

TẠO DÒNG CÁC GEN MÃ HÓA CHITINASE 42 kDa CỦA *Trichoderma asperellum* VÀO VECTOR BIỂU HIỆN THỰC VẬT pMYV719 ĐỂ PHỤC VỤ CHUYỂN GEN

Phùng Thị Bích Hòa^{1,2*}, Nguyễn Hoàng Tuệ², Phạm Thị Huyền Trang², Trần Gia Cát Tường², Huỳnh Thị Quỳnh Trang², Nguyễn Xuân Huy³, Nguyễn Hoàng Lộc²

¹ Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

² Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

³ Ban Khoa học Công nghệ và Quan hệ Quốc tế, Đại học Huế, 03 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Phùng Thị Bích Hoà <ptbha@hueuni.edu.vn>
(Ngày nhận bài: 09-01-2022; Ngày chấp nhận đăng: 19-01-2022)

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này, các gen chitinase mang trình tự peptide tín hiệu như *Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* đã được tạo dòng trong vector biểu hiện thực vật pMYV719 và biến nạp thành công vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Trong đó, gen *Chi42* là kiểu gen hoang dại từ chủng nấm *Trichoderma asperellum* SH16. Hai gen *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* có nguồn gốc từ gen *Chi42* đã được tối ưu hóa bộ ba sử dụng để biểu hiện thực vật. Vi khuẩn *A. tumefaciens* mang các gen chitinase được sử dụng để chuyển gen vào cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) trong các nghiên cứu tiếp theo để cải thiện khả năng kháng nấm bệnh của chúng.

Từ khóa: chitinase 42 kDa, *Chi42*, *syncodChi42-1*, *syncodChi42-2*, *Trichoderma asperellum*

Cloning genes encoding chitinase 42 kDa of *Trichoderma asperellum* into the plant expression vector pMYV719 for genetic transformation

Phung Thi Bich Hoa^{1,2}, Nguyen Hoang Tue², Pham Thi Huyen Trang², Tran Gia Cat Tuong², Huynh Thi Quynh Trang², Nguyen Xuan Huy³, Nguyen Hoang Loc^{2*}

¹ Faculty of Biology, University of Education, Hue University, 34 Le Loi St., Hue, Vietnam

² Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

³ Department of Science, Technology and International Relations, Hue University, 03 Le Loi St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Phung Thi Bich Hoa <ptbhoa@hueuni.edu.vn>
(Received: 09 January 2022; Accepted: 19 January 2022)

Abstract. In this study, chitinase genes containing a signal peptide sequence, such as *Chi42*, *syncodChi42-1* and *syncodChi42-2*, were cloned in the plant expression vector pMYV719 and successfully transferred into *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Among them, *Chi42* is a wild-type gene of *Trichoderma asperellum* SH16. Both genes *syncodChi42-1* and *syncodChi42-2* are derived from *Chi42*, which was optimized for codon usage for plant expression. *Agrobacterium* bacteria-harboring pMYV719/chitinase vector was used for genetic transformation into peanuts (*Arachis hypogaea* L.) to enhance resistance to phytopathogenic fungi in further studies.

Keywords: chitinase 42 kDa, Chi42, syncodChi42-1, syncodChi42-2, trichoderma asperellum

1 Đặt vấn đề

Chitinase (EC 3.2.1.14) là họ các enzyme xúc tác cho quá trình thủy phân các liên kết β -1,4-N-acetyl- β -D-glucosamine của chitin. Chitin là một trong những polysaccharide phổ biến trong tự nhiên [1] và là thành phần chính của khung cấu trúc thành tế bào nấm [2], bộ xương ngoài và lớp lót ruột của côn trùng và vỏ của các loài giáp xác [3]. Chitinase rất đa dạng về cấu trúc và cơ chế hoạt động và được ứng dụng phổ biến trong kiểm soát sâu bệnh hại cây trồng [4], tổng hợp chitooligosaccharide [5], công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, xử lý chất thải chế biến thủy sản và sản xuất nhiên liệu sinh học [6]. Trong sản xuất nông nghiệp, chitinase là một trong những tác nhân sinh học kháng nấm bệnh ở cây trồng hiệu quả nhất [7]. Nhiều loài nấm *Trichoderma* có khả năng tiết ngoại bào chitinase nên chúng thường được sử dụng để kiểm soát các bệnh nấm hại cây trồng [8-10]. Đến nay, một số gen chitinase của các chủng *Trichoderma* đã được tạo dòng và biểu hiện dị chúng trong một số vật chủ như *Chit46* từ

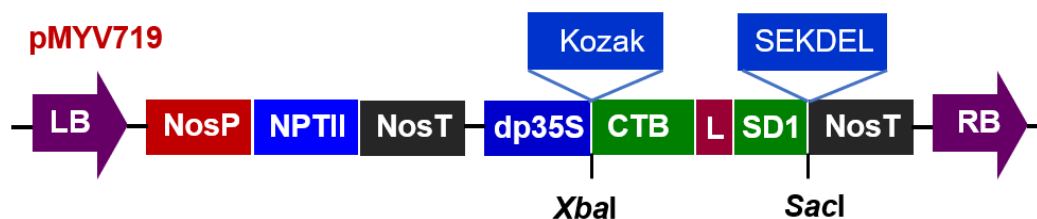
T. harzianum trong *Pichia pastoris* [11], *Chit33* và *Chit42* từ *T. harzianum* trong *E. coli* [12] và *ech42* từ *T. aureoviride* trong *Saccharomyces cerevisiae* [13]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào cho gen mã hóa chitinase 42 kDa của *T. asperellum* SH16 để biểu hiện ở thực vật, đặc biệt là cây lạc.

Nghiên cứu này có mục đích tạo dòng các gen chitinase từ chủng *T. asperellum* SH16 bao gồm gen *Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* vào vector biểu hiện thực vật pMYV719 và tiếp hợp vào *A. tumefaciens* LBA 4404 để phục vụ cho việc chuyển gen vào cây lạc sau này, giúp tăng khả năng kháng nấm bệnh cho loại cây trồng có giá trị này.

2 Đối tượng và phương pháp

2.1 Đối tượng

Vector biểu hiện thực vật pMYV719 mang promoter CaMV 35S (Hình 1) (dài khoảng 11 kb) do GS. Yang Moon-Sik (Jeonbuk National University, Hàn Quốc) cung cấp.



Hình 1. Cấu trúc của vector pMYV719

LB và RB: biên trái và phải của vùng T-DNA; NosP: promoter của gen nopaline synthase; NPTII: gen neomycin phosphotransferase II kháng kanamycin; NosT: terminator của gen nopaline synthase; Kozak: trình tự liên ứng để ribosome nhận biết và bắt đầu dịch mã; CTB: gen mã hóa tiểu đơn vị B độc tố tả; L: trình tự Gly-ProGly-Pro; S1D: vùng biểu mô S1D; SEKDEL: tín hiệu duy trì trong mạng lưới nội sinh chất; dp35S: duplicated promoter CaMV 35S.

Các gen mã hóa chitinase 42 kDa mang trình tự peptide tín hiệu, bao gồm *Chi42* (NCBI: HM191683.1) là gen hoang dại từ *T. asperellum* SH16 [14], *syncodChi42-1* (NCBI: MT083802.1) và *syncodChi42-2* (NCBI: MT083803.1) là hai gen có

nguồn gốc từ *Chi42* đã được tối ưu hóa bộ ba sử dụng cho biểu hiện thực vật (tổng chiều dài khoảng 1,3 kb) [15] được Công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam) tổng hợp và tạo dòng trong vector pUC19.

2.2 Phương pháp

Tạo dòng gen chitinase

Các gen chitinase 42 kDa được tách dòng từ vector pUC19/chitinase bằng *Xba*I và *Sac*I. Vector pMYV719 (Hình 1) được loại bỏ trình tự CTB-L-SD1-SEKDEL (khoảng 1 kb) cũng bằng hai enzyme nói trên để thay bằng một trong ba gen chitinase. Các sản phẩm cắt hạn chế được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) trước khi thực hiện phản ứng gắn. Hỗn hợp dung dịch gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt [16]. Thể biến nạp sau đó được chọn lọc trên môi trường LB (Luria-Bertani) rắn có bổ sung 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamycin. Vector tái tổ hợp pMYV719/chitinase có mặt trong *E. coli* được kiểm tra bằng cắt hạn chế.

Tam hợp

Hỗn hợp các vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA 4404 và *E. coli* TOP10 mang helper plasmid pRK2013 và *E. coli* TOP10 mang vector biểu hiện thực vật pMYV719/chitinase được nuôi cấy đồng thời trên môi trường LB rắn và sau đó thể tiếp hợp được chọn lọc trên cùng môi trường nhưng có bổ sung 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ spectinomycin và 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ kanamycin. Các khuẩn lạc *A. tumefaciens* sinh trưởng trên môi trường chọn lọc được giả định là mang vector tái

tổ hợp pMYV719/chitinase và được kiểm tra bằng khuếch đại PCR và cắt hạn chế.

Khuếch đại PCR

Phương pháp PCR khuôn lạc được sử dụng cho các tế bào *E. coli* đã biến nạp [17]. DNA plasmid của *A. tumefaciens* LBA 4404 từ tam hợp được chuẩn bị theo Kamble và Fawade [18].

Khuếch đại PCR được thực hiện với cặp mồi đặc hiệu của gen chitinase (Bảng 1). Thành phần phản ứng PCR gồm có DNA khuôn mẫu (20 ng DNA plasmid từ *A. tumefaciens* hoặc khuẩn lạc *E. coli*), 10 pmol mỗi mồi, 1 μL PCR Master Mix (Thermo Scientific), bổ sung nước cất để đạt thể tích phản ứng cuối cùng là 12 μL . Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: biến tính gen ở 95 °C/15 min; 30 chu kỳ tiếp theo: 95 °C/1 min, 55 °C/1 min và 72 °C/1 min; hoàn chỉnh sản phẩm PCR ở 72°C/10 min.

Gen *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* có trình tự nucleotide ở các vùng gắn mồi giống nhau. Vì vậy, chúng được dùng chung một cặp mồi *syncodChi42-F* và *syncodChi42-R*. Hai trình tự TCTAGA và GAGCTC lần lượt là các vị trí nhận biết của *Xba*I và *Sac*I.

Bảng 1. Trình tự nucleotide của các mồi đặc hiệu khuếch đại PCR gen chitinase

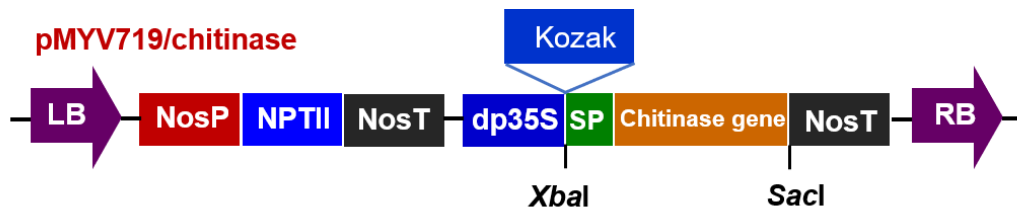
Primer	Trình tự nucleotide 5'- 3'	Kích thước sản phẩm PCR (kb)
Chi42-F	GCGCTCTAGAAAACTAAAAGTAGAAG	~ 1,3
Chi42-R	GCGCGAGCTCTTAGTTGAGACCGCTT	
syncodChi42-F	GCGCTCTAGAAAACTAAAAGTAGAAG	
syncodChi42-R	GCGCGAGCTCTTAATTCAAACCAGAT	

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Vector pMYV719/chitinase

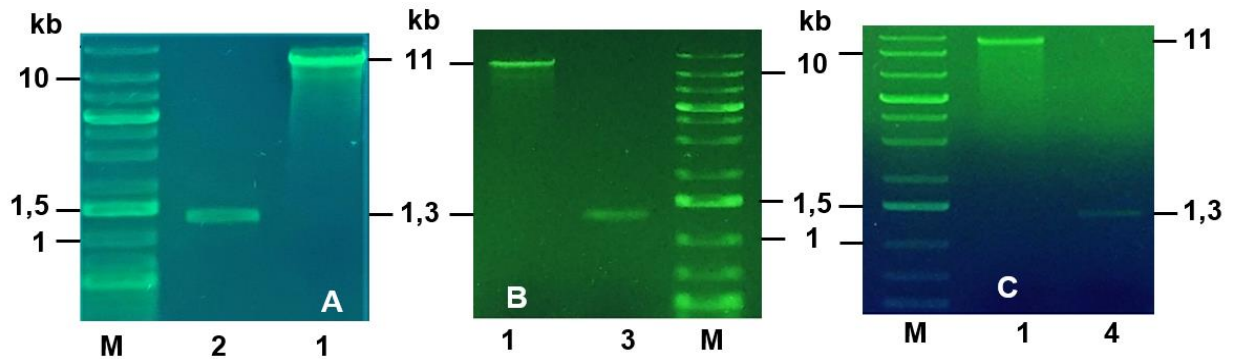
Các gen chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*) mang trình tự peptide tín hiệu ở đầu 5' được tách dòng từ vector pUC19/chitinase và thay thế đoạn gen CTB-L1-SD1-SEKDEL trong vector biểu hiện thực vật pMYV719 (Hình 2). Các gen chitinase có chiều dài khoảng 1,3 kb, trong khi vector pMYV719 thiếu trình tự CTB-L1-SD1-SEKDEL có kích thước khoảng 11 kb. Các sản

phẩm cắt hạn chế gồm có các gen chitinase và vector pMYV719 đã được tinh sạch (Hình 3) trước khi tạo các vector tái tổ hợp pMYV719/*Chi42*, pMYV719/*syncodChi42-1* và pMYV719/*syncodChi42-2*. Các vector tái tổ hợp sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli*. Sự có mặt của các gen chitinase được kiểm tra bằng khuếch đại PCR (Hình 4) và cắt hạn chế các vector pMYV719/chitinase từ các khuẩn lạc đã sinh trưởng trên môi trường chọn lọc (Hình 5-7). Kết quả này cho thấy các vector biểu hiện thực vật đã được biến nạp thành công vào tế bào *E. coli*.



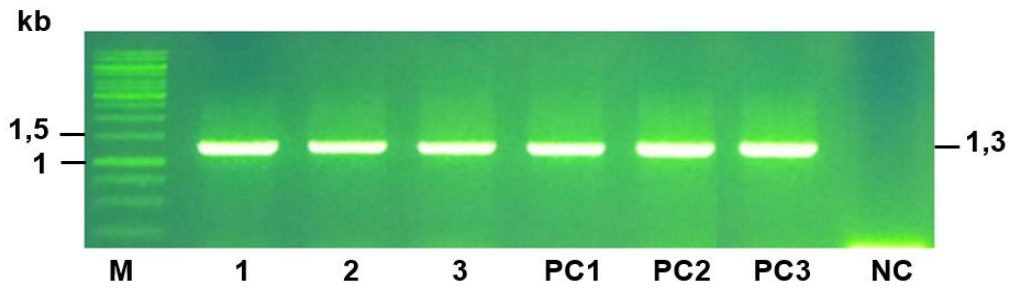
Hình 2. Cấu trúc của vector pMYV719/chitinase

LB và RB: biên trái và phải của vùng T-DNA, NosP: promoter của gen nopaline synthase, NPTII: gen neomycin phosphotransferase II kháng kanamycin, NosT: terminator của gen nopaline synthase, Kozak: trình tự liên ứng để ribosome nhận biết và bắt đầu dịch mã, dp35S: duplicated promoter CaMV 35S, SP: chuỗi peptide tín hiệu, chitinase gene: một trong ba gen *Chi42*, *syncodCh42-1* và *syncodCh42-2*.



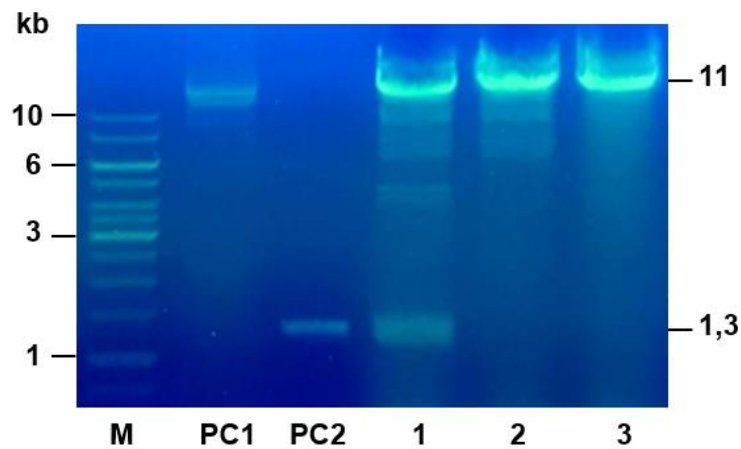
Hình 3. Tinh sạch vector pMYV719 và các gen chitinase

M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1: pMYV719; 2: *Chi42*; 3: *syncodChi42-1*; 4: *syncodChi42-2*.



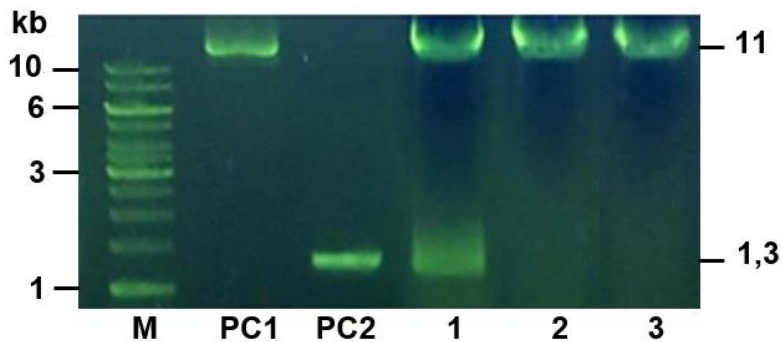
Hình 4. Khuếch đại PCR các gen chitinase từ khuẩn lạc *E. coli* với cặp mồi đặc hiệu

M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1: *Chi42*; 2: *syncodChi42-1*; 3: *syncodChi42-2*; PC1: pUC19/*Chi42*; PC2: pUC19/*syncodChi42-1*; PC3: pUC19/*syncodChi42-2*; NC: *E. coli* không biến nạp.



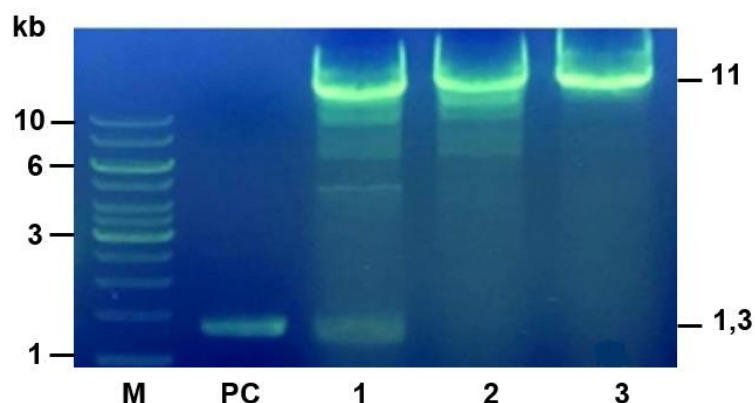
Hình 5. Cắt hạn chế vector pMYV719/*syncodChi42-1* bằng *Xba*I và *Sac*I

M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1-3: pMYV719/*syncodChi42-1* được cắt lần lượt bằng *Sac*I và *Xba*I, *Xba*I và *Sac*I; PC1: pMYV719 mạch vòng; PC2: gen *syncodChi42-1*.



Hình 6. Cắt hạn chế vector pMYV719/*syncodChi42-2* bằng *Xba*I và *Sac*I

M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1-3: pMYV719/*syncodChi42-2* được cắt lần lượt bằng *Sac*I và *Xba*I, *Xba*I và *Sac*I; PC1: pMYV719 mạch vòng; PC2: gen *syncodChi42-2*.



Hình 7. Cắt hạn chế vector pMYV719/Chi42 bằng *Xba*I và *Sac*I

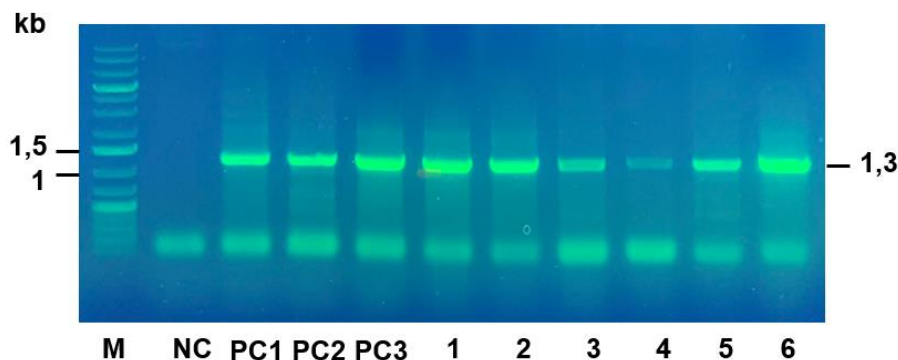
M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ); 1-3: pMYV719/Chi42 được cắt lần lượt bằng *Sac*I và *Xba*I, *Xba*I và *Sac*I; PC: gen *Chi*42.

Để biểu hiện một gen ngoại lai trong tế bào thực vật, các gen cần được đặt dưới sự điều khiển của một promoter thích hợp. Trong nghiên cứu này, các gen mã hóa chitinase được kiểm soát bằng promoter CaMV 35S của virus khảm súp lơ. Đây là một trong những promoter cấu thành được sử dụng rộng rãi nhất [19-20]. Promoter CaMV 35S là một trình tự khởi động phiên mã có thể điều khiển sự biểu hiện của các gen ngoại lai trong toàn bộ cơ thể [21].

3.2 Tam hợp ba chủng vi sinh vật

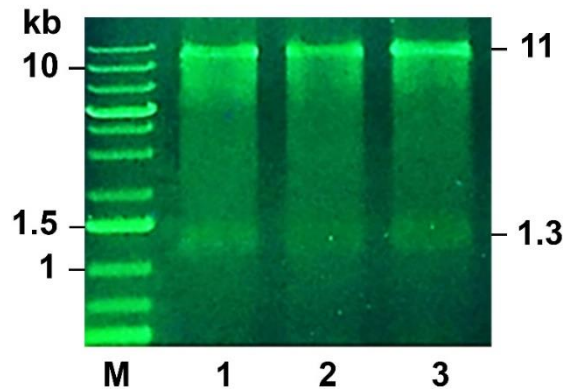
Sự có mặt của các vector pMYV719/chitinase trong *A. tumefaciens* LBA 4404 được kiểm tra bằng

khuếch đại PCR và cắt hạn chế. Kết quả khuếch đại PCR ở Hình 8 cho thấy các vector biểu hiện pMYV719/chitinase đã được biến nạp thành công vào *Agrobacterium*. Đồng thời, sản phẩm cắt hạn chế bằng *Xba*I và *Sac*I cũng đã củng cố cho nhận định này. Sự xuất hiện hai băng DNA có kích thước như mong đợi khoảng 11 kb và 1,3 kb, tương ứng với kích thước của vector pMYV719 đã loại bỏ trình tự CTB-L-SD1-SEKDEL và gen chitinase (Hình 9). Kết quả này cho thấy *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp đã sẵn sàng cho quá trình chuyển gen chitinase vào cây lạc trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 8. Khuếch đại PCR các gen chitinase ở vector pMYV719/chitinase có trong *A. tumefaciens* LBA 4404

M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb Plus (Thermo Scientific, Mỹ); 1-2: *Chi*42; 3-4: *syncodChi*42-1; 5-6: *syncodChi*42-2; PC1: pUC19/*Chi*42; PC2: pUC19/*syncodChi*42-1; PC3: pUC19/*syncodChi*42-2; NC: *A. tumefaciens* không biến nạp.



Hình 9. Cắt hạn chế vector các pMYV719/chitinase bằng *Xba*I và *Sac*I

M: thang chuẩn kích thước DNA 1 kb Plus (Thermo Scientific, Mỹ); 1: *Chi42*; 2: *syncodChi42-1*; 3: *syncodChi42-2*. Gen chitinase dài ~1,3 kb và vector pMYV719 dài ~11 kb.

4 Kết luận

Các gen mã hóa chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*) có nguồn gốc từ *T. asperellum* SH16 đã được tạo dòng trong vector biểu hiện thực vật pMYV719. Vector pMYV719/chitinase sau đó đã được biến nạp thành công vào *A. tumefaciens* LBA 4404 để phục vụ cho việc chuyển gen vào cây lạc trong các nghiên cứu tiếp theo nhằm cải thiện khả năng kháng nấm gây bệnh của chúng.

Thông tin tài trợ

Nghiên cứu này được Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) tài trợ trong đề tài mã số 106.02-2017.346.

Lời cảm ơn

Phùng Thị Bích Hòa và Nguyễn Hoàng Tuệ chân thành cảm ơn Tập đoàn Vingroup – Công ty CP đã cấp học bổng thông qua chương trình đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) và Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata) với mã số VINIF.2020.TS.111 và VINIF.2021.ThS. 46.

Tài liệu tham khảo

1. Susana PMC, Eva GLrPn. Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application. In: Desiree Nedra K, editor. The Complex World of Polysaccharides. Rijeka: IntechOpen; 2012. p. Ch. 1.
2. Langner T, Göhre V. Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current genetics*. 2016;62(2):243-254.
3. Tang WJ, Fernandez JG, Sohn JJ, Amemiya CT. Chitin is endogenously produced in vertebrates. *Curr Biol*. 2015;25(7):897-900.
4. Patil NS, Waghmare SR, Jadhav JP. Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. *Process Biochemistry*. 2013;48(1):176-183.
5. Yang S, Fu X, Yan Q, Guo Y, Liu Z, Jiang Z. Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*. *Food Chemistry*. 2016;192:1041-8.
6. María Valdés R, Liliana C. Industrial Enzymes and Metabolites from Actinobacteria in Food and Medicine Industry. In: Dharumadurai D, Yi J, editors. *Actinobacteria*. Rijeka: IntechOpen; 2016. p. Ch. 13
7. Kumar M, Brar A, Yadav M, Chawade A, Vivekanand V, Pareek N. Chitinases—Potential Candidates for Enhanced Plant Resistance towards Fungal Pathogens. 2018;8(7):88

8. Baranski R, Klocke E, Nothnagel T. Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens. *J Phytopathol.* 2008;156(9):513-521.
9. Gentile A, Deng Z, La Malfa S, Distefano G, Domina F, Vitale A, Polizzi G, Lorito M, Tribulato E. Enhanced resistance to *Phoma tracheiphila* and *Botrytis cinerea* in transgenic lemon plants expressing a *Trichoderma harzianum* chitinase gene. *Plant Breed.* 2007;126(2):146-151.
10. Ojaghian S, Wang L, Xie GL, Zhang JZ. Increased resistance against storage rot in transgenic carrots expressing chitinase chit42 from *Trichoderma harzianum*. *Sci Hort.* 2018;234(14):81-86.
11. Deng JJ, Shi D, Mao HH, Li ZW, Liang S, Ke Y, Luo XC. Heterologous expression and characterization of an antifungal chitinase (*Chit46*) from *Trichoderma harzianum* GIM 3.442 and its application in colloidal chitin conversion. *International journal of biological macromolecules.* 2019;134:113-121.
12. Boer H, Simolin H, Cottaz S, Söderlund H, Koivula A. Heterologous expression and site-directed mutagenesis studies of two *Trichoderma harzianum* chitinases, Chit33 and Chit42, in *Escherichia coli*. Protein expression and purification. 2007;51(2): 216-226.
13. Jinzhu S, Qian Y, Beidong L, Dianfu C. Expression of the chitinase gene from *Trichoderma aureoviride* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology.* 2005;69(1)39-43.
14. Loc NH, Quang HT, Hung NB, Huy ND, Phuong TT, Ha TT. *Trichoderma asperellum* *Chi42* genes encode chitinase. *Mycobiol.* 2011;39(3):182-186.
15. Luong NN, Tien NQD, Huy NX, Man LQ, Sinh DDH, Tue NH, et al. Expression of 42 kDa chitinase (Ta-CHI42) of *Trichoderma asperellum* from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2021;368: fnab110.
16. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007;6:253.
17. Bergkessel M, Guthrie C. Colony PCR. *Methods Enzymol.* 2013;529:299-309.
18. Kamble SP, Fawade MM. A rapid and inexpensive one-tube genomic DNA extraction method from *Agrobacterium tumefaciens*. *3 Biotech.* 2014;4(2):213-215.
19. Jefferson RA, Klass M, Wolf N, Hirsh D. Expression of chimeric genes in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology.* 1987;193(1):41-46.
20. Somssich M. *A short history of the CaMV 35S promoter* (No. e27096v3). *PeerJ Preprints.* 2019.
21. Stockhaus J, J Schell, L Willmitzer. Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST S1 with the presence of chloroplasts. *EMBO J.* 1989;8: 2445-2451.