

## Thiết kế vector biểu hiện pPICZαA mang gen MGG00245 mã hóa cho enzyme PMO

Construction of expression vector pPICZαA carrying MGG00245 gene coding for a putative PMO enzyme

Lê Quỳnh Loan<sup>1,2</sup>, Vũ Văn Vân<sup>3</sup>, Nguyễn Phước Khải Hoàn<sup>2</sup>, Trần Văn Hiếu<sup>2</sup>,  
Nguyễn Minh Hùng<sup>4,5\*</sup>  
Quynh Loan Le<sup>1,2</sup>, Van Van Vu<sup>3</sup>, Khai Hoan Nguyen Phuoc<sup>2</sup>, Van Hieu Tran<sup>2</sup>,  
Minh Hung Nguyen<sup>4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành, Đại học Nguyễn Tất Thành

<sup>4</sup>Trung tâm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Cao, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>5</sup>Khoa Y, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam

<sup>1</sup>Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>2</sup>University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City

<sup>3</sup>NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University

<sup>4</sup>Center for Molecular Biology, Institute of Research and Development, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam

<sup>5</sup>Faculty of Medicine, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam

(Ngày nhận bài: 15/01/2020, ngày phản biện xong: 28/03/2020, ngày chấp nhận đăng: 27/6/2020)

### Tóm tắt

Các enzyme polysaccharide monooxygenase (PMO) có nguồn gốc từ nhiều chủng nấm và vi khuẩn, được biết đến với khả năng phân hủy các polysaccharide bền như chitin, cellulose và tinh bột. Chúng có tiềm năng ứng dụng cao trong việc tăng hiệu quả phân hủy polysaccharide, tuy nhiên vẫn chưa được nghiên cứu và việc chủ động được nguồn protein là vô cùng quan trọng cho các nghiên cứu về sau. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thiết kế vector biểu hiện pPICZαA mang gen mã hóa cho PMO (pPICZαA-PMO) nhằm sản xuất protein PMO tái tổ hợp bằng chủng nấm men *Pichia pastoris*. Đầu tiên, chúng tôi đã tối ưu hóa codon cho gen mã hóa PMO để phù hợp chủng chủ. Tiếp đến, vector pPICZαA-PMO được tạo ra bằng kỹ thuật gen. Sau đó, vector tái tổ hợp được biến nạp vào chủng chủ *P. pastoris* X33. Kết quả thu được, chúng tôi đã tạo thành công vector tái tổ hợp pPICZαA-PMO và biến nạp thành công vào chủng nấm men *P. pastoris* X33. Đây là cơ sở để chúng tôi tiếp tục sản xuất PMO tái tổ hợp cho các nghiên cứu về sau.

**Từ khóa:** Polysaccharide monooxygenase; PMO; *Pichia pastoris*; Biểu hiện protein.

\*Corresponding Author: Nguyen Minh Hung; Center for Molecular Biology, Institute of Research and Development, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam; Faculty of Medicine, Duy Tan University, Da Nang, 550000, Vietnam  
Email: hungmolbio@gmail.com

## Abstract

The polysaccharide monooxygenase (PMO) enzymes are sourced from multiple fungal and bacterial strains, and are known for their ability to break down durable polysaccharides such as chitin, cellulose, and starch. They have a high potential for polysaccharide degradation efficiency, but only some have been studied, and proactive protein sources are extremely important for future studies. Therefore, we designed the expression vector pPICZaA that carries the gene coding for PMO (pPICZaA-PMO) to produce recombinant PMO protein using the yeast strain *Pichia pastoris* X33. First, we optimized the codon for the PMO coding gene to match the host strain. Next, the pPICZaA-PMO vector was created using genetic engineering. The recombinant vector was then transformed into the host strain *P. pastoris* X33. As a result, we successfully created the recombinant vector pPICZaA-PMO and successfully transformed it into *P. pastoris* X33 yeast strains. This is the basis for us to continue to produce recombinant PMO for later research.

**Keywords:** Polysaccharide monooxygenase; PMO; *Pichia pastoris*; Protein expression.

## 1. Mở đầu

Các enzyme PMO được tổng hợp và tiết ra bởi rất nhiều chủng nấm và vi khuẩn khác nhau [1-6]. Gần đây các enzyme này được biết đến với khả năng phân cắt các loại polysaccharide bền, chẳng hạn như chitin [5, 7, 8], cellulose [5, 8] và tinh bột [9, 10]. Hiện nay, có bốn họ enzyme PMO: (i) PMO đặc hiệu cellulose từ nấm [11-14] (còn có các tên khác là GH61 hoặc AA9); (ii) PMO đặc hiệu chitin [5, 7, 8] và/hoặc cellulose [5, 7, 8] (CBM33 hoặc AA10) từ vi khuẩn; (iii) PMO đặc hiệu chitin từ nấm (AA11) [8]; và (iv) PMO đặc hiệu tinh bột từ nấm (AA13) [9, 10]. Các enzyme PMO đặc hiệu cellulose và chitin có khả năng oxi hóa và phân cắt trực tiếp bề mặt cơ chất mà không thực hiện bước tách chuỗi polysaccharide khỏi cơ chất không tan. Các đầu chuỗi mới được tạo thành bởi các enzyme PMO sau đó sẽ tiếp tục được thủy phân bởi các enzyme GH, làm tăng hiệu quả phân hủy polysaccharide của các enzyme GH.

Hiện nay, công nghệ protein tái tổ hợp đang trở nên phổ biến với các chủng chủ có khả năng biến đổi sau dịch mã. *Pichia pastoris* có khả năng đạt mật độ tế bào rất cao trong quá trình lên men, điều đó giúp nâng cao hiệu quả sản xuất protein. Bên cạnh đó, với sự hiểu biết về bộ gen của *P. pastoris* cùng với kỹ thuật gene đã cho phép chèn vào hệ gene của chủng chủ này những trình tự mã hóa cho protein mong muốn và biểu hiện ở dạng tiết vào môi trường,

thuận tiện cho việc thu nhận sản phẩm. Vì vậy với mục tiêu chủ động tạo nguồn enzyme PMO cho các nghiên cứu về sau, trong nghiên cứu này chúng tôi mô tả quy trình tối ưu codon và thiết kế vector pPICZaA nhằm mục đích biểu hiện một loại PMO ở nấm men *Pichia pastoris*.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Tối ưu hóa codon và khuếch đại gene PMO00245

Tối ưu hóa các codon sử dụng nhằm tăng hiệu quả biểu hiện protein có nguồn gốc từ nấm mốc trên hệ thống nấm men *P. pastoris* với các thông số: 1) không chứa các codon hiếm hiện diện dưới 10%; 2) không chứa các vị trí cắt hạn chế mới hoặc vị trí cắt hạn chế có trong MCS của vector dòng hóa; 3) không tạo ra các cấu trúc RNA kém bền SD (splice donor).

Gene PMO00245 mã hóa cho protein PMO sau khi tối ưu được tổng hợp hóa học, sau đó được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp môi đặc hiệu PMOFXho: 5' CTCGAGATGTTTCGCCAAGCTCGCC-3' và PMORXba: 5'-TCTAGAAATCCTTGGACAAAGTCAACGCATG-3' lần lượt mang vị trí cắt của enzyme giới hạn *XhoI* và *XbaI*. Thể tích của phản ứng PCR là 50  $\mu$ L bao gồm 2X MyTaq Red Mix, 0,5 mM mỗi loại môi; 50 ng DNA khuôn. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu kỳ nhiệt: bước 1: 95 $^{\circ}$ C trong 5 phút; bước 2: 95 $^{\circ}$ C trong 30 giây; bước 3: 55 $^{\circ}$ C trong 30 giây; bước 4:

72<sup>0</sup>C trong 30 giây; bước 5: 72<sup>0</sup>C trong 5 phút; bước 6: 4<sup>0</sup>C; từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và được chụp ảnh trên máy geldoc nhờ nhuộm phát quang bởi RedSafe (iNtRON). Sản phẩm PCR được thổi gel và tinh sạch bằng bộ Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, 28706).

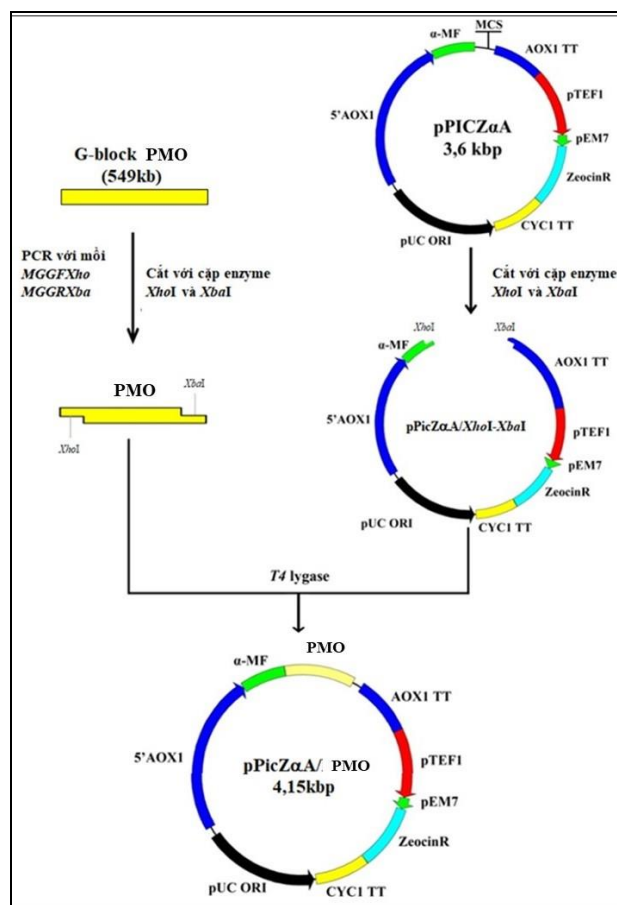
## 2.2. Cắt enzyme hạn chế và gắn gene vào vector biểu hiện

Sản phẩm PCR và vector biểu hiện pPICZαA (TFS, V19520) được cắt bằng hai enzyme giới hạn *XhoI* và *XbaI* (NEB). Thành phần phản ứng cắt enzyme giới hạn bao gồm: 1 μg DNA, enzyme *XhoI* 1,5 μL, enzyme *XbaI* 1,5 μL, 10X buffer Tagno 10 μL, H<sub>2</sub>O vừa đủ đến thể tích 50 μL. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37<sup>0</sup>C trong 2 giờ. Sản phẩm cắt enzyme giới hạn (sản phẩm PCR và vector pPICZαA) được điện di trên gel agarose 1% và thổi gel bằng bộ Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, 28706).

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pPICZαA nhờ enzyme T4-ligase. Thành phần phản ứng trong thể tích 20 μL bao gồm: 10× Rapid Ligation Buffer, 5 μL sản phẩm PCR và vector pPICZαA (~100 ng mỗi loại), 1 μL 5 U/μL T4 DNA ligase, H<sub>2</sub>O vừa đủ đến 20 μL. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 22<sup>0</sup>C trong 2 giờ.

## 2.3. Biến nạp vector tái tổ hợp pPICZαA vào E. coli DH5α

10 μL hỗn hợp ghép nối gene pPICZαA được sử dụng để biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α nhờ sốc nhiệt ở 42<sup>0</sup>C trong 30 giây. Tế bào sau biến nạp được nuôi phục hồi ở 37<sup>0</sup>C trong 1 giờ và tiếp tục được cấy trải lên đĩa môi trường LB chọn lọc có bổ sung 25 μg/mL Zeocin (TFS, R25001) và ủ qua đêm ở 37<sup>0</sup>C. Quy trình thiết kế vector biểu hiện pPICZαA được thể hiện trong Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế vector pPICZαA mang gene PMO00245

## 2.4. Chọn dòng bằng phương pháp PCR khuẩn lạc

Sau khi thu được các khuẩn lạc kháng Zeocin trên đĩa môi trường LB, 10 khuẩn lạc đã được lựa chọn cho phản ứng PCR colony cặn môi đặc hiệu 3'-AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' và 5'-AOX1: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'. Thể tích phản ứng PCR là 25 μL bao gồm 2X MyTaq Red Mix, 0,5 mM mỗi loại môi; DNA khuôn chứa trong khuẩn lạc. Phản ứng PCR được thực hiện theo chu kỳ nhiệt: bước 1: 95<sup>0</sup>C trong 5 phút; bước 2: 95<sup>0</sup>C trong 30 giây; bước 3: 55<sup>0</sup>C trong 30 giây; bước 4: 72<sup>0</sup>C trong 30 giây; bước 5: 72<sup>0</sup>C trong 5 phút; bước 6: 4<sup>0</sup>C; từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 30 chu kỳ. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose

1% và được chụp ảnh trên máy geldoc nhờ nhuộn phát quang bởi RedSafe (iNtRON). Chọn 02 khuẩn lạc dương tính với PCR colony để tách plasmid và giải trình tự nucleotide.

### 2.5. Điện biến nạp pPICZ $\alpha$ A-PMO00245 vào tế bào *Pichia pastoris* X33

Plasmid pPICZ $\alpha$ A-PMO00245 được thu nhận từ chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ /pPICZ $\alpha$ A-PMO00245 bằng bộ Kit GeneJET plasmid miniprep. Trước khi biến nạp vào tế bào khả biến *Pichia pastoris* X33, plasmid pPICZ $\alpha$ A-PMO00245 được mở vòng tại vị trí trên vùng promoter AOX1 bằng enzyme *SacI*. Thành phần phản ứng cắt enzyme giới hạn *SacI* như sau: 10X buffer 5  $\mu$ L, plasmid pPICZ $\alpha$ A-PMO00245 30  $\mu$ L, enzyme *SacI* 2  $\mu$ L trong tổng thể tích 50  $\mu$ L. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 04 giờ. Sau khi ủ, gia nhiệt 80°C trong 20 phút để bất hoạt phản ứng, tinh sạch lại sản phẩm cắt bằng cột EZ-10 theo quy trình của nhà sản xuất.

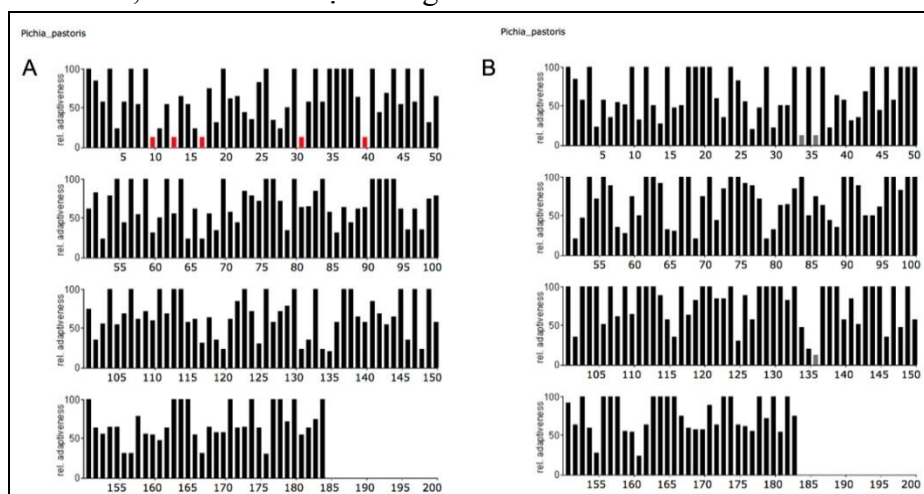
Tiến hành điện biến nạp theo quy trình sau: 1) Chuẩn bị và giữ lạnh ở 4°C các thành phần: tế bào khả biến *P. pastoris* X33; plasmid pPICZ $\alpha$ A-PMO00245/*SacI*; cuvet điện biến nạp; môi trường YPD; 2) Bổ sung 5  $\mu$ g pPICZ $\alpha$ A-PMO00245/*SacI* vào ống tế bào khả biến *P. pastoris* X33, hòa đều nhẹ nhàng.

3) Hút toàn bộ hỗn hợp vào cuvet điện biến nạp và điều chỉnh hệ thống điện biến nạp với thông số: 25  $\mu$ F, hiệu điện thế 1,5 kV, điện trở 200  $\Omega$ . Tiến hành điện biến nạp trong 5 mili giây. 4) Bổ sung 1 ml môi trường YPD, hòa đều hỗn hợp, chuyển vào ống ly tâm 1,5 ml. Ủ ống ly tâm chứa hỗn hợp ở 30°C trong 2 giờ. 5) Ly tâm 6000 vòng 3 phút, loại bỏ 900  $\mu$ l dịch nổi. Hòa đều sinh khối và tiến hành nuôi cấy trải bằng môi trường YPD-zeocin100. Ủ ở 30°C trong 2 ngày cho đến khi xuất hiện khuẩn lạc. Tiếp tục chọn các khuẩn lạc kháng Zeocin trên môi trường YPD bằng PCR colony.

## 3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

### 3.1. Kết quả tối ưu hóa codon gene PMO00245

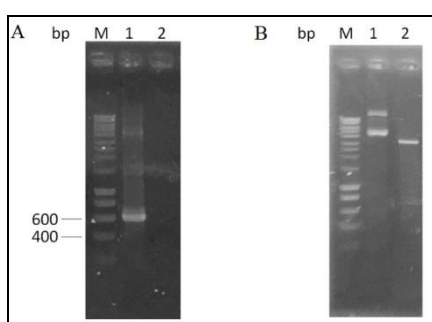
Kết quả cho thấy, sau quá trình tối ưu hóa tần số các codon hiếm (dưới 10%, Hình 2A) đã hoàn toàn được thay thế bằng các codon phổ biến hơn trong nấm men (Hình 2B). Ngoài ra, khi phân tích bản đồ enzyme cắt hạn chế cho thấy, quá trình tối ưu hóa cũng không tạo các vị trí cắt của enzyme giới hạn có trong MCS của vector pPICZ $\alpha$ A, đặc biệt là không còn vị trí nhận biết của enzyme *XhoI* là enzyme giúp dòng hóa gene mục tiêu vào ngay sau trình tự tiết  $\alpha$ -factor của vector.



Hình 2. Tần số xuất hiện của các codon tương ứng với trình tự trước khi tối ưu (A) và sau khi tối ưu (B) theo bảng mã ưu tiên sử dụng của *P. pastoris*

### 3.2. Kết quả PCR và cắt enzyme hạn chế

Gene PMO00245 mã hóa cho PMO00245 được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu PMOFXho và PMORXba lần lượt mang vị trí nhận biết của enzyme XhoI và XbaI. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 549 bp (Hình 2A) đúng bằng kích thước của đoạn gene PMO00245 khi thiết kế cặp mồi PMOFXho và PMORXba. Đối chứng âm không xuất hiện bất kì băng DNA nào, chứng tỏ không có sản phẩm ngoại nhiễm.



**Hình 3. Ảnh điện di DNA trên gel agarose 1%. A) Sản phẩm PCR khuếch đại gene PMO00245; M. thang DNA, 1. Sản phẩm PCR, 2. Đối chứng âm; B) Sản phẩm plasmid pPICZαA được cắt với 02 enzyme giới hạn XhoI và XbaI; M. thang DNA, 1. plasmid trước khi xử lý, 2. plasmid sau khi xử lý enzyme giới hạn.**

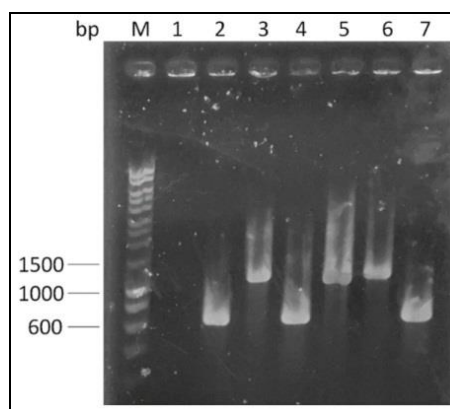
Gene PMO00245 và vector pPICZαA sau đó được cắt bằng hai enzyme hạn chế XhoI và XbaI để tạo hai đầu dính phục vụ cho việc ghép nối gene PMO00245 vào vector pPICZαA. Sản phẩm cắt enzyme sau đó được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pPICZαA được thể hiện trên Hình 3B, làn số 2 cho thấy, chỉ còn một băng DNA, chứng tỏ plasmid đã được cắt mở vòng thành công.

### 3.3. Kết quả tạo dòng tế bào *E. coli* DH5α mang vector biểu hiện

Gene PMO00245 và plasmid pPICZαA sau khi được xử lý với enzyme cắt giới hạn được nối lại với nhau bằng enzyme T4 ligase. Sau đó

được biến nạp vào *E. coli* DH5α và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có chứa kháng sinh Zeocin. Các khuẩn lạc được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi 5'AOX1 và 3'AOX1. Kết quả PCR cho thấy có sự chênh lệch kích thước của sản phẩm PCR (Hình 4, làn 3, 5, 6) chứng tỏ gene PMO00245 đã được chèn vào plasmid, đồng thời kích thước chênh lệch phù hợp với kích thước gene mã hóa (549bp) PMO00245 cộng với kích thước đầu 5'AOX và 3-AOX của vector. Các làn 2, 4, 7 xuất hiện băng có kích thước ngắn hơn chứng tỏ đây là sản phẩm nhân đoạn đầu 5'AOX và 3-AOX của vector mà không có đoạn gene PMO00245 được chèn vào.

Sau khi kiểm tra khuẩn lạc dự tuyển bằng phương pháp PCR khuẩn lạc, các khuẩn lạc đã xác định mang plasmid tái tổ hợp chứa gene mục tiêu được hoạt hóa để tăng sinh và tinh sạch sử dụng bộ kit GeneJET plasmid miniprep. Plasmid sau khi được tinh sạch được giải trình tự nucleotide bằng cặp mồi 5'AOX và 3-AOX. Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy gene PMO00245 được chèn vào plasmid pPICZαA có trình tự hoàn toàn đúng với trình tự gen PMO00245 đã được tối ưu (Hình 5).



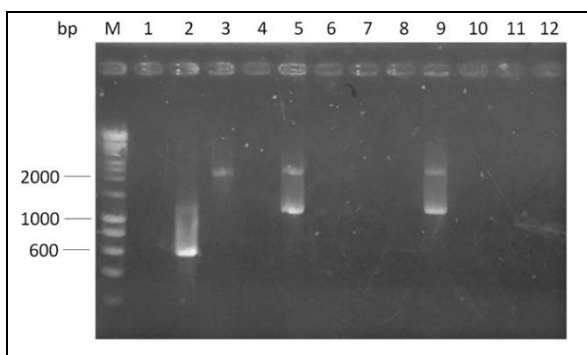
**Hình 4. Ảnh điện di gel agarose kết quả PCR khuẩn lạc. M. thang DNA, 1. chứng âm, 2-7: các khuẩn lạc dự tuyển.**

	881	891	901	911	921	931	941	951	961	971	981	
<b>G-block clone 6</b>	-----	ATGTCGCCAAGCTGGCCATAGTCAGTGGCTAGTTCGCAACGGTTTAGCACATGGTAAACATTACAGTACCACCTTGCCTGATACCTGGGGCAGCAATGGCG										
Consensus		atgttcgccaagctggccatagtcagtgctctagttgcaacggtttagcacatggtaaacattacagtagccaccttgcctgattacctggggcagcaatggcg										
<b>G-block clone 6</b>	991	1001	1011	1021	1031	1041	1051	1061	1071	1081	1091	
<b>G-block clone 6</b>	AAGCGCTGTGGCAGCCGGCTATCCGCTGTGCAAGCCGATGGTACTATTCGTTAGAAGACGTTAAAGTAAACGGGAGCAACCTGATATCTATCGTTGTCCAGGAGC											
Consensus	aaggcgtgtgggagccggcgtatccgctgtgcaagccgatggtactatccgttagaagacgttaaagttaacgggagcaaacctgtaattctatcgttgtgtgaggagc											
<b>G-block clone 6</b>	1101	1111	1121	1131	1141	1151	1161	1171	1181	1191	1201	
<b>G-block clone 6</b>	TGCTTTCGANGTATATAAGACCCGACTACAGACCTTCAAGCGAGCAGCGTATACAAATGAAGCAGCAATCCCAATTCCTCATGAAGTCCCTGAGCTTAGCTATTA											
Consensus	tgttcttcaagataataaagaccgactacagaccttcaagcgaggacaggtgatataaagaagcagcaatcccaattcctcatgaagtccttgaagcttagtattat											
<b>G-block clone 6</b>	1211	1221	1231	1241	1251	1261	1271	1281	1291	1301	1311	
<b>G-block clone 6</b>	TGATTCACAGCTTAAACAAACCATAGGTCAGCTTTGATTTTCTTGTGAGCTATGCCGATGAAAAGTTGCTTAGCTCCCGGAGCAGACCTGCTCAGTGTACT											
Consensus	togatccaagtctacaagaacataggtcagccttgattttctogtagctatgocgatgaaaagtgcctaaagctgcccggagcaaacactgacctcagtttact											
<b>G-block clone 6</b>	1321	1331	1341	1351	1361	1371	1381	1391	1401	1411	1421	
<b>G-block clone 6</b>	ATGCCCAAGCTTAAAGCCAACTAGTGTACAACGGTGGTGAATGCGTCTCCAGTGGCATTGGGTTGGAACAGCCGCCAAGCAGCTTACCACTATGCGTTGACTTTGT											
Consensus	atgcccaagctttaaagccaaactagtgtaacaacgggtggatgcaagcgtctccagttggcattgggttggaaagcggccaaacagacttaccagctcagtggttgacttgt											
<b>G-block clone 6</b>	1431	1441	1451	1461	1471	1481	1491	1501	1511	1521	1531	
<b>G-block clone 6</b>	CCANGG-----											
Consensus	ccaagga											

Hình 5. Kết quả giải trình tự nucleotide gene PMO00245 trong vector pPICZαA.

3.4. Kết quả tạo dòng tế bào *Pichia pastoris* X33 mang vector biểu hiện

Plasmid tái tổ hợp pPICZαA-PMO00245 được cắt mở vòng tại vị trí *SacI* để tăng hiệu suất trao đổi chéo vào hệ gene của nấm men, sau đó được biến nạp vào *P. pastoris* X33 bằng phương pháp điện biến nạp. Hỗn hợp biến nạp được nuôi cấy trên môi trường YPD-zeocin. Sau đó, các khuẩn lạc được kiểm tra một lần nữa bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi 3’AOX1 và 5’AOX1. Kết quả điện di sản phẩm PCR colony được thể hiện trên Hình 3 cho thấy làn 5, 9 xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 1100bp phù hợp với trình tự gene mục tiêu đã chèn vào giữa promoter và terminator AOX1 của plasmid. Đồng thời xuất hiện băng có kích thước khoảng 2200 Kb (Hình 9. làn 3, 5, 9) tương ứng với kích thước trình tự AOX trên bộ gen của chủng *P. pastoris* chứng tỏ kiểu hình của chủng *P. pastoris* khi được chèn gen là Mut<sup>+</sup>.



Hình 6. Kết quả điện di sau khi PCR khuẩn lạc các khuẩn lạc *P. pastoris* dự tuyển. M. thang DNA, 1. chứng âm; 2. pPICZαA; 3. *P. pastoris* X33, 4-11. khuẩn lạc dự tuyển

4. Kết luận

Đã thiết kế thành công vector biểu hiện pPICZαA mang gene PMO00245 mã hóa cho PMO00245.

Đồng thời tạo thành công chủng *P. pastoris* X33:PMO00245 mang gen mã hóa PMO00245.

Lời cảm ơn: Công trình khoa học này là một phần kết quả của Chương trình Hợp tác Khoa học và Công nghệ Nghị định thư giữa Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Bộ Ngoại giao và Hợp tác quốc tế Italia (Mã số NĐT.36.ITA/18).

Tài liệu tham khảo

- [1]. Horn, S.J., et al., *Novel enzymes for the degradation of cellulose*. Biotechnology for Biofuels, 2012. **5**: p. 45.
- [2]. Hemsworth, G.R., G.J. Davies, and P.H. Walton, *Recent insights into copper-containing lytic polysaccharide mono-oxygenases*. Current Opinion in Structural Biology, 2013. **23**: p. 660-668.
- [3]. Tian, C., et al., *Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2009. **106**: p. 22157-22162.
- [4]. Yakovlev, I., et al., *Substrate-specific transcription of the enigmatic GH61 family of the pathogenic white-rot fungus Heterobasidion irregulare during growth on lignocellulose*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **95**: p. 979-990.
- [5]. Forsberg, Z., et al., *Comparative study of two chitin-active and two cellulose-active AA10-type lytic polysaccharide monooxygenases*. Biochemistry, 2014. **53**: p. 1647-1656.
- [6]. Beeson, W.T., et al., *Cellulose Degradation by Polysaccharide Monooxygenases*. Annual Review of Biochemistry, 2015. **84**: p. 923-946.

- [7]. Vaaje-Kolstad, G., et al., *An Oxidative Enzyme Boosting the Enzymatic Conversion of Recalcitrant Polysaccharides*. Science, 2010. **330**: p. 219-222.
- [8]. Hemsworth, G.R., et al., *Discovery and characterization of a new family of lytic polysaccharide monooxygenases*. Nature chemical biology, 2014. **10**: p. 122-126.
- [9]. Lo Leggio, L., et al., *Structure and boosting activity of a starch-degrading lytic polysaccharide monooxygenase*. Nature Communications, 2015. **6**: p. 5961.
- [10]. Vu, V.V., et al., *A family of starch-active polysaccharide monooxygenases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**: p. 13822-13827.
- [11]. Harris, P.V., et al., *Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family*. Biochemistry, 2010. **49**: p. 3305-3316.
- [12]. Quinlan, R.J., et al., *Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. **108**: p. 15079-15084.
- [13]. Phillips, C.M., et al., *Cellobiose Dehydrogenase and a Copper-Dependent Polysaccharide Monooxygenase Potentiate Cellulose Degradation by Neurospora crassa*. ACS Chemical Biology, 2011. **6**: p. 1399-1406.
- [14]. Beeson, W.T., et al., *Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases*. Journal of the American Chemical Society, 2012. **134**: p. 890-892.





