

THIẾT KẾ VECTOR TÁI TỔ HỢP ĐỂ BIỂU HIỆN VÀ CỐ ĐỊNH LIÊN TỤC BETA-MANNANASE TRÊN BỀ MẶT *LACTOBACILLUS PLANTARUM* WCFS1 SỬ DỤNG PROMOTER THƯỜNG TRỰC PGM

DESIGN OF RECOMBINANT VECTOR FOR CONSTITUTIVE EXPRESSION AND DISPLAY OF BETA-MANNANASE ON THE CELL SURFACE OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM* WCFS1 EMPLOYING CONSTITUTIVE PROMOTER PGM

Nguyễn Hoàng Minh^{1*}, Nguyễn Thu Hà²

¹Trường Đại học Bách khoa - Đại học Đà Nẵng, Việt Nam

²Trường Đại học Tài nguyên tự nhiên và Khoa học sự sống, Muthgasse 18, A-1190, Viên, Áo

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: nhminh@dut.udn.vn

(Nhận bài / Received: 23/6/2023; Sửa bài / Revised: 17/8/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 24/8/2023)

Tóm tắt - *Lactobacillus plantarum* là một loại vi khuẩn sinh axit lactic quan trọng trong thực phẩm. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo về hiệu quả sử dụng vi khuẩn này để tổng hợp enzyme tự do. Tuy nhiên, rất ít nghiên cứu về việc phát triển *L. plantarum* như chất mang an toàn để sản xuất enzyme cố định. Ở nghiên cứu này, vector tái tổ hợp pPgm_1261ManB đã được thiết kế để biểu hiện và cố định beta-mannanase (ManB) lên bề mặt *L. plantarum* WCFS1 một cách liên tục nhờ promoter thường trực Pgm từ *L. acidophilus* NCFM. Với mục tiêu đó, hai đoạn *pgm* và *lp1261-manB-myc* được khuếch đại nhờ phản ứng PCR sử dụng khuôn lần lượt là vector pUC và pSIP_1261ManB với các cặp mồi tương ứng. Hai sản phẩm PCR được lai với nhau nhờ phương pháp PCR mở rộng vùng chồng lấp. Đoạn lai sau đó được gắn vào vector pSIP409GusA và tạo ra plasmid tái tổ hợp pPgm_1261ManB. Vector này tiếp tục được biến nạp vào tế bào biểu hiện *L. plantarum* nhằm nghiên cứu sự biểu hiện và cố định liên tục ManB trên bề mặt lợi khuẩn *L. plantarum*.

Từ khóa - *Lactobacillus plantarum*; Pgm; mannanase; cố định; promoter thường trực

1. Đặt vấn đề

Mannan endo-1,4- β -mannosidase hay 1,4- β -D-mannanase (EC 3.2.1.78) (tên thường gọi là β -mannanase), là enzyme nội phân có khả năng xúc tác phân cắt ngẫu nhiên liên kết β -1,4-mannosidic trong chuỗi chính của cơ chất β -1,4-mannans, glucomannans, and galactomannans thành các manno-oligosaccharides (MOSs), và một lượng nhỏ mannose, glucose và galactose [1]. β -mannanases đã được ứng dụng trong một số lĩnh vực liên quan đến thực phẩm, chăn nuôi, dược, công nghiệp giấy, tiền xử lý sinh khối chứa lignocellulose cho việc tạo ra nhiên liệu thế hệ hai. Hiện tại, việc sử dụng β -mannanases cho mục tiêu chuyển đổi các phế phẩm nông nghiệp rẻ tiền như bã dứa, bã cà phê thành các MOSs có hoạt tính cải thiện sức khỏe con người và động vật đang là mối quan tâm lớn. Vì vậy, nhiều nghiên cứu với những nỗ lực lớn đang tập trung tạo ra MOSs bằng con đường bền vững, hiệu quả và kinh tế [2].

Những nghiên cứu trước đây cho thấy, beta-mannanase (ManB) từ *Bacillus licheniformis* DSM13 đã được tổng hợp tốt ở dạng tự do nhờ lợi khuẩn *L. plantarum* WCFS1

Abstract - *Lactobacillus plantarum* is an important lactic acid-producing bacterium in the food industry. Many studies have reported on the utilization of this bacterium to produce free enzymes. However, little literature has been carried out to employ *L. plantarum* as a safe carrier for enzyme immobilization. In this study, the recombinant vector pPgm_1261ManB was designed to continuously express and display beta-mannanase (ManB) on the surface of *L. plantarum* WCFS1 by constitutive promoter Pgm from *L. acidophilus* NCFM. With that goal, the two segments *pgm* and *lp1261-manB-myc* were amplified by PCR reaction using vectors pUC and pSIP_1261ManB respectively. The two PCR products then were hybridized by overlapping PCR method. The resulting fragment was inserted into the vector pSIP409GusA, and, consequently, a recombinant plasmid pPgm_1261ManB was generated. This vector was further transformed into *L. plantarum* for expression and display of ManB on the *Lactobacillus* surface.

Key words - *Lactobacillus plantarum*; Pgm; mannanase; immobilization; constitutive promoter

với hệ vector biểu hiện pSIP dựa trên promoter cảm ứng [3]. Tuy nhiên rất ít nghiên cứu tổng hợp enzyme ở dạng cố định trên bề mặt tế bào vi sinh vật. Biểu hiện protein trên bề mặt hiện nay là một chiến lược quan trọng thu hút sự quan tâm đông đảo của các nhà nghiên cứu hướng đến các ứng dụng liên quan đến công nghệ sinh học, dược học (như là sản xuất vaccine, kháng thể, chất hấp thụ sinh học, hệ cảm biến biosensor...) [4]. Một trong những đặc điểm thú vị nhất của hệ thống cố định enzyme trên bề mặt tế bào vi sinh vật đó là đoạn gen mã hóa cho enzyme quan tâm được nối với các đoạn gắn được phân lập từ chính cơ chế gắn tự nhiên của vi sinh vật bằng công nghệ DNA tái tổ hợp. Sau đó, cả tổ hợp lai này sẽ được tổng hợp và thực hiện việc trình diện enzyme trên bề mặt tế bào thông qua sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Kết quả là, tế bào vi sinh vật được tạo ra có gắn enzyme trên bề mặt hoàn toàn có thể dễ dàng thu hồi được qua bước lọc hoặc ly tâm đơn giản. Khi so sánh với phương pháp hóa học truyền thống, phương pháp cố định enzyme trên bề mặt tế bào bằng công nghệ di truyền này (genetic immobilization) thể hiện nhiều ưu điểm hơn ngoài việc có thể tái sử dụng nhiều

¹ The University of Danang - University of Science and Technology, Vietnam (Nguyen Hoang Minh)

² University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria (Nguyen Thu Ha)

lần: không cần hoạt hóa chất mang; không cần tổng hợp và tinh sạch enzyme; không cần thực hiện quá trình gắn enzyme sau khi tinh sạch lên chất mang (tế bào vsv thực hiện tất cả các giai đoạn kể trên); tế bào có gắn enzyme có thể dễ dàng bảo quản và việc tổng hợp enzyme cố định trên tế bào rất đơn giản chỉ bằng một thao tác nuôi cấy đơn giản; enzyme cố định bền hơn khi được cố định trên bề mặt tế bào ở độ cao hợp lý [5].

Về cơ bản, một protein hay enzyme có thể được gắn trên bề mặt tế bào *Lactobacillus* thông qua nhiều con đường khác nhau, bao gồm gắn trên thành tế bào (móc neo chứa đoạn bảo thủ LPXTG, lipoprotein) hoặc gắn trên màng tế bào (móc neo chuyển màng và lipoprotein) [4]. Trong khi các móc neo khác được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi, rất ít tài liệu nói về việc cố định bề mặt bằng móc neo lipoprotein. Sự gắn của móc neo lipoprotein dựa vào liên kết cộng hóa trị của đoạn motif lipobox nằm ở đầu C của vùng tín hiệu tiết lên thành tế bào vi khuẩn. Sau khi protein được tiết ra ngoài theo con đường Sec, enzyme diacylglycerol transferase sẽ nối cystein bảo thủ trong hộp lipobox với phospholipid của thành tế bào bằng liên kết cộng hóa trị, đồng thời tín hiệu tiết được loại bỏ nhờ enzyme lipobox-specific peptidase (enzyme đặc thù nhận biết trình tự cắt trong vùng lipobox). Dựa vào cơ chế này, sự gắn enzyme lên bề mặt tế bào có thể thực hiện được bằng cách lai đoạn gen mã hóa enzyme quan tâm vào đầu C của đoạn gắn lipoprotein [5]. Trước đây, đoạn gắn Lp_1261 đã được sử dụng để cố định mannanase từ *Bacillus licheniformis* và chitosanase từ *Bacillus subtilis* lên bề mặt tế bào *L. plantarum* WCFS1 nhờ hệ vector biểu hiện cảm ứng pSIP [6].

Ưu điểm của pSIP là tổng hợp được lượng lớn protein, quá trình tổng hợp được điều hòa chặt chẽ và kiểm soát bởi một loại peptide cảm ứng (induced peptide, IP). Nói chung, hệ biểu hiện cảm ứng phù hợp cho các ứng dụng liên quan đến sản xuất protein tái tổ hợp mang tính độc đối với vật chủ hay những ứng dụng đòi hỏi một lượng lớn protein. Tuy nhiên, việc sử dụng hệ thống cảm ứng không phù hợp đối với những nghiên cứu liên quan đến thực phẩm hay y học. Do vậy, việc xây dựng và thiết kế hệ thống biểu hiện liên tục có khả năng tạo lượng protein tái tổ hợp cao đang là giải pháp thay thế.

Để có thể thực hiện mục tiêu trên, promoter thường trực *pgm* đã được lựa chọn để nghiên cứu quá trình tổng hợp, tiết và cố định ManB trên bề mặt lợi khuẩn *L. plantarum* WCFS1. Đây là promoter được đánh giá cao trong quá trình tổng hợp protein nội bào trong vật chủ lactobacilli. Promoter Pgm điều hòa cho quá trình tổng hợp phosphoglycerate mutase (*pgm*) là một promoter thường trực mạnh từ *Lb. acidophilus* NCFM, chủng probiotic được sử dụng rộng rãi trong sản phẩm sữa, dinh dưỡng. Tri Duong và cộng sự đã chỉ ra rằng hoạt tính β -glucuronidase được điều hòa bởi promoter *pgm* cao gấp 10 lần so với mức độ quan sát được với promoter cảm ứng trong hai vật chủ *Lb. acidophilus* và *Lb. gasserii* [7]. Điều đó cho thấy rằng, việc sử dụng vector biểu hiện liên tục dựa trên promoter Pgm có thể là công cụ hữu dụng cho việc siêu tổng hợp protein tái tổ hợp trong lactobacilli và các thành viên khác trong gia đình vi khuẩn sinh axit lactic.

Hướng đến mục tiêu trên, năm 2019 nhóm tác giả đã công bố kết quả liên quan đến quá trình biểu hiện và cố định thành công ManB từ *Bacillus licheniformis* DSM13 lên bề mặt của lợi khuẩn *L. plantarum* WCFS1 một cách liên tục dựa vào promoter thường trực Pgm và SlpA [8]. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả trình bày kết quả về quá trình tạo dòng hệ vector tái tổ hợp pPgm_1261ManB chứa promoter thường trực Pgm dựa trên phương pháp PCR mở rộng vùng chồng lấp. Nghiên cứu này giúp người đọc hiểu rõ hơn về cách thức thiết kế một vector tái tổ hợp hướng đến mục tiêu phát triển hệ thống xúc tác toàn tế bào (whole-cell biocatalysts), từ đó mở ra nhiều cơ hội tạo ra nhiều cấu trúc plasmid tái tổ hợp khác trong công nghệ protein tái tổ hợp.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Hóa chất, enzymes and plasmids

- Erythromycin đạt độ tinh khiết cao và được mua từ công ty Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

- Enzyme cắt hạn chế (*Bgl*II, *Eco*RI), enzyme tổng hợp (Phusion polymerase), enzyme gắn (T4 DNA ligase) và các đệm được mua từ hãng Fermentas (Vilnius, Lithuania) và sử dụng theo bảng hướng dẫn của nhà sản xuất.

- Các vector pSIP_1261ManB chứa gene mannanase (*manB*) từ *B. licheniformis* DSM13 (ATCC 14580) và pUC57 (GenScript) chứa promoter liên tục *pgm* từ *L. acidophilus* NCFM được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR để khuếch đại trình tự gen *lp1261-manB-myc* và trình tự promoter *pgm*. Plasmid pEV là biến thể của plasmid pLp_2578sAmyA, không mang tín hiệu tiết, không có gen *man* được sử dụng làm đối chứng âm.

2.1.2. Chủng vi sinh vật, môi trường và điều kiện nuôi cấy

L. plantarum WCFS1 được phân lập từ nước bọt của người theo mô tả bởi Kleerebezem et al., xuất xứ từ NIZO Food Research (Ede, Hà Lan) và hiện nay được bảo quản tại bộ sưu tập giống của trường Đại học Khoa học Sự Sống Na Uy (Ås, Na Uy) [9]. *Escherichia coli* NEB5 α (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Germany) sử dụng cho các thí nghiệm biến nạp liên quan đến quá trình tạo dòng DNA được nuôi cấy trong môi trường lỏng Luria-Bertani (LB) tại 37°C với tốc độ lắc 120 rpm. *L. plantarum* được nuôi cấy trong môi trường lỏng deMan, Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid) tại 37°C không lắc. Khi cần, erythromycin được bổ sung vào môi trường với nồng độ cuối là 200 μ g/ml và 5 μ g/ml cho *E. coli* và *L. plantarum* một cách lần lượt. Môi trường thạch được chuẩn bị bằng cách bổ sung 1.5% (w/v) agar vào môi trường lỏng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản

- Plasmids được tách từ chủng *E. coli* sử dụng bộ kit PureYield™ plasmid miniprep System (Promega). Sự khuếch đại DNA được thực hiện bởi enzyme proof-reading Phusion polymerase, hỗn hợp dNTP, và các cặp mồi được đặt từ VBC Biotech (Viên, Áo), và máy ổn nhiệt Biometra TRIO thermocycler xuất xứ từ Biometra (Göttingen, Đức)

- Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này được mua từ công ty Microsynth (Áo) [8]. Trình tự DNA sau khi được khuếch đại được xác định bởi công ty Microsynth (Viên, Áo).

M1 (Fw-pgm):
ATGCAGATCTTGGCGACAAGTAATAAACTAAAC (chứa vị trí cắt *Bg*III)

M2 (Rv-pgm1261Man):
CTTTTGCAGCTGTTTTGAAATTCATAGCCTTCTTAGC
TTCTTCAAC

M3 (Fw-pgm1261Man):
GTTGAAGAAGCTAAGAAGGCTATGAATTTCAAACA
GCTGCAAAAAG

M4 (Rv-1261Man):
ATGCGAATTCCTTACAGATCCTTCTTGAGATG (chứa vị trí cắt *Eco*RI)

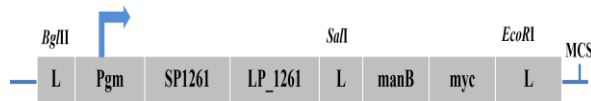
- Sản phẩm PCR và đoạn DNA thu được từ phản ứng cắt được tinh sạch bằng bộ kit Illustra™ GFX™ PCR DNA và Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK).

- Phản ứng gắn được thực hiện nhờ enzyme T4 DNA ligase (Fermentas; Vilnius, Lithuania) ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ.

- Phương pháp PCR khuôn lạc (colony PCR) được thực hiện bằng cách lấy một khuẩn lạc hòa tan trong 0,1 ml nước cất hai lần trước khi gia nhiệt ở 99°C trong 7 phút. Sau đó, dịch chiết tế bào chứa DNA được đặt vào bể đá ổn định trong vòng 10 phút trước khi được sử dụng như khuôn cho phản ứng PCR.

- Tất cả plasmid được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* NEB5α theo phương pháp sốc nhiệt. Plasmids tạo ra được biến nạp vào tế bào biểu hiện *L. plantarum* WCFS1 theo phương pháp của Aukrust and Blom [10].

2.2.2. Xây dựng cấu trúc plasmid mang promoter thường trực *Pgm*



Hình 1. Sơ đồ mô tả cấu trúc các phần của plasmid biểu hiện liên tục hướng đến mục tiêu tổng hợp, tiết và cố định ManB. Trình tự tín hiệu tiết, đoạn gắn *Lp_1261* và gen mã hóa manB được lấy từ plasmid pSIP_1261ManB. Đoạn gắn lipoprotein (móc neo) *Lp_1261* có 75 amino acid trong đó tín hiệu tiết chiếm 22 amino acid. Đầu C của gen *manB* được gắn với đuôi *myc* (30-bp, GAACAAAACATCTCAGAAGAGGATCTG). Tất cả các phần có thể dễ dàng được thay thế nhờ các vị trí cắt của các enzyme cắt hạn chế (*Sal*I and *Eco*RI)

Với mục tiêu xây dựng cấu trúc plasmid pPgm_1261ManB, hai đoạn *pgm* (~357 bp) và *lp1261-manB-myc* (~1299 bp) được khuếch đại nhờ phản ứng PCR sử dụng pUC57 và pSIP_1261ManB làm khuôn với các cặp mồi tương ứng (cặp mồi M1/M2 mang vị trí cắt của *Bg*III ở đầu N và M3/M4 mang vị trí cắt *Eco*RI ở đầu C), tạo sản phẩm PCR1 và PCR2. Hai sản phẩm PCR này tiếp tục được lai với nhau nhờ phương pháp PCR mở rộng vùng chồng lấp (overlap extension PCR) bao gồm hai bước PCR.

- Chu kỳ nhiệt của PCR1 (không cần thêm mồi):
- + Bước 1: Biến tính ban đầu: 98°C trong 30 giây.

+ Bước 2 (lặp lại 15 chu kỳ) gồm 3 giai đoạn: Biến tính ở 98°C trong 10 giây → Gắn mồi ở 65°C trong 20 giây → Kéo dài 72°C trong 1 phút

+ Bước 3: ổn định 5 phút ở 72°C.

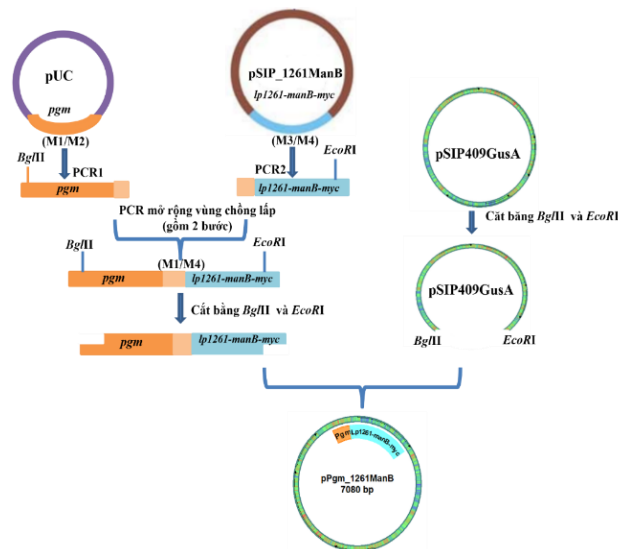
- Chu kỳ nhiệt của PCR2 (cặp mồi M1/M4 được thêm vào để khuếch đại cả đoạn với vị trí gắn *Bg*III tại đầu N và *Eco*RI tại đầu C):

+ Bước 1: Biến tính ban đầu: 98°C trong 30 giây.

+ Bước 2 (lặp lại 15 chu kỳ): Biến tính ở 98°C trong 10 giây → Gắn ở 51°C trong 20 giây → Kéo dài 72°C trong 1 phút

+ Bước 3: ổn định 5 phút ở 72°C.

Kết quả sau hai bước PCR, đoạn *pgm* (~357 bp) được nối với đoạn *lp1261-manB-myc* (~1299 bp) tạo thành đoạn *pgm_lp1261-manB-myc* (~1656 bp). Sau đó, đoạn này được gắn với vector pJET1.2 trước khi được biến nạp vào tế bào *E. coli* nhằm thu nhận một lượng lớn DNA. Tiếp đó, đoạn *pgm_lp1261-manB-myc* được gắn xử lý bằng hai enzyme cắt hạn chế *Bg*III-*Eco*RI để gắn vào vector pSIP409GusA (~5.4 kb), tạo ra plasmid pPgm_1261ManB. Vector biểu hiện cố định liên tục này được biến nạp vào *E. coli* NEB5α trước khi chuyển vào tế bào biểu hiện *L. plantarum* WCFS1. Cách thiết kế vector pPgm_1261ManB được biểu diễn như sơ đồ ở Hình 2.



Hình 2. Sơ đồ thiết kế cấu trúc vector tái tổ hợp pPgm_1261ManB

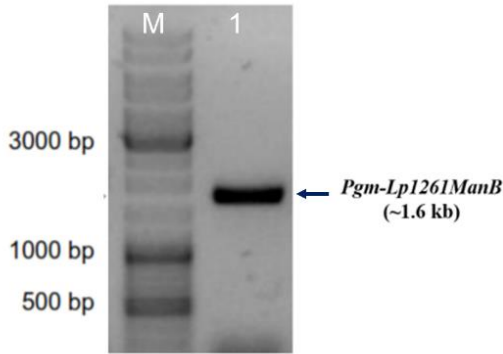
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nối vùng trình tự promoter thường trực *pgm* với đoạn gen *lp1261-manB-myc* mã hóa cho móc neo và mannanase bằng phương pháp mở rộng vùng chồng lấp

Trình tự promoter *pgm* (~357 bp) và đoạn gen *lp1261-manB-myc* (~1299 bp) được khuếch đại sử dụng khuôn là các vector pUC57 và pSIP_1261ManB với các cặp mồi tương ứng. Trong đó, cặp mồi M1/M2 mang vị trí cắt của *Bg*III ở đầu N có vai trò khuếch đại đoạn *pgm* từ vector pUC57 và cặp mồi M3/M4 mang vị trí cắt *Eco*RI ở đầu C khuếch đại *lp1261-manB-myc* từ vector pSIP_1261ManB. Sản phẩm PCR1 chứa trình tự *pgm* được nối với sản phẩm PCR2 chứa tổ hợp gen *lp1261-manB-myc* bằng phương pháp mở rộng vùng chồng

lấp (overlapping extension PCR). Phương pháp thực hiện được trình bày chi tiết trong phần 2.2.2.

Sản phẩm nối được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose (Hình 3). Kết quả cho thấy trên bản điện di đồ xuất hiện băng DNA đậm nét tại kích thước khoảng ~1.6 kb, tương ứng với kích thước của đoạn nối *pgm_lp1261-manB-myc* như mong đợi. Điều đó chứng tỏ rằng, trình tự promoter *pgm* đã được nối thành công với tổ hợp gen *lp_1261-manB-myc*.



Hình 3. Kiểm tra sản phẩm PCR nối trình tự promoter *pgm* (339 bp) và đoạn gen *lp1261-manB-myc* (~1299 bp) bằng phương pháp mở rộng vùng chồng lấp (1). Thang DNA chuẩn được thể hiện ở đường chạy M

Sau khi thu được đoạn *pgm-lp1261-manB-myc*, đoạn DNA này được gắn với vector pJET1.2 trước khi được biến nạp vào tế bào *E. coli* nhằm thu nhận một lượng lớn DNA, và hạn chế những rủi ro của các phản ứng cắt ghép sau này.

```

1  AGATCTTGGCACAAGTAATAAACTAAACAAAACAACACTACAAAATATTTCT
51  TTTTGTITTTTCATGATTTTTACACTTCTCTTAGTATGCTTTTGTATATAG
101  TTAGCACAAAAAGCAGAAAAATAAAGTAGAAAAATAAAAAAGATGTTTT
151  TTTGCCCATATCTCTATGAAAAAACTGTGAAATGTGTAATAATATGGATG
201  AAACATTGAATTTAAAAGGAGATATTTTCATGTCAAAATTAGTTTTAATCC
251  GTCACGGTCAAAGTGAATGGAACTTTCAAACCAATTTACTGGTTGGGTT
301  GACGTTAAACCTTTGAGAAAAAGGTGTTGAAGAAGCTAAGAAGGCTATGAA
351  TTTCAAACAGCTGCAAAAAGTAACCGTCTGTCGCCGCGCATCCGCTACTAT
401  TCTTAGCTGCTTGTGGCTCAAGCAAGAGTCTTCAAGTCTAAGCAAACG
451  GCCAATTGGACCGAATCAGCCGAATTAACCAACGATGGACATTTCTAAGTC
501  CACCGATGTTGGTTAGTTCTAACCGCTTGAATAACCAATGAAGGGTTAT
551  ACCGCTTCGGTAAGAAGCGGGGACGATTCGCCGCGTGCACCAACCGTT
601  TCTCCGCTGAACCCGAATGCCAGCCGACGCAAAAGCGGTGATGAACG
651  GTCGCCCACTGCCAATCGGACGGAAAGCGGGTGTATGTCGGGGGCGT
701  TCGGAGGATACAGCCTCGACACATTTTCAACCGCTGAAGCCGACCGGATC
751  AAACAGGCAACAGGACAGCTGCCGGCCATATACGGCTGCGATTATGCAAG
801  AGGATGGCTGGAGCCGAAAAGATCGCCGATACGATTGACTACAGCTGCA
851  ACCGTGATTTGATCGCATACTGGAAAAGCGGAGGCATTCGCCAATCAGC
901  ATGCACCTCGCAAAACCCCGCTTTACTTCCGGTCAATATAAACTCAGAT
951  TTCAAACAGCCAGTATGAGAAATTTAGATTCTTCCACTCCTGAAGGAA
1001  AGCGGCTTGAGCGGATGCTGAGCAAATCGCGGACGCGCTCCAGGAGCTT
1051  GAAAAATGAAGGCGTGCCTGTTCTATTTCAGACCCCTTCAAGAAATGAACGG
1101  CGAATGGTTCTGTTGGGGGCTGACGCAATATAATCAAAAAGACAGCGAAA
1151  GAATCTCCTTGTACAAACAGCTCTATGTGAAAATCTATGACTATATGACA
1201  AAAACAAGAGGCGCTGGATCATCTCTTGTGGGTGTATGCGCCGGACGCCAA
1251  CAGAGACTTTAAAACGGACTTTTATCCGGGCGCATCATATGTGGACATTG
1301  TCGGGCTTGACGCTTATTTTATGACCCCGTACGCCATTGATGGCTACGAA
1351  GAGCTCACATCGCTGAACRAAGCGGTTGCTTTACAGAACTCGGACCGCA
1401  GACGACAAACCGCGGGCTGGATTACGCGCGGTTTATCCATGCCATCAAG
1451  AAAAAATCCCGAAAACGAGTACTTCTCGGCTGGAAACGATGAGTGGAGC
1501  CCGGCTGTAATAAGGGAGCGGACACCCTCTATCTTCAATCATGGACGCT
1551  GAATTAAGGAGAGATATGGGACGGGATCTTTGACGCTGTCGTGGAAAG
1601  AACAAAACACTATCTCAGAAAGGATCTGTAAAGAATTC

```

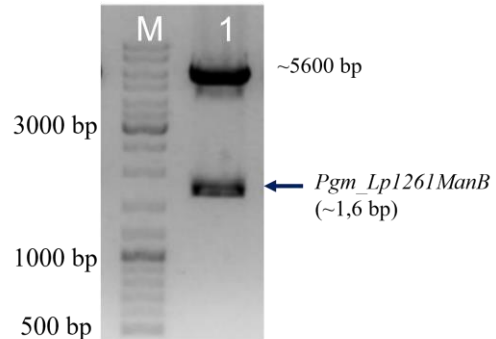
Hình 4. Trình tự nucleotide của đoạn *pgm-lp1261manB-myc* (~1,6 kb). Các nucleotide được viết in nghiêng biểu thị cho các vị trí cắt giới hạn *Bgl*II (AGATCT) và *Eco*RI (GAATTC). Các nucleotide (AGGAGA) được tô đậm và bôi vàng là vị trí gắn của ribosome. Các nucleotide ATG và TAA được bôi đậm luân lượt là vị trí mã hóa cho bộ ba khởi đầu và kết thúc

Để xác định hiệu quả của quá trình nối trình tự promoter *pgm* và tổ hợp gen *lp1261-manB-myc* bằng phản ứng PCR mở rộng vùng chồng lấp ở trên, đoạn gen *pgm-lp1261-manB-myc* trong vector pJET_pgm_1261ManB đã được giải trình tự. Kết quả phân tích và so sánh trình tự giữa dòng mang plasmid tái tổ hợp và trình tự gen gốc cho thấy các dòng tái tổ hợp đều mang tổ hợp gen *pgm_lp1261-manB-myc* (kích thước xấp xỉ 1,6 kb) với trình tự nucleotide (Hình 4) tương đồng 100% với trình tự gốc. Những phân tích trên đã chỉ ra rằng tổ hợp gen *pgm_lp1261-manB-myc* đã được nối chính xác và thành công.

3.2. Thiết kế vector tái tổ hợp pPgm_1261ManB

Để có thể tạo ra vector biểu hiện pPgm_1261ManB chứa promoter thường trực *pgm*, vector pJET_pgm_1261ManB và vector pSIP409GusA cũng được cắt bằng hai enzyme cắt hạn chế *Bgl*II và *Eco*RI để thu được các đoạn chèn *pgm-lp1261-manB-myc* (~1,6 kb) và khung vector (~5,6 kb) tương ứng với các đầu lệch phù hợp. Các đoạn này sau đó được lai với nhau. Sản phẩm lai tạo thành là vector pPgm_1261ManB được biến nạp vào *E. coli* NEB5α (tế bào tạo dòng), trước khi được biến nạp vào tế bào vật chủ *L. plantarum* WCFS1.

Để kiểm tra dòng tế bào *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pPgm_1261ManB, plasmid được tách và cắt bằng hai enzyme cắt ở trên. Kết quả điện di ở Hình 5 cho thấy, sản phẩm cắt plasmid pPgm_1261ManB gồm hai băng với kích thước mong đợi 5.6 kb và 1.6 kb, đúng như dự đoán. Điều này chứng tỏ, vector pPgm_1261ManB đã được tạo thành công.

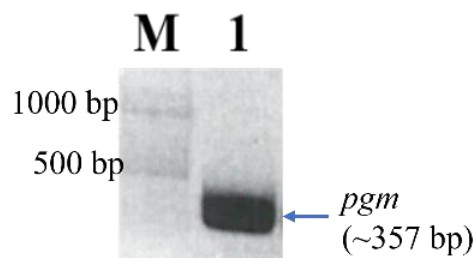


Hình 5. Kiểm tra dòng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pPgm_1261ManB bằng phản ứng cắt plasmid, tạo ra hai băng với kích thước 5.6 kb và 1.6 kb (đường chạy 1). Thang DNA chuẩn được thể hiện ở đường chạy M

3.3. Biến nạp plasmid tái tổ hợp pPgm_1261ManB vào vi khuẩn *L. plantarum* WCFS1

Để tạo ra tế bào *L. plantarum* WCFS1 mang plasmid tái tổ hợp pPgm_1261ManB phục vụ cho mục tiêu biểu hiện và cố định ManB trên bề mặt tế bào, plasmid tái tổ hợp pPgm_1261ManB được tách từ tế bào *E. coli* NEB5α và được biến nạp vào tế bào vi khuẩn biểu hiện *L. plantarum* WCFS1 theo quy trình được mô tả trước đây. Các khuẩn lạc *L. plantarum* được sàng lọc trên môi trường MRS có kháng sinh erythromycine bằng phương pháp PCR khuẩn lạc sử dụng hai môi M1 và M2 (cặp môi khuếch đại đoạn *pgm*). Sản phẩm PCR tạo ra dự đoán có kích thước khoảng 357 bp. Đúng như dự đoán, ở đường chạy 1 tương ứng với

dịch chiết của chủng *L. plantarum* mang pPgm_1261Man có băng DNA to đậm ở kích thước khoảng 357 bp (Hình 6). Điều này chứng tỏ các chủng vi khuẩn này có mang plasmid pPgm_1261Man mong muốn.



Hình 6. Kiểm tra dòng *L. plantarum* mang plasmid tái tổ hợp pPgm_1261ManB bằng phương pháp PCR khuẩn lạc tạo ra băng với kích thước 357 bp (đường chạy 1). Thang chuẩn DNA thể hiện ở đường chạy M

4. Kết luận

Chúng tôi đã tạo dòng thành công hệ thống vector biểu hiện và cố định liên tục ManB trên bề mặt tế bào lợi khuẩn *L. plantarum* WCFS1 dựa trên promoter thường trực Pgm. Hệ thống này cũng là mối quan tâm nghiên cứu cho các mục tiêu ứng dụng khác như sản xuất và phân phối protein đích đến vật chủ (người và động vật).

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2019.339.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. Yamabhai, S. Sak-Ubol, W. Srila, and D. Haltrich, "Mannan biotechnology: from biofuels to health", *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 36, no. 1, pp. 32-42, 2014.
- [2] C. Songsiririthigul, B. Buranabanyat, D. Haltrich, and M. Yamabhai, "Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan licheniformis in *Escherichia coli*", *Microbial Cell Factories*, vol. 9, no. 20 pp. 1-13, 2010,.
- [3] S. Sak-Ubol *et al.*, "Secretory production of a beta-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system", *Microbial Cell Factories*, vol. 15, no. 1, pp. 1-12, 2016.
- [4] K. Leenhouts, G. Buist, and J. Kok, "Anchoring of proteins to lactic acid bacteria", in *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, vol. 76, pp. 367-376, 1999.
- [5] C. Michon, P. Langella, V. G. H. Eijssink, G. Mathiesen, and J. M. Chatel, "Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications", *Microbial Cell Factories*, vol. 15, no. 1, pp. 1-16, 2016.
- [6] H. M. Nguyen *et al.*, "Display of a β - mannanase and a chitosanase on the cell surface of *Lactobacillus plantarum* towards the development of whole - cell biocatalysts", *Microbial Cell Factories*, vol. 15, no. 1, pp. 1-14, 2016.
- [7] T. Duong, M. J. Miller, R. Barrangou, M. A. Azcarate-Peril, and T. R. Klaenhammer, "Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus*", *Microbial Biotechnology*, vol. 4, no. 3, pp. 357-367, 2011.
- [8] H. M. Nguyen *et al.*, "Constitutive expression and cell-surface display of a bacterial β -mannanase in *Lactobacillus plantarum*", *Microbial Cell Factories*, vol. 18, no. 1, pp. 1-12, 2019.
- [9] M. Kleerebezem *et al.*, "Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1", *PNAS*, vol. 100, no. 4, pp. 1990-1995, 2003.
- [10] T. Aukrust and H. Blom, "Transformation of *Lactobacillus* strains used in meat and vegetable fermentations", *Food Research International*, vol. 25, no. 4, pp. 253-261, 1992.