

# 大肠杆菌多酚氧化酶结构域及连接区域对其功能的影响

周 波,杨江科\*

(武汉轻工大学生物与制药工程学院,湖北武汉 430023)

**摘 要:**以毕赤酵母 X-33 作为宿主,在摇瓶水平上测定了大肠杆菌多酚氧化酶(CueO)的表达量、最适 pH 和最适温度,并研究了信号肽、前导肽、第三结构域以及结构域连接区域的“盖子”结构对其功能的影响。结果表明:甲醇诱导 72 h 后,CueO 最高表达量为 81.26  $\mu\text{g/mL}$ ,最高酶活为 356.67 U/L,最适 pH 为 2.5,最适温度为 45  $^{\circ}\text{C}$ 。去掉 CueO 自身信号肽,其表达量和酶活分别提高至野生型的 3.08 倍和 3.5 倍;前导肽的缺失导致 CueO 的错误折叠,阻碍 CueO 的正常分泌;第三结构域的缺失增加了蛋白的表达,但导致 CueO 完全失活;结构域连接区域“盖子”结构的缺失和替换均会导致 CueO 丧失活性,这一发现与现有报道完全不同。本研究为实现大肠杆菌多酚氧化酶的工业化应用奠定了一定的理论基础。

**关键词:**大肠杆菌,多酚氧化酶,信号肽,前导肽,结构域,“盖子”结构

## Effects of the Structure Domain and Linker Region of Polyphenol Oxidase on Its Function in *Escherichia coli*

ZHOU Bo, YANG Jiang-ke\*

(College of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** Using *Pichia pastoris* X-33 as host, the expression level, optimum pH and optimum temperature of polyphenol oxidase (CueO) from *Escherichia coli* were measured at the shake flask level, and the effect of CueO's signal peptide, leader peptide, third domain, and the “cap” structure of the linker region on its function were investigated. The study demonstrated that the highest expression, highest enzyme activity, optimum pH and optimum temperature were 81.26  $\mu\text{g/mL}$ , 356.67 U/L, 2.5 and 45  $^{\circ}\text{C}$  from CueO at methanol induction for 72 h, respectively. Meanwhile, results showed that compared with the wild type, the expression level and enzyme activity were increased to 3.08 times and 3.5 times, respectively, after the self-signal peptide of CueO was removed. The secretion of CueO was hindered, after the leading peptide was removed. Although the protein concentration was increased, but the enzyme activity was completely lost, after the third domain of CueO was removed. Thereafter, CueO's enzyme activity was lost, regardless of whether the “cap” structure of the linker region was deleted or replaced. More importantly, this result is completely different from the current literature reports. The study laid some theoretical foundation for the industrial application of CueO.

**Key words:** *Escherichia coli*; polyphenol oxidase; signal peptide; leader peptide; domain; “cap” structure

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2019)18-0114-08

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.18.019

**引文格式:**周波,杨江科.大肠杆菌多酚氧化酶结构域及连接区域对其功能的影响[J].食品工业科技,2019,40(18):114-120,126.

漆酶(laccase, EC 1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶(polyphenol oxidases, PPO)<sup>[1]</sup>,可以通过获得  $\text{O}_2$  并将其作为电子传递介质,来催化多酚、多氨基苯等物质的氧化<sup>[2]</sup>。在低污染纺织、纸张脱色、生活洗涤、食品饮料等一系列行业都具有巨大的应用潜力<sup>[3]</sup>,几乎涉及到化学、食品、医疗、生物和环保等各个领

域<sup>[4-5]</sup>,因此近年来对漆酶的研究日益受到企业和科研工作者的强烈关注。

漆酶按其来源不同可分为植物漆酶、昆虫漆酶、真菌漆酶以及细菌漆酶<sup>[6-7]</sup>。一直以来人们致力于研究真菌漆酶,但真菌漆酶具有产量低、成本高等缺点,导致其已难以满足现代工业化产业需求<sup>[8-9]</sup>;而

收稿日期:2019-02-19

作者简介:周波(1990-),男,硕士研究生,研究方向:工业酶与分子改造,E-mail:969905395@qq.com。

\*通讯作者:杨江科(1973-),男,博士,教授,研究方向:工业酶与分子改造,E-mail:jiangke.yang@gmail.com。

基金项目:中国大洋矿产资源开发协会项目“深海生物资源计划”(DY135-B2-07)。

细菌漆酶具有来源广、生长周期短、热稳定性好等优势,可以很好地弥补真菌漆酶的不足<sup>[10-11]</sup>。因此,对细菌漆酶的研究将显得尤为重要。细菌漆酶是一种含铜的单体蛋白,其分子呈球状结构,由三个 cupredoxin-like 结构域构成<sup>[12]</sup>。此外,细菌漆酶还含有4个保守的铜原子区域:一个I型铜(T1 Cu)、一个II型铜(T2 Cu)和两个III型铜(T3 Cu),共同构成细菌漆酶分子保守的活性中心<sup>[13]</sup>。

大肠杆菌多酚氧化酶(CueO)是大肠杆菌(*Escherichia coli*)铜耐受系统中 Cue 家族的一员<sup>[14]</sup>,存在于*E.coli*的周质空间,参与*E.coli*铜耐受系统的调节,将高毒的Cu<sup>+</sup>氧化成低毒的Cu<sup>2+</sup>从而降低铜对*E.coli*的毒性作用<sup>[15-16]</sup>。研究表明,CueO的结构具有细菌漆酶典型的保守活性中心,被认为是细菌漆酶家族的一员<sup>[17]</sup>,因此在针对细菌漆酶的研究中,关于CueO的文献报道也越来越多。

如 Ueki 等发现 CueO 的 Asp112 在三核铜中心对 O<sub>2</sub> 的结合和反应中间体 H<sup>+</sup> 的生成中发挥了重要作用<sup>[18]</sup>。Li 等发现 CueO 突变体 E106F 的氧化活性对外源铜离子的依赖性较母体降低<sup>[19]</sup>。Komori 等发现 Glu506 在 CueO 与底物反应过程中对质子的运输有重要作用<sup>[20]</sup>。同时,由于生物信息学技术和蛋白质结构解析等手段的快速发展。2002 年,Roberts 团队首次解析了*E.coli* CueO 蛋白的晶体结构,发现 CueO 比典型漆酶多出一截 α-螺旋,正好以“盖子”的形式遮挡住 T1 Cu 位点<sup>[17]</sup>。此后,针对 CueO α-螺旋的研究越来越多,Kataoka 等将 CueO 的 α-螺旋替换后,增加了其对于底物的结合能力<sup>[21]</sup>。李旭将 CueO 的 α-螺旋替换后导入*E.coli*,发现蛋白不表达<sup>[22]</sup>。Wang 将 CueO 的 α-螺旋(R-loop)突变后,增加了漆酶活性<sup>[23]</sup>。马小建等对 CueO 进行点突变和缺失 α-螺旋后,发现酶活提高了约 9 倍<sup>[24]</sup>。

目前,虽然有部分文献对*E.coli* CueO 进行了相关研究,但针对其自身信号肽、前导肽以及第三结构域对其功能的影响却未见报道;虽然针对*E.coli*

CueO α-螺旋的研究已有相关报道,但该特殊结构对其功能的影响却依旧不明确。本文以*E.coli*来源的 CueO 作为研究对象,实现其在毕赤酵母中的异源表达;并通过构建突变体,以期望对突变体的研究,进而阐明 CueO 自身信号肽、前导肽、第三结构域对其功能的影响,以及 CueO 结构域连接区段特有的“盖子”结构对其功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

*E.coli* BL21 (DE3), *E.coli* DH5α, 毕赤酵母 X-33 实验室保存;质粒 pMD19-T Vector, PCR 相关试剂, T4 连接酶, 限制性内切酶 大连宝生物技术有限公司;质粒 pPICZαA 赛默飞世尔科技(中国)有限公司;质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司;2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS) 美国 Sigma 公司;本实验所用引物 由南京金斯瑞公司合成;LB 培养基(g/L) 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水定容至 1 L(固体培养基加入 18 g 琼脂粉);YPD 培养基(g/L) 蛋白胨 20 g, 酵母粉 10 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水定容至 1 L(固体培养基加入 18 g 琼脂粉);BMGY 培养基(g/L) 蛋白胨 20 g, 酵母粉 10 g, 50 × 甘油 20 mL, 1 mol/L 磷酸钾缓冲液 100 mL, 蒸馏水定容至 1 L。

5084 台式高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司;TPProfessional PCR 仪 德国 Biometra 公司;DYY 核酸电泳仪, DYCZ-24DN 蛋白电泳仪 北京六一仪器厂;GBox-HR-E-M 凝胶成像系统 英国 Syngene 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 下表为试验中用到的所有引物。  
1.2.2 *E.coli* BL21 CueO 基因的获得及表达载体的构建 CueO 基因的获得:提取*E.coli* BL21 基因组,参考*E.coli* 多酚氧化酶 CueO 基因(GenBank 登录号:AM946981.2)序列设计引物 Eclac-F 和 Eclac-R, 以

表 1 引物设计  
Table 1 Designed primers

| 引物名称          | 引物序列                                              |
|---------------|---------------------------------------------------|
| Eclac-F       | 5'-GAATTC ATGCAACGTCGTGATTTCTT-3'                 |
| Eclac-R       | 5'-TCTAGA TTATACCGTAAACCCTAACATC-3'               |
| Eclac-DM-F1   | 5'-GAATTC GAGAGACCAACCTTGCCAATTC-3'               |
| Eclac-DM-F2   | 5'-GAATTC AACCGTATCCAGTTGACCATC-3'                |
| Eclac-DM-R1   | 5'-TCTAGA TTA GTATTGACCCTTAGCAGAAGCGAAC-3'        |
| Eclac-DM-R2   | 5'-TCTAGA TTAAACAGTGAAACCCAACATC-3'               |
| Eclac-Mut1-F2 | 5'-GCAATTGTCTATGGACGGAGATCAAGCTATGG-3'            |
| Eclac-Mut1-R1 | 5'-CCATAGCTTGATCTCCGTCCATAGACAATTGC-3'            |
| Eclac-Mut2-F2 | 5'-GCTTATGGAAAAATAC TCTGCTTCC ATGGGTCATGGTAACA-3' |
| Eclac-Mut2-R1 | 5'-TGTTACCATGACCCAT GGAAGCAGA GTATTTTTCATAAGC-3   |
| Eclac-Mut3-F2 | 5'-GTTGCAATTGCTATGGCTGGAATGGACCACT-3'             |
| Eclac-Mut3-R1 | 5'-AGTGGTCCATTCCAGCCATAGACAATTGCAAC-3'            |
| Eclac-Mut4-F2 | 5'-GTTGCAATTGTCTATG TCTGCTTCC AACAAGATCAACGGTC-3' |
| Eclac-Mut4-R1 | 5'-GACCGTTGATCTTGT GGAAGCAGA CATAGACAATTGCAAC-3'  |

提取的基因组为模板,PCR 扩增得到 CueO 基因,AT 克隆至 pMD19-T 载体,测序分析验证后获得阳性重组子。

表达载体的构建:将 pMD19-T-CueO 重组载体经 EcoR I 和 Xba I 酶切回收后克隆至载体 pPICZαA。经序列分析和酶切验证后,得到 pPICZαA-CueO 表达载体。

1.2.3 针对 CueO 结构域的突变体构建 参考 CueO 的基因序列设计突变引物,PCR 扩增得到 4 条突变体序列: CueO-ΔSp、CueO-Mp、CueO-ΔSp/Δ411~516、CueO-Mp/Δ411~516,依次 AT 克隆至 pMD19-T 载体,测序分析验证后获得阳性克隆子,经 EcoR I 和 Xba I 酶切后克隆至表达载体 pPICZαA。

1.2.4 针对 CueO 结构域连接区段的突变体构建 参考 CueO-ΔSp 的基因序列设计突变引物,PCR 扩增得到 4 条突变体序列: CueO-ΔSp/Δ357~371、CueO-ΔSp/Δ372~387、CueO-ΔSp/Δ356~378、CueO-ΔSp/Δ357~407,依次 AT 克隆至 pMD19-T 载体,测序分析验证后获得阳性克隆子,经 EcoR I 和 Xba I 酶切后克隆至表达载体 pPICZαA。

1.2.5 毕赤酵母感受态的制备与重组酵母的构建 将毕赤酵母 X-33 划线活化,挑取 3 个酵母菌单菌落转接至 50 mL YPD 培养基,28 ℃ 培养过夜。按 1:100 的比例取 1 mL 种子液转接至 100 mL YPD 培养基,28 ℃ 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8。6000 r/min 离心收集菌体,依次用无菌水和 1 mol/L 山梨醇各重悬漂洗三次,最后加适量山梨醇重悬菌体,即得到毕赤酵母感受态<sup>[24]</sup>。将重组表达质粒用 Bgl II 线性化,浓缩后电转到毕赤酵母中,28 ℃ 孵育 2 h 后涂布于含有 Zeocin™ 抗性的 YPD 平板,28 ℃ 静置培养 48 h。挑取颜色雪白、形状规则、外形饱满的转化子划线纯化<sup>[25]</sup>。

1.2.6 摇瓶发酵与诱导表达 将筛选得到的阳性重组酵母单菌落接种到含 5 mL YPD 培养基的 PA 瓶中,28 ℃ 过夜培养作为种子液,按 1:25 转接至含 25 mL BMGY 培养基中,28 ℃ 连续振荡培养,每 24 h 加 500 μL 甲醇诱导表达,诱导 72 h 停止发酵。取发酵上清液加入适量上样缓冲液,沸水浴 5 min,跑 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析诱导产物<sup>[25]</sup>。

1.2.7 蛋白含量与酶活测定 蛋白浓度的测定采用

Bradford 法<sup>[24]</sup>。

酶活的测定采用 ABTS 法<sup>[24]</sup>:2 mmol/L ABTS,50 mmol/L 柠檬酸-磷酸盐缓冲液,2 mmol/L CuSO<sub>4</sub>,总体积 2 mL,以煮沸 10 min 灭活的 CueO 作为对照,室温反应 5 min,测定 OD<sub>420</sub> 吸光值。酶活定义:每分钟氧化 1 μmol ABTS 所需的 CueO 的量为一个 U,比活力为每毫克 CueO 具有的酶活力。

酶活计算公式:酶活 (U/L) =  $n \times V_t \times \Delta OD / (\varepsilon \times 5 \times V_e / 10^6)$ 。

其中,n 为酶液稀释倍数;V<sub>t</sub> 为反应体系总体积;V<sub>e</sub> 为反应体系酶液体积;ΔOD 为反应前后吸光度的变化;ε 为 ABTS 摩尔消光系数(36000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>)。

1.2.8 CueO 的酶学性质分析 最适 pH 测定:配制 pH1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 的柠檬酸-磷酸盐缓冲液,以 ABTS 作为底物,以煮沸 10 min 灭活的酶液作为对照,在室温条件下反应 5 min 测定不同 pH 条件下相应酶活。以最高酶活作为 100%,其他相应 pH 条件下的酶活除以最高酶活,即为该 pH 条件下相对酶活。

最适温度测定:在最适 pH3.0 条件下,设置不同反应温度为 30、35、40、45、50、55、60、65 ℃,以 ABTS 作为底物,以煮沸 10 min 灭活的酶液作为对照,在不同温度条件下反应 5 min 测定其相应酶活。以最高酶活作为 100%,其他相应温度条件下的酶活除以最高酶活,即为该温度条件下相对酶活。

## 1.3 数据处理

蛋白浓度和酶活等数据用 Graphpad Prism7 软件处理:打开软件后选择 Column graphs,数据处理类型选择 Mean & SD,在 Data 栏中输入数据,软件自动生成柱状图并计算出均值和误差值;打开软件后选择 XY graphs,选择样本数,数据处理类型选择 Mean SD N,在 Data 栏中输入数据,软件自动生成折线图。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体 pPICZαA-CueO 的构建

图 1 为琼脂糖凝胶电泳:泳道 1 为提取的 *E.coli* BL21 基因组 DNA,泳道 2 为 PCR 扩增得到的 CueO 基因,泳道 3 为重组质粒 pMD19-T-CueO 经 EcoR I 和 Xba I 酶切的结果,泳道 4、5 分别为经 EcoR I 和 Xba I 酶切后的 CueO 基因及 pPICZαA,泳道 6 为表达载体 pPICZαA-CueO 的酶切结果,可以确定表

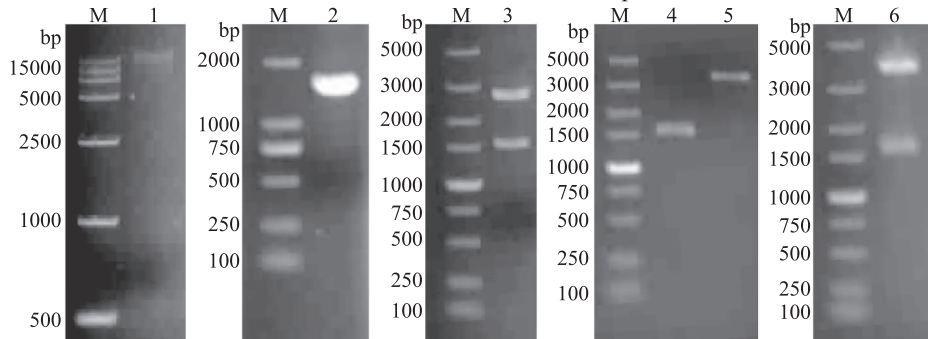


图 1 表达载体 pPICZαA-CueO 的构建

Fig.1 Construction of expression vector pPICZαA-CueO

注:图中 M 为 DNA 分子 Marker。

达载体 pPICZαA-CueO 构建成功。

2.2 重组酵母 Pichia pastoris/CueO 的摇瓶发酵及产物分析

挑取 6 株不同的重组酵母转化子摇瓶发酵,甲醇诱导 72 h 后,用 SDS-PAGE 方法分析表达产物,并对其蛋白含量和酶活进行测定。如图 2A 所示,6 株重组酵母均实现了胞外表达;图 2B 和图 2C 分别为蛋白含量及酶活测定结果,其中表达量和酶活最高的均为 6#菌株,最高表达量为 81.26 μg/mL,最高酶活为 356.67 U/L。说明表达量和酶活正相关,表达量高时相应的酶活也高。

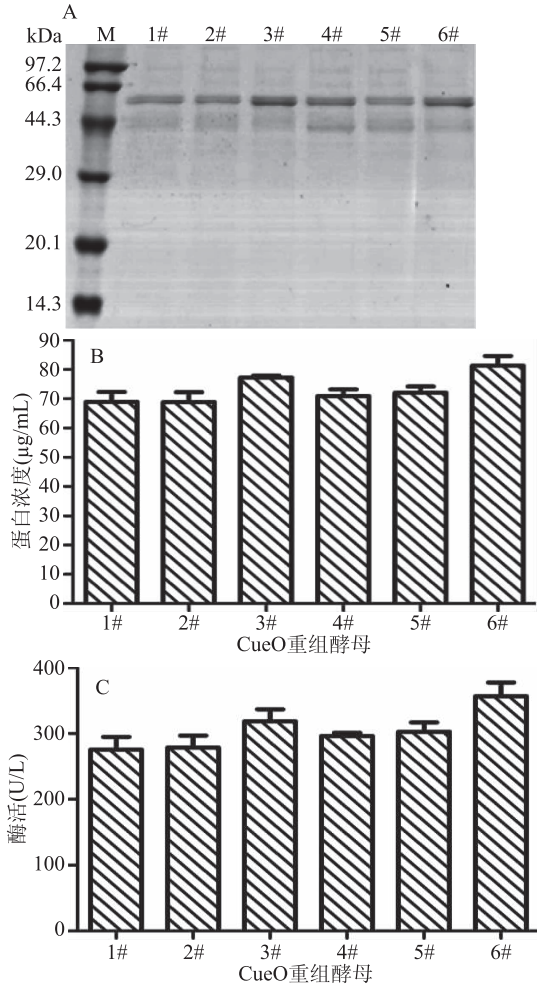


图2 重组酵母 Pichia pastoris/CueO 表达产物的分析

Fig.2 Analysis of recombinant yeast Pichia pastoris/CueO expression products

注:A 图中 M 为蛋白质分子 Marker。  
1#~6#为 CueO 重组酵母。

2.3 CueO 酶学性质分析

在室温条件下,测定 6#菌株发酵上清液在不同 pH 环境下的多酚氧化酶活性。如图 3A 所示:以 ABTS 作为底物时,其最适反应 pH 为 2.5,将此条件下测得的酶活设为 100%,依次计算其他 pH 条件下的相对酶活力。可以发现在 pH 为 2.0 和 3.0 的情况下,相对酶活力下降为 70% 和 80%;当 pH 达到 4.0 时,相对酶活迅速下降为 3%。说明 E.coli 多酚氧化酶 pH 范围非常窄,且适合在偏酸性环境下

使用。

在 pH2.5 的条件下,测定 6#菌株发酵上清液在不同温度环境下的多酚氧化酶活性。如图 3B 所示:以 ABTS 作为底物时,其最适反应温度为 45 ℃,将此条件下测得的酶活设为 100%,依次计算其他温度条件下的相对酶活力。发现当温度上升到 50 ℃时,酶活几乎没有下降,相对酶活为 99%;当温度上升到 60 ℃时,相对酶活仍保持在 40% 以上。而骆燕筛选得到的金针菇漆酶最适温度仅为 37 ℃,40 ℃后酶活显著下降<sup>[26]</sup>,相对而言本研究克隆得到的 E.coli 多酚氧化酶耐热性较好。

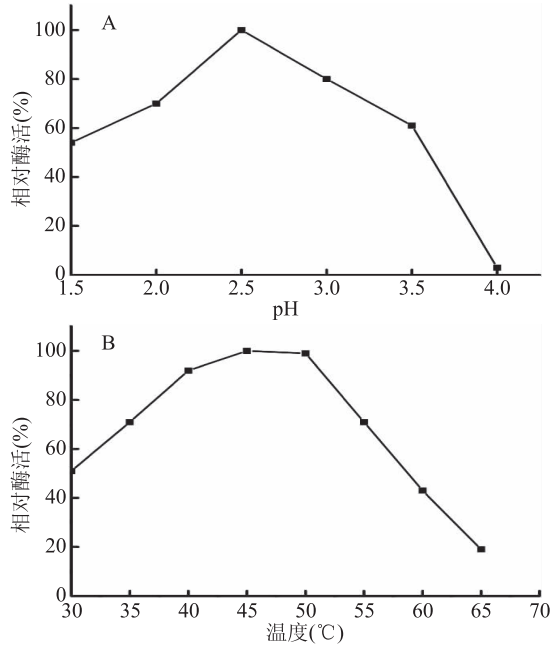


图3 pH 和温度对 CueO 酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH and temperature on CueO enzyme activity

2.4 CueO 信号肽、前导肽及第三结构域突变体的构建及其表达产物的分析

图 4 是 CueO 的结构域示意图,完整的野生型 CueO 由信号肽 (Signal peptide)、前导肽 (Lead peptide) 和包含三个结构域 (Domain) 的成熟肽 (Mature peptide) 三部分构成。

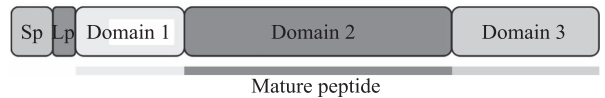


图4 大肠杆菌多酚氧化酶结构域示意图  
Fig.4 Schematic diagram of CueO domain

2.4.1 CueO-ΔSp 和 CueO-Mp 突变体的构建 为了研究信号肽 (AA1-29) 对 CueO 功能的影响,以表达载体 pPICZαA-CueO 为模板,用设计好的突变引物 Eclac-DM-F1 和 Eclac-DM-R2 进行 PCR 扩增,得到去信号肽的突变体 CueO-ΔSp;为了研究前导肽 (AA30-45) 对 CueO 功能的影响,用引物 Eclac-DM-F2 和 Eclac-DM-R2 扩增得到成熟肽的突变体 CueO-Mp。图 5A 为 CueO-ΔSp 和 CueO-Mp 突变体构建的琼脂糖凝胶电泳结果,可以确定突变体构建

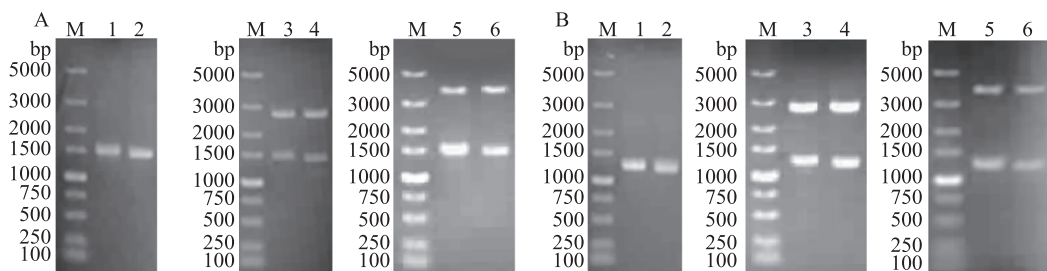


图5 突变体的构建

Fig.5 Construction of mutants

注:A中1、2、3、4、5、6依次分别为突变体 CueO-ΔSp 和 CueO-Mp 的 PCR 产物、与 pMD19-T 酶连后的酶切结果、与 pPICZαA 酶连后的酶切结果。B 中 1、2、3、4、5、6 依次分别为突变体 CueO-ΔSp/Δ411~516 和 CueO-Mp/Δ411~516 的 PCR 产物、与 pMD19-T 酶连后的酶切结果、与 pPICZαA 酶连后的酶切结果。M 为 DNA 分子 Marker。

成功。

**2.4.2 CueO-ΔSp/Δ411~516 和 CueO-Mp/Δ411~516 突变体的构建** 为了研究第三结构域(AA411~516)对 CueO 功能的影响,以突变体 CueO-ΔSp 质粒为模板,用引物 Eclac-DM-F1 和 Eclac-DM-R1 扩增得到突变体 CueO-ΔSp/Δ411~516;以突变体 CueO-Mp 质粒为模板,用引物 Eclac-DM-F2 和 Eclac-DM-R1 扩增得到突变体 CueO-Mp/Δ411~516。图 5B 为 CueO-ΔSp/Δ411~516 和 CueO-Mp/Δ411~516 突变体的琼脂糖凝胶电泳结果,可以确定突变体构建成功。

**2.4.3 CueO-ΔSp、CueO-Mp、CueO-ΔSp/Δ411~516 和 CueO-Mp/Δ411~516 表达产物的分析** 图 6A 和 6B 为突变体 PAGE 图,图 6C 和图 6D 分别为突变体蛋白含量及酶活测定结果。可以发现突变体 CueO-ΔSp 的表达量为 250.29 μg/mL,是野生型 CueO 的 3.08 倍;CueO-ΔSp 的酶活为 1248.36 U/L,是野生型 CueO 的 3.5 倍。突变体 CueO-Mp 和突变体 CueO-

Mp/Δ411~516 没有表达,而突变体 CueO-ΔSp/Δ411~516 相较于野生型,虽然表达量大幅度增加(为 453.14 μg/mL),但却没有检测到酶活。这说明信号肽的缺失可以提高 CueO 的表达量和酶活;第三结构域的缺失能够提高表达量,但会导致 CueO 失活;前导肽的缺失会阻碍蛋白的分泌,推测前导肽可能伴侣蛋白的识别位点。

## 2.5 针对 CueO 结构域连接区域突变体的构建及其表达产物的分析

使用蛋白质三维结构分析软件 PyMOL,发现 CueO 分子的结构域 2 和结构域 3 之间有一段 Met 残基富含区域(深黑色部分:AA355~400),所构成的(螺旋作为“盖子”正好覆盖了酶活性中心的 T1 Cu 位点,而这一特殊结构在毛栓菌漆酶 TtL 中却并未存在(图 7)<sup>[27]</sup>。

**2.5.1 Mut-1、Mut-2、Mut-3 和 Mut-4 突变体的构建** 以 CueO-ΔSp 质粒为模板,Eclac-DM-F1/Eclac-Mut1-R1 和 Eclac-Mut1-F2/Eclac-DM-R2 为引

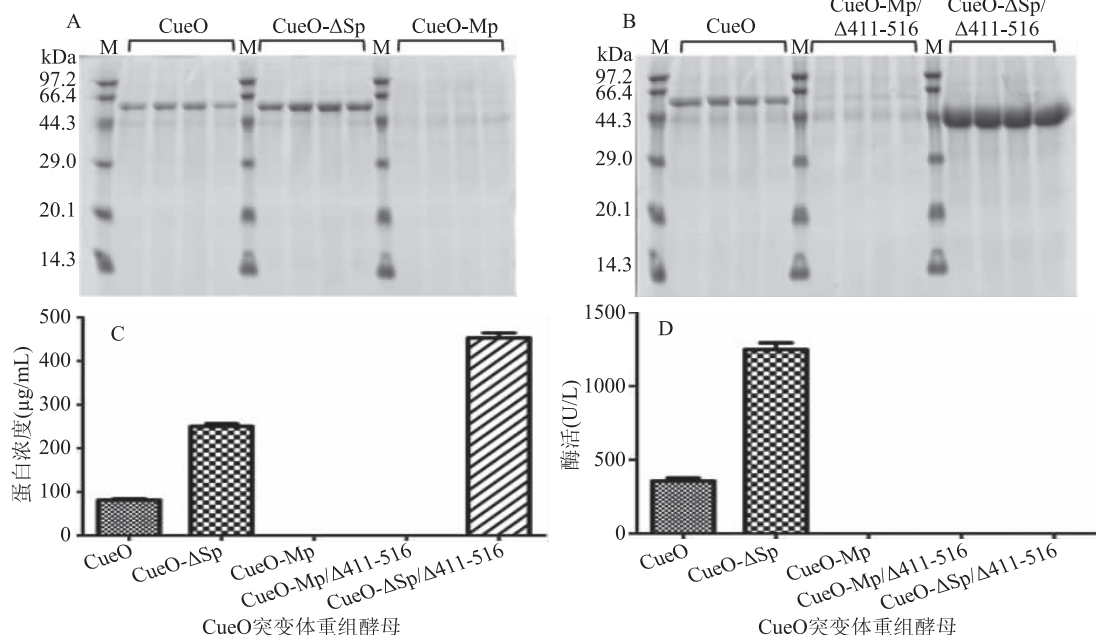


图6 突变体表达产物的分析

Fig.6 Analysis of mutants expression products

注:A 图和 B 图中 M 为蛋白质分子 Marker。

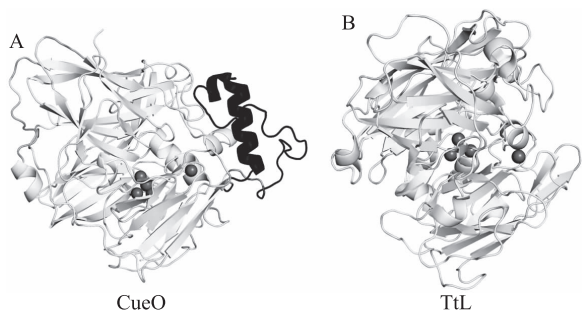


图7 大肠杆菌多酚氧化酶(CueO)和毛栓菌漆酶(TtL)三维结构图

Fig.7 Three-dimensional structure of CueO and TtL

物,通过2步PCR对AA357-371(图8A)进行缺失突变,得到突变体 Mut-1;Eclac-DM-F1、Eclac-Mut2-R1和Eclac-Mut2-F2、Eclac-DM-R2为引物,通过2步PCR对AA372-387(图8B)进行缺失突变,并插入氨基酸残基 Ser-Ala-Ser,得到突变体 Mut-2;Eclac-DM-F1、Eclac-Mut3-R1和Eclac-Mut3-F2、Eclac-DM-R2为引物,通过2步PCR对AA356-376(图8C)进行缺失突变,得到突变体 Mut-3;Eclac-DM-F1、Eclac-Mut4-R1和Eclac-Mut4-F2、Eclac-DM-R2为引物,通过2步PCR对AA356-407(图8D)进行缺失突变,并插入氨基酸残基 Ser-Ala-Ser,得到突变体 Mut-4。

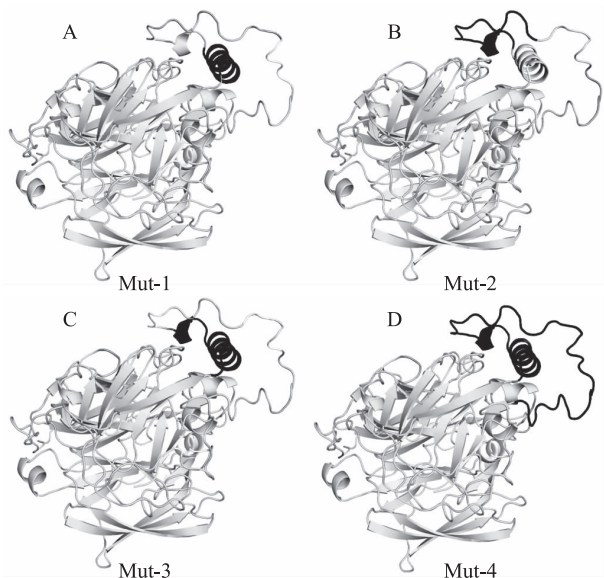


图8 CueO结构域连接区域4个突变体的三维结构图

Fig.8 Three-dimensional structure diagram of four mutants in the CueO domain connection region  
注:深黑色区域为突变区段。

图9为突变体 Mut-1、Mut-2、Mut-3、Mut-4的琼脂糖凝胶电泳结果,可以确定突变体构建成功。  
2.5.2 Mut-1、Mut-2、Mut-3和Mut-4表达产物的分析 图10A和10B为突变体PAGE图,图10C和10D分别为突变体蛋白含量及酶活测定结果。可以发现4个突变体均实现酵母胞外分泌,但与突变前相比,表达量均有所下降;而且除了 Mut-2检测到酶活,其余突变均未检测到多酚氧化酶活性。

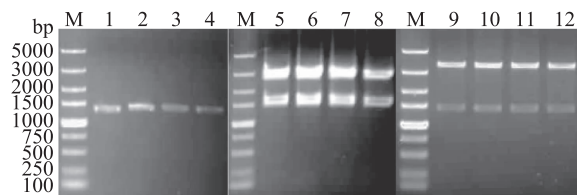


图9 Mut-1、Mut-2、Mut-3、Mut-4突变体的构建

Fig.9 Construction of Mut-1, Mut-2, Mut-3, Mut-4 mutants  
注:1、2、3、4分别为 Mut-1、Mut-2、Mut-3、Mut-4的PCR产物;5、6、7、8分别为 Mut-1、Mut-2、Mut-3、Mut-4与pMD19-T酶连后的酶切结果;9、10、11、12分别为 Mut-1、Mut-2、Mut-3、Mut-4与pPICZαA酶连后的酶切结果。M为DNA分子Marker。

表明,针对氨基酸残基 AA357-371所构成的α螺旋进行缺失或者替换之后会导致 CueO 彻底失活,这一发现与现有文献报道的结论完全不同<sup>[23-24]</sup>。

### 3 结论与讨论

克隆得到 *E.coli* CueO,并在毕赤酵母中实现胞外分泌表达,其最适 pH 和最适温度分别为 2.5 和 45℃,表明 CueO 适合在偏酸性环境下使用,在中高温环境下也可以发挥很好的催化作用。如 Sakaguchi 采用漆酶和木醋酸对煮熟的鸡蛋壳表面进行处理,发现漆酶增强了木醋酸中酚类化合物的杀菌效果,使煮熟的鸡蛋可在 40℃ 和 75% 相对湿度下贮藏 21 d 而不会被微生物感染变质<sup>[28]</sup>。此外,还通过对一系列突变体的研究,发现信号肽的缺失(CueO-ΔSp)分别将 CueO 的蛋白表达量和酶活提高为 250.29 μg/mL 和 1248.36 U/L,是野生型 CueO 的 3.08 倍和 3.5 倍;第三结构域的缺失虽然提高了蛋白表达量,但导致 CueO 失活;前导肽的缺失阻碍了蛋白的分泌;无论对 CueO 结构域之间连接区段中的α-螺旋进行缺失或者替换,均会导致 CueO 的彻底失活,这一发现与现有文献报道的α-螺旋的缺失可以提高酶活的结论完全不同<sup>[23-24]</sup>。

由于 CueO 实现其氧化活性必须有外源铜离子的参与<sup>[19]</sup>,同时 Cortes 在研究 CueO 三铜位点与甲硫氨酸簇(α-螺旋)之间的相互关系时,发现外源铜离子可与甲硫氨酸簇结合<sup>[29]</sup>。因此,我们推测可能正是外源铜离子与α-螺旋的结合使得 CueO 从底物中获取电子的路径得以完善,进而发挥其氧化能力。但是,是否因α-螺旋的缺失导致外源铜离子无法结合,使得 CueO 丧失活性,仍需进一步研究。

本文完成对 *E.coli* CueO 的异源表达及其关键结构域功能的初步探究,为进一步改造 *E.coli* CueO 以提高其商业价值,并最终实现其工业化应用奠定了一定的理论基础。

### 参考文献

- [1]秦澎,辜运富,曾先富,等.香菇漆酶高产菌株筛选及漆酶基因的表达研究[J].菌物学报,2017(9):162-165.
- [2]李晨歌.漆酶及其应用研究进展[J].陇东学院学报,2017,28(1):62-66.
- [3]Wang F,Zhao P,Fei C,et al.Research progress of Laccase

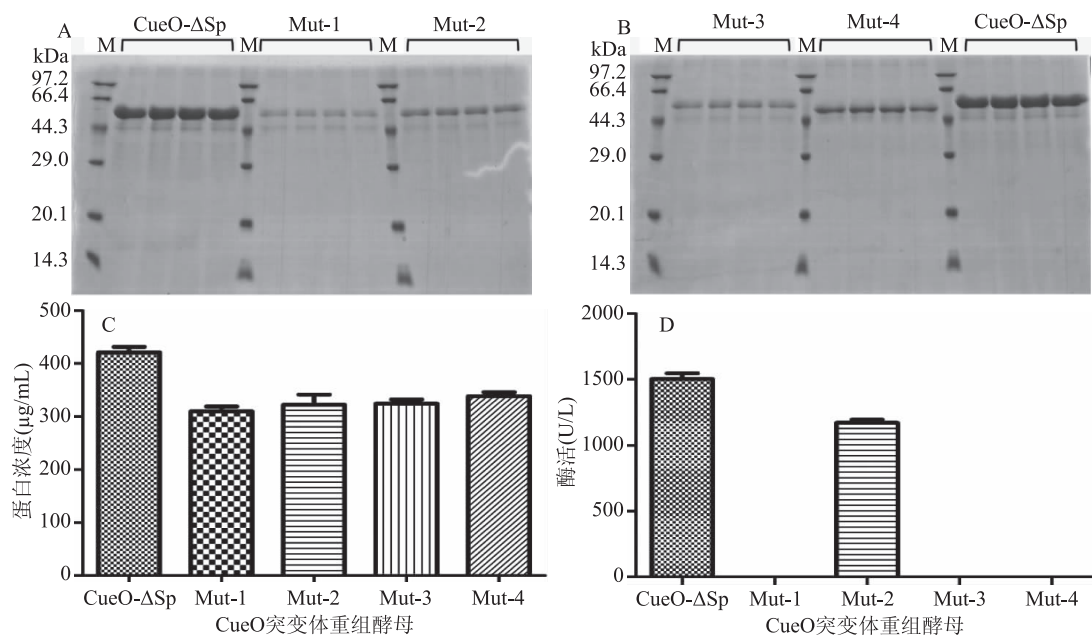


图10 突变体 Mut-1、Mut-2、Mut-3、Mut-4 表达产物的分析

Fig.10 Analysis of expression products of mutants Mut-1, Mut-2, Mut-3, Mut-4

注:A 图和 B 图中 M 为蛋白质分子 Marker。

and its application [J]. Life Science Instruments, 2017, 127: 1217-1225.

[4] Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda R C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2016, 21(1): 19-38.

[5] 鲍炳鑫. 双孢菇漆酶的分离提取及其应用[D]. 南京: 南京理工大学, 2017.

[6] 邓寒梅, 邵可, 梁家豪, 等. 漆酶的来源及固定化漆酶载体研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 10-15.

[7] Dwivedi U N, Singh P, Pandey V P, et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2011, 68(2): 117-128.

[8] Chauhan P S, Goradia B, Saxena A. Bacterial laccase: Recent update on production, properties and industrial applications[J]. 3 Biotech, 2017, 7(5): 323.

[9] 喻财铃. 漆酶基因结构与功能关系及分子设计研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2010.

[10] 李成名, 王佳懿, 卢磊. 短小芽孢杆菌 LC01 漆酶基因在毕赤酵母中的胞外表达及重组漆酶酶学性质研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(3): 185-193.

[11] 董冰雪. 宏基因组来源耐  $Mn^{2+}$ 、热稳定细菌漆酶的分子克隆及酶学特性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(6): 1190-1199.

[12] Hakulinen N, Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences Cmls, 2015, 72(5): 857-68.

[13] 刘慧平. 细菌漆酶基因挖掘、酶学特性及其结构研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.

[14] Grass G, Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001, 286(5): 902-908.

[15] Petersen C, Møller, Lisbeth B. Control of copper homeostasis

in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR [J]. Gene, 2000, 261(2): 289-298.

[16] Singh S K, Grass G, Rensing C, et al. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli* [J]. Journal of bacteriology, 2004, 186(22): 7815-7817.

[17] Roberts S A, Weichsel A, Grass G, et al. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(5): 2766-2771.

[18] Ueki Y, Inoue M, Kurose S, et al. Mutations at Asp112 adjacent to the trinuclear Cu center in CueO as the proton donor in the four-electron reduction of dioxygen [J]. FEBS Letters, 2006, 580(17): 4069-4072.

[19] Li X, Wei Z, Zhang M, et al. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 354(1): 21-26.

[20] Komori H, Kajikawa T, Kataoka K, et al. Crystal structure of the CueO mutants at Glu506, the key amino acid located in the proton transfer pathway for dioxygen reduction [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 438(4): 686-690.

[21] Kataoka K, Komori H, Ueki Y, et al. Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli*-deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site [J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 373(1): 141-152.

[22] 李旭. 大肠杆菌漆酶 CueO 的结构与功能研究[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2006.

(下转第126页)

表 10 最优产品的质量检验结果  
Table 10 The quality inspection results of the best products

| 项目               | 检验结果                                                                                                              | 标准要求                                            | 单项判定 |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------|
| 外观色泽             | 浅棕色,色泽光亮均匀                                                                                                        | 符合品种应有的色泽                                       | 合格   |
| 滋味、气味            | 有榄钱苯乙醇苷的风味,酸甜微苦,略有清凉感,无异味                                                                                         | 符合产品应有的滋味和气味,无异味                                | 合格   |
| 形态               | 块形完整、大小基本一致、无裂缝、无明显变形                                                                                             | 块形完整、大小基本一致、无裂缝、无明显变形                           | 合格   |
| 杂质               | 无正常视力可见杂质                                                                                                         | 无正常视力可见杂质                                       | 合格   |
| 组织               | 坚实不松散、剖面精密、不黏连                                                                                                    | 坚实不松散、剖面精密、不黏连                                  | 合格   |
| 干燥失重             | 0.456 ± 0.038 g                                                                                                   | ≤ 5 g/100 g                                     | 合格   |
| 菌落总数(CFU/g)      | n <sub>1</sub> = 3600, n <sub>2</sub> = 1700, n <sub>3</sub> = 2200, n <sub>4</sub> = 1400, n <sub>5</sub> = 1200 | n~5, c~2, m~10 <sup>4</sup> , M~10 <sup>5</sup> | 合格   |
| 大肠菌群(CFU/g)      | n <sub>1</sub> = 2, n <sub>2</sub> = 4, n <sub>3</sub> < 3, n <sub>4</sub> = 4, n <sub>5</sub> = 6                | n~5, c~2, m~10, M~10 <sup>2</sup>               | 合格   |
| 铅含量              | 未检出                                                                                                               | < 0.5 mg/kg                                     | 合格   |
| 砷含量              | 未检出                                                                                                               | < 0.5 mg/kg                                     | 合格   |
| 食品添加剂            | 未检出                                                                                                               | 符合 GB 2760 要求                                   | 合格   |
| 营养强化剂            | 未检出                                                                                                               | 符合 GB14880 要求                                   | 合格   |
| 苯乙醇苷类化合物含量(mg/g) | 33.24 ± 2.62                                                                                                      |                                                 |      |

[8]章传真.甘露醇的临床应用[J].海峡药学,2004(5):115-118.  
[9]侯秀娟,李秀萍,张倩.甘露醇的临床应用[J].中国社区医师(医学专业),2012,14(31):20-21.  
[10]杨丽,王怡.甘露醇治疗脑卒中的临床应用进展[J].临床合理用药杂志,2011,4(24):165-167.  
[11]刘富东,吴家晔,储照虎,等.甘露醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤时神经细胞凋亡的影响[J].临床神经病学杂志,2002,15(1):21-23.  
[12]刘郁,刘连新,李素婷,等.复方口腔溃疡口含片制备工艺优选[J].中国试验方剂学杂志,2012,18(8):58-59.  
[13]李桢,宋小宁,赵军,等.雪梨含片制备及其配方的响应面优化[J].食品工业,2015,36(8):127-131.  
[14]周文红,李家怡,高程海,等.大孔吸附树脂分离纯化白骨壤果实中苯乙醇苷的工艺研究[J].食品科技,2018,43(1):231-235.  
[15]王小宁,常体伟,屈勇,等.复方金桔含片的制备工艺研

究[J].现代中药研究与实践,2017,31(3):38-42.  
[16]张丽珍,詹晓如,胡奕勤,等.四味清口含片处方的优化及制备工艺研究[J].中国医药科学,2013,3(21):51-56  
[17]张慧,张云龙,田洋,等.普洱茶三七含片的研制[J].食品科学,2010,31(22):516-520.  
[18]陈武,邹盛勤,伍晓春,等.绞股蓝无糖口含片的制备工艺研究[J].食品科学,2008(3):245-248.  
[19]王锐平,陈雪峰,王宁,等.大枣口含片生产工艺的研究[J].食品工业科技,2007(1):154-155,158.  
[20]刘源,黄苇,张敏妹,等.湿法制备话梅含片工艺的研究[J].食品研究与开发,2013,34(21):66-69.  
[21]吴丽娟.玉米皮膳食纤维粉质特性的研究及其片剂的研制[D].长春:吉林农业大学,2011.  
[22]王谦.松花灵芝片剂的制备工艺和质量检验[D].济南:山东师范大学,2016.  
[23]李映莹.芪丹颗粒的制备工艺及质量标准研究[D].武汉:武汉理工大学,2014.

(上接第 120 页)

[23] Wang H, Liu X, Zhao J, et al. Crystal structures of multicopper oxidase CueO G304K mutant; Structural basis of the increased laccase activity [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):14252.  
[24]马小建.大肠杆菌来源的漆酶 CueO 在毕赤酵母 GS115 中的高效表达及在染料脱色中的应用研究[D].武汉:湖北大学,2017.  
[25]Chen G J, Yang J K, Peng X B, et al. High-level secretory expression of *Aspergillus* exo-inulinase and its use in the preparation of fructose syrup from inulin [J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2017, 133(1):543-551.  
[26]骆燕.一株高产漆酶野生金针菇菌株的鉴定及酶学性质

研究[J].食用菌,2018,234(3):11-15.  
[27]Matera, Irene, Gullotto, et al. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate [J]. Inorganica Chimica Acta, 2008, 361(14):4129-4137.  
[28]Sakaguchi H, Uyama N, Uyama H. Preserving boiled eggs with a sterilization system employing microbial laccase and wood vinegar [J]. Animal Science Journal, 2010, 78(6):668-671.  
[29]Cortes L, Wedd A G, Xiao Z. The functional roles of the three copper sites associated with the methionine-rich insert in the multicopper oxidase CueO from *E. coli* [J]. Metallomics, 2015, 7(5):776-785.