

# 铜离子对黑木耳漆酶活性及其基因转录水平的影响

米昊雨, 耿楠楠, 杜鹏禹, 刘增才\*, 邹莉\*

东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

**摘要:** 以黑木耳“黑厚圆”为研究对象, 探究铜离子对黑木耳漆酶活性及漆酶基因转录表达的影响。结果表明, 铜离子浓度在 100–700  $\mu\text{mol/L}$  范围内, 黑木耳的胞外漆酶活性随着浓度的增加显著提高; 同时, 铜离子浓度显著影响漆酶基因的转录水平, 其中 *AhLac1*、*AhLac3*、*AhLac6* 基因转录水平随铜离子浓度增加显著上调, *AhLac2*、*AhLac4* 和 *AhLac5* 基因表达量在 500  $\mu\text{mol/L}$  时达到最高值, 分别上调了 3.38、1.29 和 1.59 倍。不同诱导时间下, *AhLac1*、*AhLac3* 和 *AhLac6* 基因转录水平随诱导时间延长呈现不同程度的上调趋势。进一步的相关性分析显示, 漆酶活性与 *AhLac1*、*AhLac3*、*AhLac6* 基因的转录水平之间存在正相关关系。研究结果为提高黑木耳产量及漆酶基因的分子调控机制研究提供科学依据。

**关键词:** 黑木耳; 铜离子; 漆酶活性; 转录表达

## [引用本文]

米昊雨, 耿楠楠, 杜鹏禹, 刘增才, 邹莉, 2025. 铜离子对黑木耳漆酶活性及其基因转录水平的影响. 菌物学报, 44(4): 240271

Mi HY, Geng NN, Du PY, Liu ZC, Zou L, 2025. Effects of copper ions on the laccase activities and gene transcription level of *Auricularia heimuer*. Mycosystema, 44(4): 240271

## Effects of copper ions on the laccase activities and gene transcription level of *Auricularia heimuer*

MI Haoyu, GENG Nannan, DU Pengyu, LIU Zengcai\*, ZOU Li\*

School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

**Abstract:** The effect of copper ions on laccase activity and transcriptional expression of laccase genes in *Auricularia heimuer* “Hei Hou Yuan” is investigated. The results show that as the copper

资助项目: 山东省重点研发计划(2024LZGCQY018)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shandong Province (2024LZGCQY018).

\*Corresponding authors. E-mail: LIU Zengcai, 1758458181@qq.com; ZOU Li, 13903650896@163.com

Received: 2024-09-26; Accepted: 2024-12-03

ion concentration increases from 100 to 700  $\mu\text{mol/L}$ , extracellular laccase activity in *A. heimuer* increases significantly. Copper ion concentration strongly influences the transcriptional levels of laccase genes. Specifically, the transcription levels of *AhLac1*, *AhLac3*, and *AhLac6* are significantly upregulated as the copper ion concentration rises. The expression levels of *AhLac2*, *AhLac4*, and *AhLac5* peak at 500  $\mu\text{mol/L}$ , and increase by 3.38-, 1.29-, and 1.59-fold, respectively. Under different induction times, the transcription levels of *AhLac1*, *AhLac3*, and *AhLac6* show varied degrees of upregulation with the extension of induction period. Correlation analysis further reveals a positive relationship between laccase activity and the transcriptional levels of *AhLac1*, *AhLac3*, and *AhLac6*. This study provides a scientific basis for improving the yield of *A. heimuer* and investigating the molecular regulatory mechanisms underlying laccase gene expression.

**Keywords:** *Auricularia heimuer*; copper ion; laccase activity; transcription level

黑木耳 *Auricularia heimuer* F. Wu, B.K. Cui & Y.C. Dai 隶属于担子菌门 Basidiomycota、蘑菇纲 Agaricomycetes、木耳目 Auriculariales、木耳科 Auriculariaceae (吴芳和戴玉成 2015; 戴玉成等 2021; Wu *et al.* 2021), 又称光木耳、云耳等, 是我国食用菌主栽品种之一。黑木耳质地滑嫩, 味道鲜美, 被誉为“素中之荤”, 具有极高的营养和药用价值(戴玉成和杨祝良 2008; 潘年港等 2023; 沈若茗等 2024), 深受消费者喜爱。

作为一种典型的木腐菌, 黑木耳能够分泌多种木质素降解酶分解栽培基质中的木质素(Galic *et al.* 2020), 为菌丝生长过程中物质的合成提供营养(孙健 2022; 杨迪 2023)。在黑木耳分泌的多种木质素降解酶中, 漆酶发挥着关键作用。漆酶是一种含铜的多酚氧化酶, 与植物的抗坏血酸氧化酶和哺乳动物的血浆铜蓝蛋白同属蓝色多铜氧化酶家族(司静等 2011c; Zheng *et al.* 2016; Ma *et al.* 2018)。漆酶在自然界中广泛分布于植物、真菌、少数昆虫和细菌中, 一些动物肾脏(如猪肾)和血清中也发现了漆酶。微生物漆酶是自然界中漆酶的主要来源, 按其来源可分为真菌漆酶和细菌漆酶(吴怡等 2019)。其中真菌漆酶, 尤其是白腐真菌漆酶在木质素降解中起重要作用, 因此引起了科

学家们的广泛关注(司静等 2011a, 2011b; Si *et al.* 2013; 安琪等 2015; 曹永佳等 2021; 王豪等 2021)。近年来, 漆酶在多个领域具有广泛应用, 包括纸浆造纸、生物合成、食品、能源、木材加工、环保、改善纤维特性和生物检测等(吴怡等 2020; Si *et al.* 2021a)。同时, 漆酶还参与菌体色素合成、孢子产生等生物过程。基于其重要的应用价值, 漆酶日益受到重视(Zheng *et al.* 2017; Si *et al.* 2021b; 唐禄鑫等 2023; Wang *et al.* 2024), 而漆酶活性的高低对食用菌栽培基质中木质素的降解和子实体的品质也有重要影响(潘年港等 2023; 杨迪 2023)。

漆酶的合成、分泌和活性受到多种条件如金属离子、芳香族化合物等的影响。韩增华等(2012)对黑木耳漆酶粗酶液进行分离, 并得到一纯化成分 LacC, 发现  $\text{Ag}^+$  对漆酶 LacC 有激活作用, 而  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  则有抑制作用。同时, 真菌同一菌株中存在动力学、理化特性各异多个漆酶同工酶, 且在不同条件下漆酶同工酶及其基因的表达表现出选择性诱导效应。愈创木酚能够不同程度地诱导斑玉蕈 3 个漆酶同工酶基因转录水平的表达, 但差异很大(张津京等 2016)。1 mmol/L 的  $\text{Cu}^{2+}$  对盘长孢状刺盘孢 *Colletotrichum gloeosporioides* 漆酶约 3/4 的基因家族成员促进表达, 对 *Cglac3* 调控没有影

响,对 *Cglac12* 和 *Cglac13* 抑制表达(董玲玲等 2022)。在影响漆酶活性与分泌的多种因素中,金属离子不仅可以增加漆酶同工酶基因的表达量,还可以提高其活性。特别是铜离子,不仅作为漆酶活性和基因转录的强效诱导剂,而且在含铜酶中形成金属活性位点方面发挥着至关重要的作用(Collins & Dobson 1997)。外源添加一定浓度的铜离子能够有效地提高糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus*、刺芹侧耳 *Pleurotus eryngii* 漆酶活性及漆酶基因的转录水平(Palmieri *et al.* 2000; Sharghi *et al.* 2024)。虽然已有研究表明铜离子能够提高黑木耳漆酶活性(肖楚 2012),但在分子水平上关于铜离子调控漆酶基因转录表达的研究尚未见报道。

本实验室前期在黑木耳中发现漆酶基因家族成员有 6 个,因此,本研究以黑木耳“黑厚圆”为实验材料,探究外源铜离子作用下,黑木耳漆酶活性和漆酶基因转录水平的变化情况,并分析漆酶活性与基因转录水平的相关性,以期为提高黑木耳产量和深入研究漆酶基因的分子调控机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

采用的黑木耳菌株为“黑厚圆”,保藏于东北林业大学森林保护学科实验室。

#### 1.1.2 试剂

TRNzol Universal 总 RNA 提取试剂购于天根生化公司,荧光定量反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)购于 TaKaRa 公司,2,2'-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), ABTS]购自 Solarbio 公司,葡萄糖、琼脂、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 均为国产分析纯。

#### 1.1.3 培养基

PDA 培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖

20 g,琼脂 18 g,定容至 1 000 mL,pH 自然。

PDB 液体培养基:去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,定容至 1 000 mL。

上述培养基均通过 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min,备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌种培养

用无菌接种钩挑取菌丝体接种于 PDA 固体培养基中央,25 °C 避光培养至菌丝长满平板,用直径为 5 mm 的打孔器在菌落边缘打出菌饼,备用。无菌条件下,向装有 100 mL PDB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中接种 12 个同步生长的黑木耳菌饼,置于 25 °C、150 r/min 的恒温摇床培养。培养 4 d 后加入 CuSO<sub>4</sub> 母液(0.1 mol/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 经 0.22 μm 水系滤膜过滤除菌),使培养基中铜离子终浓度分别为 0、100、300、500、700 μmol/L,每个处理 3 个重复。在诱导第 7 天时,收集发酵液和菌丝体,用于漆酶活性、菌丝体生物量测定和荧光定量分析。

根据漆酶活性、菌丝体生物量及漆酶基因转录水平确定铜离子最适添加浓度,在液体摇瓶培养 4 d 后添加铜离子至最适浓度,同时设置未添加铜离子的空白对照组,每个处理 3 个重复。分别在诱导第 2、4、6、8 和 10 天时收集发酵液和菌丝体,用于酶活和荧光定量分析。

#### 1.2.2 菌丝生物量测定

将液体培养基用 4 层纱布过滤,收集菌丝体,经无菌水洗涤 3 次后,80 °C 烘干至恒重,称量得到的菌丝体干重即为菌丝生物量(马银鹏等 2023)。

#### 1.2.3 漆酶活性测定

取 2 mL 发酵液,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为粗酶液。酶活性测定参考肖楚(2012)的方法,反应体系为 0.1 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5) 2.7 mL、0.5 mol/L ABTS 溶液 0.2 mL 和粗酶液 0.1 mL。在 25 °C 下反应 3 min 后,迅速置于冰上终止反应,并利用酶标

仪在 420 nm 处测定吸光度。1 min 内氧化 1 μmol ABTS 所需的酶量即为一个酶活力单位(U)。以煮沸灭活的粗酶液作为对照，每个样品设置 3 个重复。

1.2.4 漆酶基因转录水平检测

利用 TRIzol 法提取菌丝体总 RNA，通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量，根据荧光定量反转录试剂盒步骤，去除基因组 DNA，并将总 RNA 反转录 cDNA，cDNA 置于-20 °C保存备用。使用 Primer Premier 5.0 设计荧光定量 PCR 引物(表 1)，设计时参考转录组(PRJNA1180765)中黑木耳漆酶基因序列。内参基因选择黑木耳 *β-actin* 基因，以合成的 cDNA 为模板，对黑木耳漆酶基因进行转录表达水平分析。荧光定量 PCR (qRT-PCR)反应体系及程序参考孙健(2022)的报道。以 2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算基因相对表达量，每个处理重复 3 次。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

| Table 1 Primers for qRT-PCR |                                |
|-----------------------------|--------------------------------|
| 基因名称                        | 引物序列                           |
| Gene                        | Primer sequence (5'→3')        |
| AhLac1                      | Forward: ATGGACGTTGACTGGGGATA  |
|                             | Reverse: CCGTGAAGATGAATGGGATG  |
| AhLac2                      | Forward: ACCTCCAGATAACCAACACCA |
|                             | Reverse: TCCGTGCCAATGAATGCT    |
| AhLac3                      | Forward: TTGAGCGTGCAGCTTATTG   |
|                             | Reverse: CAGATACCCGAGTCGTCCTT  |
| AhLac4                      | Forward: CGCCTGGGCAGACTTTTAC   |
|                             | Reverse: AGCTTCGGGAATGTTGTGA   |
| AhLac5                      | Forward: TGGACCTGCGGATGTAACGA  |
|                             | Reverse: CGACGATGCTGCCATTCTTG  |
| AhLac6                      | Forward: CGGCAATAGCACCTGGAA    |
|                             | Reverse: CAAATGAATCGGGTGAGC    |
| β-Actin                     | Forward: GCCCTCGTTCCTTGGTCTTG  |
|                             | Reverse: GTGCTCAACGACGCCAGGAT  |

1.3 数据处理和分析

采用 SPSS 27.0 进行统计数据的方差分析和显著性检验，使用 GraphPad Prism 9.5 进行柱形图的绘制，根据皮尔逊相关系数(Pearson correlation

coefficient)对测定数据进行双变量相关性分析，利用 Origin 绘制相关性热图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度铜离子处理对黑木耳菌丝体生物量、漆酶活性及基因转录水平的影响

2.1.1 对黑木耳菌丝体生物量的影响

为了研究不同浓度铜离子对黑木耳菌丝体生物量的影响，收集铜离子诱导后的黑木耳菌丝体，并测量其菌丝体干重(图 1)。结果表明，随着铜离子浓度的增加，菌丝体生物量先保持稳定后降低，且在 300 μmol/L 和 500 μmol/L 浓度下，生物量均高于对照组，但与对照并无显著差异，超过 500 μmol/L，菌丝体生物量显著下降。

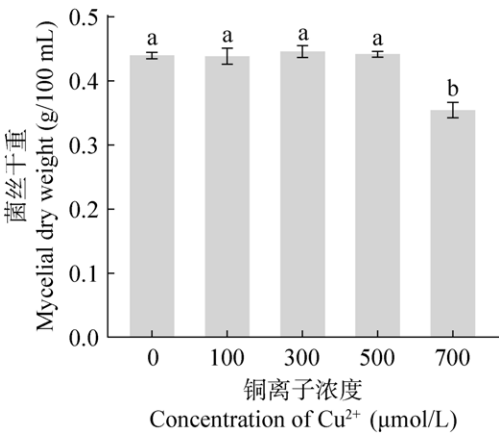


图 1 不同诱导浓度铜离子对黑木耳菌丝体生物量的影响 不同小写字母表示差异显著(P<0.05). 下同 Fig. 1 Effects of different concentrations of copper ions on the mycelial biomass of Auricularia heimuer. Different lowercase letters indicate significant differences (P<0.05). The same below.

2.1.2 对黑木耳漆酶活性的影响

对不同浓度铜离子诱导下黑木耳漆酶活性进行测定(图 2)，结果表明，未添加铜离子时，漆酶活性为(2.18±0.08) U/L，随着铜离子浓度的增加，漆酶活性呈现上升趋势，在 500 μmol/L 浓度下，活性升高趋势最为明显，达到(16.66±

0.38) U/L, 为对照组的 7.6 倍; 当铜离子浓度增至 700  $\mu\text{mol/L}$  时, 漆酶活性达到最高值。由此可知 500  $\mu\text{mol/L}$  和 700  $\mu\text{mol/L}$  对黑木耳漆酶活性诱导效果较好。

### 2.1.3 对黑木耳漆酶基因转录水平的影响

为进一步探究黑木耳漆酶基因对不同浓度铜离子的响应情况, 采用 qRT-PCR 技术测定不同浓度铜离子处理下黑木耳漆酶基因的转录水平(图 3)。结果表明, 铜离子对黑木耳漆酶基因转录均有显著影响, 其中 *AhLac1*、*AhLac3* 和 *AhLac6* 的转录水平随着铜离子浓度的增加呈现上升趋势(图 3A, 3C, 3F), 在铜离子浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$  和 700  $\mu\text{mol/L}$  处理下均具有显著的

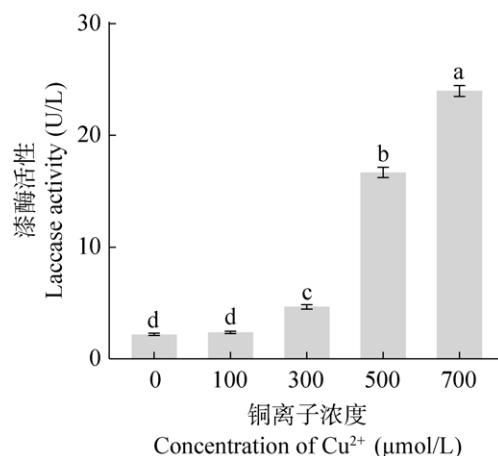


图 2 不同诱导浓度铜离子对黑木耳漆酶活性的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of copper ions on the laccase activities of *Auricularia heimuer*.

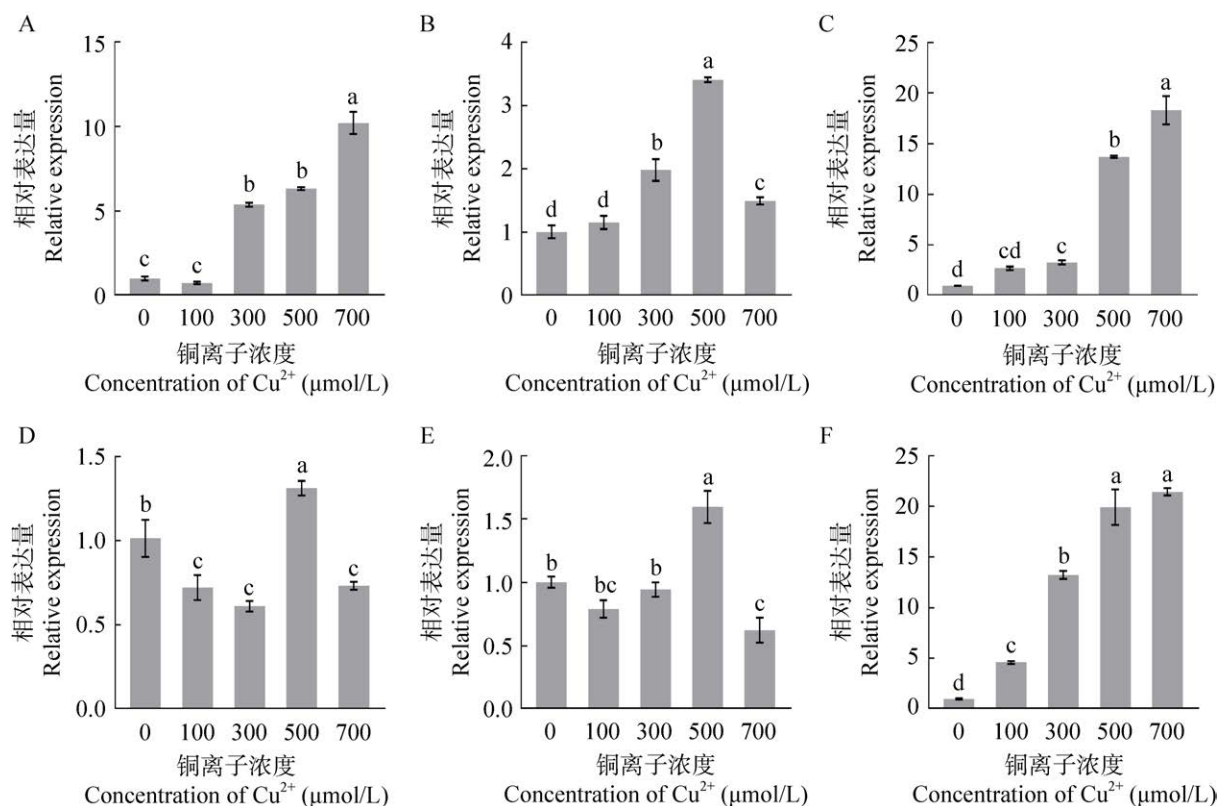


图3 不同诱导浓度铜离子对黑木耳漆酶基因转录水平的影响 A: *AhLac1* 基因表达量; B: *AhLac2* 基因表达量; C: *AhLac3* 基因表达量; D: *AhLac4* 基因表达量; E: *AhLac5* 基因表达量; F: *AhLac6* 基因表达量

Fig. 3 Effects of different concentration of copper ions on the transcription levels of laccase genes in *Auricularia heimuer*. A: *AhLac1* gene expression level; B: *AhLac2* gene expression level; C: *AhLac3* gene expression level; D: *AhLac4* gene expression level; E: *AhLac5* gene expression level; F: *AhLac6* gene expression level.

上调趋势,说明铜离子对 *AhLac1*、*AhLac3* 和 *AhLac6* 的转录表达的影响是浓度依赖型的。*AhLac2* (图 3B)和 *AhLac5* (图 3E)基因的转录水平呈现先上升后下降的趋势, *AhLac4* 基因(图 3D)表达则为先下降后上升随后又下降的趋势。*AhLac2*、*AhLac4* 和 *AhLac5* 基因转录水平均在铜离子浓度为 500  $\mu\text{mol/L}$  达到最高值,分别上调了 3.38、1.29、1.59 倍,但在 700  $\mu\text{mol/L}$  时有所下降,表明这些基因的表达在高浓度下存在抑制效应。同时,6 个漆酶基因的转录水平均在 500  $\mu\text{mol/L}$  铜离子诱导下显著提高,表明该浓度为促进漆酶基因表达的关键浓度。

## 2.2 不同诱导时间铜离子对黑木耳漆酶活性及基因转录水平的影响

### 2.2.1 对黑木耳漆酶活性的影响

选择 500  $\mu\text{mol/L}$  作为最适诱导浓度,进一步研究不同诱导时间对黑木耳漆酶活性的影响(图 4)。未添加铜离子时,漆酶活性呈现先上升后下降的趋势。添加铜离子后,漆酶活性在诱导前期(第 2–4 天)缓慢上升,随后第 6–10 天迅速上升,在第 8 天时漆酶活性为 13.22 U/L,为对照的 3.6 倍,并在第 10 天达到最高值,酶活为  $(24.1 \pm 0.41)$  U/L,是对照组的 12.3 倍,此时对照组漆酶活性已下降,由此可知铜离子对于漆酶活性有较好的诱导效应。

### 2.2.2 对黑木耳漆酶基因转录水平的影响

进一步探究黑木耳漆酶基因对铜离子不同诱导时间的响应情况,采用 qRT-PCR 技术检测添加 500  $\mu\text{mol/L}$  铜离子诱导下,不同时间点黑木耳漆酶基因的转录水平变化(图 5)。结果表明,添加铜离子后, *AhLac3* 和 *AhLac6* 基因随着诱导时间增加基因表达量逐渐增加,并在诱导后期(第 10 天)上调显著,分别上调了 13.8 倍(图 5C)和 59.1 倍(图 5F)。*AhLac1* 基因在诱导第 10 天时也达到最大值,上调了 11.3 倍(图 5A),但 *AhLac1* 基因表达水平随诱导时间的增加先上

升后下降,再上升。*AhLac2* 和 *AhLac5* 基因表达水平随时间增加先下调后上调,均在第 10 天达到最大,分别上调了 1.35 倍(图 5B)和 3.9 倍(图 5E)。*AhLac4* 基因表达则存在不同程度的下调(图 5D)。以上结果说明,除了 *AhLac4* 基因外,5 个漆酶基因均在诱导第 10 天达到最大,说明铜离子诱导时间对黑木耳不同漆酶同工酶基因的转录水平影响很大。

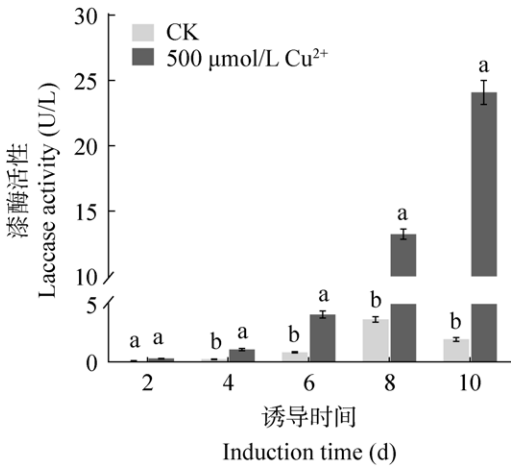


图 4 不同诱导时间铜离子对黑木耳漆酶活性的影响

Fig. 4 Effects of different induction time of copper ions on the laccase activities of *Auricularia heimuer*.

## 2.3 相关性分析

### 2.3.1 不同浓度铜离子诱导下黑木耳漆酶活性和基因转录水平的相关性

利用皮尔逊相关系数进一步分析漆酶活性、铜离子浓度与基因转录水平之间的相关性(图 6)。漆酶活性与铜离子浓度之间呈现显著正相关性( $P < 0.05$ ),相关系数达 0.96;漆酶活性与 *AhLac1* 和 *AhLac6* 基因转录水平呈现显著正相关( $P < 0.05$ ),相关系数分别为 0.92 和 0.90。漆酶活性与 *AhLac3* 基因转录水平极显著正相关( $P < 0.001$ ),相关系数为 1.0。由此说明漆酶活性的升高与 *AhLac1*、*AhLac3* 和 *AhLac6* 基因转录水平密切相关。漆酶活性与 *AhLac2*、*AhLac4* 和 *AhLac5* 基因转录水平相关性弱,分别为 0.43、

0.21 和 0.04。

### 2.3.2 铜离子不同诱导时间下黑木耳漆酶活性和基因转录水平的相关性

铜离子不同诱导时间下漆酶活性与基因转录水平之间的相关性(图 7)分析结果显示,漆酶活性与 *AhLac3* 基因转录水平显著正相关 ( $P<0.05$ ), 相关系数为 0.94。漆酶活性与

*AhLac6* 基因转录水平高度正相关( $P<0.01$ ), 相关系数为 0.96; 漆酶活性与 *AhLac1* 基因转录水平有一定正相关性, 相关系数为 0.75; *AhLac5* 基因的转录水平与漆酶活性相关系数为 0.89, 但其基因转录水平存在下调情况; 漆酶活性与 *AhLac4* 基因转录水平之间存在一定负相关性, 相关系数为-0.41。

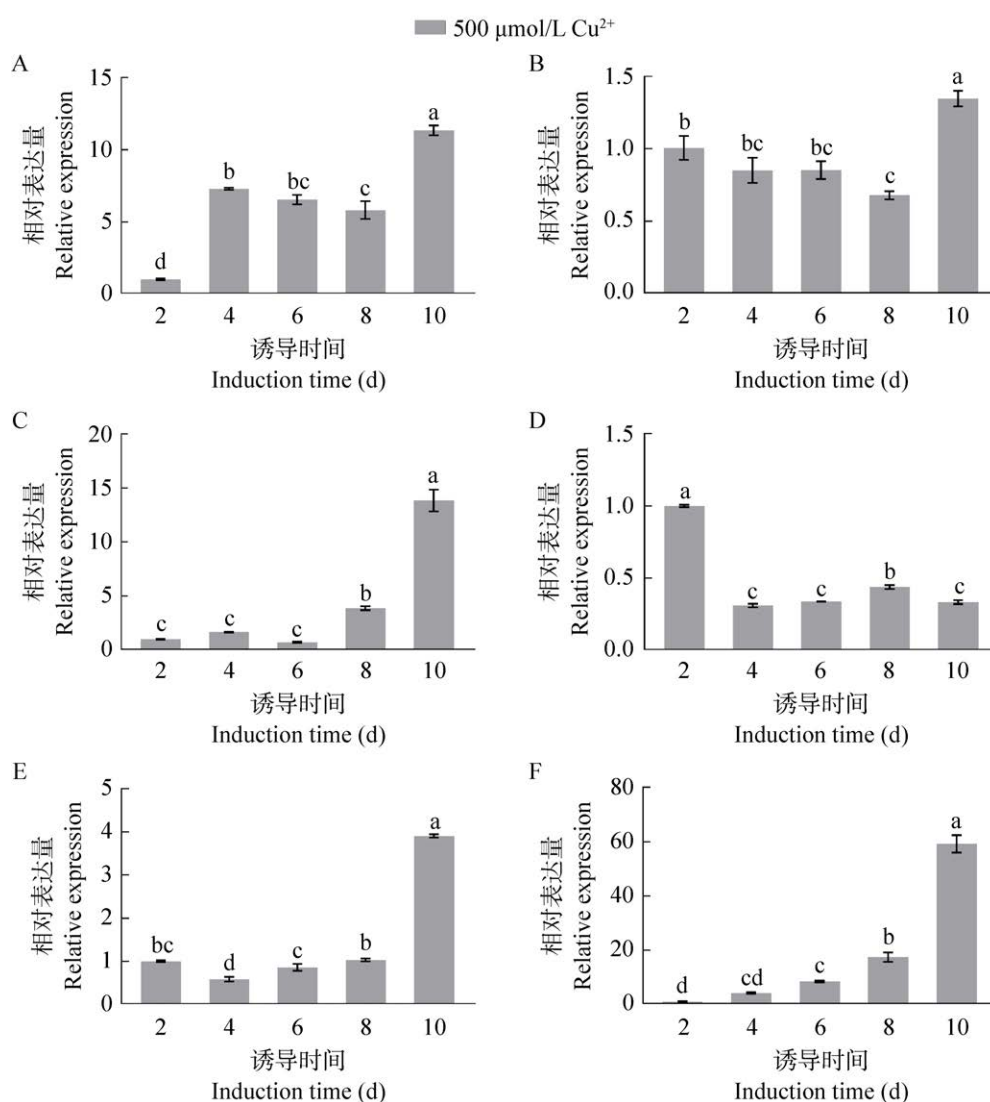


图 5 不同诱导时间下铜离子对黑木耳漆酶基因转录水平的影响 A: *AhLac1* 基因表达量; B: *AhLac2* 基因表达量; C: *AhLac3* 基因表达量; D: *AhLac4* 基因表达量; E: *AhLac5* 基因表达量; F: *AhLac6* 基因表达量

Fig. 5 Effects of different induction times of copper ions on the transcription levels of laccase genes in *Auricularia heimuer*. A: *AhLac1* gene expression level; B: *AhLac2* gene expression level; C: *AhLac3* gene expression level; D: *AhLac4* gene expression level; E: *AhLac5* gene expression level; F: *AhLac6* gene expression level.



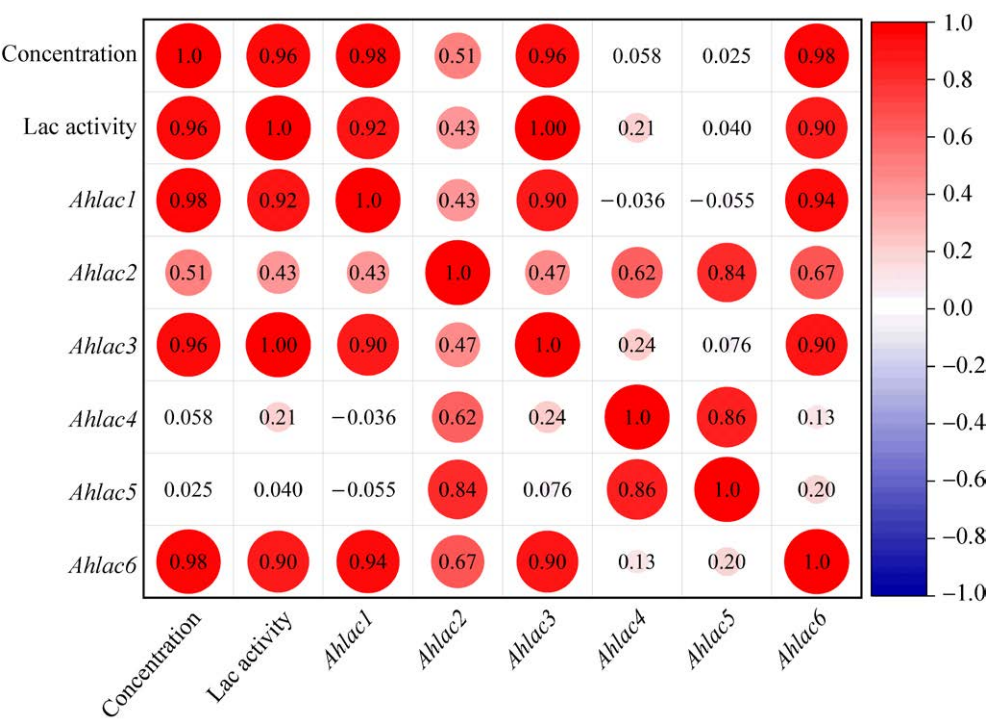


图 6 漆酶活性、铜离子浓度与基因转录水平之间的相关系数热图

Fig. 6 Heatmap of the correlation coefficients between laccase activities, concentrations of copper ion, and gene transcription levels.

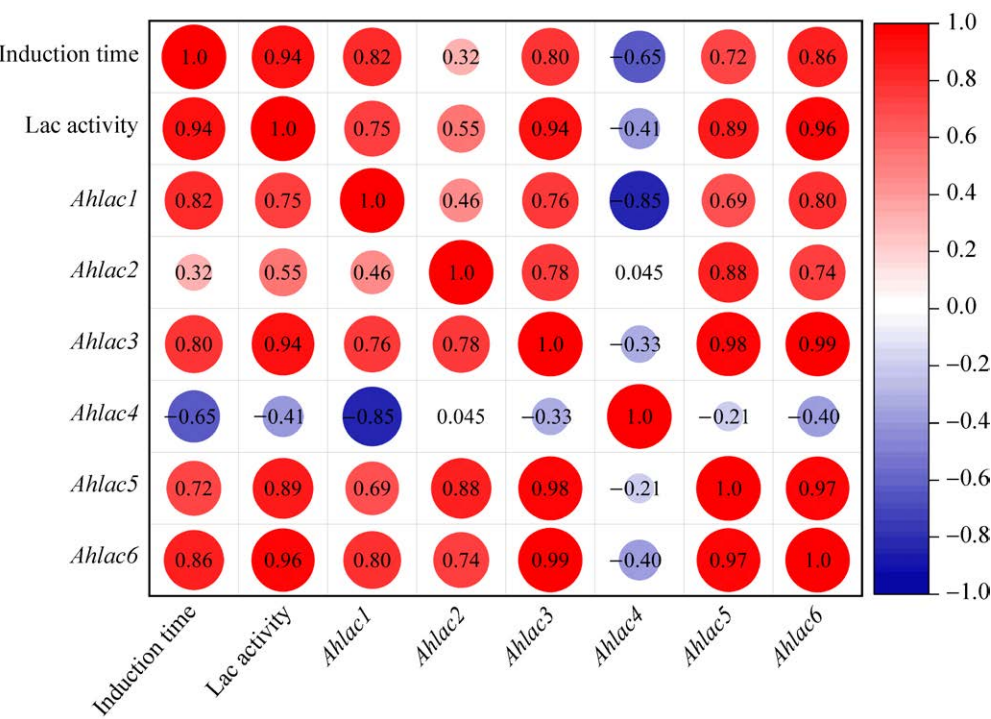


图 7 不同诱导时间下漆酶活性与基因转录水平之间的相关系数热图

Fig. 7 Heatmap of the correlation coefficients between laccase activities and gene transcription levels under different induction time.



### 3 讨论

近年来,对于黑木耳漆酶的研究主要集中在生理生化和酶学性质层面(肖楚 2012),而在分子生物学层面,针对漆酶基因转录水平的研究相对较少。漆酶是一种诱导型氧化酶,缺乏对黑木耳中漆酶基因诱导和表达的基础生物学知识,限制了我们对黑木耳漆酶进一步开发和应用。漆酶活性及表达受到多种因素的影响,包括金属离子、碳氮源、酚类化合物及芳香化合物等(陈带娣等 2013)。其中,铜离子作为漆酶活性中心的组成部分,能够直接参与漆酶的催化反应,从而提高漆酶的活性和产量(余卓 2021),其在提高漆酶活性方面具有独特且关键的作用。本研究通过外源添加铜离子,分析了其对黑木耳漆酶活性及漆酶基因转录水平的影响。不同浓度铜离子处理下黑木耳漆酶活性测定结果表明,当铜离子浓度在 100–700  $\mu\text{mol/L}$  时,黑木耳漆酶活性呈现持续上升趋势,这种诱导现象与阿魏侧耳 *Pleurotus ferulae* (赵丽婷 2017)、毡毛栓孔菌 *Trametes velutina* (Yang *et al.* 2013)、云芝栓孔菌 *Trametes versicolor* (Jawale *et al.* 2023)中的研究结果一致,但与刺芹侧耳 *Pleurotus eryngii* (Sharghi *et al.* 2024)、灵芝 *Ganoderma lingzhi* (Manavalan *et al.* 2013)中低浓度促进、高浓度抑制的特点存在差异。这表明,铜离子对不同种类真菌漆酶活性的影响存在差异。此外,在最适诱导浓度下,随着诱导时间延长漆酶活性显著提高,进一步证明铜离子对漆酶活性有良好的诱导效应。铜离子对黑木耳菌丝体生物量的影响随着浓度的增加,先保持无显著差异,随后降低。这一现象与糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* (Zhu *et al.* 2016)和刺芹侧耳 *Pleurotus eryngii* (Sharghi *et al.* 2024)中铜离子浓度对生物量的影响趋势相似,在低浓度时,铜离子可能促进菌丝体的生长,因为铜离

子作为酶的辅因子,有助于提高细胞的代谢活性(冯焯等 2020)。但随着浓度升高,生物量出现下降趋势,说明黑木耳对金属离子的结合和利用能力有限,从而导致其对不同浓度铜离子的响应存在差异。

漆酶的表达受多种外界条件和因素的影响。多数情况下,这些因素首先导致同工酶在基因转录水平上发生变化,从而在蛋白质水平影响不同漆酶的结构和性质。适量的铜离子可以作为漆酶的底物,诱导漆酶基因的转录和蛋白合成。Yang *et al.* (2013)研究表明,铜离子能够上调毡毛栓孔菌 *Trametes velutina* 的漆酶基因转录水平,从而提高其漆酶活性。实时荧光定量结果显示,不同浓度铜离子对黑木耳 6 个同工酶基因表达的调控存在差异,铜离子在不同程度上提高了黑木耳漆酶基因 *AhLac1*、*AhLac3* 和 *AhLac6* 转录水平,且 *AhLac1*、*AhLac3* 和 *AhLac6* 转录水平对铜离子浓度的响应趋势一致,推测这 3 个基因是漆酶活性升高的主要贡献者。但 *AhLac2*、*AhLac4* 和 *AhLac5* 基因转录水平对于铜离子浓度不存在明显的响应趋势。相似的情况出现在灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 中,其漆酶基因 *BcLCC2* 表达水平对不同浓度的铜离子的影响响应一致,而 *BcLCC1* 和 *BcLCC3* 基因则表现出不一致的响应(Buddhika *et al.* 2021)。盘长孢状刺盘孢 *Colletotrichum gloeosporioides* 中,1 mmol/L 的  $\text{Cu}^{2+}$  对约 3/4 的漆酶基因家族成员促进表达,但对 *Cglac3* 调控没有影响,并抑制 *Cglac12* 和 *Cglac13* 的表达(董玲玲等 2022)。大斑病凸脐蠕孢 *Exserohilum turcicum* 的 3 个漆酶基因 *Stlac1*、*Stlac3* 和 *Stlac5* 能被 0.03% ( $\phi$ ) 白藜芦醇诱导上调表达,*Stlac1* 的表达却被抑制(曹可等 2015)。铜离子诱导不同时间,5 个黑木耳漆酶基因转录水平平均在第 10 天达到最大,但 *AhLac4* 基因则存在持续下调现象。不同处理时间对灵芝漆酶同工酶基因

转录表达水平也存在不同的影响(胡楚霄等 2019),铁、锰、铬等其他金属离子只诱导白腐菌部分漆酶基因转录水平上调(卓睿 2015)。综上所述可知,同一外源物对真菌漆酶基因家族成员的调控存在差异。这可能是由于不同的漆酶同工酶基因虽然具有较高铜离子结合位点的保守性,但因其氨基酸序列相似性低,使得漆酶的空间构象差异大。当外源物充当底物选择与漆酶活性中心(Gomaa & Momtaz 2015)、周边酸性氨基酸残基  $\omega$ -羧基阴离子(Shi *et al.* 2016)以及咪唑基配位体(Gomaa & Momtaz 2015; 付林俊等 2019)结合时,会促进或抑制漆酶的活性,从而反馈性地影响上游漆酶基因家族成员的表达。同时,诱导过程中部分黑木耳漆酶基因转录水平和酶活性变化情况存在不一致,推测是转录后蛋白调控所致。

据报道, *Laccase2* 是小麦全蚀病菌中的铜诱导型基因(Litvintseva & Henson 2002),糙皮侧耳也存在多个铜响应基因(Palmieri *et al.* 2000)。在灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 中, *BcLCC2* 是一个铜诱导型漆酶基因,并在铜诱导下鉴定出了 *BcLCC2* 基因编码的 63.4 kDa 同工酶(Buddhika *et al.* 2021),从而建立了与诱导剂类型相关的酶-基因的联系。综合相关性分析结果来看, *AhLac1*、*AhLac3* 和 *AhLac6* 基因转录水平与漆酶活性相关较高,且基因转录水平均存在不同程度上调,推测这 3 个基因可能是黑木耳中的铜诱导型基因,但铜诱导型漆酶基因具体的作用机制仍待进一步研究。

综上所述,本研究探讨了外源铜离子对黑木耳漆酶活性和漆酶基因转录水平的影响,发现适宜浓度的铜离子能够提高漆酶活性和漆酶基因转录水平,且漆酶活性和漆酶基因转录水平之间存在关联性。研究不仅分析了铜离子对漆酶活性和基因转录水平的调控作用,还为提高黑木耳漆酶活性提供了新思路,并为深入研

究漆酶基因的分子调控机制提供理论基础。

## 作者贡献

米昊雨: 论文构思、撰写及修改; 耿楠楠: 稿件审阅及修改; 杜鹏禹: 实验材料、数据管理; 刘增才: 论文指导; 邹莉: 实验监督与指导、论文审核。

## 利益冲突

作者声明,该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

## [REFERENCES]

- An Q, Wu XJ, Wu B, Dai YC, 2015. Effects of carbon and nitrogen sources on lignocellulose decomposition enzyme activities in *Flammulina velutipes*. *Mycosystema*, 34(4): 761-771 (in Chinese)
- Buddhika UVA, Savocchia S, Steel CC, 2021. Copper induces transcription of *BcLCC2* laccase gene in phytopathogenic fungus, *Botrytis cinerea*. *Mycology*, 12(1): 48-57
- Cao KK, Liu N, Ma SX, Cao ZY, Liang DX, Chai JT, Dong JG, 2015. Optimization of fermentation condition for laccase production by *Setosphaeria turcica* using the response surface methodology and the enzymatic characters. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(11): 2165-2175 (in Chinese)
- Cao YJ, Ma HF, Cui BK, Si J, Dai YC, 2021. Lignocellulolytic enzyme activities of three white rot fungi under different solid-state fermentation media. *Mycosystema*, 40(5): 1123-1139 (in Chinese)
- Chen DD, Niu JZ, Yu XY, Yan JP, Chagan I, 2013. The factors affecting the expression and activity of laccase in fungi. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 25(11): 1053-1058 (in Chinese)
- Collins PJ, Dobson A, 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3444-3450
- Dai YC, Yang ZL, 2008. A revised checklist of medicinal fungi in China. *Mycosystema*, 27(6): 801-824 (in Chinese)
- Dai YC, Yang ZL, Cui BK, Wu G, Yuan HS, Zhou LW, He SH, Ge ZW, Wu F, Wei YL, Yuan Y, Si J, 2021. Diversity and systematics of the important macrofungi in Chinese forests. *Mycosystema*, 40(4): 770-805 (in Chinese)

- Dong LL, Tan Q, Zhang MT, Xiao CL, Zhang H, Pu JJ, Liu XM, 2022. Effects of exogenous compounds on laccase activity and expression of laccase gene family members of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Fruit Science*, 39(7): 1157-1166 (in Chinese)
- Feng X, Zhang XX, Liu M, Liu YH, Zhang H, Wei H, Yang ZX, 2020. Induction of Cu(II) on morphological development and ligninase activities of *Fusarium* sp. ZH-H2. *Mycosystema*, 39(5): 839-847 (in Chinese)
- Fu LJ, Liu H, Zhang XQ, Zhang SQ, Ren DJ, 2019. Effect of different ions on laccase enzyme activity. *Chemical Reagents*, 41(8): 830-835 (in Chinese)
- Galic M, Stajic M, Vukojevic J, Simonić J, 2020. Capacity of *Auricularia auricula-judae* to degrade agro-forestry residues. *Cellulose Chemistry and Technology*, 54(1-2): 179-184
- Gomaa OM, Momtaz OA, 2015. Copper induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46: 285-292
- Han ZH, Liu JN, Dang AL, Zhang PQ, Dai XD, Zhang JC, 2012. Purification and characterization of laccase from *Auricularia auricula*. *Journal of Fungal Research*, 10(4): 234-239 (in Chinese)
- Hu CX, Lei SY, Qin YP, Zhao YJ, Xiang QJ, 2019. Influence of anthracene on laccase activity and transcriptional expression profiles of *Ganoderma lucidum*. *Biotechnology Bulletin*, 35(9): 112-117 (in Chinese)
- Jawale JP, Nandre VS, Kulkarni MV, Doshi PJ, 2023. Combinatorial effect of copper ions on the laccase productivity of *T. versicolor* NFCCI 4361 and its biomass application into spent wash remediation. *Waste and Biomass Valorization*, 14(11): 3775-3787
- Litvintseva AP, Henson JM, 2002. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3): 1305-1311
- Ma HF, Ge Meng, Cui BK, Si J, Dai YC, 2018. Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: laccase immobilization and characterization. *Chemical Engineering Research and Design*, 132: 664-676
- Ma YP, Jiang W, Zhang PQ, Dai XD, Zhou SY, Ma QF, Liu JN, Tian S, Zhu JN, Zhang JC, Wang TL, 2023. Optimization of liquid fermentation conditions of *Auricularia auricular*. *Edible Fungi*, 45(1): 21-24 (in Chinese)
- Manavalan T, Manavalan A, Thangavelu KP, Heese K, 2013. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochemical Engineering Journal*, 70: 106-114
- Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G, 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3): 920-924
- Pan NG, Liu LY, Zhu SR, Cheng GH, Wang X, Zhang ZJ, Li CT, 2023. Effects of different shading treatment on antioxidant activities and growth of basidiomata of *Auricularia heimuer*. *Mycosystema*, 42(9): 1953-1965 (in Chinese)
- Sharghi S, Ahmadi FS, Kakhki AM, Farsi M, 2024. Copper increases laccase gene transcription and extracellular laccase activity in *Pleurotus eryngii* KS004. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(1): 111-116
- Shen RM, Lu JY, Zhang Y, Wei H, Lu L, 2024. Hypolipidemic functions of edible and medicinal mushrooms: a review. *Mycosystema*, 43(8): 4-15 (in Chinese)
- Shi XY, Zhang LL, Wu F, Fu YY, Yin SJ, Si YX, Park YD, 2016. Kinetics for Cu<sup>2+</sup> induced *Sepia pharaonis* arginine kinase inactivation and aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 926-933
- Si J, Cui BK, Dai YC, 2011a. Primary screening of effective *Trametes* strains with high laccase-productivity and optimization of conditions on laccase production. *Microbiology China*, 38(3): 405-416 (in Chinese)
- Si J, Cui BK, He S, Dai YC, 2011b. Optimization of conditions for laccase production by *Perenniporia subacida* and its application in dye decolorization. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 17(5): 736-741 (in Chinese)
- Si J, Li W, Cui BK, Dai YC, 2011c. Advances of research on characteristic, molecular biology and applications of laccase from fungi. *Biotechnology Bulletin*, 2: 48-55 (in Chinese)
- Si J, Ma HF, Cao YJ, Cui BK, Dai YC, 2021a. Introducing a thermo-alkali-stable, metallic ion-tolerant laccase purified from white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Frontiers in Microbiology*, 12: 670163
- Si J, Peng F, Cui BK, 2013. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. *Bioresource Technology*, 128: 49-57
- Si J, Wu Y, Ma HF, Cao YJ, Sun YF, Cui BK, 2021b. Selection of a pH- and temperature-stable laccase from

- Ganoderma australe* and its application for bioremediation of textile dyes. *Journal of Environmental Management*, 299: 113619
- Sun J, 2022. Mining and functional study of genes related to cellulose degradation in *Auricularia heimuer*. PhD Dissertation, Northeast Forestry University, Harbin. 1-126 (in Chinese)
- Tang LX, Wang YX, Peng MY, Wang H, Si J, Cui BK, 2023. Fungal laccase and its production, immobilization, and application: a review. *Mycosystema*, 42(9): 1821-1837 (in Chinese)
- Wang H, Tang LX, Ma HF, Qian K, Si J, Cui BK, 2021. Immobilization of laccase from *Trametes orientalis* and its application for decolorization of multifarious dyes. *Biotechnology Bulletin*, 37(11): 142-157 (in Chinese)
- Wang H, Tang LX, Ye YF, Ma JX, Li X, Si J, Cui BK, 2024. Laccase immobilization and its degradation of emerging pollutants: a comprehensive review. *Journal of Environmental Management*, 359: 120984
- Wu F, Dai YC, 2015. Notes on the nomenclature of the *Auricularia auricula-judae* complex. *Mycosystema*, 34(4): 604-611 (in Chinese)
- Wu F, Tohtirjap A, Fan LF, Zhou LW, Alvarenga RLM, Gibertoni TB, Dai YC, 2021. Global diversity and updated phylogeny of *Auricularia* (Auriculariales, Basidiomycota). *Journal of Fungi*, 7(11): 933
- Wu Y, Ma HF, Cao YJ, Si J, Cui BK, 2019. Advances on properties, production, purification and immobilization of fungal laccase. *Biotechnology Bulletin*, 35(9): 1-10 (in Chinese)
- Wu Y, Ma HF, Cao YJ, Si J, Cui BK, 2020. Medium optimization for the laccase production by white rot fungus *Porodaedalea laricis* and its dye decolorizing capacity. *Biotechnology Bulletin*, 36(1): 45-59 (in Chinese)
- Xiao C, 2012. Screening, optimization of fermentation conditions and enzymatic characteristics of *Auricularia auricula* strains with high laccase. MS Thesis, Northeast Agricultural University, Harbin. 1-79 (in Chinese)
- Yang D, 2023. Formula screening and extracellular enzyme activity study of *Auricularia heimuer* cultivated with corn cob. MS Thesis, Jilin Agricultural University, Changchun. 1-56 (in Chinese)
- Yang Y, Wei F, Zhuo R, Fan F, Liu H, Zhang C, Ma L, Jiang M, Zhang X, 2013. Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS One*, 8(11): e79307
- Yu Z, 2021. Study on laccase production in liquid fermentation of *Trametes versicolor* induced by GHK-Cu and its mechanism. MS Thesis, Jiangsu University, Zhenjiang. 1-91 (in Chinese)
- Zhang JJ, Chen MJ, Feng ZY, Huang JC, Song XX, Wang H, Chen H, 2016. Effects of aromatic compounds on biomass, laccase activities and transcript levels of *Hypsizygus marmoreus*. *Mycosystema*, 35(9): 1130-1138 (in Chinese)
- Zhao LT, 2017. Study on *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* laccase gene expression and corresponding proteins effected by co-cultured *Rhodotorula mucilaginosa*. MS Thesis, Jiangnan University, Wuxi. 1-51 (in Chinese)
- Zheng F, An Q, Meng G, Wu XJ, Dai YC, Si J, Cui BK, 2017. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: purification, characterization, and application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102: 758-770
- Zheng F, Cui BK, Wu XJ, Meng G, Liu HX, Si J, 2016. Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110: 69-78
- Zhu C, Bao G, Huang S, 2016. Optimization of laccase production in the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* (ACCC 52857) induced through yeast extract and copper. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(2): 270-276
- Zhuo R, 2015. Cloning and transcriptional regulation analysis of laccase gene and laccase multi-gene family from white rot fungi. PhD Dissertation, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan. 1-197 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 安琪, 吴雪君, 吴冰, 戴玉成, 2015. 不同碳源和氮源对金针菇降解木质纤维素酶活性的影响. *菌物学报*, 34(4): 761-771
- 曹可可, 刘宁, 马双新, 曹志艳, 梁东旭, 柴江婷, 董金皋, 2015. 大斑刚毛座腔菌高产漆酶条件的响应面优化及酶学特性. *中国农业科学*, 48(11): 2165-2175
- 曹永佳, 马鸿飞, 崔宝凯, 司静, 戴玉成, 2021. 不同固体发酵培养基下三种白腐真菌分泌的木质纤维素酶活性. *菌物学报*, 40(5): 1123-1139
- 陈带娣, 牛杰振, 余晓媛, 严金平, 伊日布斯, 2013. 影响真菌漆酶表达及其活性的因素. *生命科学*, 25(11): 1053-1058
- 戴玉成, 杨祝良, 2008. 中国药用真菌名录及部分名称的修订. *菌物学报*, 27(6): 801-824

- 戴玉成, 杨祝良, 崔宝凯, 吴刚, 袁海生, 周丽伟, 何双辉, 葛再伟, 吴芳, 魏玉莲, 员瑗, 司静, 2021. 中国森林大型真菌重要类群多样性和系统学研究. 菌物学报, 40(4): 770-805
- 董玲玲, 谭晴, 张梦婷, 肖春丽, 张贺, 蒲金基, 刘晓妹, 2022. 外源物对杧果胶孢炭疽病菌漆酶活性及漆酶基因家族成员表达的作用. 果树学报, 39(7): 1157-1166
- 冯煊, 张小雪, 刘猛, 刘月涵, 张惠, 魏欢, 杨志新, 2020. Cu(II)对一株镰刀菌形态发育及木质素酶系活性的影响. 菌物学报, 39(5): 839-847
- 付林俊, 刘海, 张晓晴, 张淑琴, 任大军, 2019. 不同离子对漆酶酶活的影响. 化学试剂, 41(8): 830-835
- 韩增华, 刘佳宁, 党阿丽, 张丕奇, 戴肖东, 张介驰, 2012. 黑木耳漆酶纯化及部分漆酶特性的研究. 菌物研究, 10(4): 234-239
- 胡楚霄, 雷善钰, 秦艳平, 赵奕锦, 向泉桔, 2019. 葱对3株灵芝菌株漆酶活性及其转录表达水平的影响. 生物技术通报, 35(9): 112-117
- 马银鹏, 姜威, 张丕奇, 戴肖东, 周舒扬, 马庆芳, 刘佳宁, 田爽, 朱加楠, 张介驰, 王天亮, 2023. 黑木耳液体发酵条件优化研究. 食用菌, 45(1): 21-24
- 潘年港, 刘凌云, 朱姝蕊, 程国辉, 王辛, 张兆娟, 李长田, 2023. 不同遮光处理对黑木耳菌丝抗氧化及子实体生长发育的影响. 菌物学报, 42(9): 1953-1965
- 沈若茗, 陆俊佑, 张煜, 魏华, 陆玲, 2024. 大型食药菌的降血脂功能研究进展. 菌物学报, 43(8): 4-15
- 司静, 崔宝凯, 戴玉成, 2011a. 栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化. 微生物学通报, 38(3): 405-416
- 司静, 崔宝凯, 贺帅, 戴玉成, 2011b. 微酸多年卧孔菌产漆酶条件优化及其在染料脱色中的应用. 应用与环境生物学报, 17(5): 736-741
- 司静, 李伟, 崔宝凯, 戴玉成, 2011c. 真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展. 生物技术通报, 2: 48-55
- 孙健, 2022. 黑木耳纤维素降解相关基因的挖掘及功能研究. 东北林业大学博士论文, 哈尔滨. 1-126
- 唐禄鑫, 王雅娴, 彭明意, 王豪, 司静, 崔宝凯, 2023. 真菌漆酶及其生产、固定化与应用. 菌物学报, 42(9): 1821-1837
- 王豪, 唐禄鑫, 马鸿飞, 钱坤, 司静, 崔宝凯, 2021. 东方栓孔菌漆酶的固定化及其对不同染料脱色的作用. 生物技术通报, 37(11): 142-157
- 吴芳, 戴玉成, 2015. 黑木耳复合群中种类学名说明. 菌物学报, 34(4): 604-611
- 吴怡, 马鸿飞, 曹永佳, 司静, 崔宝凯, 2019. 真菌漆酶的性质、生产、纯化及固定化研究进展. 生物技术通报, 35(9): 1-10
- 吴怡, 马鸿飞, 曹永佳, 司静, 崔宝凯, 2020. 白腐真菌落叶松锈迷孔菌产漆酶液体培养基的优化及其对染料的脱色作用. 生物技术通报, 36(1): 45-59
- 肖楚, 2012. 黑木耳漆酶高产菌株筛选及发酵条件、酶学性质的研究. 东北农业大学硕士论文, 哈尔滨. 1-79
- 杨迪, 2023. 玉米芯栽培黑木耳的配方筛选及胞外酶活性研究. 吉林农业大学硕士论文, 长春. 1-56
- 余卓, 2021. 蓝铜胜肽诱导变色栓菌液态发酵产漆酶及其机制的研究. 江苏大学硕士论文, 镇江. 1-91
- 张津京, 陈明杰, 冯志勇, 黄建春, 宋晓霞, 汪虹, 陈辉, 2016. 芳香族化合物对斑玉蕈菌丝生物量、漆酶活性及其转录水平的影响. 菌物学报, 35(9): 1130-1138
- 赵丽婷, 2017. 共培养胶红酵母对阿魏蘑漆酶基因表达及其相关蛋白的影响. 江南大学硕士论文, 无锡. 1-51
- 卓睿, 2015. 白腐真菌漆酶及同工酶基因家族的克隆表达调控研究. 华中科技大学博士论文, 武汉. 1-197