

TẠO DÒNG BIỂU HIỆN *malQ* TỪ *ESCHERICHIA COLI* K12 VÀ XÁC ĐỊNH ĐIỀU KIỆN HOẠT ĐỘNG TỐI ƯU CỦA ENZYM MalQ

Trần Phương Lan¹, Park Kwan-Hwa² và Park Jong-Tea²

ABSTRACT

The gene of *malQ* encoding 4- α -glucanotransferase (amylomaltase) is located in the *malPQ* operon of *Escherichia coli* K12. It has an open reading frame of 2082 nucleotides encoding 694 amino acid residues of a 72 kDa protein. In an effort to understand the function of this enzyme from *E. coli*, MalQ was overexpressed by constructing in pET29b. The optimal reaction condition of MalQ was at 37°C, in 200 mM sodium acetate buffer, pH 6.5.

Keywords: 4- α -glucanotransferase, amylomaltase, *E. coli* K12, *malQ*

Title: Cloning *malQ* from *Escherichia coli* K12 and Determination of Optimal Reaction Condition of MalQ

TÓM TẮT

Gen *malQ* giải mã enzym 4- α -glucanotransferase (amylomaltase) được định vị trong *malPQ* operon của *Escherichia coli* K12. Gen *malQ* có 2082 nucleotide mã hóa 694 amino acid hình thành protein có trọng lượng phân tử là 72 kDa. Để tìm hiểu đặc tính của enzym này từ *E. coli*, MalQ được biểu hiện bằng cách biến nạp trong vector pET29b. Điều kiện hoạt động tối thích của enzym MalQ được xác định ở nhiệt độ 37°C, pH 6.5 trong dung dịch sodium acetate 200 mM.

Từ khóa: 4- α -glucanotransferase, amylomaltase, *E. coli* K12, *malQ*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hệ thống maltose/maltodextrin của *E. coli* bao gồm 10 gen qui định kết hợp, điều khiển tổng hợp các protein liên quan đến hiệu quả sử dụng maltose và các maltodextrin như một nguồn carbon và năng lượng [2]. Trong tế bào chất, MalQ được biểu hiện với glucan phosphorylase và cả hai có vị trí trên cùng operon. Protein này được xác định là thành phần của hệ thống vận chuyển và sử dụng maltooligosaccharide [4]. Để hiểu và xác định đặc tính của MalQ, “Tạo dòng biểu hiện *malQ* từ *Escherichia coli* K12 và xác định điều kiện hoạt động tối ưu của enzym MalQ” được thực hiện.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Chủng vi sinh vật

Chủng vi khuẩn *E. coli* K12, do giáo sư W. Boos ở trường Đại học Konstanz- Đức cung cấp, sử dụng cho chiết tách DNA mục tiêu; Chủng *E. coli* BL 21 (DE3) được

¹ Trường Đại học Ang Giang

² Khoa Kỹ thuật Sinh học Nông Nghiệp, Trường ĐH Quốc gia Seoul, Hàn Quốc

sử dụng làm vật chủ cho biểu hiện dòng gen. *E. coli* được nuôi cấy trong môi trường Luria-Bertani (LB) [1% tryptone, 0,5% yeast extract và 1% NaCl] có bổ sung 20 µg/ml kanamycin kháng sinh khi cần để làm nhân tố chọn lọc.

2.2 Tạo dòng gen *malQ* ở *E.coli* K12

Dựa vào trình tự gen *malQ* của *E. coli* K12 trong ngân hàng gen, cặp môi *malQ*-NdeI R (5'-AAACGCTAAGGAAGCCATATGGAAAGC-3') và *malQ*-XhoI F (5'-AACCGCACTCTCGAGCTTCTTCGCTGCAGC-3') được thiết kế để dùng cho PCR. PCR được thực hiện trong thiết bị thermal cycler với 34 chu kỳ. Trong mỗi chu kỳ, giai đoạn 1 nâng nhiệt đến 94°C, 30 giây; giai đoạn 2 hạ nhiệt xuống 55°C, 30 giây; giai đoạn 3 nâng nhiệt đến 72°C, 135 giây. Thành phần phản ứng PCR gồm 100 µl trong đó dung dịch đệm [10 mM Tris/pH 8.85; 25 mM KCl; 5 mM (NH₄)₂SO₄; 2 mM MgSO₄; 0.2 mM mỗi dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)], 50~100 ng DNA bản mẫu, 50 pmole mỗi xuôi và mỗi ngược, 2.5U Ex Taq DNA polymerase. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Germany) và cắt bằng *NdeI* và *XhoI*. Đoạn gen *malQ* được nối vào vector pET-29(+)(T7 promoter, N-terminal His₆ tag, Kan^r, Novagen Inc., Madison, Wis.) tại *NdeI* và *XhoI* nhờ T4 DNA ligase. Thành phần phản ứng nối gồm plasmid pET29-*malQ*[His] và gen *malQ*. Sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3).

2.3 Sản xuất và tinh sạch MalQ

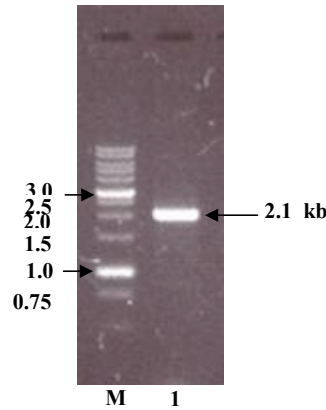
Sản phẩm nối sau khi được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) sẽ được chọn lọc dựa trên kiểu hình kháng kanamycin. Các khuẩn lạc dự tuyển được kiểm chứng bằng phương pháp PCR khuẩn lạc sử dụng cặp môi *malQ*-NdeI R và *malQ*-XhoI F của gen *malQ*. Phương pháp bản đồ cắt hạn chế cũng được sử dụng để kiểm tra plasmid thu được [1]. Biến nạp pET29-*malQ* vào *E.coli* BL21 (DE3). Chúng biểu hiện sau khi biến nạp được nuôi ở 37°C trong môi trường Luria-Bertani (LB) lỏng hoặc LB agar có bổ sung 20 µg/ml kanamycin. Sự biểu hiện của gen được điều tiết bằng cách thêm isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Tế bào thu được bằng cách ly tâm (12,000 rpm, 10 phút). Tế bào được phá vỡ trong thiết bị VC-600, Sonics & Materials Inc. Enzym thô được chiết tách bằng ly tâm (12,000 rpm, 4°C, 15 phút) và tinh sạch bằng nhựa nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) trong cột sắc ký Poly-Prep[®]. Protein mục tiêu được thẩm tách lại trong dung dịch đệm 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Bradford [3]. Độ tinh khiết và khối lượng phân tử của protein tinh sạch được phân tích bằng 10% SDS-PAGE.

3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tạo dòng biểu hiện gen *malQ* từ *E. coli* K12

Để tách gen *malQ*, đoạn gen 2082 bp của gen này được khuếch đại từ nhiễm sắc thể DNA của *E. coli* K12 bằng PCR (Hình1). Sản phẩm PCR được xử lý bằng enzym giới hạn *XhoI* và *NdeI* và sau đó được chuyển vào vector pET29b với vị trí giới hạn tương ứng. DNA tái tổ hợp được chuyển vào *E. coli* BL21 (DE3). Trình tự nucleotide của đoạn *malQ* trong pET29b-*malQ*[His] được thẩm định qua phân

tích trình tự DNA (Biomedic-Korea) xác định không có sai sót trong suốt quá trình PCR.



Hình 1: Phân tích agarose gel electrophoresis của sản phẩm PCR

Cột M: 1kb DNA chuẩn; Cột 1: sản phẩm PCR

3.2 Cấu trúc cơ bản của gen *malQ*

Khung đọc mở gen *malQ* bắt đầu bằng start codon ATG ở nucleotide 3,292 và kết thúc với TAG codon ở nucleotide 1,208 giải mã chuỗi polypeptide đơn của 694 amino acid (Hình 2).

1	ATG	GAA	AGC	AAA	CGT	CTG	GAT	AAT	GCC	GCG	CTG	GCG	GCG
1	M	E	S	K	R	L	D	N	A	A	L	A	A
40	GGG	ATT	AGC	CCC	AAT	TAC	ATC	AAT	GCC	CAC	GGT	AAA	CCG
14	G	I	S	P	N	Y	I	N	A	H	G	K	P
79	CAG	TCG	ATT	AGC	GCC	GAA	ACC	AAA	CGG	CGT	TTG	CTT	GAC
27	Q	S	I	S	A	E	T	K	R	R	L	L	D
118	GCG	ATG	CAT	CAA	CGT	ACC	GCC	ACG	AAA	GTG	GCG	GTA	ACG
40	A	M	H	Q	R	T	A	T	K	V	A	V	T
157	CCA	GTC	CCG	AAT	GTC	ATG	GTT	TAT	ACC	AGC	GGC	AAA	AAA
53	P	V	P	N	V	M	V	Y	T	S	G	K	K
196	ATG	CCG	ATG	GTG	GTG	GAG	GGC	AGC	GGC	GAA	TAT	AGC	TGG
66	M	P	M	V	V	E	G	S	G	E	Y	S	W
235	CTG	CTG	ACC	ACC	GAA	GAA	GGA	ACG	CAG	TAC	AAA	GGC	CAT
79	L	L	T	T	E	E	G	T	Q	Y	K	G	H
274	GTA	ACG	GGG	GGC	AAA	GCG	TTC	AAT	CTA	CCG	ACG	AAG	CTG
92	V	T	G	G	K	A	F	N	L	P	T	K	L
313	CCG	GAA	GGT	TAT	CAC	ACG	CTG	ACA	CTC	ACC	CAG	GAC	GAC
105	P	E	G	Y	H	T	L	T	L	T	Q	D	D
352	CAG	CGC	GCG	CAT	TGC	CGG	GTG	ATT	GTC	GCC	CCG	AAA	CGC
118	Q	R	A	H	C	R	V	I	V	A	P	K	R
391	TGT	TAC	GAA	CCG	CAG	GCG	TTG	CTG	AAT	AAA	CAA	AAG	CTG
131	C	Y	E	P	Q	A	L	L	N	K	Q	K	L
430	TGG	GGT	GCC	TGC	GTT	CAG	CTT	TAT	ACG	CTG	CGA	TCG	GAA
144	W	G	A	C	V	Q	L	Y	T	L	R	S	E
496	AAA	AAC	TGG	GGT	ATT	GGG	GAT	TTT	GGC	GAT	CTC	AAA	GCG
157	K	N	W	G	I	G	D	F	G	D	L	K	A
508	ATG	CTG	GTG	GAT	GTG	GCA	AAA	CGT	GGC	GGG	TCG	TTC	ATT
170	M	L	V	D	V	A	K	R	G	G	S	F	I
547	GGC	CTG	AAC	CCG	ATT	CAT	GCG	CTC	TAT	CCG	GCA	AAT	CCG

183 G L N P I H A L Y P A N P
 586 GAG AGC GCC AGC CCA TAC AGC CCG TCT TCT CGC CGT TGG
 196 E S A S P Y S P S S R R W
 625 CTG AAT GTG ATT TAT ATC GAC GTT AAC GCC GTT GAA GAT
 209 L N V I Y I D V N A V E D
 664 TTC CAT CTT AGC GAA GAG GCT CAG GCC TGG TGG CAG TTG
 222 F H L S E E A Q A W W Q L
 703 CCG ACC ACG CAA CAG ACG CTG CAA CAG GCG CGC GAT GCC
 235 P T T Q Q T L Q Q A R D A
 742 GAC TGG GTC GAT TAC TCC ACG GTT ACC GCC CTA AAA ATG
 248 D W V D Y S T V T A L K M
 781 ACA GCA TTA CGA ATG GCG TGG AAA GGT TTC GCG CAA CGT
 261 T A L R M A W K G F A Q R
 820 GAT GAT GAG CAG ATG GCC GCG TTT CGC CAG TTT GTT GCA
 274 D D E Q M A A F R Q F V A
 859 GAG CAG GGC GAC AGC CTG TTC TGG CAG GCA GCC TTT GAT
 287 E Q G D S L F W Q A A F D
 898 GCG CTA CAT GCC CAG CAA GTG AAA GAG GAC GAA ATG CGC
 300 A L H A Q Q V K E D E M R
 937 TGG GGC TGG CCT GCA TGG CCA GAG ATG TAT CAG AAC GTG
 313 W G W P A W P E M Y Q N V
 976 GAT TCA CCA GAA GTG CGT CAG TTC TGC GAA GAA CAT CGT
 326 D T P E V R Q F C E E H R
 1015 GAT GAC GTC GAT TTT TAT CTC TGG TTG CAG TGG CTG GCT
 339 D D V D F Y L W L Q W L A
 1054 TAC AGC CAG TTT GCC TGC TGG GAG ATA AGC CAG GGC
 352 Y S Q F A A C W E L S Q G
 1093 TAT GAA ATG CCG ATT GGC TTG TAT CGT GAT CTG GCG GTT
 365 Y E M P I G L Y R D L A V
 1132 GGC GTA GCG GAA GGT GGG GCG GAA ACC TGG TGT GAC CGT
 378 G V A E G G A E T W C D R
 1172 GAA CTA TAT TGC CTG AAA GCA TCG GTT GGC GCG CCG CCG
 391 E L Y C L K A S V G A P P
 1210 GAT ATC CTC GGC CCG TTG GGG CAG AAC TGG GGA TTA CCG
 404 D I L G P L G Q N W G L P
 1249 CCA ATG GAC CCG CAT ATC ATC ACC GCG CGT GCC TAT GAA
 417 P M D P H I I T A R A Y E
 1288 CCG TTT ATC GAG CTG TTG CGT GCC AAT ATG CAA AAC TGC
 430 P F I E L L R A N M Q N C
 1327 GGC GCA TTA CGA ATT GAC CAT GTG ATG TCG ATG CTG CGT
 443 G A L R I D H V M S M L R
 1366 TTG TGG TGG ATA CCG TAT GGC GAG ACG GCA GAT CAG GGC
 456 L W W I P Y G E T A D Q G
 1405 GCG TAT GTT CAC TAT CCG GTG GAT GAT CTG CTC TCG ATT
 469 A Y V H Y P V D D L L S I
 1444 CTG GCA CTC GAA AGT AAA CGT CAT CGC TGT ATG GTG ATT
 482 L A L E S K R H R C M V I
 1483 GGT GAA GAT CTC GGT ACC GTA CCG GTA GAG ATT GTC GGT
 495 G E D L G T V P V E I V G
 1522 AAG CTG CGC AGC AGC GGT GTG TAC TCT TAC AAA GTG CTC
 508 K L R S S G V Y S Y K V L
 1561 TAT TTC GAA AAC GAC CAC GAG AAG ACG TTC CGT GCA CCG
 521 Y F E N D H E K T F R A P

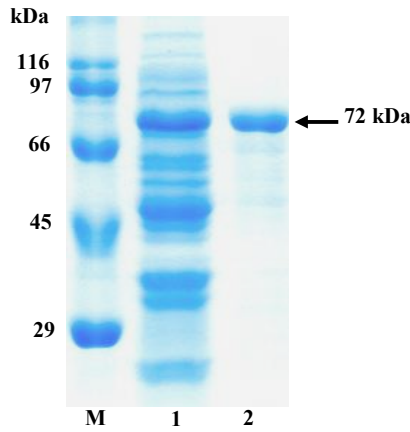
1600	AAA	GCG	TAT	CCG	GAG	CAG	TCG	ATG	GCG	GTT	GCG	GCG	ACA
534	K	A	Y	P	E	Q	S	M	A	V	A	A	T
1639	CAT	GAC	CTG	CCA	ACG	CTG	CGC	GGT	TAC	TGG	GAG	TGC	GGG
547	H	D	L	P	T	L	R	G	Y	W	E	C	G
1678	GAT	CTA	ACG	CTG	GGC	AAA	ACC	CTG	GGG	CTG	TAT	CCG	GAT
560	D	L	T	L	G	K	T	L	G	L	Y	P	D
1717	GAA	GTG	GTA	CTG	CGC	GGT	CTG	TAT	CAG	GAT	CGC	GAA	CTG
573	E	V	V	L	R	G	L	Y	Q	D	R	E	L
1756	GCG	AAG	CAA	GGG	CTG	CTG	GAT	GCA	CTG	CAT	AAA	TAT	GGT
586	A	K	Q	G	L	L	D	A	L	H	K	Y	G
1795	TGT	CTG	CCG	AAA	CGT	GCC	GGG	CAT	AAG	GCA	TCG	TTG	ATG
599	C	L	P	K	R	A	G	H	K	A	S	L	M
1834	TCG	ATG	ACG	CCG	ACG	CTG	AAC	CGT	GGT	TTG	CAG	CGC	TAC
612	S	M	T	P	T	L	N	R	G	L	Q	R	Y
1873	ATT	GCC	GAC	AGT	AAC	AGT	GCT	CTG	TTA	GGA	CTA	CAG	CCG
625	I	A	D	S	N	S	A	L	L	G	L	Q	P
1912	GAA	GAC	TGG	CTG	GAT	ATG	GCC	GAA	CCG	GTG	AAT	ATT	CCT
638	E	D	W	L	D	M	A	E	P	V	N	I	P
1951	GGC	ACC	AGT	TAC	CAG	TAT	AAA	AAC	TGG	CGA	CGC	AAG	CTT
651	G	T	S	Y	Q	Y	K	N	W	R	R	K	L
1990	TCC	GCA	ACG	CTT	GAG	TCG	ATG	TTT	GCC	GAT	GAT	GGC	GTG
664	T	A	T	L	E	S	M	F	A	D	D	G	V
2029	AAC	AAG	TTG	CTG	AAG	GAT	TTG	GAC	AGA	CGG	CGC	AGA	GCT
677	N	K	L	L	K	D	L	D	R	R	R	R	A
2068	GCA	GCG	AAG	AAG	AAG	TAG							
690	A	A	K	K	K	*							

Hình 2: Trình tự chuỗi nucleotide của gen *malQ*

Trình tự protein dự đoán được trình bày bên dưới trình tự DNA, () stop codon*

3.3 Biểu hiện và tinh sạch MalQ tái tổ hợp

Amylomaltase *E. coli* được giải mã bởi gen *malQ* hợp nhất với C-terminal His₆ tag của vector pET29b và biểu hiện dưới sự kiểm soát của promoter T7. Plasmid tái tổ hợp được chuyển vào *E. coli* BL21 (DE3) và nuôi cấy trong môi trường LB chứa kanamycin (20 µg/ml). Gen biểu hiện sẽ được điều tiết bằng cách bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0.2 mM được xem là thích hợp ở mức hấp thu quang học đạt đến 0.6 (đo ở 600 nm). Sản phẩm MalQ tạo ra trong *E.coli* được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực Ni-NTA. Kết quả hoạt tính enzym được xác định bằng phương pháp Lugol’s [5] (Bảng 1) cho thấy enzym được tinh sạch 3 lần, với sản lượng đạt được là 20% trong quá trình tinh sạch một bước và trọng lượng phân tử tương đương 72 kDa (Hình 3) tương quan với trọng lượng phân tử dự đoán từ trình tự amino acid của MalQ.



Hình 3: Phân tích SDS-PAGE của MalQ tái tổ hợp được biểu hiện từ pET29b trong *E. coli* BL21 (DE3)

Cột M: trọng lượng phân tử chuẩn; Cột 1: trong phần hòa tan của tế bào được phá vỡ; Cột 2: MalQ sau khi tinh sạch

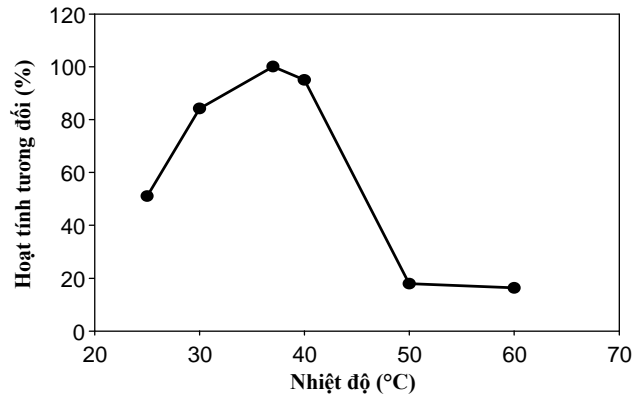
Bảng 1: Hoạt tính và hàm lượng protein của enzym MalQ qua các bước tinh sạch

Bước tinh sạch	Tổng thể tích (ml)	Protein tổng (mg)	Hoạt tính tổng (mU)	Hoạt tính riêng (mU/mg)	Sản lượng (%)	Độ tinh sạch
Phá vỡ tế bào	20	242.7	3,000	12.4	100	1
Ni-NTA	4	18.1	600	33.2	20	3

3.4 Đặc tính của enzym MalQ

3.4.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ

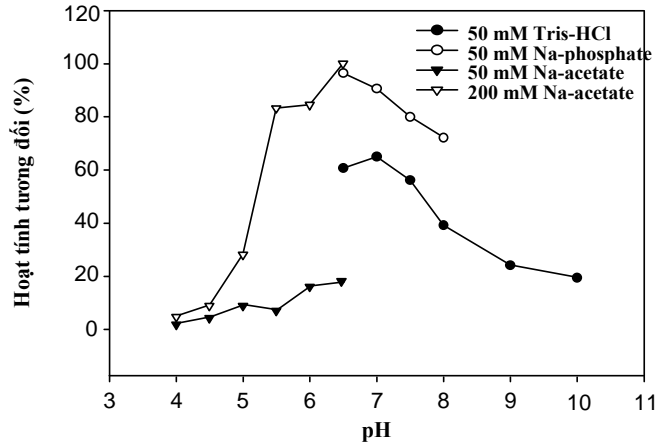
Tốc độ phản ứng của MalQ tăng dần và đạt tối đa ở nhiệt độ 37°C, nhưng sau đó hoạt tính của enzym giảm nhanh ở nhiệt độ trên 40°C. Vì vậy, nhiệt tối thích cho hoạt động của MalQ tái tổ hợp là 37°C khi 0.05% (w/v) amylose trong 200 mM sodium acetate bufer (pH 6.5) được sử dụng làm cơ chất (Hình 4).



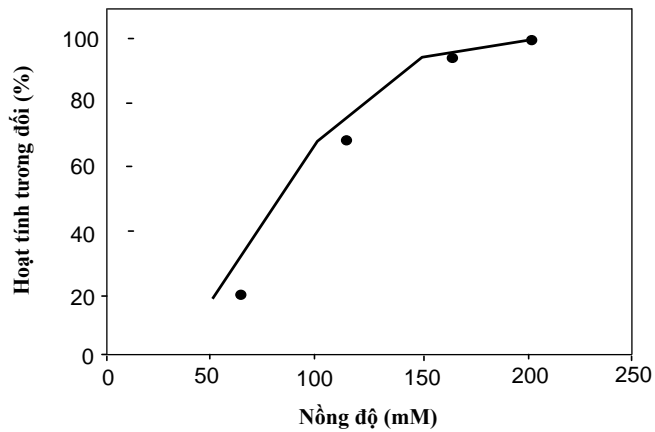
Hình 4: Nhiệt độ tối ưu của MalQ

3.4.2 Ảnh hưởng của pH và ion sodium

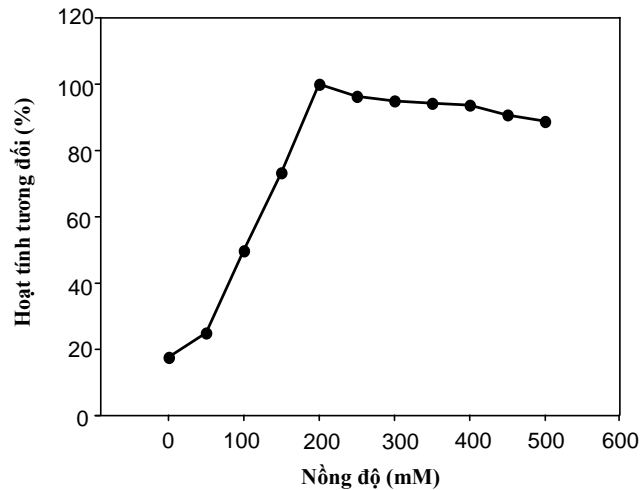
Để xác định pH tối ưu của MalQ, hoạt tính tương đối của MalQ với amylose được đo qua một loạt pH từ 4 đến 10. Dung dịch đệm được sử dụng như sau: 50 mM sodium acetate (pH 4.0 đến 6.0); 200 mM sodium acetate (pH 4.0 đến 6.5); 50 mM sodium phosphate (pH 6.5 đến 8.0); and 50 mM Tris-HCl (pH 6.5 đến 10) (Hình 5). Enzym MalQ hoạt động tốt nhất ở pH 6.5 với 0.05% (w/v) amylose trong môi trường 200 mM sodium acetate; ngược lại hoạt tính của nó khá thấp trong dung dịch đệm 50 mM sodium acetate.



Hình 5: pH tối ưu của MalQ



Hình 6: Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch đệm sodium acetate trên hoạt tính của MalQ



Hình 7: Ảnh hưởng của ion sodium trên hoạt tính của MalQ

Hoạt tính của enzym MalQ không bị ức chế bởi nồng độ ion sodium cao. Khi nồng độ sodium chloride được tăng lên từ 200 mM đến 500 mM trong dung dịch đệm 50 mM sodium acetate, hoạt tính của enzym này chỉ thay đổi 11% (Hình 6 và 7).

4 KẾT LUẬN

Với “tạo dòng biểu hiện *malQ* từ *Escherichia coli* K12 và xác định điều kiện hoạt động tối ưu của enzym MalQ” bước đầu cung cấp các dữ liệu và thông tin cơ bản cho các nghiên cứu về đặc tính xúc tác của enzym này đồng thời giúp tìm hiểu sâu hơn vai trò của nó trong hệ thống chuyển hóa maltodextrin/glycogen của *E. coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Boos, W. and H. Shuman. 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 204-229.
- [2] Böhm, A. and W. Boos. 2004. Gene regulation prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 151-156.
- [3] Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- [4] Decker, K., R. Peist, J. Reidl, M. Kossmann, B. Brand and W. Boos. 1993. Maltose and maltotriose can be formed endogenously in *Escherichia coli* from glucose and glucose-1-phosphate independently of enzymes of the maltose system. *J. Bacteriol.* 175: 5655-5665.
- [5] Liebl, W., R. Feil, J. Gabelsberger, J. Kellermann and K. H. Schleifer. 1992. Purification and characterization of a novel thermostable 4- α -glucanotransferase of *Thermotoga maritima* cloned in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 207: 81-88.