

灵芝漆酶注释基因 *Lacc1* 的生物信息学分析 及其 Cu^{2+} 诱导表达

陈岳文^{1,2,3}, 康信聪³, 熊兴耀¹, 刘东波^{1,2,3*}

(1.湖南省作物种质资源创新与利用重点实验室,湖南长沙 410128; 2.湖南农业大学园艺园林学院,湖南长沙 410128; 3.国家中医药管理局亚健康干预技术实验室,湖南长沙 410128)

摘要:为验证 *Lacc1* 基因的功能,揭示灵芝漆酶基因及其启动子结构与其转录表达的内在关系,预测了 *Lacc1* 的氨基酸序列结构及灵芝漆酶注释基因 *Lacc1* 的上游启动子区域,研究已测序的菌株——灵芝 P9 在 Cu^{2+} 诱导条件下漆酶基因 *Lacc1* 的表达情况。Protein Blast 分析结果表明,*Lacc1* 含有 3 个铜氧化酶(Cu-oxidase)保守结构域,与 *Polyporus ciliatus* 漆酶 lcc3-3 的相似性最高,为 71%,并具有高度保守的漆酶特征序列 L1-L4; 亚细胞位置和信号肽预测结果表明,*Lacc1* 含有信号肽,且为胞外分泌酶;*Lacc1* 基因上游启动子区域包含 1 个 TATA box、3 个金属响应元件(MRE)、5 个氮因子结合位点(NIT2)、1 个压力响应元件(STRE); 在 150 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} 的诱导下,*Lacc1* 基因的表达在第 6、8、10 和 14 天分别上调了 2.8、4.9、1.6 和 1.9 倍,通过对 *Lacc1* 的启动子结构和诱导表达分析,推测灵芝漆酶注释基因 *Lacc1* 的诱导表达特性与启动子区域的金属响应元件等调控位点具有极大相关性。

关键词: 灵芝; 漆酶; 生物信息学分析; Cu^{2+} 诱导表达

中图分类号: S567.3⁺1; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2013)03-0265-05

Bioinformatics analysis of putative laccase gene *Lacc1* from *Ganoderma lucidum* and Cu^{2+} induced gene expression

CHEN Yue-wen^{1,2,3}, KANG Xin-cong³, XIONG Xing-yao¹, LIU Dong-bo^{1,2,3*}

(1. Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, China; 2. College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 3. State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, Changsha 410128, China)

Abstract: To verify the function of *Lacc1* gene and investigate the relationship between the gene, promoter structure and transcription, expression for *Ganoderma lucidum* Laccase, we analyzed the amino acid structure of *Lacc1* and upstream promoter region of putative laccase gene *Lacc1*, whilst studied the putative laccase gene transcription in *Ganoderma lucidum* strain P9 induced by Cu^{2+} . Result of protein blast showed that *Lacc1* had three Cu-oxidase conserved domains and multiple sequence alignments showed that *Lacc1* had the highest homology with lcc3-3 of *polyporus ciliatus*, which was 71%, and the highly conserved laccase signature sequence L1-L4 was also found in *Lacc1*. The results of signal peptide prediction and sub-cellular location identification showed that *Lacc1* is an extracellular (secreted) protein containing signal peptide. The prediction of upstream promoter region of gene *Lacc1* showed 1 TATA box, 3 MRE (metal responsive element), 5 NIT2 (nitrogen regulatory element) and 1 STRE (stress responsive element). The expression of gene *Lacc1* was up-regulated 2.8-fold, 4.9-fold, 1.6-fold and 1.9-fold at 6th day, 8th day, 10th day and 14th day after induction by 150 $\mu\text{mol/L}$ Cu^{2+} , respectively, in comparison to the reference condition. Via the analysis of *Lacc1* sequence

收稿日期: 2013-03-04

基金项目: 国家“973”项目(2012CB723004); 国家农业科技成果转化项目(2012GB2D200328)

作者简介: 陈岳文(1988—), 男, 湖南衡东人, 硕士研究生, 主要从事珍稀中药材种质资源保护与可持续利用研究, chen_yuewen@foxmail.com; *通信作者, chinasaga@163.com

and Cu^{2+} induced gene expression, the Cu^{2+} induced transcription of *Lacc1* gene was closely related to regulation motifs such as the responding elements for metals in the promoter region.

Key words: *Ganoderma lucidum*; laccase; bioinformatics; Cu^{2+} induced expression

漆酶(benzenediol : oxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2)是一类含铜多酚氧化酶,多分布于植物^[1]和真菌^[2]中,在部分细菌^[3]和节肢动物中也有分布^[4]。目前,对漆酶的研究主要集中在担子菌亚门的白腐真菌^[5]。漆酶在孢子分裂、子实体分化、色素生成、抗胁迫、木质素降解^[6]过程中扮演着重要角色。漆酶具有广泛的底物专一性,能够直接催化氧化邻-苯二酚、对-苯二酚、氨基酚、多酚、多胺和二芳胺等难降解化合物^[7],在染料脱色、纸浆漂白、土壤修复、生物传感器和生物质能源^[8]等方面应用广泛。漆酶的合成与分泌受到营养水平(C/N)、培养条件、生长时期以及所添加诱导物(芳香类物质、金属离子等)的影响,这些影响因素大部分都作用在漆酶的转录水平,这可能与漆酶结构及其基因上游启动子区域相关的顺式作用相关^[9]。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)属于真菌门、担子菌纲、多孔菌科、灵芝属,其食用、药用价值一直都是关注的热点,人工栽培技术也相当成熟。目前,对灵芝分解、利用木质素的酶系统的研究很少。国家中医药管理局亚健康干预技术实验室于2012年5月发布的灵芝全基因组精细图谱是世界上首个公开发表的兼性腐生真菌基因组图^[10],它不仅提出了灵芝重要药效成分——灵芝三萜的完整代谢合成途径,而且揭示了灵芝在木质素纤维素降解方面的巨大潜力^[10]。在灵芝全基因组中,发掘出了真菌木质素氧化酶(fungal oxidative lignin oxidative enzymes, FOLymes)家族中的16个漆酶基因,与其他担子菌比较,灵芝漆酶基因拷贝数仅次于灰盖鬼伞菌(*Coprinopsis cinerea*),提示灵芝具有很强的木质素降解能力。根据灵芝基因组测序结果,*Lacc1*是由漆酶注释基因 *Lacc1* 所推断的氨基酸序列。笔者对 *Lacc1* 的氨基酸序列和漆酶注释基因 *Lacc1* 上游启动子区域进行分析预测,研究已测序的菌株——灵芝 P9 在 Cu^{2+} 诱导条件下漆酶基因 *Lacc1* 的表达情况,旨在为进一步探索漆酶基因的调控机制提供依据,为灵芝漆酶基因的功能基因组分析打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株及主要生化试剂

灵芝(*Ganoderma lucidum*)P9 菌株,由国家中医药管理局亚健康干预技术实验室保存。

反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit)和荧光定量 PCR 所需 SYBR Premix Taq Reaction Mixture 购自 Takara ;荧光定量 PCR 引物由深圳华大基因科技有限公司合成。

1.1.2 培养基

菌种生长培养基: PDA 培养基(马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂粉 15 g/L)。

漆酶产酶培养基: 秸秆粉(过 0.3 mm 孔径筛)30 g/L, 葡萄糖 10 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.005 g/L, 基础培养基 100 mL/L。

基础培养基: KH_2PO_4 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, CaCl_2 0.01 g/L, Tween-80 5 g/L, V-B₁ 0.1 g/L, 微量元素培养基 1 mL/L。

微量元素培养基: MnSO_4 0.5 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, CaCl_2 0.1 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, H_3BO_3 0.01 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L。

1.2 方法

1.2.1 *Lacc1* 氨基酸结构分析

通过 NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对 *Lacc1* 进行 Protein Blast, 与 NCBI 数据库中的氨基酸序列进行同源性比对;应用 DNAMAN 软件对 *Lacc1* 氨基酸序列与糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)漆酶(GenBank 登录号 AAR21094)、灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)漆酶(GenBank 登录号 ABP81837)、云芝(*Trametes versicolor*)漆酶(GenBank 登录号 CAA 77015)、黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)漆酶(GenBank 登录号 AAO42609)、裂褶菌(*Schizophyllum commune*)漆酶(GenBank 登录号 BAA

31217)、双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)漆酶(GenBank 登录号 ACN49096)、球型马拉色菌(*Malassezia globosa*)漆酶(GenBank 登录号 XP_001728597)等 7 个漆酶氨基酸进行序列比对,并构建系统发育树。

应用 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)和 Protcomp 9.0(<http://linux1.softberry.com/>)对 *Lacc1* 的氨基酸序列进行信号肽和亚细胞位置预测。

1.2.2 *Lacc1* 基因上游启动子区域预测

选取 *Lacc1* 基因上游 2 000 bp 区域,应用 Softberry(<http://linux1.softberry.com/>)和 TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/>)数据库对启动子区域转录调控元件进行预测。

1.2.3 菌株的培养

将灵芝 P9 菌种接种于 PDA 平板,于 25 °C 培养 7 d 后 4 °C 保存。取菌龄为 7 d 的菌块(直径约 6 mm)接种于装有 100 mL 液体产酶培养基的 250 mL 锥形瓶中,25 °C、150 r/min,避光培养。培养 72 h 后,将 CuSO_4 溶液加入到培养基中,至 Cu^{2+} 终浓度为 150 $\mu\text{mol/L}$ [11],并设置培养基中未加 Cu^{2+} 的阴性对照组。

1.2.4 粗酶液和菌丝的获得

收集不同培养时期(第 4、6、8、10、12、14 天)的灵芝菌球,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,菌球经液氮速冻后-80 °C 保存,备用。

1.2.5 RNA 的制备和 cDNA 反转录

灵芝总 RNA 提取:取不同时期的灵芝菌球样本,液氮速冻研磨成粉,采用改良 CTAB 法 [12] 提取。1% 琼脂糖凝胶电泳验证总 RNA 完整性,用紫外分光光度法(NanoDrop ND-1000)测定所提 RNA 的纯度和浓度。

取 1 μg 灵芝总 RNA 样本,用反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit, Takara)进行 RNA 的反转录,合成第一链 cDNA(根据试剂盒说明,总 RNA 样本中的基因组 DNA 污染会在 cDNA 链合成前去除),用紫外吸收法测定 cDNA 浓度。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

运用 Primer Premier 5.0 软件对 *Lacc1* 基因和内参基因 *GAPDH*(甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因)设计特异性引物,引物由深圳华大基因科技有限公司合成。

Lacc1-F: 5'-CCATTTCGCTCACCGTCATC-3';

Lacc1-R: 5'-CCTTTGCCTTCGTTGTTGTTTC-3';

GAPDH-5'-F: CGCTCAACAAGAAGACTTCGTC AA-3'; 5'-*GAPDH*-R: GTAGACAAGGAGGTCAC AGA-3'。

反应体系(10 μL): 5 μL SYBR Premix *Taq* Reaction Mixture, 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , 0.8 μL cDNA 模板(400 ng/ μL)和 3.4 μL ddH₂O。所有检测样品设置 3 个重复,并设置样本阴性对照(NTC)。RT-qPCR 于 Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR System 上进行。反应程序:95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。

1.2.7 标准曲线的制定

根据不同的 cDNA 浓度,分别采用不同的梯度稀释倍数(10 倍或 5 倍)制作 *Lacc1* 和 *GAPDH* 基因的标准曲线,计算扩增效率。

1.2.8 数据分析

采用文献[13]方法对 RT-qPCR 的数据进行处理,计算 *Lacc1* 基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *Lacc1* 氨基酸结构预测分析结果

漆酶注释基因 *Lacc1* 全长 1 539 bp,位于灵芝基因组图谱 scaffold 176 的 81869-83862 位(Genbank No. JH660822),由 *Lacc1* 基因所推断的 *Lacc1* 含有 512 个氨基酸。SignalP 4.0 结果显示,*Lacc1* 含有信号肽的可能性为 90.5%,剪切位点在 24 和 25 个氨基酸之间的最大可能性为 79.4%。由 Protcomp9.0 预测结果可知:*Lacc1* 在细胞外的可能性为 93%;在内质网的可能性为 3%,在线粒体的可能性为 3%;在高尔基体的可能性为 1%,由此可以推测 *Lacc1* 为胞外分泌蛋白。

Blastp 结果显示,*Lacc1* 氨基酸序列含有 3 个铜氧化酶保守结构域,GenBank 登录号(pfam07732、pfam00394 和 pfam07731),与 *Polyporus ciliatus* 的漆酶 LCC3-3 具有 71% 的最大相似性。同源进化分析结果如图 1 所示。灵芝漆酶 *Lacc1* 与 *T.ver* 漆酶

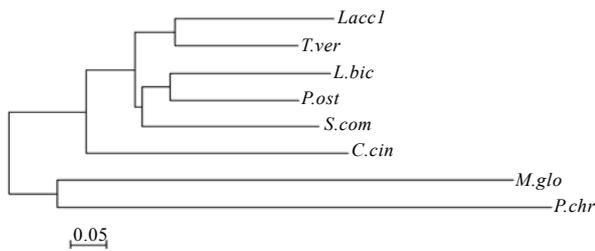


图 1 Lacc1 同源进化分析结果

Fig.1 Phylogenetic analysis of Lacc1 in basidiomycota fungi

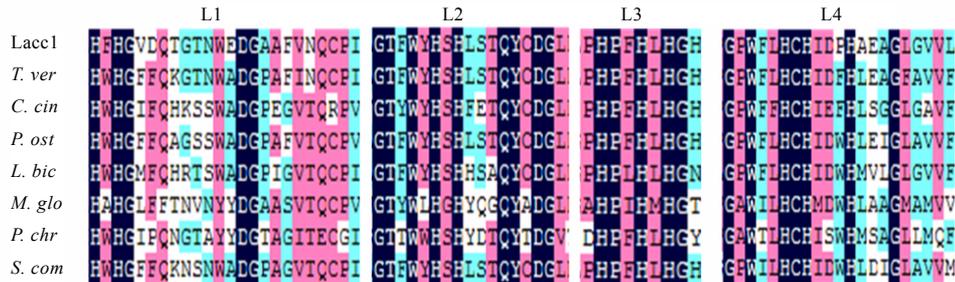


图 2 Lacc1 氨基酸序列中漆酶的特征序列比对结果

Fig 2 Comparison of signature sequences from Lacc1 with the corresponding sequences from other basidiomycota fungi laccases

2.2 漆酶基因 Lacc1 上游启动子区域分析结果

通过对 Lacc1 基因上游 2 000 bp 的启动子区域进行分析,发现真核生物启动子的顺式作用元件(图 3),3 个金属响应元件(MRE)分别位于第-550,

-1654, -1673 位;5 个氮因子结合位点(NIT2)分别位于第-361, -431, -597, -1328, -1390 位;1 个压力响应元件(STRE)位于第-1432 位;核心启动子元件 TATA box 位于第-107 位。

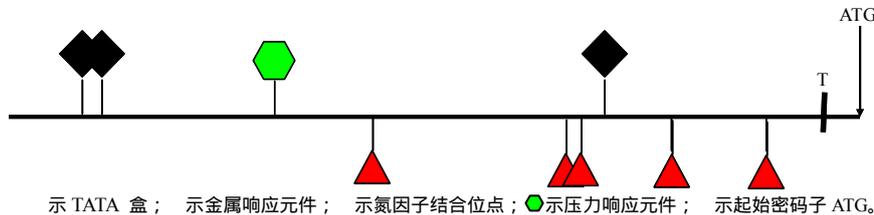


图 3 Lacc1 基因上游启动子区域顺式作用元件的分布

Fig.3 Distribution of putative cis-acting elements in the promoter region of Lacc1

2.2 Lacc1 和 GAPDH 基因的扩增效率及 Cu²⁺诱导下 Lacc1 基因的表达水平

根据 Lacc1 基因的标准曲线方程 $y = -3.3115x + 36.71 (R^2=0.9999)$ 和 GAPDH 基因的标准曲线方程 $y = -2.485x + 31.56 (R^2=0.9955)$, 计算得 Lacc1 和 GAPDH 基因的的扩增效率分别为 100.4%、91.1%。

在灵芝不同生长时期 Lacc1 基因于 Cu²⁺诱导下的表达情况见图 4。Cu²⁺的加入在转录水平上对 Lacc1 基因有影响,在全部检测时间点上对 Lacc1 基因有上调作用,其中在第 6、8、10、14 天 Lacc1 基因分别上调 2.8, 4.9, 1.6 和 1.9 倍。

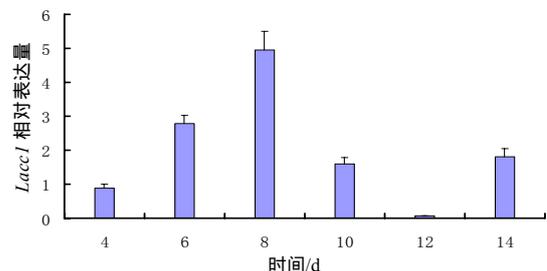


图 4 灵芝不同生长时期 Lacc1 基因于 Cu²⁺诱导下的表达
Fig.4 Expression of Lacc1 gene at different growth stages induced by Cu²⁺

3 结论与讨论

尽管不同来源的漆酶氨基酸序列差异很大,但其催化位点序列还是非常保守,且氨基酸 N 端都有信号肽^[14]。通过 BlastP 比对,在 Lacc1 的氨基酸序

同源,与 C.cin 漆酶的亲缘关系最近,其次是 P.post 漆酶、L.bic 漆酶、S.com 漆酶,与 M.glo 漆酶和 P.chr 漆酶的亲缘关系最远。

序列比对结果(图 2)显示,Lacc1 的氨基酸序列中含有非常保守的 10 个组氨酸和 1 个半胱氨酸残基。

列中发现 3 个铜氧化酶的保守结构域(GenBank 登录号 pfam07732、pfam00394 和 pfam07731)。在这 3 个结构域中通常结合 4 个铜原子 2 个组氨酸(His)和 1 个半胱氨酸(Cys)作为铜配体位于 N 端区域, 8 个组氨酸作为铜原子结合位点分布于 C 端^[8], 这 10 个组氨酸和 1 个半胱氨酸及其周围的氨基酸残基都非常保守, 因此, *Lacc1* 属于多铜氧化酶(MCO)中的一类。通过 *Lacc1* 氨基酸序列与其他白腐菌漆酶的氨基酸序列比对和分析, 发现 *Lacc1* 含有非常保守的漆酶特征序列 L1、L2、L3、L4(L1: H-W-H-G-X9-D-G-X5-QCPI; L2: G-T-X-W-Y-H-S-H-X3-Q-Y-C-X-D-G-L-X-G-X-(FLIM); L3: H-P-X-H-L-H-G-H; L4: G-(PA)-W-X-(LFV)-HCHI-DAE-X-H-X3-G-(LMF)-X3-(LFM)^[15])。此序列可以将 *Lacc1* 与其他的多铜氧化酶, 如抗坏血酸氧化酶、血浆铜蓝蛋白区分开来, 通常用于漆酶的鉴定^[15]。

笔者在对 *Lacc1* 基因的上游启动子区域进行分析过程中, 检索出多个顺式作用元件, 如 MRE(核心序列为 5'-TGCRNC-3')^[16]、NIT2(核心序列为 5'-TATCT-3'或 5'-GATA-3')^[9]和 STRE(核心序列为 5'-CCCT-3')^[16]等。 Cu^{2+} 诱导灵芝漆酶注释基因 *Lacc1* 转录过程中, *Lacc* 上游启动子中的 MRE 很有可能与 Cu^{2+} 应答, 从而参与调节基因的表达。Piscitelli 等^[9]研究认为, Cu^{2+} 能诱导漆酶及漆酶基因的转录, 其中 Cu^{2+} 对漆酶基因转录水平的影响与其启动子区域内的金属响应元件等顺式作用元件的分布有着紧密联系, 启动子区域中的金属响应位点能够与金属离子应答, 从而调节基因转录, 这种模式在真菌中普遍存在。除此之外, 漆酶基因 *Lacc1* 启动子区域出现了 STRE 和 NIT2, 表明该基因很有可能受到外界环境胁迫及受培养基中氮源调控^[9,16]。

笔者对灵芝漆酶基因 *Lacc1* 的启动子结构及 *Lacc1* 的 Cu^{2+} 诱导表达情况进行分析, 明确了启动子区域的 MRE 等调控位点和 Cu^{2+} 诱导 *Lacc1* 基因表达间的关系, 这为后续利用定点突变等手段阐明 *Lacc1* 基因与启动子区域调控位点的关系, 以及通过异源表达验证 *Lacc1* 基因功能提供了依据, 为发掘木质素降解高效酶系打下了基础。

参考文献:

[1] Mayer A M . Polyphenol oxidases in plants—recent progress[J] . *Phytochemistry* , 1987 , 26 : 11–20 .

- [2] Hatakka A . Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi , production and role in lignin degradation[J]. *FEMS Microbiology Letters* , 1994 , 13 : 125–135 .
- [3] Cardenas W , Dankert J R . Cresolase , catecholase and laccase activities in haemocytes of the red swamp crayfish[J] . *Fish Shellfish Immunology* , 2000 , 10 : 33–46 .
- [4] Kramer K J , Kanost M R , Hopkins T L , et al . Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems[J] . *Tetrahedron* , 2001 , 57 : 385–392 .
- [5] Saparrat M , Balatti P A , Martinez M J , et al . Differential regulation of laccase gene expression in *Coriopsis rigida* LPSC No.232[J] . *Fungal Biology* , 2010 , 114(11/12) : 999–1006 .
- [6] Kilaru S , Hoegger P J , Kues U . The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies[J]. *Current Genetics* , 2006 , 50(1) : 45–60 .
- [7] Giardina P , Faraco V , Pezzella C , et al . Laccases : A never-ending story[J] . *Cellular and Molecular Life Sciences* , 2009 , 67(3) : 369–385 .
- [8] Ursula Kues , Martin Rühl . Multiple multi-copper oxidase gene families in basidiomycetes – what for?[J] . *Current Genomics* , 2011 , 12(2) : 72–94 .
- [9] Piscitelli A , Giardina P , Lettera V , et al . Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi[J] . *Current Genomics* , 2011(12) : 104–112 .
- [10] Liu D , Gong J , Dai W , et al . The genome of *Ganoderma lucidum* provides insights into triterpenes biosynthesis and wood degradation[J] . *PLoS ONE* , 2012 , 7(5) : e36146 .
- [11] Pezzella C , Lettera V , Piscitelli A , et al . Transcriptional analysis of *Pleurotus ostreatus* laccase genes[J] . *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2012 , 97(2) : 705–717 .
- [12] 康信聪, 刘东波, 夏志兰, 等 . 北冬虫夏草 DNA 提取方法的比较[J] . *湖南农业大学学报 : 自然科学版* , 2011 , 37(2) : 147–149 .
- [13] Schmittgen T D , Livak K J . Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J] . *Nature Protocols* , 2008 , 3(6) : 1101–1108 .
- [14] 钞亚鹏, 钱世钧 . 真菌漆酶分子生物学研究进展[J] . *生物工程进展* , 2001 , 21(5) : 23–27 .
- [15] Kumar S V , Phale P S , Durani S , et al . Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family[J] . *Biotechnology and Bioengineering* , 2003 , 83(4) : 386–394 .
- [16] Soden D M , Dobson A D . Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajorcaju*[J]. *Microbiology* , 2001 , 147(7) : 1755–1763 .

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维