

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM  
301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**

**Đề tài**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYME  
TRONG CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM**

**MÃ SỐ: KC 04-07**

***Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước: PGS. TS. Ngô Tiến Hiện***

**Đề tài nhánh**

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG  
BẰNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN ĐỂ SINH TỔNG HỢP ENZYME  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE CÓ HIỆU SUẤT CAO. NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP  
TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG SINH TỔNG HỢP ENZYME  
COLLAGENASE VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM**

***Chủ nhiệm đề tài nhánh cấp nhà nước: TS. Trương Nam Hải  
Viện Công nghệ sinh học – Viện Khoa học và kỹ thuật Việt Nam  
18 Hoàng Quốc Việt – Cầu Giấy – Hà Nội***

**Hà Nội, 10 – 2004**

***Bản quyền:***

***Đơn xin sao chép toàn bộ hoặc từng phần tài liệu này phải gửi đến Viện trưởng Viện  
Công nghiệp Thực phẩm, trừ trong trường hợp sử dụng với mục đích nghiên cứu***

BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ  
VIỆN CÔNG NGHIỆP THỰC PHẨM  
301 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội

**BÁO CÁO TỔNG KẾT  
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT**

**Đề tài cấp Nhà nước**

**NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG CÔNG NGHỆ ENZYME  
TRONG CHẾ BIẾN MỘT SỐ NÔNG SẢN THỰC PHẨM**

**MÃ SỐ: KC 04-07**

***Chủ nhiệm đề tài cấp nhà nước: PGS. TS. Ngô Tiến Hiên***

**Đề tài nhánh cấp Nhà nước**

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG  
BẰNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN ĐỂ SINH TỔNG HỢP ENZYME  $\beta$ -  
GALACTOSIDASE CÓ HIỆU SUẤT CAO. NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP  
TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG SINH TỔNG HỢP ENZYME  
COLLAGENASE VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM**

***Chủ nhiệm đề tài nhánh cấp nhà nước: TS. Trương Nam Hải  
Viện Công nghệ sinh học – Viện Khoa học và kỹ thuật Việt Nam  
18 Hoàng Quốc Việt – Cầu Giấy – Hà Nội***

**Hà Nội, 10 – 2004  
Bản thảo viết xong tháng 9 – 2004**

*Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện đề tài cấp Nhà nước, Mã số:  
KC 04-07*

**DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN ĐỀ TÀI**

|                                 |                                |
|---------------------------------|--------------------------------|
| <i>1. TS. Trương Nam Hải</i>    | <i>Viện Công nghệ sinh học</i> |
| <i>2. CN. Trần Minh Trí</i>     | <i>Viện Công nghệ sinh học</i> |
| <i>3. CN. Nguyễn Thanh Thuỷ</i> | <i>Viện Công nghệ sinh học</i> |
| <i>4. ThS. Đỗ Thị Huyền</i>     | <i>Viện Công nghệ sinh học</i> |
| <i>5. CN. Nguyễn Thanh Lịch</i> | <i>Viện Công nghệ sinh học</i> |
| <i>6. CN. Lê Thị Thu Hồng</i>   | <i>Viện Công nghệ sinh học</i> |

## BÀI TÓM TẮT

Beta-galactosidaza là enzym được sử dụng rộng rãi không chỉ trong nghiên cứu mà còn được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm, y dược. Điển hình trong quá trình lên men bơ sữa, beta-galactosidaza được bổ sung để tránh khả năng kết tinh lactoza và làm tăng độ ngọt của sản phẩm, trong công nghiệp dược, chúng được sử dụng làm thuốc trợ tiêu hoá cho những người thiếu khả năng hấp thụ lactoza và một số bệnh khác. Enzyme này rất phổ biến ở nhiều vi sinh vật và đã được sản xuất ở mức độ công nghiệp để ứng dụng. Tuy nhiên, việc lên men những chủng vi sinh vật này để thu enzym cũng gặp khó khăn do chúng không có khả năng tổng hợp enzym ở mức độ cao, không có cơ chế để điều khiển sự biểu hiện của gen mã hoá cho enzym, ngoài ra việc tinh sạch enzym cũng gặp nhiều trở ngại do enzym bị lẫn nhiều protein của vi sinh vật chủ. Từ những khó khăn nêu trên, chúng tôi đã đặt ra mục đích là tạo ra chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lượng lớn enzym beta-galactosidaza dưới sự điều khiển phiên mã của T7-promotor và enzym được tạo ra từ chủng tái tổ hợp được tinh sạch dễ dàng nhờ cột sắc ký ái lực. Gen mã hoá cho beta-galactosidaza từ *E. coli* ATCC11105 được nhân lên bằng PCR và được đưa vào vectơ biểu hiện pET22b(+) sau đó được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21. Các dòng biến nạp được chọn lọc trực tiếp trên môi trường chứa cơ chất Xgal. Chúng tôi đã tối ưu hoá việc tổng hợp enzym từ chủng *E. coli* tái tổ hợp và thu được lượng lớn enzym beta-galactosidaza. Việc tổng hợp enzym được kiểm soát chặt chẽ dưới sự cảm ứng của IPTG. Enzym được tổng hợp từ chủng tái tổ hợp có chứa thêm 6 axit amin Histidin. Đây là trình tự cho phép enzym được tinh sạch một cách dễ dàng nhờ dùng cột ái lực gắn đặc hiệu với Histidin. Kết quả chúng tôi đã tạo được chế phẩm enzym tái tổ hợp tinh sạch ở mức độ phòng thí nghiệm.

Ngược lại với beta-galactosidaza, enzym collagenaza chỉ có mặt ở một số vi sinh vật và động vật. Enzym này có rất nhiều ứng dụng trong y học nhờ khả năng phân cắt các sợi collagen ở những mô hoặc da bị hỏng. Tuy nhiên việc tinh sạch enzym này từ các chủng vi sinh vật hoặc mô động vật để ứng dụng gặp rất nhiều

khó khăn. Bên cạnh đó, gen mã hoá cho collagenaza từ vi sinh vật chưa được nghiên cứu nhiều. Vì vậy để có thể sản xuất lượng lớn enzym từ chủng tái tổ hợp, điều cần thiết trước tiên là phải phân lập được gen mã hoá cho enzym. Chủng *Bacillus subtilis* FS-2 được biết có khả năng tổng hợp collagenaza. Để phân lập được gen, chúng tôi đã tạo ngân hàng hệ gen của chủng *Bacillus* trong vectơ pUC18. Từ ngân hàng hệ gen này chúng tôi đã sàng lọc để chọn ra dòng plasmid có chứa gen mã hoá cho collagenaza bằng cách cấy trải trên môi trường có chứa collagen. Kết quả, trong khoảng gần 10 000 dòng biến nạp chúng tôi đã chọn được một dòng có khả năng thuỷ phân collagen. Đoạn gen trong vectơ pUC18 này có kích thước trên 3Kb đã được đọc trình tự và so sánh trên ngân hàng gen quốc tế để tìm ra khung đọc đúng của gen mã hoá collagenaza.

# I. MỤC LỤC

|                                                                                 |                               |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| MỞ ĐẦU .....                                                                    | 1                             |
| 1.1 TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....                                                    | 2                             |
| 1.1.1. Đại cương về $\beta$ -galactosidase .....                                | 2                             |
| 1.1.2. $\beta$ -Galactosidaza của <i>E. coli</i> .....                          | 3                             |
| 1.1.3. Ứng dụng của $\beta$ -galactosidaza .....                                | 5                             |
| 1.2. PHƯƠNG PHÁP .....                                                          | 6                             |
| 1.2.1. Tách chiết ADN hệ gen của vi khuẩn <i>E. coli</i> ATCC 11105 .....       | 6                             |
| 1.2.2. Nhân gen LacZ mã hoá $\beta$ -galactosidaza bằng kỹ thuật PCR .....      | 6                             |
| 1.2.3. Đưa gen LacZ vào vectơ pET-22b(+) .....                                  | 6                             |
| 1.2.4. Biến nạp ADN plasmit vào tế bào <i>E. coli</i> BL21 bằng xung điện ..... | 7                             |
| 1.2.5. Tách chiết ADN plasmit từ vi khuẩn <i>E. coli</i> .....                  | 7                             |
| 1.2.6. Xử lý ADN plasmit bằng hai enzym hạn chế Nco I và Xho I .....            | 7                             |
| 1.2.7. Định tính sự biểu hiện gen trên môi trường đặc .....                     | 8                             |
| 1.2.8. Biểu hiện $\beta$ -galactosidaza trong môi trường lỏng. ....             | 8                             |
| 1.2.9. Tinh sạch prôtêin bằng cột sắc ký ái lực [8] .....                       | 8                             |
| 1.2.10. Xác định hoạt tính enzym .....                                          | 8                             |
| 1.3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....                                                 | 9                             |
| 1.3.1. Thiết kế cặp mồi nhân đoạn gen LacZ .....                                | 9                             |
| 1.3.2. Nhân đoạn gen lacZ bằng phương pháp PCR                                  | Error! Bookmark not defined.0 |
| 1.3.3. Thiết kế vecter biểu hiện pET-22blacZ                                    | Error! Bookmark not defined.0 |
| 1.3.4. Biểu hiện gen <i>LacZ</i> trong <i>E. coli</i> BL21                      | Error! Bookmark not defined.3 |
| 1.3.5. Tinh sạch $\beta$ -Galactosidase bằng phương pháp sắc ký ái lực          | Error! Bookmark not defined.  |
| 1.3.6. Hoạt tính của $\beta$ -Galactosidase tái tổ hợp                          | Error! Bookmark not defined.  |
| 1.4. KẾT LUẬN .....                                                             | 18                            |

|                                                                                                                                        |                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| TÀI LIỆU THAM KHẢO .....                                                                                                               | 18                           |
| PHẦN 2.....                                                                                                                            | 21                           |
| với đề tài: “ <i>Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống sinh tổng hợp enzyme collagenase và ứng dụng trong thực phẩm</i> ”. |                              |
| 2.1: TỔNG QUAN .....                                                                                                                   | Error! Bookmark not defined. |
| 2.1.1. Đại cương về collagenase .....                                                                                                  | Error! Bookmark not defined. |
| 2.1.2. Những ứng dụng của collagenase.....                                                                                             | Error! Bookmark not defined. |
| 2.2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....                                                                                           | 27                           |
| 2.2.1. Vật liệu.....                                                                                                                   | 27                           |
| 2.2.2. Phương pháp.....                                                                                                                | 27                           |
| 2.3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....                                                                                                        | 29                           |
| 2.3.1. Tách chiết ADN hệ gien của chủng B. subtilis.....                                                                               | 29                           |
| 2.3.2. Thiết lập ngân hàng gien của B. subtilis FS – 2.....                                                                            | Error! Bookmark not defined. |
| 2.3.3. Sàng lọc gien mã hoá Collagenase từ ngân hàng gien.....                                                                         | Error! Bookmark not defined. |
| 2.3.4. Nghiên cứu đoạn gen chứa gen mã hoá Collagenase trong pUCCol.....                                                               | Error! Bookmark not defined. |
| 2.4. KẾT LUẬN .....                                                                                                                    | 37                           |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO .....                                                                                                               | 38                           |

## BẢNG CHỮ VIẾT TẮT

|                |                                             |
|----------------|---------------------------------------------|
| ADN            | axit deoxiribonucleotit                     |
| Amp            | ampixilin                                   |
| ARN            | axit ribonucleotit                          |
| bp             | base pair                                   |
| dNTPs          | doexiribonucleotide 5'-triphosphates        |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>                     |
| EDTA           | etylen diamin tetra acetic acid             |
| EtBr           | ethidium bromide                            |
| IPTG           | isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside |
| kb             | kilo base                                   |
| LB             | luria-betani medium                         |
| PCR            | Polymerase Chain Reaction                   |
| TAE            | Tris-Acetate-EDTA                           |
| TE             | Tris-EDTA                                   |
| SDS            | Sodium dodecyl sulphate                     |



## MỞ ĐẦU

Ngày nay, cùng với những tiến bộ của khoa học kỹ thuật, công nghệ ADN tái tổ hợp cũng đạt được rất nhiều thành tựu. Việc sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp tạo ra những chủng vi sinh có khả năng tổng hợp mạnh các enzyme để dùng làm giống khởi động đang là một hướng chủ yếu của công nghệ sinh học hiện đại.

$\beta$ -Galactosidase là enzyme được nghiên cứu từ những năm 50 của thế kỷ trước. Enzyme này được nghiên cứu kỹ hơn sau khi Jacob và Monod đưa ra mô hình điều khiển của operon *Lac*.  $\beta$ -Galactosidase có thể được tìm thấy ở rất nhiều loài động vật, thực vật, nấm và vi khuẩn.  $\beta$ -Galactosidase còn được gọi là lactaza vì chúng có khả năng phân giải lactoza thành glucoza và galactoza. Nhờ khả năng này mà  $\beta$ -galactosidase được sử dụng trong nhiều ngành công nghiệp như công nghiệp thực phẩm, y dược. Trong công nghiệp thực phẩm,  $\beta$ -galactosidase được bổ sung vào quá trình lên men bơ sữa để tránh sự kết tinh lactoza và tăng độ ngọt của sản phẩm. Trong y dược, chúng được sử dụng làm thuốc trợ tiêu hoá cho những người thiếu khả năng hấp thụ lactoza hoặc bổ sung cho những người bị bệnh GM<sub>1</sub>-gangliosidosis và bệnh Morquio típ B do suy giảm hoạt tính của  $\beta$ -galactosidase trong tế bào. Ngoài ra  $\beta$ -galactosidase còn đóng vai trò làm dấu chuẩn để tách và chọn dòng phân tử trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp.  $\beta$ -Galactosidase còn được ứng dụng trong kỹ thuật ELISA vì chúng hoạt động với nhiều cơ chất sinh màu tổng hợp như ONPG, PNPG, X-gal. Ngược lại, collagenase chỉ có ở một số giới hạn sinh vật và chủ yếu là ở các mô của động vật có xương sống. Collagenase cũng được các nhà khoa học trên thế giới đặc biệt quan tâm nghiên cứu và ứng dụng rất rộng rãi trong y học như để chữa các vết bỏng, vùng mô bị thoái hoá, ... Tuy nhiên việc tinh sạch enzyme này cho việc ứng dụng gặp rất nhiều khó khăn và đòi hỏi chi phí tốn kém. Từ những trở ngại trên một vấn đề đặt ra cho các nhà khoa học là làm thế nào để có thể thu được lượng lớn các enzyme này một cách dễ dàng và enzyme có độ tinh sạch cao. Bằng kỹ thuật di truyền và tái tổ hợp gen, chúng tôi đã tiến hành đề tài “*Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống bằng kỹ thuật di truyền để sinh tổng hợp enzyme  $\beta$ -galactosidase có hiệu suất cao. Nghiên cứu phân lập tuyển chọn và tạo chủng giống sinh tổng hợp enzyme collagenase và ứng dụng trong thực phẩm*”. Đề tài gồm các phần sau: (1) nhận được gen mã hoá  $\beta$ -galactosidase từ chủng vi khuẩn *E. coli* ATCC11105; (2) tạo được chủng *E. coli* BL21 tái tổ hợp có khả năng tổng hợp lượng lớn enzyme  $\beta$ -galactosidase, enzyme này được tinh sạch một cách dễ dàng; (3) Nhận được ngân hàng gen của chủng *Bacillus subtilis* FS-2, chủng này có khả năng tổng hợp

collagenase. Đề tài được thực hiện tại Phòng Kỹ thuật Di truyền - Viện Công nghệ Sinh học.

## 1. NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG BẰNG KỸ THUẬT DI TRUYỀN ĐỂ SINH TỔNG HỢP ENZYME $\beta$ - GALACTOSIDASE CÓ HIỆU SUẤT CAO

### 1.1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1.1. Đại cương về $\beta$ -galactosidase

$\beta$ -Galactosidase ( $\beta$ -D-galactoside galactohydrolase E.C. 3.2.1.23) là enzyme có khả năng xúc tác cho hai kiểu phản ứng: phản ứng chuyển gốc galactozyl và phản ứng thủy phân. Nhờ khả năng chuyển gốc galactozyl của  $\beta$ -galactosidase mà lactoza có thể chuyển thành allolactoza, một chất cảm ứng tự nhiên của operon *Lac*. Phản ứng thủy phân chính của  $\beta$ -galactosidase là thủy phân đường đôi lactoza thành hai đường đơn glucoza và galactoza. Ngoài ra, nó còn có thể xúc tác phản ứng thủy phân các liên kết  $\beta$ -D-galactosit từ đầu không khử của các hợp chất hydrocacbon, glycoprotein, hoặc galactolipit [5], [6], [11], [15].

$\beta$ -Galactosidase từ các loài nấm men có những nét đặc trưng về mặt cấu trúc cũng như về khối lượng phân tử. Ví dụ;  $\beta$ -Galactosidase của *Saccharomyces lactis* chỉ có một tiểu đơn vị với khối lượng phân tử 124 kDa, có thể hoạt động được ở 4°C. Nhờ vậy mà  $\beta$ -galactosidase này được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm khi chế biến các sản phẩm bơ sữa trong điều kiện lạnh nhằm ức chế sự sinh trưởng của các loại vi khuẩn.  $\beta$ -Galactosidase ở *S. fragilis* có hai tiểu đơn vị, có khối lượng phân tử tương ứng là 90 và 120 kDa, và chứa một số ion kim loại như  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ .  $\beta$ -Galactosidase của *S. lactis* có hoạt tính cao nhất khi nồng độ của  $\text{Na}^+$  hay  $\text{K}^+$  ở 40-100 mM và nồng độ của  $\text{Mn}^{++}$  là 0,1-1mM. Hiện nay, người ta đã tiến hành tách dòng và biểu hiện gen mã hoá  $\beta$ -galactosidase ở nấm men nhằm tạo ra chủng có khả năng tổng hợp  $\beta$ -galactosidase mạnh và đã đạt được một số kết quả nhất định [5], [6].

$\beta$ -Galactosidase ở vi khuẩn là loại enzyme ngoại bào. Sau khi được tổng hợp, nó được tiết ra ngoài môi trường hoặc được tiết vào khoang chu chất. Đây là một enzyme thích ứng điển hình, được tổng hợp khi trong môi trường chỉ có đường lactoza hay các chất có

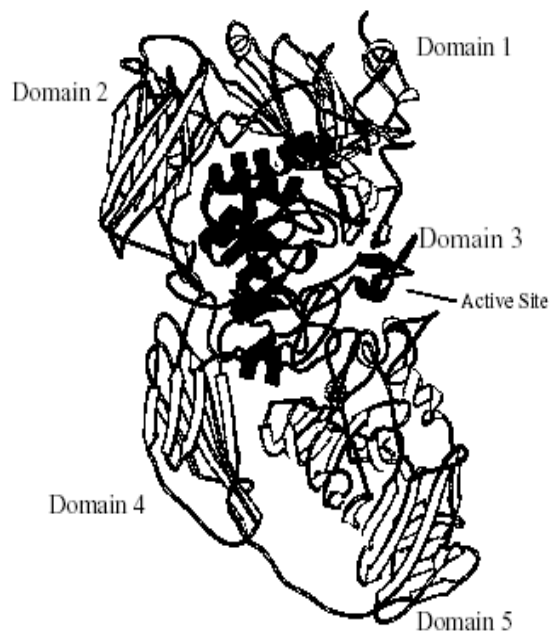
cấu trúc tương tự lactoza như axit lactobiotic.  $\beta$ -Galactosidase của vi khuẩn có khối lượng phân tử khá lớn (trên 100 kDa), thường hoạt động tối ưu ở 37°C trong điều kiện môi trường có độ pH trung bình (6,0-8,0).  $\beta$ -Galactosidase là enzyme không chịu nhiệt, khi nhiệt độ tăng lên 55°C thì hoạt tính của enzyme hầu như bị mất. Enzyme này hoạt động với hai loại cơ chất tổng hợp là ONPG và PNPG, mỗi loại enzyme có ái lực khác nhau với mỗi loại cơ chất khác nhau.

$\beta$  - Galactosidase của vi khuẩn rất đa dạng và phong phú về cấu tạo cũng như kích thước.  $\beta$ -Galactosidase của *Thermus sp* A4 chỉ có một tiểu đơn vị có trọng lượng 75 kDa còn của *T. aquaticus* lại có khối lượng rất lớn, hơn 700 kDa với bốn tiểu đơn vị giống nhau. Mặc dù vậy, điều thú vị là các tiểu đơn vị của  $\beta$ -galactosidase ở nhiều loài vi khuẩn khác nhau lại có kích thước và khối lượng phân tử gần giống nhau [12], [15].

### **1.1.2. $\beta$ -Galactosidase của *E. coli***

#### **1.1.2.1. Cấu trúc**

$\beta$ -Galactosidase của *E. coli* là một enzyme có cấu trúc bậc bốn với bốn tiểu đơn vị giống nhau, mỗi tiểu đơn vị được tạo thành từ một chuỗi polypeptide trọng lượng 116 kDa với 1023 axit amin. Các axit amin cuộn xoắn lại tạo thành năm vùng chức năng (domain) xếp xung quanh một cấu trúc vòng trống ( $\alpha/\beta$ ) ở trung tâm. Các vùng chức năng này có cách cuộn xoắn khác nhau, vùng 1 cuộn theo kiểu jelly roll, vùng 2 và vùng 4 lại cuộn theo kiểu cấu trúc của globulin miễn dịch, vùng 3 cuộn theo kiểu vòng trống ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> và vùng 5 cuộn theo kiểu supersandwich [13], (Juers, Matthews, 1994).



Hình 1: Cấu trúc một tiểu đơn vị của  $\beta$ -galactosidaza của *E. coli* và trung tâm hoạt động của enzym

#### 1.1.2.2. Trung tâm hoạt động

Trung tâm hoạt động của  $\beta$ -galactosidase bao gồm bốn vùng chức năng khác nhau, nằm trên hai tiểu đơn vị liền kề và tạo thành hình một túi nhỏ có kích thước vừa khít với kích thước của phân tử lactoza. Trung tâm này nằm ở ngay đầu của vùng 3, kết hợp với các gốc của vùng 1 và 5 trên cùng tiểu đơn vị và của vùng 2 trên tiểu đơn vị khác. Trong trung tâm hoạt động của enzyme có một ion  $\text{Na}^+$ , ngoài ra khi hoạt động enzyme này còn cần sự có mặt của ion  $\text{Mg}^{2+}$ , các ion này đóng vai trò làm ổn định cấu trúc của  $\beta$ -galactosidase trong trạng thái chuyển tiếp. Từ các nghiên cứu đột biến điểm có định hướng, người ta đã xác định được rằng các gốc Tyr503, Glu537, His540, Trp999 đóng vai trò quan trọng trong phản ứng gắn với cơ chất, làm biến đổi cấu trúc của cơ chất, phá vỡ liên kết  $\beta$ -D-galactosit và hình thành các liên kết mới trong trung tâm hoạt động của enzyme.

#### 1.1.2.3. Hoạt động của enzyme

$\beta$ -Galactosidase của *E. coli* bền trong khoảng pH từ 6,0-8,0 và hoạt động tối ưu ở 37°C trong môi trường có độ pH = 7,4. Các ion dương hoá trị một và alcohol có tác dụng làm tăng hoạt tính của enzyme, trong khi đó  $\beta$ -mercaptoetanol lại ức chế sự hoạt động của

enzyme này. Cả hai đường đơn glucoza và galactoza đều ức chế sự hoạt động của enzyme, galactoza ức chế cạnh tranh với lactoza còn glucoza lại ức chế không cạnh tranh. Trong môi trường có độ pH thích hợp  $\beta$ -galactosidase giữ được hoạt tính sau 4-6 tháng bảo quản ở 5°C. Đây là một enzyme không bền nhiệt, ở 55°C enzyme mất hoạt tính sau 40 phút trong môi trường có  $Mg^{2+}$  và sau 10 phút trong môi trường không có  $Mg^{2+}$ .  $\beta$ -galactosidase của *E. coli* hoạt động tốt đối với cơ chất ONPG (o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) và ít hoạt động với cơ chất PNPG (p-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside) được thể hiện ở giá trị  $K_m$  tương ứng.

### 1.1.3. Ứng dụng của $\beta$ -galactosidase

$\beta$ -Galactosidase là một trong những enzyme có nhiều ứng dụng nhất trong nhiều ngành công nghiệp cũng như trong nghiên cứu sinh học phân tử.

Trong công nghiệp thực phẩm,  $\beta$ -galactosidase được bổ sung vào quá trình lên men bơ sữa để tránh sự kết tinh lactoza và tăng độ ngọt của sản phẩm.

Trong công nghiệp dược chúng được sử dụng làm thuốc trợ tiêu hoá cho những người thiếu khả năng hấp thụ lactoza hoặc bổ sung cho những người bị bệnh  $GM_1$ -gangliosidosis và bệnh Morquio típ B do hoạt tính của  $\beta$ -galactosidase trong tế bào bị suy giảm.

Trong kỹ thuật ADN tái tổ hợp,  $\beta$ -galactosidase đóng vai trò dấu chuẩn trong quá trình tách và chọn dòng phân tử.

$\beta$ -Galactosidase còn được ứng dụng trong kỹ thuật ELISA vì chúng hoạt động với nhiều cơ chất sinh màu tổng hợp như ONPG, PNPG, X-gal.

Từ những ý nghĩa thực tiễn trên mà  $\beta$ -galactosidase đã được các nhà khoa học quan tâm để tách chiết enzyme từ nhiều nguồn sinh vật khác nhau, và tiến hành nghiên cứu sản xuất ở quy mô công nghiệp. Tuy nhiên việc tinh sạch enzyme gặp nhiều khó khăn do lẫn với nhiều loại protein của vi khuẩn. Việc nghiên cứu tạo chủng vi sinh có khả năng tổng hợp cao  $\beta$ -galactosidase bằng kỹ thuật tái tổ hợp ADN là một trong những hướng nghiên cứu nhằm giải quyết những hạn chế trong sản xuất và tinh sạch  $\beta$ -galactosidase công nghiệp hiện nay. Để tiến hành hướng nghiên cứu này, chúng tôi chọn hệ biểu hiện trong *E. coli* để biểu hiện gen.

## 1.2. PHƯƠNG PHÁP

### 1.2.1. Tách chiết ADN hệ gien của vi khuẩn *E. coli* ATCC 11105

Vi khuẩn *E. coli* ATCC 11105 được nuôi cấy trong 5ml ở 37°C qua đêm đến pha ổn định. Tế bào vi khuẩn được phá vỡ bằng SDS 1%. Protein bám AND được phân cắt bằng proteinaza K. Sau đó protein được loại bằng phenol/chlorform/ isoamylalcohol. ADN hệ gien được rửa bằng ethanol 100%.

### 1.2.2. Nhân gien LacZ mã hoá $\beta$ -galactosidase bằng kỹ thuật PCR

Dựa vào trình tự gien *LacZ* của *E. coli* trong ngân hàng gien quốc tế (gi:7428187), cặp mồi *LacZF1-NcoI* và *LacZR2-XhoI* được thiết kế dùng cho PCR (hãng GIENSET Singapore Biotech.Pte Ltd tổng hợp). PCR được tiến hành như sau: Biến tính ADN ở 94°C trong 3 phút; nhân ADN bằng 25 chu trình nhiệt với các bước sau: 94°C trong 1 phút, 55°C 1 phút, 72°C trong 1 phút 30 giây. Phản ứng nhân ADN kết thúc ở 72°C trong 8 phút. ADN được giữ ở 4°C sau khi kết thúc PCR.

### 1.2.3. Đưa gien LacZ vào vectơ pET-22b(+)

Để đưa gien *lacZ* vào vectơ pET-22b(+) tại vị trí *NcoI* và *XhoI* trong vùng đa nối, sản phẩm PCR và vectơ pET-22b(+) được xử lý bằng hai enzyme hạn chế *NcoI* và *XhoI*. Đoạn gien *lacZ* và plasmid sau khi xử lý có kích thước tương ứng ~ 3 kb và ~ 5,4 kb được nối lại với nhau bằng ADN ligaza. Sản phẩm phản ứng nối ghép được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL 21.

### 1.2.4. Biến nạp ADN plasmid vào tế bào *E. coli* BL21 bằng xung điện

Tế bào vi khuẩn được làm trẻ hoá đến đầu pha log và được làm sạch bằng cách rửa nhiều lần bằng nước cất vô trùng khử ion. Dưới tác dụng của điện trường cực lớn, màng tế bào giãn ra, nhờ đó ADN di chuyển theo điện trường xâm nhập vào trong tế bào. Khi ngừng xung điện, cấu trúc của màng phục hồi và giữ ADN lại ở bên trong tế bào. Trên plasmid có gien kháng kháng sinh nên chúng tôi dễ dàng tìm thấy các dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid bằng cách chọn lọc trên môi trường có kháng sinh tương ứng.

### 1.2.5. Tách chiết ADN plasmid từ vi khuẩn *E. coli*

Các tế bào *E. coli* mang plasmid được nuôi đến pha cân bằng thì được ly tâm thu lại. Thành và màng tế bào bị phá bằng chất NaOH và SDS đồng thời ADN cũng được biến tính. Sau đó ADN được hồi tính trở lại bằng cách trung hoà độ pH của dung dịch. AND hệ gien và protein được rửa lại bằng dung dịch trung hoà. ADN plasmid hoà tan được tách khỏi rửa bằng ly tâm rồi được rửa lại bằng cồn.

### 1.2.6. Xử lý ADN plasmid bằng hai enzyme hạn chế *Nco I* và *Xho I*.

Phản ứng cắt ADN plasmid bằng hai enzyme *NcoI* và *XhoI* với tổng thể tích là 60 µl có thành phần như sau:

|                         |           |
|-------------------------|-----------|
| + Đệm 10 lần thích hợp  | : 6 µl    |
| + ADN plasmid           | : 15 µl   |
| + <i>NcoI</i>           | : 0,8 µl  |
| + <i>XhoI</i>           | : 0,8 µl  |
| + Nước khử ion vô trùng | : 37,4 µl |

Hỗn hợp của phản ứng được trộn đều và ủ ở 37°C trong 3 giờ.

### 1.2.7. Định tính sự biểu hiện của gien trên môi trường đặc

Cấy vạch một khuẩn lạc của vi khuẩn *E. coli* BL21 mang vector pET-22b*LacZ* trên môi trường LB đặc + Amp + IPTG + X-gal. Đối chứng là một khuẩn lạc đơn của vi khuẩn *E. coli* BL21 mang vector pET-22b(+) cấy trên cùng một đĩa. Nuôi ở 37°C qua đêm, lấy ra để vào tủ lạnh 4°C trong 5 giờ, quan sát sự khác biệt về màu sắc khuẩn lạc.

### 1.2.8. Biểu hiện β-galactosidase trong môi trường lỏng

- Cấy một khuẩn lạc vào 50 ml môi trường LB lỏng + Amp. Nuôi lắc qua đêm ở 37°C, 200vòng/phút.
- Chuyển 2ml dịch huyền phù nuôi cấy ở trên sang 100 ml môi trường LB lỏng + Amp. Nuôi lắc ở 37°C, 200 vòng/phút trong 2 – 2,5 giờ để đạt OD<sub>600</sub> = 0,8.

- Cảm ứng: Bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,5 mM, chuyển sang nuôi lắc ở 30°C, 200 vòng/phút. Lần lượt lấy mẫu ở các thời điểm 0<sup>h</sup>, 1<sup>h</sup>, 2<sup>h</sup>, 3<sup>h</sup>, 4<sup>h</sup>, 5<sup>h</sup> mỗi lần lấy 2ml dịch cảm ứng cho vào ống Eppendorf 2ml. Kiểm tra sản phẩm cảm ứng trên gel điện di polyacrylamid 10%

### 1.2.9. Tinh sạch protein bằng cột sắc kí ái lực [8]

Phương pháp tinh sạch bằng cột ái lực Talon dựa vào liên kết ái lực giữa ion Coban (Co<sup>2+</sup>) với vòng imidazol của Histidin. Các Histidin ở càng gần nhau trên chuỗi polypepetit thì liên kết giữa chúng với ion Coban càng mạnh. Khi đưa dịch chiết thô của tế bào lên cột và rửa bằng đệm nhiều lần thì chỉ còn protein tái tổ hợp có đuôi gồm 6 Histidin được giữ lại. Imidazol trong đệm thu mẫu có nồng độ cao sẽ cạnh tranh với các phân tử protein tái tổ hợp do đó đẩy các phân tử protein tái tổ hợp ra khỏi các ion Coban. Kiểm tra mức độ tinh sạch của enzyme bằng điện di biến tính trên gel polyacrylamit 10%.

### 1.2.10. Xác định hoạt tính enzyme

ONPG là chất không màu nhưng sản phẩm thủy phân của nó là ONP<sup>-</sup> (o - nitrophenyl) lại có màu vàng da cam và hấp thụ cực đại ở bước sóng 420 nm. Độ hấp thụ của 1nmol/ml ONP<sup>-</sup> ở bước sóng 420 nm là 0,0045 trong cuvet 1 cm. Cùng một lượng  $\beta$ -galactosidase xúc tác phản ứng thủy phân ONPG ở các nồng độ khác nhau thì tốc độ tạo màu là khác nhau. Đo tốc độ tạo màu ban đầu của các phản ứng này và áp dụng phương trình Lineweaver - Buck thì có thể xác định được hoạt tính của  $\beta$ -galactosidase.

## 1.3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Gien *lacZ* của vi khuẩn *E. coli* ATCC11105 đã được tách dòng và đưa vào vector biểu hiện pET-22b(+), để tạo thành vector pET-22b*LacZ*. Quy trình thiết kế vector biểu hiện pET-22b*LacZ* để biểu hiện trong chủng biểu hiện *E. coli* BL21 như sau: đoạn gen *lacZ* sau khi được nhân lên bằng kỹ thuật PCR từ ADN hệ gen của *E. coli* ATCC11105 và ADN plasmid pET-22b(+) cùng được xử lí bằng hai enzyme hạn chế *XhoI* và *NcoI*, sau đó hai sản phẩm của phản ứng cắt được nối lại với nhau bằng ADN ligaza để tạo thành vector biểu hiện pET-22b*LacZ*.

Vector biểu hiện pET-22b*LacZ* được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để tạo chủng vi khuẩn tái tổ hợp mang vector pET-22b*LacZ* có khả năng tổng hợp cao  $\beta$ -galactosidase. *E. coli* BL21 là chủng đã bị đột biến mất gen *lon* và *ompT* mã hoá cho proteinaza [16], vì



thể các protein ngoại lai sau khi được tổng hợp sẽ không bị phân huỷ bởi proteinaza của cơ thể chủ.

### 1.3.1. Thiết kế cặp môi nhân đoạn gen *lacZ*

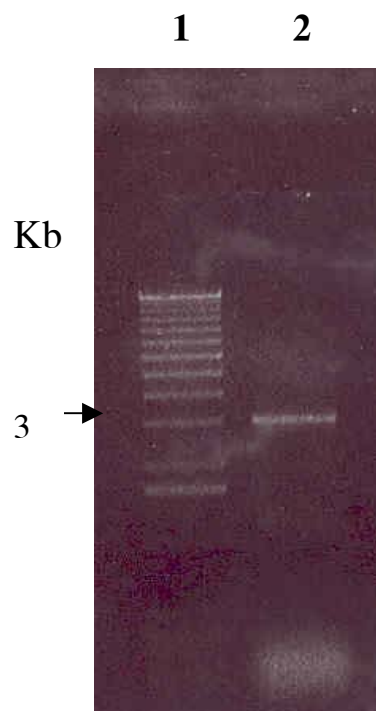
Dựa vào trình tự đoạn gen *lacZ* của *E.coli* trong ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi đã thiết kế cặp môi dùng để nhân gen *lacZ* mã hoá cho  $\beta$ -galactosidase từ hệ gen của *E. coli* BL21. Dự định gen *lacZ* sẽ được đưa vào vectơ pET22b(+) bằng điểm cắt *Nco*I và *Xho*I nên trên hai đoạn môi chúng tôi cũng thiết kế thêm các trình tự tương ứng của hai enzyme hạn chế đó. Hai cặp môi có trình tự như sau:

- Môi đầu 5' LacZ-*Nco*I: 5' **GCCATGGT**GACCATGATTCAGGATT- 3'

- Môi đầu 3' LacZ-*Xho*I: 5' – **CCGCTGGAGTTTTT**GACACCAGACCAA- 3'

### 1.3.2. Nhân đoạn gen *lacZ* bằng phương pháp PCR

Từ hệ gen vi khuẩn *E.coli* ATCC11105, bằng hai cặp môi đã được thiết kế ở trên chúng tôi đã tiến hành PCR nhân gen *lacZ*. Sản phẩm PCR có chiều dài khoảng 3kb và được kiểm tra trên gel agarose 0,8% (Hình 2).



**Hình 2: Sản phẩm PCR nhân đoạn gen *lacZ* trên gel agarose 0,8%**

**Đường chạy số 1: thang ADN chuẩn**

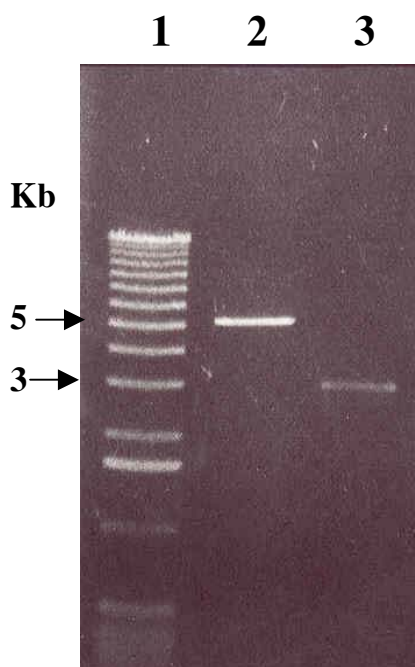
**Đường chạy số 2: sản phẩm PCR**

### 1.3.3. Thiết kế vectơ biểu hiện pET-22blacZ

#### 1.3.3.1. Đưa gen *lacZ* vào vectơ pET-22b(+)

Vectơ pET-22b(+) và sản phẩm PCR nhân gen *lacZ* được xử lý bằng hai enzyme hạn chế *NcoI* và *XhoI*. Sản phẩm sau khi cắt là một băng sáng, rõ chứng tỏ pET-22b(+) đã được mở vòng hoàn toàn, tạo điều kiện cho việc gắn gen *lacZ* một cách dễ dàng bằng ADN ligaza (Hình 3).

Sản phẩm lai được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 bằng phương pháp xung điện. Sau đó, các thể biến nạp được cấy trên môi trường thạch đĩa có kháng sinh Amp chọn lọc và ủ ở 37°C qua đêm.



**Hình 3: Sản phẩm phản ứng cắt pET-22b(+) và sản phẩm PCR bằng *NcoI* và *XhoI* trên gel agarose 0,8%**

**Đường chạy số 1: thang ADN chuẩn**

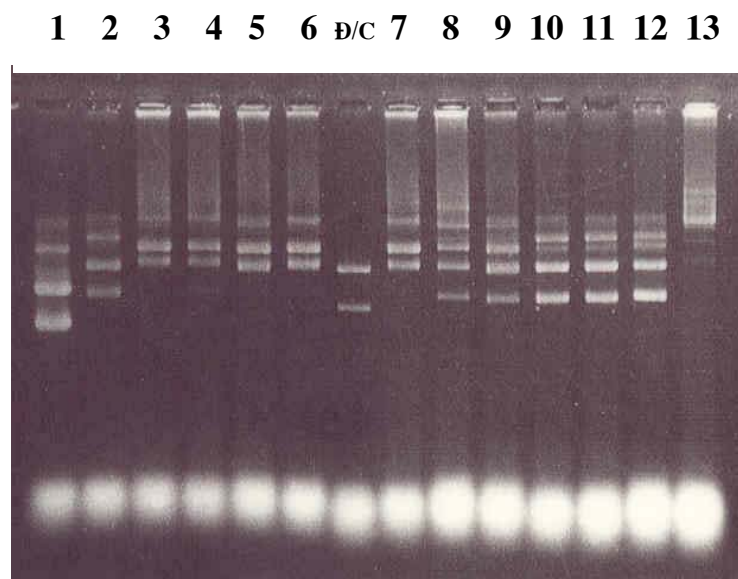
**Đường chạy số 2: vectơ pET-22b**

**Đường chạy số 3: sản phẩm PCR**

#### 1.3.3

Vectơ pET-22b*LacZ* được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* BL21 bằng phương pháp xung điện. Dưới tác dụng của dòng điện một chiều cực mạnh trong khoảng thời gian ngắn 4,7-5 giây, điện tích màng tế bào bị thay đổi và ADN có thể xâm nhập vào tế bào một cách dễ dàng. Các tế bào sau khi biến nạp được trải trên môi trường LB chứa Amp, X-gal, IPTG

và nuôi ở 37°C qua đêm. Kết quả là trên mỗi đĩa petri mọc khá nhiều khuẩn lạc. Trên đĩa xuất hiện hai loại khuẩn lạc, khuẩn lạc màu xanh và khuẩn lạc màu trắng. Đây là những khuẩn lạc gồm các thể biến nạp có chứa vector vì những tế bào không mang vector đã bị áp lực chọn lọc ampicillin đào thải. Chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc tách plasmid để kiểm tra. ADN plasmid được tách từ các khuẩn lạc đơn khác nhau được kiểm tra trên gel điện di agarose 0,8%. Những plasmid mang gen ngoại lai sẽ có kích thước lớn hơn plasmid gốc. Kết quả cho thấy, các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc số 3, 4, 5, 6, 7 lớn hơn nhiều so với plasmid đối chứng pET-22b(+). Các khuẩn lạc mang ADN plasmid này được chọn để nghiên cứu những bước tiếp theo.



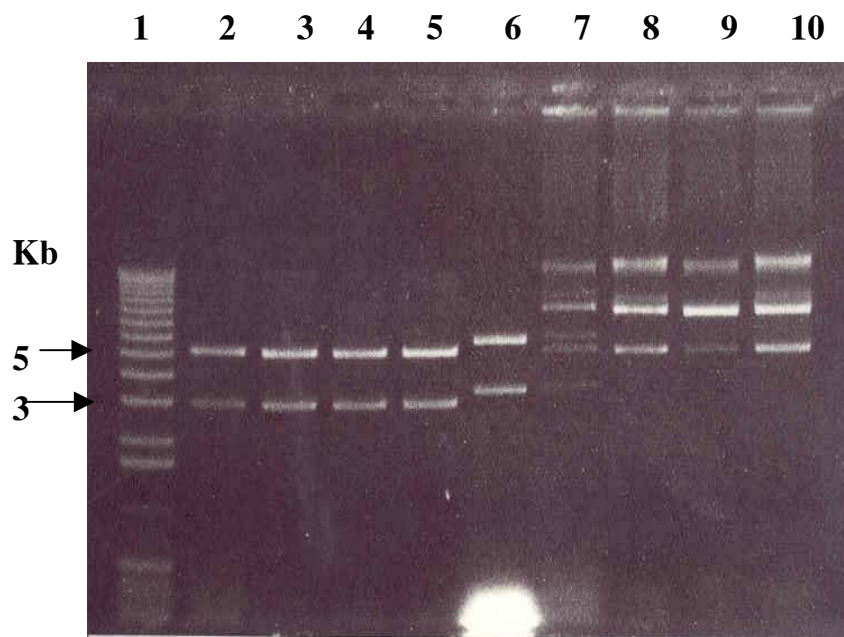
**Hình 4: ADN plasmid được tách từ các thể biến nạp khác nhau trên gel agarose 0,8%**

**Đường chạy Đ/C: pET-22b(+)**

**Đường chạy 1-13: plasmid từ các dòng khuẩn lạc tái tổ hợp khác nhau**

### **1.3.3.3. Kiểm tra thể biến nạp chứa vector biểu hiện**

Để kiểm tra xem các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc số 4, 5, 6, 7 có đúng là pET-22blacZ hay không, chúng tôi tiến hành cắt các plasmid này lại bằng hai enzyme hạn chế *NcoI* và *XhoI*. Đây là hai enzyme đã được dùng để cắt và đưa gen *lacZ* vào vector pET-22b(+) để tạo vector biểu hiện pET-22bLacZ. Đúng như dự đoán, các plasmid này đã có thêm một đoạn gen kích thước gần 3 Kb bằng kích thước của gen *lacZ*. Như vậy có thể nói chúng tôi đã đưa được gen *lacZ* vào vector pET-22b(+).



**Hình 5: ADN plasmid dòng số 4, 5, 6, 7 trên gel agarose 0,8%**

**Đường chạy số 1: thang ADN chuẩn**

**Đường chạy số 2-5: ADN plasmid dòng số 4, 5, 6, 7 được cắt bằng *NcoI* và *XhoI***

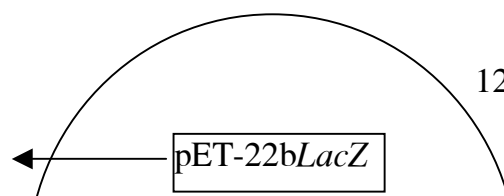
**Đường chạy 6: ADN plasmid gốc**

**Đường chạy 7-10: ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc 4, 5, 6, 7**

#### 1.3.4. Biểu hiện gen *lacZ* trong *E. coli* BL21

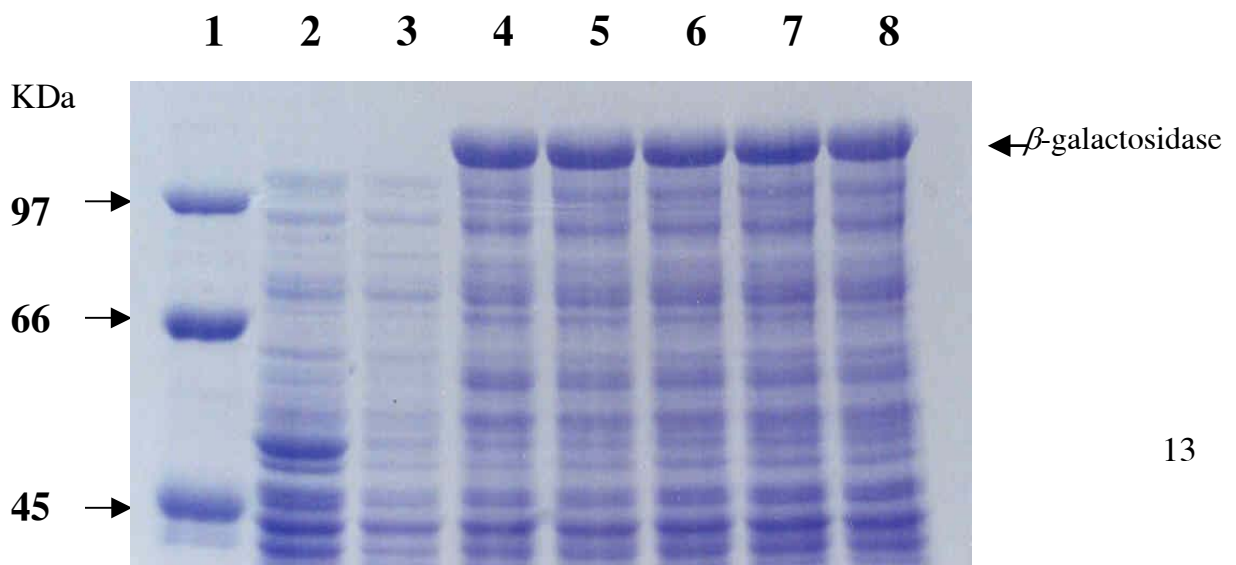
##### 1.3.4.1. Định tính khả năng biểu hiện của $\beta$ -galactosidase trên môi trường thạch đĩa

Khi trong môi trường nuôi cấy có mặt chất cảm ứng IPTG, lập tức phân tử IPTG liên kết ái lực với protein repressor, làm thay đổi cấu trúc không gian của protein này. Để định tính sự biểu hiện  $\beta$ -galactosidase trong vi khuẩn *E. coli* BL21, chúng tôi chọn hai dòng tế bào cấy vạch lên môi trường thạch LB chứa Amp, IPTG, X-gal. Một dòng tế bào *E. coli* BL21 mang hệ pET-22bLacZ và một dòng tế bào đối chứng *E. coli* BL21 mang pET-22b(+). Đĩa sau khi cấy được ủ ở 30°C qua đêm. Kết quả là dòng tế bào *E. coli* BL21 mang pET-22bLacZ có màu xanh trong khi đó tế bào mang pET-22b(+) lại có màu trắng (Hình 6). Sở dĩ dòng tế bào *E. coli* BL21 mang pET-22bLacZ có màu xanh là do  $\beta$ -galactosidase được tổng hợp ra đã thủy phân X-gal tạo màu xanh. Như vậy  $\beta$ -galactosidase tái tổ hợp đã được biểu hiện trên môi trường thạch đĩa LB có chứa Amp, IPTG, X-gal.



#### 1.3.4.2. Biểu hiện gen *lacZ* trong môi trường lỏng

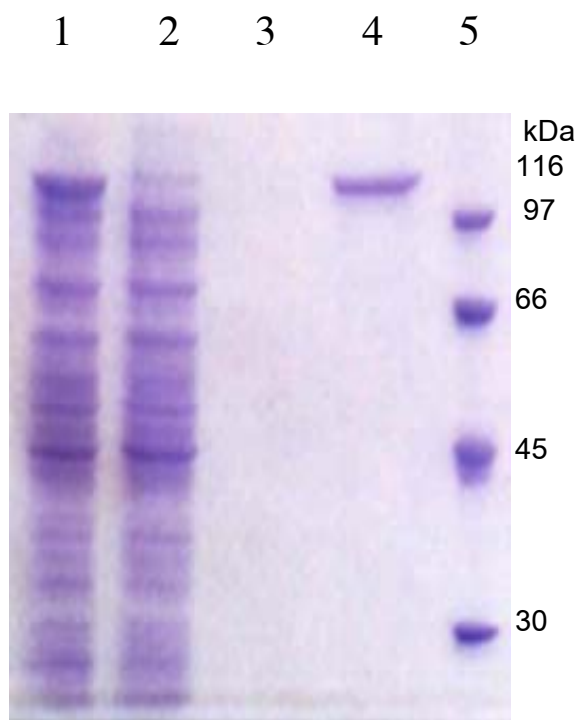
Cấy chuyển một khuẩn lạc màu xanh từ môi trường thạch đĩa sang môi trường LB lỏng có chứa Amp, nuôi lác qua đêm để làm trẻ hoá tế bào sau đó chuyển tế bào sang môi trường cảm ứng có chứa IPTG. Sau khi cảm ứng, chúng tôi tiến hành lấy mẫu theo giờ để chạy điện di kiểm tra protein được tạo ra sau khi cảm ứng. Kết quả điện di (Hình 7) cho thấy các mẫu protein từ *E. coli* BL21 mang pET-22b*LacZ* sau 1<sup>h</sup>, 2<sup>h</sup>, 3<sup>h</sup>, 4<sup>h</sup> và 5<sup>h</sup> cảm ứng đã xuất hiện thêm một băng protein khá lớn kích thước khoảng trên 100 kDa. Băng protein đó là băng  $\beta$ -galactosidase mà ta đang nghiên cứu và như đã được biết thì trọng lượng  $\beta$ -galactosidase của *E. coli* khoảng 116 kDa. Mẫu thu từ dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid pET-22b(+) và mẫu của tế bào không được cảm ứng không có băng protein này. Điều này chứng tỏ việc phiên mã gen *lacZ* phụ thuộc chặt chẽ vào sự cảm ứng của IPTG trong môi trường.



### 1.3.5. Tinh sạch $\beta$ -galactosidase bằng phương pháp sắc kí ái lực

Như ta đã biết, trên vectơ pET-22b(+) đã được thiết kế sẵn một trình tự mã hoá cho sáu axit amin Histidin nằm liền nhau ngay phía trước vùng đa nối để thuận lợi cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp về sau. Khi ta đưa đoạn gen ngoại lai vào vùng đa nối thì trình tự trên sẽ được phiên mã và dịch mã cùng với gen ngoại lai, vì vậy protein được tổng hợp sẽ là một protein tái tổ hợp có sáu Histidin ở phía đầu C.

Phương pháp tinh sạch bằng cột Talon dựa vào liên kết ái lực giữa ion Coban ( $\text{Co}^{2+}$ ) với vòng imidazol của Histidin. Khi các Histidin ở gần nhau thì liên kết giữa chúng với ion Coban càng mạnh. Protein tái tổ hợp trong vectơ pET-22b(+) có đuôi His-tag với sáu Histidin liên tục sẽ liên kết rất đặc hiệu với ion Coban. Các phân đoạn protein tái tổ hợp được thu lại ở dạng tinh sạch. Kết quả sản phẩm protein tinh sạch được kiểm trên gel polyacrylamit 10% (Hình 8)



Từ ảnh điện di ta thấy ở đường chạy số 4 là  $\beta$ -galactosidase tinh sạch chỉ có một băng protein có kích thước lớn khoảng 116 kDa điều đó chứng tỏ cột Talon có ái lực đặc hiệu với  $\beta$ -galactosidase tái tổ hợp có thêm đuôi gồm sáu Histidin.

Bằng phương pháp Bradford, chúng tôi tính được nồng độ  $\beta$ -galactosidase trong dịch tinh sạch là 0,0424mg/ml hay  $9,12 \cdot 10^{-8} \text{M}$ . Sau khi xác định được nồng độ  $\beta$ -galactosidase tinh sạch, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu tính chất động học của enzyme này.

### 1.3.6. Hoạt tính của $\beta$ -galactosidase tái tổ hợp

$\beta$ -Galactosidase thủy phân các liên kết  $\beta$ -D-galactozit như ở lactoza và các chất có gốc  $\beta$ -D-galactoza từ đầu không khử, các chất tổng hợp chứa gốc  $\beta$ -D-galactopyranoside; ONPG, PNPG, X-gal là những cơ chất sinh màu tổng hợp đặc hiệu đối với  $\beta$ -galactosidase.

Dựa vào đường chuẩn BSA ta có thể định lượng được  $\beta$ -galactosidase. Sau khi tinh sạch chúng tôi sử dụng 20  $\mu\text{l}$ , 40 $\mu\text{l}$ , 60 $\mu\text{l}$  dịch chứa  $\beta$ -galactosidase để tiến hành thí nghiệm kiểm tra hoạt tính enzyme. Mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần. Đo OD 595nm ta được lượng enzyme tinh sạch là 0.05 mg/ml.

**Bảng 1: Hoạt tính và động học của enzyme  $\beta$ -galactosidase tái tổ hợp**

| (U/mg) | $k_{\text{cat}}$ /s | $K_m$ (mM) |
|--------|---------------------|------------|
| 157,6  | 86467               | 0,664      |

Như trong bảng đơn vị hoạt tính của enzyme 157,6 U/mg. Với giá trị  $K_m = 0,664$  mM cho thấy ái lực giữa  $\beta$ -galactosidase và cơ chất tổng hợp ONPG tương đối mạnh trong điều kiện phản ứng thừa cơ chất. Giá trị  $k_{cat} = 86467$  là hiệu lực của enzyme, số vòng quay của một phân tử enzyme với các phân tử cơ chất. Ta thấy tốc độ phản ứng xảy khá nhanh trong một giây một phân tử enzyme có khả năng thủy phân 86467 phân tử cơ chất.

Từ kết quả trên cho ta thấy:

$$1/V_{max} = 0,3853 \text{ nên } V_{max} = 2,5953$$

$$-1/K_m = -5,2 \text{ nên } K_m = 0,192 \text{ mg khi đó vận tốc phản ứng bằng một nửa vận tốc cực đại.}$$

Vậy sau 5 phút với 5  $\mu$ l dịch enzyme thủy phân được 0.384 mg cơ chất ONPG.

$\beta$ -Galactosidase tinh sạch từ *E. coli* BL21 tái tổ hợp trong thí nghiệm của chúng tôi có giá trị  $K_m$  nhỏ hơn so với  $\beta$ -galactosidase tái tổ hợp từ vi khuẩn *Rhizobium meliloti* ( $K_m = 1\text{mM}$ ) [15].

Hằng số  $K_{cat}$  của  $\beta$ -galactosidase là 36264 có nghĩa là thời gian cần thiết để enzyme thủy phân một phân tử ONPG trong điều kiện bão hoà cơ chất là  $1/36264$  giây hay trong 1 giây một phân tử  $\beta$ -galactosidase thủy phân được 36264 phân tử cơ chất. Ta thấy giá trị  $K_{cat}$  này tương đối lớn vì vậy enzyme này có thể được sử dụng trong công nghiệp thực phẩm.

#### 1.4. Kết luận

1. Nhận được gen mã hoá  $\beta$ -galactosidase của vi khuẩn *E. coli* ATCC11105
2. Tạo được chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21 có khả năng tổng hợp lượng lớn enzyme  $\beta$ -galactosidase và enzyme này được tinh sạch một cách dễ dàng bằng cột sắc ký Talon. Enzyme tái tổ hợp được tạo ra có ái lực cao với cơ chất và có khả năng thủy phân rất hiệu quả cơ chất.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO



1. Becerra M., Cerdan E., Gonzalez Siro M. I. (1998), "Dealing with different methods for *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase purification", *Biol Proced Online*, 1, pp. 48-58.
2. Becerra M., Cerdan E., Gonzalez Siro M. I. (1997), "Heterologous *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase production and release by *Saccharomyces cerevisiae* osmotic remedial thermosensitive autolytic mutants", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1335, pp. 235-241.
3. Clontech (2001), *Talon Metal Affinity Resins User Manual PT1320 (PR16704)*, America.
4. Feliu J. X., Ramirez A., Villaverde A. (1998), "Distinct mechanisms of antibody-mediated enzymatic reactivation in  $\beta$ -galactosidase molecular sensors" *FEBS Letter*, 438, pp. 267-271.
5. Huber R. E., Hakda S., Cheng C., Cupples C. G., Edwards RA. (2003), "Trp-999 of beta-galactosidase (*Escherichia coli*) is a key residue for binding, catalysis, and synthesis of allolactose, the natural lac operon inducer", *Biochemistry*, 42(6), pp.1796-1803.
6. Huber R. E., Kurz G., Wallenfels K. (1976), "A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (*E. coli*) on lactose.", *Biochemistry*, 15(9), pp. 1994-2000.
7. Hung M. N., Lee B. H. (2002), "Purification and characterization of a recombinant beta-galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96", *Appl Microbiol Biotechnol*, 58(4), pp. 439-445.
8. Jacobson R. H., Zhang X. J., DuBose R. F., Matthews B. W. (1994), "Three-dimensional structure of beta-galactosidase from *E. coli*." *Nature*, 369(6483), pp. 761-766.
9. Kim C., Chung H., Lee M., Choi L., Kim M., (1999), "Development of dried liposomes containing  $\beta$ -galactosidase for the digestion of lactose in milk", *International Journal of Pharmaceutics*, 183, pp. 185-193.

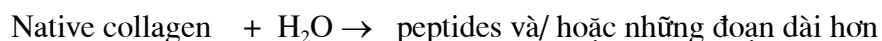
10. Leahy M., Vaughan P., Fanning L., Fanning S., Sheehan D. (2001), "Purification and some characteristics of a recombinant dimeric *Rhizobium meliloti*  $\beta$ -galactosidase expressed in *Escherichia coli*", *Enzyme and Microbial Technology*, 28, pp. 682-688.
11. Obon J. M., Castellar M. R., Iborra J. L., Manjon A. (2000), " $\beta$ -Galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: a simple experimental and modeling study of batch and continuous reactors", *Biochemical Education*, 28, pp. 164-168.
12. Richard J. P., Huber R. E., Heo C., Amyes T. L., Lin S. (1996), "Structure-reactivity relationships for beta-galactosidase (*Escherichia coli*, *lac Z*). 4. Mechanism for reaction of nucleophiles with the galactosyl-enzyme intermediates of E461G and E461Q beta-galactosidases", *Biochemistry*, 35(38), pp. 12378-12401.
13. Ring M., Huber R. E. (1990), "Multiple replacements establish the importance of tyrosine-503 in beta-galactosidase (*Escherichia coli*).", *Arch Biochem Biophys*, 283(2), pp. 342-350.
14. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989), *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed, Cold Spring Harbor laboratory Press, New York.
15. Thomas J. G., Barneys F. (1996), "Protein Misfolding and Inclusion Body Formation in Recombinant *Escherichia coli* Cells Over expressing Heat-shock Protein". *The Journal of Biological Chemistry*, 271, pp. 11141- 11147.
16. Turner P. C., McLennan. A. G., Bates A. D., White M. R. H. (1997), *Instant Notes in Molecular Biology*, Bios Scientific Publishers, UK.
17. Weaver R. F. (1999), *Molecular Biology*, WCB/McGraw-Hill, USA.

## 2. NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP TUYỂN CHỌN VÀ TẠO CHỦNG GIỐNG SINH TỔNG HỢP ENZYME COLLAGENASE VÀ ỨNG DỤNG TRONG THỰC PHẨM”

### 2.1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 2.1.1. Đại cương về collagenase

Collagenase là một enzyme xúc tác quá trình thủy phân collagen tự nhiên.



Một số enzyme có nguồn gốc từ vi khuẩn không tuân theo định nghĩa chung. Chúng có khả năng thủy phân collagen ở dạng biến tính hoặc gelatin, tuy nhiên chúng cần thiết các trình tự amino acid cho sự phân cắt. Một trình tự ngắn cần thiết tối thiểu là R-Pro-X-Gly-Pro, trong đó Pro có thể được thay thế bằng Hyp và amino acid đầu tiên của nhóm phải được cố định vững chắc trong phân tử. Sự phân cắt được xảy ra ở giữa X và Gly[4].

**Bảng 2: Một số collagenase từ các nguồn khác nhau đã được nghiên cứu**

| Enzyme              | Nguồn gốc                       | Cơ chất và phân tích                                               | Đặc tính                                                                                                |
|---------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Collagenase<br>[2]  | <i>B. subtilis</i>              | Collagen không tan, gelatin                                        | MW: 125,000<br><br>Chất ức chế EDTA, trypsin, iodoacetamide, acid idoacetic, 2-β-mecaptoethanol và DFP. |
| Collagenase<br>[12] | <i>Vibrio alginolyticus</i>     | Collagen tự nhiên, peptide tổng hợp. Cần có mặt của Zn             | MW: 81,875                                                                                              |
| Collagenase<br>[13] | <i>Clostridium histolyticum</i> | Collagen tự nhiên, 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D- | MW: 116,000                                                                                             |

|                          |                                     |                                                                                                    |                                                                                                                 |
|--------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                          |                                     | Arg. Cần có mặt của Zn, Ca                                                                         |                                                                                                                 |
| Collagenase<br>[8]       | <i>Clostridium perfringens</i>      | Azocoll, Collagen tự nhiên, cơ chất tổng hợp và collagen type I. Cần có mặt của Zn                 | MW: 120, 000                                                                                                    |
| Collagenase<br>[3]       | Vi khuẩn biển<br><i>Vibrio B-30</i> | Collagen tự nhiên, peptide tổng hợp. Cần có mặt của ion kim loại                                   | MW: 105,000 (từ các tiểu phần có trọng lượng là, 24, 000 và 28, 000 Da.)                                        |
| Collagenase<br>[11]      | <i>Cytophaga sp.</i><br>L43-1       | Collagen tự nhiên                                                                                  | MW: 120, 000                                                                                                    |
| Collagenase<br>A<br>[4]  | <i>C. histolyicum</i>               | Collagen, gelatin, peptide tổng hợp; Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala.OH                                  | MW: 105,000<br><br>Phụ thuộc Ca, cần Zn. Sản phẩm phân cắt cơ chất tạo ra các peptide đầu NH <sub>2</sub> - Gly |
| Collagenase<br>B<br>[4]  | <i>C. histolyicum</i>               | Collagen, gelatin, peptide tổng hợp: Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala.OH                                  | MW, 57,400<br><br>Phụ thuộc Ca, cần Zn. Sản phẩm phân cắt cơ chất tạo ra các peptide đầu NH <sub>2</sub> - Gly  |
| Pseudocollagenase<br>[4] | <i>C. histolyicum</i>               | Gelatin; không thuỷ phân collagen; có thể thuỷ phân peptide tổng hợp: Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala.OH |                                                                                                                 |
| Collagenase<br>[4]       | <i>M. tuberculosis</i>              | Collagen chế biến từ da có dạng nhầy, peptide tổng hợp: Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala.OH, cần Ca.      | MW: 77, 000                                                                                                     |

|                    |                                    |                                                                                                                           |                                                                                                               |
|--------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Collagenase<br>[4] | <i>P. aeruginosa</i>               | Không thuỷ phân collagen, nhưng chúng thuỷ phân peptide tổng hợp: Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala.OH, không cần Ca.             |                                                                                                               |
| Collagenase<br>[4] | <i>Bacteroides malaninogenicus</i> | Collagen chế biến từ da có dạng nhầy                                                                                      | Dạng hạt, bị ức chế bởi EDTA và H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , được hoạt hoá bằng Cysteine                   |
| Collagenase<br>[4] | <i>Streptomyces madurae</i>        | Collagen (chế biến từ da dưới dạng nhầy), Azocoll, Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala.OH,                                          | MW: 35,000<br>Chất ức chế EDTA,<br><br>Không có mặt của nhóm –SH, Liên kết thuận nghịch với Ca.               |
| Collagenase<br>[4] | <i>Trichophyton schoenleinii</i>   | Collagen (chế biến từ da dưới dạng nhầy), Azocoll,                                                                        | MW: 20,000<br><br>pH tối ưu 6,5; chất ức chế EDTA, Cysteine; không thuận nghịch với Ca, Mg; Không có nhóm –SH |
| Collagenase<br>[4] | <i>Aspergillus oryzae</i>          | Hemoglobin, peptide tổng hợp, N-acetyl Tyrosine ethylester, gelatin, collagen nguyên thuỷ (chế biến từ da dưới dạng nhầy) | MW: 20,000<br><br>Hoạt động không cần Ion kim loại. PH tối ưu là 9-10.                                        |
| Collagenase<br>[4] | Tadpole, <i>Rana catesbiana</i>    | collagen (chế biến từ da dưới dạng nhầy), gelatin, peptide tổng hợp                                                       | pH tối ưu, 8-9<br><br>Cần có mặt Ion Ca;<br><br>Bị ức chế bởi EDTA, cystein,                                  |

|                    |                                                                                           |                                                                                                                 |                                                                 |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|                    |                                                                                           |                                                                                                                 | serum                                                           |
| Collagenase<br>[4] | Từ mô nguyên bào sợi của chuột và của các tế bào Hela                                     | Được phân tích bằng sự thủy phân peptide; PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg.OH tạo màu vàng                              |                                                                 |
| Collagenase<br>[4] | Bạch cầu hạt ở người, mô nguyên thủy                                                      | Collagen nguyên thủy (chế biến từ da dưới dạng nhầy); C- peptide giải phóng từ gel                              | pH = 7,6<br><br>Chất ức chế EDTA, cysteine                      |
| Collagenase<br>[4] | Mô biểu bì ở người                                                                        | Collagen nguyên thủy (chế biến từ da dưới dạng nhầy); C- peptide giải phóng từ gel; phân tích sự ức chế của gel | pH = 7-8<br><br>Chất ức chế; EDTA, cysteine, huyết thanh người  |
| Collagenase<br>[4] | Từ các mô xương của người, dê, chuột                                                      | Collagen nguyên thủy (chế biến từ da dưới dạng nhầy); C- peptide giải phóng từ gel                              | pH = 7-9, cần $\text{Ca}^{2+}$<br><br>Chất ức chế EDTA, cystein |
| Collagenase<br>[4] | Từ mô viêm màng hoạt dịch dạng khớp của người                                             | Collagen nguyên thủy (chế biến từ da dưới dạng nhầy), $^{14}\text{C}$ - peptide giải phóng từ gel               | pH= 7,6;<br><br>Chất ức chế EDTA và huyết thanh người           |
| Collagenase<br>[4] | Từ dạ con của chuột, mô bì bị bệnh của người, vết thương đang lên da non, từ mô xương của | Collagen nguyên thủy (chế biến từ da dưới dạng nhầy); sự ức chế gel.                                            |                                                                 |

|                    |                                                         |                                             |  |
|--------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--|
|                    | chuột đang<br>lớn, chỗ viêm<br>lợi ở người, ..          |                                             |  |
| Collagenase<br>[4] | Từ tuyến gan<br>tụy của <i>Uca</i><br><i>pugillator</i> | Collagen (chế biến từ da<br>dưới dạng nhầy) |  |

### 2.1.2. Những ứng dụng của collagenase

Collagenase là một enzyme đặc biệt, xúc tác quá trình thủy phân, phân cắt collagen tự nhiên và collagen đã bị biến tính. Collagenase được sử dụng với nhiều mục đích khác nhau, trong các nghiên cứu cơ bản cũng như trong nghiên cứu ứng dụng thực tế về hoá sinh, y tế, công nghiệp dược, công nghiệp thực phẩm thuộc da. [2].. Collagenase có mặt trong động vật, người và trong khá nhiều loài vi khuẩn[9].

#### - Phân tách mô tế bào

Collagenase có tầm quan trọng đặc biệt khi phân tách các mô quá nhiều sợi, (thớ) hoặc quá nhạy cảm cho phép sử dụng trypsin, chất mà không ảnh hưởng lên các vật liệu sợi và phá huỷ các vật liệu không bền. Sự phân tách thường được thực hiện hoặc bằng cách ngâm toàn bộ cơ quan hoặc bằng cách ủ một mẫu nhỏ của mô cùng với enzyme hoà tan. Collagenase đã được ứng dụng thành công cho việc phân lập rộng rãi và đa dạng của các loại tế bào.

#### - Phân tách các tế bào đảo Langerhan của tuyến tụy

Collagenase ứng dụng quan trọng trong sự phân lập các tế bào đảo Langerhan của tuyến tụy khi trong đảo có nhiều tế bào khác nhau đặc biệt. Trong quá trình này có một số nhân tố giới hạn sự thành công của phương pháp bao gồm những sự khác nhau đáng kể trong việc chuẩn bị cho collagenase hoạt động, các nhân tố gây độc cho tế bào  $\beta$ -cell, và tác dụng của collagenase lên tính di truyền miễn dịch và các đặc tính động học của các tế bào đảo.

#### - Phân lập các tế bào cơ tim

Collagenase cũng được sử dụng trong việc phân lập các tế bào cơ tim. Sự phân tách các mô được tiến hành bằng cách ngâm nguyên vẹn cơ quan trong dung dịch enzyme, trong đó collagenase được chọn lựa hoặc một mình hoặc được kết hợp với một enzyme khác chẳng hạn hyaluronidase hoặc trypsin. Collagenase có thể được sử dụng khi phân tách một cách hoàn toàn bằng cách ngâm một mẫu mô nhỏ vào dịch enzyme.

#### **- Phân lập các tế bào gan**

Các tế bào gan được phân lập sử dụng trong các nghiên cứu các tế bào thúc đẩy sự phát triển của khối u, trong nghiên cứu các cơ chế điều khiển tế bào, trong dược phẩm và các hệ thống phân tích chất gây ung thư.

Thêm vào đó, phân lập các tế bào gan cho cấy ghép đang được sử dụng như là một mô hình điều trị cho các bệnh nhân bị hỏng chức năng gan hoặc bị sai lệch cơ chế trao đổi phụ thuộc vào gan.

#### **- Phân lập các tế bào của khối u**

Toàn bộ các dạng tế bào khối u cần phải được phân lập để nghiên cứu từ các mô ung thư nhằm mục đích tạo vaccin để phòng chống ung thư.

#### **- Chẩn đoán các tế bào ung thư phổi**

Sự tăng collagenase hoạt động trong đại thực bào phân lập từ cuống phổi là một dấu chuẩn để chẩn đoán các tế bào ung thư phổi[10].

#### **- Phân lập tế bào từ các mô khác**

Collagenase được ứng dụng thành công trong việc phân lập các tế bào từ mô xương, mô sụn, tuyến giáp trạng, mô buồng trứng, mô dạ con, mô biểu bì, màng trong của tế bào, các tế bào thần kinh và các tế bào khác.

## **2.2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.2.1. Vật liệu**

#### **\* Các chủng vi sinh vật và plasmid**



- Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 lac U169 (phi80 lacZM15)*] được sử dụng làm thể nhận trong thí nghiệm biến nạp, nhân và giữ ngân hàng gen của *B. subtilis* FS-2 trong plasmid.
- Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* FS-2 mang gen mã hoá collagenase do Viện Công nghệ Sinh học – Đại học Bách khoa cung cấp
- Plasmid pUC 18 (2686bp) dùng để tách dòng các đoạn gen của genom *B. subtilis* FS-2.

## **2.2.2. Phương pháp**

### **2.2.2.1. Tách chiết ADN hệ gen của *Bacillus subtilis* FS-2**

- Nuôi cấy lắc một khuẩn lạc chủng *B. subtilis* FS-2 trong 10 ml môi trường YPD ở 30°C, 200 vòng/phút để qua đêm.
- Ly tâm dịch nuôi cấy 5000 vòng/phút trong 5 phút. Bỏ dịch nổi thu lấy tế bào.
- Bổ sung 1 ml dung dịch SE, lắc đều cho tan tế bào.
- Ly tâm thu tế bào 5000 vòng/phút, 5 phút.
- Hoà lại tế bào trong 0,4 ml TE
- Bổ sung 0, 1ml lysozyme (2mg/ml) vào dịch tế bào chọn đều ủ ở 37°C, 1 giờ.
- Bổ sung 10  $\mu$ l proteinaza K, ủ 80°C, 1 giờ.
- Bổ sung 600 $\mu$ l phenol/chloroform, lắc đều bằng máy vortex để loại protein.
- Ly tâm hỗn dịch 13000 vòng/phút trong 5 phút. Dùng pippet hút lấy pha trên.
- Bổ sung 600  $\mu$ l chloroform/isoamylalcohol (24:1 v/v), lắc đều bằng máy Vortex.
- Ly tâm hỗn dịch 14000 vòng/phút, trong 10phút. Hút lấy pha trên.
- Bổ sung 50  $\mu$ l Na-acetat 3M và 1ml cồn tuyệt đối để lạnh trộn đều và ủ hỗn dịch ở – 20°C trong 1 giờ.
- Ly tâm 14000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ phần dịch nổi thu ADN kết tủa ở đáy ống ly tâm.

- Rửa lại ADN bằng 0,5 ml cồn 70%. Ly tâm 14000 vòng/phút trong 10 phút, bỏ phần dịch nổi và ADN được làm khô sạch cồn bằng máy Speed Vac.
- Hòa tan ADN trong 50µl nước vô trùng.

#### 2.2.2.2. Xử lý ADN bằng enzyme giới hạn

Phản ứng cắt được tiến hành với tổng thể tích phản ứng 10 $\mu$ l với thành phần như sau:

- |                          |      |
|--------------------------|------|
| - đệm 10 lần thích hợp   | 1 μl |
| - ADN (~ 1μg)            | 2 μl |
| - Enzyme giới hạn        | 1 μl |
| - Nước khử ion vô trùng. | 6 μl |

Hỗn hợp phản ứng được trộn đều, ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp của enzyme, thường ở 37°C trong 120 phút. Sản phẩm phản ứng cắt được kiểm tra trên gel điện di agarosa 0,8%.

### 2.2.2.3. Phản ứng nối ghép gien

Các đoạn ADN cần nối ghép và ADN vectơ được trộn lẫn với nhau theo tỷ lệ 3:1 (về số mol). T4 ADN ligaza được cho vào phản ứng với nồng độ 1 đơn vị / 2μg ADN.

\* Thành phần phản ứng như sau:

- |                                                    |       |
|----------------------------------------------------|-------|
| - Đệm 10 lần cho T4 ADN ligaza                     | 2 μl  |
| - T4 ADN ligaza 4U/μl                              | 1 μl  |
| - Dung dịch BSA 2mg/ml                             | 2 μl  |
| - H <sub>2</sub> O khử ion + ADN tham gia phản ứng | 15 μl |

+ Hỗn hợp phản ứng được ủ qua đêm ở 16°C.

## 2.3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 2.3.1. Tách chiết ADN hệ gien của chủng *B. subtilis*

Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy huyền phù qua đêm ở giai đoạn ổn định. Sau đó ly tâm thu tế bào, rửa tế bào bằng đệm TE. Màng tế bào *B. subtilis* được phá vỡ bằng lysozyme. Sau một thời gian ủ ở 37°C lớp màng ngoài tế bào nhanh chóng bị phá huỷ. ADN hệ gien và các chất nội bào được giải phóng ra khỏi tế bào. EDTA và proteinaza K làm bất hoạt, phá huỷ những protein không có lợi cho quá trình tách chiết ADN. Phenol/chloroform có tác dụng làm sạch những mảnh vỡ và các protein đã bị biến tính có trong mẫu. ADN hệ gien không bị biến tính và được rửa bằng cồn tuyệt đối. Kết quả tách chiết và làm sạch ADN hệ gien được kiểm tra trên gel điện di agarosa 0,8%.

### 2.3.2. Thiết lập ngân hàng gien của *B. subtilis* FS -2

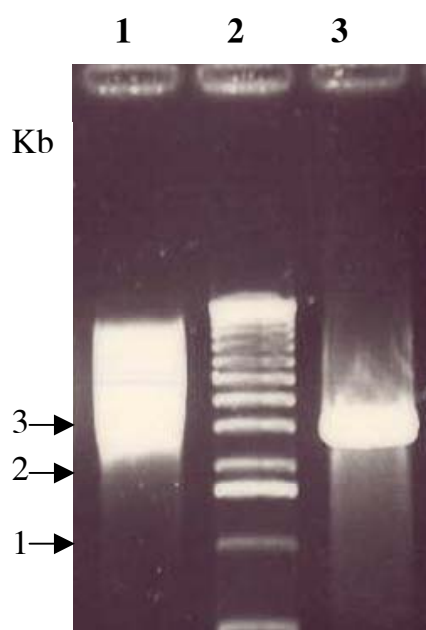
#### 2.3.2.1. Thiết kế vectơ pUC 18 mang các đoạn gien của *Bacillus subtilis* FS-2

##### 2.3.2.1.1. Xử lý vectơ pUC 18 bằng *Bam*HI

Hỗn hợp phản ứng ADN plasmid và enzyme sau khi trộn được ủ ở 37°C trong hai giờ để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Sau phản ứng sản phẩm ADN plasmid được cho qua cột để tinh sạch ADN nhằm loại bỏ những mẫu vụn, hoá chất thừa (Hình ...).

##### 2.3.2.1.2. Xử lý ADN genom bằng enzyme *Sau*3AI

AND hệ gien của *B. subtilis* được cắt bằng enzyme *Sau*3AI sao cho các đoạn gien được cắt ra có chiều dài 3-8 Kb là nhiều nhất. Sau đó, những đoạn gien có chiều dài 3-8 Kb này được tinh sạch lại qua cột sắc ký ái lực và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0.8% (Hình 9).



#### **2.3.2.1.3. Đưa các đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 vào pUC18**

Các đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 có kích thước 3-8 Kb được nối với pUC18 bằng AND ligaza. Phản ứng nối ghép các đoạn được tiến hành ở nhiệt độ 16 °C. Sau đó sản phẩm nối ghép gen được biến nạp vào *E. coli* DH5α để kiểm tra đồng thời để giữ lại các dòng gen dùng cho việc sàng lọc chọn ra dòng mang gen mã hoá collagenase. Để có được hiệu suất biến nạp cao, chúng tôi đã sử dụng phương pháp xung điện để biến nạp. Sản phẩm biến nạp được cấy trải trên môi trường trường LB có chứa Amp , IPTG và Xgal.

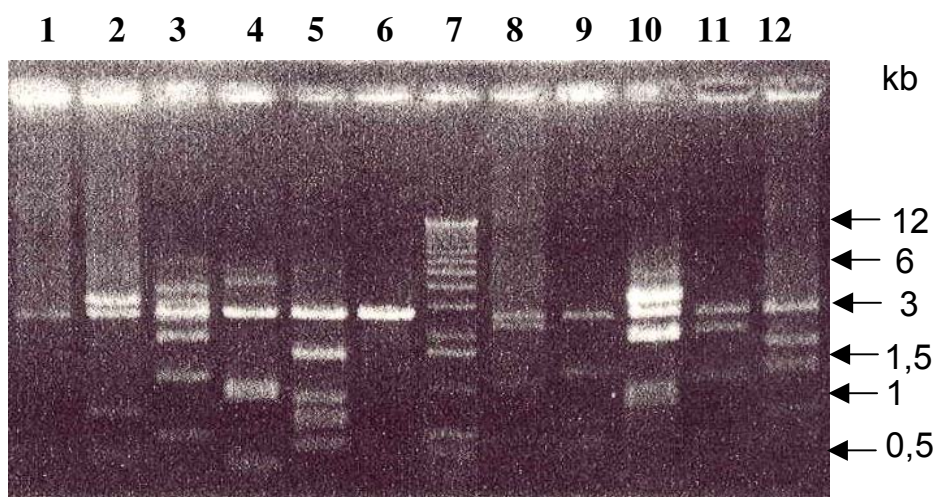
#### **2.3.2.2. Kiểm tra chất lượng ngân hàng gen**

Để kiểm tra chất lượng ngân hàng gen, chúng tôi đã tách plasmid từ các dòng biến nạp khác nhau để kiểm tra tỷ lệ các dòng mang đoạn gen của *B. subtilis* được chèn vào và kích thước của đoạn chèn.

Chọn ngẫu nhiên một số khuẩn lạc trắng và khuẩn lạc xanh nuôi trong môi trường lỏng LB + Amp qua đêm ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Thu tế bào từ môi trường nuôi cấy, rửa tế bào bằng dung dịch đệm glucoza, EDTA để tạo nối các cation  $Mg^{++}$  và  $Ca^{++}$  cần cho sự ổn định màng tế bào. Để phá tế bào chúng tôi dùng dung dịch II NaOH và SDS. Dưới tác dụng của SDS các thành phần photpholipit và protein của màng tế bào bị hoà tan. Màng tế bào bị vỡ ra, NaOH làm biến tính cả ADN plasmid và ADN nhiễm sắc thể thành sợi đơn. Các vòng sợi đơn plasmid vẫn dính với nhau. Lúc này, trong tế bào chỉ còn hai loại ADN nhiễm sắc thể và ADN plasmid. Sau đó, Kali axetat và axit acetic được bổ sung vào dung dịch. Lúc này trong dung dịch xuất hiện tủa không tan của SDS/lipit/ protein và pH trở về trung tính. Tại pH trung tính các ADN phục hồi trở lại. Vì ADN nhiễm sắc thể rất dài nên nó chỉ hồi tính một phần nên sẽ bị mắc vào tủa SDS/ lipit/ protein khi ly tâm. Còn ADN plasmid được phục hồi hoàn toàn thành mạch kép và hoà trở lại vào dịch nổi không bị dính

theo tủa. Bước tiếp theo ly tâm thu pha dịch nổi ở trên trong đó có ADN plasmid và một ít ARN. Từ đây ta có thể thu nhận ADN plasmid bằng cách tủa cồn 70% etanol tuyệt đối trong lạnh. Phần tủa được làm khô hoà vào 50 µl TE đệm có bổ sung ARNaza ở 37°C trong 1 giờ nhằm loại sạch ARN còn sót lại. Kiểm tra sản phẩm tách trên gel điện di agarose 0,8%. Kết quả chúng tôi thu được các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc màu trắng có khối lượng lớn hơn các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc màu xanh và đối chứng. Điều đó chứng tỏ rằng tất cả các dòng khuẩn lạc màu trắng đã có các đoạn gen chèn vào và chúng tôi có thể kết luận rằng chất lượng của ngân hàng gen được tạo ra là tốt. Tuy nhiên để chắc chắn hơn nữa chúng tôi xử lý các plasmid tách từ các thể biến nạp bằng các enzyme hạn chế để kiểm tra kích thước của đoạn gen được chèn vào vectơ.

Các plasmid được cắt kiểm tra bằng hai enzyme hạn chế *EcoRI* và *HindIII*. Sản phẩm sau phản ứng cắt được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.



**Hình 10: Sản phẩm cắt ADN plasmid tách từ ngân hàng gen *B. subtilis* bằng hai enzyme hạn chế *Hind III* và *EcoR I* trên gel agarose 0.8%**

**Đ/C 1, 6: pUC 18**

**Đ/C 2-5, 8-12: ADN plasmid tách từ khuẩn lạc trắng**

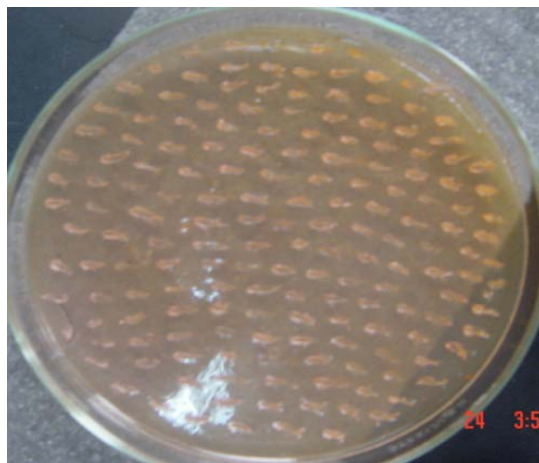
**Đ/C 7: Thang ADN chuẩn**

Kết quả điện di trên hình 10 cho ta thấy sau khi các ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc màu trắng thấy văng ra các đoạn ADN ngẫu nhiên khác nhau. Từ kết quả kiểm tra này cho phép kết luận rằng chúng tôi đã tạo được ngân hàng gen của *B. subtilis* FS-2 trong *E. coli* DH5α.

### 2.3.3. Sàng lọc gien mã hoá collagenase từ ngân hàng gien

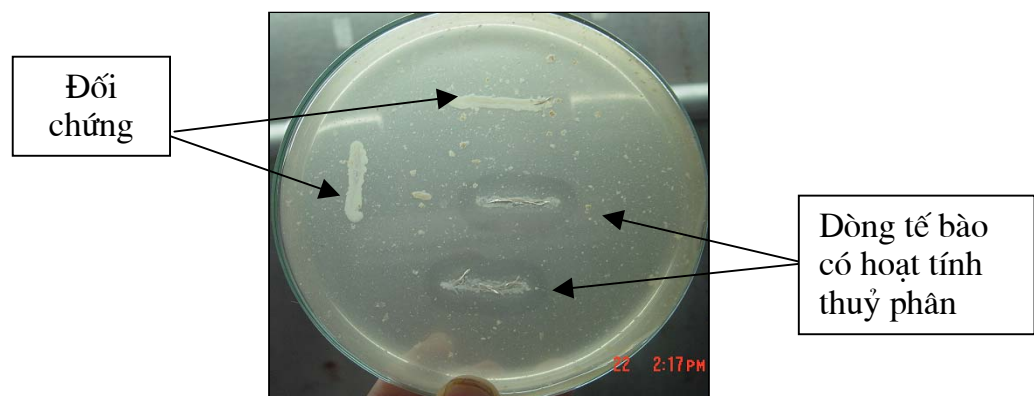
#### 2.3.3.1. Sàng lọc dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp có khả năng thủy phân collagen

Để chọn sơ bộ được đúng thể biến nạp chứa vectơ pUC18 mang gien tái tổ hợp có khả năng thủy phân collagen, chúng tôi tiến hành cấy vạch riêng từng khuẩn lạc lên môi trường thạch đĩa có bổ sung 0,3% collagen không tan. Các khuẩn lạc cấy vạch lên đĩa (300 khuẩn lạc/ đĩa) được ủ ở 30<sup>0</sup>C qua đêm. Đưa các đĩa ủ qua đêm đặt trong tủ lạnh 2 ngày sau đó đưa ra quan sát. Những dòng có khả năng thủy phân collagen thì xung quanh khuẩn lạc sẽ xuất hiện vòng thủy phân trong và khá rõ. Chúng tôi chọn dòng có hoạt tính thủy phân collagen để nghiên cứu tiếp.



**Hình 11:** Các thể biến nạp trên môi trường thạch đĩa chứa collagen 0,3%

Sau khi sàng lọc gần mười ngàn dòng tế bào tái tổ hợp, chúng tôi đã chọn ra được dòng có khả năng thủy phân collagen (Hình 12).



**Hình 12:** Dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp có khả năng thủy phân

Từ đĩa cấy chuyển ta thấy dòng đối chứng: *E. coli* DH5 $\alpha$  + pUC 18 không có vòng thủy phân. Dòng *E. coli* DH5 $\alpha$  + pUC 18 + đoạn gen ngoại lai của *B. subtilis* FS-2 xuất hiện vòng thủy phân khá rõ. Chúng tôi chọn dòng tế bào này để nghiên cứu tiếp.

### **2.3.3.2. Kiểm tra đoạn gen được chèn trong plasmid của thể biến nạp có hoạt tính thủy phân collagen**

Chúng tôi tiến hành tách plasmid của dòng tế bào có khả năng thủy phân collagen. Plasmid sau đó được kiểm tra trên gel agarose 0.8%. Như được chỉ ra trên hình 13, plasmid được tách từ dòng có khả năng thủy phân collagen có kích thước cao hơn rất nhiều so với pUC18. Như vậy plasmid trong dòng có khả năng thủy phân collagen chắc chắn chứa một đoạn gen mã hoá cho enzyme phân cắt collagen. Chúng tôi đặt tên cho plasmid này là pUCCol.



**Hình 13: Plasmid tách từ dòng biến nạp có khả năng thủy phân collagen trên gel agarose 0.8%**

**Đường chạy 1: ADN plasmid tách từ dòng biến nạp có hoạt tính thủy phân**

**Đường chạy 2: pUC18**

Để kiểm tra đoạn gen được chèn trong pUCCol mang gen mã hoá cho collagenaza, chúng tôi đã tách lại plasmid này và biến nạp lại vào trong tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$ . Thể biến nạp được

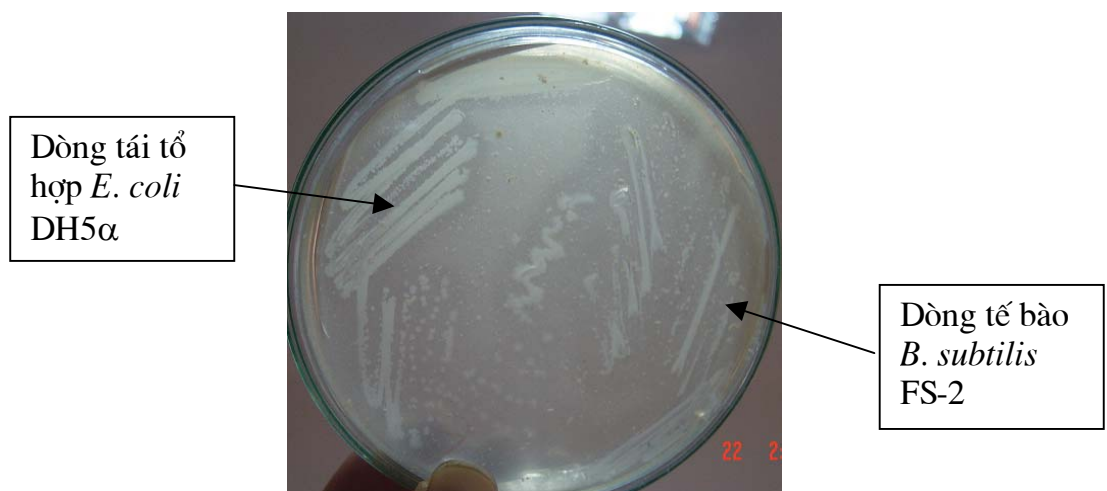
trải trên đĩa chứa collagen. Kết quả (Hình 14) cho thấy 100% các dòng tế bào biến nạp lại có khả năng thuỷ phân collagen.



**Hình 14: 100% dòng biến nạp lần 2 đều có hoạt tính thuỷ phân collagen**

#### **2.3.3.3. So sánh hoạt tính collagenase giữa dòng tái tổ hợp với chủng gốc *B. subtilis* FS-2**

*E. coli* tái tổ hợp mang pUCCol và *B. subtilis* FS-2 được cấy rìa trên môi trường LB có chứa collagen. Cả hai dòng tế bào đều có khả năng thuỷ collagen tương đương nhau (Hình 15).



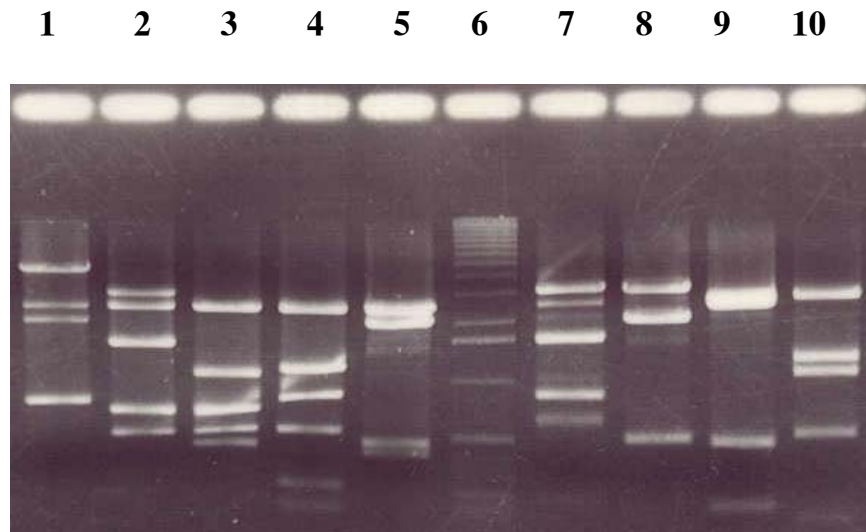
**Hình 15: Hoạt tính collagenase của dòng *E. coli* tái tổ hợp và của chủng gốc**

#### **2.3.4. Nguyên nhân đoạn gen chưa gen mã hoá collagenase trong pUCCol**

Đoạn gen của *B. subtilis* FS-2 được chèn vào trong pUCCol là khá lớn nên không thể đọc trình tự trực tiếp đoạn gen từ pUCCol được. Vì vậy, để tìm hiểu sâu về đoạn gen đó và định ra được vùng gen mã hoá cho collagenase, trước hết chúng tôi phải lập sơ đồ của một số



enzyme hạn chế trên đoạn gen. PUCCol được cắt bằng nhiều enzyme hạn chế khác nhau *Kpn* I, *Hind* III; *Hinc* II, *Kpn* I; *Sma* I, *Hinc* II; *EcoR* I, *Hind* III; *Sma* I, *Hind* III; *Nco* I, *Hind* III; *Sma* I, *Nco* I; *Nde* I, *Sma* I; *Eco R* I, *Pst* (Hình 16) và từ kết quả này chúng tôi đã lập được sơ bộ một số enzyme hạn chế trên đoạn gen (Hình 18).



**Hình 16. Kết quả xử lý ADN plasmid bằng các enzyme**

**Đường chạy 1 : ADN plasmid xử lý bằng *Kpn* I, *Hind* III**

**Đường chạy 2 : ADN plasmid xử lý bằng *Kpn* I, *Hinc* II**

**Đường chạy 3 : ADN plasmid xử lý bằng *Sma* I, *Hinc* II**

**Đường chạy 4 : ADN plasmid xử lý bằng *EcoR* I, *Hind* III**

**Đường chạy 5 : ADN plasmid xử lý bằng *Sma* I, *Hind* III**

**Đường chạy 6 : Thang ADN chuẩn**

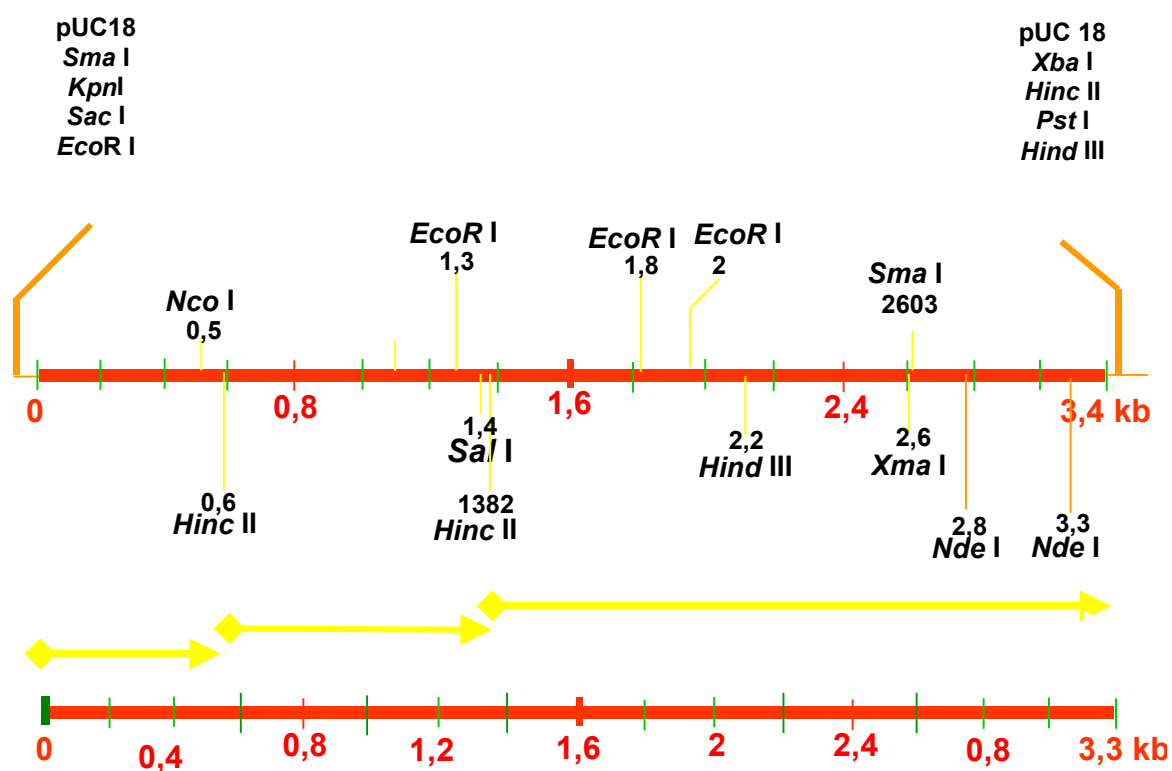
**Đường chạy 7 : ADN plasmid xử lý bằng *Nco* I, *HinIII*Đ/C**

**Đường chạy 8 : ADN plasmid xử lý bằng *Sma* I, *Nco* I**

**Đường chạy 9 : ADN plasmid xử lý bằng *Nde* I, *Sma* I**

**Đường chạy 10: ADN plasmid xử lý bằng *Eco R* I, *Pst* I**

Hình 17: sơ đồ enzyme hạn chế



Từ sơ đồ enzyme hạn chế, chúng tôi đã tách dòng các đoạn nhỏ của đoạn gen này và tiến hành đọc trình tự gen.

## 2.4. KẾT LUẬN

1. Đã thiết lập được ngân hàng genom của chủng *B. subtilis* trong *E. coli* DH5α
2. Đã sàng lọc từ ngân hàng genom được dòng mang gen mã hoá cho enzyme thuỷ phân collagen của *B. subtilis* FS - 2.
3. Đã đọc trình tự của đoạn gen trong pUCCol

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bryan A. Moore, Sadie Aznavoorian, Jeffrey A. Engler, and L. Jack Windsor, 2000  
“*Induction of collagenase-3 (MMP-13) in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*”.
2. Hiroko Nagano and Kim Anh To “*Purification of collagenase and Specificity of its Related Enzyme from Bacillus subtilis FS-2*” Bioci. Biotechnol. Biochem., 182-183, 2000
3. Joseph Merkel and Joseph H. Dreisbach “*Purification and Characterization of a Marine Bacterial Collagenase*” Biochemistry, 1978, 17 (14)
4. Methods in enzymeology, 1982, vol.28
5. Michael D. bond and Harold E. Van Wart “*characterization of the individual Collagenase from Clostridium*”
7. Kuniko Yoshihara, Osamu Matsushita, Junzaburo Minami, and Akinobu Okabe, 1994 “*Cloning and Nucleotide Sequence Anlysis of the ColH Giene from Clostridium histolyticum Encoding a collagenase and a Gelatinase*”
8. Osamo Masushita, Kuniko Yoshihara, Sei-ichi Katayama, Jujaburo Minami, and Akinobu Okabe, “*Purification and characterization of a Clostridium perfringens 120-Kilodalton collagenase and Nucleotide Sequence of the Corresponding Gene*” Jounal of Bacteriology, Jan. 1994, p. 149-156
9. M. Walid Qouronfleh, T. F. Ho, P. G. Brake, T. M. Banks , T. A. Pulvino, R. C. Wahl, J. Eshrraghi, S. K. Chowdhury, R. B. Ciccarelli, B. N. Jones. “*productin of selenomethionune-labeled recombinant human neutrophil collagenase in Escherichia coli*” Jounal of Biotechnology 39 (1995) p 119-128

10. Yhakoda, Y Ito, A Nagate, K Utssumi, M Aoshima and K Ohyashiki, 2002, “*Increased collagenase activity in maccrophages From bronchial lavage as a diagnostic marker if non-small cell lung cancer.*”
11. Yoshikiyo Sasagawa, Kazuo Izaki, Yuko Matsubara, Koki Suzuki, Hisao Kofima and Yoshiyuki Kamio. 1995 “*Molecular cloning and Sequence analysis of the giene encoding the collagenase from Cytophage sp. L43-1 strain*”
12. Hiroaki Takeuchi, Yuji Shibano, Kazuyuki Morihara, Jun Fukushima, Sumako Inami, Borivoj Keil, Anne-marie Gilles, Susumu Kawamoto and Kenji Okuda. “*Structural giene and complete amino acid sequence of Vibrio alginolyticus collagenase*” Biochem. J. (1992) 281 703-708
13. Osamu Matsushita, Chang-Min Jung, Junzaburo Minami, Seiichi Katayama, Nozomu Nishi, and Akinobu Okabe. “*A study of the collagen – binding Domain of a 116 – kDa clostridium histolycum collagenase*” J Bio Chem, Vol.273, 1998.