

BIỂU HIỆN VÀ THU NHẬN ENZYME T4 DNA LIGASE TÁI TỔ HỢP TRONG *E. COLI*

Dương Long Duy, Lương Văn Đức, Nguyễn Thị Phương Hiếu, Trần Thanh Hòa,
Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 03 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 18 tháng 11 năm 2011)

TÓM TẮT: Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày kết quả cảm ứng biểu hiện và tinh chế thu nhận enzyme T4 DNA ligase tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp pET16b-T4Dnl mang gen gp30 mã hóa enzyme T4 DNA ligase. Thẻ 10xHis được gắn vào đầu N của protein T4 DNA ligase để hỗ trợ cho việc tinh chế thu nhận. Chúng tôi tiến hành biến nạp plasmid pET16b-T4Dnl vào tế bào *E. coli* BL21(DE3). Sau đó tiến hành cảm ứng biểu hiện protein 10xHis-T4Dnl bằng IPTG và tinh chế thu nhận bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột Ni-NTA. Kết quả biểu hiện và tinh chế được xác nhận bằng SDS-PAGE và lai Western. Protein thu nhận được thử hoạt tính bằng phương pháp nối các đoạn DNA λ /HindIII.

Từ khóa: T4 DNA ligase, 10xHis-T4Dnl, *E. coli*, protein tái tổ hợp.

MỞ ĐẦU

T4 DNA ligase có nguồn gốc từ thực khuẩn thể T4, được mã hóa bởi gen gp30 dài 1464bp nằm trong đoạn DNA 1,9kb khi cắt bộ gen phage T4 bằng enzyme HindIII. Cấu trúc protein chỉ gồm một mạch polypeptide với trọng lượng phân tử khoảng 55.23kDa. T4 DNA ligase thuộc họ enzyme nucleotidyl transferase, có vai trò xúc tác phản ứng hình thành liên kết phosphodiester giữa hai phân tử DNA, cần năng lượng là ATP và cofactor là Mg²⁺. Cấu trúc không gian ba chiều của T4 DNA ligase vẫn chưa được nghiên cứu [4].

Ngày nay người ta thường sử dụng hệ thống sản xuất protein tái tổ hợp nhờ vi sinh vật, đặc biệt là chủng chủ *Escherichia coli*. Trong số các hệ thống vector sử dụng để biểu hiện

protein tái tổ hợp trong *E. coli* thì hệ thống vector pET dựa trên promoter T7 được sử dụng rộng rãi nhất. Do promoter T7 chỉ tương thích với T7 RNA polymerase nên những vector có promoter T7 chỉ được sử dụng cho hệ thống tế bào chủ *E. coli* có mang gen mã hóa T7 RNA polymerase như *E. coli* BL21(DE3). Gen mã hóa T7 RNA polymerase được gắn vào bộ gen tế bào chủ dưới sự kiểm soát của lacI repressor và promoter lacUV5. T7 RNA polymerase chỉ được biểu hiện khi được cảm ứng bởi IPTG [2].

Để thu nhận protein tái tổ hợp, có nhiều chiến lược được nghiên cứu phát triển và đem lại hiệu quả cao. Một trong những chiến lược được sử dụng phổ biến là protein mục tiêu được gắn thêm các đuôi dung hợp ở đầu C hay đầu N. Các đuôi dung hợp này có ái lực chuyên biệt

với chất nền sắc ký nhất định và do đó có thể tinh chế thu nhận protein mục tiêu thông qua phương pháp sắc ký ái lực cho độ tinh sạch khá cao chỉ qua một bước tinh chế [1].

Hoạt tính của enzyme DNA ligase có thể được kiểm tra bằng nhiều phương pháp khác nhau [3]. Phương pháp trắng xanh dựa vào khả năng nối chèn đoạn DNA bất kỳ vào gen mã hóa cho enzyme β -galactosidase. Phương pháp nối các đoạn DNA đầu bằng hoặc đầu dính thường nối các đoạn DNA của bộ gen phage λ được cắt bằng enzyme cắt giới hạn. Và một số phương pháp sử dụng đồng vị phóng xạ.

Trong bài báo cáo này, chúng tôi trình bày các kết quả biểu hiện và tinh chế thu nhận T4 DNA ligase dung hợp với thể 10xHis cùng với kết quả kiểm tra hoạt tính protein thu nhận được.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và plasmid

Escherichia coli DH5 α [F- *endA1 hsdR17 (rk-/mk-)* *supE44 thi λ -recA1 gyrA96 Δ lacU169 (ϕ 80 *lacZ Δ M15)*] được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và lưu trữ plasmid. *E. coli* BL21(DE3) [F-*dcm ompT hsdS_B (r_B-m_B-)* *gal met*] được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và biểu hiện protein mục tiêu dưới sự cảm ứng của IPTG. Plasmid pET16b-*T4Dnl* được cung cấp bởi Tiến sĩ Richard P. Bowater (Trường Khoa học Sinh học, Đại học East Anglia, Norwich NR4 7TJ, Anh) có kích thước 7167 kb, mang gen *T4Dnl* mã hóa cho enzyme T4 DNA ligase ở vị trí enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Nde*I, được dùng để biểu hiện T4 DNA ligase dạng dung hợp với thể 10xHis*

dưới sự kiểm soát của promoter T7 khi có mặt của IPTG và có mang gen kháng ampicilline dùng để sàng lọc thể biến nạp.

Biến nạp, sàng lọc và kiểm tra

Plasmid pET16b-*T4Dnl* được biến nạp vào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp CaCl₂ lạnh. Thể biến nạp DH5 α /pET16b-*T4Dnl* được sàng lọc trên môi trường LB thạch có bổ sung ampicilline 100 μ g/ml. Thu nhận thể biến nạp và tách plasmid bằng phương pháp SDS kiềm. Plasmid thu nhận được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator đặc hiệu cho vùng thượng lưu và vùng hạ lưu của vùng MCS trên plasmid pET16b và phản ứng cắt với hai enzym *Bam*HI và *Nde*I. Điện di sản phẩm khuếch đại và sản phẩm cắt trên gel agarose 1% và so sánh với thang DNA 1kb để kiểm tra kích thước. Plasmid pET16b-*T4Dnl* tách chiết được biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp CaCl₂ lạnh và được sàng lọc kiểm tra với các bước tương tự.

Điều kiện nuôi cấy và biểu hiện protein 10xHis-T4Dnl

Cảm ứng biểu hiện protein 10xHis-T4Dnl từ chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-*T4Dnl* bằng cách nuôi cấy lắc hoạt hóa qua đêm và cấy chuyển (tỉ lệ 1:20) sang ống nghiệm chứa 5ml môi trường LB (10g/l tryptone, 5g/l cao nấm men và 5g/l muối NaCl) bổ sung ampicilline 100 μ g/ml ở 37°C, tốc độ lắc 250 vòng/phút. Khi OD₆₀₀ đạt 0,8-1, bổ sung IPTG đến nồng độ cuối là 0,5mM và ethanol 2% (v/v), nuôi cấy lắc 250 vòng/phút ở 17°C trong 4 giờ. Ly tâm dịch nuôi cấy thu sinh khối và tiến hành phá tế bào bằng phương pháp sonicate. Dịch

phá tế bào được ly tâm để thu nhận mẫu protein nổi và tủa. Các mẫu protein thu được sẽ được điện di trên gel polyacrylamide 15% có sự hiện diện của SDS và so sánh kích thước với thang protein chuẩn. Protein sau khi điện di được chuyển lên màng lai HybondTM (Amersham) và thực hiện lai Western với kháng thể kháng polyhistidine và phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG của chuột cộng hợp với horseradish peroxidase HRP (Abcam). Hiện phim bằng bộ Kit ECL (Amersham).

Tinh chế thu nhận

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET16b-*T4Dnl* được cảm ứng biểu hiện ở thể tích lớn hơn (200ml) trong 20 giờ ở 17°C. Tiến hành thu sinh khối, phá tế bào và ly tâm thu nhận dịch protein nổi có chứa 10xHis-*T4Dnl*. Protein mục tiêu được tinh chế bằng phương pháp sắc kí ái lực với cột Ni-NTA 5ml (Amersham Pharmacia HiTrapTM Chelating HP). Các phân đoạn protein gắn cột, rửa và dung ly khỏi cột được thu nhận để phân tích bằng SDS-PAGE và xác nhận bằng lai Western với kháng thể kháng thể polyhistidine. Phân đoạn protein dung ly được thẩm tích qua dung dịch 20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 1 mM DTT (dithiothreitol) và 10% glycerol, giữ ở 4°C.

Kiểm tra hoạt tính

Bộ gen phage λ được cắt bằng enzyme *HindIII* để tạo thành các đoạn DNA đầu dính có kích thước khác nhau. Tiến hành phản ứng nối 2,1 μ g DNA λ /*HindIII* bằng protein 10xHis-*T4Dnl* (2,1 μ g/ μ l) sau tinh chế với các thể tích tăng dần từ 1-6 μ l. Thực hiện song song mẫu chứng âm không bổ sung 10xHis-*T4Dnl* và

mẫu chứng dương xúc tác bởi 1 μ l T4 DNA ligase thương mại (Fermentas). Sản phẩm nối được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

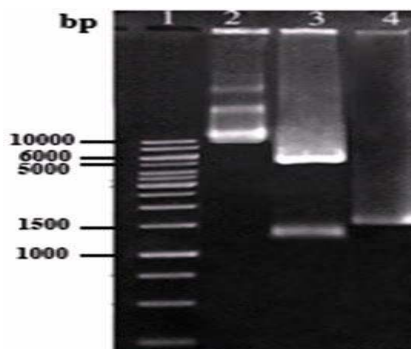
Tạo dòng tế bào *E. coli* DH5 α /pET16b-*T4Dnl*

Kết quả kiểm tra plasmid pET16b-*T4Dnl* tách chiết từ chủng *E. coli* DH5 α /pET16b-*T4Dnl* (Hình 1) cho thấy ở giếng 2 có ba vạch tương ứng với các trạng thái tự nhiên khác nhau của plasmid. Giếng 3 cho hai vạch, vạch kích thước lớn tương ứng với kích thước của plasmid pET16b khoảng 5700bp sau khi cắt mở vòng bằng enzyme *BamHI* và *NdeI*, vạch kích thước nhỏ có kích thước khoảng 1464bp tương ứng với gen *T4Dnl*. Kết quả PCR với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator cho thấy có một vạch (giếng 4) có kích thước khoảng 1683bp lớn hơn kích thước gen *T4Dnl* (1464bp), chứng tỏ plasmid có mang gen *T4Dnl*. Vì nếu không mang gen *T4Dnl* thì kết quả PCR sẽ chỉ cho một vạch có kích thước khoảng 227bp (là đoạn DNA từ vùng thượng lưu đến vùng hạ lưu của vùng MCS trên plasmid pET16b). Như vậy, plasmid thu nhận được là plasmid pET16b có gắn gen *T4Dnl* mục tiêu.

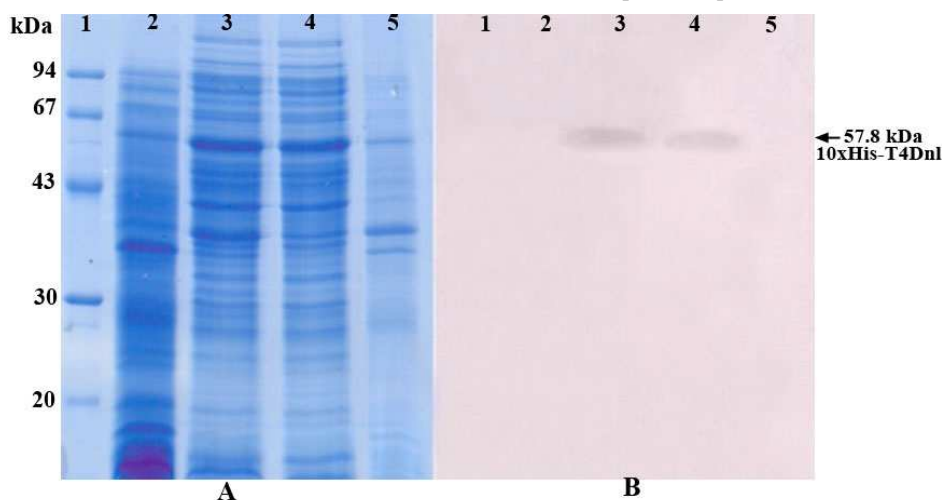
Biểu hiện protein 10xHis-*T4Dnl*

Kết quả phân tích SDS-PAGE (Hình 2A) cho thấy trên băng gel, các giếng 3, 4, và 5 lần lượt là các mẫu protein tổng số, nổi và tủa của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-*T4Dnl* được cảm ứng biểu hiện. Ở giếng 3 và giếng 4 có một vạch protein to và đậm nằm giữa vạch 67kDa và vạch 43kDa của thang chuẩn LMW

trương ứng với kích thước 57,8kDa của protein 10xHis-T4Dnl, trong khi đó vạch tương ứng ở giếng 5 rất mờ. Mặt khác, ở giếng 2 là mẫu tế bào không được cảm ứng không có vạch protein này. Như vậy cả ba mẫu protein tổng số, nổi và tủa của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-T4Dnl được cảm ứng đều có vạch protein với kích thước tương ứng với protein 10xHis-T4Dnl và phần lớn nằm trong pha nổi, nên có khả năng chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-T4Dnl đã tổng hợp được protein 10xHis-T4Dnl.



Hình 1. Kết quả kiểm tra plasmid pET16b-T4Dnl tách chiết từ chủng *E. coli* DH5 α /pET16b-T4Dnl. 1, thang DNA 1 kb; 2, plasmid pET16b-T4Dnl; 3, plasmid pET16b-T4Dnl/BamHI và NdeI; 4, PCR với cặp mồi T7 promoter/ T7 terminator.



Hình 2. Kiểm tra và xác nhận sự biểu hiện protein 10xHis-T4Dnl bằng SDS-PAGE (A) lai Western (B). 1, thang protein phân tử lượng thấp (LMW); 2, *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-T4Dnl (-) IPTG; 3, *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-T4Dnl (+) IPTG (pha tổng); 4, *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-T4Dnl (+) IPTG (pha nổi); 5, *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-T4Dnl (+) IPTG (pha tủa)

Để chứng minh protein biểu hiện vượt mức trong tế bào chất *E. coli* là 10xHis-T4Dnl, chúng tôi tiến hành lai Western với kháng thể đặc hiệu kháng thể polyhistidine. Kết quả lai Western (Hình 2B) cho thấy có sự xuất hiện vạch lai khoảng 57,8kDa ở pha tổng và pha nổi tương ứng với vạch protein biểu hiện vượt mức

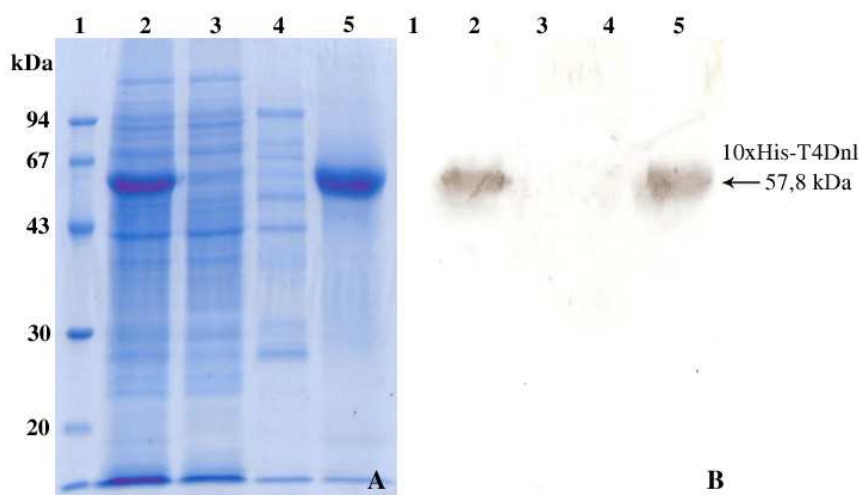
trên bản điện di SDS-PAGE (giếng 3, 4). Điều này chứng tỏ các vạch protein biểu hiện vượt mức dưới sự cảm ứng bởi IPTG trên bản gel SDS-PAGE chính là protein 10xHis-T4Dnl. Như vậy có thể khẳng định protein được cảm ứng biểu hiện vượt mức trong chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET16b-T4Dnl chính là protein

10xHis-T4Dnl. Kết quả phân tích cũng cho thấy protein 10xHis-T4Dnl có khả năng tan trong tế bào chất E. coli.

Tinh chế thu nhận

Kết quả chạy điện di SDS-PAGE (Hình 3A) cho thấy ở giếng 2 có một vạch to đậm có kích thước tương ứng với kích thước protein 10xHis-T4Dnl (57,8 kDa) và rất nhiều vạch protein khác. Đây là dịch protein nổi đã được xử lý trước khi qua cột. Giếng 3 (phân đoạn protein sau khi qua cột) xuất hiện nhiều vạch protein nhưng vạch tương ứng với kích thước protein 10xHis-T4Dnl rất nhạt. Chứng tỏ protein 10xHis-T4Dnl phần lớn đã gắn hết lên cột. Ở giếng 4 không xuất hiện vạch protein tương ứng với kích thước protein 10xHis-T4Dnl cho thấy protein 10xHis-T4Dnl gắn rất chặt lên cột Ni-NTA và không bị mất đi trong bước rửa. Giếng 5 là phân đoạn dung ly, chỉ xuất hiện một vạch protein to đậm có trọng lượng phân tử khoảng 57,8 kDa, chứng tỏ đã

thu nhận được protein dung hợp 10xHis-T4Dnl ở bước dung ly. Mặt khác, qua bước gắn cột và bước rửa, một lượng lớn protein tạp đã được loại bỏ. Để xác nhận protein thu nhận được là 10xHis-T4Dnl, chúng tôi thực hiện lai Western với kháng thể kháng thể polyhistidine. Dựa trên kết quả lai (Hình 3B) cho thấy, ở giếng 3 (bước gắn kết) và giếng 4 (bước rửa) không thấy xuất hiện vạch protein mục tiêu, chứng tỏ protein 10xHis-T4Dnl đã gắn lên cột, lượng không gắn cột không đáng kể và không bị thất thoát ở bước rửa. Ở giếng 2 và giếng 5 chỉ xuất hiện một vạch protein tương ứng với vạch có trọng lượng phân tử khoảng 57,8 kDa tương ứng với kích thước protein 10xHis-T4Dnl trên bản gel điện di SDS-PAGE chứng tỏ protein thu nhận được ở phân đoạn dung ly là 10xHis-T4Dnl. Từ các kết quả trên, chúng tôi kết luận rằng đã thu nhận được protein dung hợp 10xHis-T4Dnl bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA với độ tinh sạch khá cao.

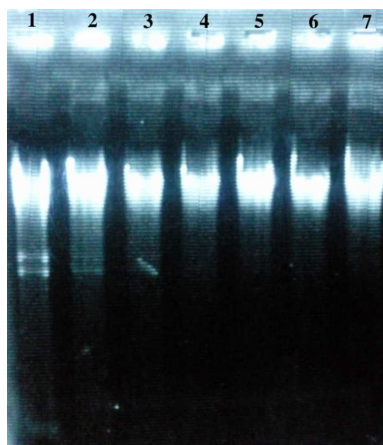


Hình 3. Kiểm tra và xác nhận protein 10xHis-T4Dnl thu được sau quá trình tinh chế bằng SDS-PAGE (A) lai Western (B). 1, Thang protein phân tử lượng thấp; 2, Dịch protein nổi trước khi qua cột; 3, Phân đoạn protein sau khi qua cột; 4, Phân đoạn rửa các protein gắn không đặc hiệu; 5, Phân đoạn dung ly protein mục tiêu.

Kiểm tra hoạt tính

Dịch protein thu được sau khi thẩm tích có nồng độ là 0,21mg/ml (xác định bằng phương pháp Bradford). Sau đó tiến hành thử hoạt tính nối đầu dính các đoạn phân tử DNA λ /HindIII bằng protein 10xHis-T4Dnl thu nhận được. Kết quả phản ứng nối (Hình 4) cho thấy giếng 1 là DNA của phage λ được xử lý bằng enzyme HindIII cho nhiều vạch với các kích thước khác nhau. Từ giếng 2 đến giếng 6 là các phản ứng

nối DNA λ /HindIII với thể tích dịch protein 10xHis-T4Dnl tăng dần từ 1-5 μ l. Ở tất cả các giếng này các vạch DNA λ /HindIII có kích thước nhỏ dần biến mất và xuất hiện vệt smear cao dần có kích thước lớn hơn ở gần miệng giếng. Ở giếng 7, phản ứng nối được xúc tác bằng enzyme T4 DNA ligase thương mại cũng cho kết quả tương tự. Điều đó chứng tỏ protein 10xHis-T4Dnl có hoạt tính xúc tác phản ứng nối đầu dính các phân tử DNA λ /HindIII.



Hình 4. Kết quả phản ứng nối DNA λ /HindIII bằng protein 10xHis-T4Dnl. 1, DNA λ /HindIII; 2, 3, 4, 5, 6, phản ứng nối DNA λ /HindIII bằng dịch protein 10xHis-T4Dnl lần lượt ở các thể tích 1, 2, 3, 4, 5 μ l; 7, phản ứng nối DNA λ /HindIII bằng 1 μ l enzyme T4 DNA ligase thương mại (Fermentas)

Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công dòng tế bào *E. coli* BL21(DE3) có mang vector tái tổ hợp pET16b-T4Dnl. Dòng tế bào này có khả năng biểu hiện vượt mức protein 10xHis-T4Dnl dung hợp với thể 10xHis ở dạng tan trong tế bào chất *E. coli*. Sự tổng hợp protein mục tiêu đã được kiểm chứng bằng điện di

SDS-PAGE và khẳng định lại bằng Western blot. Chúng tôi đã tinh chế thành công protein 10xHis-T4Dnl bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột Ni-NTA với độ tinh sạch khá cao. Protein tái tổ hợp sau tinh chế có hoạt tính ligase được kiểm tra bằng phương pháp nối các đoạn DNA λ /HindIII.

**EXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT T4 DNA LIGASE
IN *E. COLI***

Duong Long Duy, Luong Van Duc, Nguyen Thi Phuong Hieu, Tran Thanh Hoa,

Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT: *In this study, we report results on the expression and purification of recombinant T4 DNA ligase. Plasmid pET16b-T4Dnl contains the gp30 gene which encodes for T4 DNA ligase. The target protein is fused with 10xHis tag to facilitate the purification and recovery. pET16b-T4Dnl was transformed into E. coli BL21(DE3) and then induced the expression of 10xHis-T4Dnl by IPTG. The recombinant protein was purified by Ni-NTA chromatography and confirmed by SDS-PAGE and Western blot. The activity of purified protein was tested by joining DNA λ /HindIII.*

Key words: *T4 DNA ligase, 10xHis-T4Dnl, E. coli, recombinant protein.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Amersham Biosciences, *Protein purification handbook*. Amersham Biosciences, Sweden (2001).
- [2]. H P Sorensen, K K Mortensen, *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. Journal of biotechnology. 115 (2), 113-128 (2005).
- [3]. Hyone-Myong Eun, *Enzymology primer for recombinant DNA technology*. San Diego: Academic Press (1996).
- [4]. J Armstrong, RS Brown, A Tsugita, *Primary structure and genetic organization of phage T4 DNA ligase*. Nucleic acids research. 11 (20), 7145-7156 (1983).