

# 野生革耳菌漆酶 cDNA 在巴斯德毕赤酵母中的表达<sup>\*</sup>

张敏<sup>1,2</sup>, 肖亚中<sup>2</sup>, 余聪<sup>1</sup>, 龚为民<sup>1</sup>

(1. 中国科学技术大学生命科学学院, 中国科学院结构生物学开放实验室, 合肥 230026)

(2. 安徽大学生命科学学院微生物与基因技术实验室, 合肥 230039)

**摘要:** 将分离到的野生革耳菌(*Panus rudis*)漆酶的 cDNA 序列克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 上, 构建成受强启动子 AOX1 控制的重组表达载体. 重组质粒 DNA 经 BglII 线性化后, 电击转化毕赤酵母 GS115 细胞, 通过 G418 筛选和 PCR 鉴定的重组酵母在甲醇诱导后能分泌表达活性漆酶. 低温培养是该漆酶基因活性表达的必要条件. 培养基中添加 400  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{CuSO}_4$  最有利于漆酶的活性表达.

**关键词:** 野生革耳菌; 漆酶; cDNA 序列; 毕赤酵母; 表达

**中图分类号:** Q936

**文献标识码:** A

## 0 引言

漆酶(Laccase, 苯二酚:氧 氧化还原酶, EC 1. 10. 3. 2)是一种含铜的多酚氧化酶, 广泛地存在于真菌(尤其是白腐真菌)中, 与木质素的降解, 真菌的发育和形态发生(如孢子的产生、菌索和子实体的形成), 以及植物病原体的形成相关<sup>[1]</sup>. 真菌漆酶具有广泛的底物作用范围, 能氧化酚类和芳香类化合物, 在氧化还原介体存在的条件下, 真菌漆酶还能催化氧化一些非酚类和异生类物质<sup>[2]</sup>. 因此, 真菌漆酶不仅在木素的生物降解和制浆造纸中有重要应用前景<sup>[3,4]</sup>, 而且在化工染料脱色、芳香类污染物脱毒等方面也具有潜在应用价值<sup>[5~7]</sup>, 成为酶工程与环境保护交叉领域研究的热点.

由于天然野生型真菌的漆酶产量较低, 培养周期长, 有的还需要一些有毒的芳香类小分子化合物的诱导, 因而限制了真菌漆酶的大量生产和广泛应用. 建立有效的漆酶重组表达系统不仅可以大量生产漆酶蛋白, 为工业化生产和应用奠定基础, 而且还能通过点突变技术研究催化机理, 对漆酶蛋白进行改良(如扩大酶的 pH 适应范围, 提高酶的热稳定性和氧化还原电位). 巴斯德毕赤酵母表达系统作为一种操作简便的真核细胞表达系统, 具有外源蛋白表达量高, 可对表达蛋白进行加工和翻译后修饰(如糖基化, 二硫键形成等), 重组菌稳定性

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2003-12-16

基金项目: 中国科学院“百人计划”(30225015), 国家自然科学基金资助项目(30370045)和安徽省优秀青年基金资助项目(04043048).

作者简介: 张敏, 女, 1970 年出生, 博士生. 研究方向: 生物化学和分子生物学. E-mail: zhmin 07@ustc. edu.

好,适合高密度发酵等优点<sup>[8]</sup>.近年来已有一些不同来源的真菌漆酶基因在毕赤酵母中实现了异源表达,如 *Trametes versicolor* 漆酶<sup>[9,10]</sup>, *Pycnoporus cinnabarinus* 漆酶<sup>[11]</sup>,及 *Pleurotus sajor-caju* 漆酶<sup>[12]</sup>等.

在前期工作中,我们发现了野生革耳菌不需诱导就能产生较大量的漆酶,并且这种组成型漆酶具有较好的热稳定性和较高的比酶活<sup>[13]</sup>,是一种极具研究价值和开发潜力的真菌漆酶.通过 RT-PCR 分离出的该酶的 cDNA 序列(GenBank Accession No. AY439331),包括 1479bp,编码 493 个氨基酸的漆酶成熟蛋白.本文阐述了该 cDNA 序列在毕赤酵母中的活性表达.

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株,质粒和培养基

野生革耳菌(*Panus rudis*)购自中科院微生物所菌种保藏中心,在 4℃ 的 CPDA 培养基中保存.使用液体培养基见文献<sup>[13]</sup>.DNA 扩增用大肠杆菌 DH5 $\alpha$ .用于异源表达的酵母 *Pichia pastoris* GS115(*his4*)菌株和表达质粒 pPIC9K(Invitrogen)由徐冲老师惠赠.酵母完全培养基 YPD,选择培养基 MD,诱导培养基 BMGY/BMMY 按 Invitrogen 试剂盒操作手册配制.

### 1.2 酶与试剂

Taq DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶和限制性内切酶购自大连宝生物工程公司.质粒抽提和胶回收试剂盒为上海华舜公司产品.G418,YNB 购自上海生工生物工程公司.ABTS 为 Sigma 公司产品.实验用引物由上海生工生物工程公司合成.核酸序列由上海晶泰生物工程公司测定.

### 1.3 毕赤酵母表达载体的构建

用上游引物 5'-GACGAATTTCGCGATCGGGCCGGTGACGGAC-3' 和下游引物 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCGAGGGCGTCGCAGGTG-3'通过 PCR 反应对 pMD 18-T 载体上野生革耳菌漆酶 cDNA 序列进行扩增,同时在目标序列两端添加 EcoRI 和 Not I 酶切位点.PCR 反应步骤为:94℃,3 min;94℃,1 min,55℃,1 min,71℃,1.5 min,35 个循环;最后 71℃,10 min.胶回收 PCR 产物,用 EcoR I 和 NotI 双酶切,酶切产物与同样进行双酶切的酵母表达载体 pPIC9K 相连,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,筛选、培养转化子细胞,抽提重组质粒,进行酶切检测和测序鉴定.

### 1.4 毕赤酵母的转化和转化子的筛选鉴定

构建的重组表达载体 DNA 用 BglII 酶切线性化.毕赤酵母细胞 GS115 (*his4*)培养至 OD<sub>600</sub> = 1.3~1.5 时,4℃,1 500 g 离心 5 min,菌体细胞用 1 mol/L 山梨糖醇处理和重悬,与线性化重组表达载体 DNA 混合,电击转化,参数为电压 1 500 V,电容 25  $\mu$ F,电阻 200  $\Omega$ ,放电时间约 4 ms.电击后迅速加入 1 mL 冰冷的 1 mol/L 山梨糖醇,将细胞涂布于 MD 平板,30℃ 培养 3 天.将转化克隆转移到分别含有 0.5,1.0,2.0,3.0,4.0 mg/mL G418 的 YPD 平板上进行筛选培养.选择在 3.0 和 4.0 mg/mL G418(Geneticin)平板上存活的转化克隆,提取基因组 DNA,进行重组酵母的 PCR 鉴定.

### 1.5 重组酵母的培养及漆酶的生产

挑取 PCR 鉴定的重组酵母单克隆于 100 mL BMGY 培养基中 28℃,250 rpm 振荡培养

至  $OD_{600} = 6 \sim 10$ ,  $1\ 500\ g$  离心  $5\ min$ , 收集菌体细胞, 并将细胞重悬于  $20\ mL$  BMMY (含  $0.2\ mmol/L\ CuSO_4$ ) 培养基中, 在特定温度下,  $250\ rpm$  振荡培养, 每  $24$  小时向培养物中添加甲醇至终浓度  $2.5\%$ , 同时取样检测培养液中的生物量, 培养基的  $pH$  值和培养液上清中的漆酶活性. 用无外源基因的 pPIC9K 转化的酵母细胞做实验对照.

### 1.6 漆酶活性的测定

以 ABTS 为底物, 测定反应前  $3\ min$  内反应液在  $420\ nm$  处吸光值的增加. 反应液包括  $2\ mmol/L$  ABTS 和  $50\ mmol/L$  乙酸缓冲液 ( $pH\ 4.5$ ). ABTS 在  $420\ nm$  处的摩尔消光系数为  $36\ 000\ (mol^{-1} \cdot L)/cm$ . 测量值取三次平行实验的平均值.

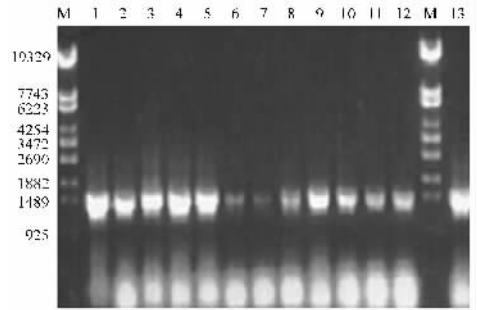
## 2 结果

### 2.1 野生革耳菌漆酶酵母表达载体 pPRL 的构建

将野生革耳菌漆酶 cDNA 序列插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 多克隆位点 EcoRI 和 NotI 之间, 酶切和序列测定结果表明漆酶 cDNA 序列与 pPIC9K 载体上  $\alpha$  因子信号肽融合后形成正确的阅读框架. 将构建的野生革耳菌漆酶的重组表达质粒命名为 pPRL.

### 2.2 毕赤酵母转化子的筛选与鉴定

将重组质粒 pPRL 用 BglII 线性化后, 通过电击法转化毕赤酵母 GS115 菌株, 在 MD 平板  $28\ ^\circ C$  培养三天后有多个单菌落出现. 经 G418 筛选后, 在  $3.0$  和  $4.0\ mg/mL$  G418 平板上得到  $12$  个单菌落. 提取重组酵母基因组 DNA, 进行 PCR 鉴定, 扩增得到目的条带 (图 1), 证明野生革耳菌漆酶的重组表达载体整合入酵母基因组 DNA 中.



(M: DNA 标准分子量, 1—12: 重组酵母克隆, 13: 重组质粒阳性对照)

图 1 重组毕赤酵母的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR analysis of *P. pastoris* integrants

### 2.3 野生革耳菌漆酶基因在重组酵母细胞中的活性表达

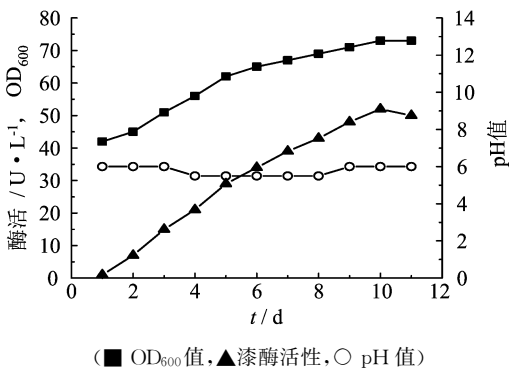


图 2 野生革耳菌漆酶在毕赤酵母中的活性表达

Fig. 2 The production of PrL in *P. pastoris* GS115

经 G418 筛选和 PCR 鉴定的重组酵母单克隆用用 BMGY/BMMY 培养基摇瓶培养, 甲醇诱导后, 培养液上清中有明显漆酶活性, 表明表达载体 pPIC9K 上酿酒酵母  $\alpha$  因子信号肽能有效引导野生革耳菌漆酶在毕赤酵母中的分泌表达. 从图 2 可以看出, 重组酵母在甲醇诱导后  $24$  小时即可在培养液上清中检测到漆酶活性. 随着诱导培养时间的增加, 漆酶活性逐渐升高, 到第  $10$  天达到峰值, 且培养液上清中的漆酶活性与酵母细胞的生物量具有明显的相关性. 重组酵母

培养过程中培养基的 pH 值始终维持在 5.5~6.0,表明 BMMY 培养基中 pH6.0 的磷酸缓冲液能有效地缓冲培养过程中 pH 值的变化. 对照菌培养液上清始终没有漆酶活性.

## 2.4 温度对野生革耳菌漆酶活性表达的影响

实验发现,温度是影响野生革耳菌漆酶在毕赤酵母中活性表达的重要因素(图 3). 在 28℃ 条件下,用 BMMY 培养基诱导培养时,几乎检测不到漆酶的 ABTS 活性;但在 20℃ 和 16℃ 条件下,培养液上清中的有明显漆酶活性,并且漆酶活性随着培养时间的增加而增加,最高酶活为 83U/L.

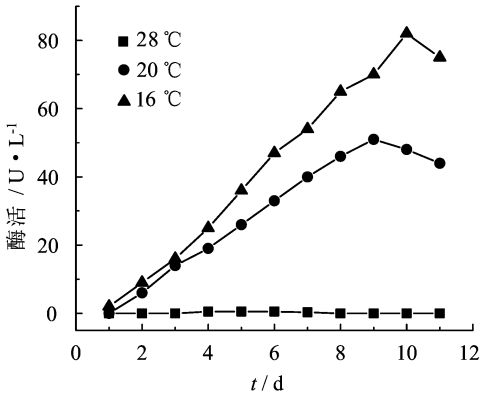


图 3 培养温度对野生革耳菌漆酶活性表达的影响

Fig. 3 The effects of temperature on PrL production by *P. pastoris*.

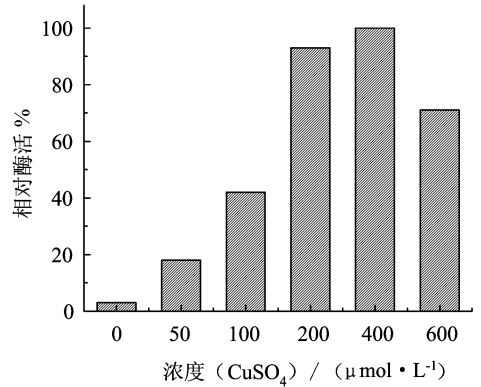


图 4 CuSO<sub>4</sub> 浓度对野生革耳菌漆酶活性表达的影响

Fig. 4 The effects of CuSO<sub>4</sub> concentration on PrL production by *P. pastoris*.

## 2.5 铜离子浓度对野生革耳菌漆酶活性表达的影响

漆酶是含铜的金属蛋白,培养基中添加一定浓度的外源铜对漆酶的活性表达也很重要. 不同浓度的外源铜离子对重组漆酶活性的影响也不同. 实验中发现(图 4),当培养基中 CuSO<sub>4</sub> 的浓度为 400 μmol/L 时,表达的重组漆酶活性最大.

## 3 讨论

真菌漆酶蛋白一般为 520~550 个氨基酸的多肽序列,其中 N 端为 16~23 个氨基酸的分泌信号肽序列. 目前已有数个不同来源的真菌漆酶基因在曲霉菌、毕赤酵母和酿酒酵母中得到了异源表达<sup>[9~12,14~17]</sup>.

温度对不同蛋白异源表达的影响是不同的. 通常情况下,毕赤酵母培养温度为 28~30℃,大多数漆酶蛋白在毕赤酵母中表达的培养温度也为 30℃<sup>[9,11,16]</sup>. 本文的研究发现诱导培养时的温度对野生革耳菌漆酶在毕赤酵母中的活性表达影响很大,低温培养有利于该蛋白的活性表达. 当诱导培养的温度为 28℃ 时,培养上清几乎检测不到漆酶活性;而在 16℃ 条件下,甲醇诱导后 24 小时即可检测到漆酶活性. 这种低温利于蛋白活性表达的情况与 *Trametes versicolor* 漆酶在酿酒酵母中表达的情况类似<sup>[15]</sup>. 毕赤酵母表达 *Pleurotus sajor-caju* 漆酶也是在较低的 20℃<sup>[12]</sup>. 这可能是由于培养温度影响了酵母菌合成蛋白的速率,蛋白酶对外源蛋白的降解活性,或表达产物的正确折叠和修饰(如糖基化,二硫键形成),以及表达产物的有效分泌等情况而造成的.

培养基的 pH 值也是影响毕赤酵母细胞表达外源蛋白的重要因素. 毕赤酵母在无缓冲液的培养基中培养时, 培养液的 pH 值会逐渐下降, 如何控制和保持酵母培养基合适的 pH 对漆酶的活性表达非常重要<sup>[12,16]</sup>. 如在培养基中添加 0.8% 的丙氨酸, 可以维持所需 pH 值 7 天以上, 表达的漆酶活性高, 持续时间长<sup>[10]</sup>. 本文的研究实验表明, 使用含有 pH 6.0 磷酸缓冲液的 BMMY 培养基可以有效地控制并维持发酵液 pH 值在 5.5~6.0 之间. 培养基的低 pH 值对于漆酶活性表达的影响一方面可能是由于漆酶容易受到酸性蛋白酶的降解作用, 另一方面可能也与漆酶本身的性质有关, 过酸的条件不利于漆酶活性的发挥.

漆酶属于蓝铜氧化酶, 4 个铜原子分别构成了漆酶的两个活性中心. 外源铜的存在不仅能提高漆酶的活性, 还有助于提高漆酶的稳定性<sup>[18]</sup>. 在毕赤酵母表达漆酶的过程中, 培养基中铜离子的浓度对漆酶的活性表达也有直接影响. 有研究表明, 培养基中铜离子浓度为 0.2 mmol/L 时, 活性漆酶的表达水平最高<sup>[10]</sup>. 铜离子浓度并不是影响重组漆酶的合成(转录和翻译水平), 而是直接影响活性漆酶蛋白的多少(活性和稳定性). 实验条件下, 当培养基中  $\text{CuSO}_4$  的浓度为 400  $\mu\text{mol/L}$  时, 重组野生革耳漆酶表达的水平最高.

目前, 大多数在毕赤酵母中得到活性表达的真菌漆酶表达量仍很有限, 摇瓶培养上清中的酶活水平约为 10~40 U/L (以 ABTS 为底物测活)<sup>[10~12,16~17]</sup>, 但在发酵罐高密度发酵条件下, *Trametes versicolor* 的漆酶 Lcc IV 在毕赤酵母中表达的酶活高达 1 500 U/L<sup>[9]</sup>. 利用蛋白酶缺陷型菌株, 根据酵母密码子偏好重新设计合成漆酶基因, 构建串联重复多拷贝基因, 以及高密度发酵等途径有望大幅度提高野生革耳菌漆酶在毕赤酵母中的活性表达水平.

### 参 考 文 献

- [1] Thurston C F. The structure and function of fungal laccase [J]. *Microbiology*. 1994, 140: 19-26.
- [2] Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002, 18: 169-171.
- [3] Eggert C, Temp U, Eriksson K-E L. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* [J]. *FEBS Letters*. 1997, 407: 89-92.
- [4] Srebotnik E, Hammel K E. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system [J]. *Journal of Biotechnology*. 2002, 81: 179-188.
- [5] WONG Yu-xing, Yu Jian. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes [J]. *Water Research*. 1999, 33: 3512-3520.
- [6] Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, 22: 335-341.
- [7] Pickard M A, Roman R, Tinoco R, *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase [J]. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65: 3805-3809.
- [8] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, 24: 45-66.
- [9] Brown M A, Zhao Z, Mauk A G. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase; laccase IV from *Trametes versicolor* [J]. *Inorganica Chimica Acta* 2002, 331: 232-238.
- [10] O'Callaghan J, O'Brien M M, Dobson A D W. Optimisation of the expression of a

- Trametes versicolor* laccase gene in *Pichia pastoris* [J]. Journal of industrial Microbiology and Biotechnology. 2002, 29: 55-59.
- [11] Otterbein L, Record E, Longhi S, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris* [J]. Eur. J. Biochem. 2000, 267: 1619-1625.
- [12] Soden D M, O'Callaghan J, Dobson A D W. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host [J]. Microbiology. 2002, 148: 4003-4014.
- [13] 张敏, 肖亚中, 王芳等. 野生革耳菌组成型漆酶的生成条件及性质研究[J]. 中国科学技术大学学报, 2002, 32(4): 462-469.
- [14] Record E, Punt P J, Chamkha M, et al. Expression of the *Pycnoporus cinnabarinus* laccase gene in *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme [J]. Eur. J. Biochem. 2002, 269: 602-609.
- [15] Cassland P, Jonsson L J. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature [J]. Appl Microbiol Biotechnol. 1999, 52: 393-400.
- [16] Jossion L J, Saloheimo M, Penttila M. Laccase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* cDNA cloning of lcc1 and expression in *Pichia pastoris* [J]. Curr Genet. 1997, 32: 425-430.
- [17] Gelo-pujic M, Kim H-H, Butlin N G, et al. Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris* [J]. Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65: 5515-5521.
- [18] Baldrian P, Gabriel J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus* [J]. FEMS Microbiol. Lett. 2002, 206: 69-74.

## Expression of cDNA of Laccase From *Panus Rudis* in *Pichia Pastoris*

ZHANG Min<sup>1,2</sup>, XIAO Ya-zhong<sup>2</sup>, YU Cong<sup>2</sup>, GONG Wei-min<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Sciences, USTC, Hefei 230026, China)

(2. School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China)

**Abstract:** A cDNA coding for laccase from *Panus rudis* was cloned into the vector pPIC9K for heterologous expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter. *Pichia pastoris* GS115 was transformed by the electroporation method with the recombinant plasmid DNA linearised with BglIII. After G418 screening and PCR analysis, the recombinant *Pichia* strains were grown in liquid medium BMGY and BMMY and secreted active laccase after methanol induction. The production of laccase was relative to the biomass and the pH value of the medium was maintained at pH 5. 5-6. 0 during the culture course. It was necessary for active laccase production to culture the recombinant *Pichia* strains under decreased temperature (16 or 20°C). A copper concentration of 400 μM in medium produced the highest level of active laccase.

**Key words:** *panus rudis*; laccase; cDNA sequence; *Pichia pastoris*; expression