

SÀNG LỌC VÀ NHÂN DÒNG GEN MÃ HÓA PECTATE LYASE TỪ *Bacillus subtilis* CÓ NGUỒN GỐC VIỆT NAM

Đỗ Thị Thu Hằng, Võ Hoài Bắc*, Lê Văn Trường

Viện Công nghệ sinh học, *vh_bac@yahoo.com

TÓM TẮT: Pectate lyase (PL) là enzyme quan trọng trong bệnh thực vật do vi sinh vật tiết ra. PL phân hủy polygalacturonate của thành tế bào thực vật tạo ra các oligogalacturonate. Trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả sàng lọc được 9 chủng *Bacillus subtilis* nguồn gốc Việt Nam có khả năng sản xuất pectate lyase cao. pH tối ưu phản ứng phân hủy polygalacturonate của các enzyme này từ 8,5-10. Gen mã hóa pectate lyase (*pel*) của bốn chủng *B. subtilis* khác nhau đã được cloning trong *E. coli* và giải trình tự gen. Pectate lyase của 4 chủng vi khuẩn này có 420 amino acid (aa). Trình tự amino acid suy diễn của các enzyme này có độ tương đồng từ 98,8-99,8% so với trình tự amino acid của pectate lyase từ chủng *B. subtilis* 168. Có 10 vị trí amino acid bị thay đổi trong trình tự aa của 4 pectate lyase khi so sánh giữa chúng với nhau. Trình tự aa của PL từ các chủng phân lập từ thực vật bảo thủ hơn các chủng phân lập từ đất khi so sánh chúng với PL của *B. subtilis* 168.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, endopolygalacturonate lyase, nhân dòng gen, pectate lyase, pectin acid.

MỞ ĐẦU

Pectate lyase (PL) hay endopolygalacturonate lyase (EC 4.2.2.2) là enzyme quan trọng trong bệnh thực vật do vi sinh vật gây ra [2]. Enzyme này phân cắt ngẫu nhiên liên kết α -1,4 glycosidic của polygalacturonate trong thành tế bào thực vật thông qua phản ứng β -elimination tạo ra các oligogalacturonate có liên kết đôi giữa C4 và C5 ở đầu đường không khử [2]. PL thường thấy trong các vi sinh vật gây bệnh thực vật như vi khuẩn *E. chrisanthemi* [9], *E. carotovo* [10], *B. subtilis* [14], nấm mốc [8]. Gần đây, PL cũng đã được tìm thấy trong vi khuẩn ưa lạnh *P. haloplanktis* phân lập từ biển Nam cực [20]. Pectate lyase xúc tác phản ứng phân cắt cơ chất pectin và pectin acid (polygalacturonate) ở pH tối ưu trong khoảng 8-10 [22]. PL có ứng dụng quan trọng trong công nghiệp dệt là loại bỏ pectin trong vải bông thô, để thay thế chất kiềm trong khâu nấu kiềm (alkaline scouring), làm tăng chất lượng của vải bông và giảm thiểu ô nhiễm môi trường do chất kiềm gây ra [6, 4, 15, 11, 18].

Pectate lyase từ *B. subtilis* đã được Nasser et al. (1990, 1993) [13, 14] nghiên cứu từ những năm 90 của thế kỷ trước, tuy nhiên, hiện nay chưa có công trình nào nghiên cứu, giải mã trình tự gen của gen mã hóa enzyme này từ các chủng *B. subtilis* phân lập ở Việt Nam. Trong bài báo này, chúng tôi công bố nghiên cứu về

sàng lọc các chủng *B. subtilis* sinh pectate lyase phân lập từ Việt Nam từ các bộ sưu tập chủng giống trong nước, kết quả nhân dòng và giải trình tự các gen này, đồng thời so sánh trình tự amino acid của chúng với các gen cùng loại đã biết trên ngân hàng gen để góp phần hiểu biết thêm về tính đa dạng của enzyme này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng vi sinh vật, môi trường nuôi cấy

Hai mươi chủng *Bacillus subtilis* nguồn gốc Việt Nam từ bộ sưu tập chủng giống của ngân hàng chủng giống VTCC, Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội và Trung tâm Công nghệ sinh học Biolab được sử dụng để sàng lọc enzyme pectinase. *E. coli* DH5a được sử dụng làm chủng nhân dòng gen. Môi trường LB (1% tryptone, 0,5% yeast extract, 1% NaCl) được sử dụng làm môi trường nuôi cấy *B. subtilis* và *E. coli*. Kháng sinh ampicilin được bổ sung vào môi trường nồng độ 100 μ g/ml khi cần thiết. Môi trường LB 0,2% pectin hoặc môi trường khoáng chất Belistky [19] được sử dụng để nuôi cấy *B. subtilis* cho mục đích thu PL.

Primer, vector

Primer sử dụng trong thí nghiệm có trình tự như sau: BSpelF: atcg aag cttatg aaa aaa gtg atg tta gc; BSpelR: atcg aag ctt tac tgc tga ctg tt.

Plasmid pJET1.2 sử dụng trong thí nghiệm nhân dòng được mua từ hãng Fermentas.

Phương pháp

Sàng lọc các chủng B. subtilis có hoạt tính enzyme pectinase trên môi trường thạch đĩa

Các chủng *B. subtilis* trong bộ sưu tập chủng giống được trẻ hóa trên môi trường LB thạch đĩa qua đêm sau đó cấy vạch sang môi trường LB thạch đĩa bổ sung cơ chất pectin 0,2%, nuôi qua đêm trong tủ ấm 37°C. Các đĩa nuôi cấy sau đó được nhuộm với dung dịch 0,5% Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (HTAB) (Sigma) để phát hiện vòng thủy phân pectin như mô tả của Truong et al. (2001) [20]. Sau khi nhuộm với HTAB trong 1 h, các khuẩn lạc của các chủng sinh pectinase sẽ xuất hiện vòng thủy phân với cơ chất pectin trên đĩa thạch.

Thu nhận enzyme pectinase ngoại bào

Các chủng *B. subtilis* được trẻ hóa trên môi trường LB lỏng ở 37°C, 200 vòng/phút qua đêm, sau đó cấy chuyển 1% sang môi trường LB lỏng hoặc môi trường khoáng chất Belistky có bổ sung 0,2% cơ chất pectin để kích thích sự sản sinh pectinase. Sau 24h nuôi cấy ở cùng điều kiện, dịch enzyme ngoại bào được thu bằng ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để loại tế bào, dịch nổi chứa enzyme ngoại bào được thu nhận và bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xác định hoạt tính pectinase bằng phương pháp đường khử

Hoạt tính pectinase được xác định bằng phương pháp đường khử như mô tả của Bernfeld (1955) [1]. 50 µl dịch enzyme ngoại bào được bổ sung vào 450 µl dung dịch phản ứng chứa 0,2% pectin từ citrus (Sigma) trong đệm Tris 50 mM, NaCl 20 mM và CaCl₂ 0,1 mM pH 10. Phản ứng được thực hiện ở 42°C trong 1 giờ. Phản ứng enzyme được kết thúc bằng việc bổ sung 500 µl 3,5 dinitrosalicylic acid (DNSA), đun sôi 10 phút, sau đó dung dịch phản ứng được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Li tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút trước khi đo ở bước sóng 530 nm trên máy đo quang phổ. Một đơn vị hoạt tính enzyme (unit) được định nghĩa là lượng enzyme pectinase phân cắt cơ chất pectin tạo ra 1 µM glucose trong 1 phút.

Xác định hoạt tính pectate lyase bằng phương pháp phát hiện liên kết đôi

Hoạt tính pectate lyase được xác định thông qua việc phát hiện liên kết đôi được tạo thành sau phản ứng của enzyme với cơ chất pectin acid. Phương pháp được cải tiến từ phương pháp của Collmer (1988) [5]: 50 µl dịch enzyme ngoại bào lên men từ môi trường khoáng được bổ sung vào 450 µl dung dịch phản ứng chứa 0,2% pectin acid 98% demethylation (Sigma) trong đệm Tris 50 mM, NaCl 20 mM và CaCl₂ 0,1 mM pH 10. Phản ứng được thực hiện ở 42°C trong 1 giờ. Phản ứng được kết thúc bằng việc bổ sung 500 µl HCl 200 mM, li tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút trước khi đo trên máy quang phổ ở bước sóng 232 nm. Đối chứng âm được sử dụng bằng nước cất thay cho dịch enzyme.

Các phương pháp sử dụng trong thao tác với DNA

Phương pháp biến nạp plasmid vào *E. coli*, tách chiết plasmid từ tế bào *E. coli* bằng li giải với NaOH và SDS, tách chiết DNA genome từ *Bacillus* và phương pháp điện di DNA trên agarose theo mô tả của Sambrook (1989) [16].

Phương pháp nhân gen bằng PCR

Gen *pel* được nhân lên bằng PCR sử dụng Taq Polymerase của hãng Fermentas. Chu trình phản ứng: Biến tính: 94°C trong 2 phút, biến tính: 94°C trong 30 giây, gắn mồi: 55°C trong 30 giây, kéo dài: 72°C trong 1,5 phút, lặp lại 30 chu kỳ từ bước 2, kéo dài: 72°C trong 10 phút, kết thúc: 4°C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sàng lọc các chủng *B. subtilis* sản sinh pectinase

Để chọn được các chủng *B. subtilis* mang gen pectinase, các vi khuẩn *B. subtilis* được mua từ bộ sưu tập chủng giống của Trung tâm Công nghệ sinh học Biolab và Bảo tàng giống chuẩn Việt Nam (VTCC) được sử dụng. Thông tin các chủng *Bacillus* này thể hiện trong bảng 1. Các chủng vi khuẩn được trẻ hóa sau đó cấy vạch trên môi trường thạch đĩa 0,2% pectin như mô tả trong phần phương pháp. Sau khi nhuộm với HTAB, 17 chủng đã xuất hiện vòng thủy phân pectin trên đĩa thạch trong tổng số 20

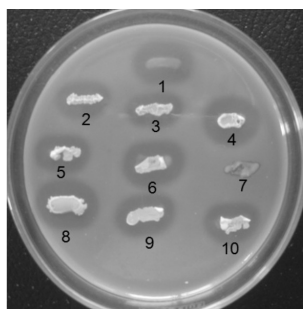
chủng vi khuẩn được sử dụng, chỉ 3 chủng là không có vòng thủy phân (bảng 1 và hình 1). Điều này chứng tỏ hầu hết các chủng *B. subtilis* trong bộ sưu tập này đều có khả năng sinh enzyme pectinase. Kết quả này hoàn toàn phù

hợp với đặc điểm của loài vi khuẩn này và phù hợp với các nghiên cứu trước đây về vi khuẩn thuộc loài *B. subtilis* của Nasser et al. (1990), Nasser et al. (1993), Soriano et al. (2006) [13, 14, 17].

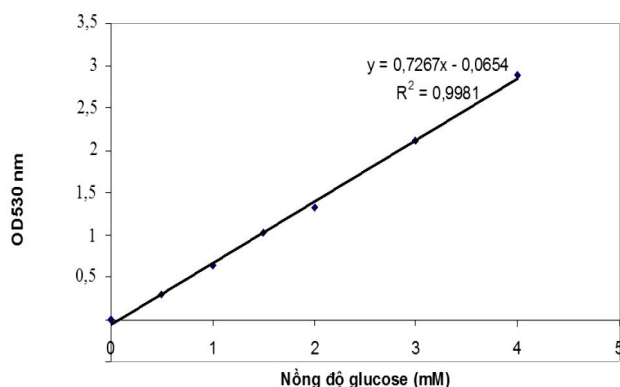
Bảng 1. Kết quả sàng lọc các chủng *B. subtilis* có khả năng phân hủy pectin trên đĩa thạch

STT	Tên chủng	Nguồn	Vòng thủy phân	STT	Tên chủng	Nguồn	Vòng thủy phân
1	VBS1	Đất	-	11	VBS11	Đất	++
2	VBS2	Đất	+	12	VBS12	Đất	-
3	VBS3	Đất	+	13	VBS13	Rong sụn	++
4	VBS4	Đất	+	14	VBS14	Đất	++
5	VBS5	Đất	+	15	VBS15	Đất	++
6	VBS6	Đất	++	16	VBS16	Đất	+
7	VBS7	Đất	++	17	VBS17	Đất	-
8	VBS8	Rễ cây	++	18	VBS18	Đất	+
9	VBS9	Đất	++	19	VBS19	Đất	+
10	VBS10	Đất	++	20	VBS20	Đất	+

Tạo vòng thủy phân với cơ chất pectin ở mức độ bình thường (+), mức độ mạnh (++) và không tạo vòng thủy phân (-).



Hình 1. Hình ảnh một số chủng *B. subtilis* tạo vòng thủy phân pectin trên đĩa thạch LB 0,2% pectin. Thứ tự các chủng từ 1-10: VBS6 - VBS15



Hình 2. Đồ thị đường chuẩn glucose

Ảnh hưởng của pH đến khả năng phân hủy pectin của pectinase từ các chủng nghiên cứu

Pectate lyase thuộc nhóm enzyme pectinase phân hủy pectin ở pH tối ưu từ 8-10 [22], vì vậy, các enzyme pectinase hoạt động tối ưu ở pH kiềm nhiều khả năng sẽ là pectate lyase. Trong thí nghiệm này, 9 trong 17 chủng vi khuẩn có hoạt tính mạnh với pectin trên đĩa thạch được chọn để nghiên cứu (bảng 2).

Các vi khuẩn trên được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng có bổ sung 0,2% pectin để kích thích sự tiết pectinase ngoại bào. Sau khi nuôi cấy 24 giờ ở 37°C, enzyme ngoại bào được thu

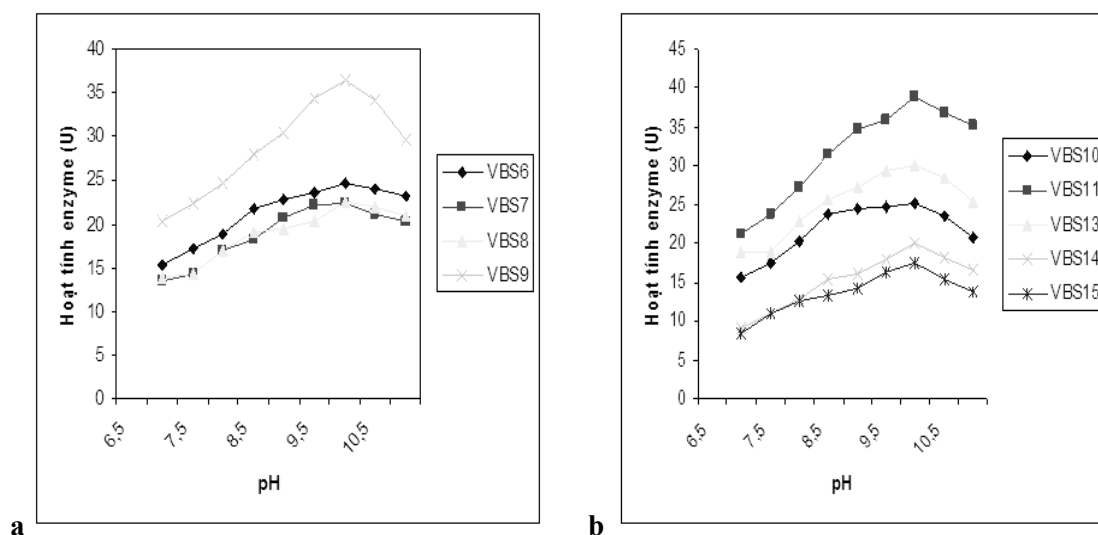
nhận và sử dụng để làm phản ứng với cơ chất pectin. Để định lượng hoạt tính pectinase, phương pháp đường khử được sử dụng. Giá trị OD 530 nm thu được sau phản ứng enzyme được chuyển đổi sang đơn vị unit dựa theo đồ thị chuẩn glucose với phương trình hồi qui $y = 0,7267x - 0,0654$, và $r = 0,9981$ (hình 2).

Kết quả trên hình 3 và bảng 2 cho thấy, hai chủng VBS7 và VBS10 có hoạt tính pectinase tối ưu lần lượt là pH 9,5-10 và pH 8,5-10 và 7 chủng còn lại có hoạt tính pectinase tối ưu ở pH 10. Như vậy, tất cả 9 chủng *B. subtilis* được lựa chọn nuôi cấy trên môi trường LB lỏng bổ sung

0,2% pectin đều có khả năng sinh enzyme pectinase kiềm.

So sánh hoạt tính pectinase của các chủng nghiên cứu ở pH tối ưu cho thấy, hoạt tính pectinase được xác định thấp nhất là chủng VBS15 (17,5 unit), cao nhất là chủng VBS11 (38,9 unit) (hình 3). Điều này có thể giải thích

rằng, các chủng *B. subtilis* tuy cùng loài nhưng phân lập từ các nguồn khác nhau cho nên sẽ có sự sai khác nhất định về gen dẫn đến ái lực với pectin của các enzyme này sẽ khác nhau. Mặt khác, khả năng bài tiết enzyme của các chủng khác nhau thường không giống nhau, do đó, hoạt tính pectinase từ dịch ngoại bào mạnh yếu khác nhau.



Hình 3. Đồ thị ảnh hưởng của pH tới hoạt tính pectinase ngoại bào của các chủng VBS6-VBS9 (a) và các chủng VBS10-VBS15 (b)

Bảng 2. Hoạt tính pectinase của các chủng nghiên cứu ở pH tối ưu

STT	Tên chủng	pH tối ưu	Hoạt tính pectinase (U)
1	VBS6	10	24,7
2	VBS7	9,5 - 10	22,3
3	VBS8	10	22,5
4	VBS9	10	36,5
5	VBS10	8,5 - 10	25,5
6	VBS11	10	38,9
7	VBS13	10	30,1
8	VBS14	10	20,1
9	VBS15	10	17,5

Hoạt tính pectate lyase của các enzyme thu được

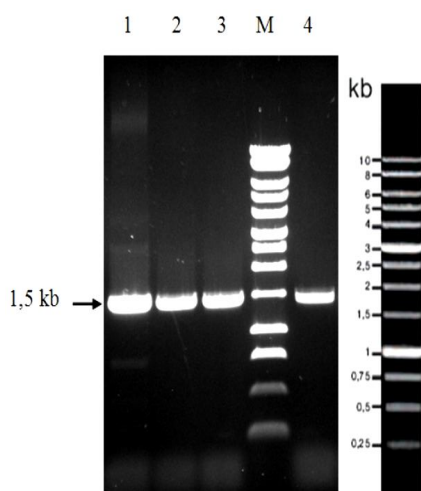
Pectate lyase phân cắt cơ chất pectin acid theo cơ chế chuyển liên kết β -elimination, sản phẩm tạo thành một liên kết đôi trong phân tử đường galacturonate. Liên kết đôi này dễ dàng được phát hiện bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 232 nm như mô tả của Macmillian et al. (1966) [12]. Để khẳng định các chủng *Bacillus* trên có sinh PL hay không, dịch enzyme ngoại bào

của các chủng *B. subtilis* được nuôi cấy trên môi trường khoáng chất Belisky được sử dụng để làm phản ứng enzyme với cơ chất pectin acid 90% demethylation (Sigma), là cơ chất đặc trưng cho nhóm enzyme PL. Sau khi kết thúc phản ứng, hoạt tính enzyme được đánh giá bằng đo trực tiếp trên máy đo quang phổ ở bước sóng 232 nm. Kết quả cho thấy, tất cả các chủng nghiên cứu đều cho giá trị OD 232 nm từ 0,24-0,71, khá cao so với mẫu

đôi chứng âm (0,005). Điều này chứng tỏ enzyme pectinase của các chủng này đều có khả năng phân cắt pectin acid tạo ra liên kết đôi trong sản phẩm phản ứng (bảng 3), do đó, có thể kết luận rằng các enzyme của 9 chủng nghiên cứu này đều thuộc nhóm pectate lyase. Bốn chủng VBS6, VBS8, VBS11 và VBS13 cho hoạt tính cao nhất (giá trị OD từ 0,51-0,71) (bảng 3).

Bảng 3. Hoạt tính pectate lyase của các enzyme thu được

STT	Tên chủng	OD 232 nm
1	VBS6	0,514
2	VBS7	0,322
3	VBS8	0,710
4	VBS9	0,296
5	VBS10	0,412
6	VBS11	0,670
7	VBS13	0,503
8	VBS14	0,24
9	VBS15	0,411
10	ĐC âm	0,005



Hình 4. Sản phẩm nhân gen *pel* từ các chủng *B. subtilis*

1-4: VBS6, VBS8, VBS11 và VBS13; M: DNA marker. Băng DNA 1,5 kb được chỉ bằng mũi tên, thang DNA chuẩn đặt cạnh ảnh điện di.

Nhân dòng gen mã hóa pectate lyase

Nhân gen pel từ các chủng *B. subtilis* bằng PCR

Bốn chủng VBS6, VBS8, VBS11 và VBS13 được lựa chọn để nhân dòng các gen *pel* vào *E. coli*. DNA tổng số của các chủng này

được tách chiết và sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng nhân gen, với cặp mồi đặc hiệu BspelF và BspelR được thiết kế dựa theo trình tự *pel* của chủng *B. subtilis* BS168 [14]. Sau khi kết thúc phản ứng nhân gen, sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8%, trong đệm TAE 1X. Kết quả trên điện di đồ cho thấy, cả 4 mẫu DNA được sử dụng làm khuôn mẫu đều đã khuếch đại một đoạn gen khoảng 1,5 kb đúng như kích thước của gen pectate lyase đã được tính toán từ trước (hình 4).

Các băng DNA 1,5 kb này được cắt ra, làm sạch, gắn vào vector pJET1.2 bằng T4 ligase sau đó biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường chọn lọc được tách chiết plasmid và phân tích bằng XhoI và XbaI để kiểm tra gen chèn trong vector. Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid trên gel agarose cho thấy, hầu hết các mẫu plasmid đều mang đoạn gen chèn khoảng 1,5 kb (kết quả không trình bày). Điều này chứng tỏ các gen *pel* đã được gắn vào vector và nhân lên trong *E. coli*.

Giải trình tự gen *pel*

Bốn dòng plasmid mang fragment kích thước 1,5 kb của 4 gen *pel* khác nhau trên được sử dụng để giải trình tự gen trên máy giải trình tự gen tự động. Kết quả thu được 4 trình tự nucleotide có độ dài như nhau, mã hóa cho một protein 420 amino acid. Trình tự nucleotide của 4 gen *pel* từ chủng VBS6, VBS8, VBS11 và VBS13 đã được đăng trên Genbank với mã số theo thứ tự là JX083068, JX083069, JX083070 và JX083071. So sánh trình tự amino acid (aa) suy diễn của 4 gen trên bằng phần mềm so sánh BLAST trên NCBI cho thấy chúng có độ tương đồng với các trình tự aa của PL từ *B. subtilis* 168 lần lượt là 98,8; 99,7; 99,0 và 99,5%. Điều này chứng tỏ rằng 4 gen *pel* được nhân dòng từ 4 chủng vi khuẩn VBS6, VBS8, VBS11 và VBS13 đều là gen mã hóa cho pectate lyase.

Sự đa dạng của các pectate lyase phân lập từ *B. subtilis* nguồn gốc Việt Nam

Với mục đích đánh giá sự đa dạng của các pectate lyase phân lập từ Việt Nam, trình tự aa của PL từ *B. subtilis* 168 được sử dụng để so sánh theo hàng cùng với 4 PL này. Phần mềm so sánh cụm ClustalW được sử dụng. Kết quả cho thấy, có 9 vị trí aa khác nhau khi so sánh

giữa 5 trình tự aa này với nhau (hình 5). Khi so sánh riêng rẽ trình tự aa của 4 PL phân lập với PL từ *B. subtilis* 168 cho thấy các PL này có sự khác nhau nhất định, cụ thể: PL của VBS6 có 5 aa (L-162, H-181, A-248, M-249, Q-294), VBS8 có 1 aa (Q-294), VBS11 có 4 aa (K-118, T-140, Q-294, P-356) và VBS13 có 2 aa (D-69, A-376) sai khác so với PL của *B. subtilis* 168 (hình 5). Điều thú vị là PL từ VBS6 và VBS11 phân lập từ đất có số lượng aa khác biệt (5 và

4 aa) nhiều hơn PL từ VBS8 (1 aa) phân lập từ rễ cây và VBS13 (2 aa) phân lập từ rong sụn. Như vậy, dường như các chủng phân lập từ thực vật có trình tự aa của PL ít thay đổi hơn so với các chủng phân lập từ đất. *B. subtilis* 168 cũng là chủng có nguồn gốc từ chủng *B. subtilis* ATCC 6051 được phân lập từ một loại cỏ vào năm 1875 [21]. *B. subtilis* 168 là chủng được gây đột biến dị dưỡng từ chủng *B. subtilis* ATCC 6051 tryptophan [3, 7].

VBS13	MKKVMLATALFLGLTPAGANAADLGHQTLGSDNDGWGAYSTGTTGGSKASSSNVYTVSNRN	60
BS-168	MKKVMLATALFLGLTPAGANAADLGHQTLGSDNDGWGAYSTGTTGGSKASSSNVYTVSNRN	60
VBS11	MKKVMLATALFLGLTPAGANAADLGHQTLGSDNDGWGAYSTGTTGGSKASSSNVYTVSNRN	60
VBS8	MKKVMLATALFLGLTPAGANAADLGHQTLGSDNDGWGAYSTGTTGGSKASSSNVYTVSNRN	60
VBS6	MKKVMLATALFLGLTPAGANAADLGHQTLGSDNDGWGAYSTGTTGGSKASSSNVYTVSNRN	60
VBS13	QLVSALGKEDTNTTPKIIYIKGTIDMNVDDNLKPLGLNDYKDPEYDLDKYLKAYDPSTW	120
BS-168	QLVSALGKEDTNTTPKIIYIKGTIDMNVDDNLKPLGLNDYKDPEYDLDKYLKAYDPSTW	120
VBS11	QLVSALGKEDTNTTPKIIYIKGTIDMNVDDNLKPLGLNDYKDPEYDLDKYLKAYDPSTW	120
VBS8	QLVSALGKEDTNTTPKIIYIKGTIDMNVDDNLKPLGLNDYKDPEYDLDKYLKAYDPSTW	120
VBS6	QLVSALGKEDTNTTPKIIYIKGTIDMNVDDNLKPLGLNDYKDPEYDLDKYLKAYDPSTW	120
VBS13	KEPSGTQEEARARSQKNQKARVMVDIPANTTIVGSGTNAKVVGGNFQIKSDNVIIRNIEF	180
BS-168	KEPSGTQEEARARSQKNQKARVMVDIPANTTIVGSGTNAKVVGGNFQIKSDNVIIRNIEF	180
VBS11	KEPSGTQEEARARSQKNQKARVMVDIPANTTIVGSGTNAKVVGGNFQIKSDNVIIRNIEF	180
VBS8	KEPSGTQEEARARSQKNQKARVMVDIPANTTIVGSGTNAKVVGGNFQIKSDNVIIRNIEF	180
VBS6	KEPSGTQEEARARSQKNQKARVMVDIPANTTIVGSGTNAKVVGGNFQIKSDNVIIRNIEF	180
VBS13	DAYDYFPQWDPTDGSSGNWNSQYDNIITINGGTHIWIDHCTFNDGSRPDSTSPKYYGRKY	240
BS-168	DAYDYFPQWDPTDGSSGNWNSQYDNIITINGGTHIWIDHCTFNDGSRPDSTSPKYYGRKY	240
VBS11	DAYDYFPQWDPTDGSSGNWNSQYDNIITINGGTHIWIDHCTFNDGSRPDSTSPKYYGRKY	240
VBS8	DAYDYFPQWDPTDGSSGNWNSQYDNIITINGGTHIWIDHCTFNDGSRPDSTSPKYYGRKY	240
VBS6	DAYDYFPQWDPTDGSSGNWNSQYDNIITINGGTHIWIDHCTFNDGSRPDSTSPKYYGRKY	240
VBS13	QHHDGQTDASNGANYITMSYNYHDHDKSSIFGSSDSKTSDDGKLIKITLHHNRYQNIQVQR	300
BS-168	QHHDGQTDASNGANYITMSYNYHDHDKSSIFGSSDSKTSDDGKLIKITLHHNRYQNIQVQR	300
VBS11	QHHDGQTDASNGANYITMSYNYHDHDKSSIFGSSDSKTSDDGKLIKITLHHNRYQNIQVQR	300
VBS8	QHHDGQTDASNGANYITMSYNYHDHDKSSIFGSSDSKTSDDGKLIKITLHHNRYQNIQVQR	300
VBS6	QHHDGQTDASNGANYITMSYNYHDHDKSSIFGSSDSKTSDDGKLIKITLHHNRYQNIQVQR	300
VBS13	APRVRFQVHVYNNYEGSTSSSSYPFSYAWGIGKSSKIYAQNNVIDVPLSAAKTIISVF	360
BS-168	APRVRFQVHVYNNYEGSTSSSSYPFSYAWGIGKSSKIYAQNNVIDVPLSAAKTIISVF	360
VBS11	APRVRFQVHVYNNYEGSTSSSSYPFSYAWGIGKSSKIYAQNNVIDVPLSAAKTIISVF	360
VBS8	APRVRFQVHVYNNYEGSTSSSSYPFSYAWGIGKSSKIYAQNNVIDVPLSAAKTIISVF	360
VBS6	APRVRFQVHVYNNYEGSTSSSSYPFSYAWGIGKSSKIYAQNNVIDVPLSAAKTIISVF	360
VBS13	SGGTALYDSGTLNQTQINASAANGLSSSVGWTPSLHGSIDASANVKSNNVQAGAGKLN	420
BS-168	SGGTALYDSGTLNQTQINASAANGLSSSVGWTPSLHGSIDASANVKSNNVQAGAGKLN	420
VBS11	SGGTALYDSGTLNQTQINASAANGLSSSVGWTPSLHGSIDASANVKSNNVQAGAGKLN	420
VBS8	SGGTALYDSGTLNQTQINASAANGLSSSVGWTPSLHGSIDASANVKSNNVQAGAGKLN	420
VBS6	SGGTALYDSGTLNQTQINASAANGLSSSVGWTPSLHGSIDASANVKSNNVQAGAGKLN	420

Hình 5. So sánh theo hàng trình tự amino acid của PL từ 4 chủng *B. subtilis* phân lập ở Việt Nam với PL từ *B. subtilis* 168. Các amino acid không tương đồng được đánh dấu bằng bôi đen.

KẾT LUẬN

Đã sàng lọc được 9 chủng *B. subtilis* sinh pectinase ưa kiềm nguồn gốc Việt Nam. Các chủng này đều có hoạt tính enzyme pectate lyase.

Đã nhân dòng và giải mã trình tự gen mã hóa enzyme pectate lyase từ bốn chủng VBS6, VBS8, VBS11 và VBS13 có nguồn gốc Việt Nam. Trình tự aa của PL từ các chủng phân lập

từ thực vật bảo thủ hơn các chủng phân lập từ đất khi so sánh chúng với PL của *B. subtilis* 168.

Lời cảm ơn: Công trình được tài trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học công nghệ tiềm năng thuộc chương trình “Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học” của Bộ Khoa học và Công nghệ. Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng trang thiết bị của phòng Thí nghiệm trọng điểm về công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bernfeld P., 1955. Amylases a and b. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in enzymology*. Academic, New York., 149-155.
- Birch G. G., Blakebrough. N and Parker J. K., 1981. *Enzymes and Food Processing*, Applied Science Publishers Ltd., London, 296.
- Burkholder P.R. and Giles N. H. 1947. Induced biochemical mutants in *Bacillus subtilis*. *Am. J. Bot.*, 34: 345-348.
- Buchert J., and Pere J. 2000. Scouring of cotton with pectinases, proteases and lipases. *Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter.*, 31(5): 48- 52
- Collmer A. et al., 1988. Assay methods for pectic enzymes. In: Wood WA, Kellog ST. (eds). *Methods in enzymology*. Academic San Diego., 329-399.
- Etters J. N., Husain P. A., N. K. Lange K. N., 1999. Alkaline pectinase: an eco-friendly approach to cotton preparation., *Textile Asia*, 83-86.
- Hemphil H. E., Whitely H. R., 1975. Bacteriophage of *Bacillus subtilis*. *Bacteriol. Rev.*, 39: 257-315.
- Jayani R. S., Saxena S., Gupta R., 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40(9): 2931-2944.
- Keen N. T., Tamaki S., 1986. Structure of two pectate lyase genes from *Erwinia chrysanthemi* EC1 and their high-level expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 168: 595-606.
- Lei S. P, Lin H. C, Heffernan. L., Wilcox. G., 1985. Cloning of the pectate lyase genes from *Erwinia carotovora* and their expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 35(1-2): 63-70.
- Liu J., Showmaker L. H, Condon B., 2000. Patent: Single-bath ioscouring and dyeing of textiles. Document Number CA Patent 2372972.
- Macmillian J. D. and Phaff H. J., 1966. *Methods in enzymology*, 8: 632.
- Nasser W., Chalet F., Robert-Baudouy J., 1990. Purification and characterization of extracellular pectate lyase from *Bacillus subtilis*. *Biochimie*, 72: 689-695.
- Nasser W., Awadé A.C., Reverchon S., Robert-Baudouy J., 1993. Pectate lyase from *Bacillus subtilis*: molecular characterization of the gene, and properties of the cloned enzyme. *FEBS Lett.*, 335(3): 319-26.
- Nierstrasz V. A., Warmoeskerken M. M. C. G., 2003. *Textile Processing with Enzymes*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, England.
- Sambrook J., Fritschi EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Soriano M., Diaz P., Pastor FIJ., 2006. Pectinolytic systems of two aerobic sporogenous bacterial strains with high activity on pectin. *Curr. Microbiol.*, 50: 114-118.
- Solbak A. I., Richardson T. H., McCann R. T., Kline K. A., Bartnek F., Tomlinson G., Tan X., Parra-Gessert L., Frey G. J., Podar M., Luginbühl P., Gray K. A., Mathur E. J., Robertson D. E., Burk M. J., Hazlewood G. P., Short J. M, Kerovuo J. 2005. Discovery of pectin-degrading enzymes and directed evolution of a novel pectate lyase for processing cotton fabric. *J. Biol. Chem.*, 280(10): 9431-8.
- Stülke J., Hanschke R., Hecker M., 1993. Temporal activation of β -glucanase

- synthesis in *Bacillus subtilis* is mediated by the GTP pool. *J. Gen. Microbiol.*, 139(9): 2041-1045.
20. Truong L. V., Tuyen H., Helmke E., Binh L. T., Schweder T., 2001. Cloning of two pectate lyase genes from the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain ANT/505 and characterization of the enzymes. *Extremophiles*, 5(1): 35-44.
21. Wipat A., Colin R. Harwood, 1999. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 28: 1-9.
22. Whitaker J. R., 1990. Microbial pectolytic enzymes. In: William M. Fogerty and Gatherine T. Kelly (eds). *Microbial enzymes and biotechnology*, 2nd edition.

SCREENING AND CLONING OF PECTATE LYASE GENES FROM *Bacillus subtilis* ISOLATED IN VIETNAM

Do Thi Thu Hang, Vo Hoai Bac, Le Van Truong

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Pectate lyase (PL) is an important enzyme in plant pathogenesis, PL is secreted by microorganisms. PL degrades polygalacturonate of plant cell wall product oligogalacturonates. In this report, we described the screening of nine strains of *B. subtilis*, which isolated from Vietnam with ability to produce pectate lyase. The optimal pH for enzymatic degradation of polygalacturonate was from 8.5 to 10. The genes encoding pectate lyase from 4 different strains were cloned in *E. coli* and sequenced. Pectate lyase of these 4 strains contains 420 amino acid (aa). The deduced amino acid sequence of these PLs showed 98.8-99.8 % identity to PL from *B. subtilis* 168. There are 9 aa positions were changed in the amino acid sequencing of 4 strains in comparison between them and *B. subtilis* 168. The amino acid sequences of PLs of strains from plant were more conserve than those of PLs of strains from soil in comparison with PL from *B. subtilis* 168.

Keywords: *Bacillus subtilis*, cloning, endopolygalacturonate lyase, pectate lyase, pectin acid.

Ngày nhận bài: 10-4-2012