

TÁCH DÒNG GEN MÃ HOÁ MỘT CHẤT ỨC CHẾ TRIPXIN CỦA HẠT BÍ ĐỎ (*CUCURBITA MAXIMA*) CMTI-V VÀ BIỂU HIỆN Ở *E. COLI*

Đào Thị Thuý, Nguyễn Quỳnh Uyển, Nguyễn Thị Bích Hậu,
Võ Thị Thương Lan và Phạm Thị Trân Châu

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

1. Mở đầu

Các protein ức chế tripxin (TI) của hạt các cây họ bầu bí (*Cucurbitaceae*) tuy được phát hiện muộn hơn các TI thực vật khác nhưng đã được quan tâm nghiên cứu nhiều vì chúng có những đặc tính quý về mặt khoa học và có tiềm năng ứng dụng lớn.

Hạt của hầu hết các loại bầu bí kể cả 2 TI có cấu trúc vòng mới được phát hiện từ hạt gấc [4] đều có TI với khối lượng phân tử vào khoảng 3 kDa, có 3 cầu disunfua, chúng được xếp thành một họ mới, họ TI bầu bí (squash inhibitor) [9]. Trong số các TI họ bầu bí, các TI phân tử thấp của hạt bí đỏ (CMTI-I, III) được phát hiện sớm hơn cả và ngoài tác dụng ức chế tripxin các TI này còn ức chế factor XIIa [6] (proteinaz-xerin xúc tác cho phản ứng đầu tiên trong quá trình đông máu). Gần đây [7] người ta còn phát hiện thêm một TI khác từ hạt bí đỏ, CMTI-V khác với các CMTI đã biết, CMTI-V bao gồm 68 axit amin, và chỉ có 1 cầu disunfua, có khối lượng phân tử là 7,1kDa, có tính kiềm và cũng có tác dụng ức chế đặc hiệu factor XIIa. Tuy nhiên hàm lượng TI này ở hạt bí đỏ tương đối thấp, vì vậy đã có một số công trình nghiên cứu sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để tách dòng gen mã hoá chúng [1,2,13,14] với hy vọng có thể sản xuất bằng các biện pháp Công nghệ Sinh học.

Công trình này tách gen mã hoá CMTI-V từ hạt bí đỏ, sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để tách dòng và biểu hiện gen CMTI-V ở *E.coli*.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

- Lá bí đỏ (*Cucurbita maxima*) cần non tươi được sử dụng làm nguyên liệu để tách ADN tổng số.

- Chủng *E.coli* DH5 α (MBI Fermentas) được dùng làm tế bào chủ để nhân bản plasmit tái tổ hợp. Chủng *E.coli* BL21 (DE3) của Life Technologies (Mỹ) được dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Các môi do Invitrogen life technologies tổng hợp theo thiết kế của chúng tôi. Các hoá chất thông dụng trong Sinh học phân tử của các hãng Sigma, Bio.Rad, Promega. dNTPs, Mix ladder, Taq DNA polimeraz, λ DNA ladder của Finnzymes, BamHI, T₁ DNA ligaz của Promega. Tripxin tụy tạng bò và cơ chất BApNA (N $_{\alpha}$ -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride) của Sigma; Plasmit pET 14b của hãng Invitrogen; Kit để tách ADN tổng số và tách plasmit của Qiagen; X-gal (Bromo-4-chloro-3 indolyl- β -D-galactopyranoside) của MBI Fermentas; Glass microfibre filters của Whatman, Anh.

2.2. Phương pháp

- Tách ADN toàn phần từ lá bí đỏ:

ADN tổng số của lá bí đỏ non làm khuôn trong phản ứng PCR được tách theo phương pháp của Eija Pehu và cộng sự [3]. Kiểm tra hàm lượng và độ sạch của ADN bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260nm, 280nm; phương pháp điện di trên gel agaroz.

- Tách dòng và nhân gen của CMTI-V

Đã sử dụng 2 cặp mồi sau:

Mồi xuôi (forward primer) có chứa trung tâm nhận biết của NdeI:

5' CAATGGATCCTCCTGCCCAGGTAAGTC 3'

Mồi ngược (reverse primer) có chứa trung tâm nhận biết của BamH I:

3' CGCGGATCCGCGTATACCGATCCTCGG 5'

Phản ứng PCR để tổng hợp và kiểm tra lại gen CMTI-V được thực hiện như sau: thể tích hỗn hợp phản ứng 25 μ l bao gồm: 2 μ l ADN genom bí đỏ (520ng ADN), 1,25 μ l mồi xuôi (225ng), 1,25 μ l mồi ngược (225ng), 0,5 μ l dNTPs (200 μ M), 0,5 μ l Taq polimeraz (0,5IU), 19,5 μ l đệm PCR 1 lần.

Chương trình chạy PCR: biến tính ADN khuôn ở 94 $^{\circ}$ C trong 3 phút, nhiệt độ gắn mồi ở 63 $^{\circ}$ C trong 1 phút, tổng hợp ở 72 $^{\circ}$ C trong 1 phút, tổng số là 30 chu kỳ, nhân lại gen CMTI-V trong 8 phút ở 72 $^{\circ}$ C, cuối cùng sản phẩm PCR được giữ ở 4 $^{\circ}$ C cho tới khi kiểm tra trên agaroz.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên agaroz 2%, tinh sạch qua Glass Microfibre filters (GF/D, GF/C, Whatman, UK).

- Phương pháp điện di ADN trên gel poliacrilamit 5% [12]: Đệm điện di TAE, tiến hành điện di ở điều kiện 90 phút, 150V. Sau khi điện di, cố định trong etanol 10% trong 5 phút, rửa bằng dung dịch HNO₃ 3% trong 3 phút, rửa bằng nước Milli Q 1 phút, nhuộm bằng AgNO₃ 0,2% trong 20 phút, rửa sạch AgNO₃ bằng nước Milli Q, cuối cùng hiện băng ADN bằng dung dịch Na₂CO₃ 3% và 0,1% fomaldehit trong khoảng 3 phút, giữ gel trong axit acetic 10%.

- Điện di trên gel poliacrilamit 15% phát hiện băng TI theo phương pháp đã mô tả trước đây [8].

2.3. Thiết kế vectơ tái tổ hợp

Plasmid pET-14b có chứa trung tâm nhận biết của BamH I và Nde I được mở vòng bằng cách xử lý với 2 enzym này ở điều kiện: 37 $^{\circ}$ C trong 2 giờ.

Sản phẩm PCR nhân bản ADN genom bí đỏ với mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu đã được tinh sạch, cắt với BamH I và Nde I (ở điều kiện 37°C trong 2 giờ), đưa vào plasmid pET-14b đã mở vòng bằng 2 enzym trên.

Phản ứng gắn được thực hiện ở 4°C trong thời gian 16 giờ nhờ T₄ ligaz [10].

Vectơ tái tổ hợp pET-14b – CMTI-V viết tắt (pET-TI-V) được biến nạp vào chủng *E.coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt [5].

Các thể biến nạp được sàng lọc trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB) (1% tripton, 0,5% cao nấm men, 1% NaCl) có bổ sung ampixilin (100 μ g/ml), nuôi qua đêm ở 37°C. Chọn các khuẩn lạc màu trắng (có mang ADN ngoại lai) cấy chuyển sang các đĩa thạch trong môi trường LB có ampixilin (100 μ g/ml) để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Nuôi vi khuẩn *E.coli* DH5 α tái tổ hợp, tách plasmid tái tổ hợp, tinh sạch (theo phương pháp Qiagen [11]). Cắt bằng 2 enzym giới hạn BamH I và Nde I, kiểm tra bằng phương pháp PCR, sản phẩm được kiểm tra kích thước bằng cách điện di trên gel agaroz 2% với thang chuẩn ADN.

Dòng vectơ mang gen CMTI-V đã qua kiểm tra như trên, được giải trình tự vùng có cADN theo phương pháp Sanger.

2.4. Biểu hiện protein tái tổ hợp ở *E.coli*

Vectơ tái tổ hợp pET-14b-TI-V được biến nạp vào chủng *E.coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt [5].

Sàng lọc vi khuẩn tái tổ hợp trên môi trường thạch LB có ampixilin, X-gal, các khuẩn lạc trắng được nuôi trên môi trường lỏng có chứa ampixilin (100 μ g/ml) ở 37°C đến khi đạt giá trị OD₆₀₀ = 0,6. Thêm IPTG (isopropyl β -thiogalactoside) để cảm ứng biểu hiện protein đích.

Thu sinh khối tế bào, phá màng tế bào bằng siêu âm (máy Sonicprep 150 của Đức). 1 thể tích tế bào + 50 thể tích dung dịch đệm TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8,0), li tâm 12.000 vòng /phút ở 4°C trong 30 phút, thu dịch trong giữ ở -20°C để cho các thí nghiệm tiếp theo. Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp bằng phương pháp PAGE có chứa cơ chất [8].

3. Kết quả và thảo luận

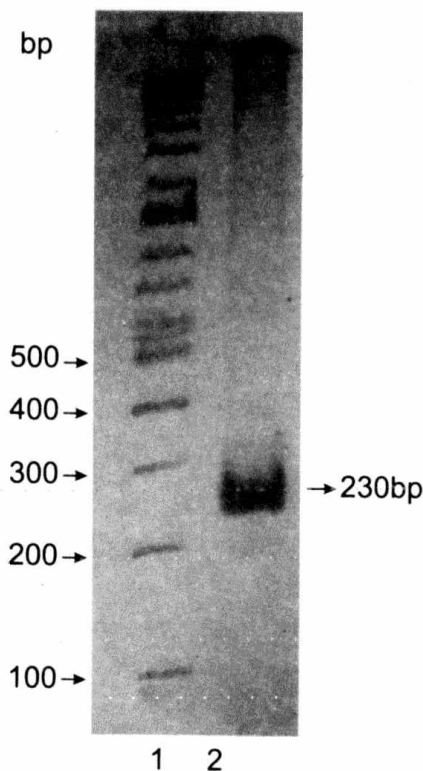
3.1. Tách và tinh chế ADN tổng số

Lá bí đỏ non nghiền trong niơ lỏng, chiết theo tỉ lệ 1:4 (mg/ μ l) dung dịch AP₁ nồng độ RNAz cuối cùng là 100 μ g/ml, giữ ở 65°C trong 10 phút, thêm 130 μ l AP₂ giữ trong nước đá 5

phút, li tâm, thu dịch nổi, cho qua cột QIA shredder (QIAsMC), thu dịch qua cột. Thêm dung dịch AP₃, etanol vào dung dịch nhận được qua cột theo tỉ lệ thể tích 0,5:1:1, trộn đều cho toàn bộ hỗn dịch này qua cột Dneasy MC, rửa cột 2 lần bằng dung dịch đệm AW. Thôi ADN khỏi cột bằng 100µl dung dịch đệm AE. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của ADN tổng số bằng điện di trên agaroz và trên máy quang phổ (spectronic Unicam). Kết quả nhận được tỉ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ là 1,86-1,90, chứng tỏ chế phẩm có độ sạch đạt yêu cầu. Điện di trên gel agaroz 0,8% với thang chuẩn λ ADN các nồng độ khác nhau cho thấy hàm lượng ADN tổng số thu được là 260ng/ml. Như vậy, ADN thu được có chất lượng tốt và hàm lượng đủ cho các nghiên cứu tiếp.

3.2. Nhân bản đoạn gen CMTI-V từ ADN genom bí đỏ bằng kỹ thuật PCR

Sử dụng ADN đã tinh sạch làm khuôn trong phản ứng PCR, với mỗi xuôi, mỗi ngược và các điều kiện phản ứng như đã nêu trong phần phương pháp. Theo tính toán lí thuyết sẽ nhận được sản phẩm phản ứng có kích thước 230bp. Kết quả điện di trên gel poliacrilit 5% (hình 1) cho thấy sản phẩm PCR thu được có 1 băng với kích thước đúng như tính toán lí thuyết vào khoảng 230bp.

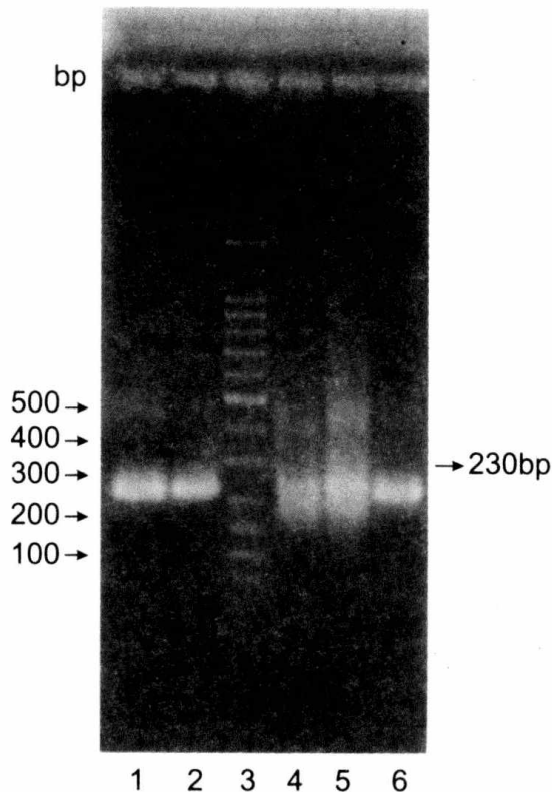


Hình 1: Điện di đồ sản phẩm PCR sử dụng ADN genom bí ngô làm khuôn

- 1 - Thang ADN chuẩn (100-10000bp)
- 2 - Sản phẩm PCR ~ 230bp

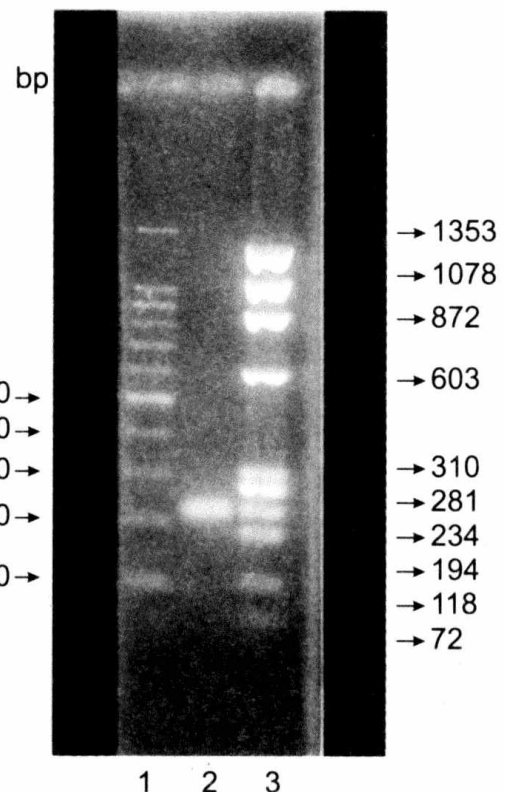
Phân tích trình tự nucleotit chứng tỏ đúng là gen CMTI-V (kết quả không trình bày ở đây). Ngoài ra, chúng tôi cũng đã tổng hợp gen mã hoá CMTI-V theo phương pháp đã mô tả trước đây [14] và nhân đoạn gen đã được tổng hợp bằng kỹ thuật PCR với 2 phản ứng PCR

nối tiếp nhau, phản ứng sau sử dụng sản phẩm của phản ứng trước làm khuôn, với 2 mỗi xuôi và ngược. Kết quả trên hình 2 cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng 230bp, đúng theo tính toán lí thuyết. Sản phẩm PCR được tinh sạch qua màng Recochip, nhận được một băng ADN sắc nét, có kích thước tương ứng 230bp (hình 3).



Hình 2: Kết quả tổng hợp gen CMTI-V

- 1 - Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi môi là 200ng
- 2- Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi môi là 250ng
- 3 - Thang ADN chuẩn (100bp)
- 4,5- Sản phẩm PCR 2, mỗi xuôi, mỗi ngược, khuôn là sản phẩm PCR1.



Hình 3: Kết quả tinh sạch sản phẩm

- PCR của gen CMTI-V
- 1- Thang ADN chuẩn (100bp)
 - 2- Sản phẩm PCR (của cột 4, 5 ảnh 3) sau khi tinh sạch
 - 3- Thang ADN chuẩn λ /Hae III (100bp)

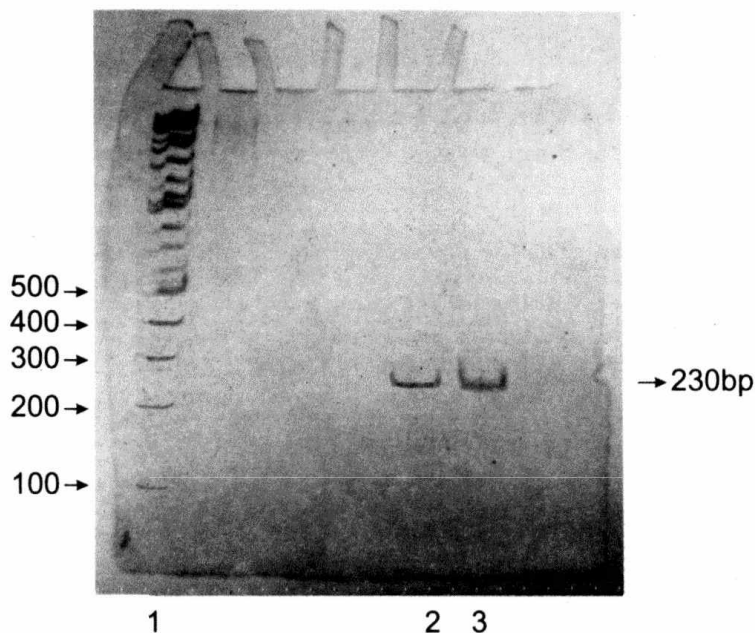
3.3. Tách dòng gen CMTI-V

Để thu được đủ số lượng gen CMTI-V dùng trong biến nạp, sản phẩm PCR nhân bản từ genom bí đỏ đã được tinh sạch, cắt bằng BamHI và NdeI, điện di trên gel agaroz 2% để tách và tinh sạch gen CMTI-V, nối vào plasmid pET 14b cũng đã được cắt với 2 enzym BamHI và NdeI. Quá trình gắn gen vào plasmid được thực hiện nhờ T_4 ligaz. Vectơ mang gen CMTI-V (được kí hiệu là pET-TI-V) được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5 α để nhân vectơ tái tổ hợp. Kết quả biến nạp được sàng lọc trên môi trường LB-agar có

ampixilin, X-gal và IPTG, các khuẩn lạc màu trắng (khuẩn lạc dương tính) là các vi khuẩn tái tổ hợp có chứa pET-TI-V.

3.4. Kiểm tra tiếp sản phẩm biến nạp bằng PCR

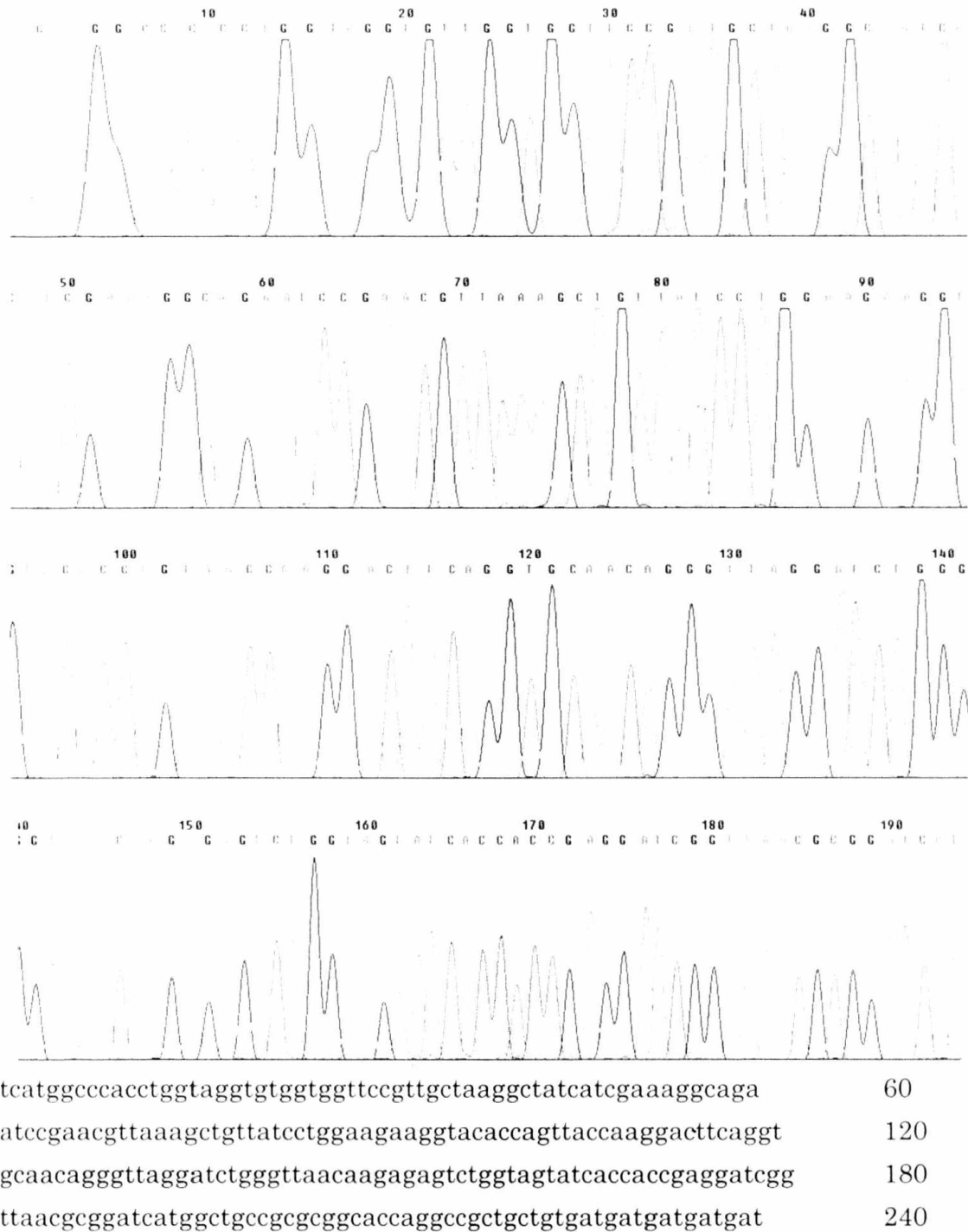
Tách ADN plasmit từ các khuẩn lạc dương tính dùng làm khuôn trong PCR với cặp mồi xuôi, ngược đặc hiệu của gen CMTI-V. Kết quả trên hình 4 cho thấy sản phẩm PCR có 1 băng ADN sắc nét được nhân bản từ các vectơ tái tổ hợp có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR khi sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn, đã được tách dòng trong *E.coli*.



Hình 4: Điện di đồ sản phẩm PCR trên PAGE 5% ADN plasmit tách từ các khuẩn lạc dương tính

- 1- Thang ADN chuẩn (100-10000bp)
- 2- Sản phẩm PCR sử dụng ADN plasmit tái tổ hợp làm khuôn với cặp mồi đặc hiệu cho gen CMTI-V
- 3- Sản phẩm PCR sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn

Để tiếp tục kiểm tra sản phẩm biến nạp, plasmit của các khuẩn lạc dương tính đã được tinh sạch và xác định trình tự nucleotit của đoạn gen đích nối vào plasmit pET14b. Kết quả được trình bày ở hình 5.

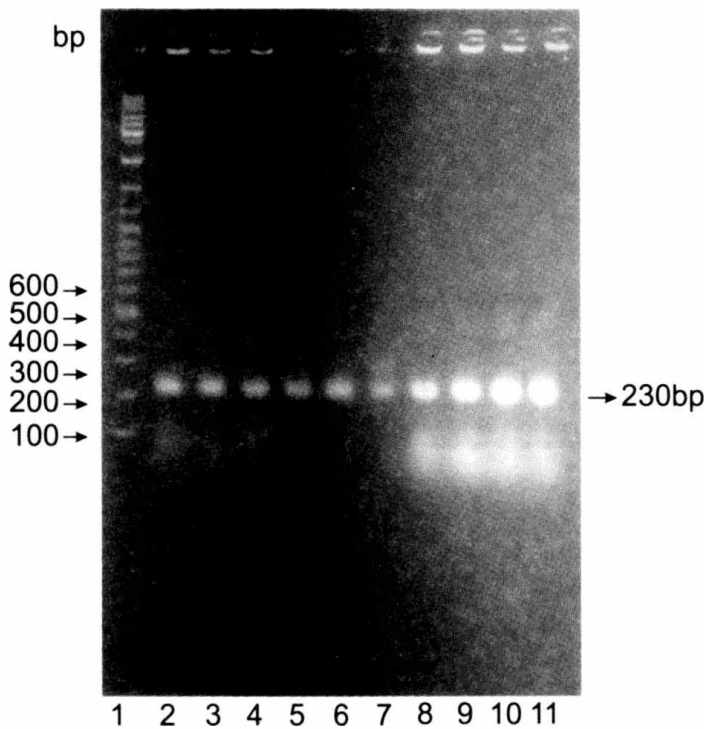


Hình 5: Kết quả xác định trình tự đoạn ADN plasmit tái tổ hợp có chứa gen CMTI-V

3.5. Biểu hiện gen CMTI-V trong *E.coli* BL21

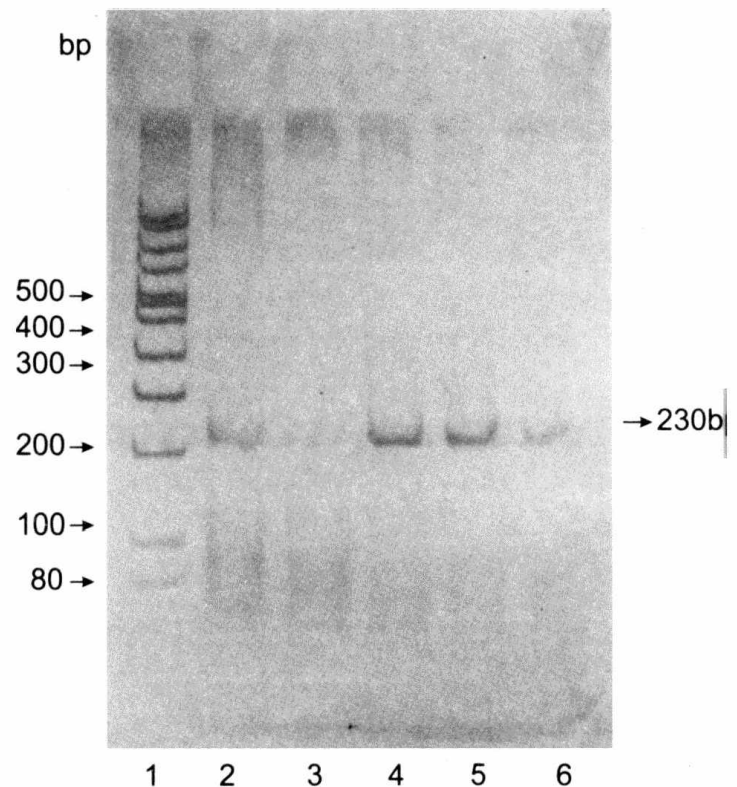
Plasmit tái tổ hợp pET-TI-V được biến nạp vào *E.coli* BL21 (DE3), kí hiệu là BL21-pET-TI-V. Sau khi biến nạp, cấy trải vi khuẩn tái tổ hợp trên môi trường LB đặc có ampicilin và X-gal, chọn các khuẩn lạc trắng (khuẩn lạc dương tính, đã được biến nạp) nuôi cấy tiếp trên môi trường LB lỏng có ampicilin ở 37°C qua đêm, tách plasmit và kiểm tra

bằng kỹ thuật PCR. Kết quả trên hình 6 và 7 cho thấy các khuẩn lạc đều cho sản phẩm PCR đúng kích thước đã dự tính.



Hình 6: Điện di đồ sản phẩm PCR trên gel agaroz 2% (sử dụng ADN plasmit tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc khác nhau của BL21-pET-TI-V làm khuôn).

1-Thang ADN chuẩn
(Marker Mix: từ 100-10000bp)
2-11: sản phẩm PCR của ADN plasmit của các khuẩn lạc dương tính khác nhau

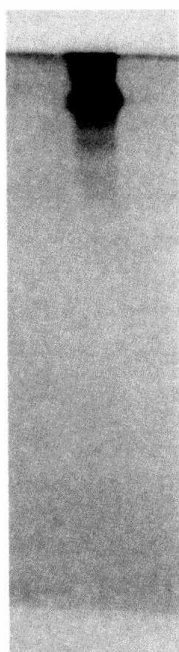


Hình 7: Điện di đồ sản phẩm PCR trên PAGE 5% (sử dụng ADN plasmit tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc khác nhau của BL21-pET-TI-V làm khuôn).

1 - Thang ADN chuẩn
(Marker 100bp: từ 80-1031bp)
2,3 - Đối chứng: sản phẩm PCR ban đầu (sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn với mỗi xuôi, ngược (1 μ l và 0,5 μ l))
4,5,6 - Sản phẩm PCR của các ADN plasmit tách từ các khuẩn lạc khác nhau của BL21-pET-TI-V.

Các khuẩn lạc dương tính được nuôi trên môi trường LB lỏng, cảm ứng bằng IPTG để biểu hiện gen CMTI-V. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ chất cảm ứng, thời gian, nhiệt độ nuôi cấy v.v... đến quá trình biểu hiện (kết quả không trình bày ở đây). Ở các điều kiện đã lựa chọn tiến hành nuôi vi khuẩn trên máy lắc hoặc lên men. Sau khi thu tế bào vi khuẩn, phá vỡ màng tế bào và li tâm.

Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp có trong dịch nổi sau li tâm bằng phương pháp điện di trên gel poliacrilamit không có SDS, có cơ chất [8]. Kết quả trên hình 8 cho thấy có một băng TI chủ yếu (băng màu xanh trên nền trắng).



Hình 8: Điện di trên gel poliacrilamit 15% không SDS, có cơ chất, băng TI có màu xanh

4. Kết luận

1. Đã tách tinh chế ADN genom của bí đỏ có độ sạch đạt tỉ lệ OD_{260}/OD_{280} là 1,86-1,90.
2. Gen mã hoá CMTI-V đã được nhân lên bằng kỹ thuật PCR khi sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn, đã tinh sạch và xác định trình tự.
Gen mã hoá CMTI-V cũng đã được tổng hợp thành công từ 4 môi gốì nhau.
3. Đã thiết kế vectơ tái tổ hợp mang gen CMTI-V (pET-TI-V) và nhân dòng trong *E.coli* DH5 α
4. Biểu hiện gen CMTI-V trong *E.coli* BL21, nhận được protein tái tổ hợp có hoạt tính ức chế trypsin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bolewska, K., Krowarsch, D., Otlewski, J., Jaroszewski, L., Bierzynski, A., Synthesis, cloning and expression in *E.coli* of a gene coding for the Met 8 \rightarrow Leu CMTI-I- a representative of squash inhibitors of serine proteinases *FEBS Letters* V.377 (1995), pp 172-174.
2. Botes DP., Qobose MD., Corfield VA. Synthesis of wild type and three mutant *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor encoding genes by a single-strand approach. *Gene* V. 105 N^o 2 (1991), pp 243-247.
3. Deana Namuth, Kimmo Koivu, Jelena Arbatova, Viktor Kuvshinov and Eija Pehu. *Advanced plant Molecular Biology Laboratory Manual*, University of Helsinki, Finland (1998), pp 4-7
4. Hernandez, J.F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T.M, Andrieu, J.P., Heitz, A., Trinh H.T., Pham T.T. Chau., and Le Nguyen D., V. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry*, V. 39 (2000), pp 5722-5730.
5. Hioraki Inoue, Hiroshi Nojima and Hiroto Okayama, Transformation of *E. coli* with plasmids, *Gene*,96 (1990), pp 23-28.

6. Hojima, Y., Pierce, J.V., and Pisano, J.J., Pumpkin seeds inhibitor of human Factor XIIa, (activated Hageman factor) and bovine trypsin. *Biochemistry* V.21, (1982), pp 3741-3746.
7. Krishnamoorthi, R., Gong, Y.-X., and Richardson, M. A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *FEBS Letter*. V. 273, (1990), pp 163-167.
8. Pham Tran Chau, Konopska L., Leluk J., Trypsin inhibitors in the aleurone grains of *Cucurbita pepo* var. patissonina (white bush) cotyledons. *Biochem. Physiol. pflanz* V. 181 (1986), pp 565-569.
9. Polanowski, A., Otlewski, J., Leluk, J., Wilimowska – Pelc, A., and Wilusz, T., . A new family of serine proteinase inhibitors from squash seeds. *Biol. Zentralbl* V. 107, (1988), pp 45-49.
10. *Promega Protocols and Applications Guide* (1989), pp 52-56.
11. *Qiagen Mini Hand book* (1999), pp 9-11.
12. Ulrike Schindler and Anthony R. Cashmore. *Methods in Plant Molecular Biology A Laboratory Course Manual*, (1995), Cold Spring Harbor laboratory Press in USA, pp 275-277.
13. Võ Thị Thương Lan, Phạm Thị Trân Châu, Phân lập gen mã cho triplexin inhibitor (TI-IV) từ một số cây thuộc họ bầu bí bằng kỹ thuật PCR. *Di truyền và ứng dụng. Chuyên san CNSH* (2000), pp. 32-36.
14. Wen L., Kim S-S., Tinn T.T., Hoang J-K., Krishnamoorthi Gong Y., Lwin Y. N., and Kyin S. Chemical synthesis, Molecular cloning, overexpression and site-directed mutagenesis of the gene coding for pumpkin (*Cucurbita maxima*) trypsin inhibitor CMTI-V. *Protein Expression and purification* V.4 (1993), pp. 215-222.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XX, N_o3, 2004

CLONING AND EXPRESION IN *E.COLI* OF THE GENE CODING FOR PUMPKIN (*CUCURBITA MAXIMA*) TRYPSIN INHIBITOR, CMTI-V

**Dao Thi Thuy, Nguyen Quynh Uyen, Nguyen Thi Bich Hau,
Vo Thi Thuong Lan and Pham Thi Tran Chau**

Centre of Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

CMTI-V is a trypsin inhibitor discovered in 1990. from pumpkin seeds. It consists of 68 amino acid residues in a single chain and one disulfide bridge, Mr of 7.1kDa. The CMTI-V also specifically inhibits factor XIIa. However the content of CMTI-V in pumpkin seeds is rather low, therefore it is worthy to study the gene encoding CMTI-V, cloning and expression of the gene in *E.coli*.

For this purpose, the total genomic DNA from pumpkin (*Cucurbita maxima*) was isolated and purified. The CMTI-V gene was successfully cloned from genomic DNA of pumpkin by PCR technique, using its specific forward and reverse primers containing restriction enzyme specific sites. The PCR amplified product was inserted into plasmid pET-14b to form pET-14b-CMTI-V and transformed into *E.coli* DH5 α . Selection and checking the positive clones by PCR and the target gene in recombinant vector was sequenced. The obtained results indicated that the gene was successfully cloned. The target gene was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) and the recombinant protein was tested for inhibitory activity against trypsin on PAGE containing substrate. One major TI band was found.