

## 一个推测的拟南芥漆酶基因在巴斯德毕赤酵母中的表达

周玉萍<sup>1,2</sup>, 陈琼华<sup>2</sup>, 陈佩<sup>2</sup>, 程惠贞<sup>1</sup>, 田长恩<sup>1,2\*</sup>

(1. 广州大学植物抗逆基因功能研究广州市重点实验室, 广州 510006; 2. 广州大学生命科学学院, 广州 510006)

**摘要:** *At5g01040* 基因是一个推测的拟南芥漆酶基因。根据其编码序列设计引物, 利用 RT-PCR 方法扩增出 1755 bp 的片段。测序结果表明, 该片段存在 3 个突变位点, 其中一个突变位点改变了所编码的氨基酸。将该片段克隆到表达载体 pPICZαB 上, 电击转化毕赤酵母。经筛选获得 80 个候选重组菌株, 其中 18 个菌株的培养液中存在漆酶活性, 说明所克隆的基因在毕赤酵母中实现了分泌表达, 证实了 *At5g01040* 编码的蛋白具有漆酶活性。

**关键词:** 漆酶; 拟南芥; 巴斯德毕赤酵母

中图分类号: Q813

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)04-0429-03

## Expression of a Putative *Arabidopsis* Laccase Gene in *Pichia pastoris*

ZHOU Yu-Ping<sup>1,2</sup>, CHEN Qiong-Hua<sup>2</sup>, CHEN Pei<sup>2</sup>, CHENG Hui-Zhen<sup>1</sup>, TIAN Chang-En<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangzhou Key Laboratory for Functional Studies on Plant Stress Resistant Genes, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** *At5g01040* encodes a putative laccase in *Arabidopsis*. Primers were designed according to the coding sequence of the gene. Using of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with above primers, a fragment of 1755 bp in length was amplified from total RNA of *Arabidopsis*. Sequencing result showed that there were three mutant sites in the cloned fragment with comparison to the sequence published in GenBank. However only one of them changes encoded amino acid, and this amino acid is not in conserved domain or motif found in functional laccase. The sequenced fragment was fused downstream of a N-terminal peptide encoding *S. cerevisiae* α-factor secretion signal driven by *AOX1* promoter in the pPICZαB and the recombinant vector was then introduced into *Pichia* by electroporation. Eighty Zeocin-resistant colonies were identified by PCR as candidate lines carrying *At5g01040*. Laccase activity analysis of individual candidate lines showed that eighteen candidates had laccase activity, suggesting that cloned gene is able to express secretively in *Pichia* cell and *At5g01040* encodes a protein with laccase activity.

**Key words:** Laccase; *Arabidopsis*; *Pichia pastoris*

漆酶(Laccase EC 1.10.3.2)是一类由单基因编码的含铜多酚氧化酶, 具有较宽的底物作用范围<sup>[1]</sup>, 广泛应用于木材加工、造纸、食品、纺织和环境保护等领域<sup>[2]</sup>。拟南芥共有 17 个推测的漆酶编码基因, 即从 *AtLac1* 至 *AtLac17*<sup>[3]</sup>, 关于这类基因功能的报道不多。实验证实 *AtLac15* (*At5g48100*) 基因的编码蛋白具有漆酶活性, 涉及种皮中黄酮类的氧化聚合<sup>[4]</sup>, 其突变体表型是种皮颜色变浅<sup>[4,5]</sup>、萌发率降低以及主根伸长受抑<sup>[5]</sup>。当培养在加有 PEG 的培养基上, *AtLac2* (*At2g29130*) 基因的 T-DNA 插入突变体的主根比野生型的长<sup>[6]</sup>; 在正常条件下, *AtLac8* (*At5g01040*) 基因的 T-DNA 插入突变体的开花期比野生型的提前 2 d 左右<sup>[6]</sup>。但是, 后两个

基因的编码产物是否具有漆酶活性未知。本研究拟利用 RT-PCR 方法克隆出 *At5g01040* 的编码序列, 转入毕赤酵母, 并在工程菌的发酵液中检测漆酶活性, 旨在证实该基因的编码产物具有漆酶活性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 拟南芥 *At5g01040* 基因克隆

根据拟南芥 (*Arabidopsis*) *At5g01040* 基因的编码序列和表达载体 pPICZαB 的多克隆位点设计如下引物。正向引物: 5'-TCACTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGCCTCGACTTCATCATTATCTC-3' *Xho* I; 反向引物: 5'-AGTCCGCGTTAGTAAGACAAATCAATGTTAGTCGTCCGAGAGTCATAGAT-3' *Sac* II。

收稿日期: 2008-08-26, 修回日期 2008-12-15。

基金项目: 广东省科技计划(2007B080701008); 广州市属高校科技计划(62031); 广州大学科研创新团队项目。

作者简介: 周玉萍(1970-), 女, 副教授, 博士研究生, 主要从事分子遗传学研究(E-mail: zhouyuping007@163.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: changentian@yahoo.com.cn)。