

## TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GIEN *xynA* MÃ HOÁ ENZYM XYLANASE A TỪ CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* CN2 Ở *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)

Dương Thị Lương Liên<sup>1, \*</sup>, Đào Văn Minh<sup>1</sup>, Takanori Furukawa<sup>2</sup>, Trần Liên Hà<sup>1</sup>,  
Wataru Ogasawara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>2</sup>Khoa Kỹ thuật sinh học, Đại học Công nghệ Nagaoka, Nhật Bản.

\*Email: [lien.duongluong@gmail.com](mailto:lien.duongluong@gmail.com)

Đến Tòa soạn: 15/3/2012; Chấp nhận đăng: 15/3/2013

### TÓM TẮT

*Bacillus subtilis* CN2 phân lập từ nước nắm của Việt Nam. Gen *xynA* từ genome của *Bacillus subtilis* CN2 được nhân lên sử dụng cặp mồi thiết kế trên cơ sở trình tự gen xylanase của các chủng *B. subtilis* trên Genbank. Gen *xynA* được tách dòng ở *E. coli* DH5a và biểu hiện ở *E. coli* BL21 với vector pET22b(+). Gen *xynA* gồm 639 bp và có độ tương đồng 96 % với gen *xynA* của chủng *Bacillus* sp. BP-7. Kết quả này cho thấy rằng gen *xynA* của *B. subtilis* CN2 có khả năng có đặc tính giống với *xynA* của chủng *Bacillus* sp. BP-7. Khi biểu hiện gen *xynA* ở *E. coli* BL21 (D3) với IPTG là chất cảm ứng thì xylanase tạo thành ở dạng kết tủa là do quá trình biểu hiện quá mạnh. Khi thay thế môi trường LB với chất cảm ứng là IPTG bằng môi trường TB với chất cảm ứng yếu hơn là  $\alpha$ - lactose thì lượng protein hòa tan tăng lên. Protein này có hoạt tính cao gấp 430 lần so với môi trường chứa chất cảm ứng là IPTG.

*Từ khóa:* tách dòng, biểu hiện, *xynA*, *Bacillus subtilis*, xylanase, *Escherichia coli*.

### 1. MỞ ĐẦU

Sinh khối thực vật có 3 thành phần chính, trong đó đứng thứ 2 là hemicellulose chiếm 23 đến 35 %. Trong hemicellulose, xylan là thành phần chủ yếu, cấu trúc được hình thành từ các

liên kết  $\beta$ -1,4-xylose. Xylanase  $\beta$ -1,4-xylanohydrolase [EC 3.2.1.8] là một enzym rất quan trọng phân cắt cơ chất xylan thành đường xylose (đường 5C). Không chỉ như vậy, xylanase còn có rất nhiều ứng dụng trong các ngành công nghiệp khác như thực phẩm, phụ gia cho thức ăn chăn nuôi, giấy và bột giấy [1], tách bã coffee, dầu thực vật, và tinh bột, ... [2]. Vì vậy xylanase đang được quan tâm rất nhiều. Nhiều bài báo công bố xylanase A đã được tách dòng, tinh sạch, và khảo sát đặc tính phân cắt từ rất nhiều chủng khác nhau bao gồm vi khuẩn, nấm men, và nấm mốc, ... [3, 4, 5]. *Bacillus subtilis* CN2 được phân lập từ nước mắm của Việt Nam [6], sau quá trình tuyển chọn cho thấy chủng này sinh xylanase cao. Hiện nay chưa có bất kỳ báo cáo nào nghiên cứu về xylanase từ các chủng sử dụng trong sản xuất nước mắm. Vì vậy trong bài báo này thông báo về kết quả tách dòng, giải trình tự và biểu hiện gen mã hoá enzym xylanase A ở *E. coli* BL21(DE3) với hy vọng tạo ra được chủng *E. coli* tái tổ hợp có thể lên men và thu được lượng lớn xylanase.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Chủng vi sinh vật và Plasmid

Chủng *B. subtilis* CN2 được phân lập từ nước mắm ở Việt Nam [6], chủng *Bacillus* f1BD và f1NH được phân lập từ gỗ mục, *B. subtilis* Natto phân lập từ sản phẩm lên men Natto (Nhật Bản). Các chủng này được nhận từ bộ sưu tập giống của bộ môn Vi sinh, Hoá sinh và Sinh học phân tử, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  và *E. coli* BL21(DE3) là vật chủ tương ứng sử dụng cho tách dòng và biểu hiện gen *xynA*.

Plasmid pET22b(+) (Novagen) có kích thước 5500 bp, được sử dụng làm vector tách, nhân dòng và biểu hiện gen.

### 2.2. Môi trường, kit và hoá chất

Môi trường Potato/Dextrose/Agar (PDA) thạch nghiêng được sử dụng để giữ giống trong ống thạch nghiêng ở 4 °C.

Môi trường dùng để tách dòng Luria-Bertani (LB) có bổ sung lượng kháng sinh ampicilin 100  $\mu$ g/ml.

Môi trường dùng để biểu hiện LB, Terrific Broth (TB) [7], chất cảm ứng dùng để biểu hiện gen sử dụng IPTG và  $\alpha$ - lactose, chất kháng sinh ampicilin nồng độ 100  $\mu$ g/ml.

Các hoá chất khác sử dụng cho tách dòng và biểu hiện của Sigma (Mỹ) và Nacalai Tesque, Kyoto, NEB, Takara (Nhật Bản),... Hoá chất sử dụng cho phản ứng PCR từ hãng Takara.

Các kit sử dụng: kit tách plasmid-Plasmid Midi kit (100), kit tách gel (QIAquick gel extraction), kit tách protein-Bug Buster (BB) (Invitrogen); ADN Ligation Mix, Mighty Mix (Takara), kit loại bỏ nhóm phosphate đầu 5' của vector - rAPid alkaline phosphatase (Roche Applied Science, USA).

Cơ chất Birchwood xylan (Sigma) với nồng độ 1% sử dụng cho thử hoạt tính.

### **2.3. Phương pháp liên quan đến tách dòng ADN**

Các quá trình tách dòng được thực hiện theo Sambrook và cộng sự [8].

#### **2.3.1. Tách ADN tổng số**

ADN tổng số của chủng *B. subtilis* CN2 được tách bằng phương pháp tách theo mô tả của Ausubel và cộng sự [9].

#### **2.3.2. Khuếch đại gen *xynA* từ *B. subtilis* CN2**

Cặp mồi được thiết kế dựa trên các trình tự gen *xynA* từ các chủng *Bacillus* trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen (Genbank) có kí hiệu sau: HM543164.1, AF027868.1, AJ536759.1, JF312742.1. Sử dụng phần mềm Clustaw2 trên trang web <http://www.ebi.ac.uk>. Chọn cặp mồi dựa vào trình tự gen *xynA* của chủng *B. subtilis* mang kí hiệu AF027868.1, gắn thêm trình tự nhận biết enzym giới hạn *MscI* và *XhoI* (phần gạch chân). Đoạn gen *xynA* được khuếch đại nhờ sử dụng trình tự cặp mồi như sau:

Mồi xuôi BXMscI: 5'-ACTGGCCAATGTTTAAGTTTAAAAAGAATTTCTTAGTT-3',

Mồi ngược BXXhoI: 5'-ATCTCGAGCCACACTGTTACGTTAGAACTTC-3'.

Hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm: 4 µl dNTPs 25 mM; 10 µl Primer STAR buffer (có MgCl<sub>2</sub>) 10X; 12 µl Betain 5 M; 1 µl mồi xuôi (BXMscI) 10 pM; 1 µl mồi ngược (BXXhoI) 10 pM; 0,5 µl Primer STAR ADN polymerase 2,5U/µl; 20,5µl H<sub>2</sub>O; khuôn ADN 1µl (<200 ng); tổng thể tích phản ứng là 50µl. Phản ứng PCR bắt đầu với 2 phút biến tính ở 98 °C, 30 chu kì (10giây ở 98 °C, 5 giây ở 55 °C, 50 giây ở 72 °C), bước kéo dài cuối cùng 5 phút ở 72 °C. Sản phẩm PCR sẽ được phân tích bằng điện di agarose gel 1%. Bảo quản sản phẩm PCR ở -20 °C.

#### **2.3.3. Biến nạp vector tái tổ hợp vào vật chủ**

20 µg sản phẩm PCR sau khi tinh sạch [8] được cắt đồng thời với cặp enzym giới hạn *MscI* (60U) và *XhoI* (60U), sau đó tinh sạch và kết tủa sản phẩm sau cắt. 20 µg plasmid pET22b(+) được thủy phân bởi 2 enzym giới hạn trên (37 °C, qua đêm), sau khi tinh sạch loại bỏ nhóm phosphate ở đầu 5' sử dụng kit rAPid Alkaline phosphatase (Roche. USA) [10] để hạn chế sự tự nối với chính nó khi thực hiện phản ứng gắn với sản phẩm PCR sau xử lí. Có thể sử dụng trực tiếp hỗn hợp phản ứng này cho bước gắn tiếp theo với sản phẩm PCR tỉ lệ phản ứng : sản phẩm PCR : plasmid ADN : hỗn hợp gắn = 4 : 1 : 5 tổng phản ứng là 10 µl thực hiện phản ứng ở 16 °C, qua đêm. Vector tái tổ hợp pET-xynA (hình 1c) được thiết kế chứa T7 promoter, đoạn trình tự kháng kháng sinh ampicilin, đoạn trình tự dẫn pelB, gen *xynA* và trình tự His-tag. Dùng phương pháp sock nhiệt (42 °C, 30 giây) để biến nạp vector tái tổ hợp vào vật chủ *E. coli* DH5α đã làm khả biến theo phương pháp Hiriaki Inoue và cộng sự [11]. Sau đó tế bào được cấy trên môi trường LB chứa 100 µg/ml ampicilin và nuôi ở 37 °C.

#### 2.3.4. Chọn lọc khuẩn lạc chứa gen *xynA*

Chọn ngẫu nhiên các khuẩn lạc đơn trên đĩa thạch để tách plasmid ADN (miniprep) [8]. Sau đó cắt plasmid tách được bằng cặp enzym giới hạn *MscI* và *XhoI*. Tiếp theo, mẫu được phân tích bằng điện di trên gel agarose 1 % để kiểm tra plasmid có chứa band có kích thước tương ứng với gen *xynA*.

#### 2.4. Giải trình tự đoạn gen *xynA*

Tách và tinh sạch plasmid chứa gen *xynA* bằng phương pháp PEG 4000 [8], giải trình tự bằng máy giải trình tự CEQ 2000 (Beckman Coulter). Trình tự chuỗi nu thu được phân tích bằng chương trình BLAST C 255+ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>

#### 2.5. Biểu hiện gen *xynA*

Biến nạp vector pET-xynA vào *E. coli* BL21 (DE3) (đã làm khả biến) theo phương pháp sock nhiệt. Tế bào sau biến nạp được cấy trên đĩa thạch chứa môi trường LB với hàm lượng ampicilin 100 µg/ml, nuôi qua đêm ở 37 °C. Sau đó, lấy một khuẩn lạc riêng rẽ *E. coli* BL21 (DE3) từ đĩa thạch nuôi lắc 180 rpm ở 37 °C trong môi trường LB lỏng chứa ampicilin 100 µg/ml đến khi OD<sub>600</sub> = 0,6 thì bổ sung 1 mM IPTG (nồng độ cuối). Lấy mẫu ở 0 giờ, 4 giờ, 8 giờ sau khi cảm ứng. Lựa chọn điều kiện nuôi cấy sinh enzym tái tổ hợp bằng cách thay đổi nhiệt độ sau cảm ứng 37 °C, 25 °C, 20 °C, 16 °C, thời gian nuôi và nồng độ chất cảm ứng 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, thay đổi môi trường và chất cảm ứng từ LB với IPTG thành TB với α-lactose.

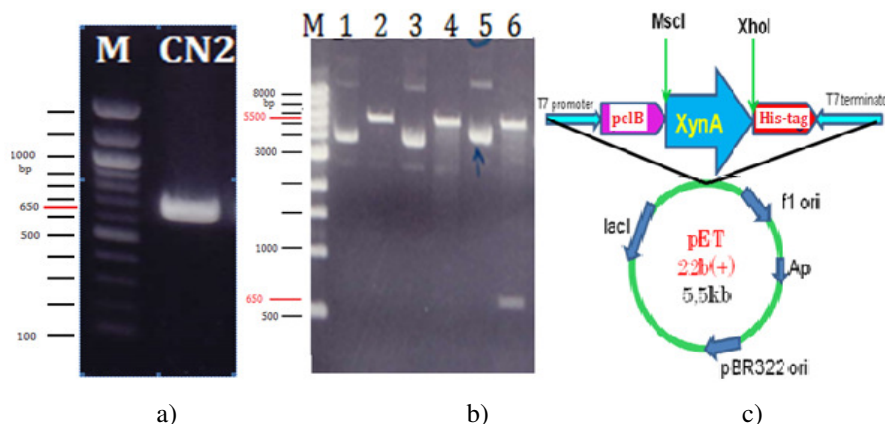
## 2.6. Phương pháp thử hoạt tính enzym

Kit BugBuster được sử dụng để tách protein tổng số từ tủa sinh khối tế bào, các bước thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất [12]: tỉ lệ bổ sung 100 µl BB ứng với pellet của 1 ml canh trường sau khi li tâm 6000 rpm, đảo trộn thật đều hỗn hợp trên, để 20 phút ở nhiệt độ phòng, tiếp theo li tâm 15000 rpm, lấy phần dịch lỏng bên trên (enzym thô) để thử hoạt tính hoặc giữ ở -20 °C làm các thí nghiệm tiếp theo. Hoạt tính enzym xylanase được xác định bằng phương pháp đường khử theo Nelson-Somogyi [13, 14]. Một đơn vị hoạt độ của xylanase được xác định bằng lượng enzym giải phóng ra được 1 µmol đường khử trong 1 phút. Sử dụng xylose làm đường khử chuẩn. Điều kiện phản ứng ở 50 °C, 30 phút, sử dụng cơ chất Birchwood xylan (Sigma) hoà trong đệm sodium phosphate 200 mM, pH 6,0 theo Perrin và cộng sự [15].

Đo vòng thủy phân xylanase A từ chủng tái tổ hợp trên môi trường đặc LB chứa 1 % xylan, 2 % agar bằng cách nhỏ dịch enzym thô, sau đó ủ ở 55 °C trong 3 giờ, sau đó kiểm tra vòng phân giải bằng congo đỏ.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tách dòng



Hình 1. Điện di đồ khuếch đại sản phẩm PCR, chọn lọc plasmid chứa gen *xynA* và cấu trúc vector tái tổ hợp pET-*xynA*

- Sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gen *xynA* từ *B. subtilis* CN2. Giếng M marker 100 bp, CN2 sản phẩm PCR của gen *xynA* ứng vạch 650 bp.
- Chọn lọc khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp pET-*xynA*. M marker 1000 bp, giếng 1, 3, 5 là plasmid sau khi tách, giếng 2, 4, 6 là sau khi xử lý với enzym giới hạn *MscI* và *XhoI* tương ứng.
- Cấu trúc vector tái tổ hợp pET-*xynA*.

Sử dụng cặp mồi *BXMscI* và *BXXhoI* đã thiết kế, khuếch đại được đoạn gen mã hoá xylanase A với khuôn là ADN tổng số tách từ *B. subtilis* CN2. Sản phẩm PCR thu được trên hình 1a kích thước khoảng 650 bp chỉ có một band duy nhất, không bị nhòe.

Sau khi gắn sản phẩm PCR với vector pET22b(+), biến nạp vector tái tổ hợp vào *E. coli* DH5 $\alpha$ , nuôi trên môi trường chứa kháng sinh ampicillin. ADN plasmid được thủy phân với 2 enzym giới hạn *MscI* và *XhoI*, sau đó chạy kiểm tra bằng điện di gel. Từ hình 1b ta thấy giếng số 6 có 2 băng, 1 băng tương ứng với kích thước plasmid pET22b(+) 5500 bp, băng khác có kích thước khoảng 650 bp tương ứng với kích thước gen *xynA*. Plasmid ở giếng 5 chứa gen *xynA*, được phân lập từ khuẩn lạc chứa vector này là khuẩn lạc nhân dòng gen *xynA*. Trong 40 khuẩn lạc ngẫu nhiên được tách plasmid thu được 13 khuẩn lạc có chứa plasmid ADN tái tổ hợp mang gen *xynA* tương ứng với 13 dòng gen.

### 3.2. Giải trình tự

Kết quả giải trình tự thu được toàn bộ chuỗi nucleotid của đoạn chèn trong pET22b(+) khung đọc mở 639 nucleotid (không có trình tự bộ ba kết thúc TAA) mã hoá 213 acid amin khối lượng tương ứng 23,4 kDa. Thêm bộ ba kết thúc và sau khi phân tích trình tự gen *xynA*, có 96 % độ tương đồng cao nhất với trình tự gen của chủng *Bacillus* sp. BP-7 [16] số công bố AJ536759.1 khi so sánh gen *xynA* dựa trên cơ sở dữ liệu chuỗi nucleotid đã công bố trong DDBJ/EMBL/GENBank, với 618 nu tương đồng trên tổng số 642 nu.

```
TGGCCAATGT   TTAAGTTTAA   AAAGAAT TTC   TTAGTTGGAT   TAACGGCAGC
TTTAATGAGT   ATCAGCATGT   TTTCGGCAAC   CGCCTCTGCA   GCTGGCACAG   ATTACTGGCA
AAATTGGACT   GATGGGGGCG   GAACAGTAAA   CGCAGTCAAT   GGATCTGGCG   GGAATTACAG
TGTGAATTGG   TCTAATACCG   GAAATTTCTG   TGTGGTAAA   GGCTGGACTA   CAGGCTCGCC
ATTTAGAACA   ATAAACTATA   ATGCCGGAGT   TTGGGCGCCG   AATGGCAATG   GATATTTGAC
TTTATATGGT   TGGACGAGAG   CACCTCTCAT   TGAATATTAT   GTAGTGGATT   CATGGGGTAC
TTATAGACCT   ACTGGAACGT   ATAAAGGTAC   GGTTTACAGT   GATGGGGGTA   CATATGACGT
GTACACAACT   ACACGTTATG   ATGCACCTTC   CATTGATGGC   GATAAAACTA   CTTTTACGCA
GTACTGGAGT   GTTCGCCAGT   CGAAGAGACC   AACTGGAAGC   AACGCTACAA   TCACTTTCAG
CAATCACGTT   AACGCATGGA   AGAGATATGG   GATGAATCTG   GGCAGTAATT   GGTCTTACCA
AGTCTTAGCG   ACAGAGGGAT   ATAAAAGTAG   TGGAAGTTCT   AACGTAACAG
TGTGGCTCGAG
```

Hình 2. Trình tự gen *xynA* của *B. subtilis* CN2.

Với trình tự 6 nu đầu và nu cuối (phần in nghiêng) tương ứng là trình tự nhận biết của enzym giới hạn *MscI* và *XhoI*. Trình tự mở đầu ATG mã hoá methionin.

Cùng với trình tự acid amin của gen *xynA*:

```
   10   20   30   40   50   60   70   80   90  100  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....  
MFKFKKNFLVGLTAALMSISMFSATASAAAGTDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWNTGNFVVGKGTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWT  
   110  120  130  140  150  160  170  180  190  200  
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....  
RAPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVYSDDGGTYDVTTRYDAPSIDGDKTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKRYGMNLGSNWSYQVLATE  
    210  
.....|.....|.....  
GYKSSGSSNVTVW*
```

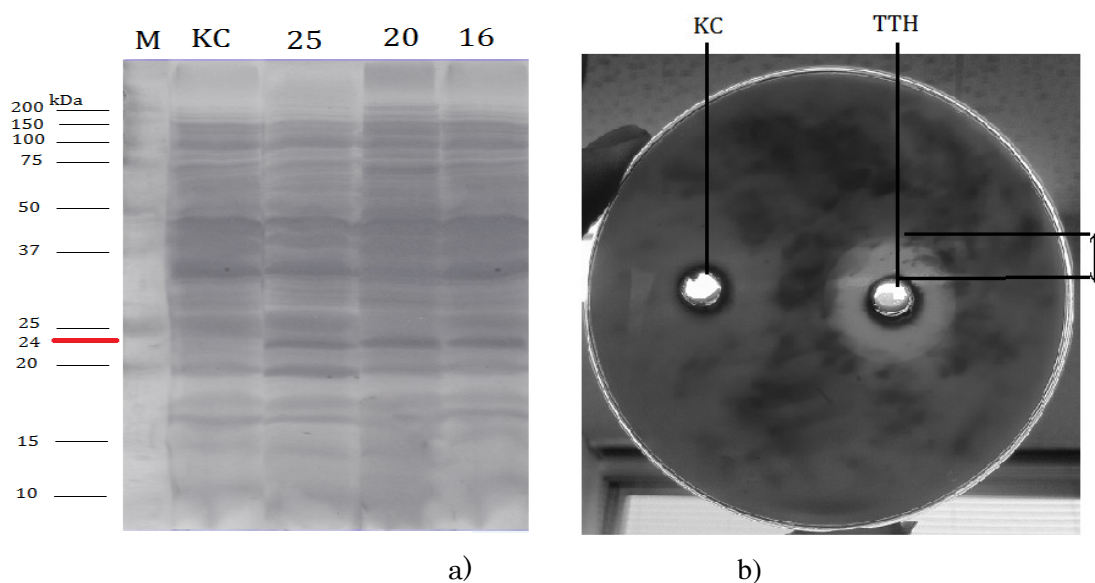
Hình 3. Trình tự acid amin của gen *xynA* từ *B. subtilis* CN2.

Dựa trên trình tự chuỗi acid amin và phân tích nhóm kỵ nước, xylanase được chia thành 2 nhóm lớn là nhóm 10 và nhóm 11 [17, 18], có nhiều gen từ *Bacillus* tạo ra nhiều xylanase khác nhau, có rất nhiều trong số đó đã được tách dòng và khảo sát đặc tính thủy phân [6, 19]. Họ 11 có khối lượng phân tử thấp hơn (< 30 kDa) và hoạt độ riêng cao hơn họ 10 [20] và đặc hiệu chỉ với cơ chất là xylan. Từ trình tự chuỗi acid amin, chương trình Blast thể hiện protein thuộc họ 11 dựa vào cấu trúc domain của protein và khối lượng phân tử 23,418 kDa. Bên cạnh đó xylanase từ *Bacillus* sp. BP-7 với khối lượng phân tử thấp 23,4 kDa, pI 9,0 nhiệt độ tối ưu 55 °C, độ bền nhiệt trong khoảng 65 °C, pH tối ưu đạt được ở 6,0, pH bền là 8,0 đến 9,0 [16]. Từ kết quả phân tích và tính chất xylanase từ *Bacillus* sp. BP-7 ta có thể đoán được một số đặc điểm của *B. subtilis* CN2.

### 3.3. Biểu hiện gen *xynA* từ *B. subtilis* CN2

Sau khi biến nạp plasmid pET-*xynA* vào *E. coli* BL21 (DE3) trong môi trường LB chứa chất cảm ứng IPTG, nuôi ở các nhiệt độ, thời gian và nồng độ IPTG khác nhau. Tuy nhiên protein tái tổ hợp chủ yếu tạo ra dưới dạng không tan và lượng protein tạo ra hầu như không thay đổi (dữ liệu không thể hiện). Kết quả cho thấy quá trình biểu hiện quá mạnh, vì T7 là promoter của virus nên nó biểu hiện rất mạnh và rất nhạy cảm với chất cảm ứng. Hơn nữa khi bổ sung IPTG, chất này không phải nguồn dinh dưỡng cho vật chủ mà nó chỉ có tác dụng cảm ứng biểu hiện gen, vì vậy ngay cả lượng IPTG rất nhỏ (0,1 mM) cũng không thể cải thiện lượng protein hoà tan được tạo thành. Nên môi trường biểu hiện thay bằng TB và chất cảm ứng là  $\alpha$ -lactose. Chất cảm ứng này là nguồn dinh dưỡng (đường) mà vật chủ có khả năng đồng hoá, do đó lượng  $\alpha$ -lactose còn sót lại trong tế bào vật chủ sẽ rất ít. Điều này khiến lượng chất cảm ứng

trong tế bào giảm đáng kể nên làm giảm mức độ biểu hiện gen, khiến cho protein tạo ra ở dạng tan. Ở nhiệt độ 37 °C cũng khiến mức độ biểu hiện mạnh, protein tạo ra thường ở dưới dạng không tan, ở thể vùi. Nên với chất cảm ứng  $\alpha$ -lactose, xylanase tái tổ hợp được biểu hiện ở nhiệt độ thấp hơn như 25 °C, 20 °C và 16 °C.



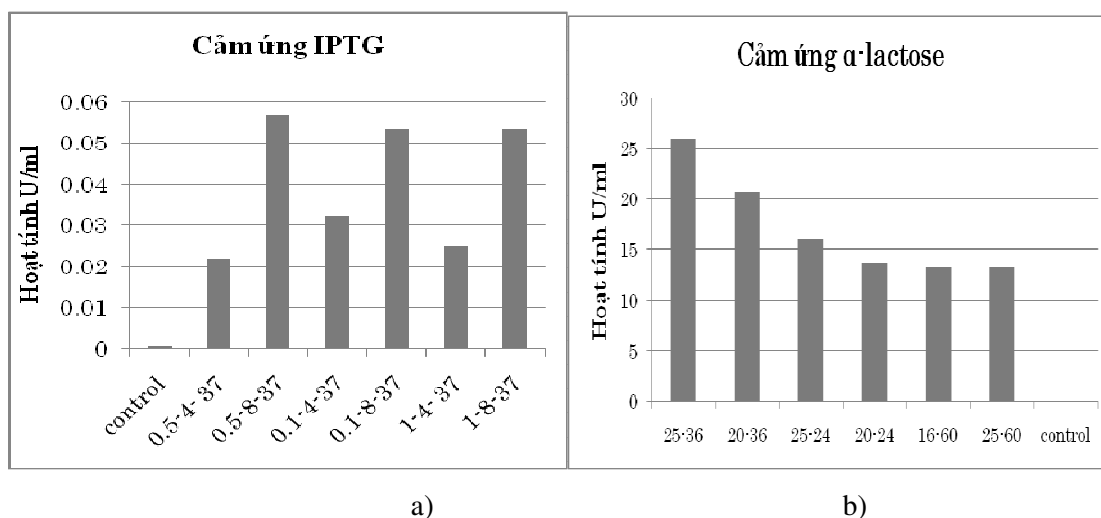
Hình 4. Biểu hiện gen *xynA* từ chủng *B. subtilis* CN2 ở *E. coli* BL21 (DE3) trong môi trường TB chứa  $\alpha$ -lactose.

- Điện di đồ xylanase tái tổ hợp được tạo ra trong khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau. Trong đó giếng M là marker, KC: kiểm chứng; 25, 20, 16 là protein được biểu hiện ở nhiệt độ tương ứng là 25 °C, 20 °C và 16 °C sau 36 giờ nuôi, tốc độ lắc 250 rpm.
- Hoạt tính xylanase tái tổ hợp xác định bằng phương pháp đục lỗ thạch. Trong đó KC: mẫu kiểm chứng; TTH: xylanase tái tổ hợp.

Kết quả điện di (hình 4a) cho thấy, so với mẫu kiểm chứng KC là dịch enzyme thô được tách từ *E. coli* BL21(DE3) chứa pET22b(+), thì các giếng 25, 20, 16 chứa dịch enzyme thô được tách từ *E. coli* BL21(DE3) chứa vector tái tổ hợp pET-*xynA* có thêm một vạch rất rõ khoảng 24 kDa, đúng với kích thước theo lý thuyết của protein được dịch mã từ gen *xynA* của chủng *B. subtilis* CN2.

Kết quả ở hình 4b cho thấy vòng thủy phân rất rõ ứng với chủng *E. coli* mang gen tái tổ hợp. Từ kết quả này có thể kết luận đã biểu hiện thành công đoạn gen mã hoá enzyme xylanase A của chủng *B. subtilis* CN2. Hoạt tính của xylanase A tái tổ hợp dùng cảm ứng IPTG và  $\alpha$ -lactose trong đồ thị sau:





Hình 5. Hoạt tính xylanase tái tổ hợp biểu hiện với chất cảm ứng IPTG và  $\alpha$ -lactose:

- a) Cảm ứng với IPTG kí hiệu 0,5-4-37: môi trường LB, 0,5 mM IPTG, sau 4 giờ cảm ứng, 37 °C  
 b) Cảm ứng với  $\alpha$ - lactose 25-36: môi trường TB, 25 °C, thu enzym sau 36 giờ nuôi cấy.

Từ đồ thị hình 5 cho thấy khi cảm ứng với IPTG hoạt tính xylanase rất thấp, có giá trị cao nhất ở nồng độ IPTG 0,5 mM, cảm ứng sau 8 giờ ở 37 °C chỉ 0,06 U/ml. Trong khi đó cảm ứng với  $\alpha$ -lactose lại cho hoạt tính cao hơn 430 lần ở 25 °C, sau 36 h nuôi cấy (26 U/ml). Từ kết quả này cho ta thấy với những vector sử dụng T7 promoter hoặc những promoter tương tự, ở nhiệt độ 37 °C, protein biểu hiện quá mạnh khiến những protein tạo ra chủ yếu ở thể vùi và không có hoạt tính. Do lượng protein tạo ra quá nhiều có thể gây độc cho tế bào vật chủ vì vậy quá trình biến đổi cấu trúc của protein từ cấu trúc bậc thấp đến cấu trúc bậc 3 hoặc bậc 4 sẽ bị hạn chế. Một nguyên nhân nữa khiến sự biểu hiện không thành công là do T7 là promoter của virus nên nó cực kì nhạy cảm với chất cảm ứng. Vì vậy, để biểu hiện thành công, ngoài cách thay đổi nồng độ IPTG và giảm nhiệt độ thông thường; theo Trond Erick [21] trong vector biểu hiện đã được thiết kế chứa đoạn trình tự *pelB* để dẫn protein sau khi được tạo ra vào periplasmid, đây là môi trường thuận lợi cho quá trình hình thành cầu disulfide và biến đổi cấu trúc. Một điểm khác biệt trong nghiên cứu này là sự thay đổi chất cảm ứng từ IPTG sang chất cảm ứng yếu hơn là  $\alpha$ -lactose trong môi trường TB trong quá trình biểu hiện đã làm tăng đáng kể lượng protein tan được tạo ra.

**Lời cảm ơn.** Công trình này được hỗ trợ và giúp đỡ từ chương trình GENESYS (quỹ JICA, từ chính phủ Nhật Bản) năm 2010-2011, phòng thí nghiệm của giáo sư Ogasawara Wataru, Khoa Kỹ thuật sinh học, Trường Đại học Công nghệ Nagaoka và phòng thí nghiệm bộ môn Vi sinh, Hoá sinh và Sinh học phân tử, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm Trường Đại học Bách khoa Hà Nội.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Beg Q. K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S. - Microbial xylanases and their industrial application: A review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** (2001) 326-338.
2. Wong K. K. Y., Saddler J. N. - Trichoderma xylanases, their properties and purification, *Crit. Rev. Biotechnol.* **12** (1992) 413-435.
3. Huang J., Wang G., Xiao L. - Cloning, sequencing, and expression of xylanase gene from a *Bacillus subtilis* strain B10 in *Escherichia coli*, *Bioresour. Technol.* **97** (2006) 802-808.
4. Petrescu I., Brassuer J. L., Chessa J. P., Ntarima P., Claeysens M., Devreese B., Marino G., Gerday C. -Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*, *Extremophiles* **4** (2000) 137-144.
5. Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., Amorim D. S. - Xylanases from fungi: properties and industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67** (2005) 577-591.
6. Tran L. H. & Nagano H. - Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production, *Journal of food science* **67** (2002) 1184-1187.
7. Tartoff K. D., and Hobbs C. A. - Improved media for growing plasmid and cosmid clones, *Bethesda research laboratories focus* **9** (1987) 12-14.
8. Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. - *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y, 2003.
9. Ausubel F. M., Bren R., Kingtons R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. - *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, New York, 1994.
10. Manual of rAPid Alkaline Phosphatase from Roche Applied Science [https://e-labdoc.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/04898133001\\_en\\_02.pdf](https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04898133001_en_02.pdf).
11. Hiriaki Inoue, Hiroshi Nojima, Hiroto Okayama. - High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* **96** (1990) 23- 28.
12. Protocol for kit BugBuster protein extraction reagent (Novagen) [https://e-labdoc.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/04898133001\\_en\\_02.pdf](https://e-labdoc.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04898133001_en_02.pdf).
13. Nelson N. -A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose, *Journal of Biological Chemistry* **153** (May, 1944) 375–380.
14. Somogyi M. - Notes on sugar determination, *Journal of Biological Chemistry* **70** (3)

- (1926) 599–612.
15. Perrin D. D., Boyd Dempsey, Chapman & Hall, Book: Buffers for pH and Metal Ion Control, New York, 1983.
  16. Óscar Gallardo, Pilar Diaz, Javier Pastor F. I. - Cloning and characterization of xylanase A from the strain *Bacillus* sp. BP-7: comparison with Alkaline pI- low molecular weight xylanases of Family 11, *Current Microbiology* **48** (2004) 267-279.
  17. Gilkes N. R., Henrissat B., Kilburn D. G., Miller RC. Jr, Warren RA. J. - Domain in microbial  $\beta$ -1,4- glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families, *Microbial. Rev.* **55** (1991) 303-315.
  18. Henrissat B., Bairoch A. -Updating the sequence - based classification of glycosyl hydrolases, *Biochem. J.* **316** (1996) 695-696.
  19. Gupta N., Reddy V. S., Maiti S., Ghosh A. - Cloning, expression and sequence analysis of gene encoding the alkali - stable, thermostable endoxylanase from alkalophilic, mesophilic *Bacillus* sp. strain NG-27, *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (2000) 2631-2635.
  20. Biely P., Vrsanská M., Tenkanen M., Kluepfel D. - Endo-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties, *J. Biotechnol.* **57** (1997) 151-166.
  21. Trond Erik vee Aune. - High level recombinant protein production in *Escherichia coli* by engineering broad-host-range plasmid vectors containing the Pm/xylS expression cassette. Thesis for the degree philosophiae doctor, Trondheim (March, 2008) 3-28.

## ABSTRACT

### CLONING AND EXPRESSION XYLANASE A CODING *xynA* GENE FROM *BACILLUS SUBTILIS* CN2 IN *ESCHERICHIA COLI* (DE3)

Duong Thi Luong Lien<sup>1,\*</sup>, Dao Van Minh<sup>1</sup>, Takanori Furukawa<sup>2</sup>, Tran Lien Ha<sup>1</sup>,  
Wataru Ogasawara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*School of Biotechnology - Food Technology, Hanoi University of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology*

\*Email: [lien.duongluong@gmail.com](mailto:lien.duongluong@gmail.com)

A fragment of of *xynA* gene from chromosome DNA of *B. subtilis* CN2 found in Vietnamese fish source was amplified using primer designed base on sequence of *B. subtilis* xylanase gene given in GenBank. Using pET22b(+) (Novagen) for cloning *xynA* gene in *E. coli* DH5 $\alpha$ , sequencing and Expression *xynA* gene into *E. coli* BL21 (DE3). Sequenced an open reading frame with 639 bp, analysed sequene of *xynA* gene of *B. subtilis* CN2, it has 96% max identity with *xynA* gene of *Bacillus* sp. BP-7. From this result can be suggested that the recombinant xylanase has properties the same xylanase coding *xynA* gene from *Bacillus* sp. BP-7. When *xynA* gene was expressed in *E. coli* BL21(DE3) using IPTG as an inducer, xylanase were almost produced insoluble protein form and expression process was overexpress. When medium IPTG containing LB was replaced by TB contain  $\alpha$ -lactose, a weaker inducer, the amount of soluble protein produced in the recombinant *E. coli* BL21(DE3) was larger. This protein has relative activity as 430 fold than its relative activity when recombinant *E. coli* BL21(DE3) was induced by IPTG.

*Keywords:* cloning, expression, *xynA*, *Bacillus subtilis*, xylanase, *Escherichia coli*.