

BIẾN NẠP VÀ BIỂU HIỆN VƯỢT MỨC GEN MÃ HÓA α -AMYLASE CHỊU NHIỆT TRONG *Bacillus subtilis*

Huỳnh Ngọc Vi Ca, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc

Khoa Sinh học, Trường ĐH Khoa học tự nhiên – ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 25 tháng 7 năm 2003)

TÓM TẮT: α -Amylase là một trong những enzyme quan trọng được ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Nhằm đáp ứng nhu cầu sử dụng α -amylase trong thực tiễn sản xuất, chúng tôi tiến hành tạo dòng *B. subtilis* tái tổ hợp sản xuất enzyme α -amylase chịu nhiệt. Gen *amyQ* mã hóa cho α -amylase chịu nhiệt, có nguồn gốc từ *Bacillus amyloliquefaciens*, được dòng hóa và đưa vào tế bào chủ *B. subtilis*. Sự biểu hiện gen *amyQ* trong dòng *B. subtilis* tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp định tính và định lượng. Sự biểu hiện vượt mức của α -amylase được xác nhận bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE).

MỞ ĐẦU

α -Amylase là một enzyme trong nhóm glycoside hydrolase, hiện diện trong vi sinh vật, động vật và thực vật. Đây là một trong những enzyme quan trọng được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp, y học và nhiều lĩnh vực kinh tế quốc dân [1]. Hầu hết các lĩnh vực ứng dụng của α -amylase trong công nghiệp đều đòi hỏi enzyme này có tính chịu nhiệt cao 80-100°C. Tuy nhiên, đa số các enzyme α -amylase trong tự nhiên dễ dàng mất hoạt tính ở nhiệt độ cao. Một số loài có khả năng sinh tổng hợp α -amylase chịu nhiệt song không thể sử dụng trực tiếp cho mục đích sản xuất enzyme do có những mặt không thuận lợi về lợi ích kinh tế.

Ứng dụng thành tựu của kỹ thuật di truyền, một số dòng tế bào tái tổ hợp đã được thiết lập thành công, có khả năng biểu hiện gen mã hóa α -amylase. Các dòng này được sử dụng để sản xuất enzyme α -amylase với sản lượng lớn cung cấp cho các ứng dụng thuộc các lĩnh vực khác nhau. Trong hầu hết các trường hợp, gen mã hóa α -amylase được biểu hiện trong tế bào chủ *E. coli*. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy hệ thống *E. coli* có một số nhược điểm như sự tiết không chuyên biệt các sản phẩm protein, hiệu suất tạo protein tái tổ hợp thấp, một số trường hợp có biến đổi sau dịch mã trên sản phẩm protein tái tổ hợp. Các nhược điểm này dẫn đến hiện tượng không ổn định về hoạt tính, cấu trúc không gian ba chiều của protein tái tổ hợp [6].

Bacillus subtilis là một tế bào chủ khác cũng được sử dụng để biểu hiện protein ngoại lai. *B. subtilis* đáp ứng được những yêu cầu của một tế bào chủ lý tưởng như tăng trưởng nhanh trong môi trường rẻ tiền, an toàn do không tạo nội độc tố, có khả năng tiếp nhận DNA ngoại lai. Mặt khác, gen mã hóa cho enzyme α -amylase chịu nhiệt *amyQ* được nghiên cứu sử dụng nhiều trong sản xuất α -amylase tái tổ hợp là gen có nguồn gốc từ vi khuẩn *B. amyloliquefaciens*. Vì vậy, *B. subtilis* là tế bào chủ thích hợp hơn *E. coli* để biểu hiện vượt mức α -amylase chịu nhiệt nhằm giảm thiểu những trở ngại do sai khác trong quá trình biến đổi sau dịch mã ở sản phẩm α -amylase tái tổ hợp [6,7].

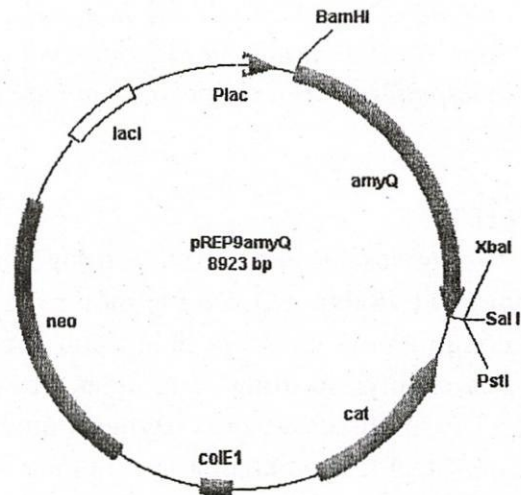
Trong báo cáo này, chúng tôi trình bày kết quả tạo dòng *B. subtilis* biểu hiện vượt mức enzyme α -amylase chịu nhiệt. Khả năng tạo α -amylase của dòng tế bào tái tổ hợp được chứng minh dựa trên hoạt tính của enzyme và mức độ biểu hiện α -amylase của dòng tái tổ hợp được khảo sát bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật. Chủng *Escherichia coli* DH5 α (*F' endA1 hsdR17 (r_k/m_k) supE44 thiλ recA1 gyrA96 Δ lacU169[(ϕ 80 lacZ Δ M15)]*) được dùng để khuếch đại số lượng bản sao các vector. Chủng *Bacillus subtilis* PY79(FA-) ($\Delta amyE, spA-, FA-$) được dùng làm tế bào chủ để biểu hiện vượt mức gen mã hóa α -amylase chịu nhiệt.

Môi trường và hóa chất. Môi trường LB (Luria-Bertani, trypton 1%, yeast extract 0,5%, NaCl 0,5%) được sử dụng trong nuôi cấy, biến nạp *E. coli* và *B. subtilis*. Môi trường thử khả năng phân giải tinh bột của dòng tái tổ hợp là môi trường có chứa tinh bột tan 2%, agar 1,5%.

Vector pREP9amyQ (PTN. Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐH Quốc gia TP. HCM) có kích thước 8923bp, mang gen *amyQ* mã hóa cho enzyme α -amylase chịu nhiệt có nguồn gốc từ *B. amyloliquefaciens*, có trình tự ColE1 kiểm soát DNA sao chép trong *E. coli* và *B. subtilis*, gen kháng Neomycine (Neo^R) được dùng làm gen chọn lọc trong *B. subtilis*. Promoter P_{lac} điều khiển hoạt động phiên mã của gen *amyQ*, là một promoter cảm ứng với IPTG.



Hình 1: Sơ đồ plasmid pREP9amyQ biểu hiện gen mã

Phương pháp. Phương pháp biến nạp với tác nhân calcium trong điều kiện lạnh được dùng để biến nạp plasmid vào *E. coli* [3]. Phương pháp Calcium lạnh cải biên được dùng để đưa vector vào *B. subtilis* [3]. Plasmid được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp SDS-kiểm cải biên [3]. Tiến hành kiểm tra sự hiện diện của gen *amyQ* trên plasmid bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *amyQ*. 1 μ g plasmid được sử dụng làm khuôn mẫu với 6 pmol mồi xuôi (5'-GATCCCATGGAGAGGGAGAGGAAAATGATTCAAAACG) và 6 pmol mồi ngược (5'-TGCTTACTCGAGTTTCTGAACATAAATGGAGACGGACCC). Phản ứng PCR với tổng thể tích là 25 μ l được tiến hành ở điều kiện: 94 $^{\circ}$ C – 1 phút, 55 $^{\circ}$ C – 1 phút và 72 $^{\circ}$ C – 1 phút lặp lại 30 chu kỳ.

Hoạt tính của α -amylase tái tổ hợp được định tính như sau: tế bào *B. subtilis* amyQ/PY79(FA-) sau khi nuôi cấy và cảm ứng bằng IPTG, phá vỡ tế bào, thu nhận dịch enzyme, nhỏ lên hộp petri chứa môi trường agar-tinh bột (2%), ủ ở 37 $^{\circ}$ C qua đêm. Các đĩa thạch được nhuộm với dung dịch Lugol để phát hiện hoạt tính phân giải tinh bột. Hoạt tính enzyme được định lượng bằng phương pháp Bernfeld. Phương pháp này dựa trên sự định lượng đường maltose được tạo thành sau phản ứng thủy phân tinh bột. Hàm lượng đường

maltose được xác định bằng máy so màu thông qua phản ứng tạo màu của thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid với nhóm C=O trong phân tử maltose ở bước sóng 540nm. Trong khoảng tuyến tính, hàm lượng maltose tỉ lệ thuận với cường độ màu của hỗn hợp phản ứng. Do vậy, trước tiên, tiến hành xây dựng đường tương quan tuyến tính chuẩn giữa số mol maltose và mật độ quang. Pha loãng mẫu tới giới hạn cần thiết, tiến hành phản ứng định lượng, đo cường độ màu và dựa vào đường chuẩn để xác định hoạt độ enzyme.

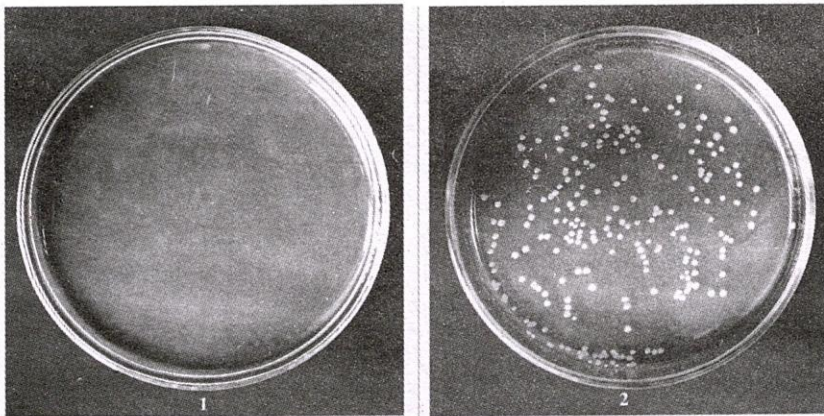
Sự biểu hiện vượt mức α -amylase chịu nhiệt của dòng *B. subtilis* amyQ/PY79(FA-) được phân tích bằng điện di trên gel polyacrylamide với sự hiện diện của tác nhân SDS (SDS-PAGE) [4]. Tiến hành xử lý 10 μ l dịch chiết enzyme thu nhận từ dòng *B. subtilis* amyQ/PY79(FA-) với 10 μ l dung dịch nạp mẫu. Đun sôi cách thủy 5 phút. Mẫu được nạp hết vào giếng. Tiến hành điện di trên gel polyacrylamide có nồng độ acrylamide là 12,5% với 2mA/giếng mẫu. Sau điện di, tiến hành nhuộm gel với dung dịch nhuộm trong 1-2 giờ. Sau đó, giải nhuộm bằng cách ngâm gel trong dung dịch giải nhuộm cho đến khi nền gel trở nên trong suốt không màu. Sấy khô gel trong chân không.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

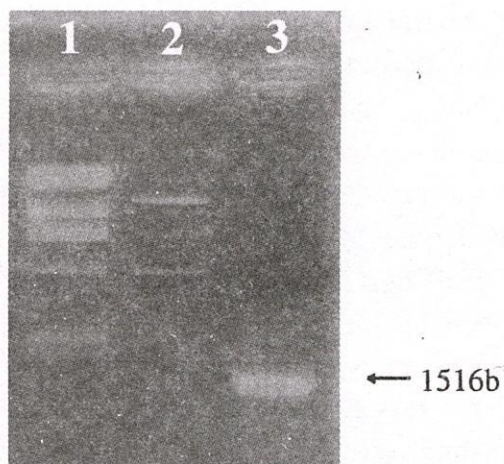
Thu nhận plasmid pREP9amyQ và kiểm tra sự hiện diện của gen amyQ.

Plasmid pREP9amyQ biểu hiện gen mã hóa α -amylase chịu nhiệt được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và thể biến nạp được tuyển chọn nhờ tính kháng Neomycine (Neo^R). Plasmid pREP9amyQ mang gen kháng Neo do đó thể biến nạp có chứa plasmid này sẽ có khả năng phát triển trên môi trường có bổ sung Neo. Ngược lại, tế bào chủ *E. coli* DH5 α không mang plasmid sẽ không phát triển được trên môi trường có Neo (Hình 2).

Từ các thể biến nạp thu được, plasmid pREP9amyQ được tách chiết và kiểm tra bằng phản ứng khuếch đại PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen amyQ (Hình 3). Plasmid tách được từ thể biến nạp cho 3 vạch trên bản điện di agarose (giếng 2). Khi sử dụng plasmid làm khuôn để thực hiện phản ứng khuếch đại với cặp mồi chuyên biệt cho amyQ, sản phẩm khuếch đại có kích thước là 1516bp tương ứng với kích thước của amyQ (Hình 3, giếng 3).



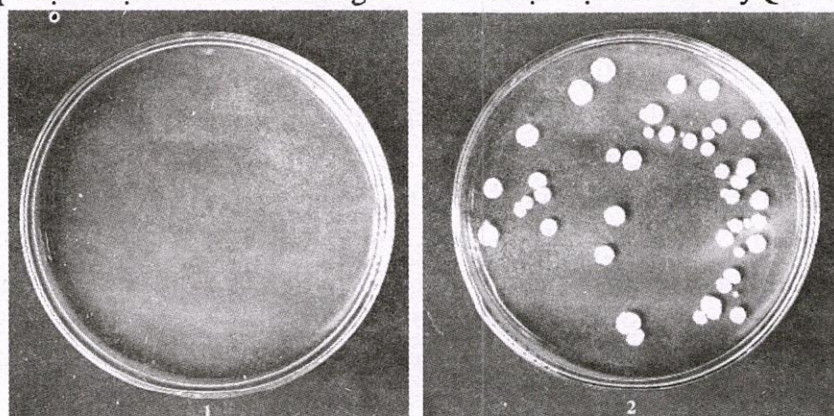
Hình 2: Kết quả biến nạp pREP9amyQ vào tế bào *E. coli* DH5 α . 1, *E. coli* DH5 α ; 2, *E. coli* DH5 α được biến nạp bằng pREP9amyQ.



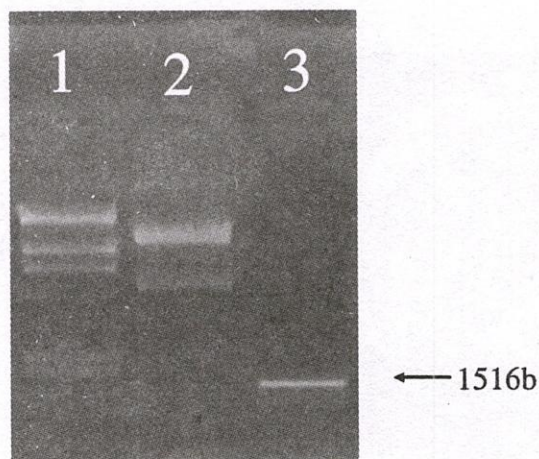
Hình 3: Kiểm tra plasmid pREP9amyQ bằng điện di trên gel agarose và bằng phản ứng PCR. 1, thang chuẩn λ -HindIII; 2, pREP9amyQ; 3, sản phẩm

Tạo dòng *B. subtilis* amyQ/PY79(FA-) mang gen amyQ.

Plasmid pREP9amyQ được biến nạp vào tế bào *B. subtilis* PY79(FA-) với nhân tố chọn lọc cũng là khả năng kháng neomycine. Thể biến nạp chứa plasmid mang gen kháng Neo có thể phát triển được trên môi trường có Neo (34 μ g/ml). Ngược lại, tế bào chủ không mang plasmid tức không mang gen kháng Neo sẽ không mọc được trên môi trường này. Dòng biến nạp mọc được trên môi trường LB-Neo được đặt tên là amyQ/ PY79(FA-) (Hình 4).



*Hình 4: Kết quả biến nạp pREP9amyQ vào tế bào *B. subtilis* PY79(FA-). 1, PY79(FA-); 2,*



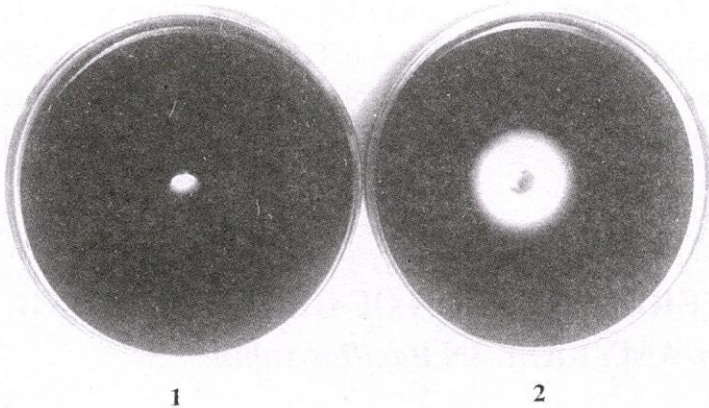
Hình 5: Phân tích plasmid pREP9amyQ bằng điện di trên gel agarose và bằng phản ứng PCR. 1, thang chuẩn λ -HindIII; 2, plasmid thu được sau tách chiết; 3, sản phẩm khuếch đại từ khuôn plasmid.

Từ các thể biến nạp thu được, tiến hành tách chiết plasmid và kiểm tra bằng phản ứng khuếch đại PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen amyQ. Plasmid được tách chiết từ thể biến nạp *B. subtilis* cho 3 vạch trên bản điện di agarose (Hình 4, giếng 2). Kết quả phản ứng

PCR (Hình 4, giếng 3) cho thấy sản phẩm khuếch đại từ khuôn DNA plasmid có kích thước tương đương với kích thước của đoạn gen *amyQ*.

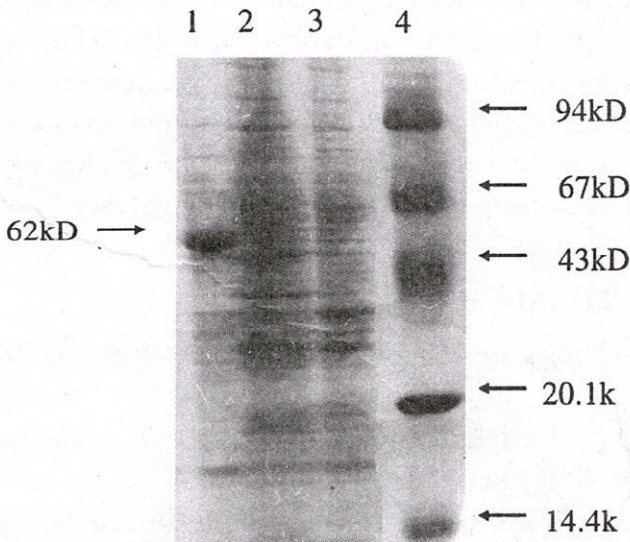
Phân tích sự tạo thành α -amylase tái tổ hợp bởi dòng *B. subtilis amyQ/PY79(FA-)*.

Đĩa thạch được bổ sung dịch đồng nhất từ dòng tái tổ hợp *amyQ/PY79(FA-)*, sau khi được nhuộm bằng Lugol tạo một vòng phân giải trong suốt xung quanh vị trí nhỏ dịch. Trong khi đó, đĩa đối chứng được thực hiện tương tự với dòng tế bào chủ *PY79(FA-)* không có vòng phân giải này (Hình 6). Như vậy, dòng *B. subtilis amyQ/PY79(FA-)* có khả năng sản xuất enzyme α -amylase có hoạt tính phân giải tinh bột. Mặt khác, việc xác định hoạt tính của dịch đồng nhất của dòng tái tổ hợp cho thấy dịch đồng nhất có hoạt tính là 22.400U/ml.



*Hình 6: Kết quả khảo sát hoạt tính của dịch α -amylase được tách chiết từ dòng *amyQ/PY79(FA-)*. 1, *PY79(FA-)*; 2, *amyQ/PY79(FA-)*.*

Phân tích sự biểu hiện α -amylase tái tổ hợp bằng điện di SDS-PAGE.



*Hình 7: Biểu hiện vượt mức enzyme α -amylase của dòng tái tổ hợp. 1, *amyQ/PY79(FA-)* được cảm ứng IPTG; 2, *amyQ/PY79(FA-)*; 3, *PY79(FA-)*.*

Dịch đồng nhất dòng *B. subtilis amyQ/PY79(FA-)* được cảm ứng với IPTG được phân tích bằng điện di SDS-PAGE và kết quả được trình bày trên Hình 7. Hình 7 cho thấy dịch đồng nhất này có vạch protein đậm tương ứng với trọng lượng phân tử của enzyme α -amylase (62 kDa) (giếng 1). Ngược lại, ở các mẫu dịch đồng nhất từ dòng *amyQ/PY79(FA-)* không được cảm ứng bằng IPTG (giếng 2) và dòng *PY79(FA-)* (giếng 3) hầu như không có vạch protein này. Dựa vào đậm độ của vạch α -amylase so với các vạch protein khác, có thể thấy mức độ biểu hiện của α -amylase trong tế bào tái tổ hợp được cảm ứng với IPTG là vượt

trội so với protein tổng số của tế bào. Kết quả này cho thấy dòng amyQ/PY79(FA-) có khả năng biểu hiện vượt mức gen mã hóa α -amylase.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp biến nạp, chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng tế bào *B. subtilis* amyQ/PY79(FA-) có khả năng biểu hiện vượt mức gen mã hóa enzyme α -amylase chịu nhiệt. Enzyme α -amylase được thu nhận từ sinh khối đồng tái tổ hợp sau khi nuôi cấy và cảm ứng bằng IPTG. Hoạt tính của α -amylase được kiểm chứng dựa trên hoạt tính phân giải tinh bột tạo vòng phân giải trong suốt xung quanh vị trí nhỏ dịch enzyme và việc định lượng bằng phương pháp Bernfeld cho thấy hoạt tính của α -amylase là 22.400U/ml. Sự biểu hiện vượt mức enzyme α -amylase ở dòng tái tổ hợp được xác định bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE). Kết quả điện di cho thấy lượng α -amylase tạo ra là vượt trội so với tổng protein của tế bào khi được cảm ứng bằng IPTG. Chúng tôi đang tiếp tục khảo sát một số đặc tính như giới hạn chịu nhiệt, nhiệt độ và pH tối thích nhằm làm tăng hiệu quả thủy phân tinh bột và điều kiện bảo quản enzyme làm cơ sở cho việc sản xuất và ứng dụng α -amylase tái tổ hợp này.

TRANSFORMATION AND OVEREXPRESSION OF GENE ENCODING THERMOSTABLE α -AMYLASE IN *Bacillus subtilis*

Huynh Ngọc Vi Ca, Dang Thi Phuong Thao, Tran Linh Thuoc

ABSTRACT: α -Amylase is one of important enzymes being used in various fields. In response to the needs of thermostable α -amylase in practical applications, we established a clone of recombinant *B. subtilis* being able to produce a thermostable α -amylase. The amyQ gene encoding a thermostable α -amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* was cloned to an expression vector, transformed into and overexpressed in *B. subtilis*. The expression of amyQ gene in the recombinant *B. subtilis* clone was qualitatively and quantitatively tested basing on α -amylase activity. The overexpression of α -amylase gene was confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lương Đức Phẩm, Hồ Sưởng, 1978, *Vi sinh tổng hợp*, chương IV, trang 103-106, 152-167, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
2. Lê Ngọc Tú, La Văn Chứ, Phạm Trân Châu, Nguyễn Lâm Dũng, 1982, *Enzim vi sinh vật*, chương III, trang 186-220, NXB Khoa học và Kỹ thuật.
3. Frederick M. Ausubel, Roger Brent et al., 1994, *Current protocols in molecular biology*, vol. 1, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.
4. Frederick M. Ausubel, Roger Brent et al., 1994, *Current protocols in molecular biology*, vol. 2, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.
5. H. J. Rehm and G. Reed, 1993, *Biotechnology*, vol. 2, pp. 191-198, VCH Verlagsgesellschaft rubH, D-6940 Weinheim.
6. H. J. Rehm and G. Reed, 1993, *Biotechnology*, vol. 9, pp. 457-465, VCH Verlagsgesellschaft rubH, D-6940 Weinheim.
7. Keith Stephenson, Colin R. Harwood, 1996, *Bacillus*, *Biochem. Journal*, 243-253.