

NGHIÊN CỨU CẢI BIẾN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* SINH TỔNG HỢP COENZYME Q10

Nguyễn Việt Phương, Trương Quốc Phong*, Đặng Thị Thu

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội,
Số 1, Đại Cồ Việt, Hai Bà Trưng, Hà Nội

*Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn

Đến Toàn soạn: 13/3/2014; Chấp nhận đăng: 14/10/2014

TÓM TẮT

Coenzyme Q10 (CoQ10) là một trong những thành phần quan trọng của chuỗi hô hấp đóng vai trò trong việc vận chuyển điện tử. Ngày nay CoQ10 được sử dụng nhiều như một nguồn thực phẩm chức năng hoặc thuốc hỗ trợ điều trị do đặc tính chống oxy hóa mạnh và vai trò có lợi của nó trong việc điều trị nhiều bệnh hiểm nghèo ở người như ung thư, tim mạch, tiểu đường,... Nhiều quá trình sinh học đã được phát triển để có thể sản xuất CoQ10 ở quy mô lớn. Những quá trình này chủ yếu dựa vào các vi sinh vật vì chúng có khả năng tạo hàm lượng CoQ10 cao. Trong số các chủng vi sinh vật tổng hợp CoQ10 thì *Agrobacterium tumefaciens* được đánh giá là chủng có khả năng sản xuất CoQ10 ở quy mô lớn do chúng có khả năng tổng hợp lượng lớn CoQ10 trên môi trường đơn giản, rẻ tiền. Mục đích của nghiên cứu này là tăng cường hoạt tính của hai enzyme chìa khóa của con đường tổng hợp CoQ10 (decaprenyl diphosphate synthase và 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase), giúp tăng khả năng tổng hợp CoQ10. Hai gen *dps* và *dxs* nguồn gốc *A. tumefaciens* TT4 mã hóa decaprenyl diphosphate synthase và 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase tương ứng được tách dòng thành công trong vector pJET1.2. Hai gen này tiếp tục được gắn vào vector biểu hiện pCAMBIA13011, sau đó chuyển vào vi khuẩn chủ *A. tumefaciens* EHA105. Khả năng tổng hợp CoQ10 của các dòng tái tổ hợp được đánh giá cao hơn 1,8 lần so với chủng tự nhiên. Trong số 28 dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang cấu trúc pCAM-dps-dxs, 3 dòng có khả năng sinh tổng hợp CoQ10 cao nhất được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, decaprenyl diphosphate synthase (*dps*), 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (*dxs*), Coenzyme Q10 (CoQ10).

1. MỞ ĐẦU

Ubiquinone-10 hay Coenzyme Q10 (CoQ10), là một trong những loại coenzyme tham gia vào chuỗi vận chuyển điện tử bám màng ở cả prokaryote và eukaryote. CoQ10 có vai trò quan trọng trong việc sản xuất ra ATP - nguồn năng lượng sinh học của cơ thể. Do có tính chất chống oxy hóa mạnh, trung hòa các gốc tự do nên CoQ10 ngày càng được sử dụng nhiều làm nguồn thực phẩm chức năng, giúp cải thiện sức khỏe và được đưa vào các mỹ phẩm làm đẹp như một chất chống oxy hóa, chống lão hóa để giúp cơ thể trẻ hóa; ứng dụng trong y tế nhằm ngăn ngừa

ung thư, điều trị nhiều bệnh về tim mạch, tiểu đường, Parkinson, tăng hệ thống miễn dịch, giảm huyết áp...[1 - 4]. Với nhiều ứng dụng có lợi như vậy nên nhu cầu về CoQ10 ngày một tăng lên. Để đáp ứng nhu cầu đó đã có nhiều giải pháp được đưa ra như tổng hợp hóa học, bán tổng hợp và công nghệ sinh học. Do CoQ10 có cấu trúc phức tạp nên hiện nay việc tổng hợp CoQ10 chủ yếu được nghiên cứu ở vi sinh vật như *Agrobacterium tumefaciens*, *E. coli*, *Sporobolomyces*, *Rhodobacter*, *Cyptococcus*, *Rhodopodium*, *Utilago*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* [5-10]. Trong những năm gần đây *A. tumefaciens* là một trong những vi khuẩn đang được sử dụng để sản xuất CoQ10 do chúng có nhiều ưu điểm như có hàm lượng CoQ10 tương đối cao so với các vi sinh vật khác, chỉ tổng hợp CoQ10, môi trường nuôi đơn giản, rẻ tiền, phù hợp sản xuất ở quy mô công nghiệp [6, 8, 11]. Trong con đường sinh tổng hợp CoQ10 hai gene được xem là chìa khóa làm tăng quá trình tổng hợp CoQ10 ở *A. tumefaciens* là *dps* (decaprenyl diphosphate synthase) và *dxs* (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase). Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành đưa hai gene *dps* và *dxs* nguồn gốc chủng *Agrobacterium tumefaciens* TT4 vào chủng *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 nhằm tạo ra chủng tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp Coenzyme Q10 cao.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng *A. tumefaciens* TT4 từ bộ sưu tập giống của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển CNSH, Đại học Bách khoa Hà Nội. Chủng *A. tumefaciens* EHA105 từ Viện Công nghệ Sinh học, VAST.

Hai cặp mồi để khuếch đại gen *dps* và *dxs* với trình tự các cặp mồi tương ứng như sau:

Mồi xuôi (DpsF): 5'-ATAGAGCTCATTGCCGCGCAAGGCGTCAGTT-3';

Mồi ngược (DpsR): 5'-TTTGGATCCTCAGTTGAGACGCTCGATGCA-3'.

Mồi xuôi (DxsF): 5'-TAAGGATCCACGCATAGAACAGGCCAAAC-3';

Mồi ngược (DxsR): 5'-ATTGTGCGCATCAGCCGGCGAAACCGACGC-3';

Vector tách dòng pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, Mỹ); vector biểu hiện pCAMBIA1301 nhận từ Viện Công nghệ Sinh học, VAST.

Hóa chất dùng cho phản ứng PCR, cắt nối ghép gen và điện di của các hãng như Sigma, Merck, New England Biolabs (NEB), Thermo Scientific,...Taq DNA polymerase (Sigma, Mỹ), Enzyme cắt hạn chế được mua của hãng New England Biolabs, Mỹ. Kit tách tinh sạch sản phẩm PCR (Invitrogen, Mỹ), thổi gel của Quiagen, Mỹ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các phương pháp sinh học phân tử

Các phương pháp tách chiết DNA tổng số, phương pháp PCR, cắt DNA bằng enzyme hạn chế, nối ghép gen bằng T4-DNA ligase, tinh sạch DNA, biến nạp bằng sốc nhiệt được thực hiện như mô tả bởi Sambrook và Russell 2001 [12].

2.2.2. Phương pháp tạo *Agrobacterium tumefaciens* khả biến

Làm mới giống trên môi trường thạch YEB. Khuẩn lạc đơn được cấy trong 2 ml môi trường lỏng LB và nuôi lắc ở 28°C, 6 – 8 giờ. Chuyển 1 ml dịch vi khuẩn sang 100 ml môi trường LB lỏng + 0,1 % glucose và nuôi lắc ở 28 °C đến khi OD_{660nm} đạt 1– 1,5. Làm lạnh mẫu trong đá 15 phút, li tâm 5000 vòng/phút trong 20 phút để thu cặn tế bào. Rửa cặn 3 lần bằng 1 mM HEPES (N–2–hydroxyethylpiperazine–N’–2–ethanesulfonic acid) pH 7,0; 1 lần bằng 10 % glycerol. Sinh khối được hòa lại trong 10 % glycerol. Chia 100 µl dịch tế bào vào mỗi ống eppendorf, làm lạnh trong nitơ lỏng và bảo quản ở – 80 °C.

2.2.3. Phương pháp biến nạp plasmid vào *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp xung điện

Plasmid được tinh sạch (PureLink PCR purification kit, Invitrogen) và xác định nồng độ trước khi tiến hành biến nạp. Tế bào khả biến được làm tan trên đá trong 30 phút sau đó được bổ sung 10 µl plasmid (40 - 50 ng/µl). Hỗn hợp được trộn đều, giữ trên đá 10 phút và sau đó chuyển vào cuvet. Đặt cuvet vào thiết bị và tiến hành biến nạp ở điều kiện 2,5 kV, 25 F, 400 Ω. Bổ sung 800 µl SOC vào cuvet và chuyển toàn bộ hỗn dịch sang ống eppendorf và lắc ở 28°C trong 2 giờ. Dịch nuôi sau đó được trải lên môi trường thạch YEB có bổ sung kanamycin và nuôi ở 28 °C trong 2 ngày.

2.2.4. Phương pháp tách chiết CoQ10

Quá trình tách chiết thu nhận Coenzyme Q10 từ *Agrobacterium tumefaciens* được thực hiện theo phương pháp của Tian [13].

2.2.5. Phương pháp xác định CoQ10

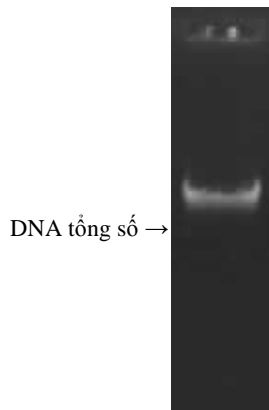
CoQ10 được xác định dựa vào phản ứng Craven như mô tả bởi Shimada và cộng sự [14]. Quy trình có thể tóm tắt như sau: Bổ sung 500 µl 100 mM Ethylcyanoacetate vào 500 µl dung dịch CoQ10, trộn đều ủ trong 6 phút, bổ sung 100 µl 0,4 M KOH. Đo phản ứng 1 phút một lần trong 10 phút ở bước sóng 625 nm.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tách dòng gen *dps* và *dxs* của *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.1. Tách chiết DNA tổng số từ chủng *A. tumefaciens* TT4

Chủng *A. tumefaciens* TT4 được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng qua đêm để thu sinh khối. DNA tổng số được tách chiết từ sinh khối thu được theo phương pháp được trình bày trong phần phương pháp nghiên cứu. DNA được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose (Hình 1) cho thấy xuất hiện một băng DNA rất đậm, không thấy xuất hiện vệt sáng phía dưới. Kết quả này chứng tỏ DNA thu được là nguyên vẹn. Kết quả đánh giá chất lượng DNA bằng đo độ hấp thụ quang (Bảng 1) tỉ số A₂₆₀/A₂₈₀ và A₂₆₀/A₂₃₀ đều đạt khoảng 2. Kết quả này chỉ ra rằng DNA tổng số thu được là sạch, đảm bảo yêu cầu thí nghiệm. Hàm lượng DNA đạt 505 ng/µl, đảm bảo đủ lượng DNA cho các nghiên cứu tách dòng gen tiếp theo.



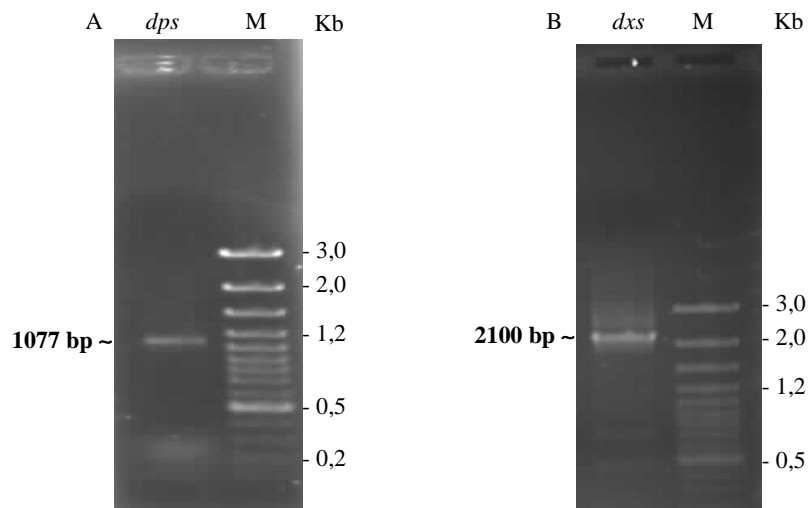
Bảng 1. Định lượng DNA tổng số.

A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Nồng độ (ng/ μ l)
2,01	1,98	505

Hình 1. Phổ điện di DNA tổng số tách chiết từ *Agrobacterium tumefaciens* TT4.

3.1.2. Khuếch đại gen *dps* và *dxs* bằng phản ứng PCR

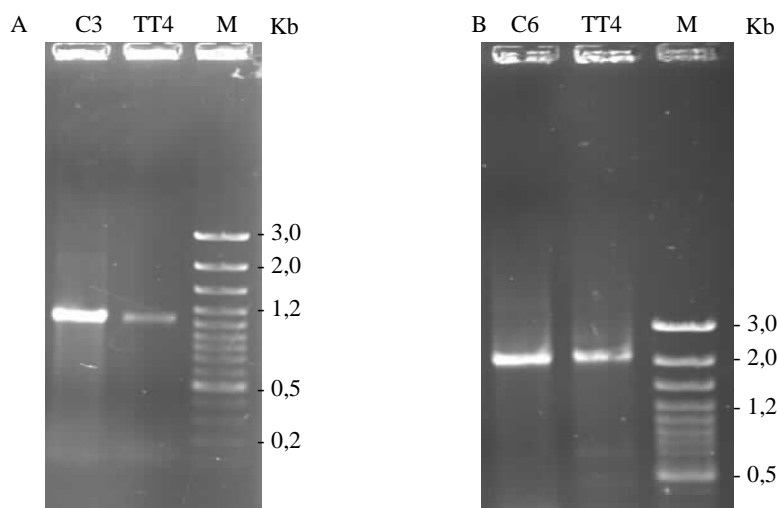
Hai cặp mồi đặc hiệu hai đoạn gen *dps* và *dxs* mã hóa hai enzyme chìa khóa của con đường tổng hợp CoQ10 là decaprenyl diphosphate synthase và 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase đã được thiết kế với trình tự như trong phần vật liệu. Theo thiết kế với cặp mồi DpsF/R sẽ cho phép khuếch đại đoạn gen *dps* có kích thước 1077 bp; với cặp mồi DxsF/R sẽ cho phép khuếch đại đoạn DNA có kích thước 2103 bp bao gồm đoạn gen *dxs* (1920 bp) và đoạn DNA phía đầu 5' của gen này (183 bp). Kết quả phổ điện di sản phẩm PCR cho thấy xuất hiện một băng DNA xấp xỉ 1,2 kb (Hình 2A) và một băng kích thước khoảng 2,1 kb (Hình 2B) khi sử dụng cặp mồi DpsF/R và DxsF/R tương ứng. Kích thước của các sản phẩm PCR thu được là hoàn toàn phù hợp với kích thước của hai đoạn gen đích cần khuếch đại. Từ kết quả này cho thấy hai đoạn gen *dps* và *dxs* đã được khuếch đại từ khuôn DNA tổng số của chủng *A. tumefaciens* TT4 bằng kỹ thuật PCR.



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *dps* (A) và *dxs* (B) từ DNA tổng số của *Agrobacterium tumefaciens* TT4. M, thang DNA chuẩn 100bp (Thermo Scientific, Mỹ).

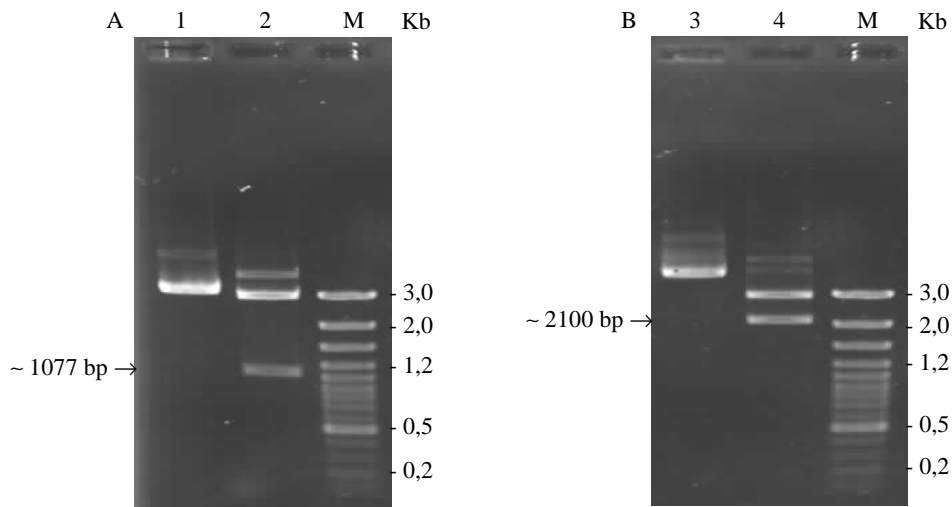
3.1.3. Tách dòng gen *dps* và *dxs*

Sản phẩm PCR của hai gen *dps* và *dxs* được xử lý bằng enzyme Klenow và gắn vào vector tách dòng pJET1.2/blunt (Thermo Scientific, USA) theo hướng dẫn sử dụng của kit. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào *E. coli* DH10b để chọn dòng mang vector tái tổ hợp. Vector pJET1.2/blunt mang gen kháng ampicilin và gen gây chết *eco47IR* cho phép chọn lọc các dòng mang vector tái tổ hợp một cách hiệu quả. Theo thiết kế, gen đích sẽ được gắn vào vị trí MCS nằm giữa gen *eco47IR* trên vector dẫn đến bất hoạt gen *eco47IR* và cho phép *E. coli* mang vector tái tổ hợp có thể sinh trưởng được. *E. coli* mang vector pJET1.2/blunt tự đóng vòng sẽ bị chết do chứa gen *eco47IR* ở trạng thái hoạt động. Kết quả biến nạp cho thấy xuất hiện 10 và 7 khuẩn lạc trên môi trường LB thạch chứa ampicilin (100 µg/ml) tương ứng với hai gen *dps* và *dxs*. Plasmid đã được tách chiết từ những khuẩn lạc và được sử dụng cho sàng lọc sơ bộ để chọn ra một dòng tương ứng với mỗi gen để nghiên cứu tiếp theo. Trước tiên, plasmid được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen *dps* và *dxs* tương ứng. Kết quả cho thấy đều xuất hiện băng sản phẩm PCR trên phổ điện di với kích thước phù hợp với kích thước của gen *dps* (Hình 3A) và *dxs* (Hình 3B). Kích thước sản phẩm PCR từ khuôn DNA plasmid tương đương với kích thước sản phẩm PCR từ khuôn DNA tổng số của chủng *A. tumefaciens* TT4 ban đầu (Hình 3). Kết quả nhận được chứng tỏ hai dòng được lựa chọn mang gen đích tương ứng là *dps* và *dxs*. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn hơn DNA plasmid của hai dòng này tiếp tục được xử lý bằng các enzyme hạn chế thích hợp.



Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *dps* (A) và *dxs* (B) từ DNA plasmid của các dòng tái tổ hợp. C3, C6 là khuôn DNA plasmid tách chiết từ clone số 3 và số 6. TT4 là khuôn DNA tổng số tách chiết từ chủng *A. tumefaciens* TT4. Đường chạy M là thang DNA chuẩn 100bp (Thermo Scientific, Mỹ).

Theo thiết kế hai trình tự cắt của enzyme hạn chế *SacI* và *BamHI* được đưa vào đầu 5' của cặp mồi *DpsF/R* và tương tự trình tự cắt của *BamHI* và *SalI* được đưa vào cặp mồi *DxsF/R*. Kết quả xử lý bằng enzyme cắt hạn chế cho thấy đối với cả hai clone 3 và 6 đều vắng ra băng DNA có kích thước tương ứng với kích thước gen *dps* khoảng 1077 bp (Hình 4A) và gen *dxs* khoảng 2100 bp (Hình 4B). Từ các kết quả thu được có thể khẳng định rằng hai dòng số 3 và 6 là các dòng tái tổ hợp mang hai gen đích tương ứng là *dps* và *dxs*.



Hình 4. Phổ điện di sản phẩm cắt DNA plasmid bằng các enzyme hạn chế đối với dòng số 3 mang gen *dps* (A) và dòng 6 mang gen *dxs* (B). Đường chạy 1, 3 là DNA plasmid chưa cắt; đường chạy 2, 4 là DNA plamid được cắt bằng cặp enzyme *SacI/BamHI* và *BamHI/SalI* tương ứng với clone 3 và 6. Đường chạy M là thang DNA chuẩn 100bp (Thermo Scientific, Mỹ).

3.1.4. Xác định trình tự gen *dps* và *dxs* được tách dòng

Để kiểm tra trình tự và khung đọc của hai gen đích *dps* và *dxs* đã được tách dòng hai plasmid tái tổ hợp được sử dụng làm khuôn cho phản ứng xác định trình tự. Trình tự nucleotide và axit amin suy diễn của gen *dps* (Hình 5) và *dxs* (Hình 6) đã được xác định. Kết quả cho thấy gen được tách dòng chứa một khung đọc mở cho phép dịch mã tổng hợp một protein nguyên vẹn.

```

ttgccgcacaaggcatcagtttttattgtcgaattcaaattcgaactggagtcctgtccc
M P H K A S V F I V E F K F E L E S C P
ttgggcgctcgtcataccgcttgaagaaagcaaaaacaaactcgcacccgtcaagccgctt
L G V V I P L E E S K N K L A S V K P L
gtcgcacctgacccgccccgacatggaacgggtgaaccagcttatcctttccaaggccggt
V D L T R P D M E R V N Q L I L S K A G
tccgacgtgcagatgataccgaggtggccaaccacctcatctcgtcaggcggcaagcgc
S D V Q M I P E V A N H L I S S G G K R
ctgcccggatgctgacgctcgcctcggcctcgatgttcggttacgagggcgataatcac
L R P M L T L A S A S M F G Y E G D N H
atcaagctcggccacgagcgttgagttcatgcacacggcgacgcttctgcatgacgacgtg
I K L A T S V E F M H T A T L L H D D V
gtggatgaaagcgatctgctgctcggcgaatccaccgcacgcaccatctggggtaaccag
V D E S D L R R G K S T A R T I W G N Q
gcaagcgttctcgtcggcgacttctcgttggccaggctttccgcatgatgggtggatgtc
A S V L V G D F L L G Q A F R M M V D V
ggctctctcgtatgccctcgacgtgctctccaccgcccgcctcggatcatcgccgaggggtgag
G S L D V L S T A A S V I A E G E
gtgctgcagctttcggctcgccaagaacatggaaacgaccgaggacgattatcttcagggtg
V L Q L S V A K N M E T T E D D Y L Q V
attcgcgccaagacggctgccctcttcgcccgcggccgaagtcggccccatcgtcgcg
    
```

I R A K T A A L F A A A A E V G P I V A
aagaccgacaaggcgaccgcagtgccctgaaatcttatggcatgaatctcggcctcgcc
K T D K A T R S A L K S Y G M N L G L A
ttccagctggatgatgagctcttggactatggcggcaagtcggccgatctcggcaaaaac
F Q L V D D V L D Y G G K S A D L G K N
acagggcgacgatttccgaggggcaagatcacctgcccggatcatcctgtcctatcgccgc
T G D D F R E G K I T L P V I L S Y R R
ggcacgcaggatgagcgcgctttctggcgcaatgccatcgaaaaaggcgagagcagcgac
G T Q D E R A F W R N A I E K G E S S D
gagaacctcgaaaaggcgctcggcctgatcacaataataacggcctcgggtgatacgata
E N L E K A L G L I T K Y N G L G D T I
ggcgtgcaacgcattatggcaccattgcccgcgatgcgcttgaccggttgccgcagagc
G R A T H Y G T I A R D A L A P L P Q S
ccctggaaagatgcgcttctggaagtgatcgacttctgcatcgagcgtctcaactga
P W K D A L L E V I D F C I E R L N -

Hình 4. Trình tự nucleotide và axit amin suy diễn của gen *dps* được tách dòng.

ttgaccggaatgccacagacaccattgcttgaccgggtgaattttccctccgatctcaag
M T G M P Q T P L L D R V N F P S D L K
gagatcgatgatcgcgacttgccggaactggcaagggaactgcgacgagatgatcgat
E I D D R D L P E L A R E L R D E M I D
gccgtgctgaaaaccgggtgggcatctgggtgcccgccttgggtggtggaactgacgatt
A V S K T G G H L G A G L G V V E L T I
gccatccacaagggtcttcaacacgcccgaagaccggctgatcttcgatgctcggacaccaa
A I H K V F N T P E D R L I F D V G H Q
tgttatccgcacaagatcctgaccggccggcgggatcgcatccgcacgctgcggcaggaa
C Y P H K I L T G R R D R I R T L R Q E
gggtggcctttccgggtttcaccgcgctgcccgaagcgaatatgacgatttccggcgccggc
G G L S G F T R R A E S E Y D D F G A G
cattcctccacctccattttccgcccggctctcggcatggcgggtggcggcgggcttgatggc
H S S T S I S A G L G M A V A A G L D G
agcgaccgcaaggatgatcgctgtcatcggcgacggctcgatgtctgcccggatggccttt
S D R K V I A V I G D G S M S A G M A F
gaggcgtgaacaatgcccggcgctcgatgcacgactgatcgatccttgaacgacaac
E A L N N A G A L D A R L I V I L N D N
gacatgtccattgcccgcgacggcgcgatgagcgcctatctggcgctctcgcttcc
D M S I A P P T G A M S A Y L A R L A S
ggcgcacctatatgggttttcgcgatttccgcaagaagctcaccgcctatctcggcaag
G R T Y M G F R D F G K K L T A Y L G K
acgatcgaccgcgccattaccgcgcccgtgaccatgcgcccgggttacgtgaccggcggc
T I D R A I T R A V T H A R G Y V T G G
accctggtcgaggagctcgggtttctatcacatcggcccgatcgacggctcactccttcgac
T L F E E L G F Y H I G P I D G H S F D
cacctggtgcccgtgctgcgcaatgtgcccgcgacaaccagaaaaggccctgtcctcatccat
H L L P V L R N V R D N Q K G P V L I H
gtgggtgacacagaaaggcaagggttatgcccggcggaagccgcagcggacaaaatatcac
V V T Q K G K G Y A P A E A A A D K Y H
ggcgtcaacaagttcgatgtcatcaccggcgcgagggcgaagccaagccgaatgcgccc
G V N K F D V I T G A Q A K A K P N A P
agctataccagcgtctttgcccaggcgctgatccaggaagccacgctcgatgagaaaaatc
S Y T S V F A E A L I Q E A T L D E K I
atcgggtgacggccgagatgcccacgggtaccggcctcgacaagatggcccagctgttc
I G V T A A M P N G T G L D K M A E L F

```
ccggcgcgcaccttcgatgtcggcattgcccgaacagcatgccgtcacctttgcggcggga
P A R T F D V G I A E Q H A V T F A A G
cttgcggctgacggttacaagccgttctgcgcgctttattccaccttcctgcagcgcggt
L A A D G Y K P F C A L Y S T F L Q R G
tacgaccagttggtgcatgatgtggcaatacagagcctgcccgctgcgtttcccgatcgac
Y D Q L V H D V A I Q S L P V R F P I D
cgcgcgggttttgcggcggcggacggggccgacccatgccggctctttcgacaccactttc
R A G F V G A D G P T H A G S F D T T F
ctcgcaccctccccggcatggtagttatggcggcctcggatgagggcggagctgaaacat
L A T L P G M V V M A A S D E A E L K H
atggctccgcacggcggcggcctatgacgaaggccccgatttcccttccggtatccgcgcgga
M V R T A A A Y D E G P I S F R Y P R G
gaaggtgtcggcgttgaaatgcccgcacgcggggagattcttcagatcggcaagggtcgc
E G V G V E M P A R G E I L Q I G K G R
atcatcaaggaaggcacgaaggttgccctgctttccttcggaaccgccttgcggaatgc
I I K E G T K V A L L S F G T R L A E C
ctggcggcggcgaagacctggacgcggcggctctcccacgacgggtgccgatgcgcgc
L A A A E D L D A A G L P T T V A D A R
ttcgccaagccgctcgatctcgatctcatccgccagctcggcagccatcatgagattctg
F A K P L D L D L I R Q L A S H H E I L
gtgacggctgaggaaggctcggctcggcgggtttcggcgcacatgtgctgcatttcatggca
V T V E E G S V G G F G A H V L H F M A
agtggcggcctgctcgatcacggcccaagggtgcggacactcacactgccggaccagtg
S G G L L D H G P K V R T L T L P D Q W
gtggaacaggccaagccagagaccatgtatgccaatgccggcctcgaccgggcccggcatc
V E Q A K P E T M Y A N A G L D R A G I
Atttccacgggtgttcaatgcgctcggccag-----
I S T V F N A L G Q R Q A G V G F A G -
```

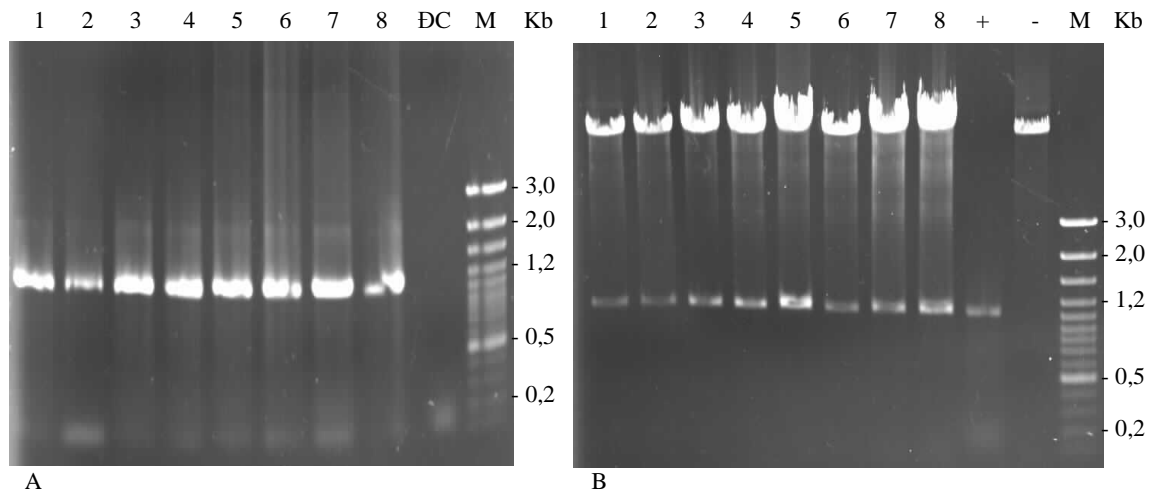
Hình 5. Trình tự nucleotide và axit amin suy diễn của gen *dxs* được tách dòng.

3.2. Tạo cấu trúc biểu hiện mang gen *dps* và *dxs*

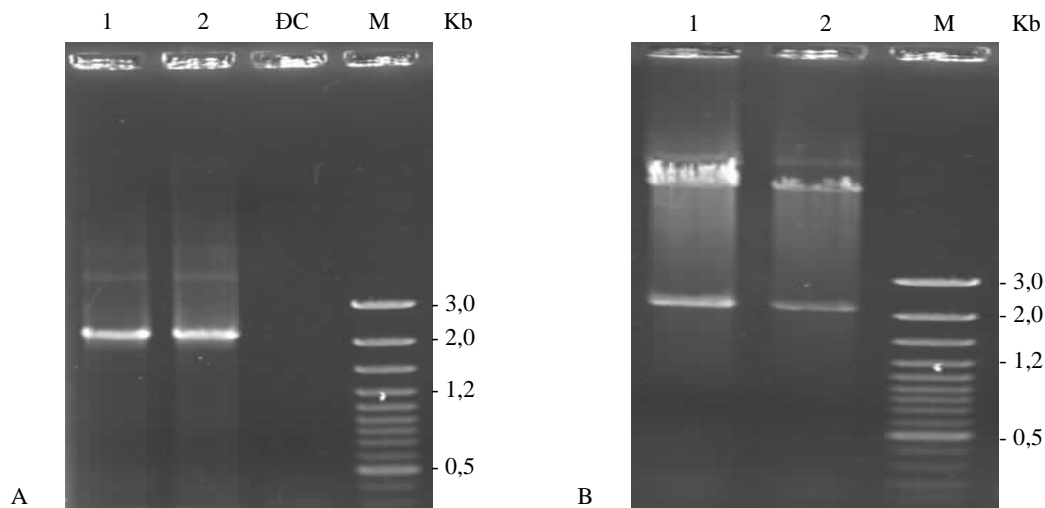
Trong nghiên cứu này vector pCAMBIA1301 với kích thước 11837 bp được sử dụng làm vector biểu hiện phù hợp chủng chủ *A. tumefaciens*. Hai gen *dps* và *dxs* sẽ được đưa độc lập và đồng thời vào vector pCAMBIA1301 để tạo ra các cấu trúc biểu hiện pCAM-*dps*, pCAM-*dxs* và pCAM-*dps-dxs*.

3.2.1. Tạo cấu trúc biểu hiện mang gen *dps* và *dxs* độc lập

Hai gen *dps* và *dxs* được cắt ra khỏi vector tách dòng bằng hai cặp enzyme cắt hạn chế tương ứng là *SacI/BamHI* và *BamHI/SalI*. Hai đoạn gen này được tinh sạch bằng phương pháp thổi gel sử dụng kit DNA gel purification kit (QIAGEN, Mỹ). Hai gen *dps* và *dxs* thu được đã được gắn vào vector biểu hiện pCAMBIA1301 đã được mở vòng bằng cặp enzyme cắt hạn chế tương ứng. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào *E. coli* DH10b để chọn dòng. Kết quả biến nạp cho thấy xuất hiện 11 và 2 khuẩn lạc tương ứng với gen *dps* và *dxs* trên môi trường LB thạch chứa kanamycin (100 µg/ml). DNA plasmid từ các dòng đã được sử dụng để sàng lọc sơ bộ cho các nghiên cứu tiếp theo. Đối với gen *dps*, 8 dòng đã được lựa chọn để kiểm tra sự có mặt của gen đích bằng phản ứng PCR sử dụng mồi đặc hiệu (Hình 6A) và xử lý bằng cặp enzyme cắt hạn chế *SacI/BamHI* (Hình 6B). Kết quả cho thấy cả 8 dòng đều xuất hiện băng DNA khoảng 1,1 kb tương ứng với kích thước gen *dps* (1077bp) (Hình 6).



Hình 6. Phổ điện di sản phẩm PCR (A) và cắt enzyme hạn chế (B) của các dòng được lựa chọn đối với gen *dps*. Đường chạy 1-8 tương ứng với 8 dòng được lựa chọn. ĐC là sản phẩm PCR từ khuôn plasmid pCAMBIA1301 đối chứng không mang gen. Đường chạy (+) là sản phẩm PCR từ khuôn gốc. Đường chạy (-) là sản phẩm cắt plasmid đối chứng. M là thang DNA chuẩn 100bp (Thermo Scientific, Mỹ).

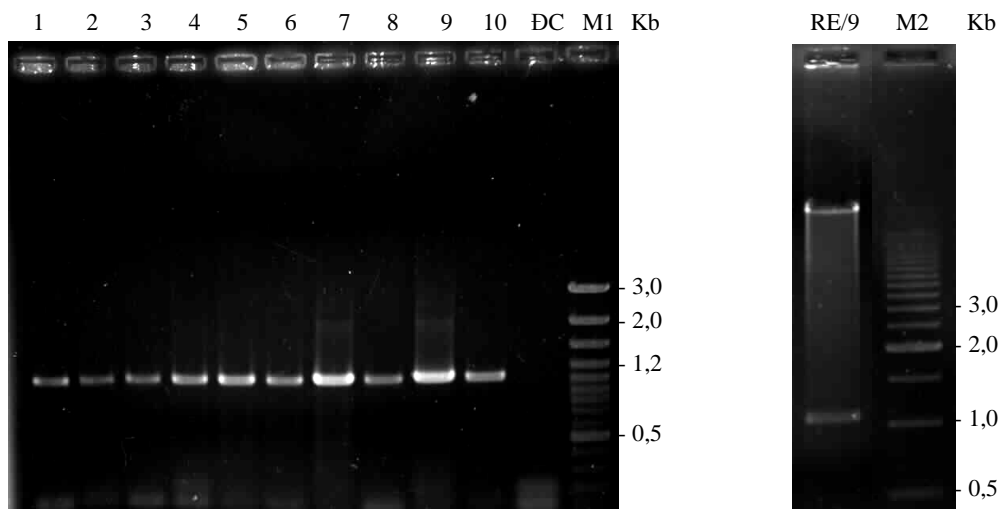


Hình 7. Phổ điện di sản phẩm PCR (A) và cắt enzyme hạn chế (B) của các dòng được lựa chọn đối với gen *dxs*. Đường chạy 1-2 tương ứng với 2 dòng được lựa chọn. ĐC là sản phẩm PCR từ khuôn plasmid pCAMBIA1301 đối chứng không mang gen. M là thang DNA chuẩn 100 bp (Thermo Scientific, Mỹ).

Tương tự đối với gen *dxs*, 2 dòng đã được lựa chọn để kiểm tra sự có mặt của gen đích bằng phản ứng PCR sử dụng môi đặc hiệu (Hình 7A) và xử lý bằng cặp enzyme *Bam*HI/*Sal*I (Hình 7B). Kết quả cho thấy cả 2 dòng đều xuất hiện băng DNA khoảng 2,1 kb tương ứng với kích thước đoạn gen đích *dxs* (2103 bp) (Hình 7). Các kết quả thu được cho thấy rằng gen *dps* và *dxs* đã được tách dòng thành công trong vector biểu hiện pCAMBIA1301. Các cấu trúc tái tổ hợp được ký hiệu pCAM-*dps* và pCAM-*dxs* tương ứng.

3.2.2. Tạo cấu trúc biểu hiện mang đồng thời hai gen *dps* và *dxs*

Để tạo cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp chứa đồng thời hai gen *dps* và *dxs*, gen *dps* thu được từ vector tách dòng sau khi xử lý bởi cặp enzyme cắt hạn chế *SacI* và *BamHI* được nối vào vector pCAM-*dxs* đã được mở vòng bởi *SacI/BamHI*. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào *E. coli* DH10b và kết quả thu được 10 khuẩn lạc. Kết quả PCR từ khuôn plasmid sử dụng cặp mồi DpsF/R cho thấy cả 10 khuẩn lạc đều cho sản phẩm có kích thước tương đương với kích thước đoạn gen *dps* (1077 bp) (Hình 8). Đối chứng sử dụng khuôn pCAM-*dxs* không thấy xuất hiện sản phẩm, điều đó chứng tỏ plasmid từ 10 dòng thu được mang gen *dps*. Dòng số 9 được lựa chọn để kiểm tra plasmid bằng việc cắt với *SacI/BamHI*, kết quả cho thấy xuất hiện 1 băng DNA xấp xỉ 1,2 kb. Từ kết quả này có thể khẳng định rằng đã gắn được gen *dps* vào vector tái tổ hợp pCAM-*dxs* để tạo cấu trúc tái tổ hợp mới chứa đồng thời hai gen *dps* và *dxs*, được ký hiệu pCAM-*dps-dxs*.

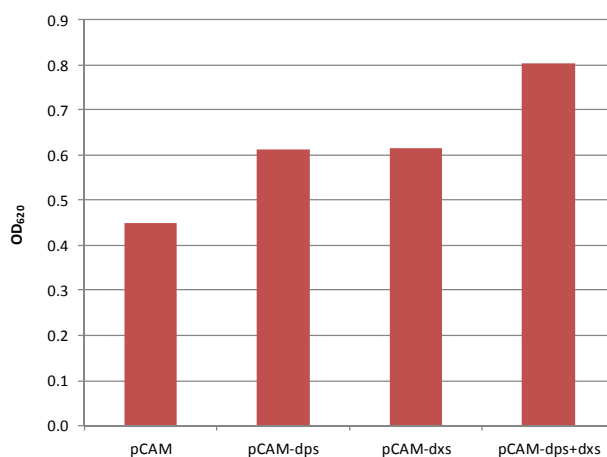


Hình 8. Phổ điện di sản phẩm PCR từ khuôn plasmid của 10 dòng sử dụng cặp mồi DpsF/R (A) và sản phẩm cắt enzyme hạn chế (B). Đường chạy 1-10, sản phẩm PCR từ khuôn plasmid của 10 dòng tương ứng; mẫu đối chứng sử dụng khuôn pCAM-*dxs* (ĐC); RE/9, dòng số 9 được xử lý bởi *SacI/BamHI* thang DNA chuẩn 100 bp (M1) và 1 kb (M2).

3.3. Tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp mang cấu trúc pCAM-*dps-dxs*

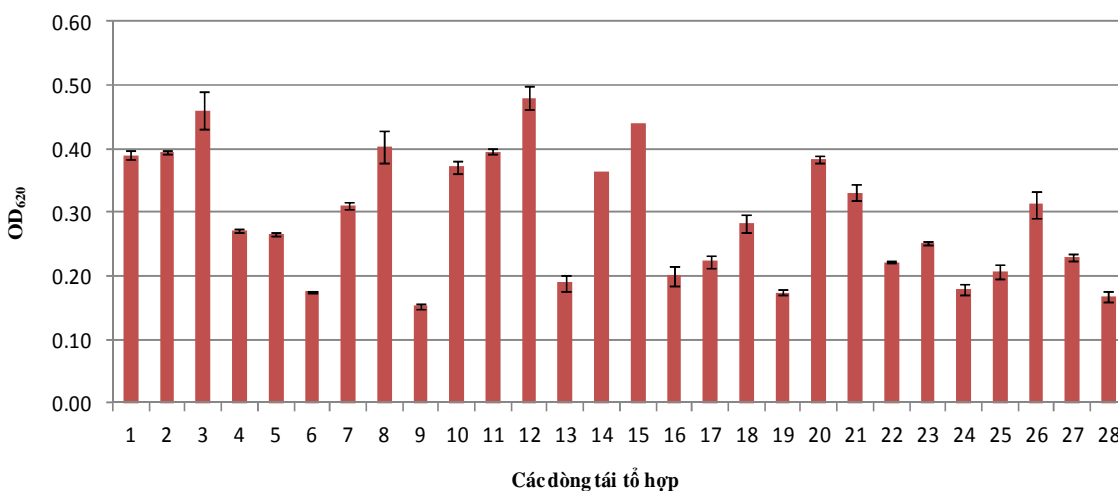
Chủng *A. tumefaciens* EHA105 có khả năng tổng hợp CoQ10 và nhạy cảm với kháng sinh kanamycin được sử dụng làm chủng chủ. Các cấu trúc tái tổ hợp pCAM-*dps*, pCAM-*dxs*, pCAM-*dps-dxs* được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* khả biến bằng phương pháp xung điện (như mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu). Các dòng tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường chứa kanamycin (100 µg/ml). Để xác định được khả năng sinh tổng hợp CoQ10 của các chủng tái tổ hợp, các chủng pCAM-*dps*, pCAM-*dxs*, pCAM-*dps-dxs*, và chủng đối chứng pCAM được nuôi cấy trong môi trường chứa 5 % sucrose, 2 % cao nấm men, 2 % peptone, 1 % (NH₄)₂SO₄, 0,05 % K₂HPO₄, 0,05 % KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O, 0,2 % CaCO₃ và 100 µg/ml kanamycin ở 30 °C. Sinh khối được thu nhận sau 96 giờ nuôi cấy để tách chiết CoQ10. Khả năng sinh tổng hợp CoQ10 của các chủng tái tổ hợp so với chủng đối chứng được thể hiện trên Hình 9. Kết quả cho thấy chủng tái tổ hợp chứa đơn gen pCAM-*dps* và pCAM-*dxs* có khả năng sinh tổng hợp CoQ10 tăng lên 1,34 và 1,38 lần so với đối chứng. Khi kết hợp cả hai gen *dps* và *dxs*

tạo chủng pCAM-*dps-dxs* đã làm tăng khả năng tổng hợp CoQ10 của *A. tumefaciens* lên 1,80 lần so với đối chứng. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với nghiên cứu trước đây của Cheong và cộng sự [15]. Do đó các dòng *A. tumefaciens* mang cấu trúc pCAM-*dps-dxs* được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 9. Khả năng sinh tổng hợp CoQ10 của các chủng *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Chủng tái tổ hợp chứa vector tái tổ hợp mang đơn gen pCAM-*pds* và pCAM-*dxs* và đồng thời hai gen pCAM-*dps-dxs*. Chủng đối chứng mang vector pCAMBIA1301.

Kết quả khảo sát khả năng sinh tổng hợp CoQ10 của 28 dòng *A. tumefaciens* pCAM-*dps-dxs* tái tổ hợp cho thấy khả năng sinh tổng hợp CoQ10 là khác nhau (Hình 10). Trong số 28 dòng có 10 dòng (1, 2, 3, 8, 10, 11, 12, 14, 15) có khả năng tổng hợp CoQ10 đạt trên 75 % so với dòng cao nhất; chỉ có 3 dòng (3, 12 và 15) có khả năng tổng hợp CoQ10 đạt trên 90 % so với dòng cao nhất.



Hình 9. Khả năng sinh tổng hợp CoQ10 của các dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang cấu trúc pCAM-*dps-dxs*.

4. KẾT LUẬN

Hai gen *dps* và *dxs* mã hóa cho hai enzyme chìa khóa của con đường tổng hợp CoQ10 ở *A. tumefaciens* đã được tách dòng thành công. Các cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp phù hợp chủng chủ *A. tumefaciens* đã được tạo ra bao gồm pCAM-*dps*, pCAM-*dxs* và pCAM-*dps-dxs*. Các chủng *A. tumefaciens* DPS, DXS và DPXS tái tổ hợp mang các cấu trúc biểu hiện được chọn lọc và có khả năng sinh tổng hợp CoQ10 cao hơn chủng tự nhiên. Chủng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang đồng thời hai gen *dps* và *dxs* có khả năng sinh tổng hợp CoQ10 cao hơn các chủng mang chỉ *dps* hoặc *dxs*. Khả năng sinh tổng hợp CoQ10 của 28 dòng *A. tumefaciens* tái tổ hợp mang đồng thời hai gen đã được đánh giá cho phép lựa chọn được 3 dòng (3, 12 và 15) có khả năng tổng hợp CoQ10 cao nhất. Các dòng được lựa chọn *A. tumefaciens* DPXS03, DPXS12 và DPXS15 sẽ được sử dụng cho nghiên cứu tối ưu tổng hợp CoQ10.

Lời cảm ơn. Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu quy trình công nghệ tạo chế phẩm CoQ10 từ *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp để sản xuất thực phẩm chức năng” của Bộ Công thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alan R. G. - The Role of Coenzyme Q10 in Clinical Medicine, *Alternative Medicine Review* **1** (1996) 11-17.
2. Munkholm H., Hansen H.H.T., Rasmussen K. - Coenzyme Q10 treatment in serious heart failure, *Biofactors* **9** (1999) 285-289.
3. Overvad K., Diamant B., Holm L., Holmer G., Mortensen S. A., Stender S. - Q10 in health and disease, *European Journal of Clinical Nutrition* **53** (1999) 764-770.
4. Prakash S., Sunitha J., Hans M. - Role of coenzyme Q10 as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases. *Indian Journal of Pharmacology* **42** (6) (2010) 334-337.
5. Urakami T. and Yoshida T. - Production of ubiquinone and bacteriochlorophyll *a* by *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter sulfidophilus*, *Journal of Fermentation Bioengineering* **76**(3) (1993) 191-194.
6. Yoshida H., Kotani Y. - Production of ubiquinone-10 using bacteria, *Journal of Genetic Applied Microbiology* **44** (1998) 19-26.
7. Zahiri H. S., Yoon S. H., Keasling J. D. - Coenzyme Q10 production in recombinant *Escherichia coli* strains engineered with a heterologous decaprenyl diphosphate synthase gene and foreign mevalonate pathway, *Metabolic Engineering* **8** (2006) 406 - 416.
8. Ha S. J., Kim S. Y., Seo J. H., Moon H. J., Lee K. M. and Lee J. K. - Controlling the sucrose concentration increases coenzyme Q10 production in fed-batch culture of *Agrobacterium tumefaciens*, *Applied Microbiology and Biotechnology* **76** (2007a) 109-116.
9. Ha S. J., Kim S. Y., Seo J. H., Oh D. K., Lee J. K. - Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*, *Applied Microbiology Biotechnology* **74** (2007b) 974-980.

10. Lee J. K., Oh D. K., Kim S. Y. - Cloning and characterization of the *dxs* gene, encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase from *Agrobacterium tumefaciens*, and its overexpression in *Agrobacterium tumefaciens*, Journal of Biotechnology **128** (2007) 555–566.
11. Gu S. B., Yao J. M., Yuan Q. P., Xue P. J., Zheng Z. M. and Yu Z. L. - Kinetics of *Agrobacterium tumefaciens* ubiquinone-10 batch production, Process Biochemistry **41** (2006) 1908-1912.
12. Sambrook J., Russell D. W. - Molecular cloning. Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Blood. Analytical biochemistry 23, 132-1140.
13. Tian Y., Yue T., Pei J., Yuan Y., Li J. and Lo Y. M. - Effects of Cell Lysis Treatments on the Yield of Coenzyme Q10 Following *Agrobacterium tumefaciens* Fermentation, Food Science and Technology International **16**(2) (2010) 195-199.
14. Shimada H., Kodjabachian D. and Ishida M. - Specific and rapid analysis of ubiquinones using Craven's reaction and HPLC with postcolumn derivatization, Journal of Lipid Research **48** (2007) 2079-2085.
15. Cheong S. R., Kim S. Y., Lee J. K., Lee H. C., Ha S. J., Koo B.S., Yoo J.H. - Fermentation process for preparing coenzyme Q10 by the recombinant *Agrobacterium tumefaciens*, United States Patent Application Publication (2008) US2008/0261282 A1.

ABSTRACT

IMPROVEMENT OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* STRAINS FOR ENHANCING COQ10 PRODUCIBILITY

Nguyen Viet Phuong, Truong Quoc Phong*, Dang Thi Thu

Center for Research and Development in Biotechnology,
Hanoi University of Science and Technology, No.1, Dai Co Viet, Ha Ba Trung, Hanoi

*Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn

Coenzyme Q10 (CoQ10) plays a role in electron transport and is one of the important components of the respiratory chain. In present CoQ10 is used more as a source of functional food or treatment supporting drug due to strong antioxidant properties and its beneficial role in the treatment of many serious diseases as cancer, cardiovascular, diabetes,... Many biological processes have been developed to produce CoQ10 on a large scale. These processes are mainly relied on microorganisms because they have the ability to generate high levels of CoQ10. Among the CoQ10 producing microorganisms, *Agrobacterium tumefaciens* is considered as species with CoQ10 producibility in large scale due to their ability to produce large amounts of CoQ10 on the simple, inexpensive media. The purpose of this research is to increase the activity of two key enzymes of CoQ10 synthesis (decaprenyl diphosphate synthase and 1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate synthase), leading to improve the CoQ10 producibility of *A. tumefaciens*. Two genes *dps* and *dxs* from *A. tumefaciens* TT4 strain encoding decaprenyl diphosphate synthase and 1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate synthase respectively were successfully cloned in the cloning vector pJET1.2. These two genes were further inserted into the expression

vector pCAMBIA13011, in turn transferred into the host strain *A. tumefaciens* EHA105. The CoQ10 producing ability of recombinants was determined 1.8 times higher than the original one. Of the 28 clones of *A. tumefaciens* carrying recombinant structure pCAM-*dps-dxs*, 3 clones with capable of the highest CoQ10 biosynthesis were selected for subsequent studies.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, decaprenyl diphosphate synthase, 1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate synthase, Coenzyme Q10 (CoQ10).