

## NHÂN DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN 28S rRNA CỦA CHỦNG NẤM SÒ SINH TỔNG HỢP CELLULASE

• ThS. Trịnh Đình Khả<sup>(\*)</sup>, Nguyễn Thị Huyền<sup>(\*\*)</sup>

### Tóm tắt

Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả kết quả nhân dòng và phân tích trình tự gen 28S rRNA của chủng nấm sò DKVN01 sinh tổng hợp cellulase. Phân đoạn gen 28S rRNA đã được phân lập bằng phản ứng PCR và nhân dòng vào vector pJET1.2/blunt để đọc trình tự nucleotide. Trình tự phân đoạn gen 28S rRNA của chủng DKVN01 có kích thước 625 bp và có độ tương đồng cao với một số đại diện của chi nấm sò *Pleurotus* (90,5 - 100%). Trong đó, trình tự gen tương đồng cao nhất với loài *Pleurotus ostreatus* (Mã số AB733315). Chủng DKVN01 được đặt tên là *Pleurotus ostreatus* DKVN01. Trình tự phân đoạn gen 28S rRNA của chủng này đã được đăng ký trên Genbank với mã số JX987096.

Từ khóa: cellulase, nhân dòng, gen 28S rRNA, giải trình tự, *Pleurotus ostreatus*.

### 1. Đặt vấn đề

Cellulase là hệ enzyme có khả năng thủy phân liên kết  $\beta$ -1,4-glycoside trong phân tử cellulose tạo thành các polysaccharide mạch ngắn, dextrin và glucose. Do đó, cellulase được ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm, sản xuất thức ăn chăn nuôi, sản xuất bia, bột giấy, ngành công nghiệp chất tẩy rửa, ngành công nghiệp dệt may, nhiên liệu và hóa chất, quản lý chất thải và xử lý ô nhiễm môi trường [1], [2]. Cellulase được sinh tổng hợp bởi các chủng vi khuẩn, vi nấm và nấm mốc [9]. Một trong những công việc cần tiến hành khi nghiên cứu các chủng vi sinh sinh tổng hợp enzyme là phải phân loại chủng vi sinh đó. Hiện nay, để phân loại chủng vi sinh vật người ta có thể dựa vào những đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa và phân loại phân tử. Trong đó, phân loại học phân tử dựa vào trình tự nucleotide của gen mã hóa rRNA đang là một công cụ hữu hiệu trong phân loại và bổ sung cho quá trình phân loại bằng các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa.

Gen 28S rRNA là gen mã hóa đặc trưng cho rRNA của tiểu phần lớn ribosome của các chủng nấm. Gen 28S rRNA có kích thước khoảng 2,9 kb. Trên gen 28S rRNA có các vùng bảo tồn có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử trong phân loại phân tử. Trong đó, vùng trình tự D1, D2 ở phần đầu của gen 28S rRNA có độ bảo tồn cao, do đó trình tự vùng này thường được dùng trong phân

loại phân tử [6]. Cặp môi NL1, NL4 được thiết kế dựa trên trình tự vùng D1, D2 để nhân một phần của gen 28S rRNA đã được nhiều tác giả sử dụng trong nghiên cứu phân loại học phân tử các chủng nấm [3], [4], [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi công bố kết quả nhân dòng và phân tích trình tự vùng D1, D2 của gen 28S rRNA thuộc chủng nấm sò DKVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase tuyển chọn từ bộ sưu tập chủng giống của Phòng thí nghiệm Sinh học - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên.

### 2. Vật liệu và phương pháp

#### 2.1. Vật liệu

##### 2.1.1. Chủng giống

Chủng nấm sò DKVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase được cung cấp từ bộ sưu tập chủng giống của Phòng thí nghiệm Sinh học - Khoa Khoa học Sự sống - Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên. Chủng *E. coli* DH10B được cung cấp bởi hãng Invitrogen (Mỹ).

##### 2.1.2. Hóa chất

Kit nhân dòng pJET1.2/blunt, *Xho*I, *Xba*I, T4 - DNA ligase được mua từ hãng Fermentas, CMC (carboxymethyl cellulose) từ Sigma, Peptone, cao nấm men, agarose từ Bio Basic (Canada).

#### 2.2. Phương pháp

##### 2.2.1. Phương pháp xác định hoạt tính cellulase

Chủng nấm sò (Hình 1A) được lên men trong môi trường PDA dịch thể có bổ sung 1% CMC ở 30°C, lắc 200 vòng/phút trong 4 ngày. Dịch enzyme ngoại bào được thu hồi bằng cách ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở điều kiện 4°C

<sup>(\*)</sup> Nghiên cứu sinh, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên.

<sup>(\*\*)</sup> Cử nhân, Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên.

để xác định hoạt tính. Hoạt tính cellulase được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch agar có bổ sung 0,5% CMC với các thể tích dịch lên men khác nhau 30-50  $\mu$ l. Sau 24h ủ ở 37°C, vòng phân giải cơ chất CMC được xác định bằng phương pháp nhuộm đặc hiệu với dung dịch lugol 1%.

### 2.2.2. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Chủng nấm DKVN01 được nuôi cấy trong môi trường PDA dịch thể sau 3 ngày thu sinh khối tế bào. Sinh khối tế bào nấm được nghiền nhanh trong niro lỏng thành dạng bột mịn. Mẫu được chuyển vào tube 2 ml, bổ sung 1 ml dung dịch phá tế bào (CTAB 2% (w/v); NaCl 1,4 M; 2-mecaptoethanol 0,2% (v/v); EDTA 20 mM; Tris-HCl 100 mM; pH 8,0) và 50  $\mu$ l protease K (200 mg/ml) trong 3 giờ ở 56°C, thỉnh thoảng đảo nhẹ. Sau đó, mẫu được bổ sung 200  $\mu$ l dung dịch 5 M potassium acetate ủ 10 phút trong đá. Sau khi ly tâm 10 phút ở 4°C với 10000 vòng/phút, dịch nổi chứa DNA tiếp tục được chiết bằng chloroform: isoamyl alcohol (24:1) để loại protein và rửa DNA bằng 100% isopropanol. DNA được hòa trong đệm TE, pH 8,0 điện di kiểm tra và bảo quản ở -20°C [5].

### 2.2.3. Phân tích trình tự gen 28S rRNA

Cặp mồi NL1 (5'- GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG - 3') và NL4 (5'- GGT CCG TGT TTC AAG ACG G - 3') [4] được sử dụng để nhân phân đoạn gen 28S rRNA có kích thước khoảng hơn 600 bp của chủng nấm DKVN01. Hỗn hợp phản ứng gồm 1,5  $\mu$ l (50 ng) DNA khuôn; 1  $\mu$ l (10 pmol) mỗi mồi loại; 2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 2  $\mu$ l dNTP 2,5 mM; 0,25  $\mu$ l *Taq* polymerase 5U; 2,5  $\mu$ l đệm PCR 10x; nước cất khử ion đến 25  $\mu$ l. PCR được tiến hành theo chu trình: 95°C/5 phút, 30 chu kỳ (95°C/1 phút, 50°C/1 phút, 72°C/1 phút), 72°C/10 phút.

Sản phẩm PCR được lai vào vector pJET1.2/blunt bằng T4 ligase theo kit của hãng Fermentas. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E.coli* chủng DH10B và chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung ampicillin nuôi cấy ở 37°C qua đêm. DNA plasmid được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [8].

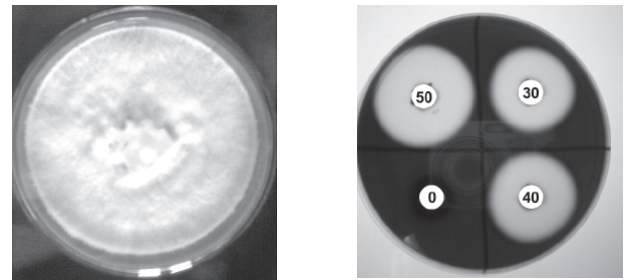
Trình tự gen 28S rRNA được đọc trên hệ thống giải trình tự tự động bởi Công ty Macrogen -

Hàn Quốc. Trình tự nucleotide được xử lý và phân tích bằng phần mềm DNASTAR (Winstconsin, USA) và Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định hệ số tương đồng và dựng cây phân loại.

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen 28S rRNA

Chủng nấm sò DKVN01 đã được khảo sát khả năng sinh tổng hợp cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả cho thấy chủng DKVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase ngoại bào mạnh (Hình 1B).



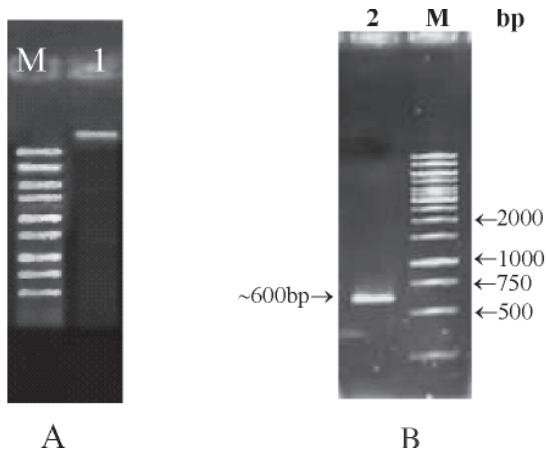
A

B

### Hình 1. Khuẩn lạc chủng nấm sò DKVN01 (A) và hoạt tính cellulase ngoại bào (B)

Chú thích: 0: 50  $\mu$ l dịch môi trường trước khi lên men; 30: 30  $\mu$ l dịch sau lên men; 40: 40  $\mu$ l dịch sau lên men; 50: 50  $\mu$ l dịch sau lên men.

DNA tổng số của chủng nấm DKVN01 được tách chiết theo phương pháp đã mô tả. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy DNA không bị đứt gãy, có thể dùng cho các nghiên cứu về nhân dòng gen (Hình 2A). Sử dụng cặp mồi NL1, NL4 thiết kế dựa trên trình tự vùng bảo thủ D1-D2 của gen 28S rRNA chúng tôi đã nhân được sản phẩm PCR tương đối đặc hiệu có kích thước khoảng 600 bp (Hình 2B). Kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết về kích thước của phân đoạn D1-D2 của gen 28S rRNA và tương đương với những nghiên cứu trước đây về phân đoạn gen này của các chủng nấm *Aspergillus fumigatus*, *Emericella* sp. DTQ-RM1.5 và *Penicillium* sp. DTQ-HK1 [5], chủng *Aspergillus niger* VTCC-F021 [7], chủng *Peniophora* sp. NDVN01 [10].

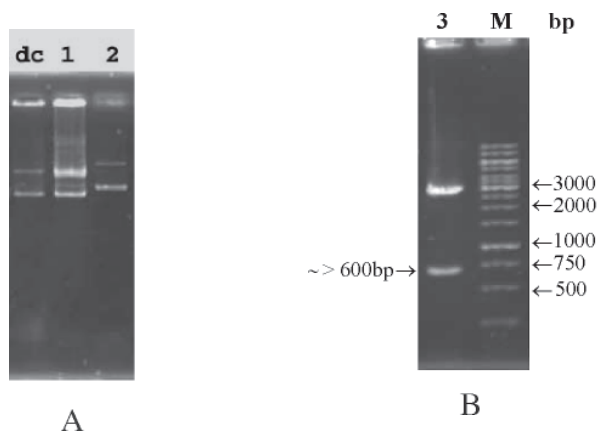


**Hình 2. Hình ảnh điện di DNA tổng số (A) và sản phẩm PCR (B)**

Chú thích: M: Marker 1kb; 1: DNA tổng số; 2: Sản phẩm PCR.

**3.2. Nhân dòng**

Sản phẩm PCR được lai vào vector pJET1.2/blunt và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH10B. Plasmid tái tổ hợp đã được tinh sạch và điện di kiểm tra. Kết quả cho thấy dòng plasmid số 2 cao hơn đối chứng âm (Hình 3A), rất có thể sản phẩm PCR đã được lai vào vector pJET1.2/blunt. Để khẳng định, chúng tôi đã tiến hành cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn *XhoI* và *XbaI*. Kết quả điện di cho thấy có sản phẩm cắt kích thước khoảng 600 bp (Hình 3B) phù hợp với tính toán lý thuyết. Như vậy, sản PCR đã được nhân dòng bằng vector pJET1.2/blunt.



**Hình 3. Hình ảnh điện di plasmid (A) và sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn (B)**

Chú thích: dc: đối chứng pJET1.2/blunt; M: Marker 1kb; 1: plasmid không mang đoạn chèn; 2: plasmid có mang đoạn chèn; 3: sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme *XhoI* và *XbaI*.

**3.3. Phân tích trình tự**

Sản phẩm plasmid tái tổ hợp mang phân đoạn chèn đã được đọc trình tự bởi hãng Macrogen - Hàn Quốc. Kết quả đọc trình tự cho thấy phân đoạn gen 28S rRNA của chủng DKVN01 có kích thước 625 bp (Hình 4).

```

gcatatcaat aagcggagga aaagaacta acaaggattc cccctagtaac tgcgagtgaa 60
gggggaaaag ctcaaattta aaatctgggt gtccttggcc atccgagttg taatctagag 120
aagtgttacc cgcgctggac cgtgtacaag tcccctggaa tggggcgtca tagagggtga 180
gaatcccgct tttgacacgg actaccaggg ctttgtgatg cactctcaaa gactcgagtt 240
gtttgggaat gcagctcaaa atgggtggtg aattccatct aaagctaaat attggcgaga 300
gaccgatagc gaacaagtac cgtgagggaa agatgaaaag aactttggaa agagagttaa 360
acagtacgtg aaattgttga aagggaaacg cttgaagta ctcgctctg ccagggatca 420
accttacttt tgtgagcgtt acttctcgtt tgatgggtca gcatcagttt tggctgctgg 480
ataaaggtca gagaatgtg gcacctcgg gtgtgttata gtccttgatc agatacagtg 540
gctgggaact aggaactcag cccgcaagg ctgtcttagg atgtgggcaa aatggcttta 600
atcgaccgct cttgaaacac ggacc
    
```

**Hình 4. Trình tự nucleotide phân đoạn gen 28S rRNA của chủng DKVN01**

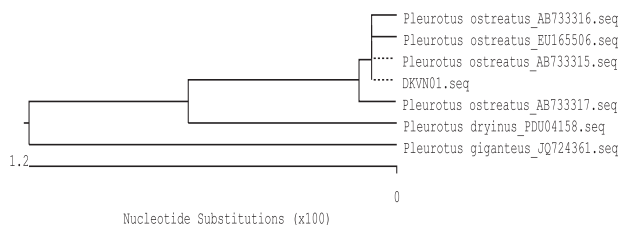
Phân đoạn gen 28S rRNA của chủng nấm sò DKVN01 có 179 nucleotide loại A (28,64%), 178 nucleotide loại G (28,48%), 151 nucleotide loại T (24,16%) và 117 nucleotide loại C (18,72%). Số nucleotide loại A và T chiếm 52,8%, số nucleotide loại G và C chiếm 47,2%. Tỷ lệ (A+T/G+C) bằng 1,12. Sử dụng phần mềm Blast so sánh với các trình tự gen đã công bố trên Genbank, chúng tôi nhận thấy trình tự phân đoạn gen 28S rRNA của chủng DKVN01 có độ tương đồng cao với một số loài thuộc chi nấm sò *Pleurotus*. Sử dụng phần mềm DNASTAR, chúng tôi đã tính được hệ số tương đồng di truyền của chủng DKVN01 với một số chủng thuộc chi *Pleurotus* đã công bố (Bảng 1).

Kết quả Bảng 1 cho thấy, hệ số tương đồng di truyền về trình tự gen 28S rRNA của chủng DKVN01 tương đồng 100% với chủng *Pleurotus ostreatus* (mã số trên Genbank: AB733315); tương đồng 99,9% với một số chủng *Pleurotus ostreatus* đã công bố (mã số trên Genbank AB733316; AB733317; EU165506). Do đó, chủng DKVN01 đã được đặt tên là *Pleurotus ostreatus* DKVN01 và trình tự phân đoạn gen 28S rRNA đã được đăng ký trên Genbank với mã số JX987096.

**Bảng 1. Hệ số tương đồng di truyền của chủng DKVN01 với các chủng đã công bố**

		Percent Identity							
	1	2	3	4	5	6	7		
1	█	95.7	90.5	100.0	99.9	99.9	99.9	1	DKVN01.seq
2	1.3	█	86.2	95.7	95.5	95.5	95.7	2	<i>Pleurotus dryinus</i> _PDU04158.seq
3	2.6	2.2	█	90.5	90.3	90.6	90.5	3	<i>Pleurotus giganteus</i> _JQ724361.seq
4	0.0	1.3	2.6	█	99.9	99.9	99.9	4	<i>Pleurotus ostreatus</i> _AB733315.seq
5	0.2	1.5	2.8	0.2	█	99.7	99.7	5	<i>Pleurotus ostreatus</i> _AB733316.seq
6	0.2	1.5	2.4	0.2	0.3	█	99.7	6	<i>Pleurotus ostreatus</i> _AB733317.seq
7	0.0	1.3	2.6	0.0	0.2	0.2	█	7	<i>Pleurotus ostreatus</i> _EU165506.seq
	1	2	3	4	5	6	7		

Sử dụng phần mềm DNASTAR, chúng tôi đã dựng được cây phân loại của chủng DKVN01 với một số chủng thuộc chi *Pleurotus* (Hình 5).



**Hình 5. Cây phân loại chủng nấm DKVN01**

#### 4. Kết luận

Đã nhân dòng và phân tích trình tự gen 28 rRNA của chủng nấm sò DKVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase mạnh tuyển chọn ở Việt Nam. Phân đoạn gen 28S rRNA của chủng DKVN01 có kích thước 625 bp. Trình tự nucleotide tương đồng 90,5-100% với một số chủng thuộc chi nấm *Pleurotus*. Chủng DKVN01 đã được đặt tên là *Pleurotus ostreatus* DKVN01 và trình tự nucleotide gen 28S rRNA đã được đăng ký trên Genbank với mã số JX987096./.

#### Tài liệu tham khảo

- [1]. Bhat M. K. (2000), "Cellulase and related enzymes in biotechnology", *Biotechnol. Adv.*, (18), p. 355-383.
- [2]. Du rre P. (1998), "New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (49), p. 639-648.
- [3]. Hennequin C., Abachin E., Symoens F., Lavarde V., Reboux G., Nolard N., Berche P. (1999), "Identification of Fusarium species involved in Human infections by 28S rRNA gene sequencing", *J. Clin. Microbiol.*, (37), p. 3586-3589.
- [4]. Hinrikson H. P., Hurst S. F., Lott T. J., Warnock D. W., Morrison C. J. (2005), "Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important Aspergillus species", *J. Clin. Microbiol.*, (45), p. 2092-2103.
- [5]. Trịnh Đình Khá, Quyền Đình Thi, Nguyễn Sỹ Lê Thanh (2007), "Tuyển chọn và nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, (5), tr. 355-362.
- [6]. Prasanna D. K., Daisy L. K., David N. F. (2009), "Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad-range fungal PCR assays", *Appl. Environ. Microbiol.*, (75), p. 1559-1565.
- [7]. Pham T. H., Quyen D. T., Nghiem N. M. (2010), "Optimization of endoglucanase production by *Aspergillus niger* VTCC-F021", *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, (6), p. 4151-5157.
- [8]. Sambrook J., Russell D. W. (2001), *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [9]. Saranraj P., Stella D., Reetha D. (2012), "Microbial cellulases and its applications: a review", *International Journal of Biochemistry & Biotech Science*, (1), p. 1-12.
- [10]. Trinh D. K., Quyen D. T., Do T. T., Nguyen T. T. H., Nghiem N. M. (2013), "Optimization of culture conditions and medium components for carboxymethyl cellulase (CMCase) production by a novel basidiomycete strain *Peniophora* sp. NDVN01", *Iranian J. Biotech.*, (11), p. 251-259.

#### CLONING AND ANALYZING THE 28S rRNA GENE SEQUENCE OF A CELLULASE-PRODUCING MUSHROOM STRAIN

##### Summary

In this study, we described the results of cloning and analyzing the 28S rRNA gene sequence of a cellulase-producing mushroom strain. The 28S rRNA gene segment was isolated by PCR reaction and cloned into the vector pJET1.2/blunt for nucleotide sequencing. The results showed that the analyzed 28S rRNA gene sequence of the DKVN01 strain is 625 bp and highly homologous to some representatives of the basidiomycetes genus *Pleurotus* (90.5-100%). Among them, it has the highest homology with that of *Pleurotus ostreatus* strain (coded AB733315). The DKVN01 is named *Pleurotus ostreatus* DKVN01, whose sequence of segmenting the 28S rRNA gene has been deposited in GenBank, coded JX987096.

Key word: cellulase, cloning, gene 28S rRNA, *Pleurotus ostreatus* DKVN01, sequencing.