

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (7) :828 - 835; 4 July 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicroen  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.014

## 草菇漆酶基因 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的克隆及异源表达

吴林<sup>1</sup>, 阳经慧<sup>1,2</sup>, 陈明杰<sup>1</sup>, 汪虹<sup>1</sup>, 鲍大鹏<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>国家食用菌工程技术研究中心, 农业部南方食用菌资源利用重点实验室, 上海市农业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 201403

<sup>2</sup>西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100

**摘要:** 【目的】克隆草菇漆酶基因 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的全长 cDNA, 证实其编码的蛋白具有漆酶活性, 最终建立草菇漆酶基因的异源表达及纯化体系。【方法】利用 RACE 技术克隆全长 cDNA 序列, 并利用生物信息技术进行序列分析, 在此基础上, 去除全长 cDNA 的编码信号肽的序列并在 3' 端添加 His-tag 碱基序列, 把修饰后的 cDNA 片段克隆到表达载体 pPIC9K 上, 并转化到毕赤酵母 GS115 中进行表达, 对重组蛋白利用 Ni 柱进行分离纯化并以 ABTS 底物法检测重组蛋白的漆酶活性。【结果】*vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的全长 cDNA 的长度分别为 1599 bp 和 1554 bp, 且分别含有 19 和 15 个外显子; 其编码的蛋白的理论分子量分别是 57.3 kDa 和 56.3 kDa, 理论等电点分别为 4.73 和 5.62, 且都属于分泌型的胞外蛋白; 表达出的重组蛋白 RBvvlac1 和 RBvvlac6, 其分子量大小约为 70 kDa, 说明存在翻译后修饰; 含有 150 mmol/L 咪唑的缓冲液对 RBvvlac1 和 RBvvlac6 发酵液进行洗脱所得到的蛋白溶液具有最高漆酶活性 (333.17 U/L 和 227.63 U/L)。【结论】草菇漆酶基因 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 能够编码有活性的漆酶蛋白, 本研究建立的异源表达及纯化体系适用于草菇或其它漆酶基因的异源表达与纯化。

**关键词:** 草菇, 漆酶基因, 异源表达, 漆酶活性

中图分类号: Q933 文章编号: 0001-6209(2014)07-0828-08

草菇 (*Volvariella volvacea*) 是一种可以通过降解稻草等农业废弃物来产生自身生长所需要的营养及能量的大型真菌, 因具有较高的食用、营养、保健价值, 在我国南方及东南亚地区广泛栽培, 是最具中国特色的食用菌品种, 在世界上享有“中国蘑菇”之称。草菇的生物转化率较低, 一般只有 15% - 40%<sup>[1]</sup>, 而其它食用菌可以达到 100% 以上。究其原因可能是草菇分解木质素的能力相对较弱或者缺失, 而其生长依赖的稻草等基质中的纤维素被木质

素包裹或包围着, 这造成纤维素无法充分利用, 最终导致其生物转化率较低<sup>[2]</sup>。

真菌的木质素过氧化物酶 (lignin peroxidase, 简称 LiP), 锰过氧化物酶 (manganese peroxidase, 简称 MnP) 和漆酶 (Laccase EC1.10.3.2, 简称 Lac) 是降解木质素的主要酶系。在草菇中, 木质素过氧化物酶和锰依赖过氧化物酶活性均没有被检测出<sup>[3]</sup>, 但是可以检测出两种形式的胞外漆酶活性<sup>[4]</sup>。漆酶基因广泛发现于各种各样的担子真菌和子囊真菌中,

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 [沪农科攻字 (2011) 第 1-2 号]; 上海市农业科学院科技发展基金 [农科发 2013 (02)]

\* 通信作者。Tel: +86-21-62200794; Fax: +86-21-62201337; E-mail: baodp@hotmail.com

作者简介: 吴林 (1981-), 男, 安徽萧县人, 助理研究员, 博士, 主要从事食药真菌对基质的高效利用及分子遗传学研究。E-mail: wulin206@126.com, wulin206@hotmail.com

收稿日期: 2013-10-19; 修回日期: 2013-12-10

其编码的漆酶蛋白在数量和特性描述程度上都占据了多铜氧化酶 (multicopper oxidases, MCOs) 类群的最重要的席位<sup>[5]</sup>。许多真菌的漆酶基因以基因家族的形式存在<sup>[6-8]</sup>。真菌漆酶基因承载了各种各样的生理功能, 不仅能够降解木质素, 而且在子实体的形成、色素的形成、植物病原真菌与宿主的相互作用、土壤有机物的循环利用及逆境胁迫中都起到重要作用<sup>[5]</sup>。

真菌漆酶是一类含铜的多酚氧化酶, 能够催化多种酚类和非酚类化合物发生氧化, 主要产生水等副产物<sup>[9]</sup>, 在纸张漂白、生态修复、染料脱色、果汁与酒的澄清和纺织品的清洁等方面得到广泛应用且发展潜力巨大<sup>[10-11]</sup>。一直以来除了真菌漆酶基因的生物功能被研究外, 漆酶基因资源的挖掘和利用也被广泛关注。为了解决野生型真菌漆酶合成效率普遍较低、使用成本高以及由芳香族诱导剂造成的环境污染问题, 人们尝试采用异源表达等生物工程来生产重组漆酶。目前, 很多真菌的漆酶基因都实现了异源表达, 如 *Pleurotus sajor-caju*<sup>[12]</sup>, *Trametes versicolor*<sup>[13]</sup>, *Flammulina velutipes*<sup>[14]</sup> 等。但是由于不同物种具有不同的漆酶基因, 且不同的漆酶基因具有不同的结构及功能等特性, 所以在异源表达过程中, 需要针对不同漆酶基因的表达条件和纯化条件开展优化研究, 如启动子和信号肽的选择、纯化标签的选择及添加方式、表达菌株的选择、表达温度、发酵条件、纯化及洗脱条件的选择等等, 以期建立一个高效的异源表达体系。

草菇基因组中有 11 个预测的漆酶基因 (*vv-lac1* 至 *vv-lac11*), 系统进化分析表明其中 9 个基因 (*vv-lac1-5* 和 *vv-lac7-10*) 归为一个大亚群, 另外 2 个基因 (*vv-lac6* 和 *vv-lac11*) 归为另外一个小亚群<sup>[15]</sup>。目前为止, 只有 John A. Buswell 的课题组对草菇 V14 菌株中属于大亚群的 2 个漆酶基因进行过转录特性的研究<sup>[16-17]</sup>, 对其它草菇漆酶基因的异源表达还没有任何的报道。本研究选取了草菇漆酶基因大亚群中的 *vv-lac1* 和小亚群中的 *vv-lac6* 作为研究对象, 利用 RACE 技术克隆了其 cDNA 片段, 并在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 菌株中成功进行了异源表达。对漆酶重组蛋白进行了纯化和活性的测定, 初步建立了草菇漆酶基因异源表达的体系。研究结果为进一步开展草菇漆酶基因的异源表达及开发利用提供了方法学上的借鉴。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及质粒

草菇 V23 菌株由上海市农业科学院食用菌研究所菌种保藏中心提供。 *P. pastoris* GS115 菌株、 *Escherichia coli* JM109 菌株以及表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司, 克隆载体 PMD19-T 购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 培养基及培养条件

草菇 V23 基础培养基参照朱刚等人<sup>[18]</sup>所用的方法制备。 YPD、MD、BMM 和 LB 培养基均按照 *P. pastoris* 表达体系说明书 (*Pichia* Expression Kit, Invitrogen, USA) 配制。

草菇 V23 菌丝培养方式: 在 250 mL 的三角瓶中分别装入 100 mL 基本培养基, 将草菇 V23 菌种接种其中, 置于 32℃ 下摇床培养, 转速为 150 r/min。

### 1.3 草菇基因组 DNA 和 RNA 提取以及 cDNA 合成

草菇基因组 DNA 提取, 总 RNA 提取和 cDNA 合成操作均参照朱刚等人<sup>[18]</sup>所用的方法进行。

### 1.4 引物设计、PCR 扩增和测序

根据草菇基因组中 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 漆酶基因序列<sup>[15]</sup>, 利用 primer 5 来设计不同引物 (表 1)。 PCR 反应操作按照 TaKaRa Ex Taq Kit (TaKaRa) 试剂盒说明书进行。 PCR 反应产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences) 纯化目的条带, 纯化产物连接于 PMD19-T 载体 (TaKaRa), 操作按说明书进行。 连接产物转化入大肠杆菌感受态细胞 Top10 (天根生化科技有限公司), 阳性菌落经菌液 PCR 验证后, 委托生工生物工程 (上海) 有限公司对载体插入片段进行测序。

### 1.5 草菇漆酶同源基因 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的全长 cDNA 的调取及序列分析

对草菇 V23 进行培养, 4d 后取培养液 2 mL, 加入 1 mL 0.03% (W/V) ABTS 溶液充分混匀, 直至培养液变为蓝绿色, 以确定培养液具有漆酶活性, 以此说明此时菌丝内有漆酶基因表达。 同时收集菌丝提取总 RNA, 反转录成 cDNA 作为模板, 利用 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的特异性引物 (表 1) 和 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 技术获取这 2 个基因的全长 cDNA。 把 RACE 产物克隆到 PMD19-T 载体

上, 测序鉴定。RACE 技术利用 TaKaRa 5'-Full RACE Kit with TAP 和 TaKaRa 3'-Full RACE Core

Set with PrimeScript RTase Kit [宝生物工程(大连)有限公司] 并参照其说明书进行操作。

表 1. 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study

name	sequence (5'→3')	function	source
3'RACE Adaptor	contains the Takara unique design of dT region		
3'RACE Outer Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT	amplifying 3' end of	TaKaRa 3'-Full
3'RACE Inner Primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG	cDNA	RACE Core Set with
3'RACE Control Outer Primer	GACTGCAGGACATTGTGGTAGGG	Control for amplifying	PrimeScript RTase
3'RACE Control Inner Primer	ATCTTTGACTGCCGTTCTCGACC	3' end cDNA	Kit
3'RACE GSP Outer Primer-vvlac1	GTAGGCAATAAGGGCGACCAA	Amplifying 3' end of	
3'RACE GSP Inner Primer-vvlac1	TCCACTGTTGCGCAAGAGTAC	cDNA of <i>Vv-lac1</i>	This study
3'RACE GSP Outer Primer-vvlac6	ATGACCCCGAAGATCCACACAG	Amplifying 3' end of	
3'RACE GSP Inner Primer-vvlac6	TAGGATCATCTCACTACCGACT	cDNA of <i>Vv-lac6</i>	
5'RACE Outer Primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA	Amplifying 5' end of	
5'RACE Inner Primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG	cDNA	TaKaRa 5'-Full
5'RACE Control Outer Primer	AGGTAGGTGATGTTCCGAGAGCCT	Control for amplifying	RACE Kit with TAP
5'RACE Control Inner Primer	TTGAGTCCGCTCAGCAGAGAT	5' end of cDNA	
5'RACE GSP Outer Primer-vvlac1	CTGAAACGATTCCTGCTATATCC	Amplifying 5' end of	
5'RACE GSP Inner Primer-vvlac1	AGGATGACACCAAGACCGCTTCG	cDNA of <i>Vv-lac1</i>	This study
5'RACE GSP Outer Primer-vvlac6	GTGTAAATGGAAGGATCGCGGT	Amplifying 5' end of	
5'RACE GSP Inner Primer-vvlac6	GACCTG ATTCTCTTC AGCTCA	cDNA of <i>Vv-lac6</i>	

利用 ProtParam tool 预测蛋白质的相对分子质量和理论等电点等理化性质, 并利用 SignalP4.0 和 Target P1.1 分别进行蛋白质信号肽预测和亚细胞定位。

## 1.6 编码信号肽的序列的去除及 His-tag 标签的添加

根据预测的信号肽序列, 找出编码信号肽序列的 DNA 片段, 并从全长的 cDNA 序列中去除。根据不含编码信号肽序列的 cDNA 的两端序列设计 5'端引物及 3'端带有 His-tag 的引物(表 1)。利用这些引物对, 以含有 *vv-lac1* 或 *vv-lac6* 的全长 cDNA 序列的 PMD19-T 载体为模板, 进行 PCR 扩增, 以得到带有 His-tag 标签且不含编码信号肽序列的 cDNA 序列片段 *vvlac1*<sup>-SP/+His-tag</sup> 和 *vvlac6*<sup>-SP/+His-tag</sup>, 把扩增产物再次克隆到 PMD19-T 中, 以生成质粒 PMD19-T + *vvlac1*<sup>-SP/+His-tag</sup> 和 PMD19-T + *vvlac6*<sup>-SP/+His-tag</sup>, 测序验证。

## 1.7 表达质粒构建

根据带有 His-tag 标签且不含编码信号肽序列的 cDNA 序列片段设计含有 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切位点的引物(表 1)。利用这些引物对, 分别以质粒 PMD19-T + *vvlac1*<sup>-SP/+His-tag</sup> 和 PMD19-T + *vvlac6*<sup>-SP/+His-tag</sup> 为模板进行 PCR 扩增。对扩增产物

和表达载体 pPIC9K 进行 *EcoRI/NotI* 双酶切处理, 凝胶纯化后, 用 TaKaRa DNA Ligation Kit 进行过夜连接反应, 最终获得表达质粒 pPIC9K-rbvvlac1 和 pPIC9K-rbvvlac6。

## 1.8 阳性重组子筛选

参照李剑凤等<sup>[19]</sup>所用的方法进行。即将质粒 pPIC9K-rbvvlac1、pPIC9K-rbvvlac6 及空白对照载体 pPIC9K 用 *SalI* 酶线性化, 凝胶纯化后的线性化 DNA 通过电击转化到新鲜制备的 *P. pastoris* GS115 感受态细胞中; 将转化产物涂布到 MD 平板上, 于 30℃ 培养以筛选 His<sup>+</sup> 转化子。随机挑取 200 个 His<sup>+</sup> 转化子, 接种到 BMM 平板上(含 0.3 × 10<sup>-3</sup> mol/L CuSO<sub>4</sub> 和 0.2 × 10<sup>-3</sup> mol/L ABTS (2, 2'-连氨基-双-[β-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]), pH 6.0), 于 28℃ 培养, 每隔 24 h 添加 100 μL 甲醇, 直至目标克隆周围出现漆酶氧化特征色。随机挑取 10-15 个周围出现漆酶氧化特征色的转化子, 以 pPIC9K / GS115 为空白对照, 破壁处理后作为模板, 利用 pPIC9K 特异性引物 factor 和 3' AOX (表 1) 进行 PCR 扩增并测序鉴定, 鉴定正确的转化子分别命名为 pPIC9K-rbvvlac1/GS115 和 pPIC9K-rbvvlac6/GS115。

对周围具有漆酶氧化特性且测序鉴定正确的重

组子进行蛋白表达的 Western blot 检测。具体方法为把 pPIC9K-*rbvvlac1*/GS115 和 pPIC9K-*rbvvlac6*/GS115 单菌落分别接种到 100 mL BMG 培养液 (1000 mL 三角瓶) 中, 于 28℃、220 r/min 培养 16 - 18 h 至  $OD_{600} \approx 4$ ; 离心获得菌体, 用 BMM 培养基重悬, 然后转接到 100 mL BMM 培养液【含  $0.3 \times 10^{-3}$  mol/L  $CuSO_4$  和 0.8% (M/V) 丙氨酸, pH6.0, 1000 mL 三角瓶】中, 调整  $OD_{600} \approx 2$ , 于 20℃、200 r/min 开始诱导; 每隔 24 h 添加甲醇至终浓度为 0.5%, 诱导 96 h; 离心收集上清液, 取 20  $\mu$ L, 用 12% 聚丙烯酰胺胶进行蛋白分离, 以 200 mA 电流把胶中蛋白转移到 PVDF 膜, 转膜时间为 65 min; 将转膜后的 PVDF 膜用脱脂奶粉室温封闭 2 h, 再用组氨酸抗体 (1:2000) 于 4℃ 孵育过夜; 用羊抗鼠二抗 (1:4000) 孵育 1 h, DAB 显色, 检测条带大小及浓度。其中组氨酸抗体和羊抗鼠二抗均由碧云天 (Beyotime) 生物技术研究所合成。

### 1.9 重组蛋白的纯化及酶活测定

取 100 mL 经 Western blot 检测显示具有最高浓度条带的上清液, 缓慢注入经 100 mL pH7.5 的 50 mmol/L PBS 缓冲液平衡后的 Ni 柱中; 再次用 100 mL pH7.5 的 50 mmol/L PBS 缓冲液对 Ni 柱进行平衡; 分别用含 50、100、150、200、300 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液 (pH7.4) 进行梯度洗脱, 并收集洗脱液; 对蛋白洗脱液等进行 SDS-PAGE 银染检测, 银染过程利用 Protein Stains Q 快速银染试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 并参照其说明书进行。

取上述洗脱液进行酶活检测。酶活检测方法采用 ABTS 法, 3.0 mL 反应体系中含 2 mL 0.1 mol/L pH5.0 醋酸钠缓冲溶液、0.5 mL 0.03% (W/V) ABTS 溶液和 0.5 mL 酶液。30℃ 避光保温 3 min, 测定反应液在 420 nm 处吸光度的变化。以 100℃ 煮

沸 15 min 的酶液作为对照。定义每分钟催化 1  $\mu$ mol ABTS 氧化所需酶量为 1 个酶活力单位 (U)。运用以下公式 (1) 计算漆酶酶活。

$$U = \frac{\Delta OD \times V_1}{T \times V_2 \times \epsilon} \quad \text{公式 (1)}$$

$V_1$  = 反应体系的总体积;  $V_2$  = 酶液的体积;  $\epsilon$  = ABTS 在 420 nm 处的摩尔吸光系数;  $T = 1$  min;  $\Delta OD = 1$  min 中内吸光度的变化。

## 2 结果

### 2.1 *Vv-lac1* 和 *vv-lac6* 基因的序列特征

利用 RACE 技术获取的 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的全长 cDNA 序列的长度分别为 1599 bp 和 1554 bp, 分别是其 DNA 序列长度的 52.8% 和 61.2%。将二者的 DNA 序列与它们相对应的全长 cDNA 序列 [GenBank No.: KF944449 (*vv-lac1*) 和 KF944450 (*vv-lac6*)] 进行对比, 结果显示 *Vv-lac1* 和 *vv-lac6* 分别含有 19 和 15 个外显子 (表 2), 与已报道的基因结构一致<sup>[15]</sup>。根据蛋白序列预测结果, VV-LAC1 和 VV-LAC6 的蛋白序列的理论分子量分别是 57.3 kDa 和 56.3 kDa (不考虑翻译后修饰) 和理论等电点分别为 4.73 和 5.62, 其信号肽序列裂解位点分别位于 N 端的第 32 和 33 个氨基酸之间及第 18 和 19 个氨基酸之间 (表 2), 也即 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的全长 cDNA 序列中编码信号肽的序列分别为位于 5' 端的长度 96 bp 和 54 bp 的 DNA 片段。以上特点均是典型的漆酶蛋白所具有的, 同时也说明这 2 个基因序列特征差异较大, 但可能都是分泌型蛋白, 而这 2 个蛋白质被亚细胞定位在胞外 (表 2), 预示着这 2 个基因编码的蛋白都分泌到细胞外起作用, 这些生物信息学分析为揭示其功能提供了线索。

表 2. *Vv-lac1* 和 *vv-lac6* 基因结构与蛋白性质

Table 2. Gene structures of *vv-lac1* and *vv-lac6* and characterization of theirs encoded proteins

gene name	distribution of exons	number of amino acids <sup>a</sup>	molecular weight/ kDa <sup>a,b</sup>	isoelectric point <sup>a,b</sup>	cleavage site of signal peptide <sup>a,c</sup>	subcellular localization <sup>a,d</sup>
<i>vv-lac1</i>		533	57.3	4.73	between No. 32 and No. 33 amino acids: AQA-SP	extracellular
<i>vv-lac6</i>		518	56.3	5.62	between No. 18 and No. 33 amino acids: SAA-SL	extracellular

a: Proteins encoded by *vv-lac1* and *vv-lac6*. b: Predicted by ProtParam tool and the predicted proteins have not been modified by posttranslational modification, such as glycosylation. c: Predicted by SignalP4.0 software. d: Predicted by Target P1.1 software.

## 2.2 *Vv-lac1* 和 *vv-lac6* 基因在毕赤酵母中的表达

*Vv-lac1* 和 *vv-lac6* 的全长 cDNA 在经过去除编码信号肽的序列、添加 His-tag 及 *EcoRI* 和 *NotI* 酶切位点后分别被成功克隆到表达载体 pPIC9K 中形成表达质粒 pPIC9K-*rbvvlac1* 和 pPIC9K-*rbvvlac6*, 这类表达质粒能够利用 pPIC9K 上的  $\alpha$  信号肽把重组蛋白有效分泌出去, 同时分泌的重组蛋白的 C 端带有的 His-tag 有利于后续蛋白分离纯化。

把表达质粒 pPIC9K-*rbvvlac1* 和 pPIC9K-*rbvvlac6* 转化到 *P. pastoris* GS115 感受态细胞后, 在 MD 平板上筛选 His<sup>+</sup> 克隆转化子, 计算得出其转化效率约为每 ng 质粒能够得到 62 个转化子。随机转接的 200 个 His<sup>+</sup> 转化子到 BMM (含 ABTS) 平板上, 在 48 h 内, 约 90% 的转化子周围有漆酶氧化底物 ABTS 的特征色生成, 而空白对照为阴性, 这一结果初步证明目标转化子能够分泌性表达活性漆酶蛋白。

从上述对漆酶氧化底物 ABTS 反应为阳性的 pPIC9K-*rbvvlac1* 和 pPIC9K-*rbvvlac6* 转化子中分别挑选 10 个菌落, 进行 PCR 扩增及测序验证, 结果表明有 16 个转化子中序列是完全正确的, 即 8 个 pPIC9K-*rbvvlac1*/GS115 和 8 个 pPIC9K-*rbvvlac6*/GS115。对这 16 个转化子进行诱导表达后, 其胞外蛋白经 Western blot 的验证显示, 在大于蛋白理论分子量 57.3 kDa 和 56.3 kDa 的范围内能够检测到目的蛋白, 其分子量在 70 kDa 左右 (图 1), 造成蛋白分子量增大的原因可能是漆酶蛋白翻译后修饰, 即漆酶蛋白糖基化<sup>[5]</sup>, 另外其所携带的 His-tag 标签也能够导致分子量增大。Western blot 的结果还显示 pPIC9K-*rbvvlac1*/GS115-3 菌株和 pPIC9K-*rbvvlac6*/GS115-4 菌株的重组蛋白条带浓度最高 (图 1), 说明这 2 个重组子表达及分泌重组蛋白的效率较高。

## 2.3 *Vv-lac1* 和 *vv-lac6* 重组蛋白的分离及漆酶活性

含有不同咪唑浓度 (50、100、150、200、300 mmol/L) 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 对镍柱中的重组蛋白 RBvvlac1 和 RBvvlac6 进行梯度洗脱后, 洗脱液经 SDS-PAGE 银染检测, 结果显示这 5 种浓度的咪唑缓冲液均能够洗脱该重组蛋白, 含有 50 和 100 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱下来的蛋白有较多杂带, 含有 150、200、300 mol/L 咪唑的缓冲液洗脱下来的蛋白条带较为单一 (图 2), 说明后 3 种咪唑浓度的缓冲液洗脱下来的蛋白比较纯净。

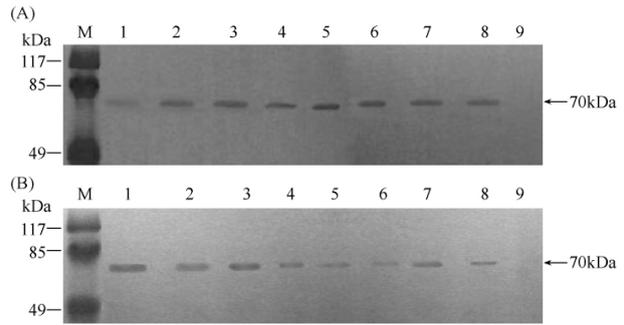


图 1. Western blot 检测 pPIC9K-*rbvvlac1*/GS115 (A) 和 pPIC9K-*rbvvlac6*/GS115 (B) 表达的重组蛋白

Figure 1. Western blot analysis of the recombinant proteins expressed by pPIC9K-*rbvvlac1*/GS115 (A) and pPIC9K-*rbvvlac6*/GS115 (B). M. Protein marker; lane 9. Negative control, pPIC9K/GS115 yeast transformant. A: lane 1-8. Yeast transformants pPIC9K-*rbvvlac1*/GS115-1,2,3...8; B: lane 1-8. Yeast transformants pPIC9K-*rbvvlac6*/GS115-1,2,3...8.

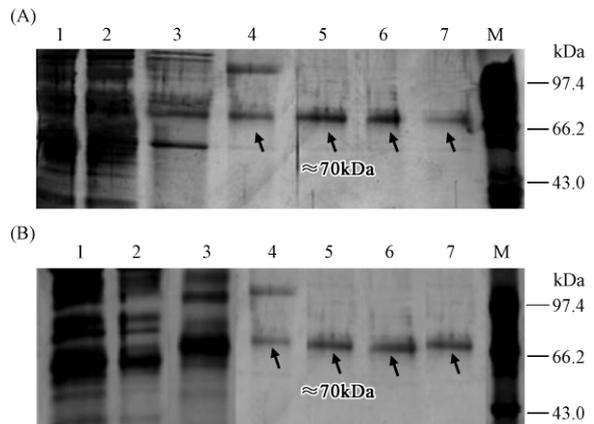


图 2. SDS-PAGE 银染检测纯化的 RBvvlac1 (A) 和 RBvvlac6 (B)

Figure 2. Silver staining of SDS-PAGE gel for detecting the isolated RBvvlac1 (A) and RBvvlac6 (B). The recombinant proteins were indicated by the arrows. Lane 1. Supernatant; lane 2. cellular content of yeast transformants; lane 3. Proteins isolated by 50 mmol/L imidazole eluent; lane 4. Proteins isolated by 100 mmol/L imidazole eluent; lane 5. Proteins isolated by 150 mmol/L imidazole eluent; lane 6. Proteins isolated by 200 mmol/L imidazole eluent; lane 7. Proteins isolated by 300 mmol/L imidazole eluent; M. Protein marker.

采用 ABTS 法在 30°C 下对含有咪唑的缓冲液 (pH 7.4) 洗脱下来的蛋白溶液进行酶活测定, 以未经纯化的粗酶液中漆酶活性作为对照。结果显示含有 150 mmol/L 咪唑的缓冲液洗脱下来的蛋白溶液具有最高漆酶活性 (333.17 U/L 和 227.63 U/L), 分别是 RBvvlac1 和 RBvvlac6 的粗酶液中漆酶比活

力 (363.46 U/L 和 371.96 U/L) 的 91.6% 和 61.2%, 说明这一缓冲液对粗酶液的纯化效果较好。

结果还显示 (表 3), 高浓度的咪唑 (200、300 mmol/L) 可能会造成重组蛋白漆酶活性的丧失。

表 3. 重组蛋白 RBvvlac1 和 RBvvlac6 的漆酶活力

Table 3. Laccase activity of RBvvlac1 and RBvvlac6

protein name	$\Delta A^a$	$\Delta A / [c(\text{imidazole eluents}) / (\text{mmol/L})]^b$					specific activity / (U/L) <sup>a</sup>					[specific activity / (U/L)] / [c(imidazole eluents) / (mmol/L)] <sup>b</sup>				
		0.038/50	0.055/100	0.060/150	0/200	0/300	363.46	210.93/50	305.32/100	333.17/150	0/200	0/300	138.81/50	122.17/100	227.63/150	0/200
RBvvlac1	0.066															
RBvvlac6	0.067															

a: Proteins in culture solution; b: Isolated proteins in different concentrations of imidazole eluents which were used to wash the recombinant protein out from Ni columns.

### 3 讨论

本研究首次对草菇漆酶基因进行了异源表达及重组蛋白的纯化, 成功克隆了 3 个典型草菇漆酶基因 *vv-lac1* 与 *vv-lac6* 的全长 cDNA 片段, 获得了 2 个有活性的草菇漆酶重组蛋白, 初步建立起草菇漆酶基因的异源表达及重组蛋白纯化体系。根据草菇全基因组序列我们得到了 *vv-lac1* 与 *vv-lac6* 的 DNA 序列, 但是由于这 2 个基因中含有内含子, 通过生物信息学手段预测的编码蛋白序列不一定准确, 从而影响揭示这 2 个基因的序列特征及其异源表达的蛋白特性。为此本研究采用 RACE 技术获得了这 2 个基因全长的 cDNA 序列, 翻译得到准确的蛋白编码序列。通过序列比较分析确定了其外显子和内含子的数目及分布 (表 2)。草菇 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 基因属于不同的 2 个家族, 具有不同的特性, 如外显子编码氨基酸序列的相似性和内含子位置的一致性<sup>[15]</sup>, 因此 *vv-lac1* 和 *vv-lac6* 基因是草菇基因组中 2 个典型的、具有代表性的漆酶基因。

利用酵母表达系统进行漆酶基因的异源表达的报道很多<sup>[20]</sup>, 主要是因为真菌漆酶较为复杂, 是一种含铜的多酚氧化酶, 多数是分泌型蛋白, 且存在翻译后修饰-糖基化<sup>[5]</sup>, 而酵母表达系统具有分子遗传操作容易、能够对重组蛋白进行翻译后的加工修饰和分泌表达、具备完善的发酵方法、重组蛋白表达量高等特点而被广泛使用<sup>[21-22]</sup>。本研究以 pPIC9K 为表达载体, 以 *P. pastoris* 为宿主, 利用载体上的  $\alpha$  信号肽在毕赤酵母中进行了分泌表达。通过 ABTS 筛选、PCR 扩增、测序验证及 Western blot 的筛选验证, 不仅排除了假阳性转化子, 得到正确的阳性转化子, 而且证实了这些阳性转化子表达的重组蛋白能够分泌到胞外, 说明了 pPIC9K 上  $\alpha$  信号肽的有效性。而这些转化子表达的重组蛋白, 经纯化后表现出漆酶活性, 说明了预测的信号肽编码序列的去除及 his-tag 的添加方式没有造成重组蛋白漆酶活性的丧失, 证明所用

的表达与纯化体系的有效性, 同时明确证实了基因 *vv-lac1* 与 *vv-lac6* 能够编码分泌到胞外的漆酶蛋白。

但是在 RBvvlac1 和 RBvvlac6 重组漆酶蛋白的分离过程中, 利用高浓度咪唑洗脱下来的漆酶重组蛋白虽然很纯净, 但却没有检测到漆酶活性, 可能的原因是高浓度的咪唑使漆酶蛋白失去铜离子。漆酶是一类含铜的蛋白, 含有 4 个保守的铜离子结合的位点且结合铜离子后才具有漆酶的活性<sup>[5]</sup>, 而咪唑是在重组蛋白纯化中被广泛使用的洗脱试剂, 但是它能够与铜离子结合形成配合物<sup>[23-24]</sup>, 由此推测咪唑具有和漆酶蛋白竞争铜离子的能力, 当咪唑浓度达到一定程度时可以使得绝大多数漆酶蛋白失去铜离子, 从而丧失漆酶活性。而低浓度的咪唑不足以使得所有漆酶蛋白失去铜离子。因此, 在以后对重组漆酶的纯化中, 要充分考虑咪唑浓度造成的影响, 优化咪唑的浓度, 或者用其它试剂代替咪唑。

在本研究中, 对 RBvvlac1 和 RBvvlac6 这 2 个重组蛋白进行纯化后, 其漆酶活性都有不同程度的下降, 一方面可能是因为纯化柱中仍有一部分重组蛋白没有被洗脱下来, 另一方面可能是因为咪唑使得部分重组蛋白失去铜离子造成的。在相同条件下对这 2 个重组蛋白进行纯化的效果却差别较大 (表 3), 这可能是 RBvvlac1 和 RBvvlac6 对铜离子的结合力差别较大造成的。对铜离子结合能力较弱的重组蛋白 RBvvlac6 在咪唑作用下可能失去较多的铜离子, 进而丧失较多的漆酶活性。而在粗酶液中, 这 2 个重组蛋白的漆酶活性相差不大 (363.46 U/L 和 371.96 U/L), 其可能的原因是: 一方面编码这 2 个蛋白的漆酶基因共存于一个物种中, 其所编码的蛋白酶本身的酶活相差不大, 另一方面这 2 个重组蛋白所处的粗酶液中的环境 (温度, pH 等) 使得检测到的漆酶活性相差不大。如果改变这 2 个蛋白所处的环境, 即改变漆酶的反应条件, 那么其酶活可能会相差较大。这与这 2 个蛋白的酶学特性有关, 鉴于本文的主旨, 其酶学特性等将在后续研究中重点关注。

## 参考文献

- [1] Chang ST. Cultivation of *Volvariella* mushroom in Southeast Asia. *Mushroom Newsletter for the Tropics*, 1980, 1: 5-13.
- [2] Min H, Zhou X, Lin X, Li Q, Deng L. Primary screening test of *Volvaria volvacea* strain for high efficient utilization of lignin and hemicellulose. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 2008, 36 (23): 9947-9948. (in Chinese)  
 闵华, 周晓舟, 林贤普, 李钦芳, 邓玲姣. 高效利用木质素·半纤维素的草菇菌株初筛试验. *安徽农业科学*, 2008, 36 (23): 9947-9948.
- [3] Buswell JA, Cai YJ, Chang ST, Peberdy JF, Fu SY, Yu HS. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 1996, 12 (5): 537-542.
- [4] Chen S, Ma D, Ge W, Buswell JA. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. *FEMS Microbiology Letter*, 2003, 218 (1): 143-148.
- [5] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67 (3): 369-385.
- [6] Kilaru S, Hoegger PJ, Ku'eres U. The laccase multigene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Current Genetics*, 2006, 50 (1): 45-60.
- [7] Xiao YZ, Hong YZ, Li JF, Hang J, Tong PG, Fang W, Zhou CZ. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71 (4): 493-501.
- [8] Pezzella C, Autore F, Giardina P, Piscitelli A, Sannia G, Faraco V. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics*, 2009, 55 (1): 45-57.
- [9] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, 140 (1): 19-26.
- [10] Keum YS, Li QX. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, 2004, 56 (1): 23-30.
- [11] Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 66 (8): 3357-62.
- [12] Soden DM, O'Callaghan J, Dobson AD. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*, 2002, 148 (pt12): 4003-14.
- [13] Guo M, Pu J, Du L, Lu F, Bai D. Cloning of cDNA encoding laccase (Lcc1) from *Coriolus versicolor* and expression of the gene in *Pichia methanolica*. *Mycosystema*, 2005, 24 (2): 221-226. (in Chinese)  
 郭梅, 蒲军, 杜连祥, 路福平, 白东清. 杂色云芝漆酶基因(Lcc1)的克隆及在甲醇毕赤酵母中的表达. *菌物学报*, 2005, 24 (2): 221-226.
- [14] Zhang Y, Jiang Q, Jiang M, Ma L. Cloning of a laccase gene from *Flammulina velutipes* and study on its expression in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (6): 775-778. (in Chinese)  
 张银波, 姜琼, 江木兰, 马立新. 金针菇漆酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达研究. *微生物学报*, 2004, 44 (6): 775-778.
- [15] Bao DP, Gong M, Zheng HJ, Chen MJ, Zhang L, Wang H, Jiang JP, Wu L, Zhu YQ, Zhu G, Zhu Y, Li CH, Wang SY, Zhao Y, Zhao GP, Tan Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) Genome. *PLoS One*, 2013, 8 (3): e58294.
- [16] Chen S, Ge W, Buswell JA. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiology Letter*, 2004, 230 (2): 171-176.
- [17] Chen S, Ge W, Buswell JA. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom. *Volvariella volvacea*. *European Journal of Biochemistry*, 2004, 271 (2): 318-328.
- [18] Zhu G, Wu L, Chen M, Wang H, Tan Q, Bao D. The bioinformatic analysis and the gene expression and determination of enzyme activity of manganese peroxidase in *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 2013, 32 (5): 919-927. (in Chinese)  
 朱刚, 吴林, 陈明杰, 汪虹, 谭琦, 鲍大鹏. 草菇锰过氧化物酶生物信息学分析以及基因表达和酶活性的测定. *菌物学报*, 2013, 32 (5): 919-927.
- [19] Li J, Hong Y, Xiao Y. Cloning, sequence analysis and expression of anthranilate synthetase gene in *Corynebacterium pkinense*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47 (1): 54-58. (in Chinese)  
 李剑凤, 洪宇植, 肖亚中. 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. *微生物学报*, 2007, 47 (1): 54-58.
- [20] Liu Z, Guo L, Lin J. Advances in heterologous expression of fungal laccases. *China Biotechnology*, 2009, 29 (6): 135-142. (in Chinese)  
 刘志明, 郭丽琼, 林俊芳. 真菌漆酶异源表达研究进展. *中国生物工程杂志*, 2009, 29 (6): 135-142.
- [21] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression

in the methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24 (1) : 45-66.

- [22] B öer E, Steinborn G, Kunze G, Gellissen G. Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77 (3) : 513-523.
- [23] He S, Yang R, Wen K, Gu A, Shi Q, Wang Z, Yan C. Synthesis, crystal structure and thermal decomposition of Copper(II) complex with imidazole and 2-Oxo-propionic acid salicyloyl hydrazone. *Acta Chimica Sinica*, 2003, 61 (5) : 715-720. (in Chinese)

何水祥, 杨锐曹, 文凯, 顾爱萍, 史启祯, 王哲明, 严纯华. 铜(II)与咪唑及2-羧基丙酸水杨酰肼混配体配合物的合成、晶体结构及热分解研究. *化学学报*, 2003, 61 (5) : 715-720.

- [24] Zhao Y, Pang Z, Lu Y. Mechanism of film forming for imidazole and its derivatives on surface of copper. *Journal of Chemical Industry and Engineering*, 2004, 55 (4) : 659-663. (in Chinese)
- 赵永生, 庞正智, 卢艳华. 咪唑化合物在铜表面的成膜机理. *化工学报*, 2004, 55 (4) : 659-663.

## Cloning and heterologous expression of laccase genes *vv-lac1* and *vv-lac6* from *Volvaria volvacea*

Lin Wu<sup>1</sup>, Jinghui Yang<sup>1,2</sup>, Mingjie Chen<sup>1</sup>, Hong Wang<sup>1</sup>, Dapeng Bao<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization(South), Ministry of Agriculture, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China

<sup>2</sup>College of life science, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

**Abstract:** [Objective] To clone the full-length cDNAs of two laccase genes, *vv-lac1* and *vv-lac6*, from *Volvaria volvacea*, verify their encoded proteins with laccase activity and develop a heterologous expression and protein purification system for *V. volvacea* laccase genes. [Methods] The full-length cDNAs were cloned with rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology and carried out in silico analysis. After modified by removing the sequence encoding signal peptide and adding the sequence encoding His-tag at 3' ends, the cDNAs were cloned into pPIC9K vector. The resulting constructs were transformed into *Pichia pastoris* GS115 for heterologous expression. The recombinant proteins were purified with Ni columns and the laccase activity were detected with ABTS assay. [Results] The full-length cDNAs of *vv-lac1* and *vv-lac6* are 1,599 bp and 1,554 bp, and contain 19 and 15 exons, respectively. The predicted molecular weights of the proteins encoded by *vv-lac1* and *vv-lac6* are 57.3 kDa and 56.3 kDa, respectively. The predicted isoelectric points are 4.73 and 5.62, respectively. Both proteins are extracellular. The recombinant proteins RBvvlac1 and RBvvlac6 are 70kDa, which may be modified by posttranslational modification. The solutions of the two recombinant proteins eluted by 150 mmol/L imidazole eluent have the highest laccase activity levels (333.17 U/L and 227.63 U/L). [Conclusion] The proteins encoded by the laccase genes *vv-lac1* and *vv-lac6* from *V. volvacea* have laccase activity, the heterologous expression and protein purification system developed in this study is suitable for future studies of other laccase genes from *V. volvacea* or other fungi.

**Keywords:** *Volvaria volvacea*, laccase gene, heterologous expression, laccase activity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Key Agricultural Project of Science and Technology Bureau of Shanghai of China [(2011)1-2] and by the Science and Technology Development Fund of the Shanghai Academy of Agricultural Sciences of China [2013 (02)]

\* Corresponding author. Tel: +86-21-62200794; Fax: +86-21-62201337; E-mail: baodp@hotmail.com

Received: 19 October 2013 / Revised: 10 December 2013