

BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA LIPASE (*LIP*A) TỪ CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* FS2

Nguyễn Hồng Thanh, Phùng Thu Nguyệt, Trương Nam Hải

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Gen mã hóa lipase A (*lipA*) của chủng *B. subtilis* FS2 phân lập từ nguồn nước mắm của Việt Nam được tách dòng dựa vào kỹ thuật PCR. Một đoạn DNA chứa toàn bộ khung đọc mở (ORF) mã hóa lipase A với kích thước 543 bp được tách dòng bởi vector pBlueScriptSK(+) trong tế bào *E. coli* DH5 α . Đoạn gen mã hóa lipase A được thu lại từ plasmid tái tổ hợp pBlueLipA sau khi xử lý plasmid này bằng hai enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Xho*I. Đoạn gen này được đưa vào vector biểu hiện pET22b(+) tạo thành plasmid tái tổ hợp pETLipA và được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21. Dòng khuẩn lạc mang gen ngoại lai được lựa chọn và nuôi cấy trong môi trường LB với 1 mM chất cảm ứng IPTG. Lipase A tái tổ hợp có kích thước khoảng 24 kDa được biểu hiện ở dạng protein ngoại bào sau 2 h cảm ứng và biểu hiện mạnh nhất sau 5 h với nồng độ protein tương ứng khoảng 0,5 mg/ml. Protein tái tổ hợp có chứa 6 gốc histidine (His) với pI 9,2 được tinh sạch qua cột sắc ký Ni²⁺ HiTrap 5 ml. Sản phẩm protein tinh sạch được kiểm tra hoạt tính enzyme trên đĩa thạch có chứa 0,1% tributyrin. Hoạt tính riêng của enzyme được xác định là 19.814 U/mg.

Từ khóa: *Bacillus subtilis* FS2, biểu hiện gen, lipase A, tinh sạch protein, *lipA* tái tổ hợp

MỞ ĐẦU

Lipase (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) là một enzyme xúc tác cho sự thủy phân triacylglycerol thành glycerol và các acid béo. Đồng thời enzyme này còn có khả năng tham gia vào các quá trình tổng hợp tạo nên ester và các quá trình ester hóa. Chúng có khả năng hoạt động bền vững trong môi trường có nhiệt độ cao và dung môi hữu cơ (Bornscheuer *et al.*, 1994). Do vậy, lipase có tiềm năng ứng dụng rộng rãi trong nhiều ngành công nghiệp như các quá trình xử lý các hợp chất hữu cơ, sản xuất chất tẩy rửa, quá trình tổng hợp các hợp chất bề mặt, công nghiệp hóa dầu, công nghiệp thực phẩm, công nghiệp sản xuất giấy, công nghiệp mỹ phẩm và đặc biệt trong ngành dược phẩm (Soberon *et al.*, 1994; Rohit *et al.*, 2001; Jaeger *et al.*, 2002).

Lipase phân bố rộng rãi trong tự nhiên ở cả động vật, thực vật và vi sinh vật nhưng chỉ có lipase của vi sinh vật mới có giá trị ứng dụng trong các ngành công nghiệp. Các vi sinh vật có khả năng tổng hợp lipase bao gồm vi khuẩn, nấm mốc, nấm men và actinomyces được tìm thấy ở nhiều nơi khác nhau như trong rác thải công nghiệp, các nhà máy xử lý dầu, các vùng đất bị nhiễm dầu, các loại hạt chứa dầu và ở các vùng suối nước nóng (Coolbear, 1992; Errtting, Eibl *et al.*, 1994; Haki *et al.*, 2003).

Hiện nay, lipase thương mại đang được sản xuất

lượng lớn trên quy mô công nghiệp và đặc biệt được sử dụng nhiều trong công nghiệp sản xuất chất tẩy rửa. Ngoài ra, lipase còn có thể thủy phân acid béo không no như astaxanthine, methyl ketone, decalactone tạo hương trong công nghiệp chế biến thực phẩm như bơ, chocolate, sữa và trong đồ uống hoa quả. Do tầm quan trọng và ứng dụng rộng rãi của lipase trong các ngành công nghiệp nên các nghiên cứu tìm nguồn lipase mới và sản xuất với giá thành rẻ đang được quan tâm.

Trong công trình này chúng tôi trình bày kết quả biểu hiện gen lipase A của chủng *Bacillus subtilis* FS2 trong *E. coli* BL21 với mục đích nghiên cứu về động học và các thuộc tính của nó.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Môi trường LB đặc có chứa ampicillin và cơ chất 0,1% tributyrin (Sigma, Mỹ).

Cột sắc ký ái lực HiTrap 5 ml (Amersham, Mỹ).

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* FS2 do TS. Tô Kim Anh, Trường Đại học Bách khoa, Hà Nội cung cấp.

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α (*endA1 recA1 hsdR17 supE44 gypA96 thi-1 relA1 Δ lacU169* (Φ 80

lacZAM15)) dùng trong thí nghiệm tách dòng gen.

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) dùng trong thí nghiệm biểu hiện gen.

Cặp môi dùng cho nhân và tách dòng gen *lipA*

Primer F:

AATGGATCCCGCTGAACACAATCCAGTCGTTA
*Bam*HI

Tm = 58;

Primer R:

AATCTCGAGATTTCGTATTCTGGCCCCCGCCG
*Xho*I

Tm = 63.

Phương pháp

Tách chiết DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2

DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2 được tách chiết như đã mô tả trước đây (Phung Thu Nguyet *et al.*, 2005).

Kỹ thuật PCR

Đoạn gen *lipA* có kích thước khoảng 0,6 kb được nhân lên bằng kỹ thuật PCR từ DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2 với các đoạn môi được thiết kế thêm các điểm cắt *Bam*HI và *Xho*I để thuận lợi cho quá trình cắt nối gen *lipA* từ vector tách dòng sang vector biểu hiện. Chu trình nhiệt của phản ứng gồm: 94°C:10 phút để biến tính DNA hệ gen, tiếp theo là 25 chu kỳ nhiệt gồm: 94°C: 1 phút; 55°C: 45 giây; 72°C: 50 giây, hoàn thiện quá trình kéo dài chuỗi ở 72°C trong 5 phút và giữ mẫu ở 4°C.

Thiết kế vector biểu hiện pETLipA

Vector pBlueScriptSK(+) và sản phẩm PCR sau khi được xử lý bằng hai enzyme hạn chế *Bam*HI và *Xho*I được nối với nhau nhờ T4 DNA ligase tạo thành plasmid tái tổ hợp pBlueLipA. Sản phẩm của phản ứng nối ghép DNA được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α để nhân dòng và chọn lọc plasmid tái tổ hợp. Plasmid pBlueLipA được xử lý bằng *Bam*HI và *Xho*I để thu đoạn gen *lipA* có kích thước 0,6 kb. Đoạn gen này được gắn vào vector biểu hiện pET22b(+) tạo nên plasmid tái tổ hợp pETLipA. Trình tự của đoạn gen *lipA* trong plasmid tái tổ hợp được xác định bằng máy xác định trình tự gen tự động ABI Prism 3100 DNA Sequencer và bộ hóa

chất Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Biểu hiện gen *lipA* trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3)

Đoạn gen *lipA* với kích thước 0,6 kb sau khi được nhân dòng trong vector pBluescriptsk(+) được thu lại bằng cách xử lý vector này với hai enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Xho*I và được đưa vào vector pET22b(+) cũng được xử lý bằng hai enzyme tương tự. Sản phẩm của phản ứng nối ghép DNA được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21. Dòng khuẩn lạc mang gen được lựa chọn để biểu hiện trong môi trường LB. Protein tái tổ hợp có kích thước khoảng 24 kDa được biểu hiện sau 2 h nuôi cấy với chất cảm ứng là IPTG ở nồng độ 1 mM.

Phương pháp xác định nồng độ protein

Nồng độ protein được xác định theo phương pháp Bradford (1976).

Phương pháp tinh sạch protein bằng cột ái lực His-tag

Tế bào nuôi cấy sau khoảng 3 - 5 h cảm ứng trong 200 ml môi trường được thu lại bằng cách ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Tủa tế bào được rửa lại bằng nước cất vô trùng. Hòa tan tủa tế bào bằng dung dịch Lysis buffer (50 mM sodium phosphate; 0,5 M NaCl; 10 mM imidazole; 0,5 mg/ml lysosyme; pH 8) theo tỷ lệ: 1 ml Lysis buffer: 10 ml dịch nuôi cấy tế bào. Dịch tế bào được giữ trong tủ -85°C trong khoảng 3 - 5 h, sau đó hoà tan tủa tế bào bằng cách cho vào tủ ấm 37°C để phá vỡ tế bào bằng sốc nhiệt và lysosyme. Sau đó toàn bộ dịch tế bào được phá triệt để bằng siêu âm trong khoảng 10 phút. Dịch chiết enzyme được thu lại bằng cách ly tâm 13.000 vòng/phút trong khoảng 15 phút và được giữ trong điều kiện lạnh để hạn chế sự hoạt động của các protease nội bào. Sau khi cân bằng cột bằng 20 ml Binding buffer, mẫu được đưa lên cột với một lượng nhất định khoảng 50 ml (0,5 mg/ml). Protein không bám sẽ đi qua cột và được thu lại để điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE. Rửa cột bằng 50 - 100 ml Washing buffer để loại bỏ các protein không đặc hiệu còn bám trên cột. Protein bám đặc hiệu sẽ được thu lại bằng Elution buffer theo từng phân đoạn, mỗi phân đoạn 1 ml. Các phân đoạn như dịch qua cột, dịch rửa các protein bám không đặc hiệu và dịch thu protein bám được điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12,6%.

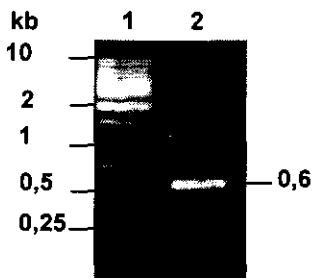
Phương pháp xác định hoạt tính lipase A

Hoạt tính của lipase được xác định bằng cách sử dụng bộ kit với cơ chất phát huỳnh quang triglyceride 1,2-dioleoyl-3-pyrenedecanoyl-rac-glycerol (DPG). Cơ chế của phản ứng dựa vào sự phân cắt cơ chất DPG của lipase, giải phóng các phân tử acid béo pyrenedecanoic (PDA). Sự phát huỳnh quang của cơ chất giảm dần theo thời gian do sự phân giải của cơ chất tạo thành sản phẩm PDA và được đo ở bước sóng 470 nm. Các monomer phân tử acid béo tạo thành hấp thụ cực đại ở bước sóng 340 nm. Tỷ lệ OD 340/470 phản ánh lượng sản phẩm được tạo thành trong một khoảng thời gian nhất định, do đó phản ánh tốc độ xúc tác phản ứng của enzyme. Một đơn vị hoạt độ của enzyme được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để thủy phân hoàn toàn 1 μmol cơ chất DPG trong thời gian 1 phút dưới điều kiện chuẩn. Do đó, hoạt tính enzyme được xác định dựa vào tỷ lệ OD 340/470 nm. Thành phần đệm cho phản ứng giữa enzyme và cơ chất bao gồm 100 mM glycine và 19 mM deoxycholate pH 9,5.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân đoạn gen mã hóa enzyme LipA bằng kỹ thuật PCR

Trong quá trình phân lập gen collagenase từ ngân hàng genome của chủng *B. subtilis* FS2, chúng tôi đã nhận được một dòng biến nạp chứa đoạn DNA có kích thước 3,2 kb có hoạt tính lipase. Sau khi xác định trình tự đoạn gen này, chúng tôi phát hiện được một khung đọc mở dài 0,6 kb mã hóa cho lipase A của *B. subtilis*. Dựa vào đoạn trình tự này, chúng tôi đã thiết kế mỗi để nhân đoạn gen lipA trực tiếp từ DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR trên gel 0,8% agarose. 1: Thang DNA chuẩn 1 kb, 2: Sản phẩm PCR.

Theo tính toán lý thuyết đoạn gen lipA được nhân lên có kích thước khoảng 0,6 kb. Kết quả nhân

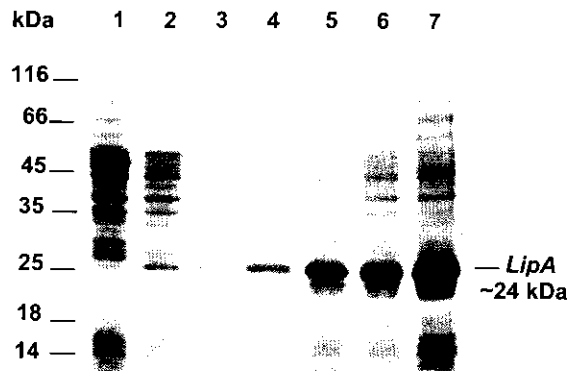
dòng gen lipA từ DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2 được thể hiện trên hình 1.

Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR là một băng DNA đặc hiệu có kích thước khoảng 0,6 kb đúng với lý thuyết. Điều này khẳng định hai đoạn nối được thiết kế là đặc hiệu và chương trình chạy PCR là phù hợp, sản phẩm PCR đủ điều kiện để tiến hành đưa vào vector pBlueScriptSK(+) và nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* DH5 α. Bằng một số phản ứng cắt kiểm tra và đọc trình tự, đoạn gen đưa vào được khẳng định là đoạn gen mong muốn.

Biểu hiện gen lipA trong tế bào E. coli BL21

Với mục đích biểu hiện lượng lớn enzyme tái tổ hợp, hệ vector biểu hiện pET22b(+) được lựa chọn để biểu hiện lipase A trong tế bào *E. coli*. Hệ biểu hiện vector pET22b(+) với tín hiệu tiết pelB có chức năng định hướng cho protein ngoại lai tiết ra khoang chu chất của tế bào. Một đặc điểm thuận lợi khác của hệ vector biểu hiện này là phía sau vùng đa nối còn có một trình tự mã hóa cho 6 gốc His, gắn với đầu C của protein ngoại lai nhờ đó protein có thể được tinh chế dễ dàng trên cột sắc ký ái lực với các gốc His.

Protein tái tổ hợp có kích thước khoảng 24 kDa được tổng hợp. Kết quả điện di trên gel 12,6% polyacrylamide có chứa SDS được thể hiện trên hình 2.



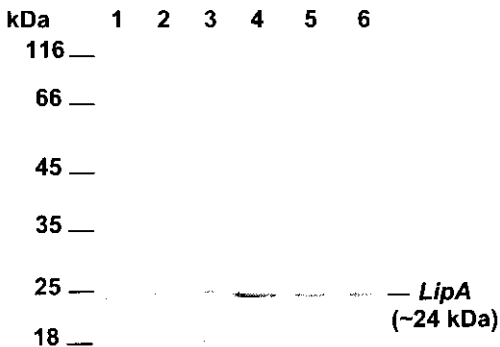
Hình 2. Điện di protein tái tổ hợp trên gel 12,6% polyacrylamide. 1: Dòng đối chứng chứa plasmid pET22b (+) sau 3 h cảm ứng, 2: Dòng tế bào pETLipA không cảm ứng bằng 1 mM IPTG, 3: Thang protein chuẩn, 4-7: Dòng tế bào pETLipA sau 1, 2, 3 và 5 h cảm ứng bằng 1 mM IPTG.

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nồng độ IPTG từ 0,5 mM tới 1 mM không ảnh hưởng tới khả năng tổng hợp protein ngoại lai. Tuy nhiên, nhiệt độ cảm

ứng đã ảnh hưởng rất nhiều tới quá trình tổng hợp của protein ngoại lai. Chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm với các nhiệt độ cảm ứng khác nhau ở 25, 30, 37°C và kết quả cho thấy ở nhiệt độ 37°C thì lượng protein ngoại lai tiết ra là nhiều nhất, tuy nhiên hoạt tính lipase trên đĩa thạch không phải là cao nhất. Điều này chứng tỏ, khi mà protein ngoại lai được tổng hợp ra quá nhanh thì quá trình hình thành cấu trúc không gian bậc 3 của protein bị ảnh hưởng (quá trình missfolding). Ở điều kiện nhiệt độ 30°C thì lượng protein tiết ra là đáng kể và hoạt tính thủy phân cũng là cao nhất so với ở điều kiện 25°C và 37°C. Như vậy, điều kiện 30°C, nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,5 mM và 5 h cảm ứng là điều kiện để quá trình tổng hợp protein là thích hợp nhất.

Tinh chế protein tái tổ hợp

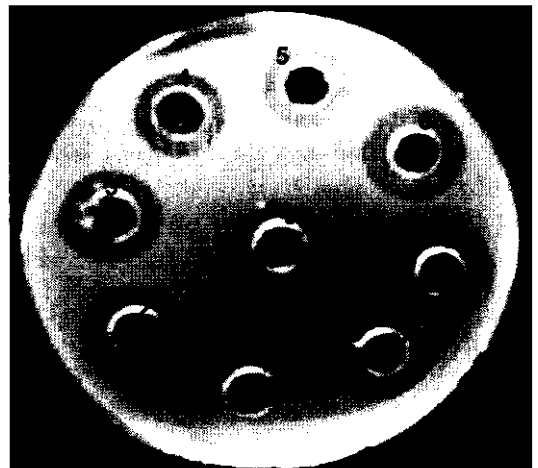
Khác với quá trình tinh sạch lipase từ các chủng tự nhiên khá phức tạp, các protein tái tổ hợp được biểu hiện trong *E. coli* BL21 với các hệ vector có thiết kế thêm các gốc His ở đầu C vì vậy mà giúp cho các protein tái tổ hợp có khả năng liên kết với ion Ni²⁺ trên các cột sắc ký ái lực. Theo các nghiên cứu trước đây cho thấy, khả năng gắn của các protein khác nhau phụ thuộc vào pH của môi trường đệm, đồng thời phụ thuộc vào sự có mặt của các amino acid histidine. Vì vậy, ở các protein không có đuôi His-tag hoặc có chứa một vài amino acid histidine thì khả năng gắn trên cột là rất kém, chúng thường bị rửa trôi ở các nồng độ imidazole khác nhau phụ thuộc vào việc có nhiều histidine hay không. Protein lipase A được thiết kế gắn thêm 6 histidine nằm ở đầu C do đó có ái lực mạnh với Ni²⁺, thuận lợi cho việc tinh sạch. Kết quả lipase tái tổ hợp tinh sạch được thu lại theo các phân đoạn được thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Điện di protein tinh sạch trên gel 12,6% polyacrylamide. 1: Dịch phá tế bào sau khi biểu hiện, 2, 4, 5, 6: Protein tinh sạch được thu ở các phân đoạn khác nhau, 3: Thang protein chuẩn.

Xác định hoạt tính của LipA tái tổ hợp trên đĩa thạch

Các nghiên cứu trước đây của Cardenas và đồng tác giả (2001) cho thấy, phương pháp sàng lọc các chủng có khả năng tổng hợp lipase thường được thực hiện bằng phương pháp đĩa thạch có chứa cơ chất tributyrin với nồng độ từ 0,1 đến 0,5%. Sự xuất hiện của các vòng thủy phân chứng tỏ khả năng tổng hợp lipase của các chủng tự nhiên. Ngoài ra, một phương pháp nghiên cứu khác như phương pháp của Kouler và Jaeger (1987) xác định khả năng thủy phân lipid trên môi trường đĩa thạch có chứa Rhodamine B như một cơ chất của lipase. Phương pháp này tuy nhạy và chính xác nhưng khá tốn kém và phức tạp. Vì vậy, trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng phương pháp thử hoạt tính protein tái tổ hợp tinh sạch trên đĩa thạch có chứa cơ chất của lipase là tributyrin 0,1%. Kết quả kiểm tra hoạt tính của lipase tinh sạch được thể hiện trên hình 4.



Hình 4. Kiểm tra hoạt tính của lipase tái tổ hợp trên đĩa thạch chứa 0,1% tributyrin. 1: Đối chứng không chứa lipase, 2-8: Lipase tái tổ hợp sau khi tinh sạch, 9: Lipase từ dịch chiết tế bào sau khi biểu hiện.

Kết quả hình 4 cho thấy, lipase A tái tổ hợp có khả năng thủy phân cơ chất tributyrin 0,1%, chứng tỏ enzyme tinh sạch vẫn giữ được hoạt tính so với hoạt tính lipase của chủng tự nhiên.

Trên cơ sở enzyme đã tinh chế, chúng tôi đã tiến hành xác định hoạt tính riêng của enzyme này như đã mô tả trong phần phương pháp. Kết quả cho thấy, lipase A có hoạt tính riêng là 19.814 U/mg protein.

KẾT LUẬN

Gen mã hóa lipase A đã được tách dòng thành công từ DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2. Đoạn gen này đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* BL21 và được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực HiTrap. Lipase A được kiểm tra được hoạt tính thủy phân lipid với cơ chất là tributyrin trên đĩa thạch. Hoạt tính riêng của lipase tái tổ hợp là 19.814 U/mg protein.

Lời cảm ơn: Đề tài được thực hiện bằng kinh phí của Dự án Việt Nam - Thụy Điển mã số VS/BT-03 (Đề tài: “Sản xuất protein tái tổ hợp ứng dụng trong Nông nghiệp và Y học”).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bornscheuer U, Reif OW, Lausch R, Freitag R, Scheper T, Fragiskos Kolis N, Menge U (1994) Lipase of *Pseudomonas cepacia* for biotechnological purposes: purification, crystallization and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1201: 55-60.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Cardenas J, Alvarez E, de Castro-Alvarez MS, Sanchez-Montero JM, Valmaseda M, Elson SW, Sinisterra JV (2001) Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J Mol Catal B Enzym* 14: 111-123.

Coolbear T, Daniel RM, Morgan HW (1992) The enzymes from extreme thermophiles: bacterial sources, thermostabilities and industrial relevance. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 45: 57-98.

Errtting J, Eibl H (1994) Industrial applications of lipases, in: Woolley P, Petersen SB, Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application, Cambridge University Press, Cambridge, England: 289-314.

Kouler G, Jaeger KE (1987) Specific and Sensitive Plate Assay for bacterial lipase. *Appl Environ Microbiol* 53(1): 211-213.

Haki GD, Rakshit SK (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* 89: 17-34.

Jaeger KE, Reetz TM (1998) Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 16(9): 396-403.

Jaeger KE, Eggert T (2002) Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13(4): 390-397.

Phung Thu Nguyet, Tran Minh Tri, Nguyen Hong Thanh, To Kim Anh, Truong Nam Hai (2005) Cloning and expression of gene encoding for collagenase from *B. subtilis* FS-2. *Proceeding of International Vietnam - Korea Symposium*: 16-21.

Rohit S, Yusuf C, Uttam CB (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnol Adv* 19: 627-662.

Soberon CG, Palmeros B (1994) *Pseudomonas* lipases: molecular genetics and potential industrial applications. *Crit Rev Microbiol* 20: 95-105.

EXPRESSION OF GENE ENCODING LIPASE (LIP A) FROM BACILLUS SUBTILIS FS2

Nguyen Hong Thanh, Phung Thu Nguyet, Truong Nam Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

The gene encoding an extracellular lipase from *Bacillus subtilis* FS2 was cloned using PCR technique. An open reading frame (ORF) of 543 bp encoding lipase A from genomic DNA of *B. subtilis* FS2 was cloned into vector pBlueScriptSK(+) forming pBlueLipA recombinant plasmid. The *LipA* gene obtained by digestion of pBlueLipA vector with *Bam*HI and *Xho*I was inserted into pET22b(+) resulting in the recombinant vector pETLipA. The recombinant vector containing *LipA* gene was transformed into *E. coli* BL21 cells for expressing in LB medium. The recombinant protein of ~24 kDa was expressed in *E. coli* BL21 cell after induction at 2 hours with 1 mM IPTG and the strongest expression was at 5 hours after induction with a protein concentration of 0.5 mg/ml. The recombinant protein containing 6 histidine

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562790; Fax: 84-4-7562790; E-mail: tnhai@hn.vnn.vn

(His) residues at C terminal with an isoelectric point (pI) 9.2 was purified through an affinity chromatography using 5 ml HiTrap column. The enzymatic activity of the purified recombinant protein was determined on an agar plate containing 0.1% tributyrin. The enzyme has the specific activity of about 19,814 U/mg.

Keywords: *Bacillus subtilis* FS2, gene expression, lipase A, protein purification, recombinant lipase