

PHÂN LẬP VÀ PHÂN TÍCH GEN MÃ HÓA β -1,3-GLUCANASE TỪ *Bacillus* sp. 41

Nguyễn Thị Thanh Huyền^{1,2}, Lê Thị Nhật Anh¹, Trần Quốc Dung^{3*}, Nguyễn Đức Huy^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường THPT chuyên Lê Quý Đôn, Đông Hà, Quảng Trị

³Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

TÓM TẮT

β -1,3-glucanase là một enzyme tiềm năng trong hệ thống phòng thủ chống lại sự tấn công của các loại nấm gây hại ở thực vật. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho một β -1,3-glucanase (*Bgl*) từ chủng *Bacillus* sp. 41 đối kháng *Aspergillus niger* đã được khuếch đại, tạo dòng, giải trình tự nucleotide và phân tích cấu trúc thành công. Kết quả thu được cho thấy gen có kích thước 655 bp, mã hoá cho một chuỗi polypeptide có kích thước 214 aa. Trình tự *Bgl* chứa đoạn mã hóa cho chuỗi tín hiệu peptide dài 29 aa, chứng tỏ *Bgl* mã hóa cho protein ngoại bào. Cấu trúc không gian dự đoán của protein này được mô tả tương đồng cao với β -1,3-1,4-glucanase ở *Bacillus subtilis* với 55% trình tự amino acid là phiên β . Dựa trên các đặc điểm *Bgl* cũng như cấu trúc protein mã hóa cho thấy *Bgl* đóng vai trò quan trọng trong hệ gen của *Bacillus*. Do đó, phân lập thành công gen *Bgl* là một dữ liệu di truyền quan trọng hỗ trợ cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc hiểu rõ cơ chế đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* sp. đối với các loại nấm gây hại. Bên cạnh đó, kết quả tạo dòng thành công *Bgl* cung cấp nguyên liệu di truyền để tạo ra enzyme tái tổ hợp thông qua biểu hiện trong vật chủ thích hợp.

Từ khóa: β -1,3-glucanase, *Bacillus*, *Bgl*, tạo dòng.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, các loài thực vật đã xây dựng một loạt các cơ chế phòng thủ nhằm chống lại sự tấn công của các tác nhân sinh học có nguy cơ gây hại cho bản thân. Để cân bằng khả năng phòng vệ với các hoạt động sinh lý diễn ra bên trong cơ thể, thực vật đã sử dụng các biện pháp sinh hoá bao gồm: sản xuất phytoalexin tăng cường sự phát triển của thành tế bào (lignin hoá và suberin hoá), kích thích sự biểu hiện của các protein chống tác nhân gây hại (protein PR) (Bhuiyan *et al.*, 2009; Tiku, 2020). Protein PR được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1970 trong nghiên cứu về lá thuốc lá bị nhiễm *Tobacco mosaic virus* (Van Loon *et al.*, 1970). Hiện nay, 17 họ protein PR đã được công nhận dựa trên sự tương đồng về trình tự amino acid, đặc tính sinh học và cơ chế hoạt động của enzyme (Sinha *et al.*, 2014). Các PR thể hiện đa dạng chức năng đối với thực vật như: hoạt tính kháng nấm, diệt côn trùng, kháng virus, kháng khuẩn, vận chuyển chất lỏng, kích thích nảy mầm ở hạt, phát triển ống phấn và sự thụ tinh. β -1,3-glucanase là một protein PR2 điển hình được biết đến với chức năng tăng sức đề kháng của thực vật trước sự tấn công của nấm bệnh. Tuy nhiên, không phải loài thực vật nào cũng có khả năng sản sinh ra enzyme này để chống lại nấm bệnh, do đó, việc tìm kiếm sinh vật có khả năng sản sinh enzyme này hỗ trợ việc phòng chống nấm bệnh ở thực vật là cần thiết (Worrall *et al.*, 1992).

Ở các giới sinh vật khác như nấm, β -1,3-glucanase tham gia vào quá trình mở rộng của tế bào và giải phóng bào tử (El-Katatny *et al.*, 2001); ở vi khuẩn enzyme này phá hủy thành tế bào nấm để sử dụng làm nguồn cung cấp dinh dưỡng (Watanabe *et al.*, 1992). Nhiều nghiên cứu đánh giá về khả năng kiểm soát sinh học nấm bởi β -1,3-glucanase từ vi sinh vật mang lại hiệu quả cao đã được công bố, trong đó đề cập nhiều phải kể đến là các loài thuộc chi *Bacillus* như *B. circulans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*,... (Magnin-Robert *et al.*, 2007; Otsuka *et al.*, 2022; Duy, 2023; Masilamani *et al.*, 2013; Phén *et al.*, 2016).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo về quá trình nhân bản và giải trình tự của gen mã hoá β -1,3-glucanase phân lập từ chủng *Bacillus* sp. 41. Dựa trên kết quả giải trình tự, cấu trúc bậc 2 của protein chức năng đã được dự đoán và đối chiếu với dữ liệu của ngân hàng PDB. Kết quả của báo cáo là tiền đề cho các nghiên cứu chuyên sâu trong công tác tuyển chọn, sản xuất các protein tái tổ hợp dạng PR2 phục vụ phòng trừ nấm bệnh trong sản xuất nông nghiệp và công nghiệp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 41 được phân lập từ đất nông nghiệp Tỉnh Quảng Trị được bảo quản và lưu trữ tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế (Huyền *et al.*, 2024). Chủng vi khuẩn được nuôi cấy và lưu trữ trong môi

trường LB chứa 1% pepton, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl. Chúng vi khuẩn *Escherichia coli* TOP10 được nuôi cấy trên môi trường LB rắn chứa 2% agar.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 41 được tách chiết dựa trên phương pháp CTAB theo mô tả của Sambrook và Russell (2003) với một số điều chỉnh: Vi khuẩn sau 18 giờ nuôi cấy trong môi trường LB với tốc độ lắc 180 vòng/phút được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Sinh khối được rửa lại bằng nước cất vô trùng để loại bỏ hoàn toàn môi trường nuôi cấy và tái huyền phù 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). Tế bào được ủ ở 65°C trong 15 phút. Dịch chiết tế bào chứa DNA tổng số được thu hồi bằng ly tâm trong 5 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút. DNA tổng số được tách chiết và tinh sạch trong 700 μ L hỗn hợp gồm: phenol, chloroform, isopropanol (tỷ lệ 25:24:1), trộn đều bằng vortex và phân tách bằng ly tâm 5 phút với tốc độ 10.000 vòng/phút. Khoảng 500 μ L pha trên được chuyển sang ống 1,5 mL mới và DNA tổng số được kết tủa với 2 lần thể tích ethanol tinh khiết, rửa kết tủa bằng ethanol 70% và hòa tan trong 50 μ L đệm TE. DNA tổng số sau đó được kiểm tra chất lượng bằng điện di trên gel agarose 1% với thuốc nhuộm 6x GelRed Loading Buffer (ABT-VN).

Phân lập gen β -1,3-glucanase từ *Bacillus* sp. 41

Để phân lập gen mã hoá β -1,3-glucanase từ DNA tổng số của chủng *Bacillus* sp. 41 đã được tách chiết, trình tự mỗi đặc hiệu được thiết kế dựa trên các phân tích trước đó về gen β -1,3-glucanase và dữ liệu hệ gen chủng vi khuẩn *Bacillus halotolerans* Y6 (GenBank: MH643779). Trình tự mỗi xuôi là BglIF 5'-ATGTCTACTGCATCAGCTCA-3' và trình tự mỗi ngược BglIR 5'-TTATTTTTTTGTATAGCGC-3'. Phản ứng khuếch đại chuỗi polymerase (PCR) được tiến hành với thành phần phản ứng gồm 50 ng DNA tổng số, 10 pmol mỗi xuôi, 10 pmol mỗi ngược, 1x MyTaq™ Mix (Bioline, Đức) trong thể tích phản ứng 20 μ L. Chu trình nhiệt PCR được thực hiện ở 95°C trong 10 phút; 30 chu kỳ với 95°C trong 60 giây, 55°C trong 30 giây và 72°C trong 90 giây; kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% trong đệm TAE (Tris acetic acid EDTA) với hiệu điện thế 70V trong 30 phút, sử dụng thuốc nhuộm 6x GelRed Loading Buffer (ABT-VN).

Tạo dòng gen β -1,3-glucanase

Sản phẩm PCR có kích thước phù hợp được phân tách và tinh sạch từ gel agarose bằng Kit tách chiết – TopPURE® PCR/GEL DNA Purification Kit (HI-412) (ABT, Việt Nam). Sản phẩm PCR sau tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% trước khi tạo dòng và giải trình tự. Khoảng 40 ng sản phẩm PCR sau tinh sạch được ủ với 50 ng pGEM®T-Easy vector (Promega, Mỹ) trong phản ứng có 1x đệm gắn, 3 đơn vị T4 DNA ligase ở 4°C qua đêm. Hỗn hợp gắn được biến nạp vào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Tế bào *E. coli* TOP10 được nuôi cấy trên môi trường LB rắn có bổ sung 50 μ g/mL ampicillin (Amp), 50 μ g/mL 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl –D-Galactopyranoside (X-gal) và 100 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) trong 16 giờ ở 37°C. Thể tái tổ hợp được chọn lọc dựa vào sự xuất hiện khuẩn lạc có viền màu xanh hoặc màu trắng trên đĩa, trong đó khuẩn lạc màu trắng có chứa vector tái tổ hợp.

Khuẩn lạc *E. coli* TOP10 màu trắng xuất hiện được kiểm tra bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mỗi đặc hiệu gen β -1,3-glucanase như mô tả ở trên. Các khuẩn lạc cho kết quả sản phẩm PCR đặc trưng được nuôi cấy trong 5 mL môi trường LB có bổ sung ampicillin qua đêm ở 37°C. Tế bào *E. coli* TOP10 được thu nhận bằng ly tâm lạnh ở 4°C với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút. DNA plasmid được tách chiết sử dụng Kit tách chiết – TopPURE® Plasmid DNA Extraction Kit (HI-142) (ABT, Việt Nam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sự hiện diện gen β -1,3-glucanase trong thể tái tổ hợp với vector pGEM®T-Easy được kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn *Kpn*I (Thermoscientific, Mỹ) và phản ứng PCR sử dụng cặp mỗi M13 (M13F: 5'-GTAAACGACGGCCAGT-3'; M13R: 5'-CGGATAACAATTTACACAGG-3') được thiết kế trên vector pGEM®T-Easy. Sản phẩm PCR bằng cặp mỗi M13 được gửi đi giải trình tự theo phương pháp Sanger tại Công ty TNHH DNA Sequencing, Việt Nam.

Phân tích trình tự gen β -1,3-glucanase

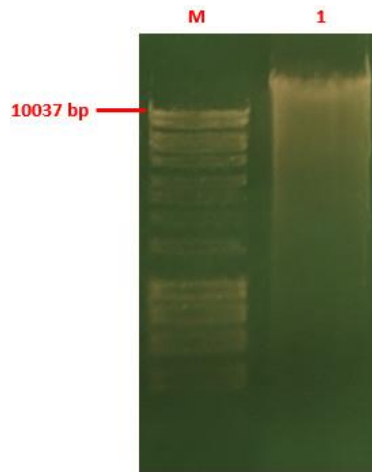
Trình tự nucleotide gen β -1,3-glucanase được so sánh và đối chiếu với trình tự gen tương ứng từ chủng *B. halotolerans* Y6 sử dụng phần mềm Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Trình tự amino acid suy diễn của gen β -1,3-glucanase được thu nhận bằng công cụ protein translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>). Sự hiện diện của trình tự nucleotide mã hóa tín hiệu peptide của gen β -1,3-glucanase được xác định sử dụng công cụ SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>). Cuối cùng, cấu trúc không gian 3D của protein β -1,3-glucanase được dự đoán bằng phần mềm Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (Kelley *et al.*, 2015), điểm đẳng điện sử dụng phần mềm IPC2 (<https://ipc2.mimuw.edu.pl/>).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tách chiết DNA tổng số

Bacillus sp. 41 sau 18 giờ nuôi cấy trong môi trường LB lỏng, tốc độ lắc 180 vòng/ phút được thu sinh khối và tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp CTAB theo mô tả của Sambrook và Russell (2003). DNA tổng số sau

khi tách chiết được điện di trên agarose gel 1%. Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy DNA tổng số thu được là một băng duy nhất, có kích thước lớn hơn 10 kb với nồng độ 500 ng/ μ L, sạch, ít đứt gãy, rõ nét. Chất lượng DNA tổng số đảm bảo để làm nguyên liệu cho những thí nghiệm tiếp theo.

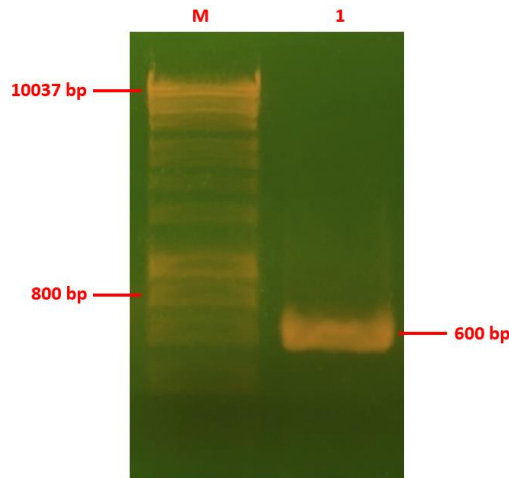


Hình 1. Kết quả điện di DNA tổng số

M: Hyper Ladder 1kb (Bioline); 1: DNA tổng số *Bacillus* sp. 41

Khuếch đại gen β -1,3-glucanase

Gen mã hoá β -1,3-glucanase (*Bgl*) được khuếch đại từ DNA tổng số của chủng *Bacillus* sp. 41 với cặp mồi đặc hiệu *Bgl*. Kết quả phản ứng PCR cho thấy sản phẩm khuếch đại với kích thước khoảng 600 bp. Do đó, sản phẩm PCR được tinh sạch từ gel agarose 1% tạo nguồn nguyên liệu cho bước tạo dòng và giải trình tự gen.



Hình 2. Kết quả PCR với cặp mồi đặc hiệu

M: Hyper Ladder 1kb (Bioline); 1: Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu từ DNA tổng số *Bacillus* sp. 41

Tạo dòng gen *Bgl*

Sản phẩm PCR mang gen *Bgl* sau tinh sạch được gắn vào vector pGEM®-T Easy theo phương pháp TA-cloning dưới sự xúc tác của enzyme T4 Ligase và biến nạp vào *E. coli* TOP10. Các khuẩn lạc đơn màu trắng sau 16 giờ cấy trên đĩa LB có bổ sung Amp, IPTG và X-gal được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc đơn với cặp mồi đặc hiệu nhằm kiểm tra sự có mặt của gen mã hoá có trong vector pGEM®-T Easy tái tổ hợp. Trình tự mồi M13 được thiết kế nằm ở hai đầu vùng tạo dòng của vector pGEM®-T Easy cho phép lựa chọn chính xác các khuẩn lạc có mang gen *Bgl*. Kết quả điện di gel agarose 1% được trình bày ở Hình 3.



Hình 6. Cấu trúc dự đoán của Bgl

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, gen *Bgl* đã được phân lập thành công từ DNA tổng số của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 41 bằng cặp mồi *Bgl*. Gen mã hoá có chiều dài 655 bp, trình tự amino acid suy diễn có chiều dài 214 aa. Protein Bgl được dự đoán có cấu trúc và chức năng tương tự enzyme β -1,3-1,4 glucanase *B. subtilis* 168.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2022.TS056 và Đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số CT2022.09.DHH.01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bhuiyan N, Selvaraj G, Wei Y, & King J (2009). Role of lignification in plant defense. *Plant Signal Behav*, 4(2): 158-159.
- Duy L (2023). Evaluation of antifungal activity against *Corynespora cassicola* by bacteria isolated from soil in the root zone of cucumber plants. *Biodiversitas*, 24(12): 6584-6591.
- El-Katatny M, Gudelj M, Robra K, Elnaghy M, Gübitz G (2001). Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56: 137-143.
- Furtado G, Ribeiro L, Santos C, Tonoli C, De Souza A, Oliveira R, Ward R (2011). Biochemical and structural characterization of a β -1, 3-1, 4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochem*, 46(5): 1202-1206.
- Kelley L, Mezulis S, Yates C, Wass M, Sternberg M (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc*, 10(6): 845-858.
- Magnin-Robert M, Trotel-Aziz P, Quantinet D, Biagianni S, Aziz A (2007). Biological control of *Botrytis cinerea* by selected grapevine-associated bacteria and stimulation of chitinase and β -1, 3 glucanase activities under field conditions. *Eur J Plant Pathol*, 118: 43-57.
- Masilamani R, Sharma OP, Muthuvel SK, Natarajan S (2013). Cloning, expression of b-1,3-1,4 glucanase from *Bacillus subtilis* SU40 and the effect of calcium ion on the stability of recombinant enzyme: *in vitro* and *in silico* analysis. *Bioinformation*, 6:9(19):958-62.
- Nguyễn Thị Thanh Huyền, Nguyễn Đức Huy, Nguyễn Bảo Hưng, Lê Thị Nhật Anh, Nguyễn Thị Minh Nga, Trần Quốc Dung (2024). Khả năng đối kháng bệnh than thư do *Colletotrichum fructicola* CL5 trên ớt của β -1,3-glucanase sinh tổng hợp từ *Bacillus* spp.. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 133(3A): 49-60.
- Otsuka Y, Sato K, Yano S, Kanno H, Suyotha W, Konno H, Taira T (2022). GH-16 type β -1, 3-glucanase from *Lysobacter* sp. MK9-1 enhances antifungal activity of GH-19 type chitinase, and its glucan-binding domain binds to fungal cell-wall. *J Appl Glycosci*, 69(3): 49-56.
- Sambrook S, Russell D (2003). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY.
- Sinha M, Singh R, Kushwaha G, Iqbal N, Singh A, Kaushik S, Singh T (2014). Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *Sci World J*, 2014: 543195.
- Tiku A (2020). Antimicrobial compounds (phytoanticipins and phytoalexins) and their role in plant defense. *Co-evolution of secondary metabolites, Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham.
- Trần Vũ Phấn, Trần Ánh Lua, Đinh Ngọc Trúc (2016). Khả năng kích kháng lưu dẫn của vi khuẩn *Bacillus* spp. đối với bệnh cháy lá lúa do nấm *Pyricularia oryzae* trong điều kiện nhà lưới. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Số chuyên đề: Nông nghiệp*, 3: 249-257.
- Van Loon L, Van Kammen A (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40(2): 199-211.
- Vogeli-Lange R, Frundt C, Hart C M, Nagy F, Meins F (1994). Developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I β -1, 3-glucanase B promoter. *Plant Mol Biol*, 25: 299-311.
- Watanabe T, Kasahara N, Aida K, Tanaka H (1992). Three N-terminal domains of beta-1,3-glucanase A1 are involved in binding to insoluble beta-1,3-glucan. *J Bacteriol*, 174(1): 186-190.
- Worrall D, Hird D, Hodge R, Paul W, Draper J, Scott R (1992). Premature dissolution of the microsporocyte callose wall causes male sterility in transgenic tobacco. *The Plant Cell*, 4(7): 759-771.

ISOLATION AND ANALYSIS OF AN β -1,3-GLUCANASE FROM *Bacillus* sp. 41

Nguyen Thi Thanh Huyen^{1,2}, Le Thi Nhat Anh¹, Tran Quoc Dung^{3*}, Nguyen Duc Huy^{1*}

¹*Institute of Biotechnology, Hue University*

²*Le Quy Don High School, Dong Ha, Quang Tri*

³*University of Education, Hue University*

SUMMARY

β -1,3-glucanase is a potential enzyme involved in the defense system against harmful fungi in plants. In the present study, a gene encoding for β -1,3-glucanase (*Bgl*) isolated from *Bacillus* sp. 41 strain which inhibited harmful *Aspergillus niger* was successfully amplified, cloned, performed nucleotide sequencing and analyzed the structure. The results indicated that the gene consisted of 655 bp, encoding for a polypeptide chain of 214 aa. The functional prediction of *Bgl* indicated the gene encodes for a signal peptide of 22 aa length demonstrated that *Bgl* encodes for an extracellular protein. The predicted structure of translated protein was highly similar to the β -1,3-1,4 glucanase in *Bacillus subtilis*, containing 55% amino acid chain of β -sheet. The properties of *Bgl* and secondary structure of translated protein propose *Bgl* is importance factor in *Bacillus* genome. Thus, the successful isolation of the *Bgl* gene provides important genetic data that supports for further study to elucidate the antagonistic mechanism between *Bacillus* sp. to harmful fungi. In addition, these results provide genetic sources for the expression of recombinant enzyme in appropriate hosts.

Keywords: β -1,3-glucanase, *Bacillus*, *Bgl*, cloning.

* Author for correspondence: Tran Quoc Dung; Email: tranquocdung@hueuni.edu.vn or Nguyen Duc Huy; Email: ndhuy@hueuni.edu.vn