

## TẠO ĐỘT BIẾN Ở VỊ TRÍ AXÍT ASPACTIC 101 (D101) CỦA ENZYM EPOXIT HYDROLAZA Ở HẠT ĐẬU TƯƠNG BẰNG KỸ THUẬT PCR

NGHIÊM NGỌC MINH

*Viện Công nghệ sinh học*

CHIKAFUSA FUKAZAWA

*Viện Công nghiệp thực phẩm quốc gia Nhật Bản*

Epoxit hydrolaza (EHs) là những enzym khá phổ biến có chức năng xúc tác để thủy phân vòng epoxy thành một sản phẩm có 2 nhóm hydroxyl (diols) gần nhau khi có mặt một phân tử nước (H<sub>2</sub>O). Trong những năm gần đây, một số phòng thí nghiệm đã quan tâm nghiên cứu tới cấu trúc, vai trò và chức năng của enzym này ở người [1, 2], động vật [3, 11], côn trùng [4] và vi sinh vật [5, 6].... Trong hạt thực vật có chứa một số axit béo khác nhau có vòng epoxy và những dẫn xuất của chúng, có thể có chức năng kháng nấm tự nhiên [7, 8]. Năm 1995, Katsube cs. đã công bố trình tự cDNA mã hoá cho enzym EH [9]. Sau đó, Masaomi và cs. cũng đã thông báo kết quả biểu hiện và làm sạch được enzym này trong hạt đậu tương ở dạng hoà tan [10]. Trong chuỗi axit amin của EH, axit aspactic ở một số vị trí như D103 của *Arabidopsis*, D101 của thuốc lá, D334 của người... là một axit amin khá bảo thủ và có thể có vai trò nhất định trong việc duy trì hoạt tính enzym của chúng. Để nghiên cứu vai trò của vị trí D101 của EH ở hạt đậu tương, chúng tôi đã tiến hành tạo các đột biến trực tiếp ở vị trí này (D101E, D101Q, D101C, D101T, D101H, D101S) bằng kỹ thuật PCR để phục vụ cho những nghiên cứu về mức độ biểu hiện và một số tính chất khác của enzym này.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Nguyên liệu

ADN plasmid có mang trình tự cDNA của gen EH bình thường ở hạt đậu tương (dùng làm khuôn cho phản ứng PCR), lấy từ phòng thí nghiệm của Dr. Fukazawa- Nhật Bản.

Takara Ex taq™ Kit của hãng Takara Shuzo co., LTD. Nhật Bản: dùng trong phản ứng PCR, TA Cloning<sup>(R)</sup> Kit có vectơ pCR2.1, T4 DNA ligaza, tế bào khả biến *E. coli* INV F' của hãng Invitrogen™.

Kit đọc trình tự: Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (RPN 2438/ RPN 2538) của hãng Amersham pharmacia biotech. Mỗi đọc trình tự: Fluorescein-Labeled Primer M4 (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') và Fluorescein-Labeled Primer RV-M (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGT CACGAC-3') của hãng Takara Shuzo co., LTD. Nhật Bản.

Các enzym giới hạn *Nde* I và *EcoR* I của hãng Wako/ NIPON GIENE.

Các cặp môi đột biến được thiết kế dựa trên trình tự cDNA của gen EH ở hạt đậu tương có trình tự như sau:

D101E: AT GAT GGC TCC CCA CTC ATG AGC CAC AAG G  
 D101Q: AT GAT GGC TCC CCA TIG ATG AGC CAC AAG G  
 D101G: AT GAT GGC TCC CCA GCC ATG AGC CAC AAG G  
 D101S: AT GAT GGC TCC CCA GGA ATG AGC CAC AAG G  
 D101C: AT GAT GGC TCC CCA GCA ATG AGC CAC AAG G  
 D101H: AT GAT GGC TCC CCA GTG ATG AGC CAC AAG G  
 D101T: AT GAT GGC TCC CCA GGT ATG AGC CAC AAG G  
 EH-Star-Sense2: ATATACATATGGAGCAAATAAAGCACAGAAC  
 EH-End-Anti2: GTTGAATTCGTTTTTGGACAGATCAGAACTTG

## 2. Phương pháp

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

Điều kiện của phản ứng PCR lần 1 được tiến hành như sau:

H <sub>2</sub> O khử ion đã khử trùng:	31,5μl
Dung dịch 10x Ex Taq™	5 μl
Hỗn hợp dNTP	4 μl
EH-DNA khuôn (template) (10ng/μl)	1 μl
Môi EH-Start-Sense 2 (20pmol)	4 μl
Môi đột biến (20pmol) (gồm 1 trong 7 loại đã được tổng hợp)	4 μl
Ex Taq:	<u>0,5 μl</u>

Tổng cộng: 50 μl

Nhiệt độ ủ là 62°C, tiến hành trong 30 chu kỳ.

Điều kiện của phản ứng PCR lần 2 được tiến hành như sau:

H <sub>2</sub> O khử ion đã khử trùng:	31,5 μl
Dung dịch 10x Ex Taq™	5 μl
Hỗn hợp dNTP	4 μl
EH-DNA khuôn (template) (10ng/μl)	2 μl
Môi EH-Start-Sense 2 (20pmol)	4 μl
Sản phẩm PCR lần 1 (1 nmol/μl) (Đun sôi ở 100°C trong 5 phút, sau đó ủ ngay trong đá)	3 μl
Ex Taq:	<u>0,5 μl</u>

Tổng cộng: 50 μl

Nhiệt độ ủ là 64°C, tiến hành trong 30 chu kỳ.

- Phương pháp tách ADN plasmid (Sambrook và cs. 1989).

- Phương pháp nhân dòng (cloning) được tiến hành theo hướng dẫn trong TA Cloning<sup>R</sup> Kit và đọc trình tự ADN.

Điều kiện phản ứng PCR cho việc đọc trình tự được tiến hành như sau:

H <sub>2</sub> O khử ion đã khử trùng:	22 μl
Môi M4 (hoặc RV-M)	2 μl
ADN plasmid (3,8 μg/μl)	1 μl
Tổng cộng:	25 μl

Hỗn hợp phản ứng này được chia đều ra 4 ống eppendorf (6,1μl/ 1 ống) đã có sẵn 2 μl của mỗi một loại dNTP (G, A, T, C). Sau đó hỗn hợp này được chạy phản ứng PCR với chu trình nhiệt trải qua 3 bước như sau:

Bước 1: [95°C/5 phút]/ 1 chu kỳ.

Bước 2: [95°C/30 giây –% 50°C/ 30 giây –% 72°C/ 1 phút]/15 chu kỳ.

Bước 3: [95°C/30 giây –% 72°C/ 1 phút]/15 chu kỳ.

Trước khi tra mẫu vào gel để đọc trình tự, hỗn hợp phản ứng được làm nóng lên tới 94°C/5 phút rồi làm lạnh ngay trong nước đá.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Kết quả thu nhận sản phẩm PCR lần 1

Chúng tôi đã sử dụng những cặp môi đột biến và môi EH-Star-Sense 2 (có chứa vị trí cắt của enzym *Nde* I và vị trí khởi đầu phiên mã ATG) để nhân một đoạn gen có kích thước 326 bp (trong đó bao gồm cả các vị trí đột biến cần quan tâm).

Bằng kỹ thuật PCR với công thức phản ứng và chu trình nhiệt như đã nêu ở phần phương pháp, chúng tôi đã nhận được kết quả như sau: sau khi kiểm tra sản phẩm PCR lần 1 bằng điện di trên gel agarosa 1% chúng tôi đã nhận được một băng ADN có kích thước khoảng 326 bp khá đặc hiệu.

Băng ADN này được cắt và thổi ra bằng cách dùng túi thẩm tích và điện di một chiều ở 100V với thời gian là 30 phút. Sau đó, ADN này được làm sạch từng bước bằng butanol bão hòa trong TE, phenol bão hòa trong TE, hỗn hợp chlorophóc + isoamyl và cuối cùng được hoà tan trong dung dịch TE (pH = 8) với nồng độ 1nmol/μl.

Như vậy, sau khi cắt và làm sạch đoạn ADN (326 bp) của sản phẩm PCR lần 1, chúng tôi có 7 đoạn ADN (mỗi đoạn chứa 1 vị trí đột biến khác nhau) được dùng làm môi cho phản ứng PCR lần 2.

### 2. Kết quả thu nhận sản phẩm PCR lần 2

Chúng tôi đã sử dụng những đoạn ADN có kích thước 326 bp (sản phẩm PCR lần 1) và môi EH- End-Anti 2 (có vị trí cắt của enzym *EcoR* I

và vị trí kết thúc phiên mã TGA) để nhân một đoạn gen có kích thước khoảng 1kb, trong đó gồm toàn bộ chiều dài của gen EH (cDNA) với những vị trí đột biến cần quan tâm bằng kỹ thuật PCR. Trong phản ứng PCR lần 2 này, do sử dụng sản phẩm PCR lần 1 có trọng lượng phân tử khá lớn (326 bp) làm mẫu mà chúng tôi đã phải tăng nhiệt độ ủ lên 64°C để tạo điều kiện cho việc bắt cặp giữa mẫu và sợi khuôn xảy ra được tốt hơn. Kết quả chúng tôi đã nhận được băng ADN có kích thước khoảng gần 1kb khá đặc hiệu.

Những đoạn ADN có kích thước khoảng 1 kb (từ 7 đột biến khác nhau) được cắt, thoi ra và làm sạch như đối với sản phẩm PCR lần 1. Sau đó, ADN này được hoà tan trong dung dịch TE (pH = 8) với nồng độ 40 ng/μl để nhân dòng vào vectơ *pCR<sup>R</sup>* 2.1 (hình 1).

Đối với các đột biến khác (D101Q, D101C, D101T, D101H, D101S), chúng tôi cũng thu được kết quả tương tự như D101E (không minh họa bằng hình ảnh trong bài này).

### 3. Nhân dòng và đọc trình tự các gen EH đột biến

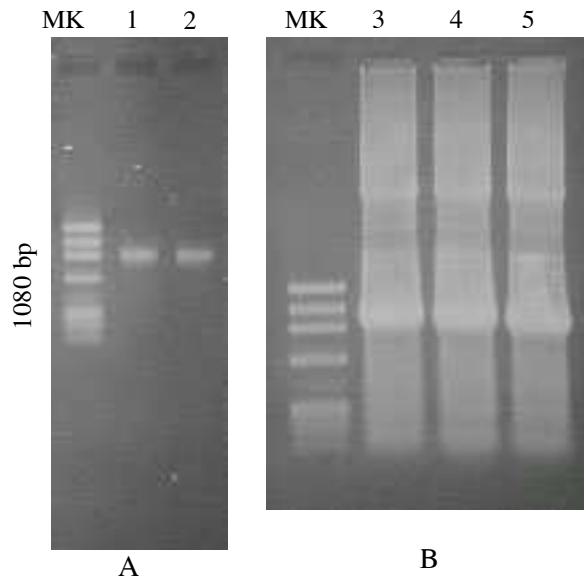
#### a. Kết quả nhân dòng các gen EH đột biến

Đoạn ADN có kích thước khoảng 1kb, sau khi 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 vi khuẩn *E.coli INV F'* và được chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa 50 mg/lít ampicillin, 80 mg/lít 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

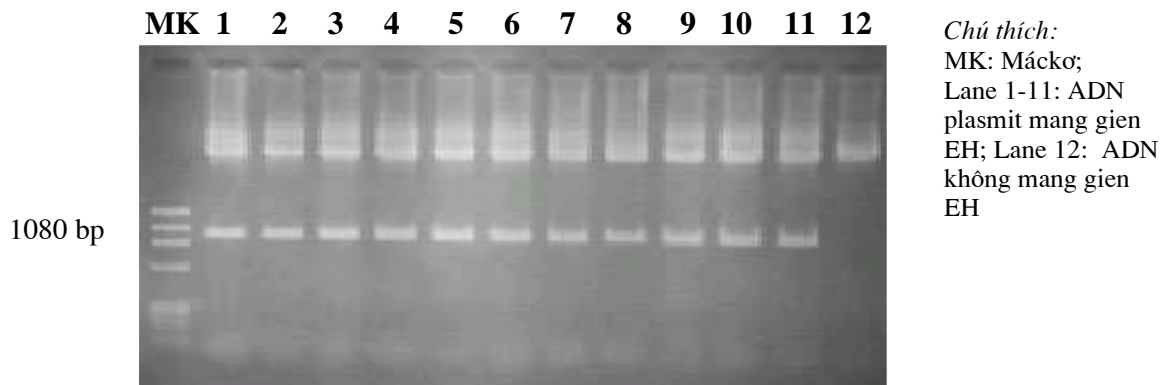
khẩn lạc trắng đã được chọn để tách ADN plasmit. Để kiểm tra xem đoạn ADN (khoảng 1 kb) đã được gắn vào trong plasmit hay chưa, ADN plasmit đã được tách và ủ với enzym *EcoR* I ở 37°C trong 3 giờ, sau đó kiểm tra sản phẩm bằng điện di trên gel agarosa 1%. Kết quả chúng tôi đã nhận được những băng ADN có kích thước khoảng 1kb (hình 2).

Một vài plasmit có mang đoạn ADN khoảng 1kb đó đã được làm sạch với số lượng lớn và dùng để đọc trình tự nucleotit.



**Hình 1. A.** Sản phẩm PCR lần 2 của D101E  
**B.** Sản phẩm PCR lần 2 (của D101E) sau khi được cắt và làm sạch

*Chú thích:* MK: Mắckơ; Giếng 1-2: đoạn ADN đã được làm sạch để nhân dòng; Giếng 3, 4, 5: sản phẩm PCR lần 2 chưa được làm sạch.



**Hình 2.** ADN plasmit được cắt kiểm tra bằng *EcoR* I

*Chú thích:*  
MK: Mắckơ;  
Lane 1-11: ADN plasmit mang gen EH; Lane 12: ADN không mang gen EH

### b. Kết quả đọc trình tự nucleotit

Để chuẩn bị nguyên liệu cho việc đọc trình tự, chúng tôi đã tách ADN plasmid, xử lý ARN bằng cách ủ với enzym RNaza ở 37°C trong 3 giờ, sau đó làm sạch và kết tủa ADN bằng 20%PEG + 2,5 M NaCl và hoà ADN trong dung dịch TE (pH = 8) với nồng độ 3,8 µg/µl.

Quá trình đọc trình tự được tiến hành qua đêm trên máy DSQ-1000/DNA Sequencer - Shimadzu. 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 cần thiết theo yêu cầu của thí nghiệm (hình 3).

Các plasmid có mang những vị trí đột biến được giữ ở -20°C để sử dụng cho nghiên cứu biểu hiện enzym EH ở *E. coli*.

Tương tự như vậy, 6 trình tự khác của gen EH đột biến ở các vị trí D101Q, D101C, D101T, D101H, D101S cũng đã nhận được bằng phương pháp tương tự (không minh hoạ bằng hình ảnh trong bài này).

#### **NdeI**

```
ATATACATAT GGAGCAAATA CAGTTGAAGT GAATGGCATA AAAATGCATG
TTGCAGAGAA AGGAGAGGGT CCAGTGGTGT TGTTCCCTCCA CGGCTTCCCT
GAGCTCTGGT ACTCATGGCG CCATCAGATT CTCTCTCTCA GCTCCCTCGG
CTACCGCGCC GTCGCTCCCG ATCTCCGTGG CTACGGTGAC ACCGAGGCAC
CACCTTCAAT CAGCAGCTAC AACTGCTTCC ACATAGTGGG TGATCTCGTT
GCGCTTATTG ACTCTCTGGG TGTCCAACAA GTGTTCCCTG TGGCTCATGA*
CTGGGGAGCC ATCATAGGTT GGTATCTATG CATGTTTCGC CCTGACAAAG
TTAAGGCCTA TGTCTGCCTC AGTGTCCCTC TCCTCCGCAG AGACCCAAAC
ATCAGAACGG TGGATGGCAT GCGTGCTTTG TATGGAGACG ACTACTATGT
CTGCAGATTT CAGAAACCAG GGGAAATGGA GGCTCAGATG GCTGAAGTTG
GCACTGAGTA TGTTCTCAA AACATCCTTA CAACTCGCAA TCCTGGTCCT
CCAATTCTTC CCAAGGGAAG GTTTCAATTC AATCCAGAAA TGCCCAACAC
CTTGCCCTCT TGGCTCACAG AAGAAGATCT CGCCTATTAT GTCTCCAAAT
TTGAGAAAAC CGGATTCACT GGACCCTTGA ACTACTACAG AAATTTCAAC
TTAAATTGGG AGTTGACGGC ACCATGGACA GGAGGGCAA TCAAGGTGCC
CGTAAAATAC ATAACAGGTG AGTTGGACAT GGTATACAAC TCGCTGAACT
TGAAGGAGTA TATCCACGGC GGAGGGTTCA AGCAAGATGT GCCAAATTTA
GAACAAGTGA TTGTGCAGAA AGGAGTGGCT CACTTCAATA ATCAAGAAGC
AGCAGAGGAA ATCGATAAT ACATATACGA TTTTATCAAC AAGTTCGAT
CTTGTCCAAA AACGAATTC AC
```

**Stop codon**

#### **EcoRI**

### Hình 3. Trình tự nucleotit của gen EH đột biến ở vị trí D101E

(axit aspartic ở vị trí 101 đổi thành axit glutamic)

Chú thích: **GA\**C***: Vị trí đột biến D101E

### III. KẾT LUẬN

1. Đã nhận được sản phẩm PCR lần 1 (trọng lượng phân tử khoảng 326 bp) mang vị trí đột biến D101E, D101Q, D101C, D101T, D101H, D101S và vị trí khởi đầu phiên mã (ATG).
2. Đã nhận được sản phẩm PCR lần 2 (trọng lượng phân tử khoảng 1 kb) là toàn bộ gen EH có thể đã mang đột biến ở vị trí D101

(bao gồm cả vị trí khởi đầu phiên mã và vị trí kết thúc phiên mã - TGA).

3. Bằng kỹ thuật nhân dòng và đọc trình tự, chúng tôi đã nhận được trình tự nucleotit của gen mã hoá cho enzym EH nhưng có điểm đột biến ở vị trí axit aspartic 101.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Takashi Y., et al.**, 2000: J. Biol. Chem., 275(30): 23082 -23088.

2. **Armstrong R. N.**, 1999: Drug metab. Rev., 31: 71-86.
3. **Michael A., Heike W., and Franz O.**, 1996: J. Biol. Chem., 271(8): 4223-4229.
4. **Linderman R. J., et al.**, 1995: Tetrahedron, 51: 10845-10856.
5. **Rick R., et al.**, 1997: J. Biol. Chem., 272(23): 14650-14657.
6. **Rink R., et al.**, 1999: J. Am. Chem. Soc., 121: 7417-7418.
7. **Badami R. C., and Patil K. B.**, 198: Prog. Lipid Res., 19: 119-153.
8. **Hemberg M., and Fahlstadius P.**, 1992: Plant Physiol., 99: 987-995.
9. **Katsube T. et al** 1995: Plant Physiol., 109: 722-723.
10. **Masaomi A., et al.**, 2000: Eur. J. Biochem., 267: 2649-2657.
11. **Bentley P., and Oesch F.**, 1975: FEBS Lett., 59: 291-295.

## PRODUCTION OF THE SOYBEAN EPOXIDE HYDROLASE MUTANTS AT ASP101 (D101) SITE BY THE PCR TECHNIQUE

NGHIEM NGOC MINH, CHIKAFUSA FUKAZAWA

### SUMMARY

The epoxide hydrolases are widely distributed among many species, including bacteria, fungi, plants and mammals. 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 information on the molecular structure of these enzymes, as well as insight to the enzymatic mechanisms that involved.

In this report, we demonstrate the production of the soybean epoxide hydrolase mutants at Asp101 site (D101E, D101Q, D101C, D101T, D101H, D101S) by the PCR technique, using the target mutant primers. Employing the 1<sup>st</sup> PCR products as primer and the EH- End-Anti 2 primer, the entire cDNA fragment (nearly 1kb) consisted of target mutants encoding epoxide hydrolase from the soybean seeds was obtained by PCR. The cloning and the sequencing of this EH gene were also performed.

*Ngày nhận bài : 7-5-2003*