

NHÂN DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA LACCASE 2 TỪ *Fusarium oxysporum* HUIB02 TẠO NGUỒN NGUYÊN LIỆU DI TRUYỀN BIỂU HIỆN TÁI TỔ HỢP

Đặng Thị Thanh Hà¹, Lê Mỹ Tiểu Ngọc², Nguyễn Thị Mỹ Lệ³, Nguyễn Bảo Hưng²,
Lê Kim Tuấn⁴, Trần Thị Hương Giang⁵, Phạm Thị Ngọc Lan⁶, Trần Thúy Lan², Lê Thị Kim Thoa⁷,
Trịnh Thị Phương Thảo⁷, Vũ Đức Hoàng⁷, Nguyễn Đức Huy^{2*}

¹ Trường Đại học Tây Nguyên, Buon Ma Thuột, Đắk Lắk

² Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Thừa Thiên Huế

³ Trường Khoa học Môi trường và Tài nguyên sinh vật, Đại học Quốc gia Jeonbuk, Hàn Quốc

⁴ Công ty cổ phần thủy sản số 5, Bình Tân, Thành phố Hồ Chí Minh

⁵ Phòng Công nghệ phôi, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam, Hà Nội

⁶ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

⁷ Khoa Sinh Môi trường, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Đà Nẵng

TÓM TẮT

Gen mã hóa cho một laccase của *Fusarium oxysporum* HUIB02 được phân lập bằng phản ứng chuỗi PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR thu được trên gel agarose 0.8% có kích thước khoảng 2,2 kb. Sau khi được tinh sạch từ gel, sản phẩm gắn vào vector pGEM[®]T-Easy và biến nạp vào *E. coli* Top10. Vector tái tổ hợp được phân lập từ chủng *E. coli* và gửi giải trình tự DNA. Kết quả giải trình tự cho thấy gen mã hóa laccase dài 2229 nu và chứa 5 vùng không mã hóa với tổng chiều dài 291 nu. So sánh tương đồng với dữ liệu gen của chủng *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287 cho kết quả tương đồng cao lên đến 99% với gen laccase ở phân nhóm 2. Do đó, gen laccase được đặt tên là *Folac2*. *Folac2* mã hóa một protein có chiều dài 645 aa. Trình tự amino acid chứa đoạn tín hiệu peptide dài 26 aa, cho thấy đây là enzyme ngoại bào. Phân tích dự đoán cấu trúc cho kết quả có 16 vị trí glycosyl hóa kiểu N, đóng vai trò quan trọng trong hoàn thiện chức năng enzyme sau dịch mã. Chuỗi polypeptide của *Folac2* có 7 vị trí gấp cuộn xoắn α và 36 vị trí gấp cuộn phiến β .

Từ khóa: *Fusarium oxysporum*, laccase, gen, nhân dòng.

MỞ ĐẦU

Laccase thuộc nhóm oxi hóa khử nhân đồng xúc tác cho quá trình oxi hóa các hợp chất hữu cơ bao gồm cả hợp chất phenol thông qua sự khử phân tử oxy thành nước. Laccase chứa 4 nguyên tử đồng và hai cầu liên kết disulfide phân bố trong 3 vùng khác nhau gọi là T1, T2 và T3. T1 là một trung tâm đơn nhân chứa 1 nhân Cu, trong khi một nhân Cu khác ở T2 và hai nhân Cu ở T3. Quá trình oxi hóa cơ chất xảy ra ở vùng T1 thông qua trình tự tripeptide His-Cys-His, sau đó các điện tử được chuyển đến trung tâm ba hạt nhân T2/T3 và diễn ra sự khử O₂ thành nước (Janusz *et al.*, 2020; Mayolo-Deloisa *et al.*, 2020). Đặc điểm phân tử đặc trưng laccase là có chiều dài khoảng 500 amino acid với khối lượng phân tử khoảng 50-300 kDa và tồn tại dưới dạng isoenzyme (Kumar, Chandra, 2020). Laccase oxy hóa phổ rộng các cơ chất tự nhiên bao gồm phenol, polyphenol, anilin, aryl diamine, phenol thay thế methoxy, hydroxyindol, benzenethiol, các hợp chất kim loại vô cơ- / hữu cơ- và nhiều loại khác. Do đó, laccase được ứng dụng nhiều trong công nghệ sinh học như tẩy trắng bột giấy, tẩy màu thuốc nhuộm vải, chế biến thực phẩm, sử dụng trong tổng hợp chất hữu cơ, xử lý các nguồn nước thải bị ô nhiễm; xử lý phụ phẩm nông nghiệp để tạo nguyên liệu cho các quá trình khác (Morsi *et al.*, 2020). Các phản ứng oxy hóa xúc tác laccase có thể được tăng cường nhờ các mediator. Các mediator phần lớn là các hợp chất hóa học nhỏ với khả năng bị oxi hóa liên tục bởi enzyme, sau đó bị khử bằng cơ chất. Thông qua mediator, laccase có thể oxi hóa nhóm cơ chất mà bản thân enzyme không thể oxy hóa trực tiếp được (Kumar, Chandra, 2020).

Nguồn sản xuất laccase chủ yếu từ vi khuẩn, côn trùng, nấm và thực vật (Morsi *et al.*, 2020). Nhiều nghiên cứu chứng minh laccase từ nấm có hoạt tính phân giải lignin tốt hơn enzyme từ nguồn khác do đặc tính oxi hóa khử cao. Trong đó, nấm mục trắng bao gồm *Trametes versicolor*, *Pleurotus pulmonarius*, *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*,... là nguồn sản xuất laccase tốt nhất. Hiện nay, đã có hơn 150 laccase khác nhau được công bố trên thế giới (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2020). Gần đây, các nghiên cứu chứng minh *Fusarium oxysporum* tiết ra laccase với hoạt độ cao. Enzyme ngoại bào khử màu và khử độc thuốc nhuộm tổng hợp với hiệu quả cao (El-Fakharany *et al.*, 2016). Hiện nay, genome của *F. oxysporum* đã được giải trình tự và công bố tại <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Fusox2/Fusox2.home.html> (Ma *et al.*, 2010). Phân tích dữ liệu cho thấy có 38 gen mã hóa enzyme thuộc nhóm oxi hóa nhân đồng. Nghiên cứu biểu hiện gen laccase trong quá trình sinh trưởng và phát triển của *oxysporum* chứng minh có ít nhất 6 gen laccase biểu hiện (Canero, Roncero, 2008; Reyes-Medina, Macias-Sanchez, 2015). So sánh với cơ sở dữ liệu laccase đã được đặc tính hóa và xác định cấu trúc không

gian, Kwiatos và cộng sự phát hiện genome của *F. oxysporum* chứa ít nhất 4 gen mã hóa laccase. Laccase mã hóa bởi gen nhóm 1, 2 và 4 là các enzyme ngoại bào, trong khi laccase 3 mã hóa protein nội bào do thiếu trình tự mã hóa tín hiệu peptide ở đầu tận cùng 5' (Kwiatos *et al.*, 2020).

Chủng nấm *F. oxysporum* HUIB02 phân lập được từ mẫu thực vật với hoạt lực laccase ngoại bào. Enzyme ngoại bào khử màu nhiều loại thuốc nhuộm tổng hợp khác nhau (Huy *et al.*, 2020). Sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử, gen mã hóa laccase nhóm 3 và 4 đã được nhân dòng và giải trình tự thành công với kết quả tương đồng cao các gen tương ứng ở chủng nấm *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (Đặng Thanh Hà *et al.*, 2018; Đặng Thị Thanh Hà *et al.*, 2020). Ở nghiên cứu này, gen mã hóa laccase nhóm 2 tiếp tục được nhân dòng và phân tích trình tự làm nguyên liệu di truyền tạo chủng tái tổ hợp biểu hiện *Folac2* ngoại bào.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Chủng *F. oxysporum* HUIB02 được phân lập từ xác bã thực vật và đã định danh phân tử (Huy *et al.*, 2020). Vector nhân dòng vòng pGEM[®]-T-Easy được mua từ hãng Promega, Mỹ cho các thí nghiệm nhân dòng. Chủng vi khuẩn *E. coli* Top10 (Invitrogen, Mỹ) được sử dụng cho thí nghiệm biến nạp vector nhân dòng mang gen laccase.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của chủng *F. oxysporum* HUIB02 được tách chiết dựa trên phương pháp tách chiết DNA tổng số dùng đệm cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) như mô tả của Sambrook và cs (Sambrook, Russell, 2003). Sinh khối nấm được thu hồi bằng ly tâm 14000 vòng/phút trong 5 phút, 4°C. Sau đó, rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy và tái huyền phù trong 500 µL đệm CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoethanol). Tế bào được phá vỡ bằng sóng siêu âm ở tần số 60 Hz, khoảng ngắt quãng 6 giây trong 5 phút bằng thiết bị siêu âm VC-130 (Sonics, Mỹ) kết hợp ở 65°C trong 30 phút. Dịch chiết tế bào chứa DNA tổng số được 14000 vòng/phút trong 5 phút, 4°C. DNA tổng số được tách chiết và tinh sạch sử dụng 500 µL hỗn hợp phenol: chloroform: isopropanol (tỷ lệ 25:24:1), trộn đều bằng vortex và phân tách bằng ly tâm lạnh với tốc độ 14.000 vòng/phút trong 10 phút, 4°C. Khoảng 400 µL pha trên được chuyển sang ống 1,5 mL mới và DNA tổng số được kết tủa với 2 lần thể tích ethanol tinh khiết, rửa kết tủa bằng ethanol 70% và hòa tan trong 50 µL nước cất vô trùng. DNA tổng số được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% bổ sung thuốc nhuộm RedSafe[™] Nucleic Acid Staining Solution 20000x (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc) bằng dòng điện một chiều ở 80V trong 55 phút. Gel được quan sát dưới đèn tử ngoại (UV transilluminator, Wealtec).

Khuếch đại gen mã hóa laccase với cặp mồi đặc hiệu

Trình tự mồi *Folac2F* (5'-ATGGCTCTCATAGAGCGAGTATG-3'), *Folac2R* (5' TTAATACCAGAATCACCTTCAAAG-3') dùng để khuếch đại gen *laccase* 2 được thiết kế dựa trên gen tương tự từ cơ sở dữ liệu nucleotide genome của *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 với mã số định danh protein 10184. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 40 ng DNA tổng số, 6 µL Go Taq[®] Green Master Mix 2x (Promega, Mỹ); 0,5 µL mỗi xuôi (10 pmol/ µL); 0,5 µL mỗi ngược (10 pmol/ µL); nước đến thể tích 12µL.

Quá trình PCR khuếch đại gen được thực hiện trong máy luân nhiệt (Veriti © 96-well Thermal Cycler, AB Applied Biosystems, Mỹ) có chu trình nhiệt: biến tính 95°C trong 5 phút; 30 chu kì nhiệt với mỗi chu kì là 95°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút 30 giây; cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, điện áp 80V trong 30 phút.

Gắn sản phẩm PCR vào vector nhân dòng

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pGEM[®]-T-Easy (Promega, Mỹ) bằng T4 DNA Ligase, thành phần phản ứng gắn bao gồm: 50 ng vector pGEM[®]-T Easy, 5 µl đệm, 3 đơn vị T4 DNA ligase, 70 ng sản phẩm PCR, sau đó bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µl, phản ứng gắn được ủ 25°C trong 1 giờ.

Biến nạp và chọn lọc thể biến nạp

Hỗn hợp phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào *Escherichia coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Thể biến nạp được nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường LB có bổ sung 50 µg/ml ampicillin, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galactopyranoside (X-gal) và Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) trong 16 giờ ở 37°C. Thể tái tổ hợp được chọn lọc dựa trên nguyên lý của vector pGEM[®]-T-Easy có vị trí gắn sản phẩm PCR nằm giữa gen mã hóa β-galactosidase. Sản phẩm PCR gắn thành công vào vector sẽ làm gián đoạn trình tự gen mã hóa cho β-galactosidase dẫn đến *E. coli* TOP10 tái tổ hợp không sản xuất được enzyme β-galactosidase để chuyển hóa cơ chất X-gal. Các khuẩn lạc có màu trắng xuất hiện trên đĩa được lựa chọn và kiểm tra sự hiện diện của vector tái tổ hợp chứa gen *laccase*. DNA plasmid được tách chiết sử dụng kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự hiện diện gen mã hóa laccase trong thể tái tổ hợp với vector

pGEM® -T Easy được kiểm tra bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu và cắt bằng enzyme cắt giới hạn *EcoRI* (Thermo scientific, Mỹ).

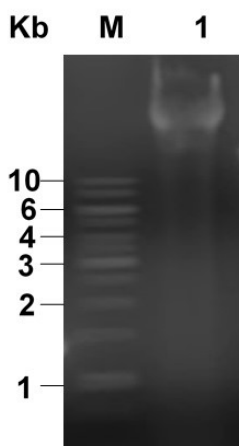
Giải trình tự gen *laccase*

Plasmid tái tổ hợp có mang gen được gửi đi phân tích trình tự để xác định gen quan tâm tại công ty First BASE (Malaysia). Trình tự gen *laccase* được phân tích và so sánh với gen *laccase* tương ứng ở chủng *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 và các gen *laccase* khác trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen thế giới GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Đặc tính của gen *laccase* được phân tích bằng các phần mềm miễn phí của trung tâm phân tích trình tự sinh học, Đại học kỹ thuật Đan Mạch (<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA tổng số

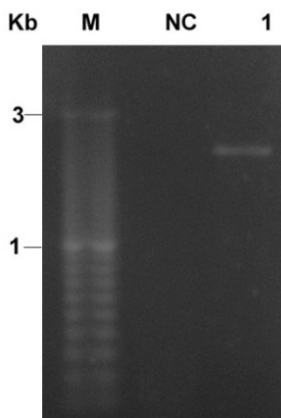
Sau khi nuôi cấy 72 giờ, sinh khối *F. oxysporum* HUIB02 thu hồi bằng ly tâm và tách chiết DNA tổng số bằng đệm CTAB. Điện di kiểm tra kết quả trên gel agarose 1% (Hình 1) cho thấy có một band DNA với kích thước lớn với hàm lượng khoảng 400 ng/μL. Bằng DNA tổng số thu được không bị đứt gãy, sạch, không nhiễm RNA, có thể sử dụng làm khuôn mẫu cho các phản ứng PCR.



Hình 1. Điện di đồ DNA tổng số tách chiết từ chủng *F. oxysporum* HUIB02

Khuếch đại gen *laccase*

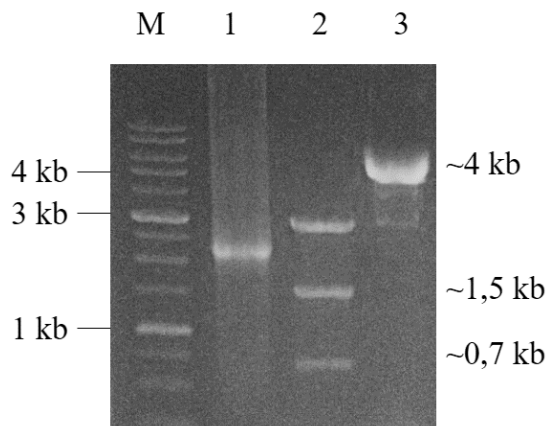
Hình 2 cho thấy rằng gen *laccase* được khuếch đại thành công từ DNA tổng số, sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% xuất hiện bằng rõ, không có các sản phẩm phụ, có kích thước khoảng 2,2 kb, tương đương kích thước gen *laccase* của *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* đã được công bố. Kết quả khuếch đại sản phẩm PCR tương tự khi sử dụng các cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại các gen *laccase* khác từ *F. oxysporum* HUIB01 (Đặng Thanh Hà *et al.*, 2018; Đặng Thị Thanh Hà *et al.*, 2020). Các kết quả chứng minh có sự bảo thủ và tương đồng cao của họ gen *laccase* ở *F. oxysporum* HUIB02 và *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Do đó, sản phẩm PCR đáp ứng được các điều kiện cần thiết như nguồn nguyên liệu cho bước nhân dòng và giải trình tự gen.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR đoạn gen *Folac2* với với khuôn mẫu DNA tách chiết từ chủng *F. oxysporum* HUIB02
M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); NC: đối chứng âm; 1: sản phẩm PCR khuếch đại từ DNA tổng số với cặp mồi *Folac2F/Folac2R*

Nhân dòng gen *laccase*

Sau khi biến nạp vào *E. coli* Top10. Thể tái tổ hợp được chọn bằng phương pháp khuẩn lạc xanh trắng. Các khuẩn lạc màu trắng được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *Folac2F/Folac2R* cho sản phẩm với kích thước 2,2 kb được chọn tách chiết DNA plasmid. Phân tích hình ảnh điện di agarose gel 0,8% plasmid tái tổ hợp, phản ứng PCR trên khuôn mẫu DNA plasmid và phản ứng cắt hạn chế với *EcoRI* được trình bày ở hình 3. Kết quả chứng minh có DNA plasmid với kích thước khoảng 4 kb cao hơn so với kích thước 3.0 kb của pGEM[®]-Easy. Trong khi đó, plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa laccase có kích thước khoảng 5 kb. Plasmid tái tổ hợp có kích thước khác như 4 kb do plasmid ở các trạng thái siêu xoắn khác nhau dẫn đến tốc độ dịch chuyển trên gel khác nhau. Phản ứng khuếch đại PCR với cặp mồi *Folac2* sử dụng DNA plasmid tái tổ hợp làm khuôn mẫu. Phản ứng cắt bằng *EcoRI* cho 3 band với kích thước 3 kb, 1,5 kb và 0,7 kb. pGEM[®]-Easy chứa 2 vị trí nhận biết *EcoRI* ở 2 đầu vùng chèn nên plasmid tái tổ hợp sau cắt sẽ chứa đoạn DNA bằng kích thước vector và 1 đoạn DNA bằng kích thước đoạn chèn. Sự xuất hiện 2 band với kích thước 1,5 kb và 0,7 kb có thể do gen *laccase* chứa vị trí nhận biết của *EcoRI*. Kết quả phản ứng khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu cho sản phẩm có kích thước 2,2 kb tương ứng với chiều dài gen *laccase* khi khuếch đại từ genome của *F. oxysporum* HUIB02.



Hình 3. Điện di đồ plasmid tái tổ hợp pGEM[®]-Easy mang gen *laccase*

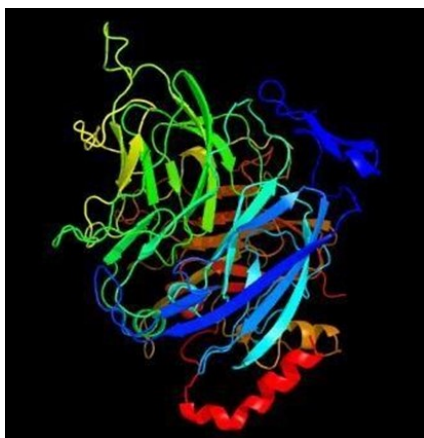
M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Mỹ); 1: sản phẩm PCR gen *Folac2* trên DNA khuôn mẫu là plasmid tái tổ hợp; 2: sản phẩm phân ứng cắt plasmid tái tổ hợp bằng *EcoRI*; 3: plasmid tái tổ hợp tách chiết từ *E. coli* TOP10.

Phân tích trình tự gen *laccase*

Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy gen *laccase* có chiều dài 2229 nucleotide. So sánh với dữ liệu genome của chủng *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 cho thấy 2 gen tương đồng 99% với gen được sử dụng làm khuôn mẫu thiết kế mồi. Gen *laccase* chứa 6 vùng không mã hóa với chiều dài của các vùng lần lượt là 52 nu, 46 nu, 50 nu, 53 nu, 47 nu, và 45 nu. Do đó, gen *laccase* được đặt tên là *Folac2*. Dữ liệu trình tự nucleotide của *Folac2* đã được đăng ký trên Genbank với mã số KY825237. So sánh với các kết quả nghiên cứu khác cho thấy *Folac2* tương đồng cao với gen *laccase* từ *F. proliferatum* ET1 (mã số: XM_031228032), *F. verticillioides* 7600 (XM_018901706).

Năm 2008 Okamoto và cộng sự đã tiến hành nhân dòng và biểu hiện gen *laccase* từ nấm thối trắng *Pleurotus ostreatus*. Gen *laccase* có chiều dài 2929 nu với vùng mã hóa bị gián đoạn bởi 19 intron khác nhau (Okamoto *et al.*, 2003). Cordoba Cañero đã phân lập và xác định rõ vai trò của 6 gen *laccase* từ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* gây bệnh ở cà chua. Tất cả các gen *lac1*, *lac2*, *lac3*, *lac4*, *lac5* và *lac9* đều có các vùng bảo tồn đặc trưng cho liên kết với đồng như của enzyme phenol oxyase (Canero, Roncero, 2008). Độ dài của các gen *laccase* ở *F. oxysporum* khác nhau, khoảng từ 1957-2471 nucleotide, trong đó hàm lượng GC của gen nằm trong khoảng từ 47 đến 51% (Kwiatos *et al.*, 2015)

Chiều dài protein suy diễn từ kết quả giải trình tự plasmid tái tổ hợp mang gen *Folac2* gồm 645 amino acid. *Folac2* chứa trình tự tín hiệu peptide dài 26 aa. *Folac2* được so sánh với dữ liệu ngân hàng protein và dự đoán sự tương đồng với các protein đã được cấu trúc hóa bằng công cụ Phyre2 (Kelley *et al.*, 2015). Kết quả cho thấy *Folac2* có cấu trúc và chức năng tương tự *laccase* của *Thielavia arenaria* (PDB: 3PPS) (Kallio *et al.*, 2011), *laccase* của *Melanocarpus albomyces* (PDB: 2Q9O) (Hakulinen *et al.*, 2008), multicopper oxidase của *Aspergillus niger* (PDB: 5LWX) (Ferraroni *et al.*, 2017) và *laccase* của *Botrytis aclada* (PDB: 3SQR) (Osipov *et al.*, 2014) với độ tin cậy 100%. So sánh cấu trúc không gian protein cho thấy các histidine (His135, His137, His179, His181, His513, His516, His518) của *Folac2* đóng vai trò trung tâm xúc tác giữa enzyme cơ chất có sự bảo thủ cao giữa các enzyme. Cysteine đóng vai trò tạo cầu liên kết disulfide cũng có tính bảo thủ cao ở các vị trí Cys44, Cys52 và Cys156, Cys356, Cys394. Bên cạnh đó, *Folac2* có 16 vị trí glycosyl hóa vốn đóng vai trò quan trọng trong việc hình thành chức năng của *laccase* sau dịch mã.



Hình 4. Mô hình cấu trúc không gian 3 chiều Folac2 từ *F. oxysporum* HUIB02
Cấu trúc phiến β được trình bày bằng hình mũi tên dạng lát mỏng; cấu trúc cuộn xoắn α được trình bày bằng hình lát mỏng dạng cuộn.

Thông qua phần mềm Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 cho thấy Folac2 có cấu trúc tương tự enzyme laccase từ *T. arenaria* với độ tin cậy 100 %. Dựa trên cấu trúc không gian của protein TaLcc1 ở *T. arenaria* (mã số c3ppsD), cấu trúc không gian của Folac2 đã được xây dựng và trình bày ở Hình 4. Kết quả cho thấy cấu trúc bậc 2 dự đoán của Folac2 có 7 vị trí gấp cuộn xoắn α và 36 vị trí gấp cuộn phiến β .

KẾT LUẬN

Gen mã hóa laccase 2 từ *F. oxysporum* HUIB02 đã được phân lập bằng phản ứng PCR và giải trình tự thành công. Chiều dài của gen là 2229 bp, mã hóa một protein chứa 645 aa. Phân tích cấu trúc protein cho kết quả là một protein ngoại bào có trình tự tín hiệu peptide và có 16 vị trí glycosyl hóa. Kết quả nghiên cứu cho thấy sự tương đồng cao với các gen laccase khác của *Fusarium*. Bên cạnh đó, đặc điểm cấu trúc của protein dự đoán phù hợp với cấu trúc một laccase điển hình. Kết quả nghiên cứu là nguyên liệu di truyền để chúng tôi tiếp tục nghiên cứu biểu hiện gen laccase này trong hệ thống vật chủ thích hợp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.04-2018.51. Nhóm tác giả trân trọng cảm ơn Đại học Huế đã hỗ trợ một phần kinh phí cho nghiên cứu qua đề tài mã số DHH-2018-15-09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đặng Thị Thanh Hà, Lê Kim Tuấn, Phạm Thị Ngọc Lan, Hoàng Tấn Quảng, Trần Thúy Lan, Nguyễn Đức Huy (2018). Nghiên cứu tạo dòng và giải trình tự gen laccase 3 (*Folac3*) từ nấm mốc *Fusarium oxysporum*. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên* 127: (1C) 1-10.
- Đặng Thị Thanh Hà, Lê Kim Tuấn, Đỗ Trần Hương Duyên, Lê Mỹ Tiểu Ngọc, Nguyễn Đức Huy (2020). Phân lập gen mã hóa laccase4 từ nấm *Fusarium oxysporum*. *Tạp chí Khoa học Trường đại học Tây nguyên* 40: 20-26.
- Canero DC, Roncero MI (2008) Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98: (5) 509-518.
- El-Fakharany EM, Hassan MA, Taha TH (2016). Production and application of extracellular laccase produced by *Fusarium oxysporum* EMT. *Int J Agric Biol* 18: (5) 939–947.
- Ferraroni M, Westphal AH, Borsari M, Tamayo-Ramos JA, Briganti F, de Graaff LH, van Berkel WJH (2017). Structure and function of *Aspergillus niger* laccase McoG. *Biocatalysis* 3: (1) 1-16.
- Hakulinen N, Andberg M, Kallio J, Koivula A, Kruus K, Rouvinen J (2008). A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. *J Struct Biol* 162: (1) 29-39.
- Huy ND, Ha DTT, Khoo KS, Lan PTN, Quang HT, Loc NH, Park SM, Veeramuthu A, Show PL (2020). Synthetic dyes removal by *Fusarium oxysporum* HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation. *Environ Technol Inno* 19(1): 101027.
- Janusz G, Pawlik A, Swiderska-Burek U, Polak J, Sulej J, Jarosz-Wilkolazka A, Paszczynski A (2020). Laccase properties, physiological functions, and evolution. *Int J Mol Sci* 21: (3) 966.
- Kallio JP, Gasparetti C, Andberg M, Boer H, Koivula A, Kruus K, Rouvinen J, Hakulinen N (2011). Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria*--common structural features of asco-laccases. *FEBS J* 278: (13) 2283-2295.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ (2015). The *Phyre2* web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10: (6) 845-858.
- Kumar A, Chandra R (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon* 6: (2) e03170.

- Kwiatos N, Ryngajllo M, Bielecki S (2015). Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. *Front Microbiol* 6: 933.
- Kwiatos N, Jedrzejczak-Krzepkowska M, Krzeminska A, Delavari A, Paneth P, Bielecki S (2020). Evolved *Fusarium oxysporum* laccase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 10: (1) 3244.
- Mayolo-Delouis K, Gonzalez-Gonzalez M, Rito-Palomares M (2020). Laccases in food industry: Bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. *Front Bioeng Biotech* 8: 222.
- Morsi R, Bilal M, Iqbal HMN, Ashraf SS (2020) Laccases and peroxidases: The smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. *Sci Total Environ* 714: 136572.
- Okamoto K, Shigematsu I, Yanase H (2003). Cloning and characterization of a laccase gene from the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Mycoscience* 44: (1) 11-17.
- Osipov E, Polyakov K, Kittl R, Shleev S, Dorovatovsky P, Tikhonova T, Hann S, Ludwig R, Popov V (2014). Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 70: (Pt 11) 2913-2923.
- Reyes-Medina MA, Macias-Sanchez KL (2015). GTPase Rho1 regulates the expression of *xyf3* and laccase genes in *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol Lett* 37: (3) 679-683.
- Sambrook S, Russell DW (2003) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York.

CLONING LACCASE 2 ENCODING GENE FROM *Fusarium oxysporum* HUIB02 PROVIDING GENETIC RESOURCE FOR RECOMBINANT EXPRESSION

Đang Thi Thanh Ha¹, Le My Tieu Ngoc², Nguyen Thi My Le³, Nguyen Bao Hung², Le Kim Tuan⁴, Tran Thi Huong Giang⁵, Pham Thi Ngoc Lan⁶, Tran Thuy Lan², Le Thi Kim Thoa⁷, Trinh Thi Phuong Thao⁷, Nguyen Duc Hoang⁷, Nguyen Duc Huy^{2*}

¹ Taynguyen University, Buon Ma Thuot, Daklak

² Institute of Biotechnology, Hue University

³ College of Environmental and Bioresource Sciences, Jeonbuk National University, Iksan, Jeonbuk 570–752, Korea

⁴ Aquaculture company number 5, Ho Chi Minh City

⁵ Laboratory of Embryo Technology, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, Ha Noi, 100000, Vietnam

⁶ University of Sciences, Hue University

⁷ Faculty of Biology and Environmental Science, University of Science and Education, The University of Danang

SUMMARY

Gene encodes for a *laccase* from *F. oxysporum* HUIB02 has been isolated by PCR reaction with specific primers pair. The PCR products observed from 0.8% agarose gel had molecular size of 2.2 kb. After gel purification, the PCR products were ligated into pGEM[®]T-Easy vector and transformed to *E. coli* Top10. Recombinant vectors were isolated from *E. coli* transformants and performed DNA sequencing. The results indicated the *laccase* gene consisted of 2229 nu in which contained 5 introns with length of 291 nu. Nucleotide sequence alignment with *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 genome database resulted in high similarity of 99% to the *laccase* group 2. Hence, the *laccase* gene named as *Folac2*. *Folac2* encoded for a protein of 645 aa in length with a signal peptide of 26 aa, indicating it is an extracellular enzyme. Protein structure prediction showed 16 N-glycosylation sites, which played an important role of enzyme in post translation modification. The *Folac2* polypeptide consisted of 7 alpha helices and 36 beta strands.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, laccase, gene cloning.

* Author for correspondence: Tel: 0916066357, Email: ndhuy@hueuni.edu.vn