



TẠO DÒNG VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN LACCASE 3 (*Folac3*) TỪ *FUSARIUM OXYSPORUM*

**Đặng Thị Thanh Hà¹, Lê Kim Tuấn², Đinh Thị Kim Thiện³, Phạm Thị Ngọc Lan³,
Hoàng Tấn Quảng², Trần Thúy Lan², Nguyễn Đức Huy^{2*}**

¹ Trường đại học Tây Nguyên, 567 Lê Duẩn, Ea Tam, Thành phố Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, Việt Nam

² Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

³ Trường đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

Tóm tắt. Laccase thuộc nhóm enzyme oxi hóa nhân đồng, xúc tác phản ứng oxi hóa nhiều hợp chất hữu cơ vòng thơm khác nhau khi có mặt của oxy. Laccase được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau, đặc biệt công nghiệp dệt, nhuộm và xử lý ô nhiễm môi trường. Gen mã hóa laccase ở nấm *F. oxysporum* HUIB02 được phân lập bằng phản ứng khuếch đại PCR với cặp mồi đặc hiệu có kích thước khoảng 2 kb. Sau khi được tạo dòng và giải trình tự, gen *Folac3* có chiều dài 1957 nu gồm 3 đoạn exon và 2 đoạn intron mã hóa một protein có chiều dài 617 aa. Phân tích cấu trúc protein Folac3 cho kết quả là một protein nội bào không có trình tự tín hiệu peptide và có 7 vị trí glycosyl hóa kiểu N. Cấu trúc bậc 2 Folac3 bao gồm 6 chuỗi xoắn α và 30 phiến β , trong khi cấu trúc không gian Folac3 tương đồng cao với enzyme oxi hóa nhân đồng ở *S. cerevisiae*. Kết quả tạo dòng thành công gen *Folac3* sẽ cung cấp nguồn nguyên liệu di truyền quan trọng cho phân tích biểu hiện dị chủng tái tổ hợp cũng như ứng dụng laccase tái tổ hợp sau này.

Từ khóa: *Fusarium oxysporum*, laccase, *Folac3*, tạo dòng

1 Đặt vấn đề

Laccase hay còn gọi p-diphenol: dioxygen oxidoreductases (EC 1.10.3.2) thuộc nhóm enzyme oxi hóa đa nhân đồng xúc tác phản ứng khử 4 điện tử của O_2 tạo thành nước, đồng thời oxi hóa các hợp chất hữu cơ [6]. Laccase oxi hóa đa dạng các hợp chất như phenol, polyphenol, aniline, aryl diamine, methoxy phenol, hydroxyindol, benzenethiol, hỗn hợp kim loại vô cơ/hữu cơ và nhiều hợp chất khác [9]. Laccase phân bố rộng rãi trong tự nhiên và được sản xuất từ thực vật bậc cao, nấm, vi khuẩn và côn trùng [10, 16]. Trong số các nguồn trên, nấm bao gồm nấm đằm, nấm túi, nấm sợi là nhóm sinh vật chính sản xuất laccase [3, 15]. Ngày nay, laccase được ứng dụng rộng rãi trong các lĩnh vực công nghiệp khác nhau như khử lignin trong công nghiệp giấy, tẩy màu trong công nghiệp màu, công nghiệp dệt sợi, sản xuất đồ uống và bia, nước giải khát, phục hồi sinh học và khử độc các chất ô nhiễm vòng thơm, sản xuất ethanol từ sinh khối thực vật, xử lý nước thải và tổng hợp hợp chất hóa học [6, 7, 14, 15].

* Liên hệ: ndhuy@hueuni.edu.vn

Fusarium oxysporum là nấm ký sinh và gây bệnh trên một số loại cây trồng như ngô, khoai tây, bông và *Arabidopsis* [2]. Những nghiên cứu trước đây cho thấy nấm *F. oxysporum* có ít nhất 6 gen mã hóa các laccase khác nhau và biểu hiện trong quá trình phát triển sợi nấm [1, 11]. Bên cạnh đó, sử dụng công cụ tin sinh học phân tích hệ gen của 12 chủng *F. oxysporum* khác nhau cho kết quả *F. oxysporum* có ít nhất 16–21 gen oxi hóa nhân đồng. Trong số này, 4 gen mã hóa protein đáp ứng được tất cả các đặc tính của laccase [6]. Các nghiên cứu trên cho thấy *F. oxysporum* là một nguồn nguyên liệu tốt để sản xuất laccase, nhưng nghiên cứu về laccase ở *F. oxysporum* chưa được quan tâm nhiều [6].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày một số kết quả phân lập gen laccase 3 (*Folac3*) từ chủng nấm *F. oxysporum* HUIB02, từ đó giải trình tự gen mã hóa, xác định đặc tính và so sánh đối chiếu với dữ liệu ngân hàng gen Genbank. Kết quả nghiên cứu là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu sâu hơn biểu hiện tái tổ hợp dị chủng nhằm sản xuất lượng lớn enzyme cho các ứng dụng khác nhau.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng

Đối tượng nghiên cứu là chủng nấm *F. oxysporum* HUIB02 được phân lập từ xác thực vật và lưu trữ tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế. Chủng nấm được nuôi cấy lưu trữ trên môi trường rắn chứa 1,5 % agar, 20 % dịch chiết khoai tây và 1,5 % peptone. Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* Top10 được nuôi cấy trên môi trường LB rắn chứa 1,5 % agar.

2.2 Phương pháp

Tách chiết DNA tổng số của *F. oxysporum* HUIB02

DNA tổng số của chủng nấm *F. oxysporum* HUIB02 được tách chiết dựa trên phương pháp tách chiết DNA tổng số dung đệm cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) như mô tả của Sambrook và cs. với một vài điều chỉnh nhỏ [12]. Sợi nấm được nuôi trong 5 mL môi trường dịch chiết khoai tây peptone trong 3 ngày ở 30 °C và thu hồi bằng ly tâm lạnh 4 °C trong 5 phút với tốc độ 14.000 vòng/phút. Sợi nấm được 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 thu hồi bằng ly tâm lạnh 4 °C trong 5 phút với tốc độ 14.000 vòng/phút. 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 4 °C trong 10 phút với tốc độ 14.000 vòng/phút. 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 μ L nước cất vô trùng. DNA tổng số sau đó được kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 0,8 % với thuốc nhuộm RedSafe™ (ABC Scientific, Mỹ).

Phân lập gen *Folac3* từ *F. oxysporum* HUIB02

Để tiến hành khuếch đại gen mã hóa *Folac3* từ DNA tổng số *F. oxysporum* HUIB02 đã được tách chiết, trình tự mỗi đặc hiệu gen laccase được thiết kế dựa trên các phân tích trước đó về gen laccase và dữ liệu hệ gen chủng nấm *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 (<http://genome.jgi.doe.gov/pages/search-for-genes.jsf?organism=Fusox2>) [1, 6]. Trình tự mỗi xuôi là 5'-ATGGTTCGCTCACGATGAAGAAG-3' và trình tự mỗi ngược là 5'-TTACTCACATAACTCCGCCG-3'. Phản ứng khuếch đại chuỗi polymerase (PCR) được tiến hành với thành phần phản ứng gồm 40 ng DNA tổng số, 10 pmol mỗi xuôi, 10 pmol mỗi ngược, 1 \times GoTaq® Green Master Mix (Promega, Mỹ) trong thể tích phản ứng 25 μ L. Chu trình nhiệt PCR được thực hiện ở 95 °C trong 10 phút; 30 chu kỳ với 95 °C trong 60 giây, 55 °C trong 30 giây và 72 °C trong 90 giây; kéo dài ở 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1 % trong đệm TAE (Tris acetic acid EDTA) với hiệu điện thế 60 V trong 60 phút sử dụng thuốc nhuộm RedSafe™.

Tạo dòng gen *Folac3*

Sản phẩm PCR có kích thước phù hợp được phân tách và tinh sạch từ gel agarose bằng Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Mỹ). Sản phẩm PCR sau tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel agarose 1 % trước khi tạo dòng và giải trình tự. Khoảng 40 ng sản phẩm PCR sau tinh sạch được ủ với 50 ng pGEM®T-Easy vector (Promega, Mỹ) trong phản ứng có 1 \times đệm gắn, 3 đơn vị T4 DNA ligase ở 4 °C qua đêm. Hỗn hợp gắn được biến nạp vào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt [12]. Tế bào *E. coli* TOP10 được nuôi cấy trên môi trường LB rắn có bổ sung 50 μ g ampicillin (Amp), 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 vào sự xuất hiện khuẩn lạc có viền màu xanh hoặc màu trắng trên đĩa trong đó khuẩn lạc màu trắng có chứa vector tái tổ hợp.

Giải trình tự gen *Folac3*

Khuẩn lạc *E. coli* TOP10 màu trắng xuất hiện được tái kiểm tra bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp môi đặc hiệu gen *Folac3* như mô tả ở trên. Các khuẩn lạc cho kết quả sản phẩm PCR đặc trưng được nuôi cấy trong 5 mL môi trường LB qua đêm ở 37 °C. Tế bào *E. coli* TOP10 được thu nhận bằng ly tâm lạnh ở 4 °C với tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA plasmid được tách chiết sử dụng Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermoscientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự hiện diện gen *Folac3* trong thể tái tổ hợp với vector pGEM®T-Easy được kiểm tra bằng phản ứng PCR sử dụng cặp môi đặc hiệu và cắt bằng enzyme cắt giới hạn *EcoRI* (Thermoscientific, Mỹ). Sau khi xác định chính xác, gen *Folac3* được

tiến hành giải trình tự nucleotide (nu) bằng cặp mồi T7 promoter: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3' và SP6Long: 5'- ATTTAGGTGACACTATAGAATAC -3' (Firstbase, Malaysia).

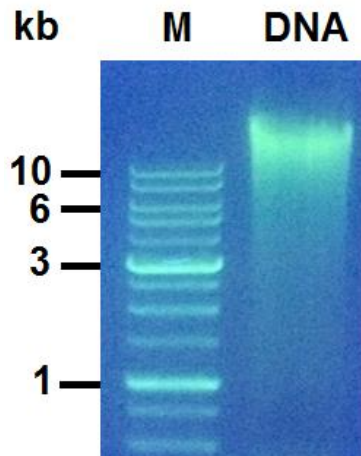
Phân tích trình tự gen *Folac3*

Trình tự nucleotide gen *Folac3* được so sánh và đối chiếu với trình tự gen laccase tương ứng *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287 sử dụng phần mềm Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), trình tự đoạn mã hóa exon và không mã hóa được xác định dựa trên trình tự khuôn mẫu gen laccase của *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287. Trình tự suy diễn amino acid của gen *Folac3* được thu nhận bằng công cụ protein translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>). Trình tự đoạn tín hiệu peptide được xác định bằng phần mềm SignalP 4.1 [8]. Các vị trí amino acid tham gia quá trình glycosyl hóa ở giai đoạn hoàn thiện sau dịch mã được xác định theo như mô tả của Gavel và cs. [4]. Cuối cùng, cấu trúc không gian 3D của protein mã hóa bởi *Folac3* được dự đoán bằng phần mềm Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 [5].

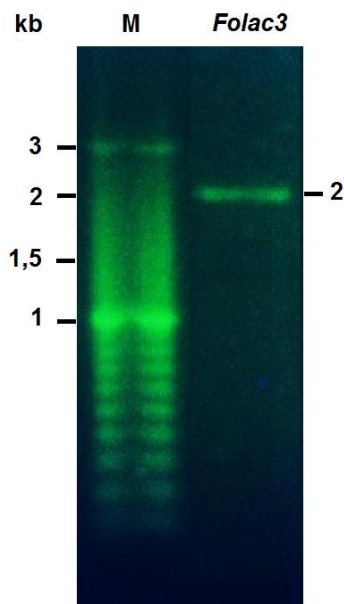
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tách chiết DNA tổng số

Để tạo nguồn nguyên liệu DNA khuôn mẫu khuếch đại gen *Folac3*, sinh khối *F. oxysporum* HUIB02 sau 3 ngày nuôi cấy được thu hồi và tách chiết DNA tổng số. Kết quả điện di DNA tổng số trình bày ở Hình 1 cho thấy có một band DNA với kích thước lớn hơn 10 kb với hàm lượng khoảng 400 ng/ μ L trên gel agarose. DNA tổng số ít bị đứt gãy và đủ chất lượng cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hình ảnh điện di DNA tổng số tách chiết từ *F. oxysporum* HUIB02
Đường M biểu diễn kích thước thước phân tử 1 kb chuẩn (Bioland Scientific, Mỹ);
đường DNA biểu diễn DNA tổng số của *F. oxysporum* HUIB02



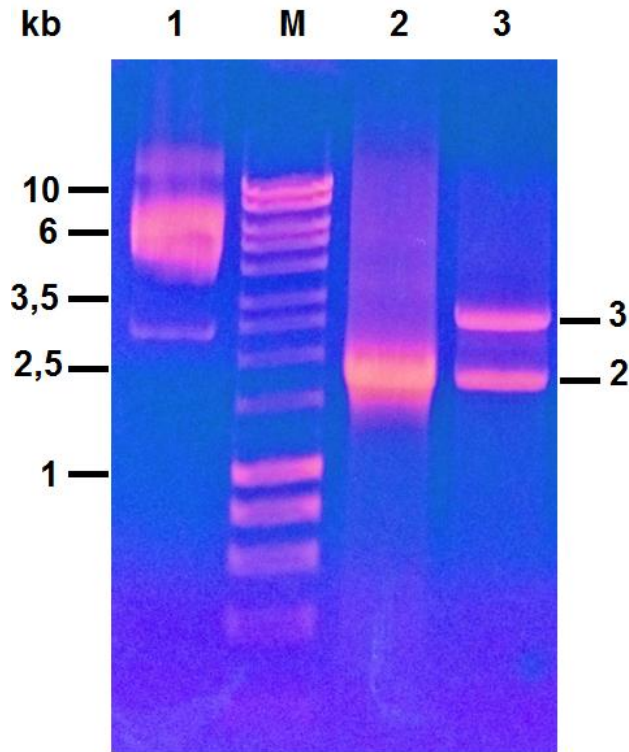
Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại PCR bằng cặp mồi đặc hiệu cho gen *Folac3*
Đường M biểu diễn kích thước thước phân tử chuẩn 100 bp (Biorad, Mỹ);
đường DNA biểu diễn DNA tổng số của *F. oxysporum* HUIB02

3.2 Khuếch đại gen *Folac3*

Để khuếch đại gen *Folac3* từ chủng *F. oxysporum* HUIB02, chúng tôi đã tiến hành thiết kế cặp primer đặc hiệu dựa trên trình tự nucleotide gen *Folac3* *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287. Kết quả phản ứng PCR cho thấy có sản phẩm khuếch đại với kích thước khoảng 2 kb tương đương kích thước gen *Folac3* của *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287 là 1957 bp. Do đó, sản phẩm PCR được phân tách và tinh sạch từ gel agarose 1 % tạo nguồn nguyên liệu cho bước tạo dòng và giải trình tự gen.

3.3 Tạo dòng gen *Folac3*

Sản phẩm PCR gen *Folac3* sau tinh sạch được gắn vào vector pGEM[®]T-Easy và biến nạp vào *E. coli* TOP10. Số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa LB có bổ sung Amp, IPTG và X-gal khoảng 50 khuẩn lạc đơn, trong đó 30 khuẩn lạc màu trắng. Vector pGEM[®]T-Easy có đặc điểm vị trí gắn sản phẩm PCR nằm giữa gen β -galactosidase. Do đó, sản phẩm PCR gắn thành công vào vector sẽ làm gián đoạn trình tự gen β -galactosidase dẫn đến *E. coli* TOP10 không sản xuất được enzyme β -galactosidase để chuyển hóa cơ chất X-gal. Trong khi đó, vector pGEM[®]T-Easy tự đóng vòng giúp *E. coli* TOP10 sản xuất enzyme β -galactosidase thủy phân X-gal và tạo thành sản phẩm có màu xanh lá cây khi được cảm ứng IPTG. Nhờ đặc điểm này mà các khuẩn lạc màu trắng thường chứa vector pGEM[®]T-Easy tái tổ hợp trong khi khuẩn lạc màu xanh chỉ chứa pGEM[®]T-Easy tự đóng vòng.



Hình 3. Hình ảnh điện di gel agarose 1 % vector tái tổ hợp pGEM[®]T-Folac3
 Đường M biểu diễn kích thước thước phân tử 1 kb chuẩn (Bioland Scientific, Mỹ);
 đường 1 biểu diễn vector tái tổ hợp pGEM[®]T-Folac3 tách chiết từ *E. coli* TOP10;
 đường 2 biểu diễn sản phẩm PCR gen Folac3 trên DNA khuôn mẫu là vector tái tổ hợp pGEM[®]T-Folac3;
 đường 3 biểu diễn sản phẩm phản ứng cắt vector tái tổ hợp pGEM[®]T-Folac3 bằng enzyme *EcoRI*.

Bảy khuẩn lạc màu trắng xuất hiện trên đĩa được chúng tôi kiểm tra bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu *Folac3* và điện di kiểm tra trên gel agarose 1 %. Chúng tôi đã chọn được khuẩn lạc có xuất hiện băng sản phẩm PCR với kích thước khoảng 2 kb (dữ liệu không trình bày). Sau đó, khuẩn lạc *E. coli* TOP10 chứa vector tái tổ hợp được nuôi cấy và tách chiết DNA plasmid. Kết quả trình bày ở Hình 3 cho thấy vector tái tổ hợp ở dạng đóng vòng có kích thước chính khoảng 5–6 kb, bên cạnh đó có band với kích thước khác như 3 kb. Sự sai khác này có thể 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 *Folac3* sử dụng DNA vector tái tổ hợp làm khuôn mẫu cho băng DNA với kích thước xấp xỉ 2 kb. Bên cạnh đó, cắt vector tái tổ hợp bằng enzyme cắt hạn chế *EcoRI* cho ra 2 băng DNA, trong đó 1 băng có kích thước 3 kb tương ứng với kích thước vector pGEM[®]T-Easy và băng có kích thước 2 kb tương ứng gen *Folac3*. Do vector pGEM[®]T-Easy có 2 vị trí nhận biết của enzyme cắt hạn chế *EcoRI* nằm ở 2 đầu của đoạn chèn, vì vậy khi sử dụng *EcoRI* để cắt vector tái tổ hợp luôn cho kết quả ít nhất 2 băng DNA trong đó có 1 băng có kích thước khoảng 3 kb. Các kết quả trên chứng minh gen *Folac3* đã được tạo dòng thành công vào vector pGEM[®]T-Easy.

3.4 Giải trình tự và phân tích đặc tính gen *Folac3*

Vector tái tổ hợp pGEM[®]T-*Folac3* sau tinh sạch được sử dụng làm khuôn mẫu để giải trình tự nu gen *Folac3* và được trình bày ở Hình 4. Kết quả cho thấy gen *Folac3* của chúng tôi có chiều dài 1957 nu bằng kích thước khuôn mẫu gen *lac3* của chủng *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287. Trình tự hoàn chỉnh gen *Folac3* được đăng ký trên ngân hàng gen Genbank với mã số KY825238.1. So sánh tương đồng với công cụ blast trên ngân hàng gen Genbank cho thấy *Folac3* tương đồng 99 % với gen *lac3* của chủng *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287. Hai gen có tổng số 17 nu khác nhau ở các vị trí 123, 446, 453, 602, 617, 630, 806, 930, 994, 998, 1071, 1170, 1232, 1316, 1617, 1847, 1886. Gen *Folac3* có hai vùng intron với chiều dài intron thứ nhất là 47 nu và intron thứ hai là 56 nu.

Gen *Folac3* mã hóa protein có chiều dài 617 amino acid (aa), tương đồng 98 % và có 10 amino acid sai khác so gen *lac3* của chủng *F. oxysporum* f. sp. lycopersici 4287 (Hình 5). Phân tích tìm kiếm tín hiệu peptide trên *Folac3* cho thấy không có tín hiệu peptide tồn tại [8], điều này cho thấy nhiều khả năng *Folac3* mã hóa enzyme laccase nội bào của *F. oxysporum*. Phân tích khả năng glycosyl hóa kiểu *N* cho thấy trình tự *Folac3* có 7 vị trí Asn-Xaa-Ser/Thr là những vị trí có khả năng liên kết với các gốc carbohydrate [4].

```

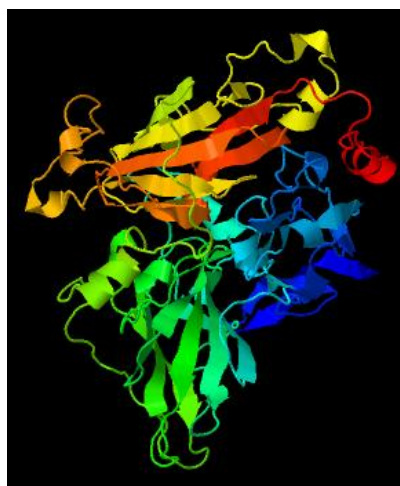
ATGGTCGCTCACGATGAAGAAGCCGATGCCTTGCTTGAGGAGTTTGAAGTGCAGAGAGGGTCAAGGTCC
GAGATGATCGAACCCCGCCTTCAGTGTGTCGCACGTGCGGTTGGAGATGGATAACAGCTCTTATCGTGGT
CGCACTACTATCGGCAATCGGGTCGTAGTGGTATTGCATGGTCCGTTAAGCAACCAAGTTCAGCGATGAT
GCTACCAGTCATCTTGGGTACCGACTCCATCCTCAGAGTCATGCATCACGTCCCCCAACAACAATCTT
TCAACTGGACTATTACAGCTGGGACCAGATCACCAGATGGAGTTGAGAAAAGAGTGTACCTTGTCAACA
TAAGGTCTCGTCAAGTATGGTGCATACACTCACTGACTTTTCGCAGATGAGTTTCCAGGACCCCTCATCG
AGGCCCCGGTCTGGTGACCGACTTGTAAATTCATATTCACAATGGCGTTCAAGATGAAGTGTATCTCTTCA
TTGGCACGGCTGCGCATGAAAGACCAGAACAGTGTGGACGGTGTCTGTTGGGTTTACACAATGTCTCTATC
GCTCCCCGGTAGAAGTTTTCACGTACAACCTTACCATTGGCGCTGAAGAACATGGGACCTTCTGGTGGCATC
CCCATTCCGATGTTCAACGTGCCGACGGCCTATGGGGAGGTCGTGATCGTACACTCACCAGATGAGATTGA
TTTGCAACGTGAAGAATACTACTCATGGTCCGGCAGCTGGTTTACCAGAATAACAACGGAAAGTACTACGC
TGATGCTGATGCGAGTAGTCGAGGAATGAACCCGTCAGATTTCATTGGTCAATGGTTCAGGGAC
GCTTCAACTGCTCCATGGCTGTTCTTCCGAGACAGTTGCTTGCTCTCAGGTCAGTTTAGTGACCTCAA
GCCCTCATGATGTCTAGGAGCCAGAAGAAGGCCAGACTTAGAGTTGTCAACACAGGCTCCGTCGCAGGC
CTTTCCCTAAGAGCTGGTGGAGCAATCATTCGACCAGTTCGCGTGGATGGAGGCTTCGCTGTCAAAGCTG
AAGCTACTGAAACAGTTGGTAATCTCTATCCTGGTGAGAGAGTTGACCTCGAGGTTGAGTGGAAAGGGGAA
CCACGCGGGAGACCATCGGCTGACCGTTTATCTTGATGACGAGTGCGTTACTATCTGTTTCACTATTGGT
AGAGATGGGAGGCTAACCAGCTTGGCAGAAACTTTGGCTATCCAACCCAGCACTTAACCCAACCCAAAG
CTTCCCAATGTTTCAGCTCAAGCACAAAGGAATCATCCAATGAACCTGTTCTCAGCCTTTGGAACAAGAT
GAGATCCAAGTCTTGCATCGCATAATCTCAAAGCCGCAACGAAGGTATCGGACCTCCAGCAAAAGGCAG
AACAGACTATCTGCTTACGCTAAGGTTGAGAAGCTGGCGCACATGGACTATGCACCAAGTTCGGATTTCAT
CAATCATACTCCTGGACGCCACAACTCCACCTTTACTGGCTCAAAACCGGACTTCATGGGACGAGAAC
CAACTCATCCCATTTATCGGGATATCAGACAGCAAACCGAAGAGAGTGCACATCGTCATCAACAACCTGG
ATGATGGCGCGCATCCGTTTCATCTTCATGGACATTCATTCTACGTTCTATCATCATACCGAAATCCAGG
TCGTGGGAGCTGGGGCAGTTATAATCCGTACACAGACGAGGCGCCACCGAACGGCTTGAATCTTGAGTTT
CCGGTGCGAAGGGATACTGTGAGTGTACCACGGCGCGGTCTATGTCGTGTTGGCGTTGGTGGCTGATAACC
CGGGAATATGGGCGTTGCATTGCCACACGCTTGTTTACATGGCGGGGATGGCGATGGGGTTACGTGT
TGGCGATATCGAGGATCCAGAGCATGTAGGCTCGGTAGATGTGCGGGCGGCGGAGTTATGTGAGTAA

```

Hình 4. Trình tự nucleotide gen *Folac3* phân lập từ chủng *F. oxysporum* HUIB02
Trình tự vùng không mã hóa intron được chú thích bằng chữ màu trắng trên nền đen.

HUIB02 4287	MVAHDEEADALLEEFELREEVKVRDDRTPPSVCRTCGRWIT ^W TALIVVALLSAIGVVVVLH MVAHDEEADALLEEFELREEVKVRDDRTPPSVCRTCGRW ^C MTALIVVALLSAIGVVVVLH	60 60
HUIB02 4287	GPLSNQLSDDATSHLGYRLHPQSHASRPPTQS ^F NWTITAGTRSPDGVEKRVYLVNNEFP GPLSNQLSDDATSHLGYRLHPQSHASRPPTQS ^F NWTITAGTRSPDGVEKRVYLVNNEFP	120 120
HUIB02 4287	GPLIEARSGDRLVIH ^I HNGVQDEGVSLHWHGLRMKDQNSVDGAVGFTQCPIAPGRSFT ^Y N GPLIEARSGDRLVIH ^V HNGVQDEGVSLHWHGLRMKDQNSVDGAVGFTQCPIAPGRSFT ^Y N	180 180
HUIB02 4287	^F TIGAEEHGT ^F FWWH ^P HS ^D VQ ^R ADGLWGGLIVHS ^P DEIDLQREEYLLMVGDFWHQ ^N Q ^T EV ^L ^F TIGAEEHGT ^F FWWH ^S HS ^D VQ ^R ADGLWGGLIVHS ^P DEIDLQREEYLLMVGDFWHQ ^N Q ^T EV ^L	240 240
HUIB02 4287	RWYADASSRGNEPVPD ^S LLVNGQGR ^F NC ^S MAV ^P PARPVACSQVQ ^F SDLKPLMMSR ^S Q ^K KAR RWYADASSRGNEPVPD ^S LLVNGQGR ^F NC ^S MAV ^P PARPVACSQVQ ^F SDLKPLMMSR ^C Q ^K KAR	300 300
HUIB02 4287	LRVVNTGSVAGLSLR ^V GGAI ^I RPV ^R VDGGFAVKAEATE ^T VG ^N LYPGERVDLEVEW ^K GNHA LRVVNTGSVAGLSLR ^V GGAI ^I RPV ^R VDGGFAVKAEATE ^T VG ^I LYPGERVDLEVEW ^K GNHA	360 360
HUIB02 4287	GDHRLTVYLDDENFGY ^P NPAL ^N PT ^Q SFPMFSSSTKES ^S NEPVPQ ^P LEQ ^D EIQVLD ^S HN ^L K GDHRLTVYLDDENFGY ^S NPAL ^N PT ^Q SFPMFSSSTKES ^S NEPVPQ ^A LEQ ^D EIQVLD ^S HN ^L K	420 420
HUIB02 4287	AATKVS ^D LPAKAE ^Q TILLYAKVEKLAHMDYAPVGF ^I NHT ^S WTP ^Q TP ^P LLAQ ^N R ^T SWDEN ^Q AATKVS ^D LPAKAE ^Q TILLYAKVEKLAHMDYAPVGF ^I NHT ^S WTP ^Q TP ^P LLAQ ^N R ^T SWDEN ^Q	480 480
HUIB02 4287	LIPFIGISDSKPKRVDIVIN ^N LDG ^A HPFHLHGHSFYVLS ^S SYRNPGRG ^S WGSYNPYT ^D E ^A LIPFIGISDSKPKRVDIVIN ^N LDG ^A HPFHLHGHSFYVLS ^S SYRNPGRG ^S WGSYNPYT ^D E ^A	540 540
HUIB02 4287	PPNGLNLEFPVRRD ^T VSVP ^R RGHVVLALVADNPGI ^W ALHCH ^T LVHMARGMAMGL ^R VGDIE PPNGLNLEFPVRRD ^T VSVP ^R RGHVVLALVADNPGI ^W ALHCH ^M LVHMARGMAMGL ^R VGDIE	600 600
HUIB02 4287	DPEHVGSDVRAAELCE 617 DPEHVGSDVRAAELCE 617	

Hình 5. So sánh trình amino acid suy diễn gen *Folac3* của chủng *F. oxysporum* HUIB02 và chủng *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287
 Các vị trí amino acid sai khác được biểu diễn bằng chữ màu trắng trên nền đen. Các vị trí glycosyl hóa kiểu N được đóng trong khung chữ nhật.



Hình 6. Mô hình cấu trúc không gian 3 chiều *Folac3* *F. oxysporum* HUIB02
 Mô hình cấu trúc không gian *Folac3* được xây dựng dựa trên mô hình cấu trúc của enzyme oxi hóa nhân đồng *Fet3p* của *Saccharomyces cerevisiae*. 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.

Kết quả sử dụng phần mềm phân tích cấu trúc protein tương đồng và nhận diện các vùng chức năng cho thấy Folac3 có cấu trúc tương tự enzyme oxi hóa nhân đồng Fet3p ở *Saccharomyces cerevisiae* với độ tin cậy 100 % [13]. Dựa trên cấu trúc không gian của protein Fet3p ở *Saccharomyces cerevisiae* (mã số PDB 1ZPU) cấu trúc không gian của Folac3 đã được xây dựng và trình bày ở Hình 6. Kết quả cho thấy cấu trúc bậc 2 dự đoán của Folac3 có 6 vị trí gập cuộn xoắn α và 30 vị trí gập cuộn phiến β .

4 Kết luận

Chúng tôi đã phân lập gen *Folac3* mã hóa laccase từ DNA tổng số của chủng nấm *F. oxysporum* HUIB02 bằng cặp primer đặc hiệu. *Folac3* có chiều dài 1957 nu với 3 vùng exon và 2 vùng intron. Trình tự amino acid suy diễn có chiều dài 617 aa. Độ tương đồng trình tự nucleotide và amino acid *Folac3* lần lượt là 99 % và 98 % khi so sánh với trình tự nucleotide và amino acid của gen laccase từ chủng *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. Kết quả phân tích đặc tính protein bằng các phần mềm tinh sinh học cho thấy Folac3 không có trình tự tín hiệu peptide và có 7 vị trí glycosyl hóa kiểu N. Do đó, Folac3 có thể là enzyme nội bào ở *F. oxysporum*. Folac3 được dự đoán có cấu trúc và chức năng tương tự enzyme oxi hóa nhân đồng của *Saccharomyces cerevisiae*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ từ Đại học Huế qua đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở (mã số DHH 2018-15-09).

Tài liệu tham khảo

1. Canero D. C., Roncero M. I. (2008), Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 98(5): 509-518.
2. Chen Y. C., Kidd B. N., Carvalhais L. C., Schenk P. M. (2014), Molecular defense responses in roots and the rhizosphere against *Fusarium oxysporum*. *Plant signaling & behavior* 9(12): e977710.
3. Forootanfar H., Faramarzi M. A. (2015), Insights into laccase producing organisms, fermentation states, purification strategies, and biotechnological applications. *Biotechnology Progress* 31(6): 1443-1463.
4. Gavel Y., von Heijne G. (1990), Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein engineering* 3(5): 433-442.
5. Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., Sternberg M. J. (2015), The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols* 10(6): 845-858.
6. Kwiatos N., Rynhajlo M., Bielecki S. (2015), Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. *Frontiers in microbiology* 6: 933.
7. Mikolasch A., Schauer F. (2009), Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(4): 605-624.
8. Nielsen H. (2017), Predicting Secretory Proteins with SignalP. *Methods in molecular biology* 1611: 59-73.
9. Piscitelli A., Pezzella C., Giardina P., Faraco V., Giovanni S. (2010), Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioengineered bugs* 1(4): 252-262.

10. Pollegioni L., Tonin F., Rosini E. (2015), Lignin-degrading enzymes. *The FEBS journal* 282(7): 1190-1213.
11. Reyes-Medina M. A., Macias-Sanchez K. L. (2015), GTPase Rho1 regulates the expression of xyl3 and laccase genes in *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology letters* 37(3): 679-683.
12. Sambrook S., Russell D. W. (2003), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
13. Taylor A. B., Stoj C. S., Ziegler L., Kosman D. J., Hart P. J. (2005), The copper-iron connection in biology: structure of the metallo-oxidase Fet3p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43): 15459-15464.
14. Upadhyay P., Shrivastava R., Agrawal P.K. (2016), Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech* 6(1): 15.
15. Virk A.P., Sharma P., Capalash N. (2012), Use of laccase in pulp and paper industry. *Biotechnology Progress* 28(1): 21-32.
16. Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A. P., Narasimha G. (2014), Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme research* 2014: 163242.

CLONING AND SEQUENCING LACCASE 3 (*Folac3*) FROM *FUSARIUM OXYSPORUM*

Dang Thi Thanh Ha¹, Le Kim Tuan², Dinh Thi Kim Thien³, Pham Thi Ngoc Lan³,
Hoang Tan Quang², Tran Thuy Lan², Nguyen Duc Huy^{2*}

¹Tay Nguyen University, 567 Le Duan, Ea Tam, Buon Ma Thuot city, Đak Lak, Viet Nam

²Institute of Biotechnology, Hue University, Road 10, Phu Vang, Thua Thien Hue, Vietnam

³Hue University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

Abstract. Laccases belong to the multi-copper oxidases family and catalyze the oxidation of a wide range of aromatic compounds in the presence of oxygen. Laccases have been widely used in various industries, especially in textiles and dyes industries, and the treatment of environmental pollutants. Laccase encoding gene from ascomycete fungus *F. oxysporum* HUIB02 was isolated through the PCR amplification using specific primers, resulting in a PCR product of 2 kb. The PCR product was cloned and sequenced. The result indicated *Folac3* had a length of 1957 nu which comprised of 3 exons and 2 introns as well as encoded for a 617 aa protein. The primary analysis of the protein structure showed that *Folac3* was an intracellular protein without a signal peptide sequence with 7 positions for *N*-glycosylation. The secondary structure analysis revealed that *Folac3* had 6 α helices and 30 β sheets, while three dimension structure analysis showed that *Folac3* was highly identical with a multi copper oxidase from *S. cerevisiae*. Our results would provide an important genetic source for further study on the heterologous expression as well as the application of recombinant laccase.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, laccase, *Folac3*, cloning