

## 黏细菌漆酶序列筛选及其重组酶学性质

赵秀艳<sup>1,2</sup>, 常飞<sup>1,2</sup>, 方泽民<sup>1,2</sup>, 张寅良<sup>1,2</sup>, 肖亚中<sup>1,2</sup>

1 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

2 安徽省微生物与生物催化工程技术研究中心, 安徽 合肥 230601

赵秀艳, 常飞, 方泽民, 等. 黏细菌漆酶序列筛选及其重组酶学性质. 生物工程学报, 2017, 33(4): 609-619.

Zhao XY, Chang F, Fang ZM, et al. Bioinformatic analysis and characterization of myxobacteria laccase-like multicopper oxidases. Chin J Biotech, 2017, 33(4): 609-619.

**摘要:** 漆酶是一种应用广泛的绿色环保的多酚氧化酶。漆酶过去被认为广泛存在于植物、昆虫和真菌中, 而近年来, 越来越多的细菌中也发现了漆酶的存在。黏细菌是一类重要的资源菌, 但与一般细菌相比, 较难分离和纯化。文中利用生物信息学的方法, 综合应用 Blast 和隐马尔可夫模型方法对黏细菌蛋白质组数据库进行搜索, 并根据多铜氧化酶的保守铜离子结合位点进行进一步筛选, 获得 30 个候选黏细菌漆酶序列。挑选其中 9 个, 在大肠杆菌中进行重组表达。利用 2,6-甲氧基苯酚 (DMP) 等常用漆酶底物检测重组酶的催化氧化活性, 其中 7 个重组蛋白具有漆酶催化活性。选择 1 个对 2,6-甲氧基苯酚 (DMP) 具有较高氧化活性的重组酶 (命名为 rSC-2), 通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化 rSC-2, 测试其酶学性质。纯化的 rSC-2 蛋白分子量约 57 kDa, 在最适反应条件下, rSC-2 催化 DMP 反应的比酶活为 0.27 U/mg。催化 DMP 反应的最适温度为 60 °C, 最适 pH 为 7.0。rSC-2 在 pH 7.0-8.0 有较高酶活, 在 60 °C 孵育 1 h 保留 50% 以上剩余酶活。低浓度的 Ca<sup>2+</sup> 对酶活有一定的促进作用, 而较高浓度的 Fe<sup>3+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Ba<sup>2+</sup> 对酶活的抑制作用较明显。这是首次对黏细菌漆酶序列进行系统性的生物信息学分析, 并实现纤维堆囊菌 *Sorangium cellulosum* 序列来源的漆酶活性蛋白在大肠杆菌细胞中重组表达。

**关键词:** 生物信息学, 黏细菌漆酶, 重组表达, 分离纯化, 酶学性质

**Received:** September 23, 2016; **Accepted:** January 3, 2017

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31600078).

**Corresponding authors:** Yinliang Zhang. Tel/Fax: +86-551-63861929; E-mail: ylzhang@ahu.edu.cn

Yazhong Xiao. Tel/Fax: +86-551-63861929; E-mail: yzxiao@ahu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31600078) 资助。

## Bioinformatic analysis and characterization of myxobacteria laccase-like multicopper oxidases

Xiuyan Zhao<sup>1,2</sup>, Fei Chang<sup>1,2</sup>, Zemin Fang<sup>1,2</sup>, Yinliang Zhang<sup>1,2</sup>, and Yazhong Xiao<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

<sup>2</sup> Anhui Provincial Engineering Technology Research Center of Microorganisms and Biocatalysis, Hefei 230601, Anhui, China

**Abstract:** Laccase is a widely-used environment-friendly copper-containing oxidase found in many plants, insects and fungi. Recently, more and more laccases are also found in bacteria. Myxobacteria are an important bacteria resource. However, myxobacteria are much more difficult to isolate and purify than other bacteria. We used bioinformatic approach to screen myxobacteria proteomes available in NCBI. Based on conserved sequences of four copper binding sites in multicopper oxidase, 30 potential laccase sequences were obtained. Among them, nine genes were synthesized and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Seven proteins showed laccase activity when tested with traditional laccase substrates. One protein, named rSC-2, was chosen for further research because it exhibited the highest activity towards 2,6-dimethyl phenol (DMP). The molecular weight of rSC-2 was 57 kDa. Its specific activity to DMP was 0.27 U/mg. The optimal temperature and the optimal pH were 60 °C and 7.0, respectively. About 50% of the original activity was retained after incubation at 60 °C and pH 7.0–8.0 for 1 h. Metals showed different effects on rSC-2. rSC-2 activity was enhanced by several metals at concentration of 1 mmol/L, such as Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup>. With a higher concentration of 5 mmol/L, the activity of rSC-2 was apparently inhibited. This is the first report of bioinformatics screening myxobacteria laccases in combination with expression in *E. coli*.

**Keywords:** bioinformatics, myxobacteria laccase, recombinant expression, separation and purification, enzymology characterization

漆酶 (Laccase) 是一种含铜的多酚氧化酶, 属于多铜氧化酶家族, 能催化多种酚类及非酚类化合物氧化, 在工业染料脱色、新型药物合成、生物传感器研制和食品饮料加工等领域具有潜在应用价值<sup>[1-3]</sup>。漆酶最初在漆树的汁液中被发现, 现在认为其广泛分布于植物、动物、特别是真菌中。1993年, Givaudan等<sup>[4]</sup>从植物根际细菌生脂固氮螺菌 *Azospirillum lipoferum* 中首次发现了细菌漆酶的存在。通过对不同微生物来源漆酶的性质比较发现, 不同的漆酶同工酶蛋白发挥不同的生理功能, 且物种来源不同的漆酶具有差异的酶学性质, 如细菌来源的漆酶在中性及偏碱性等环境有较高催

化能力<sup>[5-6]</sup>, 古细菌来源的漆酶热力学稳定性较好, 而真菌来源的漆酶比活力较高。因此, 从不同种属微生物中发现新型漆酶, 对于深入理解漆酶的功能, 以及促进其在生物工程领域的应用具有重要意义。

黏细菌 (Myxobacteria) 是一类革兰氏阴性单细胞生物, 主要存在于富含微生物和有机质的环境中, 最适生长温度在 30 °C 左右, 处于饥饿干旱环境中形成子实体, 并在内部生成黏孢子, 黏孢子对逆境有较强的抗性<sup>[7-8]</sup>。根据对底物利用能力的不同, 黏细菌被分为两大类群。一类是不能利用纤维素, 但可降解利用活细菌 (嗜细菌类群); 另一类不能降解利用活细菌, 却

能分解利用纤维素(嗜纤维素类群)<sup>[9]</sup>。与一般细菌相比,黏细菌生长缓慢,细胞壁上有复杂的胞外附属物,易于黏附携带其他污染物,较难分离和纯化。已有研究表明,黏细菌次级代谢产物具有丰富多样的生物活性,是筛选获得新型抗菌、抗肿瘤等活性化合物的重要资源<sup>[10-12]</sup>,但关于黏细菌漆酶的研究未见报道。

基因序列测定技术的快速进步为利用生物信息学方法挖掘难分离培养微生物资源提供了便利。迄今,有13个黏细菌基因组序列被发布,在此基础上,我们对候选黏细菌漆酶序列进行了生物信息学分析,结合基因人工合成方法,进一步对筛选的9个候选序列进行重组表达,并对黏细菌 *Sorangium cellulosum* 来源的具有漆酶活性的重组蛋白 rSC-2 的酶学性质进行了分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 主要试剂与仪器

2,6-甲氧基苯酚(DMP)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、多巴胺、丁香醛连氮(SGZ)、甲氧基苯酚、愈创木酚、二茂铁、邻苯二酚、标准分子量蛋白 marker 和异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自上海生物工程技术有限公司;超声细胞破碎机,冷冻离心机,镍离子亲和层析柱,One Drop 微量紫外分光光度计,pH计,电泳仪。

#### 1.1.2 培养基

LB 固体培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母浸膏5,NaCl10,琼脂15,自然pH值,121℃灭菌20min。

液体发酵培养基(g/L):胰蛋白胨10,NaCl10,琼脂15,自然pH值,121℃灭菌20min。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 黏细菌潜在漆酶基因序列的筛选

从NCBI下载所有已知的黏细菌目下的蛋白质组序列,以枯草芽孢杆菌的CotA蛋白序列(PDB ID:1GSK)和来自大肠杆菌 *Escherichia coli* 的CueO蛋白序列(PDB ID:3OD3)为模板,对黏细菌基因组数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=myxobacteria>)中有蛋白序列信息的氨基酸序列进行Blast比对,发现潜在黏细菌漆酶序列。保留 $evalue \leq 0.001$ 且比对长度 $\geq 200$ 个氨基酸的结果。

按照Ausec等<sup>[13]</sup>的方法,同时用5种漆酶多铜氧化酶(Laccase-like multicopper oxidase, MCO)的隐马尔可夫模型,分别表征5类不同类型的漆酶特征。以这5个模型为种子,用HMMER3.0软件分别对下载的黏细菌进行全蛋白质组比对。保留最高分数大于100的序列,对于每一条比对出的蛋白质序列,选取分数最高的种子模型作为该序列的特征。

通过ClustalO工具对这些序列进行多序列比对,找出铜离子保守位点,去除不包含4个铜离子保守位点的序列。利用MEGA6工具构建系统分类树状图。

### 1.2.2 黏细菌漆酶表达体系的构建

选取目标黏细菌蛋白序列,根据大肠杆菌偏好性对编码序列密码子进行优化,将优化后的序列送往商业公司进行基因合成。用pET22b构建黏细菌漆酶重组表达载体,选择 *E. coli* BL21(DE3)作为宿主细胞,将构建好的重组表达载体转化入 *E. coli* BL21(DE3)细胞进行重组表达。

### 1.2.3 重组酶的制备

挑取待培养的重组大肠杆菌阳性克隆单菌

落于 LB 液体培养基 (按 1%接种量), 37 °C、220 r/min 摇床培养至对数期, 转接 4 mL 培养液至 400 mL LB 液体培养基, 37 °C 培养至  $OD_{600}$  达到 0.8, 加入终浓度为 0.2 mmol/L IPTG, 16 °C、150 r/min 诱导表达 15–18 h。收集菌体, 超声破碎细胞, 8 000×g 离心 30 min, 收集上清, 利用  $Ni^{2+}$ -NTA 柱亲和纯化蛋白, 纯化过程参照生产商提供的使用说明书进行。SDS-PAGE 检测蛋白纯度, 用 One Drop 微量紫外分光光度计测定  $A_{280}$  并计算蛋白浓度。

#### 1.2.4 重组酶的活性测定

以 DMP 为底物考察重组蛋白的漆酶活力, 反应体系包括: 10  $\mu$ L 适当稀释的酶液、终浓度为 1 mmol/L 的 DMP 以及 50 mmol/L 的  $Na_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  缓冲液 (pH 7.0), 60 °C 反应 5 min 后, 冰上孵育 30 s 终止反应, 设置 1 个空白对照组, 3 个平行实验组, 测定方法参照 Fang 等<sup>[14]</sup>。酶活力单位 (U) 定义为每分钟氧化 1  $\mu$ mol DMP 所需的酶量。

#### 1.2.5 重组酶的最适反应温度和温度稳定性

将漆酶酶液用 50 mmol/L  $Na_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$  缓冲液 (pH 7.0) 适当稀释, 置于 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C 和 70 °C 的水浴中保温 1 h, 0 h 测定初始酶活, 1 h 后测定剩余酶活, 计算相对酶活, 以最高的酶活为 100%, 相对酶活 (%) = (各温度条件下的酶活/最高酶活)×100%。以未处理酶液的酶活力为 100%, 剩余酶活 (%) = (各温度条件下的剩余酶活/最初酶活)×100%。

#### 1.2.6 重组酶的最适 pH 值和 pH 稳定性

取等量的酶液置于不同 pH 值 (pH 4.5–5.5  $CH_3COONa$ - $CH_3COOH$ ; pH 5.5–8.0  $Na_2HPO_4$ - $KH_2PO_4$ ; pH 8.0–8.5 Tris-HCl) 的缓冲液中, 在最适温度下测定酶活力, 以 0 h 为对照, 计算相

对酶活。以最高的酶活 100%, 相对酶活 (%) = (各 pH 条件下的酶活/最高酶活)×100%。在酶对 pH 值的稳定性实验中, 以 pH 4.5–8.5 的缓冲液适当稀释酶液于 30 °C 保温 1 h 后测定其剩余酶活。

#### 1.2.7 金属离子对重组酶活性的影响

选取  $K^+$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Na^+$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ , 用  $Na_2HPO_4$ / $KH_2PO_4$  (50 mmol/L、pH 7.0) 配成母液浓度分别为 100 mmol/L 金属离子溶液, 测定金属离子存在的条件下对重组漆酶活力的影响, 以不含金属离子的反应液为对照, 加入适量母液金属离子缓冲液, 使其终浓度为 1 mmol/L 和 5 mmol/L, 每种金属离子的 2 个浓度都设 3 个平行, 结果以平均值±标准偏差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 黏细菌漆酶活性蛋白候选序列的筛选及分析

从已发布的 13 个黏细菌蛋白质组筛选获得 31 条潜在漆酶序列。通过多序列比对, 去除 1 个不完全包含 4 个保守铜离子结合位点的序列 (WP\_002631421.1), 共计 30 个序列作为漆酶活性蛋白候选序列。构建的 30 个漆酶活性蛋白候选序列系统分类进化图如图 1 所示。从图 1 可以看出, 黏细菌漆酶活性蛋白候选序列大致可分为 4 类。

类别 I 包含 8 个候选黏细菌漆酶, 来源于 6 个物种, 分别为珊瑚状珊瑚球菌 *Coralloccoccus coralloides*、深褐孢囊杆菌 *Cystobacter fuscus*、叶柄黏球菌 *Myxococcus stipitatus*、黄色黏球菌 *Myxococcus xanthus*、纤维堆囊菌 *Sorangium cellulosum* 和橙色标桩菌 *Stigmatella aurantiaca*。隐马尔可夫模型分析显示, 这 8 个漆酶活性蛋

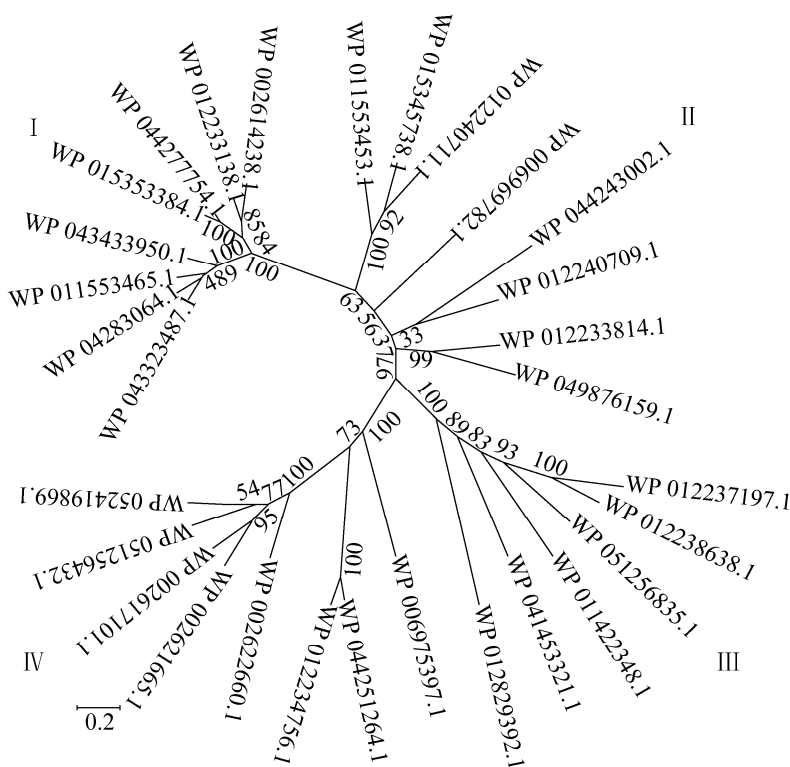


图 1 候选黏细菌漆酶系统分类进化图

Fig. 1 Phylogenetic evolutionary tree of the myxobacteria laccase candidates.

白属于 typeB 的两域小漆酶<sup>[15]</sup>, 氨基酸数目较少, 在 410–456 之间。另外, 这 8 个黏细菌漆酶活性蛋白两两之间氨基酸序列一致性超过 60%, 虽然来源不同, 但相似性较高。

类别 II 也包含了 8 个候选黏细菌漆酶, 来源于 5 个物种, 分别为珊瑚状珊瑚球菌 *Chondromyces apiculatus*、叶柄黏球菌 *Myxococcus stipitatus*、黄色黏球菌 *Myxococcus xanthus*、太平洋邻囊菌 *Plesiocy stispacifica* 和纤维堆囊菌 *Sorangium cellulosum*。隐马尔可夫模型分析表明, 这 8 个黏细菌漆酶活性蛋白属于普通的三域漆酶, 氨基酸数目在 450–502 之间。值得注意的是, 它们中有 4 个均来源于 *S. cellulosum*, 而这 4 个蛋白的两两序列一致性只有 30%–40%。反而是 3 个不同菌株来源的候选漆酶 (*M. stipitatus*、*M. xanthus* 和 *S.*

*cellulosum*) 序列一致性较高, 达到 50%–60%。

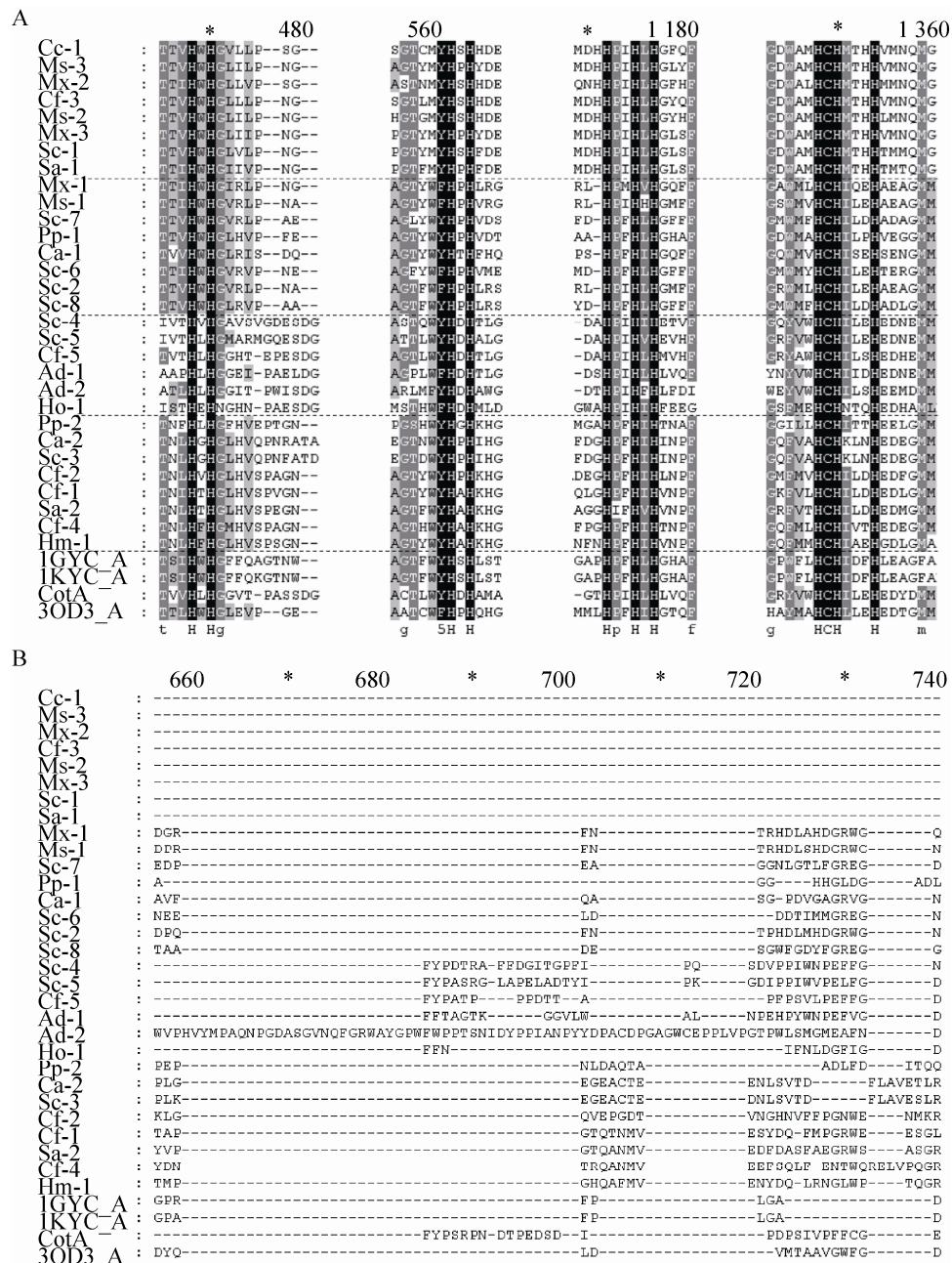
类别 III 包含 6 个候选黏细菌漆酶, 来源于 4 个物种, 分别是脱卤厌氧黏杆菌 *Anaeromyxobacter dehalogenans*、深褐孢囊杆菌 *Cystobacter fuscus*、赫黄嗜盐囊菌 *Haliangium ochraceum* 和纤维堆囊菌 *Sorangium cellulosum*。这 6 个蛋白较大, 氨基酸数量在 591–1 359 之间, 两两序列一致性也只有 20%–30%, 虽然包含 4 个铜离子结合位点, 但可能还拥有其他酶的活性。

类别 IV 同样包含了 8 个候选黏细菌漆酶, 来源于 6 个物种, 分别为软骨霉状菌 *Chondromyces apiculatus*、深褐孢囊杆菌 *Cystobacter fuscus*、细小玻管状菌 *Hyalangium minutum*、太平洋邻囊菌 *Plesiocy stispacifica*、纤维堆囊菌 *Sorangium cellulosum* 和橙色标桩菌 *Stigmatella aurantiaca*。

隐马尔可夫模型分析表明这 8 个候选黏细菌漆酶也属于普通的三域漆酶,但氨基酸数目比类别 II 大,在 527-651 之间。两两之间序列一致性差异较大,有的只有 20%-30%,而有的高达 70%。

对获得的 30 个候选黏细菌漆酶序列以及真菌来源且具有晶体结构的 2 个漆酶序列 (1KYA、

1GYC) 和 2 个细菌漆酶 (CotA、3OD3\_A) 序列进行全序列比对。结果表明,所比对序列的 4 个铜离子结合区氨基酸类型高度保守,分别为 HxHG、HxH、HxxHxH 和 HCHxxxH (图 2A),而 4 个底物结合区域编码序列的长度和类型差异较大 (图 2B, 2C)。此外,我们还标注了漆酶



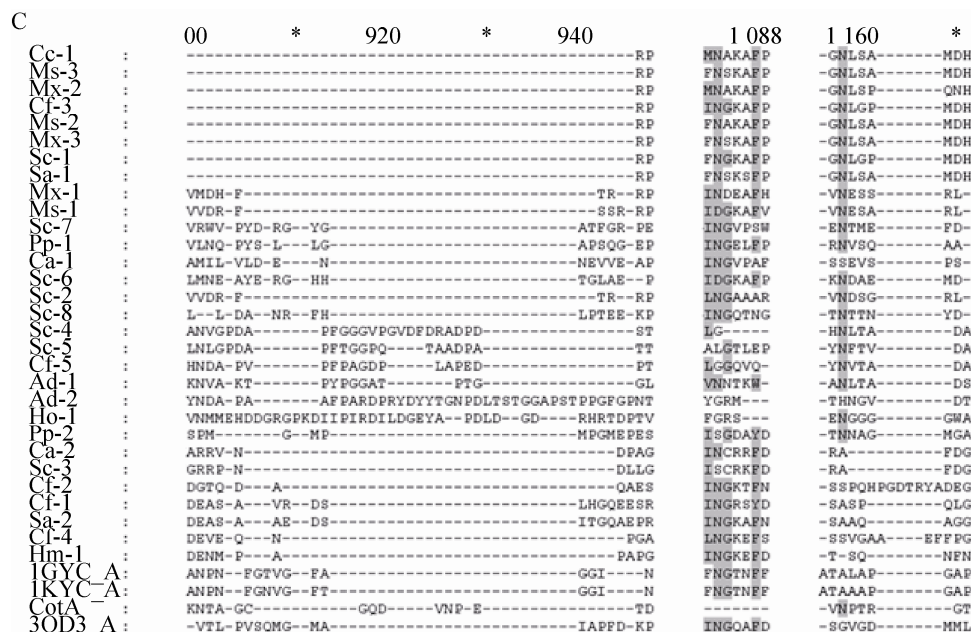


图 2 候选黏细菌漆酶的多序列比对图 (图 A 显示了 30 个候选黏细菌漆酶与 2 个真菌漆酶和 2 个细菌漆酶的 4 个铜离子结合位点; 图 B 和 C 以 1KYA、1GYC、CotA、3OD3\_A 为模板, 显示了 4 个底物结合 loop 区)

Fig. 2 Sequence alignment of the myxobacteria laccase candidates. Figure A shows the 4  $\text{Cu}^{2+}$  binding sites, figure B and C shows 4 potential substrate binding loops. The sequences are: Ad-1, Ad-2 from *Anaeromyxobacter dehalogenans* (WP\_011422348.1, WP\_041453321.1); Ca-1, Ca-2 from *Chondromyces apiculatus* (WP\_044243002.1, WP\_044251264.1); Cf-1, Cf-2, Cf-3, Cf-4, Cf-5 from *Cystobacter fuscus* (WP\_002621665.1, WP\_002622660.1, WP\_043433950.1, WP\_051256432.1, WP\_051256835.1); Cc-1 from *Coralloccoccus coralloides* (WP\_043323487.1); Hm-1 from *Hyalangium minutum* (WP\_052419869.1); Ho-1 from *Haliangium ochraceum* (WP\_012829392.1); Ms-1, Ms-2, Ms-3 from *Myxococcus xanthus* (WP\_011553453.1, WP\_011553465.1, WP\_044277754.1); Pp-1, Pp-1 from *Plesiocystis pacifica* (WP\_006969782.1, WP\_006975397.1); Sa-1, Sa-2 from *Stigmatella aurantiaca* (WP\_002614238.1, WP\_002617101.1); Sc-1, Sc-2, Sc-3, Sc-4, Sc-5, Sc-6, Sc-7, Sc-8 from *Sorangium cellulosum* (WP\_012233138.1, WP\_012240711.1, WP\_012234756.1, WP\_012237197.1, WP\_012238638.1, WP\_012240709.1, WP\_012233814.1, WP\_049876159.1); Ms-1, Ms-2, Ms-3 from *Myxococcus stipitatus* (WP\_015345738.1, WP\_044283064.1, WP\_015353384.1).

的 4 个底物结合 loop 区, 这 4 段区域彼此高度特异, 序列长度和氨基酸类型均不同。

## 2.2 重组酶的分离纯化及其性质分析

从 4 个类别分别选取 2 个潜在黏细菌漆酶序列, 共计 9 个潜在漆酶序列送往公司进行基因合成, 并构建重组酶大肠杆菌表达体系 *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-lacX。初步重组蛋白表达后, 获得粗酶液, 分别用底物 SGZ、DMP、愈创木酚、二茂铁和邻苯二酚等检测发现, 其中来自 WP\_012240709.1、WP\_012240711.1、

WP\_012233138.1、WP\_012234756.1、WP\_002621665.1、WP\_006975397.1、WP\_044243002.1 序列获得的 7 个重组蛋白具有催化活性。

选取其中一个来自类别 II (*Sorangium cellulosum*) 对 DMP 具有较高催化活性的三域漆酶 SC-2 (WP\_012240711.1) 的重组酶进行纯化制备, 分析其酶学性质。

### 2.2.1 rSC-2 表观分子量

成功构建表达载体 pET22b-SC-2, 并实现具有漆酶活性蛋白 SC-2 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的

活性表达。通过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱纯化蛋白, 经过 SDS-PAGE 检测显示单一目标蛋白条带 (图 3), 说明 rSC-2 已被成功纯化到 SDS-PAGE 电泳纯。编码 rSC-2 的氨基酸共 525 个, 理论计算 rSC-2 分子量为 57.15 kDa, 与蛋白电泳条带位置大小一致。

### 2.2.2 温度对 rSC-2 活性的影响

将反应体系置于各温度水浴中, 测定温度对 rSC-2 活性的影响。由图 4A 可以看出, rSC-2 的最适反应温度是  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  剩余酶活保留 80% 以上,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  时剩余酶活 40% 左右。

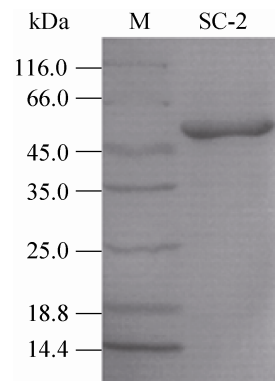


图 3 rSC-2 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 3 SDS-PAGE gel for purified rSC-2. M: molecular weight markers.

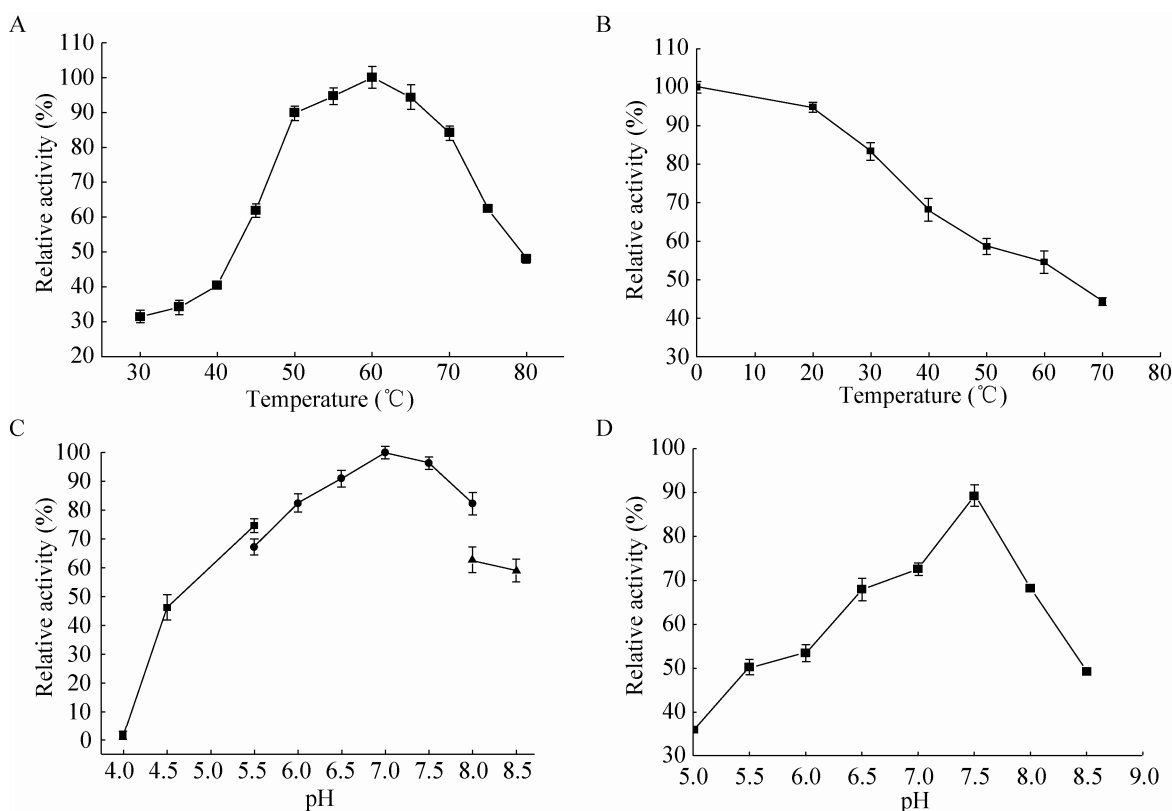


图 4 温度、pH 对 rSC-2 酶活力的影响

Fig. 4 Effects of temperature and pH on the activity and stability of rSC-2. (A) Temperature dependence of rSC-2 activity. (B) Temperature dependence of rSC-2 stability. (C) pH dependence of rSC-2 activity. (D) pH dependence of rSC-2 stability.



### 2.2.3 rSC-2 热稳定性分析

将最适反应体系置于各温度水浴中 20 °C–70 °C 放置 1 h 后测定其剩余活性。由图 4B 可以看出, rSC-2 在低温时 (0 °C–30 °C) 的稳定性较好, 酶活损失较少, 剩余酶活都在 80% 以上。30 °C 以后, 随着温度升高, 酶活下降较快, 70 °C 时剩余酶活残留约 45%, rSC-2 适宜低温保存。

### 2.2.4 pH 对 rSC-2 活性的影响

分别将各 pH 反应体系置于 60 °C 水浴中测定不同 pH 对 rSC-2 活性的影响。结果如图 4C 所示, rSC-2 的最适反应 pH 为 7.0 时, 酶活最高, 在 pH 为 7.5 时, 酶活较高, 剩余酶活在 90% 以上。

### 2.2.5 rSC-2 的 pH 稳定性

将重组酶 SC-2 与不同 pH 缓冲液充分混合稀释后, 置于 30 °C 孵育 1 h, 在最适条件下测量剩余酶活。结果如图 4D 所示, 在 pH 为 6.5–8.0 时具有较高的酶活, 酶的稳定性比较好, pH 7.5 时酶具有最好的保藏稳定性。

### 2.2.6 金属离子对 rSC-2 活性的影响

在反应体系中加入适量金属离子缓冲液, 使金属离子终浓度分别为 1 mmol/L、5 mmol/L, 最适温度孵育 3 min, 反应 5 min 测量酶活。不同金属离子对 rSC-2 活性影响的差异较大, 结果如表 1 所示, 金属离子终浓度 1 mmol/L 时,  $\text{Ca}^{2+}$  对 rSC-2 的活性有一定促进作用,  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对 rSC-2 活性影响不大,  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  对 rSC-2 活性有不同程度的抑制作用。金属离子终浓度为 5 mmol/L 时, 各金属离子对 rSC-2 活性都有不同程度的抑制作用,  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$  对 rSC-2 活性影响最大, 实验中检测不到酶活 (表 1)。

表 1 金属离子对漆酶活性影响

Table 1 Effect of metal ions on laccase activity

Metal ions	Relative activities	
	1 mmol/L	5 mmol/L
Control	100	100
$\text{Ca}^{2+}$	118±3.2	65±2.9
$\text{Mn}^{2+}$	108±5.8	92±3.5
$\text{Na}^+$	106±4.2	74±2.6
$\text{K}^+$	105±2.3	91±4.1
$\text{Mg}^{2+}$	92±4.6	78±3.3
$\text{Zn}^{2+}$	89±2.8	58±4.7
$\text{Co}^{2+}$	78±3.3	0
$\text{Ba}^{2+}$	72±1.4	0
$\text{Fe}^{3+}$	88±5.2	0

## 3 讨论

细菌漆酶于 1993 年首次从植物根际细菌生脂固氮螺菌 *Azospirillum lipoferum* 中被发现。自此, 不断有新的细菌漆酶被报道。已有研究显示, 漆酶活性蛋白在细菌中广泛存在, 且已经从真细菌 *Escherichia coli*<sup>[16-17]</sup>、古细菌 *Haloferaxvolcanii*<sup>[18]</sup>、放线菌 *Streptomyces griseoflavus*<sup>[19]</sup> 等微生物中克隆并表达获得了相应的细菌漆酶活性蛋白。然而, 至今未见有对黏细菌漆酶序列生物信息学分析和酶学性质研究的报道。我们利用生物信息学方法结合基因人工合成技术, 筛选黏细菌漆酶序列并实现其在 *E. coli* 中异源表达, 能为深入理解细菌漆酶的功能, 以及促进其在生物工程领域的应用奠定基础。

Blast 方法是基于启发式算法寻找进化上亲缘关系较近、全局高度相似的序列, 是最常用的序列相似性比对工具; 隐马尔可夫模型是一个动态的模型, 可以通过训练识别同一特征的蛋白质序列, 更加准确地获得进化上亲缘关系较远但具有保守特征的序列, 基于隐马尔可夫

模型的方法越来越多地用在生物信息学中。我们分别用 Blast 和 HMMER 的方法对黏细菌进行了全蛋白质组的比对,从 13 个黏细菌蛋白质组筛选获得 30 个漆酶活性蛋白候选序列,且两种方法获得的序列完全相同,由于这两种方法完全独立,因此也说明获得的序列可信度较高。

Kües 等对来自 6 个真菌基因组的 45 个多铜氧化酶序列进行生物信息学分析,结果显示,这些序列聚类为 6 个亚家族,包括漆酶亚家族 1 (Laccase sensu stricto subfamily 1)、漆酶亚家族 2 (Laccase sensu stricto subfamily 2)、真菌铁基氧化酶亚家族 (Fungal ferroxidases)、铁基氧化酶/漆酶亚家族 (Ferroxidase/laccase)、真菌色素多铜氧化酶亚家族 (Fungal pigment MCOs) 以及真菌抗坏血酸氧化酶 (Fungal ascorbate oxidases),这些蛋白在微生物中发挥不同的生理功能,如参与木质素的分解、菌丝体的发育、对植物的致病性等<sup>[20]</sup>。与 Kües 等的结果类似,我们对获得的 30 个黏细菌来源多铜氧化酶序列的生物信息学分析显示,其可分为 4 个类别 (I-IV),且同物种来源的多铜氧化酶序列一致性较低;同时,潜在黏细菌漆酶序列的 4 个铜离子结合区序列之间和底物结合区序列之间也存在差异,暗示其在黏细菌中也可能发挥不同的生理功能。

为了了解黏细菌漆酶功能,掌握其酶学性质,选取不同类别来源共计 9 个序列进行基因合成,并构建重组酶大肠杆菌表达体系。检测发现,有 7 个重组蛋白具有催化丁香醛连氮氧化活性,其中 rSC-2 具有最高活性,rSC-1 次之。丁香醛连氮被认为是鉴别漆酶与酪氨酸酶等的专一性底物。因此,rSC-2 和 rSC-1 可被认为是细菌漆酶。同时,以结构信息已知的真菌漆酶为参考,全序列比对结果表明,分布于类别 II

中的潜在黏细菌漆酶与真菌漆酶的序列相似性最高(图 2)。因此,选择归类于类别 II 的 rSC-2 进行深入研究。

一般情况下,真菌来源漆酶催化酚类底物氧化的最适 pH 在 5.0 左右,当催化 pH 高于 7.0 时,酶活力迅速降低<sup>[21-23]</sup>;而细菌来源漆酶通常在 pH 7.0 左右具有最适的催化活力<sup>[24-25]</sup>。对 rSC-2 酶学性质的初步分析表明,与其他细菌来源漆酶蛋白类似,rSC-2 拥有中性偏碱的最适催化 pH (7.0-7.5)。然而,与 rSC-2 不同,来自牛瘤胃微生物元基因组文库的细菌漆酶 RL5<sup>[26]</sup>催化丁香醛连氮的最适 pH 为 4.5。另外,rSC-2 具有较好的耐热性,在 60 °C 水浴 1 h,残留 55% 活性,高于海洋来源细菌漆酶 Lac15 (45 °C 半衰期为 72 min)<sup>[11]</sup>,但低于枯草芽孢杆菌来源细菌漆酶 CotA<sup>[27]</sup>。总之,对 rSC-2 酶学性质的初步研究表明,对于某些偏碱性的工业废水如造纸和染料废水等,使用真菌漆酶处理时活性较低,rSC-2 可能具有较好的应用潜力。

## REFERENCES

- [1] Shradd ha, Shekher R, Sehgal S, et al. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res*, 2011, 2011: 217861.
- [2] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(5): 219-226.
- [3] Reiss R, Ihssen J, Richter M, et al. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PLoS ONE*, 2013, 8(6): e65633.
- [4] Givaudan A, Effosse A, Faure D, et al. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, 108(2): 205-210.
- [5] Fang ZM, Li TL, Chang F, et al. A new marine

- bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability. *Bioresour Technol*, 2012, 111: 36–41.
- [6] Ruijssenaars HJ, Hartmans S. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65(2): 177–182.
- [7] Volz C, Kegler C, Müller R. Enhancer binding proteins act as hetero-oligomers and link secondary metabolite production to myxococcal development, motility, and predation. *Chem Biol*, 2012, 19(11): 1447–1459.
- [8] Cao P, Dey A, Vassallo CN, et al. How myxobacteria cooperate. *J Mol Biol*, 2015, 427(23): 3709–3721.
- [9] Muñoz-Dorado J, Marcos-Torres FJ, García-Bravo E, et al. Myxobacteria: moving, killing, feeding, and surviving together. *Front Microbiol*, 2016, 7: 781.
- [10] Wang DT, Ma ZL. The molecular biology of myxobacterium. *Chem Life*, 2010, 30(5): 779–782 (in Chinese).  
王德韬, 马中良. 黏细菌的分子生物学. 生命的化学, 2010, 30(5): 779–782.
- [11] Zhao TF, Gong GL. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Biotechnol Bull*, 2014, 30(12): 40–46 (in Chinese).  
赵婷峰, 龚国利. 黏细菌: 天然的制药工厂. 生物技术通报, 2014, 30(12): 40–46.
- [12] Vaksman Z, Kaplan HB. *Myxococcus xanthus* growth, development, and isolation. *Curr Protoc Microbiol*, 2015, 39: 7A.1.1–7A.1.21.
- [13] Ausec L, Zakrzewski M, Goesmann A, et al. Bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. *PLoS ONE*, 2011, 6(10): e25724.
- [14] Fang ZM, Li TL, Wang Q, et al. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 89(4): 1103–1110.
- [15] Ihssen J, Reiss R, Luchsinger R, et al. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 10465.
- [16] Roberts SA, Weichsel A, Grass G, et al. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5): 2766–2771.
- [17] Singh SK, Roberts SA, McDevitt SF, et al. Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper (I) and silver (I): functional role of a methionine-rich sequence. *J Biol Chem*, 2011, 286(43): 37849–37857.
- [18] Uthandi S, Prunetti L, De Vera IMS, et al. Enhanced archaeal laccase production in recombinant *Escherichia coli* by modification of N-terminal propeptide and twin arginine translocation motifs. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(10): 1523–1532.
- [19] Tishchenko S, Gabdulkhakov A, Trubitsina L, et al. Crystallization and X-ray diffraction studies of a two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2015, 71(9): 1200–1204.
- [20] Kűes U, Rűhl M. Multi plemulti-copper oxidase gene families in basidiomycetes—what for?. *Curr Genomics*, 2011, 12(2): 72–94.
- [21] Liu J, Cai Y, Liao X, et al. Purification and characterization of a novel thermal stable laccase from *Pycnoporus* sp. SYBC-L3 and its use in dye decolorization. *Biol Environ*, 2012, 113: 1–13.
- [22] Baldrian P. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(2): 215–242.
- [23] Hildén K, Hakala TK, Lundell T. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnol Lett*, 2009, 31(8): 1117–1128.
- [24] Vrsanska M, Voberkova S, Langer V, et al. Induction of laccase, lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in white-rot fungi using copper complexes. *Molecules*, 2016, 21(11): 1553.
- [25] Majeau JA, Brar SK, Tyagi RD. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour Technol*, 2010, 101(7): 2331–2350.
- [26] Belouqui A, Pita M, Polaina J, et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22933–22942.
- [27] Su JM, Bao P, Bai TL, et al. CotA, a multicopper oxidase from *Bacillus pumilus* WH4, exhibits manganese-oxidase activity. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e60573.

(本文责编 陈宏宇)