

## VAI TRÒ CỦA ĐỘT BIẾN KÉP Ở HAI VỊ TRÍ D260E VÀ Y230V TRONG ENZIM ÊPOXIT HYDROLAZA CỦA HẠT ĐẬU TƯƠNG

NGHIÊM NGỌC MINH

*Viện Công nghệ sinh học*

Êpoxit hydrolaza (EH) là một enzym phân bố rộng rãi ở nhiều đối tượng như người [1, 12], động vật [2, 7], côn trùng [5] và vi sinh vật [8, 9]. Enzym này có chức năng xúc tác để thủy phân vòng êpoxi thành một sản phẩm có 2 nhóm hydroxyl (diols) nằm gần nhau, khi thêm một phân tử nước ( $H_2O$ ). Năm 1995, Katsube và cs. đã công bố trình tự của cDNA mã hóa cho enzym EH [3]. Sau đó, Michael và cs. đã chỉ ra rằng bộ ba Asp<sup>333</sup> (axít aspactic ở vị trí 333), Asp<sup>495</sup> và His<sup>523</sup> trong EH ở chuột [7], hoặc Asp<sup>107</sup>, Asp<sup>246</sup> (tương đương với vị trí Asp<sup>260</sup> ở hạt đậu tương) và His<sup>275</sup> trong EH ở vi khuẩn [8] đã tạo thành bộ ba xúc tác của enzym EH dạng hòa tan. Ở người, vị trí của Tyr<sup>385</sup> và Tyr<sup>465</sup> (tương đương với vị trí Tyr<sup>125</sup> và Tyr<sup>230</sup> ở hạt đậu tương) có vai trò nhất định trong tâm xúc tác [12]. Masaomi và cs. (2000) cũng đã thông báo kết quả biểu hiện và làm sạch được enzym này trong hạt đậu tương ở dạng hòa tan [6]. Ở hạt đậu tương, trong chuỗi axít amin của EH, vị trí Asp<sup>260</sup> (D260) và Tyr<sup>230</sup> (Y230) cũng có thể đóng một vai trò nhất định trong việc duy trì hoạt tính enzym của chúng. Để nghiên cứu vai trò của đột biến kép ở cả vị trí D260 và Y230 trong EH của hạt đậu tương, dựa trên việc so sánh các chuỗi axít amin và số liệu về cấu trúc tinh thể của enzym EH, chúng tôi đã tạo đột biến kép trực tiếp bằng cách thay thế đồng thời Aps ở vị trí 260 bằng Glu (D260E) và Tyr ở vị trí 230 bằng Val (Y230V) nhờ kỹ thuật PCR. Đồng thời thiết kế và thử khả năng biểu hiện enzym đột biến ở dạng hòa tan trong *E. coli*.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

DNA plasmid có mang trình tự cDNA của gen EH bình thường ở hạt đậu tương (dùng làm khuôn cho phản ứng nhân bản-PCR), nhận từ

phòng thí nghiệm của GS.TS. Fukazawa, Viện nghiên cứu thực phẩm quốc gia Nhật Bản. Takara Ex taq<sup>TM</sup> Kit của hãng Takara Shuzo co., LTD. Nhật Bản: dùng trong phản ứng PCR, Kit TA Cloning<sup>(R)</sup> có vectơ pCR2.1, T4 DNA ligaza, tế bào khả biến của chủng *E.coli* INV F' của hãng Invitrogen<sup>TM</sup> dùng để nhân dòng cho đọc trình tự. Kit đọc trình tự: Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (RPN2438/RPN2538) của hãng Amersham pharmacia biotech. Các enzym giới hạn *Nde* I, *EcoR* I, tế bào khả biến của chủng JM109 nhận của hãng Wako/NIPON GIENE và chủng BL21 (DE23) của hãng Novagen.

Vectơ biểu hiện pET 21A (+) dùng để biểu hiện trong *E. coli* nhận từ hãng Invitrogen. Các cặp môi đột biến được thiết kế dựa trên trình tự cDNA (ở các vị trí bảo thủ) của gen EH ở đậu tương có trình tự như sau:

**D260E:** AACAGGTGAGTTGGAGATGGT  
AT ACAACTC.

**Y260V:** ACTGGACCCTTGAACTACGTC  
AGAAATTTC.

**EH-Star-Sense2:** ATATACATATGGAGC  
AAATAAAGCACAGAAC.

**EH-End-Anti2:** GTTGAATTCGTTTTTGG  
ACAGATCAGAACTTG.

Máy đọc trình tự DSQ 1000 automatic DNA-SEQUENCER của hãng Shimadzu-Nhật Bản.

#### 2. Phương pháp

+ Phương pháp PCR đã được sử dụng để nhân gen EH đột biến.

+ Phương pháp tách chiết DNA plasmid theo Sambrook và cs. [10].

+ Phương pháp nhân dòng (được tiến hành theo hướng dẫn trong TA Cloning<sup>R</sup> Kit).

+ Đọc trình tự của DNA bằng phương pháp dideoxynucleotit của Sanger và cs. [11].

+ Phương pháp SDS-PAGE theo Laemmli 1970 [4].

+ Phương pháp biểu hiện và làm sạch enzym EH đột biến trong *E.coli*: chủng *E.coli* BL21 (DE3) mang vectơ biểu hiện *pRSET* (có chứa gen EH đột biến) và *pKY260* được nuôi lactic ở 37°C, 200 vòng/phút qua đêm (khoảng 12-14 giờ) trong môi trường LB có bổ sung ampicillin và tetracyclin. Những tế bào nuôi cấy qua đêm (mật độ quang học OD khoảng 0,5-0,8) được thu nhận bằng ly tâm ở 4°C, 6000 vòng/phút và hòa tan trong 60 ml dung dịch đệm axetat pH 6,0 (50 mM đệm axetat, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA), sau đó được phá màng để giải phóng protein bằng cách sử dụng siêu âm. Ly tâm dung dịch này ở 10000 vòng/phút, trong 30 phút ở 4°C, loại bỏ cặn xác tế bào. Kiểm tra dịch biểu hiện trên gel SDS-PAGE.

+ Các phương pháp điện di trên gel agarosa polyacrylamit [10].

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

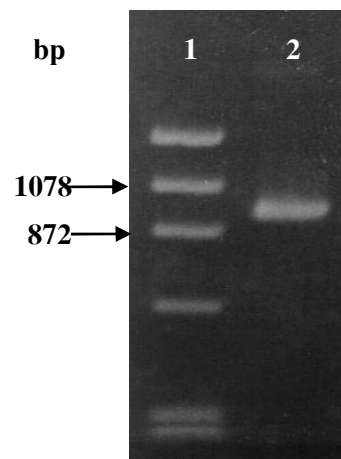
### 1. Tạo gen EH đột biến ở vị trí D260E

a. Tạo sản phẩm PCR lần 1 có chứa đột biến D260E trong gen EH

Cặp mỗi đột biến D260E và mỗi EH-End-Anti2 (có chứa vị trí cắt của enzym *EcoR* I và vị trí kết thúc phiên mã TGA) đã được sử dụng để nhân một đoạn gen có kích thước khoảng 210 bp (trong đó bao gồm cả vị trí đột biến D260E) bằng kỹ thuật PCR. Kết quả đã nhận được một băng DNA có kích thước khoảng 210 bp khá đặc hiệu. Băng DNA này được cắt và tách ra bằng cách dùng túi thẩm tích và điện di một chiều trong gel agarosa ở 100 V với thời gian là 30 phút. Sau đó, DNA này được làm sạch và hòa tan trong dung dịch TE (pH = 8) với nồng độ 1 nmol/μl.

Đoạn DNA có kích thước khoảng 210 bp (sản phẩm PCR lần 1) và môi EH-Star-Sense 2 (có chứa vị trí cắt của enzym *Nde* I và vị trí khởi đầu phiên mã ATG) được dùng để nhân một đoạn gen có kích thước khoảng 1 kb, trong đó

gồm toàn bộ chiều dài của gen EH (cDNA) có vị trí đột biến D260E bằng kỹ thuật PCR (nhiệt độ ủ là 62°C, tiến hành trong 30 chu kỳ). Kết quả đã nhận được 1 băng DNA có kích thước khoảng gần 1 kb khá đặc hiệu. Đoạn DNA này được cắt, làm sạch và kiểm tra trên gel agarosa 1% (hình 1).



**Hình 1.** Đoạn DNA (sản phẩm PCR lần 2) sau khi được cắt và làm sạch

Giếng 1: máckơ M4; giếng 2: sản phẩm PCR lần 2 của gen EH đột biến ở vị trí D260E.

b. Nhân dòng và xác định trình tự của gen EH đột biến ở vị trí D260E

Sản phẩm PCR lần 2 (đã được cắt và làm sạch) được gắn vào vectơ *pCR*<sup>R</sup> 2.1 nhờ enzym T4-DNA ligaza. Sau đó, vectơ này được biến nạp vào chủng *E. coli INV F'* và được chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa 50 mg/l ampicillin, 80 mg/l X-Gal và ủ ở 37°C qua đêm.

Kết quả, chúng tôi đã nhận được nhiều khuẩn lạc trắng xen kẽ với các khuẩn lạc xanh. Một số khuẩn lạc trắng đã được chọn để tách DNA plasmid. Sau đó, DNA plasmid này đã được cắt bằng enzym *EcoR* I ở 37°C trong 3 giờ và kiểm tra sản phẩm bằng điện di trên gel agarosa 1%. Kết quả, chúng tôi đã nhận được những băng DNA có kích thước khoảng 1 kb. Một vài plasmid có mang đoạn DNA khoảng 1 kb đó đã được làm sạch với số lượng lớn và dùng để đọc trình tự nucleotit.

Sau khi kết thúc đọc trình tự, xử lý và chọn lọc kết quả, chúng tôi đã nhận được những trình tự đúng của gen EH có vị trí đột biến D260E

nhu mong muốn. Đoạn DNA này (1 kb) đã được sử dụng làm khuôn để tạo đột biến thứ hai Y230V.

## 2. Tạo gen EH đột biến ở các vị trí D260E và Y230V

### a. Nhân dòng gen EH đột biến kép

Đoạn DNA (1kb) chứa vị trí đột biến D260E làm khuôn, cặp mỗi Y230V và EH-End-Anti2 đã được sử dụng để nhân một đoạn gen có kích thước khoảng 304 bp (trong đó bao gồm cả các vị trí đột biến D260E và Y230V) bằng kỹ thuật PCR. Kết quả đã nhận được một băng DNA có kích thước khoảng 304 bp. Băng DNA này được cắt và làm sạch qua các bước tương tự như ở mục 1 và được sử dụng làm môi cho phản ứng PCR lần hai.

#### NdeI

ATATA**CATATG**GAGCAAATAAAGCACAGAACAGTTGAAGTGAATGGCATAAAAAATGCATGTTGCAGAGAAAGG  
AGAGGGTCCAGTGGTGTGTTCCTCCACGGCTTCCCTGAGCTCTGGTACTCATGGCGCCATCAGATTCTCTCT  
CTCAGCTCCCTCGGCTACCGCGCCGTCGCTCCCGATCTCCGTGGCTACGGTGACACCGAGGCACCACCTTCAA  
TCAGCAGCTACAAC**TGCTTCC**CACATAGTGGGTGATCTCGTTGCGCTTATTGACTCTCTGGGTGTCCAACAAGT  
GTTCCCTTGTGGCTCATGACTGGGGAGCCATCATAGGTTGGTATCTATGCATGTTTTCGCCCTGACAAAGTTAAG  
GCCTATGTCTGCCTCAGTGTCCCTCTCCTCCGCAGAGACCCAAACATCAGAACGGTGGATGGCATGCGTGCTT  
TGTATGGAGACGACTACTATGTCTGCAGATTT**CAGAA**ACCAGGGGAAATGGAGGCTCAGATGGCTGAAGTTGG  
CACTGAGTATGTTCTCAAAAACATCCTTACAAC**TGCG**AAATCCTGGTCCCTCCAATTCTTCCCAAGGGAAGGTTT  
CAATTCATCCAGAAATGCCAACACCTTGCCCTCTTG**GCT**CACAGAAGAAGATCTCGCCTATTATGTCTCCA  
AATTTGAGAAAACCGGATTCACTGGACCCTTGAAC**TAC**GT**CAG**AAATTTCAACTTAAATTGGGAGTTGACGGC  
ACCATGGACAGGAGGGCA

#### Y230V

AATCAAGGTGCCCGTAAAATACATAACAGGTGAGTT**GAG**ATGGTATACAACCTCGCTGAACTTGAAGG

#### D260E

AGTATATCCACGGCGGAGGGTTCAAGCAAGATGTGCCAAATTTAGAACAAGTGATTGTGCAGAAAGGAGTGGC  
TCACTTCAATAATCAAGAAGCAGCAGAGGAAATCGATAATTACATATACGATTTTATCAACAAGTT**TGAT**CT  
TGTCCAAAACGAATTCAAC

Stop codon

**Hình 2.** Trình tự nucleotit của gen EH đột biến ở các vị trí D260E và Y230V  
(Asp ở vị trí 260 đổi thành Glu và Tyr ở vị trí 230 đổi thành Val)

Kết quả ở hình 2 cho thấy chúng tôi đã nhận được gen EH hoàn chỉnh bị đột biến, trong đó axit aspartic ở vị trí 260 bị thay thế bởi glutamin (D260E) và tyrosin ở vị trí 230 bị đổi thành valin (Y230V) đúng với mục đích của thí nghiệm đặt ra.

## 3. Khả năng biểu hiện enzym EH đột biến kép trong *E. coli*

Đoạn cDNA tái tổ hợp mã hóa cho enzym EH đột biến kép đã được gắn vào vectơ *pRSET* và chuyển vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) để biểu

hiện. Đoạn DNA có kích thước khoảng 304 bp (sản phẩm PCR lần 1) và mỗi EH-Star-Sense 2 (có chứa vị trí cắt của enzym *Nde* I và vị trí khởi đầu phiên mã ATG) được sử dụng để nhân toàn bộ gen EH có kích thước khoảng 1 kb (trong đó có thể đã gồm cả các vị trí đột biến D260E và Y230V).

Bằng các bước tiến hành tương tự như ở phần trên, các dòng tế bào mang plasmit chứa gen EH đột biến kép đã nhận được và các DNA plasmit này đã được tách và tinh sạch để đọc trình tự.

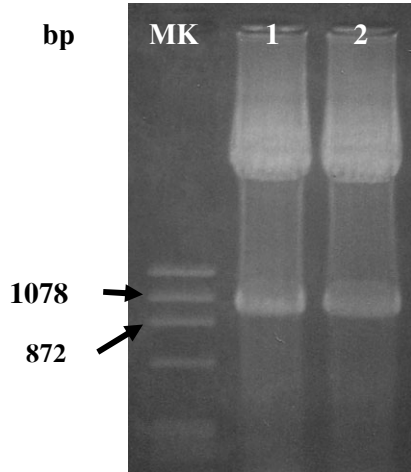
### b. Xác định trình tự của gen EH đột biến kép

Sau khi đọc trình tự, xử lý và chọn lọc kết quả, chúng tôi đã nhận được trình tự của gen EH đột biến hoàn chỉnh (hình 2).

Sau đó, vectơ *pRSET* tái tổ hợp đã được tách và cắt bằng enzym *Nde*I và *Eco*RI để kiểm tra đoạn cDNA mã hóa cho EH đột biến kép. Kết quả nhận được một đoạn DNA có kích thước phân tử khoảng 1 kb, điều này hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết (hình 3).

Các dòng tế bào chứa vectơ mang đoạn cDNA mã hóa cho EH đột biến kép này đã được dùng để biểu hiện protein. Tuy nhiên, việc biểu hiện ra dạng protein hòa tan không phải dễ dàng. Để nâng cao hiệu suất biểu hiện ở dạng hòa tan, chúng tôi đã tiến hành biểu hiện những

dòng tái tổ hợp cùng với sự có mặt của plasmid *pKY206* (*pKY206* mang gen *GroEL* và *GroES* có khả năng hỗ trợ cho việc biểu hiện ra các sản phẩm protein ở dạng hòa tan).



**Hình 3.** Các plasmid mang đoạn cDNA mã hóa cho EH đột biến kép trong chủng BL21

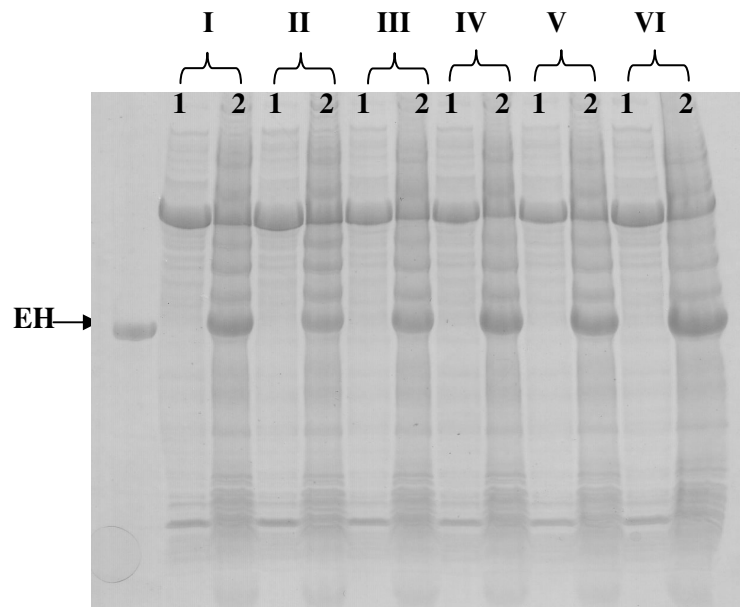
MK: máckơ M4; giếng 1-2: hai DNA plasmid tái tổ hợp được cắt bằng enzym hạn chế *coRI* và *NdeI*.

Sau khi phá tế bào để giải phóng protein

bằng siêu âm, dịch biểu hiện này được kiểm tra trên gel SDS-PAGE (hình 4).

Kết quả ở hình 4 cho thấy, ở cả 6 dòng tế bào (từ I đến VI) được chọn để biểu hiện, đều không biểu hiện được ra dạng hòa tan (các giếng số 1) mặc dù đã phối hợp với plasmid *pKY 206*. Ở các mẫu biểu hiện ra dạng không hòa tan (các giếng số 2), enzym EH nhận được có số lượng khá lớn và đặc hiệu nhưng dạng enzym này không có ý nghĩa trong nghiên cứu hoạt tính. Một điều hết sức lý thú là khi chỉ tạo đột biến đơn (hoặc chỉ tạo đột biến ở vị trí D260E hoặc vị trí Y230V) thì các enzym đột biến này đều có khả năng biểu hiện ra dạng protein hòa tan (kết quả không trình bày trong bài báo này).

Như vậy, khi tạo đột biến kép (D260E và Y230V) trong enzym EH của hạt đậu tương, enzym đột biến này không có khả năng biểu hiện ra dạng hòa tan. Điều này, theo chúng tôi, có thể do bị thay thế cùng một lúc 2 vị trí axit amin trong trình tự của enzym EH, từ đó dẫn đến có sự thay đổi nào đó về cấu trúc không gian nên enzym này đã không thể biểu hiện ra dạng protein hòa tan được.



**Hình 4.** Điện di độ-sản phẩm biểu hiện của enzym EH đột biến kép (D260E và Y230V)

*Ghi chú:* EH: enzym EH chuẩn; các số la mã I, II, III, IV, V, VI là thứ tự của 6 dòng tế bào được chọn để biểu hiện; giếng số 1 là các mẫu biểu hiện ở dạng hòa tan; giếng số 2 là các mẫu biểu hiện ở dạng không hòa tan.

### III. KẾT LUẬN

1. Bằng kỹ thuật PCR, nhân dòng và xác định trình tự nucleotit, chúng tôi đã tạo được gen mã hóa cho enzym EH đột biến ở 2 vị trí D260E và Y230V trong hạt đậu tương.

2. Đã thiết kế và biểu hiện enzym EH đột biến kép (D260E và Y230V) trong *E.coli*. Tuy nhiên, enzym đột biến này chỉ biểu hiện được ở dạng protein không hòa tan còn không biểu hiện được ở dạng protein hòa tan.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Armstrong R. N.**, 1999: Drug metab. Rev., 31: 71-86.
2. **Bentley P. and Oesch F.**, 1975: FEBS Lett., 59: 291-295.
3. **Katsube T. et al.**, 1995: Plant Physiol., 109: 722-723.
4. **Laemml U. K.**, 1970: Nature, 227: 248-254.
5. **Linderman R. J. et al.**, 1995: Tetrahedron, 51: 10845-10856.
6. **Masaomi A. et al.**, 2000: Eur. J. Biochem., 267: 2649-2657.
7. **Michael A., Heike W. and Franz O.**, 1996: J. Biol. Chem. USA, 271(8): 4223-4229.
8. **Rick R. et al.**, 1997: J. Biol. Chem., 272(23): 14650-14657.
9. **Rink R. et al.**, 1999: J. Am. Chem. Soc., 121: 7417-7418.
10. **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.**, 1989: Molecular cloning, A laboratory manual, Second edition. Cold Spring Harbor laboratory Prees.
11. **Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R.**, 1977: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467.
12. **Takashi Y. et al.**, 2000: J. Biol. Chem., 275(30): 23082 -23088.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin chân thành cảm ơn GS.TS. Chikafusa Eukazawa và TS. Masaomi Ahahira thuộc Viện nghiên cứu thực phẩm quốc gia Nhật Bản về những ý kiến thảo luận bổ ích và sự hướng dẫn tận tình.

## ROLE OF THE DOUBLE MUTANT AT TWO POSITIONS D260E AND Y230V OF THE EPOXIDE HYDROLASE IN SOYBEAN SEEDS

NGHIEM NGOC MINH

### SUMMARY

The epoxide hydrolases (EHs) are widely distributed among many bodies, including bacteria, fungi, plants and animals. These enzymes are an interesting group of functionally related enzymes that catalyse the addition of water molecule to an epoxide (oxirane moiety), producing the corresponding 1-2 diol. Recent studies have been provided valuable informations on the molecular structure of these enzymes, as well as the insight to the enzymatic mechanisms that involved.

To characterize one of the active sites of the epoxide hydrolases (EH), the gene encoding a soybean EH was modified with the synthetic oligonucleotide primers including the mutated sequence. The double mutant EH was constructed containing both of D260E and Y230V mutants. This mutant EH was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by using the *pRSET* expression plasmid in the presence of *pKY260* but not produced the soluble EH form. These results have suggested that perhaps the replacement both of the Asp position 260 by Glu and the Tyr position 230 by Val in the soybean EH has resulted in the change of its space structure and then has produced the insoluble form.

Ngày nhận bài: 14-3-2005