

一种真菌漆酶的克隆与序列分析

马文寅¹, 蔡宇杰^{*1}, 廖祥儒¹, 胡艳¹, 李枝玲², 张大兵²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏汉邦科技有限公司, 江苏 淮安 223001)

摘要: 比较了几种不同真菌 DNA 提取方法对血红密孔菌基因组的提取的影响, 根据 GenBank 中真菌漆酶氨基酸保守序列设计的简并引物, 以血红密孔菌基因组总 DNA 为模板, 扩增到一条长度为 1084 bp 的 DNA 片段。通过 BLAST 比对, 其基因序列与密孔菌属同源性最高, 为 99%, 氨基酸同源性为 88%, 说明扩增的片段确为密孔菌漆酶基因。

关键词: 漆酶; 克隆; 序列分析; 血红密孔菌

中图分类号: Q 814 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)01-040-07

Cloning and Sequencing Analysis of a Laccase Gene from Fungus

MA Wen-yin¹, CAI Yu-jie^{*1}, LIAO Xiang-ru¹, HU Yan¹, LI ZHI-ling², ZHANG Da-bing²

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Hanbon Science & Technology Co. Ltd, Huaian 223001, China)

Abstract: Effect of several different methods on the DNA extraction from *Pycnoporus sanguineus* were compared in this study. Degenerate primers were designed according to the fungal laccase condensation sequences which was registered on GenBank. A 1084bp laccase gene fragment was amplified by using genomic DNA from *Pycnoporus sanguineus* as template. According to the BLAST results, we found that the sequence presented a very high match with the laccase gene from *Pycnoporus* and shared considerable homology of above 99%. The alignment of amino acids shared considerable homology of above 88%. Therefore, the genomic DNA should be *Pycnoporus*.

Key words: laccase, cloning, sequence analysis, *Pycnoporus sanguineus*

漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是一种多酚氧化酶,最早是从漆树中发现的^[1]。漆酶广泛存在于真菌以及植物中,某些昆虫、细菌也能够分泌漆酶^[2],主要包括漆树漆酶(rhus lactase)和真菌漆酶(fungal lactase)两大类。漆酶可以氧化降解多酚类化合物及其衍生物,具有氧化与木质素有关的酚类和非酚类化合物以及高度难降解环境污染物的能力^[3],且作用范围较广。因此,它们在生物制浆,生

物漂白,芳香化合物脱毒,环境垃圾处理等^[4],以及生漆的干燥成膜和毛发染色、纸浆生产中木质素的降解、生物传感器、酶法免疫分析、有机合成、土壤修复等领域具有广泛的应用前景^[5]。白腐菌是真菌中漆酶主要的生产者^[6],但培养的过程中周期较长,在培养过程中容易被污染,不利于工业化生产^[7]。而且随着环境越来越受到人们的重视,漆酶的研究也越来越受到人们的关注。目前国内对漆

收稿日期: 2011-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(21045007); 江苏省科技创新与成果转化(重大科技支撑与自主创新)专项引导资金项目(BY2010117); 科技部科技人员服务企业项目(2009GJ10038)。

* 通信作者: 蔡宇杰(1973-),男,江苏无锡人,工学博士,副教授,主要从事生物分离技术研究。Email: yu_jie_cai@yahoo.com.cn

酶分子水平的研究还处于初步阶段,许多生理机制还不能够从分子水平对其进行合理的分析,因此,对漆酶在基因水平的研究也显得越来越重要。作者采用基因扩增的方法,从血红密孔菌基因组中成功克隆出漆酶的基因片段,对其进行了序列分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 血红密孔菌, *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1, 作者所在实验室保存。

1.1.2 试剂 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒:购自南京博飞科技有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP Mixture、Buffer、marker、PCR 产物纯化试剂盒:均购自宝生物(大连)有限公司;引物:南京金斯瑞生物有限公司合成;琼脂糖:进口分析纯;其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.3 仪器 超净工作台(SW-CJ-1FD):杭州齐威仪器有限公司产品;回转式恒温摇床(HZC-250):杰瑞尔电子有限公司产品;恒温培养箱(LHS-250 HC):江苏州江东精密仪器有限公司产品;基因扩增仪(TC-96/G/H(b)A):杭州博日科技有限公司产品;电泳仪,凝胶成像系统。

1.2 培养基及培养条件

发酵培养基(g/L):土豆 200,葡萄糖 20,愈创木酚 1 mL。121 °C 灭菌,pH 值自然。

菌丝收集:将菌种接种到 250 mL 摇瓶,装液量 50 mL,30 °C 培养 48 h。用质量分数 0.9% 的生理盐水洗涤数次,直至洗涤液呈无色,离心尽量除去上清液,收集菌体,-20 °C 保存。

1.3 基因组提取方法

分别采用 CTAB 法、植物提取方法、基因组试剂盒的方法提取基因组 DNA。

1.3.1 CTAB 法 参照 Guo 等^[8] 的方法。取 0.2 g 收集的菌体,加入液氮研磨至粉末,迅速转入 1.5 mL 的离心管中,并加入裂解液(质量分数 2% CTAB),65 °C 水浴 45 min,13 000 r/min 离心 10 min;取上清于一新的离心管中,加等体积的混合溶液 V(氯仿):V(异戊醇)=24:1,12 000 r/min 离心 10 min;取上清,加 2 倍体积的无水乙醇和 2 mol/L 的 NaCl 溶液,-20 °C 沉淀 30 min,12 000 r/min 离心 20 min;收集沉淀,体积分数 75% 乙醇溶液冲洗,洗涤时注意切勿将沉淀倒出,在超净工作

台中真空干燥;加入 100 μ L TE 缓冲液溶解 DNA,-20 °C 保存备用。

1.3.2 植物基因组提取方法 质量分数 2% CTAB 抽提缓冲液在 65 °C 水浴中预热;取少量菌体置于研钵中,液氮研磨至粉末转移至离心管中;加入 700 μ L 的质量分数 2% CTAB 抽提缓冲液,轻轻摇匀;置于 65 °C 水浴锅中保温,每隔 10 min 轻轻摇动几下,使混合均匀,30 min 后取出;冷却 2 min 后加入等体积的 V(氯仿):V(异戊醇)=24:1,振荡 2~3 min,使两者混合均匀;10 000 r/min 离心 10 min,与此同时,将 600 μ L 的异丙醇加入另一个新的离心管中;10 000 r/min 离心 1min 后,将上清液转入含有异丙醇的离心管中,上下摇动 30 s,使之充分混合;10 000 r/min 离心 1min 后,倒掉上清,注意勿将沉淀倒出;加入 800 μ L 体积分数 75% 的乙醇溶液洗涤沉淀;加入 50 μ L TE 缓冲液,溶解 DNA;置于-20 °C 保存备用^[9]。

1.3.3 试剂盒提取方法 参照试剂盒说明书进行操作。取不多于 50 g 悬浮培养的细胞,离心去除上清,液氮研磨,放入 1.5 mL 的离心管中(注意:样本的磨碎程度将影响裂解效果);加 400 μ L LE Buffer,并混合均匀,混合充分有助于裂解(可选:加入 4 μ L 的 100 mg/mL RNase A);与 65 °C 环境中温浴 15~30 min(温浴过程中可间或振荡离心管 2~3 次),然后移除(对于难裂解的样本可适当延长温浴时间);加入 130 μ L DA Buffer,混合均匀后于冰浴中放置 5 min;于 14 000 r/min 离心 3 min;将上清液转移到一个新的 1.5 mL 离心管;加入 750 μ L 或滤液体积 1.5 倍的 E Binding Buffer,并混合均匀;将混合液体转移至 Spin column;于 6 000 r/min 离心 1 min,并弃去接液管中的液体;由于混合液体体积大于 750 μ L,分两次离心过柱;向 Spin column 中加入 500 μ L 的 G Binding Buffer;于 10 000 r/min 离心 30 s,弃去接液管中液体;Spin column 中加入 600 μ L 的 Wash Buffer;于 10 000 r/min 离心 30 s,并弃去接液管中液体;上一步骤重复一次;再次将 Spin column 于 10 000 r/min 离心 1 min,并将 Spin column 转移至一个新的 1.5 mL 离心管;向 Spin column 中加入 100 μ L 至 200 μ L Elution Buffer,并于室温温浴 1 min;于 12 000 r/min 离心 1 min,并弃去 Spin column;1.5 mL 离心管液体含有 DNA;于-20 °C 保存。

1.4 PCR 扩增

1.4.1 引物设计 根据 GenBank 中漆酶的保守氨基酸序列, 采用 blastp 比对其同源性, 通过 Primer Premier 5 和 Oligo 7.0 软件设计一对简并引物, 上游引物: ATGTCCAGATTCC AATCTCTCC; 下游引物: GAGATCGCTGGGGTCCAAGTG。

1.4.2 PCR 扩增 以血红密孔菌基因组总 DNA 为模板, 进行 PCR 的扩增。反应体系 20 μL , 包括: PCR Buffer 2 μL ; Mg^{2+} 1.5 μL ; dNTPs 2.5 μL ; 上下游引物各 1 μL ; Taq DNA 聚合酶 0.2 μL ; DNA 模板 3 μL ; 加入 ddH₂O 至 20 μL 。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 34 个循环之后 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min。扩增反应结束后, 产物经体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4.3 进化树的构建 利用 Clustalx2.0 结合 MEGA5.0, 构建 *Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1 的系统发育树。首先将扩增得到的漆酶基因序列通过 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 寻找相似序列以进行同源分析。采用 Clustalx2.0 对在 NCBI 查找的具有同源性的漆酶基因序列进行多序列比对, 用 UltraEdit 进行序列调整, 采用软件 Mega5.0 用邻位相连法 (neighbor-joining, NJ) 构建 (Kimura 2-parameter distance calculation) 进化树。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果

用 3 种方法进行 DNA 的提取, 每个样品使用移液枪吸取 2 μL 进行凝胶电泳检测 (电压 80 V, 时间 40 min), 配制体积分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其结果, 结果如图 1 所示。从图中可以看出, 几种基因组提取的方法对 DNA 的提取效果并无明显的区别, 提取的 DNA 模板完全可以满足基因扩增的要求。采用试剂盒的方法提取, 与其他方法相比, 时间较短, 能够迅速地提取出 DNA 模板, 进入下一步实验; CTAB 法是由于真菌细胞结构与植物相似而借鉴的植物提取法, 因此两者提取方法大同小异。无论采用哪种方法, 对于菌体的处理都是首要的, 首先要研磨充分, 且要在研磨充分时及时加入裂解液, 使得释放的 DNA 及时溶解在裂解液中,

而不会遭到破坏^[10]。

如果需要提取较高纯度的模板, 可以对以上几种方法再进行改良加工, 加入 RNase A, 可以较好地除去 RNA 杂质。在提取或者纯化的过程中, 如在液氮研磨时, 若操作较剧烈, 易导致 DNA 的断裂, 因此要注意操作的温和性。

2.2 基因片段的扩增 采用简并引物扩增的基因片段, 用体积分数 1% 的凝胶电泳检测得到两条片段, 利用凝胶成像系统观察结果, 如图 2。将条带进行切胶回收, 经测序, 得到长度为 1 084 bp 的基因序列。将测序所得到的基因序列在 NCBI 上利用 blastn 进行基因序列比对, 发现该基因序列与密孔菌属的 *Pycnoporus coccineus* 和 *Pycnoporus sanguineus* 均有较高的同源性, 相似度最大达到 99%, 说明扩增得到的基因片段为密孔菌漆酶的基因序。



图 1 基因组 DNA
Fig. 1 Genomic DNA

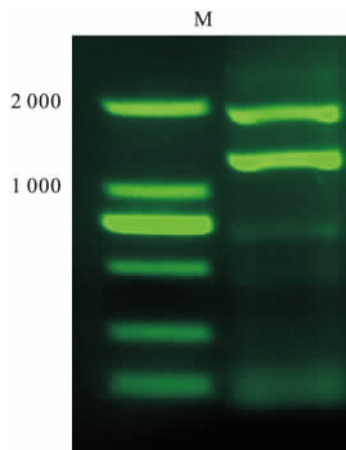


图 2 简并引物扩增基因片段
Fig. 2 Laccase gene fragment amplified

2.3 基因序列分析

经 DNAMAN 软件分析, 扩增的基因片段含有 1 084 个碱基, 编码 360 个氨基酸。利用 NCBI 上的 blastx 比对分析, 扩增出的基因片段编码的氨基酸序列与 *Pycnoporus coccineus* 相似, 同源性达到 88%, 与碱基序列比对结果一致。

表 1 扩增漆酶基因片段与其他真菌漆酶基因同源性比较

Tab. 1 Homology alignment of the amplified fragment and other fungi laccase genes

GenBank 登录号	来源	覆盖 率/%	相似 度/%
AB072704. 1	<i>Pycnoporus coccineus</i> lcc1	99	98
FJ858749. 1	<i>Pycnoporus sanguineus</i> strain BRFM 66	99	95
EU683253. 1	<i>Pycnoporus coccineus</i> strain MUCL 38527	68	99
EU678786. 1	<i>Pycnoporus sanguineus</i> strain CIRM-BRFM 542	68	99
EU683256. 1	<i>Pycnoporus sanguineus</i> strain IMB H2180	68	99
EU678784. 1	<i>Pycnoporus sanguineus</i> strain IMB W006-2	68	99
AY147188. 1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> laccase (Lcc1)	98	78
AF025481. 1	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> laccase (lcc3-1)	98	78

表 2 扩增漆酶基因片段与其他真菌漆酶氨基酸序列同源性比较

Tab. 2 Homology alignment of the amplified fragment and the amino acid sequences of other fungi laccase genes

GenBank 登录号	来源	覆盖 率/%	相似 度/%
AAQ12268. 1	laccase[<i>Trametes</i> sp. I-62]	79	81
AAQ12267. 1	laccase[<i>Trametes</i> sp. I-62]	79	81
BAB69776. 1	laccase[<i>Pycnoporus coccineus</i>]	88	100
BAB69775. 1	laccase[<i>Pycnoporus coccineus</i>]	88	100

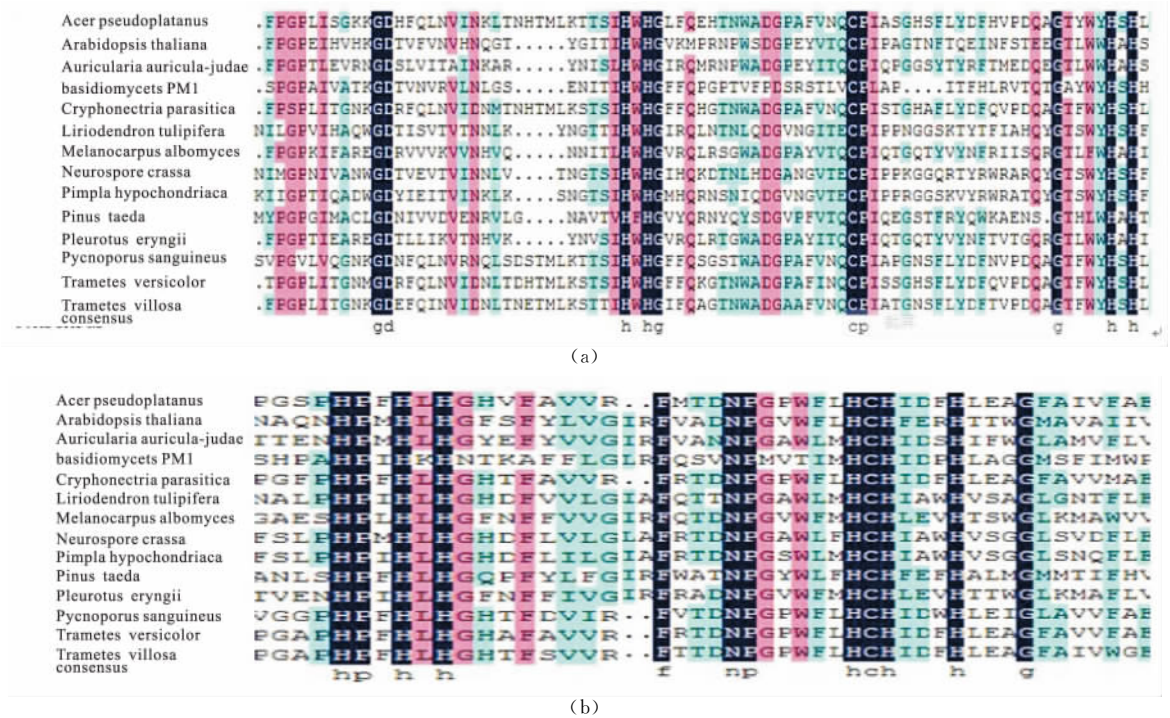


图 3 14 种不同来源漆酶氨基酸序列比对

Fig. 3 Homology alignment of the fourteen amino acid sequences

```

SYBC-L1      .GDRFQLNVIDNLNHTMLKTTISIVRNHFLTTIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAG
AAR20864.1   .GDRFQLNVIKLNHTMLKTTT.....IHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAG
AAR92463.1   .GDRFQLNVIKLNHTMLKTTT.....IHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAG
ACO51010.1   .GDRFQLNVIKLNHTMLKTTT.....IHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAG
ACZ37081.1   .GDRFQLNVIDNLNHTMLKTTT.....IHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAG
ACZ37083.1   .GDRFQLNVIDNLNHTMLKTTT.....IHWHGFFQHGNTWADGVSFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAG
Consensus    gd fqlnvi ltnhtmlkts          hwhg fq tnwadg f nqcpiasghsflydf vpdqag

```

(a)

```

SYBC-L1      EDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFESLVLTHLHPSIG.DHMTIIEADSVNTQPLEVDSIQIFA
AAR20864.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFEGANSTLINGIGRGHNMTIIEVDGVNSKPLTVDSIQIFA
AAR92463.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFEGANSTLINGIGRGHNMTIIEVDGVNSKPLTVDSIQIFA
ACO51010.1   NDDTVITLVDWYHVAAKVGPRFEGADSTLINGIGRGHNMTIIEVEGVNSKPLTVDSIQIFA
ACZ37081.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELGADTLINGIGRGHTMTIIEETDSVNTQPLEVDSIQIFA
ACZ37083.1   NDDTVITLVDWYHVAAKVGPRFEGADTLINGIGRGHTMTVIEADSVNTQPLEVDSIQIFA
Consensus    ddtvitl dwyh aak g fp          l g h mt ie vn pl vdsiqifa

```

(b)

图 4 来源于 *Pycnoporus sanguineus* 漆酶的氨基酸序列比对Fig. 4 Alignment of amino acid sequence of laccase from *Pycnoporus sanguineus*

```

SYBC-L1      ..GDRFQLNVIDNLNHTMLKTTISIVRNHFLTTIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGRGCGHM
ACG61170.1   .....HWHGFFQHGNTWADGVSFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHS
ACG75922.1   .....HWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHS
ACG75923.1   .....HWHGFFQHGNTWADGVSFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHS
ACH61789.1   .....HWHGFFQHGNTWADGVSFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHS
ACZ37082.1   QKGDRFQLNVIDNLNHTMLKTTI.....SIHWHGFFQHGNTWADGVSFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHS
BAB69775     QKGDRFQLNVIDNLNHTMLKTTI.....SIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHS
BAB69776     QKGDRFQLNVIDNLNHTMLKTTI.....SIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHS
Consensus    hwhgffqhgntwadg f nqcpiasghsflydfqvpdqag h

```

(a)

```

SYBC-L1      LEDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFESLMDLHTMTIIEADSVNTQPLEVDSIQIFAYV
ACG61170.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELSIDNHTMTVIEADSVNTQPLEVDSIQIFASQ
ACG75922.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELSIDGHTMTIIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQ
ACG75923.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELSIDGHTMTVIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQ
ACH61789.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELSIDGHTMTVIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQ
ACZ37082.1   NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELSIDGHTMTVIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQ
BAB69775     NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELSIDGHTMTIIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQ
BAB69776     NDDTVITLVDWYHVAAKLGPRFELSIDGHTMTIIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQ
Consensus    ddtvitl dwyhvaa lgprfp          d hmt ie adsv tqplevdsiqifa

```

(b)

图 5 来源于 *Pycnoporus coccineus* 漆酶的氨基酸序列比对Fig. 5 Alignment of amino acid sequence of laccase from *Pycnoporus coccineus*

```

SYBC-L1      ....GDRFQLNVIDNLNHTMLKTTISIVRNHFLTTIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGK
AAC39469.1   .GDRFQLNVIDNLNHTMLKTTI.....SIHWHGFFQHGNTWADGVSFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGI
AAD49218.1   .GDRFQLNVIKLNHTMLKTTI.....SIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGI
AAF13052.1   .GDRFQLNVIDQLNHTMLKTS.....SIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGI
AAG13724.1   .GDRFQLNVIDQLNHTMLKTS.....SIHWHGFFQHGNTWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGI
AAN71597.1   .GDRFQLNVIDNLNHTMLKTTI.....SIHWHGFFQHGNTWADGVSFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGI
Consensus    gd fqlnvi ltnhtmlkt          hwhg fq tnwadg f nqcpiasghsflydf vpdqag

```

图 6 来源于 *Pycnoporus cinnabarinus* 漆酶的氨基酸序列比对Fig. 6 Alignment of amino acid sequence of laccases from *Pycnoporus cinnabarinus*

漆酶一般含有 4 个铜离子,分别结合在 3 个高度保守的结合区域。根据光谱学特性,漆酶所包含的 4 个铜离子可以分为 3 类:Ⅰ类和Ⅱ类铜离子各一个,Ⅲ类铜离子两个。漆酶的来源不同,蛋白质也有很大差异,甚至来源相同的漆酶相对分子质量也会不同,但是结合铜离子的区域的同源性却很高,即铜原子连接的 1 个 Cys 和 10 个 His 及其周围的氨基酸残基都是很保守的。这些氨基酸都分布在含有两对 His 的 N 末端区域,或是分布于 C 末端的 Cys 和其余结合铜离子的 His 之间^[11]。

作者比对分析了 14 种漆酶的不同种属来源的漆酶氨基酸序列后发现,有 3 处较为保守的氨基酸序列,为漆酶的 4 个铜离子结合区域。其中-HWHG-是漆酶最为保守的氨基酸序列,不仅相同种属的这一序列同源性较高,且不同种属来源的漆酶也包含这一保守区域。这些保守的铜离子结合区域决定了酶的活性位点以及催化位点。

将克隆得到的密孔菌基因序列翻译成氨基酸序列后,与密孔菌属其他 3 种菌株作了序列比对,发现-LTNHTMLKTTS-、-HWHGLFTNWADG-、-NQCPASGHSFLYDF-在密孔菌属的 3 种菌的氨基酸序列中还是比较保守的,推测这 3 处保守序列不仅与漆酶的蛋白质的正确折叠有关,还与密孔菌属特有的催化活性或者底物特异性有关。白腐菌产生的漆酶具有降解废水中含酚化合物、苯氧基类

除草剂和石油工业废物等污染物的作用,可能与密孔菌属特异的保守序列有关。*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1 的稳定性较好,不仅在 pH 4.0~10.0 的范围内能保持较高的活性,而且能够在高温和低温下仍具有较好的催化活性。有机溶剂是通过介入酶蛋白的活性中心来影响酶的催化活性,*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1 对于有机溶剂的耐受性也比较较好。*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1 稳定的酶学性质是由它的基因序列决定的。

2.4 系统进化树分析

采用软件 Mega 5.0 用邻位相连法(neighbor-joining, NJ)构建进化树如图 7,可以看出,*Pycnoporus sanguineus* SYBC-L1 在遗传距离上与 *Trametes versicolor* 比较相近,而与 *Sporidiobolus salmonicolor* 较远。

对漆酶进行克隆以及序列分析,最终的目的是为了为了更好的实验基因的外源表达。而目前国内外对于漆酶的研究上都是在真菌方面。因此,表达载体一般就是巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)^[12-15]和甲醇毕赤酵母^[7,16]两种,使得漆酶的异源表达研究面较窄。基于漆酶在生物降解,环境保护等方面的重要作用,实现漆酶的高效表达具有重要的价值和意义,所以进一步加强对于漆酶分子水平的研究,使得漆酶更好地运用在环保方面,能够充分实现它的价值。

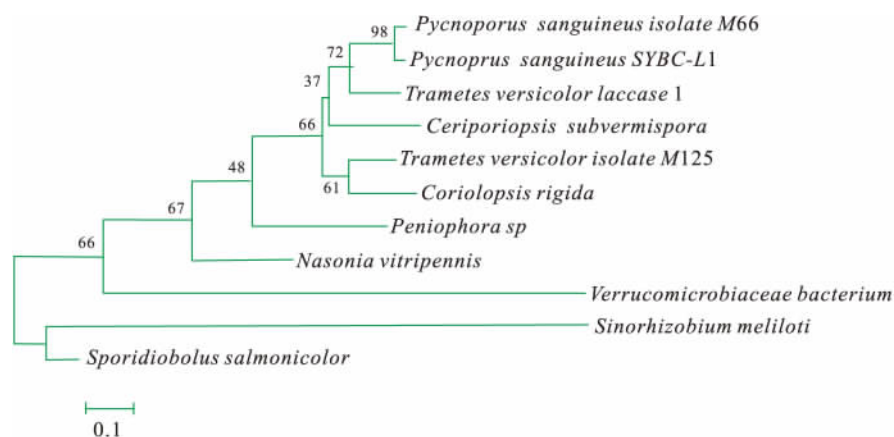


图 7 HJ 法构建扩增漆酶基因系统进化树

Fig. 7 Neighbor-joining tree of the amplified sequence

参考文献(References):

- [1] 王佳玲,余惠生.白腐菌漆酶的研究进展[J].微生物学通报,1998,25(4):233-236.

- WANG Gia-ling, YU Hui-sheng. The study progress on white rot fungi laccase[J]. **Microbiology**, 1998, 25(4): 233—236. (in Chinese)
- [2] Hahn MG. Microbial elicitors and their receptors in plants[J]. **Annu Rev Phytopathol**, 1996, 34: 387—412.
- [3] Susana R C, Jose L T H. Industrial and biotechnological applications of laccase: A review [J]. **Biotechnology Advances**, 2006, 24: 500—513.
- [4] 杨建强, 刘刚, 汤国营, 等. 改构的野生革耳漆酶基因在毕赤酵母中的表达和活性鉴定[J]. **生物技术通讯**, 2005, 16(3): 255—258.
- YANG Jian-qiang, LIU Gang, TANG Guo-ying, et al. Expression and purification of the modified gene of laccase from *Panus rudis* in *Pichia pastoris*[J]. **Letters in Biotechnology**, 2005, 16(3): 255—258. (in Chinese)
- [5] 堵国成, 赵政, 陈坚. 真菌漆酶的酶活测定及其在织物染料生物脱色中的应用[J]. **江南大学学报: 自然科学版**, 2003, 2(1): 83—90.
- DU Guo-cheng, ZHAO Zheng, CHEN Jian. Assaying fungal laccase activity and its application in bio-decolorization of the textile dyes [J]. **Journal of Southern Yangtze University: Natural Science Edition**, 2003, 2(1): 83—90. (in Chinese)
- [6] Giardina P, Annio R, Martirani L, et al. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*[J]. **Appl-Environ-Microbiol**, 1995, 61(6): 2408—2413.
- [7] 郭梅, 蒲军, 杜连祥, 等. 杂色云芝漆酶(Lcc1)的克隆及在甲醇毕赤酵母中的表达[J]. **菌物学报**, 2005, 24(2): 221—226.
- GUO Mei, PU Jun, DU Lian-xiang, et al. Cloning of cDNA encoding laccase (Lcc1) from *Coriolus versicolor* and expression of the gene in *Pichia Methanolica*[J]. **Mycosystema**, 2005, 24(2): 221—226. (in Chinese)
- [8] Guo L D, Hyde K D and Liew E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences[J]. **New Phytologist**, 2000, 147: 617—630.
- [9] Brook J, Frisch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [10] 张颖慧, 魏东盛, 邢来军, 等. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J]. **微生物学通报**, 2008, 35(3): 466—469.
- ZHANG Yin-hui, WEI Dong-sheng, Xing Lai-jun, et al. A modified method for isolating DNA from fungus[J]. **Microbiology**, 2008, 35(3): 466—469. (in Chinese)
- [11] 张敏, 肖亚中, 龚为民. 真菌漆酶的结构与功能[J]. **生物学杂志**, 2003, 20(5): 08—10.
- ZHANG Min, XIAO Ya-zhong, GONG Wei-ming. Advances on the structure and function of fungal laccase[J]. **Journal of Biology**, 2003, 20(5): 8—10. (in Chinese)
- [12] Colao M, Garzillo A, Buonocore V. Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from the basidiomycete *Trametes troglitii*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2003, 63(2): 153—158.
- [13] Kilaru S, Hoegger P J, Kues U. The laccase multi2 gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies[J]. **Curr Genet**, 2006, 50 (1): 45—60.
- [14] 湛斌, 唐雪明, 沈微, 等. 粗糙脉孢菌漆酶基因的克隆及在毕赤酵母中的初步表达[J]. **食品与生物技术学报**, 2006, 25(4): 43—46, 55.
- CHEN Bin, TANG Xue-ming, SHEN Wei, et al. Cloning of a laccase gene from *Neurospora crassa* and its preliminary expression in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(4): 43—46. (in Chinese)
- [15] 张银波, 江木兰, 胡小加, 等. 平菇漆酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究[J]. **微生物学报** 2005, 45(4): 625—629.
- ZHANG Yin-bo, JIANG Mu-lan, HU Xiao-jia, et al. Expression of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2005, 45(4): 625—629. (in Chinese)
- [16] 周宏敏, 洪宇植, 肖亚中, 等. 栓菌漆酶在毕赤酵母中高效表达及重组酶的性质[J]. **生物工程学报**, 2007, 23(6): 1055—1059.
- ZHOU Hong-min, HONG Yu-zhi, XIAO Ya-zhong, et al. High output of a *Trametes* laccase in *Pichia pastoris* and characterization of recombinant enzymes[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2007, 23(6): 1055—1059. (in Chinese)