

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5380083

(รหัสโครงการ)

Project Title : Molecular cloning and expression of laccase gene from *Lentinus polychrous* Lév.

(ชื่อโครงการ) การโคลนและการแสดงออกของยีนแลคเคสจากเชื้อเห็ดหลิน

Investigator : Rakrudee Sarnthima Mahasarakham University

(ชื่อนักวิจัย) รักฤดี สารธิมา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

E-mail Address : rakrudee.s@msu.ac.th

Project Period : 2 ปี (15 มิถุนายน 2553 ถึง 14 มิถุนายน 2555)

(ระยะเวลาโครงการ)

A highly efficient laccase-producing mushroom isolated from northeastern forest, Thailand was identified as *Lentinus polychrous* by its morphology and spores and by comparison of its internal transcribed spacer (ITS) rDNA gene sequence. The complete cDNA encoding laccase (*LP-Lac1*) from this white rot fungus was amplified by RACE-PCR, cloned and expressed in the culture supernatant of *Pichia pastoris*. The coding region consisted of 1,560 bp and encodes a protein of 495 amino acids with a signal peptide of 24 amino acids. The deduced amino acid sequence of the matured protein (LP-Lac1 protein) displayed high homology with laccase C ([AAW28938.1](#)) and laccase B ([AAW28937.1](#)) of *Trametes* sp. 420 with 81% and 80% respectively. It also contained 4 copper-binding conserved domains of typical laccase protein. The conserved domains of LP-Lac1 protein were predicted and analyzed with Conserved Domain Database (CDD). It revealed that LP-Lac1 protein contained typical conserved domains of multicopper oxidases. The calculated molecular mass is 55.6 kDa and isoelectric point of 4.72. There are 5 Cys residues presence in the deduced mature protein. Compared with other reported laccases, it can be concluded that Cys-475 is a ligand to the type-1 copper domain. Cys-109 and Cys-510 form disulfide bond, and Cys-141 and Cys-228 form the disulfide bond. Typical laccases are glycoproteins. LP-Lac1 protein has 8 potential *N*-glycosylation sites (Asn-x-Ser/Thr), at positions 78, 203, 231, 274, 362, 366, 403 and 458 of the deduced protein. *LP-Lac1* cDNA was cloned into pPICZαB, and then expressed in *P. pastoris* GS115 strain under the inducible AOX promoter. However, low production was obtained with the expression construct containing laccase cDNA with its own signal and propeptide sequences. Further study of expression condition require for increasing the recombinant laccase yield by addition of laccase inducer, copper sulfate to the production medium and varying the temperatures.

เชื้อเห็ดลมที่ผลิตแลคเคสที่มีศักยภาพสูงคัดแยกมาจากป่าในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้รับการจำแนกอนุกรมวิธานจัดเป็น *Lentinus polychrous* โดยการวิเคราะห์รูปร่างลักษณะภายนอก ลักษณะและขนาดสปอร์ และโดยการเปรียบเทียบลำดับยีนบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของ rDNA ยีนที่โค๊ดสำหรับแลคเคสโดยสมบูรณ์จากเชื้อเห็ดลมนี้ได้มาโดยเทคนิค RACE (Rapid amplification cDNA ends) ถูกโคลนและทำการแสดงออกในยีสต์ *Pichia pastoris* open reading frame ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,560 bp ถอดรหัสเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 495 ตัว และมีเปปไทด์สัญญาณ (Signal peptide) ที่มีจำนวนกรดอะมิโน 24 ตัว โปรตีนสมบูรณ์นี้ (LP-Lac1 protein) มีความคล้ายคลึงมากกับ laccase C ([AAW28938.1](#)) และ laccase B ([AAW28937.1](#)) จากเชื้อราไวท์รอต *Trametes* sp. 420 ด้วยเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 81% และ 80% ตามลำดับ โปรตีนนี้มีบริเวณจับอะตอมทองแดงครบ 4 บริเวณเหมือนกับแลคเคสทั่วไป บริเวณอนุรักษณ์นี้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนกลุ่ม multicopper oxidases ทำนายได้ว่าโปรตีนมีขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 55.6 kDa และมีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.72 ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนที่สำคัญ 5 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนแลคเคสอื่นๆในฐานข้อมูล คาดว่า Cys-475 เป็นลิแกนด์สำหรับ type-1 copper และคาดว่าเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง Cys-109 กับ Cys-510 และ Cys-141 กับ Cys-228 และพบตำแหน่งที่คาดว่าจะมีคาร์โบไฮเดรตมาเกาะอยู่ 8 ตำแหน่ง คือกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 78, 203, 231, 274, 362, 366, 403 และ 458 เมื่อนำแลคเคสยีน *LP-Lac1* cDNA มาแสดงออกในยีสต์ *P. pastoris* strain GS115 ภายใต้การเหนี่ยวนำของ AOX promoter พบว่ามีการแสดงออกของยีนแลคเคสในระดับต่ำ ในการทดลองต่อไปจะทำการเติมคอปเปอร์ซัลเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำการผลิตแลคเคส และการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแสดงออก

Keywords : laccase, identification, cloning, expression, *Lentinus polychrous*

(คำหลัก) แลคเคส การจัดจำแนก การโคลนยีน การแสดงออกของยีน เห็ดลม