

栓菌 420 漆酶 C 基因的克隆、高效表达及重组酶的染料脱色潜能

李剑凤, 洪宇植, 肖亚中*

(安徽大学生命科学学院和现代实验技术中心 合肥 230039)

摘 要 根据漆酶铜结合保守区氨基酸序列设计简并引物, 从新型漆酶合成菌株栓菌 420 (*Trametes* sp. 420) 基因组 DNA 扩增得到一新的漆酶同工酶基因 (*lacC*) 片段, 应用长距离反向 PCR 技术获得其两端侧翼序列。克隆得到的 *lacC* 序列长 3640bp, 包括长 2263bp 的开放读码框及 5' 和 3'-非编码区。*lacC* cDNA 序列长 1560bp, 编码 519aa 的多肽。推导的 LacC 蛋白序列内部存在有 10 个潜在的 N-糖基化位点和 4 个铜原子结合区。将不含自身信号序列的 *lacC* cDNA 以 pPIC9 载体为媒介克隆到表达载体 pPIC9K 上, 转化毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 细胞。重组菌在含有 0.3mmol/L CuSO₄ 和 0.8% 丙氨酸的 BMM 培养基中 20℃ 培养 9d, 重组漆酶 (rLacC) 产量达到 1.62 × 10⁴ U/L。用发酵粗酶液对终浓度 50mg/L 的染料进行脱色实验, 结果表明, 6U/L 的 rLacC 对测试的三甲基类和偶氮类染料具有良好的脱色作用, 小分子介体 ABTS 和 HBT 能够提高 rLacC 对染料的脱色效率和脱色速度。

关键词: *Trametes* sp. 420; 真菌漆酶; 异源表达; 染料脱色

中图分类号: Q78, Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0054-05

人工合成染料在使用过程中约有 15% 被作为废弃物排放到水环境中, 传统的物理化学方法处理这些染料废水较为低效、耗时, 探讨高效经济的合成染料转化降解途径对于解决染料废水污染问题有重要意义。真菌漆酶 (Laccase, EC1.10.3.2) 是一类含铜的多酚氧化酶, 能够催化氧化多种酚类和非酚类化合物, 同时伴随有分子氧还原成水^[1]。多项研究表明, 作为一种新型的生物催化剂, 真菌漆酶在染料废水处理等方面具有良好的应用潜力^[2,3]。

真菌漆酶主要来源于以担子菌 (Basidiomycetes) 等为主的高等真菌, 但野生型真菌的漆酶产量普遍较低, 且酶合成过程通常需要使用毒性芳香化合物诱导^[4,5], 发酵液后处理难度大, 成本高, 易造成环境污染。因此, 应用分子生物学技术克隆漆酶基因, 建立重组酶高效表达体系, 能为漆酶安全有效生产开辟新的技术途径。

Trametes sp. 420 是一株新的漆酶合成菌株, 在多种测试的诱导条件下, 能够有效分泌表达漆酶同工酶 (结果另文发表)。我们对该菌株尚未检测到分泌表达的漆酶同工酶基因 (*lacC*) 进行了克隆, 并实现其在 *P. pastoris* 中高效活性表达, 同时测试了重组酶 (rLacC) 对几种人工合成染料的脱色潜能,

本文报道该研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株、试剂和培养基

Trametes sp. 420 由本课题组选育, 保藏于安徽大学微生物菌种保藏中心; 毕赤酵母 (*P. pastoris*) GS115 菌株、大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 菌株和表达载体 pPIC9、pPIC9K 均购自 Invitrogen 公司; 工具酶和克隆载体 pMD18-T 购自大连 TaKaRa 公司; 总 RNA 提取试剂盒 RNeasy[®] Plant Mini Kit 购自 Qiagen 公司; DNA 凝胶纯化和质粒抽提试剂盒购自杭州 V-gene 公司。若无特殊说明, 其它生化试剂及染料均为分析纯。培养基 MD、YPD、BMM、BMG 均按照 *P. pastoris* 表达体系说明书配制。

1.2 基因组 DNA 和总 RNA 的制备

Trametes sp. 420 在葡萄糖-胰蛋白胨培养基中培养, 并用邻甲苯胺诱导其合成漆酶, 方法参考文献 [6] 基因组 DNA 和总 RNA 的抽提参考文献 [7]。

1.3 *lacC* 序列的克隆

根据真菌漆酶铜结合保守区氨基酸序列, 设计简并引物 Pc1、Pc4 (表 1)。以 *Trametes* sp. 420 基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 得到 *lacC* 的部分序

基金项目: 国家自然科学基金 (30670069, 30470056); 安徽省优秀青年基金 (04043048, 05023057); 安徽大学 211 工程学术创新团队基金 (02203109)

* 通讯作者。Tel: 86-551-5108509; Fax: 86-551-5107408; E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

作者简介: 李剑凤 (1981 -) 男, 安徽安庆人, 生化与分子生物学专业硕士研究生。

收稿日期: 2006-04-20; 接受日期: 2006-05-31; 修回日期: 2006-07-27

列, 反应体系和热循环参数参考文献 [8]。根据获得的 DNA 序列, 设计特异引物 IP_s 和 IP_a (表 1), 用长距离反向 PCR (LD-IPCR) 技术扩增其两端侧翼序列。该 PCR 产物经凝胶回收, 连接到载体 pMD18-T 上, 并转化 *E. coli* JM109 细胞。包含有目标片段的重组 DNA 用 ABI 3730 测序仪进行测序。

表 1 引物序列

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')
Pc1	CAYTGCCAYGGNTITYTYCA
Pc4	TGRAARTCDATRTGRCARTG
IP _s	TGAGATTCTGCTCCTATTTCCTGCCACC
IP _a	CCAGAACGTGCCAATGACCCATCCAT
P1	AAACTCGAGAAAAGAGCCATCGGCCCGGTTA
P2	AAAGAAATTCACGGCGTTCAAAGAC

D = A/G/T, N = A/G/C/T, R = A/G, Y = C/T

1.4 lacC cDNA 的克隆

以总 RNA 为模板, 按文献 [9] 的方法合成 cDNA 第一链。根据已知 lacC 结构基因序列, 设计含有 Xho I 和 EcoR I 位点的引物 P1、P2 (表 1)。以逆转录产物为模板, 用 Pyrobest DNA 聚合酶进行扩增, 获得不含 lacC 自身信号肽的 cDNA 序列。

1.5 重组表达载体的构建

用 Xho I 和 EcoR I 分别双酶切上述 lacC cDNA 片段和 pPIC9 载体, 凝胶纯化后用 T₄ DNA 连接酶连接。该重组质粒经 *E. coli* JM109 倍增后, 用限制性内切酶 Sph I 和 EcoR I 双酶切, 凝胶回收 6.0kb 带, 然后连接到用相同酶处理的 pPIC9K 载体片段 (4.8kb) 上, 得到表达质粒 pPlacC。对 pPlacC 进行测序, 确定 lacC cDNA 序列具有正确的编码框。

1.6 阳性重组子的筛选与发酵

表达载体 pPlacC 和相应的空白质粒分别电转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞, 涂布 MD 平板, 于 30℃ 培养以筛选 His⁺ 转化子。随机挑取 200 个 His⁺ 转化子, 点种到含有 0.3mmol/L Cu²⁺ 和 0.2mmol/L ABTS (2,2'-连氨基-双[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]) 的 BMM 平板上, 于 28℃ 培养, 每天补加 100μL 甲醇, 至菌落周围有 ABTS 氧化特征色生成。

挑取阳性转化子, 接种到 10mL BMG 液体培养基中, 30℃、200r/min 培养至菌液吸光值 OD₆₀₀ = 8 ~ 125000 × g 离心 5min。用 BMM 培养基 (pH6.0, 含 0.3mmol/L CuSO₄ 和 0.8% 丙氨酸) 重悬细胞沉淀至 OD₆₀₀ ≈ 2.0, 转移 30mL 悬液到 150mL 三角瓶中。20℃、200r/min 培养 11d, 每天补加 0.5% 体积比的甲醇。

1.7 漆酶活力测定^[10]

酶活测定以 ABTS 为底物, 测定前 3min 内反应液在 420nm 处吸光值的增加。3mL 反应体系包括 2.85mL 0.1mol/L 酒石酸钠缓冲液 (pH4.0), 100μL 15mmol/L 的 ABTS 和 50μL 酶稀释液。定义一分钟内氧化 1μmol ABTS 所需的酶量为 1 个酶活单位 (U)。

1.8 染料脱色

重组菌发酵培养物在 10000 × g 离心 10min, 上清液用于三甲基类染料 (酸性品红、溴百里香酚蓝、溴酚蓝) 和偶氮类染料 (酸性紫 7、依文思蓝) 的脱色实验。反应体系有 100mmol/L 磷酸缓冲液 (pH4.0), 终浓度 50mg/L 染料和发酵上清液 (含 6U/L rLacC)。在体系中分别添加 18μmol/L ABTS 和 1mmol/L HBT (1-羟基苯三氮唑), 考察小分子介体对染料脱色的影响, 同时设立不加酶液的空白对照。体系在 30℃ 反应 6h, 每间隔 1h 取样, 在各染料最大吸收波长处测量吸收值, 检测染料的相对含量, 计算脱色率。

2 结果

2.1 lacC 的克隆及其序列分析

用引物对 Pc1-Pc4 扩增 *Trametes* sp. 420 基因组 DNA, 获得一新型漆酶同工酶基因片段, 该片段长 1715bp。以特异反向引物 IP_s 和 IP_a 进行 LD-IPCR, 克隆获得该序列的两端未知侧翼序列, 扩增片段长 2230bp。分析表明, 该片段与 1715bp 的片段在 5'-和 3'-端分别有 186bp 和 119bp 的序列重叠。经拼接获得完整的 lacC 序列 (3640bp) (GenBank 登录号 AY839941), 包括 633bp 的 5'-非编码区、2263bp 的开放读码框和 744bp 的 3'-非编码区。lacC 基因内部含有 12 个内含子, 内含子序列长 49 ~ 73bp, 符合 "GT-AG" 剪辑规则^[11]。

对克隆得到的 lacC 5'-非编码区进行分析 (图 1) 结果表明在起始密码子 (ATG) 上游 -167 处存在有 1 个潜在的 TATA 框 (TATAAA), 2 个可能的 CAAT 框分别位于 -261 和 -335 处, 1 个可能的氮因子调控元件结合位点 (GATA)^[12] 位于 -420 处, 1 个可能的 CreA 结合位点 (5'-SYGGRG)^[13] 位于 -570 处, 并且在起始密码子与 TATA 框之间的 -63 ~ -95 处, 存在有 1 个可能的热击元件 (HSE) (TTCTTGTC TTCGTTCTTCTTCTTCATTCCTC)。另一方面, 在 lacC 基因上游非编码序列中没有发现异生物效应元件序列 (XRE, 5'-TNGCGTG)^[14] 和金属效应元件序列

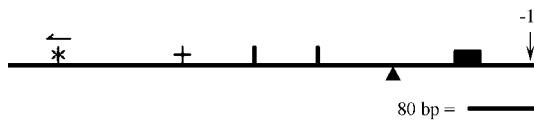


图1 *lacC* 5'-非编码区潜在顺式作用元件的分布

Fig.1 Distribution of putative *cis*-acting elements in the 5'-uncoding region of *lacC*. The initiation site of promoter upstream of the start codon ATG is indicated by a vertical arrow. ■, HSE; ▲, TATA box; |, CAAT box; +, GATA box; *, CreA-binding site.

lacC cDNA 序列全长 1560bp, 编码 519aa 的多肽, 包括 24aa 的信号肽序列和 495aa 的成熟肽。基于推导的氨基酸序列, *LacC* 成熟蛋白的计算分子量为 53312.3Da, 等电点为 pI4.39。LacC 蛋白序列中含有 10 个潜在的 N-糖基化位点(Asn-X-Ser/Thr)^[6] 以及保守的 10 个 His 残基和 1 个 Cys 残基。与其它真菌漆酶氨基酸序列比较, 推测 LacC 的 Cys-109 与 Cys-510、Cys-141 与 Cys-228 之间形成两对二硫键, 而保守的 Cys-475 则参与 I 型铜原子的连接^[9]。

将推导的 LacC 氨基酸序列与其它不同来源的漆酶进行比对分析, 结果表明, *Trametes* sp. 420 *lacC* 与小孔硬孔菌 (*Rigidoporus microporus*) 漆酶基因 (AY167042) 具有最高的一致性 (69.7%); 次之, 与绒毛栓菌 (*Trametes pubescens*) *lacC* (AF414807) 的一致性为 69.1%。而 *Trametes* sp. 420 *lacC* 与植物、昆虫来源的漆酶基因一致性较低, 如与黑麦草 (*Lolium perenne*) *lac5-4* (AF465470)、玉米 (*Zea mays*) 漆酶基因 (AM086216) 和昆虫黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 漆酶基因 (BT003483) 的一致性分别只有 19.4%、22.2% 和 22.4%。

2.2 阳性转化子的筛选

以 pPIC9 载体为媒介, 将引物 P1 和 P2 扩增得到的 *lacC* 成熟肽编码序列 (1488bp) 连接到质粒 pPIC9K 上, 获得长 10.8kb 的重组表达载体 (pPlacC)。理论上, 重组酶 (*rLacC*) 的 N 端序列与天然酶相同, 不含额外的氨基酸序列。pPlacC 和空白对照质粒经 *HpaI* 酶解线性化后, 分别转化 *P. pastoris* GS115 细胞。通过 MD 平板筛选 His⁺ 克隆, 每 ng 质粒得到的转化子数少于 100。随机转接 200 个 His⁺ 转化子到 BMM (含 ABTS) 平板上, 在 24h 内, 约 60% 的转化子周围有漆酶氧化 ABTS 形成的特征色, 判定这些克隆即为目标转化子。空白对照没有特征色生成。

2.3 重组漆酶的合成

对 20 株目标转化子进行初步摇瓶发酵, 获得的漆酶产量基本相当 (结果未显示)。从中随机选取一

个转化子 (GScl) 用于重组漆酶 *rLacC* 的合成。在含有 0.3mmol/L CuSO₄ 和 0.8% 丙氨酸的 BMM 培养基中 20℃ 培养 9d, 发酵液的漆酶活力达到 1.62 × 10⁴ U/L (图 2)。发酵过程中, 培养物 pH 维持在 6.3 左右。SDS-PAGE 电泳结果表明, *rLacC* 含量占发酵液总蛋白的 50% 以上 (图 3)。

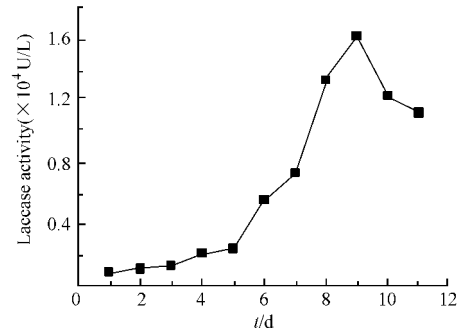


图2 酵母转化子 GScl 表达 *rLacC*

Fig.2 Expression of *rLacC* by the transformant GScl.

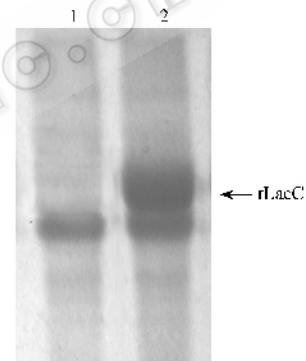


图3 酵母发酵液的电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE of yeast cultures. The cultures were sampled at the 9th day of cell growth. 1, the control transformant without the *lacC* gene. 2, the transformant GScl.

2.4 合成染料的脱色

发酵培养物经离心去除菌体, 直接用于合成染料的脱色。如图 4 所示, 重组漆酶 *rLacC* 在低浓度下 (6U/L) 对测试的三甲基类染料和偶氮类染料均有脱色作用, 空白对照转化子的发酵液则不具有脱色作用。在测试时间内, *rLacC* 活力保持 90% 以上。

脱色速度因染料结构的不同而不同 (图 4)。rLacC 对溴百里香酚蓝和依文思兰的脱色速度最快, 在没有介体的条件下, 1h 内脱色率分别达到 61.5% 和 78.6% (图 4-B, E), 而对于酸性品红和酸性紫 7, 6h 内脱色率分别只有 23.6% 和 21.5% (图 4-A, D)。脱色效率因染料结构的不同而存在差异, 与染料的种类没有明显相关性。rLacC 对溴百里香酚蓝和依文思兰的脱色效率在 1h 内即接近平衡, 与 6h 内的

效率相当(分别为 72.3% 和 85.6%)(图 4-B, E),而 rLacC 对同为三甲基类的溴酚蓝的脱色作用不明显(图 4-C)。

小分子介体 ABTS 和 HBT 能够显著提高 rLacC 对一些染料的脱色效率。在 ABTS 或 HBT 存在的条件下,酸性品红和酸性紫 7 的脱色率由原来的 21.6% ~ 23.6% 上升到 91.4% ~ 93%(图 4-A, D),均增加了约 4 倍。小分子介体还能提高 rLacC 的脱色速度,如在介体存在的条件下,酸性品红和酸性紫 7 的脱色率在反应的前 1h 内即接近最大值。另一方面,ABTS 和 HBT 对漆酶脱色的促进作用因染料的不同而有所差异,如 ABTS 对溴酚蓝的脱色率几乎没有影响,而 HBT 对其脱色率由原来的 0.5% 在 6h 内上升到 24.4%(图 4-C)。

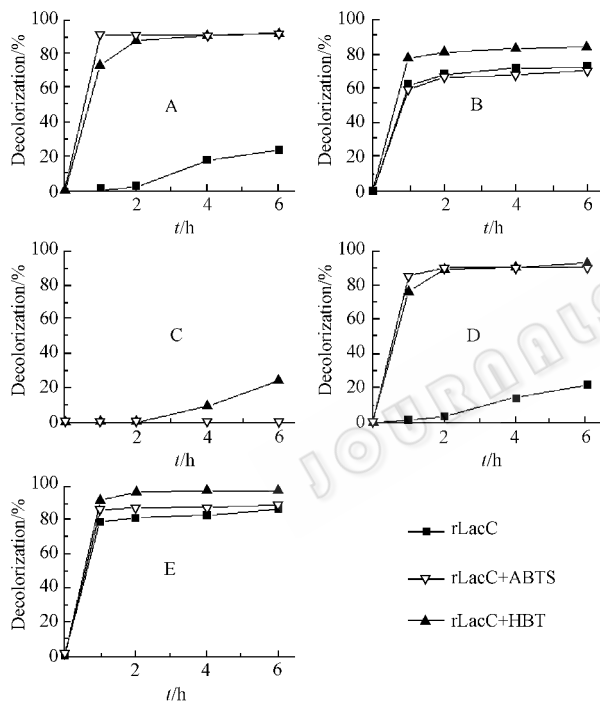


图 4 rLacC 脱色染料

Fig. 4 Decolorization of dyes by rLacC. A: Acid Fuchsin, B: Bromothymol Blue, C: Bromophenol Blue, D: Acid Violet 7, E: Evans Blue. The reaction system contained 50 mg/L dye and the supernatant with 0.06 U/mL rLacC. Mediators of ABTS (18 μ mol/L) and HBT (1mmol/L) were added into the laccase-dye systems in parallel.

3 讨论

真菌漆酶由基因家族编码,其同工酶组分因菌株不同的生长环境或生理状态而差异表达^[7]。Trametes sp. 420 是一株新的漆酶合成菌株,在前期进行的发酵条件下,在蛋白质水平上仅检测到一种漆酶同工酶组分(LacE)。基于漆酶蛋白质氨基酸保

守性设计简并引物,并对基因组 DNA 进行扩增,从 Trametes sp. 420 菌株克隆得到了新的漆酶同工酶基因 lacC 序列片段。结合使用 LD-IPCR 技术,进一步得到该基因的全长序列。分析表明, lacC 与来自其它真菌的漆酶同工酶基因具有 40% ~ 69.7% 一致性,与植物和昆虫的漆酶基因的一致性低于 23%。另一方面,漆酶基因启动子区 XRE 和 MRE 位点的存在与基因受芳香类化合物和金属离子的正调控具有相关性^[7],而在 lacC 5'-非编码区序列中没有发现 XRE 和 MRE 位点,因此, lacC 顺式作用元件的分布特征很好地对应了 Trametes sp. 420 漆酶的发酵合成规律,即在 Cu 和多种芳香诱导剂存在的条件下,菌株均不能被有效诱导而合成丰量的 LacC。

近年来,有多个漆酶同工酶基因被克隆,并实现了在酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)^[17,18]、毕赤酵母(P. pastoris)^[10,19]、黑曲霉(Aspergillus niger)^[20,21]、米曲霉(Aspergillus oryzae)^[21,22]等细胞活性表达。但在这些研究中报道的漆酶摇瓶发酵产量普遍低于 1.0×10^4 U/L,特别是利用重组漆酶进行合成染料脱色性能的研究尚不多见。我们将 lacC cDNA 序列经载体 pPIC9K 整合到毕赤酵母基因组上进行异源活性表达,在摇瓶条件下,重组菌 GSc1 发酵培养 9 天漆酶活性达到 1.62×10^4 U/L。另一方面,用含有低浓度重组漆酶(6U/L)的发酵粗液对多个染料进行了脱色性能的初步研究,结果表明,rLacC 对除溴酚蓝之外的四种合成染料具有良好的脱色作用,在适合的小分子介体存在的条件下,重组酶也能够部分脱色溴酚蓝。较高的漆酶产量、较低的脱色酶用量和较好的脱色效率使得重组菌 GSc1 及其重组酶 rLacC 在三甲基和偶氮类人工合成色素脱色中有较好应用潜力。

致谢 本校 2002 级生物技术专业的李大培同学参与了部分研究工作。

参 考 文 献

- [1] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, **140**: 19-26.
- [2] Soares GM, De Amorim MT, Costa-ferreira M. Use of laccase together with redox mediators to decolorize Remazol Brilliant Blue R. *J Biotechnol*, 2001, **89**: 123-129.
- [3] Nyanhongo GS, Gomes J, Gubitz GM, et al. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res*, 2002, **36**: 1449-1456.
- [4] Dekker RF, Barbosa AM. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria*

- [5] 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 Biotechnol*, 2003, **60**: 700-707.
- [6] Xiao YZ, Chen Q, Hang J, *et al.* Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*, 2004, **96**: 26-35.
- [7] Xiao YZ, Hong YZ, Li JF, *et al.* Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**: 493-501.
- [8] 洪宇植, 肖亚中, 房伟, 等. 长距离反向 PCR 技术高效扩增已知 DNA 片段的侧翼序列. *激光生物学报*, 2006, **15**: 46-49.
- [9] 洪宇植, 肖亚中, 房伟, 等. *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. *生物工程学报*, 2005, **21**: 547-552.
- [10] Liu ST, Saito A, Azakami H, *et al.* Expression, purification, and characterization of an unstable lysozyme mutant in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2003, **27**: 304-312.
- [11] Padgett RA, Konarska MM, Grabowski PJ, *et al.* Lariat RNA's as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science*, 1984, **255**: 898-903.
- [12] Marzulufo GA. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Micro Mol Biol Rev*, 1997, **61**: 17-32.
- [13] Kulmberg 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.
- [14] Kuramoto N, Emi Goto E, Yukito Masamune Y, *et al.* Existence of xenobiotic response element binding in *Dictyostelium*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, **1578**: 1-11.
- [15] Thiele DJ. Metal regulated transcription in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**: 1183-1191.
- [16] Gavel Y, von Heijine G. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng*, 1990, **3**: 433-442.
- [17] Larsson S, Cassland P, Jansson LJ. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1163-1170.
- [18] Bulter T, Alcalde M, Sieber V, *et al.* Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 987-995.
- [19] Soden DM, O'Callaghan J, Dobson ADW. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*, 2002, **148**: 4003-4014.
- [20] 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.
- [21] Sigouillot C, Record E, Belle V, *et al.* Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64**: 346-352.
- [22] Hoshida H, Fujita T, Murata K, *et al.* Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2005, **69**: 1090-1097.

Cloning and heterologous expression of the gene of Laccase C from *Trametes* sp. 420 and potential of recombinant Laccase in dye decolorization

LI Jian-feng, HONG Yu-zhi, XIAO Ya-zhong*

(School of Life Sciences & Modern Experiment Technology Center, Anhui University, Hefei 230039, China)

Abstract: A new laccase gene (*lacC*) was cloned from the genomic DNA isolated from *Trametes* sp. 420, a new laccase-producing fungus, using the degenerate primers based on the conserved copper-binding regions in fungal laccases. Long distance-inverse PCR (LD-IPCR) was used to amplify the flanking sequences of the gene. The *lacC* DNA sequence obtained was 3640 base pairs (bp), including the entire open reading frame (2263bp) and the 5'- and 3'-noncoding regions. The *lacC* cDNA sequence is 1560bp, encoding a 519 amino acid protein. The deduced peptide sequence of LacC contains ten putative N-glycosylation sites and four conserved copper-binding regions. The *lacC* cDNA without its signal sequence was cloned into the expression vector pPIC9K through the pPIC9 plasmid and transformed into the *Pichia pastoris* strain GS115. The positive transformant was cultured at 20°C in BMM medium containing 0.3mmol/L CuSO₄ and 0.8% alanine, with the yield of the recombinant laccase rLacC being 1.62 × 10⁴ U/L after a 9-day cell growth. Furthermore, the crude enzyme was used to decolorize several synthetic dyes at a final concentration of 50mg/L. The results showed that rLacC (6U/L) possessed the valuable ability to decolorize dyes of triarylmethane and azo types tested. The presence of low molecular weight redox mediators of ABTS and HBT increased the efficiency and velocity of dye decolorization significantly.

Keywords: *Trametes* sp. 420; Fungal laccase; Heterologous expression; Dye decolorization

Foundation items: National Natural Sciences Foundation of China (30670069, 30470056); Science & Technology Foundation of Distinguished Young Scholars of Anhui Province (04043048, 05023057); Innovative Research Team of 211 Project in Anhui University (02203109)

* Corresponding author. Tel: 86-551-5108509; Fax: 86-551-5107408; E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

Received: 20 April 2006/Accepted: 31 May 2006/Revised: 27 July 2006 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>