

Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of *PtrLAC-2* Gene of *Populus trichocarpa*

Ying Li, Jiaxin Li, Xiaotong Teng, Xiaorui Guo, Ziyi Cheng, Bin Yin, Yongzhuo Zhang, Hai Lu, Hui Li

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing
Email: liying0627@bjfu.edu.cn

Received: Mar. 2nd, 2018; accepted: Mar. 21st, 2018; published: Mar. 28th, 2018

Abstract

Objective: To clone and express the *Populus trichocarpa* laccase *PtrLAC-2* gene. This study prepared polyclonal antibody with high affinity and specificity to improve the study of structure and function of laccase. **Methods:** According to the principle of homologous cloning, laccase gene from *Arabidopsis thaliana* was used to blast the database JGI of *Populus trichocarpa*. The *Populus trichocarpa* laccase *PtrLAC-2* gene was cloned by PCR before being ligated with pET-30a(+) to construct prokaryotic expression vector *PtrLAC-2*-pET30a(+). *PtrLAC-2*-pET30a(+) was then transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells for induction expression. Recombinant protein was purified as antigen to immune rabbit to prepare polyclonal antibody. Titer of the polyclonal antibody and specificity were analyzed using ELISA and Western blot at last. **Results:** *Populus trichocarpa* laccase gene was isolated (renamed *PtrLAC-2*, Genbank: XP_002308164). Prokaryotic expression vector *PtrLAC-2*-pET30a(+) was constructed successfully. The recombinant protein with the length of 62 KDa was obtained. ELISA analysis showed that the titer of the obtained antibody was 1:102,400. Western blot showed that the antibody could specifically combine with *PtrLAC-2* protein in *Populus trichocarpa*. **Conclusion:** The *PtrLAC-2* genes successfully expressed in *E. coli* and the *PtrLAC-2* polyclonal antibody with high affinity and specificity was generated. This study will supply theoretical foundation in the following enzyme biochemical function.

Keywords

Populus trichocarpa, Laccase, Gene Clone, Prokaryotic Expression, Polyclonal Antibody

毛果杨漆酶基因*PtrLAC-2*的原核表达与多克隆抗体制备研究

李 盈, 李嘉鑫, 滕晓瞳, 郭晓蕊, 程子义, 尹 玢, 张永卓, 陆 海, 李 慧

文章引用: 李盈, 李嘉鑫, 滕晓瞳, 郭晓蕊, 程子义, 尹玢, 张永卓, 陆海, 李慧. 毛果杨漆酶基因 *PtrLAC-2* 的原核表达与多克隆抗体制备研究[J]. 植物学研究, 2018, 7(2): 177-185. DOI: 10.12677/br.2018.72024

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京
Email: liying0627@bjfu.edu.cn

收稿日期: 2018年3月2日; 录用日期: 2018年3月21日; 发布日期: 2018年3月28日

摘要

目的: 克隆毛果杨漆酶基因*PtrLAC-2*, 并对其进行原核表达, 同时制备高特异性、高效价的*PtrLAC-2*多克隆抗体, 为研究漆酶基因蛋白在体外结构与功能奠定基础。方法: 利用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, PCR同源克隆并扩增得到毛果杨*PtrLAC-2*基因序列, 将其亚克隆到pET30a(+)载体得到*PtrLAC-2*-pET30a(+)原核表达载体, 转化到大肠杆菌BL21(DE3)中诱导表达并纯化得到*PtrLAC-2*重组蛋白。采用皮下免疫法将纯化的*PtrLAC-2*蛋白免疫兔子制备多克隆抗体, 用ELISA和Western blot检测血清多克隆抗体的效价和特异性。结果: 克隆获得了毛果杨漆酶基因的序列(命名*PtrLAC-2*, 基因登录号XP_002308164), 成功构建了*PtrLAC-2*-pET30a(+)原核表达载体, 诱导表达获得了62 KDa的重组蛋白, ELISA检测显示抗体效价达1: 102,400, 经Western blot鉴定, 制备的多克隆抗体能特异性检测毛果杨中的*PtrLAC-2*蛋白。结论: 毛果杨漆酶*PtrLAC-2*基因可以在体外成功进行原核表达, 同时获得了高特异性、高效价的兔抗*PtrLAC-2*多克隆抗体, 为后续研究该酶生化功能提供了一定的理论基础。

关键词

毛果杨, 漆酶, 基因克隆, 原核表达, 多克隆抗体

Copyright © 2018 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

1. 引言

[研究意义]漆酶是一种含铜的糖蛋白氧化酶, 广泛存在于高等植物植物、真菌、细菌和一些昆虫中。有关真菌漆酶的研究近年来取得了很大的进展, 并已成功应用于造纸行业原料的处理, 燃料废水的降解和食品饮料的等方面[1]; 而高等植物中有关漆酶的研究则相对较少, 近年来对植物漆酶的不断研究表明植物漆酶可能参与了木质素的合成, 植物细胞壁的维持等[2]。木质素作为存在于高等植物中的一种天然芳香聚合物, 可为植物细胞壁提供足够的强度和硬度, 并能在运输水分的同时避免植物遭受水和生物的危害[3] [4] [5]; 在造纸工业中木质素会严重影响纸浆质量[6]; 在畜牧业中木质素则会影响牲畜的消化与营养吸收[7]。因此改变木质素的含量或组分有助于人类合理地利用木质素资源, 通过基因工程的手段调控木质素合成途径中的关键基因漆酶则成为了重要的研究方向。要想深入了解植物漆酶在体内的具体生化功能, 分子水平和蛋白水平上的研究是必不可少的。[前人研究进展]目前, 有关漆酶的异源表达的研究主要集中在真菌漆酶。Christoph J等[8]克隆了担子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; Shuangxin Ma等[9]克隆了大斑病菌中的一个漆酶基因*Stlac4*并在大肠杆菌中成功实现异源表达。植物漆酶的异源表达特别是原核表达甚少见报道。[本研究切入点]毛果杨作为模式植物其基因组测序已经完成, 因此研究其漆酶基因序列为进一步阐明漆酶在植物中的功能具有重要意义。[拟解决的关键问

题]鉴于此,本研究以毛果杨为材料,对其漆酶 *PtrLAC-2* 进行了克隆、原核表达和纯化,并制备了多克隆抗体,旨在为进一步研究木质素合成途径中的关键酶漆酶的蛋白功能研究提供参考。

2. 材料与amp;方法

2.1. 材料与试剂

实验材料毛果杨为本实验室继代保存。大肠杆菌 JM109 和 BL21(DE3),表达载体 pET30a(+)为本实验室保存;克隆载体 pMD-18T 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 DNA 回收试剂盒、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*HI 购自 promega 公司;异丙醇基硫代 β -D-半乳糖苷(IPTG)购自 Sigma 公司;蛋白 marker 购自北京全式金生物技术有限公司;聚偏二氟乙烯膜(PVDF)购自 Roche 公司,HPR 标记羊抗兔 IgG 购自北京康为世纪生物科技有限公司;化学发光剂购自 Millipore 公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

2.2. 实验方法

2.2.1. 毛果杨漆酶基因 *PtrLAC-2* 的电子克隆与序列分析

利用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,得到与拟南芥中的漆酶基因 *AtLAC17* 同源性较高的漆酶基因序列,用生物信息学的方法对获得的漆酶的基因序列 *PtrLAC-2*(基因登陆号 XP_002308164)进行分析。

2.2.2. 毛果杨漆酶基因 *PtrLAC-2* 的克隆和 *PtrLAC-2*-pET30a(+)表达载体的构建

以毛果杨组培苗的叶片为材料,根据北京天根生物公司的总 RNA 提取试剂盒的操作步骤,提取毛果杨的总 RNA,并进行反转录得到毛果杨的 cDNA 序列,设计特异性引物,上游引物:5'-GGGGTACCAAGAAACATATCAGAAAAATGGGC-3'(下划线为 *Kpn* I 酶切位点),下游引物:GCCCTAGGGGAGAGTACTCGAAATCAAAGGCTC-3'(下划线为 *Bam*HI 酶切位点),以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增目的基因,电泳检测完后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,并涂布于含 Amp (100 mg/L)的 LB 培养基上,于 37℃ 培养箱中过夜培养,挑取单菌落扩大培养并提取质粒进行 PCR 鉴定,将阳性个体送至北京华大基因公司进行测序鉴定。对测序正确的阳性克隆进行扩大培养,提取质粒,同时提取 pET30a(+)质粒进行限制性内切酶的双酶切(*Kpn* I 和 *Bam*HI),电泳检测回收目的条带,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 Kana (100 mg/L)的 LB 培养基上,于 37℃ 培养箱中过夜培养,挑取单菌落扩大培养提取质粒进行双酶切鉴定(*Kpn* I 和 *Bam*HI),得到 *PtrLAC-2*-pET30a(+)的重组原核表达载体。

2.2.3. 重组蛋白的诱导表达

将含有 *PtrLAC-2*-pET30a(+)重组载体的大肠杆菌 BL21 (DE3)用接种环蘸取涂布在含 Kana (100 mg/L)的 LB 固体培养基中,37℃ 培养 12 h 待长出单菌落;挑取单菌落接入 10 ml 含有 Kana (100 mg/L)的 LB 液体培养基中,37℃ 200 r/min 振荡培养 12 h;将菌体培养液吸出 5 ml 接种于 500 ml 含有 Kana (100 mg/L)的 LB 液体培养基中,37℃ 200 r/min 振荡培养 3~4 h,待 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6 之间,加入终浓度为 0.3 mM 的 IPTG,37℃ 200 r/min 振荡培养,4℃ 12000 rpm 离心收集诱导 3 h 后的菌液。将收集的菌体用 20 ml 重悬液(300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0)重悬后冰水浴超声裂解,4℃ 12000 r/min 离心 30 min 弃上清,将沉淀用 10 ml 8 M 尿素溶解,冰水浴超声裂解,离心后收集上清 4℃ 保存。将保存的蛋白和蛋白缓冲液按 1:1 混合后 100℃ 水浴 10 min,以未加 IPTG 组作为阴性对照,进行 12%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,并用考马斯亮蓝染色检测蛋白的表达。

2.2.4. 重组蛋白的纯化

将收集的菌体用 20 ml 重悬液(300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH8.0)重悬, 冰水浴超声裂解菌液, 12000 r/min 离心 30 min 弃上清; 沉淀依次用 20 ml 含有 2 M/4 M/6 M 尿素的洗涤液(50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA- Na_2 , 2 M/4 M/6 M 尿素, 0.5% Triton x100, 2 mM B-巯基乙醇, pH 8.0)重悬, 每级于冰上震荡 30 min, 离心后弃上清, 最终沉淀用 20 ml 含有 8 M 尿素的包涵体预溶液(8 M 尿素, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA- Na_2 , 50 mM NaCl, pH 8.0)重悬, 离心后收集上清, 进行 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 考马斯亮蓝染色后检测蛋白的表达。

2.2.5. 多克隆抗体的制备

参照李芳等的方法将 200 μg 纯化后的融合蛋白用生理盐水稀释到 200~500 μl , 与等体积弗氏完全佐剂混合乳化后, 采用皮下 6 点注射法免疫新西兰大耳白兔, 12d 后取 200 μg 融合蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混合乳化后加强免疫, 第 24 天和 36 天分别用不加佐剂的纯化蛋白 200 μg 加强免疫, 第四次免疫 10d 后采全血, 分离抗血清, -20°C 保存。动物免疫前取血做阴性对照[10]。

2.2.6. 多克隆抗体效价的检测及特异性分析

用 ELISA 检测抗血清的效价。抗原包被封闭后用抗血清孵育, 之后用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 孵育, TMB 显色后最后用终止液终止反应, 酶标仪 450 nm 紫外光波长下检测。

用 Western blot 方法进行抗体的特异性分析, 提取毛果杨的全蛋白并进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳, 300 mA 电转 1 h 转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次, 用 1:1000 倍稀释制备的多抗作为一抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 用 1:1000 倍稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 作为二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 用 HRP-ECL 化学发光法鉴定蛋白。

3. 结果与分析

3.1. 漆酶 PtrLAC-2 的序列分析

利用拟南芥漆酶基因 *AtLAC17* 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的基因 *PtrLAC-2*, 对其进行序列分析可知, 其基因全长为 3518 bp, 其中含有 6 个外显子和 3 个内含子, 其 CDS 序列全长为 1743 bp, 编码 580 个氨基酸, 该序列没有信号肽大小约为 62 kDa。由 DNAMAN 软件分析 *PtrLAC-2* 与拟南芥酶基因 *AtLAC17* 的序列同源性高达 66.21%(如图 1)。

3.2. 重组表达载体的鉴定

将重组表达载体 *PtrLAC-2-pET30a(+)* 进行 *Kpn* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定, 由酶切图可以看出重组蛋白切出了两条明显的条带, 分别是 5000 bp 左右和 1700 bp 左右, 结果与序列的大小一致(如图 2)。将酶切鉴定的质粒测序, 最终确定目的基因已正确插入 *pET30a(+)* 表达载体中。

3.3. 重组蛋白的诱导表达

将 *PtrLAC-2-pET30a(+)* 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 取阳性单菌落扩大培养, 重组菌在 37°C 、IPTG 浓度为 0.3 mM 条件下诱导 3 h, SDS-PAGE 电泳检测可见, 诱导重组菌比未诱导重组菌多出一条蛋白质条带, 其分子量约为 62 kDa, 与预期表达蛋白的大小一致(如图 3)。

3.4. 重组蛋白的纯化

将诱导表达后的重组蛋白菌体在不同浓度的洗涤液中洗涤以纯化目的蛋白, SDS-PAGE 电泳结果发现仅在 62 kDa 处有一条明显条带, 表明重组蛋白已成功进行纯化(如图 4)。

LAC-2 MGNSPRSTVLP SMAALQLLCFFFSVLPDFAAA. . ITRQYTFNITHKNFTRLCHTRSLVT
 ||||| .| .:: .:| ||:|:|. .|.|||||:|.|.
 AtLAC17MALQLLLAVFSCVLLLPQPAFGITRHYTLEIKMQNVTRLCHTKSLVS

LAC-2 VNGQFP GPRLVAREGDQVLVKVNHVAENITIHWHGVRQLTTGWADGPAYVTQCPIQTGQ
 |||||:|:|||||:||||:|:|. .|:|||||:|||||
 AtLAC17 VNGQFP GPRLIAREGDQVLIKVVNQVPNNISLHWHGIRQLRSGWADGPAYITQCPIQTGQ

LAC-2 AYTYNFTITGQRGTLWHAHISWLRSSLYGPIIILPKLNESYPFKKPYKEIPILFGGEWFN
 .|.||:|.|||||:|||||:|. .| || ||:|:|
 AtLAC17 SYVYNYTIVGQRGTLWYHAHISWLRSTVYGPLIILPKRGVPYPFAKPHKEVPMIFGEWFN

LAC-2 VDPEAVIAQALQTGAGPNVSDAYTINGLPGPLYNCSAKDTRKLVKPKGKRYLLRLINAAL
 .|.||:| || ||:|||||:|||||:|:|:|
 AtLAC17 ADTEAII RQALQTGGGPNVSDAYTINGLPGPLYNCSAKDTERLRVKPKGTYLLRLINAAL

LAC-2 NDELFFSIANHTLTVVEADAVYVKPFEADTLISPGQTTNVLLKTKPHLPNATFYMFAGP
 |||||:|||||:|||||. .|. .|:| | |
 AtLAC17 NDELFFSIANHTVTVVEADAIYVKPFETETILAPGQTTNVLLKTKSSYPSASFMTARP

LAC-2 YFSGMG SFDNSTTAGVLVYKHPSSNNHLKKLPTL.KPTLPPINATGFVANFTKKF
 |. .| |.||||.||:| |. ||:|:|. .|. .|:|
 AtLAC17 YVIGQGTFDNSTVAGILEYEPKQTKGAHSRTS IKNLQLFKPILPALNDTNFATKFSNKL

LAC-2 RSLANAKFPANVPQTVDRKFFFTVGLGTNPCPKNT. . TCQGPNNNTKFAASINNVSFVLP
 |||. . .| ||||| .| ||||| ||||| . . . |||||. .|. .|:|:|
 AtLAC17 RSLNSKNFPANVPLNVDRKFFFTVGLGTNPCNHKNNQTCQGPTNTTMFAASISNISFTMP

LAC-2 SVALLQSYFFGQSNGVFTSDFPQNPTIPFNYTGTPPNNMTVSNGTKAVVLTFNTSVELVM
 . ||||| : |||:|:|. .|. .|:|||||:|||||
 AtLAC17 TKALLQSHYSGQSHGVYSPKFPWSPTVPFNYTGTPPNNMTVSNGTNLMVLPYNTSVELVM

LAC-2 QGTSIVAAESHPLHLHGFNFVVGQGFNYDPNKDPSNFNLVDPMERNTAGVPAGGWIAI
 |:|:|:| |||||:|||||. .| |||||:| ||. ||. || ||
 AtLAC17 QDTSILGAESHPLHLHGFNFVVGQGFNFDPNKDPRNFNLVDP IERN TVGVPSGGWAAI

LAC-2 RFLADNPGVWFMHCHLDVHTSWGLRMAWIVLDGQPQNQIPPPPSDLPKC
 |||||:|||||:|||||. .|:|:| |||. |||||
 AtLAC17 RFLADNPGVWFMHCHLEVHTSWGLRMAWLVLGDGKPDQKLLPPPADLPKC

Figure 1. The amino acid sequence alignments of *Populus trichocarpa* *PtrLAC-2* and *Arabidopsis thaliana* *AtLAC17*
图 1. 毛果杨漆酶 *PtrLAC-2* 与拟南芥漆酶 *AtLAC17* 的氨基酸序列比对

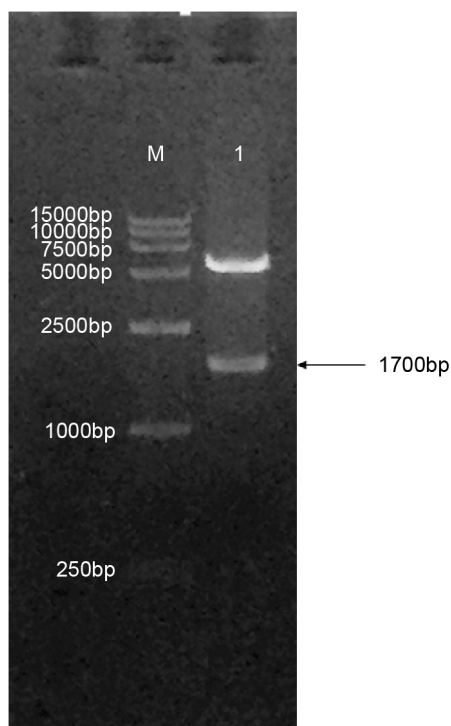


Figure 2. Identification of recombinant plasmid PtrLAC-2-pET-30a(+) with restriction enzyme, M. DNA Marker DL15000; 1. PtrLAC-2-pET-30a(+) digested by *Kpn* I and *Bam*H I

图 2. PtrLAC-2-pET30a(+). 重组质粒双酶切鉴定结果, M. DNA Marker DL15000; 1. *Kpn* I 和 *Bam*H I 双酶切后的 PtrLAC-2-pET30a(+)

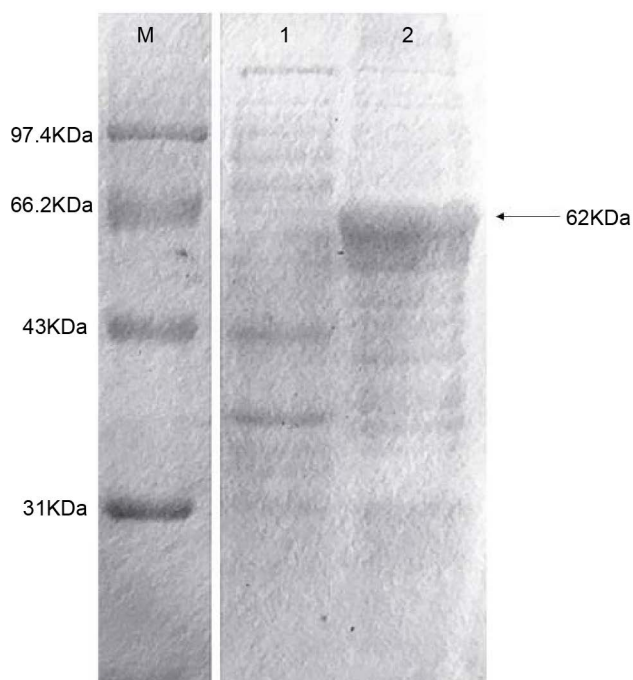


Figure 3. Induced expression of laccase PtrLAC-2 protein; M. Protein Marker; 1. Did not induced strain; 2. Protein expression by IPTG 3 hours

图 3. 漆酶 PtrLAC-2 蛋白的诱导表达; M. 蛋白 marker; 1. 未经诱导的重组蛋白; 2. IPTG 诱导 3 h 后的重组蛋白

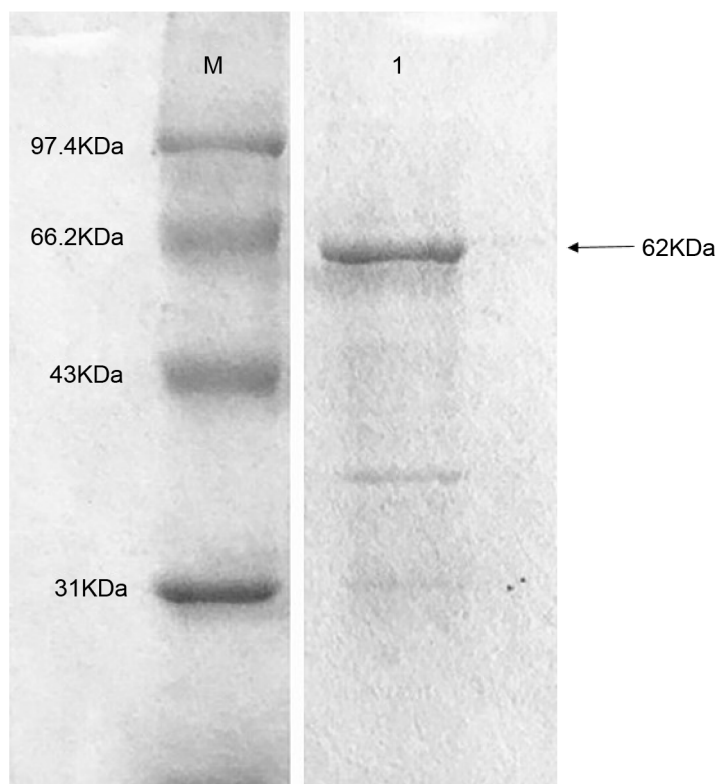


Figure 4. Purification result of recombinant protein; M. Protein Marker t; 1. The purified protein of PtrLAC-2

图 4. 重组蛋白的纯化; M. 蛋白 marker; 1. 纯化后的 PtrLAC-2 蛋白

3.5. 漆酶 *PtrLAC-2* 多克隆抗体的效价和特异性

以免疫前的兔血清为阴性对照，倍比稀释抗血清，ELISA 分析结果表明多克隆抗体的效价可达 1:102400(如图 5)。多克隆抗体以 1:1000 倍稀释后进行 Western blot 鉴定，结果显示多克隆抗体能与毛果杨全蛋白提取液在 62 kDa 大小的位置呈现特异性反应条带，实验结果表明制备的 *PtrLAC-2* 多克隆抗体具有较好的特异性(如图 6)。

4. 讨论

漆酶于 1883 年首次于漆树漆液中被发现，此后不断有新的漆酶被报道，除漆树科外，在火炬松、埃及榕、烟草、毛果杨、北美鹅掌楸、黑麦草都已被鉴定发现漆酶基因[11]。漆酶按照来源大致可分为植物漆酶、微生物(包括真菌和细菌)漆酶和动物漆酶。几类漆酶中研究报道较多的是真菌漆酶，植物漆酶一直缺乏有效的系统研究。早在 1958 年，Freudenberg 就提出植物漆酶可能与木质素合成相关，随后由于较长时间无法从植物中提取高纯度漆酶，该理论一直未受到重视[12]。直到 Sterjiades 等和 Bao 等分别从欧亚槭和火炬松中分离得到漆酶，并证明其可以在体外催化木质素单体的氧化聚合，有关植物漆酶的作用才逐渐引起人们的关注[13] [14]。Berthet S 等通过 T-DNA 插入诱变技术将拟南芥中的两个漆酶 *AtLAC4* 和 *AtLAC17* 敲除后发现植株根茎的木质部塌陷，并在双突变体的研究中发现木质素含量相比对照组有大量降低[15]。Zhao 等通过对拟南芥 *AtLAC4*、*AtLAC11*、*AtLAC17* 的三突变体研究，发现木质素无法正常沉积，同时也严重影响了拟南芥的正常生长[16]。上述研究报道表明拟南芥 *AtLAC17* 和其他漆酶基因一起在木质素的合成途径中发挥重要作用。

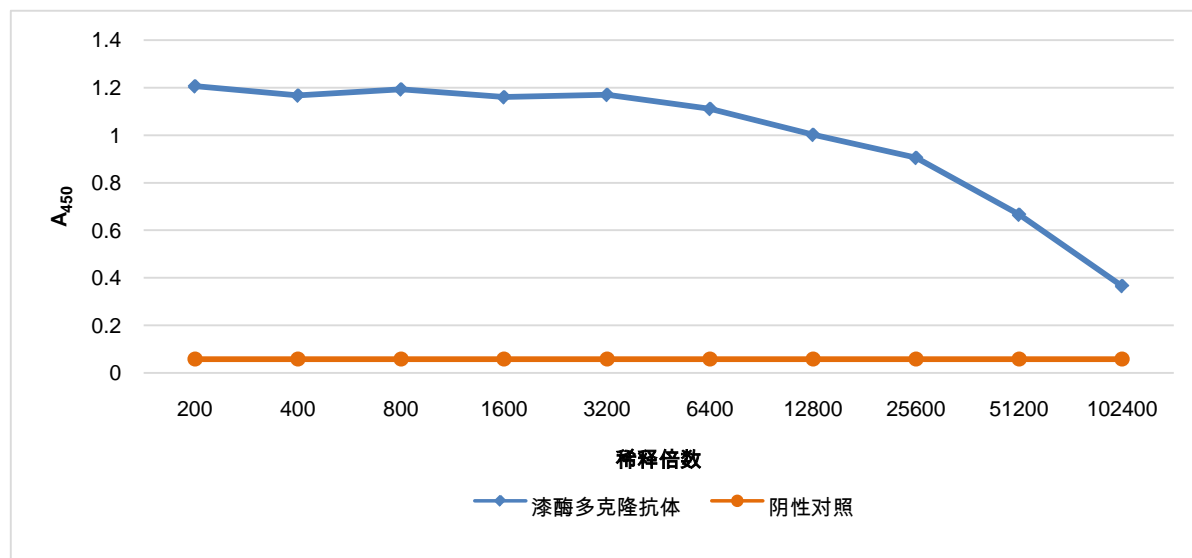


Figure 5. Titer of polyclonal antibody of PtrLAC-2 detected by ELISA

图 5. PtrLAC-2 多克隆抗体效价的 ELISA 测定

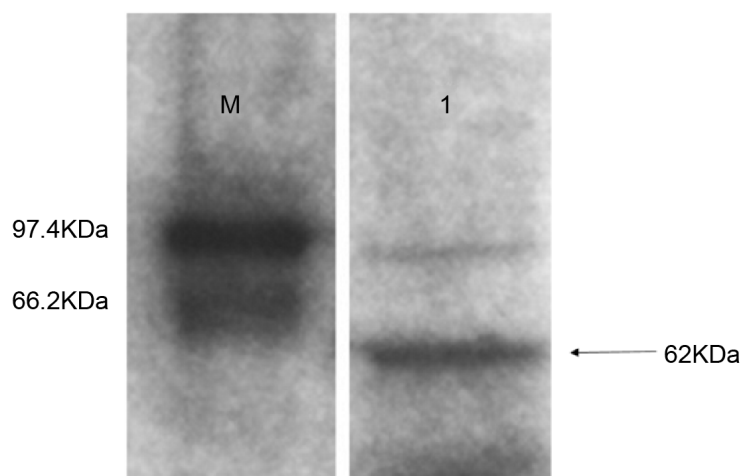


Figure 6. Identification of the specificity of PtrLAC-2 polyclonal antibody by Western blot; M. Protein Marker; 1. The recombinant protein of PtrLAC-2

图 6. PtrLAC-2 多克隆抗体特异性的 Western blot 检测; M. 蛋白 marker; 1. PtrLAC-2 重组蛋白

通过在原核生物中表达目的基因的重组蛋白产物，是研究目标蛋白功能特征和酶学特性的基础。常用的原核表达系统大肠杆菌由于生长迅速，培养基成分简单，可实现外源蛋白高效表达被广泛应用。本研究首先通过生物信息学方法结合基因人工合成技术，克隆出与 *AtLAC17* 同源性高达 66.21% 的毛果杨漆酶基因 *PtrLAC-2*，并构建 *PtrLAC-2-pET30a(+)* 原核表达载体，经 IPTG 诱导表达实现了重组质粒在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的高效表达，获得了大量重组蛋白。随后采用洗涤液对重组蛋白进行了纯化，获得了高纯度的目的蛋白，最后选用 4 次免疫方式对兔子进行抗原免疫，最终获得特异性较好的 *PtrLAC-2* 多克隆抗体，为深入理解植物漆酶的功能以及促进其在生物工程领域的应用奠定基础。

5. 结论

本研究成功实现毛果杨漆酶在大肠杆菌原核表达系统中进行体外表达，并制备了针对毛果杨漆酶

PtrLAC-2 多克隆抗体。该抗体的效价理想, 为进一步研究 PtrLAC-2 蛋白功能提供基础。

基金项目

北京林业大学杰出青年人才计划 100 万“中央高校基本科研业务费专项资金资助”(JC2015-01)。

参考文献

- [1] 艾明强. 吡喃糖氧化酶和漆酶在木质素生物降解中作用的研究[D]: [博士学位论文]. 济南: 山东大学, 2015: 28-30.
- [2] 王国栋, 陈晓亚. 漆酶的性质、功能、催化机理和应用[J]. 植物学通报, 2003(20): 469-475.
- [3] Guo, D.J., Chen, F., Inoue, K., *et al.* (2001) Downregulation of Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl CoA 3-O-Methyltransferase in Transgenic Alfalfa. Impacts on lignin structure and Implications for the Biosynthesis of G and S Lignin. *Plant Cell*, **13**, 73-88. <https://doi.org/10.1105/tpc.13.1.73>
- [4] Raes J, Rohde A, Christensen J H, *et al.* Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003,133:1051-1071. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026484>
- [5] Rogers, L.A., Dubos, C., Cullis, I.F., *et al.* (2005) Light, the Circadian Clock, and Sugar Perception in the Control of Lignin Biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 1651-1663. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri162>
- [6] 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.
- [7] 徐世晓, 赵新全, 孙平, 等. 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): 1605-1608.
- [8] Behrens, C.J., Linke, D., *et al.* (2017) Variants of PpuLcc, a Multi-Dye Decolorizing Laccase from *Pleurotus pulmonarius* Expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, **137**, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.014>
- [9] Ma, S.X., Liu, N., Jia, H., *et al.* (2017) Expression, Purification, and Characterization of a Novel Laccase from *Setosphaeria turcica* in *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*, **58**, 68-75. <https://doi.org/10.1002/jobm.201700212>
- [10] 李芳, 罗军, 许会芬, 等. 西农萨能羊 MAT 基因的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 西北农林科技大学学报, 2014(42): 10-11.
- [11] 曹山. 毛果杨木质素形成相关基因克隆及功能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016: 10-11.
- [12] Freudenberg, K., Harkin, J., Rechert, M., *et al.* (1958) Die and der verholzung beteiligten enzyme die dehydrierung des sinapyl alcohol. *Chemische Berichte*, **91**, 581-590. <https://doi.org/10.1002/cber.19580910317>
- [13] Sterjiades, R., Dean, J.F.D. and Eriksson, K.E.L. (1992) Laccase from Sycamore Maple (*Acer Pseudoplatanus*) Polymerizes Monolignols. *Plant Physiology*, **99**, 1162-1168. <https://doi.org/10.1104/pp.99.3.1162>
- [14] Bao, W., Omalley, D.M., Whetten, R., *et al.* (1993) A Laccase Associated with Lignification in Loblolly Pine Xylem. *Science*, **260**, 672-674. <https://doi.org/10.1126/science.260.5108.672>
- [15] Berthet, S., Demont-Caulet, N., Pollet, B., *et al.* (2011) Disruption of LACCASE4 and 17 Results in Tissue-Specific Alterations to Lignification of *Arabidopsis thaliana* Stems. *Plant Cell*, **23**, 1124-1137. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082792>
- [16] Zhao, Q., Nakashima, J., Chen, F., *et al.* (2013) LACCASE Is Necessary and Nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **25**, 3976-3987. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117770>

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2168-5665，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：br@hanspub.org