

BIỂU HIỆN HOMOSERINE LACTONE LACTONASE TÁI TỔ HỢP TỪ *BACILLUS THURINGIENSIS* VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH TRÊN SỰ GÂY THỐI NHŨN BỞI VI KHUẨN *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM*

Nguyễn Thị Kim Cúc

PTN Tế bào – Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Quorum sensing là một trong những cơ chế quan trọng của vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* nhằm kiểm soát mật độ quần thể, kiểm soát sự biểu hiện của gen độc lực và kiểm soát sự tương tác giữa các cá thể trong quần thể hay với quần thể khác thông qua phân tử tín hiệu N-acyl homoserine lactones. Việc loại bỏ phân tử tín hiệu này hay còn gọi là quorum quenching có ý nghĩa lớn trong việc hạn chế tác động gây thối nhũn của *Pectobacterium carotovorum*. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen mã hóa cho enzyme phân hủy N-acyl homoserine lactones (AiiA) trong chín chủng *Bacillus thuringiensis* khác nhau từ ngân hàng giống chuẩn của Hàn Quốc (KACC). Kết quả chỉ ra rằng tất cả các chủng nghiên cứu đều mang gen mã hóa cho enzyme Homoserine Lactone Lactonase (AHLase). Tuy nhiên có một số khác biệt trong trình tự gen mã hóa cho enzyme Homoserine Lactone Lactonase của các chủng khác nhau. Ba gen có trình tự protein tương đồng 100 % so với những trình tự mã hóa protein AHLase đã công bố được lựa chọn để biểu hiện và tinh sạch nhằm đánh giá tác động của enzyme này tới khả năng gây thối nhũn của vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* ở quy mô phòng thí nghiệm.

Từ khóa: AHLase, AiiA, *Bacillus thuringiensis*, N-Acyl-Homoserine Lactones, *Pectobacterium carotovorum*

MỞ ĐẦU

Quorum sensing là cơ chế giao tiếp giữa các tế bào vi sinh vật trong một quần thể thông qua các phân tử tín hiệu tiết ra từ mỗi tế bào vi sinh vật gọi là chất tự kích hoạt hay autoinducer (Rutherford, Bassler, 2012). Các phân tử tín hiệu này được tích tụ dần trong môi trường cùng với sự tăng lên của quần thể và có vai trò quan trọng trong việc kiểm soát mật độ quần thể và thay đổi mức độ biểu hiện của một số gen, điển hình là các gen độc lực. N-Acyl-Homoserine Lactones (AHLs) là phân tử tín hiệu có kích thước nhỏ do nhiều loài vi khuẩn Gram âm tiết ra để quản lý hoạt động quần thể (Kusada et al., 2019). Đã có nhiều nhóm nghiên cứu báo cáo về vai trò của AHLs trong kiểm soát quá trình phát sáng, quá trình tạo bào tử, khả năng kháng thuốc, tạo màng biofilm và tiết ra các chất gây độc của các quần thể vi khuẩn (Kusada et al., 2019). Ở các vi khuẩn gây bệnh, quorum sensing thường giúp chúng thoát khỏi hệ thống kiểm soát của vật chủ cho tới khi chúng đạt tới mật độ nhất định và có khả năng gây bệnh. Để phá bỏ phân tử tín hiệu của quorum sensing, đã có một số enzyme được tìm thấy, trong đó thường được nhắc đến là Acyl homoserine lactonase (AHLase) và acylase (Kusada et al., 2019; Kalia et al., 2011). Trong hai loại enzyme này, AHLase có khả năng loại lactone khỏi AHL tạo thành Acyl homoserine (Thomas et al., 2005). Vai trò của AHLase trong quản lý quorum sensing cũng rất được quan tâm do protein này được biểu hiện trong rất nhiều loại vi khuẩn, cả Gram âm và Gram dương như *Bacillus* spp., *Bacillus thuringiensis* (Lee et al., 2002; Dong et al., 2000). Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) là một vi khuẩn Gram dương phân bố rộng rãi trong đất (Lee et al., 2002). Vai trò diệt sâu bệnh của vi khuẩn này đã được biết đến rất nhiều và gần đây các nhà khoa học rất quan tâm tới khả năng sử dụng AHLase từ vi khuẩn này để kiểm soát quorum sensing do có rất nhiều dưới loài của *B. thuringiensis* đã được báo cáo mang gen AiiA như *aizawai*, *galleriae*, *kurstaki*, *kyushuensis*, *ostriniae* and *subtoxicus*. Để xác định các dưới loài của *B. thuringiensis* có khả năng mang gen AiiA và ứng dụng trong bảo vệ thực vật, chúng tôi đã sử dụng một số chủng *B. thuringiensis* từ ngân hàng giống chuẩn nông nghiệp của Hàn Quốc (KACC) để kiểm tra những loài mang gen, phân lập gen và biểu hiện nhằm tăng cường biểu hiện protein này cho mục đích bảo vệ thực vật.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*: KACC10168, KACC10171, KACC10175, KACC10180, KACC10183, KACC12061, KACC12073, KACC12076 và KACC12082; và 01 chủng vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum*, KACC10225 được cung cấp bởi ngân hàng giống chuẩn nông nghiệp Hàn Quốc (KACC). Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α ; BL21(DE3)LysS và vector pET32a(+) được mua từ Novagen của Đức

Môi trường nuôi cấy *B. thuringiensis* và *P. carotovorum* gồm NB (Nutrient Broth) có chứa 0,1 % cao thịt, 0,2 % cao nấm men, 0,5 % pepton, 0,5 % NaCl. Môi trường NB có chứa 1,5 % thạch được gọi là môi trường NA. Cả hai môi trường NA và NB đều dùng để nuôi vi khuẩn *B. thuringiensis* và *P. carotovorum* ở điều kiện 30 °C. Vi khuẩn DH5 α được nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani (LB) có chứa 1 % tryptone, 0,5 % cao nấm men, 1 % NaCl; vi khuẩn BL21(DE3)LysS được nuôi trong môi trường LB có bổ sung 34 μ g/ml chloramphenicol; vi khuẩn BL21(DE3)LysS mang vector tái tổ hợp pETaAiiA được nuôi cấy trên môi trường LB có chứa 50 μ g/ml ampicillin, 34 μ g/ml chloramphenicol và 1 mM ZnSO $_4$. Các chủng *E. coli* không mang vector tái tổ hợp được nuôi ở 37 °C và chủng mang vector biểu hiện protein AiiA được nuôi ở 25 °C.

Tách chiết DNA, PCR, tạo dòng và giải trình tự

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* đã được tách chiết bằng Kit AccuPrep® Genomic DNA Extraction của Bioneer, Hàn Quốc. Các plasmid được phân lập từ các vi khuẩn mang plasmid bằng Kit Plasmid DNA purification Kit của iNtRON, Hàn Quốc. Các cặp mồi dùng trong nghiên cứu này được thiết kế bằng phần mềm primer3 và tổng hợp bởi công ty Bionics, Hàn Quốc. Trình tự mồi, kích thước sản phẩm PCR dự kiến được trình bày ở Bảng 1. Điều kiện PCR đã

được xác định để phát hiện sự có mặt của gen AiiA ở các chủng *B. thuringiensis* bằng cặp mồi AiiA 1F/2R (kích thước đoạn gen khoảng 460 bp) là 94 °C trong 5 phút sau đó là 30 chu kỳ (95 °C trong 20 giây, 57 °C trong 20 giây, 72 °C trong 30 giây) và kết thúc ở 72 °C trong 10 phút. Để nhân toàn bộ gen AiiA, PCR đã được tiến hành với cặp mồi AiiA EF-B/ER-S (kích thước gen khoảng 753 bp) ở điều kiện 94 °C trong 5 phút; theo sau bởi 30 chu kỳ (95 °C trong 20 giây, 53 °C trong 20 giây, 72 °C trong 30 giây) và kết thúc ở 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR nhân lên bởi cặp mồi AiiA EF-B/ER-S đã được tạo dòng vào vector pBlueXcm ở vị trí của hai enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Sal*I sau đó vector mang gen được gửi đi giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động của hãng Solgent, Hàn Quốc.

Bảng 1. Trình tự mồi dùng trong nghiên cứu

Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Trình tự tham khảo trên GenBank
AiiA 1-F: tcccagcaggtcgttgtatg	460	AY195570
AiiA 2-R: tgaacacctgtaccactca		
AiiAEF-B: aaaaGGATCCatgacagtaaagaagctttat	753	AY195570
AiiAER-S: aaaaGTCGACctatatatactcaggggaacac		

GGATCC vị trí cắt giới hạn của enzyme *Bam*HI; GTCGAC vị trí cắt giới hạn của enzyme *Sal*I.

Biểu hiện protein AiiA tái tổ hợp

Sau khi giải trình tự, gen mã hóa protein AiiA có kích thước 753 bp đã được chuyển từ vector pBlueXcm sang vector biểu hiện pET32a(+). Vector pETAiiA đã được chuyển vào vi khuẩn BL21(DE3)LysS bằng phương pháp sốc nhiệt theo hướng dẫn của Novagen để tạo chủng vi khuẩn mang vector tái tổ hợp. Vi khuẩn tái tổ hợp mang vector sau đó được nuôi trong môi trường lỏng và được cảm ứng với IPTG ở nồng độ khác nhau để biểu hiện protein tái tổ hợp. Kết thúc quá trình nuôi cấy sinh khối vi khuẩn được thu bằng cách li tâm để loại bỏ môi trường mà hòa tan lại trong đệm có chứa 20 mM sodium phosphate, 0,5 M NaCl, 3 0mM imidazole. Các tế bào vi khuẩn sau đó bị phá vỡ bởi sóng siêu âm rồi li tâm lại để loại bỏ cặn, thu dịch nổi, lọc qua cột lọc có khả năng gắn protein yếu sau đó dịch thu được sẽ được đưa vào cột HisTrap HP để tinh sạch protein (GE Healthcare, Sweden). Protein bám trong cột sẽ được thu lại bằng đệm có chứa 20 mM sodium phosphate, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazole sau đó bảo quản ở 4 °C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Thử nghiệm khả năng hạn chế độc lực của *Pectobacterium carotovorum* của protein AiiA tái tổ hợp

Khả năng ức chế *Pectobacterium catavorum* gây thối nhũn trên khoai tây được sắp xếp theo phương pháp được Baz công bố (Baz, 2012). Cụ thể, củ khoai tây không có dấu hiệu bị bệnh, đập nát được mua về, rửa dưới vòi nước chảy và ngâm trong 10 % Sodium hypochloride, sau đó rửa lại bằng nước khử trùng. Sau đó khoai tây được cắt thành các lát có độ dày 10mm, đặt vào đĩa petri có chứa giấy thấm khử trùng trước khi đục lỗ bằng dụng cụ đục lỗ có đường kính 6mm. 10mg protein tổng số từ vi khuẩn biểu hiện protein tái tổ hợp AHLase và 10⁵ vi khuẩn *Pectobacterium catavorum* được cho vào lỗ, ủ ở nhiệt 30 °C trong 24 giờ rồi đo đường kính khu vực bị thối nhũn.

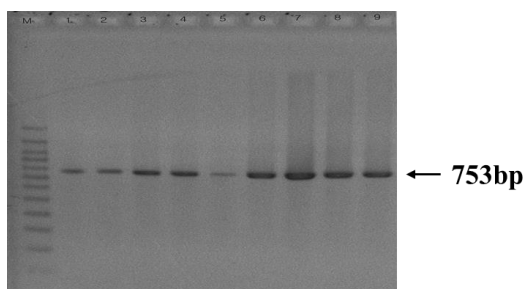
Các trình tự gen đăng kí trên ngân hàng gen

09 gen mã hóa cho protein AiiA từ các chủng *B. thuringiensis* đã được đăng kí trên ngân hàng gen với mã số GU339163, GU339165, GU339166, GU339167, GU339168, GU339169, GU339170, GU339171, GU339172

KẾT QUẢ

Sự có mặt của gen AiiA trong các chủng *B. thuringiensis*

Gen AiiA mã hóa cho protein Homoserine lactone lactonase đã được nhân lên bằng cặp mồi AiiA EF-B/ER-S (Hình 1). Kết quả gợi ý rằng tất cả 9 chủng *B. thuringiensis* cung cấp bởi KACC đều có mang gen AiiA. Gen AiiA từ các chủng *B. thuringiensis* đã được tinh sạch tạo dòng, giải trình tự và so sánh với các trình tự gen AiiA đã đăng kí trên ngân hàng gen.



Hình 1. Sự có mặt của gen AiiA trong các chủng *B. thuringiensis* từ KACC

DNA tổng số từ 9 chủng *B. thuringiensis* nhận từ KACC đã được dùng để nhân gen AiiA dùng cặp mồi AiiA EF-B/ER-S. Giếng M: Thang DNA chuẩn (1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp). Giếng số 1-9 lần lượt là AiiA gen khuếch đại từ DNA tổng số của KACC10168; KACC10171; KACC10175; KACC10180; KACC10183; KACC12061; KACC12073; KACC12076; KACC12082.

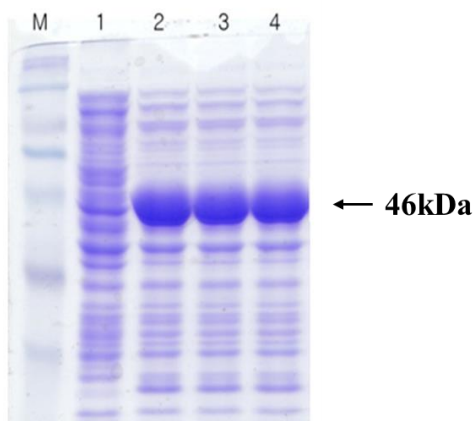
Lee và đồng tác giả (2002) đã báo cáo rằng gen AiiA có ở rất nhiều dưới loài của loài *B. thuringiensis*. Trong nghiên cứu này của chúng tôi cũng nhận thấy rằng gen mã hóa protein AiiA được phát hiện ở tất cả các chủng *B. thuringiensis* nhận

được từ KACC (Hình 1). Trình tự gen *AiiA* phân lập từ 9 chủng *Bacillus thuringiensis* từ KACC được chia thành 5 nhóm dựa vào độ tương đồng với các gen tham khảo, với mức độ tương đồng của gen từ 98-99 %, độ tương đồng về trình tự aminoacid từ 98-100 %, kết quả cụ thể trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. So sánh độ tương đồng về nucleotide và amino acid của gen *AiiA* phân lập với trình tự trên GenBank

Nguồn gen		Độ tương đồng (%)	
Gen phân lập từ các chủng KACC	Trình tự tham khảo trên GenBank	Nucleotide	Amino acid
KACC10168	AF478056	98	98
KACC12076			
KACC10171	AF478059	99	100
KACC10175			
KACC 10180			
KACC10183			
KACC12061	AY195570	98	98
KACC12073	AF478055	99	100
KACC12082	AF478052	99	100

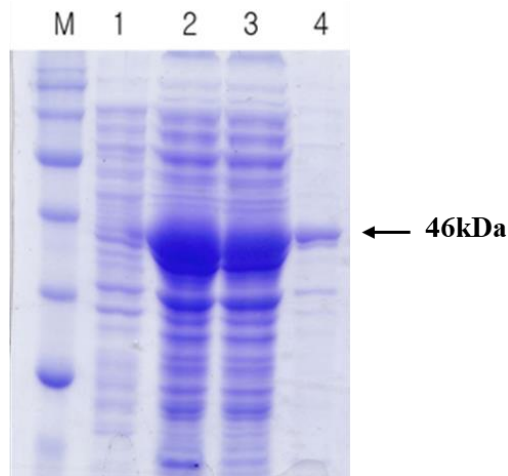
Kết quả so sánh mức độ tương đồng của các gen *AiiA* phân lập từ các chủng *B. thuringiensis* với các gen đã công bố trên ngân hàng gen chúng tôi nhận thấy rằng KACC10168 và KACC12076 thuộc dưới loài *B. thuringiensis* ser. *entomosidus*; KACC10171, KACC10175, KACC10180 và KACC10183 thuộc dưới loài *B. thuringiensis* ser. *kurstaki*; KACC12061 thuộc dưới loài *B. thuringiensis* ser. *oswaldocruzi*; KACC12073 thuộc dưới loài *B. thuringiensis* ser. *Pakistani*; KACC12082 thuộc dưới loài *B. thuringiensis* ser. *kyusuensis*. Trong số 5 dưới loài của *B. thuringiensis*, có 3 dưới loài gồm *B. thuringiensis* ser. *pakistani*; *B. thuringiensis* ser. *kurstaki* and *B. thuringiensis* ser. *kyusuensis* được cho là có hoạt tính enzyme AHLase (Lee et al., 2002; Kalia et al., 2011). Gen mã hóa protein AHLase từ 3 dưới loài này đã được đưa vào vector pET32a (+) ở vị trí cắt giới hạn BamHI và Sall, sau đó biểu hiện trong vi khuẩn BL21(DE3)LysS để biểu hiện protein tái tổ hợp. Nồng độ chất cảm ứng IPTG đã được tối ưu ở nồng độ 0,4 mM để cảm ứng biểu hiện AHLase trong vật chủ *E.coli* dưới dạng nối với đuôi TrxA và có tên TrxA-AHLase.



Hình 2. Biểu hiện protein AHLase tái tổ hợp trong *E.coli*

AiiA gene từ 3 dưới loài *B. thuringiensis* ser. *pakistani*, *B. thuringiensis* ser. *kyusuensis*, *B. thuringiensis* ser. *kurstaki*) được đưa vào vector biểu hiện pET32a(+) và biểu hiện protein AHLase tái tổ hợp trong BL21(DE3)LysS ở 30 °C. Giếng M. Thang protein chuẩn (198; 115; 90,5; 61,5; 46,2; 37,8; 26; 18,5; 9kDa). Giếng 1. Protein tổng số từ BL21(DE3)LysS. Giếng 2-4. Protein tổng số từ BL21(DE3)LysS biểu hiện AHLase tái tổ hợp lần lượt từ KACC10180, KACC12073 and KACC12082.

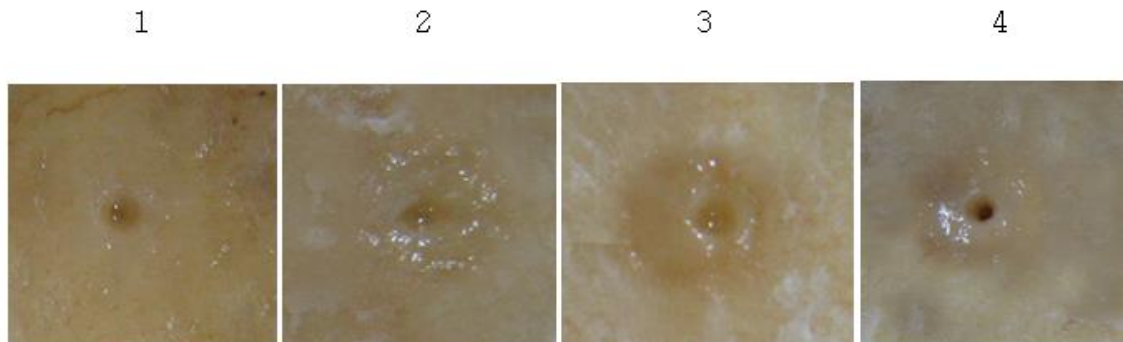
Sau khi biểu hiện TrxA-AHLase chúng tôi nhận thấy rằng protein tái tổ hợp này chủ yếu biểu hiện ở dạng thể vùi, không tan và sự có mặt của protein này không được tìm thấy trong dịch nuôi cấy (kết quả không trình bày ở đây) Sự tạo thành các protein ở dạng thể vùi ở trong vi khuẩn sẽ có những ảnh hưởng tới hoạt tính sinh học của protein (Singh et al., 2015). Do đó, trong các nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp thường tối ưu các điều kiện để hạn chế tối đa việc tạo thể vùi hoặc sẽ phải có những bước xử lý sau biểu hiện để tái phục hồi cấu trúc, chức năng của protein nhưng hiệu quả của những biện pháp này thường không cao (Singh et al., 2015). Một trong những giải pháp khác để làm giảm protein ở dạng thể vùi là tối ưu một số điều kiện nuôi cấy, đặc biệt là nhiệt độ sau khi gây cảm ứng (Teresa et al., 2013). Chính vì thế trong nghiên cứu này chúng tôi đã biểu hiện protein ở điều kiện nhiệt độ 20 °C để hạn chế biểu hiện TrxA-AHLase ở dạng thể vùi. Khi giảm nhiệt độ biểu hiện xuống còn 20 °C trong 8 tiếng sau đó phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm thì chúng tôi thu được protein tái tổ hợp chủ yếu nằm trong dịch nổi (Hình 3).



Hình 3. Protein Trx-AHLase ở dạng tan khi biểu hiện ở 20 °C

E.coli mang vector pETAiiA từ *B. thuringiensis ser. kyusuensis* đã được nuôi và cảm ứng với 0,4 mM IPTG, sau đó giảm nhiệt độ nuôi cấy xuống 20 °C và tiếp tục nuôi trong 8 giờ. Sinh khối vi khuẩn đã ly tâm bỏ môi trường, hòa tan lại trong PBS và phá tế bào bằng sóng siêu âm. Sau khi kết thúc siêu âm, dịch tế bào được ly tâm để thu dịch nổi và phần không tan. Giếng M. Thang protein chuẩn (240, 140, 100, 70, 50, 35, 24, 20 and 7kDa); Giếng 1. *E.coli* mang vector pETAiiA từ *B. thuringiensis ser. kyusuensis* không có chất cảm ứng; giếng 2. Protein tổng số từ *E.coli* mang vector pETAiiA từ *B. thuringiensis ser. kyusuensis* cảm ứng với 0,4 Mm IPTG; Giếng 3. Protein trong dịch nổi sau ly tâm; giếng 4. Protein trong cặn sau ly tâm.

Kết quả ở Hình 3 gợi ý rằng, khi giảm nhiệt độ biểu hiện, protein hầu hết không ở dạng thể vùi mà tồn tại ở dạng tan trong tế bào vi khuẩn. Đây là một phát hiện có ý nghĩa vì thông thường protein ở dạng thể vùi thường không có cấu hình không gian để có chức năng. Trước khi tiến hành tinh sạch protein tái tổ hợp, chúng tôi đã tiến hành kiểm tra khả năng hạn chế tác động gây thối nhũn lát khoai tây của vi khuẩn *Pectobacterium catavorum*. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn biểu hiện AiiA gen trước đây đã được tiến hành bằng các thí nghiệm trộn lẫn vi khuẩn mang gen AiiA tái tổ hợp với vi khuẩn *P.catavorum* (Lee et al., 2002) nhưng do đã trình bày ở trên, chúng tôi không nhận thấy sự có mặt của AHLase trong dịch nuôi cấy ở các thời điểm khác nhau nên dự kiến rằng protein tái tổ hợp không tiết ra ngoài, chính vì vậy chúng tôi đã thử nghiệm hoạt tính AHLase sử dụng protein tổng số thu được từ vi khuẩn biểu hiện TrxA-AHLase tái tổ hợp.



Hình 4. TrxA-AHLase ức chế độc lực của *Pectobacterium catavorum*. 10 mg protein tổng số từ *E.coli* biểu hiện protein TrxA-AHLase đã được đưa vào giếng đục trên lát khoai tây cùng với 10^5 vi khuẩn *Pectobacterium catavorum*. 1. 10^5 vi khuẩn *Pectobacterium catavorum*; 2-4. Hỗn hợp 10^5 vi khuẩn *Pectobacterium catavorum* với 10mg protein tổng số từ vi khuẩn *E.coli* biểu hiện AHLase lần lượt từ KACC10180, KACC12073 and KACC12082.

Tác động của AHLase tái tổ hợp trong hạn chế độc lực của vi khuẩn gây thối rễ *Pectobacterium carotovorum* đã được thực hiện bằng cách trộn protein tổng số của vi khuẩn *E.coli* biểu hiện AiiA tái tổ hợp với vi khuẩn *Pectobacterium carotovorum* và nhỏ lên lát khoai tây đã đục lỗ và kiểm tra đường kính của khu vực thối nhũn. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Hiệu quả ức chế gây thối nhũn của AHLase

TrxA-AHLase (mg)	Đường kính vòng thối nhũn (D-d) (mm)		
	KACC10180	KACC12073	KACC12082
0	26,50±1,29	27,25±1,26	25,25±1,70
5	21,25±1,26	18,50±1,29	18,00±0,81
10	15,75±1,26	15,50±1,0	13,25±0,96

Sau khi bổ sung AHLase tái tổ hợp có nguồn gốc từ các chủng *B. thuringiensis* khác nhau thì không có sự khác biệt về đường kính vòng thối nhũn nhưng có sự khác biệt giữa các giếng có bổ sung AHLase tái tổ hợp và giếng không bổ sung. Mặc dù kết quả của chúng tôi không ngăn cản hoàn toàn tác động gây thối nhũn của *P. catavorum* nhưng cũng đã hạn chế tác động gây thối nhũn. Điều này dẫn đến có thể một phần protein biểu hiện không tạo ra cấu trúc hoạt động của

AHLase làm giảm hoạt tính, thêm vào đó có thể nồng độ protein sử dụng chưa đủ để đạt được hiệu quả mong muốn. Trong các bước tiếp theo chúng tôi sẽ lần lượt kiểm tra những giả thuyết đã đưa ra nhằm nâng cao hơn nữa hoạt tính của protein AHLase tái tổ hợp. Bên cạnh đó, một nghiên cứu khác của Thomas và đồng tác giả (2005) cũng đã khẳng định protein AHLase tái tổ hợp có gắn Maltose-binding protein vẫn giữ nguyên hoạt tính AHLase (Thomas et al., 2005), chính vì vậy chúng tôi cũng cần khảo sát thêm các điều kiện khác ngoài nhiệt độ để tăng cường biểu hiện protein ở dạng có chức năng.

Tóm lại, các kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với một số kết quả đã công bố khi nghiên cứu biểu hiện AHLase từ *Bacillus sp.* (Dong et al., 2000), protein tái tổ hợp có khả năng phân hủy AHL, hạn chế tác động gây thối nhũn trên vi khuẩn *P. catavorum*. Mặc dù thí nghiệm của chúng tôi mới thực hiện ở giai đoạn đầu, còn cần khảo sát thêm một số điều kiện thực nghiệm, đặc biệt tiến hành tinh sạch những protein này để thấy rõ hơn hiệu quả protein tái tổ hợp trong quản lý quorum sensing ở *P. catavorum* trước khi tiến hành những thí nghiệm trên thực địa nhưng cũng đưa ra một gợi ý hứa hẹn cho việc kiểm soát độc lực của vi khuẩn bằng những tác nhân sinh học, ít ảnh hưởng tới môi trường, sức khỏe con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dong Y, Xu JL, Li, XZ, Zhan, LH. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (7):3526-3531.
- Kalia V, Raju SC, Purohit HJ (2011). Genomic analysis reveals versatile organisms for quorum quenching enzymes: acyl-homoserine lactone-acylase and -lactonase. *Open Microbiol J* 5:1-13.
- Kusada H, Tamaki H, Kimura N, Kamagata Y (2019). Novel N-Acyl Homoserine Lactone-Degrading Bacteria Isolated From Penicillin-Contaminated Environments and Their Quorum-Quenching Activities. *Front Microbiol* 10 (455).
- Lee S, Park SY, Lee JJ, Yum DY, Koo BT, Lee JK (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lactone-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* 68 (8):3919-3924.
- Rutherford S, Bassler BL (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2 (11):a012427.
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay A, Singh SM, Panda AK (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 4:41-41.
- Teresa S, Pedro PB, Isabel G (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *Springerplus* 2 (1):89-89.
- Thomas P, Stone EM, Costello AL, Tierney DL, Fast WL (2005). The Quorum-Quenching Lactonase from *Bacillus thuringiensis* Is a Metalloprotein. *Biochemistry* 44 (20):7559-7569.

EXPRESSION OF RECOMBINANT HOMOSERINE LACTONE LACTONASE FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* AND PRELIMINARY EVALUATION OF THE ENZYME ACTIVITY ON *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* BACTERIAL SOFT ROOT

Nguyen Thi Kim Cuc

Laboratory of Cells – Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Quorum sensing is one of important self-managment mechanism of *Pectobacterium carotovorum* to control their population density, gene expression and interaction with microbe via autoinducer molecule named N-acyl homoserine lactones which can be destroyed by quorum quenching enzyme, Homoserine Lactone Lactonase to prevent bacterial soft root. In this study, we examined the present of Homoserine Lactone Lactonase encoded gene (*AiiA*) from nine *Bacillus thuringiensis* from Korean type culture collection (KACC) and found some different among *AiiA* sequences. We expressed and purified Homoserine Lactone Lactonase from 3 different *Bacillus thuringiensis* sub-strains which have 100% and 99% homology in nucleotide and amino acid sequence, respectively with other *AiiA* reported sequences in GenBank to examined enzyme activity against *Pectobacterium carotovorum* virulence in laboratory test.

Keywords: AHLase, AiiA, *Bacillus thuringiensis*, N-Acyl-Homoserine Lactones, *Pectobacterium carotovorum*.

Author for correspondence: Tel: + 84-94.311.2476; Email: ntkcuc.huib@hueuni.edu.vn