TẠO DÒNG GIEN MÃ HOÁ α-AMYLAZA LẠNH TỪ VI KHUẨN CHỊU LẠNH *PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANCTIS* 505

LÊ VĂN TRƯỜNG, TRƯƠNG NAM HẢI, LÊ TRẦN BÌNH
Viện Công nghệ sinh học
THOMAS SCHWEDER
Viện Vi sinh và Sinh học phân tử, Greifswald, CHLB Đức

Sinh vật ưa lạnh (*psychrophs*) và chịu lạnh (*psychrotrophs*) mới được nghiên cứu từ những năm cuối thập niên sáu mươi [1, 2]. Theo Morita, sinh vật ưa lạnh sinh trưởng tốt ở nhiệt độ dưới 15°C và không phát triển được ở điều kiện trên 20°C. Sinh vật chịu lạnh sinh trưởng tốt ở nhiệt độ dưới 20-25°C, nhưng không sinh trưởng được ở nhiệt độ trên 40°C [3]. Enzym được tiết ra từ các cơ thể sinh vật ưa lạnh và chịu lạnh có cơ chế xúc tác phản ứng mạnh ở nhiệt độ thấp hơn 30°C; điều kiện nhiệt độ cao hơn 30°C có thể làm biến tính các enzym này [4]. Đặc tính xúc tác ở nhiệt độ thấp của các enzym lạnh rất có ý nghĩa kinh tế so với các enzym phân lập từ các cơ thể sinh vật *mesophiles* và *thermophiles*: tiết kiệm được năng lượng, chống được sự nhiễm của các vi khuẩn *mesophiles*, giữ được các hương vị và các vitamin trong nước quả ép không bị phân huỷ bởi nhiệt độ[5].

Gần đây, một số gien mã hoá cho enzym lạnh đang được nhiều nhà khoa học trên thế giới quan tâm. Cummings và Black [6] đã phân lập được vi khuẩn có khả năng phân huỷ xylan và xelluloza từ bùn đất 3°C trên biển Nam cực. Georges Feller và cộng sự [7] đã tách dòng được gien α-amylaza từ vi khuẩn *Alteromonas haloplanctis*, enzym này hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 30°C, pH tối ưu là 7,0 và bị biến tính ở 45°C.

Chủng vi khuẩn *Pseudoalteromonas haloplanctis* 505 được phân lập từ vùng nước trên bề mặt của biển Nam cực, sinh trưởng tốt ở nhiệt độ từ 0°C- 30°C [8]. Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả tạo dòng gien α-amylaza từ chủng vi khuẩn chịu lạnh *P. haloplanctis* 505 phân lập từ biển Nam cực.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng *P. haloplanctis* 505 phân lập từ biển Nam cực được nuôi cấy trong môi trường Zobell (pepton 5g/l, cao nấm men 1g/l, FePO4 0,01g/l, nước biển nhân tạo 700 ml/l) [9]. Điều kiện nuôi cấy ở 5°C trong 3 ngày, tốc độ lắc 200v/phút.

Chủng *E. coli* DH-5α được dùng cho thí nghiệm phân lập gien. Môi trường LB được dùng làm môi trường nuôi cấy. Ampixillin được bổ sung vào môi trường với nồng độ 100 μg/ml khi cần thiết.

Các enzym hạn chế, T4 ligase, Blocking reagent, chất cộng hợp kháng thể (antibody conjugates) và CDP star mua từ hãng Boehringer Mainheim. Màng nilon từ hãng Roche Diagnotis. Các đoạn mồi được tổng hợp từ hãng Phacmacia.

Plasmid pUC18 và pCR2.1 được sử dụng để tạo ngân hàng gien và phân lập gien.

Enzym ngoại bào của chủng 505 được thu nhận từ dịch nuôi cấy sau 3 ngày trên môi trường Zobell lỏng có bổ sung 0,5% tinh bột. Dịch nuôi cấy được ly tâm 10000 rpm để loại bỏ

Công trình được thực hiện tại Viện Marine Biotechnology, Greifswald, CHLB Đức với sự tài trợ của dự án hợp tác giữa Viện Công nghệ Sinh học với Viện Vi sinh và Sinh học phân tử CHLB Đức.

tế bào, phần dịch nổi được thu lấy và cất giữ ở 4°C cho các thí nghiệm xác định hoạt tính amylaza.

Hoạt tính amylaza được định lượng dựa vào sự phát hiện gốc đường khử theo phương pháp của Bernfeld [10]. 50 µl dung dịch enzym được bổ sung vào 450 µl dung dịch tinh bột 1% trong 50 mM đệm phốtphat với pH khác nhau. Phản ứng được thực hiện ở 30°C trong thời gian 20 phút, sau đó bổ sung 0,5 ml dung dịch DNSA (dinitrosalycilic axít), đun sôi 10 phút, làm lạnh tới nhiệt độ phòng và đo ở độ hấp phụ 530 nm.

Phương pháp phân lập gien

- *Thiết kế đoạn mồi.* Dựa vào các vùng bảo thủ từ các trình tự amino axit của các gien amylaza đã biết, chúng tôi đã tổng hợp 3 cặp mồi, các cặp này được sử dụng cho phản ứng PCR để nhân 3 đoạn gien nằm giữa mồi thuận (forward primer) và mồi nghịch (reverse primer).

- *Tổng hợp mẫu dò ADN (probe).* Mẫu dò ADN được tổng hợp từ bộ kít tổng hợp (DIG-labelling kit) theo như hướng dẫn của hãng. Sau khi tổng hợp bằng PCR, mẫu dò được tách trên gel 0,8% agarosa, làm sạch qua cột Gel-purification kit (QA-gel) và bảo quản ở -20°C cho các thí nghiệm lai ADN.

- *Tạo ngân hàng gien từ ADN genom.* ADN genom của chủng 505 được cắt không hoàn toàn bằng enzym hạn chế *Sau*3A và tách trên gel 0,8% agarosa. Các đoạn ADN kích thước khoảng 3-4 kb được thu nhận và gắn vào plasmid pUC18 qua điểm *Bam*HI. Phản ứng gắn được thực hiện qua đêm ở 16°C, sau đó biến nạp vào chủng DH-5$^{\alpha}$ bằng phương pháp xung điện [11]. Các thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường thạch LB, có bổ sung ampicillin nồng độ 100 µg/ml và 50 µl dung dịch 2% X-gal/đĩa, nuôi qua đêm ở 37°C. Các khuẩn lạc có mang đoạn ADN ngoại lai (màu trắng) được cấy chuyển sang 2 đĩa môi trường LB có bổ sung Amp, (50 khuẩn lạc/đĩa). Một đĩa để phân lập plasmid dùng cho thí nghiệm lai ADN, đĩa còn lại cất giữ ở 4°C cho thí nghiệm tiếp theo.

- *Lai ADN.* Gồm 2 bước: lai nhóm khuẩn lạc từ đĩa và lai khuẩn lạc riêng rẽ.

Lai nhóm khuẩn lạc. Plasmid tách từ ngân hàng gien được biến tính ở 95°C trong 10 phút, làm lạnh nhanh trong nước đá, sau đó hút 5 µl của mỗi mẫu chấm lên màng nilon. Plasmid được cố định trên màng bằng việc chiếu trên đèn UV 260 nm trong 1 phút. Thí nghiệm lai được thực hiện trong lò lai phân tử ở 68°C trong đệm SSC 5x, 0,1% N-lauroylsacosine và 1% Blocking reagent với nồng độ mẫu dò thích hợp. Các bước rửa và hiện được tiến hành như mô tả trong sách "Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual" của hãng Boringer Manheim [12].

Lai khuẩn lạc riêng rẽ. Sau khi lai nhóm khuẩn lạc để tìm ra nhóm khuẩn lạc dương tính, plasmid từ các khuẩn lạc đơn của các mẫu dương tính được phân lập để lai khuẩn lạc riêng rẽ. Các bước lai được thực hiện như đối với lai nhóm khuẩn lạc. Plasmid từ những khuẩn lạc dương tính được tách chiết để đọc trình tự nucleotit và phân tích gien.

Phân tích gien. Các phần mềm Blast và Clusta được sử dụng trong việc phân tích cấu trúc gien.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

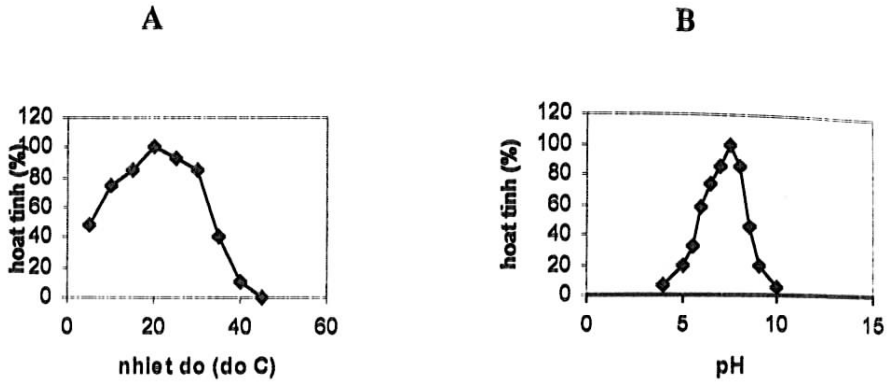
1. Đặc tính thủy phân tinh bột của amylaza từ chủng *P. haloplanctis* 505

Chủng vi khuẩn *P. haloplanctis* 505 có khả năng sinh trưởng ở nhiệt độ từ 0°C-30°C và có hoạt tính thuỷ phân tinh bột cao. Khi nuôi cấy chủng này ở 5°C thì khả năng tiết amylaza là cao nhất, với nhiệt độ nuôi cấy tăng dần thì khả năng tiết amylaza bị giảm dần; ở 35°C, vi khuẩn 505 không thể sinh trưởng được.

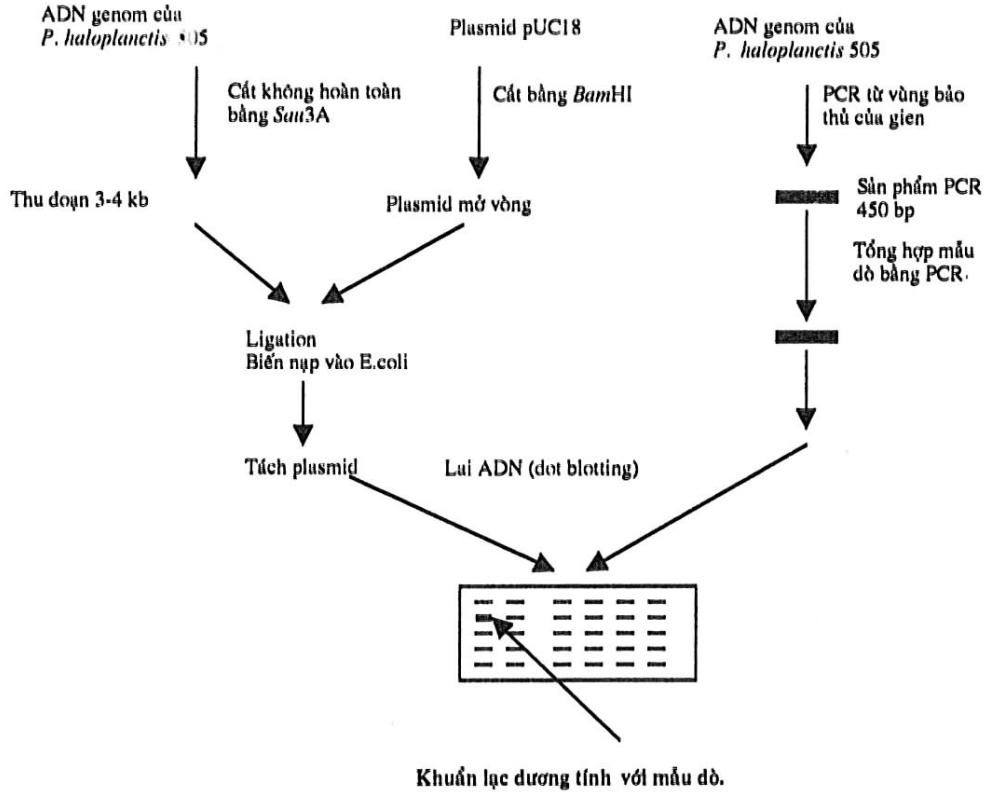
Để nghiên cứu tính chất của amylaza, dịch enzym ngoại bào thu nhận từ môi trường lỏng sau nuôi cấy được sử dụng làm phản ứng với tinh bột 1% trong đệm phốtphat như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả chỉ ra rằng nhiệt độ tối thích cho hoạt tính thuỷ phân tinh bột của enzym này là 20°C, pH tối ưu của hoạt tính enzym là 7,5. Điều đáng quan tâm là ở 5°C hoạt tính thuỷ phân tinh bột của enzym này đạt được 50% và mất hoạt tính hoàn toàn ở 40°C, đây là đặc tính điển hình của enzym lạnh (hình 1).

2. Sơ đồ phân lập gien

Các bước phân lập gien được mô tả trên hình 2. Trước tiên các đoạn đặc thù cho cấu trúc câu từ vùng bảo thủ của gien $^{\alpha}$-amylaza được nhân lên từ ADN genom của chủng 505 bằng PCR,



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và pH (B) tới hoạt tính amylaza

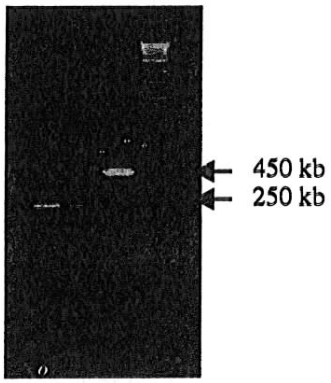


Hình 2. Sơ đồ phân lập gien amylaza từ chủng *P. haloplanctis* 505

sau đó gắn vào véc tơ pCR2.1 để đọc trình tự nucleotit. Đoạn gien này sẽ được phân tích trên chương trình phân tích gien xem có phải là gien amylaza hay không. Sau khi đã khẳng định đoạn gien này là gien amylaza, bước tiếp theo là tổng hợp mẫu dò và tạo ngân hàng gien từ ADN genom của chủng 505. Cuối cùng là lai mẫu dò với ngân hàng gien của chủng 505 để tìm ra khuẩn lạc mang gien amylaza.

3. Nhân đoạn gien amylaza của chủng 505 từ vùng bảo thủ bằng PCR

Muốn tổng hợp mẫu dò cho gien amylaza của chủng 505, trước hết phải biết được trình tự nucleotid một đoạn bất kỳ trên gien amylaza này. Để làm được việc đó, chúng tôi thiết kế 4 đoạn mồi dựa vào vùng bảo thủ của các gien amylaza đã biết để nhân chúng lên bằng PCR.



Ảnh. Sản phẩm PCR được nhân lên từ vùng bảo thủ của gien amylaza từ chủng P. *haloplanctis* 505

Ghi chú: 1, 2, 3: đoạn gien được nhân lên từ các cặp mồi P1AmyF- P3AmyR, P2AmyF-P4AmyR và P1AmyF-P4AmyR. M: marker SPPI/EcoRI

Trình tự các đoạn mồi như sau:

P1AmyF: gatacgcttattaaccat

P2AmyF: cggtttgatgcttctaaa

P3AmyR: tgtttagaagcatcaaac

P4AmyR: gtcgtgattgtctacaaa

P1AmyF được thiết kế từ vùng bảo thủ I của các gien α-amylaza đã biết, tương tự P2AmyF và P3AmyR được thiết kế từ vùng II, P4AmyR được thiết kế từ vùng IV. Các cặp P1AmyF-P4AmyR khi chạy PCR sẽ nhân lên đoạn gien có độ dài khoảng 450bp, cặp P1AmyF-P3AmyR, P2AmyF-P4AmyR sẽ nhân lên đoạn gien có độ dài khoảng 250bp.

PCR được thực hiện trong điều kiện sau:

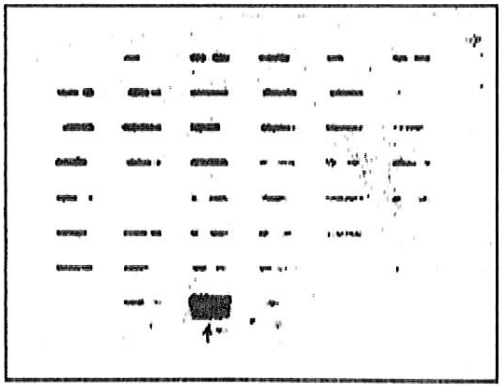
- Điều kiện biến tính (denaturation): 94°C trong 30 giây
- Điều kiện bắt cặp (annealing): 55°C, 1 phút
- Điều kiện kéo dài chuỗi (prolongation): 72°C, 40 giây
- Số chu kỳ lặp lại: 30 chu kỳ

Sản phẩm PCR được kiểm tra trên điện di agarosa 1% trong đệm TBE (ảnh). Kết quả trên hình 3 cho thấy cả 3 cặp mồi này khi chạy PCR đều nhân lên các đoạn ADN với kích thước đúng như dự kiến ban đầu. Chúng tôi chọn đoạn gien được nhân lên từ cặp P1AmyF-P4AmyR (độ dài khoảng 450bp) để gắn vào vector pCR2.1 và gửi đi đọc trình tự nucleotid của đoạn gien này. Kết quả phân tích trình tự nucleotid trên chương trình phân tích gien đã chỉ ra rằng đây chính là đoạn gien amylaza (kết quả không trình bày). Đoạn gien amylaza này sẽ được dùng làm khuôn mẫu để tổng hợp mẫu dò trong thí nghiệm lai ADN.

4. Tạo ngân hàng gien và tổng hợp mẫu dò

Ngân hàng gien được tạo theo các bước như đã mô tả trong phần phương pháp, hơn 5000 khuẩn lạc có mang ADN ngoại lai được tách plasmid để dùng cho thí nghiệm lai ADN. Mẫu dò được tổng hợp bằng phản ứng PCR với sợi khuôn là đoạn gien được nhân từ vùng bảo thủ. Các dNTP được đánh dấu bằng dioxygenin (DIG). Sau khi tổng hợp xong, mẫu dò được làm sạch và kiểm tra nồng độ cũng như độ nhạy trên phim X-quang để chọn nồng độ thích hợp cho thí nghiệm lai ADN.

5. Lai ADN (Southern hybridization)



Hình 3: Lai ADN của chủng *P. haloplanctis* 505

Mẫu dương tính được chỉ bằng mũi tên

Thí nghiệm lai được thực hiện ở 68°C qua đêm trong lò lai phân tử như đã mô tả trong phần phương pháp. Do mẫu dò được tổng hợp từ khuôn mẫu gien amylaza của chủng 505 với độ dài 450bp, nên khả năng bắt cặp với gien này rất lớn. Kết quả lai cho thấy những mẫu lai cho tín hiệu mạnh đều là những mẫu mang gien amylaza của chủng 505 (hình 3). Sau hai bước

lai ADN, chúng tôi đã tìm được 2 khuẩn lạc có tín hiệu mạnh với mẫu dò. Hai khuẩn lạc này được tách plasmid và gửi đi đọc trình tự nucleotit.

6. Trình tự nucleotit của gien amylaza phân lập từ chủng *P. haloplanctis* 505

Trình tự nucleotit của gien amylaza từ chủng *P. haloplanctis* 505 được trình bày trên hình 4. Gien này có độ dài 1431bp, mã hoá cho một protein có 453 amino axit với mã khởi đầu là ATG. Đoạn peptit tín hiệu tiết có độ dài là 24 amino axit và cắt tại điểm Ala-Thr. Khi so sánh trình tự amino axit của gien này với các gien đã biết, kết quả cho thấy chúng thuộc về dòng gien α-amylaza.

```
 aagcgttgaaggcgcattatttatagagcttgctactcaaaatgggctttatttaaatgc
 tcattgccaagtaaaagccacgcctaataaagatattagccgcagtttaatggcatttag
 ctatgtaaaaagcgatttagaatcatcaaccctgtgtattagaaacttaataatacctac
 accgctgattatatagccctgtgcaaagcattttatttgaaaatgtaaattgccaagtta
 tgtaggttatctagtaataaaggataatttacctattatgcatacgtattcagtttttat
 ttaatcaattctcaatctagtgttaaccacttgtaaataatgtcgagtagttgttttgct
                               - 35                   - 10
cgctcaacagttggatcacacactatgaaactcaataaaataatcaccaccgcaggttta
            RBS             M  K  L  N  K  I  I  T  T  A  G  L
agcctagggttgctcttaccgagtattgccacagctacgcccaccacatttgtgcatttg
 S  L  G  L  L  L  P  S  I  A↓ T  A  T  P  T  T  F  V  H  L
tttgaatggaattggcaagatgtagcgcaagaatgtgagcaatacctaggaccaaaaggc
 F  E  W  N  W  Q  D  V  A  Q  E  C  E  Q  Y  L  G  P  K  G
tacgctgcagtacaggtctcgccgcctaatgagcacattacaggaagccaatggtggaca
 Y  A  A  V  Q  V  S  P  P  N  E  H  I  T  G  S  Q  W  W  T
cgttatcagccagtaagttatgaactgcaaagtcgtggcggaaaccgtgcgcagtttatc
 R  Y  Q  P  V  S  Y  E  L  Q  S  R  G  G  N  R  A  Q  F  I
gatatggtaaatcgctgtagtgcagctggggttgatatttacgttgatacgcttattaac
 D  M  V  N  R  C  S  A  A  G  V  D  I  Y  V  D  T  L  I  N
catatggcagcaggaagtggcacaggcacagcgggaaatagctttggtaataaaagcttt
 H  M  A  A  G  S  G  T  G  T  A  G  N  S  F  G  N  K  S  F
cctatttatagcccacaagattttcatgaaagttgtaccattaatagctctgactatggc
 P  I  Y  S  P  Q  D  F  H  E  S  C  T  I  N  S  S  D  Y  G
aacgatcgctaccgagttcaaaattgtgaactcgttggacttgccgatttagataccgct
 N  D  R  Y  R  V  Q  N  C  E  L  V  G  L  A  D  L  D  T  A
tcaaactatgtacaaaataccattgcagcatatattaacgacttgcaagctattggcgta
 S  N  Y  V  Q  N  T  I  A  A  Y  I  N  D  L  Q  A  I  G  V
aaaggctttcggtttgatgcttctaaacatgttgcagcaagcgatatccaaagtttaatg
 K  G  F  R  F  D  A  S  K  H  V  A  A  S  D  I  Q  S  L  M
gctaaagtaaatggctcgccagtggtttttcaagaagtgattgatcaaggtggggaggct
 A  K  V  N  G  S  P  V  V  F  Q  E  V  I  D  Q  G  G  E  A
gttggtgcctctgaatatttaagcacaggtttagtaactgaatttaaatatagcactgag
 V  G  A  S  E  Y  L  S  T  G  L  V  T  E  F  K  Y  S  T  E
cttggtaacacttttagaaacggctcgcttgcatggctgagtaattttggcgaagggtgg
 L  G  N  T  F  R  N  G  S  L  A  W  L  S  N  F  G  E  G  W
ggctttatgccaagctcttctgcggtggtttttgtagataatcacgacaatcaacgtggt
 G  F  M  P  S  S  S  A  V  V  F  V  D  N  H  D  N  Q  R  G
catggcggcgctggtaatgtaattacctttgaggatggccgcttatatgacttagccaat
 H  G  G  A  G  N  V  I  T  F  E  D  G  R  L  Y  D  L  A  N
gtatttatgttggcttatccgtacggttatccaaaagtaatgtcgagttatgatttccat
 V  F  M  L  A  Y  P  Y  G  Y  P  K  V  M  S  S  Y  D  F  H
ggtgatacagatgctggtgggccaaatgtaccggtacataataatggtaacttagagtgt
 G  D  T  D  A  G  G  P  N  V  P  V  H  N  N  G  N  L  E  C
tttgctagtaattggaagtgtgagcatcgctggtcatatattgcaggcggggtcgatttt
 F  A  S  N  W  K  C  E  H  R  W  S  Y  I  A  G  G  V  D  F
agaaataacacgcccgacaattgggcagtaacaaactggtgggataacacaaataatcaa
 R  N  N  T  P  D  N  W  A  V  T  N  W  W  D  N  T  N  N  Q
atttcatttggccgaggtagctcgggtcatatggctattaacaaagaagactcaacactt
 I  S  F  G  R  G  S  S  G  H  M  A  I  N  K  E  D  S  T  L
agtgcaactgtgcaaaccgatatggcgccagggcaatactgtaatgtgttaaaaggcgag
 S  A  T  V  Q  T  D  M  A  P  G  Q  Y  C  N  V  L  K  G  E
ttgtcagctgatgctaaaagttgtagtggcgaggttataacggttaattccgacggtact
 L  S  A  D  A  K  S  C  S  G  E  V  I  T  V  N  S  D  G  T
attaatcttaatattggcgcttgggatgcgatggcaattcataaaaatgccaagttaaat
 I  N  L  N  I  G  A  W  D  A  M  A  I  H  K  N  A  K  L  N
acaagttcagcgccatagcactgaaagtgactggcagcgaacggttatttttattaatgc
 T  S  S  A  P  -
acaaacacaaagtggacaagatatgtttttgcgcggtggaattgaccacgcttatgcaaa
 cgcaaatctgggtcgaaattgccaaacaagtaattttgagtgtgcaatgcctattcgtca
 taataatttaaaaaacgtaacaacaagcccttggaaagcaaatgataactaccttgattg
 gtatggtatagaaaatgggcaaagtagcgaagcagaaggttctgctaccgactggacaac
 gaatgtttggcctgcaggttggggcgctgaaaaaacgctaaacacagatggttttggtgt
 aacactattaaatatatggggcgaacactattggatgcttgatgtggatatggattgtag
 taaagcggttaatggatggtttgaactaaaagcattcattaaaaatggccaaggatggga
 gactgctattgctcaaaacaatacaccttatacaagcactaatcatatggcgcaatgcgg
 aaaagttaataaatttgagtttaataattcaagtgtagtaattcgtagtttttaaaagta
```

Hình 4: Trình tự nucleotit của gien amylaza của chủng ***P. haloplanctis* 505.** Trình tự promotor được đánh số -35 , -10; Vùng bám của ribosom ký hiệu RBS. Trình tự amino axít leader sequence được gạch dưới, điểm cắt của signal peptidase ký hiệu bằng mũi tên.thẳng đứng. Bộ ba kết thúc là tag kế tiếp là trình tự lặp lại của terminator (mũi tên ngược nhau).

7. So sánh gien amylaza của chủng *P. haloplanctis* 505 với các gien amylaza đã biết

Chương trình BLAST và CLUSTA được sử dụng để so sánh gien amylaza này với các gien amylaza đã biết. Kết quả cho thấy trình tự amino axit của gien amylaza này giống 96% so với trình tự amino axit của gien α-amylaza từ chủng *Alteromonas haloplanctis* A23 [7]. Điều này chứng tỏ gien amylaza này chính là gien α-amylaza và chủng *P. haloplanctis* 505 rất gần gũi với chủng *A. haloplanctis* A23.

III. KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn chịu lạnh *P. haloplanctis* 505 có khả năng thuỷ phân tinh bột cao ở nhiệt độ thường, nhiệt độ tối ưu cho hoạt tính enzym là 20°C và bị biến tính ở 40°C; pH tối ưu là 7,5. Gien α-amylaza của chủng *P. haloplanctis* 505 đã được phân lập và nhân dòng trong *E. coli*. Trình tự amino axit của gien này giống 96% với gien α-amylaza của chủng *A. haloplanctis* A23. Hiện nay, các nghiên cứu tiếp theo về hoạt tính của enzym này cũng như việc biểu hiện nó trong các thể chủ thích hợp đang được tiến hành.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Larkin JM** and **JL Stokes**, 1966: J Bacteriol, 91: 1667-1671
2. **Gounot A-M**, 1986: Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. Experientia, 42: 1192-1197.
3. **Morita RY**, 1975: Bacteriol Rev., 39: 144-169.
4. **Charler Gerday** et al., 2000: Cold-adapted enzym: from fundamentals to biotechnology. *TIBTECH*, Vol. 8.
5. **R. Margesin, F. shchinner**, 1999: Cold-Adapted Organisms.
6. **Cumming SP. and Black G. W.**, 1999: Polymer hydrolysis in a cold climate. Extremophiles, 3: 81-87.
7. **Georges Feller** et al., 1992: Journal of biological chemistry, 267(8): 5217-5221.
8. **Le Van Truong** et al., 2001: Cloning of two pectate lyase genes from the marine Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanctis* strain ANT/505 and characterization of the enzymes. Extremophiles, 5: 35-44.
9. **Weyland H., H. J. Ruger and H. Schwaz,** 1970: Veroff. Inst. Meeresf. Bremerh., 12: 269-296.
10. **Bernfeld P.** 1955: Amylasa α and β. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) Method in enzymology. Academic, New York: 149-155.
11. **Sambruck** et al., 1989: Molecular cloning a laboratory manual, 2nd edition.
12. **Nonradioactive In situ Hybridization Application Manual**, 1996: Boehringer Manheim Co. 2nd edition.

CLONING OF A GENE ENCODING COLD-ADAPTED α-AMYLASE FROM THE PSYCHROTROPHIC BACTERIUM *PSEUDOALTEROMONAS HALOPLANCTIS* STRAIN 505

LE VAN TRUONG et al

SUMMARY

The marine antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanctis* strain 505, isolated from the sea ice which covered the surface of the Southern Ocean, showed an amylolitic activity. The cold-adapted amylase from this strain 505 was characterized by a high activity at low temperature and its optimal temperature was 20°C and optimal pH was 7.5. The α-amylase gene was cloned and sequenced. The open reading frame of this gene was 1431 bps and coded for a protein with 453 amino acids. This amylase contained a signal peptide of 24 amino acids. The amino acid sequence of this cloned gene showed 96% homology to the α-amylase gene from the *Alteromonas haloplanctis* strain A23.

Ngày nhận bài: 27-2-2001