

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH CHITINASE TỪ *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *KURSTAKI* TRONG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI*

Trịnh Thị Thu Hà^{1,2}, Đồng Văn Quyền^{1,2}, Ngô Đình Bình¹,✉

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

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: binh.gen@gmail.com

Ngày gửi bài: 03.4.2017

Ngày nhận đăng: 28.6.2017

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã phân lập được chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* (Btk) MSS1.1 có khả năng thủy phân chitin cao. Chủng Btk MSS1.1 đã được dùng để tạo chế phẩm kháng nấm gây bệnh thực vật và diệt côn trùng gây hại, tuy nhiên hiệu suất còn thấp và khó nâng cao hiệu quả sinh tổng hợp của chitinase - enzyme chìa khóa quyết định hiệu quả phòng bệnh của chế phẩm. Để khắc phục hạn chế này các nhà nghiên cứu áp dụng công nghệ protein tái tổ hợp để sản xuất chitinase qui mô công nghiệp. Hướng đi này giúp nâng cao hiệu suất sinh tổng hợp chitinase đồng thời dễ dàng tinh sạch và thu hồi enzyme hơn so với việc sử dụng chủng tự nhiên. Nhằm mục đích thu được lượng lớn enzyme có hoạt tính cao, chúng tôi tiến hành biểu hiện và thu nhận chitinase tái tổ hợp (rChiA) từ chủng Btk trong *E. coli*. Gene mã hóa chitinase của chủng Btk được thiết kế vào vector biểu hiện pET28b(+) tại vị trí *EcoRI* và *XhoI*. Protein tái tổ hợp được biểu hiện ở dạng tan và vẫn duy trì hoạt tính sinh học. Hoạt tính của chitinase tái tổ hợp tăng 1,26 lần so với chitinase tự nhiên. rChiA được tinh sạch thành công bằng sắc ký ái lực sử dụng cột Probond Nickel Resin. Kết quả thử nghiệm cho thấy, chitinase tái tổ hợp có khả năng kháng 2 loại nấm gây bệnh thực vật là *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctinia solani* nhưng không gây ảnh hưởng đến *Mucor* sp. Ngoài ra, chitinase tái tổ hợp còn làm tăng hoạt tính diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*) và sâu khoang (*Spodoptera litura*) của protein tinh thể thu nhận từ chủng *B. thuringiensis* tự nhiên. Khi sử dụng kết hợp rChiA với protein tinh thể từ chủng SP10.6 đã rút ngắn thời gian gây chết từ 72 giờ xuống còn 48 giờ (gây chết 100% đối với sâu tơ và 84,3% đối với sâu khoang), đồng thời giá trị LC₅₀ giảm 8,04 % và 6,80% lần lượt đối với sâu tơ và sâu khoang.

Từ khóa: kháng nấm, nồng độ gây chết 50%, protein tinh thể, protein tái tổ hợp, tinh sạch protein, vector biểu hiện.

MỞ ĐẦU

Chitin là chất hữu cơ đứng thứ 2 trong tự nhiên sau cellulose. Hàng năm, ước tính có khoảng 29,9 triệu tấn chitin là phụ phẩm từ các loài động vật có vỏ, khoảng 1,4 triệu tấn từ hàu và 0,7 triệu tấn từ mực ống (Narayanan *et al.*, 2014), gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Một trong những phương pháp chuyển hóa chitin tạo các dẫn xuất mạch ngắn chitin-oligosaccharide có giá trị kinh tế và ứng dụng cao, an toàn đối với con người và môi trường là sử dụng chitinase. Các enzyme này có giá trị ứng dụng không chỉ để sản xuất các dẫn xuất enzyme hữu ích mà còn là tác nhân kiểm soát nấm gây bệnh thực vật hoặc tăng hoạt tính diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Barboza-Corona *et al.*, 2008). Chitinase được sản sinh bởi các loài vi sinh vật, thực

viết và một số côn trùng nhưng với hàm lượng rất thấp. Các nhà khoa học đã nghiên cứu sử dụng công nghệ protein tái tổ hợp để sản xuất chitinase qui mô công nghiệp. Hướng đi này giúp nâng cao năng suất sinh tổng hợp enzyme đồng thời lượng enzyme thu được dễ dàng tinh sạch hơn khi sử dụng chủng tự nhiên. Hệ biểu hiện *E. coli* thường được lựa chọn để biểu hiện gen ngoại lai do một số ưu điểm như *E. coli* dễ nuôi cấy, môi trường rẻ tiền, tốc độ sinh trưởng nhanh nên có khả năng tổng hợp lượng lớn protein tái tổ hợp, có thể biểu hiện các protein lên đến 50% protein tổng số của tế bào, điều này giúp dễ dàng tối ưu nâng cao sản lượng protein tái tổ hợp bằng công nghệ lên men và giảm giá thành sản phẩm protein tái tổ hợp. Gene mã hóa chitinase đã được nhiều tác giả trên thế giới nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện trong *E. coli* (Lobo *et al.*, 2013;

Castaneda-Ramírez *et al.*, 2013; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016; Pechsrichuang *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện và tinh sạch chitinase tái tổ hợp trong *E. coli*, đồng thời xác định khả năng ức chế sự phát triển nấm gây bệnh thực vật của chitinase và tác dụng tương hỗ diệt côn trùng của chitinase tái tổ hợp khi kết hợp với protein tinh thể Bt.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Plasmid tái tổ hợp pGEM-chiA mang gen *chiA* mã hóa chitinase đã được thiết kế từ nghiên cứu trước đây (Trịnh Thị Thu Hà *et al.*, 2014). Plasmid pET28b(+) (Novagen) dùng làm vector biểu hiện. Chủng *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen) dùng làm chủng biểu hiện. Enzyme cắt hạn chế *EcoRI*, *XhoI*, thang DNA (Thermo Fisher scientific), thang protein chuẩn (Gangnam-Introbio), chitin powder (Sigma), kháng thể kháng His – tag (Hytect). Cột Probond Nikel Resin (Thermo Fisher Scientific) dùng để tinh sạch rChiA.

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện

Đoạn gen *chiA* được cắt khỏi vector tách dòng pGEM-chiA bằng *EcoRI* và *XhoI* và nối vào vector pET28b(+) đã được xử lý trước đó bằng 2 enzyme trên để tạo thành vector tái tổ hợp pET28chiA.

Biểu hiện rChiA

Các tế bào *E. coli* mang vector biểu hiện pET28chiA được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin nồng độ 50µg/ml, lắc qua đêm ở 37°C rồi chuyển 1% sang môi trường LB mới chứa kháng sinh trên. Tiếp tục nuôi cho đến khi OD_{600nm} = 0,6-0,8 thì bổ sung Isopropylthio-β-galactoside (IPTG) với nồng độ cuối cùng là 0,5 mM để cảm ứng tổng hợp protein ngoại lai. Quá trình biểu hiện rChiA được thực hiện ở 37°C và thu mẫu sau 6 giờ nuôi cấy cảm ứng. Thu tế bào bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút. Protein tái tổ hợp được phân tích bằng SDS-PAGE và Western blot.

Kiểm tra sự biểu hiện của rChiA bằng Western blot

Mẫu protein được điện di biến tính trên gel SDS-PAGE 12,5% và chuyển lên màng PVDF nhờ bộ chuyển màng của BioRad trong 1 giờ, 120V. Sau khi rửa màng 3 lần bằng đệm TBST (0,1% Tween 20 trong đệm Tris-saline), màng được ủ với kháng thể 1

(kháng thể kháng His - tag), độ pha loãng 5000 lần. Sau 1 giờ, màng được rửa lại bằng TBST 3 lần rồi tiếp tục ủ màng với kháng thể 2 (cộng hợp kháng thể kháng kháng thể 1 gắn peroxidase), độ pha loãng 10000 lần ở nhiệt độ phòng 2 giờ. Loại bỏ cộng hợp, rửa màng 3 lần bằng TBST, 1 lần bằng TBS và hiện màu bằng cách bổ sung dung dịch chứa cơ chất cho peroxidase (Promega). Màng trong dung dịch hiện màu được ủ ở nhiệt độ phòng 5 - 10 phút, sau đó được dừng phản ứng bằng H₂O. Quan sát và ghi nhận kết quả.

Tinh sạch protein

Thu tế bào từ 100 ml môi trường biểu hiện bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, hòa tan trong 10 ml đệm phá tế bào (50 mM đệm phosphate, 10 mM imidazole, pH 8), rồi bổ sung 10 mg lysozyme, ủ trong đá 30 phút, siêu âm 10 phút. Ly tâm 13.000 vòng/phút trong 15 phút thu dịch nổi. Chuẩn bị cột Probond Nikel Resin (Thermo Fisher Scientific), rửa và cân bằng cột bằng đệm cân bằng (phosphate 50 mM, imidazole 10 mM, pH 8) như hướng dẫn của nhà sản xuất. Đưa mẫu dịch nổi thu được ở trên lên cột. Các protein không chứa đuôi His-tag sẽ chảy qua cột, và tiếp tục bị loại bỏ trong quá trình rửa cột. Các protein chứa His-tag gắn trên cột được đẩy ra khỏi cột bằng 10 ml đệm đẩy (50 mM đệm phosphate, 250 mM Imidazol, pH 8), thu mỗi phân đoạn 1 ml. Các protein tái tổ hợp sau tinh sạch được kiểm tra trên gel SDS-PAGE và bảo quản ở -80°C.

Thử hoạt tính sinh học

Để xác định hoạt tính kháng nấm của rChiA: nấm *F. oxysporum*, *R. solani* và *Mucor* sp. được cấy thâm và phát triển tốt trên môi trường thạch. Dùng khoan nút chai đường kính 0,7 cm khoan và lấy một thỏi thạch dày 0,5 cm đặt vào giữa đĩa môi trường PDA. Các đĩa PDA được đục lỗ đường kính 0,7 cm và bổ sung 100 µl, 200 µl dung dịch enzyme hoặc dung dịch enzyme đã bất hoạt ở 100°C trong 5 phút (đối chứng) vào mỗi giếng. Hoạt tính ức chế sự phát triển sợi nấm của chitinase được xác định sau 3-5 ngày nuôi ở 28°C.

Nghiên cứu ảnh hưởng của rChiA tinh sạch lên thành tế bào sợi nấm: Nấm được cấy trên lam kính có phủ lớp mỏng môi trường PDA, nuôi 2 ngày ở 28°C thì bổ sung 100 µl rChiA vào sợi nấm. Sau 120 phút ủ ở 40°C, kiểm tra sự thủy phân thành tế bào nấm dưới kính hiển vi như mô tả ở nghiên cứu trước (Harighi *et al.*, 2007).

Xác định khả năng tăng hiệu quả diệt sâu của chitinase: sử dụng 2 loại sâu thử là sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu khoang (*Spodoptera litura*) ở độ tuổi 2. Tiến hành thử theo phương pháp của Park và cộng sự (1997): lá bắp cải hoặc cải xanh được rửa sạch để khô, cắt vào từng đĩa petri. Thí nghiệm được tiến hành trên 3 lô: Lô 1: phun dung dịch protein tinh thể của chủng Bt SP10.6 phân lập từ mẫu đất Sa Pa và có mang gen *cryIAb*, *cryIAC* (gen mã hóa protein CryIAb, CryIAC diệt côn trùng Bộ cánh vẩy) vào đĩa rau cải với nồng độ 300 ng/cm² diện tích bề mặt lá cải (đối với sâu tơ) và 500 ng/cm² (đối với sâu khoang); mỗi nồng độ 3 đĩa và làm khô trong tủ cấy vô trùng. Sau đó cho mỗi đĩa 10 sâu non tuổi 2, sau 24 giờ thử nghiệm kiểm tra số sâu chết sau mỗi 12 giờ; Lô 2: phun dung dịch chitinase tinh sạch với nồng độ 0 và 100 ng/cm². Mỗi nồng độ 3 đĩa, mỗi đĩa 10 con sâu; Lô 3: phun protein tinh thể nồng độ 300 ng/cm² diện tích bề mặt lá cải (đối với sâu tơ) và 500 ng/cm² (đối với sâu khoang), bổ sung chitinase nồng độ 100 ng/cm². Mỗi nồng độ 3 đĩa, mỗi đĩa 10 con sâu.

- Tỷ lệ sâu chết được tính theo công thức Abbott:

$$A = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó, A: % sâu chết; C: Số sâu sống ở mẫu đối chứng; T: Số sâu sống ở mẫu thí nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biểu hiện rChiA trong *E. coli*

Vector tái tổ hợp pET28b(+) mang gen *chiA* từ chủng Btk (pET28chiA) được thiết kế như mô tả ở mục vật liệu và phương pháp nghiên cứu. Để biểu hiện rChiA, vector tái tổ hợp pET28chiA được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng biến nạp được nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung kanamycin và cảm ứng bởi IPTG. Dịch phá tế bào được điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12,5% (Hình 1A).

Kết quả điện di cho thấy, sau cảm ứng xuất hiện một băng protein với kích thước khoảng 70 kDa đậm hơn so với các mẫu còn lại (băng 3, Hình 1A). Kích thước theo lý thuyết của protein ChiA là 74 kDa, gen *chiA* có trình tự tín hiệu dài 34 amino acid (~4 kDa) ở đầu N. Theo thiết kế trong vector biểu hiện, rChiA sẽ được biểu hiện dung hợp với 6 Histidine ở đầu C và 36 amino acid đầu N. Như vậy, protein tái tổ hợp rChiA sẽ có kích thước khoảng 79 kDa. Kết quả biểu

hiện chỉ thu được băng protein khoảng 70 kDa. Như vậy, có thể trình tự tín hiệu đầu N đã bị cắt cùng với 36 amino acid của vector.

Để khẳng định, chúng tôi tiến hành kiểm tra bằng Western blot sử dụng kháng thể kháng His-tag và đồng thời kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp bằng phản ứng DNS. Kết quả Western blot (Hình 1B) cho thấy protein tái tổ hợp phản ứng mạnh với kháng thể kháng His-tag thể hiện bởi băng tín hiệu đậm kích thước ~70 kDa. Ngoài ra trên ảnh Western blot còn xuất hiện một số băng protein có kích thước thấp hơn so với băng 70 kDa và hoàn toàn không có băng nào có kích thước lớn hơn. Sự xuất hiện của băng thấp hơn có thể giải thích là do protein chitinase tái tổ hợp bị thủy phân không đặc hiệu bởi protease trong quá trình chuẩn bị mẫu.

Xác định trạng thái biểu hiện của rChiA

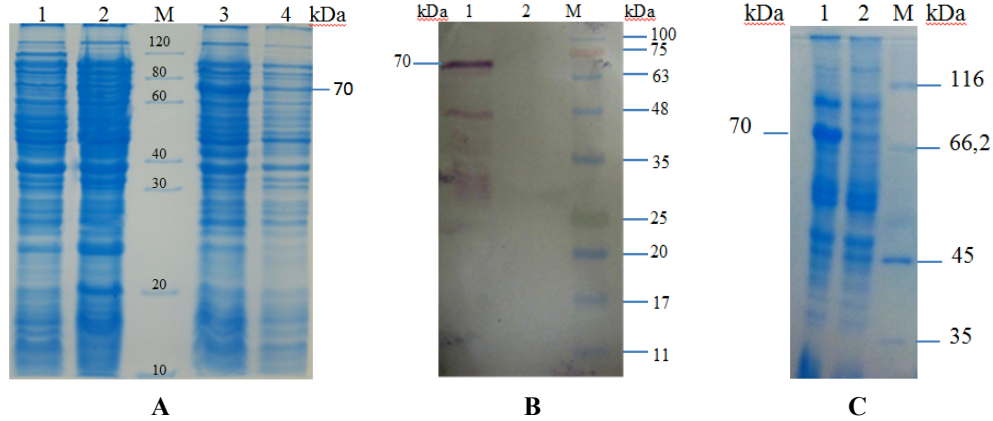
rChiA có thể sẽ không giữ được hoạt tính sinh học khi biểu hiện ở dạng thể vùi (inclusion body). Do đó chúng tôi tiến hành kiểm tra trạng thái biểu hiện rChiA. Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 1C) cho thấy phần lớn protein tái tổ hợp nằm trong phần hòa tan, phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước khi biểu hiện rChiA trong *E. coli* (Lobo *et al.*, 2013; Pechsrichuang *et al.*, 2016).

Từ những kết quả trên, có thể kết luận rằng protein đã được tiết ra khoang chu chất và peptide tín hiệu (gồm 34 amino acid đầu N) đã bị loại bỏ bởi peptidase khi rChiA được chuyển qua màng. Kết quả nghiên cứu trước đó của Lobo (Lobo *et al.*, 2013) cũng cho thấy, gen mã hóa chitinase từ *Chromobacterium violaceum* có chứa peptide tín hiệu, khi biểu hiện trong *E. coli* thu được protein trong môi trường nuôi cấy và rChiA có hoạt tính thủy phân chitin cao. Bên cạnh đó, enzyme chitosanase của *B. subtilis* đã được biểu hiện trong *E. coli*, protein tái tổ hợp dễ dàng thu được từ môi trường nuôi cấy và khoang gian bào do peptide tín hiệu được nhận ra bởi cơ chế tiết của *E. coli* (Pechsrichuang *et al.*, 2016). Ngoài ra, endochitinase từ Bt serovar *konkukian* cũng được biểu hiện trong *E. coli*. Protein tái tổ hợp thu được có kích thước 70 kDa (kích thước của protein trưởng thành sau khi peptide tín hiệu bị cắt) (Mehmood *et al.*, 2010).

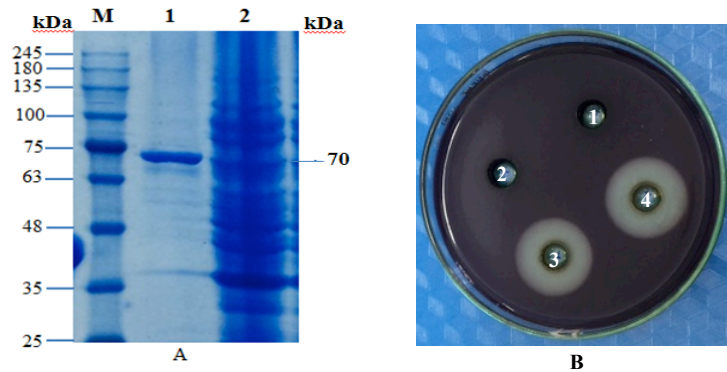
Trong một nghiên cứu trước đó, gen *chiA74* từ Bt đã được biểu hiện trong *E. coli* chủng K12, hoạt tính enzyme tái tổ hợp thu được tăng xấp xỉ 500% so với khi biểu hiện trong *E. coli* DH5 α (Cristobal *et al.*, 2013). Gần đây, gen *chiA* mã hóa endochitinase từ chủng vi khuẩn Bt *tenebrionis* DSM- 2803 đã

được biểu hiện trong *E. coli*. Protein tái tổ hợp thu được có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư ở thực vật (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2016). Thử nghiệm ban đầu cho thấy, hoạt tính chitinase của

protein tái tổ hợp do chúng tôi tạo ra là 1,10 U/ml cao hơn hoạt tính của chitinase tự nhiên 1,26 lần (kết quả không nêu ở đây). Do đó có thể kết luận rằng chitinase tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong *E. coli*.



Hình 1. Protein kiểm tra sự biểu hiện của rChiA trên gel SDS-PAGE (A) ; Phân tích Western blot (B) và Trạng thái biểu hiện của rChiA (C). A: Bảng 1: Protein tổng số từ chủng E. coli 21 mang vector pET28 trước cảm ứng; Bảng 2: Protein tổng số từ chủng E. coli BL21 mang vector pET28 sau cảm ứng; Bảng 3: Protein tổng số từ chủng E. coli BL21(DE3) mang pET28chiA sau cảm ứng IPTG; Bảng 4: Protein tổng số từ chủng E. coli BL21(DE3) mang pET28chiA trước cảm ứng IPTG; B: Bảng 1: Dịch chiết protein từ E. coli BL21(DE3) mang pET28chiA sau cảm ứng; Bảng 2: Dịch chiết protein từ E. coli BL21(DE3) mang pET28chiA trước cảm ứng; M: Thang protein chuẩn. C: Bảng 1. Protein tổng số ở pha tan; Bảng 2. Protein tổng số ở thể vùi; M: Thang protein chuẩn.



Hình 2. Điện di SDS-PAGE của chitinase tinh sạch (A) và thử nghiệm hoạt tính chitinase trước và sau tinh sạch bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. A: M. Thanh protein chuẩn, 1. Protein sau tinh sạch, 2. Protein trước tinh sạch. Hình B: 1, 2. Đối chứng (1. Protein tổng số từ E. coli không mang gen chiA, 2. Đệm chiết protein khi tinh sạch), 3. Protein trước tinh sạch, 4. Protein sau tinh sạch.

Tinh sạch protein chitinase tái tổ hợp

Như trình bày ở trên, rChiA biểu hiện ở dạng hòa tan và có gắn thêm đuôi His-tag, do đó chúng tôi tiến hành tinh sạch bằng phương pháp không biến tính sử dụng cột Probond Nikel Resin như hướng dẫn của hãng Thermo Fisher Scientific. Protein thu được sau tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel

SDS-PAGE (Hình 2A). Kết quả phân tích bằng bằng phần mềm Dolphin 1D cho thấy, protein chitinase tái tổ hợp có độ tinh sạch trên 94% , ít lẫn các protein tạp. Hoạt tính của dịch rChiA trước và sau tinh sạch được định tính sơ bộ bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch có chứa chitin huyền phù 0,5%. Kết quả cho thấy các giếng đều xuất hiện vòng thủy phân chitin màu trắng sau khi nhuộm bằng dung dịch 1% lugol (Hình 2B), trong khi đó ở mẫu

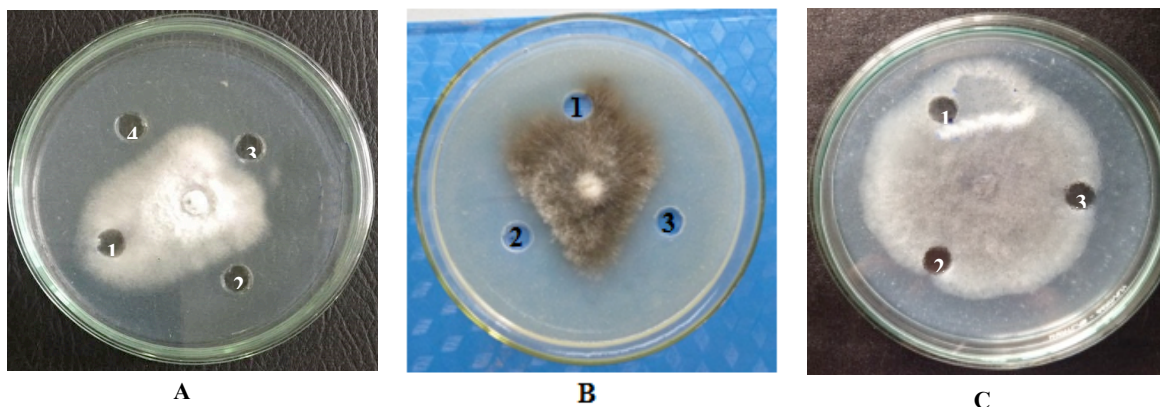
đối chứng âm (dịch protein từ chủng vi khuẩn *E.coli* không mang gen *chiA* và dung dịch đệm tinh sạch protein) không cho vòng phân giải chitin. Kết quả này chứng tỏ rChiA đã được tinh sạch thành công và vẫn giữ được hoạt tính sinh học mong muốn.

Thử nghiệm khả năng kháng nấm gây bệnh thực vật rChiA

Hoạt tính ức chế sự phát triển của một số nấm gây bệnh thực vật như *F. oxysporum* và *R. solani* của rChiA đã được chúng tôi thử nghiệm. Các bước được thực hiện như mô tả ở trên, hoạt tính ức chế được quan sát sau 3-5 ngày tiến hành thí nghiệm. Kết quả cho thấy, ở giếng bổ sung rChiA thì sợi nấm phát triển kém hẳn so với giếng đối chứng bổ sung enzyme đã bất hoạt (Hình 3A, 3B). Đối với nấm *Mucor* sp. thì sợi nấm ở giếng bổ sung chitinase vẫn phát triển bình thường giống như ở giếng đối chứng (Hình 3C). Mặt khác khi quan sát dưới kính hiển vi chúng tôi nhận thấy, nấm *F. oxysporum* và *R. solani* xử lý với rChiA thì sợi nấm bị thủy phân, biến dạng trong khi sợi nấm xử lý với nước vẫn giữ nguyên hình dạng ban đầu. Ngược lại, sợi nấm *Mucor* sp.

không ảnh hưởng gì khi xử lý với rchiA (Hình 4).

Kết quả nghiên cứu gần đây cho thấy, chitinase có hoạt tính kháng nấm khác nhau là do cấu trúc bề mặt và tỷ lệ chitin trong thành tế bào nấm khác nhau (Yan *et al.*, 2008). Chitinase có thể dễ dàng tương tác với chitin có trong thành tế bào nấm khi các vật liệu bên ngoài được sắp xếp theo cách cho phép tiếp xúc với bó sợi chitin trên bề mặt của thành tế bào nấm. Các enzyme dễ dàng liên kết với cơ chất chitin trong thành tế bào nấm, sau đó tăng vận tốc thủy phân chitin và ức chế các nấm gây bệnh. Trên thế giới đã có nhiều công bố về khả năng kháng nấm của chitinase từ các vi sinh vật khác nhau: chitinase từ loài *Apergillus terreus* có khả năng kháng 7 loại nấm gây bệnh thực vật với mức độ khác nhau, trong đó hoạt tính thể hiện mạnh nhất đối với *A. niger* và yếu nhất đối với *F. oxysporum* (Aida, Taghreed, 2014), chitinase tái tổ hợp biểu hiện trong *Pichia pastoris* có thể ức chế một cách hiệu quả sự phát triển của *Rhizopus stolonifer* và *Botrytis squamosal* nhưng không gây ảnh hưởng đáng kể đến *Aspergillus niger* và *Pythium aphanidermatum* (Yan *et al.*, 2008).



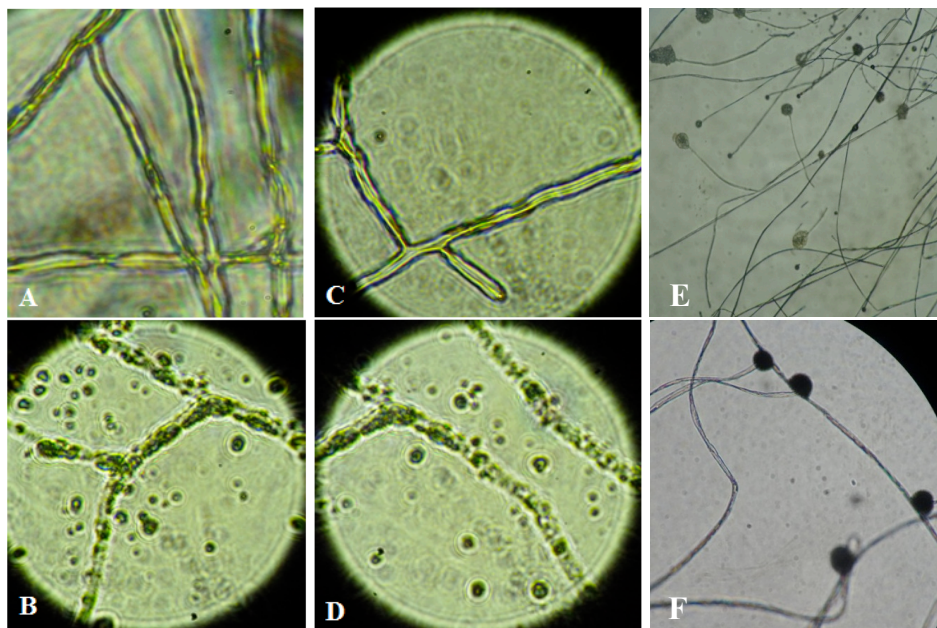
Hình 3. Sự ức chế phát triển nấm *F. oxysporum* (A), *R. solani* (B) và *Mucor* sp. (C) của rChiA. 1: đối chứng (nước), 2-4: rChiA.

Hiệu quả diệt côn trùng của rChiA

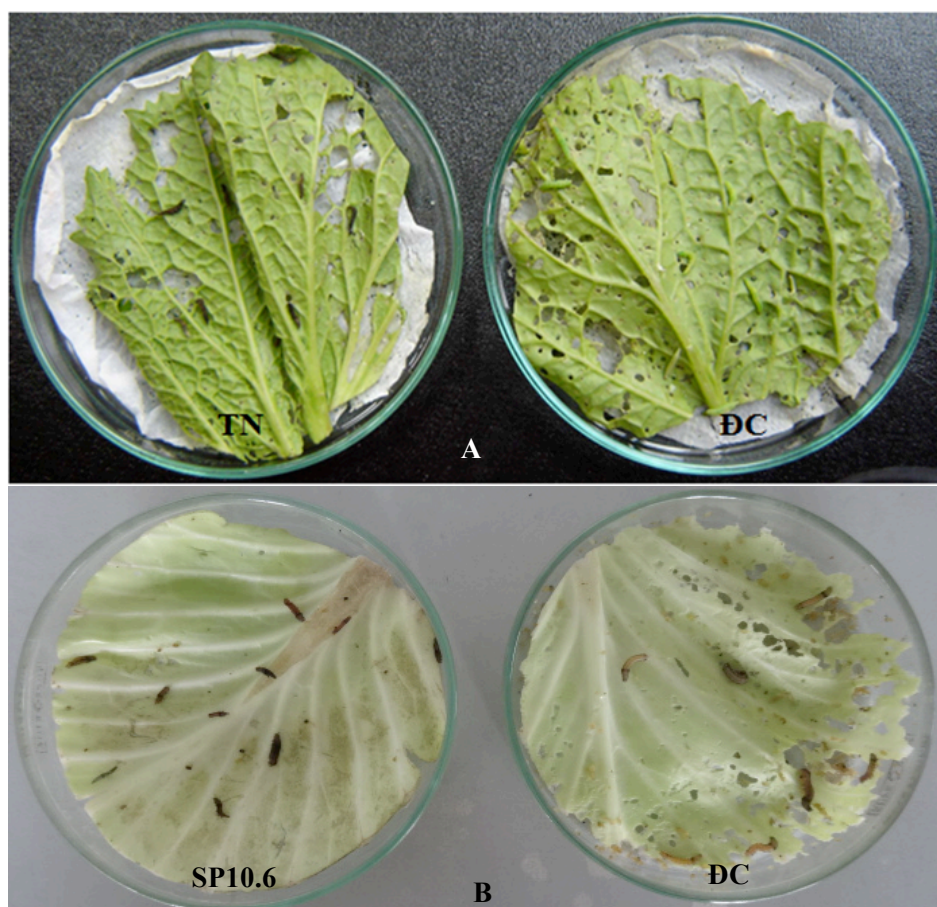
Chủng *B. thuringiensis* SP10.6 cho hoạt tính diệt sâu tơ (100%) và sâu khoang (83.3%) sau 72 giờ thử nghiệm. Hoạt tính diệt côn trùng này là do protein tinh thể độc Cry1Ab, Cry1Ac của chủng Bt SP10.6, khi tách riêng Cry1Ab, Cry1Ac và thử nghiệm khả năng diệt côn trùng thì 2 protein tinh thể này vẫn thể hiện hoạt tính cao. Đặc biệt khi kết hợp Cry1Ab, Cry1Ac với rChiA thì sâu chết nhanh hơn, tỷ lệ chết đạt 100% và 84.3% sau 48 giờ xử lý tương ứng đối

với sâu tơ và sâu khoang. Trong khi đó, khi chỉ xử lý với rChiA đơn lẻ thì tỷ lệ chết của sâu tơ và sâu khoang không đáng kể (dưới 10% sau 72 giờ thử nghiệm) (Hình 5, Hình 6).

Từ kết quả trên tiến hành xác định giá trị LC_{50} của protein tinh thể từ chủng Bt SP10.6, chúng tôi thu được kết quả sau: LC_{50} đối với sâu tơ là 167,8 ng/cm^2 , đối với sâu khoang là 283,5 ng/cm^2 . Giá trị LC_{50} khi kết hợp với rchiA là 154,3 ng/cm^2 đối với sâu tơ và 264,2 ng/cm^2 đối với sâu khoang (Bảng 1).



Hình 4. Sợi nấm *F. oxysporum*, *R. solani* và *Mucor* sp. khi xử lý với nước (A, C, E) và với rChiA (B, D, F). Nấm *F. oxysporum* và *R. solani* xử lý với rChiA thì sợi nấm bị thủy phân, biến dạng (B, D) trong khi sợi nấm xử lý với nước vẫn giữ nguyên hình dạng ban đầu (A, C). Sợi nấm *Mucor* sp. không ảnh hưởng gì khi xử lý với rChiA (F).



Hình 5. Hình ảnh thử sâu tơ (A) và sâu khoang (B) của rChiA và tinh thể Cry.

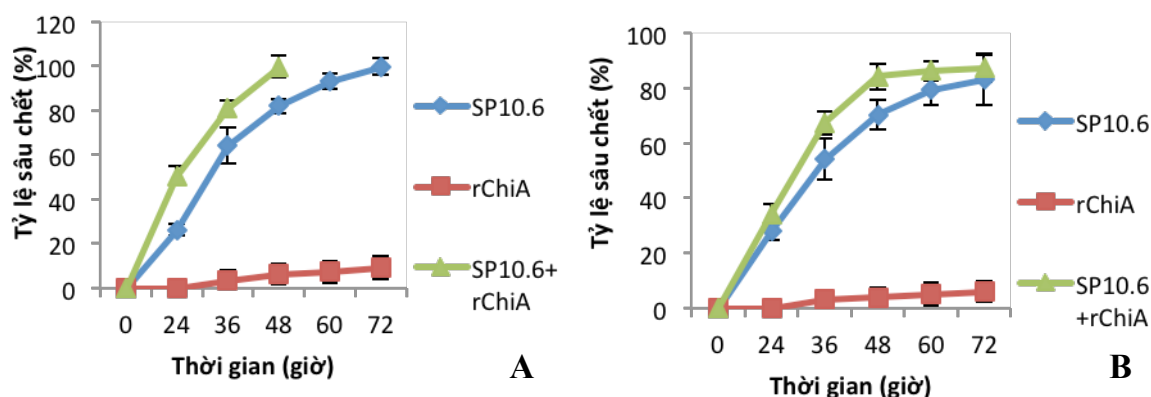
Như vậy, sử dụng kết hợp rChiA với protein tinh thể từ chủng Bt SP10.6 đã rút ngắn thời gian gây chết từ 72 giờ xuống còn 48 giờ (tỷ lệ chết 100% đối với sâu tơ và 84,3% đối với sâu khoang), đồng thời giá trị LC₅₀ giảm 8,04% và 6,80% đối với sâu tơ và sâu khoang. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với kết quả của các nghiên cứu trước đó (Ni *et al.*, 2015). Theo Ni, khi thêm chitinase tinh sạch Chi9602 và ChiW50A vào chế phẩm bào tử, tinh thể của chủng Bt YBT-1502 đã làm tăng hoạt tính diệt côn trùng đối với ấu trùng sâu bướm *H. armigera*, thể hiện ở giá trị LC₅₀ giảm 17,6% và 30,4% tương ứng.

Chitinase có tác dụng tăng khả năng diệt côn

trùng và rút ngắn thời gian gây chết côn trùng do enzyme này dễ dàng phân hủy màng peritrophic, đây là lớp màng bao bọc ruột giữa côn trùng, màng này có cấu trúc cơ bản là protein và sợi chitin. Đây là bức rào ngăn cản sự nhiễm trùng do vi khuẩn hoặc vi rút nhưng cho phép dòng chảy của các chất dinh dưỡng, chất khoáng và nước. Khi chitinase tiếp xúc với màng peritrophic thì enzyme này phân cắt ngẫu nhiên ở các vị trí bên trong mạch chitin dẫn đến sự suy yếu của ruột giữa côn trùng, gây thủng màng peritrophic, tạo điều kiện cho độc tố Cry tăng cường khả năng tiếp xúc với các thụ thể ở biểu mô ruột, giúp cho quá trình gây độc của protein tinh thể Cry diễn ra dễ dàng hơn và nhanh hơn.

Bảng 1. Nồng độ gây chết 50% (LC₅₀) của protein tinh thể Cry và rChiA.

Mẫu thử nghiệm	LC ₅₀ sâu tơ (ng/cm ²)	LC ₅₀ sâu khoang (ng/cm ²)
SP10.6	167,8	283,5
SP10.6 + rChiA	154,3	264,2



Hình 6. Thử nghiệm khả năng diệt sâu tơ (A) và sâu khoang (B) của protein tinh thể Cry, rChiA. Protein tinh thể của chủng SP10.6 khi sử dụng đơn lẻ thì tỷ lệ chết đạt 100% và 83,3% đối với sâu tơ và sâu khoang sau 72 giờ thử nghiệm, khi sử dụng kết hợp với rChiA thì sâu chết nhanh hơn, tỷ lệ chết đạt 100% và 84,3% sau 48 giờ xử lý tương ứng đối với sâu tơ và sâu khoang. Enzyme rChiA sử dụng đơn lẻ thì tỷ lệ chết của sâu tơ và sâu khoang không đáng kể (dưới 10% sau 72 giờ thử nghiệm)

KẾT LUẬN

Đã biểu hiện thành công gen *chiA* mã hóa protein chitinase từ chủng vi khuẩn Btk MSS1.1 trong *E. coli*. Chitinase tái tổ hợp thu được ở dạng tan và có hoạt tính cao gấp 1,26 lần so với chitinase tự nhiên. rChiA sau khi tinh sạch có khả năng kháng 2 loại nấm gây bệnh thực vật là *F. oxysporum* và *R. solani*. Ngoài ra, sử dụng kết hợp rChiA với protein tinh thể Cry đã rút ngắn thời gian gây chết từ 72 giờ

xuống còn 48 giờ (tỷ lệ chết 100% đối với sâu tơ và 84,3% đối với sâu khoang), đồng thời giá trị LC₅₀ giảm 8,04 % và 6,80% tương ứng đối với sâu tơ và sâu khoang.

Lời cảm ơn: Công trình được sự tài trợ của Nhiệm vụ Quỹ gen của Bộ Khoa học và Công nghệ: “Khai thác và phát triển nguồn gen diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* phục vụ cho sản xuất chế phẩm sinh học” do PGS. TS. Ngô Đình Bình làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aida FM, Taghreed AS (2014) Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. *Afr J Biotechnol* 13(14): 1567-1578
- Barboza-Corona JE, Reyes-Rios DM, Salcedo-Hernández R, Bideshi D (2008) Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *Mol Biotechnol* 39(1): 29-37
- Castaneda-Ramirez JC, de la Fuente-Salcido NM, Salcedo-Hernandez R, León-Galvan F, Bideshi DK, Barboza – Corona JE (2013) High-level synthesis of endochitinase ChiA74 in *Escherichia coli* K12 and its promising potential for use in biotechnology. *Folia Microbiol* DOI 10.1007/s12223-013-0229-7k
- De la Fuente-Salcido NM, Casados-Vázquez LE, García-Pérez AP, Barboza-Pérez UE, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R, García-Almendarez BE, Barboza-Corona JE (2016) The endochitinase ChiA Btt of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM-2803 and its potential use to control the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiology Open* 5(5): 819–829.
- Trịnh Thị Thu Hà, Đồng Văn Quyền, Đặng Văn Tiến, Ngô Đình Bình (2014) Phân lập gen mã hóa endochitinase từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* tại Hà Nội. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 12(4): 757-763
- Harighi MJ, Zamani MR, Motallebi M (2007) Evaluation of antifungal activity of purified chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220. *Biotechnol* 6(1): 28-33
- Lobo MD, Silva FD, Landim PG, da Cruz PR, de Brito TL, de Medeiros SC, Oliveira JT, Vasconcelos IM, Pereira HD, Grangeiro TB (2013) Expression and efficient secretion of a functional chitinase from *Chromobacterium violaceum* in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol* 13: 46. doi: 10.1186/1472-6750-13-46.
- Mehmood MA, Xiao X, Hafeez FY, Gai Y, Wang F (2010) Molecular characterization of an endochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian*. *World J Microbiol Biotechnol* 26(12): 2171–2178
- Narayanan K, Karthik A, Parameswaran B and Ashok P (2014) Production, purification and properties of fungal chitinases-A review. *Indian J Exp Biol* 52: 1025-1035.
- Ni H, Zeng S, Qin X, Sun X, Zhang S, Zhao X, Yu Z, Li L (2015) Molecular docking and site-directed mutagenesis of a *Bacillus thuringiensis* chitinase to improve chitinolytic, synergistic Lepidopteran-larvicidal and nematocidal activities. *Int J Biol Sci* 11(3): 304-315
- Park SH, Koo BT, Shin BS, Choi SK, Jeong YM, Pan JG and Kim JI (1997) Characterization of 1925 *Bacillus thuringiensis* isolates from plants in Korea. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 25(2): 159-165.
- Pechsrichuang P, Songsiririthigul C, Haltrich D, Roytrakul S, Namvijitr P, Bonaparte N, Yamabhai M (2016) OmpA signal peptide leads to heterogenous secretion of *B. subtilis* chitosanase enzyme from *E. coli* expression system. *Springerplus* 5(1): 1200 doi: 10.1186/s40064-016-2893-y
- Yan R, Hou J, Ding D, Guan W, Wang C, Wu Z, Li M (2008) In vitro antifungal activity and mechanism of action of chitinase against four plant pathogenic fungi. *J Basic Microbiol* 48(4): 293–301.

EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT CHITINASE FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *KURSTAKI* IN *ESCHERICHIA COLI*

Trịnh Thị Thu Hà^{1,2}, Đồng Văn Quyền^{1,2}, Ngô Đình Bình¹

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive soil bacterium that is known to be a bacterial biopesticide that produces insecticidal proteins called crystal proteins (Cry). Chitinase, an enzyme produced by *B. thuringiensis*, facilitate the invasion of Cry proteins into epithelial membranes and lead to cell death by forming ionic pores on the cell membranes. Previously, we have isolated a *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* (Btk) strain MSS1.1 showing high chitinase activities. This BtK strain has been used to produce biopesticides, however it showed some limitations such as high cost and difficult to increase the biosynthesis of chitinase - a key enzyme in antifungal and pesticidal activities of *B. thuringiensis*. In this study, we cloned and expressed a chitinase gene (*chiA*) from BtK in *Escherichia coli*. The recombinant Chitinase (rChiA) was expressed in a soluble form and successfully purified by ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Thermo fisher scientific) under native condition and its bioactivities was also characterized. The chitinase activity of rChiA was 1.26 times higher than the native enzyme. The rChiA revealed toxicity against pathogenic fungi *F.oxysporum* and *R. solani* but has no

effect on *Mucor* sp. In addition, the rChiA showed increased larval insecticidal synergism activity of Cry proteins to *Plutella xylostella* and *Spodoptera litura*. When using rChiA combined with crystal proteins from SP10.6 strain, the killing time was reduced from 72 hours to 48 hours (100% lethal rate for *Plutella xylostella* and 84.3% for *Spodoptera litura*), the LC₅₀ value decreased by 8.04% and 6.80% toward *Plutella xylostella* and *Spodoptera litura*, respectively.

Keywords: antifugi, lethal concentration 50%, crystal protein, recombinant protein, protein purification, expression vector.