

XÁC ĐỊNH GIEN MÃ HÓA CATECHOL 2,3-DIOXYGENAZA TỪ BA CHỦNG VI KHUẨN SỬ DỤNG HYDROCACBON THƠM ĐA NHÂN PHÂN LẬP TẠI KHE CHÈ, TỈNH QUẢNG NINH

LA THỊ THANH PHƯƠNG, NGUYỄN BÁ HỮU,
ĐẶNG THỊ CẨM HÀ

Viện Công nghệ sinh học

Hiện nay, hydrocacbon thơm đa nhân (PAH) phân bố rộng rãi trong môi trường biển được xem như là các chất gây ô nhiễm. Người ta ước tính hàng năm khoảng $2,3 \cdot 10^5$ tấn các hợp chất này đã được xâm nhập vào các hệ sinh thái nước [1]. Sự ô nhiễm PAH được quan tâm đặc biệt do chúng là tác nhân gây ung thư đối với động vật cũng như con người [1]. Sự phân hủy PAH bởi vi khuẩn bản địa có ý nghĩa quan trọng trong quá trình loại bỏ các chất gây ô nhiễm PAH. Thông thường, quá trình phân hủy PAH bởi vi khuẩn có sự tham gia của hệ enzym đa thành phần xúc tác sự hydroxyl hóa các hợp chất PAH tạo ra dạng *cis*-dihydrodiol. Bước tiếp theo là quá trình cắt vòng thơm, loại vòng và tạo ra catechol; đây là một trong những sản phẩm trung gian phổ biến nhất của quá trình phân hủy PAH. Quá trình cắt vòng của catechol bởi enzym dioxygenaza có thể xảy ra hai vị trí *meta* và *ortho*. Tuy nhiên, cắt vòng tại vị trí *meta* được thực hiện bởi enzym catechol 2,3-dioxygenaza (C23O); đây được coi là quá trình phổ biến nhất trong sự phân hủy PAH bởi vi khuẩn. Do vị trí quan trọng và trung tâm của catechol nên gen mã hóa cho enzym catechol 2,3-dioxygenaza được nghiên cứu đánh giá và phát hiện khả năng phân hủy PAH của các vi sinh vật tại các điểm ô nhiễm hydrocacbon dầu mỏ [4, 7].

Xuất phát từ vị trí quan trọng của gen mã hóa enzym C23O trong quá trình phân hủy hydrocacbon thơm đơn nhân và đa nhân, nên gen này đã được chọn nhằm mục đích tìm hiểu sự đa dạng vi khuẩn sử dụng PAH cũng như bản chất làm sạch ô nhiễm dầu tại Khe Chè ở mức độ phân tử và đánh giá khả năng phân hủy sinh học PAH của vi sinh vật bản địa tại các vùng ô nhiễm và không ô nhiễm. Các kết quả về phân

lập, tách dòng và đọc trình tự gen catechol 2,3 dioxygenaza từ các chủng KC-3, KC-7, KC-8 phân lập tại Khe Chè, tỉnh Quảng Ninh sẽ được trình bày trong bài báo này.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Các chủng vi khuẩn KCP-3, KCP-7, KCP-8 sử dụng PAH được phân lập từ khu thử nghiệm phân hủy sinh học xử lý ô nhiễm dầu tại Khe Chè, Cửa Lục, tỉnh Quảng Ninh.

Môi trường LB, plasmid pBluescript KS và chủng *E.coli* DH5 α được dùng trong nghiên cứu để tách dòng và đọc trình tự của gen mã hóa enzym C23O.

2. Phương pháp

Các chủng vi khuẩn KCP-3, KCP-7, KCP-8 được nuôi lắc qua đêm trên môi trường LB lỏng, ly tâm thu sinh khối và tách chiết ADN tổng số theo phương pháp của Becker và cs. [2].

Đoạn gen mã hóa enzym C23O được nhân bằng kỹ thuật PCR nhờ sử dụng cặp mồi đặc hiệu C23O-1 và C23O-2 [7]. Cặp mồi có trình tự như sau:

Mồi C23O-1 (xuôi): 5'- ATGGAT(AGT)T (AGT)ATGGG(AGT)TTCAAGGT-3'

Mồi C23O-2 (ngược): 5'-AC(AGT)GTCA (AGT)GAA(AGT)CG(AGT)TCGTTGAG-3'

PCR được thực hiện với chu trình nhiệt như sau: 95°C: 3', (94°C: 1', 50°C: 1', 72°C: 1') lặp lại 4 chu kỳ, (94°C: 1', 55°C: 1', 72°C: 1') lặp lại 30 chu kỳ; 72°C: 8'. Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C và được kiểm tra bằng điện di trên gel

agaroza 1,5%, nhuộm bản gel với ethidium bromit và xem điện di đồ dưới ánh sáng của đèn cực tím.

Vectơ pBluescript KS được mở vòng bằng *EcoRV*. Điểm cắt của enzym *EcoRV* nằm trên vùng cắt đa vị của vectơ, sau khi được cắt sẽ tạo ra sản phẩm có đầu bằng và tiếp đó sản phẩm PCR được gắn vào vị trí này của vectơ.

Các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và tách chiết ADN plasmid được tiến hành theo Sambrook và cs. [6].

Xác định trình tự gen được tiến hành theo phương pháp chu kỳ nhiệt với bộ hóa chất chuẩn của hãng Pharmacia; đọc kết quả trên máy xác định trình tự ADN tự động (ALFexpress Pharmacia).

Trình tự gen được so sánh trên ngân hàng dữ liệu gen EMBL và số liệu được xử lý bằng chương trình PC/GENE.

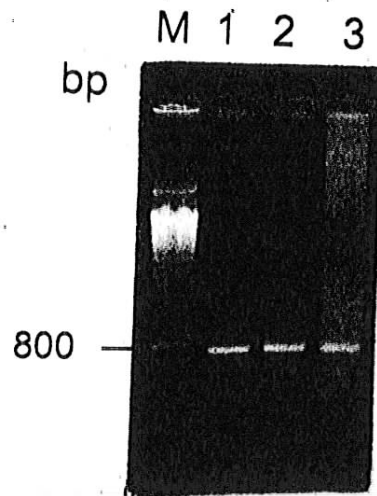
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tách chiết ADN tổng số, nhân đoạn gen nhờ PCR và gắn vào vectơ pBluescript KS

Ba chủng vi khuẩn KCP-3, KCP-7 và KCP-8 sử dụng PAH được phân lập từ các mẫu bùn cát Khe Chè theo phương pháp làm giàu trên môi trường khoáng chứa hỗn hợp PAH là nguồn cacbon và năng lượng duy nhất. Hỗn hợp PAH bị phân hủy bởi các chủng là: chủng KCP-8 phân hủy 76,12%, chủng KCP-7 (69,08%), chủng KCP-3 (63,13%) [6].

Hầu hết các con đường phân hủy sinh học hiếu khí hydrocacbon thơm đơn nhân và đa nhân đều qua sản phẩm trung gian là catechol. Nhiều công bố gần đây cho thấy gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza được sử dụng nhiều để đánh giá vi khuẩn sử dụng PAH. Cặp mồi C230-1 và C230-2 được thiết kế khá đặc hiệu nên đã được dùng để khuếch đại gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza từ các mẫu môi trường bằng kỹ thuật PCR không thông qua nuôi cấy và đánh giá sự ô nhiễm dầu tại vùng đó. Trong nghiên cứu này, ADN tổng số của 3 chủng vi khuẩn đã được tách chiết và làm sạch ARN, PCR được tiến hành trên ADN hệ gen (genom) tinh khiết với cặp mồi C230-1 và C230-2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agaroza 1,5% được trình bày trên

hình 1.



Hình 1. Phổ điện di sản phẩm PCR từ các chủng KCP-3, KCP-7, KCP-8

Ghi chú: M: thang ADN chuẩn (200 bp)

2: sản phẩm PCR của chủng KCP-3

3: sản phẩm PCR của chủng KCP-7

4: sản phẩm PCR của chủng KCP-8

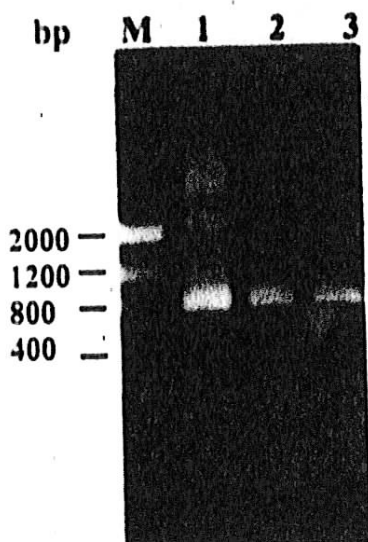
Kết quả điện di cho thấy sản phẩm PCR nhân từ cặp mồi C230 khá đặc hiệu, có kích thước khoảng 800 bp, gần với kích thước của gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza. Sản phẩm trên có thể là các gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza. Để khẳng định một cách chính xác các sản phẩm trên có phải là gen mã hóa cho enzym catechol 2,3-dioxygenaza hay không, các nghiên cứu tách dòng và đọc trình tự các sản phẩm trên đã được tiến hành.

2. Tách dòng

Vectơ pBluescript KS là một loại vectơ plasmid tách dòng có kích thước 2,96 kb được dùng để gắn sản phẩm ADN lạ. Phản ứng ghép nối của sản phẩm PCR và vectơ pBluescript KS diễn ra ở 14°C, là nhiệt độ thích hợp cho sự hoạt động của enzym T4-ligaza gắn các điểm nối trên sợi ADN. Các khả năng bắt cặp có thể xảy ra trong quá trình nối ghép là một đoạn của sản phẩm PCR nối với plasmid tạo ra sản phẩm lai như mong muốn, hoặc các plasmid tự nối với nhau, hoặc các sản phẩm PCR tự nối với nhau.

Sản phẩm lai này đã được biến nạp vào *E. coli* DH5 α .

Để kiểm tra kết quả biến nạp, các tế bào sau khi biến nạp được cấy trên đĩa thạch chứa môi trường LB có bổ sung X-gal và IPTG, ủ qua đêm ở 37 $^{\circ}$ C và sau đó chọn các khuẩn lạc trắng. Plasmid tách từ các khuẩn lạc này đã được kiểm tra sơ bộ bằng điện di agarosa 0,8% và chỉ chọn các plasmid có kích thước lớn hơn với plasmid đối chứng (không chứa ADN lạ). Tuy nhiên, kết quả này chưa khẳng định được các plasmid có mang đoạn gen mong muốn hay không. Để kiểm tra giả thuyết trên, sử dụng ADN plasmid đã chọn làm khuôn và thực hiện PCR với cặp mồi C230-1 và C230-2. Kết quả kiểm tra điện di được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR từ các plasmid của các chủng KCP-3, KCP-7, KCP-8

Ghi chú: M: thang ADN chuẩn(200 bp)

- 1: sản phẩm PCR từ plasmid của chủng KCP-3
- 2: sản phẩm PCR từ plasmid của chủng KCP-7
- 3: sản phẩm PCR từ plasmid của chủng KCP-8

Kết quả điện di ở hình 2 cho thấy sản phẩm

PCR với ADN plasmid làm khuôn có kích thước khoảng 800 bp như kích thước của sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số (hình 1). Như vậy, các plasmid chọn được trong nghiên cứu này có mang sản phẩm ADN nhân lên bằng kỹ thuật PCR với ADN tổng số. Tuy nhiên, để khẳng định các sản phẩm đó có phải là gen mã hóa cho catechol 2,3-dioxygenaza hay không cần phải xác định trình tự nucleotit của các sản phẩm PCR này.

3. Xác định trình tự nucleotit

Trong nghiên cứu này, do các điều kiện kỹ thuật và thiết bị, nên chỉ sản phẩm PCR nhân lên từ ADN tổng số của chủng KCP-7 được xác định trình tự nucleotit. Kết quả đọc trình tự nucleotit trên máy ALFexpress và phân tích số liệu bằng chương trình PC/GENE, được trình bày ở hình 3.

Trình tự các nucleotit của các gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza trong các chủng trong cùng một chi và giữa các chủng thuộc các chi khác nhau rất khác nhau. Các kết quả công bố trước đây cho thấy sự khác nhau giữa trình tự nucleotit của gen này trong các chủng thuộc chi *Pseudomonas* khác nhau từ 5- 25% và trong các chủng thuộc chi *Sphingomonas* là 24% [7]. Ngoài ra, có sự khác nhau rất lớn (50%) giữa trình tự nucleotit của gen mã hóa cho C230 trong các chi *Pseudomonas* và *Sphingomonas* [3, 7].

Trình tự nucleotit của gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza ở chủng KCP-7 đã được công bố trên ngân hàng gen EMBL, có mã số AJ492194. So sánh trình tự nucleotit ở ngân hàng gen EMBL và phân tích trên chương trình PC/GENE cho thấy đoạn gen đã được đọc trình tự trong nghiên cứu này có các mức tương đồng khác nhau với trình tự các nucleotit của gen mã hóa catechol 2, 3-dioxygenaza ở các chủng vi sinh vật khác (xem bảng sau).

C230-1

ATG GAT GTA ATG GGT TTC AAG GTG CTG → GAT GAA GCA ACC CTG GAT TCG CTT GAG
 M D V M G F K V L D E A T L D S L E
 TGC AGA TCT GCA GGC TGC GGG CGT CTC AAC TGA AGA GAT TGC GGC CGG TGA TCT
 C R S A G C G R L N L R D C G R D S
 GAA AGA CTG CGG TCG TCG CAT CAG CTT TAC CGT GCC GCA CCG GCC ACC GCT TTG
 E R L R S S H Q L Y R A A P A T A L
 AGC TGT TCG CCA CCA AGG AGC AGA CCG GCA AAT GGG GTG TGG GCA ACC GTA ACC
 S C S P P R S R P A N G V W A T V T
 CTG GAA GCC TGG CCG CGT GAC CTC AAG GGC ATG AAA GCC ACC CGT TTT GAC CAC
 L E A W P R D L K G M K A T R F D H
 TGC CTG CTG TAC GAG CCG GAT GTC GCC CGC GAC CGT GAA ACT GCT CAC CGA CGT
 C L L Y E P D V A R D R E T A H R R
 GCT GGG CAT GGA CCT GGC CGA ACA GGT GGT TGG YCC TGA AGG CAA GAG GCT GGC
 A G H G P G R T G G W X L R Q A G W
 CGG CTT CAT GAC GGC GAG CAT GAA AGC ACA CGA TGT TGC GTT CAT TGA GCA CCC
 P A S T A S M K A H D V A F I E H P
 GGA GCC TGC MAA GCT GCA CAN CGC CTC CTT CCT CCC TGG AAA ACC TGG AAC GAC
 E P A K L H X A S F L P G K P E R R
 GTG TTG AAA GCG GCG GAT CTG ATC TCC ATG ACC GAT CAN TNC CAT CGA TAT TGG
 V E S G G S D L H D R Y X P S I L V
 TCC GAC CCG TCA CGG CCT GAC CCA TGG TCA GAC GAT CTA CTT CTC GGA TCC GTC
 R P V T A L T P W S D D L L L G S V
 CGG TAA CCG CAA TGA AGT GTT CGC TGG TGG TGA CTA CCA TTA ACC CCG ATC ATG
 R Y R N E V F A G G D Y H N P D H E
 AGC CCG TGA CCT NGG ACG CCG AGC AGC TTG GCA AGG CGG TCT TCT ACC ACG ACC
 P V T X D A E Q L G K A V F Y H D R

C230-2

← GTC AGC TCA ACG ACC GTT TCA TGA CAG T
 Q L N D R F M T V

Hình 3. Trình tự nucleotit của gen mã hóa catechol 2, 3 - dioxygenaza nhân lên bằng kỹ thuật PCR và trình tự protein suy diễn của chủng vi khuẩn KCP-7 sử dụng PAH

Gen mã hóa C230 trong các chủng *Acinetobacter* sp. và *P. putida* có mức tương đồng cao nhất 71,28% và 70,67% với trình tự nucleotit của sản phẩm PCR nhân lên từ chủng KCP-7. Ngoài ra, các gen mã hóa C230 đã công bố trong các chủng thuộc các chi *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* đều có mức tương đồng (với trình

tự gen mã hóa C230 của KCP-7) thấp hơn 70%. Chúng tôi cũng so sánh trình tự protein suy diễn của chủng KCP-7. Kết quả cho thấy các chủng thuộc chi *Pseudomonas* đều có mức tương đồng thấp hơn 39,84%.

Như vậy, có thể khẳng định là đoạn gen nhân lên được từ chủng KCP-7 là gen mã hóa catechol 2,3-dioxygenaza. Tuy nhiên, các kết

So sánh trình tự nucleotit của gen mã hóa catechol 2, 3 - dioxygenaza ở chủng KCP-7 và các chủng vi sinh vật khác

STT	Vi khuẩn	% tương đồng
1	KCP-7	
2	<i>Acinetobacter</i> sp.	71,28
3	<i>Pseudomonas putida</i>	70,67
4	<i>P. putida</i> ph B	68,12
5	<i>P. stutzeri</i>	67,25
6	<i>Pseudomonas</i> sp. IC	67,11
7	<i>Ralstonia</i> sp. KN1	61,48
8	<i>Sphingomonas paucimob</i>	60,67
9	<i>Sphingomonas</i> sp. A8AN3	59,53
10	<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1	58,92
11	<i>Comamonas</i> sp. JS765 LysR	64,39

qua so sánh trên cho thấy mức tương đồng giữa gen mã hóa C23O ở chủng KCP-7 và các chủng đã công bố không cao lắm. Để khẳng định chính xác hơn trình tự của catechol 2,3 -dioxygenaza của chủng KCP-7 phân lập từ Khe Chè, trong thời gian tới, chúng tôi cần làm rõ 6 nucleotit hiện còn chưa đọc được. Theo kết quả phân loại bằng kit chuẩn API-20NE thì chủng KCP-7 được xếp vào chi *Pseudomonas*. Cho dù sau khi làm rõ 6 nucleotit còn lại có giống hệt với trình tự đã công bố thì độ tương đồng của gen mã hóa catechol 2,3 -dioxygenaza ở chủng KCP-7 phân lập tại Việt Nam vẫn khác so với (catechol 2,3 -dioxygenaza) các gen này trong các chủng vi khuẩn đã công bố. Những kết quả trên cho thấy sự đa dạng của gen catechol 2,3 dioxygenaza của các chủng vi khuẩn sử dụng PAH của Việt Nam và thế giới. Như vậy, catechol thực hiện chức năng có thể giống nhau nhưng cấu trúc có thể rất khác nhau và cũng có thể nó là một gen hoàn toàn khác. Điều này cần phải tiếp tục chứng minh bằng các nghiên cứu để xác định trình tự axit amin của enzym này và hoạt tính xúc tác cắt vòng thơm.

III. KẾT LUẬN

ADN tổng số của ba chủng vi khuẩn KCP-3, KCP-7, KCP-8 đã được tách và làm sạch. Đã

nhân được đoạn gen có kích thước khoảng 800 bp bằng kỹ thuật PCR và sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen mã hóa catechol 2,3- dioxygenaza.

Sản phẩm PCR nhân lên được từ 3 chủng KCP-3, KCP-7, KCP-8 đã được tách dòng.

Xác định trình tự sản phẩm PCR đặc hiệu nhân lên từ KCP-7 với cặp mồi C23O-1 và C23O-2 chính là gen mã hóa catechol 2,3- dioxygenaza.

Gen mã hóa C23O phân lập từ chủng KCP-7 có mức tương đồng cao nhất 71,28% và 70,67% với gen này trong các chủng *Acinetobacter* sp. và *P. putida*. Ngoài ra, các gen đã công bố trong các chủng thuộc các chi *Sphingomonas*, *Comamonas*, *Ralstonia*, *Pseudomonas* đều có mức tương đồng thấp với trình tự gen mã hóa C23O của KCP-7 hơn 70%.

Trình tự gen mã hóa C23O phân lập từ chủng KCP-7 được công bố trên ngân hàng gen EMBL với mã số là AJ492194

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ann - Sofle Alard, Alasdair H. Nellson., 1997: International Biodeterioration and Biodegradation, 39: 253-285.
2. Berker C. et al., 1995: Eur. J. Biochem., 228: 456-462.
3. Bindu Joshi, Satish Walla. 1996: FEMS Microbiology Ecology, 19: 5-15.
4. Cernigliola C. E., 1993: Current opinion in biotechnology, 4: 331-338.
5. Mahasin G. Tadros, Joseph B. Huges, 1997: Applied Biochemistry and Biotechnology, 63-65: 865-870.
6. Nguyễn Bá Hữu, 2002: Nghiên cứu các nhóm vi sinh vật và khả năng phân hủy hydrocarbon thơm đa nhân của một số chủng vi khuẩn trong quá trình xử lý ô nhiễm dầu tại Khe Chè, Quảng Ninh. Luận văn thạc sĩ.
7. Sambrook J., Fritsch E. F., T. Maniatis, 1989: Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
8. Meyer Svenja et al., 1999: Microbiology, 145: 1731-1741.

**DETECTION OF THE CATECHOL 2,3-DIOXYGENASE GENE IN THREE
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBON-DEGRADING
BACTERIA STRAINS ISOLATED FROM KHECHE,
CUALUC BAY, QUANGNINH PROVINCE**

LA THANH PHUONG, NGUYEN BA HUU, DANG THI CAM HA

SUMMARY

Three different polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria strains were isolated from bioremediation treatment plots for cleaning up the oil spill in an intertidal area of Kheche, Cualuc bay, Quangninh province and designed as KCP-3, KCP7 and KCP-8. In order to study the monitoring bioremediation, the detection of the catechol 2,3-dioxygenase gene from these strains was carried out by PCR. The primers C23O-1 and C23O-2 for specifically amplifying the catechol 2,3-dioxygenase gene (*C23O*) were used and the PCR products from these strains were approximately 800-bp. These PCR products were inserted into plasmid pbluescript KS' and finally were cloned into *E. coli* DH5 α . However, there was only one PCR product amplified from KCP-7 which was sequenced. The result showed that this PCR product was the *C23O* gene and it had high similarity 71.28% and 70.67% with the nucleotide sequences of the *C23O* genes from *Acinetobacter* sp. and *P. putida* respectively. The sequence of this gene has been registered in the EMBL/GenBank with accession number AJ492194.

Ngày nhận bài: 28-11-2002