

TỔNG HỢP VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA ENTEROCIN VÒNG AS-48 CỦA VI KHUẨN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* TRONG TẾ BÀO *ESCHERICHIA COLI*

Trần Ngọc Tân¹, Đinh Thị Thu Hằng², Nguyễn Thanh Nhân¹, Phạm Thùy Linh³, Đỗ Thị Huyền¹, Lê Văn Trường¹, Trương Nam Hải¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Enterocin AS-48 là một peptide dạng vòng bao gồm 70 amino acid. Được sinh tổng hợp bởi chủng vi khuẩn *Enterococcus faecalis*, peptide này có phổ hoạt tính kháng khuẩn khá rộng đối với cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Do đó, nhằm mục đích tạo ra sản phẩm enterocin tái tổ hợp, trình tự nucleotide của gen *as-48* từ GenBank (210 bp) được tổng hợp nhân tạo dựa trên kỹ thuật PCR hai bước. Bước 1: tiến hành PCR tự mỗi với hai đoạn mỗi dài có trình tự gối lên nhau. Bước 2: sử dụng sản phẩm PCR ở bước một làm khuôn để nhân gen *as-48* bằng kỹ thuật PCR bình thường với 2 mỗi ngắn. Sản phẩm PCR sau đó được thu nhận lại để tách dòng trong vector pJET1. Trình tự 210 nucleotide của gen trong vector tách dòng được xác định đúng như mong muốn. Để tạo ra sản phẩm enterocin AS-48 tái tổ hợp có hoạt tính, gen *as-48* đã tổng hợp được chuyển vào vector biểu hiện pTWIN1. Quá trình biểu hiện của vector này trong tế bào *E. coli* ER2566 được điều khiển bởi promoter mạnh T7. Sản phẩm của quá trình biểu hiện AS-48 tái tổ hợp là một protein dung hợp giữa đoạn peptide AS-48 với hai intein nằm ở 2 đầu C và đầu N. Kiểm tra và so sánh kích thước phân tử của sản phẩm protein dung hợp bằng kỹ thuật điện di protein SDS-PAGE với kỹ thuật Western blot cho thấy sự tương đồng về kích thước của protein dung hợp, khoảng 63 kDa. Kết quả này cho phép khẳng định, lần đầu tiên, gen *as-48* đã được tổng hợp và biểu hiện thành công, đồng thời mở ra triển vọng mới trong việc nghiên cứu hoạt tính của enterocin AS-48 tái tổ hợp.

Từ khóa: Biểu hiện, *E. coli* ER2566, enterocin AS-48, peptide dạng vòng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong quá trình đấu tranh sinh tồn, vi khuẩn có khả năng sản xuất ra một loại peptide có thể ức chế hoặc tiêu diệt vi khuẩn sống cạnh tranh trên cùng nguồn dinh dưỡng. Đặc tính này đã được các nhà khoa học quan tâm và đi sâu vào nghiên cứu nhằm phát hiện các cơ chế bảo vệ và đặc tính của từng loại peptide. Các peptide do vi khuẩn tiết ra ấy được gọi là bacteriocin và được định nghĩa như là một hợp chất có bản chất protein có khả năng tiêu diệt vi khuẩn "họ hàng" (Richard *et al.*, 2004).

Khi tồn tại trong dịch tiêu hóa của động vật, bacteriocin dễ bị phân hủy bởi protease nên thường không gây hại gì đến cơ thể chủ. Do đó, ngay từ những năm 1950, bacteriocin đã được sử dụng như là những chất bảo quản thực phẩm hữu hiệu, điển hình như nisin. Năm 1988, Cục Quản lý Dược phẩm và Thực phẩm Mỹ (FDA) đã chính thức phê chuẩn việc

sử dụng bổ sung nisin trong nguyên liệu lên men phomat, bơ như là một chất bảo quản an toàn (Chen, Hoover, 2003). Tuy nhiên, mặc dù có tính kháng khuẩn khá tốt nhưng do phổ kháng khuẩn của đại đa số bacteriocin thường hẹp và giới hạn ở trong loài nên việc sử dụng bacteriocin thường được định hướng trước với một số loài vi khuẩn gây hại nhất định.

Thuộc nhóm bacteriocin, enterocin là sản phẩm của vi khuẩn *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* và *E. mundtii*. Theo hệ thống phân loại của Klaenhammer (1993), enterocin được xếp vào lớp II dựa trên đặc điểm chính là khối lượng phân tử nhỏ hơn 10 kDa. Với đặc điểm này, enterocin AS-48 do vi khuẩn *E. faecalis* tạo ra cũng thuộc lớp II bởi khối lượng phân tử là 7149 Da (Charles *et al.*, 2006). Tuy nhiên, AS-48 lại là một enterocin khá đặc biệt bởi cấu trúc vòng điển hình. Chính cấu trúc vòng này tạo nên hoạt tính sinh học ưu việt hơn so với các enterocin khác. AS-48 vừa là enterocin có hoạt tính kháng khuẩn phổ

rộng (kháng cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương) lại vừa mang tính ổn định cao trong các điều kiện của môi trường như pH, nhiệt độ (Samyn *et al.*, 1994). Đặc biệt, AS-48 còn có khả năng ức chế được bào tử của vi khuẩn gây rối loạn tiêu hóa *B. cereus*, một loại vi khuẩn tìm thấy nhiều trong các loại thực phẩm, đặc biệt là thực phẩm từ gạo. Vì vậy, enterocin AS-48 đã và đang được nghiên cứu nhằm ứng dụng để bảo quản nhiều loại thực phẩm khác nhau như: thịt, sữa, các sản phẩm dinh dưỡng cho trẻ em, các sản phẩm chế biến từ gạo hay các sản phẩm nước hoa quả.

Dựa trên những đặc điểm sinh học và đặc tính ưu việt của AS-48 trong việc bảo quản nông sản thực phẩm, chúng tôi nhận thấy, việc tổng hợp chất bảo quản sinh học này là rất cần thiết. Quá trình tổng hợp này hoàn toàn có thể tiến hành bằng con đường tái tổ hợp mà không cần đòi hỏi quá trình phân lập chủng từ tự nhiên. Việc loại bỏ bước phân lập DNA hệ gen từ chủng vi sinh vật tự nhiên được dựa trên trình tự DNA đã có trên GenBank và kỹ thuật PCR tự môi. Các công việc tiếp theo của quá trình biểu hiện cũng được tiến hành tương tự như quá trình thiết kế để biểu hiện gen bình thường khác nhằm mục đích cuối cùng là tạo ra chủng *E. coli* tái tổ hợp có khả năng tổng hợp sản phẩm enterocin AS-48 cao.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật

Chủng *E. coli* DH5 α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZM15)*] (Invitrogen) được sử dụng để nhân dòng gen. Chủng *E. coli* ER2566 [*fhuA2 [lon] ompT gal sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10--Tet^S) endA1 Δ (mcrC-mrr)114::IS10*] (BioLabs) được sử dụng để biểu hiện.

DNA và hệ vector

Vector pJET1 (Fermentas) được sử dụng để tạo dòng gen. Hệ vector pTWIN1 (hãng BioLabs) được sử dụng cho mục đích biểu hiện gen. Trình tự gen mã hóa cho enterocin AS-48 được lấy trên GenBank với mã ký hiệu DQ1988088.

Tổng hợp gen *as-48*

Dựa trên trình tự có sẵn của gen *as-48* gồm 210 cặp nucleotide trên GenBank, 2 cặp mỗi được thiết kế để tổng hợp gen *as-48*. Cặp mỗi 1 là cặp mỗi dài

với trình tự DNA được gổì lên nhau. Cặp mỗi 2 là cặp mỗi ngắn, được thiết kế thêm vị trí cắt của enzyme hạn chế *SapI* để nối ghép gen sau này. Cả hai cặp mỗi trên đều được tổng hợp bởi hãng Amersham Pharmacia Biotech (Bảng 1). Quá trình tổng hợp gen gồm 2 giai đoạn:

Giai đoạn 1 (tạo đoạn gen): Với 2 cặp mỗi dài được thiết kế gổì lên nhau, đoạn oligonucleotide được tổng hợp bằng kỹ thuật PCR tự môi với các bước tuần tự như sau: 94°C - 2 phút, 37°C - 1 phút, 72°C - 20 giây.

Giai đoạn 2: Nhân gen bằng kỹ thuật PCR bình thường với gen khuôn là sản phẩm PCR của giai đoạn 1: 25 chu kỳ 94°C - 2 phút, 62°C - 30 giây, 72°C - 20 giây. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 6 phút.

Thiết kế hệ vector biểu hiện mang gen *as-48* (pTWIN1-AS48)

Sản phẩm tổng hợp gen *as-48* trên được nối ghép với vector pJET1 và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Các dòng plasmid đã chọn lọc được cắt kiểm tra bằng cặp enzyme hạn chế *PstI* và *SapI* và xác định trình tự DNA đó.

Sau đó, gen *as-48* trong vector tạo dòng được cắt thu và nối ghép vào vector biểu hiện pTWIN1 bằng vị trí cắt của enzyme *SapI*. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E. coli* ER2566 và cắt kiểm tra bằng enzyme hạn chế *PstI*.

Biểu hiện gen

Gen *as-48* được biểu hiện trong hệ vector pTWIN1 trên promoter mạnh T7. Chủng tế bào biểu hiện *E. coli* cũng tương tự như trong tế bào *E. coli* BL21 (Trần Ngọc Tân *et al.*, 2007a).

Western blot

Sau khi điện di protein để kiểm tra, sản phẩm protein dung hợp Intein-As48 biểu hiện được xác định bằng phương pháp Western blot về cơ bản giống như đã mô tả trước đây (Trần Ngọc Tân *et al.*, 2007b0). Tuy nhiên, trong thí nghiệm này, kháng thể 1 (BioLabs) được sử dụng là kháng thể kháng với vùng protein chitin. Độ pha loãng của kháng thể này là 5000 lần. Kháng thể thứ 2 là kháng thể kháng thỏ (BioLabs) đã được cộng hợp với peroxidase dùng để nhận biết và được sử dụng với độ pha loãng 10000 lần.

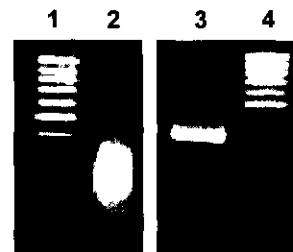
Bảng 1. Trình tự DNA các cặp mồi.

STT	Tên mồi	Trình tự DNA	Chú thích
1	AS48-F	ctt cag ttt ttg cca att gca cat atg gct aaa gag ttc ggt ata cca gca gca gtt gca gga act gtg ctt aat gta gtt gaa gct ggt gga tgg gtc act act att gtt tca att ctt act	Mồi dài, đầu xuôi
2	AS48-R	cca agc aat aac tgc tct ttt tcc ttt ttt ctt aat ttc ttt ctt aag gta tgc ttt aat tga ctc tct tcc tgc tgc agc aag taa aga aag acc tcc act acc tac agc agt aag aat tga aac aat	Mồi dài, đầu ngược
3	AS48F/SapI	ggt ggt tgc tct tcc aac ctt cag ttt	Mồi ngắn, đầu xuôi, thêm trình tự cắt enzyme hạn chế SapI
4	AS48R/SapI	ggt ggt tgc tct tcc gca cca agc aat	Mồi ngắn, đầu ngược, thêm trình tự cắt enzyme hạn chế SapI

KẾT QUẢ

Tổng hợp gen *as-48*

Dựa trên trình tự DNA trên GenBank (mã số DQ1988088), chúng tôi đã thiết kế 2 cặp mồi sử dụng để tổng hợp gen *as-48* mà không cần trình tự khuôn của gen này. Để tổng hợp gen thành công, quá trình này được thiết lập bao gồm hai giai đoạn chính. Giai đoạn 1 là việc tạo gen khuôn từ cặp mồi dài bằng kỹ thuật PCR tự mồi. Giai đoạn 2 là việc nhân gen bằng kỹ thuật PCR với đoạn DNA khuôn chính là sản phẩm của giai đoạn 1. Bằng DNA thể hiện trên đường chạy số 2, hình 1 đã cho thấy sản phẩm tự mồi chứa khá nhiều đoạn DNA với kích thước khác nhau, trải dài từ 80 đến 400 bp. Do vậy, để tiến hành thu được sản phẩm DNA đủ điều kiện cho tách dòng gen *as-48*, chúng tôi đã thiết kế thêm cặp mồi ngắn nhằm sử dụng chính sản phẩm DNA của kỹ thuật PCR tự mồi làm khuôn. Sản phẩm của giai đoạn 2 được thể hiện trên đường chạy số 3 là băng DNA khá đặc hiệu với kích thước tương đương với kích thước mong muốn (khoảng 0,22 kb). Kết quả cuối cùng của kỹ thuật PCR đã khẳng định, sản phẩm này là phù hợp với tính toán lý thuyết và đủ điều kiện để tiến hành tách dòng gen.



Hình 1. Kết quả kiểm tra sản phẩm tổng hợp gen trên gel agrose 1,7%. 1, 4: Thang DNA chuẩn 100 bp (Fermentas); 2: Sản phẩm PCR tự mồi; 3: Sản phẩm PCR bình thường.

Thiết lập hệ vector tách dòng và biểu hiện mang gen *as-48*

Sau khi đã tổng hợp được các đoạn DNA với kích thước mong muốn, các sản phẩm này được nối ghép trực tiếp vào vector tách dòng pJET1. Với đặc tính tối ưu là khả năng tạo dòng gen từ sản phẩm của kỹ thuật PCR, vector này có khả năng ghép nối với các đoạn DNA đầu bằng. Hơn nữa, sau khi biến nạp, chỉ có những dòng tế bào mang gen mới có khả năng sinh trưởng trên môi trường chọn lọc. Đặc tính đặc biệt này được tạo ra do vị trí chọn dòng nằm trong

lòng gen gây độc cho tế bào *E. coli*, gen *Eco47IR*. Vì vậy, các dòng tế bào khi được chọn lọc đều mang đoạn DNA ngoại lai.

Quá trình tạo dòng gen được tiếp tục bằng việc kiểm tra sản phẩm plasmid trong mỗi dòng tế bào đã chọn lọc. Bước kiểm tra đầu tiên là việc cắt các sản phẩm plasmid bằng enzyme hạn chế *PstI* và *SapI*. Kiểm tra sản phẩm cắt trên gel 1,7% agarose cho thấy, từ 24 dòng plasmid, có 4 dòng plasmid tạo sản phẩm cắt phù hợp như tính toán. Các dòng plasmid này được đọc trình tự DNA và so sánh trình tự đã đọc được với trình tự lý thuyết của gen *as-48* để xác định dòng plasmid mang gen chính xác nhất. Kết quả so sánh trình tự DNA cả 4 dòng đã chứng minh, các dòng gen này đều có trình tự giống nhau và hoàn toàn tương đồng với trình tự gen *as-48* lý thuyết. Cả 4 dòng đều có thể sử dụng cho mục đích thiết lập hệ vector cho biểu hiện gen *as-48*. Vì vậy, 1 trong 4 dòng tế bào mang gen *as-48* được chọn ngẫu nhiên cho mục đích thiết lập hệ biểu hiện.

Quá trình thiết lập hệ biểu hiện cũng có nhiều điểm tương tự với quá trình tạo dòng. Tuy nhiên, trong quá trình này, hai vị trí cắt của enzyme *Sap I* nằm trên 2 đầu 5' của cặp môi ngắn được sử dụng làm điểm cắt và ghép nối vào vector biểu hiện pTWIN1. Kết quả quá trình thiết lập hệ biểu hiện cũng được xác định bằng việc cắt kiểm tra bằng chính vị trí cắt của enzyme *SapI* và một vị trí cắt của enzyme khác, *PstI*. Dựa vào tính toán lý thuyết, chúng tôi đã chọn được dòng tế bào mang hệ vector biểu hiện chứa gen *as-48* là các dòng có plasmid không bị cắt bởi enzyme *SapI* và tạo bằng DNA sản phẩm (0,9 và 6,7 kb) đối với *PstI*. Với kết quả đó, chúng tôi đặt tên vector biểu hiện mang gen *as-48* là vector pTWIN1-AS48.

Biểu hiện gen *as-48* trong tế bào *E. coli* ER2566

Như đã miêu tả trong phần phương pháp, trong quá trình chọn lọc vector biểu hiện, plasmid pTWIN1-AS48 đã được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E. coli* ER2566. Đây là dòng tế bào biểu hiện tương thích với hệ vector pTWIN1. Vì vậy, sau khi chọn lọc được vector biểu hiện, các dòng tế bào mang hệ vector này được biểu hiện ngay. Kết quả kiểm tra với 3 dòng tế bào mang vector pTWIN1-AS48 (Hình 2, đường chạy 2 đến 4) cho thấy, các dòng tại đường chạy số 2 và số 3 cho khả năng biểu hiện tốt hơn tại đường chạy số 4. Bằng protein biểu hiện tại các đường chạy này có kích thước đúng như kích thước tính toán (khoảng 63 kDa). Do đó, với nồng độ protein và kích thước tương ứng, có thể

khẳng định bước đầu rằng gen *as-48* đã biểu hiện thành công.

Western blot

Trong quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp, một điểm thiết yếu cần phải xác định là protein tái tổ hợp biểu hiện phải chính xác là protein mong muốn. Để khẳng định điều đó, không đơn giản là việc xác định lượng protein được biểu hiện qua bằng protein biểu hiện mà còn phải dựa trên các đặc điểm khác. Một trong những kỹ thuật để xác định protein tái tổ hợp đã được biểu hiện là kỹ thuật Western blot.

Trong thí nghiệm này, dựa trên đặc tính của hệ biểu hiện pTWIN1 là sự dung hợp protein đích với 2 protein intein và với protein gắn kết với chitin. Protein đích đã được biểu hiện trong vô số sản phẩm protein khác nhau được xác định gián tiếp qua protein gắn kết chitin. Dựa vào sản phẩm kháng thể kháng protein gắn kết chitin (kháng thể 1) đã được thương mại, protein dung hợp được nhận biết bằng kỹ thuật Western blot (Hình 3).

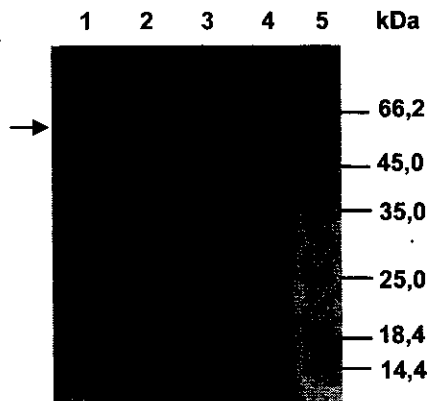
Kết quả xác định protein biểu hiện trên hình 3 cho thấy, hệ protein dung hợp được thể hiện là một băng với kích thước đúng như tính toán (63 kDa). Mặc dù, lượng protein biểu hiện (đường chạy số 3) là khá nhỏ khi so sánh với protein đối chứng (đường chạy số 2) nhưng vẫn cho phép khẳng định protein AS-48 đã được biểu hiện thành công trong hệ vector pTWIN1.

THẢO LUẬN

Trong công trình nghiên cứu này, yêu cầu đầu tiên đặt ra cho việc thiết lập hệ biểu hiện là khả năng tạo vòng của sản phẩm protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện. Điều này đặc biệt quan trọng để enterocin AS-48 có thể hình thành được cấu trúc không gian đồng thời với việc duy trì được hoạt tính sinh học vốn có. Tuy nhiên, cấu trúc dạng vòng mà chúng tôi đề cập trong công trình này phải là cấu trúc vòng của protein. Cấu trúc ấy hình thành nhờ cầu nối peptide giữa đầu N của amino acid đầu và đầu C của axit cuối (Craik *et al.*, 2003). Các mối liên kết khác hình thành nên phân tử protein dạng vòng, ví dụ như cầu nối lưu huỳnh giữa 2 amino acid cysteine, đều không được coi là protein vòng.

Để có thể tạo ra sản phẩm protein vòng, chúng tôi đã tiến hành chọn hệ pTWIN1 làm vector biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli*. Ưu điểm quan trọng nhất của hệ vector này là trình tự DNA mã hóa

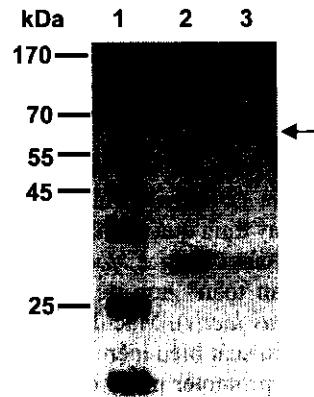
cho 2 protein intein có thể dung hợp protein đích là Ssp DnaB và Mxe GyrA. Hai intein này vừa đóng vai trò ổn định cho cơ thể chủ với những protein đích có tính độc vừa có thể tự cắt bằng các điều kiện khác nhau để tách ra sản phẩm protein biểu hiện riêng biệt (Ssp DnaB cắt bởi điều kiện pH thấp, Mxe GyrA cắt bằng Dithiothreitol) (Evans *et al.*, 1999). Hơn thế nữa, dựa vào đặc tính tự cắt của intein, sản phẩm protein đích sau khi bị cắt ra khỏi 2 intein ở 2 đầu có thể hình thành được mối liên kết peptide giữa amino acid đầu và cuối để tạo ra protein vòng. Do đó, hệ biểu hiện pTWIN được chúng tôi lựa chọn để sử dụng trong quá trình biểu hiện tạo enterocin AS-48 tái tổ hợp (Hình 4). Quá trình này được bắt đầu bằng việc thiết kế đưa trình tự DNA mã hóa cho gen *as-48* vào trong vùng trình tự đa nối của vector và tiến hành biểu hiện. Protein vòng sẽ là sản phẩm cuối cùng sau khi sản phẩm protein biểu hiện là protein dung hợp được tinh chế và cắt lần lượt 2 intein trên cột ái lực chitin.



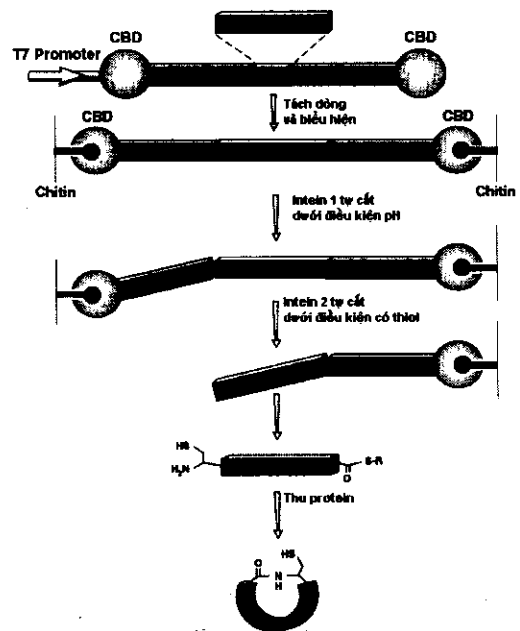
Hình 2. Kiểm tra khả năng biểu hiện gen *as-48* trên gel 12% polyacrylamide. 1. Dòng *E. coli* mang vector pTWIN1; 2-4. Dòng *E. coli* mang vector pTWIN1-AS48; 5. Thang protein chuẩn (Fermentas).

Ngoài ra, một vấn đề đặt ra đối với việc biểu hiện protein AS-48 là sản phẩm protein vòng rất độc với chính tế bào biểu hiện: *E. coli*. Trong tự nhiên, enterocin AS-48 có phổ kháng khuẩn khá rộng. Trong số các loại vi khuẩn mà enterocin này có thể ức chế như *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*..., vi khuẩn *E. coli* cũng bị ức chế (Gaslvez *et al.*, 1989). Vì vậy, khi tiến hành biểu hiện enterocin này trong tế bào *E. coli*, sản phẩm protein tái tổ hợp có thể ức chế ngược lại tế

bào chủ mang gen *as-48*. Điều lo ngại này hoàn toàn có cơ sở với những trường hợp biểu hiện protein mang độc tính cao với các dòng tế bào *E. coli*, ví dụ như các protein độc tố, các protein kháng nguyên của virus...



Hình 3. Phân tích sự biểu hiện của protein AS-48 bằng kỹ thuật Western blot. 1. Thang protein chuẩn SM0671 (Fermentas); 2. Protein từ chủng mang vector pTWIN1; 3. Protein từ chủng mang vector pTWIN1-AS48.



Hình 4. Mô hình quá trình tiến hành biểu hiện và tinh chế thu protein vòng. CBD: Vùng protein gắn với hạt chitin; Target protein: protein đích; MCS: vùng gen đa nối.

Tuy nhiên, để giải thích cho việc biểu hiện protein độc tính với tế bào chủ, có 2 lý do cho việc này. Thứ nhất, protein AS-48 chỉ có hoạt tính khi nó hình thành được cấu trúc vòng. Với hệ biểu hiện pTWIN, cấu trúc vòng của protein chỉ hình thành sau bước tự cắt của intein 2 dưới điều kiện của thiol (Perler *et al.*, 1994). Thứ 2, protein AS-48 không được biểu hiện độc lập mà được biểu hiện dung hợp với trình tự 2 intein ở 2 đầu. Do đó, chỉ khi nào protein dung hợp được cắt rời 2 intein, protein mới có thể bộc lộ được hoạt tính vốn có.

Vì cấu trúc vòng đặc biệt của AS-48, Fernández và đồng tác giả (2006) đã chuyển plasmid pMB2 mang 10 gen quy định quá trình sinh tổng hợp AS-48 trong tự nhiên của chủng *E. faecalis* sang chủng vi khuẩn lactic “an toàn” hơn để biểu hiện enterocin này (*Lactococcus lactis*). Mặc dù đã biểu hiện thành công nhưng hiệu suất biểu hiện với gen này khá thấp vì không có hệ promoter mạnh điều khiển. Hơn nữa, để thu được sản phẩm AS-48 cần đòi hỏi quá trình tinh chế khá phức tạp với hệ thống HPLC. Trong khi đó, việc biểu hiện AS-48 dạng dung hợp trong tế bào *E. coli* đã cho thấy tính ưu việt bởi tốc độ sinh trưởng nhanh và khả năng tạo protein dung hợp hiệu quả. Kết quả biểu hiện đã được thể hiện bởi băng protein dung hợp với lượng khá lớn trong protein tổng số trên hình 2, phần kết quả.

Tuy nhiên, với các kết quả đã nêu trên, AS-48 mới chỉ biểu hiện thành công dạng protein dung hợp. Để có thể tạo ra sản phẩm AS-48 có hoạt tính, sản phẩm protein dung hợp trên phải được tinh chế qua cột ái lực chitin (Hình 4). Sau 2 bước cắt bỏ intein dưới điều kiện pH và DTT, AS-48 mới có thể hình thành được cấu trúc tự nhiên là cấu trúc dạng vòng. Hoạt tính kháng khuẩn của AS-48 tái tổ hợp có thể xác định sơ bộ bằng vòng kháng khuẩn trên đĩa môi trường đặc.

KẾT LUẬN

Như vậy, với mục tiêu tạo ra sản phẩm enterocin AS-48 bằng con đường tái tổ hợp, gen *as-48* đã được tiến hành tổng hợp thành công dựa trên quá trình PCR hai bước. Kết quả này cho phép tổng hợp các đoạn gen ngắn khác mà không cần trình tự DNA khuôn. Hơn thế nữa, với những kết quả bước đầu đã đạt được trong việc biểu hiện loại protein ngắn này còn gợi mở ra hướng biểu hiện tốt cho các protein độc khác trong tế bào *E. coli*.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự

tài trợ kinh phí của Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn chủ trì thông qua dự án “Nghiên cứu công nghệ sản xuất và sử dụng chất diệt khuẩn sinh học (Nisin và Enterocin) dùng trong bảo quản nông sản thực phẩm”. Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Charles MAPF, Belkum MJV, Holzapfel WH, Abriol H, Galvez A (2006) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* 31: 293-310.
- Chen H, Hoover DG (2003) Bacteriocins and their food application. *CRFSFS* 2: 82-100
- Craik DJ, Daly NL, Saska I, Trabi M, K. Johan Rosengren (2003) Structures of naturally occurring circular proteins from bacteria. *J Bacteriol* 185(14): 4011-4021.
- Evans CT, Benner J, Xu MQ (1999) The cyclization and polymerization of bacterially expressed proteins using modified self-splicing Interins. *J Biol Chem* 274(26): 18359-18363.
- Fernández M, Martínez-Bueno M, Martín MC, Valdivia E, Maqueda M (2006) Heterologous expression of enterocin AS-48 in several strains of lactic acid bacteria. *J Appl Microbiol* 102: 1350-1361.
- Gaslvez A, Maqueda M, Martínez-Bueno M, Valdivia E (1989) Bactericidal and bacteriolytic action of peptide antibiotic AS-48 against gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms. *Res Microbiol* 140(1): 57-68.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12: 39-85.
- Perler FB, Davis EO, Dean GE, Gimble FS, Jack WE, Neff N, Noren CJ, Thorner J, Belfort M (1994) Protein splicing elements: inteins and exteins – a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucl Acids Res* 22(7): 1125-1127.
- Richard C, Drider D, Elmorjani K, Marion D, Prevost H (2004) Heterologous expression and purification of active divercin V41, a class IIa bacteriocin encoded by a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186(13): 4276-4284.
- Samyn B, Martinez-Bueno M, Devreese B, Maqueda M, Galvez A, Vaddivia E, Coyette J, Beeumen JV

(1994) The cyclic structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *FEBS Lett* 352: 87-90.

Trần Ngọc Tân, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải (2007a) Biểu hiện gen neuraminidase mã hóa cho phần epitope kháng nguyên (Nae) của virus cúm A/H5N1 trong tế bào *E. coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(1):

25-30.

Trần Ngọc Tân, Trần Thị Mỹ Hạnh, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải (2007b) Biểu hiện gen mã hóa cho protein matrix 1 của virus cúm A/H5N1 trong tế bào *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(4): 425-430.

SYNTHESIS AND EXPRESSION OF A GENE ENCODING CIRCULAR ENTEROCIN AS-48 IN *ESCHERICHIA COLI*

Trần Ngọc Tân¹, Đinh Thị Thu Hằng², Nguyễn Thanh Nhân¹, Phạm Thụy Linh³, Đỗ Thị Huyền¹, Lê Văn Trường¹, Trương Nam Hải^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology, VAST*

²*Hanoi University of Natural Sciences, VNU*

³*Institute of Chemistry, VAST*

SUMMARY

Enterocin AS-48 is a 70 amino acid circular peptide produced by *Enterococcus faecalis* and it shows broad spectrum of anti-microbial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. In order to produce the peptide, the *as-48* gene sequence was designed from GenBank and the 210 base pairs gene was artificially synthesized in two steps PCR. In the step 1, two long primers with over-lapping sequences served as DNA template and in the step 2, two short primers were used to amplify *as-48* gene by PCR. The PCR product was cloned into pJET1 vector and sequencing confirmed presence of 210 nucleotides as expected. To produce the recombinant mature enterocin AS-48 peptide, the synthetic gene was cloned to the expression vector pTWIN under the control of T7 RNA promoter in *E. coli* ER2566. The recombinant AS-48 peptide was expressed as a fusion protein with 2 intein on either side (N and C terminal). The fusion protein was 63 kDa on SDS-PAGE and reacted with chitin antibody in Western blot, thus confirming its identity. This paper described the first design of synthetic gene *as-48* and the fusion enterocin AS-48 peptide with promising antibacterial properties on agar plates.

Keywords: Circular peptide, enterocin AS-48, expression, *Escherichia coli* ER2566

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562790; Fax: 84-4-38363144; E-mail: tnhai@hn.vnn.vn