

Ứng dụng kỹ thuật metagenomics để nhận diện gene mã hóa laccase của nấm Basidiomycetes trong mẫu đất rừng Nam Cát Tiên

• **Hoàng Quốc Khánh**

Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

• **Nguyễn Bích Ngọc**

Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 02 tháng 04 năm 2013, nhận đăng ngày 10 tháng 9 năm 2013)

TÓM TẮT

Theo một số các công trình nghiên cứu hiện nay chỉ có khoảng 0,1-1% vi sinh vật được phát hiện từ việc nuôi cấy truyền thống, như vậy còn lại 99% vi sinh vật trong môi trường tự nhiên chưa được phát hiện chủ yếu là do chúng rất khó nuôi cấy hoặc không thể nuôi cấy được. Nghiên cứu các vi sinh vật mà không cần thông qua bước nuôi cấy là mục tiêu hướng tới của nghiên cứu đa dạng vi sinh hiện đại. Nghiên cứu này được

thực hiện theo hướng metagenomics nhằm khảo sát sự đa dạng của gen laccase ở nấm trong mẫu đất rừng Nam Cát Tiên bao gồm các bước thí nghiệm đơn giản, nhanh chóng, chi phí thấp như ly trích và tinh sạch DNA trực tiếp từ đất, sử dụng cặp mồi thoái hóa Cu1F/Cu2R đặc trưng cho nấm đảm, tạo dòng và phân tích trình tự thư viện gen laccase. Chúng tôi đã thành công nhận diện gen laccase từ các mẫu thu được.

Từ khóa: metagenomics, laccase, Nam Cát Tiên, phương pháp trouring.

MỞ ĐẦU

Các nghiên cứu trước đây tiếp cận bộ gen di truyền của các sinh vật đất chủ yếu thông qua việc nuôi cấy chúng trên các môi trường lỏng hoặc rắn có chứa cacbon, năng lượng, nguồn cho nhận diện từ với các điều kiện vật lý thích hợp; từ đó có thể phân lập chúng thành các chủng riêng biệt trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tuy nhiên chính những điều kiện phòng thí nghiệm đã gây các áp lực chọn lọc, dẫn tới hạn chế sự tăng trưởng của phần lớn các sinh vật. hơn thế nữa nếu chỉ dựa vào những đặc điểm vật lý, hình thái đơn giản của chúng thì khó phân biệt được rõ ràng. Để khắc phục vấn đề này các nhà khoa học đã sử dụng nhiều chiến lược phân lập trực tiếp

dựa vào phát sinh loài. Các nhà sinh thái, sinh học phân tử với sự trợ giúp của các vector tạo dòng như cosmid, fosmid hoặc BACs đã có thể cung cấp những thông tin vô giá về các sinh vật không thể nuôi cấy, cung cấp các DNA trọng lượng phân tử lớn được ly trích từ mẫu để xây dựng các thư viện metagenomic, các dòng thuần được giải trình tự và đem phân tích, so sánh [8, 9, 12, 13]. Việc giải trình tự của RNA ribosom và các gen mã hóa chúng từ đó xác định, mô tả những chủng sinh vật mới phát hiện, những chủng không thể thu được bằng phương pháp nuôi cấy, đã khởi đầu một thời kì mới của sinh thái vi sinh. Những thông tin về các gen RNA

này sẽ là cơ sở để các nhà nghiên cứu xây dựng những chiến lược nghiên cứu thích hợp nghiên cứu sự tiến hóa của chúng. Stahl cùng các cộng sự (1984) và nhóm nghiên cứu của Lane (1985) sử dụng phân tích trực tiếp của trình tự gen 16S rRNA để mô tả sự đa dạng của vi sinh vật trong mẫu môi trường mà không dùng phương pháp cấy khuẩn, phân tích 16S rRNA hoạt động độc lập và hiện diện ở hơn 13.000 sinh vật nhân sơ mới [8]. Mặc dù có những tiềm năng khoa học như thế nhưng phát huy như thế nào và tiếp cận metagenomics bằng cách thức nào để đạt được kết quả thì cho tới nay đây vẫn còn là vấn đề khó khăn cần được tiếp tục hoàn thiện.

Một trong các đối tượng được nghiên cứu nhiều gần đây của metagenomic là Laccase – một loại enzyme oxy hóa khử được ứng dụng khá phổ biến trong các ngành công nghiệp tìm thấy ở thực vật, nấm, một số vi khuẩn và côn trùng. Việc nghiên cứu laccase trên đối tượng thực vật và nấm rất phổ biến. Laccase từ nấm được nghiên cứu và khảo sát rất kỹ đặc biệt là laccase từ nấm đám *Basidiomycetes*. Trong vài thập kỷ gần đây, gen sinh tổng hợp laccase đã bắt đầu được nghiên cứu. Tính cho đến nay đã có hơn 100 gen sinh tổng hợp laccase được đánh giá và so sánh.

Laccase có phổ đặc hiệu cơ chất khá rộng. Laccase hoạt động tối thích trong khoảng pH 4-6 đối với cơ chất phenolic. Khi tăng pH sang vùng trung tính hoặc vùng kiềm thì hoạt tính của laccase giảm. Nhiệt độ bền của laccase dao động đáng kể, phụ thuộc vào nguồn gốc của vi sinh vật. Laccase bền ở 30-50°C và mất hoạt tính ở nhiệt độ trên 60°C. Laccase bền nhiệt nhất được phân lập chủ yếu từ các loài thuộc prokaryote.

Laccase (p-benzenediol: oxygen oxidoreductase, E.C.1.10.3.2) thuộc nhóm enzyme oxidase, cụ thể là polyphenol oxidase. Trong phân tử có chứa 4 nguyên tử đồng có khả năng oxy hóa cơ chất sử dụng phân tử oxy làm chất nhận điện tử.

Khác với phần lớn các enzyme khác, laccase có phổ cơ chất rất đa dạng, bao gồm diphenol, polyphenol, các dẫn xuất phenol, diamine, amine thơm, benzenethiol, PCB (Polychlorinated biphenyl), dioxin và cả các hợp chất vô cơ như iot. Các loại enzyme laccase tách chiết từ các nguồn khác nhau rất khác nhau về mức độ glycosyl hóa, khối lượng phân tử và tính chất động học.

Từ những nền tảng trên bài báo này tập trung vào vấn đề khảo sát sự đa dạng của gen laccase ở nấm với mẫu là đất rừng tự nhiên Nam Cát Tiên qua đó bước đầu đề ra được một quy trình khảo sát sự đa dạng của một gen cụ thể theo hướng metagenomics để từ đó phát triển và hoàn thiện quy trình này vào mục tiêu khảo sát đa dạng gen laccase.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Mẫu đất và vi sinh vật

Mẫu đất lấy ngẫu nhiên tại 3 nơi từ rừng quốc gia Nam Cát Tiên đánh số 1, 2, 3. Mẫu đất là phần đất trên bề mặt dưới lớp lá cây mục. Khi lấy mẫu ta gạt bỏ lớp lá mục để lộ bề mặt lớp đất và dùng thìa sạch lấy phần đất bề mặt đó cho vào túi ni lông, bảo quản trong thùng xốp có chứa đá lạnh.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định hoạt tính enzyme laccase từ đất rừng Nam Cát Tiên

Dựa trên phản ứng giữa laccase và cơ chất chất thử ABTS được sử dụng để xác định xem trong đất có vi sinh vật sản xuất enzyme laccase không, hoạt tính cao hay không [1, 11].

Chuẩn bị dịch

Chuẩn bị 50 mM dịch đệm acetate pH 5: trộn 50 ml dịch acetat 1M (8,2 g/100 ml) với 950 ml H₂O (điều chỉnh pH bằng HCl tới pH=5); buffer có thể bảo quản ở 4°C, kiểm tra pH khi sử dụng và điều chỉnh nếu cần; chuẩn bị ABTS 5mM sử dụng nước cất 25 – 50 ml.

Chuẩn bị mẫu

Mẫu đất 2,75 g; trộn đất với 91 ml đệm Na acetate 50 mM (pH đất); đồng nhất với máy trộn trong 1 phút, ngưng trộn và lắc tròn để loại bỏ đất bị dính ở mép, đánh tan thêm 1 phút; đổ dịch vào bình giữ lạnh cho tới khi sử dụng.

Dựa trên sự oxi hóa ABTS (2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) bởi laccase thành hợp chất được hấp thụ ánh sáng mạnh tại bước sóng 420 nm. Một đơn vị hoạt độ laccase là lượng enzyme cần thiết để tạo thành 1 μM sản phẩm từ ABTS trong thời gian 1 phút, ở điều kiện thí nghiệm (Bảng 1).

Bảng 1. Tỷ lệ thành phần phản ứng trong thí nghiệm đo hoạt tính laccase

Thành phần	Đối chứng (ml)	Thí nghiệm (ml)
Đệm acetate (50mM), pH 5	2, 4	1,8
Dịch đất	0,6	0,6
ABTS (5mM)	0	0,6
Tổng thể tích	3	3

Tính hoạt độ

Phản ứng xảy ra khi cho ABTS vào hỗn hợp (nhiệt độ phòng). Giá trị OD đo sau 1 phút.

Công thức tính:

$$U = \frac{(OD_t - OD_0) \times V_{pu} \times 10^6 \times D_f}{V_E \times t \times \epsilon}$$

Trong đó: U: Hoạt độ enzym (U/l), ε: Hệ số hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 420nm, ε= 36.000 (M-1cm-1).

V_{pu}: Tổng thể tích phản ứng (3 ml), V_E: Thể tích enzyme (1 ml), OD_t: Giá trị OD đo được tại thời điểm t.

OD₀: Giá trị OD đo được tại thời điểm t = 0, D_f: Độ pha loãng, t: Thời gian phản ứng.

Tất cả các thí nghiệm đo với độ pha loãng 1 lần.

Ly trích DNA

Thu nhận DNA trực tiếp là một bước khó vì đất vốn dĩ chứa nhiều thành phần phức tạp cả vô cơ lẫn hữu cơ có trong đất. Ngoài ra đất cũng có sự tồn tại DNA của các sinh vật đã chết. Các thành phần của đất liên kết chặt chẽ hoặc lỏng lẻo, phối hợp với nhau thành những mạng lưới hoặc những hốc giữ DNA trong đó. Thu nhận DNA tổng của một mẫu đất cần được tiến hành qua nhiều bước liên quan chặt chẽ với nhau, bước đầu tiên là phá màng tế bào để ly giải DNA bằng một trong các phương pháp phá màng tế bào như phương pháp vật lý, hóa học... [3].

DNA được ly trích trực tiếp từ mẫu đất mà không qua bước phân lập nuôi cấy tế bào: 13,5 ml lysis buffer, 100 μl lysozyme cho vào 5g mẫu, ủ trong 30 phút ở 37°C; thêm 3 ml SDS 10%, ủ 30 phút ở 65°C; ly tâm 7000 vòng trong 5 phút ở 4°C, thu dịch nổi, thêm chloroform/isoamyl alcohol (tỷ lệ 24/1) vào mẫu với tỷ lệ 1:1. Ly tâm 6500 vòng trong 10 phút ở 4°C, thu dịch nổi; thêm isopropanol vào mẫu với tỷ lệ thể tích là 3/5, ly tâm 13000 vòng trong 30 giây ở nhiệt độ phòng, thu tủa; dùng cồn 70° lạnh rửa tủa; hòa tủa với 200 μl TE.

Tinh sạch DNA

Các nghiên cứu về phương pháp thu nhận DNA từ đất đều có chung kết luận là DNA sau khi thu được đều cần qua một bước tinh sạch để loại bỏ hết các tạp chất là các axit humic, các chất hữu cơ trong quá trình ly trích DNA có thể còn sót lại [3]. Nghiên cứu cho thấy trong đất chứa rất nhiều thành phần gây ức chế các phản ứng PCR như là các axit humic, chúng ức chế các phản ứng của các enzyme [6, 10].

Trong phạm vi nghiên cứu chúng tôi tinh sạch bằng phương pháp troughing, quy trình như sau: Lựa chọn những genomic DNA đã được tách chiết trực tiếp từ đất bằng cách tiến hành chạy điện di trên gel TAE agarose (0,8% - 1%); quan sát các băng DNA trên gel dưới tia UV. Sau đó dùng dao cắt gel tạo thành giếng kích thước 0,5 –

1cm và chiều dài phụ thuộc vào kích thước của các băng DNA, thêm dung dịch đậm 25 – 30% PEG 8000 vào đầy giếng; chạy điện di 30 phút để DNA thu vào giếng; tập hợp DNA sạch vào eppendorf; thêm vào chloroform : isoamyl alcohol (24:1 v/v) với thể tích bằng với dịch chiết DNA thu từ giếng, ly tâm 12000 vòng ở 4°C trong vòng 10 phút, thu dịch nổi; thêm 2 µl glycogen (10mg/ml) và 50 µl sodium acetate 3M vào eppendorf trộn đều. Thêm vào 1ml cồn lạnh và kết tủa DNA ở nhiệt độ - 80°C trong vòng 25 phút; ly tâm 12000 rpm trong vòng 15 phút ở nhiệt độ 4°C thu tủa; rửa tủa DNA bằng cồn lạnh 70%; để khô khoảng 5 phút ở nhiệt độ phòng và thêm vào 35 µl TE.

Phương pháp điện di

Nhằm mục đích kiểm tra chất lượng mẫu DNA thu được, nhóm sử dụng phương pháp chạy điện di DNA trên gel agarose 0,8% và 1% trong thời gian 30 phút ở điện thế 100 V và cường độ 50 mA với tỉ lệ mẫu là 5 µl mẫu với 1 µl dung dịch nạp mẫu trong các giếng thạch.

Chọn các môi thoái hóa đặc biệt cho gen laccase

Từ nghiên cứu của D'Souza (1996) [5], bài báo này lựa chọn vùng Cu1F, Cu2R để sử dụng chọn cặp môi cho phản ứng PCR nhằm phân lập vùng thoái hóa của gen laccase. Phản ứng PCR trong đề tài được thực hiện với môi Cu1F (5'-CAT(C) TGG CAT(C) GGN TTT(C) TTT(C) CA- 3') và Cu2R (5'GG(A)CT GTG GTA CCA GAA NGT NCC-3').

PCR

Phản ứng PCR được tiến hành với điều kiện: 3 µl DNA được thêm vào 50 µl hỗn hợp phản ứng bao gồm 5 µl của 10 x Taq đệm MgCl₂ (Q-BIOgen, Heidelberg, Germany), 4 µl dNTPs

(10mM 1 lần), 1 µl mỗi primer (60 µM), và 0,2 µl polymerase Taq DNA. Hỗn hợp phản ứng được phủ lên 2 giọt dầu vô trùng và PCR chạy trên hệ thống gradien vòng Master (Eppendorf, Hamburg, Germany) với một vòng khởi đầu biến tính (30s tại 94°C), tiếp tục (30s tại 50°C) và kéo dài (2 phút tại 72°C), và chu kì kéo dài cuối cùng (10 phút tại 72°C). Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên agarose 1% với thang đo BenchTop (Promega, Madison). Các gel được nhuộm và chụp ảnh.

Trình tự DNA và phân tích trình tự

Sản phẩm PCR được biến nạp và tạo dòng thuần bằng bộ kit TOPO TA Cloning của Invitrogen. Các sản phẩm nhân dòng được gửi giải trình tự ở công ty Macrogen. Các trình tự nucleotid thu được từ mẫu đất được xử lý bởi chương trình Bioedit và kiểm tra trên ngân hàng gen DNA và thuật toán tìm Gapped BlastN (NCBI).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định hoạt tính laccase

Mẫu đất rừng Nam Cát tiên được thu ở các vị trí khác nhau trong cùng điều kiện nhiệt độ, khí hậu (mẫu được thu vào mùa mưa). Mỗi mẫu đất được tiến hành đo 3 lần lấy kết quả trung bình.

Theo công thức tính trong phần phương pháp, sau khi tính toán ta được các giá trị U(U/l) như trong Bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính enzyme laccase của các mẫu đất

STT	Mẫu đất	OD _t	U (U/l)
1	Mẫu số 1	0,039	1,81
2	Mẫu số 2	0,037	1,71
3	Mẫu số 3	0,046	2,13

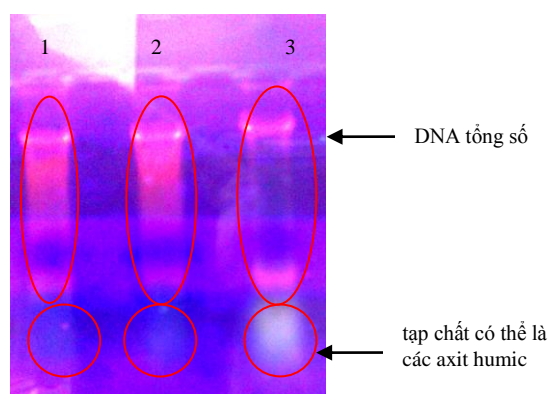
Từ Bảng 2 cho thấy các mẫu đất này đều có laccase nhưng hoạt tính không cao < 3 U/l. Mặc dù vậy thí nghiệm cho thấy có sự đổi màu của dung dịch do sự tương tác của laccase và thuốc thử ABTS, đây chính là sự khẳng định về sự có mặt của laccase trong môi trường tự nhiên mặc dù không nhiều, khẳng định lại kết quả thí nghiệm trước về hoạt tính laccase của nấm *Ectomycorehizal* (Muenzenberger và các cộng sự (1997), Gramss và các cộng sự (1998))... [6, 7]. Trong nghiên cứu này, các mẫu đo được chuẩn bị nhờ hòa lẫn đất với dung dịch đệm Na acetate để các enzyme được đồng nhất vào dung dịch. Nhìn chung so với DNA, các enzyme thường kém bền trong môi trường ngoài tế bào và mặc dù các mẫu đất khi thu nhận được bảo quản ở 4°C nhưng thời gian chờ xử lý và tiến hành đo hoạt tính cũng làm ảnh hưởng tới kết quả thí nghiệm. Số liệu đo thấp cũng chứng tỏ laccase ít có hoặc kém bền ở bên ngoài môi trường tại khu lấy mẫu. Laccase chủ yếu có trong các loại nấm phân hủy lignin, ít xuất hiện ở các nhóm sinh vật khác. Dù vậy kết quả này cũng đủ để biểu thị cho sự hiện diện của laccase trong các mẫu đất rừng Nam Cát Tiên. Việc đo hoạt tính của laccase giúp loại bỏ được những mẫu đất không chứa laccase, giảm bớt thời gian nghiên cứu.

Thu nhận DNA từ các mẫu đất rừng Nam Cát Tiên

Ba mẫu DNA thu được từ phương pháp ly trích nói trên các tube DNA có màu vàng đất, mẫu được chạy điện di trên gel agarose 0,8% để kiểm tra chất lượng mẫu. Kết quả thu được các băng DNA đậm nét rõ ràng là DNA tổng số của nhiều sinh vật khác nhau. Các băng có dạng một dải dài với nhiều kích thước khác nhau (Hình 1). Nghiên cứu này sử dụng lysozyme, chất tẩy rửa là SDS, kết quả thu được rất tốt hơn nữa phương pháp này dễ thực hiện và rẻ tiền, DNA ít bị đứt gãy.

Tinh sạch DNA

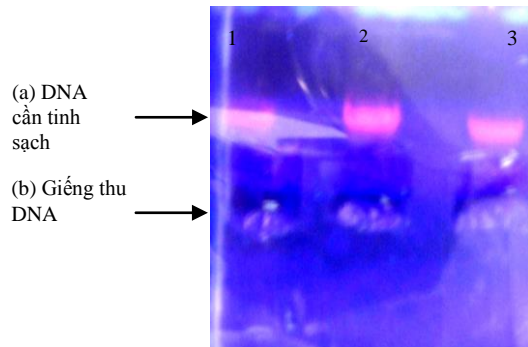
Hình 1 cho thấy có những vệt mờ trên gel ngoài những vạch DNA sáng, chứng tỏ rằng DNA tổng số thu được từ bước ly trích lần rất nhiều tạp chất. Mặc dù DNA thu được có hàm lượng tốt nhưng bước tinh sạch DNA là cần thiết để chuẩn bị cho các phản ứng PCR tiếp theo. Hình 2 thể hiện DNA tổng số được chạy trên gel 0,8% và sử dụng phương pháp trounging để thu DNA sạch. Các giếng được cắt trước DNA tổng số một đoạn kích thước 1 x 0,5 cm, chứa đầy dung dịch PEG 8000 30%. DNA khi chạy về cực dương đi qua giếng sẽ bị dung dịch giữ lại trong giếng.



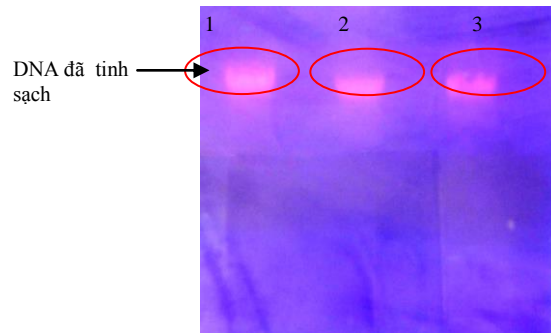
Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số ly trích từ mẫu đất 1, 2, 3. Mẫu được điện di với thể tích 5µl trong thời gian 30 phút ở điện thế 100V. Các băng DNA của 3 mẫu cho các kích thước khác nhau chụp được đánh dấu trong vòng elip.

Sau giai đoạn điện di các tạp chất sẽ bị tách ra khỏi DNA tổng số. Vấn đề còn lại là xử lý dung dịch PEG đã hòa lẫn DNA tổng số bằng một số thao tác kỹ thuật để có được DNA tinh sạch.

DNA tinh sạch thu được đem chạy điện di để kiểm tra chất lượng. DNA sử dụng với thể tích 5 µl cho một giếng. Kết quả cho thấy phương pháp trounging cho kết quả tốt, các băng DNA rõ nét và không còn các vệt mờ như ở Hình 3. Các băng DNA vẫn còn đầy đủ kích thước như mẫu DNA ban đầu. Số lượng DNA thu hồi đủ nhiều để sử dụng tiến hành các bước phân tích kế tiếp.



Hình 2. Tinh sạch DNA bằng phương pháp *troughing*. 1,2,3: mẫu 1, 2, 3 tương ứng a: các băng DNA của mẫu 1, 2, 3 tương ứng, b: các giếng thạch được khoét để thu DNA bằng phương pháp *troughing*



Hình 3. DNA sau khi tinh sạch được chạy điện di với thể tích 5 μ l trong 20 phút điện thế 100V cho kích thước băng DNA rõ ràng và không còn các vết mờ. 1,2,3: mẫu 1, 2, 3 tương ứng; các vòng tròn đánh dấu các băng DNA

Phản ứng PCR

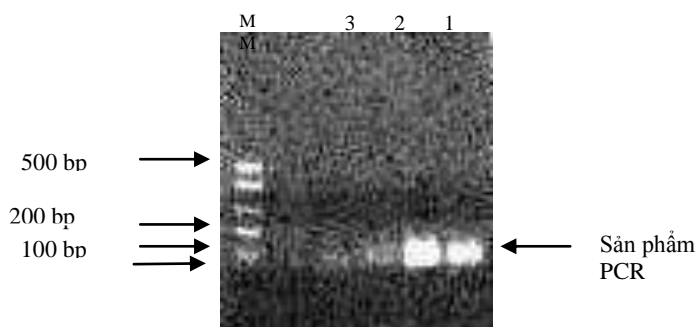
Vấn đề thu các gen laccase bằng phương pháp khuếch đại đối với nghiên cứu thuộc hướng metagenomics là một trong những bước có tính quyết định sự thành công của thí nghiệm. Tùy thuộc vào các nghiên cứu các cặp môi, các điều kiện phản ứng PCR được lựa chọn phù hợp.

Đánh giá cặp môi sử dụng

Môi thoái hóa được sử dụng nên sản phẩm PCR thu được là các đoạn gen laccase hoặc các trình tự đó kích thước tương tự của rất nhiều cá thể sinh vật khác nhau vì thế các đoạn DNA sản phẩm có kích thước khác nhau. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1% có chạy kèm thang đo kích thước cho kết quả như Hình 4. Kết quả mẫu số 1 và số 2 cho 2 băng DNA ở kích thước khoảng 100 tới 140 bp. Mẫu số 3 hầu như không có DNA. Điều này hoàn toàn phù hợp với một số nghiên cứu trước đây về sự đa dạng của gen laccase. Nghiên

cứu của Luis (2004) trước sử dụng cặp môi tương tự cho kết quả các đoạn laccase PCR thu được có kích thước nhỏ khoảng 100 bp tới 400 bp [11], trong đó các băng có ý nghĩa nghiên cứu có kích thước khoảng 100 bp tới 200 bp. Kích thước các sản phẩm PCR tương đương khiến cho băng DNA thể hiện trên hình điện di dày, đậm và không sắc nét (Hình 4).

Tiến hành dòng hóa sản phẩm PCR thu được bằng bộ Kit Topo (InVitrogen): Sản phẩm PCR mỗi mẫu được chèn vào vector tạo dòng pCR-XL-TOPO chứa gen kháng kháng sinh Kanamicin sau đó được biến nạp vào các tế bào *E. coli*. Cuối cùng các tế bào này được cấy trải trên các đĩa petri cùng thời điểm, có nồng độ kháng sinh tương tự. Các dòng chứa plasmid có đoạn DNA chèn vào thì gen kháng kháng sinh Kanamicin sẽ hoạt động và các khuẩn lạc mọc được trên đĩa cấy, các dòng không có plasmid có đoạn DNA chèn vào sẽ bị loại bỏ.



Hình 4. Kết quả PCR mẫu 1, 2, 3 tương ứng với cặp mồi Cu1F/Cu2R
1, 2, 3: mẫu 1, 2, 3 tương ứng; M: marker, Mẫu 1, 2 cho các băng DNA rõ ràng và dày hơn nhiều so với các vạch marker, mẫu số 3 cho băng DNA mờ, không đáng kể

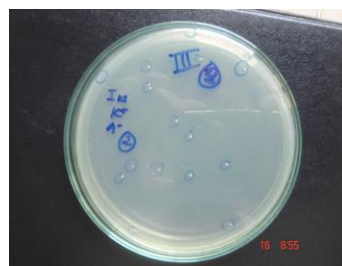
Ba mẫu DNA thu được từ 3 phản ứng PCR chỉ cho mẫu số 1 và mẫu số 2 có kết quả tốt, mẫu số 3 mờ không đáng kể rất khó xác định sự tồn tại của sản phẩm PCR. Mẫu số 1 và số 2 được tạo dòng, kết quả thực nghiệm là mẫu 1 cho 1 khuẩn lạc, mẫu số 2 cho 13 khuẩn lạc. Tổng cộng thu được 14 khuẩn lạc (Hình 5).

Khuẩn lạc được thu và PCR dịch khuẩn lạc với mồi laccase. Tuy nhiên kết quả phản ứng chỉ cho 3 mẫu dương tính, các mẫu khác không có sản phẩm PCR (Hình 6). Sản phẩm PCR có kích thước khoảng 100 bp ~130 bp phù hợp với dự

đoán ban đầu về kích thước đoạn gen laccase sử dụng mồi Cu1F, Cu2R. Như vậy có ít nhất 3 đoạn gen có khả năng là laccase đã được dòng hóa, các dòng khác có thể chứa đoạn DNA ngẫu nhiên.

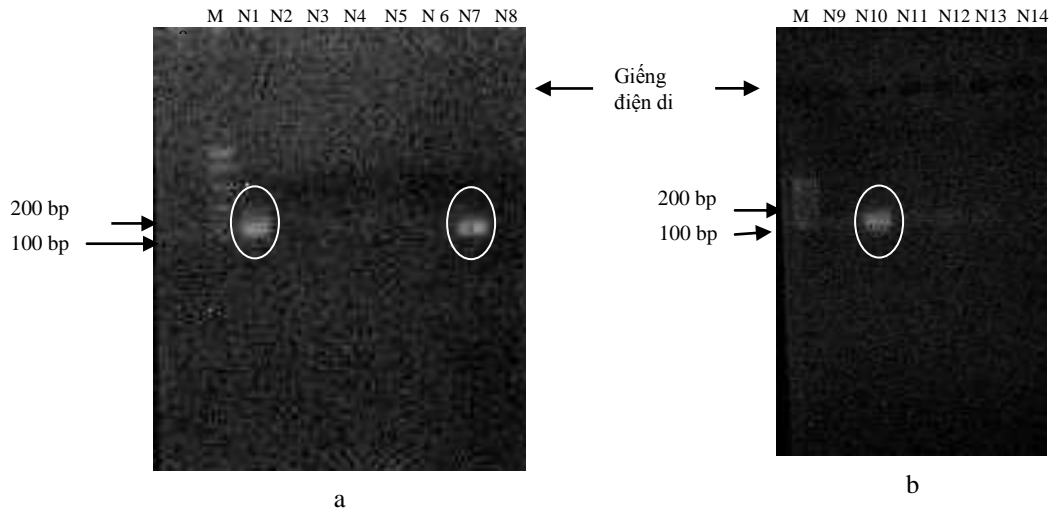


a. Sản phẩm PCR mẫu số 1 được chèn vào vector tạo dòng và biến nạp vào *E. coli* sau đó cấy trên môi trường chứa Kanamicin, cho 1 khuẩn lạc



b. Sản phẩm PCR mẫu số 2 được chèn vào vector tạo dòng và biến nạp vào *E. coli* sau đó cấy trên môi trường chứa Kanamicin cho 13 khuẩn lạc

Hình 5. Kết quả biến nạp



Hình 6. Sản phẩm PCR khuẩn lạc bằng môi laccase được chạy điện di để kiểm tra, kết quả cho thấy mẫu N1, N7 và N10 có vạch DNA ở khoảng 100 tới 140bp, các mẫu khác không có DNA.

Giải trình tự các khuẩn lạc nói trên thu được các trình tự nucleotid tương ứng. Khi so sánh các trình tự N1, N7, N10 với các trình tự laccase lấy từ Genbank, các kết quả cho thấy các mẫu có chứa các trình tự bảo tồn, tuy nhiên độ tương đồng với các trình tự laccase chưa cao. So sánh với những nghiên cứu trước đó, các nhóm laccase thu được thuộc nhóm Basidiomycetes có sự đa dạng về chủng loại, độ tương đồng tới 60 tới 100% [4, 5]. Các nhóm laccase thu được đem so sánh cho tương đồng với các trình tự trên

Genbank là từ khoảng 50 tới 80%; phân tích bằng công cụ BLAST trên trang web NCBI cho kết quả như sau:

Mẫu N1: Khi phân tích bằng công cụ Blast kết quả cho thấy mức độ bao phủ của mẫu N1 bởi trình tự của *Lachancea kluyveri*, *Moniliophthora perniciososa*, *Neurospora crassa* lớn hơn 80% và độ bao phủ được tạo thành liên lạc từ đầu 5' đến đầu 3' của mẫu N1 (Hình 7) là sản phẩm PCR được tạo ra giữa hai môi, sản phẩm được tạo dòng từ DNA tự do trong đất có nguồn gốc nấm.

Descriptions [Provide feedback on the new report](#)

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Lachancea kluyveri NRRL Y-12651 2P3.SKLU-Cont77.23, whole genome shotgun sequence	217	217	87%	2e-54	99%	AACE03000010.1
Neurospora crassa OR74A chromosome II contig7.44, whole genome shotgun sequence	217	217	87%	2e-54	99%	AABX02000044.1
Magnaporthe oryzae 70-15 cont8.205, whole genome shotgun sequence	123	123	48%	4e-26	100%	AACU03000205.1
Moniliophthora perniciosa FA553 Contig4344, whole genome shotgun sequence	80.6	80.6	51%	5e-13	85%	ABRE01004218.1
Moniliophthora perniciosa FA553 Contig12389, whole genome shotgun sequence	69.8	69.8	82%	9e-10	76%	ABRE01012142.1
Moniliophthora perniciosa FA553 Contig14873, whole genome shotgun sequence	68.0	68.0	51%	3e-09	85%	ABRE01014610.1
Moniliophthora perniciosa FA553 Contig15579, whole genome shotgun sequence						BE01015313.1
Moniliophthora perniciosa FA553 Contig2439, whole genome shotgun sequence						BE01002321.1
Saccharomyces pastorianus Weihenstephan 3470 Contig25.11, whole genome shotgun sequence	41.0	41.0	15%	0.40	100%	ARPO01000172.1
Talaromyces stipitatus ATCC 10590 qcontig_1105507294771, whole genome shotgun sequence	37.4	37.4	19%	4.8	89%	ABAS01000099.1
Ashbya gossypii ATCC 10895 chromosome IV, complete sequence	37.4	37.4	23%	4.8	85%	NC_005785.6

a

Alignments [Provide feedback on the new report](#)

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#)

Lachancea kluyveri NRRL Y-12651 2P3.SKLU-Cont77.23, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AACE03000010.1](#) Length: 9590 Number of Matches: 1

Range 1: 754 to 876 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(240)	2e-54	122/123(99%)	0/123(0%)	Plus/Plus

```

Query 8  CAATTCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG 67
          |||
Sbjct 754 CAATTCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG 813

Query 68  TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGT 127
          |||
Sbjct 814 TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGT 873

Query 128 CGT 130
          |||
Sbjct 874 CGT 876
    
```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#)

Neurospora crassa OR74A chromosome II contig7.44, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AABX02000044.1](#) Length: 303465 Number of Matches: 1

Range 1: 303327 to 303449 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(240)	2e-54	122/123(99%)	0/123(0%)	Plus/Plus

```

Query 8  CAATTCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG 67
          |||
Sbjct 303327 CAATTCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG 303386

Query 68  TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGT 127
          |||
Sbjct 303387 TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGT 303446

Query 128 CGT 130
          |||
Sbjct 303447 CGT 303449
    
```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#)

b

Neurospora crassa OR74A chromosome II contig7.44, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AABX02000044.1](#) Length: 303465 Number of Matches: 1

Range 1: 303327 to 303449 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
217 bits(240)	2e-54	122/123(99%)	0/123(0%)	Plus/Plus

```

Query 8  CAATTCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG 67
          |||
Sbjct 303327 CAATTCACACACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAG 303386

Query 68  TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGT 127
          |||
Sbjct 303387 TGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAACCTGT 303446

Query 128 CGT 130
          |||
Sbjct 303447 CGT 303449
    
```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#)

Magnaporthe oryzae 70-15 cont8.205, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AACU03000205.1](#) Length: 150 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 68 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
123 bits(136)	4e-26	68/68(100%)	0/68(0%)	Plus/Plus

```

Query 63  ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAA 122
          |||
Sbjct 1  ATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAA 60

Query 123 CCTGTCGT 130
          |||
Sbjct 61  CCTGTCGT 68
    
```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#)

c

Hình 7. Kết quả so sánh trình tự bằng công cụ Blast của NCBI trên mẫu N1
b, c: Độ bao phủ liên mạch từ đầu 5' tới 3' của N1 với một số trình tự so sánh

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Marssonina brunnea f. sp. 'multigermubi' MB_m1 contig_01722, whole genome shotgun	39.2	39.2	15%	1.4	100%	AFXC01001722.1
<input type="checkbox"/> Puccinia triticina 1-1 BBBD Race 1 cont1.31268, whole genome shotgun sequence	39.2	39.2	18%	1.4	92%	ADAS01031268.1
<input type="checkbox"/> Coprinopsis cinerea okayama7#130 chromosome 1 cont3.1, whole genome shotgun seq	39.2	39.2	18%	1.4	92%	AACS02000001.1
<input type="checkbox"/> Heterobasidion irregulare TC 32-1 HETIRscaffold_04_Cont4, whole genome shotgun seq	37.4	37.4	16%	4.8	96%	AEOJ01000004.1
<input type="checkbox"/> Melampsora larici-populina 98AG31 MELLAscaffold_30_Cont1113, whole genome shotgun	37.4	37.4	21%	4.8	87%	AECX01001113.1
<input type="checkbox"/> Aellomyces capsulatus H88 cont1.31, whole genome shotgun sequence	37.4	37.4	20%	4.8	89%	ABRJ01000031.1
<input type="checkbox"/> Talaromyces stipitatus ATCC 10500 qcontig_1105507294141, whole genome shotgun seq	37.4	37.4	17%	4.8	92%	ABAS01000005.1
<input type="checkbox"/> Aspergillus nidulans FGSC A4 chromosome 1 ANcontig1.116, whole genome shotgun seq	37.4	37.4	17%	4.8	92%	AACD01000116.1

Alignments Provide feedback on the new report

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Mẫu N7: Mức độ bao phủ của mẫu N7 bởi trình tự của với *Marssonina brunnea*, *Puccinia triticina*, *Talaromyces stipitatus*.... và các nhóm khác khoảng 20 tới nhỏ hơn 40% (Hình 8). Hình 8b, c cho thấy có một số nucleotid khác nhau giữa đoạn so sánh và mẫu (các gap).

Download GenBank Graphics Next

Marssonina brunnea f. sp. 'multigermubi' MB_m1 contig_01722, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AFXC01001722.1](#) Length: 25491 Number of Matches: 1 **Related I**

Range 1: 4169 to 4189 [GenBank](#) [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	1.4	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Plus

Query 102 AAGATCTGGCTCACCCTCCTC 122
Sbjct 4169 AAGATCTGGCTCACCCTCCTC 4189

Download GenBank Graphics Next

Puccinia triticina 1-1 BBBD Race 1 cont1.31268, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|ADAS01031268.1](#) Length: 934 Number of Matches: 1 **Related I**

Range 1: 118 to 143 [GenBank](#) [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
39.2 bits(42)	1.4	24/26(92%)	0/26(0%)	Plus/Minus

Query 76 TGAGCAACACTCCGCCACCTTGA 101
Sbjct 143 TGAGCAACACTCCGCCACCTTGA 118

Download GenBank Graphics Next

Coprinopsis cinerea okayama7#130 chromosome 1 cont3.1, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AACS02000001.1](#) Length: 4146986 Number of Matches: 1 **Related I**

Query 112 TCACCGTCTCTCCTCATTTCGCTA 137
Sbjct 2334432 TCAACGTCTCTCCTCATTTCGCTA 2334407

Download GenBank Graphics Next

Heterobasidion irregulare TC 32-1 HETIRscaffold_04_Cont4, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AEOJ01000004.1](#) Length: 2988214 Number of Matches: 1 **Related In**

Range 1: 492727 to 492749 [GenBank](#) [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
37.4 bits(40)	4.8	22/23(96%)	0/23(0%)	Plus/Plus

Query 104 GATCTGGCTCACCCTCCTCCTCA 126
Sbjct 492727 GATCTGGCTCACCCTCCTCCTCA 492749

Download GenBank Graphics Next

Melampsora larici-populina 98AG31 MELLAscaffold_30_Cont1113, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AECX01001113.1](#) Length: 6379 Number of Matches: 1 **Related In**

Range 1: 1608 to 1637 [GenBank](#) [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
37.4 bits(40)	4.8	26/30(87%)	0/30(0%)	Plus/Plus

Query 97 TTGGAAGATCTGGCTCACCCTCCTCA 126
Sbjct 1608 TTGGAAGATCTGGCTCACCCTCCTCA 1637

Hình 8. Kết quả Blast của N7 trên NCBI

Độ bao phủ với 1 số nu sai khác (gap) từ đầu 5' tới 3' của N7 với một số trình tự so sánh

Mẫu N10: Mức độ bao phủ của mẫu N10 bởi trình tự của với *Verticillium albo-atrum*, *Microbotryum violaceum*, *Trichoderma*

atroviride và các nhóm khác nhỏ hơn 30% (Hình 9). Hình 9b cho thấy có một số nucleotid khác nhau giữa đoạn so sánh và mẫu (các gap).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
Verticillium albo-atrum VaMs.102 cont1.905. whole genome shotgun sequence	39.2	39.2	20%	1.4	90%	ABPE01000905.1
Microbotryum violaceum p1A1 Lamole cont1.632. whole genome shotgun sequence	37.4	37.4	16%	4.8	96%	AEU01000632.1
Trichoderma atroviride IMI 206040 TRIATcontig_18. whole genome shotgun sequence	37.4	37.4	27%	4.8	83%	ABDG02000018.1

a

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Microbotryum violaceum p1A1 Lamole cont1.632, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|AEU01000632.1](#) Length: 32812 Number of Matches: 1

Range 1: 18131 to 18153 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) **Related Information**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
37.4 bits(40)	4.8	22/23(96%)	0/23(0%)	Plus/Minus

Query 105 TGGAGAAGCCGTCGTACATGACA 127
 Sbjct 18153 TGGAGTASCCGTCGTACATGACA 18131

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

Trichoderma atroviride IMI 206040 TRIATcontig_18, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [gb|ABDG02000018.1](#) Length: 1417455 Number of Matches: 1

Range 1: 214763 to 214802 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) **Related Information**

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
37.4 bits(40)	4.8	34/41(83%)	3/41(7%)	Plus/Minus

Features: [hypothetical protein](#)

Query 78 AGGCGTTGC--ACTTCACCCAGCCGCTGCATGGAGAAGCCGT 116
 Sbjct 214802 AGGCGCTGCTTACTCC--CCAGCTGCTGCATGGAGAAGCCGT 214763

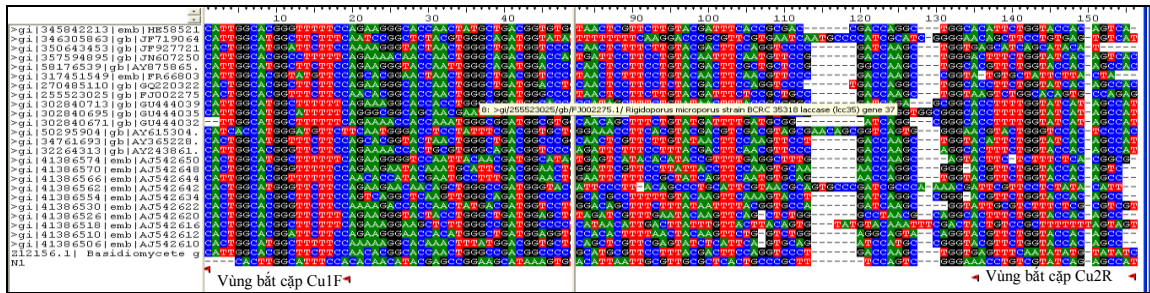
b

Hình 9. Kết quả Blast của N10 trên NCBI

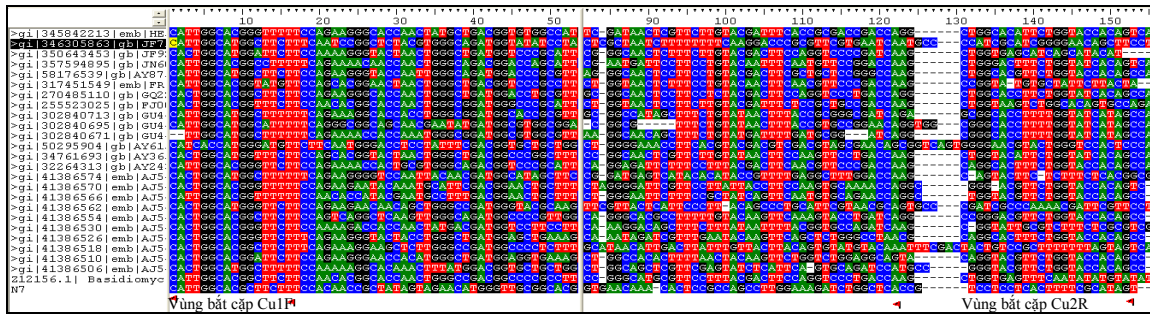
Độ bao phủ với 1 số nu sai khác (gap) từ đầu 5' tới 3' của N10 với một số trình tự so sánh

Từ kết quả trên các trình tự mẫu N7, N10 có độ bao phủ thấp chỉ đạt được trên dưới 40% nên có thể đây là các sản phẩm khuếch đại kỹ sinh. Mẫu N1 có độ bao phủ khoảng 87% với đoạn trình tự liên lạc, có khả năng đây là sản phẩm được tạo đồng từ DNA tự do trong đất có nguồn gốc từ nấm. Thực tế thu mẫu đất và từ kết quả blast ở trên cho các trình tự được bao phủ nhiều nhất với mẫu là các trình tự nucleotide của nhóm nấm Basidiomycetes nên nhóm đề tài đã lựa chọn

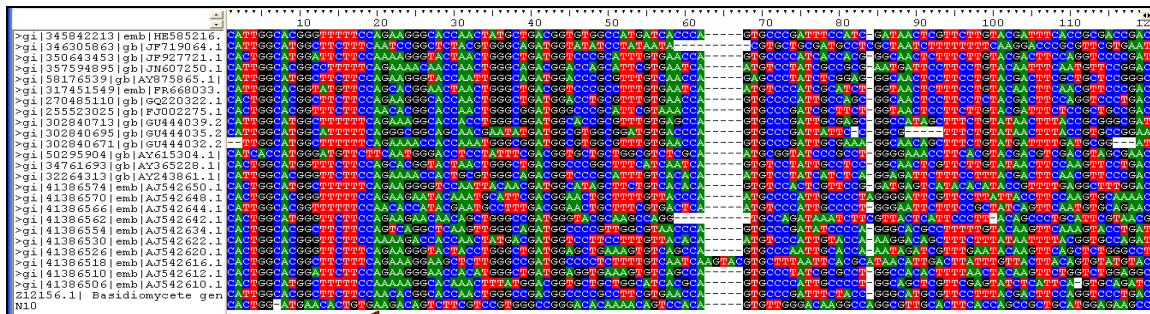
những trình tự laccase của nấm Basidiomycetes trên Genbank để phân tích. Tuy nhiên vì những dữ liệu về laccase của nhóm này chưa nhiều và hầu hết đều không rõ ràng về mặt phân loại, danh tính loài nên rất khó khăn trong việc phân tích để xác định, mặc dù vậy kết quả phân tích trên cũng cho thấy khả năng N1 là trình tự laccase của một loại nấm ở đất rừng Nam Cát Tiên (Hình 10, Hình 14).



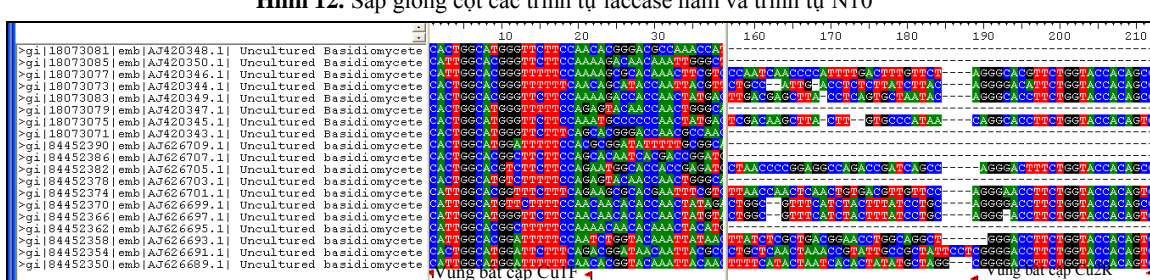
Hình 10. Sắp giống cột các trình tự laccase nấm và trình tự N1



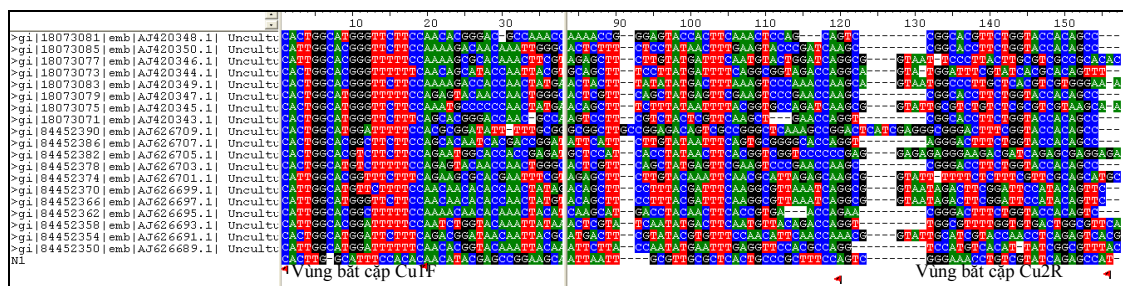
Hình 11. Sắp giống cột các trình tự laccase nấm và trình tự N7



Hình 12. Sắp giống cột các trình tự laccase nấm và trình tự N10



Hình 13. Sắp giống cột các trình tự nucleotide laccase của các nhóm nấm Basidiomycete (chưa được xác định tên cụ thể)



Hình 14. Sắp giống cột N1 và các nhóm trên.

Kết quả thực nghiệm trên cho thấy cá thể mang N1, N7, N10 chứa các trình tự bảo tồn của laccase tuy nhiên khi phân tích bằng chương trình Bioedit thì độ tương đồng với các nhóm laccase tìm được trên Genbank của N7 và N10 không cao nên chưa thể kết luận rằng đây có phải là laccase hay không, còn mẫu N1 có thể chính là đoạn gen laccase của một loại nấm trong mẫu đất.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này cho phép nhóm nghiên cứu đưa ra một số kết luận như sau:

Kiểm chứng được sự có mặt của sinh vật sinh laccase trong mẫu đất rừng Nam Cát Tiên bằng phương pháp đo hoạt tính laccase trực tiếp từ đất với chất thử ABTS .

Sử dụng thành công các phương pháp của metagenomics: thu nhận DNA trực tiếp từ các

mẫu đất, tinh sạch các mẫu DNA này bằng phương pháp troubleshooting.

Thu nhận được đoạn gen laccase có kích thước khoảng 140 bp (nhỏ hơn 300 bp như dự đoán) bằng PCR, thu được 3 dòng sản phẩm DNA tinh sạch có chất lượng tốt, các kết quả điện di kiểm chứng cho các băng DNA rõ ràng và sắc nét.

Tách được 3 dòng tế bào E. coli mang sản phẩm PCR nói trên và xác định được 1 dòng có thể chứa gen laccase cần tìm. Tuy các dòng E. coli biến nạp tạo được chưa nhiều do một số hạn chế về mặt điều kiện tiến hành thí nghiệm nhưng nghiên cứu đã bước đầu thành công trong việc phân lập trực tiếp các gen laccase từ các mẫu đất để khảo sát độ đa dạng của nó theo hướng nghiên cứu metagenomics.

Identification of Basidiomycetes laccase genes in Nam Cat Tien forest soil by metagenomics

- **Hoang Quoc Khanh**

Institute of Tropical Biology

- **Nguyen Bich Ngoc**

Viet Nam National University of Ho Chi Minh City

ABSTRACT

It was reported that there were 0.1 – 1% microorganism discovered by traditional cultivation, 99% others were not known cause of difficulties or impossible for growing in laboratory's conditions. Studying on microorganisms without culture was an aim of modern microbiology diversity. This research was used metagenomics method to access the diversity of laccase genes of

mushrooms in Nam Cat Tien forest soil. The technique was simple, fast and cheap such as extracting and purifying DNA directly from soil, cloning by using retrograde primers and analyzing sequences of genes library. We have identified successfully laccase-like gene from samples collected in Nam Cat Tien forest.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đào Thị Ngọc Ánh, Nghiên cứu phân loại, khả năng phân hủy DDT và sinh laccase của chủng nấm sợi phân lập từ đất hỗn hợp ô nhiễm thuốc trừ sâu, Luận văn thạc sỹ (2009).
- [2]. Nguyễn Hoài Giang, Nguyễn Xuân Hùng, Trịnh Tam Kiệt, Lê Đình Lương, Nghiên cứu khả năng phân loại chi Ganoderma bằng kỹ thuật phân tử RAPD-PCR và mối đặc hiệu laccase, *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng*, 1 (2005).
- [3]. D.W. Cullen, P.R. Hirsch, Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR, *Soil Biol. Biochemical*, 30: 983-993 (1998).
- [4]. D.M. Chen, A.B. Brigitte, F.S.T. Andrew, W.G.C. John, Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*, *New Phytologist* 157, 547-554 (2003).
- [5]. T.M. D'Souza, K. Boominathan, C.A. Reddy, Isolation of Laccase Gene-Specific Sequences from White Rot and Brown Rot Fungi by PCR, *Appl. Environ. Microbiology*, 62, 3739 (1996).
- [6]. P. Harnpicharnchai, T. Thonggaram, R. Sriprang, V. Champreda, S. Tanapongpipat, L. Eurwilaichitr, An efficient purification and fractionation of genomic DNA from soil by modified troughing method, *The Society for Applied Microbiology*, 45, 387-391 (2007).
- [7]. B. Helmut, P. Manuel, W. Franco, Z. Josef, A strategy for optimizing quality and

- quantity of DNA extracted from soil, *Journal of Microbiological Methods*, 45, 7-20 (2001).
- [8]. S. Jagtar, B. Arvind, S. Neha, J. Amit, B. Niti, S. Sukhdeep, B. Vandana, B. Navneet, Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances, *Biotechnology Journal*, 4, 480-494 (2009).
- [9]. A. Knietsch, T. Waschowitz, S. Bowien, A. Henne et al., Construction and screening of metagenomics libraries derived from enrichment cultures: Generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli.*, *Appl. Environ. Microbiology*, 69, 1408–1416 (2003).
- [10]. P. Luis, G. Walther, H. Kellner, F. Martin, F. Buscot, Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil, *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 1025-1036 (2004).
- [11]. D.N. Miller, J.E. Bryant, E.L. Madsen, W.C. Ghiorse, Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples, *Appl. Environ. Microbiology*, 65, 4715–4724 (1999).
- [12]. W.R. Streit, R. Daniel, *Metagenomics: Methods and Protocols*, Humana Press (2010).
- [13]. S. Voget, C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch et al., Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome, *Appl. Environ. Microbiology*, 69, 6235–6242 (2003).