

BIỂU HIỆN GEN *XBXS14* MÃ HÓA XYLAN 1,4-B-XYLOSIDASE CÓ NGUỒN GỐC TỪ VI KHUẨN RUỘT MỎI *COPTOTERMES GESTROI* TRONG TẾ BÀO *ESCHERICHIA COLI* ROSETTA (DE3)

Nguyễn Minh Thu^{1, *}, Nguyễn Minh Giang^{2, *}, Phạm Hải Như³, Đinh Nho Thái³, Đỗ Thị Huyền¹, Trương Nam Hải^{1, ✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tnhai@ibt.ac.vn

* Cả hai tác giả đều có sự đóng góp ngang nhau trong bản thảo này

Ngày nhận bài: 19.6.2017

Ngày nhận đăng: 20.9.2017

TÓM TẮT

Khung đọc mở GL0112518 gồm 1077 nucleotide (còn gọi là *Xbxs14*) mã hóa xylan 1,4- β -xylosidase kiếm đã được khai thác từ dữ liệu giải trình tự DNA metagenome của vi sinh trong ruột mồi. Gen được tổng hợp nhân tạo và gắn vào vector pET22b(+) để tiến hành biểu hiện enzyme dạng tái tổ hợp cho đánh giá tính chất enzyme. Kết quả cho thấy gen được biểu hiện tốt trong ba chủng *E. coli* BL21, *Rosetta* (DE3) và *JM109* (DE3), trong đó hai chủng *E. coli* BL21, *Rosetta* (DE3) thu được sinh khối lớn nhưng hầu hết enzyme nằm ở pha không tan. Bằng cách thay đổi điều kiện biểu hiện bao gồm nồng độ chất cảm ứng IPTG, nhiệt độ nuôi cấy biểu hiện gen và thời gian thu mẫu, một phần nhỏ enzyme đã được biểu hiện ở dạng tan. Điều kiện thích hợp cho việc biểu hiện *Xbxs14* trong chủng *E. coli* *Rosetta* (DE3) là nuôi cấy lắc trong môi trường LB, cảm ứng ở IPTG 0,05 mM, nhiệt độ 20°C trong 2 ngày. Enzyme tái tổ hợp được biểu hiện ở pha tan (soluble fraction) có hoạt tính của xylosidase, phân cắt liên kết $\beta(1\rightarrow4)$ glycoside ở cơ chất pNPX tạo màu vàng đặc trưng của nitrophenyl. Trong 1 lít môi trường nuôi cấy thu được 3,15 U enzyme.

Từ khóa: DNA metagenome, biểu hiện gen, *Coptotermes gestroi*, *Escherichia coli*, *xbxs14*

MỞ ĐẦU

Sinh khối thực vật là nguồn nguyên liệu tái tạo tiềm năng được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Cùng với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, nguồn sinh khối này ngày càng được tận dụng có hiệu quả để chuyển hóa thành các sản phẩm ứng dụng vào thực tiễn cuộc sống như tái chế rác thải thành năng lượng sinh học, chế biến thức ăn chăn nuôi, sản xuất giấy, sợi, hóa chất... (Howard và đồng tác giả, 2003). Việc sử dụng hữu hiệu sinh khối thực vật phụ thuộc chủ yếu vào khả năng chuyển hóa hiệu quả nguồn cơ chất lignocellulose trong chúng thành các sản phẩm có giá trị kinh tế cao. Một trong những công đoạn quan trọng của quá trình chuyển hóa này là thủy phân lignocellulose bởi các enzyme. Vì vậy, trong những năm gần đây, các nhà nghiên cứu vẫn tiếp tục tìm kiếm các enzyme có hoạt tính mong muốn theo ba hướng chính: (1) Sàng lọc và

phân lập gen từ chủng tự nhiên; (2) Tìm kiếm và phát hiện các gen mới từ các quần thể vi sinh vật bằng kỹ thuật Metagenomics. Hướng này cho phép khai thác các gen quý từ các vi sinh vật không nuôi cấy được vốn chiếm 99,0-99,9% vi sinh vật có trong môi trường sinh thái (Riesenfeld và đồng tác giả, 2004); (3) Gây đột biến định hướng một số gen mã hóa enzyme đã được nghiên cứu để làm tăng hoạt tính của enzyme. Trong đó, hướng sử dụng kỹ thuật Metagenomics để giải toàn bộ trình tự DNA metagenome của hệ vi sinh vật trong các hệ sinh thái mini đang rất được quan tâm. Xylan 1,4- β -xylosidase là một trong những enzyme thuộc nhóm hemicellulase tham gia chuyển hóa sinh khối thực vật cùng với các nhóm cellulase khác. Đây được coi là enzyme quan trọng phá vỡ liên kết glycoside của hemicellulose (Jordan và Wagschal, 2010). Enzyme này có khả năng cắt (1,4)- β -D- xylan từ đầu không khử để giải phóng các gốc đường D-xylose (Biely,

1985). Xylan 1,4- β -xylosidase có mặt ở cả động vật, thực vật, vi khuẩn, nấm.... Tuy nhiên, chỉ vi sinh vật mới cung cấp được lượng lớn xylan 1,4- β -xylosidase đáp ứng cho sản xuất, đem lại giá trị thương mại cao (Howard và đồng tác giả, 1960, Mattéotti và đồng tác giả, 2011). Do đó, xylan 1,4- β -xylosidase có nguồn gốc vi sinh vật hiện đang là đối tượng được nghiên cứu và ứng dụng nhiều trong sản xuất.

Trong các nghiên cứu trước đây (Do và đồng tác giả, 2014), chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật Metagenomics để phân tích toàn bộ DNA metagenome của vi sinh vật trong ruột mối *Coptotermes gestroi*. Trong số 125431 ORF thu được, bằng phần mềm tin sinh học đã ước đoán được 41 ORF mã hóa cho enzyme xylan 1,4- β -xylosidase. Để khai thác được trình tự gen hiệu quả nhất từ dữ liệu metagenome, chúng tôi đã tiến hành xây dựng mẫu dò (probe) cho nhóm enzyme xylan 1,4- β -xylosidase, họ GHF43 với độ dài là 507 amino acid. Probe này đã giúp tìm kiếm và lựa chọn được trình tự gen mang mã số GL0112518 mã hóa cho xylan 1,4- β -xylosidase (*Xbxs14*) từ dữ liệu metagenome (Nguyễn Minh Giang và đồng tác giả, 2017). Enzyme này cũng được dự đoán hoạt động tốt trong môi trường kiềm (Nguyễn Minh Giang và đồng tác giả, 2016). Dựa trên trình tự nucleotid đã biết, gen *xbxs14* đã được đặt tổng hợp và chuyển vào vector pET22b(+) tại vị trí của enzyme giới hạn *NcoI*, *XhoI* (được gọi là pET22-*xbxs14*). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu biểu hiện gen *xbxs14* trong *E. coli* với mục đích thu được enzyme tinh sạch để đánh giá hoạt tính sinh học.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Soluble BL21 (DE3) và JM109 (DE3) được sử dụng trong thí nghiệm biểu hiện gen; vector pET22b(+) mang gen *xbxs14* dùng làm vector biểu hiện. Cơ chất p-nitrophenyl- β -xylopyranoside (pNPX) (Sigma) gồm 1 phân tử β -D-xylanpyranose liên kết với nitrophenyl bằng liên kết $\beta(1\rightarrow4)$ glycoside để thử hoạt tính của xylan 1,4- β -xylosidase.

Phương pháp nghiên cứu

Biểu hiện gen *Xbxs14*

Vector pET22-*Xbxs14* được biến nạp vào 4 chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3), Rosetta (DE3), Soluble BL21 (DE3) và JM109 (DE3) bằng phương

pháp sốc nhiệt (Sambrook, Russell, 2001). Sau đó chọn khuẩn lạc rời từ đĩa biến nạp chuyển vào môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin đến nồng độ cuối cùng là 100 μ g/ml (môi trường LBA), lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Dịch nuôi cấy được chuyển sang môi trường LBA mới để đạt OD₆₀₀ ban đầu là 0,1 sau đó nuôi tiếp trong khoảng 2 giờ ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6 – 0,7 thì tiến hành bổ sung thêm IPTG để cảm ứng sinh tổng hợp enzyme tái tổ hợp. Nồng độ IPTG được khảo sát trong khoảng từ 0 đến 1 mM. Mẫu được nuôi cấy tiếp trong điều kiện lắc 200 vòng/phút ở các nhiệt độ khác nhau để lựa chọn ra nhiệt độ thích hợp. Dịch tế bào được ly tâm 5000 vòng/phút, trong 5 phút để loại bỏ dịch nổi. Tủa tế bào được hòa lại trong đệm PBS (8 g NaCl; 2 g KCl; 0,24 g KH₂PO₄; 1,42 g Na₂HPO₄ bổ sung nước cho đến 1 lít) sao cho OD₆₀₀=10. Tế bào được giữ ở -80°C đến khi phân tích. Protein trong tế bào được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6%.

Phương pháp thu protein tan và không tan

Để đánh giá protein tái tổ hợp được biểu hiện ở pha tan hay không tan, tế bào từ -80°C được làm tan nhanh trong nước ấm (40-50°C) sau đó được phá vỡ bằng siêu âm với chu kỳ 10 giây siêu âm và 20 giây nghỉ trong tổng khoảng 30 đến 40 xung ở tần số 20 khz. Dịch siêu âm được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút để tách protein pha tan và pha không tan. Pha tan là phần dịch nổi được thu lại, còn phần cặn là pha không tan được hòa trở lại trong PBS với thể tích bằng thể tích phần dịch vừa hút ra và để điện di kiểm tra.

Thử hoạt tính của xylan 1,4- β -xylosidase

Sử dụng cơ chất pNPX để thử hoạt tính của xylan 1,4- β -xylosidase theo các bước: Hỗn hợp phản ứng 180 μ l gồm có 5 mM pNPX hòa trong 50 mM đệm photphat (pH 6,0) được ủ với protein pha tan có chứa enzyme *Xbxs14* ở 37°C trong 4 giờ (tổng thể tích hỗn hợp là 250 μ l). Mẫu đối chứng 1 (ĐC1) có thành phần tương tự như trên nhưng enzyme được ủ riêng rẽ và chỉ trộn với cơ chất trước khi dùng phản ứng. Mẫu đối chứng 2 (ĐC2) có thành phần tương tự nhưng dịch protein là dịch thu được từ chủng *E. coli* Rosetta (DE3) mang pET22b(+) không mang gen *Xbxs14*. Phản ứng được dừng lại khi bổ sung 750 μ l Na₂CO₃ 2 M và đo mẫu ở bước sóng 405 nm. Kết quả phản ứng enzyme với cơ chất sẽ tạo ra màu vàng của dung dịch. Sự đổi màu từ trắng sang vàng của dung dịch là do hoạt động của xylan 1,4- β -xylosidase. Khi enzyme này cắt liên kết $\beta(1\rightarrow4)$

glycoside ở pNPX, nitrophenyl sẽ được giải phóng ra môi trường, tạo màu vàng đặc trưng của nitrophenyl. 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 μ l 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 (μ mol). Một đơn vị hoạt tính β -xylosidase (U) là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol p-nitrophenol trong 1 phút (Dashtban *et al.*, 2010).

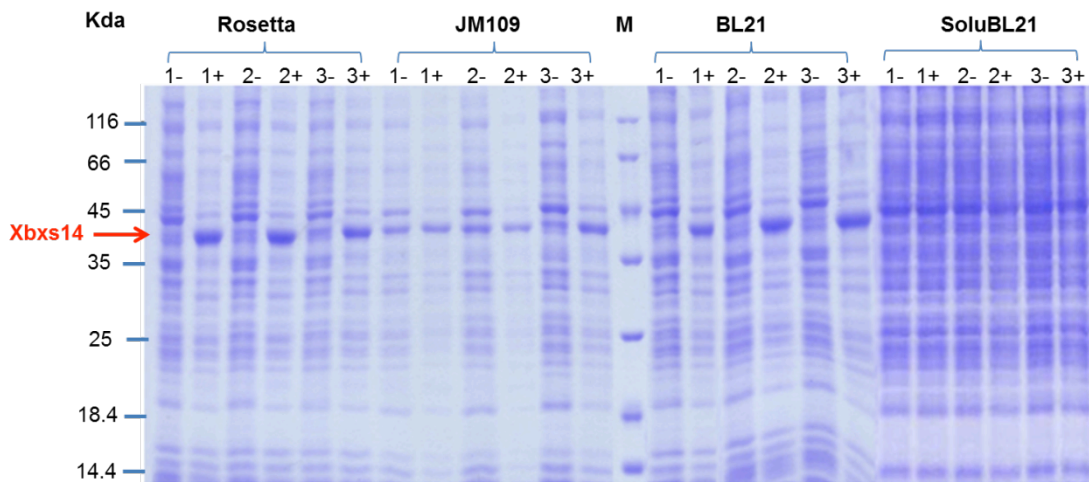
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biểu hiện gen *Xbxs14*

Gen trong vector pET22b(+) nhận được từ hãng Genscript đã được giải trình tự để kiểm tra. Kết quả, trình tự gen đúng 100% so với trình tự đặt tổng hợp. Plasmid được biến nạp vào các chủng biểu hiện để biểu hiện gen. Kết quả cho thấy ở các mẫu protein thu được sau nuôi cấy cảm ứng chủng *E. coli* Rosetta, JM109 và BL21 mang *Xbxs14* đều xuất hiện

1 băng protein kích thước khoảng 40 kDa khác với mẫu không cảm ứng và có kích thước đúng với kích thước xylan 1,4- β -xylosidase được biểu hiện. Kết quả nhận được cho thấy cả 3 chủng *E. coli* kể trên có khả năng biểu hiện gen *Xbxs14*. Các mẫu cảm ứng và không cảm ứng IPTG ở chủng *E. coli* Soluble đều cho lượng protein như nhau. Do đó, chủng này có thể không tổng hợp XBXS14 hoặc enzyme sau khi tổng hợp đã bị protease nội bào cắt bỏ (Hình 1).

Tại thời điểm thu mẫu, 2 chủng *E. coli* Rosetta và BL21 cho lượng sinh khối lớn hơn (OD_{600} tương ứng là 2,1 và 3,2) so với chủng JM109 (OD_{600} tương ứng là 0,8) và lượng protein tái tổ hợp thu được cũng lớn hơn. Từ kết quả này chúng tôi lựa chọn các mẫu biểu hiện trong 2 chủng *E. coli* Rosetta và BL21 để kiểm tra xem enzyme tái tổ hợp được tổng hợp ở pha tan hay pha tủa của tế bào. Kết quả điện di cho thấy 100% enzyme tổng hợp trong chủng BL21 là dạng không tan, trong khi đó khoảng 1/4 lượng enzyme tổng hợp trong chủng Rosetta là dạng tan (Hình 2). Vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn chủng Rosetta để nghiên cứu lựa chọn điều kiện cho biểu hiện enzyme tái tổ hợp.

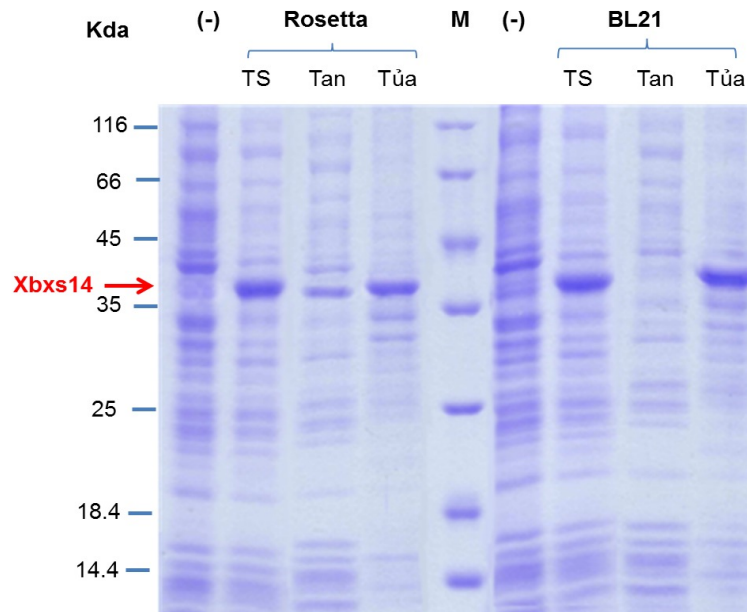


Hình 1. Phân tích sản phẩm biểu hiện của gen *Xbxs14* trong bốn chủng biểu hiện trên gel polyacrylamide 12,6%. M: Protein chuẩn (Fermentas); 1-, 2-, 3- : Dòng không cảm ứng IPTG (đối chứng); 1+, 2+, 3+: Dòng cảm ứng 1mM IPTG.

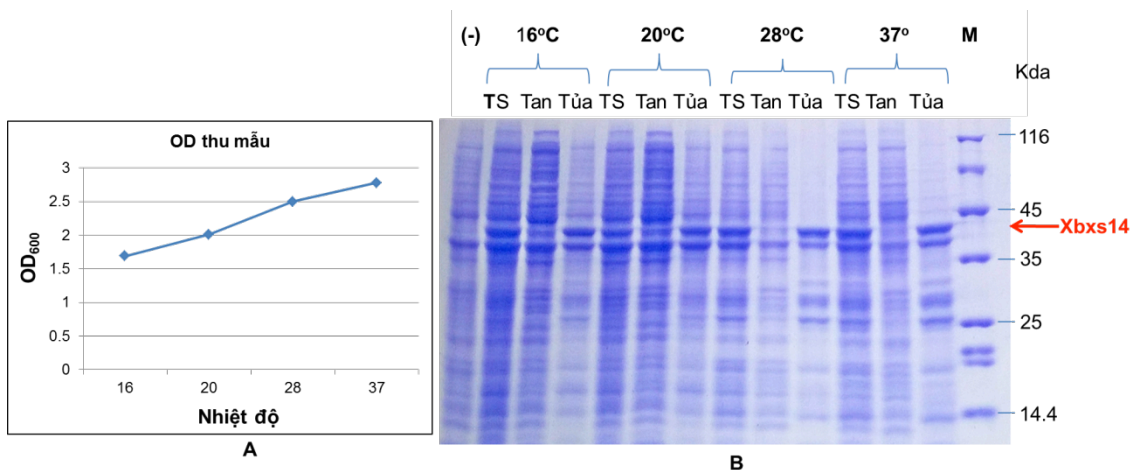
Lựa chọn nhiệt độ thích hợp cho biểu hiện gen

Nhiệt độ có ảnh hưởng lớn tới tốc độ sinh trưởng của chủng nên gián tiếp ảnh hưởng tới tốc độ sinh tổng hợp protein, cuộn xoắn protein thành cấu trúc có hoạt tính sinh học. Vì vậy, trong thí nghiệm này chúng tôi tiến hành kiểm tra khả năng sinh tổng hợp enzyme XBXS14 ở các điều kiện 16, 20, 28, 37°C. Kết quả

lượng enzyme trong protein tổng số thu được ở các nhiệt độ nuôi cấy gần tương đương nhau. Tuy nhiên, enzyme chỉ được tổng hợp ở pha tan khi nuôi chủng ở 16°C và 20°C (Hình 3). Lượng protein tan tổng hợp ở 16°C và 20°C là như nhau, tuy nhiên việc kiểm soát nhiệt độ nuôi cấy khi nuôi cấy ở nhiệt độ thấp là khó khăn vì vậy 20°C là nhiệt độ thích hợp được lựa chọn cho thí nghiệm biểu hiện xylan 1,4- β -xylosidase.



Hình 2. Phân tích sản phẩm kiểm tra khả năng tan của xylan 1,4- β -xylosidase ở *E. coli* BL21 và *E. coli* Rosetta trên gel polyacrylamide 12,6%. M: Protein chuẩn (Fermentas); (-): Dòng không cảm ứng IPTG; TS: Protein tổng số; Tan: Protein pha tan; Tủa: Protein pha tủa.



Hình 3. Biểu đồ mô tả giá trị OD₆₀₀ thu mẫu (A) và điện di đồ kiểm tra biểu hiện của gen *Xbxs14* trong tế bào *E. coli* Rosetta ở các nhiệt độ khác nhau. M: Thang protein chuẩn (Fermentas); (-): Dòng chứa pET22b(+); TS: Protein tổng số; Tan: Protein tan; Tủa: Protein tủa.

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng IPTG

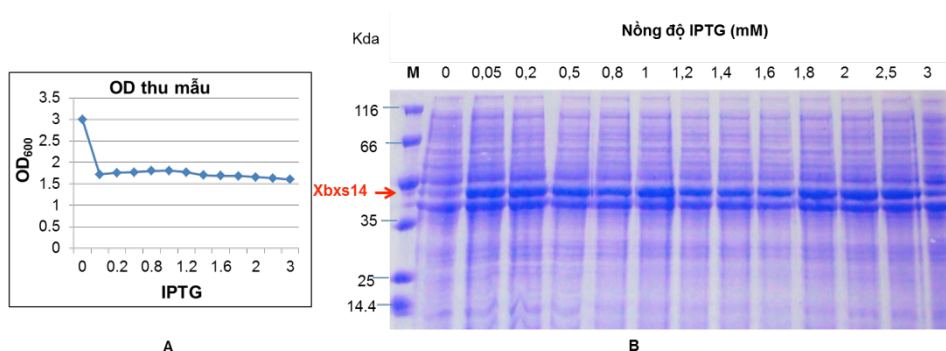
IPTG là chất cảm ứng khởi động promoter T7 trong vector pET22Xbxs14 phiên mã sinh tổng hợp gen *Xbxs14*. Mười ba nồng độ IPTG khác nhau được tiến hành khảo sát là: 0 mM; 0,05 mM; 0,2 mM; 0,5

mM; 0,8 mM; 1 mM; 1,2 mM; 1,4 mM; 1,6 mM; 1,8 mM; 2 mM; 2,5 mM và 3 mM. Chủng *E. coli* Rosetta tái tổ hợp được nuôi cấy ở điều kiện 20°C, lắc 200 vòng/phút. Sau 2 ngày nuôi cấy, một phần dịch nuôi cấy được giữ lại để kiểm tra protein tổng số bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6% để

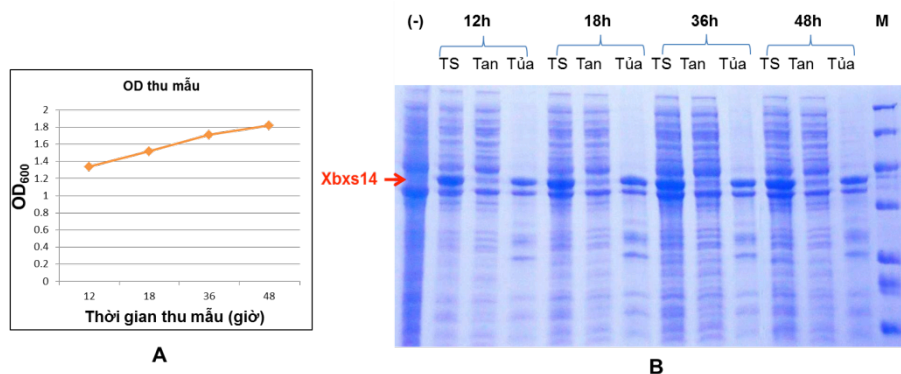
kiểm tra sinh khối đạt được và mức độ biểu hiện của xylan 1,4- β -xylosidase.

Biểu đồ sinh trưởng của các dòng tế bào được nuôi cấy với nồng độ IPTG khác nhau cho thấy, ngay sau khi cảm ứng IPTG sinh khối tế bào đã bị sụt giảm nghiêm trọng. Ngay với nồng độ IPTG rất thấp, 0,05 mM, sinh khối tế bào đã giảm gần một nửa so với không cảm ứng (Hình 4A). Điều đó chứng tỏ sự biểu hiện của gen đã làm ảnh hưởng tới quá trình trao đổi chất của chủng chủ. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ chất cảm ứng thì sinh

khối tế bào không thay đổi nhiều, đồng thời khả năng sinh tổng hợp enzyme tái tổ hợp cũng vẫn được duy trì tương tự như được cảm ứng với mức IPTG thấp. Kết quả này gợi ý rằng việc tổng hợp enzyme XBXS14 đã ảnh hưởng tiêu cực tới quá trình trao đổi chất của tế bào dẫn đến khả năng sinh trưởng của tế bào giảm hẳn. Enzyme tái tổ hợp XBXS14 được biểu hiện ở tất cả các nồng độ IPTG. Do đó nồng độ IPTG là 0,05 mM đã được sử dụng để cảm ứng sinh tổng hợp xylan 1,4- β -xylosidase.



Hình 4. Điện di đồ kiểm tra biểu hiện của gen *Xbxs14* trong tế bào *E. coli* Rosetta, khi cảm ứng các nồng độ IPTG khác nhau. M: Protein chuẩn (Fermentas); 0 – 3: Nồng độ IPTG.



Hình 5. Biểu đồ mô tả giá trị OD₆₀₀ thu mẫu của các dòng biểu hiện ở các thời gian thu mẫu khác nhau (A) và điện di đồ kiểm tra biểu hiện của gen *Xbxs14* theo các thời gian thu mẫu (B) trong tế bào *E. coli* Rosetta (DE3) trên gel polyacrylamide 12,6%. M: Protein chuẩn (Fermentas); (-): Dòng chứa pET22 b(+); TS: Protein tổng số, Tan: Protein pha tan, Tủa: Protein pha tủa.

Khảo sát thời gian thu mẫu

Thời gian cảm ứng có liên quan chặt chẽ đến hàm lượng và chất lượng của protein tái tổ hợp được biểu hiện. Thông thường, thời gian càng dài, hàm lượng protein tái tổ hợp sẽ được tổng hợp càng nhiều. Tuy nhiên khi thời gian quá dài thì chất dinh dưỡng trong môi trường bị cạn kiệt, quá trình tổng hợp protein bị

hạn chế và các protein tái tổ hợp bị cắt bởi các protease nội bào. Tiến hành khảo sát các thời điểm thu mẫu khác nhau là: 12h, 18h, 36h, 48h, với nồng độ IPTG 1 mM, ở 20°C. Dịch protein tổng số thu được sẽ kiểm tra gel polyacrylamide. Kết quả điện di (Hình 5B) cho thấy xylan 1,4- β -xylosidase đã được biểu hiện trong khoảng 12-48h nuôi cấy ở 20°C, với nồng độ chất cảm ứng

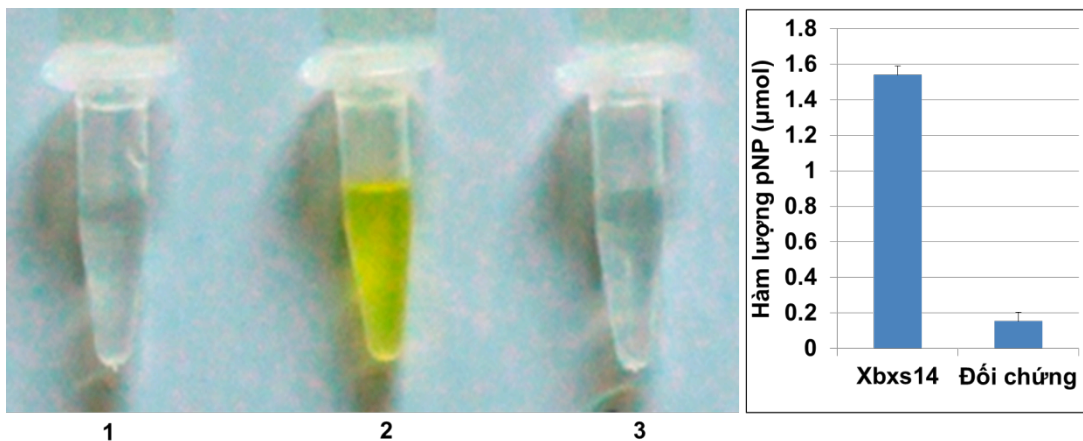
IPTG là 0,05 mM. Bằng protein xylan 1,4- β -xylosidase ở các thời điểm thu mẫu khác nhau là như nhau. Tuy nhiên sinh khối thu được (đánh giá dựa trên giá trị OD₆₀₀ thu mẫu) ở 48 giờ là lớn nhất, đồng nghĩa với việc hàm lượng protein tái tổ hợp thu được là lớn nhất (Hình 5A). Do đó, chúng tôi quyết định chọn 48 giờ là thời gian thu mẫu thích hợp. Như vậy, mặc dù gen *Xbxs14* đã được biểu hiện ở các điều kiện khác nhau nhưng lượng enzyme thu được là khá thấp. Điều này có thể do chúng chủ biểu hiện là chưa phù hợp đối với gen. Tuy nhiên việc đánh giá hoạt tính enzyme là cần thiết để khẳng định rằng mặc dù được biểu hiện thấp nhưng enzyme biểu hiện có hoạt tính sinh học đúng như dự đoán.

Kiểm tra hoạt tính của xylan 1,4- β -xylosidase

Để kiểm tra hoạt tính enzyme, cơ chất pNPX đã

được sử dụng. Kết quả thử hoạt tính cho thấy, mẫu xylan 1,4- β -xylosidase khi ủ với cơ chất pNPX ở 37°C trong 4 giờ, đã chuyển sang màu vàng đặc trưng của dung dịch chứa nitrophenyl. Kết quả xác định hoạt tính cho thấy trong 1 lít môi trường nuôi cấy, lượng enzyme tổng hợp ở pha tan đạt 3,15 U enzyme xylan 1,4- β -xylosidase.

Trong khi mẫu đối chứng 1 (ĐC1) có cùng thành phần (cơ chất pNPX, đệm, xylan 1,4- β -xylosidase) nhưng được ủ riêng rẽ ở 37°C trong 4 giờ tương tự mẫu kiểm tra hoạt tính và chỉ được trộn vào với nhau trước khi ngừng phản ứng enzyme thì vẫn giữ nguyên màu trắng. Kết quả tương tự cũng được ghi nhận ở mẫu đối chứng 2 (ĐC2), mẫu được thực hiện với điều kiện giống mẫu *Xbxs14*, nhưng enzyme xylan 1,4- β -xylosidase được thay bằng protein thu từ dòng mang pET22b (đối chứng) (Hình 6).



Hình 6. Thử hoạt tính của xylan 1,4- β -xylosidase được biểu hiện ở pha tan từ chủng *E. coli* tái tổ hợp. 1: Đối chứng 1, enzyme và cơ chất được ủ riêng rẽ và chỉ trộn vào nhau khi bổ sung Na₂CO₃ để ngừng phản ứng; 2: Ống chứa enzyme xylan 1,4- β -xylosidase được ủ chung cùng cơ chất; 3: Đối chứng 2, ủ cơ chất với protein thu từ dòng mang pET22b(+) không mang *Xbxs14*.

KẾT LUẬN

Gen *Xbxs14* mã hóa xylan 1,4- β -xylosidase có nguồn gốc từ vi khuẩn trong ruột mối đã được biểu hiện trong *E. coli*. Enzym xylan 1,4- β -xylosidase tái tổ hợp dạng tan có hoạt tính sinh học đối với cơ chất pNPX.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng nguồn kinh phí của Đề tài độc lập “Nghiên cứu metagenome của một số hệ sinh thái mini tiềm năng nhằm khai thác các gen mới mã hóa hệ enzyme chuyển hóa hiệu quả lignocelluloses“, mã số

ĐTĐLCN.15/14 và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Biely P (1985) Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol*3: 286–290.
 Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C, Qin W (2010) Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Crit Rev Biotechnol*30: 302–309.
 Do TH, Nguyen TT, Nguyen TN, Le QG, Nguyen C, Kimura K, Truong NH (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: 665–671.

Howard BH, Jones G, Purdom MR (1960) The pentosanases of some rumen bacteria. *Biochem J*74: 173–180.

Howard RL, Abotsi E, Rensburg ELJ, Van, Howard S (2003) Review - Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African J Biotechnol*2(12): 602-619.

Jordan DB, Wagschal K (2010) Properties and applications of microbial beta-D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl Microbiol Biotechnol*86: 1647–1658.

Mattéotti C, Haubruge E, Thonart P, Francis F, De Pauw E, Portetelle D, Vandenberghe M (2011) Characterization of a new β -glucosidase/ β -xylosidase from the gut microbiota of

the termite (*Reticulitermes santonensis*). *FEMS Microbiol Lett*314: 147–157.

Nguyễn Minh Giang, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải (2016) Sử dụng một số công cụ tin 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: 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*.

Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet*38: 525–552.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (CSHL Press).

EXPRESSION OF XBSX14 CODING XYLAN 1,4-B-XYLOSIDASE DERIVED FROM BACTERIA IN *COPTOTERMES GESTROI* TERMITE GUT IN *ESCHERICHIA COLI* ROSETTA (DE3)

Nguyen Minh Thu¹, Nguyen Minh Giang², Pham Hai Nhu³, Dinh Nho Thai³, Do Thi Huyen¹, Trương Nam Hải¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Ho Chi Minh University of Pedagogy*

³*Science of University, Vietnam National University, Hanoi*

SUMMARY

A gene GL0112518 consisting of 1077 nucleotides (also called *Xbxs14*) encodes alkaline xylan 1,4- β -xylosidase was determined from DNA metagenome data of bacteria in *Coptotermes gestroi* termite gut. The gene was artificially synthesized and ligated into pET22b(+) vector for expression of recombinant enzyme with purpose of enzyme characterization. As a result, the gene was expressed in three strains of *E. coli* BL21, Rosetta (DE3) and JM109 (DE3), of which two strains of *E. coli* BL21, Rosetta (DE3) grew better to obtain greater biomass. Most recombinant protein was expressed as inclusion body. After modification of expression conditions including the IPTG concentration, the temperature of culture to express gene and the duration of cultivation, small amount of the recombinant enzyme was expressed in soluble form. The appropriate conditions for the expression of *Xbxs14* in Rosetta *E. coli* strains (DE3) were shaking culture in LBA medium with IPTG concentrations of 0.05 mM, temperature of 20°C and sampling after 2 days. The recombinant enzyme expressed in the soluble fraction exhibited activity of the enzyme xylan β -1,4-xylosidase, cleavage β (1 \rightarrow 4) glycoside in the substrate p-nitrophenyl- β -xylopyranoside (pNPX) to nitrophenyl. Xylan β -1,4-xylosidase activity in 1 liter of culture was 3.15 U.

Keywords: DNA metagenome, *Coptotermes gestroi*, *Escherichia coli*, Expression, *xbxs14*