

**THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN pCB301-Xbxs14-ELP VÀ BIỂU HIỆN GEN Xbxs14 MÃ HÓA XYLAN 1,4-BETA XYLOSIDASE TỪ VI SINH VẬT RUỘT MỐI *Coptotermes gestroi* TRONG CÂY THUỐC LÁ *Nicotiana benthamiana***

Nguyễn Minh Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Minh Thu<sup>3</sup>, Nguyễn Thị Duyên<sup>2</sup>, Đỗ Thị Huyền<sup>3</sup>,  
Hồ Thị Thương<sup>3</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>3</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>3</sup>, Trương Nam Hải<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup>Bộ môn Di truyền học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

<sup>3</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

**TÓM TẮT:** Enzyme xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase (EC.3.2.1.37) là một trong những enzyme quan trọng, quyết định đến hiệu suất phân giải xylan ở thành tế bào thực vật thành đường đơn xylose, vì vậy, rất có ý nghĩa trong chuyển hóa sinh khối thực vật. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho enzyme xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase của vi sinh vật (Xbxs14) trong ruột mối *Coptotermes gestroi* được tách dòng thành công trong vector tái tổ hợp pBT. Sau đó gen được ghép nối và dung hợp với 100 gốc ELP (elastin like polypeptide) trong vector biểu hiện pCB301-ELP và biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Chủng tái tổ hợp mang gen *xbxs14* được sử dụng để nghiên cứu khả năng biểu hiện trong cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. Sử dụng phương pháp agroinfiltration, các gen được chuyển vào các khoang gian bào của tế bào, nơi vận chuyển và cung cấp các chất dinh dưỡng giữa trong và ngoài tế bào, cũng như giữa các tế bào. Việc định vị vi khuẩn biến nạp vào khoang gian bào sẽ giúp cho việc tương tác và quá trình tổng hợp protein ngoại lai sẽ được lưu giữ hiệu quả. Mẫu lá sau khi biến nạp 6 ngày được thu hoạch và tách chiết. Kết quả được kiểm tra bằng phản ứng lai miễn dịch cho thấy xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase đã biểu hiện thành công ở dạng tan trong lá cây. Dịch chiết thô của lá có hoạt tính của xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase (4,56 U/g lá) với hoạt tính tối ưu ở 60°C và pH7. Kết quả ban đầu của nghiên cứu này là cơ sở quan trọng cho việc sản xuất enzyme phân giải sinh khối thực vật từ gen *Xbxs14* phục vụ cho công nghiệp xử lý rác thải nông nghiệp, công nghiệp sản xuất giấy, được phẩm, nhiên liệu sinh học.

*Từ khóa:* Agroinfiltration, *Coptotermes gestroi*, *Nicotiana benthamiana*, pCB301Xbxs14, Xylan-1,4- $\beta$ -xylosidase.

## MỞ ĐẦU

Xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase là một trong những enzyme thuộc nhóm hemicellulase, tham gia chuyển hóa sinh khối thực vật cùng với các cellulase. Đây được coi là enzyme quan trọng phá vỡ liên kết glycoside của hemicellulose (Jordan & Wagschal, 2010). Enzyme này có khả năng cắt (1,4)- $\beta$ -D-xylan từ đầu không khử để giải phóng các gốc đường D-xylose (Biely, 1985).

Xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase được sử dụng để tách nước và giải phóng hương thơm từ nho trong quá trình sản xuất rượu vang và kết hợp với endoxylanase trong sản xuất bánh mì mang lại hiệu quả cao (Kundu & Ray, 2013). Đồng thời enzyme này còn cải thiện khả năng tiêu hóa của vật nuôi khi bổ sung vào thức ăn (Jordan & Wagschal, 2010). Cùng với cellulase và

hemicellulase khác, xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase giúp phân hủy lignocellulose tạo ra các monosaccharide, nguyên liệu cho quá trình lên men thành nhiên liệu sinh học như ethanol và butanol (Jordan & Wagschal, 2010).

Xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase thường được tìm thấy ở các sinh vật dùng sinh khối thực vật làm nguồn thức ăn, phần lớn trong số đó là vi khuẩn và nấm (Benassi et al., 2015; Kousar et al., 2013; Shao et al., 2011). Trong tự nhiên, enzyme này được cung cấp từ rất nhiều nguồn khác nhau như thực vật rừng (Corrêa et al., 2016), đất rừng (Terrasan et al., 2016; Campos et al., 2014), vi sinh vật cộng sinh trong dạ cỏ (Howard et al., 1960), vi khuẩn cộng sinh trong ruột mối (Mattéotti et al., 2011). Trong số các nguồn khai thác trên, vi sinh vật cộng sinh trong ruột mối là một trong những đối tượng tiềm

năng nhờ vào khả năng phân giải sinh khối thực vật hiệu quả trong thức ăn.

Môi, *Coptotermes gestroi*, thuộc họ *Rhinotermitidae* rất phổ biến ở Việt Nam cũng như một số quốc gia trên thế giới. Từ năm 2012, phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ sinh học đã sử dụng kỹ thuật Metagenomics để phân tích toàn bộ DNA metagenome của vi khuẩn sống tự do trong ruột loài môi *C. gestroi*. Trong số 125431 ORF thu được, bằng phần mềm tin sinh học đã được ước đoán được 41 ORF mã hóa cho enzyme xylan-1,4- $\beta$ -xylosidase (Do et al., 2014). Để khai thác được trình tự gen tốt nhất, chúng tôi đã sử dụng probe của enzyme xylan-1,4- $\beta$ -xylosidase, họ GH43 để khai thác và lựa chọn được trình tự gen mang mã số GL0112518 (gọi tắt là gen *Xbxs14*) mã hóa xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase (Nguyễn Minh Giang và nnk., 2017). Bằng phần mềm, enzyme mã hóa từ gen cũng được ước đoán là enzyme hoạt động trong môi trường kiềm (Nguyễn Minh Giang và nnk., 2016) nên có khả năng ứng dụng trong công nghiệp cao.

Năm 2000, enzyme endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase được biểu hiện thành công với hàm lượng lên đến 26% tổng số protein tan trong lá cây *Arabidopsis thaliana* (Ziegler et al., 2000b). Sự biểu hiện enzyme glycosylhydrolase trong thực vật giúp giảm chi phí sản xuất và nâng cao tính kinh tế trong việc chuyển hóa sinh khối lignocellulose (Sticklen, 2006; Taylor et al., 2008). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện gen *Xbxs14* trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. Thành công của nghiên cứu này sẽ mở ra một hướng mới trong sản xuất enzyme tái tổ hợp phân hủy sinh khối thực vật trên vật chủ là cây thuốc lá *N. benthamiana* ở Việt Nam.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

*Các chủng vi sinh vật:* chủng *Escherichia coli* DH10B (F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 endA1 araD139*  $\Delta$ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL nupG*  $\lambda$ -) của hãng Invitrogen (Hoa Kỳ) được sử dụng làm thể nhận trong thí nghiệm tách dòng gen.

Cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*, được sử dụng để biểu hiện gen. Vi khuẩn

*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen thông qua *Agrobacterium* và biểu hiện tạm thời. *A. tumefaciens* C58C1 mang vector chứa yếu tố phiên mã FUS3 được sử dụng để đồng biểu hiện tạm thời với vector đích chứa trong vi khuẩn *Agrobacterium*, dưới sự kiểm soát của promoter CaMV 35S. Plasmid pBT có kích thước 2705 bp (Phan Trọng Hoàng và nnk., 2005) được sử dụng để tách dòng gen, pCB301-ELP có kích thước 8116 bp dựa trên vector pCB301 (Xiang et al., 1999) được sử dụng để biểu hiện gen do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Gen *Xbxs14* gồm 1077 nucleotide đã được tổng hợp nhân tạo và chuyển vào vector pET22b(+) để tạo thành vector pET22-*Xbxs14*. Vector này được dùng làm nguồn cung cấp gen cho thiết kế biểu hiện gen ở thực vật.

*Cặp môi PCR:* Cặp môi dùng để tách dòng gen xylan 1,4-beta-xylosidase từ pET22-*Xbxs14* và cặp môi sử dụng để kiểm tra gen trong vector tách dòng bằng cách PCR từ khuôn lạc là pUC18 được đặt tổng hợp tại hãng Integrated DNA Technologies (Singapore).

Môi xuôi BamHI-*Xbxs14*-F: 5'- aaaGGATCCG ATAAAGTTACCAATCCG - 3'

Môi ngược BamHI-*Xbxs14*- R: 5'- aaaGGATC CACGAGCAGCGTTCAGGG - 3'

Môi xuôi pUC18F: 5'- CAGGGTTTTCCAGT CACGA - 3'

Môi ngược pUC18R: 5'- GCGGATAACAATT TCACACA - 3'

*Các loại enzyme:* *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Hoa Kỳ); enzyme hạn chế *Bam*HI (Bio-Lab và Fermentas, Hoa Kỳ); T4 DNA ligase (Fermentas, Hoa Kỳ).

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được đặt mua từ các công ty đạt tiêu chuẩn quốc tế như Bio-Lab, Fermentas, Sigma (Hoa Kỳ), Merck (CHLB Đức).

#### *Thiết kế vector biểu hiện pCB301-Xbxs14-ELP*

Vector pET22-*Xbxs14* được dùng làm khuôn để khuếch đại gen *Xbxs14* bằng kỹ thuật PCR với thành phần như sau: 18,7  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O; 2,5

μl đệm 10x; 2 μl dNTP 2 mM; 0,5 μl primer F (10 μM); 0,5 μl primer R (10 μM); 0,5 μl pET22-Xbxs14 (0,5 ng/μl); 0,3 μl dream Taq (5 U/μl). Phản ứng PCR được tiến hành với 30 với chu kỳ nhiệt 95°C trong 1 phút, 52°C trong 45 giây; 72°C trong 1 phút. Việc hoàn thiện sợi tổng hợp được tiến hành ở 72°C trong 10 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR sau đó được nối trực tiếp vào vector pBT nhờ trình tự T ở hai đầu tạo thành vector tách dòng pBTXbxs14.

Để tạo vector biểu hiện pBC301-Xbxs14-ELP, vector tách dòng pBTXbxs14 và vector pCB301-ha-ELP (Phan Trọng Hoàng và nnk., 2005) được cắt bằng enzyme cắt hạn chế BamHI và tinh sạch. Phản ứng lai tạo vector pBC301-Xbxs14-ELP được tiến hành ở 22°C trong 60 phút với thành phần gồm có: 1 μl đệm T4 DNA ligase 10X; 1,5 μl Xbxs14 (6,5 ng/μl); 1 μl pCB301-ELP (21,5 ng/μl); 0,5 μl T4 DNA ligase (5 U/μl); 6 μl dH<sub>2</sub>O. Sự có mặt của gen Xbxs14 trong vector biểu hiện được kiểm tra bằng phản ứng cắt với BamHI. Sau đó, pCB301-Xbxs14-ELP được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện (Mersereau, 1990) để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời ở thực vật.

#### **Biểu hiện xylan 1,4-β-xylosidase trên cây *Nicotiana benthamiana***

Khuẩn lạc *A. tumefaciens* mang vector đích pCB301-Xbxs14-ELP chứa đoạn gen mã hóa enzyme xylan 1,4-β-xylosidase và chủng *A. tumefaciens* chứa gen mã hóa protein hỗ trợ HcPro được nuôi riêng biệt trong 15 ml môi trường LB có bổ sung 50 μg/ml kanamycin, 50 μg/ml rifamycin, 50 μg/ml carbenicilin trong điều kiện 120 v/p, 14-16 giờ, 28°C. Sau đó, toàn bộ dung dịch chứa từng chủng được chuyển sang môi trường mới chứa 50 ml LB bổ sung 50 μg/ml kanamycin, 50 μg/ml rifamycin, 50 μg/ml carbenicilin và ủ qua đêm. Sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 4000 v/p trong 30 phút, ở 4°C. Dịch khuẩn *A. tumefaciens* chứa gen đích và gen mã hóa cho protein hỗ trợ HcPro được trộn đều và pha loãng đến nồng độ OD<sub>600</sub> 0,8-1 bằng dung dịch đệm (10 mM MES và 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Dịch huyền phù vi khuẩn được xâm nhiễm vào

*Nicotiana benthamiana* 6-8 tuần tuổi bằng phương pháp agroinfiltration thông qua máy hút chân không. Cây thuốc lá sau khi biến nạp được bọc bằng túi nilon, đưa trở lại nhà lưới để tiếp tục phát triển ở 21-26°C, 16 giờ chiếu sáng, độ ẩm 75%. Lá cây sau 6 ngày biến nạp được thu và bảo quản ở -80°C.

#### **Tách chiết và kiểm tra sự có mặt protein tái tổ hợp từ lá gây nhiễm biểu hiện tạm thời**

Nghiền 1 g lá trong nitor lỏng thành bột mịn. Thêm PBS 1X, pH7,4 theo tỷ lệ 1 g mẫu: 2 ml PBS. Dịch chiết lá được ly tâm 30 phút với 13000 v/p để loại bỏ cặn tủa. Tiến hành kiểm tra sự có mặt của enzyme tái tổ hợp trong dịch protein tan bằng phương pháp phương pháp điện di protein trên gel polyacrylamide-SDS và Western blot sử dụng kháng thể kháng C-myc.

#### **Western blot**

Các băng protein, sau khi điện di biến tính trên gel polyacrylamide-SDS sẽ được chuyển qua màng bằng máy Pierce G2 Fast Blotter ở chế độ 25 V và 1,3 mA trong 20 phút. Màng chứa kháng nguyên được phủ bằng 5% sữa tách bơ pha trong dung dịch PBS 0,05% Tween trong 5 giờ. Rửa màng bằng dung dịch PBST 3 lần, mỗi lần 5 phút. Phủ kháng thể 1: ngâm màng trong 15 ml dung dịch sữa 5% có chứa kháng thể c-myc nồng độ 180 μg/ml với độ pha loãng 100 lần qua đêm ở 4°C. Rửa màng bằng dung dịch PBST 3 lần, mỗi lần 5 phút. Phủ kháng thể 2: ngâm màng trong 15 ml dung dịch sữa tách bơ 5% có chứa kháng thể anti-mouse IgG có gắn HRP (horseradish peroxidase) trong 2 giờ. Rửa màng bằng dung dịch PBST 3 lần, mỗi lần 10 phút. Hiện màu trong dung dịch hiện màu có chứa cơ chất diaminobenzidine trong 15 phút đến khi hiện băng màu nâu theo hướng dẫn của hãng Thermo Scientific.

#### **Xác định hoạt tính của xylan 1,4-β-xylosidase**

Sử dụng cơ chất pNPX xác định hoạt tính của xylan 1,4-β-xylosidase theo các bước: Hỗn hợp phản ứng 180 μl gồm có 5 mM pNPX hòa trong 50 mM đệm phot phát (pH 6,0) được ủ với dịch chiết lá cây có chứa enzyme Xbxs14 ở 40°C trong 1 giờ (tổng thể tích hỗn hợp là 250 μl). Mẫu đối chứng 1 (ĐC1): gồm pNPX, đệm, và enzyme Xbxs14 với lượng giống với mẫu

*Xbs14*, nhưng được ủ riêng rẽ 40°C, và sau 1 giờ mới được trộn lại với nhau. Mẫu đối chứng 2 (ĐC2): gồm pNPX, đệm và dịch protein thu được từ lá cây đối chứng không mang gen, được thực hiện với điều kiện phản ứng giống với mẫu *Xbs14*. Phản ứng được dừng lại bằng 750 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 M và mẫu được đo ở bước sóng 405 nm. Lượng enzyme trong phản ứng sẽ được tính toán dựa vào đường chuẩn pNP. Đường chuẩn được thiết lập với thang 11 nồng độ pNP từ 0 mM đến 1 mM pNP pha bằng PBS 1x, pH6. Mỗi ống phản ứng có thể tích là 200 µl và được lặp lại 3 lần. Kết quả đường chuẩn tuân theo hàm  $y = 4,4454x + 0,0068$  với  $R^2 = 0,9937$ . Trong đó y là giá trị OD ở bước sóng 405 nm, x là hàm lượng pNP (µmol).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Nghiên cứu thiết kế vector pCB301-*Xbs14*-ELP

Trước hết, vector pET22*Xbs14* được dùng làm khuôn để khuếch đại gen *Xbs14* bằng cặp mồi đặc hiệu. Kết quả điện di sản phẩm PCR (hình 1A) cho thấy gen *Xbs14* có kích thước khoảng 1,1 kb đã được khuếch đại. Sau khi tinh sạch bằng Healthcare Kit, *Xbs14* có nồng độ 71,6 ng/µl, A260/A280 là 1,88. Gen *Xbs14* được ghép nối vào vector pBT tạo vector tách dòng pBT*Xbs14*. Vector pBT là vector dạng vòng mở, có đầu dính thymine có khả năng liên kết bổ sung với adenine ở chuỗi DNA được khuếch đại bằng Taq polymerase. Sau khi biến nạp sản phẩm lai vector pBT với gen *Xbs14*, 5 dòng khuẩn lạc màu trắng được chọn ngẫu nhiên để tiến hành sàng lọc gen *Xbs14* bằng PCR trực tiếp khuẩn lạc. Kết quả cho thấy cả 5 dòng đều có chứa gen *Xbs14* (kết quả không được trình bày). Để chắc chắn hơn, plasmid từ 5 dòng đã được tách chiết và cắt kiểm tra bằng *Bam*HI. Kết quả (hình 1B) cho thấy, cả 5 dòng plasmid đều có chứa gen *Xbs14*, được thể hiện là đoạn DNA có kích thước khoảng 1 kb được cắt ra khỏi vector có kích thước 2,7 kb. Gen *Xbs14* trong pBT*Xbs14* đã được kiểm tra bằng giải trình tự gen và được chuyển vào vector pCB301-ELP để tạo thành vector pCB301-*xbs14*-ELP. Tuy nhiên, trong quá trình ghép nối, gen có thể được gắn xuôi chiều hoặc ngược chiều so với promoter trong vector.

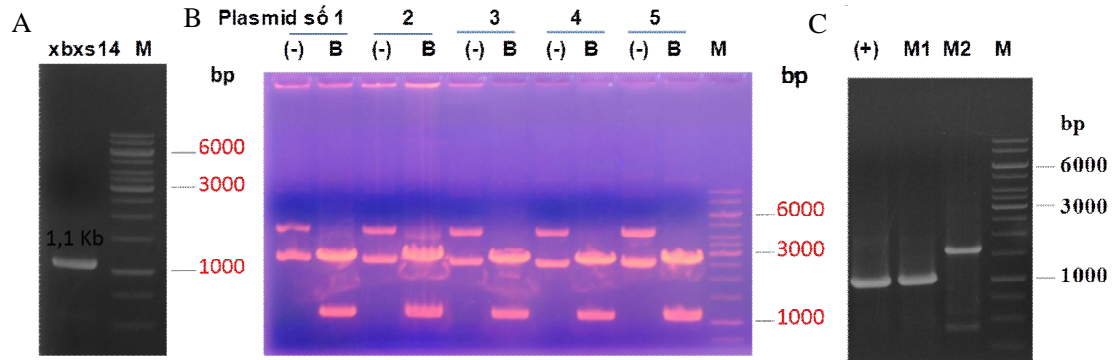
Để kiểm tra chiều của gen trong vector, chúng tôi dùng cặp mồi pUC18R/*Xbs14*R để kiểm tra, đồng thời cặp mồi *Xbs14*F/*Xbs14*R được sử dụng làm đối chứng. Kết quả (hình 1C) các dòng đối chứng đều khuếch đại gen *Xbs14* có kích thước 1,1 kb trong khi cặp mồi pUC18R/*Xbs14*R khuếch đại đoạn gen có kích thước 1661 bp tương ứng kích thước gen *Xbs14* và vùng promoter của gen. Như vậy, vector pCB301-*Xbs14*-ELP đã được thiết kế thành công. Thiết kế này giúp cho protein *Xbs14* được dung hợp với đuôi ELP sẽ thuận lợi cho quá trình tinh sạch protein và làm tăng khả năng tích lũy protein tái tổ hợp trong cây thuốc lá (Phan & Conrad, 2011). Đuôi ELP bao gồm 100 chuỗi pentapeptide (Val-Pro-Gly-Xaa-Gly) với độ dài khoảng 55 kDa và đuôi His - tag với độ dài 7,1 kDa. Mặt khác trong vector cũng có vị trí gen *Myc* mã hóa protein là kháng thể để kiểm tra trong phản ứng Western blot.

Dịch khuẩn sau khi ly tâm sẽ được bổ sung dung dịch AcetoSyringone (AS). Đây là các hợp chất phenol do tế bào thực vật bị thương tiết ra, có vai trò quan trọng trong việc nhận biết và gắn kết vi khuẩn với tế bào thực vật (Fortin et al., 1992). Vì vậy, trong các thí nghiệm chuyển gen hay biểu hiện tạm thời sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*, AS thường được thêm vào như một chất dẫn dụ khuẩn giúp cho khuẩn dễ dàng xâm nhiễm vào cây (Subramoni et al., 2014). Trong thí nghiệm biến nạp vi khuẩn *A. tumefaciens* C58C1 mang vector pCB301-*Xbs14*-ELP nồng độ AS tối ưu là 450 µM. Nồng độ AS này cũng tương tự như nghiên cứu của Wydro et al. (2006).

Vị trí lá trên cây ảnh hưởng đến quá trình biến nạp vector đích vào lá. Với đặc tính lá cây lúc còn non, khả năng sinh trưởng khỏe và khả năng tổng hợp các chất cao, ngược lại khả năng sinh trưởng của lá già kém, việc tổng hợp các chất hầu như diễn ra rất chậm. Bên cạnh đó, khả năng xâm nhập của vi khuẩn vào lá non cũng dễ hơn vào lá già. Kết quả nghiên cứu của Hồ Thị Thương và nnk. (2015) cho thấy, phần mẫu lá non thứ 1, 2 từ ngọn xuống và lá bánh tẻ (những lá chính giữa thân cây) tạo điều kiện cho sự xâm nhiễm của vi khuẩn tốt hơn. Hơn nữa, quá trình sinh tổng hợp của cây luôn diễn ra và đặc biệt, quá trình đó lại tập trung chủ yếu ở cơ quan

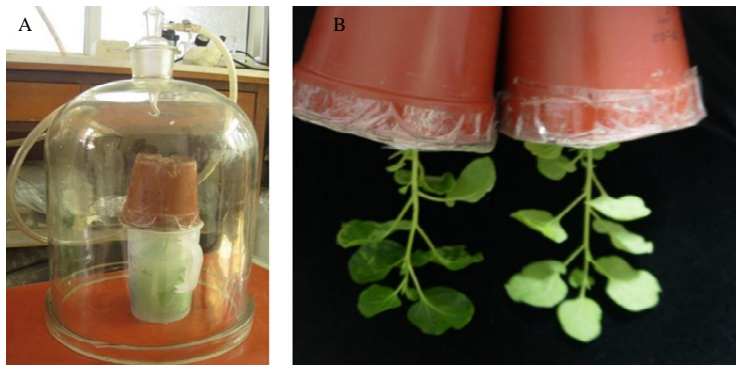
đang sinh trưởng (lá non và lá bánh tẻ), vì vậy, protein mong muốn cũng tăng lên theo. Do đó trong thí nghiệm này chúng tôi tập trung xâm

nhằm vào vị trí lá non và lá bánh tẻ đang sinh trưởng mạnh.



**Hình 1.** Điện di đồ kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen Xbxs14 từ pET22-Xbxs14 (A); sản phẩm cắt kiểm tra pBTXbxs14 bằng enzyme BamHI (B) và sản phẩm khuếch đại gen kiểm tra chiều gen trong pCB301-xbx14-ELP (C)

1-5: năm dòng plasmid; (-): plasmid không cắt; B: Dòng plasmid được cắt bằng BamHI; (+) gen Xbxs14 khuếch đại từ pET22-Xbxs14; 1: gen Xbxs14 khuếch đại từ pCB301-xbx14-ELP bằng mỗi Xbxs14F/Xbxs14R; 2: vùng gen promoter-Xbxs14 khuếch đại từ pCB301-xbx14-ELP bằng mỗi pUC18R/Xbxs14R; M: DNA chuẩn 1kb (Fermentas)



**Hình 2.** Xâm nhiễm *A. tumefaciens* vào cây bằng phương pháp hút chân không

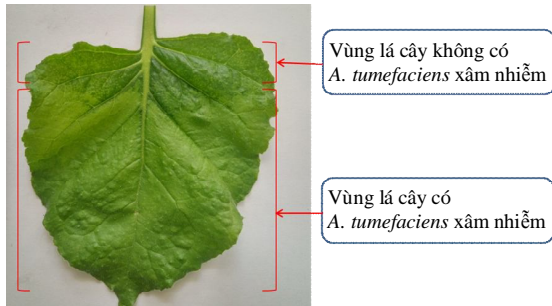
A. Cây bị nhấn chìm trong bình chứa vi khuẩn bên trong bình hút chân không; B. Cây trước (bên phải) và sau (bên trái) khi hút chân không.

**Biến nạp *A. tumefaciens* C58C1 mang vector pCB301-Xbxs14-ELP vào cây thuốc lá *N. benthamiana***

Tuổi của cây liên quan chặt chẽ đến khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn mang protein đích, ảnh hưởng đến sự tổng hợp protein tái tổ hợp và sinh khối lá thu được sau xâm nhiễm. Vì vậy, cây dùng cho biểu hiện tạm thời phải đạt tiêu chuẩn về số lượng lá, giai đoạn phát triển của lá, độ cứng cáp của cây. Theo kết quả nghiên cứu của Hồ Thị Thương và nnk. (2015), sự xâm nhiễm ở giai đoạn cây trước 3 tuần tuổi và sau 8 tuần tuổi rất kém. Tuổi xâm nhiễm tốt

nhất ở mẫu cây 4, 5, 6 tuần tuổi. Điều này có thể giải thích do ở giai đoạn tuổi này, khả năng sinh trưởng của cây mạnh với quá trình trao đổi chất liên tục giúp cho sự tổng hợp protein đích nhiều hơn. Cây 3 tuần tuổi còn rất ít lá, kích thước nhỏ, vì vậy, khi hút chân không, cây thích ứng khó hơn hoặc trong trường hợp thích ứng được, lượng mẫu thu được khi sử dụng phương pháp agroinfiltration sẽ thấp, từ đó lượng protein tái tổ hợp thu được ít hơn. Cây tuần tuổi thứ 8 xem như cây già, khả năng tổng hợp hạn chế, nồng độ protein tổng số thấp. Cây từ 4 đến 7 tuần tuổi là lúc sự sinh trưởng và phát triển

đang diễn ra mạnh, mọi sự thay đổi của cây đều có khả năng thích ứng tốt. Đặc biệt, cây ở tuần tuổi thứ 4 đến thứ 6 cho lượng protein tái tổ hợp cao nhất và vạch băng kích thước hiện rõ nhất. Trong thí nghiệm này, để xâm nhiễm chúng tôi sử dụng cây từ 4 đến 6 tuần tuổi.



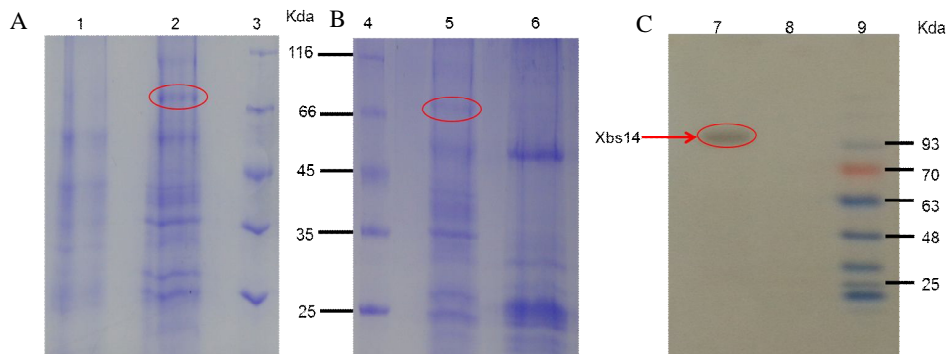
Hình 3. Lá cây bị xâm nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens*

Phương pháp hút chân không sẽ đẩy không khí trong gian bào ra ngoài, đồng thời tạo ra chênh lệch áp suất lớn để đưa vi khuẩn vào các khoảng trống đã được tạo ra (Tague & Mantis, 2006). Khi hỗn hợp *A. tumefaciens* đi vào khoang gian bào của lá, màu xanh ánh sáng bắt đầu tối đen cho thấy có sự xâm nhập thành công (hình 2B) (Chen et al., 2013). Khoảng gian bào chính là nơi vận chuyển và cung cấp các chất

đinh dưỡng như nguồn cacbon, hoocmon thực vật, ion khoáng,... giữa trong và ngoài tế bào, cũng như giữa các tế bào. Đồng thời đây cũng là nơi tương tác giữa thực vật với các vi sinh vật xâm nhập và dự trữ tạm thời các chất dinh dưỡng tổng hợp được (Sattelmacher, 2001). Việc định vị vi khuẩn biến nạp vào khoảng gian bào sẽ giúp cho sự tương tác và quá trình tổng hợp protein ngoại lai sẽ được lưu giữ hiệu quả. Mẫu lá cây *N. benthamiana* chuyển gen thành công sau khi chăm sóc 6 ngày trong nhà kính (hình 3).

### Biểu hiện gen *Xbxs14* trong cây thuốc lá *N. benthamiana*

Để kiểm tra biểu hiện của *Xbxs14* ở thuốc lá *N. benthamiana* sau khi hút chân không 5 ngày, chúng tôi tiến hành chiết xuất dịch tế bào thô chạy điện di trên gel polyacrylamide 12,6%, hiện màu bằng coomassie. Kết quả chạy điện di cho thấy có sự xuất hiện một băng kích thước khoảng 101 kDa, tương ứng với kích thước của xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase ở mẫu lá được chuyển gen trong khi băng này không xuất hiện ở mẫu lá không chuyển gen (hình 4A) và protein tủa của mẫu lá chuyển gen (hình 4B). Điều này chứng tỏ enzyme tái tổ hợp xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase đã được biểu hiện dưới dạng tan, với kích thước khoảng 101 kDa ở các cây thuốc lá chuyển gen.



Hình 4. Kết quả kiểm tra dịch chiết thô biểu hiện *Xbxs14* bằng Western-blot

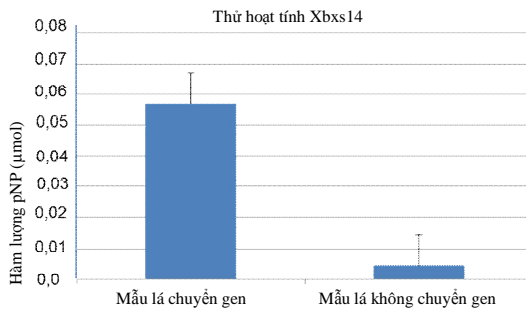
Đường chạy 1, 8: đối chứng âm (Dịch chiết thô không chứa protein gen *Xbxs14*), đường chạy 2, 5: Dịch chiết sau ly tâm mẫu protein của lá cây (protein tái tổ hợp tan), đường chạy 6: Cạn tủa sau khi ly tâm (Protein tủa, đường chạy 3, 4, 9: Protein chuẩn (Fermentas).

Biểu hiện của xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase ở cây thuốc lá *N. benthamiana* sau khi hút chân không 6 ngày đã được tiếp tục phát hiện bằng kỹ thuật

Western blot. Đây là phương pháp có độ tin cậy cao và đã được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu về biểu hiện của protein. Kết quả

phân tích cho thấy tại đường chạy 7, mẫu dịch chiết thô xuất hiện băng protein với kích thước khoảng 101 Kda, tương đương với kích thước của enzyme *Xbxs14* (39 Kda) và protein dung hợp (62,1 Kda). Trên đường chạy mẫu đối chứng âm là dịch chiết lá cây không có gen *Xbxs14* không xuất hiện băng khi hiện màu (hình 4C). Kết quả này giúp chúng tôi khẳng định gen *Xbxs14* đã biểu hiện trong cây thuốc lá biến nạp ở dạng tan.

**Kiểm tra hoạt tính của Xbxs14**



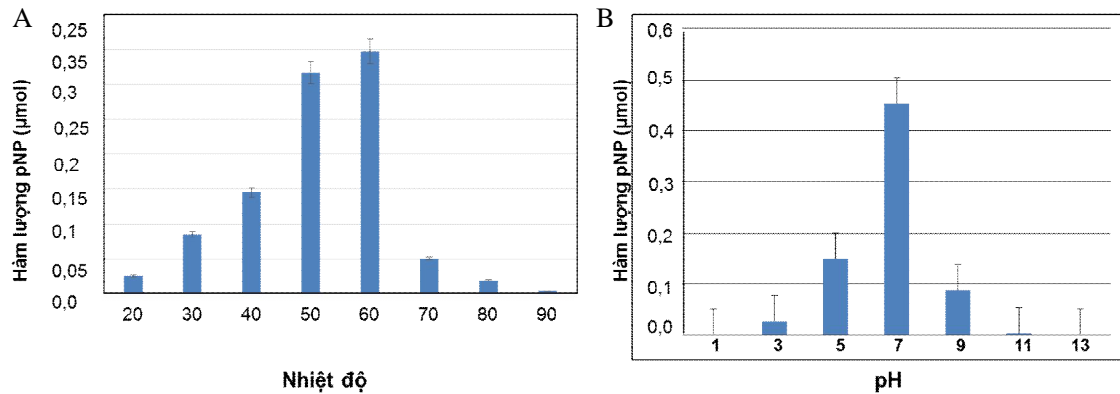
Hình 5. Hoạt tính của Xbxs14 ở mẫu lá chuyển gen

Mẫu dịch chiết thô sau khi kiểm tra bằng Western blot sẽ tiếp tục thử hoạt tính. Kết quả cho thấy ở mẫu lá chuyển gen, lượng pNP tạo ra trong 25 µl dịch chiết thô là 0,057 U và mẫu lá

không chuyển gen là 0,0044 U. Kết quả này giúp chúng tôi khẳng định enzyme *Xbxs14* biểu hiện trong lá cây đã có hoạt tính. Từ kết quả này, chúng tôi ước lượng enzyme thu được khi chiết xuất 1 g lá cây chuyển gen là 4,56 U (hình 5).

**Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính**

Chúng tôi tiếp tục nghiên cứu nhiệt độ hoạt động tối ưu của enzyme. Nhiệt độ lựa chọn để kiểm tra theo một dải: 20, 30, 40, 50, 60, 80 và 90°C. Kết quả cho thấy, hoạt tính beta - xylosidase tăng dần từ 20°C đến 60°C và giảm dần khi nhiệt độ tăng đến 80°C và giảm mạnh ở nhiệt độ 90°C. Như vậy, nhiệt độ thích hợp nhất cho hoạt động của *Xbxs14* là 60°C (hình 6). Bằng phần mềm Alcapred ước đoán ban đầu nhiệt độ hoạt động tối ưu của *Xbxs14* từ 55 đến 60°C. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy enzyme hoạt động tốt nhất ở 60°C, phù hợp với ước đoán từ phần mềm lựa chọn. Theo ước đoán từ phần mềm lựa chọn. Theo ước đoán bằng phần mềm, đây là enzyme có khả năng hoạt động tốt ở vùng pH kiềm (Nguyễn Minh Giang và nnk., 2016). Kết quả kiểm tra hoạt tính enzyme trong giải pH cho thấy, enzyme có hoạt tính cao nhất ở pH7 (pH trung tính). Hoạt tính enzyme ở pH7 cao gấp 3 lần ở pH5 và gấp 4 lần ở pH 9. Enzyme không có hoạt tính ở pH1 và pH11, pH13.



Hình 6. Biểu đồ nhiệt độ (A) và pH (B) hoạt động tối ưu của Xbxs14 tách chiết từ lá cây chuyển gen

**KẾT LUẬN**

Vector biểu hiện pCB301-Xbxs14-ELP mang gen *Xbxs14* mã hóa xylan 1,4-β-

xylosidase đã được thiết kế và biểu hiện thành công ở dạng tan trong cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp biểu hiện protein tạm thời. Dịch chiết thô của lá có hoạt

tính của xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase với hoạt tính tối ưu ở 60°C và pH 7. Nghiên cứu này là cơ sở ban đầu cho việc xây dựng phương pháp sản xuất enzyme phân giải sinh khối thực vật từ gen *Xbxs14* phục vụ cho công nghiệp xử lý rác thải nông nghiệp, công nghiệp sản xuất giấy, dược phẩm, nhiên liệu sinh học.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hỗ trợ về kinh phí của đề tài “Nghiên cứu lựa chọn gen mã hóa xylan beta xylosidase từ dữ liệu giải trình tự DNA metagenome của vi sinh vật ruột mối và biểu hiện gen tạm thời trên cây thuốc lá bằng phương pháp agroinfiltration” mã số CS16-01 và trang thiết bị của phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Benassi V. M., de Lucas R. C., Jorge J. A., Polizeli M. de L.T. de M., 2015. Screening of thermotolerant and thermophilic fungi aiming  $\beta$ -xylosidase and arabinanase production. *Braz. J. Microbiol.*, 45(4): 1459-1467.
- Biely P., 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.*, 3: 286-290.
- Campos E., Negro M. J., Sabarís G., Gonzalez S., Rorig M., Talia P., Grasso D. H., Sáez F., Manzanares P., Ballesteros, M., Cataldia A., 2014. Purification and characterization of a GH43  $\beta$ -xylosidase from *Enterobacter* sp. identified and cloned from forest soil bacteria. *Microbiol. Res.*, 169(2-3): 213-220.
- Chen Q., Lai H., Hurtado J., Stahnke J., Leuzinger K., Dent M., 2013. Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. *Adv. Tech. Biol. Med.*, 1(1): 103.
- Corrêa J. M., Christi D., Torre C. L. D., Henn C., Conceição-Silva J. L., Kadowaki M. K., Simão R. de C. G., 2016. High levels of  $\beta$ -xylosidase in *Thermomyces lanuginosus*: potential use for saccharification. *Braz. J. Microbiol.*, 47(3): 680-690.
- Do T. H., Nguyen T. T., Nguyen T. N., Le Q. G., Nguyen C., Kimura K., Truong N. H., 2014. Mining biomass-degrading genes through Illumina-based de novo sequencing and metagenomic analysis of free-living bacteria in the gut of the lower termite *Coptotermes gestroi* harvested in Vietnam. *J. Biosci. Bioeng.*, 118(6): 665-671.
- Fortin C., Nester E. W., Dion P., 1992. Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone. *J. Bacteriol.*, 174(17): 5676-5685.
- Howard B. H., Jones G., Purdom M. R., 1960. The pentosanases of some rumen bacteria. *Biochem. J.*, 74(1): 173-180.
- Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Chu Thị Kim Hoàng, Phạm Thị Vân, Phạm Bích Ngọc, Đinh Duy Kháng, Chu Hoàng Hà (2015) Nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên GP5 của virus gây bệnh lợn tai xanh trong cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*) bằng phương pháp agroinfiltration. *Tạp chí khoa học, chuyên san Khoa học Tự nhiên và Công nghệ. Tập 31.*
- Jordan D. B., Wagschal K., 2010. Properties and applications of microbial beta-D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86(6): 1647-1658.
- Kundu A., Ray R. R., 2013. Production of intracellular  $\beta$ -xylosidase from the submerged fermentation of citrus wastes by *Penicillium janthinellum* MTCC 10889. *3 Biotech*, 3(3): 241-246.
- Li J., Chen M., Liu X. W., Zhang H. C., Shen F. F., Wang G. P., 2007. Transient expression of an active human interferon-beta in lettuce. *Sci. Hortic.*, 112(3): 258-265.
- Mattéotti C., Haubruge E., Thonart P., Francis F., De Pauw E., Portetelle D., Vandenberg M., 2011. Characterization of a new  $\beta$ -glucosidase/ $\beta$ -xylosidase from the gut microbiota of the termite (*Reticulitermes santonensis*). *FEMS Microbiol. Lett.*, 314(2): 147-157.
- Nguyễn Minh Giang, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải, 2016. Sử dụng một số công cụ



- tính sinh khai thác gen mã hóa enzyme thủy phân lignocellulose từ dữ liệu metagenome của vi sinh vật trong ruột mối *Coptotermes gestroi*. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 14(1): 39-47.
- Nguyễn Minh Giang, Đỗ Thị Huyền, Phùng Thu Nguyệt, Trương Nam Hải, 2017. Xây dựng probe để khai thác và chọn gen mã hóa xylan 1-4 beta xylosidase từ dữ liệu giải trình tự metagenome. Tạp chí Công nghệ Sinh học, *Chấp nhận đăng*.
- Phan H. T., Conrad U., 2011. Membrane-based inverse transition cycling: an improved means for purifying plant-derived recombinant protein-elastin-like polypeptide fusions. *Int. J. Mol. Sci.*, 12(5): 2808-2821.
- Phan Trọng Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà, 2005. Sử dụng enzyme *XcmI* để thiết kế vector pBT phục vụ tách dòng và đọc trình tự gen. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 3(4): 459-463.
- Sattelmacher B., 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.*, 149(2): 167-192.
- Shamloul M., Trusa J., Mett V., Yusibov V., 2014. Optimization and utilization of agrobacterium-mediated transient protein production in *Nicotiana*. *J. Vis. Exp. JoVE.*, (86). doi: 10.3791/51204.
- Shao W., Xue Y., Wu A., Kataeva I., Pei J., Wu H., Wiegel J., 2011. Characterization of a novel  $\beta$ -xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(3): 719-726.
- Sticklen M., 2006. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17(3): 315-319.
- Subramoni S., Nathoo N., Klimov E., Yuan Z. C., 2014. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front. Plant Sci.*, 5:(322).
- Tague B. W., Mantis J., 2006. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation by vacuum infiltration. *Methods Mol. Biol.*, 323: 215-223.
- Taylor L. E., Dai Z., Decker S. R., Brunecky R., Adney W. S., Ding S. Y., Himmel M. E., 2008. Heterologous expression of glycosyl hydrolases in planta: a new departure for biofuels. *Trends Biotechnol.*, 26(8): 413-424.
- Terrasan F., Rafael C., Guisan J. M., Cano Carmona E., 2016. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: purification, characterization and hydrolysis of substrates. *Electron. J. Biotechnol.*, 23: 54-62.
- Wydro M., Kozubek E., Lehmann P., 2006. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Acta Biochim. Pol.*, 53(2): 289-298.
- Xiang C., Han P., Lutziger I., Wang K., Oliver D. J., 1999. A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, 40(4): 711-717.
- Ziegler M. T., Thomas S. R., Danna K. J., 2000. Accumulation of a thermostable endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase in the apoplast of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Mol. Breed.*, 6: 37-46.

**CONSTRUCTION OF VECTOR pCB301-*Xbxs14*-ELP AND  
EXPRESSION OF *Xbxs14* GENE CODING XYLAN 1,4- BETA-XYLOSIDASE  
FROM FREE LIVING BACTERIA IN THE GUT OF TERMITE  
*Coptotermes gestroi* IN *Nicotiana benthamiana* BY AGROINFILTRATION**

**Nguyen Minh Giang<sup>1</sup>, Nguyen Minh Thu<sup>3</sup>, Nguyen Thi Duyen<sup>2</sup>, Do Thi Huyen<sup>3</sup>,  
Ho Thi Thuong<sup>3</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>3</sup>, Chu Hoang Ha<sup>3</sup>, Truong Nam Hai<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup>Ho Chi Minh City University of Education

<sup>2</sup>Hanoi National University of Education

<sup>3</sup>Institute of Biotechnology, VAST

**SUMMARY**

Xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase (EC.3.2.1.37) is one of the important enzymes in lignocellulose degradation. It plays crucial role in the effective xylan degradation into xylose sugar. In this study, the gene *Xbxs14* encoding xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase of free-living bacteria in the gut of *Coptotermes gestroi* termite was successfully cloned into a recombinant pBT vector, and then transferred to fuse with 100x ELPs (Elastin like polypeptide) in the expression vector pCB301-ELP to generate pCB301-*Xbxs14*-ELP. This recombinant vector was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* bacteria. Using the agroinfiltration method, the gene was introduced into the apoplast of the cells of *Nicotiana benthamiana* where the transport and delivery of nutrients between and within the cells taking place. Localization of the transformed bacteria into the apoplast will help the interaction and the synthesis of foreign proteins to be effectively preserved. Leaf specimens 6-days after transformation were harvested and crude extract was prepared. Successful expression of soluble xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase in the leaf was confirmed using immunoassay. Crude leaf extracts exhibited xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase activity (4.56 U/g leaves) at the optimum condition of 60°C, pH7. This research provides an important basis to produce xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase from the *Xbxs14* gene for the treatment of agricultural waste, paper industry, pharmaceutical and biofuel production.

*Keywords:* Agroinfiltration, *C. gestroi*, *Nicotiana benthamiana*, pCB301*Xbxs14*, Xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase.

*Citation:* Nguyen Minh Giang, Nguyen Minh Thu, Nguyen Thi Duyen, Do Thi Huyen, Ho Thi Thuong, Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha, Truong Nam Hai, 2017. Construction of vector pCB301-*Xbxs14*-ELP and expression of *Xbxs14* gene coding xylan 1,4- beta-xylosidase from free living bacteria in the gut of termite *Coptotermes gestroi* in *Nicotiana benthamiana* by agroinfiltration. Tap chi Sinh hoc, 39(2): 226-235. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n2.9843.

\*Corresponding author: [tnhai@ibt.ac.vn](mailto:tnhai@ibt.ac.vn)

Received 25 May 2017, accepted 20 June 2017