

TÁCH DÒNG VÀ THIẾT KẾ VECTO¹ BIỂU HIỆN GIE² NAGA TRONG HỆ EUKARYOTE

NGUYỄN HOÀNG DƯƠNG, PHẠM VIỆT CƯỜNG, NGUYỄN THỊ KIM CÚC

1. MỞ ĐẦU

Amino sugars D-glucosamine (GlcN) và N-acetyl-Dglucosamine (GlcNAc) là nguồn cacbon và nitơ cho vi khuẩn, và cũng là những thành phần quan trọng của peptidoglycan thành tế bào vi khuẩn và của lipopolysaccharide thành ngoài tế bào vi khuẩn Gram âm.

Bước đầu tiên trong con đường sinh tổng hợp các tiền chất amino-sugar cần thiết cho sinh tổng hợp peptidoglycan và teichoic acid thành tế bào ở *Bacillus subtilis* là loại gốc acetyl của GlcNAc1-6-P, tạo thành acetate và GlcN-6-P. Phản ứng này được xúc tác bởi enzym N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25) NagA. Các enzym tham gia vào loại este, loại acetyl (deesterification/de-N-acetylation) từ các hợp chất carbohydrates được sắp xếp vào 13 họ dựa trên sự giống nhau trình tự amino acid. Tất cả các enzym tham gia vào khử acetyl đều nằm trong một họ riêng có trình tự giống nhau gọi là CE-9. Cho đến tháng 11/2003, đã có 134 thành viên, phần lớn có nguồn gốc từ vi khuẩn.

N-acetyl-D-glucosamine deacetylase cũng tác động lên nhóm acetamido của N-acetyl-D-glucosamine để tạo thành D-glucosamine, một vật liệu có ích trong các lĩnh vực thuốc, công nghiệp, nông nghiệp và thực phẩm. D-glucosamine gần đây được chú ý rất nhiều, đặc biệt như nguyên liệu ban đầu để sản xuất glucosaminoligosaccharides có các hoạt tính sinh lý như kháng khuẩn và kháng khối u.

Phương pháp thông thường để sản xuất D-glucosamine bao gồm thủy phân chitin và loại acetyl của N-acetyl-D-glucosamine bằng hóa chất. Các loại kiềm đặc và acid vô cơ được sử dụng trong quá trình thủy phân. Nhưng khi sử dụng các hóa chất này, các liên kết cần thiết cũng bị tách ra đồng thời với sự loại bỏ acetyl, và làm giảm năng suất tạo D-glucosamine. Phương pháp này cũng có những hạn chế là khi xử lý bằng acid hoặc kiềm, giá của thành phẩm sẽ rất đắt.

Các nhà khoa học đề nghị phương pháp khác để khử nhóm acetyl của N-acetyl-D-glucosamine bằng cách sử dụng enzym (ví dụ: deacetylase), chỉ hoạt động riêng trên N-acetyl-D-glucosamine dưới các điều kiện nhẹ nhàng mà không tạo các sản phẩm phụ. Vì vậy, trong bài báo này, gen *NagA* từ *E.coli* đã được tách dòng, giải trình tự, và thiết kế vectơ biểu hiện mang gen *NagA* nhằm nhận được protein này cho những nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

ADN tổng số từ tế bào *E. coli* DH5 được dùng làm khuôn cho việc khuếch đại gen *NagA*. Plasmid pTZ57R/T (Invitrogen, Germany) được sử dụng làm vectơ nhân dòng gen.

Plasmid pESC-His (Stratagene, USA) được sử dụng để làm hệ vectơ biểu hiện trong nấm men *S. cereviceae*

Escherichia coli DH5: được sử dụng làm chủng nhân dòng gen.

Cặp mồi *NagAR* và *NagAF* được thiết kế để khuếch đại gen *NagA*

Các cặp mồi *GALI_R/GALI_F* và *GAL10_R/GAL10_F* được dùng để kiểm tra sự có mặt của gen *NagA* trong vector pESC-His

Ngoài ra, các hóa chất và dụng cụ cần thiết có độ tin cậy cao được dùng để phục vụ cho quá trình nghiên cứu. Thí nghiệm được thực hiện tại phòng Vi sinh phân tử, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tách ADN tổng số từ *E. coli*

ADN tổng số tách chiết từ *E. coli* DH5 được dùng làm khuôn cho việc khuếch đại đoạn gen *NagA*. Phương pháp tách chiết dựa trên quy trình của Sam Brook và cs (2001) [11].

2.2.2. Nhân dòng plasmid tái tổ hợp pTZ57R/T-*NagA*

Mẫu ADN tổng số từ *E. coli* được pha loãng 10 lần, lấy 1ml làm template cho phản ứng PCR khuếch đại gen *NagA* với cặp mồi *NagAR/NagAF* với quy trình: 93°C; 3 phút, 93°C; 30 giây, 58°C; 1 phút, 72°C; 1 phút 20 giây, lặp lại 20 chu kỳ, 72°C; 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được gắn với vector nhân dòng pTZ57R/T theo hướng dẫn của hãng Invitrogen. Sản phẩm lai được giữ ở -20°C và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 (được xử lý bằng CaCl₂ 100 mM) bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong thời gian 40 giây, và cấy trải trên môi trường LB đặc (tryptone - 1%; yeast extract - 0,5%; NaCl - 1%; agar - 2%) có bổ sung Ampicillin nồng độ 100 µg/ml, ủ ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Một số dòng khuẩn lạc được lựa chọn, hoạt hóa qua đêm và plasmid tái tổ hợp được tách bằng bộ kit QIA gene. Plasmid được sử dụng làm template cho phản ứng PCR bằng cặp mồi *NagAR/NagAF* và cắt bằng enzym giới hạn *XhoI* và *HinIII* để kiểm tra sự có mặt của gen ngoại lai. Kết quả được thể hiện trên điện di đề gel agarose 1% sau khi nhuộm bằng ethidium bromide và soi dưới tia UV với bước sóng 320 nm. Dòng plasmid được lựa chọn sau khi tinh sạch được giải trình tự bằng máy xác định trình tự gen tại Viện Công nghệ Sinh học. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm Bioedit 3.0 và so sánh với các trình tự tương tự trong Ngân hàng gen Quốc tế.

2.2.3. Thiết kế vector biểu hiện pESC-His/*NagA*

Plasmid tái tổ hợp pTZ57R/T-*NagA* và pESC-HIS được xử lý bằng hai enzym giới hạn *XhoI* và *BamHI* (đây là 2 enzym được thiết kế nằm ở hai đầu của gen *NagA* và nằm ở vùng đầu tiên cắt thứ 2 của vector pESC-His (MCS 2))

Sau khi ủ ở 37°C trong 2 giờ, sản phẩm cắt được kiểm tra trên gel agarose 1%. Gen *NagA* và pESC-His mở vòng được thu hồi bằng phương pháp thôi gen theo bộ kit của QIA gene. Gen *NagA* được gắn (ligation) với vector pESC-His mở vòng, trong tổng thể tích 10 µl (3 µl *NagA* 1,5 µl, pESC-His, 1 µl Buffer II (10x), 1 µl BSA, 1 µl enzym T4 ADN ligase và 5,5 µl H₂O khi ion). Quá trình gắn được tiến hành qua đêm ở 4°C. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* bằng phương pháp hóa học [12] và chọn lọc trên môi trường LB đặc có bổ sung Ampicilline 100 µg/ml. Môi trường LB lỏng + Ampicilline được dùng để hoạt hóa các dòng khuẩn lạc chọn lọc, tách ADN plasmid theo bộ kit của QIA gene và tiến hành PCR để kiểm tra bằng cặp mồi *GALI*. Plasmid được giữ ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

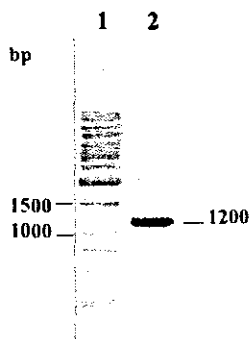
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách dòng gen *NagA*

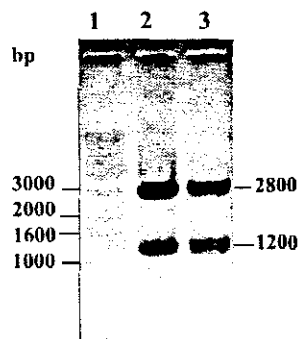
ADN tách chiết từ *E. coli* bằng phương pháp hóa học (NaOH và SDS), độ tinh sạch của ADN được đo bằng quang phổ hấp kế ở bước sóng 280 nm và 260 nm (hình 1). Dịch pha loãng ADN tổng số từ *E. coli* được dùng để làm khuôn cho việc tổng hợp gen *NagA* bằng phản ứng PCR dựa trên cặp mồi *NagAR/F*. Theo lý thuyết, gen *NagA* có kích thước khoảng 1200 bp. Kết quả PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% cho thấy, sản phẩm thu được là một băng đặc hiệu có kích thước như tính toán lý thuyết (hình 2). Sản phẩm PCR được gắn trực tiếp vào vectơ tách dòng pTZ57R/T đã mở vòng và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10. Để kiểm tra việc gắn gen *NagA* vào vectơ pTZ57R/T, plasmid tái tổ hợp đã được tách từ một số dòng tế bào *E. coli*, và được sử dụng như template cho phản ứng PCR với primers *NagAR/F* (hình 3) và được cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI* và *HindIII* (là 2 enzym được thiết kế nằm trên vectơ pTZ57R/T). Kết quả PCR và cắt bằng 2 enzym giới hạn *EcoRI* và *HindIII* đều thu được một băng đặc hiệu có kích thước khoảng 1200 bp, đúng với kích thước dự tính của gen *NagA*. Trình tự gen được xác định bởi máy giải trình tự tự động và trình tự nhận được có độ tương đồng cao (> 99%) khi so sánh với các trình tự gen *NagA* khác trên GenBank. Bởi vậy, có thể khẳng định việc gắn thành công và tạo dòng gen *NagA* trong vectơ pTZ57R/T.



Hình 1.
Ảnh điện di
ADN tổng số



Hình 2.
Ảnh điện di sản phẩm PCR
1. Marker ADN 1kb
2. Sản phẩm PCR gen *NagA*
bằng cặp mồi *NagAR/F*

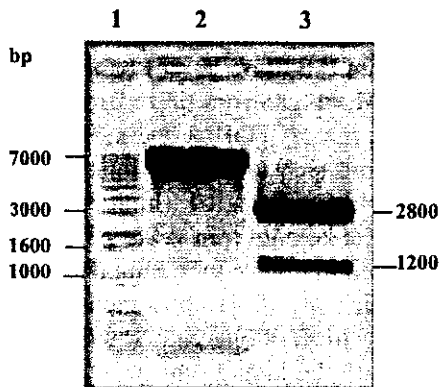


Hình 3.
Ảnh điện di sản phẩm cắt bằng
enzym *EcoRI* và *HindIII*
1. Marker ADN 1kb
2. Sản phẩm cắt pTZ57R/T-*NagA*

3.2. Thiết kế vectơ biểu hiện pESC-HIS/*NagA*

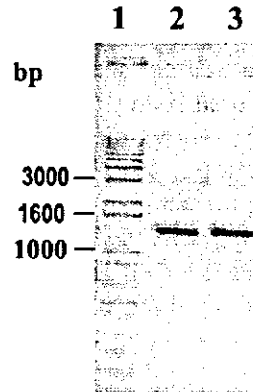
Như đã trình bày ở phần phương pháp, gen *NagA* được chuyển từ vectơ tách dòng (pTZ57R/T-*NagA*) sang vectơ biểu hiện trong hệ eukaryote (pESC-His) bằng cách cắt đồng thời cả 2 plasmids với hai enzym là *XhoI* và *BamHI*. Theo tính toán lý thuyết, vectơ biểu hiện khi bị cắt bởi 2 enzym trên sẽ mở vòng và trên điện di đồ sẽ cho một băng với kích thước ~6,7 kb, còn vectơ tách dòng pTZ57R/T-*NagA* sẽ cho 2 băng trên điện di đồ, tương ứng với gen *NagA* ~1200 bp và vectơ có kích thước 2800 bp. Kết quả thu được hoàn toàn phù hợp với lý thuyết (hình 4). Gen *NagA* và vectơ pESC-HIS mở vòng được thu lại bằng phương pháp thổi gel và nối lại với nhau nhờ sự giúp đỡ của enzym *T₄* ADN ligase. Vectơ tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli*. Tách ADN plasmid từ 2 dòng tế bào ngẫu nhiên và kiểm tra bằng phương pháp

PCR với cặp mồi đã được thiết kế trên vector pESC-HIS (*GALI_R/GALI_F*). Kết quả trên hình 5 cho thấy, kích thước sản phẩm PCR (giếng số 2 và số 3) khoảng 1500 bp bao gồm gen *NagA* (1200 bp) và đoạn oligonucleotit (288 bp) trên vector do cặp mồi *GALI* tạo ra. Như vậy bước đầu có thể khẳng định rằng gen *NagA* đã được tách dòng thành công trong hệ vector biểu hiện pESC-His.



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm cắt bằng enzymes *XhoI* và *BamHI*

1. Marker 1kb
2. Sản phẩm cắt của pESC-His
3. Sản phẩm cắt của pTZ57R/T-*NagA*



Hình 5. Ảnh điện di kiểm tra sự có mặt của gen *NagA* trong pESC-His bằng cặp mồi *GALI*

1. Marker 1kb
2. Sản phẩm PCR dòng chọn lọc số 1
3. Sản phẩm PCR dòng chọn lọc số 2

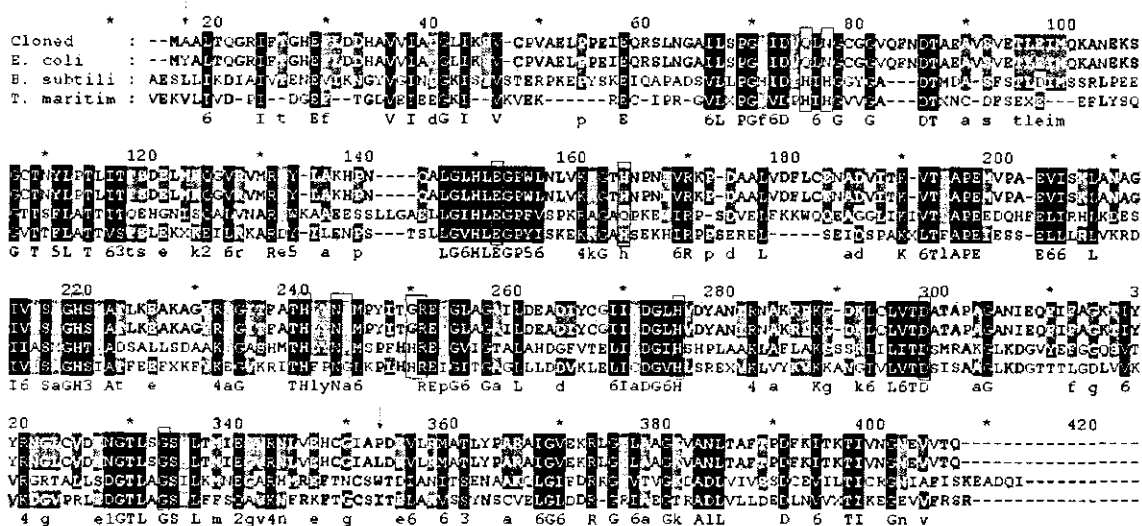
Plasmid tái tổ hợp pESC-His/*NagA* được tinh sạch và giải trình tự bằng máy xác định trình tự, Viện Công nghệ Sinh học, Viện khoa học và Công nghệ Việt Nam. Kết quả phân tích và xử lý trình tự nhận được cho thấy, gen *NagA* có kích thước 1149 bp, gồm 1 khung đọc mở có bộ 3 mở đầu (ATG) và bộ 3 kết thúc (TAA) với độ tương đồng tới 99,56% so với gen *NagA* được công bố trên ngân hàng gen thế giới (X14135). Chúng tôi đã sử dụng phần mềm để dịch mã gen trên, thu được một peptit có 382 axit amin với trình tự như sau:

SQ SEQUENCE 382 AA; 40841 MW;

MAALTQGRIF TGHEFLDDHA VVIADGLIKS VCPVAELPPE IEQRSLNGAI LSPGFIDVQL
NGCGGVQFND TAEAVSVETL EIMQKANEKS GCTNYLPTLI TTSDELMKQG VRVMREYLAK
HPNQALGLHL EGPWLNLVKK GTHNPNFVRK PDAALVDFLC ENADVITKVT LAPEMVPAEV
ISKLANAGIV VSAGHSNATL KEAKAGFRAG ITFATHLYNA MPYITGREPG LAGAILDEAD
IYCGIIADGL HVDYANIRNA KRLKGD KLCL VTDATAPAGA NIEQFIFAGK TIYYRNLCLV
DENGTLSGSS LTMIEGVRNL VEHCGIAPDE VLRMATLYPA RAIGVEKRLG TLAAGKVANL
TAFTPDFKIT KTIVNGNEVV TQ

DENGTLSGSS LTMIEGVRNL VEHCGIAPDE VLRMATLYPA RAIGVEKRLG TLAAGKVANL
TAFTPDFKIT KTIVNGNEVV TQ

So với một số trình tự axit amin có độ tương đồng cao trong GeneBank, trình tự nhận được có 2 vị trí axit amin tương đối khác so với các trình tự trong ngân hàng gen: ở vị trí axit amin số 2, Adeine được thay bằng Tyrosine và ở vị trí 328, Proline thay bằng Leusine.



Hình 6. So sánh trình tự cấu trúc bậc một gen *NagA* của *Escherichia coli*, *Thermotoga maritima*, *Bacillus subtilis* và clone. Khoanh hình chữ nhật là vùng trung tâm hoạt động của enzym [4], cả hai vị trí axit amin số 2 và 328 đều không thuộc vào những vùng đó

Theo hình 6, và những nghiên cứu mới đây của Hall và cs [13] đã làm sáng tỏ hơn vị trí và vai trò của các axit amin trong cấu trúc bậc một (Glu-131, His-143, His-195, His-216, Arg-227, Asp-273, His-25) của *NagA* khi tham gia vào vùng trung tâm hoạt động và các vị trí quan trọng của enzym trong cấu trúc bậc bốn. Vị trí số 2 và 328 không thuộc vào một trong số những vị trí quan trọng trên, do đó bước đầu về mặt lí thuyết có thể kết luận rằng sự sai khác của hai axit amin ở vị trí số 2 và 328 không có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym *NagA*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Florence Vincent DY, Elspeth Garman, Gideon J. Davies, James A. Brannigan - The Three-dimensional Structure of the N-Acetylglucosamine-6-phosphate Deacetylase, *NagA*, from *Bacillus subtilis*, *The Journal of Biological Chemistry* **279** (2004) 2809-2816.
2. Naoko Yamano NH, Chieko Endo, Nami Sakata, Shizu Fujishima, Akihiko Maruyama, and Takanori Higashihara - Purification and Characterization of N-Acetylglucosamine-6-phosphate Deacetylase from a *Alteromonas* Species Psychrotrophic Marine Bacterium, *Mar Biotechnol* **2** (2000) 57-64.
3. Sunhwa Kim I. M., Katsumi Ajisaka, Harushi Nakajima, and Katsuhiko Kitamoto - Cloning and characteration of the *NagA* gene that encode beta-N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*, *Biosci Biotechnol Biochem* **66** (2002) 2168-2175.
4. Frederico M. Ferreira GM-H, Maria Castaneda-Bueno, Ricardo Aparicio, Hannes Fischer, Mario L. Calcagno, and Glaucius Oliva - Structural Analysis of N-acetylglucosamine-6-phosphate Deacetylase Apoenzyme from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* **359** (2006) 308-321.
5. Hiroshi Tsujibo N. T., Tadahisa Mikami, Ayako Hirasawa, Katsushiro Miyamoto, and Yoshiko Inamory - A Novel-N-Acetylglucosaminidase from *Streptomyces*

- thermoviolaceus* OPC-520: Gene Cloning, Expression, and Assignment to Family 3 of the Glycosyl Hydrolases, *Applied and Environmental Microbiology* **64** (1998) 2920-2924.
6. Bruno Diez MR-S, Juan Luis de la Fuente, Miguel Angel Moreno, Jose Luis Barredo - The *nagA* gene of *Penicillium chrysogenum* encoding beta-N-acetylglucosaminidase, *FEMS Microbiology Letters* **242** (2005) 257-264.
 7. Laura I. Alvarez-Anorve MLC, and Jacqueline Plumbbridge - Why Does *Escherichia coli* Grow More Slowly on Glucosamine than on N-Acetylglucosamine? Effects of Enzyme Levels and Allosteric Activation of GlcN6P Deaminase(NagB) on rowth Rates, *J. Bacteriol* **187** (2005) 2974-2982.
 8. Perry AJMaCM - Glucosamine A Review of its Use in the Management of Osteoarthritis, *Drugs Aging* **20** (2003) 1041-1060.
 9. Ming-De Deng DKS, Alan D. Grund, Sarah L. Wassink, Richard P. Burlingame, Alan Berry, Jeffrey A. Running, Candice A. Kunesh, Linsheng Song, Thomas A. Jerrell, Reinhardt A. Rosson - Metabolic engineering of *Escherichia coli* for industrial production of glucosamine and N-acetylglucosamine, *Metabolic engineering* **7** (2005) 201-214.
 10. Tao Wu S. Z., F. Ann Draughon, William S. Conay, and Carl E. Sams - Physicochemical Properties and Bioactivity of Fungal Chitin, *J. Agric Food Chem.* **53** (2005) 3888-3894.
 11. Sambrook J. EFF, T. Maniatis - Molecular cloning, Cold spring Harbor Laboratory Press, 2001.
 12. Frederick M. A. RB, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl - Short protocol in molecular biology, John Wiley and Sons, Inc., 1995.
 13. Hall R. S BS, Fedorov A. A, Fedorov E. V, Xu C, Babbitt P. C, Almo S. C, Raushel F. M. - Structural diversity within the mononuclear and binuclear active sites of N-acetyl-D-glucosamine-6-phosphate deacetylase, *Biochemistry* **46** (2007) 7953-7962.

SUMMARY

N-acetyl glucosamine-6-phosphate (GlcNAc6P) deacetylase is an enzyme of amino sugar catabolic pathway that catalyzes the conversion of the GlcNAc6P into glucosamine 6-phosphate (GlcN6P). Depending on the sequence similarities, NagA were divided into 13 families. The enzyme was found in various species such as *Escherichia coli*, *Bacillus*, mouse, and human. Event not similarities in nucleotide lenghs (1.2 - 1.8 bp) and function in own body, but they share bioactive property that catalyze conversion of GlcNAc6P into GlcN6P. In this study, the *NagA* from *Escherichia coli* have been cloned and the expression vector (pESC-HIS/*NagA*) have been designed in order to express *NagA* in *Saccharomyces ceriviceae*. In general, *NagA* *in vivo*, do expression with moderate concentration for the growth and not overexpress if we do not intervene one or more steps in this pathway. Therefore, we can not obtain GlcN6P by fermentation of bacteria in general, but we can produce it by recombinant techniques. The nucleotide sequence of the clone showed the presence of an ORF (*nagA* gene) lacking introns, with a length of 1149 bp, and coding for a protein of 42 kDa, showing similarity to acetyl glucosaminidases.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 7 tháng 4 năm 2008

Viện Công nghệ sinh học, Viện KHCN Việt Nam