

THỬ NGHIỆM TẠO DÒNG VI KHUẨN *Escherichia coli* DH5 α MANG GEN TÁI TỔ HỢP TỔNG HỢP NHỰA POLY- β -HYDROXYBUTYRATE (PHB) TỪ VI KHUẨN *Rhizobium gallicum* M40.1 ĐỘT BIẾN

Nguyễn Thành Luân*, Phan Thị Nguyệt Ánh, Huỳnh Thị Mỹ Trang, Tôn Trinh Trinh, Lê Thị Mỹ Lệ

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Poly- β hydroxybutyrate (PHB) là loại nhựa sinh học thuộc nhóm poly hydroxyalkanoates (PHAs) và được dự trữ trong tế bào vi khuẩn dưới dạng polyester. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tạo dòng vi khuẩn *Escherichia coli* chứa gen *phbC*- mã hóa enzyme sinh tổng hợp PHB từ vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 đột biến. Kết quả thử nghiệm đã đánh giá cặp mồi F-*phbC*/R-*phbC* được thiết kế có khả năng khuếch đại gen *phbC* với kích thước 1000 bp. Để tối ưu hoá phản ứng PCR, khảo sát nhiệt độ bắt cặp và nồng độ của mồi F-*phbC*/R-*phbC* cho kết quả bắt cặp tốt ở nhiệt độ 62°C, với nồng độ mồi 25 pmol/ μ L. Vector tái tổ hợp pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* đã được biến nạp thành công vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 α khả biến, chọn lọc vi khuẩn biến nạp trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB) chứa ampicillin (100 μ g/ml)/IPTG/X-gal cùng bước sàng lọc các vi khuẩn dương tính bằng phản ứng PCR khuếch đại. Nghiên cứu này có tiềm năng đánh giá việc chuyển đổi các gen từ vi khuẩn và tạo ra các dòng vi khuẩn tái tổ hợp mang gen mã hóa enzyme sinh tổng hợp PHB có hiệu suất cao ở quy mô công nghiệp trong ứng dụng vật liệu mới thay thế.

Từ khóa: *Escherichia coli* DH5 α , nhựa sinh học, Poly- β hydroxybutyrate, PHB, *Rhizobium gallicum*.

MỞ ĐẦU

Nhựa sinh học được xem là một vật liệu mới có thể thay thế nhựa tổng hợp truyền thống và có thời gian phân hủy nhanh góp phần làm giảm ô nhiễm môi trường. Nhựa sinh học có rất nhiều loại như: nhựa dẻo từ tinh bột, nhựa acid polylactic (PLA), nhựa poly- β - hydroxybutyrate (PHB), polyacrylamide 11 (PA 11), nhựa polyethylene xuất xứ sinh học (Đoàn Văn Thước và Lưu Thị Hối, 2015). Đặc biệt poly- β - hydroxybutyrate (PHB) là một loại nhựa sinh học ưu việt có khả năng tự phân hủy thành CO₂ và H₂O trong thời gian ngắn, không sinh chất độc dioxin như nhựa truyền thống khi xử lý và đặc biệt có thể sản xuất từ vi sinh vật. Nhựa PHB tồn tại trong tế bào chất dưới dạng hạt tinh thể và có thể tách chiết nhờ dung môi. PHB đã được xác định có thể tổng hợp trong hơn 20 chi vi khuẩn khác nhau trong đó có các chi lớn như *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* (Đỗ Thị Thanh Huyền *et al.*, 2017; Hungund *et al.*, 2018). Quá trình sinh tổng hợp PHB ở vi sinh vật bắt đầu bởi phản ứng trùng hợp của hai phân tử acetyl-CoA sinh ra sản phẩm là Acetoacetyl-CoA với sự xúc tác của enzyme β -ketothiolase được mã hóa bởi gen *phbA*, sản phẩm này sẽ bị khử thành D-(β)-hydroxybutyryl-CoA do một Acetoacetyl-CoA reductase (được mã hóa bởi gen *phbB*). Bước cuối cùng và quan trọng nhất được xúc tác bởi enzyme sinh tổng hợp PHB tạo ra các mono-PHB được mã hóa khi có sự xuất hiện bởi gen *phbC* kết hợp sự tương tác cố định từ gen bảo tồn *phbA* và *phbB* (Hungund *et al.*, 2018).

Việc nghiên cứu ứng dụng PHB được xem xét ở các chủng vi khuẩn tái tổ hợp từ vi khuẩn *E.coli* được xem là khả dĩ nhất cho việc sản xuất PHB (Jiang *et al.*, 2023). Trên thế giới, các nghiên cứu nhằm tăng năng suất tạo nhựa như nghiên cứu tạo dòng một số vi khuẩn như *Azotobacter vinelandii*, *Ralstonia eutropha* và tối ưu hóa môi trường cho vi khuẩn tạo nhựa PHB được thực hiện tại Nepal (Thapa *et al.*, 2018). Tại Việt Nam, có nhiều nghiên cứu thành công đã được công bố mang lại nhiều hiệu quả tích cực và là nền tảng cho các nghiên cứu sau này như: Phạm Thanh Hà và đồng tác giả (2018) đã nghiên cứu tạo đột biến vi khuẩn *Alcaligenes latus* để nâng cao hoạt tính sinh học và đã khảo sát thành công điều kiện lên men thúc đẩy sự tích lũy PHB (Phạm Thanh Hà *et al.*, 2008; Đoàn Văn Thước và Lưu Thị Hối, 2015). Trong đó, Nguyễn Thành Luân và đồng tác giả (2018) đã nghiên cứu phân lập một số vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nhựa sinh học từ đất và thực vật tại tỉnh Bình Dương, phát hiện loài *R. gallicum* là vi khuẩn cố định đạm mới được chứng minh có khả năng sinh tổng hợp nhựa sinh học PHB với hiệu suất cao 39,84% so với sinh khối khô (Nguyễn Thành Luân *et al.*, 2018). Đây là vi khuẩn tiềm năng trong nghiên cứu ứng dụng sản xuất nhựa PHB tại Việt Nam. Sau khi được phát triển, vi khuẩn *R. gallicum* đã được gây đột biến bằng tia UV thành vi khuẩn *Rhizobium gallicum* M40.1 với khả năng tạo nhựa PHB đạt năng suất 56,97% PHB/trọng lượng khô tế bào (Nguyễn Thành Luân và Trần Mỹ Hiếu, 2019). Việc nghiên cứu tạo dòng *Massilia* sp. UMI-121 chuyển gen mang enzyme sinh tổng hợp PHB vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α bằng vector mang gen pETDuet1-*phaA2phaB1-phaC1* và pETDuet1-*phaA2phaB1-phaC1-vgb* cho hiệu suất thu hồi nhựa PHB hơn 213,30%, khối lượng thô hơn 117,42% và 44,09% kết cấu so với chủng gốc chưa chuyển gen (Jiang *et al.*, 2023). Công nghệ chuyển gen ở vi khuẩn là một bước tiến giúp tạo ra các chủng tái tổ hợp mới an toàn và

hiệu quả cao hơn. Việc sử dụng công nghệ tạo dòng có thể nhân lên một số lượng lớn trong tế bào chủ với tốc độ nhanh nhờ thể truyền có thể là plasmid, phage và cosmid cũng như các nhiễm sắc thể (NST) nhân tạo đặc biệt ở vi khuẩn có khả năng tái tổ hợp mạng như *E.coli DH5α* (Lathwal *et al.*, 2018). Các vector tái tổ hợp được chuyển vào tế bào vật chủ để tăng khả năng sao chép DNA tái tổ hợp thành nhiều bản sao, nhờ một số vi khuẩn như *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium*, đặc biệt là vi khuẩn *E. coli* vì cấu trúc di truyền của chúng khá đơn giản, dễ dàng mang gen ngoại lai (Obterbaan *et al.*, 2018). Vì vậy, nghiên cứu này nhằm tạo dòng vi khuẩn *E. coli* DH5α tái tổ hợp mang gen *phbC* tổng hợp nhựa poly-β hydroxybutyrate (PHB) từ vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 đột biến bằng tia UV nhằm lưu giữ và kiểm tra khả năng sản xuất nhựa sinh học PHB từ chủng vi sinh. Nghiên cứu tạo ra các dòng *E. coli* DH5α tái tổ hợp mang gen tổng hợp PHB để mang lại hiệu suất cao, góp phần làm phong phú thêm nguồn giống vi sinh vật có khả năng sản xuất nhựa PHB cao trong nền công nghiệp nhựa sinh học thay thế.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 được sử dụng trong nghiên cứu mang gen *phbC*-mã hóa enzyme tổng hợp nhựa PHB được gây đột biến bằng tia UV trong 40 phút từ nghiên cứu của Nguyễn Thành Luân và đồng tác giả (2019). Quá trình tăng sinh vi khuẩn *R. gallicum* M40.1. được thực hiện trên môi trường YEM cải tiến trong 24 giờ ở 28°C, 150 vòng/phút để thu nhận mật độ tế bào khoảng 10⁹ CFU/mL. Vi khuẩn *E. coli* DH5α được dùng làm tế bào chủ, cho các quy trình tạo dòng gen *phbC*, được tăng sinh trên môi trường LB (Luria Bertani Broth, Himedia, Ấn Độ) trong 24 giờ ở 37°C, 120-150 vòng/phút. Hai plasmid pBR322 và pBluescript (Thermo fisher, Mỹ) làm vector chuyển gen. Enzyme cắt giới hạn sử dụng trong quá trình cắt plasmid, lựa chọn dựa trên bản đồ trình tự plasmid pBR322 và Bluescript là *EcoRI* (10U) và *HindIII* (10U) (Bioline, Đức). Cặp mồi dùng để khuếch đại gen *phbC* từ vi khuẩn *R. gallicum* được thiết kế dựa trên trình tự bảo tồn genome vi khuẩn *R. gallicum* (GI: CP006877) chứa gen *phbC* dựa trên việc sử dụng công cụ NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), công cụ Primer Blast được dùng để thiết kế primer dựa trên trình tự FASTA của gen *phbC* để khuếch đại chuyên biệt gen *phbC*. Bên cạnh đó, công cụ Oligo analyzer-IDT (www.idtdan.com) được dùng để kiểm tra các thông số của mồi. Cặp mồi thiết kế có trình tự nhận biết của enzyme *HindIII* tại đầu 5' của mỗi xuôi và *EcoRI* tại đầu 5' của mỗi ngược từ thiết kế trên NEBCutter (New England Biolabs, Anh) (Bảng 1). Plasmid vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 được tách chiết bằng phương pháp Jiang và đồng tác giả cải tiến từ phương pháp của Chen và Kuo năm 1993 (Jiang *et al.*, 2023) . Sau khi tách chiết, DNA được đo mật độ quang ở các bước sóng 260nm, 280nm và tính tỷ lệ OD_{260nm}/ OD_{280nm} để xác định độ tinh sạch. Nồng độ DNA được tính toán theo công thức: C_{DNA}(μg/μL)=OD_{260nm} x 50 x nồng độ pha loãng.

Bảng 1. Trình tự cặp mồi F-phbC/R-phbC

Vi khuẩn	Tên mồi	Gen	Trình tự Nucleotide (5' → 3')	Tm (°C)	Kích thước sản phẩm PCR	Nghiên cứu
<i>R.gallicum</i> M40.1	F- <i>phbC</i>	<i>phbC</i>	AAGCTTTTATGTCCGCTCCATGAC	63.5	1000 bp	Tự thiết kế theo Primer BLAST
	R- <i>phbC</i>		GAATTCGTGACCGACAGCAAGCAG	70.4		

Phương pháp nghiên cứu

Biến nạp plasmid vào tế bào vi khuẩn E. coli DH5α

Phương pháp hóa biến nạp và phương pháp sốc nhiệt (Thapa *et al.*, 2018) được sử dụng để plasmid pBR322 và pBluescript vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5α được nuôi cấy lỏng lác qua đêm ở 37°C, 120-150 vòng/phút. Sinh khối được đo OD ở 600 nm đạt giá trị 0.4-0.6, sau đó tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút trong 10 phút sau đó được bổ sung 1 mL CaCl₂ 100 mM và ủ trong đá -20°C 15 phút. Thí nghiệm được tiến hành lặp lại tương tự với quy trình khảo sát ủ trên đá lần lượt ở 30 phút và 1 giờ. Lượng tủa thu nhận được hoà tan bằng 50 μL hỗn hợp Glycerol:CaCl₂ 100 mM lạnh theo tỷ lệ 1:4, tiếp tục làm lạnh nhanh tế bào khả biến bằng nitơ lỏng và bảo quản ở -80 °C. Dịch tế bào khả biến được đem rã đông và bổ sung vào 1μL plasmid pBR322/pBluescript. Hỗn hợp được mang đi ủ lạnh trong 2 phút kết hợp với ủ nhiệt nhanh ở 42°C trong 45 giây, sau đó lặp lại ủ lạnh nhanh tế bào trong 2 phút. Dịch tăng sinh thu được trong môi trường LB lỏng ở 37°C trong 1 giờ, sau đó trải dịch trên môi trường LB-agar chứa Ampicillin ở nồng độ 100 μg/mL. Khuẩn lạc biểu hiện mang gen biến nạp được đánh giá và kiểm tra sau 24 giờ trên môi trường.

Tách chiết DNA plasmid của vi khuẩn E.coli và DNA vi khuẩn R. gallicum M40.1

Phương pháp ALS (Jiang *et al.*, 2023) được sử dụng với quy trình tách chiết DNA từ vi khuẩn *E. coli* cải tiến (Jiang *et al.*, 2023) đã biến nạp được tăng sinh trong môi trường LB lỏng trong 24 giờ ở 37°C, nuôi cấy lỏng lác 120-150 vòng/phút. Sinh khối vi khuẩn sau tăng sinh được ly tâm ở 8000 vòng/phút trong 2 phút ở 20°C nhằm thu nhận sinh khối. Sinh khối được bổ sung 150 μL ALS-I kết hợp vortex mẫu để cho sinh khối tan ra. Hỗn hợp mẫu được trộn đều 4-5 lần với 300 μL ALS-II, 225 μL ALS-III; sau đó hỗn hợp được đem đi ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 20°C thu dịch nổi. Dịch nổi được bổ sung thêm 300μL isopropanol và tiến hành ly tâm

13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 20°C thu vủa. Vủa đợc bổ sung thêm 700 µL Ethanol 70% lạnh và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C để thu vủa nhận plasmid và bảo quản với 50 µL nước cất vô trùng trong -20°C. Phương pháp SDS - kiểm cải tiến (Thapa *et al.*, 2018) đợc ứng dụng tương tự như phương pháp ALS tuy nhiên phương pháp này sử dụng thêm một số hóa chất như RNAase, phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1), chloroform/isoamylalcohol, isopropanol và thời gian ủ tách thực hiện kéo dài hơn. Mẫu DNA plasmid sau khi đợc tách bằng 2 phương pháp đem điện di ở hiệu điện thế 100V trong 30 phút, gel agarose 1.5% với thang ladder 1k bp của IDT (Integrated DNA Technologies, Mỹ).

Khuếch đại trình tự gen *phbC* bằng kỹ thuật PCR

Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu đợc thử nghiệm khả năng khuếch đại vùng DNA khuôn bằng phản ứng PCR 35 chu kỳ gồm giai đoạn biến tính ban đầu (95°C trong vòng 5 phút), giai đoạn khuếch đại 35 chu kỳ (gồm các bước biến tính: 95°C trong 1 phút, gắn mồi: 60°C trong 1 phút, kéo dài mồi: 72°C trong 2 phút), giai đoạn kéo dài cuối cùng (72°C trong 10 phút), ủ và bảo quản (ở điều kiện 4°C). Thành phần phản ứng PCR trong tổng thể tích 25 µL gồm: 12.5 µLPfu polymerase mix (2X), 1 µL F-*phbC* (25 pmol/µL), 1 µL R-*phbC* (25 pmol/µL), 5 µL DNA và 5.5 µL nước cất vô trùng. Sau đó sản phẩm PCR đợc điện di trên gel agarose 1.5%, hiệu điện thế 100V, trong 30 phút sử dụng thang chuẩn 1kbp của IDT (Integrated DNA Technologies, Mỹ). Điều kiện phản ứng PCR ở nhiệt độ từ 60°C đến 70°C theo nồng độ tăng dần cách nhau 1°C và nồng độ 15 pmol/µL đến 35 pmol/µL với 5 pmol/µL khác biệt đợc sử dụng để khảo sát các khoảng nhiệt độ bắt cặp và nồng độ mồi tối ưu cho phản ứng PCR. Bộ KIT Jeanta (Phù Sa BioChem, Việt Nam) đợc dùng để tinh sạch sản phẩm PCR để chuẩn bị cho thí nghiệm kiểm tra sản phẩm sau phản ứng.

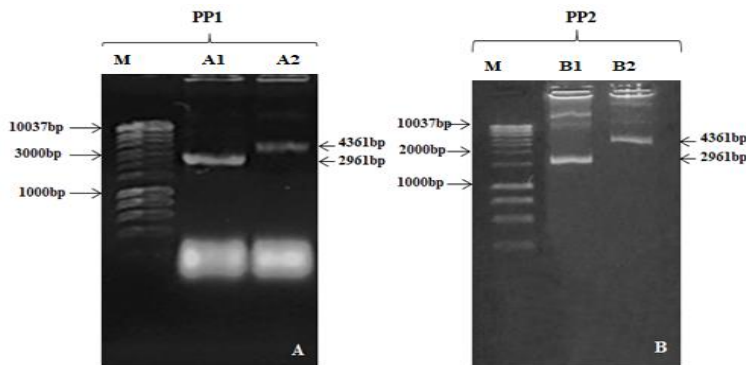
Tạo vector tái tổ hợp

Enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *HindIII* (Bioline, Đức) đợc sử dụng để cắt 2 plasmid với thành phần phản ứng cắt như sau: 7 µL plasmid pBluescript/pBR322/sản phẩm PCR, 1µL *EcoRI* (10U), 1 µL *HindIII* (10U), 4 µL Đệm 10X fast digest™ (10X), 7µL nước vô trùng, hỗn hợp trên đợc ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sản phẩm cắt sau đó đợc điện di và kiểm tra kết quả. Phản ứng nối plasmid với sản phẩm PCR gen *phbC* bao gồm 1 µL T4 reaction buffer (10X), 2 µL DNA từ sản phẩm PCR (100 ng/µL), 1 µL sản phẩm plasmid cắt (50 ng), 1U enzyme T4 ligase, 10 µL ddH₂O. Vector mang gen đợc biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α. Các dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp đợc chọn lọc trên môi trường LB-agar có bổ sung Ampicillin/X-gal/IPT và tiến hành khảo sát khả năng mang gen *phbC* bằng phản ứng PCR khuẩn lạc để kiểm tra độ đặc hiệu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng tế bào *E. coli* DH5α mang plasmid và khảo sát các phương pháp tách DNA plasmid

Kết quả tách chiết DNA plasmid pBR322 và pBluescript bằng phương pháp ALS và phương pháp SDS-kiểm (Hình 1A, Hình 1B), sản phẩm tách chiết DNA plasmid pBR322 và pBluescript bằng phương pháp ALS cho sản phẩm tách chiết có nồng độ tương đối cao, band xuất hiện sáng, gọn, tuy nhiên cuối các band xuất hiện vệt sáng đây có thể là RNA hoặc các chất tạp nhiễm tại các giếng A1 và A2 (Hình 1). Sản phẩm tách chiết DNA plasmid pBR322 và pBluescript bằng phương pháp SDS-kiểm cho sản phẩm tách chiết có nồng độ cao, band xuất hiện sáng, gọn, các band chỉ có plasmid không xuất hiện RNA hay các chất tạp nhiễm tại các giếng B1 và B2 (Hình 1). Từ 2 phương pháp tách chiết DNA plasmid trên, phương pháp SDS-kiểm đợc đánh giá thu nhận nồng độ DNA cao hơn, không còn RNA trong sản phẩm tách chiết. Do đó, phương pháp này để tách chiết plasmid để sử dụng cho các thí nghiệm sau.

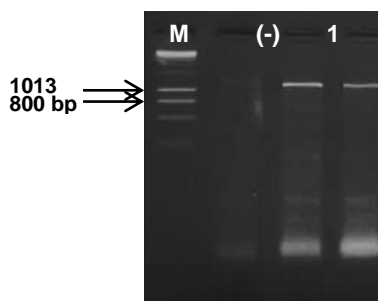


Hình 1. Kết quả điện di tách plasmid bằng phương pháp ALS (A) và SDS-kiểm (B)

Trong đó: M là ladder; giếng A1, A2: Lần lượt là plasmid pBluescript/pBR322 tách bằng phương pháp ALS; giếng B1, B2: Lần lượt là plasmid pBluescript/pBR322 tách bằng phương pháp SDS-kiểm.

Khuếch đại trình tự gen *phbC* bằng kỹ thuật PCR

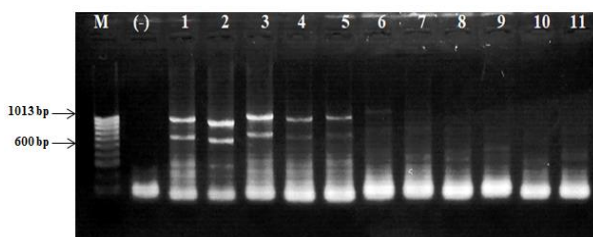
Qua quan sát kết quả chạy điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng gen *phbC* với cặp mồi thiết kế F-*phbC*/R-*phbC*, các giếng 1, 2 đều có vạch sáng với kích thước đúng như thiết kế ban đầu (Hình 2). Đối với giếng ĐC(-) vì không cho kết quả chứng tỏ phản ứng diễn ra bình thường. Ngoài ra, cuối band điện di còn xuất hiện vết sáng nhỏ hơn 50 bp đây có thể là mồi dư, mồi bắt cặp chéo tạo dimer primer. Kết quả thử nghiệm cho thấy mồi F-*phbC*2/ R-*phbC*2 thiết kế được sử dụng trong nghiên cứu này có khả năng khuếch đại gen *phbC* với kích thước 1000 bp.



Hình 2. Sản phẩm PCR với mồi F- *phbC*2/ R- *phbC*2 khuếch đại gen *phbC*

Trong đó: Giếng M là ladder 100bp, giếng (-): Đối chứng âm, giếng 1,2 : Sản phẩm PCR.

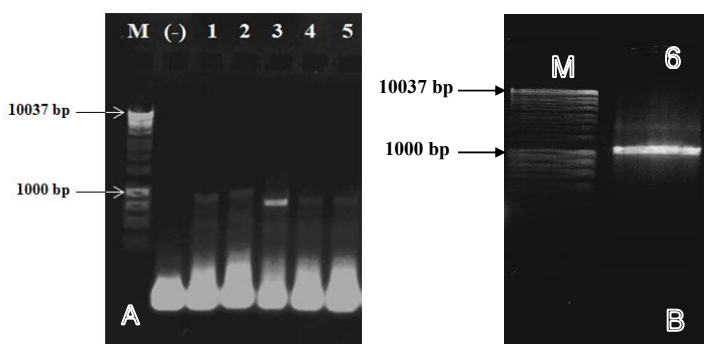
Nhiệt độ bắt cặp của cặp mồi F-*phbC*/R-*phbC* được khảo sát trong khoảng từ 60-70°C, sản phẩm PCR chỉ xuất hiện các nhiệt độ từ 60°C- 65°C, đặc biệt ở nhiệt độ 62°C cho kết quả sản phẩm PCR sáng rõ nhất (Hình 3). Do đó, ngưỡng nhiệt độ được chọn lọc cho tối ưu phản ứng PCR khuếch đại trình tự gen *phbC* ở 62°C được sử dụng cho những nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3. Kết quả khảo sát phản ứng PCR với nhiệt độ bắt cặp mồi F-*phbC*2/R-*phbC*2

Trong đó: M là ladder 100bp; Giếng (-): Giếng đối chứng âm; Giếng 1 -> 11: Mẫu PCR khuếch đại ở nhiệt độ gắn mồi từ 60-70°C.

Sản phẩm PCR đơn mồi khuếch đại DNA vi khuẩn *R. gallicum* ở nồng độ mồi khác nhau (Hình 4). Các giếng từ 1-5 đều xuất hiện band có kích thước khoảng 1000bp, phù hợp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến. Các nồng độ bắt cặp 15 pmol/μL, 20 pmol/μL, 25 pmol/μL, 30 pmol/μL, 35 pmol/μL đều cho kết quả phù hợp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến. Trong đó nồng độ 25 pmol/μL cho kết quả tốt nhất. Trong đó, giếng 3 tương ứng với nồng độ 25 pmol/μL xuất hiện vạch band sáng nhất, các giếng còn lại các band xuất hiện mờ hơn. Do đó nồng độ 25 pmol/μL được chọn là nồng độ mồi tối ưu cho những phản ứng PCR tiếp theo chọn lọc DNA và vector cho phản ứng tái tổ hợp (Hình 4).



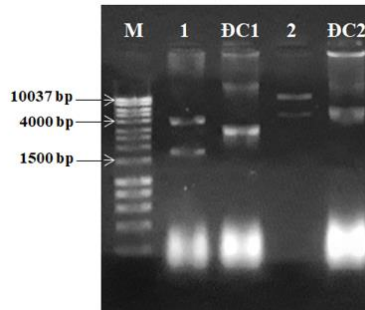
Hình 4. Kết quả điện di khảo sát nồng độ mồi F-*phbC*/R-*phbC* cho phản ứng PCR và kết quả tinh sạch PCR

Trong đó: Giếng M: Thang 1k bp; Giếng (-): Đối chứng; Giếng 1 - 5 tương ứng nồng độ 15 pmol/μL, 20 pmol/μL, 25 pmol/μL, 30 pmol/μL, 35 pmol/μL (A); Giếng 6: Kết quả khuếch đại PCR sản phẩm từ khuẩn lạc *E.coli* (B).

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch xuất hiện band có kích thước khoảng 1000 bp phù hợp với kích thước sản phẩm PCR dự kiến (Hình 5). Các band xuất hiện sáng, rõ nét, không còn tạp chất, dimer- primer dưới band chứng tỏ sản phẩm PCR đã được tinh sạch hoàn toàn từ kết quả có thể nhận thấy đã khuếch đại thành công sản phẩm vector với primer đặc hiệu. Mỗi thiết kế được kiểm nghiệm cho những nghiên cứu về vector trong tương lai.

Tạo vector tái tổ hợp

Thí nghiệm này thực hiện phản ứng cắt kết hợp cùng một lúc 2 vị trí cắt là *Hind*III và *Eco*RI nên sản phẩm tạo ra có 2 mảnh phân cắt. Kết quả điện di cho thấy plasmid đã cắt hoàn toàn, plasmid đã được mở vòng thành 2 mạch thẳng tương ứng 2 mảnh DNA mở vòng ở kích thước 4000 bp và 1500 bp (Giếng 1) và hơn 4000 bp cùng 8000 bp (giếng 2). Plasmid pBR322 và pBluescript được cắt thành công bằng *Hind*III và *Eco*RI (Hình 5). Tuy nhiên, để đánh giá trình tự của đoạn DNA plasmid được cắt thành công hay không cần phải được đánh giá qua kết quả của giải trình tự sinh học và phân tích trình tự của vector. Kết quả so với đối chứng (ĐC1 và ĐC2) cho thấy việc cắt bằng 2 enzyme *Eco*RI và *Hind*III có hiệu quả ở pBluescript và pBR322 thành 2 mảnh riêng biệt.

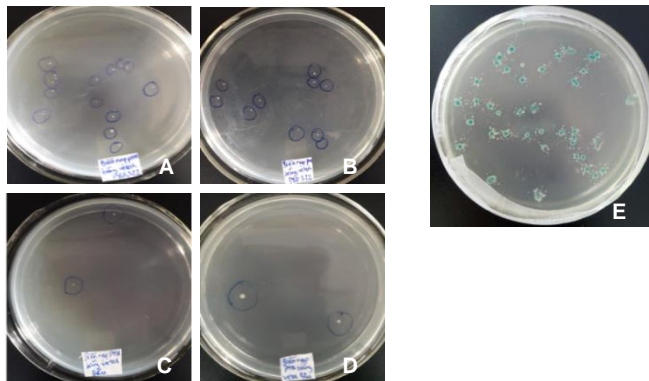


Hình 5. Kết quả phản ứng cắt 2 plasmid pBR322 và pBluescript

Trong đó: Giếng M: Thang 1kbp, giếng 1: Sản phẩm cắt của plasmid pBluescript, giếng ĐC 1: Plasmid pBluescript, giếng 2: Sản phẩm cắt của pBR322, giếng ĐC 2: Plasmid pBR322.

Biến nạp vector tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α

Biến nạp vector pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* vào vi khuẩn *E.coli* DH5α khả biến được thực hiện tương tự với plasmid chưa tái tổ hợp làm đối chứng. Kết quả vi khuẩn *E.coli* chứa 2 vector pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* đều cho toàn khuẩn lạc trắng khác biệt về màu sắc trên môi trường LB-agar/Ampicillin/X-gal/IPTG chứng tỏ các khuẩn lạc đều mang plasmid tái tổ hợp so với chủng đối chứng với plasmid chưa tái tổ hợp có khuẩn lạc màu xanh đặc trưng trên môi trường cảm biến (Hình 7).

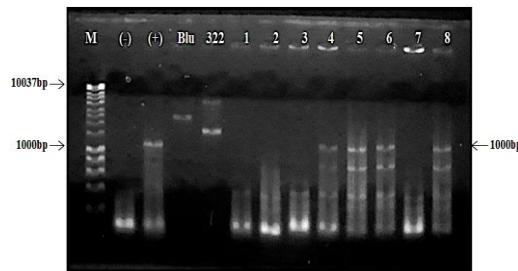


Hình 6. Hình vi khuẩn *E. coli* biến nạp vector pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* trên môi trường chứa Ampicillin/X-gal/IPTG

Trong đó: Hình A, B: Khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* biến nạp vector pBR322-*phbC*, hình C, D: Khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* biến nạp vector pBluescript-*phbC*, hình ĐC: Khuẩn lạc vi khuẩn *E. coli* biến nạp plasmid chưa tái tổ hợp.

Sản phẩm PCR khuẩn lạc biến nạp vector pBluescript-*phbC* (giếng 5-8) ở giếng 5, 6, 8 xuất hiện sản phẩm PCR, kích thước khoảng 1000 bp phù hợp với kích thước gen *phbC* cần được phân tích trình tự qua giải mã trình tự sản phẩm khuếch đại sau đó (Hình 7). Việc biến nạp được kiểm tra lặp lại với các khuẩn lạc đơn lẻ trên môi trường kiểm định chứa Ampicillin/X-Gal/IPTG cho thấy việc thu nhận chủng biến nạp với 2 vector pBluescript và pBR322 không cho hiệu quả đặc hiệu ở phản ứng này so với đối chứng dương (được chứng minh có hiệu quả với 2 vector này trên vi khuẩn *E.coli* DH5α). Kết quả trên các giếng thực tế cho thấy biểu hiện quá trình bất cặp của gen so với ĐC (+) cho kết quả khả quan trên các khuẩn lạc nuôi cấy nghi ngờ có mang plasmid pBR322-*phbC* và pBluescript-*phbC* (Giếng 4, 5, 6 và 8). Việc nghiên cứu các vector đặc hiệu hơn cũng như tìm những enzyme

cắt giới hạn hiệu quả hơn được xem xét cho những nghiên cứu tiếp theo. Vi khuẩn *E.coli* DH5 α có nhiều tiềm năng trong việc nghiên cứu lưu giữ các loại gen quý về di truyền với đặc tính vượt trội.



Hình 7. Sản phẩm PCR khuẩn lạc biến nạp vector pBR322-phbC và pBluescript-phbC

Trong đó: Giếng M: Ladder 1kbp, giếng (-): Đối chứng âm, giếng (+): Đối chứng dương, giếng Blu: Giếng đối chứng dương plasmid pBluescript, giếng 322: Giếng đối chứng dương plasmid pBR322, giếng 1, 2, 3, 4: Sản phẩm PCR khuẩn lạc mang vector pBR322-phbC, giếng 5, 6, 7, 8: Sản phẩm PCR khuẩn lạc mang vector pBluescript-phbC.

KẾT LUẬN

Vi khuẩn *E. coli* DH5 α ban đầu được chứng minh mang gen biến nạp ở các khuẩn lạc mang plasmid pBR322 và pBluescript từ vi khuẩn *R. gallicum* M40.1 được chọn lọc trên môi trường LB chứa kháng sinh Ampicillin (100 μ g/mL) nhưng chưa biểu hiện ở đoạn DNA đặc hiệu. DNA tái tổ hợp từ vi khuẩn tạo dòng có hiện diện của gen *phbC* trong vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp, các gen này chưa được biểu hiện ở tế bào vật chủ. Nghiên cứu đã đánh giá với cặp môi tự thiết kế F-*phbC*/R-*phbC* có hiệu quả ở nhiệt độ 60-65 $^{\circ}$ C với 62 $^{\circ}$ C có biểu hiện tốt nhất, nồng độ mỗi tối ưu ở 25 pmol/ μ L và enzyme đặc hiệu với *Eco*RI và *Hind*III có khả năng cắt giới hạn phân cắt thành 2 đoạn riêng biệt như mong muốn. Nghiên cứu đã lựa chọn được quy trình tách chiết plasmid là phương pháp SDS - kiểm theo quy trình của Thapa và đồng tác giả (2018). Gen *phbC* được khuếch đại và xác định thành công với kích thước khoảng 1000 bp bởi cặp môi F-*phbC*/R-*phbC* bằng phương pháp PCR nhận biết vector tái tổ hợp đã biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Ngoài ra nghiên cứu cần tăng sinh vi khuẩn *E. coli* mang vector tái tổ hợp để tách plasmid, enzyme cắt giới hạn và khuếch đại bằng PCR lặp lại nhiều lần để kiểm tra thêm nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả. Việc đánh giá khả năng tạo nhựa PHB cần được đánh giá ở mức độ tế bào đối với chủng vi khuẩn tái tổ hợp *E. coli* DH5 α nhằm mở ra hướng đi cho những hiệu quả ở quy mô công nghiệp tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Phạm Thanh Hà, Trần Đình Mẫn & Tokiwa, Y (2008). Tạo đột biến nâng cao hoạt tính sinh tổng hợp poly- β - hydroxybutyrate của vi khuẩn *Alcaligenes latus* VN1. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6 (4) 489-496.
- Lathwal P, Nehra KM, Singn M & Rana JS (2018). Characterization of Novel and Efficient Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria Isolated from Rhizospheric Soils. *J Polym Environ* 26 3437 - 3450.
- Đỗ Thị Thanh Huyền, Trần Thị Thùy Anh, Nguyễn Thị Hồng Vân, Nguyễn Quang Huy & Nguyễn Văn Sáng (2017). Tách dòng, biểu hiện và tinh sạch nhân tố phiên mã NF- κ B p50 của người trong tế bào vật chủ *E. coli*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 33 (1) 299-304.
- Hungund BS, Umloti SG, Upadhyaya KP, Manjanna J, Yallappa S & Ayachit NH (2018). Development and characterization of polyhydroxybutyrate biocomposites and their application in the removal of heavy metals. *Materials Today Proceedings*. 5 (10) 21023 - 21029. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.06.495>.
- Jiang N, Wang M, Song L, Yu D, Zhou S, Li Y, Li H & Han X (2023). Polyhydroxybutyrate production by recombinant *Escherichia coli* based on genes related to synthesis pathway of PHB from *Massilia* sp. UMI-21. *Microb Cell Fact* 22, 129. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02142-x>.
- Nguyễn Thành Luân, Nguyễn Minh Chánh, Nguyễn Thị Liên Thương & Nguyễn Thị Quỳnh Mai (2018). Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn có khả năng tổng hợp Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) từ đất và thực vật tại tỉnh Bình Dương. *Tạp chí Khoa học công nghệ và Thực phẩm* 14 (1) 12-19. <https://vjol.info.vn/index.php/hufi/article/view/44844/36228>.
- Nguyễn Thành Luân, Trần Mỹ Hiếu (2019). Khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon và nitrogen khác nhau ở mô hình in vitro lên khả năng tổng hợp nhựa sinh học Poly- β - hydroxybutyrate (PHB) của dòng vi khuẩn *R. gallicum* M40.1. *Tạp chí Khoa học Công nghệ và Thực phẩm*, 19(1) 50-58.
- Osterbaan LJ, Schmitt-Keichinger C, Vigne E & Fuchs M (2018). Optimal systemic grapevine fanleaf virus infection in *Nicotiana benthamiana* following agroinoculation. *Journal of Virological Methods* 257 16-21.
- Đoàn Văn Thược, Lưu Thị Hồi (2015). Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sự sinh trưởng và sinh tổng hợp Poly (3-Hydroxybutyrate) của chủng vi khuẩn *Yangia* sp. NĐ199. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 31 (2) 67-74.
- Thapa C, Shakya P, Shrestha R, Pal S & Manandhar P (2018). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. *Nepal Journal of Biotechnology* 6 (1) 62-68.

CLONING OF *phbC* GENE FROM *Rhizobium gallicum* M40.1 MUTANT IN *Escherichia coli* FOR POLY- β -HYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION

Nguyen Thanh Luan^{*}, Huynh Thi My Trang, Phan Thi Nguyet Anh, Ton Trinh Trinh, Le Thi My Le

Ho Chi Minh City University Of Industry and Trade

SUMMARY

Poly- β hydroxybutyrate (PHB) is a bioplastic belonging to the Poly hydroxyalkanoates (PHAs) group and is stored in bacterial cells in the form of polyester. This study aims to create *Escherichia coli* strain containing *phbC* gene - capable of biosynthesis of PHB from *R. gallicum* M40.1 mutant. The results have been evaluated that F-*phbC*/R-*phbC* primer was designed to amplify *phbC* gene in PCR reaction with the size of 1000 bp. The optimal annealing temperature and concentration of F-*phbC*/R-*phbC* primers in PCR reaction were 62°C and 25 pmol/ μ L, respectively. The recombinant DNA vector pBR322-*phbC*/pBluescript-*phbC* were successfully transformed into *E. coli* DH5 α bacteria cells, selected transformed positive bacteria on LB medium containing Ampicillin (100 μ g/mL)/IPTG/X-gal by colony PCR. This research opened the potential of PHB bioplastic production from recombinant genes of microorganisms for synthesizing plastics. Recombinant bacterial strains with PHB synthetic gene create a high capacity and effective potential of research on PHB large scale in new replacable material industry.

Keywords: *Escherichia coli* DH5 α , bioplastic, Poly- β hydroxybutyrate, PHB, *Rhizobium gallicum*.

^{*} Author for correspondence: Tel: 0917577828; Email: luannt@huit.edu.vn