

郑苗苗,池玉杰.红平菇 HP1 漆酶基因及启动子克隆和序列分析[J].江苏农业科学,2014,42(8):21-26.

# 红平菇 HP1 漆酶基因及启动子克隆和序列分析

郑苗苗,邵淑丽,张令昂,焦战战

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要:**以优化后的漆酶培养基为基础,将 RT-PCR、RACE 技术相结合,从红平菇菌株中获得漆酶基因 cDNA 全长及 Genomic DNA 全长序列,Genomic DNA 大小为 2 344 bp。通过对漆酶基因 cDNA 全长和 Genomic DNA 全长序列的比较,结果显示该基因包含 13 个外显子和 12 个内含子。基因 cDNA 全长为 1 746 bp,其中包含 1 个完整的 ORF,长度为 1 590 bp,编码 529 个氨基酸。序列在氨基酸水平上与桃红侧耳 *Pleurotus salmoneostramineus* 的氨基酸序列具有较高的同源性,相似性达 97%,与齿耳菌 *Steccherinum murashkinskyi* 漆酶氨基酸序列相似性达到 72%。通过 SEFA-PCR 的方法,扩增得到漆酶基因起始密码子上游长 1 126 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、AP2 等基本的转录起始元件外,还存在多个潜在的顺式作用元件序列位点,包括 4 个 MRE 元件、2 个 CreA 热击元件、2 个 STRE 元件、1 个 NIT2 元件、1 个 HSEs 元件、1 个 XRE 异生物质反应元件、4 个氮因子结合位点等。不同外源诱导物可以调节红平菇 HP1 漆酶基因的表达。

**关键词:**红平菇;漆酶基因;启动子克隆;转录调控

**中图分类号:**S646.1<sup>+</sup>40.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0021-05

漆酶(laccase)是一种含铜的多酚氧化酶,属于氧化酶的蓝铜家族。漆酶含有 4 个铜原子,分别位于 3 个不同结合位点,并且高度保守<sup>[1]</sup>。1883 年吉田在漆树中发现漆酶,1893 年 Laborde 在真菌中发现漆酶。目前证实漆酶普遍存在于细菌、真菌、植物、昆虫中<sup>[2]</sup>。其中真菌中的白腐菌是最重要的漆酶生产菌。近年来,漆酶是医学、化学、生物学、环境科学等领域的研究热点<sup>[3]</sup>。目前对漆酶生理生化的研究比较明确,已经研究到分子水平并深入基因工程阶段,已经克隆许多漆酶基因 cDNA 及 Genomic DNA 全长序列,并对其序列进行了核苷酸分析<sup>[4]</sup>。真菌漆酶存在很多同工酶基因,由于菌株生长环境和生理状态不同,其表达量也有所不同<sup>[5]</sup>。研究表明,真菌漆酶的分泌受金属离子、营养元素及芳香化合物影响,这些因素是在转录水平诱导漆酶上调表达<sup>[6]</sup>。由起始密码子上游的启动子及相应顺式作用元件的作用,转录水平的表达量增加。因此,研究真菌漆酶基因上游的启动子结构及功能对于提高漆酶蛋白的表达产量非常重要。本研究从红平菇 HP1 中提取总 DNA,利用 SEFA-PCR 技术克隆了漆酶基因的启动子序列并对其结构进行分析,以期为进一步了解漆酶基因的表达调控机制奠定基础。

## 1 材料与与方法

### 1.1 菌株与试剂

红平菇 HP1 *Pleurotus djamor* 采集于凉水国家自然保护区,由齐齐哈尔大学微生物实验室保存。DNAquick\_快捷型

植物基因组 DNA 提取系统、DNAquick Plant System 均购自 TIANGEN 公司;SMART RACE cDNA 扩增试剂盒(Clontech);E. Z. N. A 真菌 RNA 提取试剂盒(OMEGA);E. Z. N. A 凝胶回收试剂盒(OMEGA);两步法 RT-PCR 试剂盒、Genome Walking Kit 试剂盒、3'RACE 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;E. coli JM109 感受态细胞购自 TaKaRa 公司;pMD20-T Vector、LA Taq DNA 聚合酶(Promega);其余试剂为进口或国产分析纯。

### 1.2 基因组 DNA 和总 RNA 的提取

以陈军等报道的优化后的漆酶培养基<sup>[7]</sup>培养红平菇 HP1。提取红平菇 HP1 基因组 DNA 和总 RNA,用核酸检测仪测定产物纯度,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 试剂盒使用说明进行。在 GenBank 中选取 20 条漆酶基因全长的氨基酸序列,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 30  $\mu$ L,含 10  $\times$  PCR buffer 3  $\mu$ L,2.5 mmol/L dNTP Mixture 1  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L TaKaRa Ex Taq<sup>TM</sup> HS 0.5  $\mu$ L,引物 Lcc1-RT1 和 Lcc1-RT2 各 1  $\mu$ L,cDNA 2  $\mu$ L。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 40 s,55  $^{\circ}$ C 35 s,72  $^{\circ}$ C 3 min,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。取 5  $\mu$ L 扩增产物用 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定(以下检测方法同)。

### 1.4 漆酶 cDNA 3'/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,获得其 3'/5'末端序列(表 1),cDNA 3'末端套式 PCR 反应体系 25  $\mu$ L,第 1 次 PCR 反应含 10  $\times$  LA PCR buffer II(Mg<sup>2+</sup> Free)2  $\mu$ L,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1  $\mu$ L,1  $\times$  cDNA Dilution buffer II 1  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L 3'RACE Outer Primer 1  $\mu$ L,5 U/ $\mu$ L TaKaRa LA Taq<sup>®</sup> 1  $\mu$ L,10  $\mu$ mol/L Gene Specific Outer Primer 1  $\mu$ L,cDNA 1  $\mu$ L。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,58  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 2 min,20 个循环;72  $^{\circ}$ C

收稿日期:2013-11-06

基金项目:黑龙江省教育厅科研项目(编号:12541892);黑龙江省齐齐哈尔市社会发展攻关项目(编号:SFGG-201204)。

作者简介:郑苗苗(1982—),女,黑龙江哈尔滨人,博士,讲师,研究方向为真菌微生物。miaomiao\_0000@126.com。

通信作者:邵淑丽,博士,教授。E-mail:shshl32@163.com。

表1 扩增漆酶 cDNA 全长序列和基因组全长序列引物

引物名称	核苷酸序列 (5'→3')	缩写氨基酸序列
Lcc1 - RT1	ACYAGNACYCANTGRCANGGY	T S I H W H G
Lcc1 - RT2	TTNTGYTANCAYTCYCANCTG	F W Y H S H L
3'RACE GSP (outer)	GGAAACTATTGGATCCG/TGGT	G N Y W I R G
3'RACE NGSP (inner)	CAACTACGACGATCCGATCTTCC	P V E E P T T
5' RACE GSP	ATCGCAGGCAATGCTGACAAG	L V S I A C D
Lcc1 - S1	ATGACTCTTCTGACTCTCTC	M T L L T L S
Lcc1 - S2	TTATGGTTGAAGATCGTTGGT	D N N L Q P *
Lcc1 - SP1	GGGATCGTTGGGTCATAG	V Y D P N D P
Lcc1 - SP2	TTGATCAGGTACGTTGAAAT	D F N V P D Q
Lcc1 - SP3	GTGATCAGGTATGATGGGACAC	Q C P I I P D H

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

#### 1.5 漆酶 cDNA 全长及漆酶 Genomic DNA 全长的扩增

根据 cDNA 3'/5' 末端核苷酸序列结果, 分别在其 3' 和 5' 末端设计特异性引物, 用于扩增漆酶 cDNA 全长序列 (表 1)。同时以基因组 DNA 为模板, 扩增漆酶基因组全长。cDNA 全长 PCR 反应体系 50  $\mu$ L, 含  $5 \times$  Prime STARTM buffer ( $Mg^{2+}$  plus) 10  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP Mixture 4  $\mu$ L, 2.5 U/ $\mu$ L Prime STARTM HS DNA Polymerase 0.5  $\mu$ L, 引物 Lcc1 - S1 和 Lcc1 - S2 各 1  $\mu$ L, 反转录 cDNA 5  $\mu$ L。Genomic DNA 全长 PCR 反应体系及反应条件同“1.3”节。

#### 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 Lcc1 - SP1、Lcc1 - SP2、Lcc1 - SP3, 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 (表 1)。

#### 1.7 漆酶基因结构及启动子结构分析

将上述得到的漆酶全长基因 cDNA 和基因组全长以及 5' 端启动子序列经过胶回收试剂盒纯化后, 进行 T 载体克隆, 并送交北京英俊公司测序。运用生物信息技术对获得的漆酶全长基因 cDNA 和基因组以及 5' 端启动子序列进行同源性比较及结构特点分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 检测

提取红平菇菌丝体总 RNA 后, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果表明, 28S rRNA、18S rRNA 条带较清晰, 且 2 条带比值接近于 2:1, 证明总 RNA 较完整。经核酸检测仪检测, 280/260、260/230 分别为 2.01、2.57, 说明纯度较高。所提取总 RNA 可以用于后续试验 (图 1)。

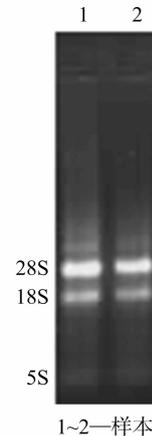
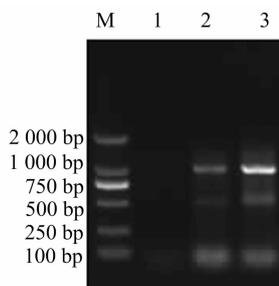


图1 红平菇HP1的总RNA电泳图

### 2.2 红平菇 HP1 漆酶基因 cDNA 全长的克隆与序列分析

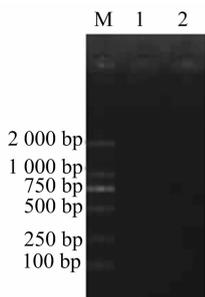
根据真菌漆酶高度保守 Cu - bind 结构域 I、IV 的氨基酸序列, 设计 1 对简并引物并扩增漆酶基因 cDNA 片段, 得到 1 条约 1 000 bp 大小条带, 将其进行大肠杆菌转化并测序, 测序结果为 1 021 bp, 进行 Blastx 比对后证明是漆酶基因 (图 2)。根据已知的漆酶 cDNA 片段, 设计 3' 端特异性的正向引物: 3'RACE GSP (outer) 和 3'RACE NGSP (inner), 以反转录的 cDNA 第 1 条链为模板, 扩增 3' cDNA 末端, 获得约 750 bp 大小条带, 进行测序后漆酶基因片段为 742 bp, 其 3' 末端有典型的 PolyA 尾巴, 并且具有加尾信号 (AATAAA) (图 3、图 4)。根据已知的漆酶 cDNA 片段设计 5' 端特异性反向互补引物: 5'RACE GSP, 以反转录液为模板, 扩增 5' cDNA 末端, 获得约 750 bp 大小条带, 进行测序后基因片段为 732 bp, 5' 端有一典型 UTR 区 (1~66 bp), 编码区长度为 666 bp, 该基因片段与 RT-PCR 扩增的基因片段有重复区域, 进行 Blastx 比对后证明是漆酶基因 (图 5)。

将 RT-PCR 获得的漆酶基因片段与 3'/5'RACE 获得的漆酶基因片段进行剪切拼接, 得到 cDNA 基因全长为 1 746 bp, 命名为 *Pd-lacI*。漆酶具有真核生物基因的一般特征, 在其 5' 端有 1 个 UTR 区, 长度为 66 bp; 3' 端具有 PolyA 尾巴和加尾信号 (AATAAA)。通过 NCBI 的 ORF Finder 检测到 1 条长 1 590 bp 的完整开放式阅读框, 其编码 529 个氨基酸, 预测蛋白分子质量为 55.52 ku, 限制性酶切位点有 78 个, 等电点 pI 约为 4.72。应用 RPS - Blast 软件进行 Cu - bind 结



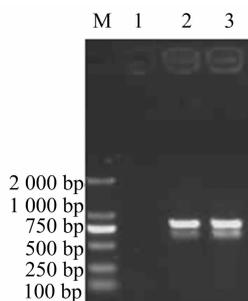
1—marker 2000; 2—对照; 3—样本

图2 红平菇HP1漆酶基因的RT-PCR结果



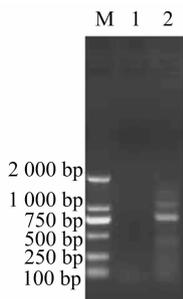
1—marker 2000; 2—对照; 3—Outer PCR

图3 红平菇HP1漆酶基因的3' RACE Outer PCR结果



1—marker 2000; 2—对照; 3—Inner PCR

图4 红平菇HP1漆酶基因的3' RACE Inner PCR结果



1—marker 2000; 2—对照; 3—样本

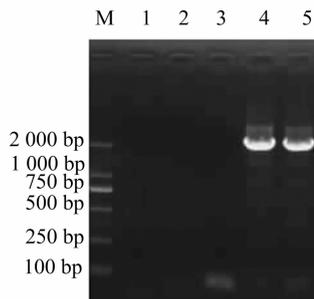
图5 红平菇HP1漆酶基因的5' RACE 结果

构域分析表明,该蛋白有3个Cu-bind结构域,即pfam07732、pfam07731、pfam00394,其中pfam07732、pfam07731是多铜氧化酶中与次级代谢物运输、分解代谢和生物合成相关的结构域;pfam00394是Cu离子保守结构域。利用SignalP V2.0软件分析位于氨基酸序列N端具有真核基因的信号肽序列(1~19aa),剪切位点为AHA-AI。利用Scanprosite软件分析得出,在漆酶基因编码的氨基酸序列中含有3个

N-糖基化位点(N-X-S/T),天冬酰胺残基分别位于序列中的第216、311、444处,它们是潜在的糖基化位点。将漆酶编码的氨基酸序列与已知的蛋白序列进行Blastp比对后发现,它与桃红侧耳*Pleurotus salmoneostramineus*的氨基酸序列具有较高的同源性,相似性达97%,与齿耳菌*Steccherinum murashkinskyi*漆酶氨基酸序列相似性达到72%。

### 2.3 漆酶 Genomic DNA 全长的克隆与结构分析

根据漆酶全长cDNA序列设计1对特异性全长引物,以提取总DNA为模板通过全长PCR扩增得到该漆酶Genomic DNA的全长序列,全长为2258bp,命名为Pd-lac1(图6)。



1—marker 15000; 2—对照; 3~6—样本

图6 红平菇HP1漆酶Genomic DNA全长结果

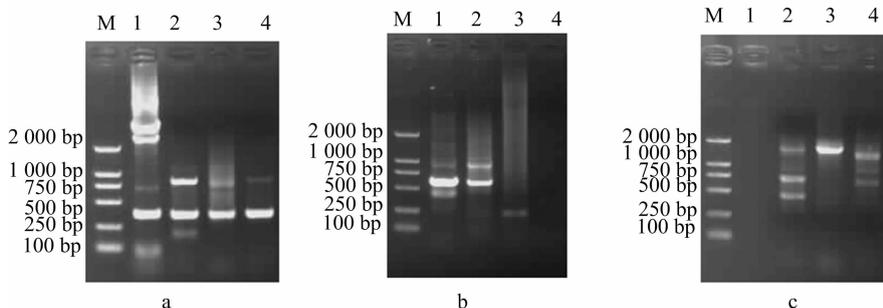
利用NCBI网站的Align Sequences Nucleotide BLAST对漆酶基因cDNA全长和基因组DNA全长序列进行分析,在所克隆的漆酶基因组DNA中包含13个外显子和12个内含子。内含子长度分别为56、48、53、51、55、66、51、51、58、68、51、56bp,是典型的真菌内含子长度(49~85bp)。每个内含子剪切位点序列为5'GT...AG-3'(图7)。

### 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的方法<sup>[8]</sup>,靠近5'端设计3条反向引物Lcc1-SP1、Lcc1-SP2、Lcc1-SP3,以红平菇HP1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Lcc1-SP1、Lcc1-SP2、Lcc1-SP3获得了较长的PCR产物(图8)。对第3轮PCR中的Lcc1-SP3、AP3引物产物进行回收测序,获得了总长度1500bp的序列信息,分析发现该序列包括漆酶基因5'末端及其上游。

利用Biological Services网站的Sequence Analysis对克隆得到的Pd-lac启动子序列进行分析。在Pd-lac启动子序列中,具有真核生物典型的启动子基本转录调控元件,Pd-lac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,1个CAAT框,位于第-105位;2个热击元件(CreA)(SYGGRG),分别位于-78、-396位;2个AP2元件,分别位于第-164、-566位;1个潜在的热击响应元件(HSEs)(TC-NNGAAN),位于第-660位;2个潜在的压力响应元件(STRE)(CCCCT/AGGGG),分别位于第-157、-866位;4个金属应答元件(MRE)(TGCRCNG),分别位于第-381、-466、-803、-928位;1个异生物质反应元件(XRE)(CAGCGW),位于第-687位;以及4个氮因子结合位点(GATA)或其互补序列(TATC),分别位于第-299、-356、-708、-983位;1个NIT2元件,位于第-418位;1个热击元件(CreA)(SYGGRG),位于-396位<sup>[9-10]</sup>(图7)。





a、b、c分别为第1、2、3轮PCR扩增结果；M—DNA marker DL2000；1—4—启动子DNA片段

图8 红平菇HP1漆酶Genomic DNA全长5'启动子

### 2.5 红平菇 HPI 漆酶基因的系统进化分析

从150个菌株中选取34个相关性菌株,与 *Pleurotus djamor* 按照UPGMA聚类法进行系统进化树分析。从图9可以看出,35个菌株分为3大类群,其中1类是16个菌株聚成第1个大类群,为多孔菌(Polyporales);2类是16个菌株聚成

第2个大类群,为伞菌(Agaricales);3类是3个菌株聚成第3个大类群,为子囊菌(Ascomycota)。红平菇漆酶cDNA基因属于伞菌,与 *Pleurotus salmoneostramineus* 遗传距离最近,同源性为97%。从系统进化树可以看出,同一菌株漆酶cDNA基因的同工酶遗传距离也具有差异,如 *Lenzites gibbosa* 等。

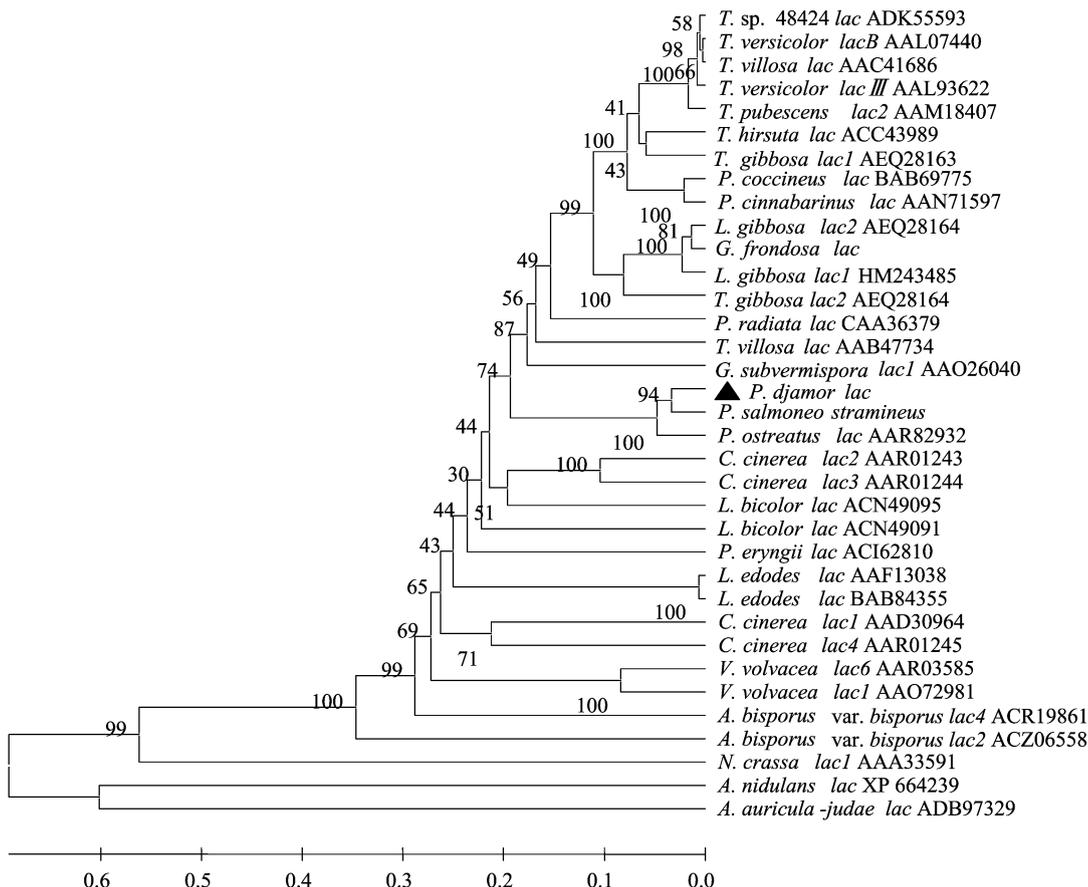


图9 Pd-lac基因的系统进化树分析

### 3 结论与讨论

红平菇漆酶5'端调控区域具有真核生物典型的启动子转录元件,CAAT-box、TATA-box、GC-box还具有金属离子效应位点(MRE),MRE对金属硫蛋白基因响应重金属离子的诱导起着至关重要的作用。另外,还分布有2个潜在的压力响应元件(STRE)和1个潜在的热激响应元件(HSEs),

HSEs通过感受外界热刺激,进而激活金属硫蛋白基因的转录,因而STRE、HSEs可能会共同响应高浓度Cu<sup>2+</sup>的压力而激活红平菇漆酶基因的转录<sup>[2]</sup>。红平菇漆酶5'启动子的克隆,为漆酶表达调控机制的研究奠定了基础。红平菇漆酶5'启动子属于可诱导型启动子,这为构建红平菇诱导型表达载体提供了理论基础。

本研究利用RT-PCR、RACE技术在红平菇菌株中克隆

张晓波,许沛东,赵艳. 野牛草基因组 DNA 提取方法的筛选[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):26-28.

# 野牛草基因组 DNA 提取方法的筛选

张晓波,许沛东,赵艳

(海南大学农学院,海南海口 570228)

**摘要:**采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、十二烷基磺酸钠(SDS)法以及高盐法3种方法对野牛草叶片的基因组DNA进行提取,并利用分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测比较3种方法提取DNA的纯度与浓度。结果表明,3种方法提取到的野牛草叶片DNA的纯度、完整性都较好,质量从高到低依次为CTAB法>高盐法>SDS法,产率依次为SDS法>CTAB法>高盐法,综合来看CTAB法是提取野牛草基因组DNA的最佳方法。

**关键词:**野牛草;DNA提取;CTAB法;SDS法;高盐法

**中图分类号:** S688.403 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0026-03

野牛草是广泛种植于我国西北、华北及东北地区的暖季型草坪草,在20世纪50年代初由中科院胡淑良先生从美国引进<sup>[1-2]</sup>。野牛草耐旱性强,在年降水量300~600mm的干旱、半干旱地区也可以正常生长,在持续干旱2~3个月的夏季生长状况依旧良好。野牛草喜pH值为6.1~8.0的黏质土壤,但在高原丘陵瘠薄土壤上也可顽强生长;野牛草具有较强的耐寒性,在我国北方大部分地区都可越冬,甚至在西北、东北的寒冷地带-39℃的低温条件下也可以正常越冬<sup>[3-6]</sup>。由于野牛草良好的抗逆性,应用广泛,对其研究也越来越多,但主要集中在品种选育<sup>[7-9]</sup>和抗逆性<sup>[3,10-12]</sup>的研究方面,而对野牛草基因组DNA的研究相对较少。然而,对于我国这个水资源平均占有量不足世界平均水平1/4,被联合国列入世

界13个贫水国之一的国家来说<sup>[13]</sup>,收集优质草坪种质材料,对其生物学特征及遗传多样性进行分析鉴定研究,筛选具有观赏价值和节水环保作用的草坪品种,有着广泛的应用前景和现实意义的。关于植物基因组DNA提取方法,国内外都有一定的研究,包括高粱等作物<sup>[14]</sup>、红掌等花卉<sup>[15]</sup>以及狗牙根等草坪草<sup>[16-17]</sup>。本试验结合国内外相关研究,参考Staub等的研究方法<sup>[18-20]</sup>,针对野牛草的特性,如叶片纤维含量高,具有绒毛、韧性高的特点,对适合基因组DNA提取的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法、十二烷基磺酸钠(SDS)法、高盐法3种方法进行比较,筛选出最佳方法。旨在为野牛草未来的遗传多样性研究提供一定的参考,同时也为适应我国城市化以及西部生态环境建设的需要,培育适合我国国情的环保型耐旱草坪植物奠定一定的基础。

收稿日期:2013-11-11

基金项目:海南大学青年基金(编号:qjij1149)。

作者简介:张晓波(1978—),男,山西岢岚人,博士,副教授,主要从事草坪管理相关研究。E-mail:angiaoo@126.com。

通信作者:赵艳。E-mail:yanbo315@126.com。

1个漆酶cDNA全长基因和基因组DNA全长序列,这对于今后研究漆酶基因的同源表达、异源表达及蛋白质的纯化奠定了基础。利用SEFA-PCR技术在红平菇菌株中克隆1个漆酶5'启动子序列,这对于今后研究红平菇漆酶的表达调控具有十分重要的意义。

## 参考文献:

- [1] Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2): 215-242.
- [2] Faraco V, Giardina P, Sanna 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]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(13): 3826-3830.
- [4] Soden D M, Dobson A. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju* [J]. Microbiology, 2008, 147(8):

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为中国农业科学院畜牧研究所培育的野牛草品种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, 2010, 96(1): 26-35.
- [6] Marzluf G A. Genetic regulation of *Nitrogen metabolism* in the fungi [J]. Microbiological Reviews, 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 Y G, Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. Biotechniques, 2007, 43(5): 649-650.
- [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]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 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.