

## BIỂU HIỆN GEN LACCASE CỦA *CERRENA UNICOLOR* ĐÃ ĐƯỢC CẢI BIẾN MÃ DI TRUYỀN TRONG NẤM MEN *PICHIA PASTORIS*

Nguyễn Thanh Ngọc, Lê Phương Hoàng Anh, Lê Thị Thu Hồng, Vũ Văn Lợi, Phạm Thị Bích Hợp, Trương Nam Hải

Viện Công nghệ sinh học

### TÓM TẮT

Đề đạt được mức độ biểu hiện cao của laccase trong nấm men *P. pastoris*, trình tự mã hóa cho laccase 1 từ *C. unicolor* đã được tổng hợp nhân tạo và được tối ưu hóa một loạt các thông số về mã bộ ba phù hợp, thành phần GC, cấu trúc bậc 2 của mRNA cũng như các vị trí cis-acting. Bằng cách này, chúng tôi đã làm tăng chỉ số phù hợp mã bộ ba từ 0,69 lên 0,91. Chỉ số đạt 0,91 được xác định là rất tốt để biểu hiện protein ngoại lai cao trong nấm men. Hơn nữa, thành phần GC trung bình và vùng đỉnh GC không mong muốn cũng đã được tối ưu để kéo dài thời gian bán hủy của mRNA. Cấu trúc loop ảnh hưởng đến khả năng bám của ribosome và tinh bên của mRNA đã được loại bỏ. Thêm vào đó, quá trình tối ưu cũng đã sàng lọc và biến đổi thành công các vị trí cis-acting âm tính. Trình tự gen sau cải biến khác với trình tự ban đầu là 23%. Gen cải biến được tổng hợp nhân tạo với kích thước khoảng 1,5 kb được nhân dòng trong vector pPIC9 và được biểu hiện trong chủng nấm men *P. pastoris* SMD1168 dưới sự điều khiển của promoter AOX1. Trong môi trường lên men BMMY, laccase tái tổ hợp đã được tiết hoàn toàn ra ngoài môi trường với kích thước phân tử ước tính khoảng 55 kDa, tuy nhiên nó bị phân cắt một phần bởi các protease của tế bào nấm men. Hoạt tính cao nhất của laccase tái tổ hợp sau 3 ngày lên men cảm ứng trong bình tam giác với cơ chất syringaldazine đạt 743,58 nkat/l.

**Từ khóa:** *Cerrena unicolor*, Laccase tái tổ hợp, *Pichia pastoris*, Syringaldazine, tối ưu mã di truyền

### MỞ ĐẦU

Laccase (EC 1.10.3.2) là enzyme oxy hóa xúc tác quá trình oxy hóa các chất phenol và các amin thơm. Phổ cơ chất hoạt động xúc tác của laccase rất rộng và có thể mở rộng đáng kể khi có mặt của chất trung gian phù hợp. Do đó, laccase được xem như là một trong những loại enzyme có giá trị trong các ứng dụng công nghiệp cũng như công nghệ sinh học, đặc biệt trong ngành công nghiệp giấy, xử lý ô nhiễm môi trường (Abadulla *et al.*, 2000; Freire *et al.*, 2002; Mayer, Staples, 2002; Herrera, 2006).

Trong tự nhiên, laccase phân bố rộng rãi ở nhiều loài thực vật, nấm và vi khuẩn. Trong đó, laccase của các loại nấm mà đặc biệt là các chủng nấm mục trắng có khả năng phân giải lignin hiệu quả nhất (Claus, 2004). Tuy nhiên, mức độ sản xuất laccase từ các chủng này thường quá thấp để sử dụng trong công nghiệp. Để tăng sản lượng laccase sản xuất từ các chủng tự nhiên, trong môi trường nuôi cấy chúng thường phải bổ sung chất cảm ứng như là các chất có bản chất phenol (Xiao *et al.*, 2003). Tuy nhiên, việc sử dụng các chất cảm ứng này sẽ làm tăng giá thành sản phẩm cũng như gây ô nhiễm môi trường. Hơn nữa, các chủng nấm mục trắng thường biểu hiện nhiều gen laccase mã hóa các isozyme với cấu trúc

bậc 1 có độ tương đồng cao nhưng tính chất hóa lý khác nhau. Hỗn hợp này sẽ gây nên sự khó khăn để tinh sạch từng enzyme cho nghiên cứu và ứng dụng. Vì vậy, việc tạo laccase tái tổ hợp đang được quan tâm. Nhiều gen laccase đã được biểu hiện trong vi khuẩn, nấm men (Bulter *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2006). Sự biểu hiện protein ngoại lai không chỉ làm tăng lượng enzyme được tạo ra mà còn cho phép tạo ra những đột biến phù hợp cho các mục đích ứng dụng trong lĩnh vực công nghệ sinh học.

*Pichia pastoris* thuận lợi cho biểu hiện protein ngoại lai do khả năng biểu hiện cao, khả năng tiết protein ngoại bào hiệu quả, có quá trình biến đổi sau dịch mã và sinh trưởng mạnh trên môi trường rẻ tiền (Romanos *et al.*, 1992; Cregg *et al.*, 1993). Thêm vào đó, các thao tác di truyền phân tử của *P. pastoris* nhanh, đơn giản và dễ dàng thu nhận protein ngoại lai. Tuy nhiên, khi biểu hiện các protein tái tổ hợp không phải từ nấm men thì các bộ ba của gen mã hóa cho các protein này có thể không phù hợp trong *P. pastoris*. Các bộ ba này thường phổ biến trong một số loài mã hiếm trong nấm men *P. pastoris* và vì vậy sự biểu hiện protein ngoại lai có thể bị hạn chế. Việc tối ưu mã bộ ba được xem như là một kỹ thuật có giá trị để làm tăng mức độ biểu hiện protein (Outchkourov *et al.*, 2002). Có nhiều nghiên cứu đã

thành công trong việc tối ưu bộ ba mã hiếm đã làm tăng sự biểu hiện protein ngoại lai trong *P. pastoris* (Xiong *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2010). Trong bài báo này, chúng tôi thông báo kết quả biểu hiện gen đã cải biến mã bộ ba mã hóa cho laccase từ chủng *Cerrena unicolor* trong chủng nấm men *P. pastoris*.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng *E. coli* DH10B [F' *endA1 recA1 galE15 galK16 mupG rpsL ΔlacX74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara.leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ*] của hãng Invitrogen được sử dụng để chọn dòng và nhân dòng gen. Chủng nấm men *P. pastoris* SMD1168 [*his4, pep4*] của hãng Invitrogen được sử dụng làm chủng biểu hiện gen. Plasmid pPIC9 của hãng Invitrogen được sử dụng làm vector biểu hiện gen trong tế bào nấm men. Gen mã hóa cho laccase của *C. unicolor* được tổng hợp nhân tạo và đã được biến đổi mã bộ ba phù hợp cho biểu hiện protein laccase trong nấm men *P. pastoris* (ký hiệu *mlac1*). Gen này được tổng hợp bởi công ty GenScript, Mỹ.

### Thiết kế vector biểu hiện gen

Gen *mlac1* được tổng hợp nhân tạo có gắn thêm trình tự nhận biết của cặp enzyme hạn chế *EcoRI* và *NotI* ở các đầu 5' và 3' tương ứng. Sau khi được tổng hợp gen này được tách dòng trong vector pUC57 tại vị trí nhận biết của enzyme hạn chế *EcoRV*. Đoạn gen *mlac1* từ vector pUC $mlac1$  được thu lại bằng sử dụng hai enzyme *EcoRI* và *NotI* để cắt. Đoạn gen này được nối với pPIC9 đã được cắt bằng hai enzyme *EcoRI* và *NotI* để tạo thành vector biểu hiện gen.

### Tạo chủng *P. pastoris* SMD1168 biểu hiện gen *mlac1*

Phương pháp tạo chủng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp được tiến hành theo mô tả của Lê Thị Thu Hồng và đồng tác giả (2006). Kiểm tra sự có mặt của gen *mlac1* trong hệ gen của các dòng nấm men biến nạp được tiến hành bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 5'AOX1 và 3'AOX1 có trình tự như sau: 5'AOX1: 5'gacttgcttccaattgacaagc 3'; 3'AOX1: 5'gcaaatgcca tcttgacatc 3'. Chương trình PCR được tiến hành theo các bước như sau: đầu tiên biến tính DNA khuôn trong vòng 2 phút ở 94°C, tiếp đến 25 chu kỳ nhiệt, mỗi chu kỳ gồm 3 bước: (i) Biến tính sợi DNA khuôn ở 94°C trong 1 phút; (ii) Mồi bắt cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 55°C trong 1 phút; (iii) Tổng hợp, kéo dài chuỗi ở

72°C trong 1 phút 30 giây. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 10 phút để tạo sợi DNA hoàn chỉnh và ủ mẫu ở 4°C.

### Biểu hiện gen *mlac1* trong nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp

Chủng nấm men tái tổ hợp được nuôi cấy trên đĩa môi trường MD để làm tươi tế bào. Khuẩn lạc từ đĩa môi trường MD được cấy vào 2 ml môi trường BMGY và nuôi qua đêm ở 30°C, lắc 250 vòng/phút. Dịch nuôi cấy qua đêm được chuyển sang môi trường BMGY mới và tiếp tục nuôi khoảng 16 giờ để OD<sub>600nm</sub> đạt trong khoảng 15. Cầm ứng bằng methanol ở nồng độ 2% và cứ sau 24 giờ lại cầm ứng bằng methanol. Protein được tiết ra trong môi trường nuôi cấy sau 2 và 3 ngày cầm ứng bằng methanol được thu lại bằng ly tâm 5000 vòng/ phút trong 10 phút. Protein tiết ngoại bào được kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và phát hiện bằng phương pháp nhuộm bạc (Bloom *et al.*, 1987).

### Xác định hoạt tính laccase

Hoạt tính của laccase trong dịch protein tiết ngoại bào được xác định dựa trên sự oxy hoá cơ chất syringaldazine trong đệm citrate-phosphate thành sản phẩm oxy hoá hấp thụ mạnh ở bước sóng 525 nm theo phương pháp của Cho và đồng tác giả (2008).

## KẾT QUẢ

### Tối ưu trình tự gen mã hóa laccase của *C. unicolor*

Một trong những phương pháp nhằm nâng cao hiệu quả biểu hiện protein ngoại lai là thay đổi trình tự mã bộ ba của gen mã hóa để phù hợp với hệ thống biểu hiện của vật chủ. Quá trình tổng hợp protein từ mRNA sẽ thuận lợi nếu mỗi mã bộ ba trên mRNA có nhiều tARN vận chuyển tương ứng trong tế bào vật chủ. Trong các hệ thống sống, số lượng các loại tARN vận chuyển các loại axit amin của các loài khác nhau là khác nhau. Do vậy, sự dịch mã biểu hiện protein của hệ thống sống này trong một hệ thống sống khác thường có hiệu quả kém do tỷ lệ không cao các tARN tương ứng với mã bộ ba trên mRNA. Sự thay đổi mã bộ ba, đặc biệt là các mã bộ ba hiếm, nhằm làm tăng số lượng mã bộ ba trên mRNA có tỷ lệ cao phân tử tARN tương ứng trong hệ biểu hiện. Dựa vào bảng tần số mã bộ ba trong nấm men, trình tự gen mã hóa laccase từ chủng *C. unicolor* FCL 139 đã được công bố trên ngân hàng gen quốc tế (FJ594061.1) đã được cải biến theo hướng tối ưu hóa để biểu hiện trong nấm men *P. pastoris*. Quá trình cải biến chỉ làm thay đổi mã bộ

ba mà không làm thay đổi axit amin mà mã bộ ba do (*mlacI*) và gen ban đầu (*lacI*) được trình bày trong hình 1.

<i>MlacI</i>	1	GTAGAATTCATTGGTCCAAGTTGCTGACTTGCCATATTACTGATGACACAATCGCTCCAGAT	60
<i>LacI</i>	1	GTAGAATTCATCGCCCCGTCGCTGACCTTCACATTACGGACGATACCATTGCCCCCGAT	60
<i>MlacI</i>	61	GGATTTTCAGACCTGCTGTTTTGGCTGGTGGAGGTTTCCCAAGTCCCTTGATTACTGGA	120
<i>LacI</i>	61	GGTTTCTCTCGTCTGCTGTTCTCGCCGGCCGGTGTTCCTGCCCCCTCATTACAGGA	120
<i>MlacI</i>	121	AACAAGGGTGACGTTTTTAAATTGAACGTTATCGATGAAATTGACTGACCGCTCAATGTG	180
<i>LacI</i>	121	AACAAGGGCGACGCTTTTAAACTCAATGTTATCGATGAACTTACGGACGATCCATGCTG	180
<i>MlacI</i>	181	AAGTCTACATCCATCCATTGGCACGGATTTTCCAAAAAGGTAATACTGGGCTGATGGA	240
<i>LacI</i>	181	AAGTCAACTTCCATCCACTGGCATGGATTCTTCCAAAAAGGTAATACTGGGCTGATGGT	240
<i>MlacI</i>	241	CCAGCTTTCGTTAACCAGTGTCTTACTACTGGTAACCTCTTCTTGACAGATTCCAA	300
<i>LacI</i>	241	CCCGCATTTGTGAACCAGTGCCTCATCACACGGGCAACTCTTCTTGACAGACTTCCAG	300
<i>MlacI</i>	301	GTTCTGTACCAGGCTGGTACTTACTGGTATCATTCTCACTTGTGCCACAATAATTGTGAT	360
<i>LacI</i>	301	GTCCCCGATCAAGCTGGAACCTACTGGTATCATAGTCACTTGTGCCACCAGTACTGTGAT	360
<i>MlacI</i>	361	GGATTGAGAGGTGCTTTTGTGTTACGATCCATGACCCCTCACAAGGATTTGTATGAC	420
<i>LacI</i>	361	GGTCTCAGAGGTGCATTCGTTGTCTACGACCCTTCAGATCCTCACAAGATCTTTACGAT	420
<i>MlacI</i>	421	GTTGATGACGAATCCACTGTTATCACATTGGCTGACTGGTACCATACTTTGGCTAGACAG	480
<i>LacI</i>	421	GTTGATGACGAGAGTACCGTCACTACTTTAGCTGATTGGTATCATACTTTGGCTCGTCAA	480
<i>MlacI</i>	481	ATTGTTGGAGTTGCTATCTCCGATACTACATTGATTAATGGATTGTCAAGAAACAATAAT	540
<i>LacI</i>	481	ATTGTTGGCGTTGCCATTTCTGATACTACTTTGATTAATGGTTTGAGCCGCAATACCAAC	540
<i>MlacI</i>	541	GGTCCAGCTGATGCTGCTTTGGCTGTTATTGACGTTGAAATGGAGAGATATAGATTCAGA	600
<i>LacI</i>	541	GGTCCGGCTGACGCTGCTCTGGCGTGATTGACGTTGAACTGGAACGGTACCGTTGCCGT	600
<i>MlacI</i>	601	TGGTTTCAATCTCTGTGACCCCTCACTGGGTTTTCTCTAAAGATAATCATGACTTCACT	660
<i>LacI</i>	601	CTTGTTCCATATCTCTGTGATCCTCACTGGGTTCTCTCGAACGACAAACATGACTTTACG	660
<i>MlacI</i>	661	GTTATTGAGGTTGATGGTGTACTGTTACATCCCAGTTAACCCATCAATCTTCCGCTGCT	720
<i>LacI</i>	661	GTCATTGAAGTTGATGGGTTACAGTAACCTCTCACGTCAACTCCGTCAATCTTCCGCGCA	720
<i>MlacI</i>	721	ACTTACTCATTGTTTAAACGCTAATCAACCAGTTGATAAATTACTGGGTTAGAGCTACTCAG	780
<i>LacI</i>	721	ACCTATTCCCTTGTAAACGCTAATCAACCAGTTGACAACTACTGGGTTCCGTCGACCCAA	780
<i>MlacI</i>	781	TCTTTGTATCATGATTCTCTGGAGGTAATAATCCCCAATTTTGGATATAAGGGTGTCT	840
<i>LacI</i>	781	TCTCTGTACCAGGCTTCTCTGGTGGCAATAATCGCCCACTCTCCGTTACAAAGGGCGT	840
<i>MlacI</i>	841	ACTGTTGCTGAACCTGCTACATCACAACACTACATCTACTAAACCATTGTTGGAGCAAAC	900
<i>LacI</i>	841	ACTGTGCCGAGCCTGCTACTTCCAAACCACTCTACTAAAGCTCTCTGGAAACTAAC	900

<i>Mlac1</i>	901	TTGCACCCTTTGGTTTCTACTCCAGTTCTCTGGTTTGCCACAACCTGGAGGTACAGACGTT	960
<i>Lac1</i>	901	CTCCACCCTCTTGTAGCACCCCTGTCCCCGGCTTGCCCTCAGCCAGTGGTACTGATGTA	960
<i>Mlac1</i>	961	GTTCAAGAACTTOATTTTGGGTTTTAACCGCTGGTAAATTCOCTATCAACGGTGCTTCATT	1020
<i>Lac1</i>	961	GTCCAGAACTTATTCTCGOTTCAACGCCGGAAGTTCCGCATCAATGGTGTAGCTTT	1020
<i>Mlac1</i>	1021	GTTCACCTTCTGTTCTCTGTTTTGTTGCAAAATTTGTCGGAACTACAAATGCTCAGGAT	1080
<i>Lac1</i>	1021	GTCCCCCTTCGGTCTCTGTTCTCCTTCAAATTCCTCAGCGGCACCACCAATGCTCAGGAT	1080
<i>Mlac1</i>	1081	TTOTTOCCATCCGGATCAAGTTTTCGAATTCGCTTTGGGTAAAACTGTTGAGTTGACATTG	1140
<i>Lac1</i>	1081	CTCCTCCCAGTGGATCGGTTTTCGAACTTCCCTTGGCAAAAAGTGTGAGTCCACCTT	1140
<i>Mlac1</i>	1141	GCTGCTGGTGTGTTTGGGAGGTCACACCCCTTTCATTGTCACGGACATAACTTCCATGTT	1200
<i>Lac1</i>	1141	GCAGCAGGTOTACTCGGCGGCCCCATCCCTTCCACTTGCACGGTCAAACTTCCACGTC	1200
<i>Mlac1</i>	1201	GTTAGATCTGCTGGTCAAGATACTCCAATAACGATGACCCCTATTGTTAGAGATGTTGTT	1260
<i>Lac1</i>	1201	GTCCGAGTGCCGGCCAAGATACTCCAACCTACGATGACCCCATTTGTTGCTGACGTTGTC	1260
<i>Mlac1</i>	1261	AACACTGGAGCTATGGGTGACAATGTTACAATCAGATTCACTACAGATAACCCAGGACCT	1320
<i>Lac1</i>	1261	AACACCGGTCTATGGGCGATAACGTCACCATCCGCTTACCACCTGACAAACCTGGAGCC	1320
<i>Mlac1</i>	1321	TGGTCTTGCACTGTCATATTGATTGGCATTGGGAGGCTGGTTTTGCTGTTGTTTCGCT	1380
<i>Lac1</i>	1321	TGGTCTCCACTGTCACCAATGACTGGCACTGGAAAGTGGTTTCGCGGTTGCTTCGCT	1380
<i>Mlac1</i>	1381	GAAGCTGTTAAACGAGACTAAGGCTGGAAATCCAAACACCTGCCTGCTGGGATAAATTTGTT	1440
<i>Lac1</i>	1381	GAGGCTGTCAACGAGACTAAGGCTGGTAAACCTACTCTGCGCGCTGGGATAAATCTTTCG	1440
<i>Mlac1</i>	1441	ACTTTGTATGACGCTTTGGCTGATGGTGACAAACATCAACATCACCATCACTAA	1494
<i>Lac1</i>	1441	ACCTTGTACGACGCTCTGCGGACGGTGACAAGCATCATCATCATCAITAA	1494

Hình 1. So sánh trình tự gen sau khi tối ưu hóa và trình tự gen mã hóa cho laccase từ chủng *C. unicolor*.

Trình tự của gen sau khi tối ưu và gen ban đầu có sự khác biệt 23%. Các vùng có trình tự nucleotit lặp lại cũng bị loại bỏ. Thêm vào đó, thành phần GC cũng được thay đổi sau khi tối ưu trình tự gen: thành phần GC trung bình của gen *mlac1* là 42,04%, trong khi đó gen *lac1* là 52,19%. Sự thay đổi thành phần GC này vẫn thuộc khoảng phần trăm lý tưởng cho sự biểu hiện, thông thường trong khoảng 30-70%. Vùng định có thành phần GC > 60% cũng đã được loại bỏ. Những thay đổi về thành phần GC này làm kéo dài thời gian bán hủy của mRNA. Các cấu trúc Loop ảnh hưởng đến khả năng liên kết của ribosome và tính bền của mRNA đã được phá vỡ. Quá trình tối ưu gen cũng đã được kiểm tra đối với các vị trí của Cis-acting âm tính.

Đặc biệt, sau khi tối ưu trình tự gen *mlac1* có chỉ số phù hợp mã bộ ba (CAI) để biểu hiện trong nấm men *P. pastoris* là 0,91 so với gen *lac1* là 0,69. Theo

lý thuyết, chỉ số CAI > 0,9 được xem như rất tốt cho mức độ biểu hiện cao và khi chỉ số CAI = 1 thì trình tự gen là hoàn toàn phù hợp cho sự biểu hiện của cơ thể chủ mong muốn. Những phân tích sâu hơn về tần số mã bộ ba phù hợp cho thấy phần trăm mã bộ ba có mức độ phù hợp cao của gen *mlac1* tăng lên đáng kể, đồng thời phần trăm mã bộ ba ở các mức độ phù hợp thấp giảm. Có đến 70% mã bộ ba trên gen *mlac1* có mức độ phù hợp cao > 90%, không có bộ ba nào thuộc khoảng mức độ phù hợp thấp < 50%. Trong khi đó, trên gen *lac1* chỉ có 44% mã bộ ba có mức độ phù hợp > 90%, còn có đến 19% mã bộ ba thuộc khoảng < 50%. Kết quả phân tích sự thay đổi về chất lượng của gen *mlac1* so với *lac1* được trình bày trong bảng 1.

Ngoài ra, trình tự gen *mlac1* cũng đã được thiết kế thêm trình tự mã hóa 6 Histone ở đầu N của protein giúp cho quá trình tinh sạch protein bằng cột

Histag. Trình tự cắt của các enzyme hạn chế *EcoRI* ở đầu 5' và *NotI* ở đầu 3' để đưa gen vào vector biểu hiện pPIC9 dùng để biểu hiện trong nấm men *P. pastoris*. Trình tự gen cái biến được tổng hợp nhân tạo bởi công ty GenScript. Sau khi tổng hợp nhân tạo, trình tự gen với kích thước khoảng 1,5 kb được đưa vào vector tách dòng pUC57 rồi đưa vào vector biểu hiện pPIC9. Vector biểu hiện tại tổ hợp pPICmlacI được biến nạp vào chủng *P. pastoris* SMD1168 và được kiểm tra sự có mặt của gen *mlacI* trong genome theo quy trình như đã trình bày trong phần phương pháp.

**Bảng 1** So sánh mức độ phù hợp mã bộ ba của gen *mlacI* và *lacI* để biểu hiện trong nấm men *P. pastoris*

Mức độ phù hợp	% mã bộ ba (trên gen <i>mlacI</i> )	% mã bộ ba (trên gen <i>lacI</i> )
0-10	0	0
11-20	0	1
21-30	0	5
31-40	0	9
41-50	0	4
51-60	3	15
61-70	9	6
71-80	9	6
81-90	7	7
91-100	70	44

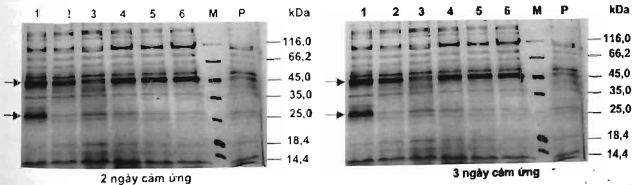
**Biểu hiện gen đã cải biến mã hóa laccase trong *P. pastoris* SMD1168**

Các chủng nấm men biến nạp *P. pastoris*

pPICmlacI được tiến hành lên men trong môi trường BMMY có bổ sung Methanol để cảm ứng promoter AOX1 tổng hợp protein ngoại lai. Đường cong sinh trưởng của các dòng nấm men tái tổ hợp chứa gen *mlacI* và chủng đối chứng tương đối giống nhau và mật độ tế bào OD<sub>600</sub> đạt khoảng 35 sau 72 h nuôi cấy lên men.

Để kiểm tra khả năng biểu hiện laccase tái tổ hợp, chúng tôi điện di dịch protein tiết ngoại bào và protein nội bào của các dòng nấm men biến nạp. Kết quả kiểm tra dịch protein ngoại bào của 6 dòng nấm men cho thấy các dòng 1, 2, 4, 5, 6 đều xuất hiện thêm một băng có kích thước khoảng 55 kDa (đúng với kích thước của protein laccase) so với dòng đối chứng (-) là *P. pastoris* SMD1168. Riêng dòng 3 thì hầu như không xuất hiện băng ở vị trí 55 kDa. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả kiểm tra gen *mlacI* trong hệ gen của các chủng biến nạp, dòng số 3 không xác định được sự có mặt của gen *mlacI* trong hệ gen. Bên cạnh đó, dịch ngoại bào ở dòng số 1 còn xuất hiện thêm băng có kích thước khoảng 27 kDa có thể do protein ngoại lai sau khi tổng hợp đã bị phân cắt bởi các protease ngoại bào của nấm men. Băng protein ngoại lai sau 3 ngày nuôi cấy lên men cảm ứng đậm hơn so với sau 2 ngày (Hình 2).

Kết quả kiểm tra protein nội bào của các dòng nấm men biến nạp gen *mlacI* không thấy có sự khác biệt so với dòng đối chứng (kết quả không được trình bày). Như vậy, có thể kết luận rằng protein tái tổ hợp sau khi được tổng hợp đã được tiết hoàn toàn ra môi trường. Do đó, chúng tôi chỉ sử dụng dịch ngoại bào của các dòng biến nạp để xác định hoạt tính của laccase tái tổ hợp.



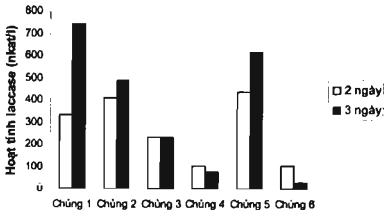
**Hình 2.** SDS-PAGE protein ngoại bào của các chủng nấm men tái tổ hợp. Dịch protein tiết ngoại bào của các chủng tái tổ hợp được dùng để kiểm tra laccase tái tổ hợp và được hiển màu bằng phương pháp nhuộm bạc. 1-6: Protein ngoại bào của các chủng nấm men biến nạp dòng 1-6, P: Protein ngoại bào của nấm men *P. pastoris* PIC9; M: Thang Protein chuẩn (Fermentas).

### Xác định hoạt tính của laccase tái tổ hợp

Để sàng lọc hoạt tính laccase tái tổ hợp từ các dòng biến nạp, dịch chiết protein ngoại bào sau 2, 3 ngày nuôi cấy lên men được tiến hành phân ứng với cơ chất Syringaldazine. Kết quả sàng lọc hoạt tính của 6 dòng nấm men được trình bày trên hình 3

Kết quả sàng lọc hoạt tính laccase cho thấy dịch protein ngoại bào sau 2, 3 ngày nuôi cấy lên men từ các dòng nấm men tái tổ hợp có hoạt tính khử cơ

chất Syringaldazine. Hầu hết các dòng có hoạt tính laccase sau ngày cảm ứng thứ 3 cao hơn so với ngày cảm ứng thứ 2. Kết quả này cũng phù hợp với kiểm tra protein tiết ngoại bào của các dòng tái tổ hợp. Trong đó, dịch protein ngoại bào của chúng sau 3 ngày nuôi cấy lên men cảm ứng có hoạt tính cao nhất với hoạt tính laccase đạt 743,58 nkat/l. Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu tối ưu lên men chùng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp sản xuất laccase phục vụ các mục đích nghiên cứu khác.



Hình 3 Đồ thị xác định hoạt tính của laccase tái tổ hợp

### KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo ra chủng nấm men mang gen laccase của *Cerrena unicolor* được cải biến có chỉ số phù hợp đạt 0,91. Laccase tái tổ hợp được tiết hoàn toàn ra môi trường với kích thước phân tử khoảng 55 kDa và tuy nhiên protein tạo ra bị cắt một phần bởi protease của tế bào chủ. Hoạt tính laccase cao nhất nhận được sau 3 ngày nuôi cấy lên men đạt 743,58 nkat/l.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện bằng kinh phí của đề tài "Nghiên cứu công nghệ sản xuất enzym lignin peroxidase và laccase từ vi sinh vật tái tổ hợp để ứng dụng trong công nghiệp sản xuất giấy" mã số DT.07.08/CNSHC thuộc Bộ Công Thương và trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Abadulla E, Tzanov T, Costa S, Robra KH, Cavaco-Paulo A, Gu' bitz GM (2000) Decolorization and detoxification

of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl Environ Microbiol* 66: 3357-3362.

Bloom H, Beier H, Gross HS (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

Bulter T, Alcalde M, Sieber V, Meinhold P, Schlachtbauer C, Arnold FH (2003) Functional expression of a fungal laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by directed evolution. *Appl Environ Microbiol* 69: 987-995.

Cho NS, Cho HY, Shin SJ, Choi YJ, Leonowicz A, Ohga S (2008) Production of Fungal Laccase and Its Immobilization and Stability. *Fac Agr Kyushu Univ* 53: 13-18.

Claus H (2004) Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* 35: 93-96.

Couto SR and Herrera JLT (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24: 500-513.

Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11: 905-910.

Freire RS, Durán N, Kubota LT (2002) Development of a laccase-based flow injection electrochemical biosensor for phenolic compounds determination and its application for monitoring remediation of Kraft E1 paper mill effluent. *Anal Chim Acta* 463: 229-238

Hong YZ, Xiao YZ, Zhou HM, Fang W, Zhang M, Zhu J, Wang J, Wu LJ, Yu ZL (2006) Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp. AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *FEMS Microbiol Lett* 258: 96-101.

Lê Thị Thu Hồng, Phùng Thu Nguyệt, Trần Thị Hương, Bùi Thanh Xuân, Phạm Thùy Hồng, Đinh Duy Kháng, Trương Nam Hải (2006) Biểu hiện vùng gen mã hóa kháng nguyên PrM-E của virus dengue typ 3 trong nấm men *Pichia pastoris*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 44: 50-56

Li Y, Zhang B, Chen X, Chen Y, Cao Y (2010) Improvement of *Aspergillus sulphureus* endo-beta-1,4-xylanase expression in *Pichia pastoris* by codon

optimization and analysis of the enzymic characterization. *Appl Biochem Biotechnol* 160: 1321-1331.

Mayer AM, Staples RC (2002) Laccase. new functions for an old enzyme - a review. *Phytochemistry* 60: 551-565.

Outchkourov NS, Stiekema WJ, Jongsma MA (2002) Optimization of the expression of equistatin in *Pichia pastoris*. *Protein Exp Purif* 24: 18-24.

Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8: 423-488.

Xiao YZ, Tu XM, Wang J, Zhang M, Cheng Q, Zeng WY, Shi YY (2003) Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 700-707.

Xiong AS, Yao QH, Peng RH, Han PL, Cheng ZM, Li Y (2005) High level expression of a recombinant acid phytase gene in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol* 98: 418-428.

## EXPRESSION OF A CODON OPTIMIZED GENE ENCODING *CERRERA UNICOLOR* LACCASE IN *PICHIA PASTORIS*

Nguyen Thanh Ngọc, Lê Phương Hoàng Anh, Lê Thị Thu Hồng, Vũ Văn Lợi, Phạm Thị Bích Hợp, Trương Nam Hải\*

Institute of Biotechnology

### SUMMARY

Laccase is polyphenol oxidase that catalyzes the oxidation of various phenolic compounds. In presence of redox mediators, laccase is also able to act on many non-phenolic compounds. Therefore, it is highly useful biocatalysts for diverse biotechnological applications. To achieve a high expression level of laccase in *P. pastoris*, the coding sequence of laccase I from *C. unicolor* was synthesized and optimized in a variety of parameters such as codon usage bias, GC content, mRNA secondary structure as well as cis-acting sequence motifs. Codon usage bias were increased in *Pichia* by upgrading the codon adaptation index from 0,69 to 0,91 considered as very good for high gene expression level. Further, GC content and unfavorable peaks have been optimized to prolong the half-life of the mRNA. The Stem-Loop structures impacting ribosomal binding and stability of mRNA were broken. In addition, our optimization process has screened and successfully modified those negative cis-acting sites. The nucleotide difference between original and modified sequences is 23%. The synthetic modified gene with length of 1.5 kb was cloned in pPIC9 vector and expressed in yeast *P. pastoris* strain SMD1168 under the dependent control of the AOX1 promoter. In BMMY fermentation medium, the recombinant laccase completely secreted into the culture medium and had the estimated molecular mass of 55 kDa, however, the laccase was partially cleaved by yeast host protease. The maximum activity of the recombinant laccase obtained after 3 days' induction cultivation in shaken flask culture employing Syringaldazine as a substrate was 743.58 nkat/l.

**Keywords:** Codon optimization, *Cerrera unicolor*, *Pichia pastoris*, recombinant laccase, syringaldazine

\* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37562790; E-mail: [tnhai@hn.vnn.vn](mailto:tnhai@hn.vnn.vn)