

偏肿革褥菌漆酶基因克隆及启动子序列分析

郑苗苗^{1,2}, 池玉杰²
(1 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;
2 东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:以优化后的漆酶培养基为基础,通过 RT-PCR 和 RACE 技术相结合,从偏肿革褥菌 *Lenzites gibbosa* 菌株中获得编码漆酶基因的 cDNA 及 Genomic DNA 的全长序列,Genomic DNA 大小为 2 165 bp. 通过比较该漆酶基因的 cDNA 和 Genomic DNA 的全长序列,发现该基因包含 11 个外显子和 10 个内含子. cDNA 序列的全长为 1 873 bp,其中包含一个完整的 ORF,长度为 1 563 bp,编码 520 个氨基酸. 序列在氨基酸水平上与彩绒革盖菌 *Trametes versicolor* 的相似性评价最高,相似性达 83%. 通过 SEFA-PCR 的方法,扩增得到漆酶基因起始密码子上游长 986 bp 的启动子序列. 分析表明,该启动子区域上除分布有 TATA-box、CAAT-box 以及 AP2 等基本的转录起始元件外,还存在有多个潜在的顺式作用元件序列位点,包括 7 个 MRE 元件、2 个 STRE 元件、1 个 HSEs 元件、7 个氮因子结合位点等. 这些结果表明,不同的外源诱导物可以调节偏肿革褥菌漆酶基因的表达.

关键词:偏肿革褥菌; 漆酶基因; 启动子克隆; 转录调控
中图分类号:Q75 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)04-0524-07

Cloning of Laccase Gene and Analysis of Its Promoter Sequence
from *Lenzites gibbosa*

ZHENG Miaomiao^{1,2}, CHI Yujie²
(1 College of Life Science and Agriculture Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China;
2 College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract:The cDNA and Genomic DNA sequences of the laccase gene from *Lenzites gibbosa* were obtained by PCR and RACE technology, and the length of laccase gene was 2 165 bp. Comparison of the cDNA and DNA sequences showed that the laccase gene contained 11 exons and 10 introns. The cDNA length of laccase gene was 1 873 bp, including an ORF with 1 563 bp length and codes 520 amino acids. The closest organism was *Trametes versicolor* with 83% similarity level of amino acids. The 986 bp sequences of promoter located in the upstream of start code of laccase gene were obtained by the approach of SEFA-PCR. The promoter not only scattered in the basic transcriptional elements of TATA-box, CAAT-box and AP2, but also contained seven elements of MRE, two elements of STRE, one element of HSEs and seven nitrogen factor binding sites, etc. The laccase gene expression of the *Lenzites gibbosa* can be regulated by different exterior inducers.

Key words:*Lenzites gibbosa*; laccase gene; promoter cloning; transcriptional regulation

漆酶(Laccase)是一种多酚氧化酶,一般含有 4 个铜原子,分布于 3 个高度保守的不同结合位点,每个铜原子在催化机制中都有很重要的作用. 漆酶能催化 O₂ 通过 4 个电子还原成水,并且伴随着一些酚类底物的

收稿日期:2012-11-13 网络出版时间:2013-09-09
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130909.1900.006.html>
作者简介:郑苗苗(1982—),女,讲师,博士;通信作者:池玉杰(1964—),女,教授,博士, E-mail:chiyujie@126.com
基金项目:国家自然科学基金(30671700);中国博士后科学基金(20090460866);齐齐哈尔市科技局社会发展攻关项目(SF-GG-201204)

氧化^[1]. 漆酶最早是由日本的吉田于 1883 年在漆树的分泌物中发现,随后 1893 年 Laborde 又证实在一些真菌中也含有这种酶. 到目前为止,发现漆酶广泛存在于真菌和植物中,而且某些昆虫、细菌当中也含有漆酶^[2]. 其中,真菌中的白腐菌类含有漆酶最多,研究也最为广泛. 近 120 多年来,漆酶一直是生物学、化学和环境科学等领域中十分活跃的研究热点^[3].

真菌漆酶存在很多同工酶基因,由于菌株的生长环境和生理状态不同其表达量也不同^[4]. 多项研究表明,受金属离子、营养元素和小分子芳香化合物影响,漆酶基因在转录水平表达较低^[5]. 由于转录本的增加主要是由转录模板上游的启动子及其相关顺式作用元件发挥作用后直接引发的,从而影响了漆酶的表达量^[6]. 因此,研究真菌漆酶基因转录控制区的结构与功能对于提高漆酶蛋白的表达产量以及在异源表达中提高漆酶活性至关重要. 本文通过 RT-PCR、RACE 技术和 SEFA-PCR 方法相结合,从偏肿革痂菌 *Lenzites gibbosa* 中获得编码漆酶基因的 cDNA、Genomic DNA 的全长序列及启动子序列,并且对其序列进行了分析,它们在 GenBank 上的登录号为 JF817353 和 JF906787.

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

偏肿革痂菌菌株采集于黑龙江省凉水国家自然保护区,由东北林业大学鉴定并保存. DNAquick_快

捷型植物基因组 DNA 提取系统、DNAquick Plant System 均为 TIANGEN 公司产品;E. Z. N. A 真菌 RNA 提取试剂盒、E. Z. N. A 凝胶回收试剂盒均为 O-MEGA 公司产品;Genome Walking Kit 试剂盒、两步法 RT-PCR 试剂盒、3'RACE试剂盒均为 TaKaRa 公司产品;SMART RACE cDNA 扩增试剂盒为 Clontech 公司产品;*Escherichia coli* JM109 感受态细胞为 TaKaRa 公司产品;pMD20-T Vector、LA *Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品;其余试剂为进口或国产分析纯.

1.2 基因组 DNA 和总 RNA 提取

以陈军等^[7]报道的优化后的漆酶培养基培养偏肿革痂菌. 提取偏肿革痂菌基因组 DNA 和总 RNA,产物用核酸检测仪测定纯度,通过琼脂糖凝胶电泳检验完整性.

1.3 cDNA 核心片段克隆

合成 cDNA 第 1 链参照两步法 RT-PCR 试剂盒使用说明. 在 GenBank 中选取 20 条不同漆酶全长基因的氨基酸序列,根据比对结果查找出同源序列保守区,从而设计 1 对简并引物(表 1),PCR 反应体系 25 μ L,含 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,dNTP Mixture(2.5 mmol/L)1 μ L, TaKaRa Ex *Taq*TM HS (5 U/ μ L)0.5 μ L,引物 Lcc-RT1 和 Lcc-RT2 各 0.5 μ L, cDNA 1 μ L. 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;然后以 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min 进行 30 个循环;于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,取 3 μ L 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定(以下检测方法相同).

表 1 扩增漆酶 cDNA 序列和基因组序列引物
Tab.1 Primers for amplifying the laccase gene fragment

引物名称	核苷酸序列(5' - 3')	氨基酸序列 ¹⁾
Lcc-RT1	ACNAGNATYCAYTGRCA YGGN	T S I H W H G
Lcc-RT2	TTYTGRTAYCAYTCNAYCTG	F W Y H S H L
3'race GSP (outer)	GGGCACATACGGCTCAGGA ACT	G A H T A Q E L
3'race NGSP (inner)	CAACTACGACGATCCGATCTTCC	N Y D D P I F
5' race GSP	CTGAAGGTATGGTTCGGGTGCGAC	C D P N H T F S
Lcc2-S1	ATGATGAATCTGGGCTTTCTCAACT	M M N L G F L N
Lcc2-S2	CTACTGGTCCCCACATCCAG	L D V G D Q *
Lcc2-SP1	CGTCATACAGATGTGCTTGAGGGT	D P Q A H L Y D
Lcc2-SP2	CGTGGGGGTCGTAAACAACAAAGG	P F V V Y D P H
Lcc2-SP3	CCCCTCAGTCCGTCGCA GTATT	Q Y C D G P R G

1) * 代表终止密码子.

1.4 漆酶 cDNA3'/5'末端的 RACE-PCR 扩增

参照 3'RACE 试剂盒和 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒使用说明合成 cDNA,根据漆酶 cDNA 基因片段序列,设计 3'/5'RACE 特异性引物(表 1),从而获得漆酶 cDNA 基因的 3'/5'末端序列. cDNA3'末端

套式 PCR 反应体系 25 μ L,第 1 次 PCR 反应含 10 $\times$ LA PCR Buffer II(Mg²⁺ Free)2 μ L,MgCl₂(25 mmol/L)1 μ L,1 $\times$ cDNA Dilution Buffer II 1 μ L,3' RACE Outer Primer (10 μ mol/L)1 μ L, TaKaRa LA *Taq*[®] (5 U/ μ L)1 μ L, Gene Specific Outer Primer(10 μ mol/L)

1 μL , cDNA 1 μL . 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 20 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min. 第 2 次 PCR 反应含 10 $\times$ LA PCR Buffer II (Mg^{2+} Free) 2.5 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 2.5 μL , dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μL , Gene Specific Inner Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 3' RACE Inner Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , TaKaRa LA *Taq* (5 U/ μL) 0.25 μL , 1st PCR 产物 0.5 μL . 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min. cDNA 5' 末端套式 PCR 反应体系 25 μL , 10 $\times$ Advantage2 PCR Buffer 2.5 μL , dNTP Mixture (10 mmol/L) 0.5 μL , 50 $\times$ Advantage2 polymerase Mixture 0.5 μL , 5' RACE-Ready cDNA 1.5 μL , GSP1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , UPM (10 $\times$) 2.5 μL . 反应条件同 3' RACE.

1.5 漆酶 cDNA 全长及 Genomic DNA 全长的扩增

根据 cDNA 3'/5' 末端测序的结果, 分别在其 5' 末端和 3' 末端设计特异性引物 (表 1), 用于扩增漆酶 cDNA 全长. 同时, 以基因组 DNA 为模板, 扩增漆酶 Genomic DNA 全长. cDNA 全长 PCR 反应体系 50 μL , 含 5 $\times$ Prime STARTM Buffer (Mg^{2+} Plus) 10 μL , dNTP Mixture (10 mmol/L) 4 μL , Prime STARTM HS DNA Polymerase (2.5 U/ μL) 0.5 μL , 引物 Lcc2-S1 和 Lcc2-S2 各 1 μL , 反转录 cDNA 5 μL . Genomic DNA 全长 PCR 反应体系及反应条件同 1. 3.

1.6 SEFA-PCR 法克隆漆酶基因的启动子序列

根据已获得的漆酶 Genomic DNA 全长序列, 设计 5' 端启动子特异性引物, 分别为: Lcc2-SP1、Lcc2-SP2、Lcc2-SP3 (表 1), 以基因组 DNA 为模板进行 3 轮 PCR 扩增, 获得漆酶基因 5' 端启动子序列.

1.7 漆酶基因结构及启动子结构分析

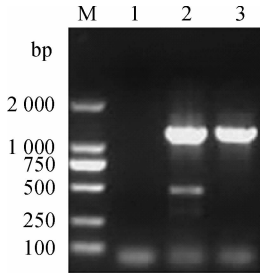
将上述获得的漆酶 cDNA 全长和漆酶 Genomic DNA 全长以及漆酶基因的启动子序列经过纯化试剂盒回收后, 进行 T 载体克隆, 并送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序. 应用相关生物学软件对获得的漆酶 cDNA 序列和漆酶基因组序列以及漆酶基因的启动子序列进行相似性比较及结构特点分析.

2 结果与分析

2.1 偏肿革痂菌漆酶 cDNA 的克隆与序列分析

根据真菌漆酶基因保守的 Cu-bind 结构域 I 和 IV 氨基酸序列设计的简并引物扩增漆酶 cDNA 核心片段, 获得 1 条约 1 200 bp 基因片段, 将其进行 T 载体克隆并测序, 结果得到大小为 1 185 bp 的基因片段, 其序列与 GenBank 中序列 Blastn 比对后得知其为漆酶基因片段 (图 1). 根据获得的漆酶 cDNA 核心片段的 3' 端保守区域设计特异性正向引物, 以此引

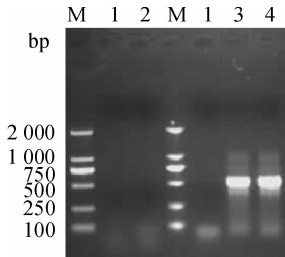
物扩增反转录的 3' RACE cDNA, 获得一大小约 500 bp 条带, 将其纯化后进行测序, 获得基因片段为 390 bp, 其 3' 端有典型的 PolyA 尾巴, 在 PolyA 尾前有一加尾信号 (AATAAA) (图 2). 将该序列输入到 GenBank 中 Blastx 比对后确认其与漆酶基因具有很高的相似性. 根据获得的漆酶 cDNA 核心片段 5' 端保守区域设计特异性反向互补引物, 以此引物扩增反转录的 5' RACE cDNA, 获得一大小约 750 bp 条带, 将其纯化后测序, 获得片段为 753 bp, 5' 端有一非编码区 (1 ~ 73 bp), 编码区的长度为 698 bp, 该序列与 RT-PCR 扩增的片段有重复区域, 且将该序列输入到 GenBank 中 Blastx 比对后发现其与漆酶基因具有很高的相似性 (图 3).



M: DNA marker DL2000; 1: 对照; 2、3: DNA 片段.

图 1 偏肿革痂菌漆酶基因的 RT-PCR 结果

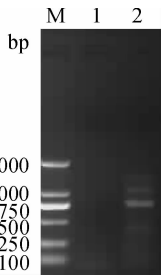
Fig. 1 RT-PCR products of laccase gene from *Lenzites gibbosa*



M: DNA marker DL2000; 1: 对照; 2: 3' RACE 内侧 DNA 片段; 3、4: 3' RACE 外侧 DNA 片段.

图 2 偏肿革痂菌漆酶基因的 3' RACE Outer PCR 和 3' RACE Inner PCR 结果

Fig. 2 3' RACE Outer PCR and Inner PCR of laccase gene from *Lenzites gibbosa*



M: DNA marker DL2000; 1: 对照; 2: 5' RACE DNA 片段.

图 3 偏肿革痂菌漆酶基因的 5' RACE-PCR 结果

Fig. 3 5' RACE-PCR of laccase gene from *Lenzites gibbosa*

根据 RT-PCR 获得的漆酶基因片段与 3'/5' RACE 获得的漆酶基因片段具有重复区域,剪切拼接后得到一全长为 1 563 bp 的漆酶基因,命名为 *Lg-lac2*。该漆酶基因 cDNA 序列在 GenBank 上的登录号为 JF817353。漆酶基因具有真核基因的一般特征:在其 5'端有一非编码区,长度为 73 bp;3'端有一典型的 PolyA 尾巴和一加尾信号(AATAAA)。通过 NCBI 的 ORF Finder 查找到 1 条长 1 563 bp 的完整开放式阅读框(Open reading frame, ORF),从第 95 ~ 1 637 bp 的核苷酸片段的相对分子质量约为 53 900,等电点(pI)约为 5.65,限制性酶切位点有 68 个,其编码 520 个氨基酸。利用 SignalP V2.0 软件分析编码的氨基酸序列发现其 N 端包括一典型信号肽序列(1~21 氨基酸),剪切位点为 VVG-AI。通过应用 Scanprosite 程序可得出在漆酶基因编码的氨基酸序列中含有 8 个 N-糖基化位点(N-X-S/T),天冬酰胺残基分别位于氨基酸序列的第 54、141、208、217、251、333、341、436 位,它们都是潜在的糖基化位点。应用 RPS-Blast 进行保守结构域分析表明,该蛋白有 3 个保守的结构域:即 pfam07732、pfam07731 和 pfam00394,其中 pfam07732 和 pfam07731 是多铜氧化酶中与次级代谢物生物合成、运输和分解代谢相关的结构域;第 3 个 pfam00394 是铜氧化酶(Cu-oxidase)的保守结构域(图 4)。将漆酶基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中登录的蛋白序列进行 Blastp 比对后发现,它与其他真菌漆酶基因编码的氨基酸序列具有较高的相似性。其中与彩绒革盖菌 *Trametes versicolor* 的氨基酸序列相似性评价最高,相似性达 83%,与变色栓菌 *Trametes* sp. I-62、栓菌 *Trametes* sp. 48424、灵芝 *Ganoderma lucidum* 的漆酶基因序列相似性达到 72%~81%。

2.3 漆酶 Genomic DNA 全长的获得与结构分析

根据漆酶 cDNA 的全长序列,设计 1 对特异性引物,以基因组 DNA 为模板通过 PCR 扩增获得该漆酶 Genomic DNA 的全长序列(图 5),长度为 2 165 bp,命名为 *Lg-lac2'*。该序列在 GenBank 中的登录号为 JF906787。

通过比较漆酶基因的 cDNA 和 Genomic DNA 全长序列,发现该漆酶基因包含 11 个外显子和 10 个内含子。内含子的长度分别为 56、53、64、51、53、59、58、57、67 和 84 bp,是典型的真菌内含子的长度(49~85 bp)^[3]。内含子中剪切位点的特征序列为 5'-GT...AG-3'(图 4)。

2.4 漆酶基因启动子的获得与转录调控元件分析

根据漆酶 Genomic DNA 全长序列信息,参照 Liu 等^[8]的方法,靠近 5'端设计 3 条反向引物 Lcc2-SP1、Lcc2-SP2 和 Lcc2-SP3,以偏肿革菌基因组 DNA 为

模板对该基因上游片段进行 hiTAIL-PCR 扩增。3 轮反应后,引物 Lcc2-SP1、Lcc2-SP2 和 Lcc2-SP3 获得了较长的 PCR 产物(图 6)。对第 2 轮 PCR 中的 Lcc2-SP2 和 AP2 引物产物进行回收测序,获得了总长度 1 500 bp 的序列信息,分析发现该序列包括了漆酶基因 5'末端及其上游。

利用 Softberry 网站的 Recognition of regulatory motifs with statistic 和 Promoter prediction 对所克隆得到的 *Lg-Lac2'*启动子序列进行分析。在所克隆的 *Lg-Lac2'*启动子序列中,5'端上游包含了真核生物启动子的基本转录调控元件,*Lg-lac2'*的启动子序列中存在许多潜在的外源诱导物响应结合元件:2 个 CAAT 框,分别位于第 -702、-776 位;5 个 AP2 元件,位于第 -119、-173、-348、-365、-731 位;1 个热击元件(CreA)(SYGGRG),位于第 -697 位;2 个潜在的压力响应元件(STRE)(CCCCT/AGGGG),分别位于第 -38、-247 位;1 个潜在的热击响应元件(HSEs)(TC-NNGAAN),位于第 -23 位;1 个异生物质反应元件(XRE)(CACGCW),位于第 -306 位;7 个氮因子结合位点(GATA)或其互补序列(TATC),分别位于第 -81、-112、-154、-218、-579、-779、-842 位;3 个金属应答元件(MRE)(TGCRGNG),分别位于第 -426、-451、-629 位;1 个 ACE 作用元件,位于第 -468 位;1 个 NIT2 元件,位于第 -154 位^[9-10](图 4)。

根据 *Lg-lac2* 的 Genomic DNA 全长序列的内含子及外显子的大小以及启动子序列的长度不同,在一定程度上与其他真菌进行比较。结果表明,*Lg-lac2* 的 T I、T III、T IV、T VI 和 T VII 内含子与其他种相同,T II、T V 和 T VIII 内含子除 *Flammol/Lulina velutipes* 较大外,其他几个种与 *Lg-lac2* 相同,T IX 和 T X 内含子 *Lg-lac2* 与其他真菌都有所不同。启动子序列以及 3'非翻译区序列的长度各种间也有所不同(图 7)。由此可见,不同种类真菌的漆酶基因结构不同,从而导致漆酶基因的功能以及漆酶基因的表达调控也各不相同。

2.5 偏肿革菌漆酶基因的系统进化分析

漆酶是一个具有重要生物学功能的酶,其在真菌、植物和动物生长过程中起着不可忽视的作用^[11-12]。因此根据它的氨基酸变异情况可在一定程度上了解物种进化的规律。用 Treeview 对白腐菌进行系统进化树分析,结果明显包括 3 部分,分别是多孔菌 Polyporales、伞菌 Agaricales 和子囊菌 Ascomycota。本文中的漆酶基因属于多孔菌,其中与 *Trametes versicolor* 漆酶基因在系统进化过程中遗传距离最近,相似性评价最高。从系统进化树也可看出,同一物种漆酶基因不同的同工酶之间遗传距离也存在着差异(图 8)。

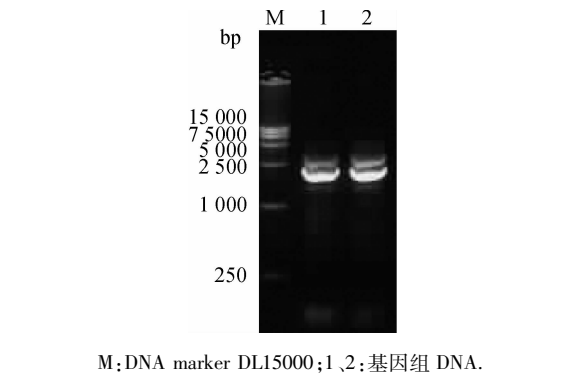


图 5 偏肿革柄菌漆酶 Genomic DNA 全长的 PCR 结果
Fig. 5 PCR products of laccase gene from *Lenzites gibbosa*

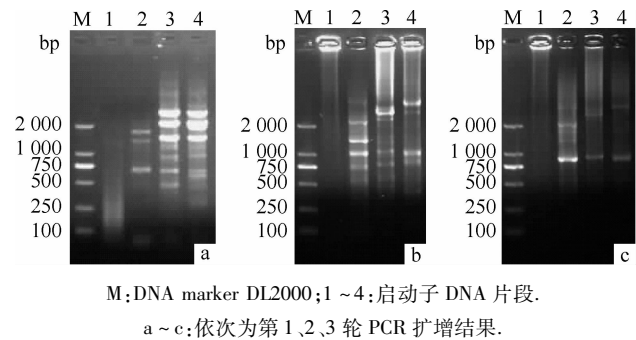


图 6 偏肿革柄菌漆酶 Genomic DNA 全长 5'启动子 hiTAIL-PCR 扩增
Fig. 6 HiTAIL-PCR products of 5'promoter of laccase gene from *Lenzites gibbosa*

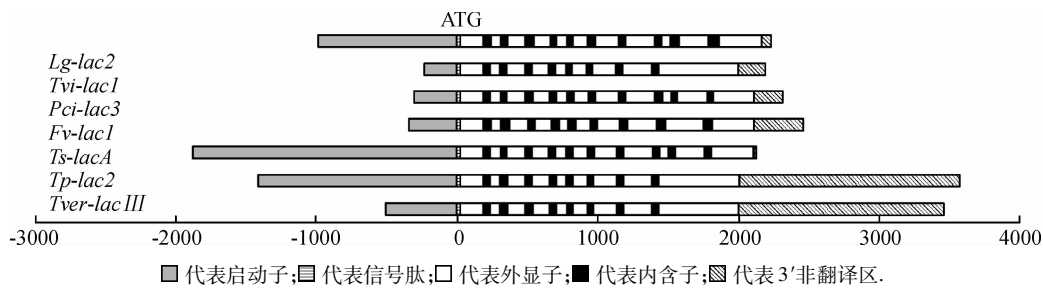


图 7 白腐真菌漆酶 Genomic DNA 全长、启动子及 3'非翻译区序列比对
Fig. 7 Comparison of promoter lengths and intron distribution for the novel *Lenzites gibbosa* laccase genes and other six selected full-length sequences with higher or lower homologous laccases from six white-rot fungi

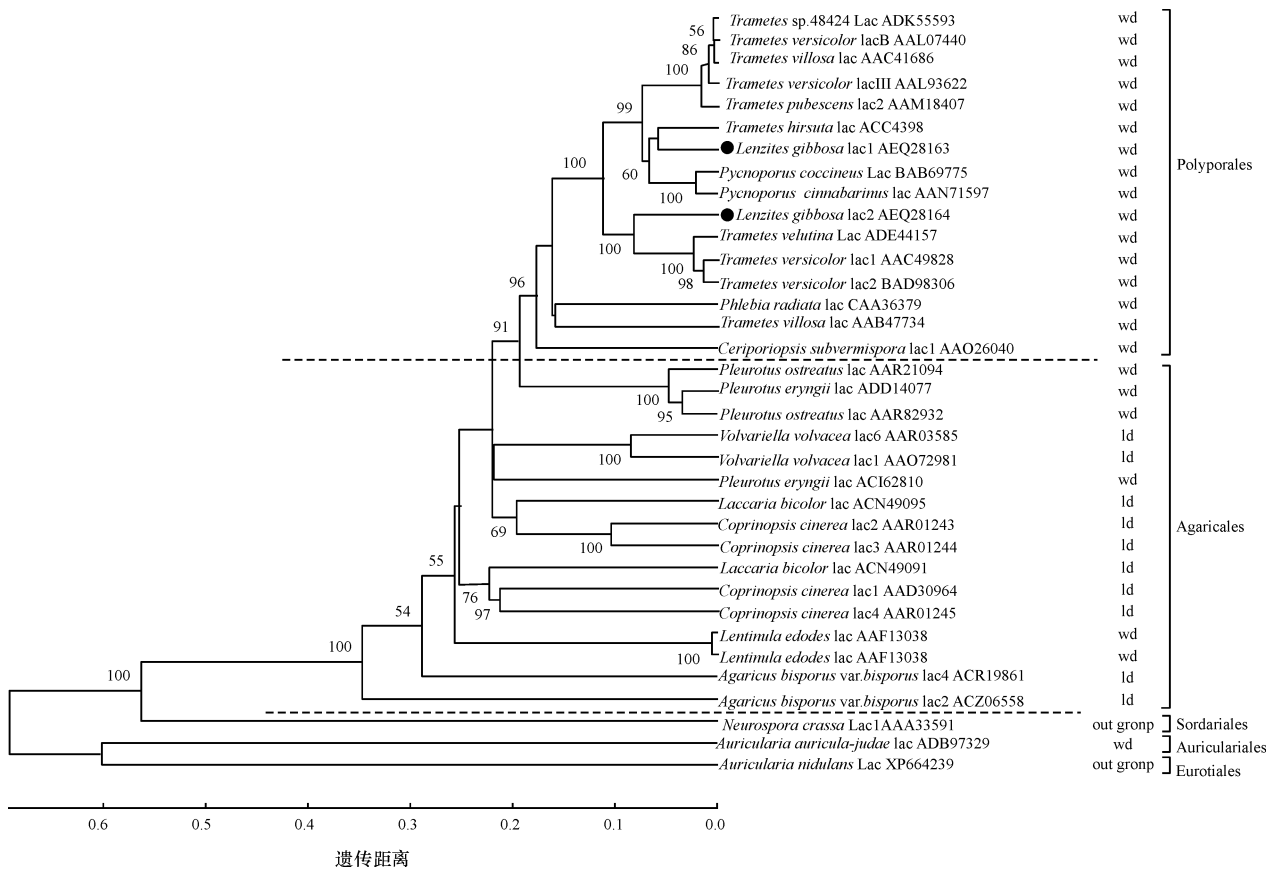


图 8 *Lg-lac2* 基因的系统进化树分析
Fig. 8 Phylogenetic tree of *Lg-lac2* gene

3 讨论与结论

对偏肿革痂菌漆酶同工酶基因启动子的克隆,有助于对偏肿革痂菌漆酶表达调控机制的进一步研究.同时,作为在偏肿革痂菌中克隆的可诱导型启动子,也为在偏肿革痂菌中构建诱导型表达载体提供了物质基础.另外,在偏肿革痂菌漆酶基因启动子的5'端调控区域,还分布有1个潜在的热击响应元件(HSEs)和2个潜在的压力响应元件(STRE).Faraco等^[2]在酵母菌*Pichia pastoris*中证明,HSEs能够感受外界强烈热刺激从而激活金属硫蛋白基因的转录,因而HSEs和STRE可能会共同响应高浓度 Cu^{2+} 的压力而激活偏肿革痂菌漆酶基因的转录.Marzluf^[6]的研究也表明,在酵母菌、粗糙脉孢菌*Neurospora crassa*等真菌中,特异的氮因子结合元件(GATA)能够激活氮结构基因的转录.而本文在所克隆的偏肿革痂菌漆酶基因启动子序列上也分析到有7个潜在的氮因子结合位点,这说明偏肿革痂菌漆酶基因还可能受到N源的调控.

综上所述,本文利用RT-PCR、RACE技术和SE-FA-PCR方法在偏肿革痂菌菌株中获得1个新的漆酶基因cDNA和Genomic DNA的全长序列以及漆酶基因启动子序列.这对于今后研究漆酶基因在偏肿革痂菌生长发育过程中所起的生物学作用和进行基因遗传操作具有重要的意义.

参考文献:

- [1] BALDRIAN P. Fungal laccases-occurrence and properties [J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(2): 215-242.
- [2] FARACO V, GIARDINA P, SANNIA G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters[J]. Microbiology, 2003, 149(8):2155-2162.
- [3] RUSHMORE T H, KING R G, PAULSON K E. Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: Identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatic

- compounds [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(10):3826-3830.
- [4] SODEN D M, DOBSON A D W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju* [J]. Microbiology, 2001, 147(7):1755-1763.
- [5] XIAO Y Z, CHEN Q, HANG J, et al. Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2 [J]. Mycologia, 2004, 96(1):26-35.
- [6] MARZLUF G A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1997, 61(1):17-32.
- [7] 陈军, 高大文, 池玉杰, 等. 偏肿拟栓菌 *Pseudotrametes gibbosa* 产漆酶的条件优化 [J]. 菌物学报, 2008, 27(6):940-946.
- [8] LIU Yaoguang, CHEN Yuanling. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Biotechniques, 2007, 43(5):649-50.
- [9] TREGER J M, MAGEE T R, McENTEE K. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 243(1):13-19.
- [10] STRAUSS J, HORVATH H K, ABDALLAH B M, et al. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the *transcriptional* and post-transcriptional level [J]. Molecular microbiology, 1999, 32(1):169-178.
- [11] MOLDES D, SANROMÁN M Á. Amelioration of the ability to decolorize dyes by laccase: Relationship between redox mediators and laccase isoenzymes in *Trametes versicolor* [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2006, 22(11):1197-1204.
- [12] TONG P, HONG Y, XIAO Y, et al. High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(2):295-301.

【责任编辑 李晓卉】