แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

ชื่อชุดโครงการวิจัย การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตพลังงานทดแทนจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การโคลนยีนแลคเคสที่ควบคุมการย่อยสลายลิกนินทางชีวภาพโดยใช้เทคโนโลยีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

(ภาษาอังกฤษ) Cloning of Laccase gene for lignin biodegradation using recombinant DNA technology.

คณะผู้ดำเนินงาน นางสาวภรณี สว่างศรี
นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ
นางสุภาวดี ง้อเหรียญ
นางสาวรุ่งนภา พิทักษ์ตันสกุล
นางบุญเรือนรัตน์รัตน์ เรืองวิเศษ
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จ.ปทุมธานี โทร. 02 – 9046885 – 95

บทคัดย่อ

แลคเคส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินสามารถผลิตโดยเชื้อราขาว *Ganoderma* การทดสอบการผลิตเอนไซม์แลคเคสในอาหารเหลวที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวเหนี่ยวนำสำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคส งานวิจัยนี้ได้คัดเลือกเชื้อ *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดีที่สุด เมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) และเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูลใน GanBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Ganoderma lucidum* ที่ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อโคลนยีนแลคเคสจากเชื้อ *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 โดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าชิ้นยีนแลคเคสที่ได้มีขนาด 1,563 คู่เบส ซึ่งมีลำดับของเพปไทด์ เท่ากับ 520 อะมิโนแอซิด การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการเชื่อมต่อชิ้นยีนแลคเคสเข้ากับ expression vector pLATE52 และถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* BL21 (DE3) ทดสอบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการชักนำด้วยสาร IPTG และวิเคราะห์รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคเคสด้วยวิธี SDS-PAGE

คำหลัก: แลคเคส การโคลนยีน เอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ

รหัสการทดลอง
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร รังสิต ธัญบุรี ปทุมธานี 12110 ประเทศไทย
Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Patumthani, 12110, Thailand

Abstract

Laccase is one of the ligninolytic enzymes of white rot fungus *Ganoderma.* Laccase producing of the isolates were tested in liquid media containing inducer, 1% (w/v) lignin as a carbon source was found to be the most efficient substrate for laccase production. *Ganoderma* sp. G1-1 was found to be the most efficient laccase-producing strains. *Ganoderma* sp. G1-1 was identified by partially sequenced and analyzed using the internal transcribed spacer. The sequenced result was exhibited as *Ganoderma lucidum* (100% similarity) with other fungal ITS sequences in the GanBank database. In other experiment, laccase gene of *Ganoderma* sp. G1-1 isolate was obtained by using RT-PCR for gene cloning technique and the full length nucleotide approximately 1,563 bp and peptides (520 amino acids) were further analyzed. Laccase gene could be overexpression within the expression vector pLATE52 and the recombinant was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The production of recombinant protein can be induced by 1 mM IPTG. The recombinant laccase was analyzed by SDS-PAGE.

Key word: Laccase, Cloning, liniolytic enzyme, recombinant DNA

คำนำ

ปัจจุบันความตระหนักถึงความยั่งยืนด้านทรัพยากรอาหาร พลังงาน และสิ่งแวดล้อม มีมากขึ้นอันเนื่องมาจากสภาวการณ์ของโลกที่เปลี่ยนแปลงไป นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 2010 ทุกประเทศทั่วโลกเริ่มให้ความสนใจกับการใช้ประโยชน์จากชีวมวลจำพวกลิกโนเซลลูโลส เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากโรงเรือน ภาคการเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ เศษวัสดุจาการเกษตร (ซังข้าวโพด, กากชานอ้อย) วัสดุเหลือทิ้งจากไม้ (ขี้เลื่อยจากทั้งไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็ง) ขยะจากกระบวนการแปรรูปอาหาร และเศษกระดาษ ฯลฯ ซึ่งชีวมวลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตพลังงานเอทานอล เซลลูโลสบริสุทธ์ และเยื่อกระดาษ เป็นต้น นับเป็นการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่าสูงสุด

ลิกนิน เป็นองค์ประกอบของชีวมวลลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนที่ย่อยสลายและกำจัดได้ยากที่สุด เนื่องจากมีองค์ประกอบของโครงสร้างที่เป็น phenyl propane เชื่อมต่อกันด้วยพันธะหลายชนิดสานต่อกันอย่างไม่มีระเบียบทำให้มีโครงสร้างที่ซับซ้อน (Crawford, 1981) แทรกอยู่ที่ผนังเซลล์ของพืช ทำให้ถูกย่อยสลายได้ยาก ในกระบวนการผลิตจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอน pretreatment เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้น ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากชีวมวลลิกโนเซลลูโลสจึงจำเป็นต้องมีขั้นตอน pretreatment เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้นและเพื่อกำจัดส่วนของลิกนินออก เทคโนโลยีการกำจัดลิกนินที่ใช้กันทั่วไปมักจะอาศัยปฏิกิริยาทางกายภาพ หรือทางเคมี (กรด, ด่าง) ซึ่งมักจะปลดปล่อยสารตกค้างในปนเปื้อนมาในสภาพแวดล้อม เนื่องจากสารดังกล่าวเป็นพิษต่อคน สัตว์และพืช อีกทั้งยังย่อยสลายได้ยาก การย่อยสลายลิกนินด้วยวิธีทางเคมีมักทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีที่เป็นอันตรายซึ่งต้องถูกจำกัดให้อยู่ในค่ามาตรฐาน ทั้งยังกำจัดลิกนินออกได้เพียงบางส่วนเท่านั้น หลาย

ประเทศจึงพยายามใช้วิธีทางชีวภาพมากขึ้น Avgerinos and Wang (1983) รายงานการย่อยสลายลิกนินทางเคมีโดยใช้สารละลายด่างที่มีความเข้มข้น 5 % และที่อุณหภูมิสูง 130-280 องศาเซลเซียส หรืออาจใช้สารทำให้เกิดการออกซิไดส์ได้ เช่น H_2O_2, NaCl, O_2 เป็นต้น (Gould, 1984) แต่การย่อยสลายทางเคมีนี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่รุนแรงและใช้อุณหภูมิสูง รวมทั้งมีการตกค้างของสารเคมีอันตรายด้วย ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาการย่อยสลายลิกนินโดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวภาพจากเชื้อจุลินทรีย์ (เอนไซม์) เพราะปฏิกิริยาไม่รุนแรง เหมือนปฏิกิริยาเคมี ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมยั่งยืน และการลงทุนถูกกว่าวิธีทางกายภาพ โดยมีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกนินในด้านต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร (เบียร์, ไวน์) การผลิตเยื่อกระดาษ การผลิตเซลลูโลสบริสุทธิ์ การใช้เป็นสารชีวบำบัดภัณฑ์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ปิโตรเคมี และกำจัดสารเคมีตกค้างทางการเกษตรในสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการผลิตพลังงานเอทานอลจากชีวมวลเซลลูโลส ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากความสามารถของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสให้มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือใช้ให้กลับมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่ามากยิ่งขึ้น

แลคเคส (laccase) เป็นเอ็นไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม extracellular glycoprotein สามารถย่อยสลายสารทั้งพวก phenolic และ non-phenolic compounds เช่น guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol, p-phenylene diamine, syringaldizine (N,N'-bis(3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzy–lidenehydrazine)) และ ABTS (2,2'-azinbis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) จากการทดลองสกัดแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าเป็น isoenzyme เนื่องจากมีการดัดแปลงโมเลกุลเพื่อความสมบูรณ์เหมาะต่อ extracellular location ที่แตกต่างกัน โดยมีการตัดสายของ polypeptide หรือเติมหมู่คาร์โบไฮเดรต เอ็นไซม์นี้มีขนาด 60-80 kDa ประกอบด้วย 520-550 กรดอะมิโน มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ 15-20% และมี copper 2-4 อะตอมต่อโมเลกุลของเอ็นไซม์

เอ็นไซม์แลคเคสสามารถย่อยสลาย lignin model compounds และ phenolic hydroxyl ได้เป็น phenoxy radicals โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอน กลุ่มราที่สามารถผลิต laccase ได้ดีคือ *Trametes* (*Polyporus*, *Coriolus*) *versicolor* (Bollag and Leonowicz, 1984) *Pleurotus ostreatus* (Sannia *et al*., 1986) white-rot fungi ที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium*, *Tremates* sp.,*Cerporiopsis subvermispora*, *Phebia radiata*, *Pycnoporous* sp, *Coriolopsis rigida*, *Pleurotus* sp., *Garnoderma lucidum*, *Nematoloma frowardii*, *Cyathus stercoreus* และ *Bjerkandera* spp. เป็นต้น (Kirk and Farrell, 1987) โดย Kirk *et al.* (1980) รายงานว่า การผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อรา white – rot เพื่อย่อยสลายลิกนิน พบว่าช่วยประหยัดพลังงานและสารเคมี ในระบบการผลิตเยื่อโดยชีววิธี แต่การเลี้ยงเชื้อเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์แลคเคสโดยตรงนั้นมีข้อจำกัดมากมาย อาทิเช่น การเลี้ยงเชื้อราเพื่อการผลิตเอนไซม์ต้องเร่งให้เชื้อราเติบโตได้ในปริมาณมาก จึงมีข้อจำกัดในเรื่องสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในสารละลายปริมาณสารอาหารที่จำกัดทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และปริมาณ inducer บางชนิด จากนั้นจึงค่อยปรับสภาวะเพื่อกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องให้มากขึ้น เพื่อทำการย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลใหญ่ โดยที่ไม่คำนึงถึงการป้อนแหล่งคาร์บอนสำหรับการสร้างเซลล์ นอกจากสภาวะที่กระตุ้นให้มีการผลิตเอนไซม์แล้ว การย่อยสลายลิกนินจำเป็นต้องมีสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ซึ่งอาจจะไม่ใช่สภาวะ

เดียวกับการผลิตเอนไซม์ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ถูกผลิตขึ้น ได้แก่ ชนิดของสารอาหาร ค่า pH, อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้นค่อนข้างนาน 1-2 สัปดาห์ จึงทำให้การนำจุลินทรีย์ไปใช้ทำงานโดยตรงนั้นทำได้ยาก

ดังนั้นการนำเทคนิครีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอมาช่วยในการผลิตเอนไซม์แลคเคส จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ให้สามารถผลิตได้ในปริมาณที่มากและรวดเร็วกว่าการผลิตจากจุลินทรีย์โดยตรง ซึ่งจะสามารถนำไปใช้ในการลดปัญหาการสะสมของสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายจากกระบวนการย่อยกำจัดลิกนินในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมถึงการรองรับการส่งเสริมการผลิตเอทานอลจากชีวมวลเซลลูโลสของภาครัฐในอนาคตอีกด้วย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากจุลินทรีย์และศึกษาการแสดงออกของยีนแลคเคสและรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ในเซลล์ *E. coli*

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
2. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (Thermal Cycle 9700)
2. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310 Genetic Analyzer
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
5. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (incubator shaker)
6. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส
7. ชุดถ่ายภาพเจล Gel Documentation
8. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ ไมโครปิเปต ขนาด P1,000 P200 P20 และ P2 ไมโครลิตร
9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ
10. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
12. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน T&A Cloninng Kit ® (RBC Bioscience)
13. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)
16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α, BL21(DE)
17. Expression Vector : aLICator LIC Cloning and Expression system (Thermo Scientific)
18. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
19. ไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR ได้แก่

- ไพรเมอร์ สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) : ITS1 (forward), ITS4 (reverse)
- ไพรเมอร์ ยีนแลคเคส (laccase gene) : lccG-F (forward), lccG-R (reverse)
- ไพรเมอร์ T&A Cloninng vector : M13-F (forward), M13-R (reverse)
- ไพรเมอร์ aLICator LIC Cloning and Expression system : LIC Forward, LIC Reverse

21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จาก http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
    - โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
    - โปรแกรม ChromasPro version 1.33 จาก http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html
    - โปรแกรม NEBcutter2 จาก http://tools.neb.com/NEBcutter2/
22. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ
    - enrichment medium (LBM), Screening medium
    - Luria-Bertani (LB)
    - LB-Ampicillin/IPTG/X-Gal

วิธีการ

1. การคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

เตรียมอาหาร LBM สำหรับใช้ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์แลคเคส ซึ่งประกอบด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ ดังนี้ KH_2PO_4 จำนวน 1.00 กรัม $C_4H_{12}N_2O_4$ 0.50 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.50 กรัม $CaCl.2H_2O$ 0.01 กรัม Yeast Extract 0.01 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ 0.001 กรัม $Fe(SO_4)3$ 0.001 กรัม และ $MnSO_4.H_2O$ 0.001 กรัม ลิกนิน 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ หลังจากนั้นเติม 20% glucose solution ที่ผ่านการกรองด้วย filter membrane ขนาด 0.2 ไมครอน (1 ml ต่ออาหาร LBM ปริมาตร 100 ml)

นำเชื้อรา จำนวนทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท ได้แก่ *Ganoderma* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท (หลินจือ และ G1-1) และ *Rigidoporus* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท (R.1-8) มาเลี้ยงเพื่อกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินในอาหารเหลว LBM ที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1 % นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 rpm นาน 7 วัน หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนใส (crude enzymes) มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็งที่มีสารบ่งชี้ ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)] บันทึกผลการตรวจวัดปฏิกิริยาบนอาหาร ABTS หากมีการผลิตเอนไซม์ Laccase จะมีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเขียว แต่หากไม่มีการสร้าง Laccase จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ดีที่สุด

2. การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยเทคนิคชีวโมเลกุล

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์แลคเคส ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่มีแผ่นกระดาษแก้ววางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 5-7 วัน ขูดเส้นใยของเชื้อราประมาณ 0.1-0.3 กรัม ใส่โกร่งบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด เติม Extraction buffer ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 6 ไมโครลิตร บดให้เข้ากันอีกครั้ง เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ผสมทุกๆ 10 นาทีด้วยเครื่อง Vortex เติม chloroform : isoamylalcohol (24:1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาช้าๆ นาน 5 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc 0.3 เท่า และ isopropanol 0.6 เท่า ของปริมาตรน้ำใส ผสมให้เข้ากันเบาๆ แช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย washing solution 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลาย ดีเอ็นเอด้วย TE buffer : RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) (25:1) 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer (PERKIN ELMER MBA2000) ที่ความยาวคลื่น A260/A280 ให้อยู่ในช่วง 1.8-2.0 และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส (Agarose gel electropholesis) โดยการหยอดดีเอ็นเอลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที แช่แผ่นวุ้นในเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อรา ด้วยคู่ไพรเมอร์ ดังนี้

Forward : ITS1 5’-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3’

Reverse : ITS4 5’-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3’ (Daniel and Jorge, 2007)

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ต่อ 1 หลอด PCR ดังนี้

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS1 (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ ITS4 (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

หลังจากนั้นนำหลอด PCR เข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีอุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
55 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส โดยวิธี Electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และ loading dye 1 ไมโครลิตร แยกผลผลิต PCR ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์

2.3 การเตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์ และการตรวจวิเคราะห์ผล

เตรียมผลผลิต PCR ให้บริสุทธิ์โดย นำผลผลิต PCR ที่เหลือจากจากข้อ 2.2 ปริมาตร 17 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAc ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร และ 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 85 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ระหว่างนี้นำมาผสมโดยพลิกกลับหลอดไปมาทุก 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน PCR ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย ddH_2O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ โดยวิธี Electrophoresis บน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel (ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร)

2.4 การหาลำดับเบสในส่วนของบริเวณ ITS

2.4.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ITS1/(ITS4) (5 ไมโครโมลาร์)	1.6	ไมโครลิตร
dH_2O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) อุณหภูมิ เวลา จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

2.4.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 2.4.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยเติม stock solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ Ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

2.4.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ย้ายลงน้ำแข็งทันที

2.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

นำตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.4.3 เข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

3. การโคลนยีนแลคเคส

3.1 การกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคส

นำเชื้อรา *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์แลคเคส ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคสเพื่อย่อยสลายลิกนิน ในอาหารเหลว LBM ที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1% [KH_2PO_4 1.00 กรัม $C_4H_{12}N_2O_4$ 0.50 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.50 กรัม $CaCl.2H_2O$ 0.01 กรัม Yeast Extract 0.01 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ 0.001 กรัม $Fe(SO_4)3$ 0.001 กรัม และ $MnSO_4.H_2O$ 0.001 กรัม ลิกนิน 10 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ หลังจากนั้นเติม 20% glucose solution ที่ผ่านการกรอง (1 ml ต่ออาหาร LBM ปริมาตร 100 ml)] นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 rpm นาน 7 วัน กรองเอาเฉพาะส่วนของเส้นใย เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัด total RNA จากเชื้อรา

นำเส้นใยเชื้อรา *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 ที่ผ่านการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคส ในข้อ 3.1 นำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลว และใช้ชุดน้ำยาสกัด total RNA สำเร็จรูป PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen) โดยเติม lysis buffer 600 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ 500 ไมโครลิตร เติม 70% เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ดูดน้ำใสใส่ Spin Cartridge ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 นาน 15 วินาที เทน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำจนหมด ล้างด้วย washing buffer I ปริมาตร 700

ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 วินาที ทิ้งหลอดและน้ำใส นำ Spin Cartridge ใส่หลอดใหม่ เติม washing buffer II ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ที่เติม ethanol แล้ว) ลงใน Spin Cartridge ปั่นเหวี่ยง Spin Cartridge ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 - 2 นาที เพื่อให้แผ่น membrane ที่จับ RNA แห้ง นำ Spin Cartridge ใส่ในหลอดใหม่ เติม RNase free water ปริมาตร 30-100 ไมโครลิตร บ่มไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยง Spin Cartridge ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที เก็บส่วนของ RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3 การเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA และทำปฏิกิริยา PCR

นำ total RNA จากข้อ 3.2 มาทำปฏิกิริยา Reverse Transcriptase PCR ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป SuperScript™ III One-Step RT-PCR system (Invitrogen) โดยการเปลี่ยนสาย RNA ให้เป็น cDNA ในขั้นตอนแรกที่อุณหภูมิ 45°C แล้วจึงทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนแลคเคส โดยทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 µl มีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ 2X Reaction Mix, 10 µM Primer lccG-F 5’ ATGGCGAAGTTCCAATCGTTGCTCTCCTGCGTCACCCTTC 3’ และ lccG-R 5’ TCAGTGATCATCAGCCGAGAGCGCATCGTACGTCGGGC 3’ 0.01 pg - 1 µg RNA Template, SS III RT PLATINIUM TAQ Mix, น้ำกลั่น นำปฏิกิริยาเข้าเครื่อง Thermal Cycle 9700 ตั้งการทำงานของเครื่อง 45°C 45 นาที 1 รอบ 94°C 2 นาที 1 รอบ เป็นการเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA ขั้นต่อไปเป็นการเพิ่มปริมาณของ cDNA เป้าหมายโดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้ 94°C 15 วินาที 55°C 30 วินาที และ 68°C 1 นาที จำนวน 40 รอบ จากนั้นตั้งเครื่องที่ 68°C นาน 7 นาที 1 รอบ

3.4 การเตรียมผลผลิต PCR (ยีนแลคเคส) ให้บริสุทธิ์

นำผลผลิต PCR (ยีนแลคเคส) ที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยนำผลผลิต PCR จากข้อ 3.3 มาแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ใน 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting gel ด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex) หลังจากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการประมาณ 2 กิโลเบส บนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้ เติมสารละลาย QG Buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 15 นาที จนเจลละลายหมด (สีของสารละลายควรมีสีเหลือง ถ้ามีสีม่วงให้เติม 3M NaOAC 10 ไมโครลิตร) เติม Isopropanol (แช่เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำใสส่วนล่างทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (บ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส) 15 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15–30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2 กิโลเบส และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5 การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ PCR Cloning vector

นำชิ้นยีนซึ่งผ่านการทำให้มีความบริสุทธิ์จากข้อ 3.4 มาเชื่อมต่อเข้ากับ T&A Cloning vector โดยใช้ชุดเวคเตอร์สำเร็จรูป T&A Cloning Kit (RBC Bioscience®) โดยเตรียมปฏิกิริยาดังนี้

Ligation Buffer A	1	ไมโครลิตร
Ligation Buffer B	1	ไมโครลิตร
T&A Cloning vector	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase	1	ไมโครลิตร
PCR product (จากข้อ 3.3)	2	ไมโครลิตร
ddH_2O	3	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปถ่ายฝากเข้ากับเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ได้ทันที นำ ligation ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.6 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation ที่เตรียมไว้ 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป Heat - shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 15 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไปเกลี่ยบนอาหาร LB- Amplicilin/IPTG/X-Gal ที่เตรียมไว้ข้างต้น นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14-16 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีสีขาว ซึ่งแสดงว่าที่มีชิ้นส่วนของยีนแลคเคสแทรกอยู่ นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม amplicilin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 180 รอบต่อนาที นาน 14 - 16 ชั่วโมง นำตะกอนเซลล์ไปใช้สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) ดังนี้ ดูดตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ จากข้อ 4.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อนำมา ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอด 4–6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกลับหลอดขึ้นลง 4–6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ใส่ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 25 ไมโครลิตร บ่มนาน 15–30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ พลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis และเก็บพลาสมิดดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสและความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.7 การตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสใน Cloning vector โดยเทคนิค PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6 ไปตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์

M13-F 5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'

M13-R 5' TCACACAGGAAACAGCTATGA C 3'

ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
ไพร์เมอร์ M13-R (5 ไมโครโมล)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
dH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยรอบของการทำ PCR ดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.8 การตรวจสอบความถูกต้องของยีนแลคเคสโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.8.1 การทำปฏิกิริยา cycle sequencing

เตรียมปฏิกิริยา cycle sequencing ในหลอด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

ผลผลิต PCR (ประมาณ 100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing V3.1	2	ไมโครลิตร
Ready Reaction buffer	1	ไมโครลิตร
Primer ไพร์เมอร์ M13-F (5 ไมโครโมล)	1.6	ไมโครลิตร

dH_2O	4.4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	10	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle (Gene Amp 9700) โดยมีรอบการทำ PCR ดังนี้

96 องศาเซลเซียส	1 นาที	จำนวน 1 รอบ
96 องศาเซลเซียส	10 วินาที	จำนวน 25 รอบ
50 องศาเซลเซียส	5 วินาที	
60 องศาเซลเซียส	4 นาที	
4 องศาเซลเซียส	infinity (α)	

3.8.2 การล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

นำปฏิกิริยา cycle sequencing จากข้อ 3.8.1 มาล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำปฏิกิริยาดังกล่าวใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม stock solution A (dH_2O 16 ไมโครลิตร : 95 เปอร์เซ็นต์ Ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ผสมโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที) นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70เปอร์เซ็นต์ Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้งปล่อยตะกอนให้แห้งในที่มืด

3.8.3 การเตรียมตัวอย่างเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Hidi formamide จำนวน 10 ไมโครลิตร จากนั้นปั่นให้อยู่ที่ก้นหลอด ดูดสารละลายทั้งหมดใส่หลอด septa นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วย้ายลงน้ำแข็งทันที ตัวอย่างที่ได้นี้ก็พร้อมที่จะเข้าเครื่อง ABI PRISM 310® DNA Sequencer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

4. การแสดงออกของยีนแลคเคสในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

4.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีนแลคเคสเข้ากับ Protein Expression Vector

นำผลผลิต PCR ของยีนแลคเคส และเวคเตอร์ (ขนาดประมาณ 4,500 คู่เบส) ซึ่งมีตำแหน่งของ T7 promoter ทำหน้าที่ถอดรหัสและแปลรหัสของยีนให้เป็นโปรตีน ทำการสร้าง recombinant protein โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Protein Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) (Thermo Scientific) โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้

ชิ้นดีเอ็นเอของยีนแลคเคส (100 นาโนกรัม)	1	ไมโครลิตร
5X LIC Buffer	2	ไมโครลิตร
T4 DNA Polymerase, 1U/ul	1	ไมโครลิตร
ddH_2O	6	ไมโครลิตร
ปฏิกิริยาทั้งหมด	10	ไมโครลิตร

ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 0.5 M EDTA ปริมาตร 0.6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม LIC Vector (60 นาโนกรัม, 0.02 pmol DNA) ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3-5 วินาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เตรียมถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* ทันที

4.2 การถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)

ทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3)) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB-ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการปรากฏของยีนในเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมต่อไป

4.3 การตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสใน aLICator LIC Cloning and Expression system

ตรวจสอบการปรากฏของยีนในพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์

LIC Forward 5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’

LIC Reverse 5’ GAGCGGATAACAATTTCACACAGG 3’

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

พลาสมิดดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
4mM dNTP	2	ไมโครลิตร
50 mM $MgCl_2$	0.6	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Forward (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ LIC Reverse (5 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase(0.5 ยูนิต/ไมโครลิตร, Immulase)	0.15	ไมโครลิตร
ddH_2O	11.25	ไมโครลิตร
รวมปฏิกิริยาทั้งหมด	20	ไมโครลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ thermal cycle โดยรอบของการทำปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

95 องศาเซลเซียส	7 นาที	จำนวน 1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	จำนวน 25 รอบ
58 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	3 นาที	
72 องศาเซลเซียส	5 นาที	
4 องศาเซลเซียส infinity (α)		

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1.5 เปอร์เซ็นต์ agarose gel นาน 30 นาที ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้า 250 โวลต์ นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide (ความ

เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation เทียบขนาดของดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.4 การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแลคเคสในเซลล์ *E. coli*

ทำการกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน (fusion protein) ในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยเตรียมเชื้อตั้งต้นของเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid ของยีนแลคเคส จากข้อ 4.2 มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว LB-Ampicillin (ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์ตั้งต้น 3 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB–Ampicillin ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที วัดความขุ่นของอาหาร จนกระทั่ง OD_{600} เท่ากับ 0.5 จากนั้นเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วย isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) โดยปรับให้มีความเข้มข้นสุดท้าย เท่ากับ 1 mM IPTG และเลี้ยงต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์ทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนเซลล์ แล้วนำมาละลายด้วย 2x sample buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปมาต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทำการวิเคราะห์ขนาดของ recombinant protein ด้วย 8 เปอร์เซ็นต์ SDS–PAGE ใน Tris-glycine buffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycine, 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS) โดยให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 120 โวลต์ เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลาย PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น 4-5 ครั้ง จนมองเห็นแถบโปรตีนชัดเจน ตรวจดูปริมาณของ fusion protein ที่เกิดขึ้น

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2558 **สิ้นสุด** กันยายน 2560 **รวม 2 ปี**

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

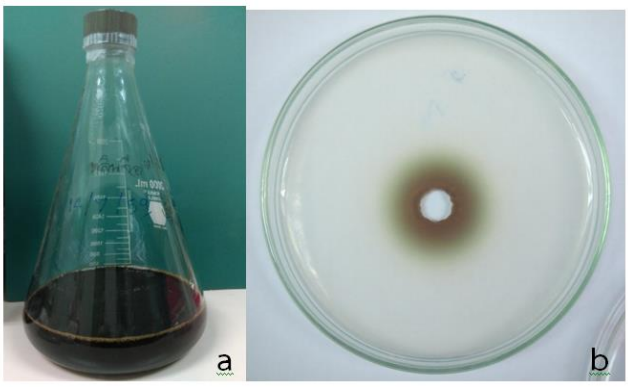
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

จากการเลี้ยงเชื้อราจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อ *Ganoderma* sp. จำนวน 2 ไอโซเลท คือ หลินจือ และ G1-1 และเชื้อ *Rigidoporus* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท R.1 R.2 R.3 R.4 R.5 R.6 R.7 และ R.8 โดยวิธีการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคสเพื่อย่อยสลายลิกนินในอาหารเหลว LBM ที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ 1% เมื่อนำเอนไซม์อย่างหยาบที่แยกได้จากเชื้อราทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายลิกนินบนอาหารที่มีสารบ่งชี้ ABTS (ภาพที่ 1a, b) นาน 24 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท G1-1 ให้ค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยาการเกิดวงสีเขียวบนอาหารได้ดีที่สุด โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 28 มม. (ตารางที่ 1) จึงได้ทำการคัดเลือก เชื้อ *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 เพื่อนำมาใช้ในการโคลนยีนแลคเคสในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางวงสีของปฏิกิริยาบนอาหารที่มีสารบ่งชี้ ABTS ของเอนไซม์อย่างหยาบจากเชื้อรา จำนวน 10 ไอโซเลท

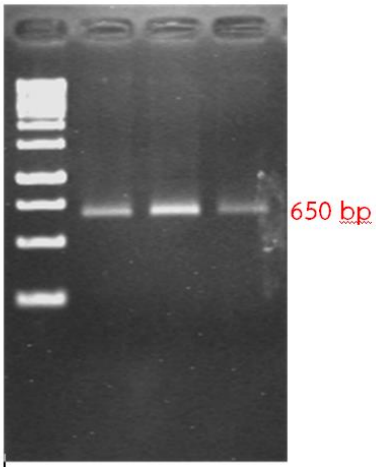
ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางวงสีของปฏิกิริยาบนอาหารที่มีสาร ABTS (มม.)
R.1	18
R.2	16
R.3	15
R.4	19
R.5	17
R.6	16
R.7	12
R.8	20
หลินจือ	26
G1-1	28



ภาพที่1 (a) การเลี้ยงกระตุ้นเส้นใยให้ผลิตเอนไซม์แลคเคสในอาหารเหลว
(b) การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสอย่างหยาบที่ผลิตโดยเชื้อรา บนอาหารที่มีสารบ่งชี้ ABTS

2. การจำแนกชนิดของเชื้อราโดยเทคนิคชีวโมเลกุล

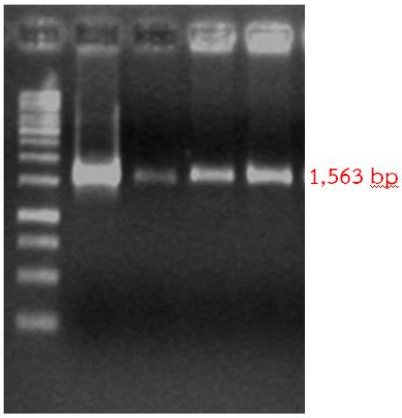
จากการคัดเลือกได้เชื้อรา *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ดีที่สุด จากข้อ 1 เมื่อนำมาทำการจำแนกชนิดโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ได้ชิ้นส่วนของผลผลิต PCR ซึ่งมีขนาดประมาณ 650 คู่เบส (ภาพที่ 2) และเมื่อนำชิ้นส่วนของผลผลิต PCR ดังกล่าวไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่า เชื้อรา *Ganoderma* sp. ไอโซเลท G1-1 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Ganoderma lucidum* (Accession No. FJ379262.1) ที่ความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์



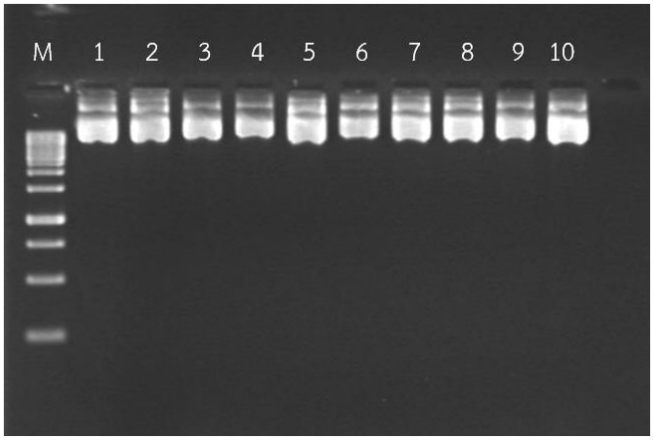
ภาพที่ 2 ผลผลิต PCR โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ ITS1, ITS4 แล้วทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส

3. การโคลนยีนแลคเคส

การสกัด total RNA จากเส้นใยเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1-1 ที่ผ่านการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์แลคเคสในอาหารเหลวที่มีลิกนินเป็นองค์ประกอบ เมื่อทำปฏิกิริยา Reverse Transcription โดยอาศัยเทคนิค Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ในส่วนของยีนแลคเคส ด้วยคู่ไพรเมอร์ lccG-F และ lccG-R ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีนแลคเคส พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนแลคเคสที่มีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส (ภาพที่ 3) หลังจากนั้นนำชิ้นยีนแลคเคสที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์พาหะโดยใช้ชุด T&A Cloning Kit (RBC Bioscience) แล้วนำไปถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อเลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเหลว LB + ampicillin 50 ug/ml ทำให้สามารถสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคสได้ (ภาพที่ 4) เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมไปทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automate sequencer และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds (Accession No. FJ656307.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 3 แสดงชิ้นส่วนของยีนแลคเคส ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,563 bp.



ภาพที่ 4 พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของ T&A Cloning Vector ที่มียีนแลคเคสขนาด 1,563 bp. แทรกอยู่ในภายใน ซึ่งได้รับการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-10; พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคส

```
Ganoderma lucidum strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds
Sequence ID: FJ656307.1Length: 1563Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 1 to 1563GenBankGraphics Next Match Previous Match
            Alignment statistics for match #1
     Score      Expect   Identities      Gaps     Strand
2887 bits(1563) 0.0    1563/1563(100%) 0/1563(0%) Plus/Plus
Query  1     ATGGTGAAATTCCAATCGTTGCTCTCCTGCGTCACCCTTCTTTTCGCCGCCTCAGCCCAT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     ATGGTGAAATTCCAATCGTTGCTCTCCTGCGTCACCCTTCTTTTCGCCGCCTCAGCCCAT  60

Query  61    GCGGGCATTGGCCCCAAGGCCGACCTTACCATTTCCAACGCGAACATCGCCCCTGATGGC  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    GCGGGCATTGGCCCCAAGGCCGACCTTACCATTTCCAACGCGAACATCGCCCCTGATGGC  120

Query  121   TACACCCGTGCCGCCGTTGTGGTGAATGGTGTCTTCCCTGGGCCGCTCATCACAGGGAAC  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   TACACCCGTGCCGCCGTTGTGGTGAATGGTGTCTTCCCTGGGCCGCTCATCACAGGGAAC  180

Query  181   AAGGGAGACCGTTTCCAGCTGAATGTCATCGACCAACTGACGAACCACACAATGCTGAAG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   AAGGGAGACCGTTTCCAGCTGAATGTCATCGACCAACTGACGAACCACACAATGCTGAAG  240

Query  241   ACCACCAGCATTCATTGGCATGGCTTTTTCCAGAAGGGCACGAACTGGGCGGATGGTCCC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   ACCACCAGCATTCATTGGCATGGCTTTTTCCAGAAGGGCACGAACTGGGCGGATGGTCCC  300

Query  301   GCGTTCATCAACCAGTGTCCGATTGCTAGCGGGCACTCGTTCCTCTACGATTTCCAGGTT  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   GCGTTCATCAACCAGTGTCCGATTGCTAGCGGGCACTCGTTCCTCTACGATTTCCAGGTT  360

Query  361   CCGGATCAGGCCGGCACTTTTTGGTACCACAGCCATCTCTCCACGCAGTACTGTGACGGT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361   CCGGATCAGGCCGGCACTTTTTGGTACCACAGCCATCTCTCCACGCAGTACTGTGACGGT  420

Query  421   CTCAGGGGTCCATTCGTGGTATATGACCCTAAGGACCCCCTCAAGGGACTGTACGACGTC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   CTCAGGGGTCCATTCGTGGTATATGACCCTAAGGACCCCCTCAAGGGACTGTACGACGTC  480

Query  481   GACAACGACTCGACTGTGATCACCCTCTCCGACTGGTATCACGTGGCTGCCAGGCTTGGA  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   GACAACGACTCGACTGTGATCACCCTCTCCGACTGGTATCACGTGGCTGCCAGGCTTGGA  540

Query  541   CCGAGCTTCCCGCTCGGCTCGGACTCGACTCTCATCAATGGCCTTGGCCGTAGCACTACC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   CCGAGCTTCCCGCTCGGCTCGGACTCGACTCTCATCAATGGCCTTGGCCGTAGCACTACC  600

Query  601   AACGCTACCGCCGGCCTCGCTGTTATCAACGTCACACAGGGCAAACGTTATCGCTTCCGC  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   AACGCTACCGCCGGCCTCGCTGTTATCAACGTCACACAGGGCAAACGTTATCGCTTCCGC  660

Query  661   CTTGTGTCCTTGTCATGCGACCCCAACTACACCTTCAGCATCGACGGCCATGACATGTCC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   CTTGTGTCCTTGTCATGCGACCCCAACTACACCTTCAGCATCGACGGCCATGACATGTCC  720

Query  721   GTTATTGAGGCGGATGGTATTGCAACGCAACCCGTGACCGCGAACGCTATTCAAATCTTC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   GTTATTGAGGCGGATGGTATTGCAACGCAACCCGTGACCGCGAACGCTATTCAAATCTTC  780

Query  781   TCTGCTCAACGATATTCTTTCGTGCTGACTGCAAATCAGACAATTGGCAACTATTGGATT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   TCTGCTCAACGATATTCTTTCGTGCTGACTGCAAATCAGACAATTGGCAACTATTGGATT  840

Query  961   CTCAATGAGGTCGACCTCCACCCCTTTGTCGCTAAACAGACGCCTGGCCGCGCTACACAG  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   CTCAATGAGGTCGACCTCCACCCCTTTGTCGCTAAACAGACGCCTGGCCGCGCTACACAG  1020
```

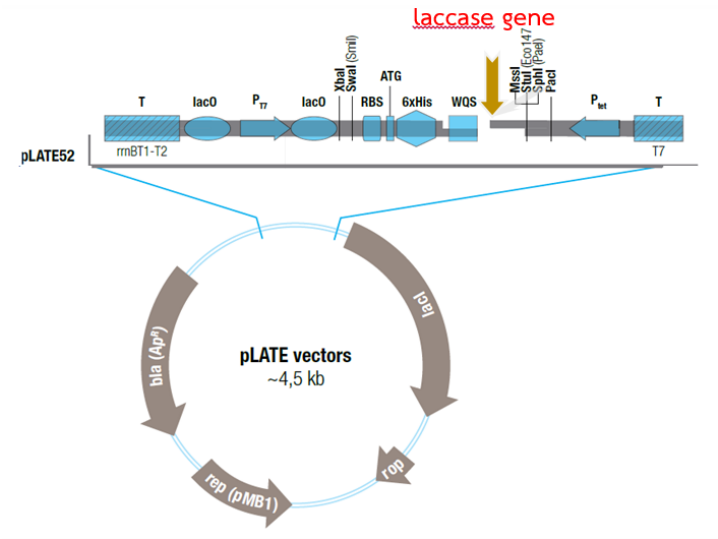
ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (cDNA) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds (Accession No. FJ656307.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

```
Query  1021  GGTGGTACCGATGTGGCCATCAACATGGTCTTCAACTTTAACGGCTCGAACTTCTTCATC  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1021  GGTGGTACCGATGTGGCCATCAACATGGTCTTCAACTTTAACGGCTCGAACTTCTTCATC  1080

Query  1081  AACAACGCGTCCTTCACGCCTCCCACTGTCCCCGTCCTCCTTCAGATTTTGAGCGGCGCA  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1081  AACAACGCGTCCTTCACGCCTCCCACTGTCCCCGTCCTCCTTCAGATTTTGAGCGGCGCA  1140

Query  1141  CAGGCCGCCCAGGACCTCCTGCCTTCCGGAAGTGTCTACACGCTGCCGATCAACAAGTCC  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1141  CAGGCCGCCCAGGACCTCCTGCCTTCCGGAAGTGTCTACACGCTGCCGATCAACAAGTCC  1200

Query  1201  ATCGAGCTCACCTTCCCCGCCACGGTCAACGCCCCCGGGGCTCCCCACCCCTTCCACCTG  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1201  ATCGAGCTCACCTTCCCCGCCACGGTCAACGCCCCCGGGGCTCCCCACCCCTTCCACCTG  1260

Query  1261  CACGGTCATTCGTTCGCTGTGGTCCGCAGCGCCGGCTCCACAGAATACAACTATAACAAT  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1261  CACGGTCATTCGTTCGCTGTGGTCCGCAGCGCCGGCTCCACAGAATACAACTATAACAAT  1320

Query  1321  CCCGTATGGCGCGACGTCGTTTCGACCGGCACCCCTGCAGCGGGCGACAACGTCACGATC  1380
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1321  CCCGTATGGCGCGACGTCGTTTCGACCGGCACCCCTGCAGCGGGCGACAACGTCACGATC  1380

Query  1381  CGCTTCCAGACCGACAACCCCGGACCGTGGTTCCTCCATTGCCACATCGACTTCCATCTC  1440
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1381  CGCTTCCAGACCGACAACCCCGGACCGTGGTTCCTCCATTGCCACATCGACTTCCATCTC  1440

Query  1441  GAGGCGGGCTTCGCTGTCGTGTTCGCCGAGGACACCGCTGATACTTCTCTGGCGAACCAT  1500
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1441  GAGGCGGGCTTCGCTGTCGTGTTCGCCGAGGACACCGCTGATACTTCTCTGGCGAACCAT  1500

Query  1501  GTCCCACAAGCATGGTCGGATCTTTGCCCGACGTACGATGCGCTCTCGGCTGATGATCAC  1560
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1501  GTCCCACAAGCATGGTCGGATCTTTGCCCGACGTACGATGCGCTCTCGGCTGATGATCAC  1560

Query  1561  TGA  1563
             |||
Sbjct  1561  TGA  1563
```

ภาพที่ 5 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ (cDNA) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds (Accession No. FJ656307.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

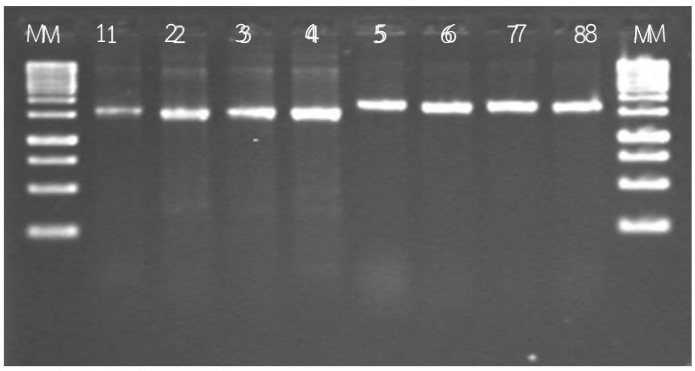
4. การแสดงออกของยีนแลคเคสในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

การเชื่อมต่อยีนแลคเคสเข้ากับเวคเตอร์ pLATE52 ซึ่งเป็น protein expression vector (aLICator LIC Cloning and Expression system) ที่มีตำแหน่งของ T7 promoter (P_{T7}) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน และได้ออกแบบคู่ไพรเมอร์ Ex_lccG-Fatg 5’ GGTTGGGAATTGCAAGCGAAGTTCCAATCGTTGCTCTCC 3’ และ Ex_lccG-Rtaa 5’ GGAGATGGGAAGTCATTAGTGATCATCAGCCGAGAGCGC 3’ ให้มีความจำเพาะกับยีนแลคเคสโดยมีตำแหน่งของปลาย 5’ ที่สามารถเชื่อมต่อกับส่วนของเวคเตอร์ pLATE52 ได้ เมื่อทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนแลคเคสซึ่งมีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส เข้ากับเวคเตอร์ pLATE52 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4.5 กิโลเบส จะทำให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมขนาดประมาณ 6,063 คู่เบส (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนที่ตำแหน่งของยีนแลคเคสที่สอดแทรกอยู่ภายใน Expression Vector (aLICator LIC Cloning and Expression system)

การถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคส เข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน ได้ทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน ตลอดจนการตรวจสอบความถูกต้องของชิ้นยีนด้วยการทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์เวคเตอร์ LIC Forward และ LIC Reverse และคู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนแลคเคส Ex_lccG-Fatg และ Ex_lccG-Rtaa พบว่า สามารถตรวจพบการปรากฏของยีนแลคเคสในเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มียีนแลคเคส (ภาพที่ 7) และเมื่อนำลำดับเบสของยีนแลคเคสมาทำการแปรรหัสสารพันธุกรรมจาก cDNA เป็นลำดับของเปปไทด์โปรตีน ด้วยโปรแกรม NEBcutter2 พบโปรตีนที่ได้มีขนาด 520 อะมิโนแอซิด (ภาพที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับ Sannia *et al*. (1986) ได้รายงานว่าเอ็นไซม์แลคเคสมีขนาดของโปรตีนอยู่ในช่วง 60-80 kDa ซึ่งประกอบด้วย 520-550 กรดอะมิโน และเมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลของโปรตีน NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* (Accession No. ACR24357.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 การตรวจสอบการปรากฏของยีนแลคเคสในพลาสมิดลูกผสม Lane M; DNA Marker 1 kb, Lane 1-4; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์ยีนแลคเคส (Ex_lccG-Fatg, Ex_lccG-Rtaa), Lane 5-8; ผลผลิต PCR จากไพรเมอร์เวคเตอร์ (LIC Forward, LIC Reverse)

NEW ENGLAND BioLabs Inc. NEBcutter

[Back to main display]

ORF Sequence

unnamed sequence

Help Comments

Coding region: 1..1563

520 aa

1 1563

[Edit] - [Delete] - [Add new ORF] - [Locate multiple cutters that excise this ORF] - [Silent Mutagenesis]

Protein sequence:

```
> 520 aa
MAKFQSLLSC VTLLFAASAH AGIGPKADLT ISNANIAPDG YTRAAVVVNG
VFPGPLITGN KGDRFQLNVI DQLTNHTMLK TTSIHWHGFF QKGTNWADGP
AFINQCPIAS GHSFLYDFQV PDQAGTFWYH SHLSTQYCDG LRGPFVVYDP
KDPLKGLYDV DNDSTVITLS DWYHVAARLG PSFPLGSDST LINGLGRSTT
NATAGLAVIN VTQGKRYRFR LVSLSCDPNY TFSIDGHDMS VIEADGIATQ
PVTANAIQIF SAQRYSFVLT ANQTIGNYWI RANPSFGNIG FTNGINSAIL
RYSGADPIEP TTAQQTTQNL LNEVDLHPFV AKQTPGRATQ GGTDVAINMV
FNFNGSNFFI NNASFTPPTV PVLLQILSGA QAAQDLLPSG SVYTLPINKS
IELTFPATVN APGAPHPFHL HGHSFAVVRS AGSTEYNYNN PVWRDVVSTG
TPAAGDNVTI RFQTDNPGPW FLHCHIDFHL EAGFAVVFAE DTADTSLANH
VPQAWSDLCP TYDALSADDH
```

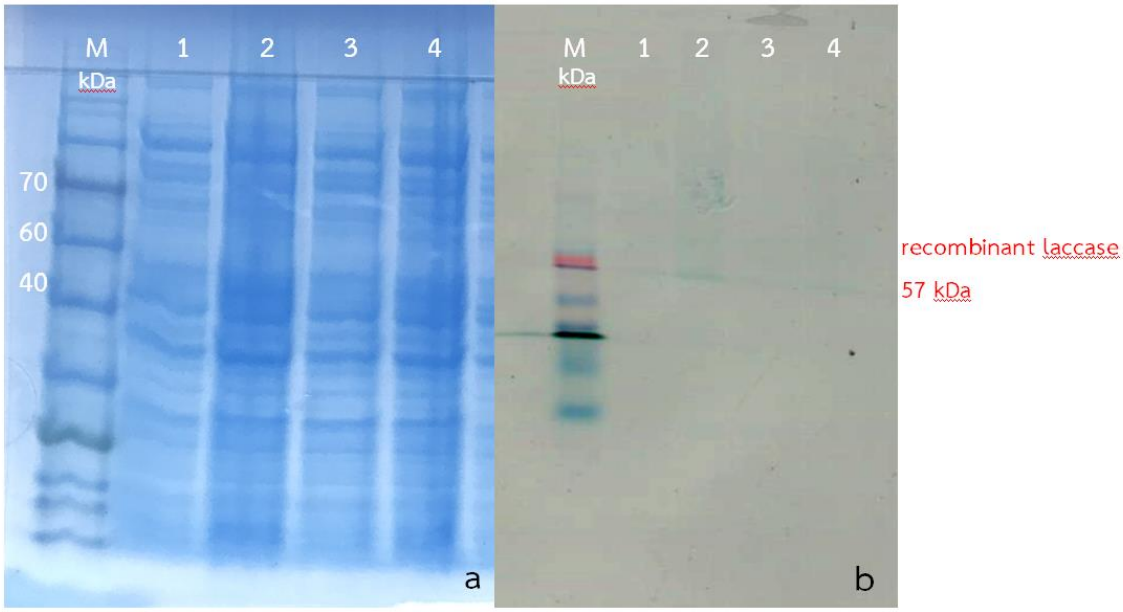
Blast this sequence at NCBI

ภาพที่ 8 ลำดับของกรดอะมิโน ที่ได้จากการแปรรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,563 คู่เบส เป็นลำดับของเปปไทด์โปรตีน ได้กรดอะมิโนเท่ากับ 520 อะมิโนแอซิด http://nc2.neb.com/NEBcutter2/

```
laccase [Ganoderma lucidum]
Sequence ID: ACR24357.1Length: 520Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 1 to 520GenPeptGraphics Next Match Previous Match First Match
                          Alignment statistics for match #1
    Score     Expect          Method            Identities    Positives     Gaps   Frame
1066 bits(2757) 0.0()  Compositional matrix adjust. 520/520(100%) 520/520(100%) 0/520(0%)
Features:
Query  1    MAKFQSLLSCVTLLFAASAHAGIGPKADLTISNANIAPDGYTRAAVVVNGVFPGPLITGN  60
            MAKFQSLLSCVTLLFAASAHAGIGPKADLTISNANIAPDGYTRAAVVVNGVFPGPLITGN
Sbjct  1    MAKFQSLLSCVTLLFAASAHAGIGPKADLTISNANIAPDGYTRAAVVVNGVFPGPLITGN  60

Query  61   KGDRFQLNVIDQLTNHTMLKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQV  120
            KGDRFQLNVIDQLTNHTMLKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQV
Sbjct  61   KGDRFQLNVIDQLTNHTMLKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQV  120

Query  121  PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPKDPLKGLYDVDNDSTVITLSDWYHVAARLG  180
            PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPKDPLKGLYDVDNDSTVITLSDWYHVAARLG
Sbjct  121  PDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPKDPLKGLYDVDNDSTVITLSDWYHVAARLG  180

Query  181  PSFPLGSDSTLINGLGRSTTNATAGLAVINVTQGKRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHDMS  240
            PSFPLGSDSTLINGLGRSTTNATAGLAVINVTQGKRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHDMS
Sbjct  181  PSFPLGSDSTLINGLGRSTTNATAGLAVINVTQGKRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHDMS  240

Query  241  VIEADGIATQPVTANAIQIFSAQRYSFVLTANQTIGNYWIRANPSFGNIGFTNGINSAIL  300
            VIEADGIATQPVTANAIQIFSAQRYSFVLTANQTIGNYWIRANPSFGNIGFTNGINSAIL
Sbjct  241  VIEADGIATQPVTANAIQIFSAQRYSFVLTANQTIGNYWIRANPSFGNIGFTNGINSAIL  300

Query  301  RYSGADPIEPTTAQQTTQNLLNEVDLHPFVAKQTPGRATQGGTDVAINMVFNFNGSNFFI  360
            RYSGADPIEPTTAQQTTQNLLNEVDLHPFVAKQTPGRATQGGTDVAINMVFNFNGSNFFI
Sbjct  301  RYSGADPIEPTTAQQTTQNLLNEVDLHPFVAKQTPGRATQGGTDVAINMVFNFNGSNFFI  360

Query  361  NNASFTPPTVPVLLQILSGAQAAQDLLPSGSVYTLPINKSIELTFPATVNAPGAPHPFHL  420
            NNASFTPPTVPVLLQILSGAQAAQDLLPSGSVYTLPINKSIELTFPATVNAPGAPHPFHL
Sbjct  361  NNASFTPPTVPVLLQILSGAQAAQDLLPSGSVYTLPINKSIELTFPATVNAPGAPHPFHL  420

Query  421  HGHSFAVVRSAGSTEYNYNNPVWRDVVSTGTPAAGDNVTIRFQTDNPGPWFLHCHIDFHL  480
            HGHSFAVVRSAGSTEYNYNNPVWRDVVSTGTPAAGDNVTIRFQTDNPGPWFLHCHIDFHL
Sbjct  421  HGHSFAVVRSAGSTEYNYNNPVWRDVVSTGTPAAGDNVTIRFQTDNPGPWFLHCHIDFHL  480

Query  481  EAGFAVVFAEDTADTSLANHVPQAWSDLCPTYDALSADDH  520
            EAGFAVVFAEDTADTSLANHVPQAWSDLCPTYDALSADDH
Sbjct  481  EAGFAVVFAEDTADTSLANHVPQAWSDLCPTYDALSADDH  520
```

ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบลำดับของอะมิโนแอซิดของยีนแลคเคส ที่ได้จากการโคลนเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน NCBI ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคส ของ *Ganoderma lucidum* (Accession No. ACR24357.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแลคเคสในเซลล์ *E. coli* เมื่อทำการถ่ายฝากพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมของยีนแลคเคสเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และกระตุ้นการทำงานของยีนด้วยสาร IPTG เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยทำการเปรียบเทียบการชักนำการแสดงออกของยีนด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้น 1 mM เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง จากการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนและแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Native-Page พบว่า เมื่อยีนได้รับการกระตุ้นด้วยสาร 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเซลล์ *E. coli* ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร IPTG ตรวจพบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แลคเคสในปริมาณน้อย โดยมีขนาดประมาณ 57 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 10) อย่างไรก็ตามในอนาคตสามารถนำยีนแลคเคสที่ได้ไปถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อให้สามารถผลิตรีคอมบิแนนท์ได้ในปริมาณมากขึ้น จากรายงานของ Mai *et al*. (2000) ได้อธิบายไว้ว่า เอ็นไซม์ laccase จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้สูงเมื่อมีสารพวก phenolic เป็นตัวกระตุ้น ซึ่งสาร phenolic นี้เป็นพิษต่อราแต่ไม่เป็นอันตรายต่อยีสต์ Larsson *et al.* (2001) ได้ทำการตัดต่อยีน laccase จาก *Trametes* เข้าสู่ระบบของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอ็นไซม์ให้สูงขึ้น พบว่าสามารถเกิดการย่อยสลายเนื้อไม้ได้ดี และทนต่อสารพวก phenolic ได้



ภาพที่ 10 a) การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE Lane M; Protein marker, Lane 1,3 ; *E. coli* BL21, Lane 2,4; ปริมาณโปรตีนที่ได้รับการกระตุ้นที่เวลา 6 ชั่วโมง (b) การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Native-PAGE และย้อมเจลด้วยสาร ABTS ได้รีคอมบิแนนท์โปรตีน ขนาด~ 57 kDa Lane M; Protein marker, Lane 1,3 ; *E. coli* BL21, Lane 2,4; ปริมาณโปรตีนที่ได้รับการกระตุ้นนาน 6 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีนแลคเคสจากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1-1 ที่คัดเลือกได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แลคเคสบนอาหารแข็งที่มีสารบ่งชี้ ABTS โดยการสกัด total RNA และเพิ่มปริมาณยีนแลคเคสจาก cDNA ได้ชิ้นส่วนของยีนแลคเคสที่มีขนาดประมาณ 1,563 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* strain 7071-9 laccase mRNA, complete cds (Accession No. FJ656307.1) ที่ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์

การเชื่อมต่อยีนแลคเคสเข้ากับ protein expression vector (pLATE52 vector) โดยมีตำแหน่งของ T7 promoter (P_{T7}) ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนแลคเคส ทำให้ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมขนาดประมาณ 6,063 คู่เบส แล้วทำการถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับโปรตีน สามารถตรวจพบการปรากฏของยีนแลคเคสในเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) ที่ได้รับการถ่ายฝาก พลาสมิดดีเอ็นเอ การแปรรหัสสารพันธุกรรมจาก cDNA เป็นลำดับของเปปไทด์โปรตีน พบว่า เปปไทด์ที่ได้มีขนาด 520 อะมิโนแอซิด และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนใน NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงกับยีนแลคเคสของเชื้อ *Ganoderma lucidum* (Accession No. ACR24357.1) ที่ identity 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทดสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของยีนแลคเคสในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) โดยการกระตุ้นด้วยสาร 1 mM IPTG นาน 6 ชั่วโมง ตรวจพบการแสดงออกในระดับโปรตีนในปริมาณน้อย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เชื้อ *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1 สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลังงานจากชีวมวลลิกโนเซลลูโลส การกำจัดสีของน้ำเสียจากอุตสาหกรรมทอผ้า ฟอกย้อมเยื่อกระดาษ การย่อยสลายของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชพวก Isoxaflutole เป็นต้น
2. สามารถนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมหรือยีน laccase ที่ได้จากเชื้อรา *Ganoderma lucidum* ไอโซเลท G1 ถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์ยีสต์เพื่อการผลิตเอนไซม์ในระบบอุตสาหกรรม ช่วยทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ในการอนุเคราะห์เชื้อสำหรับใช้ในงานวิจัย และนายคำแหง แก้งคำ พนักงานราชการ ตำแหน่งนักวิชาการเกษตร สำหรับความช่วยเหลือในงานวิจัยด้านต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

Avgerinos, G.C. and Wang, D.I. 1983. Selective solvent delignification for fermentation enhancement.
Biotechnol Bioeng. 1983 Jan;25(1):67-83.

Bollag, J. M. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. Applied and Environmental Microbiology 48(4): 849-854.

Crawford, R.L. 1981. Lignin Biodegradation and Transformation. John Wiley and Sons, Inc, New York.

Gould, J.M. 1984. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. Biotech. Bioeng. 26: 46-52.

Kirk, T.K., T. Higuchi, and H.M. Chang, 1980. Lignin Biodegradation; Microbiology, Chemistry and Potential Applications. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Kirk, T.K. and Farrell, R.L. 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology 41, 465-505.

Larsson, S., P. Cassland and L.j. Jonsson. 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibition in lignocellulose hydrolysates heterologous expression of laccase. Appl. Environ. Microb. 67: 1163-1170.

Mai, C., W. Schormann, O. Milstein and A. Huttermann. 2000. Enhanced stability of laccase in presence of phenolic compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 510-514.

Sannia, G., P. Giardina, M. Lana, M. Rossi and V. Buonocore. 1986. Laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biotechnol. Lett. 8: 797-800.