

Cloning and Prokaryotic Expression of *LAC-1* Gene from *Populus trichocarpa* Torr. & Gray

Lihong Li, Jingyi Han, Ying Wang, Shan Cao, Qiang Zhang, Luyao Jiang, Xiaoyun Yao, Hui Li, Hai Lu

College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing
Email: lilihong0827@163.com

Received: Feb. 20th, 2016; accepted: Mar. 8th, 2016; published: Mar. 15th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: Cloning, sequence analysis of the *LAC-1* gene from *Populus trichocarpa* Torr. & Gray, then induced expression and purify of the fusion protein in *E. coli* after construct prokaryotic expression vector to provide a foundation for studying the function of the target protein. **Method:** According to the principle of homologous cloning, laccase gene from *Arabidopsis thaliana* was used to blast the database JGI of *Populus trichocarpa*. The laccase gene was isolated by PCR and transformed into *E. coli* by the individual expression construct pET-30a and expression the recombination protein, then purified by Ni-NTA affinity chromatography. **Result:** *Populus trichocarpa* laccase gene was isolated (renamed *LAC-1*, Genebank: XP_002310245). Sequence analysis revealed that *LAC-1* had the key residues of laccase, phylogenetic analysis showed *LAC-1* had high homologous with *AtLAC4*. The results of SDS-PAGE demonstrated that the expressed proteins were consistent with the size of expected protein in the prokaryotic expression system. **Conclusion:** The *LAC-1* genes belonged to the family of laccase and successfully expressed in *E. coli*. This study will supply theoretical foundation in identifying and functional analysis of members from laccase family.

Keywords

Populus trichocarpa, LAC, Gene Clone, Sequence Analysis, Prokaryotic Expression

毛果杨漆酶基因*LAC-1*的克隆与原核表达研究

李丽红, 撒静宜, 王莹, 曹山, 张强, 蒋璐瑶, 要笑云, 李慧, 陆海

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京

文章引用: 李丽红, 撒静宜, 王莹, 曹山, 张强, 蒋璐瑶, 要笑云, 李慧, 陆海. 毛果杨漆酶基因 *LAC-1* 的克隆与原核表达研究[J]. 植物学研究, 2016, 5(2): 39-46. <http://dx.doi.org/10.12677/br.2016.52007>

Email: lilihong0827@163.com

收稿日期: 2016年2月20日; 录用日期: 2016年3月8日; 发布日期: 2016年3月15日

摘要

目的:克隆毛果杨漆酶基因*LAC-1*, 对其进行生物信息学分析, 并构建原核表达载体在大肠杆菌中进行融合蛋白的诱导表达并纯化目的蛋白, 为植物漆酶基因蛋白体外结构与功能的研究提供一定的理论基础。**方法:**根据同源克隆的原理, 利用已经研究公布的拟南芥中的漆酶基因序列对毛果杨基因组数据库进行同源检索, 利用PCR技术克隆毛果杨漆酶基因的序列, 构建重组表达载体, 转化大肠杆菌BL21并表达重组蛋白, 通过Ni-NTA亲和层析进行纯化。**结果:**克隆获得了毛果杨漆酶基因的序列(命名*LAC-1*, 基因登录号XP_002310245), 序列分析表明*LAC-1*具有漆酶基因的保守结构域, 进化树分析表明该序列与拟南芥的漆酶基因*AtLAC4*有较高的同源性, 利用所构建的原核表达载体, 经IPTG诱导和SDS-PAGE电泳检测结果表明表达蛋白与预期蛋白大小一致。**结论:***LAC-1*属于毛果杨基因家族的一员, 该漆酶基因可以在体外成功进行原核表达, 为毛果杨漆酶基因家族成员的鉴定及后续活性功能的分析提供了一定的理论基础。

关键词

毛果杨, LAC, 基因克隆, 序列分析, 原核表达

1. 引言

【研究意义】漆酶(EC1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶, 属于蓝色氧化酶家族, 漆酶广泛存在于植物和真菌中[1][2]。目前有关真菌漆酶的研究与应用已有大量报道, 但高等植物中有关漆酶的研究却相对较少。长期以来, 植物细胞壁丰富的过氧化物酶被认为是催化木质素单体氧化聚合的首要酶。最近的研究表明, 漆酶分泌到植物细胞次生壁, 在有氧气存在时, 可以催化同样的聚合反应。植物中的漆酶基因家族庞大, 毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)作为一种有代表性的模式植物, 其基因组测序已经完成, 因此, 研究并确定毛果杨中的漆酶基因序列对进一步研究并阐明漆酶基因在植物中的作用与功能具有重要的意义。【前人研究进展】近年来, 有关漆酶基因克隆与表达的研究主要集中在真菌漆酶方面, 而漆酶的异源表达大多数的研究集中于真核生物毕赤酵母的研究中, Yang J等[3]克隆了白腐真菌中的一个漆酶基因并在毕赤酵母GS115中成功实现异源表达; 顾春娟等[4]在毛头鬼伞漆酶的研究中, 在欲表达的漆酶氨基酸序列的N端加入10个氨基酸标签后在毕赤酵母KM71中成功表达并测得活性。真菌漆酶原核表达方面的研究相对较少, Salony等[5]首次在大肠杆菌中成功表达了真菌黑蛋巢菌布里尼的漆酶蛋白, 随后Søren Brander等[6]将克劳氏芽孢杆菌的漆酶基因在大肠杆菌BL21中成功进行了表达。【本研究切入点】目前, 有关漆酶原核表达的研究只在真菌漆酶中有过研究, 而植物漆酶基因的原核表达的研究确鲜见报道。【拟解决的关键问题】以模式植物毛果杨为材料, 克隆其漆酶基因, 构建原核表达载体, 研究植物漆酶基因能否在体外成功进行原核表达, 为植物漆酶基因家族成员的鉴定及后续结构功能的研究提供一定的理论基础。

2. 材料与方法

2.2. 实验材料与主要试剂

实验材料毛果杨(*Populus trichocarpa* Torr. & Gray)无性系取自北京林业大学生物化学与分子生物学

研究室。大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 及 BL21(DE3)由本实验室保存。表达载体 pET-30a(+)由本实验室保存。克隆载体 PMD-18T, Ex Taq 酶购自 TaKaRa 公司。植物总 RNA 提取试剂盒, 反转录试剂盒, 琼脂糖凝胶回收试剂盒与普通质粒小提试剂盒购自北京天根生物公司。T4-DNA 连接酶, 限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bam*H I 购自 promega 公司。异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Sigma 公司。

2.2 实验方法

2.2.1. 毛果杨漆酶基因 *LAC-I* 的电子克隆与序列分析

根据同源克隆的原理, 利用已经研究确定的拟南芥中的漆酶基因 *AtLAC4* 序列对毛果杨基因组数据库进行同源检索, 找到与 *AtLAC4* 同源性较高的毛果杨中的疑似漆酶的基因序列, 利用 DNAMAN 等软件分析 *LAC-I*(基因登录号 XP_002310245)的序列, 获得分析结果。

2.2.2. 毛果杨漆酶基因 *LAC-I* 的进化分析

通过在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对分析, 得到大量毛果杨漆酶基因 *LAC-I* 具有相近进化关系的基因序列, 这些基因大量存在于不同植物中, 如欧亚槭(*Acer pseudoplatanus*)、白桦树(*Betula platyphylla*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)、野生大豆(*Glycine soja*)、欧洲云杉(*Picea abies*)、海岸松(*Pinus pinaster*)、可可树(*Theobroma cacao*)等。BLAST 结果显示, 这些相关的基因全部来自漆酶基因家族。然后将这些漆酶基因与 *LAC-I* 进行了进化分析, 并利用 MEGA6.0 软件绘制了进化树。

2.2.3. 毛果杨漆酶基因 *LAC-I* 的克隆及 *LAC-I*-pET30a(+)表达载体的构建

以生长健壮的毛果杨的组培苗的叶片为材料, 根据北京天根生物公司的总 RNA 提取试剂盒的操作流程, 提取毛果杨的总 RNA。用 1%的琼脂糖凝胶对提取的总 RNA 进行电泳检测。根据北京天根公司反转录试剂盒的操作步骤, 以 Oligo(dT)18 为引物进行反转录得到毛果杨的 cDNA 序列。设计加入酶切位点的上游引物 5'-GGGGTACCATTCTAGGATTCATTCCTTTTC-3'(划线部分为 *Kpn* I 的酶切位点), 加入酶切位点的下游引物为 5'-CGGGATCCGCAAGGTGGAAGATCCTTAGGA-3'(划线部分为 *Bam*H I 的酶切位点)。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增目的基因, 25 μ L 的 PCR 体系包含: 2 μ L 毛果杨 cDNA(约 100 ng)、上下游引物各 1 μ L (10 pm/ μ L)、2.5 μ L (2.5 mmol/L)dNTP、2.5 μ L 10 \times Ex Taq buffer、0.5 μ L Ex Taq 酶(2.5 U/ μ L)、14.5 μ L ddH₂O。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min 后保存于 4 $^{\circ}$ C。

PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的条带, 将回收的产物与 pMD-18T 载体连接后转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 将转化产物涂布于含氨苄(100 mg/L)的 LB 培养基上后于 37 $^{\circ}$ C 的培养箱中过夜培养。挑取单菌落扩大培养后, 提取质粒进行 PCR 初步鉴定, 将阳性个体送到北京六合华大基因公司进行测序鉴定。

对测序正确的阳性个体进行扩播后, 提取质粒, 与质粒 pET-30a(+)同时进行限制性内切酶(*Kpn* I 和 *Bam*H I)的双酶切, 酶切产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收酶切目的条带用 T4-DNA 连接酶进行连接。连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3)后涂布于含卡那霉素(100 mg/L)的 LB 固体培养基上过夜培养, 待长出单菌落后挑取单菌落于含卡那霉素(100 mg/L)的液体 LB 培养基中扩大培养, 提取菌液的质粒后进行双酶切(*Kpn* I 和 *Bam*H I)鉴定, 获得 *LAC-I*-pET30a(+)的重组原核表达载体。

2.2.4. 毛果杨 *LAC-I* 的原核表达及纯化

将含表达载体 *LAC-I*-pET30a(+)的大肠杆菌 BL21(DE3)在含卡那霉素(100 mg/L)的 LB 固体培养基上划线后于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养到单菌落长出, 挑取单菌落于 20 mL 的含卡那霉素(100 mg/L)的液体 LB 培养基中过夜培养, 取 5 mL 过夜培养的菌液按 1:100 的比例扩大培养到 500 mL 的含卡那霉素(100 mg/L)的液体

LB培养基中培养3 h左右到 OD_{600} 为0.6左右,加入抽滤灭菌的IPTG(终浓度为0.3 mmol/L)溶液,于28℃、140 rpm的摇床中诱导培养3 h。获得的菌液在4000 rpm的条件下富集菌体,以未加IPTG诱导的转化菌株为空白对照,以12%的SDS-PAGE电泳检测重组蛋白的诱导表达结果。根据QIAGEN公司的蛋白纯化手册的步骤对目的蛋白进行纯化,以12%的SDS-PAGE电泳检测目的蛋白的纯化结果。

3. 结果与分析

3.1. 毛果杨漆酶基因 *LAC-1* 及其蛋白序列的分析

利用拟南芥漆酶基因 *AtLAC4* 对毛果杨基因组数据库同源检索,我们得到同源性较高的毛果杨的基因 *LAC-1*, 对其进行序列分析可知,其基因全长为2198 bp,其中含有6个外显子和5个内含子,其CDS序列全长为1635 bp,编码545个氨基酸,该序列没有信号肽大小约为60 KD。通过其与拟南芥中漆酶基因的氨基酸比对分析可知(图1),该序列中具有漆酶基因的三个铜离子的保守结合域,其中铜离子结合保守域I中的保守氨基酸为四个H(组氨酸)残基,铜离子结合保守域II中的保守氨基酸为N(天冬氨酸)、L(亮氨酸)、V(缬氨酸)、K(赖氨酸)、P(脯氨酸)、Q(谷氨酰胺)、T(苏氨酸),以及铜离子结合保守域III的四个保守氨基酸H(组氨酸)、C(半胱氨酸)、H(组氨酸)、L(亮氨酸)。

3.2. 毛果杨漆酶基因 *LAC-1* 的进化树分析

从进化树中可以清晰的看到(图2),同一物种的不同漆酶在进化关系上都有比较大的差异,这充分说明漆酶基因家族中不同的漆酶的功能可能存在比较大的差异。毛果杨的漆酶基因 *LAC-1* 与野生大豆(*G. soja*)的 *laccase-4* 以及拟南芥的漆酶基因 *laccase-4* 具有比较相近的进化关系,最近的研究已经表明拟南芥的漆酶基因 *laccase-4* 在拟南芥的木质素合成过程中起到重要的作用,由此我们可以初步推测毛果杨漆酶基因 *LAC-1* 可能在毛果杨木质素合成过程发挥重要作用。

3.3. 毛果杨漆酶基因 *LAC-1* 的克隆及表达载体的构建

利用毛果杨组培苗的叶片为实验材料进行毛果杨总RNA的提取,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取RNA的质量(如图3(a)),利用反转录后得到的cDNA为模板,通过PCR扩增得到大小约为1.7 Kb的片段(如图3(b)),与杨树基因组数据库中公布的漆酶的基因序列大小基本一致,将该片段回收后与pMD-18T载体连接转化大肠杆菌JM109,提取质粒进行初步的PCR鉴定,将得到的阳性送去测序,将测序结果与杨树基因组数据库中的序列进行比对,得到正确的 *LAC-1* 基因序列。将测序正确的毛果杨 *LAC-1* 与pET-30a(+)同时进行双酶切(*Kpn* I和*Bam*H I)后连接,获得重组质粒LAC-1-pET30a(+),然后进行双酶切鉴定(如图3(c))。

3.4. 重组蛋白的诱导表达及纯化

将获得的重组质粒转化大肠杆菌BL21(DE3)后,经IPTG诱导表达,以未加IPTG诱导的转化菌株为对照,进行12%的SDS-PAGE电泳,从电泳结果可得(图4(a)),在60 KD左右的位置经IPTG诱导后有一条明显的蛋白条带表达,由此可以说明毛果杨漆酶基因 *LAC-1* 在大肠杆菌BL21(DE3)中可以实现成功表达,但该表达蛋白以无活性的包涵体形式存在于菌体沉淀中。由于表达载体pET-30a(+)中带有六个组氨酸的标签,因此按照QIAGEN公司的蛋白纯化手册中的包涵体蛋白的纯化通过Ni-NTA亲和层析对包涵体蛋白进行纯化,得到了纯化后的重组蛋白(图4(b))。

4. 讨论

漆酶(EC1.10.3.2)是多铜氧化酶中的一种含铜的糖蛋白氧化酶,按照来源大致可以分为植物漆酶、微

(**)

AtLAC1	MENLGLFIIS TFLLLFTTLL -----	PYSSASTTRR FHFNVWEKVV	TRLCHTKQLL	TVNGQYPGPT	VAVHEGDIVE	IKVTNRIAHN	TTIHWHGRLRQ	90			
AtLAC2	MGASSALLSP AVLMTFLVAV	GSLMAYPEVV	TAKHAGITRH	YHFDIKLSI	TRLCRTKSIV	AVNGKFPGPR	LIAREGDRLV	VEVVNHVPNN	ISIIHWHGVRQ	100	
AtLAC4	--MGSHMVWF LFLVSFFSVF -----	PAPSESMVRH	YKFNVMKMW	TRLCSSKPTV	TVNGRYPGPT	IYAREDDTLL	IKVVNHVKYN	VSIHWHGVRQ	88		
At1LAC5	MDVTKSLLCF ISFVAFLLFS -----	SVAEANKAHH	HEFIIQATKV	KRLCETHNSI	TVNGMFPGPM	LVVNNGDTLV	VKVINRARNY	ITIIHWHGVRQ	90		
LAC-1	-----	ILGFI	-----	PFPAEAAIKK	YOFDIOVKNV	SRLCHAKPIV	TVNGRFPGPT	IYVREGDRVM	VNVTNYAOYN	MSIHWHGRLKQ	75
铜离子结合保守域 I * *)											
AtLAC1	YRTGWADGPA YITQCPIRSK	QSYTYRFKVE	DQRGTLWHA	HHSWQRASVY	GAFIIYPRQP	YPFSGSHIQS	EIPIILGEWW	NDDVDNVEKA	MMKTGAGAKV	190	
AtLAC2	LRSGWADGPS YITQCPIQTG	QSYVYNFTIS	GQRGTLFWHA	HISWLRATVY	GPLIILPKRN	ESYFVKPYK	EVPILGGEWF	NADPEAVINQ	SLQTGAGPNV	200	
AtLAC4	YRTGWADGPA YITQCPIQPG	QVYTYNYTLT	GQRGTLWHA	HILWLRATVY	GALVILPKRG	VPYFPKPDN	EKVIVLGEWW	KSDTENIINE	ALKSGLAPNV	188	
At1LAC5	MRTGWADGPE FVTQCPIRPG	SSYTYRFTIQ	GQEGTLWHA	HSSWLRATVY	GSLLVFPAG	SSYPFKPHR	NVPLLLGEWW	DANPVDVIRE	SIRTGGAPNV	190	
LAC-1	YRNGWADGPA YITQCPIQTG	SSYTYDFNVT	GQRGTLWHA	HILWLRATVY	GAIVIMPQKG	TPYFPQPNM	EVPILLGEWW	NTDVEEVEKQ	GTEMGLPPNM	175	
(铜离子结合保守域 II* * ** ** ***)											
AtLAC1	SDAYTLNGLP GLYPCSTKD	TFTATVDAGK	TYLIRIINAA	LNNELFVAVA	NHILTVEVD	AVYTKPVHTK	AIMIAPGQIT	TLLLRAD-QL	SGGEFLIAAT	289	
AtLAC2	SDAYTLNCLP CPLYNCSSKD	TYLKVKPKC	TYLLRLINAA	LNNELFFSIA	NHSFTVEAD	AVYVKPFVTN	TLVIAPGQIT	NVLLKTKPQA	PNATFFMLAR	300	
AtLAC4	SDSHMINGHP GPVRCNPSQG	-YKLSWENGK	TYLLRLVNA	LNEELFFKVA	GHIFTVEVD	AVYVKPFKTD	TVLIAPGQIT	NVLLTAS-KS	AGK-YLVTAS	285	
At1LAC5	SDAYTINGQP GDLYKCSSQD	TTVVPINVGE	TILLRVINSA	LNNQLPFTVA	NHKLTVVGAD	ASYLKPFTTN	VIVLGPQGIT	DVLTITGD-QP	PNR-YYMAAR	287	
LAC-1	SDAHTINGKP GPLFPCSEKH	TFAMEIESGK	TYLLRIINAA	LNNELFFGIA	GHNMTVEVD	AVYTKPFTTQ	TILVIAPGQIT	NVLVLAN-QV	PGR-YFMAIR	273	
AtLAC1	PYVTSVFP-F NNSTTVGFIR	YTKTKPKENS	VNTRRRRRLT	AMSTVVALPN	MLDTKFKATK	SDSIKSLGSA	KYPCKVPTKI	DKRVITTISL	NLQDCPLN--	386	
AtLAC2	DYFTMGGA-F DNTTVAGILE	YETPSSS---	SSSISSKN	HPLLKTPGLPA	INATNFVAIKF	SSKFRSLATT	KFPANVTQVK	DKIKFFTVGL	GSSCPNK---	391	
AtLAC4	PFMDAPIA-V DNVTATATVH	YSG-----	TLSS	SPTILTLPPP	QNATSIANNF	TNSLRSLNSK	KYPALVPTTI	DHHLFFTVGL	GLNACPT---	368	
At1LAC5	AYQSAQNAPF GNTTTTALIQ	YKSAPCCGVG	GGSGTKKGN	FKPIMPILPA	YNDTNTVTRF	SQSFRSLRR-	AEVPTIE	DEMFLVTIGL	GLNCPKNFR	383	
LAC-1	AFLDVPLP-V DNKTATAIMQ	YKG-----	IPNT	DLPSPQLPA	SNDTEFALGY	NRKLRSLNTA	QFPANVPLKV	DRNLFYTVGF	GKDSCTPT---	356	
(*)											
AtLAC1	-QTCDCYACK RFFASMNIS	FVRPP-ISIL	ESYKQKSKG	VFSLDFPEKP	PNRFDFTGVD	PVSENMNTEF	GTKLFEVEFG	SRLEIVFQGT	SFLNIEMHPL	485	
AtLAC2	NQTCQCPNGT KFAASMNIS	FALPR-TALL	QSYFFAQSNR	GYYTDFPAPF	LHPFNYTGP	PNNTLVIN--	GTKVWVIFPN	TSVEVVLQDT	SILGAESHPL	488	
AtLAC4	---CKAGNS RVVASINNV	FIMPK-TALL	PAHYFNTSG-	VFTTDFKPN	PHVFNYSGGS	VIN-MATET-	GTRLYKLPYN	ATVQLVLQDT	GVIAPENHVP	461	
At1LAC5	SRRCQCPNGT RFTASMNVS	FALPSNYSL	QAHHHGIPG-	VFTTDFPAK	PVKFDYTGNN	ISRSLYQDR	GTKLYKLYG	SRVQIVLQDT	GIVIPENHPI	482	
LAC-1	---CVNG--T KLLASLNNIS	FVMPQ-IGLL	QAHYFNISG-	VFKINPDKP	PYFPNYIGAP	LTASLGIVH-	GIRLSKIAFN	SIVELVLQDT	NLLTVESHFP	448	
铜离子结合保守域 III * * *)											
AtLAC1	HVHGHNFFVV	GRGFGNFDPE	KDPKRYNLVD	PPERNTFAVP	TGGWAAIRIN	ADNPGVWFH	CHLEQHTSWG	LAMGFIVKDG	PLPSQTLPP	PHDLPQC	582
AtLAC2	HLHGYNFYVV	GQGFNFDPN	KDPAKFNVD	PAERNVTGVP	SGGWVAIRFQ	ADNPGVWLMH	CHLDVHLSWG	LRMAWIVLDG	ELPNQKLPPP	PSDLPKC	585
AtLAC4	HLHGFNFFEV	GRGLGNFNT	KDPKNFNLVD	PVERNITGVP	SGGWVIRFR	ADNPGVWFMH	CHLEVHTTWG	LKMAFLVENG	KGPNQSILPP	PKDLPKC	558
At1LAC5	HLHGYDFYII	AEGFGNFPK	KDTAKFNLED	PPLRNTVGP	VNGWAVIRFI	ADNPGVWIMH	CHLDAHISWG	LAMAFVENG	NGVLQTEIQP	PHDLPVC	579
LAC-1	HLHGYNFVVV	GTGIGNFDPA	KDPAKYNLVD	PVERNVTGVP	TGGWTAIRFR	ADNPGVWFMH	CHLELHTGWG	LKTAFFVEEG	PGSDQSILPP	PKDLPCC	545

Figure 1. The amino acid sequence alignments of *Populus trichocarpa* LAC-1 and *Arabidopsis thaliana* laccases

图 1. 毛果杨漆酶 LAC-1 与拟南芥漆酶的氨基酸序列比对

生物(包括真菌和细菌)漆酶和动物漆酶[7]。日本人吉田于 1883 年首次在漆树(*Toxicodendron vernicifluum*(Stokes)F.A.Barkley)漆液里发现漆酶,随后研究发现某些高等真菌也能分泌这种酶,并且高等真菌分泌的漆酶能够催化降解多种芳香族化合物特别是酚类。与真菌所分泌的漆酶作用恰恰相反,漆酶在植物中主要起到合成木质素的作用。Sterjiades 等[8]和 Bao 等[9]分别从欧亚槭(*A. pseudoplatanus*)和火炬松(*Pinus taeda* L.)中分离得到漆酶,并证明其可以在体外催化木质素单体的氧化聚合。Berthet S 等[10]通过对拟南芥突变体的研究确定了 *LAC4* 和 *LAC17* 在拟南芥木质素合成中起重要作用。而木质素是植物细胞

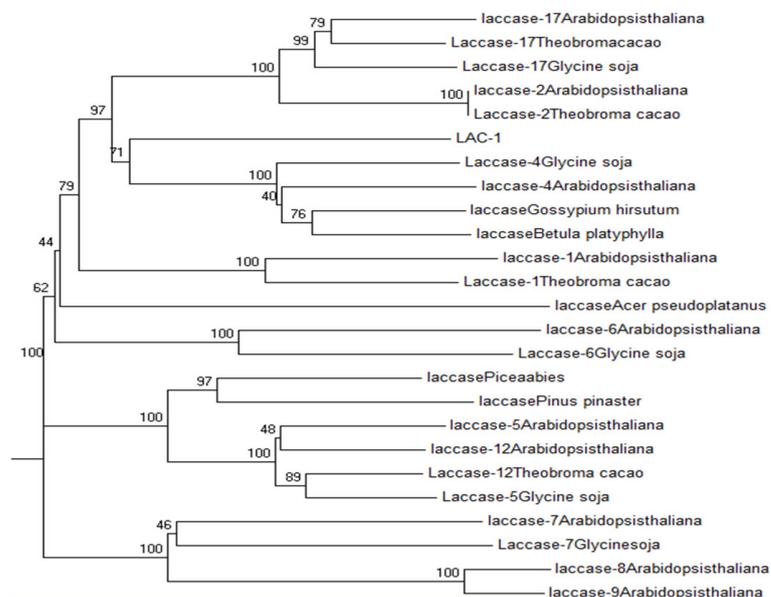


Figure 2. Phylogenetic relationship of LAC-1 protein in *Populus trichocarpa* and other plants

图 2. 毛果杨漆酶 LAC-1 蛋白与其它植物蛋白的系统发生分析

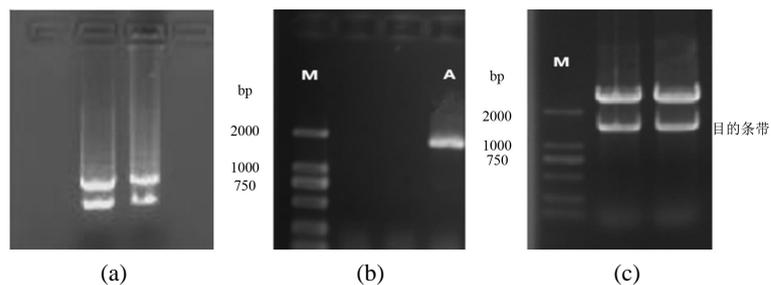


Figure 3. The results of LAC-1 gene cloning and double digestion of recombinant vector ((a) electrophoresis of *Populus trichocarpa* totle RNA, (b) electrophoresis of LAC-1 cloning, (c) double digestion of recombinant vector)

图 3. 毛果杨漆酶基因 LAC-1 的克隆及重组载体双酶切鉴定结果((a) 毛果杨总 RNA 电泳图, (b) 漆酶基因 LAC-1 克隆电泳图, (c) 重组载体双酶切鉴定结果)

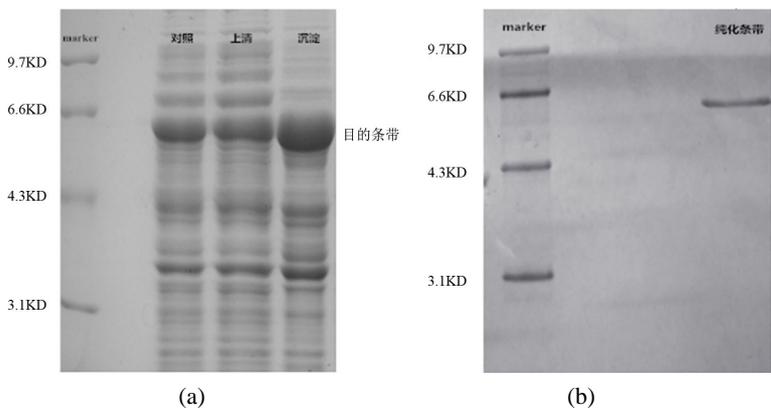


Figure 4. Analysis of induced expression and purified products by SDS-PAGE

图 4. 诱导表达及纯化产物的 SDS-PAGE 分析

壁氧化聚合木质素单体而形成的高聚物。木质素结构稳定, 很难在短时间内被降解。在造纸工业中, 木质素是严重影响纸浆质量和造成环境污染的重要因素[11]。在畜牧业中, 饲草的木质素影响牲畜的消化与营养吸收, 木质素含量的高低是饲草优劣的指标之一[12]。降低木质素含量或改变其组分, 将有利于更好地利用资源植物。

自漆酶基因被发现以来, 有关其研究一直经久不衰, 但漆酶的研究主要集中在高等真菌方面, 而关于植物漆酶的研究相对较少。有关植物漆酶的体外表达研究更是鲜见报导。要了解漆酶基因在植物体内的生化功能, 必须从蛋白水平上进行研究。原核表达系统是最常用的表达系统, 以大肠杆菌为代表的原核表达系统是外源基因表达的首选[13], 因此原核表达为研究植物漆酶蛋白的表达与功能提供了一条有效的途径。本研究中将克隆得到的毛果杨漆酶基因 *LAC-I* 与原核表达载体 pET-30a(+)重组后转入大肠杆菌 BL21(DE3)中经 IPTG 诱导表达后, 经 SDS-PAGE 电泳检测表明, 漆酶基因与组氨酸标签形成融合蛋白后, 在原核表达系统中可以进行成功表达, 但表达的融合蛋白主要以无活性的包涵体形式存在, 这说明毛果杨漆酶基因虽然能在大肠杆菌中实现表达, 但由于原核生物表达条件的限制导致表达蛋白并不能正确实现折叠而导致了包涵体蛋白的形成。利用表达融合蛋白上的组氨酸标签, 通过 Ni-NTA 亲和层析对包涵体蛋白进行纯化并获得纯化目的蛋白, 而进一步研究该包涵体蛋白的复性以及体外活性与结构功能是本文后续的研究方向, 毛果杨漆酶基因 *LAC-I* 在体内参与怎样的代谢活动, 其是否与毛果杨中木质素合成过程相关都会在以后的深入研究中逐渐揭晓。

5. 结论

毛果杨漆酶基因在合适的条件下可以在原核表达系统中实现成功表达, 为植物漆酶基因体外结构与功能的研究提供了基本资料。

基金项目

国家自然科学基金项目(31570582, 30671697, J1103516)。

参考文献 (References)

- [1] Hong, Y.Z., Zhou, H.M., Tu, X.M., *et al.* (2007) Cloning of a Laccase Gene from a Novel Basidiomycete *Trametes* sp. 420 and Its Heterologous Expression in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology*, **54**, 260-265. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-006-0068-8>
- [2] Alexandre, G. and Zhulin, I.B. (2000) Laccases Are Widespread in Bacteria. *Trends in Biotechnology*, **18**, 41-42. [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01406-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01406-7)
- [3] Yang, J., Ng, T.B., Lin, J. and Ye, X. (2015) A Novel Laccase from Basidiomycete *Cerrena* sp.: Cloning, Heterologous Expression, and Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **77**, 344-349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.03.028>
- [4] Gu, C.J., Zheng, F., Long, L.K., Wang, J. and Ding, S.J. (2014) Engineering the Expression and Characterization of Two Novel Laccase Isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by Fusing an Additional Ten Amino Acids Tag at N-Terminus. *PLOS One*, **9**, e93912. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093912>
- [5] Salony, G.N., Baranwal, R., Chhabra, M., Mishra, S., Chaudhuri, T.K. and Bisaria, V.S. (2008) Laccase of *Cyathus bulleri*: Structural, Catalytic Characterization and Expression in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1784**, 259-268.
- [6] Brander, S., Mikkelsen, J.D. and Kepp, K.P. (2014) Characterization of an Alkali-and Halide-Resistant Laccase Expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*. *PLOS One*, **9**, e99402. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0099402>
- [7] 万云洋, 杜子民. 漆酶结构与催化机理[J]. 化学通报, 2007(9): 662-670.
- [8] Sterjiades, R., Dean, J.F. and Eriksson, K.E. (1992) Laccase from Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus*) Polymerizes Monolignols. *Plant Physiology*, **99**, 1162-1168. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.99.3.1162>
- [9] Bao, W., Omalley, D.M., Whetten, R. and Sederoff, R. (1993) A Laccase Associated with Lignification in Loblolly pine Xylem. *Science*, **260**, 672-674. <http://dx.doi.org/10.1126/science.260.5108.672>

- [10] Serge, B., Nathalie, D.C., Brigitte, P., *et al.* (2011) Disruption of LACCASE4 and 17 Results in Tissue-Specific Alterations to Lignification of *Arabidopsis thaliana* Stems. *Plant Cell*, **23**, 1124-1137.
<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.082792>
- [11] 冷东梅. 造纸黑液木质素资源化处理[J]. 化学工程与装备, 2009(12): 164-167.
- [12] 徐世晓, 赵新全, 孙平, 赵同标, 赵伟. 青藏高原 5 种牧草木质素含量及其体外消化率研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1605-1608.
- [13] 郭广君, 吕素芳, 王荣富. 外源基因表达系统的研究进展[J]. 科学技术与工程, 2006, 6(5): 582-587.