

文章编号:1673-1689(2006)04-0043-04

粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达

谌斌^{1,2}, 唐雪明^{1*}, 沈微¹, 方惠英¹, 诸葛健^{1*}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验, 江苏 无锡 214036; 2. 广西师范大学 资源与环境学系, 广西 桂林 541004)

摘要: 采用连续延伸 PCR 方法克隆到粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)漆酶基因, 并将其克隆到表达载体 pPIC9k, 重组质粒经线性化、电激转化 *Pichia pastoris* KM71, 部分阳性克隆的 PCR 结果表明: 漆酶基因已整合到巴斯德毕赤酵母染色体上, 重组菌经甲醇诱导后 3~5 d 产漆酶量最高, 为 2~3 U/mL。

关键词: 粗糙脉孢菌; 漆酶; 连续延伸 PCR 方法; 巴斯德毕赤酵母

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

Cloning of a Laccase Gene from *Neurospora crassa* and Its Preliminary Expression in *Pichia pastoris*

CHEN Bin^{1,2}, TANG Xue-ming^{1*}, SHEN Wei¹, FANG Hui-ying¹, ZHUGE Jian^{1*}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. College of Resources and Environmental Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: A laccase gene (*lac*) from *Neurospora crassa* was cloned using successive PCR method. The gene, *lac*, was inserted into the expression vector pPIC9k, and then transformed into the *Pichia pastoris* KM71. PCR results indicated that the laccase gene from *Neurospora crassa* has been successfully integrated into the chromosome of *Pichia pastoris*. The highest laccase activity of the positive recombinant strain reached 2~3 U/mL by induction with methanol for 3~5 days.

Key words: *Neurospora crassa*; laccase; a successive PCR method; *Pichia pastoris*

漆酶(laccase)又称苯二酚, 是一类含铜的多酚氧化酶(EC1. 10. 3. 2), 它具有广泛的底物作用范围, 可以氧化降解单酚、邻苯二酚和对苯二酚在内的多种酚类化合物及其衍生物, 也可以氧化降解一

些不含酚羟基的酚类类似物^[1-2], 应用涉及生物、化学、物理、医学、环境等多个领域, 特别是由于漆酶有宽广的底物专一性, 在制浆造纸废水处理及生物漂白、有毒环境污染物转化和能源开发等诸多领域

收稿日期: 2005-06-08; 修回日期: 2005-09-28.

基金项目: 教育部重点实验室开放基金项目(20040501); 江南大学海外人才引进专项基金项目(101000-21050436).

作者简介: 谌斌(1967-), 男, 广西桂林人, 发酵工程博士研究生; * 通讯作者.

具有潜在的应用价值,成为近年来倍受关注的环保友好材料^[3-5]。

漆酶最初发现于一种日本漆树的树液中,后来在真菌、细菌、昆虫中也有发现,其中真菌是自然界中最主要的漆酶生产者。有关真菌漆酶的研究主要集中在担子菌和子囊菌,目前从自然界中筛选新的高性能的产酶菌株仍是漆酶制备的主要途径,但是迄今为止尚未获得突破^[1]。粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)是一种很重要的研究微生物遗传学的模式子囊菌,是少数能产生漆酶的子囊菌,其产生的漆酶和大多数真菌漆酶的性质一样,即有较好的耐热性能,最适 pH 值偏酸性^[6]。粗糙脉孢菌漆酶是一种诱导型漆酶,其合成易受环境条件(特别是诱导物)的影响,在没有诱导剂的存在下,它几乎不产漆酶,在有诱导剂的存在下,它可以产生一定量的漆酶^[7-9]。作者尝试进行了粗糙脉孢菌漆酶合成的诱导研究,虽然经过 6~7 d 诱导培养后可得到 4~5 U/mL 的漆酶产量,但这一过程太长,培养时易被污染,很难工业化生产。而利用基因工程技术则有可能获得漆酶的高产菌株。作者通过连续延伸 PCR 技术从粗糙脉孢菌中扩增出漆酶基因,并在巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris*)中实现了初步表达。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

原始菌株:粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*):作者所在实验室保藏的野生型菌株;表达载体:pPIC9k(Invitrogen);宿主菌:巴斯德毕赤氏酵母(*Pichia pastoris* KM71)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109。

1.2 培养基

LB, YPD, YNB(Difco 酵母氮基 W/O, 不含 His, Trp, Met), YNBG 培养基(1.34% YNB 培养基, 2 g/dL 葡萄糖), MGY 培养基(1.34% YNB, 1% 甘油, 4×10^{-5} g/dL 生物素), MM 培养基(1.34% YNB, 0.5% 甲醇, 4×10^{-5} g/dL 生物素, 100 μ mol/L CuSO_4)。

1.3 试剂和仪器

愈创木酚(guaiacol)(美国 Sigma 公司产品), *pfu* DNA 聚合酶, *EcoR* I, *Not* I, *Sac* I(MBI 公司产品);其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。PCR 仪(BIOMETRA 公司制造),电泳仪(北京六一仪器厂制造),WFT7200 型可见分光光度计(尤尼柯上海有限公司制造),回转式恒温调速摇瓶柜

(上海欣蕊自动化设备有限公司制造),Mini Protein 电泳仪(BIO-RAD 公司制造),UVP 凝胶成像系统(英国 UVP 公司制造),电转化仪(Multiporator EPPENDORF 公司制造)。

1.4 重组菌构建

1.4.1 粗糙脉孢菌染色体 DNA 提取 参照文献^[10]的方法。

1.4.2 引物设计 根据粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中漆酶基因的 DNA 序列设计 6 条引物, B3 比 B2 多了一个 *Not* I 酶切位点, B1 与 A1、A1 与 A2、A2 与 A4 各有部分序列相互重叠,以利于片段延伸。具体序列分别如下:

B1: 5'-TACAAGCTCCACCCTCACCGAGACTGATAAC-3'(序列与外显子 1 的 5' 序列相同)

B2: 5'-TGCTCTACCACTTCATCTTCACCTCCCTCG-3'(序列与外显子 1 的 3' 序列互补)

B3: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCAATGCTCTACCACTTCATCTTCACCTCCCTC-3'(序列与外显子 1 的 3' 序列互补,划线部分为引入的 *Not* I 酶切位点)

A1:

5'-GACTATGAACTCGGAACTCCTAATACCGCAAGACCAGACGATACAAGCTCACCTCACCTCACCGAGACTG-3'(序列中 42 bp 与外显子 2 的 3' 序列相同, 25 bp 与外显子 1 的 5' 序列相同)

A2:

5'-GGCAGTGTGGTCTCCAGGATTCAACATCAACACCGACTATGAACTTGGTACTCCTAAT-3'(序列与外显子 2 的 3' 序列相同, 24 bp 与 A1 的相同)

A4:

5'-CCGGAATTCGGCGGAGGGGGTGGTTGCAACTCTCCTACTAATCGTCAGTGTGGTCT-3'(序列与外显子 2 的 3' 序列相同, 14 bp 与 A2 的相同,划线部分为引入的 *EcoR* I 酶切位点)

1.4.3 连续延伸 PCR 方法扩增粗糙脉孢菌的漆酶基因 连续延伸 PCR 方法扩增粗糙脉孢菌的漆酶基因见图 1。首先以粗糙脉孢菌染色体 DNA 为模板, B1、B2 为引物,常规 PCR 方法扩增出外显子 1;再以扩增到的外显子 1 为模板,先加入引物 B3、A1, 5 个循环后加入引物 B3、A2, 5 个循环后加入引物 B3、A4(浓度是前面引物的 2 倍),再经过 30 个循环后,扩增到了粗糙脉孢菌的漆酶基因。PCR 反应体系:同常规的 PCR 方法,只是加入引物 B3、A4

时每 50 μL 体系中补加 0.5 μL 的 *pfu*DNA 聚合酶;PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3min,(95 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s),经过 40 个循环后,于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

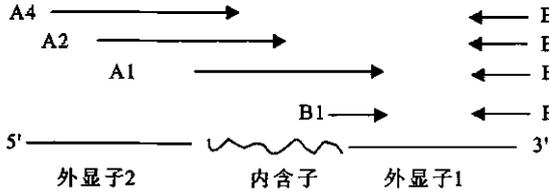


图1 连续延伸 PCR 方法扩增粗糙脉孢菌漆酶基因示意图

Fig.1 Cloning of Laccase gene of *N. crassa* by using successive PCR

1.4.4 构建重组表达载体 将 B3、A4 PCR 产物以 *EcoR* I、*Not* I 双酶切,回收约 1.71 kb 片段,与经相同处理的 pPIC9K 表达载体连接,转化到大肠杆菌 JM109 细胞中,在含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上筛选转化子,提取质粒,用 *EcoR* I、*Not* I 酶切鉴定,筛选出阳性转化子即重组表达载体 PIC9K-*lac*。

1.4.5 重组菌获得 重组表达载体经 *Sac* I 酶切后,电激转化毕赤酵母 KM71,筛选阳性转化子。pPIC9K 空表达载体经 *Sac* I 酶切后,电激转化毕赤酵母 KM71,筛选阳性转化子作为对照菌株。

1.5 漆酶的表达

将鉴定后的阳性转化子单菌落接种到 YPD 液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至稳定期;离心收集菌体,转入 MGY 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 48 h;离心收集菌体,转入 MM 培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养,每天补加一定量的甲醇进行诱导。

1.6 漆酶活性测定

以愈创木酚为底物,取 4 mL 含有 1 mmol/L 愈创木酚的 50 mmol/L 琥珀酸-氢氧化钠缓冲液(pH 4.5)和 1 mL 酶样液,混合均匀后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min,测 OD₄₆₅ 值。对照管中加 4 mL 不含底物的上述缓冲液和 1 mL 酶样液。愈创木酚的消光系数 $\epsilon = 12\,000\ \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。定义每分钟氧化 1 μmol 底物所需的酶量为一个酶活力单位(U)^[1]。

2 实验结果

2.1 重组表达载体 pPIC9K-*lac* 的构建

将引物 B3、A4 所扩增的 PCR 产物以 *EcoR* I、*Not* I 双酶切,回收约 1.71 kb 片段,插入表达载体 pPIC9K 多克隆位点中的 *EcoR* I、*Not* I 位点,获得

重组表达载体 pPIC9K/*lac*(见图 2)。*EcoR* I、*Not* I 双酶切鉴定出重组表达载体 pPIC9K/*lac*(见图 3)。

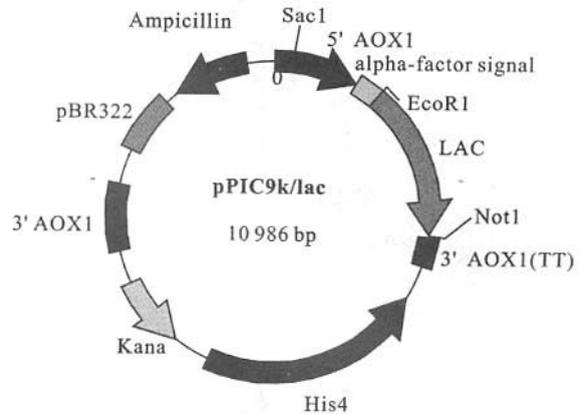
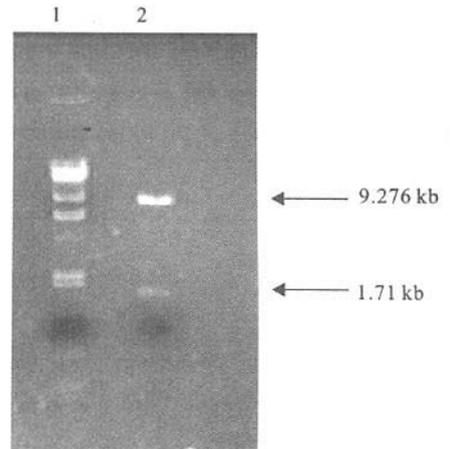


图2 重组表达载体 pPIC9K/*lac* 的构建

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pPIC9K/*lac*



1. λ -DNA/*Hind* III Marker;2. pPIC9K-*lac*/*EcoR* I、*Not* I

图3 重组表达载体 pPIC9K/*lac* 的酶切鉴定

Fig.3 Identification of pPIC9K/*lac* by digestion with endoenzymes

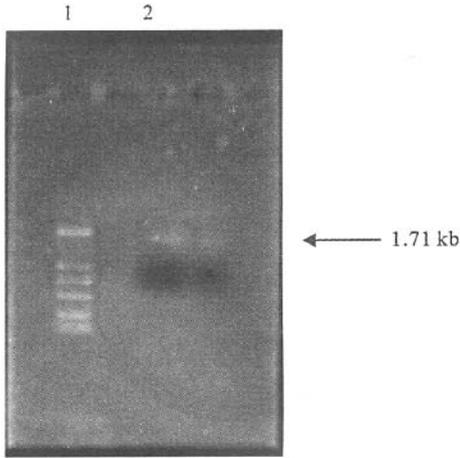
2.2 重组菌的构建与鉴定

用电转化方法分别将重组表达载体 pPIC9K/*lac* 和空载体 pPIC9K 转化到巴斯德毕赤氏酵母 *Pichia pastoris* KM71 中,在不含组氨酸的 YNBG 平板上各获得了几十个转化子。分离纯化后,用 PCR 方法对其中的一些菌株进行鉴定,见图 4。

2.3 重组菌的诱导表达

分别挑取 5 株含有重组表达载体 pPIC9K/*lac* 和 1 株含空载体 pPIC9K 的重组巴斯德毕赤氏酵母 *Pichia pastoris* KM71 进行培养,从诱导开始,每天测定漆酶酶活。从前者的发酵液中检测到漆酶酶活,空载体对照没有检测到漆酶酶活。测定的 5 株重组菌发酵液酶活为 2~3 U/mL(见表 1)。重组菌表达漆酶的蛋白质电泳图谱见图 5。重组菌发酵液

比空载体对照在66 200附近明显多出一条蛋白质条带,重组酶的相对分子质量大约为64 800。



1. DL 2000 III Marker; 2. PCR 鉴定结果

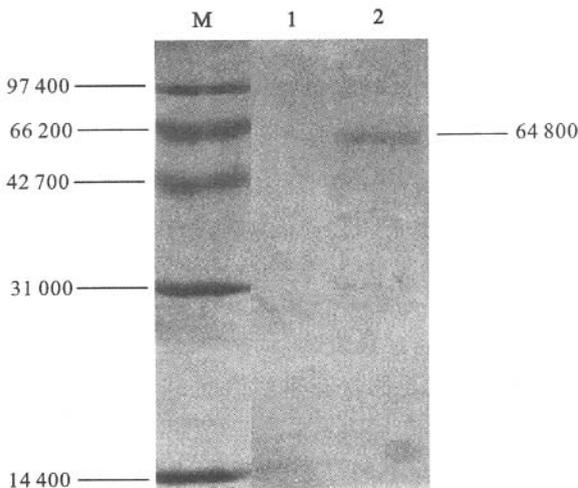
图4 PCR 鉴定 pPIC9k-lac 转化子

Fig. 4 Identification of recombinant pPIC9k/lac by PCR

表1 重组菌株产生的漆酶酶活

Tab. 1 Laccase activities of the recombinant strains

重组菌株编号	漆酶酶活/(U/mL)
对照(空载体)	0
RL-1	2.21
RL-2	2.52
RL-3	2.94
RL-4	2.47
RL-5	2.68



M. 相对分子质量标准; 1. 对照菌的发酵液; 2. 重组菌的发酵液

图5 重组菌表达漆酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant laccase

万方数据

3 讨论

Germann 等在 1986 年利用 RT-PCR 技术首先克隆了粗糙脉孢菌的漆酶基因,这也是第一个被克隆的真菌漆酶基因^[11],但 RNA 操作需要严格的实验室设备和操作技术,费用也不低,如果目的基因外显子数量不多,利用连续延伸 PCR 技术克隆基因就比较简便^[12-15],粗糙脉孢菌的漆酶基因仅有一个内含子,作者利用连续延伸 PCR 技术成功克隆出粗糙脉孢菌的漆酶基因,并在巴斯德毕赤氏酵母中实现了表达。

由于毕赤氏酵母没有天然质粒,故携带外源基因的载体 pPIC9K 是以同源重组的方式整合到毕赤氏酵母染色体上,可获得表达框稳定及多位点整合的重组菌。巴斯德毕赤氏酵母染色体上的 AOX1 和组氨酸脱氢酶(histidinol dehydrogenase, HIS4)基因位点都已成功用于表达外源蛋白质。由于外源基因酶切位点的限制,作者选用的是 KM71 的 HIS4 基因位点。

重组菌在甲醇诱导后 3~5 d 产漆酶量最高(2~3 U/mL),以后产酶量逐渐下降。与野生型粗糙脉孢菌相比,产酶量低(2 U/mL),但诱导时间缩短 3~4 d。本研究中重组菌初步发酵试验是在 250 mL 三角瓶中进行,装液量为 30 mL,如采取发酵罐优化工艺并实施高密度发酵,重组菌的产酶水平势必将进一步提高。

对全基因实施宿主偏好的密码子替换和改造是重组酶表达水平的一个重要措施,目前这已被认为是利用毕赤酵母进行工程菌构建的发展方向。已有研究者将植酸酶基因的编码区全部改造为酵母偏爱密码后,植酸酶基因的表达量大幅提高^[13]。本研究小组正利用毕赤酵母氨基酸密码子偏好表结合生物信息学技术对漆酶编码基因实施全程密码子替换,同时不改变基因的氨基酸顺序并保持能量平衡,以期获得高效表达的漆酶毕赤酵母基因工程菌。

(下转第 55 页)

参考文献:

- [1] 冯若,朱昌平,赵逸云,等. 双频正交辐照的声化学效应研究[J]. 科学通报,1997,42(9):925-928.
- [2] 蔡建秀,吴文珊,吴凌云,等. 22种药用蕨类植物的总黄酮含量研究[J]. 福建师范大学学报(自然科学版),2000,16(4):63-66.
- [3] 张冬冬,王春艳,解春华. 薄层析法测定黄花菜中黄酮成分[J]. 中国卫生检验杂志. 2002,12(8):445.
- [4] 曾里,夏之宁. 超声波和微波对中药提取的促进和影响[J]. 化学研究与应用,2002,14(3):245-249.
- [5] 季大洪,苏瑞强,王颖. 高新技术在中药提取分离中应用[J]. 时针国医国药,2000,11(4):369-370.
- [6] 郭孝武. 超声技术在中草药成分提取中的应用[J]. 中草药,1993,24(10):548-549.
- [7] 关崇新,回瑞华,侯冬岩. 从总黄芩中提取总黄酮的方法研究[J]. 鞍山师范学院学报,2000,2(4):87-90.
- [8] 孙波,彭密军,杨晓燕. 超声波提取杜仲叶的工艺研究[J]. 林产化学与工业,1999,19(3):67-70.
- [9] Sinisterra J V. Application of ultrasound to biotechnology:an overview[J]. *Ultrasonic*,1992,30(3):180-185.
- [10] Clark Chambers, Kim Exandi-Larsen, William E. Aqueous extraction of solubles from oranges: a kinetics study[J]. *Food Chemistry*,1996,59(4):483-486.

(责任编辑:朱明)

(上接第46页)

参考文献:

- [1] 肖亚中. 真菌漆酶研究[D]. 合肥:中国科技大学,2002.
- [2] 钆亚鹏,叶军,钱世钧. 担子菌组成型漆酶产生特性的研究[J]. 微生物学报,2000,40(6):628-632.
- [3] 郭梅,蒲军,路福平,等. 白腐菌漆酶特性及其应用前景[J]. 天津农学院学报,2004,11(3):44-47.
- [4] 曹治云,郑腾,谢必峰,等. 漆酶工业应用的研究进展[J]. 生物技术通讯,2004,15(4):414-416.
- [5] 钆亚鹏,钱世钧. 真菌漆酶及其应用[J]. 生物工程进展,2001,21(5):23-28.
- [6] Stanley C F, Karl-Erik E. Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase[J]. *J Bacteriol*,1974,120(1):458-465.
- [7] Gianna P, Paola G, Carmen B, et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* [J]. *Appl Environ Microbiol*,2000,66(3):920-924.
- [8] Petr B, Jiri G. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus* [J]. *FEMS Microbiol Lett*,2002,206:69-74.
- [9] Stanley C F, Karl-Erik E. Induction of *Neurospora crassa* laccase with protein synthesis inhibitors[J]. *J Bacteriol*,1974,120(1):458-465.
- [10] 周小玲,沈微,饶志明,等. 一种快速提取真菌染色体DNA的方法[J]. 微生物学通报,2004,31(4):89-92.
- [11] Germann U A, Lerch K. Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*; Amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1986,83:8854-8858.
- [12] 彭日荷,熊爱生,李贤,等. 苏云金芽孢杆菌 cryIA(c)Bt 基因的合成及其在大肠杆菌中稳定表达[J]. 生物化学与生物物理学报,2001,33(2):219-224.
- [13] 彭日荷,熊爱生,李贤,等. 应用毕氏酵母高效表达耐高温植酸酶[J]. 生物化学与生物物理学报,2002,34(6):725-730.
- [14] 彭日荷,熊爱生,李贤,等. 信号肽序列对毕赤酵母表达外源蛋白质的影响[J]. 生物化学与生物物理学报,2003,35(2):154-160.
- [15] 陆长梅,袁生,赵庆新. 用 Overlap-PCR 法从 *Trichoderma reesei* QM9414 基因组 DNA 中克隆并表达木聚糖酶 III [J]. 生物工程学报,2004,20(5):764-769.

(责任编辑:李春丽)