

TẠO DÒNG VÀ GIẢI TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA PECTINASE Ở *ASPERGILLUS NIGER* M13

Phan Thị Thanh Diễm¹, Lê Mỹ Tiểu Ngọc², Nguyễn Thị Mỹ Lệ³, Nguyễn Bảo Hưng²,
Lê Thị Kim Thoa², Trịnh Thị Phương Thảo², Trương Thị Phương Lan⁴,
Nguyễn Đức Huy², Phạm Thị Ngọc Lan⁵, Trần Quốc Dung⁶

¹ Trường Đại học Quảng Nam

² Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

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

⁴ Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

⁵ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

⁶ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Endo-polygalacturonase (pectinase) thu hút được nhiều nhà nghiên cứu nhờ ứng dụng rộng rãi trong thực phẩm, xử lý nước thải, thức ăn chăn nuôi, giấy và bột giấy, nước ép trái cây và công nghiệp dệt. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho pectinase từ chủng *Aspergillus niger* M13 được tạo dòng sử dụng 3 cặp mồi thiết kế dựa trên trình tự của các gen endogalacturonase có mã số KM244045, X64356 và Y18806. Sản phẩm khuếch đại được gắn vào pGEM[®]-T Easy và biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt vào *E. coli* TOP10. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết và xác định trình tự. Kết quả giải trình tự 3 gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* mã hóa cho pectinase có kích thước lần lượt là 1.237 bp, 1.728 bp và 1.338 bp. Các gen được đăng ký trên GenBank với các mã số tương ứng MT502411, MT502412 và MT502413.

Từ khóa: Pectinase, *Aspergillus niger*, tạo dòng, giải trình tự.

MỞ ĐẦU

Pectin là một heteropolysaccharide được tìm thấy trong khoảng giữa các tế bào và thành tế bào sơ cấp của thực vật bậc cao. Pectin hoạt động như một "chất keo" giữa các polysaccharide của thành tế bào (cellulose và hemicellulose) và protein (glycoprotein giàu hydroxyproline). Pectin được cấu tạo gồm có mạch chính là các chuỗi acid D-galacturonic được liên kết bởi liên kết 1,4-glycosid, ngoài ra còn có liên kết ester với nhóm methyl ở các nhánh phụ. Quá trình thủy phân pectin liên quan đến một số enzyme, như pectate lyase (EC 4.2.2.2), pectin lyase (EC 4.2.2.10), exo-polygalacturonase (EC 3.2.1.67) và quan trọng nhất là endo-polygalacturonase (EC 3.2.2.15) hay còn gọi là pectinase (Wang *et al.*, 2018). Enzyme này sẽ khử các mạch polymer của pectin nhờ các phản ứng thủy phân và ester hóa. Pectinase phân tách acid polygalacturonic thành acid monogalacturonic bằng cách mở các liên kết glycosid và phá vỡ liên kết ester giữa các nhóm carboxyl và methyl (Amin *et al.*, 2019). Pectinase tồn tại tự nhiên ở nhiều loại thực vật, tuy nhiên việc sản xuất công nghiệp enzyme này thường được thực hiện bằng hệ thống vi sinh vật. Pectinase được sử dụng rộng rãi để phá vỡ các nguyên liệu thực vật trong các ngành sản xuất thực phẩm, từ đó làm tăng quá trình chiết xuất nước ép trái cây. Các pectinase có tính axit trong tự nhiên cho phép giảm vị đắng và vẩn đục của sản phẩm thực phẩm, đặc biệt là nước ép trái cây. Ngoài ra, pectinase được áp dụng để xử lý nước thải từ các ngành công nghiệp khác nhau. Bên cạnh đó, chế biến trà và cà phê, khai thác dầu, công nghiệp dệt, sản xuất thức ăn chăn nuôi và sản xuất giấy cũng cần pectinase.

Một số lượng lớn các chủng vi khuẩn, chủ yếu là *Bacillus* sp., nấm men (*Yarrowia lipolytica* và *Saccharomyces cerevisiae*) và nhiều loại nấm sợi như *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojaori*, *A. penicillium griseoroseum* và *Phanerochaete chrysosporium*, là những hệ thống sinh vật sản xuất pectinase tiềm năng (Amin *et al.*, 2019). Trong số các chủng này, *A. niger* đã thu hút sự chú ý nhiều nhất vì có lịch sử lâu đời trong các ngành công nghiệp lên men và nó được xác định là an toàn (GRAS), theo Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ. Mặc dù *A. niger* là một vi sinh vật GRAS và chủng này không tạo ra độc tố nấm hoặc kháng sinh trong các điều kiện để sản xuất enzyme, nhưng hoạt động của enzyme tự nhiên không đủ cao cho các ứng dụng công nghiệp và rất khó để tinh sạch. Các vi sinh vật sản xuất pectinase thân thiện với môi trường có thể được thao tác về mặt di truyền để cải thiện chủng và tăng năng suất. Do đó, để tạo nguyên liệu di truyền sản xuất các pectinase tái tổ hợp, bước đầu chúng tôi đã tiến hành phân lập, tạo dòng các gen mã hóa enzyme pectinase từ *A. niger* M13. Nội dung bài báo này sẽ trình bày các kết quả trong việc phân lập, tạo dòng, xác định trình tự các gen mã hóa pectinase hiện diện trong chủng nấm *A. niger* M13.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm *A. niger* M13 đã được chúng tôi phân lập từ vỏ bưởi da xanh (Diem *et al.*, 2018), hiện đang được lưu trữ tại Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA tổng số từ *A. niger* M13

Sinh khối sợi nấm nghiền trong 500 μ L đệm CTAB (100 mM Tris-HCl, pH 8; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2 % β -mercaptoethanol) với sự hỗ trợ của các hạt thủy tinh. Dịch chiết tế bào được thu hồi bằng ly tâm 14.000 vòng/phút trong 5 phút, 4°C. Dịch chiết thu được bổ sung thêm hỗn hợp phenol: chloroform: isopropanol (tỷ lệ 25:24:1) với tỷ lệ thể tích 1:1, trộn đều và phân tách bằng ly tâm 14.000 vòng/phút trong 10 phút, 4°C. Hút chuyển pha trên sang ống eppendorf 1,5 mL mới và DNA tổng số được kết tủa với cùng một thể tích ethanol tinh khiết, sau đó rửa kết tủa bằng ethanol 70% 2 lần và hòa tan trong 50 μ L nước cất vô trùng. DNA tổng số được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8% bổ sung thuốc nhuộm RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution 20000x (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc) bằng dòng điện một chiều ở 80 V trong 50 phút. Gel được quan sát dưới đèn tử ngoại (UV transilluminator, Wealtec).

Phân lập các gen mã hóa pectinase từ chủng *A. niger* M13

Trình tự mỗi dùng để phân lập các gen mã hóa pectinase từ chủng *A. niger* M13 được thiết kế dựa trên các gen endogalacturonase của *A. niger* (mã số KM244045, X64356 và Y18806). Các trình tự nucleotide của mỗi bao gồm: *AspPecA-F*: 5'-ATGGTCCGTCAGCTTATC-3' và *AspPecA-R*: 5'-CTACAAATCGCAGCTAATCC-3'; *AspPecB-F*: 5'-ATGAAGCGCAGCGCGCTCCT-3' và *AspPecB-R*: 5'-TTAAGGGCATCCCGAAGAGG-3'; *AspPecC-F*: 5'-ATGCATTTCTCCAGAACGC -3' và *AspPecC-R*: 5'- TTAATCGCTGCAGGAAGCGC -3'.

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 60 ng DNA tổng số, 6 μ L Go Taq® Green Master Mix 2x (Promega, Mỹ); 1 μ L mỗi xuôi (10 pmol/ μ L); 1 μ L mỗi ngược (10 pmol/ μ L); và thêm nước cất vô trùng để đạt tổng thể tích là 12 μ L. Quá trình khuếch đại các gen pectinase được thực hiện bằng máy luân nhiệt (Veriti® 96-well Thermal Cycler, AB Applied Biosystems, Mỹ). Chu trình nhiệt tối ưu dùng để khuếch đại các gen pectinase gồm biến tính 95°C trong 5 phút; 30 chu kì nhiệt với mỗi chu kì là 95°C trong 1 phút, 55°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút; cuối cùng là 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, điện áp 80 V trong 30 phút.

Tạo dòng các gen mã hóa pectinase

Sản phẩm PCR được tạo dòng trong vector pGEM®-T Easy (Promega), thành phần phản ứng gắn bao gồm: 50 ng vector pGEM®-T Easy, 5 μ L đệm, 3 đơn vị T4 DNA ligase, 60 ng sản phẩm PCR, sau đó bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 μ L, phản ứng được ủ 25°C trong 1 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4°C. Vector pGEM®-T Easy mang đoạn chèn được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt, thể biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp khuẩn lạc xanh-trắng trên đĩa Petri chứa môi trường LB rắn có bổ sung 50 μ g/mL ampicillin và tác nhân chọn lọc IPTG (isopropylthiogalactose) + X-gal.

Giải trình tự gen pectinase

DNA plasmid của tế bào được tách chiết bằng Kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermoscientific, Mỹ). Sau đó, DNA plasmid được sử dụng làm khuôn mẫu để kiểm tra các gen pectinase bằng phản ứng PCR như mô tả ở trên và xác nhận bằng phản ứng cắt với enzyme *EcoRI* (Thermoscientific, Mỹ). Plasmid tái tổ hợp có mang gen được gửi đi phân tích trình tự để xác định gen quan tâm tại công ty First BASE (Malaysia).

Phân tích trình tự gen pectinase

Trình tự gen mã hóa pectinase được phân tích và so sánh với gen pectinase trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen thế giới GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Phân tích đặc tính của các gen pectinase sử dụng các phần mềm miễn phí của Trung tâm Phân tích trình tự sinh học, Đại học Kỹ thuật Đan Mạch (<http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml>).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA tổng số

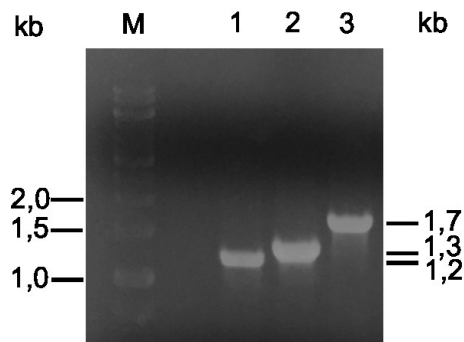
Nhân sinh khối *A. niger* M13 trong môi trường PDA ở 30°C, 180 vòng/phút. Sau 72 giờ nuôi cấy, sinh khối sợi nấm được thu nhận và rửa sạch môi trường nuôi cấy bằng nước cất khử trùng trước khi tiến hành tách chiết DNA tổng số. Kết quả tách chiết DNA tổng số được thể hiện rõ trên Hình 1, DNA thu được có kích thước lớn hơn 10 kb, không bị đứt gãy, sạch, không nhiễm RNA. Như vậy phương pháp tách chiết DNA tổng số sử dụng đệm CTAB là hoàn toàn phù hợp với chủng *A. niger* M13. DNA thu được đảm bảo chất lượng để làm khuôn mẫu cho các phản ứng PCR phân lập các gen pectinase.



Hình 1. DNA tổng số của chủng *A. niger* M13
M: marker DNA 1 kb; 1, 2: DNA tổng số tách chiết bằng đệm CTAB

Phân lập gen

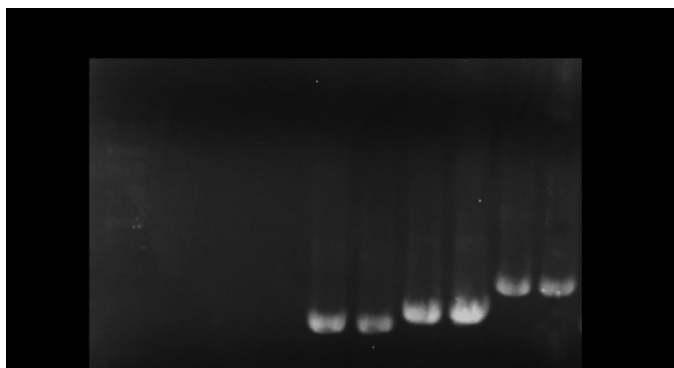
Để xác định sự hiện diện các gen pectinase trong chủng *A. niger* M13, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với khuôn mẫu là DNA tổng số được tách chiết bằng đệm CTAB, sử dụng các cặp mồi được trình bày ở trên. Kết quả phản ứng PCR được thể hiện chi tiết trong Hình 2. Theo hình ảnh điện di trên agarose, chúng tôi thu được 3 sản phẩm PCR tương ứng với 3 cặp mồi *AspPecA-F/AspPecA-R*, *AspPecB-F/AspPecB-R* và *AspPecC-F/AspPecC-R*, các sản phẩm lần lượt có kích thước là 1200 bp (*AspPecA*), 1700 bp (*AspPecB*) và 1300 bp (*AspPecC*). Các băng DNA rõ, đậm, không xuất hiện sản phẩm phụ, điều này chứng tỏ các cặp mồi sử dụng là đặc hiệu và xác định được sự hiện diện của ba gen khác nhau mã hóa cho pectinase ở *A. niger* M13. So sánh với kích thước các gen được dùng để thiết kế mồi, chúng tôi nhận thấy 3 gen *AspPecA*, *AspPecB*, *AspPecC* khuếch đại từ hệ gen của *A. niger* M13 dài hơn trình tự CDS của các gen dùng để thiết kế mồi. Điều này hoàn toàn hợp lý vì các gen của chủng *A. niger* dùng để khuếch đại đều được phân lập từ mRNA, do đó đã loại bỏ các đoạn intron trong quá trình phiên mã.



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm PCR các gen pectinase trên gel agarose 0,8%.
M: marker DNA 1 kb; 1, 2, 3: sản phẩm PCR gen pectinase A, pectinase C, pectinase B

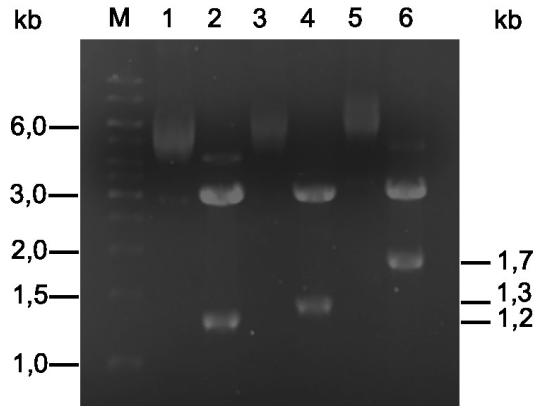
Tạo dòng gen

Sau khi biến nạp vào *E. coli* TOP10, tiến hành chọn lọc các khuẩn lạc màu trắng tái tổ hợp và kiểm tra nhanh bằng phản ứng PCR trực tiếp từ khuẩn lạc. Kết quả PCR được hiển thị ở Hình 3.



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm PCR khuẩn lạc chứa pGEM[®]-T Easy-pectinase
M: marker DNA 1 kb; 1, 2: Sản phẩm PCR khuếch đại từ khuẩn lạc mang pGEM[®]-T Easy-*AspPecA*; 3, 4: Sản phẩm PCR khuếch đại từ khuẩn lạc mang pGEM[®]-T Easy-*AspPecC*; 5, 6: Sản phẩm PCR khuếch đại từ khuẩn lạc mang pGEM[®]-T Easy-*AspPecB*

Mỗi gen chúng tôi tiến hành chọn ngẫu nhiên 2 khuẩn lạc tái tổ hợp, từ hình ảnh thu được cho thấy đã có sự biến nạp thành công vector pGEM[®]-T Easy-*AspPecA*, vector pGEM[®]-T Easy-*AspPecB* và vector pGEM[®]-T Easy-*AspPecC*. Các băng PCR thu được đúng bằng kích thước sản phẩm PCR khuếch đại từ DNA tổng số. Sản phẩm PCR đặc hiệu, không xuất hiện băng phụ. Sau đó chọn ngẫu nhiên 3 khuẩn lạc của 3 gen để tách chiết plasmid DNA và kiểm tra các gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* nằm trong vector pGEM[®]-T Easy tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp được xử lý với enzyme *EcoRI*, các kết quả được hiển thị trong Hình 4.



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm phản ứng cắt bằng *EcoRI*

M: marker DNA 1 kb; 1: plasmid pGEM[®]-T Easy-*AspPecA*, 2: sản phẩm phản ứng cắt *EcoRI* đối với pGEM[®]-T Easy-*AspPecA*, 3: plasmid pGEM[®]-T Easy-*AspPecC*, 4: sản phẩm phản ứng cắt *EcoRI* đối với pGEM[®]-T Easy-*AspPecC*, 5: plasmid pGEM[®]-T Easy-*AspPecB*, 6: sản phẩm phản ứng cắt *EcoRI* đối với pGEM[®]-T Easy-*AspPecB*

Theo Hình 4, plasmid pGEM[®]-T Easy-*AspPecA* có kích thước khoảng 4 kb (còn xuất hiện thêm băng phụ 3 kb), plasmid pGEM[®]-T Easy-*AspPecC* có kích thước 4,5 kb, plasmid pGEM[®]-T Easy-*AspPecB* có kích thước 5 kb (cũng xuất hiện băng phụ có kích thước 3,5 kb). Sự xuất hiện các băng phụ khi điện di kiểm tra các plasmid tái tổ hợp có thể do plasmid thực tế tồn tại ở nhiều dạng khác nhau làm cho tốc độ di chuyển trong cùng 1 bản gel cũng khác, từ đó sẽ xuất hiện các băng có kích thước không bằng nhau (Tweedie, Stowell, 2005). Bên cạnh đó, khi xử lý với enzyme hạn chế *EcoRI*, pGEM[®]-T Easy-*AspPecA* bị cắt tạo thành 3 băng có kích thước khác nhau (băng 4.2 kb là băng pGEM[®]-T Easy-*AspPecA* chỉ mới được cắt tại một vị trí, băng thứ hai có kích thước 3 kb là pGEM[®]-T Easy mạch thẳng, băng thứ 3 có kích thước 1,2 kb chính là *AspPecA*), pGEM[®]-T Easy-*AspPecC* bị cắt hoàn toàn tạo thành 2 băng (pGEM[®]-T Easy mạch thẳng 3 kb và gen pectinase 1,3 kb), và pGEM[®]-T Easy-*AspPecB* cắt chưa hoàn toàn cũng tạo ra 3 sản phẩm (băng khoảng 4,7 kb là băng pGEM[®]-T Easy-*AspPecB* cũng chỉ mới được cắt tại một vị trí, băng thứ hai có kích thước 3 kb là pGEM[®]-T Easy mạch thẳng, băng thứ 3 chính là pectinase *AspPecB* có kích thước 1,7 kb). Như vậy, khi xử lý với *EcoRI* được thiết kế sẵn ở hai đầu của vùng tạo dòng trên pGEM[®]-T Easy, chúng tôi khẳng định đã tạo dòng các gen mã hóa cho pectinase thành công trong pGEM[®]-T Easy.

Giải trình tự gen mã hóa pectinase

Kết quả giải trình tự cho thấy gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* có kích thước lần lượt là 1.237 bp, 1.728 bp và 1.338 bp và được đăng ký trên GenBank với các mã số tương ứng MT502411, MT502412 và MT502413. *AspPecA* mã hóa cho một chuỗi polypeptide với chiều dài 362 amino acid, trong khi *AspPecB* và *AspPecC* mã hóa chuỗi polypeptide với chiều dài lần lượt 495 và 384 amino acid. Phân tích bằng phần mềm dự đoán trình tự tín hiệu peptide SignalP-4.0 cho thấy *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* chứa trình tự mã hóa tín hiệu peptide với chiều dài lần lượt là 18, 16 và 19 amino acid (Petersen *et al.*, 2011). Điều này chứng tỏ đây là các enzyme ngoại bào. Bussink và đồng tác giả (1991, 1992a, 1992b) đã chứng minh sự hiện diện của 7 gen endopolygalacturonase (*pga*) khác nhau trong *A. niger* N400 trong đó ba gen *pgal*, *pgall* và *pgaC* đã được xác định (Bussink *et al.*, 1991; 1992a; 1992b). Đặc tính hóa sinh phân tử của endopolygalacturonase E từ *A. niger* N400 đã được nghiên cứu. Toàn bộ gen endopolygalacturonase bao gồm 1.293 bp bị gián đoạn bởi ba intron ngắn (lần lượt là 50, 50 và 59 bp) (Parenicova *et al.*, 1998). Parenicova và đồng tác giả (2000) đã phân lập hai gen *pgaA* và *pgaB*, hai gen mã hóa endopolygalacturonase (PGs, EC 3.2.1.15) A và B, từ thư viện gen của *A. niger* N400. Vùng mã hóa protein 1.167 bp của gen *pgaA* bị gián đoạn bởi một intron, trong khi vùng mã hóa 1.234 bp của gen *pgaB* chứa hai intron. Các protein tương ứng, PGA và PGB, bao gồm 370 và 362 amino acid tương ứng, *pgaD* từ *A. niger* N400 cũng được phân lập có kích thước 1716 bp (Parenicova *et al.*, 2000). Singh (2012) phân lập gen mã hóa một pectinase từ dữ liệu metagenome trong đất có khung đọc mở 1.311 bp mã hóa chuỗi protein 47,9 kDa. Năm 2014, Liu và đồng tác giả đã tách được gen endo-galacturonase A (*pgaA*) từ *A. niger* JL-15 có khung đọc mở 1.113 nucleotide mã hóa cho một peptide gồm 370 amino acid. Tuy nhiên, gen mã hóa pectinase từ *A. niger* phân lập ở Việt Nam vẫn chưa được công bố nhiều.

Trình tự amino acid suy diễn của các gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* được tiến hành so sánh lần lượt với các gen từ các chủng *A. niger* ZJ5A (AQT01640), *A. tubingensis* CBS 134.48 (OJI88021) và *A. luchuensis* CBS 106.47 (OJZ80574) thu từ dữ liệu ngân hàng GenBank bằng công cụ Clustal Omega. Kết quả cho thấy, tỉ lệ tương đồng giữa các gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* với các chủng trên lần lượt là 100%; 99,60% và 99,74%. Như vậy, các gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* phân lập từ *A. niger* M13 có sự tương đồng cao về kích thước và trình tự đối với các gen tương tự đã được công bố.

<i>AspPecB</i>	INAPASSTIDL SGLQTGA AVIFAGETTFGDTYDSDFDPIV ISGTDV TITGEEGHVINGNEAYWDGEGSNGGQDKPDHFI	256
OJI88021	INAPASSTIDL SGLQTGA AVIFAGETTFGDTYDSDFDPIV ISGTDV TITGEEGHVINGNEAYWDGEGSNGGQDKPDHFI	257
<i>AspPecA</i>	IEVPAGETLDL TGLKKGTTVIFEGETTFGYKEW-KGPLISMSGTDITVKQASGAKINC DGARWWDGKGSNGGKTKPKFFQ	129
AQT01640	IEVPAGETLDL TGLKKGTTVIFEGETTFGYKEW-KGPLISMSGTDITVKQASGAKINC DGARWWDGKGSNGGKTKPKFFQ	129
<i>AspPecC</i>	VAVPSGTTLDL TDLNDGTHVIFQGETTFGYEEW-TGPLVSVSGTDITVEGESGAVLNGDGRWWDGEGGNGGKTKPKFFY	149
OJZ80574	VAVPSGTTLDL TDLNDGTHVIFQGETTFGYEEW-TGPLVSVSGTDITVEGESGAVLNGDGRWWDGEGGNGGKTKPKFFY	149
	: .*	
<i>AspPecB</i>	VVKDMYNSKIENLNILNYPVHCFEIEDTEYLITITGLILNNTAGDAANSKSDGDPATHNTDGF DIKQSDFLTL SNTWVHNQ	336
OJI88021	VVKDMYNSKIENLNILNYPVHCFEIEDTEYLITITGLILNNTAGDAANSKSDGDPAAHNTDGF DIKQSDFLTL SNTWVHNQ	337
<i>AspPecA</i>	-AHKLDESSITGLKIYNTPVQGF SILA-DHLTITDVTIDNSAGTS-----KGHN TDAFDIGQSTYITIDGATVYNQ	198
AQT01640	-AHKLDESSITGLKIYNTPVQGF SILA-DHLTITDVTIDNSAGTS-----KGHN TDAFDIGQSTYITIDGATVYNQ	198
<i>AspPecC</i>	-AHDLTSSITKSIYVENSFPVQVFSIDGSTDLTMTDITVDNTDGD T-----DDLAA NTDGF DIGESTYITITGAEIYNQ	221
OJZ80574	-AHDLTSSITKSIYVENSFPVQVFSIDGSTDLTMTDITVDNTDGD T-----DDLAA NTDGF DIGESTYITITGAEIYNQ	221
	:.*: .*	
<i>AspPecB</i>	DDCVAVTSGSSIVVDNL CYGGHGLSIGSIGGKSNNTVNGVTF SNSQVINS ENGCRIKSNADTTGEVYNVRYENITLSGI	416
OJI88021	DDCVAVTSGSSIVVDNL CYGGHGLSIGSIGGKSNNTVNGVTF SNSQVINS ENGCRIKSNADTTGEVYNVRYENITLSGI	417
<i>AspPecA</i>	DDCLAINSGEHI TFTNGYCDGGHGLSIGSIGGRSDNTVNDVTI SSKVLSQNGVRIKTIYKGTGTVENVKFEDITLSDI	278
AQT01640	DDCLAINSGEHI TFTNGYCDGGHGLSIGSIGGRSDNTVNDVTI SSKVLSQNGVRIKTIYKGTGTVENVKFEDITLSDI	278
<i>AspPecC</i>	DDCVAINSGENIYFSA SCSGGHGLSIGSVGRDNTVKNVTFYDVNVLK SQAIRIKTIYGD TGSVSEVTYHEIAFSDA	301
OJZ80574	DDCVAINSGENIYFSA SCSGGHGLSIGSVGRDNTVKNVTFYDVNVLK SQAIRIKTIYGD TGSVSEVTYHEIAFSDA	301
	***:.*: .*	
<i>AspPecB</i>	TDYGLD VQDYENGGATGDP TNGVKIENISFVN VKGTMS--DGKDY YILCGD GSCSNFVFTD VDTGGSDD-SCNYPSSG	493
OJI88021	TDYGLD VQDYENGGATGDP TNGVKIENISFVN VKGTMS--DGKDY YILCGD GSCSNFVFTD VDTGGSDD-SCNYPSSG	494
<i>AspPecA</i>	SKYGI VVEQDYENGSPTGTPTNGVKVEDITFKKVTGSVK-SSGTDI YILCGSGSCSNWTWSGV DVTGGKSSKCKNVPSSG	357
AQT01640	SKYGI VVEQDYENGSPTGTPTNGVKVEDITFKKVTGSVK-SSGTDI YILCGSGSCSNWTWSGV DVTGGKSSKCKNVPSSG	357
<i>AspPecC</i>	TDYGLI IEQNYDDTS--KTPTTGVPITDFVLENIIGTCEDDDCTEVYIACGDGSCSDWTWTGVS VTTGGKVSDDCLNVPSSG	379
OJZ80574	TDYGLI IEQNYDDTS--KTPTTGVPITDFVLENIIGTCEDDDCTEVYIACGDGSCSDWTWTGVS VTTGGKVSDDCLNVPSSG	379
	:.*: .*	
<i>AspPecB</i>	CP--- 495	
OJI88021	CP--- 496	
<i>AspPecA</i>	ASCSD 362	
AQT01640	ASCSD 362	
<i>AspPecC</i>	ISCDL 384	
OJZ80574	ISCDL 384	

Hình 5. So sánh trình tự amino acid suy diễn của 3 gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* bằng công cụ Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Dấu chấm thể hiện các vị trí tương đồng thấp, dấu hai chấm thể hiện độ tương đồng cao và dấu sao thể hiện độ tương đồng tuyệt đối

KẾT LUẬN

Ba gen mã hóa cho pectinase *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* từ nấm *A. niger* M13 đã được tạo dòng và giải trình tự thành công. Ba gen *AspPecA*, *AspPecB* và *AspPecC* có chiều dài lần lượt 1.237 bp, 1.728 bp và 1.338 bp, mã hóa chuỗi polypeptide có chiều dài 362, 495 và 384 amino acid theo tuần tự. Ba gen đều mã hóa cho các enzyme ngoại bào với chuỗi tín hiệu peptide ở vùng 5'. Kết quả nghiên cứu cung cấp thêm dữ liệu di truyền về gen pectinase phân lập từ *A. niger* phân lập ở Việt Nam cũng như là nguồn nguyên liệu quan trọng cho các nghiên cứu biểu hiện tái tổ hợp về sau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amin F, Bhatti HN, Bilal M (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases-A review. *Int J Biol Macromol* 122: 1017-1026.
- Bussink HJ, Brouwer KB, de Graaff LH, Kester HC, Visser J (1991). Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. *Curr Genet* 20 (4): 301-307.
- Bussink HJ, Buxton FP, Fraaye BA, de Graaff LH, Visser J (1992a). The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes. *Eur J Biochem* 208 (1): 83-90.
- Bussink HJ, van den Hombergh JPTW, van den IJssel PRLA, Visser J (1992b). Characterization of polygalacturonase-overproducing *Aspergillus niger* transformants. *Appl Microbiol Biotechnol* 37: 324-329.
- Diem PTT, Lan PTN, Chau NTB, Dung TQ (2018). Isolation and screening of mould strains for cloning and expressing pectinase gene. *Journal of Science, Hue University* 127 (1C): 95-106 (in Vietnamese).
- Liu MQ, Dai XJ, Bai LF, Xu X (2014). Cloning, expression of *Aspergillus niger* JL-15 endo-polygalacturonase A gene in *Pichia pastoris* and oligo-galacturonates production. *Protein Expr Purif* 94: 53-59.
- Parenticova L, Benen JA, Kester HC, Visser J (1998). pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*. *Eur J Biochem* 251 (1-2): 72-80.

Parenicova L, Benen JA, Kester HC, Visser J (2000). pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*. *Biochem J* 345 Pt 3: 637-644.

Petersen TN, Brunak S, Heijne GV, and Nielsen H (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-786.

Tweedie JW, Stowell KM (2005). Quantification of DNA by agarose gel electrophoresis and analysis of the topoisomers of plasmid and M13 DNA following treatment with a restriction endonuclease or DNA topoisomerase I. *Biochem Mol Biol Educ* 33 (1): 28-33.

Singh R, Dhawan S, Singh K, Kaur J (2012). Cloning, expression and characterization of a metagenome derived thermoactive/thermostable pectinase. *Curr Mol Biol Rep* 39 (8): 8353-8361.

Wang D, Yeats TH, Uluisik S, Rose JKC, Seymour GB (2018). Fruit Softening: Revisiting the Role of Pectin. *Trends Plant Sci* 23: (4) 302-310.

CLONING AND SEQUENCING GENES ENCODING FOR PECTINASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* M13

Phan Thi Thanh Diem¹, Le My Tieu Ngoc², Nguyen Thi My Le³, Nguyen Bao Hung²,
Le Thi Kim Thoa², Trinh Thi Phuong Thao², Truong Thi Phuong Lan⁴, Nguyen Duc Huy²,
Pham Thi Ngoc Lan⁵, Tran Quoc Dung^{6*}

¹ Quang Nam University

² Institute of Biotechnology, Hue University

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

⁴ University of Medicine and Pharmacy, Hue University

⁵ University of Science, Hue University

⁶ University of Education, Hue University

SUMMARY

Endo-polygalacturonase has been recently attracted the researchers due to various application in food processing, waste water treatment, animal feed, paper industry, juice processing and textile industry. In this study, the genes encode for pectinase from *Aspergillus niger* M13 were cloned using 3 primer pairs based on the nucleotide sequences of endogalacturonase encoding genes with accession number of KM244045, X64356, and Y18806. The PCR products were ligated into pGEM[®]-T Easy and transferred to *E. coli* Top10. Recombinant plasmids were isolated and performed nucleotide sequencing. The results indicated *AspPecA*, *AspPecB*, *AspPecC* encoding for pectinases with the length of 1237 bp, 1728 bp, and 1338 bp. The genes have been deposited in GenBank database with accession numbers of MT502411, MT502412, MT502413, respectively.

Keywords: Pectinase, *Aspergillus niger*, cloning, sequencing.

* Author for correspondence: Tel: 0985005092; Email: tranquocdung@hueuni.edu.vn