

QUY TRÌNH ĐƠN GIẢN SẢN XUẤT ADN POLYMERASE VÀ CHẾ PHẨM ‘HOTSTART’ Ở QUI MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Vũ Tuấn Nam¹, Chong Chom-Kyu², Lê Tiến Dũng^{1*}

¹Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học và Nông nghiệp Việt Nam,
*research@letidung.info

²Công ty TNHH Genbody, Cheonan, Hàn Quốc

TÓM TẮT: Phản ứng nối kết chuỗi các phân tử nucleotide hay còn gọi là PCR (Polymerase Chain Reaction) sử dụng enzyme ADN polymerase và các thành phần khác để khuếch đại đoạn ADN mục tiêu, trong đó enzyme ADN polymerase đóng vai trò then chốt. Vector mang gen mã hóa cho ADN polymerase từ vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* được biến nạp vào tế bào *Escherichia coli* để biểu hiện enzyme này. Taq ADN polymerase tái tổ hợp được tinh sạch theo quy trình đơn giản, dễ thực hiện gồm các bước phá tế bào bằng sóng siêu âm, ly tâm lấy dịch chiết, xử lý nhiệt, kết tủa bằng ammonium sulphate và thẩm tích qua đêm. Enzyme thu được có độ sạch cao khi kiểm tra bằng điện di protein và có hoạt tính tương đương với enzyme thương mại khi so sánh bằng phản ứng khuếch đại ADN. Cứ mỗi 500 mL môi trường kết hợp nuôi cấy lắc chúng tôi thu được 2,0-2,5 ml enzyme có hoạt tính tương đương với 7.000-8.000 đơn vị Taq ADN polymerase thương mại có giá trị tương đương với sản phẩm nhập khẩu khoảng 30 triệu đồng. Thử nghiệm tạo chế phẩm “hotstart” enzyme chúng tôi thấy tỉ lệ pha trộn 100 : 1 (nanogram kháng thể : đơn vị Taq) có khả năng ngăn chặn sự hình thành các băng ADN không đặc hiệu. Enzyme thu được cho thấy có thể thích ứng với phản ứng PCR có ADN khuôn có độ phức tạp khác nhau như ADN genome, ADN plasmid hay ADN bổ sung (cDNA). Quy trình này có thể nhân rộng để tự sản xuất Taq ADN polymerase sử dụng trong phòng thí nghiệm.

Từ khóa: enzyme tái tổ hợp, hotstart Taq ADN polymerase, Taq ADN polymerase, protein tái tổ hợp.

MỞ ĐẦU

PCR (còn gọi là phản ứng nối kết chuỗi các phân tử nucleotide) là phương pháp khuếch đại đoạn gen mong muốn dưới tác dụng của enzyme ADN polymerase để tạo ra hàng ngàn đến hàng triệu bản sao ADN. PCR được Mullis et al. (1985) [14] phát minh, đưa lại một cuộc cách mạng trong di truyền học phân tử, giúp phân tích từng gen mục tiêu nhỏ lẻ trong một hệ gen có cấu trúc phức tạp khổng lồ. Với ưu điểm nhanh chóng, chính xác với độ tin cậy rất cao và yêu cầu lượng ADN ban đầu rất thấp, kỹ thuật PCR được nhanh chóng áp dụng rộng rãi để chẩn đoán các bệnh về virus, vi khuẩn, các bệnh ký sinh trùng và cho kết quả rất chính xác. Bên cạnh đó, với đặc tính sao chép chính xác thành phần và trật tự nucleotide trong chuỗi ADN, PCR còn có vai trò quan trọng trong việc phân tích trình tự và cấu trúc ADN, có ý nghĩa to lớn trong phân loại các loài vi sinh vật [16, 20].

Tuy nhiên thách thức lớn của phương pháp PCR là yêu cầu enzyme xúc tác có hoạt tính bền

trong điều kiện nhiệt độ cao. Taq ADN polymerase là enzyme bền nhiệt đáp ứng được các yêu cầu này [5]. Taq polymerase, còn gọi là Taq pol hoặc Taq, là enzyme ADN polymerase chịu nhiệt, có nguồn gốc từ vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* được phát hiện lần đầu tiên năm 1965, có hoạt tính polymerase cao và khả năng chịu nhiệt tốt, phù hợp với điều kiện hoạt động của phản ứng PCR [2, 18]. Taq ADN polymerase xúc tác cho sự kết hợp của dNTP vào ADN với tỷ lệ khoảng một ngàn cặp nucleotide mỗi phút trong môi trường đệm phù hợp chứa ADN khuôn và ion Mg^{2+} đóng vai trò cofactor. Taq ADN polymerase có hoạt tính 5'-3' exonuclease nhưng thiếu chức năng 3'-5' exonuclease, đồng thời có khả năng nối 1 nucleotide adenine tại đầu 3' của chuỗi ADN, mà thông qua đó, rất hữu ích để tạo các đầu thò trong kỹ thuật tách dòng từ các sản phẩm PCR [12, 17]. Chính nhờ những đặc tính hữu dụng ấy mà enzyme Taq cùng với kỹ thuật PCR đã góp phần làm thay đổi những kỹ nghệ sinh học hiện đại và là nền tảng cho sự phát triển vượt

bậc cho các kỹ thuật sinh học phân tử sau này. Đã có nhiều phương pháp khác nhau để sản xuất Taq ADN polymerase với các kỹ thuật khác nhau, thay vì nguồn gốc ban đầu từ suối nước nóng, trong đó, phương pháp phổ biến nhất hiện nay chính là tái tổ hợp gen mã hóa enzyme Taq và chuyển vào tế bào *E. coli*. Enzyme Taq ADN polymerase tái tổ hợp và biểu hiện trong *E. coli* có những đặc điểm giống với Taq có nguồn gốc từ *Thermus aquaticus* về hoạt tính xúc tác cũng như khả năng chịu nhiệt. Tách dòng và biểu hiện enzyme Taq trong hệ thống biểu hiện *E. coli* tạo ra những bước đột phá trong quá trình sản xuất Taq polymerase [8, 9]. Việc tự sản xuất để chủ động cung cấp enzyme ADN polymerase sẽ giúp tiết kiệm chi phí nghiên cứu nhất là với “hot start” enzyme thường có giá cao trên thị trường. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một quy trình đơn giản để biểu hiện và tinh sạch ADN polymerase tái tổ hợp có nguồn gốc từ vi khuẩn ưa nhiệt *Thermus aquaticus* và thử nghiệm chế phẩm “hotstart”.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Tế bào *E. coli* BL21(DE3) khả biến do chúng tôi tự sản xuất. Plasmid mang gen mã hóa enzyme Taq ADN polymerase dưới sự điều khiển của promoter T7 và mang gene kháng ampicillin do Công ty TNHH Genbody (Cheonan, Hàn Quốc) cung cấp; IPTG (Promega, Hoa Kỳ), môi trường LB-Luria Bertami (Serva, Đức). Kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng Taq ADN polymerase được sản xuất từ dòng tế bào lai (hybridoma) J1E8 được cung cấp bởi công ty C&K BioResource (Cheongju, Hàn Quốc), và các hóa chất khác có độ tinh sạch đáp ứng được các yêu cầu của sinh học phân tử, được cung cấp bởi Merck (Đức).

Biểu hiện gen: Chủng *E. coli* mang gen mã hóa enzyme Taq ADN polymerase được nuôi trong 250 ml dung dịch môi trường LB chứa 50 µg/ml ampicillin ở 37°C cho đến khi đạt giá trị OD₆₀₀ khoảng 0,8. Việc biểu hiện protein được cảm ứng bằng cách bổ sung IPTG vào môi trường để đạt nồng độ 1 mM và tiếp tục nuôi lắc trong 5 giờ ở 30°C. Thu tế bào bằng cách ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và lưu giữ ở -80°C đến khi tách chiết protein.

Tách chiết và tinh sạch enzyme: Rửa tế bào vi khuẩn trong đệm A, thu lại tế bào bằng ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Sau đó, hòa tan lại tế bào trong 5 ml đệm A, bổ sung 1mM PMSF (Sigma, Hoa Kỳ). Để thu protein, vách tế bào được phá bằng sóng siêu âm trong 3 phút trong khi dung dịch tế bào vẫn giữ trên đá. Để loại bỏ các protein khác, dịch tế bào thu được sau ly tâm được ủ ở 70°C trong 1 giờ và ly tâm 12000 vòng/phút trong 10 phút, 4°C, thu dịch nổi. Để loại các tạp chất không phải là protein, Taq ADN polymerase được kết tủa bằng cách bổ sung ammonium sulphate bão hòa theo tỷ lệ 1:1, lắc đều trong 10 phút ở nhiệt độ phòng rồi ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút, thu tủa. Hòa tan tủa trong 3 ml đệm A và thẩm tích trong 250 ml đệm B ở 4°C trong vòng 12 đến 16 tiếng. Thu protein, pha loãng với tỷ lệ 1:1 với đệm B. Sản phẩm tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel SDS-polyacrylamide 10% (w/v) (SDS-PAGE).

Đệm A: 50 mM Tris-HCl pH=7,8, 50 mM dextrose, 1 mM EDTA.

Đệm B: 20 mM Tris-HCl pH=7,8, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH=7,8, 50% glycerol.

Kiểm tra hoạt tính enzyme: Taq ADN polymerase sau khi tinh sạch được thử hoạt tính xúc tác thông qua phản ứng PCR với các cặp mồi khác nhau và trên các ADN khuôn là plasmid, ADN genome và cDNA. Phản ứng PCR được thực hiện với thể tích 20 µl với đệm phản ứng của enzyme thương mại (NEB, Hoa Kỳ) hoặc đệm tự pha, 0,25 µM mỗi xuôi, 0,25 µM mỗi ngược, 0,25 µM dNTP, và một lượng khác nhau ADN khuôn. Sản phẩm được điện di trên gel agarose 1,5% (w/v), nhuộm ethidium bromide và hiển thị hình ảnh dưới ánh sáng cực tím có bước sóng 365 nm.

Thử nghiệm chế phẩm “hotstart” Taq ADN polymerase: “hotstart” Taq ADN polymerase được tạo thành bằng cách bổ sung một lượng 50, 100 và 150 nanogram kháng thể đơn dòng kháng Taq ADN polymerase (xem phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu) cho mỗi đơn vị hoạt độ enzyme. Chế phẩm “hotstart” được kiểm tra mức độ nhân dòng đặc hiệu bằng cách thực hiện phản ứng PCR với nhiệt độ gắn mồi thấp. Sản phẩm

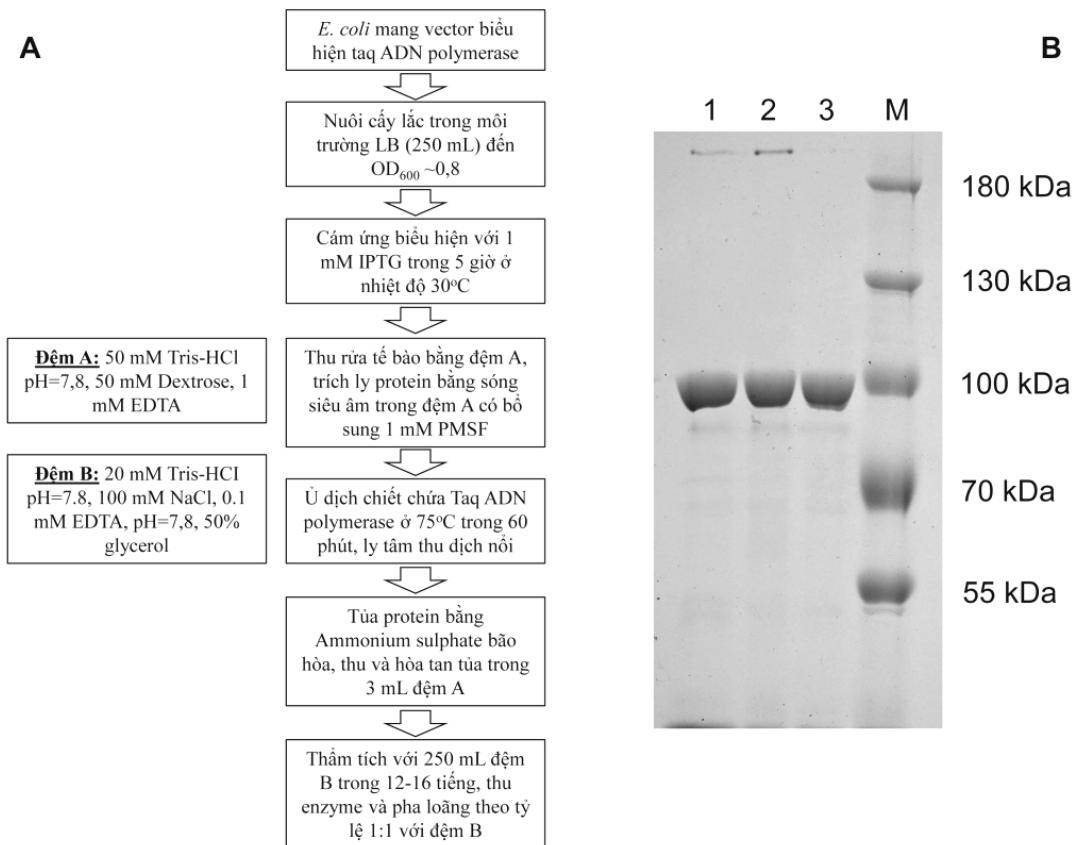
khuếch đại được kiểm tra trên gel agarose 1,5% (w/v).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biểu hiện và tinh sạch Taq ADN polymerase

Tế bào *E. coli* mang vector biểu hiện Taq ADN polymerase được nuôi và cảm ứng như mô tả trong phần Vật liệu và phương pháp và tóm tắt trên hình 1A. Protein thu được qua các bước tinh sạch được kiểm tra độ sạch trên bằng

điện di protein trên gel SDS-PAGE. Kết quả điện di (hình 1B) cho thấy, enzyme Taq ADN polymerase đã được tinh sạch và có kích thước khoảng 95 kDa. Kết quả này cũng cho thấy rằng hoàn toàn có thể tinh sạch Taq ADN polymerase bằng các bước đơn giản. Với mỗi mẻ biểu hiện là 500 mL dung dịch nuôi cấy, chúng tôi thu được 2,0-2,5 mL enzyme tinh sạch bảo quản trong đệm B.



Hình 1. Quy trình đơn giản biểu hiện và tinh sạch Taq ADN polymerase (A) và độ sạch của enzyme thu được (B)

Giếng 1: enzyme sau khi xử lý nhiệt; giếng 2: enzyme sau khi tủa bằng $(NH_4)_2SO_4$, giếng 3: enzyme sau thẩm tích; M: protein chuẩn.

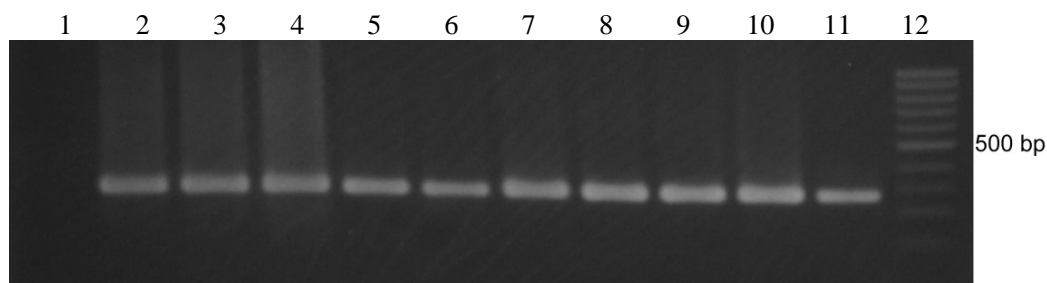
Kiểm tra hoạt tính enzyme

Để đánh giá hiệu quả của quá trình tinh sạch lên hoạt tính enzyme, protein thu được sau các bước xử lý được đem thử trong phản ứng PCR và so sánh với enzyme thương mại. Kết quả cho thấy, protein thu được ở tất cả các bước đều có thể nhân đoạn ADN tương tự như enzyme

thương mại, điều này chứng tỏ đã thu được enzyme Taq ADN polymerase ở dạng hoạt động (hình 2). Ngoài ra, kết quả cũng cho thấy, bước kết tủa và thẩm tích đã giảm được hiện tượng kéo vệt (smear) trên gel agarose, tức là đã loại bỏ được các tạp chất không mong muốn (protein tạp, chất phân tử thấp) ra khỏi dung

dịch enzyme. Các băng điện di ADN nhân dòng bởi các mẫu enzyme sau khi thẩm tích (hình 2, giếng 8, 9, 10) có độ đậm lớn hơn và sáng nét

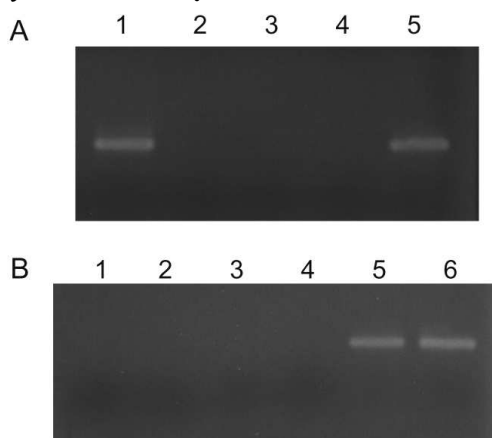
hơn so với mẫu enzyme sau rửa cho thấy enzyme sau khi thẩm tích có hoạt tính xúc tác cao hơn hẳn so với mẫu trước thẩm tích.



Hình 2. Kiểm tra hoạt tính enzyme Taq

Giếng 1: mẫu âm tính đối chứng (không ADN khuôn); Giếng 2, 3, 4: Enzyme sau khi tinh sạch sơ bộ; Giếng 5, 6, 7: Enzyme sau rửa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tỷ lệ 1:1; Giếng 8, 9, 10: enzyme sau thẩm tích; Giếng 11: mẫu dương tính (1 unit Taq-NEB); Giếng 12: Marker; Giếng 2, 5, 8: 1 μl enzyme; Giếng 3, 6, 9: 2 μl enzyme; Giếng 4, 7, 10: 3 μl enzyme.

Tối ưu hóa điều kiện phản ứng cho Taq ADN polymerase thu được



Hình 3. Tối ưu hoạt tính enzyme Taq. (A) Xác định tương đối đơn vị của Taq ADP polymerase và (B) xác định hàm lượng Mg^{2+} cần thiết trong phản ứng

(A): Giếng 1: mẫu đối chứng dương (bổ sung 1 đơn vị Taq-NEB); Giếng 2: mẫu đối chứng âm (không có ADN khuôn); Giếng 3, 4, 5: bổ sung lần lượt 0,1; 0,2; và 0,3 μl enzyme sau khi tinh sạch vào phản ứng PCR. (B): Giếng 1: 0,25 mM MgCl_2 ; Giếng 2: 0,50 mM MgCl_2 ; Giếng 3: 0,75 mM MgCl_2 ; Giếng 4: 1,00 mM MgCl_2 ; Giếng 5: 1,25 mM MgCl_2 ; Giếng 6: 1,50 mM MgCl_2

Thực hiện phản ứng PCR với lượng enzyme bổ sung cho mỗi phản ứng lần lượt từ 0; 0,1; 0,2

và 0,3 μl enzyme. Kết quả cho thấy, trên gel agarose chỉ xuất hiện sản phẩm của phản ứng PCR có bổ sung 0,3 μl enzyme đóng vai trò xúc tác. Ở những phản ứng còn lại không xuất hiện sản phẩm, cho thấy thể tích enzyme tối thiểu cần thiết cho phản ứng PCR khoảng 0,3 μl (hình 3A). Bằng mắt thường, so sánh tương đối độ đậm và độ sáng nét của sản phẩm PCR dùng 0,3 μl enzyme so với băng tạo thành bởi enzyme thương mại (1 đơn vị enzyme Taq) chúng tôi ước lượng hoạt độ enzyme Taq sau khi tinh sạch khoảng 4,0 đơn vị/ μl , tương đương với khoảng 3.500-4.000 đơn vị trên mỗi mL enzyme tinh sạch. So với giá mua enzyme Taq ADN polymerase thương mại từ các nhà cung cấp, mỗi mẻ tinh sạch thu được 2,0 mL enzyme của chúng tôi có giá trị khoảng 30 triệu đồng nhập khẩu sản phẩm tương đương.

Sau khi xác định được lượng enzyme tương đương với mỗi đơn vị enzyme thương mại, chúng tôi tiến hành pha chế dung dịch đệm cho phản ứng PCR dành riêng cho enzyme Taq ADN polymerase tinh sạch được. Thành phần đệm được pha theo công thức đệm cho Taq ADN polymerase thương mại của hãng New England Biolabs (Hoa Kỳ) bao gồm 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 50 mM KCl và MgCl_2 nồng độ thử nghiệm từ 0 mM đến 1,5 mM, trong đó, nồng độ 1,5 mM MgCl_2 tương ứng với nồng độ MgCl_2 thương mại. Kết quả cho thấy, phản ứng

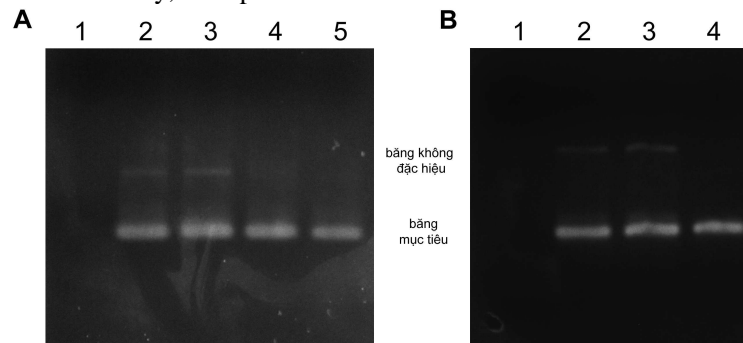
PCR chỉ xảy ra với $MgCl_2$ ở nồng độ 1,25 mM và 1,5 mM trong khi ở các nồng độ thấp hơn không hề có sự xuất hiện của sản phẩm PCR (hình 3B). Như vậy, nồng độ $MgCl_2$ tối thiểu cần thiết cho phản ứng PCR sử dụng enzyme và đệm do chúng tôi sản xuất vào khoảng 1,25-1,50 mM.

Đánh giá hiệu quả khuếch đại và độ đặc hiệu của “hotstart” Taq polymerase

Nguyên tắc của chế phẩm “hotstart” là đưa vào một chất có thể tương tác đặc hiệu với trung tâm hoạt động của Taq ADN polymerase ở nhiệt độ thường nhưng lại ngừng tương tác và giải phóng trung tâm hoạt động khi enzyme đạt đến một nhiệt độ nhất định trong chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR. Hiện nay có hai cách để tạo chế phẩm “hotstart”: (1) trộn enzyme với 1 aptamer liên kết đặc hiệu, và (2) trộn enzyme với kháng thể đặc hiệu cho Taq ADN polymerase. Trong nghiên cứu này, enzyme “hotstart” Taq ADN polymerase được tạo thành từ việc trộn với kháng thể đơn dòng anti-Taq ở mức 50, 100 hoặc 150 ng kháng thể với mỗi đơn vị hoạt độ enzyme. Chế phẩm này được sử dụng trong phản ứng khuếch đại ADN bên cạnh mẫu đối chứng không bổ sung kháng thể anti-Taq. Kết quả (hình 4A-B) cho thấy, chế phẩm “hotstart” Taq ADN polymerase bổ sung kháng thể ở mức 100 ng/đơn vị enzyme trở lên đã kìm hãm được việc hình thành sản phẩm PCR không đặc hiệu trong quá trình khuếch đại gen mục tiêu. Trên hình 4A có thể thấy, chế phẩm bổ

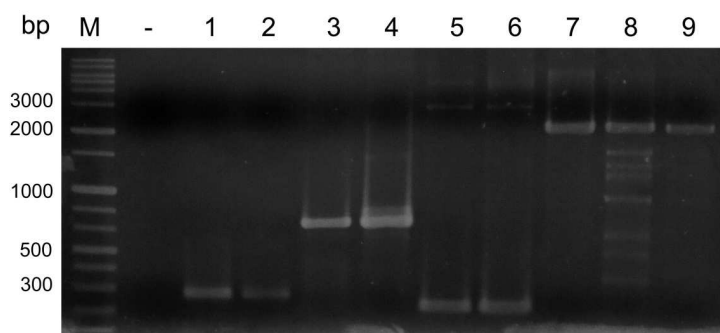
sung 100 và 150 ng anti-Taq đã không xuất hiện bất kỳ sản phẩm phụ nào trên bản gel điện di agarose trong khi chế phẩm bổ sung 50 ng kháng thể không có sự khác biệt đáng kể nào so với phản ứng không bổ sung kháng thể anti-Taq. Để tái khẳng định sự có mặt của kháng thể đặc hiệu là tác nhân kìm hãm sản phẩm không đặc hiệu, chúng tôi thử nghiệm phản ứng với 100 ng albumin huyết thanh bò và 100 ng kháng thể. Kết quả trên hình 4B cho thấy, chỉ có phản ứng bổ sung 100 ng kháng thể thì mới không có băng không đặc hiệu trong khi phản ứng bổ sung 100 ng albumin huyết thanh bò vẫn xuất hiện sản phẩm không đặc hiệu. Kết quả này cho thấy, có thể tạo chế phẩm “hotstart” Taq ADN polymerase bằng cách bổ sung kháng thể đơn dòng anti-Taq sản xuất từ dòng tế bào lai J1E8 với tỉ lệ 100 ng kháng thể cho mỗi đơn vị hoạt độ enzyme Taq ADN.

Để đánh giá khả năng thích ứng của enzyme Taq ADN polymerase chúng tôi tự sản xuất trong phản ứng PCR với ADN khuôn có độ phức tạp khác nhau, chúng tôi tiến hành phản ứng PCR với ADN khuôn là ADN genome, ADN plasmid và ADN bổ sung (cDNA). Kết quả (hình 5) cho thấy, enzyme do chúng tôi tự sản xuất theo qui trình đơn giản trong báo cáo này hoàn toàn có thể ứng dụng trong các phản ứng PCR có ADN khuôn đa dạng. Trong trường hợp phản ứng tạo nhiều băng không đặc hiệu thì sử dụng chế phẩm “hotstart”.



Hình 4. Kiểm tra hiệu quả khuếch đại của “hotstart” Taq ADN polymerase.

(A): Giếng 1: đối chứng âm (không có ADN khuôn); giếng 2, enzyme Taq ADN polymerase thương mại; Giếng 3, 4, 5: “hotstart” Taq ADN polymerase với 50, 100, 150 ng kháng thể anti-Taq bổ sung cho mỗi đơn vị hoạt độ. (B): Giếng 1: đối chứng âm (không có ADN khuôn); giếng 2: Taq ADN polymerase; giếng 3: Taq ADN polymerase + 100 ng albumin huyết thanh bò; giếng 4: Taq ADN polymerase + 100 ng kháng thể anti-Taq.



Hình 5. Đánh giá hiệu quả nhân dòng của Taq ADN polymerase tự sản xuất trong phản ứng PCR với các ADN khuôn có độ phức tạp khác nhau.

1, 2: Khuôn là ADN genome sắn; 3, 4, 5, 6: Khuôn là các ADN plasmid; 7, 8, 9: Khuôn là ADN bổ sung (cDNA). 1, 3, 5, 7: sử dụng enzyme thương mại; 2, 4, 6, 8: sử dụng enzyme tự sản xuất; 9: sử dụng enzyme “hotstart” tự sản xuất.

THẢO LUẬN

Taq ADN polymerase là một enzyme quan trọng cho phản ứng nhân dòng và giải trình tự ADN trong nghiên cứu sinh học phân tử [19]. Nó là một enzyme tiêu chuẩn được sử dụng trong hầu hết các phòng thí nghiệm sinh học phân tử hiện nay. Do đó, xu hướng tự sản xuất enzyme sẽ giúp các nhóm nghiên cứu chủ động hơn, dễ dàng hơn, giảm chi phí mà vẫn duy trì được mức độ tin cậy cần thiết. Ở Việt Nam, mặc dù enzyme Taq ADN polymerase tái tổ hợp đã được một số đơn vị nghiên cứu biểu hiện và tinh sạch. Tuy nhiên, vẫn chưa có công trình nào được công bố, bên cạnh một số enzyme khác đã được công bố như T4 DNA ligase, keratinase, hay uricase [4, 6, 7]. Chính vì vậy, chúng tôi chú trọng vào việc đơn giản hóa quy trình tách chiết và tinh sạch để có thể áp dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm.

Quy trình tách chiết và tinh sạch enzyme trong nghiên cứu này được phát triển và cải biến từ các quy trình đã được công bố trên các tạp chí uy tín, để trở nên đơn giản và có thể áp dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm sinh học, ngay cả đối với những phòng thí nghiệm có quy mô nhỏ, bởi tính không đòi hỏi hóa chất và thiết bị phức tạp, cũng như thao tác dễ dàng thực hiện [3, 9, 10]. Tuy vậy, enzyme thu được có độ tinh sạch cao và hoạt độ tốt, sản phẩm khuếch đại từ enzyme này vẫn thể hiện độ sắc nét và sáng rõ, cho thấy enzyme thu được hoàn toàn đáp ứng được yêu cầu của các thí nghiệm sinh

học. Quy trình này sẽ hỗ trợ nghiên cứu các kỹ thuật sinh học phân tử trong các phòng thí nghiệm cũng như trong giảng dạy. Nghiên cứu sẽ tiếp tục được thực hiện để xác định thời gian bảo quản lâu dài cho enzyme.

Một trong những yếu tố làm giảm độ đặc hiệu của việc nhân dòng ADN bằng Taq ADN polymerase là enzyme này có thể xúc tác phản ứng trùng hợp ở nhiệt độ thấp khi đó các cặp mồi chưa bắt cặp đặc hiệu với ADN đích. Để giải quyết vấn đề này người ta đã phát minh ra chế phẩm enzyme chỉ hoạt động sau khi phản ứng trải qua chu kỳ nhiệt gọi là enzyme “hotstart”. Việc tạo ra “hotstart” Taq ADN polymerase bằng cách bổ sung kháng thể đặc hiệu anti-Taq đã cải thiện đáng kể tính đặc hiệu của phản ứng PCR. Kháng thể anti-Taq ngăn chặn sự tương tác giữa enzyme và cơ chất ở điều kiện nhiệt độ thấp từ đó hạn chế tối đa sự trùng hợp từ các mồi bắt cặp không đặc hiệu và sự tự bắt cặp của các mồi trước quá trình biến tính đầu tiên của phản ứng PCR [13, 15]. Chính vì vậy, kháng thể anti-Taq đã giúp cho chế phẩm “hotstart” Taq ADN polymerase tăng độ đặc hiệu của phản ứng cũng như độ chính xác và độ tin cậy của kỹ thuật.

Cùng với quy trình tách chiết và tinh sạch enzyme, nghiên cứu cũng đưa ra các thử nghiệm quan trọng để tạo ra dung dịch đệm phản ứng PCR dành riêng cho enzyme thu được từ quy trình trên. Với thử nghiệm nồng độ ion Mg^{2+} có vai trò như một cofactor cho enzyme Taq ADN

polymerase, nồng độ $MgCl_2$ phù hợp có vai trò quyết định đến hiệu quả khuếch đại phản ứng PCR [11]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng đến nồng độ Mg^{2+} phù hợp, đủ nhỏ để không ảnh hưởng đến độ đặc hiệu của phản ứng PCR mà vẫn hạn chế được sự xuất hiện của các sản phẩm phụ không mong muốn do nồng độ Mg^{2+} quá cao. Nồng độ 1,5 mM $MgCl_2$ được đánh giá là phù hợp cho phản ứng, cũng là tương đồng với nhiều loại đệm PCR của các hãng thương mại hiện nay. Bên cạnh đó, đệm phản ứng PCR thể hiện khả năng hỗ trợ tốt hoạt tính xúc tác của enzyme Taq ADN polymerase và “hotstart” Taq ADN polymerase đem đến cho phản ứng PCR có độ đặc hiệu cao và hoàn toàn đủ tin cậy trong các nghiên cứu sinh học phân tử.

KẾT LUẬN

Tổng hợp lại, nghiên cứu đã đưa ra được quy trình hoàn thiện, đơn giản, dễ thực hiện nhưng vẫn đảm bảo độ tin cậy cao đối với tách chiết và tinh sạch enzyme Taq ADN polymerase có hoạt tính sinh học. Enzyme thu được có hoạt tính xúc tác mạnh, đồng thời chuẩn hóa được nồng độ đệm phản ứng phù hợp với enzyme, đáp ứng được các yêu cầu nghiên cứu sinh học phân tử. Quy trình có thể áp dụng để sản xuất enzyme Taq ADN polymerase và phiên bản “hotstart” có hoạt tính tốt, giá thành rẻ phục vụ nghiên cứu trong các phòng thí nghiệm sinh học phân tử hoặc trong giảng dạy.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí từ Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia, NAFOSTED, mã số 106-NN.02.-2013.46. Tác giả xin cảm ơn Công ty Genbody (Hàn Quốc) đã cung cấp vector pDG-Taq và Công ty C&K Bioresource (Hàn Quốc) đã tặng kháng thể đặc hiệu anti-Taq. Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Quốc tế Chọn giống Phân tử cây Sắn có sử dụng các thiết bị được tài trợ bởi Trung tâm Nông nghiệp Nhiệt đới Quốc tế (CIAT).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bartlett J. S., Stirling D., 2003. A Short History of the Polymerase Chain Reaction, in PCR Protocols, J.S. Bartlett and D. Stirling, Editors, Humana Press. p. 3-6.
2. Chien A., Edgar D. B., Trela J. M., 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology, 127(3): 1550-1557.
3. Dąbrowski S., Kur J., 1998. Cloning and Expression in *Escherichia coli* of the Recombinant His-Tagged DNA Polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. Protein Expression and Purification, 14(1): 131-138.
4. Dương Long Duy, Lương Văn Đức, Nguyễn Thị Phương Hiếu, Trần Thanh Hòa, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thước, 2011. Biểu hiện và thu nhận enzyme T4 DNA ligase tái tổ hợp trong *E. coli*. Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, 14(3): 73-79.
5. Grimm E., Arbuthnot P., 1995. Rapid purification of recombinant Taq DNA polymerase by freezing and high temperature thawing of bacterial expression cultures. Nucleic Acids Research, 23(21): 4518-4519.
6. Phạm Thanh Hà, Trần Đình Mẫn, Trần Thị Hoa, 2012. Phân lập, tuyển chọn và xác định hoạt tính của vi khuẩn sinh tổng hợp enzyme uricase. Tạp chí Sinh học, 34(4): 473-478.
7. Nguyễn Thu Hiền, Nguyễn Thị Thu Hiền, Khuất Hữu Thanh, Nguyễn Huy Hoàng, 2013. Chọn dòng và biểu hiện gen keratinase trong *Escherichia coli* BL21(DE3) từ vi khuẩn *Bacillus*. Tạp chí Sinh học, 35(3se): 51-57.
8. Lawyer F. C., Stoffel S., Saiki R. K., Chang S. Y., Landre P. A., Abramson R. D., Gelfand D. H., 1993. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. Genome Research, 2: 275-287.
9. Lawyer F. C., Stoffel S., Saiki R. K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D. H., 1989. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA

- polymerase gene from *Thermus aquaticus*. The Journal of Biological Chemistry, 264(11): 6427-6437.
10. Lu C., Erickson H. P., 1997. Expression in *Escherichia coli* of the Thermostable DNA Polymerase from *Pyrococcus furiosus*. Protein Expression and Purification, 11(2): 179-184.
 11. Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M., 2002. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 16(1): 47-51.
 12. Mishra N., Kumar A., 2010. Cloning and characterization of isolated Taq DNA polymerase gene from phage. The Bioscan, 5(1): 7-11.
 13. Mizuguchi H., Nakatsuji M., Fujiwara S., Takagi M., Imanaka T., 1999. Characterization and Application to Hot Start PCR of Neutralizing Monoclonal Antibodies against KOD DNA Polymerase. Journal of Biochemistry, 126(4): 762-768.
 14. Mullis K. B., Erlich H. A., Arnheim N., Horn G. T., Saiki R. K., Scharf S. J. 1987. Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent No. 4683195.
 15. Nilsson J., Bosnes M., Larsen F., Nygren P.-Å., Uhlén M., Lundeberg J., 1997. Heat-Mediated Activation of Affinity-Immobilized Taq DNA Polymerase. BioTechniques, 22: 744-751.
 16. Rivas R., Velázquez E., Zurdo-Piñero J. L., Mateos P. F., Martínez Molina E., 2004. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. Journal of Microbiological Methods, 56(3): 413-426.
 17. Roayaei M., Galehdari H., 2008. Cloning and expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*. Jundishapur J. Microbiol., 1(1): 1-5.
 18. Sadeghi H. M. M., Rabbani M., Moazen F., 2007. Amplification and cloning of Taq DNA polymerase gene from *Thermus Aquaticus* strain YT-1. Res. Pharm. Sci., 1: 49-52.
 19. Sadeghi H. M. M., Rabbani M., Rismani E., Moazen F., Khodabakhsh F., Dormiani K., Khazaei Y., 2011. Optimization of the expression of reteplase in *Escherichia coli*. Research in Pharmaceutical Sciences, 6(2): 87-92.
 20. Zhou W., Rousset F., Neill S., 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 265(1395): 509-515.

A SIMPLE PROTOCOL FOR THE PRODUCTION OF COMMERCIAL-GRADE TAQ DNA POLYMERASE AND ITS “HOT START” VERSION AT LABORATORY SCALE

Vu Tuan Nam¹, Chong Chom-Kyu², Le Tien Dung¹

¹International Laboratory for Cassava Molecular Breeding, Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Science, Pham Van Dong street, North Tu Liem, Hanoi, Vietnam

²Genebody Inc., Cheonan, South Korea

SUMMARY

PCR (Polymerase Chain Reaction) is a versatile molecular biology technique which uses DNA polymerase to amplify target DNA fragments. Taq ADN polymerase, a thermostable DNA polymerase originally isolated from the thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*, is frequently used in PCR and DNA sequencing. The objective of this study was to test a simplified, but reliable, procedure for the expression and

purification of recombinant Taq DNA polymerase from *E. coli* and development of its “hotstart” version. Our results showed that a protocol consists of heat treatment, ammonium sulfate precipitation and dialysis steps were sufficient to produce commercial-grade Taq ADN polymerase. For every batch of 0.5 L culture medium, we obtained 2.0-2.5 mL of purified Taq DNA polymerase roughly equivalent to 7,000-8,000 units of commercial Taq DNA polymerase, which value about US\$1,500 of imported similar product. By the addition of 100 ng of specific antibody against Taq ADN polymerase per unit of the isolated enzyme, we could produce the “hotstart” version which affectively inhibited non-specific amplification in PCR reactions. The enzyme produced in this study was shown to be compatible with various types of PCR template, including genomic DNA, plasmid DNA and cDNA. Taken together, our data showed that this simple protocol can be applied to express and purify Taq ADN polymerase enzyme that is qualified for research use in molecular biology laboratories.

Keywords: Hotstart Taq ADN polymerase, recombinant protein, Taq polymerase.

Ngày nhận bài: 2-12-2014