

TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN LIGNIN PEROXIDASE H8 CỦA *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* TRONG *PICHIA PASTORIS*

Phí Quyết Tiến, Vũ Văn Lợi, Phan Thị Hồng Thảo, Phạm Thị Bích Hợp

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Gen *mlipH8* mã hóa isoenzyme lignin peroxidase (LiP) H8 đã loại bỏ peptide tín hiệu được khuếch đại từ cDNA của nấm mục trắng *Phanerochaete chrysosporium* 36210. Kết quả giải và phân tích trình tự nucleotide cho thấy, *mlipH8* của chủng 36210 - gồm 990 nucleotide mã hóa cho 330 amino acid - có độ tương đồng cao (92 - 99%) so với trình tự của các gen tương ứng trên GenBank. Ngoài ra, gen *mlipH8* trong nghiên cứu (mã số truy cập GU119913 trên GenBank) bị thiếu hụt (deleted) 42 nucleotide mã hóa cho 14 amino acid so với gen *mlipH8* của các chủng *P. chrysosporium* khác. Từ kết quả nhận được, chúng tôi đã xây dựng cây phân loại dựa trên phân tích trình tự LiP H8 nhận được trong nghiên cứu. Gen *mlipH8* được gắn vào vector biểu hiện pPIC9 tạo plasmid tái tổ hợp pPIC9-*mlipH8* và biến nạp vào nấm men *Pichia pastoris* GS115 (*his4*). Nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPIC9-*mlipH8* biểu hiện hoạt tính LiP ngoại bào cao trong môi trường lên men, trong đó chủng C138 thể hiện hoạt tính cao nhất đạt 15476 nkat.L⁻¹ sau 120 h nuôi cấy.

Từ khóa: Lignin, Lignin peroxidase H8, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pichia pastoris*, protein tái tổ hợp

MỞ ĐẦU

Lignocellulose là thành phần cấu trúc chính của thực vật, có mặt trong nguyên liệu, phụ phẩm và chất thải của sản xuất nông, lâm, công nghiệp. Lignocellulose chứa lignin, hemicellulose và cellulose, trong đó lignin (chiếm khoảng 20 - 30% sinh khối khô) là hợp chất khó bị phân giải nhất. Lignin là polymer của các phenylpropanoid phức tạp được cấu trúc từ ba loại rượu thơm coniferyl, sinapsyl và p-coumaryl (Elis Nina, 2002).

Trong quy trình sản xuất bột giấy, cần phải loại bỏ lignin khỏi sinh khối gỗ và giữ lại bột giấy (cellulose và một phần hemicellulose) sao cho độ dài, độ bền của xơ sợi chứa cellulose được bảo tồn cao nhất. Một trong các hướng có triển vọng được quan tâm nhiều là sử dụng các enzyme phân hủy lignin trong sản xuất bột giấy và giấy (xử lý dăm mảnh nguyên liệu, tẩy trắng bột giấy, khử màu nước thải) nhằm giảm sử dụng hóa chất và giảm thải các chất độc hại ra môi trường (Elis Nina, 2002). Các enzyme phân hủy lignin quan trọng nhất là lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) và laccase (Wang *et al.*, 2004; KirK *et al.*, 1996; Gettemy *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2006). LiP là enzyme phân hủy lignin mạnh nhất, oxy hóa các tiểu phân lignin không chứa hợp chất phenol (chiếm 90% polymer của các phenylpropanoid) (Gold *et al.*, 2000; Martinez, 2002). Các nghiên cứu trước đây cho thấy khi sử

dụng enzyme phân hủy lignin từ *Phanerochaete chrysosporium* để tẩy trắng bột giấy cho phép giảm 2/3 hàm lượng lignin, độ trắng của bột tăng 54,6% (Elis Nina, 2002).

LiP được mã hóa bởi một tổ hợp các gen và đã được biểu hiện như là sản phẩm đồng hóa bậc hai của quá trình nuôi cấy. Trong dịch nuôi cấy *P. chrysosporium* đã tách ra được 6 loại isoenzyme LiP bao gồm các enzyme H1, H2, H6, H7, H8 và H10 (Ollikka *et al.*, 1993; Leisola *et al.*, 1987). Các isoenzyme này được cho rằng có thể tạo ra từ quá trình sửa đổi các protein sau quá trình dịch mã (*post-translational modification*). Các gen mã hóa enzyme H2, H6, H8 và H10 đã được xác định và giải trình tự trong khi một số gen mã hóa các isoenzyme LiP khác chưa được xác định. Trong các isoenzyme trên thì LiP H2 và LiP H8 có hoạt tính phân hủy lignin cao hơn. Khi biểu hiện enzyme tái tổ hợp LiP H8 trên *Escherichia coli*, enzyme chỉ có hoạt tính khi thực hiện cuộn lại (*refolding*) các thể vùi LiP đã biến tính (*denatured inclusion bodies*) (Doyle, Smith, 1996). Vì vậy, biểu hiện LiP H8 trong các vi sinh vật khác như nấm men, nấm mốc, nấm mục... nhằm thu enzyme LiP hoạt tính cao đang được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới quan tâm (Wang *et al.*, 2004; Martinez, 2002; Wang, Wen, 2009; Doyle, Smith, 1996).

Ở Việt Nam, hiện nay chưa có công trình nghiên cứu nào biểu hiện các isoenzyme LiP từ *P.*

chrysosporium và ứng dụng trong công nghệ sản xuất bột giấy (Nguyễn Thị Thanh Kiều, Phạm Thành Hồ, 2002). Do vậy, mục tiêu của của nghiên cứu này là tách dòng và biểu hiện isoenzyme LiP H8 của *P. chrysosporium* trong nấm men *Pichia pastoris* nhằm thu enzyme tái tổ hợp có hoạt tính cao.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống vi sinh vật, vector và vật liệu khác

Chủng nấm mục trắng (white rot fungus) *Phanerochaete chrysosporium* 36201 nhận từ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. Chủng *Escherichia coli* XL1-blue [$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac}$] (Stratagene, Mỹ) được sử dụng để nhân dòng gen. Chủng nấm men *Pichia pastoris* GS115 (*his4*) (Invitrogen, Mỹ) mất khả năng sinh tổng hợp histidine được sử dụng làm chủng chủ để biểu hiện enzyme tái tổ hợp LiP H8.

Vector tách dòng pCR⁺2.1 (Invitrogen, Mỹ) được sử dụng để tạo dòng gen, vector pPIC9 (Invitrogen, Mỹ) được sử dụng để thiết kế vector biểu hiện.

Khuếch đại gen mã hóa LiP H8 từ cDNA

Tách RNA tổng số của nấm mục trắng *P. chrysosporium* 36201 và tổng hợp DNA bổ sung (cDNA) từ RNA tổng số bằng quá trình sao chép ngược (reverse transcription - RT) theo nghiên cứu của Phi Quyết Tiến và đồng tác giả (2009).

Sử dụng phần mềm Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) để thiết kế cặp mồi đặc hiệu có gắn thêm trình tự các enzyme giới hạn *EcoRI* và *NorI* (trình tự in nghiêng và gạch chân) nhằm khuếch đại một phần gen *lipH8* mã hóa cho LiP H8 đã loại bỏ trình tự của peptide tín hiệu (mature lignin peroxidase H8 - *mlipH8*). Gen *mlipH8* của nấm mục trắng *P. chrysosporium* 36201 được khuếch đại bằng phản ứng Polymerase Chain Reaction (PCR) từ khuôn cDNA sử dụng cặp mồi: Ex-Lig-F (5'-GGAATTCGCACCTGTTCCAACGGCA-3') Ex-Lig-R (5'-CGCGGCCGCTTAAACACCGGAGGCGGA-3') theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút, 30 chu trình (94°C trong 60 giây, 59°C trong 45 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 10 phút rồi giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, tinh sạch bằng kit PureLinkTM - DNA Purification (Invitrogen).

Tách dòng và phân tích trình tự gen *mlipH8*

Gen *mlipH8* có kích thước 0,99 kb sau khi tinh sạch được gắn vào vector pCR⁺2.1 (TA cloning Kit, Invitrogen) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Trình tự nucleotide của gen *mlipH8* trên vector tách dòng pCR⁺2.1 được xác định trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM[®]3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả đọc trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm phân tích DNA STAR (Lasergene Inc., Madison, WI, USA), so sánh với các gen tương ứng đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST trên NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Trình tự amino acid suy định của *mlipH8* được phân tích và so sánh với trình tự amino acid của các protein tương ứng bằng công cụ Clustal-X (version 1.83), xây dựng cây phân loại bằng phần mềm TreeView.

Tạo chủng nấm men tái tổ hợp

Xử lý vector pCR2.1::*mlipH8* và pPIC9 dòng thời với hai enzyme giới hạn *EcoRI* và *NorI*. Tinh sạch gen *mlipH8*, vector pPIC9 và thực hiện phản ứng ghép nối DNA bằng enzyme T4 ligase ở 22°C trong thời gian 1 h. Biến nạp toàn bộ sản phẩm nhận được sau phản ứng ghép nối DNA vào chủng *E. coli* XL1-blue. Tách plasmid pPIC9-*mlipH8* thu được trong tế bào *E. coli*, xử lý bằng enzyme giới hạn để kiểm tra kích thước của gen *mlipH8* được chèn trong vector biểu hiện pPIC9. Mở vòng plasmid pPIC9-*mlipH8* bằng enzyme giới hạn *Sal I* và biến nạp vào chủng nấm men *Pichia pastoris* GS115 bằng xung điện. Toàn bộ DNA (pPIC9-*mlipH8* expression cassette) được tách hợp vào bộ gen của chủng *P. pastoris* GS115 (*his4*) nhờ trao đổi chéo một phần đoạn gen histidinol dehydrogenase (*his4*) trên vector pPIC9-*mlipH8* với gen tương ứng trên bộ gen của nấm men. Các chủng *P. pastoris* GS115/pPIC9-*mlipH8* tái tổ hợp được lựa chọn trên đĩa thạch MD (1,34% yeast nitrogen base (YNB); 4×10^{-5} % biotin, 2% dextrose) và kiểm tra hoạt tính enzyme LiP H8, tính kháng kháng sinh geneticin. Đánh giá sự có mặt của gen *mlipH8* trên bộ gen nấm men nhờ phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 5'A0X1 (GACTGGTTCACCAATTGACAAGC) và 3'A0X1 (GCAATGGCATTCTGACATCC).

Sàng lọc chủng nấm men biểu hiện LiP H8 tái tổ hợp hoạt tính cao

Các chủng nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPIC9-*mlipH8* được nuôi cấy trong môi trường lỏng BMMY (1% cao nấm men, 1% pepton; 100mM potassium phosphate, pH 6,0; 1,34% YNB; $4 \times 10^{-5}\%$ biotin; 1% methanol) trên máy lắc tốc độ 220 vòng/phút, nhiệt độ 30°C trong 24 h. Tiếp đó, gây cảm ứng quá trình sinh tổng hợp enzyme LiP H8 tái tổ hợp bằng methanol sao cho nồng độ cuối cùng đạt 2% (v/v). Dịch lên men các chủng nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPIC9-*mlipH8* sau 2, 3, 4, 5 ngày nuôi cấy được xác định hoạt tính LiP H8. Mẫu đối chứng là chủng GS115/pPIC9 không được tích hợp gen *mlipH8* vào bộ gen của nấm men.

Xác định hoạt tính enzyme lignin peroxidase

Ly tâm dịch lên men các chủng *P. pastoris* GS115/pPIC9-*mlipH8* ở 4.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu dịch enzyme LiP H8. Hoạt tính LiP H8 được xác định theo phương pháp của Niladevi và đồng tác giả (2005) sử dụng cơ chất 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). Phản ứng được thực hiện trong hỗn hợp bao gồm các phần đều nhau 200 μ l của: đệm potassium phosphate 100 mM (pH 7,0) 200 μ l; 4-amino antipyrine 16 mM: 200 μ l; 2,4-dichlorophenol 25 mM: 200 μ l; dịch enzyme LiP

H8 thô: 200 μ l; dung dịch H_2O_2 50 mM (được bổ sung cuối cùng): 200 μ l. Phản ứng được thực hiện ở 37°C trong thời gian 1 phút rồi đo độ hấp thụ ánh sáng trên máy quang phổ ở bước sóng 510 nm. Hoạt tính enzyme (đơn vị $nkat.L^{-1}$) được xác định với hệ số hấp thụ (ϵ) của 2,4-DCP là $21.647 M^{-1}cm^{-1}$.

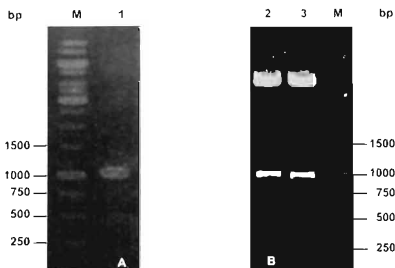
Đăng ký trình tự *mlipH8* trên GenBank

Trình tự gen *mlipH8* của chủng nấm mục trắng *P. chrysosporium* 36210 nhận được trong nghiên cứu này được đăng ký trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank với mã số truy cập là GU119913. Trình tự của các amino acid suy diễn tương ứng dưới mã số truy cập ACY82388.1

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại gen mã hóa LiP H8

RNA tổng số tách từ chủng *P. chrysosporium* 36210 được kiểm tra trên gel agarose cho thấy RNA có hai băng đậm nét hơn lần lượt thể hiện cho tiểu phần 28S rRNA và 18S rRNA của nấm mục trắng (kết quả không công bố). Phản ứng tổng hợp cDNA từ khuôn RNA tổng số cho một dải DNA đại diện cho hỗn hợp các đoạn cDNA có độ dài khác nhau trên agarose gel (kết quả không công bố).



Hình 1. Sản phẩm PCR khuếch đại gen *mlipH8* (A) và plasmid pCR2 1::*mlipH8* (B) trên gel agarose 1,0%. M. Thang DNA chuẩn; 1. Sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại gen *mlipH8* từ cDNA của nấm mục trắng *P. chrysosporium* 36210 2 và 3. Plasmid pCR2 1::*mlipH8* được cắt bởi enzyme giới hạn *EcoRI*.

Gen *mlipH8* mã hóa Lip H8 đã loại bỏ peptide tín hiệu của *P. chrysosporium* 36210 được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ khuôn cDNA sử dụng cặp mồi Ex-Lig-F và Ex-Lig-R cho một băng DNA duy nhất có kích thước 1,0 kb trên bản gel agarose, tương ứng với kích thước mong đợi khi thiết kế mồi khuếch đại gen *mlipH8* từ *P. chrysosporium* (Hình 1A). Kết quả khuếch đại gen *mlipH8* bằng phản ứng PCR cho thấy cặp mồi được thiết kế trong thí nghiệm là phù hợp và đặc hiệu.

Tách dòng và phân tích trình tự gen *mlipH8* của *P. chrysosporium* 36210

Sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại gen *mlipH8*

được tinh sạch và gắn vào vector tách dòng pCR[®]2.1. Sau khi được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* XL1-blue và nuôi trên môi trường LB có bổ sung 100 µg/ml ampicillin, plasmid pCR[®]2.1::*mlipH8* được tinh sạch và xử lý với enzyme giới hạn *EcoRI*. Kết quả điện di kiểm tra plasmid pCR[®]2.1::*lipH8* sau khi xử lý với enzyme giới hạn cho thấy hai băng DNA rõ nét có kích thước lần lượt là 1,0 kb và 3,9 kb thể hiện cho gen *mlipH8* và vector pCR[®]2.1 trên gel agarose (Hình 1B). Từ những kết quả trên cho thấy gen *mlipH8* đã được chèn vào vector tách dòng pCR[®]2.1. Vì vậy, plasmid pCR[®]2.1::*mlipH8* được sử dụng để giải trình tự hai chiều cho đoạn chèn *mlipH8* sử dụng cặp mồi M13-F và M13-R.

```
CAA35939      ATCSNGKTVGDASSCAWFDVLDIQQNLFHGGQCGAEAHESIRLVFHDSIAISPAMEAQG
AAB00798      ATCSNGKTVGDACSCAWFDVLDIQQNLFHGGQCGAEAHESIRLVFHDSIAISPAMEAQG
AAA53109      ATCSNGKTVGDASCCAWFDVLDIQQNLFHGGQCGAEAHESIRLVFHDSIAISPAMEAQG
ACY82388.1    ATCSNGKTVGDASCCAWFDVLDIQQNLFHGGQCGAEAHESIRLVFHDSIAISPAMEAQG
CAA38177      ATCSNGATVGDASCCAWFDVLDIQQNLFQGGQCGAEAHESIRLVFHDAIATSPAMEAQG
*****      *****
```

```
CAA35939      KFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTGPGDFIAFAGAVALSNC
AAB00798      KFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTGPGDFIAFAGAVALSNC
AAA53109      KFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTGPGDFIAFAGAVALSNC
ACY82388.1    KFGGGGADGSIMIF-----EIVKLQKPFVQKHGVTGPGDFIAFAGAVALSNC
CAA38177      KFGGGGADGSIMIFDDIETAFHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTGPGDFIAFAGAVALSNC
*****      *****
```

```
CAA35939      PGAPQMNFFTGAPATQAPDGLVPEPFHTVDQIINRVNDAGEFDELELVMLSAHSVAA
AAB00798      PGAPQMNFFTGAPATQAPDGLVPEPFHTVDQIINRVNDAGEFDELELVMLSAHSVAA
AAA53109      PGAPQMNFFTGAPATQAPDGLVPEPFHTVDQIINRVNDAGEFDELELVMLSAHSVAA
ACY82388.1    PGAPQMNFFTGAPATQAPDGLVPEPFHTVDQIINRVNDAGEFDELELVMLSAHSVAA
CAA38177      PGAPQMNFFTGAPATQAPDGLVPEPFHTVDQIARVNDAGEFDELELVMLSAHSVAA
*****      *****
```

```
CAA35939      VNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRGTAFPGSGGNQGEVESPLPGEIRIQSDHT
AAB00798      VNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRGTAFPGSGGNQGEVESPLPGEIRIQSDHT
AAA53109      VNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRGTAFPGSGGNQGEVESPLPGEIRIQSDHT
ACY82388.1    VNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQLRGTAFPGSGGNQGEVESPLPGEIRIQSDHT
CAA38177      VNDVDPTVQGLPFDSTPGIFDSQFFVETQFRGI AFPGSGGNQGEVESGMAGIIRIQTDHT
*****      *****
```

```
CAA35939      IARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLALTQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLP
AAB00798      IARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLALTQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLP
AAA53109      IARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLALTQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLP
ACY82388.1    IARDSRTACEWQSFVNNQSKLVDDFQFIFLALTQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLP
CAA38177      IARDSRTACEWQSFVNNQSKLVSDFFQFIFLALTQLGQDPNAMTDCSDVIPQSKPIPGNLP
*****      *****
```

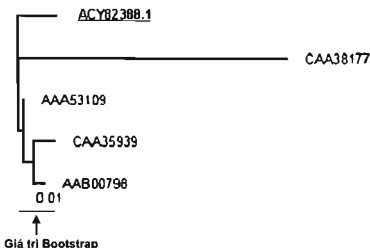
Hình 2. So sánh trình tự amino acid của Lip H8 từ chủng *P. chrysosporium* 36210 (trình tự được gạch chân) với trình tự protein tương ứng từ các chủng *P. chrysosporium* khác được đăng ký trên GenBank. Dấu sao (*) thể hiện sự tương đồng trong trình tự amino acid của các enzyme Lip H8. Khung chữ nhật (open rectangle) thể hiện vùng trình tự amino acid của chủng gốc 36210 bị xóa (deleted) 14 amino acid.

Kết quả phân tích trình tự gen *mlipH8* trong vector tách dòng pCR[®]2.1::*mlipH8* cho thấy gen *mlipH8* có độ dài 990 bp mã hóa cho protein gồm 330 amino acid. Khi so sánh trình tự gen *mlipH8* của chủng *P. chrysosporium* 36210 với các gen tương

ứng của các chủng *P. chrysosporium* khác cho thấy độ tương đồng cao trong trình tự nucleotide (92 - 99%). Tuy nhiên, gen *mlipH8* của chủng *P. chrysosporium* 36210 bị mất (deleted) 42 nucleotide mã hóa cho 14 amino acid của trình tự protein Lip

H8 (Hình 2). Các kết quả giải trình tự gen *mlipH8* của chủng 36210 được lặp lại 3 lần đều cho kết quả tương tự. Như vậy, gen *mlipH8* của chủng 36210 được khẳng định là thiếu hụt 42 nucleotide. Khi so sánh độ tương đồng giữa các trình tự amino acid thông qua cây phân loại dựa trên phân tích trình tự LiP H8 của chủng *P. chrysosporium* 36210 (mã số

truy cập trên GenBank là ACY82388.1) cho độ tương đồng cao (98%-99%) với LiP H8 tương ứng của *P. chrysosporium* khác có mã số truy cập trên GenBank là AAA53939, AAA53109, AAB00798 và thể hiện sự tương đồng thấp hơn hơn (92%) so với trình tự amino acid tương ứng có mã số truy cập CAA38177 (Hình 3).



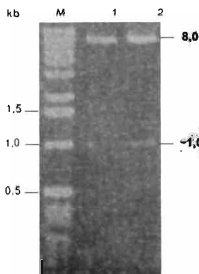
Hình 3. Cây phân loại dựa trên phân tích trình tự LiP H8 của chủng *P. chrysosporium* 36210 và các trình tự LiP H8 tương ứng của các chủng *P. chrysosporium* khác (tên của trình tự amino acid được ghi bằng số đăng ký trên GenBank). Giá trị bootstrap (%) thể hiện tỷ lệ sai khác về di truyền

Thiết kế vector biểu hiện LiP H8 trong nấm men *P. pastoris*

Khi phân tích trình tự và khung đọc (open reading frame) của gen *mlipH8* trong vector tách dòng cho thấy gen *mlipH8* nhận được trong thí nghiệm cho khung đọc mã hóa enzyme LiP H8 gồm 330 amino acid. Do đó, phản ứng PCR khuếch đại gen *mlipH8* từ cDNA của *P. chrysosporium* 36210 được thực hiện tốt, không bị lỗi và mất nucleotide trong quá trình nhân và khuếch đại DNA. Ngoài ra, việc thiếu hụt 42 nucleotide mã hóa 14 amino acid không làm thay đổi khung đọc của gen *mlipH8* của chủng 36210. Gen *mlipH8* tiếp đó được cắt khỏi vector tách dòng bằng hai enzyme giới hạn *EcoRI* và *NorI* và gắn vào vector biểu hiện pPIC9 tại hai vị trí cắt tương ứng để tạo vector biểu hiện trong *P. pastoris*. Vector biểu hiện pPIC9-*mlipH8* được biến nạp vào chủng *E. coli* XL1-blue, tinh sạch, cắt bằng hai enzyme giới hạn *EcoRI*, *NorI* và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1.0% (Hình 4).

Kết quả hình 4 cho thấy, vector biểu hiện pPIC9-*mlipH8* sau khi xử lý với hai enzyme giới hạn cho hai băng DNA có kích thước lần lượt là 1,0 kb và 8,0

kb tương ứng với kích thước của gen *mlipH8* và vector gốc pPIC9. Do vậy, vector biểu hiện tái tổ hợp pPIC9-*mlipH8* đã được thiết kế thành công.

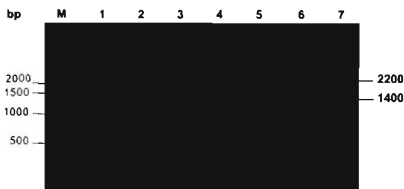


Hình 4. Sản phẩm cắt vector biểu hiện pPIC9-*mlipH8* bằng enzyme giới hạn M. Thanh DNA chuẩn, Băng 1 và 2. Vector biểu hiện pPIC9-*mlipH8* được cắt bởi hai enzyme giới hạn *EcoRI* và *NorI*.

Tạo chủng *P. pastoris* tái tổ hợp biểu hiện LiP H8

Tế bào nấm men *P. pastoris* GS115 sau khi được biến nạp vector biểu hiện đã mở vòng (linearized vector pPIC9-*mlipH8*) bằng xung điện được chọn lọc trên môi trường thạch MD. Kết quả thí nghiệm cho thấy, một số khuẩn lạc nấm men sau khi biến nạp plasmid pPIC9-*mlipH8* phát triển trên môi trường MD, trong khi tế bào nấm men gốc GS115 (đối chứng) không phát triển trên môi trường MD khuyết đường histidine (kết quả không công bố). Từ kết quả trên cho thấy, bước đầu đã tạo thành công chủng nấm men tái tổ hợp mang pPIC9-*mlipH8* cassette nhờ trao đổi chéo bổ sung giữa một vùng gen hoàn chỉnh *his4* trên plasmid pPIC9-*mlipH8* với vùng gen *his4* đã bị đột biến trên bộ gen của chủng GS115. Nhờ đó, nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/ pPIC9-*mlipH8* có thể tổng hợp được histidine và phát triển trên môi trường tối thiểu MD.

Kiểm tra sự có mặt của gen *mlipH8* trên bộ gen của các chủng tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPIC9-*mlipH8* cho thấy các chủng này đều tạo sản phẩm PCR đặc hiệu khuếch đại gen *mlipH8* nằm giữa vùng đặc hiệu 5' AOX1 và 3' AOX1, gồm hai băng có kích thước lần lượt là 1,4 kb và 2,2 kb (Hình 5). Băng 1,4 kb thể hiện gen *mlipH8* (~ 1,0 kb) và vùng đệm 5' AOX1 và 3' AOX1 ở hai đầu của gen *mlipH8* (flanking regions) có kích thước khoảng 0,45 kb trên vector tái tổ hợp pPIC9-*mlipH8* đã tích hợp vào bộ gen nấm men *P. pastoris* GS115. Ngoài ra, băng 2,2 kb thể hiện vùng gen oxy hóa methanol (alcohol oxidase gene - AOX1) của chủng nấm men gốc GS115 (Hình 5). Khi thực hiện phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 5'AOX1, 3'AOX1 và khuôn DNA là bộ gen của nấm men *P. pastoris* GS115 chỉ cho một băng DNA duy nhất có kích thước 2,2 kb (kết quả không công bố). Do đó, các kết quả trên khẳng định sự tích hợp thành công pPIC9-*mlipH8* cassette vào bộ gen của nấm men *P. pastoris* GS115.



Hình 5. Kiểm tra sự có mặt của gen *mlipH8* với khuôn DNA là bộ gen của nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/ pPIC9-*mlipH8*. M: Thang DNA chuẩn, 1-6: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn DNA là bộ gen của các chủng nấm men tái tổ hợp C131, C133, C135, C138, C139, C136. 7: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn DNA là plasmid pPIC9-*mlipH8*.

Kiểm tra hoạt tính LiP H8 của các chủng nấm men tái tổ hợp

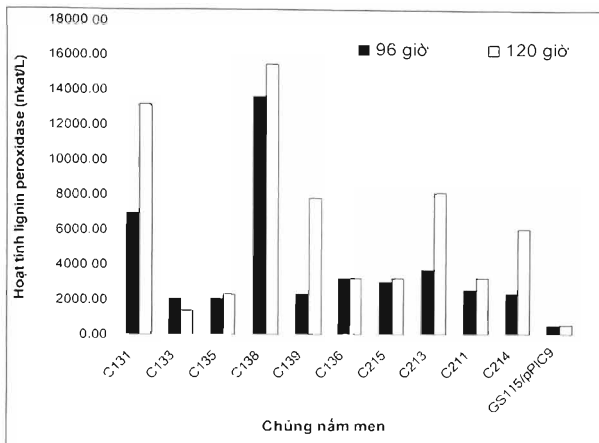
Kiểm tra hoạt tính LiP của 100 chủng nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/ pPIC9-*mlipH8* trong môi trường BMGY có cảm ứng bằng methanol cho thấy tất cả các chủng nấm men tái tổ hợp đều có hoạt tính LiP. Hình 6 trình bày hoạt tính LiP của 10 chủng nấm men tái tổ hợp có mức biểu hiện cao nhất.

Kết quả thí nghiệm cho thấy hầu hết các chủng nấm men tái tổ hợp thể hiện hoạt tính LiP tăng dần

theo thời gian nuôi cấy và đạt cao nhất ở 110 - 120 h. Đặc biệt, chủng C131 và C138 đạt 13.166 nkat.L⁻¹ và 15.476 nkat.L⁻¹ tương ứng. Dịch nuôi của chủng nấm men GS115/pPIC9 có phản ứng nhẹ với cơ chất. Điều này có thể lý giải do chủng GS115/pPIC9, cũng như nhiều vi sinh vật khác, có sinh ra một số enzyme oxy hóa có tính đặc hiệu cơ chất không cao nên cũng cho phản ứng dương tính nhẹ trong thí nghiệm. Đáng chú ý là, hoạt tính enzyme LiP H8 của chủng *P. chrysosporium* 36210 được thể hiện trong nấm men tái tổ hợp chủng tổ vùng thiếu hụt 14 amino acid không ảnh hưởng tới trung tâm hoạt động (active site) hay vùng kết hợp với cơ chất (substrate-binding

Từ các kết quả trên cho thấy, chúng tôi đã tạo thành công chủng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp sinh LiP H8 hoạt tính cao, trong đó chủng C138 có

hoạt tính cao nhất đạt 15.476 nkat.L⁻¹ sau 120 h nuôi cấy. LiP H8 tái tổ hợp sẽ được tiếp tục nghiên cứu về điều kiện thu nhận enzyme tinh sạch và tính chất của enzyme.



Hình 8. Hoạt tính lipoxygenase của các chủng nấm men tái tổ hợp sau 96 và 120 h nuôi cấy.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế được cặp mồi đặc hiệu khuếch đại gen *mli*P_{H8} từ khuôn cDNA của chủng nấm mục trắng *P. chrysosporium* 36210. Đã tách dòng và phân tích trình tự gen *mli*P_{H8}. Kết quả phân tích cho thấy gen *mli*P_{H8} của chủng 36210 có độ tương đồng cao (92% - 99%) so với trình tự của các gen tương ứng trên GenBank. Ngoài ra, gen *mli*P_{H8} trong nghiên cứu bị thiếu hụt 42 nucleotide mã hóa cho 14 amino acid so với gen *mli*P_{H8} của các chủng *P. chrysosporium* khác. Từ kết quả phân tích trình tự gen *mli*P_{H8} và trình tự amino acid suy diễn, đã xây dựng được cây phân loại trình tự LiP H8 của các chủng *P. chrysosporium* khác nhau. Đã tạo được chủng nấm men tái tổ hợp *P. pastoris* GS115/pPIC9-

mlipH8 có khả năng biểu hiện LiP H8. Chủng nấm men tái tổ hợp C138 thể hiện hoạt tính LiP cao nhất đạt 15.476 ngat L⁻¹ sau 120 h nuôi cấy.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện nhờ kinh phí của Bộ Công thương cấp cho đề tài mã số DT.07.08/CNSHCB thuộc đề án “Phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghiệp chế biến đến năm 2020”. Nhóm tác giả chân thành cảm ơn PGS TS. Nguyễn Thành Hồ, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh, đã cung cấp chủng *Phanerochaete chrysosporium* 36201. Xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ về trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Doyle WA, Smith AT (1996) Expression of lignin peroxidase H8 in *Escherichia coli*: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and haem. *Biochem J* 315: 15-19.
- Elis Nina H (2002) Biobleaching of wood pulp of *Acacia Aangium* and *Pinus merkusii* using *Phanerochaete chrysosporium*. *Makalah Pengantar Falsafah Sains Symposium* PPS702-S3
- Genemy JMB, Alic M, Gold MH (1998) Reverse transcription PCR analysis of the regulation of the manganese peroxidase gene family. *Appl Environ Microbiol* 64: 569-574.
- Gold MH, Youngs HL, Gelpke MD (2000) Manganese peroxidase. *Met Ions Biol Syst* 37: 559-586.
- Hong YZ, Xiao YZ, Zhou HM, Fang W, Zhang M, Zhu J, Wang J, Wu LJ, Yu ZL (2006) Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiol Lett* 258: 96-101.
- Kirk TK, Croan S, Tien M (1996) Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enz Microb Technol* 8: 27-32.
- Leisola MSA, Kozulic B, Meussdoerffer F, Fiechter A (1987) Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem* 262: 419-424.
- Martinez AT (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enz Microb Technol* 30: 425-444.
- Nguyễn Thị Thanh Kiều, Phạm Thành Hồ (2002) Nghiên cứu sự phân hủy lignin và cellulose của ba chủng *Phanerochaete chrysosporium* nhập nội. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh*, tập 5.
- Niladevi KN, Prema P (2005) Mangrove actinomycetes as the source of ligninolytic enzymes. *Actinomycetologica* 19: 40-47.
- Ollikka P, Alhonenmäki K, Leppänen V, Glumoff T, Rajola T, Suominen I (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59: 4010-4016.
- Phi Quyet Tien, Vũ Văn Lợi, Phan Thị Hồng Thảo, Vũ Thị Hạnh Nguyên, Bạch Thị Mai Hoa, Nguyễn Phương Như, Nguyễn Thị Hồng Liên, Hồ Tuyên, Phạm Thị Bích Hợp, Lê Gia Hy (2009) Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa D-amino acid oxidase từ nấm men *Trigonopsis variabilis* 0864 trong *Escherichia coli*. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, Nhà xuất bản Đại học Thái Nguyên*. 409-413.
- Wang H, Lu F, Sun Y, Du L (2004) Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia methanolicus*. *Biotechnol Lett* 26: 1569-1573.
- Wang W, Wen X (2009) Expression of lignin peroxidase H2 from *Phanerochaete chrysosporium* by multi-copy recombinant *Pichia* strain. *J Environ Sci* 21: 218-222.

CLONING AND EXPRESSION OF LIGNIN PEROXIDASE H8 FROM PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM IN PICHIA PASTORIS

Phi Quyet Tien, Vũ Văn Lợi, Phan Thị Hồng Thảo, Phạm Thị Bích Hợp*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The gene *mlpH8*, encoding isoenzyme lignin peroxidase (LiP) H8 without signal peptide, was amplified from cDNA of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* 36210. The sequence of amplified *mlpH8* gene, consisting of 990 nucleotides coding for an 330-amino-acid protein, was analyzed and revealed high homology (approximately 92% to 99%) with that from other *P. chrysosporium* strains. The present *mlpH8*, deposited under accession number GU119913, showed a 42-nucleotide deletion compared to referential DNA sequences on the NCBI GenBank database. Based on the deduced amino acid sequences, phylogenetic tree of LiP H8 sequences from *P. chrysosporium* was constructed. Gene *mlpH8* was then subcloned into pPIC9, resulting in expression plasmid pPIC9-*mlpH8*. The pPIC9-*mlpH8* expression cassette was integrated onto chromosomal

* Author for correspondence: Tel: 84-4-38363257; Fax: 84-4-38363144; E-mail: phamhop@ibt.ac.vn

DNA of *Pichia pastoris* GS115 (*his4*) by homologous transformation to the *his4* gene locus of the yeast. The selected transformants *P. pastoris* GS115/pPIC9-*mlipH8* could secret high yield of LiP in the cultures, of which the recombinant strain C138 expressed the highest LiP activity of 15476 nkat.L⁻¹ after 120-hour cultivation.

Keywords: Heterologous expression, lignin peroxidase, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pichia pastoris*