

NHÂN DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ NUCLEOTIDE VÙNG MÃ ITS-rDNA CỦA CHỦNG NẤM PHÂN HỦY SINH HỌC CELLULOSE

Trịnh Đình Khá*

Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, chúng tôi mô tả kết quả nhân dòng và phân tích trình tự vùng mã ITS-rDNA của chủng nấm NDVN01 phân hủy sinh học cellulose. Vùng mã ITS-rDNA đã được phân lập bằng phản ứng PCR và nhân dòng vào vector pJET1.2/blunt để đọc trình tự nucleotide. Trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA của chủng NDVN01 có kích thước 808 bp và có độ tương đồng cao với một số đại diện của chi nấm đảm *Peniophora* (92,1 – 99,3%). Trong đó, trình tự nucleotide tương đồng cao nhất với loài *Peniophora* sp. M104-3B (Mã số GenBank: HM595565). Trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA của chủng này đã được đăng ký trên GenBank với mã số JF925333. Chủng nấm NDVN01 được đặt tên là *Peniophora* sp. NDVN01.

Từ khóa: Nhân dòng, giải trình tự, phân hủy sinh học cellulose, *Peniophora*, vùng mã ITS-rDNA

MỞ ĐẦU

Cellulose là dạng hợp chất hữu cơ phổ biến nhất trên trái đất được tổng hợp nhờ quá trình quang hợp của thực vật. Cellulose được phân hủy sinh học bởi enzyme cellulase do các chủng vi khuẩn, vi nấm và nấm đảm sinh tổng hợp [9]. Việc chuyển hóa sinh học cellulose bởi enzyme cellulase thành đường có nhiều ý nghĩa quan trọng và được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực: công nghiệp thực phẩm, sản xuất thức ăn chăn nuôi, sản xuất bia, bột giấy, ngành công nghiệp chất tẩy rửa, ngành công nghiệp dệt may, nhiên liệu và hóa chất, quản lý chất thải và xử lý ô nhiễm môi trường [2], [5]. Một trong những công việc cần tiến hành khi nghiên cứu các chủng vi sinh phân hủy sinh học cellulose là phải phân loại chủng vi sinh đó. Hiện nay, để phân loại chủng vi sinh vật người ta có thể dựa vào những đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa và phân loại phân tử. Trong đó, phân loại học phân tử dựa vào trình tự nucleotit của gen mã hóa rRNA đang là một công cụ hữu hiệu trong phân loại và bổ sung cho quá trình phân loại bằng các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hóa.

ITS-rDNA là vùng trình tự nucleotide đặc trưng nằm giữa gen mã hóa 18S rRNA, 5,8S và gen mã hóa 28S rRNA. Vùng ITS-rDNA

có trình tự tương đối bảo thủ nên có thể được sử dụng làm chỉ thị phân tử trong phân loại phân tử [4]. Cặp mồi ITS1F, ITS4B được thiết kế dựa trên trình tự vùng cuối của gen 18S rRNA và vùng đầu của gen 28S rRNA (hình 1) đã được nhiều tác giả sử dụng trong nghiên cứu phân loại học phân tử các chủng nấm [3], [6], [7]. Sử dụng cặp mồi ITS1-F, ITS4-B sẽ nhân được đoạn DNA bao gồm một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA, vùng ITS1, gen mã hóa 5,8S rRNA, vùng ITS2 và một phần trình tự gen mã hóa 28S rRNA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi công bố kết quả nhân dòng và phân tích trình tự vùng ITS-rDNA của chủng nấm đảm NDVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulase tuyển chọn ở Việt Nam.

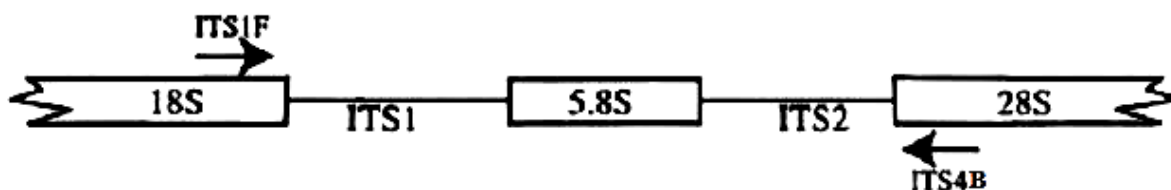
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

- Chủng giống

Chủng nấm NDVN01 có khả năng sinh tổng hợp cellulose phân lập từ gỗ mục được cung cấp từ bộ sưu tập chủng giống của phòng thí nghiệm Sinh học – Khoa Khoa học Sự sống – Trường Đại học Khoa học – Đại học Thái Nguyên. Chủng *E. coli* DH10B được cung cấp bởi Phòng Công nghệ Sinh học enzyme – Viện Công nghệ Sinh học – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

* Tel: 0983 034876; Email: khatd@tnus.edu.vn



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc gen mã hóa rRNA và vùng thiết kế cặp mồi ITS1F, ITS4B [3], [6], [7]

- Hóa chất

Kit nhân dòng pJET 1.2/blunt, enzyme *Xho*I, *Xba*I, T4 – DNA ligase được mua từ hãng Fermentas (Litva), CMC (carboxymethyl cellulose) từ Sigma (Mỹ), Peptone, cao nấm men, agarose từ Bio Basic (Canada).

Phương pháp

- Xác định hoạt tính phân hủy cellulose

Chủng nấm NDVN01 được lên men trong môi trường PDA dịch thể có bổ sung 1% CMC ở 30°C, lắc 200 vòng/phút trong 4 ngày. Dịch ngoại bào được thu hồi bằng cách ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút ở điều kiện 4°C để xác định hoạt tính thủy phân cellulose. Hoạt tính thủy phân cellulose được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch agar có bổ sung 0,5% CMC với các thể tích dịch lên men khác nhau 20-80 µl. Sau 24h ủ ở 37°C, vòng phân giải CMC được xác định bằng phương pháp nhuộm đặc hiệu với dung dịch lugol 1%.

- Tách chiết DNA tổng số

Chủng nấm NDVN01 được nuôi cấy trong môi trường PDA dịch thể sau 5 ngày thu pellet. Pellet nấm được nghiền nhanh trong ni tơ lỏng thành dạng bột mịn. Mẫu được chuyển vào tube 2 ml, bổ sung dung dịch phá tế bào và 50 µl protease K (200 mg/ml) trong 3h ở 56°C, thỉnh thoảng đảo nhẹ. Sau đó, mẫu được bổ sung 200 µl dung dịch 5M CH₃COOK ủ 10 phút trong đá. Sau khi ly tâm 10 phút ở 4°C với 10000 vòng/phút, dịch nổi chứa DNA tiếp tục được chiết bằng chloroform : isoamyl alcohol (24:1) để loại protein và tủa DNA bằng 100% isopropanol. DNA được hòa trong đệm TE (pH 8,0), sau đó được điện di kiểm tra và bảo quản ở -20°C [1].

- Phân tích trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA

Cặp mồi ITS1F (5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A- 3') và ITS4B (5'- CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG - 3') [3], [6], [7] được sử dụng để nhân vùng mã ITS-rDNA của chủng nấm NDVN01. Hỗn hợp phản ứng gồm 1,5 µl (50 ng) DNA khuôn; 1 µl (10 pmol) mồi mỗi loại; 2 µl MgCl₂ 25 mM; 2 µl dNTP 2,5 mM; 0,25 µl *Taq* polymerase 5U; 2,5 µl đệm PCR 10x; nước cất khử ion đến 25 µl. PCR được tiến hành theo chu trình: 95°C/ 5 phút, 30 chu kỳ (95°C/1 phút, 50°C/1 phút, 72°C/1 phút), 72°C/10 phút.

Sản phẩm PCR được lai vào vector pJET 1.2 bằng T4 ligase theo kit của hãng Fermentas. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH10B và chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung ampicillin nuôi cấy ở 37°C qua đêm. DNA plasmid được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001) [8].

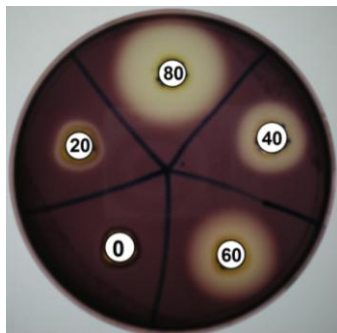
Vùng mã ITS-rDNA của chủng NDVN01 được giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động bởi công ty Macrogen - Hàn Quốc. Trình tự nucleotide được xử lý và phân tích bằng phần mềm DNASTAR (Wincosin, USA) và Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) để xác định hệ số tương đồng và dựng cây phân loại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA tổng số và phân lập vùng mã ITS-rDNA

Chủng nấm NDVN01 đã được khảo sát khả năng phân hủy cellulose bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả cho thấy dịch

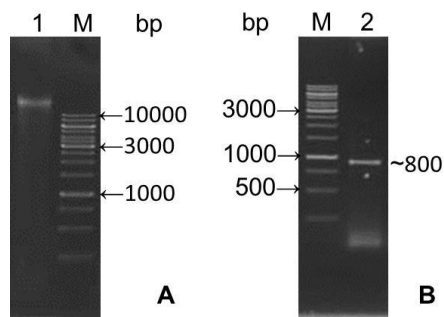
lên men ngoại bào của chủng NDVN01 có khả năng phân hủy cơ chất CMC mạnh với đường kính vòng thủy phân cơ chất CMC tăng theo nồng độ dịch lên men thử nghiệm (hình 2).



Hình 2. Hoạt tính phân hủy cellulose của dịch lên men ngoại bào của chủng nấm NDVN01

0: 80 μl dịch môi trường trước khi lên men; 20: 20 μl dịch sau lên men; 40: 40 μl dịch sau lên men; 60: 60 μl dịch sau lên men; 80: 80 μl dịch sau lên men

DNA tổng số của chủng nấm NDVN01 được tách chiết theo phương pháp đã mô tả. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy DNA không bị đứt gãy, có thể dùng cho các nghiên cứu về nhân dòng gene (hình 3A). Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS1F, ITS4B để phân lập vùng mã ITS-rDNA. Kết quả điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy sản phẩm PCR tương đối đặc hiệu có kích thước khoảng 800 bp (hình 3B). Kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết và tương đương với những nghiên cứu trước đây về vùng ITS-rDNA của các chủng nấm đảm [4], [6].

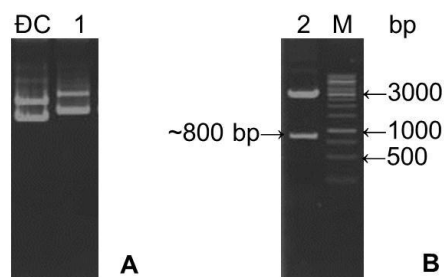


Hình 3. Hình ảnh điện di DNA tổng số (A) và sản phẩm PCR (B)

M: Marker; 1: DNA tổng số; 2: Sản phẩm PCR

Nhân dòng

Sản phẩm PCR được lai vào vector pJET 1.2 và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH10B. Plasmid tái tổ hợp đã được tinh sạch và điện di kiểm tra. Kết quả cho thấy dòng plasmid số 1 cao hơn đối chứng âm (Hình 4A), rất có thể sản phẩm PCR đã được lai vào vector pJET 1.2. Để khẳng định chúng tôi đã tiến hành cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme giới hạn *XhoI* và *XbaI*. Kết quả điện di cho thấy có sản phẩm cắt kích thước khoảng hơn 800 bp (hình 4B) phù hợp với tính toán. Như vậy, sản PCR đã được nhân dòng bằng vector pJET 1.2.



Hình 4. Hình ảnh điện di plasmid (A) và sản phẩm cắt bằng enzyme giới hạn (B)

ĐC: đối chứng pJET1.2; M: Marker; 1: plasmid có mang đoạn chèn; 2: sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp bằng enzyme *XhoI* và *XbaI*

Phân tích trình tự

Sản phẩm plasmid tái tổ hợp mang đoạn chèn đã được đọc trình tự bởi hãng Macrogen - Hàn Quốc. Kết quả cho thấy vùng mã ITS-rDNA của chủng nấm NDVN01 có kích thước 808 bp (hình 5).

Trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA phân lập từ chủng nấm NDVN01 có 200 nucleotide loại A (24,75%), 206 nucleotide loại G (25,50%), 196 nucleotide loại T (24,26%) và 206 nucleotide loại C (25,50%). Tổng số nucleotide loại A và T chiếm 49,01%, tổng số nucleotide loại G và C chiếm 50,99%. Tỷ lệ (A+T/G+C) bằng 0,96. Sử dụng phần mềm Blast so sánh với các trình tự gene đã công bố trên GenBank chúng tôi nhận thấy, trình tự nucleotide phân lập được có độ tương đồng cao với một số loài thuộc chi nấm đảm

Peniophora. Đồng thời phân tích cấu trúc chúng tôi nhận thấy trình tự nucleotide phân lập được bao gồm một phần trình tự gen mã hóa 18S rRNA, vùng ITS1, gen mã hóa 5,8S rRNA, vùng ITS2 và một phần trình tự gen mã hóa 28S rRNA. Kết quả này phù hợp với tính toán lý thuyết và những nghiên cứu trước

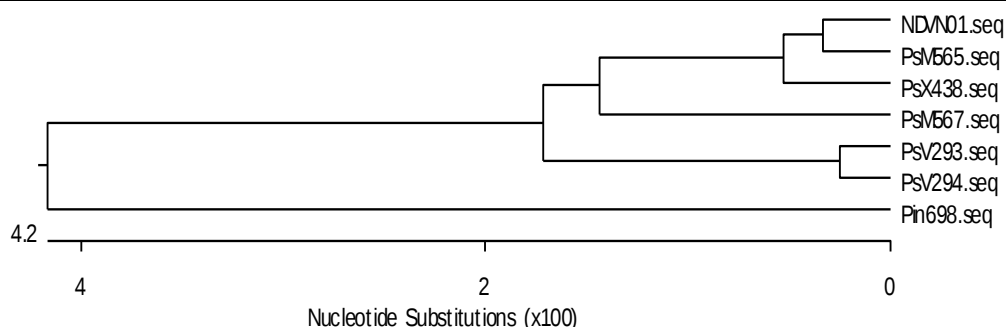
đây khi sử dụng cặp mồi ITS1F và ITS4B để nhân vùng mã ITS-rDNA của các chủng nấm đảm [3], [6], [7]. Sử dụng phần mềm DNA star chúng tôi đã tính được hệ số tương đồng di truyền (bảng 1) của chủng NDVN01 với một số chủng thuộc chi *Peniophora* và dựng được cây phát sinh chủng loại (hình 6).

GAGACTT	GTACACGGTC	CAGCACGGAA	AACGCTTCTC	TAAATTACAA	CTCGGACGCC	60
GACGCCA	GATTTTAAAT	TTGAGCTCAT	CCCGCTTCAC	TCGCAGTTAC	TAGGGGAATC	120
GTTAGTT	TCTTTTCCTC	CGCTTATTGA	TATGCTTAAG	TTCAGCGGGT	AGTCCCGCCT	280
TCGAGGT	CAAGTTGGTA	GTGATTGTCC	CAGTGGGACG	GTTGGAAGCG	ACTCCCATAG	240
CGCTAAG	CCGAGGCGTA	GATGACTATC	ACACCAAGGC	CGCAAGGGCT	TCGCTAATGC	300
CAAGGAG	AGCGGATCGA	CCAGGGACCC	GCAAGCTCCC	AAATCCCAGC	CCGATACCCT	360
AAAAAGG	TAGGGGGTGG	AGGAGTTCAC	GACACTCGAA	CAGGCGTGCC	CCTCGGAATG	420
AGGGGCG	CAAGGTGCGT	TCAAAGATTC	GATGATTAC	TGAATTCTGC	AATTCACATT	480
TATCGCA	TTTCGCTGCG	TTCTTCATCG	ATGCGAGAGC	CAAGAGATCC	GTTGTTGAAA	540
GTATTTG	TGCGAGTTAA	CGCAAGGTAC	ATTGAGATAC	TTAATCGGGG	GTATGTTAAA	600
AGCATGC	GAGCTTCCGA	TCTCTCTTCT	GCTCGCACAC	TTGGTTTACA	GTGGGGTGGA	660
GAGAAGG	GACACCAGCC	CAGACGAGCA	CATCCCATCG	CTGGGCAGCT	GCAGTACCGG	720
GGCATTC	CGAGCTTCGC	AAATGATCCT	TCCGCAGGTT	CACCTACGGA	AACCTTGTTA	780
CTTTTAC	TTCCTCTAAA	TGACCAAG				808

Hình 5. Trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA của chủng nấm NDVN01

Bảng 1. Hệ số tương đồng về trình tự nucleotide giữa vùng mã ITS-rDNA của chủng NDVN01 với một số chủng nấm thuộc chi *Peniophora*

Hệ số tương đồng (%)										
Hệ số sai khác (%)		1	2	3	4	5	6	7		
	1		92,1	99,3	96,3	96,7	96,9	99,2	1	NDVN01
	2	7,9		91,1	90,7	93,1	92,8	91,7	2	Pin698
	3	0,7	8,9		97,2	96,2	96,5	98,8	3	PsM565
	4	3,7	9,3	2,8		96,5	96,7	97,7	4	PsM567
	5	3,3	6,9	3,8	3,5		99,5	97,1	5	PsV293
	6	3,1	7,2	3,5	3,3	0,5		97,4	6	PsV294
	7	0,8	8,3	1,2	2,3	2,9	2,6		7	PsX438
		1	2	3	4	5	6	7		



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại chủng nấm NDVN01

Pin698: *Peniophora incarnata* (EU918698); PsM565: *Peniophora* sp. M104-3B (HM595565); PsM567: *Peniophora* sp. M48 (HM595567); PsV293: *Polyporales* sp. Vega601 (EF672293); PsV294: *Polyporales* sp. Vega382 (EF672294); PsX438: *Peniophora* sp. XL-A26 (EF488438)

Kết quả bảng 1 cho thấy trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA của chủng NDVN01 tương đồng 92,1 - 99,3% với một số chủng thuộc chi *Peniophora*. Trong đó, trình tự tương đồng cao nhất (99,3%) với chủng *Peniophora* sp. M104-3B có mã số GenBank: HM595565 (PsM565); tương đồng 99,2% với chủng *Peniophora* sp. XL-A26 có mã số GenBank: EF488438 (PsX438). Do đó, chủng NDVN01 đã được đặt tên là *Peniophora* sp. NDVN01 và trình tự vùng mã ITS-rDNA đã được đăng ký trên GenBank với mã số JF 925333.

KẾT LUẬN

Đã nhân dòng và phân tích trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA của chủng nấm NDVN01 có khả năng phân hủy cellulose. Vùng mã ITS-rDNA của chủng nấm NDVN01 có kích thước 808 bp. Trình tự nucleotide tương đồng 92,1-99,3% với một số chủng thuộc chi nấm đảm *Peniophora*. Chủng NDVN01 đã được đặt tên là *Peniophora* sp. NDVN01 và trình tự nucleotide vùng mã ITS-rDNA đã được đăng ký trên GenBank với mã số JF 925333.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự giúp đỡ một số vật liệu và hóa chất từ Phòng Công nghệ sinh học Enzyme – Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trịnh Đình Khá, Quyền Đình Thi và Nguyễn Sỹ Lê Thanh (2007), "Tuyển chọn và nghiên cứu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng sinh tổng hợp cellulase của chủng *Penicillium* sp. DTQ-HK1", *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 5, tr. 355-362.
2. Bhat M.K. (2000), "Cellulase and related enzymes in biotechnology", *Biotechnol. Adv.*, 18, pp. 355-383.
3. Buchan A., Newell S.Y., Moreta J.I.L., and Moran M.A. (2002), "Analysis of internal transcribed spacer (ITS) regions of rRNA genes in fungal communities in a Southeastern U.S. salt marsh", *Microb. Ecol.*, 43, pp. 329-340.
4. Coleman A.W. and Mai J.C. (1997), "Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparisons as a tool for predicting genetic relatedness", *J. Mol. Evol.*, 45, pp. 168-177.
5. Dürre P. (1998), "New insights and novel developments in clostridial acetone/butanol/isopropanol fermentation", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, pp. 639-648.
6. Gardes M. and Bruns T.D. (1993), "ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts", *Mol. Ecol.*, 2, pp. 113-118.
7. Prewitt M.L., Susan V.D., Thomas C.M., and Walter J.D. (2008), "Comparison of general fungal and basidiomycete-specific ITS primers for identification of wood decay fungi", *Forest Prod. J.*, 58, (4), pp. 66-71.
8. Sambrook J. and Russell D.W. (2001), *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
9. Saranraj P., Stella D., and Reetha D. (2012), "Microbial cellulases and its applications: a review", *Int. J. Biochem. & Biotech. Sci.*, 1, pp. 1-12.

SUMMARY

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF ITS-rDNA REGION IN FUNGAL STRAIN FOR THE BIOLOGICAL DEGRADATION OF CELLULOSE**Trình Đình Khả****College of Sciences – TNU*

In this study, we described the result of cloning and sequencing analysis of the ITS-rDNA region in fungal strain for the biological degradation of cellulose. The ITS-rDNA region of NDVN01 strain was isolated by PCR reaction and cloned into the vector pJET1.2/blunt for nucleotide sequencing. The sequence analysis result has showed that the sequence of the ITS-rDNA region of NDVN01 strain has 808 bp and high homology to those of some representatives of the basidiomycetes genus *Peniophora* (92,1-99,3%). Among them, it has the highest homology with that of *Peniophora* sp. M104-3B strain (accession number HM595565). The ITS-rDNA region of the NDVN01 strain was deposited in GenBank with accession number JX987096. The NDVN01 strain was named *Peniophora* sp. NDVN01.

Keywords: *Biological degradation of cellulose, cloning, ITS-rDNA region, Peniophora, sequencing.*

Ngày nhận bài: 08/12/2016; Ngày phản biện: 12/12/2016; Ngày duyệt đăng: 24 /01/2017

Phản biện khoa học: TS. Phạm Thị Thanh Nhân - Trường ĐH Sư phạm - ĐHTN

* Tel: 0983 034876; Email: khatd@tnus.edu.vn