

TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GENE MÃ HÓA ENZYME XYLANASE TỪ NẤM MỐC *Aspergillus niger* C1 VÀO *E. coli* BL21

Trần Liên Hà*, Nguyễn Thị Ngọc Nga

Viện Công nghệ sinh học - Công nghệ thực phẩm
Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, 1 Đại Cồ Việt, Hà Nội

*Email: tranlienha@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 20/8/2011; Chấp nhận đăng: 15/11/2012

TÓM TẮT

Enzyme xylanase (endo- β -1,4-xylanase, EC 3.2.1.8) là enzyme xúc tác phản ứng thủy phân các liên kết β -1,4-D-xylopyranose trong xylan. Gene xylanase và vùng mã hóa gene xylanase (cds) của nấm mốc *Aspergillus niger* C1 được gắn vào vector biểu hiện pRSET A. Vector pRSET A-xylanase tái tổ hợp được tách dòng trong *E. coli* TOP10, biểu hiện trong *E. coli* BL21. Gene xylanase từ *A. niger* C1 gồm 746 nucleotit trong đó có 1 intron ở vị trí 278-347, trình tự gene có 98 % độ tương đồng với gene mã hóa xylanase EU42881.1. Gene này được mã hóa bởi 225 axit amin và được gắn peptide tín hiệu gồm 37 axit amin có khối lượng phân tử là 30 kDa. Protein dung hợp được tổng hợp khi bổ sung 0,5 mM IPTG, định tính bằng điện di SDS – PAGE có trọng lượng phân tử là 30 kDa. Dịch enzyme xylanase thô có hoạt độ 381,0 U/ml.

Từ khóa: xylanase, *Aspergillus niger*, gene xylanase.

1. MỞ ĐẦU

Xylan, một trong những thành phần cơ bản của hemicellulose, là polysaccharide chiếm tỉ lệ lớn thứ hai sau cellulose ở thành tế bào thực vật, tồn tại ở dạng liên kết hoặc không liên kết với cellulose, lignin, pectin hay những polysaccharide khác để duy trì tính nguyên trạng của thành tế bào [1]. Xylan là một hỗn hợp có chứa các nhóm phụ là các gốc acetyl, 4-O-methyl-D-glucuronosyl và α -arabinofuranosyl liên kết với bộ khung được tạo bởi các gốc xylopyranose. Bộ khung này được liên kết với nhau theo kiểu β -1,4-glycozide [2]. Để thủy phân hoàn toàn xylan cần có sự kết hợp của một hệ thống các enzyme. Trong số đó, enzyme quan trọng nhất là enzyme endo-xylanase (endo- β -1,4-xylanase), xúc tác phản ứng thủy phân các liên kết β -1,4-D-xylopyranose trong xylan [3, 4]. Enzyme xylanase được ứng dụng rộng rãi trong công nghệ sản xuất thức ăn gia súc, công nghệ thực phẩm, sản xuất giấy, sản xuất cồn nhiên liệu... [4, 5, 6].

Với mong muốn nghiên cứu đặc điểm của gene xylanase ở *A. niger* cũng như mong muốn sản xuất xylanase với năng suất cao hơn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài: “**Tách dòng, biểu hiện gene mã hóa enzyme xylanase từ nấm mốc *Aspergillus niger* C1 vào *E. coli* BL21**”.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng vi sinh vật và plasmid

Chủng giống *Aspergillus niger* C1 trong bộ sưu tập giống, Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách Khoa Hà Nội [9].

Chủng *E. coli* TOP10, chủng *E. coli* BL21 và plasmid pRSET A (Invitrogen).

2.2. Hóa chất

4 loại deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), MgCl₂ và Ex-Taq polymerase (Fermentas), primer được tổng hợp từ công ty Sigma.

Bộ Kit của invitrogen được sử dụng để tách chiết DNA plasmid.

Tris base, ethylene diamine- tetra- acetic acid (EDTA), CTAB, NaCl, NaH₂PO₄, NaCl, imidazole, DTT, Triston – X100, Co-IP (protease inhibitor), hạt Coban, SiO₂, NaI, isopropanol... (Sigma).

2.3. Môi trường

- Môi trường Czapek (g/l): saccharose 30, cao nấm men 5, NaNO₃ 3, KH₂PO₄ 1, MgSO₄. 7H₂O 0,5, KCl 0,01.

- Môi trường LB (g/l): cao nấm men 5, trypton 10, NaCl 10, agar 15.

2.4. Phương pháp tách chiết DNA tổng số

Một lượng 0,2 gam sinh khối nấm mốc sau khi nuôi 48 giờ cho vào 1 ml đệm lysis (100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 2 % SDS, 1 % β-mecaptoethanol, 100 μg protease K) rồi ủ ở 65 °C trong 1 giờ. Sau đó bổ sung NaCl 5 M để đạt nồng độ NaCl là 0,7 M và CTAB 10 % với thể tích bằng 1/10 dịch, ủ ở 65 °C trong 30 phút. Hỗn hợp Chloroform:Isoamyl alcohol (24 : 1) cho vào dịch với tỉ lệ 1 : 1, li tâm ở 13000 vòng/ phút trong 10 phút và thu dịch nổi. Tiếp đó, isopropanol được cho vào với tỉ lệ 1 : 1, li tâm ở 13000 vòng/phút trong 30 phút, thu kết tủa. Kết tủa được rửa bằng ethanol 70%, li tâm ở 13000 rpm/ 10 phút. Làm khô kết tủa và hòa tan trong 50 μl TE (10 mM Tris, 1mM EDTA).

2.5. Phương pháp khuếch đại gene bằng phản ứng overlap PCR

Từ phân tích các trình tự gene xylanase trên dữ liệu của ngân hàng gene cặp môi F1 và F2 được thiết kế để nhân gen mã hóa cho enzyme xylanase. Kết quả thu được so sánh với trình tự gene xylanase trên ngân hàng gene thế giới bằng chương trình BLAST của cơ sở dữ liệu NCBI, xác định được gene xylanase có một intron nằm giữa hai exon. Để biểu hiện gene xylanase từ nấm mốc *A. niger* C1 vào *E. coli* cần loại bỏ được đoạn intron bằng phương pháp overlap PCR. Sử dụng hai cặp môi F1R1 và F2R2 để khuếch đại hai đoạn exon riêng rẽ. Sau đó, sản phẩm phản ứng PCR với cặp môi F1R1 và F2R2 sẽ được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp môi F1R2.

Môi F1 và môi R2 được gắn đoạn nucleotide là vị trí cắt của enzyme cắt giới hạn *Xho* I và *Nco* I để chèn vào vector tách dòng và biểu hiện pRSET A:

F1 : 5'- GCCTCGAGATGCTCACCAAGAACCT- 3'

Xho I

R1 : 5'- CATTGTCCTGCGCACTTCCGGGGT- 3'

F2 : 5' -TTCATGGTGCGCAGGACATCACCTA- 3'

R2 : 5'- GCCCATGGTTACTGAACAGTGATGG- 3'

Nco I

2.6. Phương pháp tách dòng và biểu hiện gene xylanase

Sản phẩm của PCR và overlap PCR và vector pRSET A được cắt bằng với hai enzyme giới hạn *Xho* I và *Nco* I; nối vòng bằng enzyme *T₄ ligase* tạo vector tái tổ hợp. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP 10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Tế bào sau đó được cấy trang trên mặt thạch có bổ sung Ampicillin với tỉ lệ 50 µg/µl, nuôi qua đêm ở 37 °C. Lấy 1 khuẩn lạc riêng rẽ nuôi trong ống nghiệm chứa 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicillin với tỉ lệ 50 µg/µl, nuôi lắc 200 vòng/ phút qua đêm ở 37 °C rồi tách plasmit để giải trình tự gene.

Lấy 5 ml canh trường khuẩn lạc chứa vector và cds xylanaza chuyển sang bình 2 lít có chứa 400 ml môi trường LB lỏng, bổ sung ampicillin với tỉ lệ 50 µg/µl, nuôi lắc 200 vòng/ phút ở 37 °C trong khoảng từ 3 giờ – 5 giờ (tới khi OD_{600nm} = 0,6). Bổ sung IPTG cho tới nồng độ IPTG đạt 0,5 mM, nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 22 °C qua đêm trong thời gian 8 giờ.

2.7. Định tính bằng SDS – PAGE

Lấy 10 µg dịch lên men được trộn đều với đệm mẫu protein 5X (12 mM Tris-HC; 5 % glycerol; 0,4 % SDS; 2,8 mM 2-mercaptoethanol; 0,2 % bromophenol blue), đun sôi trong thời gian 10 phút. Điện di trên gel polyacrylamide 10 % nhuộm bản gel bằng thuốc nhuộm coomassie blue.

2.8. Xác định hoạt độ enzyme bằng phản ứng DNS

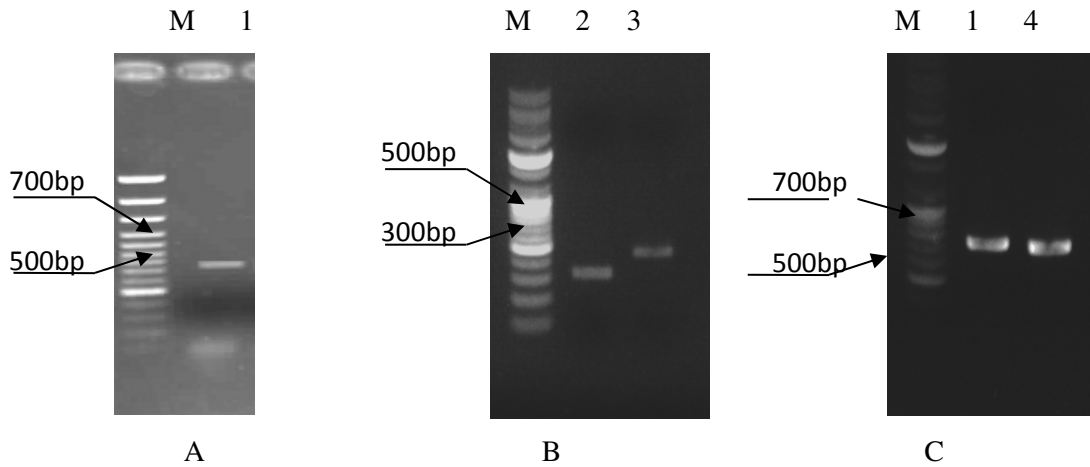
Sử dụng enzyme xylanase phản ứng với cơ chất xylan 1 % pha trong đệm citrate pH = 5,3. Phản ứng enzyme được tiến hành ở 5 0°C trong 5 phút.

“*Một đơn vị hoạt độ của enzyme xylanase được định nghĩa là lượng enzyme có khả năng thủy phân xylan tạo 1 µmol xylose trong thời gian 1 phút*”.

3. KẾT QUẢ

3.1. Phản ứng khuếch đại gene và vùng mã hóa enzyme xylanase

Hình 1 cho thấy các kết quả chạy PCR khuếch đại gene và vùng mã hóa enzyme xylanase. Gene mã hóa enzyme xylanaza có độ dài 700 bp - 800 bp. Kết quả điện di cho thấy vạch khuếch đại đoạn exon 1 có kích thước khoảng 300 bp và đoạn exon 2 có kích thước khoảng 400 bp (hình 1B). Sau khi khuếch đại thành công hai đoạn exon một và exon hai, thu cds của gene xylanase bằng phản ứng overlap PCR. Phản ứng overlap PCR với cặp mồi F1R2 sử dụng sản phẩm của phản ứng PCR khuếch đại hai đoạn exon riêng lẻ làm DNA khuôn thu được sản phẩm có độ dài 600 bp - 700 bp (hình 1C). Sản phẩm tinh sạch cds xylanase bằng bộ kit MINELUTE được sử dụng để gắn vào vector pRSET A và tách dòng trong *E. coli* TOP10 (hình 1C2).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR và overlap PCR khuếch đại gene xylanase và cds xylanase của nấm mốc A. C1.

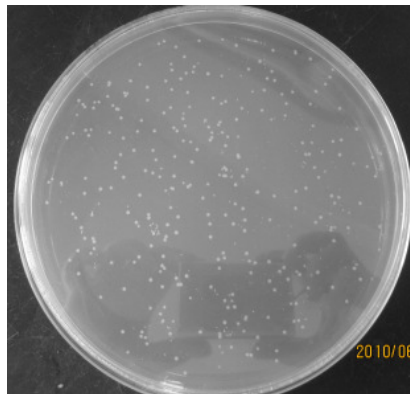
M: thang DNA chuẩn 100 bp; A: Điện di đồ sản phẩm của PCR khuếch đại gene mã hóa xylanase;

B: Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại 2 exon của gene xylanase;

C: Điện di đồ tinh sạch sản phẩm overlap PCR khuếch đại cds của gene xylanase (1: sản phẩm overlap PCR; 2: sản phẩm overlap PCR sau tinh sạch).

3.2. Tách dòng gene xylanase trong *E. coli* TOP10

Sản phẩm phản ứng PCR khuếch đại gene xylanaza và cds gene xylanase được đưa vào vector pRSET A và biến nạp vào trong tế bào chủ *E. coli* TOP10 (hình 2). Tiến hành tách plasmid tái tổ hợp và giải trình tự gene xylanaza và cds xylanaza.



Hình 2. Kết quả biến nạp pRSET A gắn cds xylanase vào *E. coli* TOP10.

Kết quả giải trình tự gene xylanaza và cds gene xylanase cho ta thấy gene xylanaza có độ dài 746 bp và cds xylanaza 68 bp và 1 intron ở vị trí 278-347 (hình 3). Kiểm tra độ tương đồng cds gene xylanase của nấm mốc *A. niger* C1 và cds gene xylanase B (*xynB*) của nấm mốc

Aspergillus niger (mã số EU423881.1.) bằng chương trình BLAST của cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy độ tương đồng đạt 98 %.

Kết quả phân tích ở trên khẳng định rằng đã tách dòng thành công gene xylanaza và cds gene mã hóa xylanase từ chủng nấm mốc *A. niger* C1 vào *E. coli* TOP10.

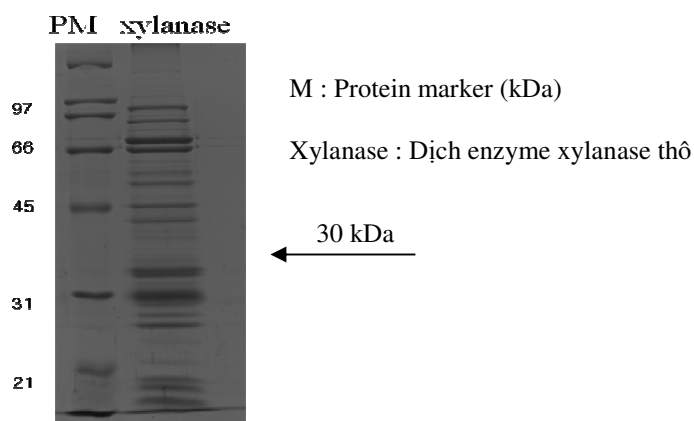
```
ATGCTCACCAAGAACCTTCTCCTCTACTTCGCCGCGGCTAAGGCTGCTCTGGCTGTTCCC
CAGCACTCTGTGCGCCAGCGTTTCGGATGCCTTGACATGCTCTCTGAGCGCTCGACCCCG
AGCTCGACCGGCGAGGACAACGGCTTCTACTACTCCTTCTGGACCGACGGCGGTGGCGAC
GTGACCTACACCAACGGAGATGCTGGTGCCTACACTGTTGAGTGGTCCAACGTGAGCAAC
TTTGTGCGGTGGAAAGGGCTGGAACCCCGGAGGTGCGCAgtaagttaatcatcctcacact
Atccttttaaggatccaataaaacgattactcacatcatctccagg GGACATCACCTA
CAGCGGCACCTTCACCCCTAGCGGCAACGGCTATCTCTCCGTCTATGGCTGGACCACCGA
CCCCCTGATCGAGTACTACATCGTTCGAGTCTACGGCGACTACAACCCCGGCGAGTGGAGG
CACATAACAAGGGCACCGTCACCTCGGACGGATCCGTTTACGATATCTACACGGCTACCCG
TACCAATGCTGCTTCCATTTCAGGGAACCGCTACCTTCACTCAGTACTGGTCCGTCCGCCA
GAACAAGAGAGTTGGCGGAACTGTTACCACCTCCAACCACTTCAATGCTTGGGCTAAGCT
GGGAATGAACCTGGGTACTCACAACCTACCAGATCGTGGCTACCGAGGGTTACCAGAGCAG
TGGATCTTGGCCCATCACTGTTCAGTAA
```

Hình 3. Trình tự gene mã hóa enzyme xylanase của nấm mốc *A. niger* C1

(Chữ in nghiêng là trình tự intron).

3.3. Biểu hiện gene mã hóa xylanase trong *E. coli* BL21

Vector pRSET A có chứa cds xylanase được biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt vào *E. coli* BL21, nuôi trong môi trường LB lỏng bổ sung ampicillin với chất cảm ứng là IPTG. Thu enzyme thô bằng phương pháp siêu âm phá tế bào. Protein tổng số được điện di kiểm tra gel polyacrylamide 10 % (hình 4). Kết quả cho thấy dịch enzyme thô có 1 band đậm có kích thước khoảng 30 kDa và có hoạt độ đạt 381 U/ml. Từ kết quả giải trình tự cho thấy enzyme xylanase của nấm mốc *Aspergillus niger* C1 có 226 amino acid, được gắn thêm peptide tín hiệu gồm 37 amino acid của vector pRSET A có trọng lượng khoảng 30 kDa. Do vậy band có kích thước 30 kDa là band của enzyme xylanase.



Hình 4. Điện di đồ protein tổng số trên PAGE.

Hoạt độ enzyme xylanase tái tổ hợp từ nấm mốc *A. niger* C1 biểu hiện trong *E. coli* BL21 đạt 381 U/ml cao hơn hoạt độ enzyme xylanase tái tổ hợp từ *A. usamii* E001 [7] cũng được biểu hiện trong *E. coli* BL21 với vector biểu hiện pET-28a là 287 U/ml nhưng thấp hơn hoạt độ của enzyme xylanase từ *Trichoderma reesei* RutC-30 [8] là 560 U/ml. Cùng hệ thống vật chủ biểu hiện, nhưng đối với những gene xylanase từ những chủng nấm mốc khác nhau, sử dụng vector biểu hiện khác nhau, điều kiện nuôi thu và tinh sạch enzyme khác nhau sẽ thu được những enzyme có hoạt tính khác nhau.

4. KẾT LUẬN

Tách dòng thành công gene xylanase từ *A. niger* vào *E. coli* TOP10. Gene có kích thước 746 bp chứa 1 intron ở vị trí 278 - 347. Biểu hiện thành công cds gene xylanase kích thước 668 bp vào *E. coli* BL21 với dịch enzyme thô có hoạt độ 381U/ml, kiểm tra sự biểu hiện bằng điện di SDS – PAGE phát hiện protein có trọng lượng phân tử 30 kDa.

Lời cảm ơn. Các tác giả chân thành cảm ơn GS.TS. Hwang Inhwan khoa khoa học và đời sống Trường Đại học Công nghệ Pohang giúp đỡ để thực hiện một số thí nghiệm trên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Biely P. - Microbial xylanolytic systems, Trends in Biotechnol. **3** (1985) 286-289.
2. Bissoon S., Christov L., and Singh S. - Bleach boosting effects of purified xylanase from *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp, Process Biochem. **37** (2002) 567-572.
3. Chenyan Zhou, Jianyu Bai, Shanshan Deng, Jin Wang, Jie Zhub, Minchen Wu, Wu Wang - Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*, Bioresource Technology **99** (2008) 831-838.
4. Polizeli M. L., Rizzatti A. C., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S. - Xylanase from fungi: properties and industrial application, Appli. Microbiol. Biotechnol. **67** (2005) 577-591.
5. Kansoh A. L. - Xylanase and mannanase from *Streptomyces gallbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp, Antonie Van Leeuwenhoek J. Gen. Mol. Microbiol. **85** (2004) 103-110.
6. Wong K. K. Y., Tan L. U. L., and Saddler, J. N. - Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications, Microbiol. Rev. **52** (1988) 305-317.
7. Chenyan Zhou, Jianyu Bai, Shanshan Deng, Jin Wang, Jie Zhu, Minchen Wu, Wu Wang - Cloning of a xylanase gene from *Aspergillus usamii* and its expression in *Escherichia coli*, Bioresource Techonology **99** (2008) 831-838.
8. HeJun, YuBing, ZhangKeying, DingXuemei, ChenDaiwen - Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene in *Escherichia coli* and activity of the enzyme on fiber-bound substrates Protein expressionandpurification **67** (2009) 1-6.
9. Trần Liên Hà, Nguyễn Thương Thương, Nguyễn Thành Chung, Nguyễn Văn Cách - Phân lập và tuyển chọn chủng nấm mốc có khả năng sinh enzyme xylanase cao và một số đặc tính của chủng, Tạp chí Sinh học **8** (2010) 879-884.

ABSTRACT

CLONING AND EXPRESSION XYLANASE GENE OF *Aspergillus niger* C1 IN *E. coli* BL21

Tran Lien Ha*, Nguyen Thi Ngoc Nga

School of Biotechnology - Food Technology, Hanoi University of Science and Technology

*Email: tranlienha@yahoo.com

Enzyme xylanase (endo- β -1,4-xylanase, EC 3.2.1.8) is a catalytic enzyme of β -1,4-D-xylopyranose hydrolysis in xylan. Xylanase gene and coding region of xylanase gene (cgs) of *Aspergillus niger* C1 were inserted in expression pRSET A vector. For cloning gene and expression gene *E. coli* TOP10 and *E. coli* BL21 were used, respectively. Xylanase gene of *A. niger* C1 has 746 nucleotide, in which one intron is from 278 - 347. The gene sequence has 98 % homology with xylanase gene EU42881.1. The gene encodes for 225 amino acid and with signal peptide of 37 amino acid they have molecular weight of 30 kDa. The fermentation has xylanase activity of 381.0 U/ml.

Keywords: xylanase, *Aspergillus niger*, gene xylanase.