

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA CHO ENZYME ACETYLCHOLINESTERASE TRONG HỆ BIỂU HIỆN *E.coli*

Nghiêm Ngọc Hoa¹, Đặng Thị Quỳnh¹, Phạm Thị Thu Hường²,
Nguyễn Thị Vân Anh², Tô Văn Thiệp¹, Nguyễn Văn Hoàng¹, Phạm Kiên Cường^{1*}.

Tóm tắt: *Acetylcholinesterase (AChE)* là một enzyme quan trọng tham gia vào hệ thống dẫn truyền tín hiệu thần kinh, có mặt rộng rãi ở hầu hết các loài động vật. Chức năng chính của *AChE* là giới hạn tác dụng truyền đạt xung thần kinh tại vị trí các khớp thần kinh. Điều này được thực hiện nhờ quá trình thủy phân *Acetylcholine* dưới sự xúc tác của *AChE*, tạo thành *Choline (ChOH)* và *axit axetic*. Ứng dụng quan trọng của *AChE* là dùng để sản xuất ra các phương tiện phát hiện nhanh thuốc trừ sâu bảo vệ thực vật họ phospho hữu cơ trong môi trường, nông sản, rau quả. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho *acetylcholinesterase* đã được nhân bản bằng PCR và nhân dòng vào vector *pTOP-TA-V2* để tạo ra vector nhân dòng *pTOP-AChE*. Tiếp theo, gen mã hóa enzyme *AChE* từ vector *pTOP-AChE* được chuyển vào vector biểu hiện *pET43a*, để tạo ra vector biểu hiện *pET43a-AChE*. Vector này được biến nạp vào chủng *E.coli DH5a* tạo nên dạng tái tổ hợp *DH5a-pET43a-AchE*. Sự biểu hiện của gen mã hóa enzyme *AchE* đã được kiểm tra bằng phương pháp điện di và thâm tích miễn dịch.

Từ khóa: *Acetylcholinesterase*, Biểu hiện, Tái tổ hợp.

1. MỞ ĐẦU

Acetylcholinesterase là một enzyme quan trọng tham gia vào hệ thống dẫn truyền tín hiệu thần kinh, có mặt rộng rãi ở hầu hết các loài động vật [10, 11, 13]. Chức năng chính của enzyme *acetylcholinesterase* là giới hạn tác dụng truyền đạt xung thần kinh tại vị trí các khớp thần kinh [11]. Một trong những ứng dụng quan trọng của enzyme *acetylcholinesterase* là dùng để sản xuất ra các phương tiện phát hiện nhanh nhóm chất độc thần kinh, thuốc trừ sâu bảo vệ thực vật họ phospho hữu cơ [7]. Do có nhiều ứng dụng trong đời sống, trên thế giới, *AChE* được nghiên cứu tách chiết từ rất sớm. Để đạt được độ tinh sạch và hoạt độ phù hợp cho các mục đích khác nhau, các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu tinh sạch enzyme *AChE* từ các nguồn khác nhau [3-6]. Tuy nhiên việc tách chiết enzyme *acetylcholinesterase* bằng các quy trình khác nhau đều có những hạn chế nhất định về hiệu suất, hoạt độ riêng. Một số nhược điểm như độ ổn định thấp, phụ thuộc nhiều vào nguồn nguyên liệu, nên khó sản xuất với quy mô lớn. Do đó, các nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu biểu hiện enzyme *acetylcholinesterase* dưới dạng tái tổ hợp nhằm thu nhận được một lượng lớn dùng cho mục đích phân tích hoặc trị liệu cũng như nghiên cứu [8, 12, 14].

Ở Việt Nam, chưa có nhiều công trình nghiên cứu sản xuất enzym *eacetylcholinesterase* tái tổ hợp. Một số công trình nghiên cứu chủ yếu tập trung vào việc tách chiết enzyme này từ các nguồn tự nhiên (thực vật, động vật và vi sinh vật), khảo sát các tính chất lý-hóa và hoạt tính sinh học của chúng [1, 2]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nhân dòng gen mã hóa cho enzyme *AChE* vào vector *pET43a* và biểu hiện ở *E. coli*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Chủng *E. coli* DH5 α , BL21 (DE3) RIL được mua từ hãng Invitrogen.

Hỗn hợp dNTP, thang chuẩn DNA được mua từ hãng Thermofisher; Taq DNA polymerase, enzyme giới hạn được mua từ hãng Enzymomics, T4 DNA ligase của hãng Promega, bộ kit tinh sạch plasmid của hãng Bioneer và kit đọc trình tự của hãng Beckman Coulter.

Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh sạch dành cho phân tích và được mua từ các hãng tin cậy (Sigma, Merk...).

2.2. Thiết bị

Máy PCR (Bio – Rad, Singapore), máy điện di (Cleaver - Anh), hệ thống phân tích hình ảnh (Biorad – Italia), máy đo quang phổ Halo RB (RB – 10), máy ly tâm lạnh (Sigma – Đức), tủ ẩm (Memer – Đức), máy đo pH (Mettle toledo), máy lắc (Big bill, Mỹ).

2.3. Phương pháp, kĩ thuật nghiên cứu

2.3.1. Xác định hàm lượng protein

Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp đo mật độ quang ở bước sóng $\lambda=280$ nm và theo phương pháp của Lowry và cộng sự [9] với tinh thể albumin huyết thanh bò làm đường chuẩn.

2.3.2. Xác định hoạt độ Acetylcholinesterase

Hoạt tính của Acetylcholinesterase được xác định theo Kit của Biovision. Một đơn vị hoạt tính được xác định là lượng enzyme cần thiết để thủy phân 1 μ mol cơ chất ACh trong 1 phút ở 37 $^{\circ}$ C với chất chỉ thị màu AChE probe, đo ở bước sóng $\lambda=570$ nm.

2.3.3. Nhân dòng đoạn gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase

Gen mã hóa cho enzyme acetylcholinesterase được nhân bản trực tiếp bằng phương pháp PCR. Đoạn mỗi được sử dụng trong phản ứng PCR này có chứa trình tự nhận biết của enzyme *EcoRI* (AChE-Fw:5'-TGGACCGAATTCATGAGGCCCGTGGTGTC-3') và enzyme *XhoI* (AChE-Rv:5'-GTGGTGCTCGAGTCACAGGTCTGAGCAGCGATCC-3')

PCR chứa 1xTaq polymerase buffer, 2 mM MgCl $_2$, 0,2 mM dNTPs, và 2,5 đơn vị Taq polymerase với tổng thể tích cuối là 25 μ l. Quá trình nhân bản được tiến hành bởi máy GeneAmp PCR System 9700 với 1 vòng ở 95 $^{\circ}$ C trong 5 phút để khởi động nóng, tiếp theo là 35 chu kỳ gồm 30 giây ở 95 $^{\circ}$ C, 45 giây ở 60 $^{\circ}$ C, và 2 phút ở 72 $^{\circ}$ C, tiếp theo là kéo dài ở 72 $^{\circ}$ C trong 7 phút và bảo quản ở 4 $^{\circ}$ C cho đến khi sử dụng.

Sản phẩm PCR sau khi được tạo thành được gắn vào vector pTOP-TA-V2 nhờ kit ligase (kit TOP clonerTMTA core), và được biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Các khuẩn lạc dương tính mang vector nhân dòng được phát hiện bằng phương pháp PCR sử dụng trực tiếp khuẩn lạc làm nguồn cho DNA khuôn với cặp mỗi đặc hiệu cho đoạn gen AChE (AChE Fw, AChE Rv). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Trình tự nucleotide được xác định theo phương pháp Sanger trên máy đọc trình tự CEQ 8000 (Beckman Coulter).

2.3.4. Biểu hiện gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase ở E. coli

Plasmid tái tổ hợp pTOP mang gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase và vector pET43a được tinh sạch theo kit Qiagen, cùng được xử lý bằng enzyme giới hạn *XhoI* và *EcoRI*, sản phẩm cắt sau khi điện di kiểm tra, được tinh sạch nhằm thu

được AChE và vector pET43a. Phản ứng gắn được thực hiện ở 4⁰C, qua đêm, sử dụng T4 DNA ligase (Promega). Vector tái tổ hợp mang gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase ký hiệu là pET43a-AChE được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21 (DE3) RIL và được nuôi cấy trong môi trường Luria Bertani (LB) có chứa ampicillin 50 µg/ml, chloramphenicol 34 µg/ml. Sinh tổng hợp enzyme acetylcholinesterase được cảm ứng bằng IPTG 1mM.

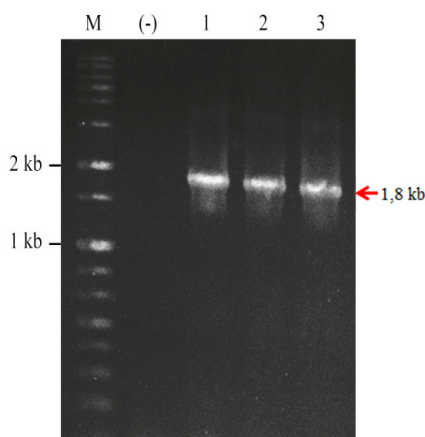
2.3.5. Thu dịch chiết tế bào và kiểm tra sự biểu hiện của enzyme acetylcholinesterase ở *E. coli*

Sinh khối tế bào thu nhận bằng ly tâm từ 100 ml dịch nuôi cấy và được hòa trong 1 ml đệm Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 có chứa NaCl 200 mM, PMSF 1mM, Triton X-100 0,1%, Imidazol 5 mM, DTT 1 mM (đệm A), huyền dịch được làm lạnh trên đá và cho siêu âm 3 chu kỳ, mỗi chu kỳ 30 giây để phá vỡ các tế bào. Hỗn hợp sau đó được ly tâm ở 14.000 vòng/phút, 4⁰C trong 20 phút để thu dịch chiết tế bào. Sự có mặt của enzyme acetylcholinesterase được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide có SDS (SDS-PAGE).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Nhân bản đoạn gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase

Đoạn gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase được nhân bản bằng PCR với cặp mồi AChE-Fw, AChE-Rvsử dụng plasmid pGEMT-AChE làm khuôn. Kết quả thu được (Hình 1) cho thấy sự có mặt băng DNA nhân bản kích thước khoảng 1,8kb, tương ứng với kích thước của đoạn gen AChE (đường chạy 1,2,3), Trong khi đó, mẫu đối chứng âm thì không có băng DNA nhân bản nào chứng tỏ chúng tôi đã nhân bản thành công đoạn gen mã hóa cho enzyme acetylcholinesterase với cặp mồi AChE-Fw, AChE-Rv.



Hình 1. Nhân dòng gen AChE vào plasmid pTOP TA-V2.

A) Điện di sản phẩm PCR nhân bản gen *AchE* trên gel agarose 1%

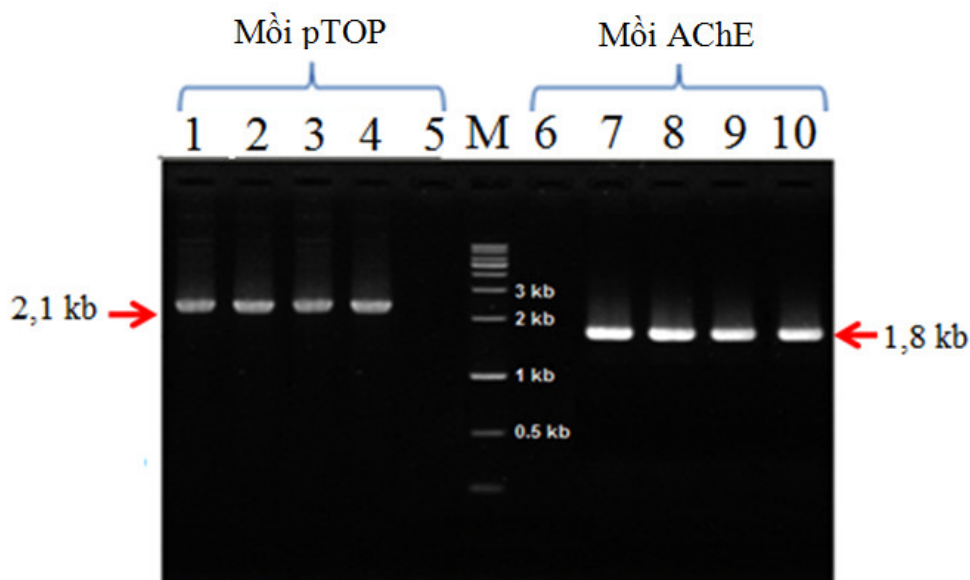
M: Thang chuẩn DNA 1kb; (-) Sản phẩm PCR từ đối chứng âm (không có DNA); 1,2,3: Sản phẩm PCR sử dụng pGEMT-AChE làm khuôn

3.2. Nhân dòng gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase vào vector pTOP

Sản phẩm PCR đoạn gen *AChE* (1,8kb) được gắn trực tiếp vào vector nhân dòng pTOP, biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5α và các tế bào biến nạp được

nuôi cấy trên môi trường LB chứa ampicillin 50 µg/ml. Tiếp theo, chúng tôi đã chọn ngẫu nhiên 4 khuẩn lạc để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen nhân dòng bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi pTOP Fw/Rv được thiết kế đặc hiệu cho vector pTOP. Theo tính toán lý thuyết, nếu vector có mang đoạn gen *AChE* thì sản phẩm PCR thu được sẽ có kích thước khoảng 2,1kb, bao gồm kích thước của đoạn gen *AChE* khoảng 1,8 kb cộng với kích thước đoạn DNA nằm giữa 2 mồi trên vector pTOP là 0,3 kb.

Kết quả điện di trên gel agarose 1% sản phẩm PCR sử dụng DNA từ 4 khuẩn lạc trắng làm khuôn cho thấy các sản phẩm PCR từ khuẩn lạc trắng đều cho băng DNA có kích thước khoảng 2,1 kb (các đường chạy 1-4). Khi PCR với cặp mồi đặc hiệu *AChE* Fw/Rv (hình 2) cho thấy, sản phẩm PCR từ khuẩn lạc trắng cho băng DNA kích thước khoảng 1,8 kb tương đương với kích thước gen mã hóa enzyme *AChE* (đường chạy 7-10). Như vậy, chúng tôi đã thu được các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp vector pTOP có chứa đoạn gen nhân bản có kích thước khoảng 1,8 kb đặc hiệu cho *AChE*. Vì vậy, có thể kết luận đã nhân dòng thành công đoạn gen mã hóa *AChE* vào vector pTOP.



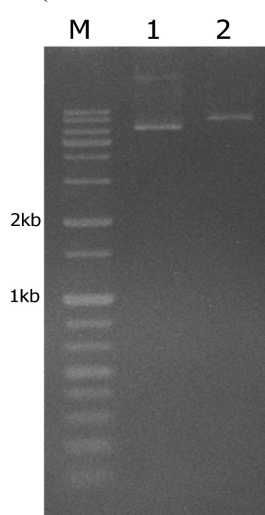
Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc kiểm tra vector pTOP-*AChE*.

- M: Thang chuẩn DNA 1kb
- 1- 4: Khuẩn lạc PCR với Mồi pTOP Fw/Rv
- 5,6: Đối chứng âm
- 7- 10: Khuẩn lạc PCR với Mồi *AChE* Fw/Rv

3.3. Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa enzyme acetylcholinesterase trong pET43a

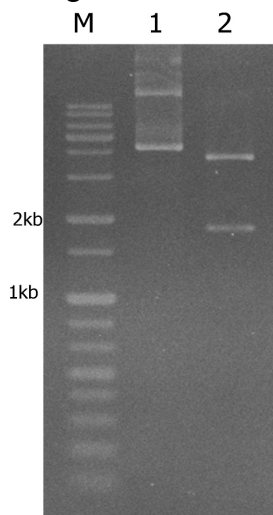
Để thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa *AChE*, vector pET43a được sử dụng. Xử lý vector pTOP-*AChE* và vector pET43a bằng *XhoI* và *EcoRI*, sản phẩm cắt sau khi điện di kiểm tra (hình 3, 4) được tinh sạch nhằm thu được *AChE* và vector pET43a. Sản phẩm tinh sạch được đem đi ligase bằng T4 ligase, để 4°C qua đêm. Sau đó, sản phẩm ligase được đem đi biến nạp vào *E. coli* DH5α chọn lọc các

khuẩn lạc trên môi trường chứa Ampicillin 50 µg/ml. Plasmid từ khuẩn lạc được tách ra và kiểm tra sự có mặt của gen mã hóa AChE bằng PCR với 2 cặp mồi T7 promoter và T7 terminator của vector pET43a và cặp mồi AChE Fw/Rv. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu được ở hình 5 cho thấy, khi sử dụng cặp mồi T7 của vector pET43a, sản phẩm PCR cho băng DNA có kích thước khoảng 2,1 kb (bằng kích thước 1,8 kb của đoạn gen mã hóa AChE cộng với đoạn 300 bp của vector), còn khi sử dụng cặp mồi AChE Fw/Rv cho băng DNA có kích thước khoảng 1,8 kb (kích thước của riêng đoạn gen mã hóa cho AChE).



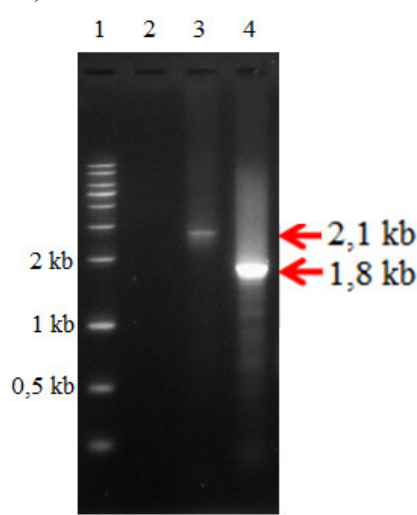
Hình 3. Ảnh điện di sản phẩm cắt plasmid pET43a với enzyme giới hạn *EcoRI* và *XhoI*.

M: 1 kb DNA marker; **1:** plasmid pET43a nguyên bản; **2:** plasmid pET43a cắt với enzyme giới hạn *EcoRI* và *XhoI*.



Hình 4. Ảnh điện di sản phẩm cắt plasmid pTOP – AChE với enzyme giới hạn *EcoRI* và *XhoI*.

M: 1kb DNA marker; **1:** plasmid pTOP-AChE nguyên bản; **2:** plasmid pTOP-AChE cắt với enzyme giới hạn *EcoRI* và *XhoI*.

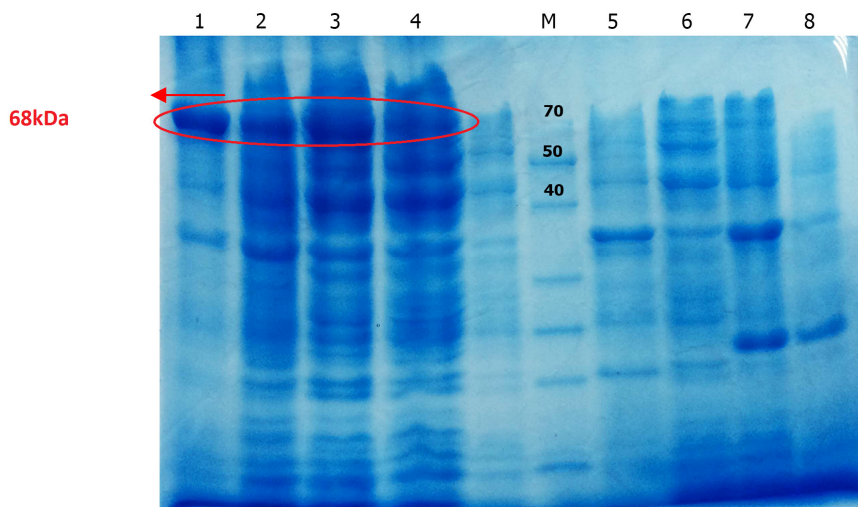


Hình 5. Kết quả PCR kiểm tra plasmid pET43a-AChE.

1: Thang chuẩn DNA 1kb; **2:** Đối chứng âm; **3:** Plasmid pET43a-AChE kiểm tra với mồi T7 Fw/Rv; **4:** Plasmid pET43a-AChE kiểm tra với mồi AChE Fw/Rv.

Kết quả này chứng tỏ đã gắn thành công đoạn gen mã hóa AChE vào pET43a và plasmid tái tổ hợp này được ký hiệu là pET43a-AChE.

Chúng tôi cũng đã tiến hành đọc trình tự để khẳng định việc gắn đoạn gen mã hóa cho AChE vào vector là đúng vị trí và khung đọc. Để biểu hiện gen mã cho AChE, vector pET43a-AChE được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21 RIL và cấy trải trên môi trường LB có chứa Ampicillin 50 µg/ml và chloramphenicol 34 µg/ml. Nhằm kiểm tra khả năng biểu hiện AChE bằng vector pET 43a ở *E. coli*, dịch chiết sinh khối tế bào đã được điện di trên gel polyacrylamide 12% có chứa SDS kết quả thu được như hình 6.



Hình 6. Điện di gel polyacrylamide có SDS kiểm tra sự biểu hiện của AChE ở *E. coli* BL21 DE3.

M: Thang chuẩn protein;

1,2,3,4: dịch chiết tổng số tế bào *E. coli* BL21 DE3 mang vector pET43a - AChE; 5,6,7,8: dịch chiết tổng số tế bào *E. coli* không mang vector pET43a - AChE.

Kết quả SDS-PAGE cho thấy dịch chiết tổng số tế bào *E. coli* BL21 DE3 mang vector pET43a - AChE xuất hiện băng protein với khối lượng phân tử khoảng 68kDa tương ứng với kích thước AChE tái tổ hợp tính toán lý thuyết, trong khi đó dịch chiết tổng số tế bào *E. coli* không mang vector pET43a - AChE không xuất hiện băng protein có kích thước khoảng 68kDa. Do đó, chúng tôi bước đầu khẳng định vi khuẩn *E. coli* BL21 DE3 đã biểu hiện được enzyme AChE tái tổ hợp.

Kết quả xác định hoạt tính protein AChE tái tổ hợp thu được trong dịch chiết protein tổng số có hoạt độ riêng (U/mgpr) là 6,94.

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nhân dòng gen AChE vào hệ thống vector biểu hiện pET43a và chuyển thành công vào hệ thống sinh vật biểu hiện *E. coli* BL21 DE3. AChE tái tổ hợp có kích thước khoảng 68 kDa có hoạt độ là 6,94 U/mgprotein.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học công nghệ cấp Viện Khoa học và Công nghệ quân sự với tên gọi "Nghiên cứu ứng dụng công nghệ tái tổ hợp ADN trong sản xuất enzyme acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) phục vụ mục đích phân tích phát hiện chất độc cơ phốt pho".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Lê Minh Trí. (2005), "Nghiên cứu khai thác và ứng dụng enzyme acetylcholinesterase chẩn đoán chất độc phospho hữu cơ", Luận văn thạc sỹ khoa học, Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.

- [2]. Lê Minh Trí. (2010), “*Nghiên cứu tinh sạch, tính chất đặc trưng và ứng dụng của acetylcholinesterase từ ốc bươu vàng*”, Luận án tiến sĩ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội.
- [3]. Aliriz S., Turkoglu V. (2003), “*Purification and characterization of acetylcholinesterase from the Lake Van fish*” (*Chalcalburnus tarichii* Pallas, 1811), *Prep Biochem Biotechnol*, Vol. 33(2), pp. 137-45.
- [4]. Askar K.A., Kudi A.C. & Moody A.J. (2011), “*Purification of soluble acetylcholinesterase from sheep liver by affinity chromatography*”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 165, pp. 336–346.
- [5]. Assis C.R., Castro P.F., Amaral I.P., Carvalho E.V., Carvalho L.B., Bezerra R.S. (2010), “*Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui (Colossoma macropomum) and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides*”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 29(10), pp. 2243-8.
- [6]. Augustinsson K.B. (1948), “*Cholinesterases, a study in comparative enzymology*”, *Acta Physiologica Scandinavica*, Vol. 15(Suppl 52), pp. 1–182.
- [7]. Harel M., Kryger G., Rosenberry T.L., Mallender W.D., Lewis T., Fletcher R.J., Guss J.M., Silman I., Sussman J.L. (2000), “*Three-dimensional structures of Drosophila melanogaster acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors*”, *Protein Sci.* 2000 Jun; 9(6): 1063–1072.
- [8]. Jingquan L. Q., Jun Y., Songjie W., Fangfang Zh., Songci X., Junyang L., Joelle K. S., Wei Zh., Hui W. (2013), “*Surface Display of Recombinant Drosophila melanogaster Acetylcholinesterase for Detection of Organic Phosphorus and Carbamate Pesticides*”, *PLoS ONE* 8(9): e72986. doi:10.1371/journal.pone.0072986.
- [9]. Lowry H.O., Rosebrough J.N., Farr A.L., Randall R.J. (1951), “*Protein measurement with the folin phenol reagent*”. Department of Pharmacology, Washington University School of Medicine.
- [10]. Paulus J.M., Maigne J., and Keyhani E. (1981), “*Mouse megakaryocytes secrete acetylcholinesterase*”, *Blood*, Vol. 58, pp. 1100–1106.
- [11]. Taylor P. (1991), “*The cholinesterase*”. *J Biol Chem.* 1991 Mar 5;266(7): 4025–4028.
- [12]. Vincenzo T., Marta G., Martine A., Elvio G., Rita R., Gabriella R. (1999), “*Molecular Cloning and Expression of a Full-Length cDNA Encoding Acetylcholinesterase in Optic Lobes of the Squid Loligo opalescens*”. Department of Experimental Medicine, Division of Molecular and Cell Biology, University of Perugia, Perugia, Italy; and Differentiation Cellulaire et Croissance, INRA, Montpellier, France.
- [13]. Zajicek J. (1957), “*Studies on the histogenesis of blood platelets and megakaryocytes*”, *Acta physiologica Scandinavica*, Vol. 40, pp. 1–32.
- [14]. Zhifan Y., Jun Ch., Yonggin Ch., Sijing J. (2010), “*Molecular cloning and characterization of an Acetylcholinesterase cDNA in the Brown Planthopper, Nilaparvata lugens*”. *J Insect Sci.* 2010; 10: 102.

ABSTRACT

EXPRESSION OF A GENE ENCODING
ACETYLCHOLINESTERASE ENZYME IN *E.coli*

*Acetylcholinesterase (AChE) is an important enzyme, involved in the neurotransmitter system, which is widespread in most animals. The main function of AChE is to limit the effect of transmitting neural impulses at the synapse site. This is accomplished by the hydrolysis of acetylcholine under the catalysis of AChE, forming choline and acetic acid. The important use of AChE is to produce vehicles for the rapid detection of organophosphorus insecticides in the environment, agricultural products, and vegetables. In this study, the gene encoding for acetylcholinesterase was cloned by PCR and cloned into the pTOP-TA-V2 vector to generate pTOP-AChE lineage vector. Next, the AChE gene from the pTOP-AChE vector was transposed into the expression vector pET43a, to generate the pET43a-AChE expression vector. This vector is transformed into the *E. coli* DH5a strain that forms the recombinant DH5a-pET43a-AChE. The expression of the gene encoding enzyme AChE has been tested by electrophoresis and Western blotting analysis.*

Keywords: Acetylcholinesterase, Expression, Recombinant.

Nhận bài ngày 13 tháng 9 năm 2017

Hoàn thiện ngày 08 tháng 3 năm 2018

Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 4 năm 2018

Địa chỉ: ¹Viện Công nghệ môi trường/Viện Khoa học và Công nghệ Quân sự;

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên/Đại học Quốc gia Hà Nội.

*Email: phamkiencuong83@gmail.com.