G, FARACO V. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi[J]. *Current Genomics*, 2011, 12(2): 104-112.
- [19] VISWANATH B, RAJESH B, JANARDHAN A, KUMAR AP, NARASIMHA G. Fungal laccases and their applications in bioremediation[J]. *Enzyme Research*, 2014, 2014: 163242.