



青島農業大學

学士学位论文

题 目	利用 GS115 异源表达大球盖菇 GL0170 中漆酶基因及其功能验证
姓 名	李敏
学 号	20180202997
学 院	生命科学学院
专 业	生物技术（食用菌）
班 级	201801
指导教师	郭立忠

二〇二二年五月

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的学位论文，是在导师的指导下进行研究工作所取得的原创性成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中标明。

本声明的法律后果由本人承担。

论文作者（签名）：

年 月 日

学位论文授权使用授权书

本论文作者完全了解青岛农业大学有权保留并向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权青岛农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其它复制手段保存、汇编学位论文。

论文作者（签名）：

年 月 日

指导教师（签名）：

年 月 日

利用 GS115 异源表达大球盖菇 GL0170 中漆酶基因及其功能验证

摘要：近年来，国内外对漆酶的研究多为木质素分解、纸浆漂白、染料废水脱色、对环境有害物质的降解等。毕赤酵母表达系统是目前已开发的较为成熟的、用于表达外源性蛋白质的甲醇营养型表达系统。用毕赤酵母作表达漆酶的宿主菌，可以有效提高漆酶的产量。本研究利用毕赤酵母构建重组表达载体 pPIC9K-Lac-QM2-GS115，将大球盖菇中提取到的漆酶基因 *Lac-QM2* 成功进行异源表达。通过最适产酶条件优化，得出该漆酶的最适诱导时间为 96 h，最适甲醇浓度为 1.0%。该研究成果拓展了漆酶的生产途径，在环保、食品、造纸、合成染料的脱色、脱毒等方面有着十分广阔的应用前景。

关键词：漆酶；毕赤酵母；大球盖菇；优化

Heterologous expression of laccase gene in GL0170 of *Stropharia rugosoannulata* by GS115 and its functional verification

Abstract: At present, the research on the application of laccase is mainly focused on the decomposition of lignin, pulp bleaching, decolorization of dye wastewater, degradation of toxic substances in the environment and so on. *Pichia pastoris* expression system is a methanol nutritional expression system developed in recent years and widely used to express foreign proteins. Using *Pichia pastoris* as host bacteria to express laccase can effectively increase the yield of laccase. In this study, the laccase gene *Lac-QM2* extracted from *Stropharia rugosoannulata* was successfully heterogeneously expressed by constructing *Pichia pastoris* recombinant expression vector pPIC9K-Lac-QM2-GS115. Through the optimization of the optimum conditions for laccase production, it was concluded that the optimum induction time of laccase was 96h and the optimum methanol concentration was 1.0%. The results of this experimental research expands the production way of laccase, and have a very broad application prospect in the fields of environmental protection, food, papermaking, decolorization and detoxification of synthetic dyes.

Key words: Laccase; *Pichia pastoris*; *Stropharia rugosoannulata*; Optimize

目 录

1 文献综述.....	1
2 材料与方法.....	3
2.1 实验材料.....	3
2.1.1 试剂.....	3
2.1.2 实验菌株.....	4
2.1.3 主要仪器设备.....	4
2.1.4 培养基及试剂配制.....	5
2.2 实验方法.....	5
2.2.1 目的基因扩增.....	6
2.2.2 质粒提取及酶切.....	7
2.2.3 pPIC9K-Lac-QM2 表达载体的构建.....	8
2.2.3.1 pPIC9K-Lac-QM2 同源重组连接.....	8
2.2.3.2 pPIC9K-Lac-QM2 热激转化.....	8
2.2.3.3 pPIC9K-Lac-QM2 转化子验证.....	8
2.2.4 pPIC9K-Lac-QM2 重组质粒线性化.....	9
2.2.5 毕赤酵母感受态制备.....	9
2.2.6 转化 GS115 及验证.....	10
2.2.6.1 电击转化.....	10
2.2.6.2 pPIC9K-Lac-QM2 重组转化子筛选.....	10
2.2.7 pPIC9K-Lac-QM2-GS115 诱导表达.....	11
2.2.8 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白纯化.....	11
2.2.8.1 镍柱亲和层析.....	11
2.2.8.2 SDS-PAGE 检测.....	12
2.2.9 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白功能验证.....	13
2.2.10 pPIC9K-Lac-QM2 产酶条件优化.....	13
3 结果.....	14
3.1 Lac-QM2 目的基因扩增验证.....	14
3.2 pPIC9K-Lac-QM2-DH5 α 验证.....	14
3.3 pPIC9K-Lac-QM2-GS115 筛选验证.....	15
3.4 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白 SDS-PAGE 分析结果.....	16

3.5 筛选 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白最适产酶条件.....	16
4 分析与讨论.....	18
5 结论.....	18
参考文献.....	19
致谢.....	21

1 文献综述

漆酶 (Laccase, EC 1.10.3.2) 是一种含 Cu^{2+} 的多酚氧化酶, 能催化酚类和非酚类化合物芳族胺、羧酸、类固醇激素、生物色素等产生醌类化合物、羰基化合物与水, 于细菌、真菌、植物和昆虫中广泛存在^[1]。真菌漆酶主要用于木质素降解, 而植物漆酶主要起到木质素合成的作用, 实际应用于生产的漆酶主要来源于真菌^[2]。近年来, 国内外对漆酶的研究多为木质素分解、纸浆漂白、染料废水脱色、对环境有害物质的降解等。樊云燕等研究了枯草芽孢杆菌漆酶的木质素降解性能, 发现其对木质素的降解率在培养 24 h 后达到了 17.1%^[3]; 陈荣平等进行了漆酶催化活性染料模拟废液脱色的性能研究, 发现漆酶对 100 mg/L 的 C.I. 活性蓝 19 染料模拟废液的催化脱色率为 72.2%^[4]; Anastasia Zerva 等发现金顶侧耳漆酶对橄榄油生产废水中的酚类物质含量降低的影响^[5]; Piyangkun Lueangjaroenkit 等发现多带曲霉 KU-RNW027 中的一种漆酶在无氧化还原介质体系中降解染料和医药产品的新特性^[6]。

分泌漆酶的真菌主要有担子菌、子囊菌与半知菌等高等真菌, 其中担子菌主要有平菇、白灵菇、灰树花、黑木耳、云芝等^[7]。大球盖菇 (*Stropharia rugosoannulate*) 隶属担子菌亚门、层菌纲、伞菌目、球盖菇科, 它可分泌多糖、甾体化合物等多种药理活性物质, 经济效益和生态效益都很高^[8]。大球盖菇中含有的漆酶可有效降解木质素^[9]。在环境污染治理中, 大球盖菇漆酶对土壤及废水中的 2,4,6-三硝基甲苯 (TNT)、苯胺化合物、苯甲酚、二甲苯、甲酚、氯苯和氯化苯酚等各种有害芳香族化合物能有效降解, 因此, 大球盖菇漆酶在环境生态修复中具有十分重要的作用^[9]。

毕赤酵母表达系统是目前已开发的较为成熟的、用于表达外源性蛋白质的甲醇营养表达系统^[10]。毕赤酵母具有目前最强、调控机理最严格的启动子之一——醇氧化酶基因启动子, 表达质粒能够稳定整合在基因组中的特定位置; 能够翻译后修饰加工外源蛋白, 并具有较高的表达能力, 同时它本身分泌的蛋白质较少, 这对下游的分离和提纯非常有利; 作为单细胞真核生物, 不仅能在菌体积累阶段短时间内快速生长到较高的菌体浓度, 且分子遗传学操作相对简单, 容易实现高密度发酵, 适用于外源基因的多拷贝整合和高效诱导表达^[11]。可是, 毕赤酵母也有自身的一些不利因素, 如糖基化缺失、生产时间长、溶氧要求高、甲醇安全隐患等^[12]。因毕赤酵母发酵时间较长, 其本身产生的大量蛋白酶能对外源性蛋白质进行特异性识别, 进而使其降解^[13]。

毕赤酵母作为一种较为成熟的外源蛋白表达系统,已成功表达了 500 多种外源蛋白,其多个优良的表达特点,如表达量高、分泌效率高、遗传操作简单、培养成本低、产业化较为容易等,也早已得到普遍证实^[12]。近年来毕赤酵母表达系统已成功高效表达了多个蛋白。宋细忠等利用毕赤酵母成功进行灵芝中的免疫调节因子 *LZ-8* 的表达研究^[14];叶德晓等利用毕赤酵母成功表达 α -L-鼠李糖苷酶 *AnRhaE*^[15];裴佐蒂等利用毕赤酵母成功表达灰盖鬼伞漆酶 *CCLCC1*^[16];钱晓芬等利用毕赤酵母成功表达牛乳铁蛋白功能片段 *BifF*^[17];魏东升等成功进行毕赤酵母高效分泌葡萄糖氧化酶的表达^[18]。

毕赤酵母 GS115 是一种甲醇营养型的工程菌,利用 AOX1 作为启动子,通过单一碳源甲醇可高效诱导外源蛋白的表达。BMGY 和 BMMY 培养基均含有能保持一定 pH 值的磷酸盐缓冲液,有利于分泌表达 pH 敏感度较高的外源蛋白。重组 GS115 的培养分两个阶段,分别以甘油和甲醇为碳源^[1]。甘油是一种可以被 GS115 迅速吸收到细胞中的碳源,既是细胞正常生长的物质基础,又可以为细胞提供必要的能量^[11]。甲醇不仅可作为 GS115 的碳源,还可诱导 AOX1 基因驱动外源基因表达,适宜的甲醇浓度对外源蛋白的表达十分关键^[16]。

本实验将以 pPIC9K 质粒作为融合表达载体。该载体为高效分泌表达穿梭载体,毕赤酵母 GS115 可用作宿主菌指导胞外分泌蛋白进行多拷贝整合,并利用组氨酸缺陷型标记对高拷贝转化体进行互补筛选。增加基因拷贝数是提高重组蛋白表达的最有效手段之一^[17]。因为 pPIC9K 含卡那 (Kan) 抗性基因,其阳性转化菌具有抗 G418 的能力,而整合的拷贝数和 G418 抗性存在一定计量依赖性,所以,获取高拷贝整合菌株可通过增加 G418 浓度^[19]。pPIC9K 载体大小 9,276 bp,质粒图谱如下:

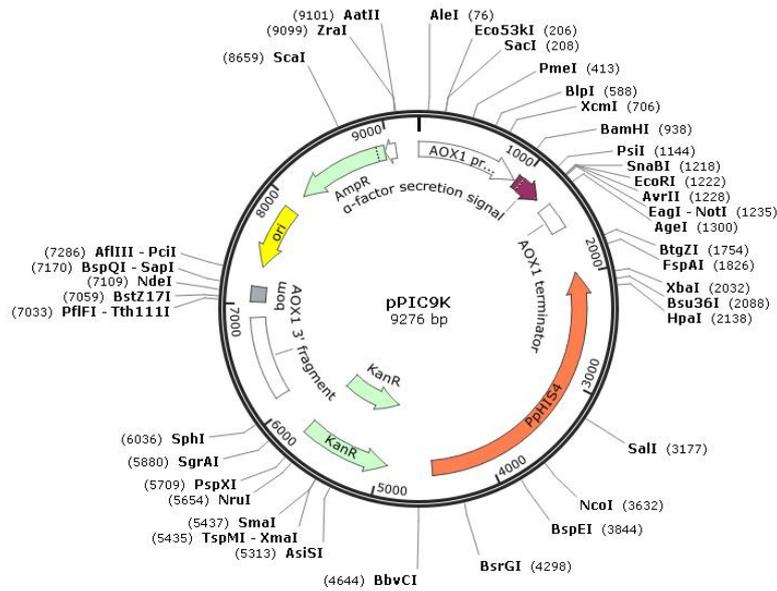


图 1.1 pPIC9K 质粒图谱

本研究主要通过查阅毕赤酵母表达载体构建的相关文献，将 *Lac-QM2* 基因片段整合到 GS115 染色体上，异源表达大球盖菇 GL0170 中漆酶。优化大球盖菇 GL0170 产漆酶的最适条件，构建在 GS115 中可以异源表达大球盖菇中分泌蛋白的体系。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 试剂

HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 试剂盒、C115 试剂盒购于南京诺唯赞生物科技有限公司；

50×TAE Buffer、酵母提取物、蛋白胨、琼脂粉、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、TureColor 双色预染蛋白 Marker、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司；

绿色荧光核酸染料、无氨基酵母氮源 (YNB)、过硫酸铵 (APS)、四甲基乙二胺 (TEMED) 购于索莱宝生物科技有限公司；

葡萄糖、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、丙三醇 (甘油)、山梨醇、无水乙醇、甲醇、盐酸购于莱阳市康德化工有限公司；

硫酸卡纳霉素（Kan）、G418 硫酸盐、生物素、2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐（ABTS）购于上海麦克林生化科技有限公司；

EcoRI、*Not I*、*Sac I* 购于宝生物工程(大连)有限公司；

2×P520、2×M5 购于北京聚合美生物科技有限公司；

丙二酸钠、丙二酸购于上海山浦化工有限公司；

琼脂糖购于德国 BioFroxx 公司；

Bio Gold 5,000 DNA Marker 购于浙江博而金科技股份有限公司；

30%丙烯酰胺（Acr-Bis）购于北京兰杰柯科技有限公司；

十二烷基硫酸钠（SDS）购于天津市北联精细化学品开发有限公司。

2.1.2 实验菌株

大球盖菇 GL0170 由山东省农业应用真菌实验室保藏；大肠杆菌 DH5 α 感受态购于北京擎科生物科技有限公司；毕赤酵母 GS115 感受态购于上海昂羽生物技术有限公司。

2.1.3 主要仪器设备

表 2.1 实验所使用的主要仪器和设备

仪器名称	型号	厂家
紫外分析仪	JY02S	北京君意东方电泳设备有限公司
电泳仪	DYY-12	北京市六一仪器厂
脱色摇床	WD-9405A	北京市六一仪器厂
核酸蛋白测定仪	BioPhotometer plus	德国艾本德公司
立式压力蒸汽灭菌器	LT-CPS	立德泰勃（上海）科学仪器有限公司
凝胶成像系统	LMS-26	美国 UVP 公司
电转仪	MicroPulser	美国伯乐公司
PCR 仪	A37029	美国应用生物系统公司
微型漩涡混合仪	XW-80A	上海沪西分析仪器厂有限公司
电热恒温培养箱	DRP-9082	上海森信实验仪器有限公司
低温恒温槽	DC-1015	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
紫外可见分光光度计	752	上海舜宇恒平科学仪器有限公司
振荡培养箱	ZQZY-98AN	上海知楚仪器有限公司
双人单面净化工作台	SW-CJ-2FD	苏州净化设备有限公司
程控五段金属浴	OSE-DB-02	天根生化科技（北京）有限公司
台式高速冷冻离心机	TGL20M	长沙湘智离心机仪器有限公司

2.1.4 培养基及试剂配制

(1) LB 培养基 (1 L) : LB 肉汤粉 25 g, 加蒸馏水定容到 1 L, 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

(2) YPD 培养基 (1 L) : 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 葡萄糖 20 g, 加蒸馏水定容到 1 L, 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

(3) MD 培养基 (1 L) : YNB 13.4 g, 葡萄糖 10 g, 加蒸馏水定容到 1 L, 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min, 另外加入 500×生物素 2 mL。

(4) 1 M pH6.0 磷酸盐缓冲液 (1 L) : 1 M K_2HPO_4 132 mL, 1 M KH_2PO_4 868 mL。

(5) BMGY 培养基 (1 L) : YNB 13.4 g, 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 甘油 10 g, 加 pH6.0 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液定容到 1 L, 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min, 另外加入 500×生物素 2 mL。

(6) BMMY 培养基 (1 L) : YNB 13.4 g, 酵母粉 10 g, 蛋白胨 20 g, 加 pH6.0 的 0.1 M 磷酸盐缓冲液定容到 1 L, 121°C 高压蒸汽灭菌 20 min, 另外加入甲醇 10 mL。

(7) Lac 检测液: 0.5 mM ABTS, 加 pH4.5 的 100 mM 丙二酸-丙二酸钠缓冲液定容至所需体积。

2.2 实验方法

前期将大球盖菇 GL0170 分泌蛋白利用 DEAE Sefinose FF 柱子进行纯化, 利用 LC-MS/MS 得到该蛋白的序列, 推测其为漆酶, 得到其氨基酸序列, 进而得到 DNA 序列, 克隆并异源表达该蛋白, 主要技术路线如下:



图 2.1 技术路线

2.2.1 目的基因扩增

根据大球盖菇 GL0170 全基因组测序结果，找到了大球盖菇 GL0170 漆酶序列，结合蛋白质组数据，选择高丰度的漆酶 *Lac-QM2* 作为本研究的目标基因。将 pPIC9K 通过同源重组技术与目的基因结合，在大肠杆菌中表达，筛选构建成功的转化子，引物序列如下：

表 2.2 引物序列

引物名称	引物序列(5'—3')
9K-QM2-F	GCTGAAGCTTACGTAGAAATTCATGCTCTCTCTCTTAGCTGTT
9K-QM2-R	GAATTAATTCGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGATGGTTGTTGAA TGTCTGAGGAG
9K-AOXI-F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
9K-AOXI-R	GCAAATGGCATTCTGACATCC

提取大球盖菇 GL0170 的 RNA 序列，利用 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper) 试剂盒反转录得 cDNA，具体步骤见说明书。

产物可立即用于 PCR 反应，进行 PCR 扩增。本研究使用的引物序列见表 2.2，PCR 体系和程序见表 2.3、2.4。

表 2.3 目的基因扩增体系

试剂	加入量
9K-QM2-F	1.6 μL
9K-QM2-R	1.6 μL
cDNA	1.6 μL
2 \times P520	15.0 μL
ddH ₂ O	10.2 μL
Total	30.0 μL

表 2.4 目的基因扩增程序

温度	时间	循环数
98 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
98 $^{\circ}\text{C}$	30 ses	
52 $^{\circ}\text{C}$	20 ses	35
72 $^{\circ}\text{C}$	30 ses	
72 $^{\circ}\text{C}$	5 min	1
4 $^{\circ}\text{C}$	forever	1

将扩增后的目的基因片段参照 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒进行切胶回收，具体步骤见说明书。

2.2.2 质粒提取及酶切

参照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒，具体步骤见说明书。选择 pPIC9K 载体上单个限制性内切酶位点，本研究中选择 *EcoR* I 和 *Not* I 将 pPIC9K 进行双酶切，酶切体系如下：

表 2.5 pPIC9K 双酶切体系

试剂	加入量
<i>EcoR</i> I	2.5 μL
<i>Not</i> I	2.5 μL
10 \times Q.Cut Buffer	5.0 μL
pPIC9K	40.0 μL
Total	50.0 μL

将酶切体系在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应约 2 h，然后参照 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒进行回收，具体步骤见说明书。

2.2.3 pPIC9K-Lac-QM2 表达载体的构建

2.2.3.1 pPIC9K-Lac-QM2 同源重组连接

将扩增后的目的基因片段和酶切后的 pPIC9K 利用 C115 试剂盒进行同源重组连接，50°C，15 min，结束后立即放冰上。连接体系如下：

表 2.6 同源重组连接体系

试剂	加入量
2×C115	6.0 μL
目的基因片段	2.0 μL
酶切 pPIC9K	4.0 μL
Total	12.0 μL

2.2.3.2 pPIC9K-Lac-QM2 热激转化

将 2.2.3.1 获得的重组质粒转化至大肠杆菌 DH5α，具体步骤见说明书。

2.2.3.3 pPIC9K-Lac-QM2 转化子验证

培养 12 h 后，平板上出现菌落，将单菌落挑入 600 μL 含 Kan 抗性 LB，在 37°C，125 rpm 的恒温振荡培养箱进行培养^[20]。继续培养 12 h 后，用菌液 PCR 筛选出正确的转化子，PCR 体系和程序如下：

表 2.7 转化子验证 PCR 扩增体系

试剂	加入量
9K-AOXI-F	0.8 μL
9K-AOXI-R	0.8 μL
菌液模板	0.8 μL
2×M5	7.5 μL
ddH ₂ O	5.1 μL
Total	15.0 μL

表 2.8 转化子验证 PCR 扩增程序

温度	时间	循环数
95°C	5 min	1
95°C	30 ses	
56°C	30 ses	34
72°C	1 min	
72°C	5 min	1
4°C	forever	1

将正确大小的片段对应的菌株转接到含 Kan 抗性 LB 中，37°C，125 rpm 振荡培养，参照 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取重组质粒，并以此为模板，进行 PCR 扩增，扩增条件同表 2.7、2.8，测序。

2.2.4 pPIC9K-Lac-QM2 重组质粒线性化

用 *Sac* I 对测序正确的重组质粒进行单酶切，以 pPIC9K 作为对照。酶切体系如下：

表 2.9 重组质粒单酶切体系

试剂	加入量
10×Q.Cut Buffer	3.0 μL
<i>Sac</i> I	1.0 μL
pPIC9K-Lac-QM2/pPIC9K	26.0 μL
Total	30.0 μL

将酶切体系在 37°C 反应约 1 h，然后参照 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒进行回收。

2.2.5 毕赤酵母感受态制备

(1) 将 10 μL 购买的毕赤酵母 GS115 感受态细胞接种于 50 mL YPD 中，于 30°C、200 rpm 摇床中进行过夜培养；

(2) 取 50 μL 过夜培养物，将其接种于 100 mL YPD 中，使其过夜生长到 $OD_{600}=1.3-1.5$ ；

(3) 4°C，1500×g 离心 5 min，收集细胞，用 100 mL 预冷的无菌水悬浮；

(4) 4°C，1500×g 离心 5 min，收集细胞，用 50 mL 预冷的无菌水悬浮；

(5) 4°C，1500×g 离心 5 min，收集细胞，用 20 mL 预冷的 1 M 山梨醇悬浮；

(6) 4°C, 1500×g 离心 5 min, 收集细胞, 用 1 mL 预冷的 1 M 山梨醇悬浮, 立即用于转化^[21]。

2.2.6 转化 GS115 及验证

2.2.6.1 电击转化

(1) 将 10 μL 线性化质粒加入 80 μL 上述感受态细胞, 然后将其转移到预冷的 0.2 cm 电转杯中;

(2) 在冰上放置 5 min;

(3) 打开电转仪, 调节电压为 1500V, 时间为 5 ms, 然后进行电击;

(4) 立刻加入预冷的 1 M 山梨醇 1 mL 于电转杯, 转移混合物至 1.5 mL 离心管中, 30°C、200 rpm 进行复苏 1-2 h;

(5) 8,000 rpm 离心 1 min, 弃上清 900 μL, 余 100 μL 重悬菌体, 均匀涂布到含 Kan 抗性的 MD 固体平板上, 平板于 30°C 培养, 直至克隆产生。

2.2.6.2 pPIC9K-Lac-QM2 重组转化子筛选

培养 2 天后, 平板上出现菌落, 将单克隆转化子分别划线于不同浓度 G418 抗性的 YPD 平板上, 并于 30°C 下培养 2-3 天, 筛选高拷贝转化子^[22]。分别设置 G418 浓度梯度为 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 (单位: mg/mL)。平板长出菌落, 对所筛选出的菌落进行进一步的确认。从高浓度 G418 平板中挑取单菌落, 用 50 μL 无菌水稀释作为模板, 进行菌液 PCR, 测序。PCR 体系和程序如下:

表 2.10 重组转化子筛选 PCR 反应体系

试剂	加入量
9K-AOXI-F	0.8 μL
9K-QM2-R	0.8 μL
菌液	0.8 μL
2×cTaq Mix	7.5 μL
ddH ₂ O	5.1 μL
Total	15.0 μL

表 2.11 重组转化子筛选 PCR 反应条件

温度	时间	循环数
95°C	10 min	1
95°C	30 ses	
56°C	30 ses	40
72°C	80 ses	
72°C	5 min	1
4°C	forever	1

2.2.7 pPIC9K-Lac-QM2-GS115 诱导表达

(1) 将上述测序正确的转化子接种至 10 mL BMGY, 在 30°C, 200 rpm 振荡培养, 直至 $OD_{600}=2-6$;

(2) 无菌各取 200 μ L, 稀释 5 倍, 测 OD_{600} , 剩余全部离心, 在 5,000 rpm 离心 4 min 后, 收集菌体, 弃上清;

(3) 用 0.1 M pH6.0 的磷酸盐缓冲液冲洗两次, 用 1 mL 重悬菌体, 并转接到 50 mL BMMY 中, 控制初始 $OD_{600}=1$, 加入 1% 的甲醇, 在 30°C, 200 rpm 振荡培养;

(4) 每隔 24 h 加甲醇至终浓度 1%, 以持续诱导菌体产酶, 取 1 mL 菌液, 测 OD_{600} , 12,000 rpm 离心 5 min, 取上清测定漆酶活力, 分析菌体生长状况及产酶情况, 连续诱导 120 h。

2.2.8 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白纯化

2.2.8.1 镍柱亲和层析

将上述漆酶活力高的菌株继续培养, 培养条件同 2.2.7, 培养至 120 h, 11,000 rpm 离心, 将上清进行 Ni 柱纯化, 具体步骤如下:

(1) 冲洗重力柱: 加入 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 10 mL, 使缓冲液自然流出, 重复 2 次。

(2) 蛋白上样: 将收集到的粗酶液缓慢加入到重力柱中, 使包含 His 标签的蛋白与 Ni 结合, 不含有 His 标签的蛋白从下面自然流出, 用 50 mL 离心管接流出液。

(3) 冲洗重力柱: 加入 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液 10 mL, 使缓冲液自然流出, 重复 2 次, 进一步清洗干净不能结合的蛋白, 使得获得的蛋白更加纯净。用

含有 2 mM 咪唑的缓冲液进行冲洗，把结合力弱的杂蛋白冲洗掉，用 50 mL 离心管接流出液。

(4) 蛋白洗脱：首先加入含 20 mM 咪唑的缓冲液 10 mL 用于蛋白洗脱，用 50 mL 离心管接流出液。然后用含 100 mM 咪唑的缓冲液 10 mL 进行蛋白洗脱，用 50 mL 离心管接流出液。

(5) 冲洗重力柱：用 10 mL 含有 500 mM 咪唑的缓冲液冲洗凝胶介质，使得没有脱落的蛋白全部脱落，用 50 mL 离心管接流出液。再加入 10 mL 蒸馏水，最后加入 20%乙醇，放于 4°C 保存。

(6) 蛋白超滤：将洗脱流出液加入到超滤管中，于 8,000×g 高速冷冻离心 15 min，将蛋白浓缩，弃流出液。用 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2-3 次，去除高浓度的咪唑^[23]。

2.2.8.2 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 检测亲和层析柱中蛋白纯化效果，分析结果图条带。SDS-PAGE 步骤如下：

(1) 制胶：按照配方分别配制分离胶、浓缩胶，混匀。将分离胶用移液枪加入胶室至距短玻璃板上沿约 2 cm，缓缓注入 1 mL 蒸馏水封住胶面，静置 30 min，待凝。当分离胶凝固后，倾去水层，加入浓缩胶，立即插好样品梳，静置 15 min，待凝。

表 2.12 分离胶配方（胶浓度：12.5%）

试剂	加入量
30%聚丙烯酰胺	3.33 mL
三蒸水	2.67 mL
4×分离胶 buffer (pH8.8)	2.0 mL
10%SDS	80.0 μL
10%APS	40.0 μL
Temed	8.0 μL
Total	8.0 mL

表 2.13 浓缩胶配方（胶浓度：3.25%）

试剂	加入量
30%聚丙烯酰胺	0.43 mL
三蒸水	2.57 mL
4×分离胶 buffer (pH6.8)	1.0 mL
10%SDS	40.0 μL
10%APS	20.0 μL
Temed	4.0 μL
Total	4.0 mL

(2) 点样：浓缩胶凝固后，将样品梳取出，并将电极缓冲液倒入电泳槽。取 20 μL 蛋白样品，于 100°C 变性 10 min，加入 5 μL 5×Loading Buffer，用移液枪点入胶孔。

(3) 电泳：将电泳槽与电泳仪正负电极连接，然后打开电源，调节电压为 120 V，时间为 90 min，然后进行电泳。

(4) 染色：电泳完毕，倒出电极缓冲液，将胶片小心地取下，浸泡于考马斯亮蓝染液中，室温染色 30 min。

(5) 脱色：用蒸馏水洗去表面染液，将胶片移入脱色液中，于脱色摇床脱色，直到条带明显。

2.2.9 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白功能验证

用 ABTS 作为底物测定漆酶活力是目前国际上应用最广泛的一种方法。将 10 μL 待测酶液加入 190 μL 含有 ABTS 的 Lac 检测液中，混合后 30°C 水浴，测量 420 nm 吸光值的变化^[24]。

2.2.10 pPIC9K-Lac-QM2 产酶条件优化

为了验证 pPIC9K-Lac-QM2 产酶的最适时间，将诱导时间设置为 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h，筛选产漆酶的最适时间。根据文献将本研究的甲醇浓度设置为 0.5%、1%、1.5%，每隔 24 h 补加一定量的甲醇并取样一次，测 OD₆₀₀，测酶活力，筛选添加甲醇的最适浓度。

3 结果

3.1 Lac-QM2 目的基因扩增验证

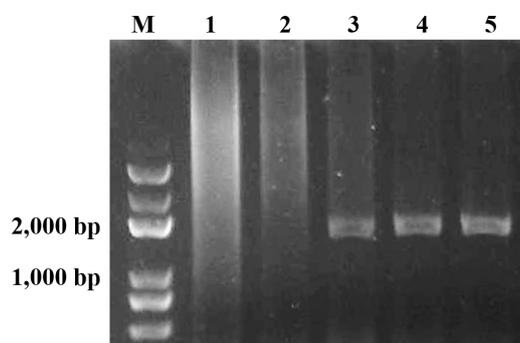


图 3.1 目的基因扩增验证结果

* M: DL 5,000 DNA Marker; 1-2: 阴性对照; 3-5: 分别扩增的 3 个相同的目的基因片段。

以 9K-QM2-F/R 为引物，以反转录的 cDNA 为模板，进行 PCR 扩增，后通过琼脂糖凝胶电泳，获得了一个目的大小为 1,572 bp 的 DNA 片段。进行胶回收。

3.2 pPIC9K-Lac-QM2-DH5 α 验证

挑取在 Kan 抗性的 LB 平板上生长的 10 个 pPIC9K-Lac-QM2-DH5 α 转化子，在 LB 中进行扩繁，以 9K-AOXI-F/R 进行菌液 PCR 鉴定，判断扩增产物的大小是否符合期望。验证结果如图 3.2 所示：

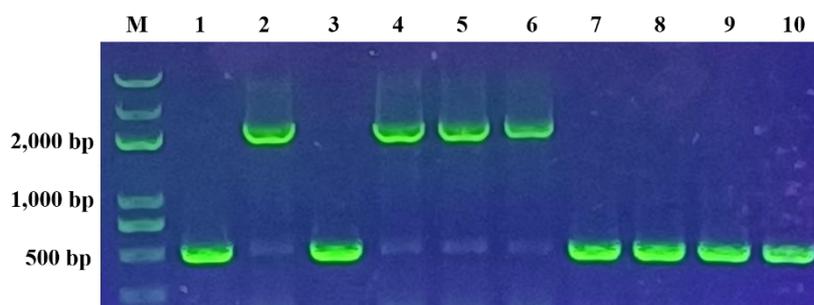


图 3.2 热激转化子验证结果

* M: DL 5,000 DNA Marker; 1-10: 分别挑选的 10 个不同的转化子。

经验证，2 号、4 号、5 号和 6 号转化子均在 2,200 bp 左右有明显条带，表明在 pPIC9K 质粒上插入了目的基因。将验证正确的 2 号转化子接种于 LB 中进行扩繁，并提取质粒，测序。

3.3 pPIC9K-Lac-QM2-GS115 筛选验证

将 *Sac* I 单酶切的质粒 pPIC9K-Lac-QM2 电击转化到 GS115, 进行 YPD 平板上高浓度 G418 单菌落的筛选, 以 9K-AOXI-F/9K-QM2-R 进行菌液 PCR, 检验 pPIC9K-Lac-QM2 是否成功转入毕赤酵母。PCR 结果如图 3.3 所示:

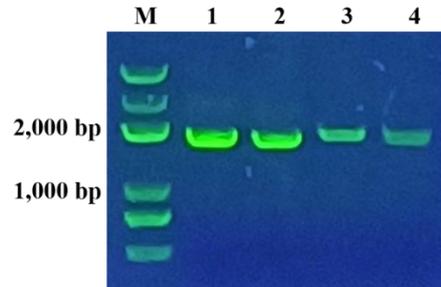


图 3.3 电击转化子筛选验证结果

* M: DL 5,000 DNA Marker; 1-4: 分别挑选的 4 个不同的重组转化子。

经验证, 4 个重组转化子均在 2,000 bp 左右有明显条带, 符合实验预期。将 PCR 产物送公司测序, 进一步确认是否正确。

对测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 序列比对, 发现与漆酶相似性最高。下载部分已知的漆酶序列, 进行系统发育树制作, 验证其分类属性^[25]。

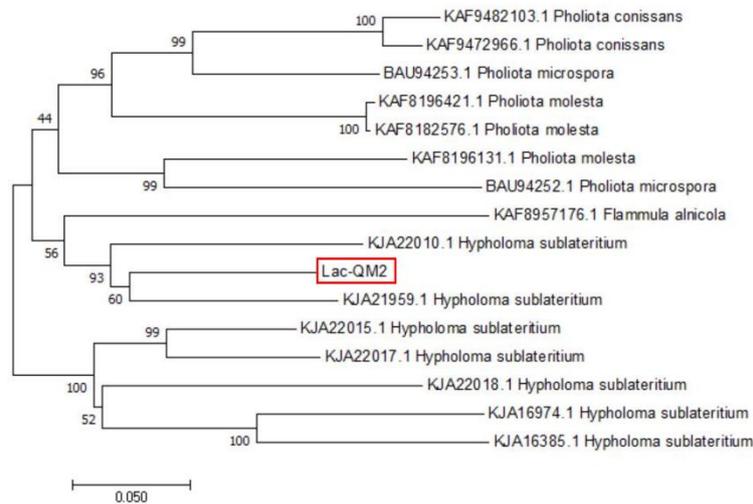


图 3.4 Lac-QM2 与其它漆酶蛋白同源性分析

该系统发育树显示, 测序蛋白基因 *Lac-QM2* 与 KJA21959.1 *Hypholoma sublateritium* 有较高同源性, NCBI 上显示二者相似度为 84.16%。

3.4 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白 SDS-PAGE 分析结果

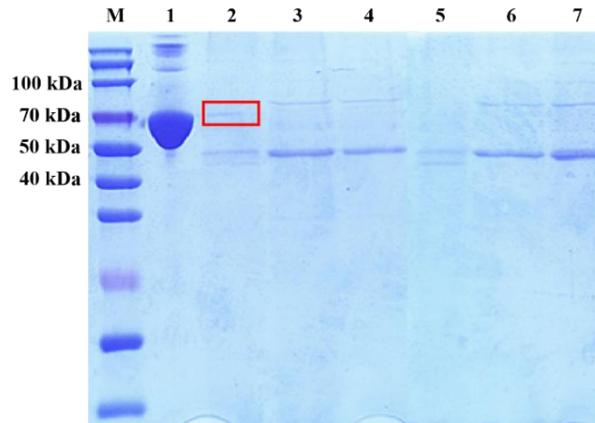


图 3.5 纯化 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白电泳结果

* M: 蛋白 Marker; 1: BSA 标品; 2: 纯化 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白; 3: 收集 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白的穿过; 4: pPIC9K-Lac-QM2 粗酶液; 5: 纯化对照组蛋白; 6: 收集对照组蛋白的穿过; 7: 对照组粗酶液

结果显示, 经重力柱纯化后的 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白样品在约 70 kDa 处有不同于其它样品的明显条带, 说明成功纯化了 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白。

3.5 筛选 pPIC9K-Lac-QM2 蛋白最适产酶条件

分别挑取 4 个不同的重组转化子于 BMMY 中培养, 选择 GS115 生长状况最好的菌株进行产酶条件优化, 4 个重组 GS115 菌株诱导生长状况如图 3.6 所示:

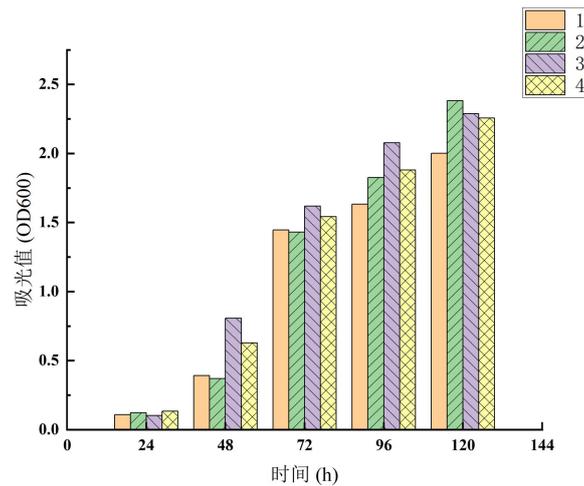


图 3.6 不同重组 GS115 菌株生长状况

图 3.6 显示, 3 号菌株在 48 h、72 h、96 h 时, 生长状况均明显优于其它菌株, 且在 120 h 仅次于 2 号菌株, 故取生长状况最好的 3 号菌株, 重新接入 BMMY, 进行酶的最适诱导时间和最适甲醇浓度研究, 测 OD₆₀₀, 测酶活力。

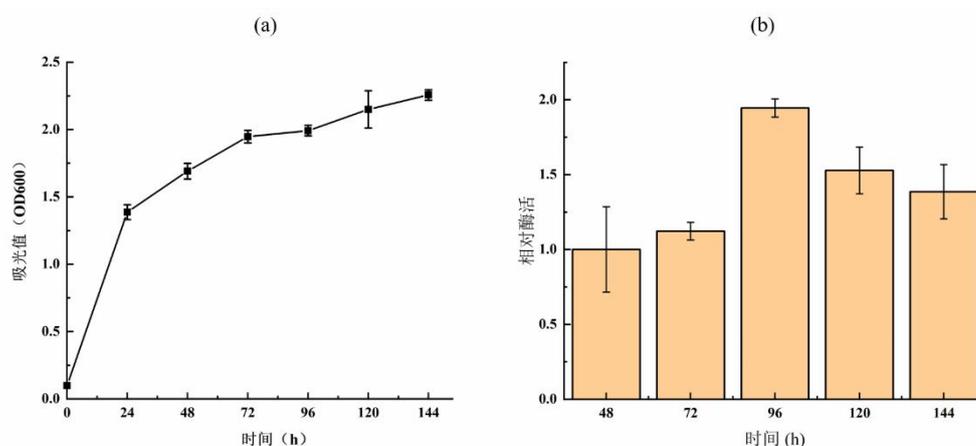


图 3.7 重组 GS115 产漆酶最适诱导时间的优化

由图 3.7(a)可知, 在 24 h 内重组 GS115 生长速率最快, 从 24-144 h 逐渐趋于平稳, 在 144 h 吸光值达到最高; 由图 3.7(b)可知, 漆酶活力从 48-96 h 明显增加, 并于 96 h 达到最高, 从 96-144 h 逐渐降低。这可能是因为随着发酵时间延长, GS115 代谢产物积累, 使已分泌的漆酶稳定性有所降低^[26]。由此可以推测该漆酶的最适诱导时间为 96 h。

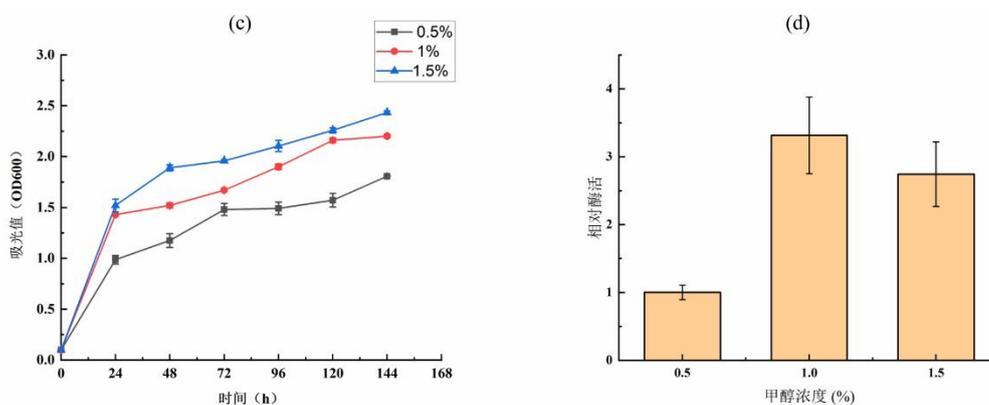


图 3.8 重组 GS115 产漆酶最适甲醇浓度的优化

由图 3.8 可知, 当甲醇浓度为 0.5% 时, 重组 GS115 菌株生长状况最差, 漆酶活力最低; 当甲醇浓度为 1.0% 时, 菌株生长状况较好, 漆酶活力最高; 当甲醇浓度为 1.5% 时, 菌株生长状况最好, 但相对酶活低于甲醇浓度为 1.0% 时。这可能是因为高浓度的甲醇会使 GS115 细胞产生毒害, 从而抑制细胞生长和蛋白分泌表达。经综合判断, 该漆酶的最适甲醇浓度为 1.0%。

4 分析与讨论

漆酶在木质素降解、废水处理、生物转化等方面潜力巨大^[27]。以毕赤酵母作为宿主菌表达漆酶，使实现漆酶产量大幅提高成为可能，在生产符合工业化应用所需热稳定性好，耐碱性强，pH 适应范围广等特殊性质的漆酶方面将有广阔的发展前景。可是，漆酶生物催化的分子机理和调控技术还需要全面分析和进一步的明确、验证，所以漆酶的应用研究仍停留在实验室的阶段，为了达到工业化应用目标还需不断努力^[2]。漆酶在环保、食品、造纸以及合成染料的脱色和脱毒等领域的应用前景非常开阔^[28]。

本研究利用毕赤酵母构建重组表达载体 pPIC9K-Lac-QM2-GS115，将大球盖菇中提取到的漆酶基因 *Lac-QM2* 成功进行异源表达。通过最适产酶条件优化，得出该漆酶的最适诱导时间为 96 h，最适甲醇浓度为 1.0%，今后如有需要可根据此结果做进一步优化。还可通过酶的底物谱研究、酶催化动力学研究、漆酶与其它分泌酶的协同催化研究等，推测其催化机理，进行结构解析，做更高层次的深入研究。

5 结论

该实验成功地构建了一种用于重组毕赤酵母的基因表达载体 pPIC9K-Lac-QM2-GS115，得到了包含目的基因的重组质粒；重组产物在毕赤酵母 GS115 宿主细胞中成功表达，并通过测定漆酶活力进行了功能验证；成功纯化漆酶蛋白，经 SDS-PAGE 电泳处理有大小正确的清晰条带；通过最适产酶条件优化，测定了该漆酶的最适诱导时间为 96 h，最适甲醇浓度为 1.0%。

参考文献

- [1] 邓涛.内切纤维素酶在毕赤酵母中的表达及其对造纸纤维素的修饰[D].广州:华南理工大学,2016.
- [2] 任红艳,张瑞琴,张婷婷,等.食用菌漆酶的提取与应用技术研究进展[J].中国食用菌,2018,37(6):8-14.
- [3] 樊云燕,李昆,张锦华.木质素降解菌的筛选及其漆酶性质研究[J].畜牧与兽医,2015,47(10):35-40.
- [4] 陈荣平,翦育林,陈镇,等.漆酶对活力染料模拟废液的催化脱色性能研究[J].湖南工程学院学报,2018,28(3):55-58.
- [5] Zerva, A; Pentari, C; Topakas, E.Crosslinked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases from pleurotus citrinopileatus induced in olive oil mill wastewater (OOMW) [J] *Molecules*, 2020, 25(9):2221.
- [6] Lueangjaroenkit, P; Teerapatsakul, C; Sakka, K,et al.Two manganese peroxidases and a laccase of trametes polyzona KU-RNW027 with novel properties for dye and pharmaceutical product degradation in redox mediator-free system [J] *Mycobiology*, 2019, 47(2):217-229.
- [7] 周永斌,钱磊,李凤美,等.大球盖菇液体发酵产漆酶条件的优化[J].江苏农业科学,2018,46(23) :114 -118.
- [8] 刘娟,闵冬青,唐可兰,等.大球盖菇的研究现状及发展前景[J].湖南农业科学,2021(6):113-117.
- [9] 鲍蕊,杜双田,张晶,等.温度对大球盖菇生长发育的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2016,44(10):193-198.
- [10] 钱洪喜.PRRSV N 基因原核双基因表达载体与毕赤酵母表达载体的构建及其表达研究 [D].四川:四川农业大学.2008.
- [11] 程宇.重组毕赤酵母分泌表达 LacTT 漆酶的发酵条件优化[D].广州:华南理工大学,2015.
- [12] 朱文,胡又佳,谢丽萍.毕赤酵母高效表达外源蛋白的相关策略及研究进展[J].中国医药工业杂志,2018,49(4):417-424.
- [13] 侯增淼,李晓颖,高恩,等.高效毕赤酵母表达载体的改造与应用[J].生物学杂志,2019,36(1):107-111.
- [14] 宋细忠,肖建勇,巩伯梁,等.利用毕赤酵母系统高效表达灵芝中的免疫调节因子 LZ-8 蛋白 [J].微生物学免疫学进展,2011,39(3):1-5.
- [15] 叶德晓,黄佳俊,卢宇靖,等. α -L-鼠李糖苷酶 AnRhaE 在毕赤酵母中的表达及应用[J].食品与发酵工业,2021,47(3):25-30;35.

- [16] 裴佐蒂,彭日荷,田永生.灰盖鬼伞漆酶在毕赤酵母中表达及条件优化[J].上海农业学报,2014,30(4):6-9.
- [17] 钱晓芬,吴涛,赵理想,等.基因拷贝数对重组毕赤酵母的牛乳铁蛋白功能片段表达及细胞存活率的影响[J].食品与发酵工业,2021,47(4):1-6.
- [18] 魏东升,段广东,钱江潮.葡萄糖氧化酶在毕赤酵母中的高效分泌表达[J].华东理工大学学报(自然科学版),2021,47(3):300-307.
- [19] 易绍萱,吴军,贺伟峰,等.人CTLA-4胞外区cDNA毕赤酵母表达载体的构建及高拷贝稳定整合菌株的筛选[J].重庆医学,2002,31(8):679-681.
- [20] Grandes-Blanco, AI; Tlecuil-Beristain, S; Díaz, R, et al. Heterologous expression of laccase (LACP83) of *Pleurotus ostreatus* [J] *BioResources*, 2017, 12(2):3211-3221.
- [21] 林亚虬.葡萄漆酶的毕赤酵母异源表达纯化及酶学特性与功能研究[D].南京:南京农业大学,2013.
- [22] 刘学锋,吕正兵,汪波,等.pPIC3.5K/Thanatin-(G8S2)-PPA 毕赤酵母表达载体的构建和表达[J].浙江理工大学学报,2012,29(6):847-851.
- [23] 赵书雪.丛毛单胞菌 QT12 降解 3-氨基苯甲酸关键基因的功能研究[D].青岛:青岛农业大学,2019.
- [24] 闫洪波.偏肿拟栓菌锰过氧化物酶 cDNA 基因克隆及在毕赤酵母中的表达[D].黑龙江:东北林业大学,2009.
- [25] 王闵凯,宋瑞清,邓勋.毛栓菌漆酶基因克隆及其酵母表达载体的构建[J].安徽农业科学,2009,37(27):12975-12977;13110.
- [26] 李彩联,郭艳丽,张铁鹰.高产漆酶菌株的筛选、鉴定和固态发酵条件优化[J].动物营养学报,2021,33(11):6501-6509.
- [27] Janusz, G; Kucharzyk, KH.; Pawlik, A, et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation [J] *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 52(1):1-12.
- [28] Hu Meirong; Zhou Xue; Shi Yiping, et al. Essential role of the N- and C-terminals of laccase from *Pleurotus florida* on the laccase activity and stability [J] *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 174(5):2007-2017.

致谢

岁月不居，时节如流。四年时光匆匆而逝，回首种种，百感交集，最多的是感恩。感谢郭立忠老师和于浩老师提供的优秀的科研平台，以及赵书雪师姐的倾囊相助，让我的毕业设计实验得以顺利施展；感谢一路支持我的父母，教会我为人处世，见证我一路成长；感谢每一个出现在我身边的同学朋友，把我的大学生活装点得丰富多彩；感谢一路披荆斩棘的自己，坚守初心，梦向远方。

追风赶月莫停留，平芜尽处是春山。执笔至此，我的大学生活就此终结，我也将离开熟悉的环境和熟识的人，去往另一个城市，踏上未知的新的征途。心之所向，素履以往。祝我和我在乎的人们前程似锦，一路发光，我们都会有一个光明美好的未来。