

K

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
Trung tâm Công nghệ Sinh học
144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI

**“NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ SẢN XUẤT
PROTEIN TÁI TỔ HỢP, PROTEIN BẤT HOẠT RIBOXOM CÓ
GIÁ TRỊ SỬ DỤNG TRONG Y DƯỢC VÀ NÔNG NGHIỆP”**

CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI : **GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu**

Hà nội, tháng 10 năm 2004
Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện Đề tài cấp Nhà nước,
mã số KC-04-14

54A4 - 1

1317105

CÁC ĐỀ TÀI NHÁNH

- 14.1. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp ức chế proteinaz (RePPI)*

Chủ trì: GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu

Trung tâm Công nghệ Sinh học,

Đại học Quốc gia Hà Nội

- 14.2. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp ức chế α -amilaz (Re α -AI)*

Chủ trì: PGS. TS. Đặng Thị Thu

Bộ môn Công nghệ thực phẩm – Công nghệ sau thu hoạch,

Viện Công nghệ Sinh học – Công nghệ Thực phẩm,

Đại học Bách khoa Hà nội

- 14.3. *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein bất hoạt riboxom*

Chủ trì: PGS. TS. Nông Văn Hải

Viện Công nghệ Sinh học,

Viện Khoa học và Công nghệ Quốc gia

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN

Đề tài nhánh	Họ tên	Cơ quan
14.1	GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu	TTCNSH-ĐHQGHN
	TS. M.K. Reddy	Khối (Division) Sinh học phân tử thực vật, Trung tâm Quốc tế Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ sinh học, Ấn độ.
	TS. Võ Thương Lan	Khoa Sinh học, ĐHKHTN-ĐHQGHN
	PGS.TS. Trịnh Hồng Thái	“
	TS. Dương Văn Hợp	TTCNSH-ĐHQGHN
	Ths. Phan Thị Hà	Phòng CN Enzim-Protein. TTCNSH-ĐHQGHN
	CN. Đào Thị Thuý	“
	CN. Hoàng Thu Hà	“
	CN. Nguyễn Quỳnh Uyển	“
	CN. Đặng Xuân Nghiêm	“
	CN. Nguyễn Phương Nam	“
	KS. Nguyễn Phương Thảo	“
	KS. Mai Kiều Linh	“
14.2	PGS.TS. Đặng Thị Thu	Bộ môn CNTP-CN sau thu hoạch, ĐHBKHN
	TS. Nguyễn Xuân Sâm	Viện CNSH-CNTP
	TS. Tô Kim Anh	Bộ môn CNTP-CN sau thu hoạch, ĐHBKHN
	TS. Lê Quang Hoà	“
	CN. Trương Quốc Phong	“
14.3	PGS. TS. Nông Văn Hải	Viện CNSH, Viện KHCN Quốc gia
	PGS. TS. Phan Văn Chi	“
	TS. Lê Thị Thu Hiền	“
	TS. Trần Thị Phương Liên	“
	Ths. Nguyễn Huy Hoàng	“
	Ths. Nguyễn Đăng Tôn	“
	CN. Nguyễn Đình Cường	“
	CN. Đặng Thành Nam	“
	CN. Nguyễn Thuý Dương	“
	CN. Phạm Thu Thuý	“

MỤC LỤC

Các đề tài nhánh	1
Danh sách những người thực hiện	2
Mục lục	3
Lời mở đầu	4
Chương 1. Thông tin chung về đề tài	6
Chương 2. Các sản phẩm của đề tài	9
2.1 Vật liệu.....	9
2.2 Quy trình	43
2.3 Các công trình khoa học đã công bố.....	65
2.4 Bảng thống kê kết quả đối chiếu với nội dung đã đăng ký của sản phẩm tạo ra.....	68
Chương 3. Kết luận.....	77

LỜI MỞ ĐẦU

Nhiều nghiên cứu của nước ngoài cũng như các nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy các protein ức chế proteinaz (PPI), protein ức chế α -amilaz (α -AI) cũng như protein bất hoạt riboxom (RIP) tách từ thực vật có tiềm năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược. Mặc dù đã tìm được các nguồn thực vật giàu các chất này và cũng đã sử dụng chúng làm nguyên liệu để sản xuất các chất đã nêu nhưng trong thực tế cũng có những khó khăn: chu kỳ sống của thực vật dài, việc khai thác phụ thuộc vào mùa vụ, hàm lượng không ổn định v.v... Vì vậy bên cạnh việc khai thác nguồn nguyên liệu tự nhiên cần tiến hành nghiên cứu sản xuất protein bằng con đường tái tổ hợp nhằm khắc phục được các điểm yếu đã nêu.

Các protein kìm hãm proteinaz (PPI) là những protein làm giảm thuận nghịch hoạt độ của các proteaz. Proteaz tham gia vào nhiều quá trình sống quan trọng như hoạt hoá proenzim, prohoocmon, đông máu, thụ tinh, viêm, nhiễm, biến thái, quá trình tấn công của nấm mốc, vi khuẩn, virus (kể cả HIV) vào vật chủ v.v... Vì vậy PPI không chỉ điều hoà quá trình phân giải protein nội sinh mà còn có thể góp phần bảo vệ cơ thể, giới hạn tác dụng của các yếu tố gây bệnh, kìm hãm quá trình sinh trưởng phát triển của côn trùng v.v...

Các chất kìm hãm α -amilaz (α -AI) đã được nghiên cứu trong nhiều phòng thí nghiệm từ năm 1945. Khối lượng phân tử α -AI từ 14-18 kD. α -AI có nhiều trong không bào của cây đậu *P. vulgaris*. α -AI có tác dụng kìm hãm α -amilaz nên đã làm giảm tác hại của côn trùng, sâu mọt, bọ cánh cứng phá hoại lương thực trong quá trình bảo quản hoặc có thể sử dụng để điều trị các bệnh do hoạt độ amilaz tăng cao quá mức bình thường. Vì vậy, chúng có tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực bảo vệ thực vật trước và sau thu hoạch, cũng như trong một số lĩnh vực y học.

Các protein bất hoạt riboxom (RIP) của thực vật là một nhóm protein có hoạt tính N - glicozidaz có khả năng nhận biết và cắt gốc adenin đặc hiệu trên tiểu phần ARNr lớn, do đó phá hủy riboxom và ngăn cản quá trình sinh tổng hợp protein. RIP được tìm thấy đầu tiên ở thực vật, chủ yếu ở thực vật hạt kín (cả thực vật một và hai lá mầm). Đồng thời, RIP cũng đã được phát hiện ở nấm *Volvariella volvacea* và *Lyophyllum shimeij*, tảo *Laminaria japonica*. Một số RIP có thể sử dụng làm thuốc ra thai, thuốc chống HIV.

chống ung thư. RIP còn đóng vai trò trong hệ thống bảo vệ của thực vật bởi hoạt tính kháng nấm, vi khuẩn, virus. Ngoài ra, RIP không những tác động lên ribosom của động vật có vú mà còn tác động lên ribosom của các côn trùng, thực vật, nấm men và vi khuẩn.

Các kết quả nghiên cứu trước đây của chúng tôi đã phát hiện được một vài PPI, α -AI và RIP có khả năng sử dụng trong nông nghiệp và y dược. Cụ thể là: MCoTI-II (PPI từ hạt gấc – *Momordica cochinchinensis*), CMTI-V (PPI của hạt bí đỏ – *Cucurbita maxima*), α -AI từ đậu cove (*Phaseolus vulgaris*), RIP của hạt mướp đắng (*Momordica charantia*). Tuy nhiên do những hạn chế trong việc khai thác nguồn nguyên liệu tự nhiên (mùa vụ, chất lượng...) nên chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại thiết lập và hoàn thiện một số qui trình sản xuất một số vi khuẩn tái tổ hợp mang các gen quy định các protein nói trên.

Để đạt được mục tiêu này chúng tôi đã tiến hành tổng hợp hoặc phân lập các gen mã hoá cho các protein đích: MCoTI-II của hạt gấc, CMTI-V của hạt bí đỏ, α -AI của đậu cove, RIP của mướp đắng; thiết kế các vectơ mang các gen này và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* để tạo các vi khuẩn tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp các protein đích; nghiên cứu các điều kiện thích hợp để nuôi cấy các vi khuẩn tái tổ hợp; xây dựng qui trình tách và tinh sạch các protein tái tổ hợp để tiến hành ứng dụng thử.

Mặt khác, đối với các protein có khả năng diệt côn trùng, tiến hành thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng.

CHƯƠNG 1. THÔNG TIN CHUNG VỀ ĐỀ TÀI

1. Tên đề tài: *Nghiên cứu công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp, protein bất hoạt riboxom có giá trị sử dụng trong y dược và nông nghiệp*
2. Mã số: **KC-04-14**
3. Thời gian thực hiện : 36 tháng (Từ tháng 10/2001 đến tháng 10/2004)
4. Cấp quản lý: Nhà nước
5. Kinh phí: Tổng số = 2.200.000.000 VND
Trong đó, từ Ngân sách SNKH: 2.100.000.000
6. Thuộc Chương trình: “Nghiên cứu Khoa học và Phát triển Công nghệ Sinh học”
7. Chủ nhiệm đề tài:

Họ và tên: **Phạm Thị Trân Châu**

Học hàm/học vị: Giáo sư, Tiến sĩ Khoa học

Điện thoại: 7.680.638 (CQ)/ 8.543.905 (NR)

E-mail: chauptt@vnu.edu.vn; pttranchau@yahoo.com

Địa chỉ cơ quan: Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội
144 Đường Xuân Thuỷ, Cầu giấy, Hà nội

Địa chỉ nhà riêng: Số 17, ngõ Bạch Liên (ngõ 126), đường Khuất Duy Tiến,
Nhân chính, Thanh Xuân, Hà nội.

8. Cơ quan chủ trì đề tài:

Tên tổ chức KH&CN: Trung tâm Công nghệ Sinh học,
Đại học Quốc gia Hà nội

Điện thoại: 7.680.907 Fax: 7.680.907

E-mail: biotechttk@hn.vnn.vn

Địa chỉ: Nhà E2-144 Đường Xuân Thuỷ, Cầu Giấy, Hà nội

9. Mục tiêu của đề tài:

Thiết lập và hoàn thiện một số qui trình sản xuất một số protein tái tổ hợp có khả năng ứng dụng lớn trong nông nghiệp và y dược.

10. Nội dung nghiên cứu đã đăng ký

*** Phân lập và đọc trình tự nucleotit của các gen TI, α AI, RIP:**

- Thu thập mẫu cây có chứa gen mã hoá TI, RIP (các cây họ bầu bí như: *Cucurbita maxima*, *Momordica cochinchinensis*...) và α -AI (một số loại đậu cô ve: *Phaseolus vulgaris*).

- Tách chiết và tinh sạch ADN từ các mẫu thực vật trên.
- Thiết kế trình tự các cặp môi thích hợp của các gen TI, α -AI, RIP.
- Phân lập các gen TI, α -AI, RIP mong muốn.
- Kiểm tra các gen phân lập được bằng cách dùng enzym giới hạn để cắt và đọc trình tự nucleotit của gen.

*** Thiết kế các vectơ biểu hiện gen TI, α -AI, RIP trong *E. coli* hoặc nấm men:**

- Chọn các vectơ thích hợp.
- Biến nạp gen vào *E. coli* hoặc nấm men
- Xác định sự biểu hiện gen tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* hoặc nấm men.

*** Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy vi khuẩn mang gen protein tái tổ hợp:**

- Lựa chọn điều kiện nuôi cấy (môi trường, nhiệt độ, pH...).
- Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy thu sản phẩm.

*** Thăm dò điều kiện tách và tinh sạch protein tái tổ hợp:**

- Thăm dò điều kiện tách protein tái tổ hợp từ *E.coli* hoặc nấm men đã được biểu hiện gen.
- Tinh sạch protein tái tổ hợp qua các bước sắc ký: lọc gel, trao đổi ion, ái lực,...
Chọn điều kiện và xây dựng quy trình tinh sạch thích hợp ít nhất 3 protein tái tổ hợp TI, α -AI, RIP
- Đánh giá độ tinh sạch của sản phẩm protein tái tổ hợp thu được bằng phương pháp điện di phát hiện trực tiếp các băng TI, α -AI, RIP trên gel poliacrilamit, điện di protein.
- Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp thu được.

*** Thử nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm:**

- Thử tác dụng của các chế phẩm protein tái tổ hợp (TI, α -AI, RIP) trừ các loại sâu rau (sâu xanh, sâu tơ, sâu khoang...) và các loại côn trùng có hại khác. Đánh giá hiệu quả trừ sâu của chế phẩm này.
- Thử tác dụng kháng khuẩn của TI và RIP.
- Thử tác dụng của TI ức chế một số yếu tố đông máu có vai trò trong điều trị bệnh thrombosis.
- Thăm dò các ứng dụng khác trong y học.

*** Thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng**

- Có các chủng *Agrobacterium* thích hợp để chuyển gen vào cây trồng.

*** Tình hình sử dụng kinh phí**

TT	Nội dung chi	Tổng vốn đầu tư (triệu đồng)
1- 114	Thuê khoán chuyên môn	680,0
2- 119	Nguyên vật liệu, hoá chất, dụng cụ, tài liệu	907,5
3- 109	Điện nước, xăng dầu	120,5
4- 145	Thiết bị	100,0
5- 117	Xây dựng, sửa chữa nhỏ	35,0
6- 113	Công tác phí	21,6
7- 134	Quản lý cơ sở	30,0
8- 112	Nghiệm thu, hội nghị, hội thảo	27,0
9- 110	Văn phòng phẩm	13,0
10- 111	Phim ảnh, thông tin liên lạc	15,4
11- 116	Đoàn vào	30,0
12- 115	Đoàn ra	120,0
		Tổng 2.100

CHƯƠNG 2. CÁC SẢN PHẨM CỦA ĐỀ TÀI

2.1. VẬT LIỆU

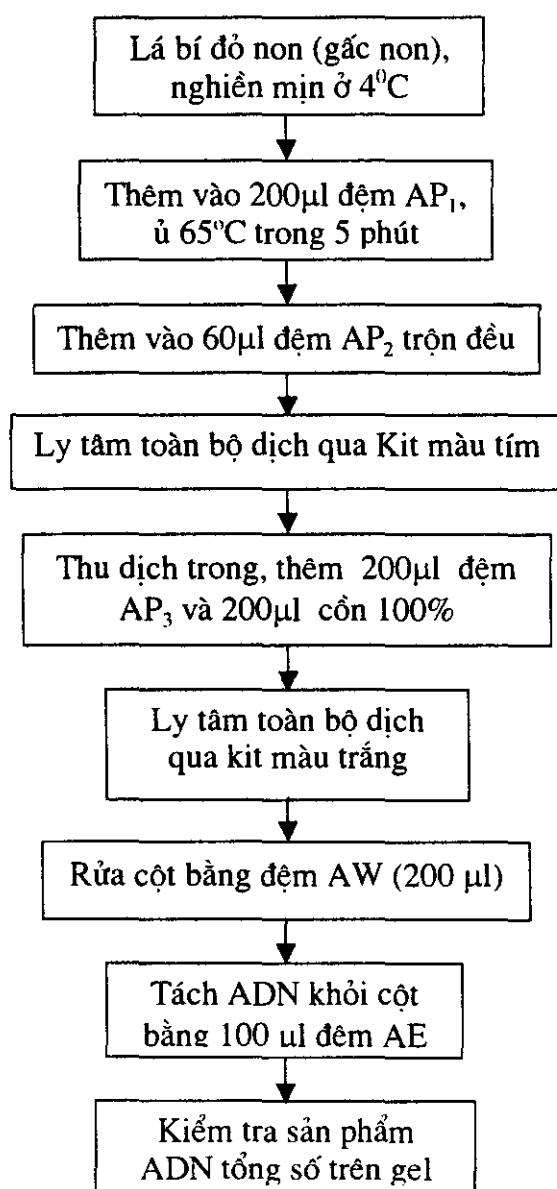
2.1.1. Bốn gen tái tổ hợp có hoạt lực ổn định: gen mã hoá MCoTI-II, CMTI-V, α -AI, RIP

2.1.1.1. Tách ADN tổng số

♣ *Tách ADN tổng số của gấc và bí đỏ*

Đã tiến hành tách ADN tổng số của bí đỏ, của gấc theo phương pháp Qiagen Kit (sơ đồ 1) và phương pháp được mô tả bởi Eija Pehu và cộng sự (sơ đồ 2).

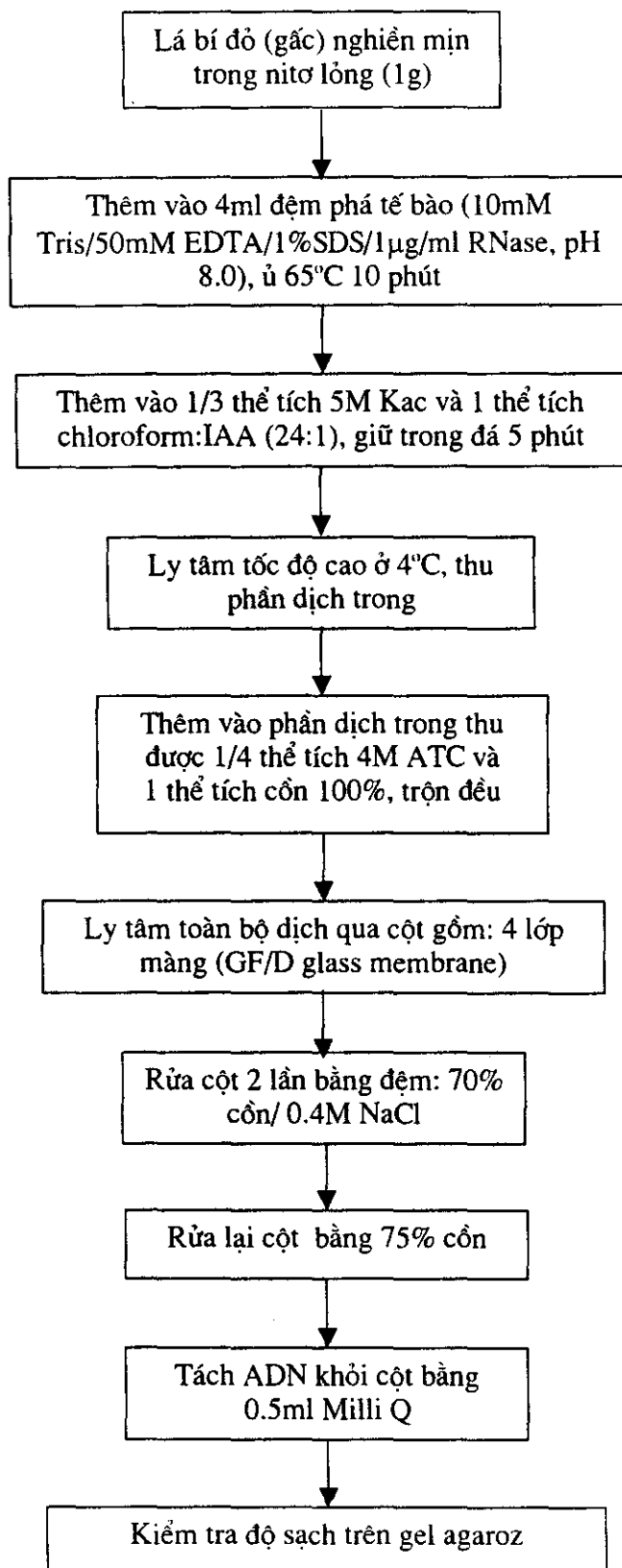
Sơ đồ 1: Phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Qiagen Kit



** Các bước cụ thể của phương pháp tách ADN tổng số của gấc (bí đỏ) theo Qiagen Kit:*

1. 100mg lá gấc, hoặc lá bí đỏ non rửa sạch bằng nước cất, thấm khô (không làm dập nát lá). Cho vào ống eppendorf 1,5ml sạch đã khử trùng, nghiền mịn bằng chày nhựa chuyên dụng đã khử trùng (như máy nghiền), ống phải được giữ trong nước đá hoặc nhúng trong nitơ lỏng.
2. Sau khi nghiền mịn lá, cho vào ống eppendorf 400 μ l đệm AP₁ (10mM tris/50mM EDTA/1%SDS/1 μ g/ml RNase, pH 8,0), ủ ở 65°C trong 10 phút, lắc nhẹ ống eppendorf 2 lần.
3. Lấy tube ra giữ trong đá, cho vào 130 μ l đệm AP₂ (5M Kac: Kalium acetat), trộn nhẹ ống (không dùng pipet), giữ trong đá 5 phút.
4. Cho toàn bộ hỗn dịch trên qua Kit màu tím, ly tâm 2 phút, tốc độ 16.000 vòng/phút.
5. Thu toàn bộ dịch trong qua Kit, thêm vào dịch trong thu được 0,5 thể tích đệm AP₃ (4M GITC: Guanidin thiocyanat) và 1 thể tích cồn tuyệt đối, trộn nhẹ bằng pipet.
6. Cho toàn bộ dịch trên qua Kit màu trắng, ly tâm 1 phút ở 6000 vòng/phút.
7. Rửa Kit màu trắng 2 lần, mỗi lần bằng 500 μ l đệm AW (70% cồn/0,4M NaCl). Rửa tiếp một lần bằng 500 μ l cồn 75%.
8. Tách ADN khỏi Kit bằng 100 μ l đệm AE (1mM EDTA, 10mM Tris).
9. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của ADN trên gel agaroz 0,8%, bằng máy quang phổ với bước sóng 260nm/280nm.

Sơ đồ 2: Phương pháp tách ADN tổng số của gốc (bí đỏ) theo Eija Pehu và cộng sự



* *Các bước cụ thể của phương pháp tách ADN tổng số của gốc (bí đỏ) theo Eija Pehu:*

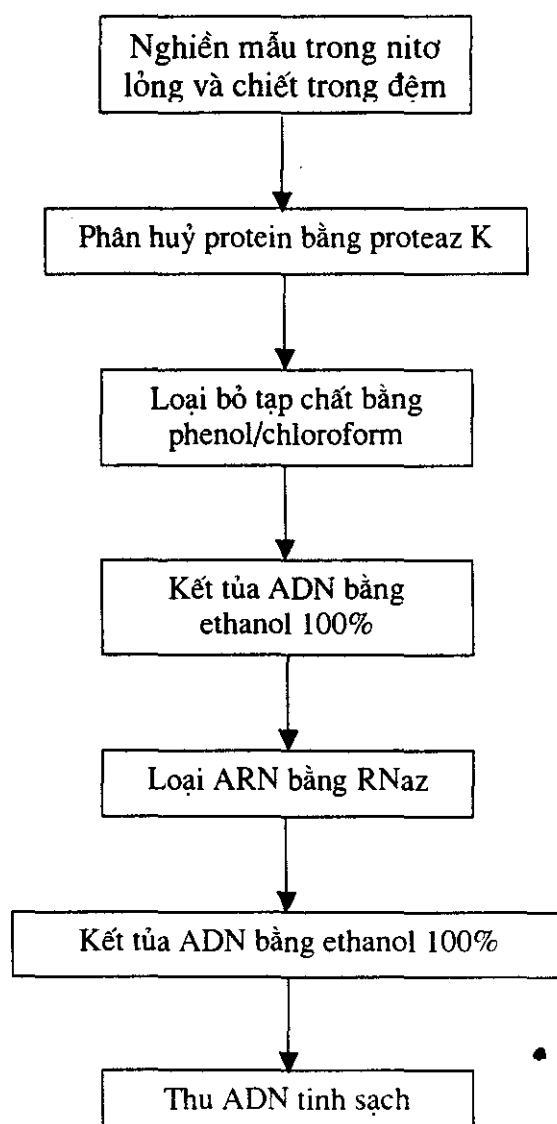
1. 1g lá gốc, hoặc lá bí đỏ non rửa sạch bằng nước cất, thấm khô (không làm dập nát lá). Cho vào cối sứ sạch, nghiền mịn trong nitor lỏng bằng chày sứ chuyên dụng. dùng thìa inox nhúng trong nitor lỏng để cho bột lá đã nghiền mịn vào ống Falcol 50ml sạch, đã khử trùng, chịu được các dung môi hữu cơ (làm thật nhanh khi nitor còn đủ lạnh tránh để bột lá bị chảy nước).
2. Cho vào ống 4ml đệm phá tế bào (10mM tris/50mM EDTA/1%SDS/1 μ g/ml RNase, pH 8,0), ủ ở 65°C trong 10 phút, lắc nhẹ ống 2 lần.
3. Lấy ống ra, giữ trong đá, thêm vào 1/3 thể tích 5M Kac (Kalium acetat) và 1 thể tích chloroform : IAA (isoamyl alcohol) (24:1) (hai đệm này đã đạt khoảng 4°C), trộn nhẹ ống (không dùng pipet), giữ trong đá 5 phút.
4. Ly tâm 20.000 vòng/phút ở 4°C, trong 20 phút, thu phần dịch trong phía trên.
5. Thêm vào phần dịch trong thu được 1/4 thể tích 4M đệm ATC (Amonium thiocyanat) và 1 thể tích cồn 100%, trộn đều bằng pipet.
6. Dùng xilanh 5ml đã bỏ pít tông, làm cột. Lót dưới đáy xilanh 1 lớp giấy lọc, để 4 lớp màng GF/D glass membrane và trên cùng là 1 lớp giấy lọc, khử trùng trước khi dùng.
7. Đặt cột đã chuẩn bị như trên vào ống falcol 15ml sạch, đã khử trùng. Cho toàn bộ dịch thu được ở bước 5 qua cột bằng ly tâm tốc độ 300 vòng/phút, trong 2 phút, ở nhiệt độ phòng.
8. Rửa cột 2 lần bằng dung dịch cồn 70% có 0,4M NaCl, mỗi lần 5ml, ly tâm 300 vòng/phút, trong 2 phút, nhiệt độ phòng.
9. Rửa lại 1 lần bằng cồn 75%, ly tâm 5500 vòng/phút, trong 1 phút. Chuyển cột sang ống falcol 15ml mới.
10. Tách ADN bằng 0,5ml -1ml nước MilliQ, ly tâm 5500 vòng phút, trong 1 phút.
11. Kiểm tra nồng độ của ADN trên gel agaroz 0,8%.
12. Cho 3 μ l RNase vào dung dịch ADN thu được, ủ ở 37°C trong 1 giờ để loại bỏ ARN.
13. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của ADN bằng máy quang phổ với bước sóng 260nm/280nm.

Cả hai phương pháp đã sử dụng đều đạt hiệu suất tương đương 100mg lá tươi tách được 26 μ g ADN, có tỷ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ là 1.86-1.90. Phương pháp nêu ở sơ đồ 1 tuy nhanh hơn nhưng phải có kit, vì vậy trong điều kiện không có kit có thể sử dụng phương pháp nêu ở sơ đồ 2.

♣ **Tách ADN tổng số từ đậu cô ve trắng (*Phaseolus vulgaris*)**

Quy trình tách chiết ADN tổng số từ mầm đậu cô ve trắng được mô tả ở sơ đồ 3.

Sơ đồ 3: Các bước tiến hành tách chiết và tinh sạch ADN tổng số của đậu cô ve trắng



* *Các bước cụ thể của phương pháp tách chiết và tinh sạch ADN tổng số của đậu cô ve trắng:*

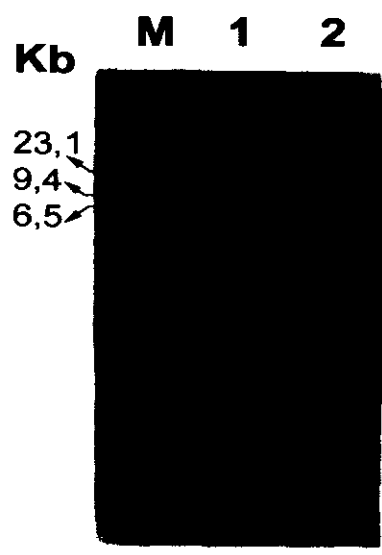
1. 0,5g mầm đậu cô ve trắng tươi được nghiền mịn trong nitor lỏng. Sau đó được chiết bằng 6ml đệm có thành phần NaCl 10mM, Tris-HCl 10mM, pH=8 . EDTA 25mM. SDS 0,5%.
2. Phân huỷ protein bằng proteaz K (10 µg/ml) trong 2 giờ ở 56°C.
3. Cho một thể tích hỗn hợp phenol / chloroform / isoamylalcohol (25 : 24 : 1).
4. Ly tâm 14.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C, thu dịch trong.
5. Kết tủa ADN bằng etanol 100%, để trong 3 giờ ở -20°C.
6. Ly tâm 14.000 vòng phút, trong 15 phút ở 4°C, thu kết tủa.
7. Rửa tủa bằng etanol 70%, ly tâm thu kết tủa 14.000 vòng phút, trong 15 phút ở 4°C, thu kết tủa
8. Hoà tan kết tủa bằng 400µl H₂O khử ion vô trùng
9. Loại ARN bằng 3µl RNaz (nồng độ 10µg/ml) trong 1 giờ ở 37°C .
10. Kết tủa và hoà tan lại như bước 5-8.

*** Tách ADN tổng số từ mướp đắng**

ADN tổng số được tách chiết từ lá mướp đắng theo phương pháp Sambrook, cụ thể được tiến hành như sau:

1. Nghiền mẫu trong nitor lỏng: lá mướp đắng non được nghiền trong nitor lỏng thành dạng bột mịn; bổ sung 3 ml đệm chiết ADN tổng số vào 0,3 - 0,5 g lá; ủ 65°C trong 1 giờ.
2. Tách chiết: loại bỏ protein và tạp chất bằng phenol: chloroform: isoamylalcohol (25: 24: 1); lắc đều, ly tâm 12000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, thu dịch ở pha trên.
3. Tủa ADN bằng EtOH 100%, bổ sung natri axetat 3M pH 5,2 (tỉ lệ thể tích 1/10), để qua đêm ở - 20°C.
4. Thu tủa: ly tâm thu tủa 12000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, thu tủa; rửa lại tủa ADN bằng EtOH 70% (hai lần), làm khô, hòa tan trong 200 µl nước khử ion vô trùng.
5. Loại ARN: bổ sung 2 µl RNaz 10 mg/ml vào 100 µl dung dịch ADN thô, dẫn nước đến 400 µl, ủ 37°C trong 3 giờ; chiết bằng một thể tích tương đương cloroform: isoamylalcohol (24: 1); ly tâm 12000 vòng/phút, 4°C, 15 phút, thu dịch pha trên; lặp lại bước 3 và bước 4 để tinh sạch ADN.

Sau khi tách chiết, ADN tổng số được kiểm tra bằng đo quang phổ bước sóng 260nm và 280nm và chạy điện di trên gel agaroz. *Các chế phẩm ADN thu được đều có một băng trên gel agaroz 0,8%, có tỷ số $OD_{260nm/280nm}$ là từ 1,86-1,96 đạt độ sạch để sử dụng cho các bước nghiên cứu tiếp.*

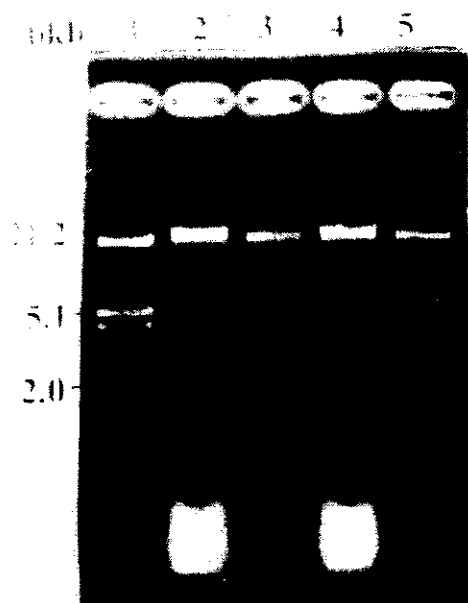


Hình 1: Phổ điện di ADN tổng số của bí đỏ và gấc

M. Thang chuẩn ADN

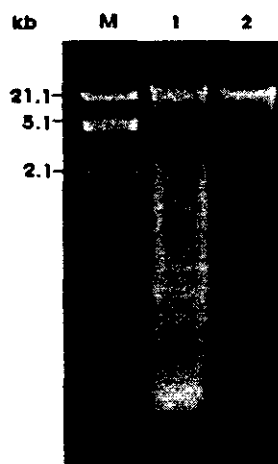
1. ADN tổng số của bí đỏ

2. ADN tổng số của gấc



Hình 2 : Phổ điện di ADN tổng số từ mầm đậu cô ve

1. Thang ADN chuẩn (ADN λ /Hind III/ Eco RI)
2. ADN tổng số của đậu cô ve nâu chưa loại ARN
3. ADN tổng số của đậu cô ve nâu đã loại ARN
4. ADN tổng số của đậu cô ve trắng chưa loại ARN
5. ADN tổng số của đậu cô ve trắng đã loại ARN



Hình 3. Điện di đồ ADN genom từ cây mướp đắng

- M: Thang chuẩn ADN λ /HindIII/EcoRI
- 1: ADN genom mướp đắng trước khi loại ARN
- 2: ADN genom mướp đắng sau khi loại ARN

2.1.1.2. Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V), MCoTI-II (TI-II), α -AI và RIP từ ADN tổng số của các thực vật tương ứng bằng kỹ thuật PCR

- *Phân lập gen mã hoá CMTI-V (gen TI-V) từ ADN tổng số của bí đỏ*

Trình tự nucleotit của cặp mồi như sau:

Mồi xuôi (forward primer):

5' - CATATGCATATGTCCTCCTGCCCAGGTAAGTC - 3'
NdeI

Mồi ngược (reverse primer):

5' - CGCGGATCCGCGTTAACCGATCCTCGGTGGTG - 3'
BamHI

Chu trình nhiệt của PCR là:

95°C: 3 phút, [95°C: 30 giây, 55°C: 1 phút 30 giây, 72°C: 2 phút] x 35 chu kỳ;
72°C: 8 phút và kết thúc ở 4°C.

* *Cụ thể như sau:*

1. ADN tổng số của bí đỏ có độ sạch = 1.90, nồng độ $\approx$ 560ng/ μ l được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR (25 μ l) tổng hợp gen CMTI-V.
2. Hai mồi đặc hiệu cho CMTI-V (xuôi và ngược) như đã nêu trên được dùng với nồng độ thích hợp nhất của mỗi mồi là 150ng trong 1 phản ứng; dNTPs nồng độ 200 μ M, 200ng ADN tổng số của bí đỏ (làm khuôn), Taq 0.2IU. Cụ thể là:

0,5 μ l ADN tổng số (560ng/ μ l)

0,5 μ l dNTPs (10mM)

1 μ l mồi xuôi (150ng/ μ l)

1 μ l mồi ngược (150ng/ μ l)

0,25 μ l Taq (2IU/ μ l)

2,5 μ l đệm cho Taq (10X)

19,25 μ l nước MilliQ khử trùng

= 25 μ l cho 1 phản ứng PCR.

3. Phản ứng PCR gồm:

94°C 3 phút

35 chu kỳ { 94°C 30 giây
55°C 1 phút 30 giây
72°C 2 phút

72°C 8 phút

4°C

4. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agaroz 2% và gel poliacrilamit 5% cho kích thước CMTI-V ~230bp (đúng kích thước như dự tính).

5. Tinh sạch gen CMTI-V từ gel agaroz như sau:

- + Điện di lượng lớn sản phẩm PCR trên gel agaroz 2% song song với thang chuẩn ADN, cắt lấy băng ADN đúng kích thước CMTI-V theo thang chuẩn, cho vào ống eppendorf 2ml sạch.
- + Cho vào ống trên khoảng 1 thể tích đệm gồm: 4M GITC (Guanidin thiocyanat), ủ ở 65°C cho tới khi agaroz tan hoàn toàn. Thêm vào bằng 1 thể tích cồn 100%, trộn nhẹ bằng pipet.
- + Cho toàn bộ hỗn dịch có chứa ADN ở trên qua cột có 4 lớp màng GF/D glass membrane bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 1 phút ở nhiệt độ phòng.
- + Rửa cột 2 lần bằng dung dịch cồn 70% có 0,4M NaCl, mỗi lần 0,5ml, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút, nhiệt độ phòng.
- + Rửa lại 1 lần bằng cồn 75%, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút. Chuyển cột sang ống mới.
- + Tách ADN bằng 100µl nước MilliQ, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút.
- + Kiểm tra độ sạch của ADN trên gel agaroz 2% cho thấy chỉ có 1 băng ADN với kích thước khoảng 230bp. Đo độ hấp phụ ở các bước sóng 260nm và 280nm cho thấy tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,82 đủ tiêu chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo.

- **Phân lập gen mã hoá MCoTI-II (gen TI-II) từ ADN tổng số của gấc**

Trình tự nucleotit của cặp mồi như sau:

Mồi xuôi (forward primer):

5' GAATTCCATATGAGCGGCAGCGATGGCGGCGTGTGCCCCGA 3'
NdeI

Mồi ngược (reverse primer):

5' CGGCTCGAGTTAGCCGCAATAGCCGTTGCCGCCGCAAAT 3'
XhoI

Chu trình nhiệt của PCR là:

95°C: 3 phút, [95°C: 30 giây; 61°C: 1 phút 30 giây; 72°C: 2 phút] x 40 chu kỳ; 72°C: 10 phút và kết thúc ở 4°C.

* Cụ thể như sau:

1. ADN tổng số của gấc có độ sạch = 1,86, nồng độ = 1000ng/μl được dùng làm khuôn trong phản ứng PCR (25μl) tổng hợp gen MCoTI-II.
2. Hai mồi đặc hiệu cho MCoTI-II (xuôi và ngược), nồng độ 150ng thích hợp nhất cho mỗi mồi, dNTPs nồng độ 200μM, 400ng ADN tổng số của gấc (làm khuôn), Taq 0.2 IU. Cụ thể là:

0,4μl ADN tổng số	(1000ng/μl)
0,5μl dNTPs	(10mM)
1μl mồi xuôi	(150ng/μl)
1μl mồi ngược	(150ng/μl)
0,25μl Taq	(2IU/μl)
2,5μl đệm cho Taq	(10X)
19,26μl nước MilliQ khử trùng	

= 25μl cho 1 phản ứng PCR.	

3. Phản ứng PCR gồm:

94°C 3 phút

40 chu kỳ {

94°C 30 giây

61°C 1 phút 30 giây

72°C 2 phút

72°C 8 phút

4°C

4. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agaroz 2% và gel poliacrilamit 5% cho kích thước MCoTI-II ~110bp (đúng kích thước như dự tính).
5. Tinh sạch gen MCoTI-II từ gel agaroz như sau:
 - + Điện di lượng lớn sản phẩm PCR trên gel agaroz 2% song song với thang chuẩn ADN, cắt lấy băng ADN đúng kích thước MCoTI-II theo thang chuẩn, cho vào ống eppendorf 2ml sạch.
 - + Cho vào ống trên khoảng 1 thể tích đệm gồm: 4M GITC (Guanidin thiocyanat), ủ ở 65°C cho tới khi agaroz tan hoàn toàn. Thêm vào bằng 1 thể tích cồn 100%, trộn nhẹ bằng pipet.
 - + Cho toàn bộ hỗn dịch có chứa ADN ở trên qua cột có 4 lớp màng GF/D bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 1 phút ở nhiệt độ phòng.
 - + Rửa cột 2 lần bằng dung dịch cồn 70% có 0,4M NaCl, mỗi lần 0,5ml, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút, nhiệt độ phòng.
 - + Rửa lại 1 lần bằng cồn 75%, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút. Chuyển cột sang ống mới.
 - + Tách ADN bằng 100µl nước MilliQ, ly tâm 6000 vòng/phút, trong 1 phút.
 - + Kiểm tra độ sạch của ADN trên gel agaroz 2% cho thấy chỉ có 1 băng ADN với kích thước khoảng 110bp. Đo độ hấp phụ ở các bước sóng 260nm và 280nm cho thấy tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,83, nồng độ đạt khoảng 450ng/µl đủ tiêu chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo.

*** Phân lập gen mã hoá α -AI từ ADN tổng số của đậu cô ve**

Cặp mồi có trình tự nucleotit như sau :

Mồi AIF : 5' - GGC CAT GGC TTC CTC CAA CTT AC - 3'

Mồi AIR : 5' - GCG GAT CCT AGA GGA TTT TGT TG - 3'

Chu trình nhiệt của PCR là:

95°C: 3 phút, [95°C: 1 phút, 54°C: 1 phút, 72°C: 1 phút 20 giây] x 30 chu kỳ:

72°C: 10 phút và kết thúc ở 4°C.

*** Phân lập gen mã hoá RIP từ ADN tổng số của mướp đắng**

Cặp mồi có trình tự nucleotit như sau:

MAP65F: 5' – CCTACTGCACCATGGATGTTAACCTTCG – 3'
NcoI

MAP859R: 5' – GGATTATTATGGATCCTTCAATTCACAACAG – 3'
BamHI

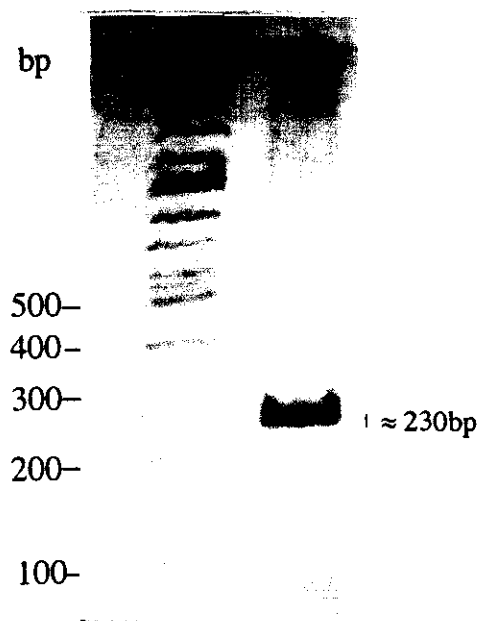
Chu trình nhiệt của PCR là:

94°C: 1 phút; [94°C: 1 phút; 54°C: 1 phút; 72°C: 1 phút 20 giây] x 32 chu kỳ;
72°C: 10 phút và kết thúc ở 4°C.

Tổng thể tích là 25 µl gồm:

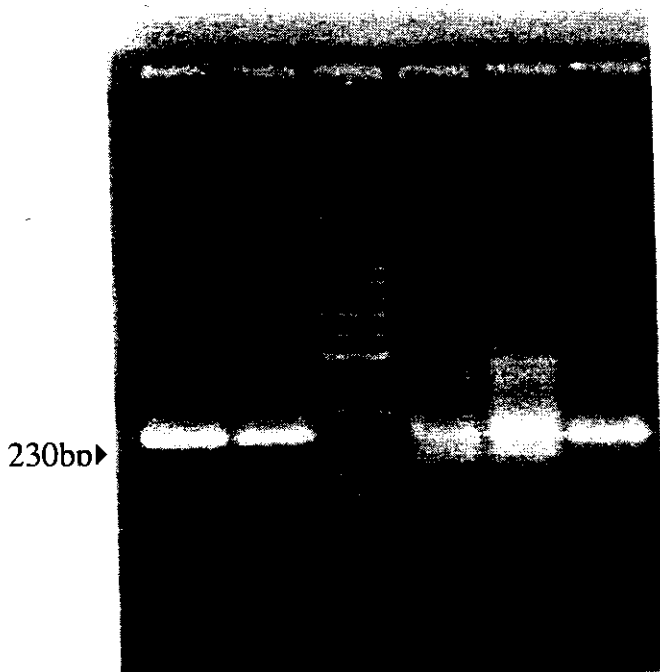
500 ng ADN genom; 10 pM mỗi mồi; 0,625 unit Taq ADN polymeraz;
MgCl₂ 2,4 mM; dNTP 1 mM và đệm tương ứng.

Kết quả điện di kiểm tra các sản phẩm PCR cho thấy các gen thu được đều có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết.



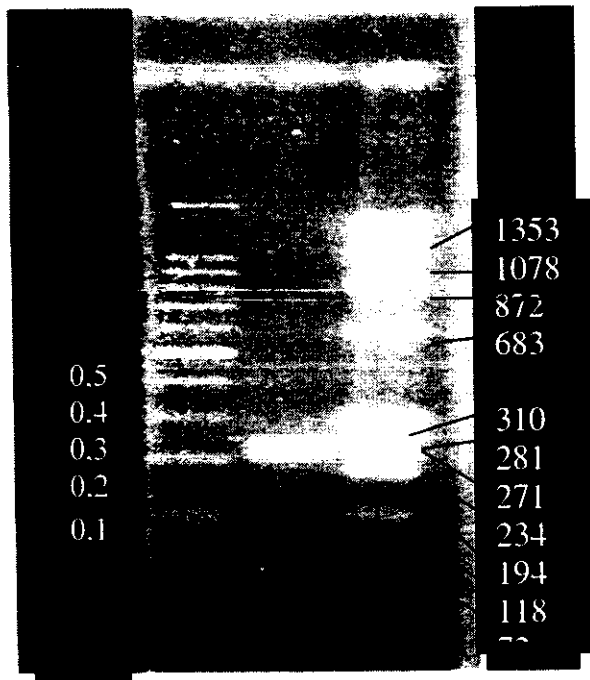
Hình 4. Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng ADN tổng số của bí đỏ làm khuôn

1. Thang ADN chuẩn Mix (100bp – 10000bp)
2. Sản phẩm PCR ≈ 230bp



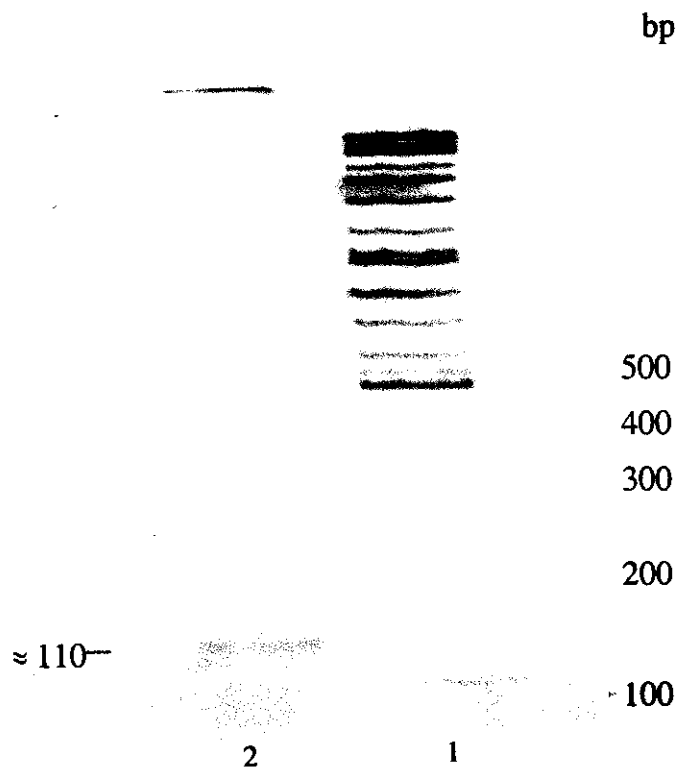
Hình 5: Kết quả tổng hợp hoá học gen CMTI-V

1. Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi môi là 200 ng.
2. Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi môi là 250 ng.
3. Thang chuẩn ADN 100bp (100bp-1031bp).
4. 5. 6. Sản phẩm PCR 2 (mỗi xuôi và ngược, khuôn là sản phẩm PCR 1)



Hình 6: Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR của gen CMTI-V

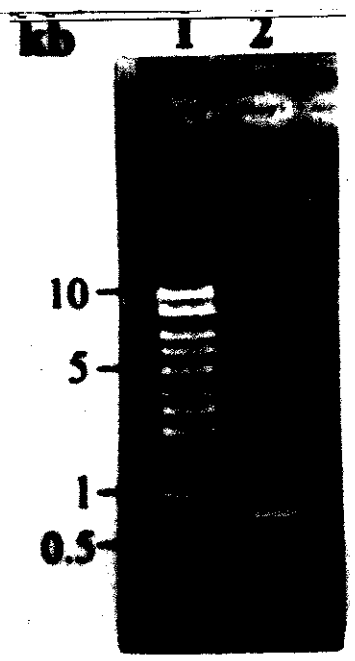
1. Thang chuẩn ADN 100bp (100bp-1031bp).
2. Sản phẩm PCR (cột 4, 5 hình 5 sau khi tinh sạch qua màng Recochip)
3. Thang ADN chuẩn *Hae*III 72-1353



Hình 7. Phổ điện di sản phẩm PCR gen

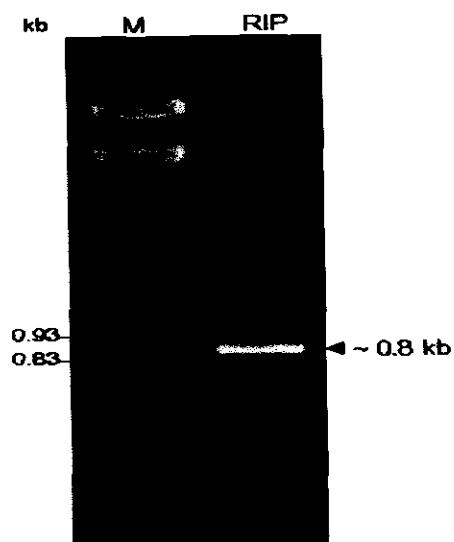
MCoTI-II trên gel poliacrilamit 5%

1. Thang ADN chuẩn 100bp # SMO 0321/2/3 (100-3000)
2. Sản phẩm PCR của gen MCoTI-II



Hình 8: Phổ điện di sản phẩm PCR của đậu cô ve trắng

1. ADN λ / *Bam* HI/ *Eco*RI
2. Sản phẩm PCR



Hình 9. Phổ điện di sản phẩm PCR từ ADN genom cây mướp đắng

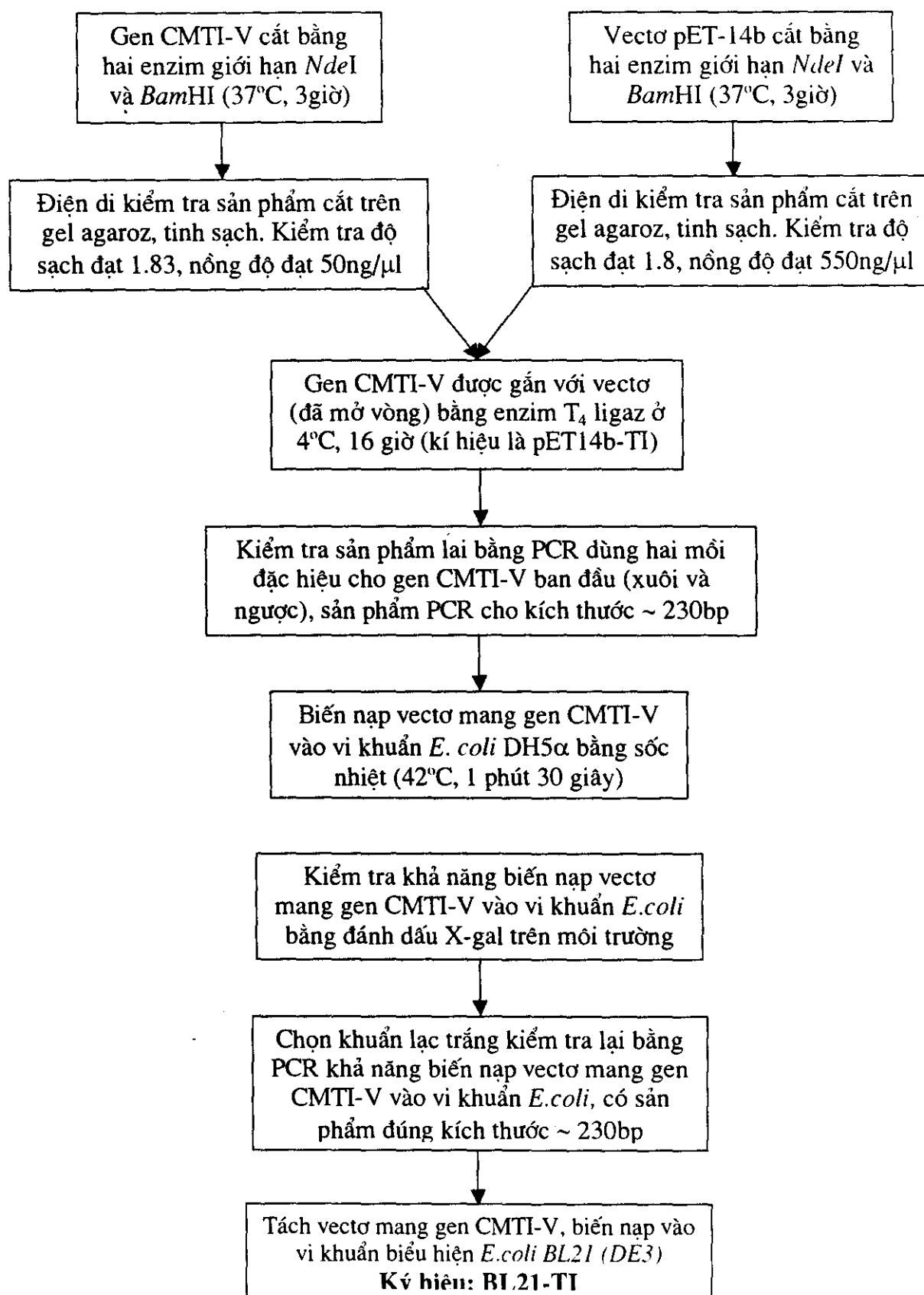
M: Thang chuẩn ADN λ /*EcoRI*/ *Bam*HI

RIP: Sản phẩm PCR gen mã hoá RIP

2.1.1.3. Thiết kế và biến nạp vectơ tái tổ hợp

♣ Đối với gen *CMTI-V*

Sơ đồ 4: Lai và biến nạp gen CMTI-V vào vectơ và vi khuẩn *E. coli*



* Các bước tiến hành như sau:

1. Gen CMTI-V thu được từ sản phẩm PCR được cắt bằng 2 enzym giới hạn ở hai đầu tương ứng, dùng làm insert cho phản ứng lai với vectơ thực hiện như sau:

5 μ l sản phẩm PCR (khoảng 5 μ g ADN)

1 μ l enzym *Nde*I (10U/ μ l)

1 μ l enzym *Bam*H I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

11 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 3 giờ.

2. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch đoạn gen CMTI-V qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,83, nồng độ là 260ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với vectơ tương thích.
3. Song song với cắt và tinh sạch đoạn gen CMTI-V (Insert), vectơ tương thích (pET-14b) cũng được mở vòng bằng chính 2 enzym giới hạn tương ứng như với đoạn gen CMTI-V (*Nde*I và *Bam*H I). Tiến hành như sau:

1 μ l (khoảng 6 μ g ADN plasmit)

1 μ l enzym *Nde*I (10U/ μ l)

1 μ l *Bam*H I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

15 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 3 giờ

4. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm vectơ (đã mở đoạn tương ứng cho insert) được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,81 nồng độ là 280ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với insert (đoạn gen CMTI-V).

5. Lai đoạn gen CMTI-V với vectơ pET-14b đã mở vòng bằng enzym T₄ ligaz. tiến hành như sau:

4μl insert (khoảng 1μg)

1μl vectơ (khoảng 280ng)

1μl đệm cho T₄ ligaz (10X)

0,5μl enzym T₄ ligaz (20U/μl)

3,5μl nước MilliQ

= 10μl cho phản ứng, ủ ở 4°C 16 giờ.

6. Kiểm tra sản phẩm lai trên gel agaroz 1%.
7. Kiểm tra sản phẩm lai bằng PCR với môi tương ứng của gen CMTI-V, phản ứng gồm:

0,5μl sản phẩm lai (khoảng 400ng/μl)

0,5μl dNTPs (10mM)

1μl môi xuôi (150ng/μl)

1μl môi ngược (150ng/μl)

0,25μl Taq (2IU/μl)

2,5μl đệm cho Taq (10X)

19,25μl nước MilliQ khử trùng

= 25μl cho 1 phản ứng PCR.

8. Phản ứng PCR gồm:

94°C 3 phút

35 chu kỳ { 94°C 30 giây
55°C 1 phút 30 giây
72°C 2 phút
72°C 8 phút
4°C

9. Sản phẩm lai đoạn gen CMTI-V vào vectơ pET-14b thành công (ký hiệu pET 14b-TI) ở trên được biến nạp vào vi khuẩn DH5α theo phương pháp sốc nhiệt ở 42°C

trong 1 phút 30 giây, gạt trên môi trường LB-agar có ampicilin 200mg/ml + 1mM IPTG + 1µg/ml X-gal, ủ ở 37°C khoảng 16 giờ để chọn lọc các khuẩn lạc mang gen CMTI-V (khuẩn lạc trắng).

10. Kiểm tra các khuẩn lạc trắng bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu cho gen CMTI-V, sản phẩm điện di trên gel agaroz 2% cho kích thước đúng khoảng 230bp. Phản ứng gồm:

0,5µl (chấm 1 khuẩn lạc trắng bằng tăm khử trùng, hoà vào 20µl nước MilliQ khử trùng)

0,5µl dNTPs (10mM)

1µl mỗi xuôi (150ng/µl)

1µl mỗi ngược (150ng/µl)

0,25µl Taq (2IU/µl)

2,5µl đệm cho Taq (10X)

19,25µl nước MilliQ khử trùng

= 25µl cho 1 phản ứng PCR.

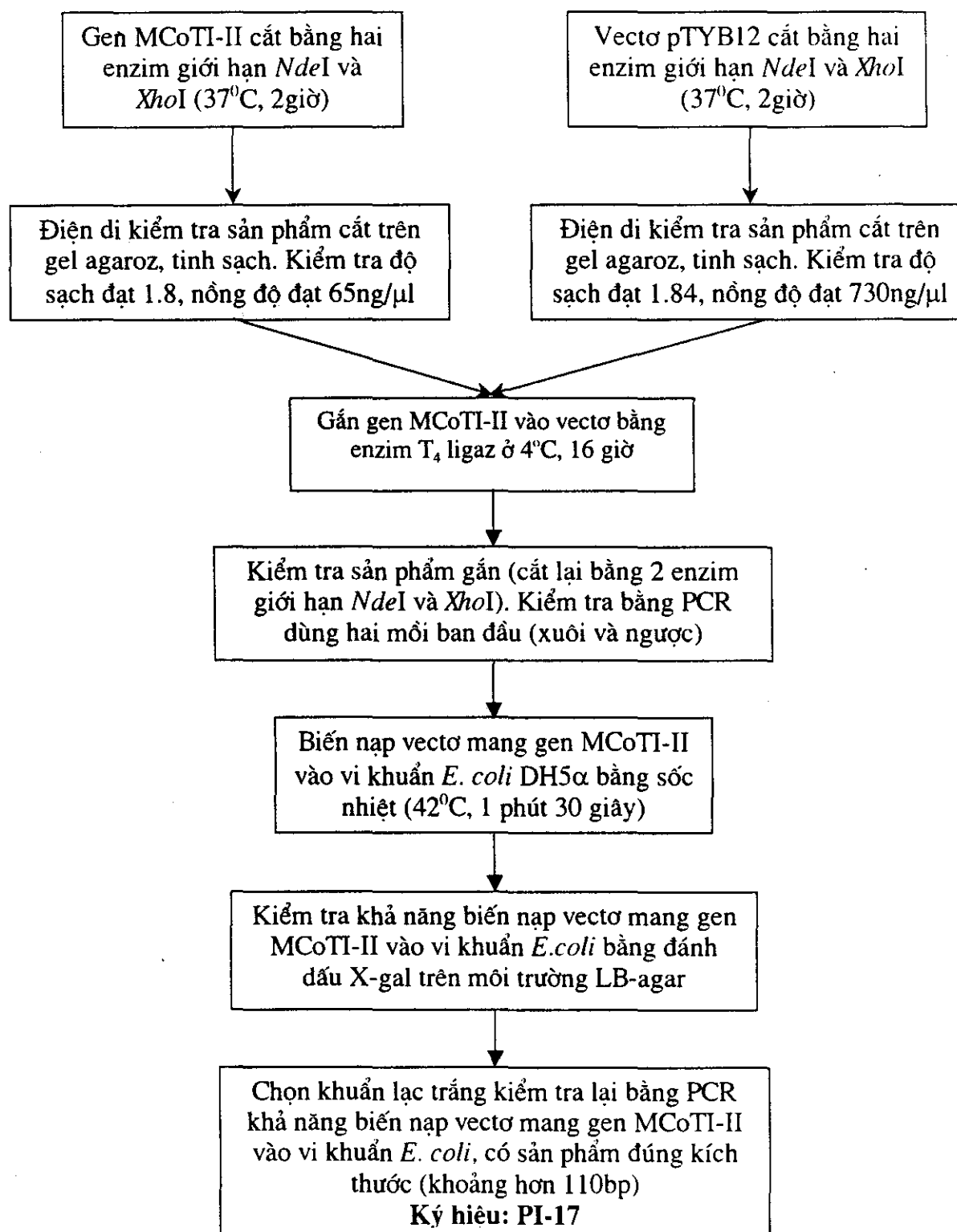
11. Phản ứng PCR gồm:

94°C 3 phút
35 chu kỳ { 94°C 30 giây
55°C 1 phút 30 giây
72°C 2 phút
72°C 8 phút
4°C

12. Nuôi biểu hiện khuẩn lạc trắng đã được chọn lọc trong môi trường LB dịch thể có 200µg/ml ampicilin ở 37°C qua đêm (khoảng 16 giờ), thu tế bào, tách plasmit để tiến hành giải trình tự gen CMTI-V và dùng để biến nạp vào vi khuẩn biểu hiện *E. coli* BL21.

♣ Đối với gen MCoTI-II

Sơ đồ 5: Biến nạp gen MCoTI-II vào vector và vi khuẩn *E. coli*



* Các bước tiến hành như sau:

1. Gen MCoTI-II thu được từ sản phẩm PCR được cắt bằng 2 enzym giới hạn ở hai đầu tương ứng, dùng làm insert cho phản ứng lai với vectơ thực hiện như sau:

5 μ l sản phẩm PCR (khoảng 5 μ g ADN)

1 μ l enzym *Nde*I (10U/ μ l)

1 μ l *Xho* I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

11 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 2 giờ.

2. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch đoạn gen MCoTI-II qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,8, nồng độ là 65ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với vectơ tương thích.
3. Song song với cắt và tinh sạch đoạn gen MCoTI-II (Insert), vectơ tương thích pTYB12 cũng được mở vòng bằng chính 2 enzym giới hạn tương ứng như với đoạn gen MCoTI-II (*Nde*I và *Xho* I). Tiến hành như sau:

1 μ l (khoảng 5 μ g ADN plasmid)

1 μ l enzym *Nde*I (10U/ μ l)

1 μ l *Xho*I (10U/ μ l)

2 μ l đệm enzym (10X)

15 μ l nước MilliQ

= 20 μ l của phản ứng, ủ ở 37°C trong 2 giờ

4. Sau thời gian phản ứng, toàn bộ sản phẩm vectơ (đã mở đoạn tương ứng cho insert) được điện di trên gel agaroz 0,8% và tinh sạch qua màng GF/D, thu 10 μ l. Sản phẩm tinh sạch được kiểm tra nồng độ, độ sạch bằng máy quang phổ tỉ lệ OD_{260nm}/OD_{280nm} là 1,84 nồng độ là 730ng/ μ l đủ dùng cho phản ứng lai với insert (đoạn gen MCoTI-II).

5. Lai đoạn gen MCoTI-II với vectơ pTYB12 đã mở vòng bằng enzym T₄ ligaz. tiến hành như sau:

6,5μl insert (khoảng 420μg)
 0,4μl vectơ (khoảng 300ng)
 1μl đệm cho T₄ ligaz (10X)
 0,5μl enzym T₄ ligaz (20U/μl)
 1,6μl nước MilliQ

 = 10μl cho phản ứng, ủ ở 4°C 16 giờ.

6. Kiểm tra sản phẩm lai trên gel agaroz 1%.
7. Kiểm tra sản phẩm lai bằng PCR với mỗi tương ứng của gen MCoTI-II, phản ứng gồm:

0,5μl sản phẩm lai	(khoảng 300ng/μl)
0,5μl dNTPs	(10mM)
1μl mỗi xuôi	(150ng/μl)
1μl mỗi ngược	(150ng/μl)
0,25μl Taq	(2IU/μl)
2,5μl đệm cho Taq	(10X)
19,25μl nước MilliQ khử trùng	

 = 25μl cho 1 phản ứng PCR.

8. Phản ứng PCR gồm:

	94°C 3 phút
40 chu kỳ {	94°C 30 giây
	63°C 1 phút 30 giây
	72°C 2 phút
	72°C 8 phút
	4°C

9. Sản phẩm lai đoạn gen MCoTI-II vào vectơ pTYB12 thành công (ký hiệu PI-17) ở trên được biến nạp vào vi khuẩn DH5α theo phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 1 phút 30 giây, gặt trên môi trường LB-agar có ampicilin 200mg/ml + 1mM IPTG +

1µg/ml X-gal, ủ ở 37°C khoảng 16 giờ để chọn lọc các khuẩn lạc mang gen MCoTI-II (khuẩn lạc trắng).

10. Kiểm tra các khuẩn lạc trắng bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu cho gen MCoTI-II, sản phẩm điện di trên gel agaroz 2% cho kích thước đúng khoảng 110bp. Phản ứng gồm:

0,5µl (chấm 1 khuẩn lạc trắng bằng tăm khử trùng, hoà vào 20µl nước MilliQ khử trùng)	
0,5µl dNTPs	(10mM)
1µl mỗi xuôi	(150ng/µl)
1µl mỗi ngược	(150ng/µl)
0,25µl Taq	(2IU/µl)
2,5µl đệm cho Taq	(10X)
19,25µl nước MilliQ khử trùng	

= 25µl cho 1 phản ứng PCR.

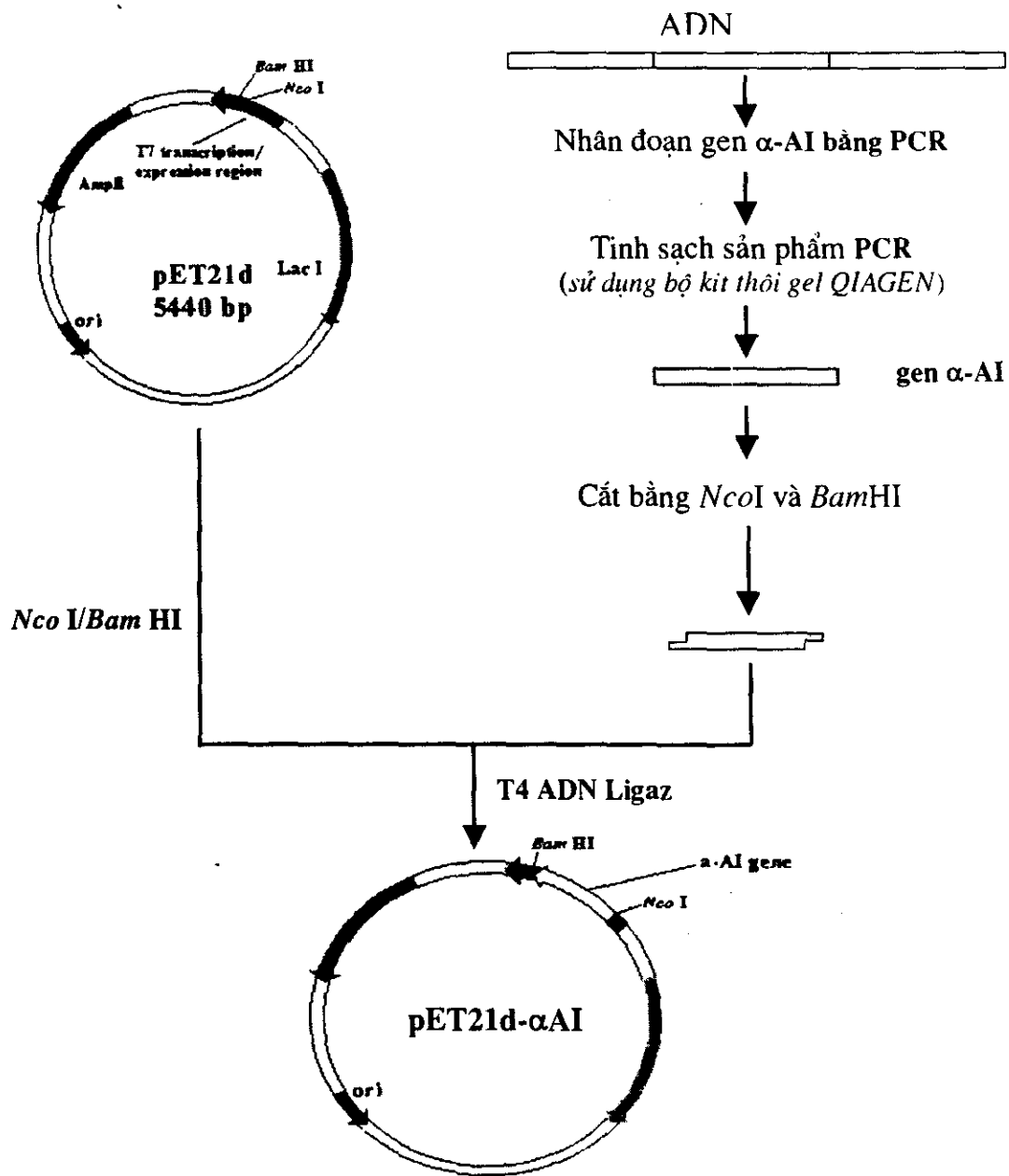
11. Phản ứng PCR gồm:

	94°C 3 phút
40 chu kỳ {	94°C 30 giây
	63°C 1 phút 30 giây
	72°C 2 phút
	72°C 8 phút
	4°C

12. Nuôi biểu hiện khuẩn lạc trắng đã được chọn lọc trong môi trường LB dịch thể có 200µg/ml ampicilin ở 37°C qua đêm (khoảng 16 giờ), thu tế bào, tách plasmid để tiến hành giải trình tự gen MCoTI-II và dùng để biến nạp vào vi khuẩn biểu hiện *E.coli* BL21.

♣ Đối với gen α -AI

Sơ đồ 6. Thiết kế vectơ pET 21 d(+) mang gen α -AI



PLASMIT TÁI TỔ HỢP

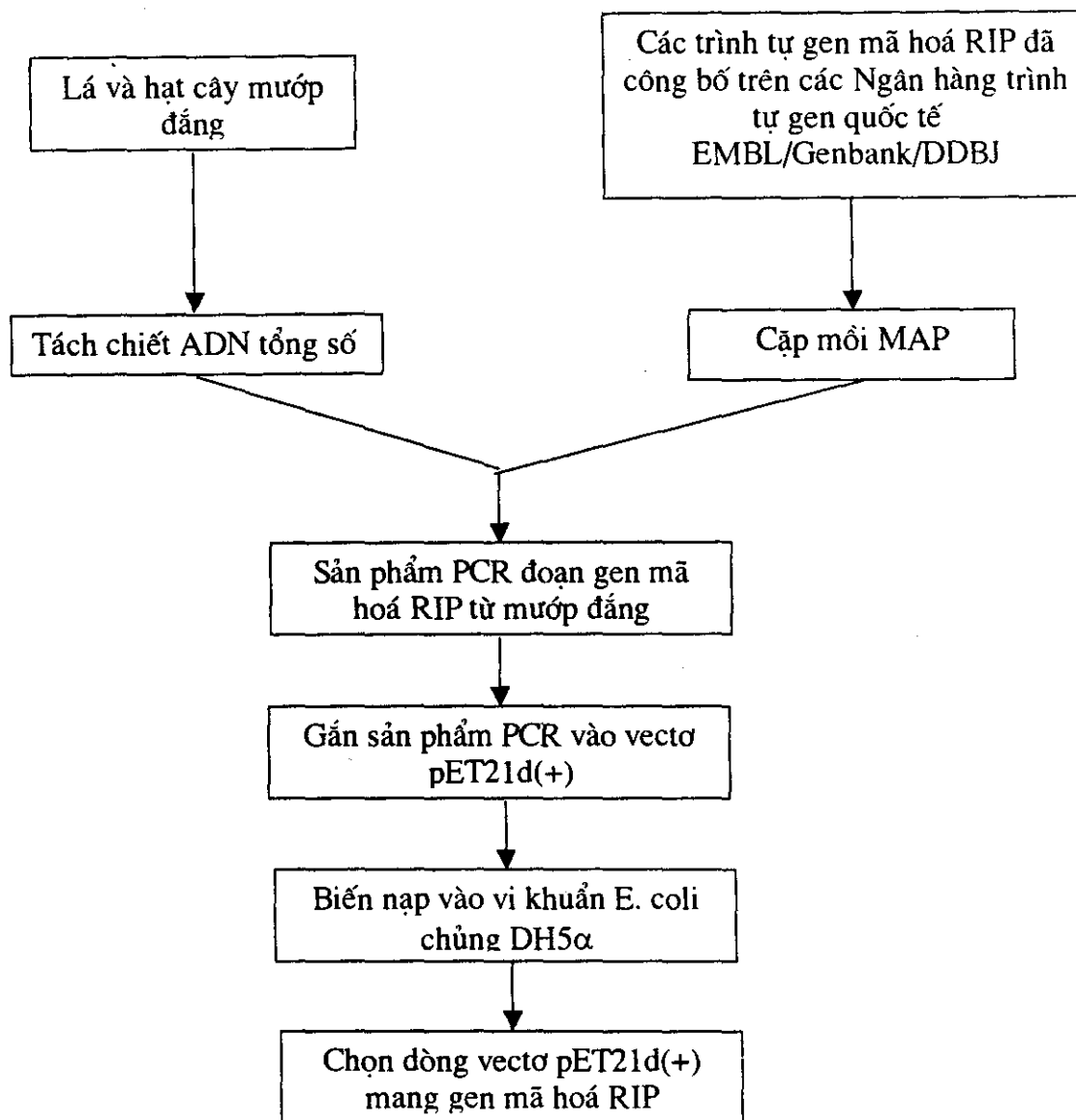
Quá trình biến nạp được thực hiện bằng phương pháp sốc nhiệt.

** Các bước tiến hành như sau:*

1. Từ ADN tổng số nhân đoạn gen α -AI bằng PCR với các điều kiện như đã mô tả ở phần phân lập gen.
2. Tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit thôi gel QIAGEN
3. Cắt gen bằng hai enzym giới hạn *NcoI* và *BamHI*
4. Plasmid pET21d được mở vòng bằng hai enzym giới hạn *NcoI* và *BamHI*
5. Thực hiện phản ứng nối bằng T4 ADN ligaz: 3 μ l vectơ pET21d đã mở vòng + 5 μ l gen α -AI sau tinh sạch sản phẩm PCR + 0,6 μ l T₄ ADN ligaz + 1,2 μ l đệm T₄ ligaz x10 + 2,2 μ l nước cất. Hỗn hợp ủ qua đêm ở 12-16°C.

♣ Đối với gen RIP

Sơ đồ 7. Quy trình thiết kế vectơ pET21d(+) mang gen RIP



Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Tiến hành tách chiết và tinh sạch ADN genom (như đã mô tả cụ thể ở phần tách ADN tổng số).
2. Tiến hành PCR nhân gen mã hóa RIP với cặp môi đặc hiệu như đã mô tả ở phần phân lập gen.
3. Xử lý sản phẩm PCR với hai enzym hạn chế *Bam*HI và *Nco*I, tinh sạch sản phẩm PCR và tiến hành ghép nối vào vector pET21d(+) đã được mở vòng bằng hai enzym hạn chế tương ứng. Thể tích của phản ứng ghép nối là 10 µl gồm: 3 µl sản phẩm PCR

ting sạch, 1 μ l vectơ, 1 μ l ligaz và 5 μ l H₂O. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 14°C trong 14 - 16 giờ.

4. Bổ sung 5 μ l sản phẩm ghép nối vào ống tế bào khả biến BL21(DE3) đã được để trong đá 30 phút sau khi lấy ra từ - 84°C, để trong 30 phút đá, sốc nhiệt ở 42°C trong 90 giây, bổ sung 300 μ l LB lỏng, nuôi lắc ở 37°C trong 1 giờ, cấy trải trên đĩa LB đặc có bổ sung ampicilin (50 μ l/ml) và nuôi ở 37°C trong 12 - 16 giờ.
5. Cấy chuyển các khuẩn lạc đơn sang 2 ml LB lỏng có bổ sung ampicilin (50 μ l/ml) và nuôi lắc ở 37°C trong 12 - 16 giờ. Tách chiết ADN plasmit theo phương pháp sử dụng các dung dịch I, II và III.

Bước 1: Ly tâm 1,5 ml dịch nuôi cấy trên ở 6000 vòng/phút trong 8 phút;

Bước 2: Hoà cạn tế bào vi khuẩn trong 100 μ l dung dịch I để lạnh, giữ trong đá 5 phút

Bước 3: Bổ sung 200 μ l dung dịch II pha mới, đảo đều ống eppendorf nhẹ nhàng và giữ trên đá 10 phút;

Bước 4: Thêm 150 μ l dung dịch III để lạnh, đảo nhẹ và ủ trong đá từ 3-5 phút;

Bước 5: Thêm 550 μ l phenol: chloroform, đảo đều ống eppendorf và ly tâm ở 12000 vòng/phút trong 15 phút; Hút dịch pha trên sang ống eppendorf mới và chiết tiếp bằng chloroform: isoamylalcohol;

Bước 6: Bổ sung 1 ml EtOH 100% và 10 μ l 3M CH₃COONa, để lạnh -20°C trong 3 giờ và ly tâm 12000 vòng/phút trong 8 phút để thu ADN;

Bước 7: Rửa cạn bằng 0,2 ml EtOH 70%, ly tâm 12000 vòng/phút trong 3 phút, làm khô và hoà cạn trong 40 μ l 0,01 M TE, giữ ở -20°C;

Bước 8: Bổ sung RNaz vào mẫu ADN đến nồng độ cuối cùng là 1 mg/ml, ủ mẫu ở 37°C trong 1 giờ, chiết bằng phenol: chloroform, chloroform: isoamylalcohol và rửa lại ADN bằng EtOH. Nồng độ và độ sạch của ADN được xác định bằng phổ hấp thụ trên máy quang phổ tử ngoại và điện di trên gel agaroz 0,8%

6. Kiểm tra các plasmit tái tổ hợp bằng xử lý với hai enzym hạn chế *Bam*HI và *Nco*I [Phản ứng cắt plasmit tái tổ hợp với enzym hạn chế có sự tham gia của các thành phần: 1 μ l dung dịch đệm; 2 μ l plasmit (~20 ng); 0,5 μ l enzym hạn chế *Bam*HI và

*Nco*I; 6,5 µl H₂O khử ion vô trùng. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều, ủ ở nhiệt độ và thời gian thích hợp (thường ở 37°C, 3 giờ)] và bằng kỹ thuật PCR.

2.1.1. 4. Giải trình tự các gen CMTI-V, MCoTI-II, α -AI và RIP

Để tiếp tục kiểm tra kết quả biến nạp, đã xác định trình tự các đoạn gen mã hoá CMTI-V, MCoTI-II, α -AI và RIP trong các vectơ tái tổ hợp tương ứng. Kết quả cho thấy các trình tự gen đích trong plasmid tái tổ hợp đúng với các trình tự đã đưa vào vectơ.

♣ Trình tự gen CMTI-V

```
TGA TGGCCC ACC TGGTAG GTG TTG GTG GTT CCG TTG CTA AGGCTA TCA TC   50
GAAAGGCAG AAT CCGAAC GTT AAAGCT GTT ATC CTG GAAGAAGGT ACA CC   100
AGTTAC CAA GGA CTT CAG GTG CAA CAGGGT TAG GATCTG GGT TAACAA GA   150
AGT CTG GTA GTA TCA CCA CCG AGGATC GGT TAA CGCGGA TCA TGGCTG CC   200
GGC GCGGCA CCA GGC CGC TGC TGT GAT GAT GAT GATGAT G               240
```

♣ Trình tự gen MCoTI-II

```
1   GCTCGCGGAT TTCAGACCTG TTATTTTCGAG AAGGAGACGA TTATTATGGG 50
51  TATTACTTTA TCTGATGATT CTGATCATCA GTTTTTGCTT GGATCCCAGG 100
101 TTGTTGTACA GAATGCTGGT CATATGAGCG GCAGCGATGG CGGCGTGTGC 150
151 CGAAAATTCT GAAAAAATGC CGCCGCGATA GCGATTGCCC GGGCGCGTCA 200
201 TTTGCCGCGG CAACGGCTAT TGCGGCTAAC TCGAGCCCCG GTGACTGCAG 250
251 GAAGGGGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC 300
301 TGCCACCGCT GAGCAATAAC TAGCATACCC CTTGGGGCCT CTAAACGGGT 350
351 CTTGAGGGGT TTTTGCTGA AAGGAGGAAC TATATCCGGA TATCCCGCAA 400
401 GAGCCCGGCA GTACCGGCAT AACCAAGCCT ATGCCTACAG CATCCAGGGT 450
451 GACGGTGCCG AGGATGACGA TGAAGCGCCA TTG
```

♣ Trình tự gen α -AI

```
ATGGCTTCCTCCAACCTTACTCTCCCTAGCCCTCTTCCTTGTGCTTCTCACCCCTCGCAAAC 60
TCAGCCACCGAAACCTCCTTCAATATCGATGGGTTCACAAAACCAACCTTATCCTTCAA 120
GGCGATGCCATCGTCTCATCGAACGGCAACTTACAACCTATCCATAATTCATACGACTCTA 180
TGAGCAGAGCCTTTTACTCCGCCCCCATCCAAATCAGGGGACAGCACCACCGGCAACGTC 240
GCCAGCATCGACACCAACTTCACAATGAATATCCGGACTCACCGCCAAGCAAATTCCGCC 300
GCTGGCCTTGACTTTGTTCTCGTCCCGTCCAGCCGAATCCAAAGGCGATACTGTGACT 360
GTGGAGTTCGACACCTTCCTTAGCCGTATTAGCATCGACGCGAACAACAACCGATATCAA 420
AACCGTGCCTTGGGATGTACACGACTACGACGGACAAAACGCGGAGGTTTCGGTCACCTAT 480
AACTCCTCCACGAAGTCTTTGCGGTTTCTCTGTAAACCCTTCTACGGGAAAGAGCAACG 540
ACGTCTCTACCACAGTGGAGCTGGAGAAAGAAGTTTACGACTGGGTGAGGGTTGGGTTCT 600
CTGCCACCTCAGGGGCTTATCAATGGAGCTATGAAACGCACGACGTTCTCTCTTGGTCTT 660
TTCTTCCAAGTTCATCAATCTTAAGGACCAAAAATCTGAACGTTCCAACATCGTCCTCAA 720
CAAAATCCTCTAG
```

♣ *Trình tự gen RIP*

```
1 atggatgtta acttcgattt gtcgactgcc actgcaaaaa cctacacaaa atttatcgaa
61 gatttcaggg cgactcttcc atttagccat aaagtgtatg atatacctct actgtattcc
121 actatttccg actccagacg tttcatactc ctcaatctca caagttatgc atatgaaacc
181 atctcggtgg ccatagatgt gacgaacgtt tatgtttgtg cctatcgac cgcgatgta
241 tcttactttt ttaaagaatc tcttcttgaa gcttataaca tcttattcaa aggtacgcgg
301 aaaattacac tgccatatac cggtaattat gaaaatcttc aaactgctgc acacaaaata
361 agagagaata ttgatcttgg actccttgcc ttgagtagtg ccattaccac attgttttat
421 tacaatgccc aatctgctcc ttctgcattg cttgtactaa tccagacgac tgcagaagct
481 gcaagattta agtatatcga gcgacacgtt gctaagtatg ttgccactaa ctttaagcca
541 aatctagcca tcataagctt ggaaaatcaa tggctctgctc tctccaaaca aatatttttg
601 gcgcagaatc aaggaggaaa atttagaaat cctgtcgacc ttataaaaacc taccggggaa
661 cggtttcaag taaccaatgt tgattcagat gttgtaaaag gtaatatcaa actcctgctg
721 aactccagag ctagcactgc tgatgaaaac tttatcacia ccatgactct acgtggggaa
781 tctgttgtga attga
```

2.1.2. Sinh khối vi sinh vật tái tổ hợp

Đề tài đã sản xuất được 3 kg sinh khối vi sinh vật tái tổ hợp. Lượng sinh khối đó đã được dùng cho các bước tạo chế phẩm tiếp theo.

2.1.3. Chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật

Đề tài đã sản xuất được 0,5 kg các chế phẩm protein tái tổ hợp (ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Re α AI và ReRIP) ở dạng thô.

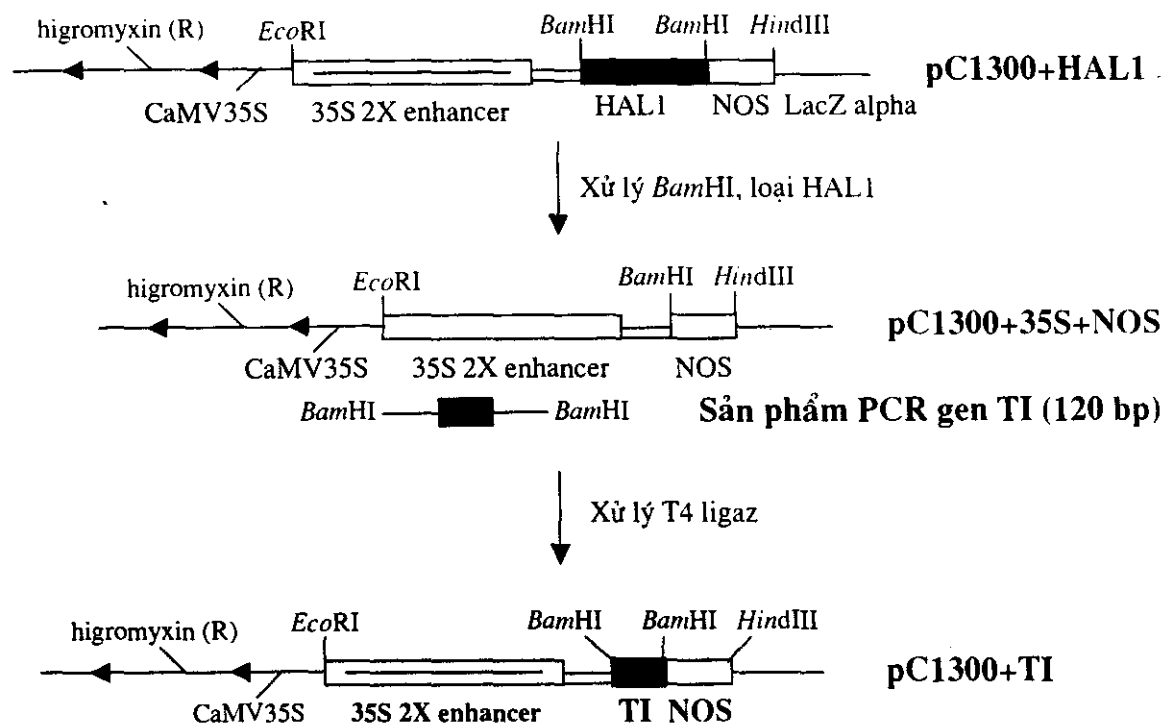
2.1.4. Chế phẩm protein tinh sạch

Đề tài đã sản xuất được 4 g chế phẩm protein tái tổ hợp ở dạng tinh sạch. Cụ thể là

- ReMCoTI-II: 0,2 g
- ReCMTI-V: 0,8 g
- Re α AI: 1 g
- ReRIP: 2 g

2.1.5. Thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng

2.1.5.1. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá MCoTI-II (TI-II)



Sơ đồ 12. Thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI

Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmit tái tổ hợp pC1300+TI có kích thước khoảng 10,2 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 10 dòng tế bào chứa các plasmit có kích thước nhỏ hơn ADN plasmit đối chứng là vectơ trung gian. Các plasmit này được ký hiệu là pCTI-1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 21 và pCTI-22. Sau khi kiểm tra đã lựa chọn 2 dòng pCTI-5 và pCTI-6.

Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6

Ti-plasmit tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6 sau khi thiết kế thành công được chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện ở điều kiện 25 μ F; 400 Ω ; 2,5 kV; 8-10 ms.

Kiểm tra sự có mặt của gen TI-II trong tế bào *A. tumefaciens* bằng cách tách ADN plasmit biến nạp trở lại vào tế bào *E. coli* DH5 α , cắt bằng enzym giới hạn, tiến hành PCR và điện di. Kết quả cho thấy đoạn gen TI-II đã được nhận rất đặc hiệu với kích thước khoảng 120bp, phù hợp với mẫu đối chứng. Điều đó chứng tỏ gen TI-II đã được đưa vào vectơ trung gian pC1300+35S+NOS và tạo được hai chủng *A. tumefaciens* EHA105:pCTI-5, EHA105:pCTI-6 tái tổ hợp mang gen TI phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.

2.1.5.2. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá α -AI

Qua nghiên cứu bản đồ vectơ chúng tôi đã lựa chọn vectơ pCAMBIA1301 làm nguyên liệu cho các thí nghiệm thiết kế vectơ tái tổ hợp. Để thiết kế vectơ tái tổ hợp, vectơ pCAMBIA1301 mở vòng khuyết đoạn GUS và đoạn gen α -AI đã tinh sạch được gắn kết với nhau nhờ phản ứng lai dưới sự hỗ trợ của enzym T_4 ligaz. Theo tính toán lý thuyết, đoạn gen α -AI với hai đầu gấn sẽ gắn vào hai vị trí là hai đầu gấn của pCAMBIA1301 mở vòng tương ứng. Ti-plasmit tái tổ hợp tạo thành là plasmit mang cấu trúc CaMV35S - α -AI - NOS polyA và gen chọn lọc kháng hygromycin nằm giữa vùng T-ADN. Trong cấu trúc vectơ còn mang gen kháng kanamixin, do đó ta có thể chuyển cấu trúc này vào vi khuẩn và chọn lọc các dòng mang thể tái tổ hợp.

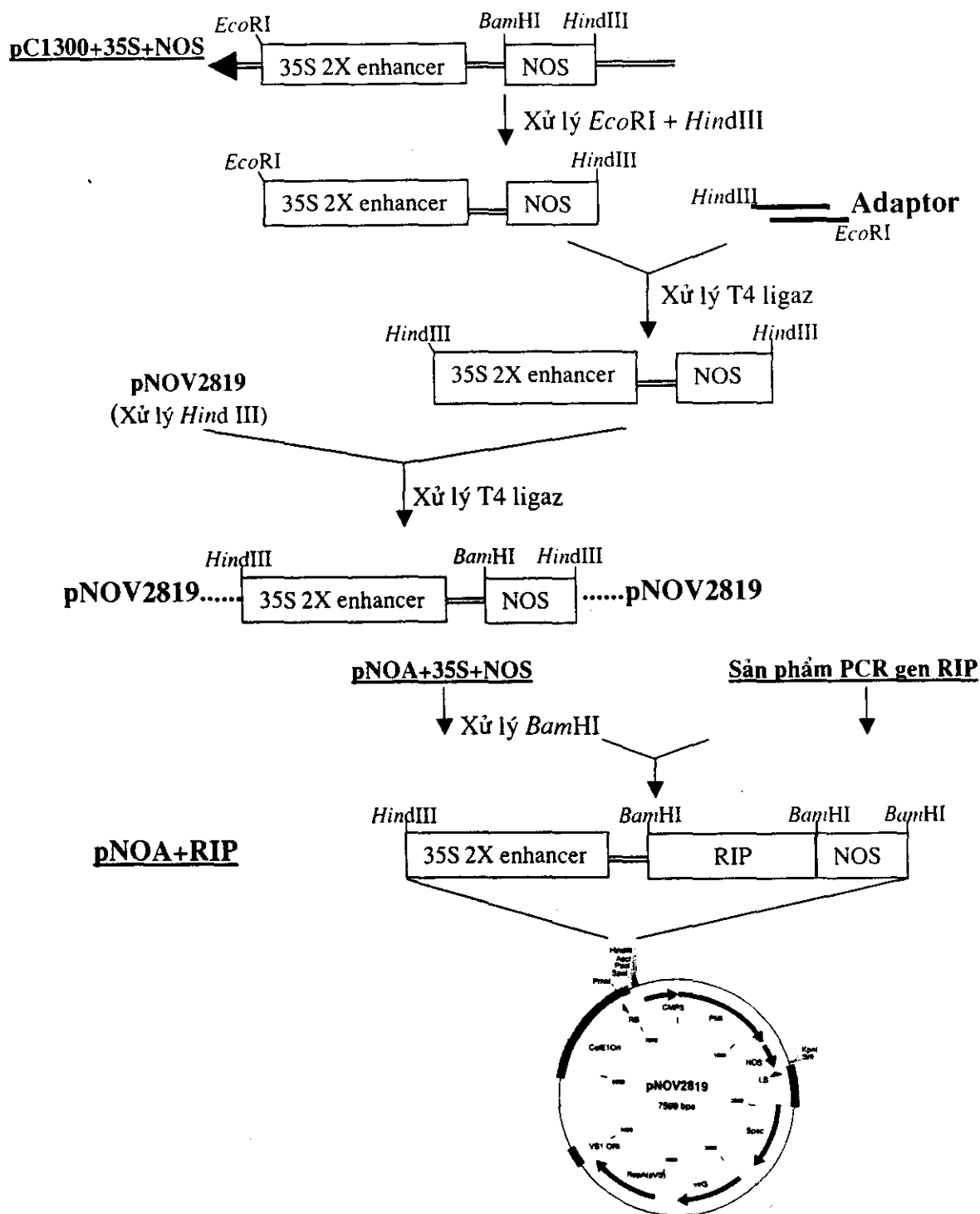
Theo tính toán của chúng tôi, vectơ pCAMBIA1301 tái tổ hợp mang gen mã hoá α -AI có kích thước khoảng 10,5 kb; có kích thước phân tử nhỏ hơn vectơ pCAMBIA1301. Chọn plasmit có kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết, kiểm tra bằng kỹ thuật PCR, điện di. Kết quả đã nhận được 1 băng có kích thước đúng kích thước gen mã hoá α -AI, 750bp. Xác định trình tự nucleotit, so sánh với các trình tự trong ngân hàng gen EMBL/GenBank/DDBJ cho thấy chúng tôi đã tạo được plasmit pCAMBIA1301 mang gen mã hoá α -AI. Đoạn gen mà chúng tôi giải mã có 96,463% thành phần nucleotit đồng nhất với đoạn trình tự gen α -AI (có số hiệu đăng ký AJ439614.1) do Smith-Waterman công bố. Đoạn trình tự giải mã được có chiều dài khoảng 750 nucleotit. Kết quả này cho phép khẳng định rằng đoạn gen α -AI đã được gắn vào vectơ Ti-plasmit.

2.1.5.3. Thiết kế vectơ (Ti-plasmit) tái tổ hợp mang gen mã hoá McRIP

Sơ đồ thí nghiệm thiết kế vectơ pNOA+RIP mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + RIP + NOS

Sau khi tiến hành nghiên cứu bản đồ một số vectơ Ti-plasmit tái tổ hợp thuộc hệ thống pCAMBIA (một trong những thể hệ vectơ hai nguồn mới nhất) và pNOV (thể hệ vectơ chọn lọc tích cực đang được ưa chuộng hiện nay), chúng tôi nhận thấy pC1300+HAL1 và pNOV2819 là vật liệu đáp ứng yêu cầu thiết kế vectơ.

Trên cơ sở vectơ nguồn pNOV2819 và kết cấu gồm đoạn khởi động 35S 2X enhancer + đoạn kết thúc NOS tách từ vectơ pC1300+HAL1, chúng tôi đã thiết kế Ti-plasmit trung gian pNOA+35S+NOS. Đây là vectơ cơ sở để tạo Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP phục vụ cho công tác chuyển gen. Thí nghiệm thiết kế vectơ được trình bày trên Sơ đồ 13.



Sơ đồ 13. Thí nghiệm thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP

Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP có kích thước ~ 9,4 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 6 dòng tế bào chứa các plasmit có kích thước nhỏ hơn ADN plasmit đối chứng là vectơ trung gian. Các plasmit này được ký

hiệu là pNOA+RIP-3, 4, 7, 9, 14 và pNOA+RIP-18. Các dòng tế bào này được nuôi cấy và tách chiết plasmit để sử dụng trong các thí nghiệm kiểm tra tiếp theo.

Đã tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các Ti-plasmit tái tổ hợp kết quả cho thấy chúng tôi đã thiết kế được Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP, trong đó gen RIP được điều khiển biểu hiện bởi đoạn khởi động 35S 2X enhancer.

Tạo chủng A. tumefaciens mang Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-9

Ti-plasmit tái tổ hợp pNOA+RIP-9 sau khi thiết kế thành công được chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện ở điều kiện 25 μ F; 400 Ω ; 2,5 kV; 8-10 ms.

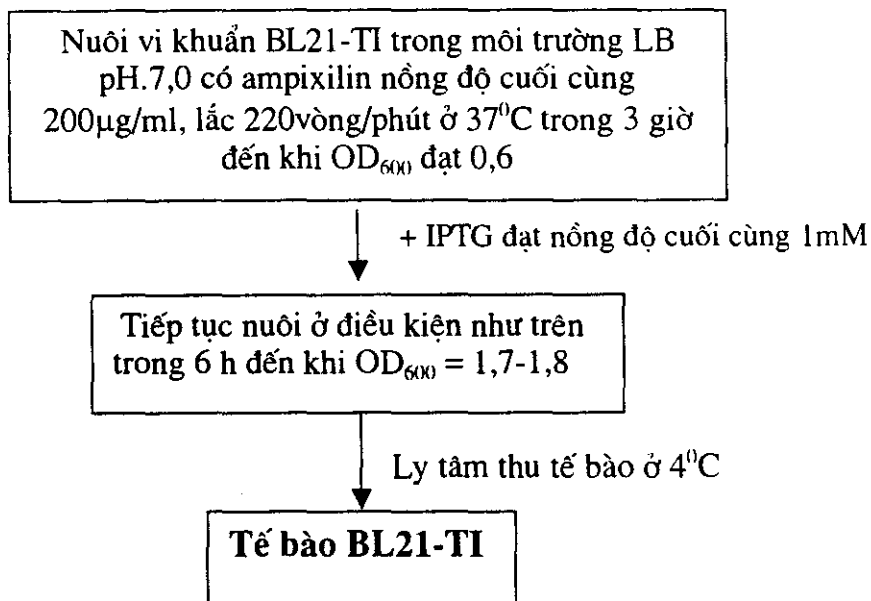
Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong tế bào *A. tumefaciens* bằng kỹ thuật PCR. Kết quả cho thấy đoạn gen RIP đã được nhân rất đặc hiệu, với kích thước ~ 0,8 kb phù hợp với mẫu đối chứng. Điều đó chứng tỏ đã thành công trong việc đưa đoạn gen RIP vào vectơ trung gian pNOA+35S+NOS và tạo được chủng *A. tumefaciens* EHA105:pNOA+RIP-9 tái tổ hợp mang gen RIP phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.

Các dòng *A. tumefaciens* chủng EHA105: pNOA+RIP-9 có chứa gen RIP đã được chuyển giao cho nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Lê Trần Bình (Phòng Công nghệ Tế bào thực vật - Viện Công nghệ Sinh học) và TS. Bùi Mạnh Cường (Bộ môn Công nghệ Sinh học - Viện Nghiên cứu Ngô) để tiến hành các thí nghiệm chuyển gen thực vật.

2.2. QUY TRÌNH

2.2.1. Quy trình thích hợp nuôi cấy *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp

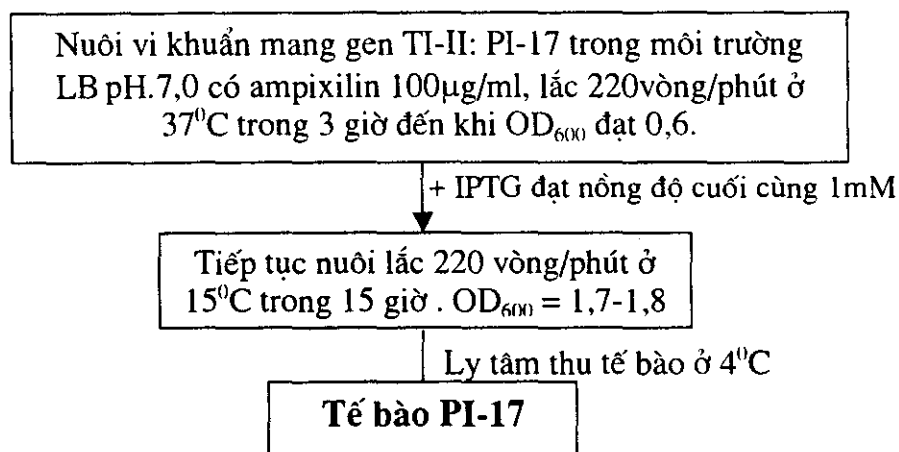
♣ Quy trình 1. Qui trình nuôi BL21-TI biểu hiện gen CMTI-V



Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Dùng tăm khử trùng, chấm một khuẩn lạc cho vào môi trường LB dịch thể pH7,0 có 200µg/ml Ampixilin, lắc 220 vòng/phút ở 37°C cho đến khi đo OD₆₀₀=1,7-1,75 (khoảng 16 giờ).
2. Cho dung dịch huyền phù vi sinh vật này vào môi trường LB dịch thể mới, với tỉ lệ sao cho OD₆₀₀ đạt khoảng 0,1. Nuôi cấy ở 37°C, lắc 200 vòng/phút khoảng 3 giờ.
3. Sau 3 giờ, kiểm tra OD₆₀₀=0,5-0,6 thêm IPTG đạt nồng độ cuối cùng trong môi trường là 1mM/ml, cùng điều kiện nhiệt độ và tốc độ lắc như trên, trong 6 giờ.
4. Sau 6 giờ biểu hiện protein tái tổ hợp, kiểm tra OD₆₀₀ = 1,7-1,8 là thời điểm đạt sinh khối nhiều nhất (thu được khoảng 5 gam tế bào/1lít môi trường nuôi cấy). Ly tâm thu tế bào ở 4°C, 5000 vòng/phút trong 10 phút, rửa tế bào bằng đệm TE 1 lần, ly tâm như trên bỏ hết dịch trong, giữ tế bào ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

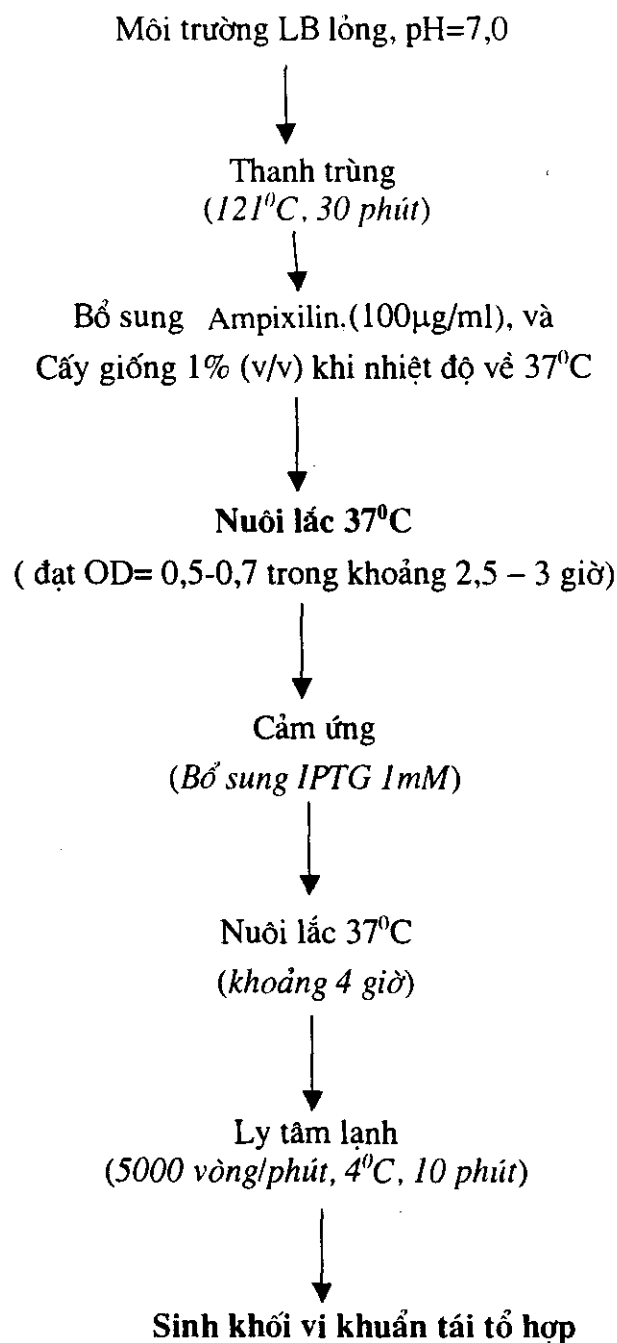
♣ **Quy trình 2. Quy trình nuôi cấy PI-17 biểu hiện gen MCoTI-II**



Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Dùng tăm khử trùng, chấm một khuẩn lạc vi khuẩn PI17 cho vào môi trường LB dịch thể pH7,0 có 100µg/ml Ampixilin, lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho đến khi đo OD₆₀₀=1,7-1,75 (khoảng 16 giờ).
2. Cho dung dịch huyền phù vi sinh vật này vào môi trường LB dịch thể mới, với tỉ lệ sao cho OD₆₀₀ đạt khoảng 0,1. Nuôi cấy ở 37°C, lắc 220 vòng/phút khoảng 3 giờ.
3. Sau 3 giờ, kiểm tra OD₆₀₀=0,5-0,6 thêm IPTG đạt nồng độ cuối cùng trong môi trường là 1mM/ml, lắc 200 vòng/phút ở 15°C trong 15 giờ.
4. Sau 15 giờ biểu hiện protein tái tổ hợp, kiểm tra OD₆₀₀=1,7 – 1,8 là thời điểm đạt sinh khối nhiều nhất (thu được khoảng 5 gam tế bào/1lít môi trường nuôi cấy). Ly tâm thu tế bào ở 4°C, 5000 vòng/phút trong 10 phút, giữ tế bào ở -20°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

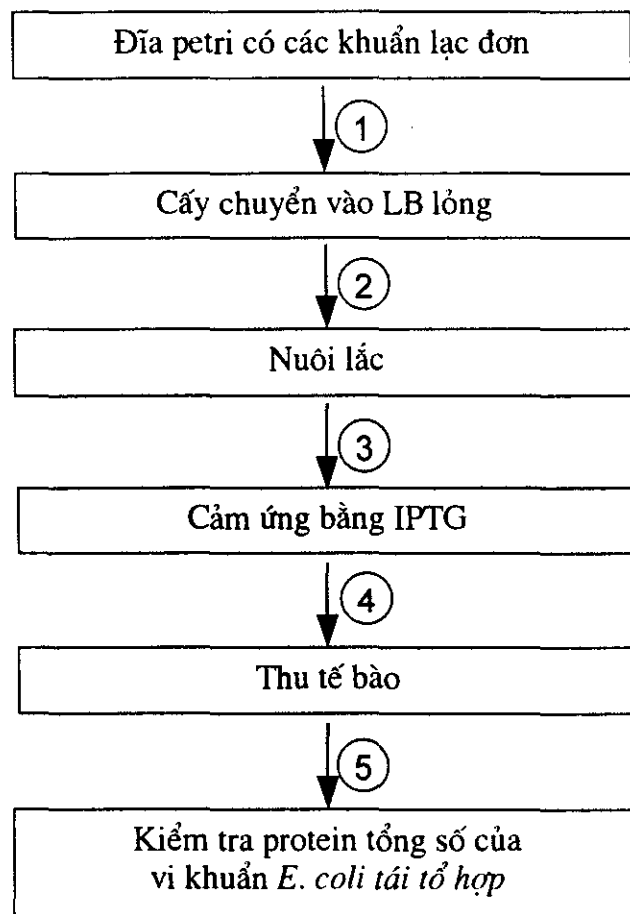
♣ **Qui trình 3. Quy trình nuôi chủng vi khuẩn *E. coli* sinh tổng hợp α -AI**



* Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Môi trường LB lỏng có pH 7,0 được thanh trùng 121⁰C, 30 phút
2. Để nguội môi trường đến khoảng 37⁰C rồi bổ sung ampicilin (100 μ g/ml) và cấy giống (đã nuôi tăng sinh qua đêm) 1% (v/v).
3. Nuôi khuẩn lắc (200 vòng/phút) ở 37⁰C cho đến khi đạt OD= 0,5-0,7 trong khoảng 2,5 – 3 giờ
4. Cảm ứng bằng IPTG đạt nồng độ cuối cùng là 1mM
5. Lắc ở 37⁰C trong 4 giờ
6. Ly tâm thu sinh khối tế bào ở 5000 vòng/phút, 4⁰C, 10 phút

♣ **Qui trình 4. Quy trình nuôi cấy *E. coli* tái tổ hợp chứa đoạn gen mã hoá RIP**



1. Cấy chuyển một khuẩn lạc đơn *E. coli* chủng BL21(DE3) mang vector pET21d(+) tái tổ hợp có chứa đoạn gen mã hoá RIP vào 50 ml môi trường LB lỏng có chứa ampicillin (nồng độ 50 µg/ml).
2. Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm (12-16 giờ).
3. Hoạt hóa tế bào: bổ sung 10 ml dịch nuôi vào 490 ml môi trường LB lỏng có chứa ampicillin (nồng độ 50 µg/ml) (tiến hành thí nghiệm với 5 bình nuôi có thể tích 2,5 lít). Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho tới khi OD 600nm của dịch nuôi đạt 0,5 - 0,7.
4. Cảm ứng bằng IPTG với nồng độ 0,7 mM. Nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C qua đêm (12-16 giờ).

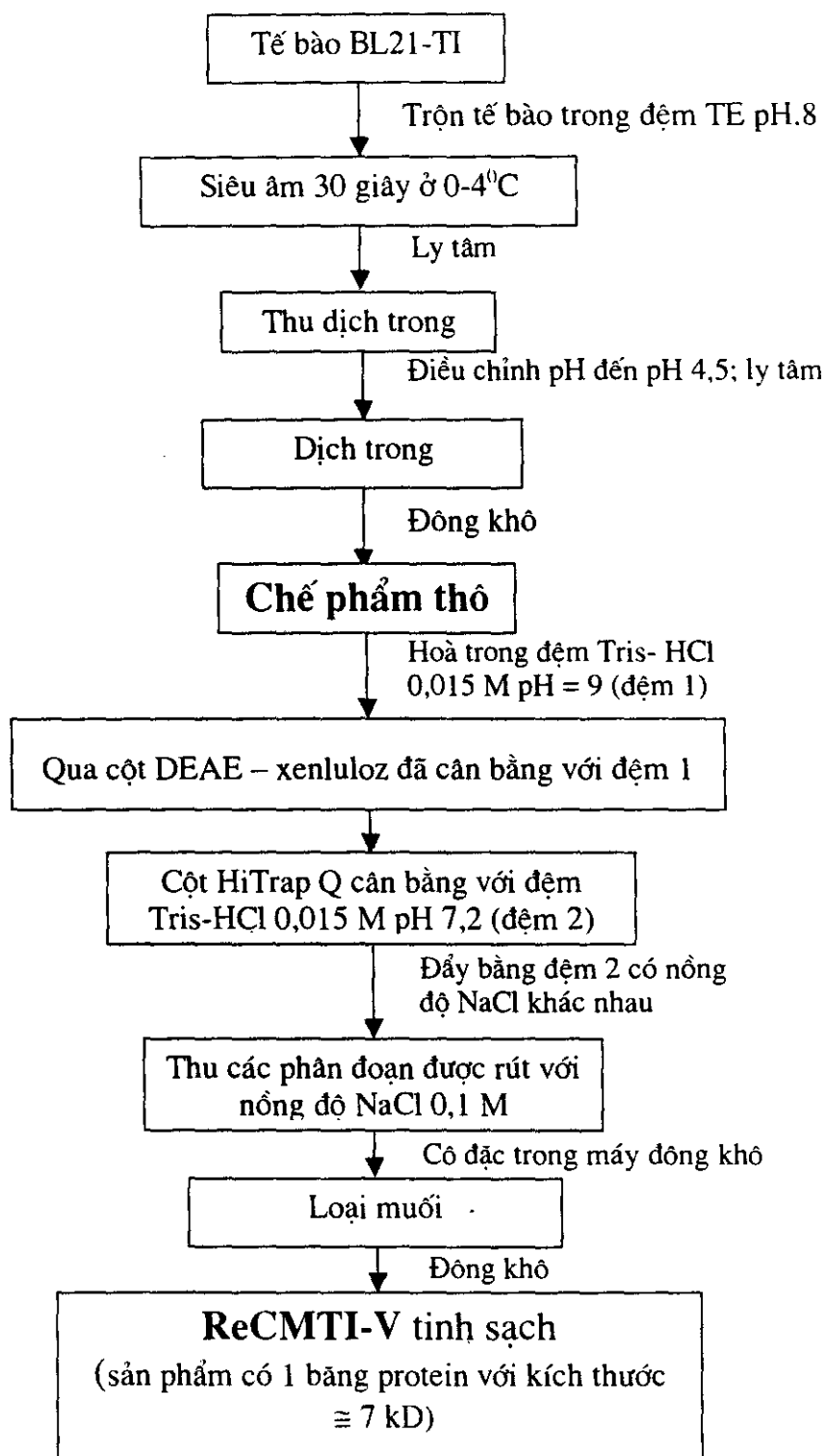
5. Chuyển dịch nuôi vào các ống ly tâm 0,5 lít. Ly tâm 6000 vòng/phút, 6 phút, 4°C (sử dụng rotor văng) dịch nuôi để thu sinh khối tế bào. Chuyển sinh khối tế bào sang các ống falcon 50 ml, bảo quản sinh khối tế bào ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Với các dòng tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3) mang vector pET21d(+) tái tổ hợp có chứa đoạn gen mã hoá RIP đã tạo ra được, chúng tôi đã tiến hành biểu hiện gen mã hóa RIP trong 300 lít môi trường LB lỏng có chứa ampicilin (nồng độ 50 µg/ml) theo các bước tương tự như trên. Lượng sinh khối vi sinh vật tái tổ hợp (có chứa RIP) thu được sau quá trình này là 3,3 kg. Sinh khối này được bảo quản ở - 20°C để phục vụ cho các nghiên cứu về tính chất RIP qua cột sắc ký trao đổi ion, thử nghiệm hoạt tính sinh học của RIP tinh sạch.

Vượt mức một quy trình so với đăng ký.

2.2.2. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch các protein tái tổ hợp

♣ *Qui trình 1. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReCMTI-V*



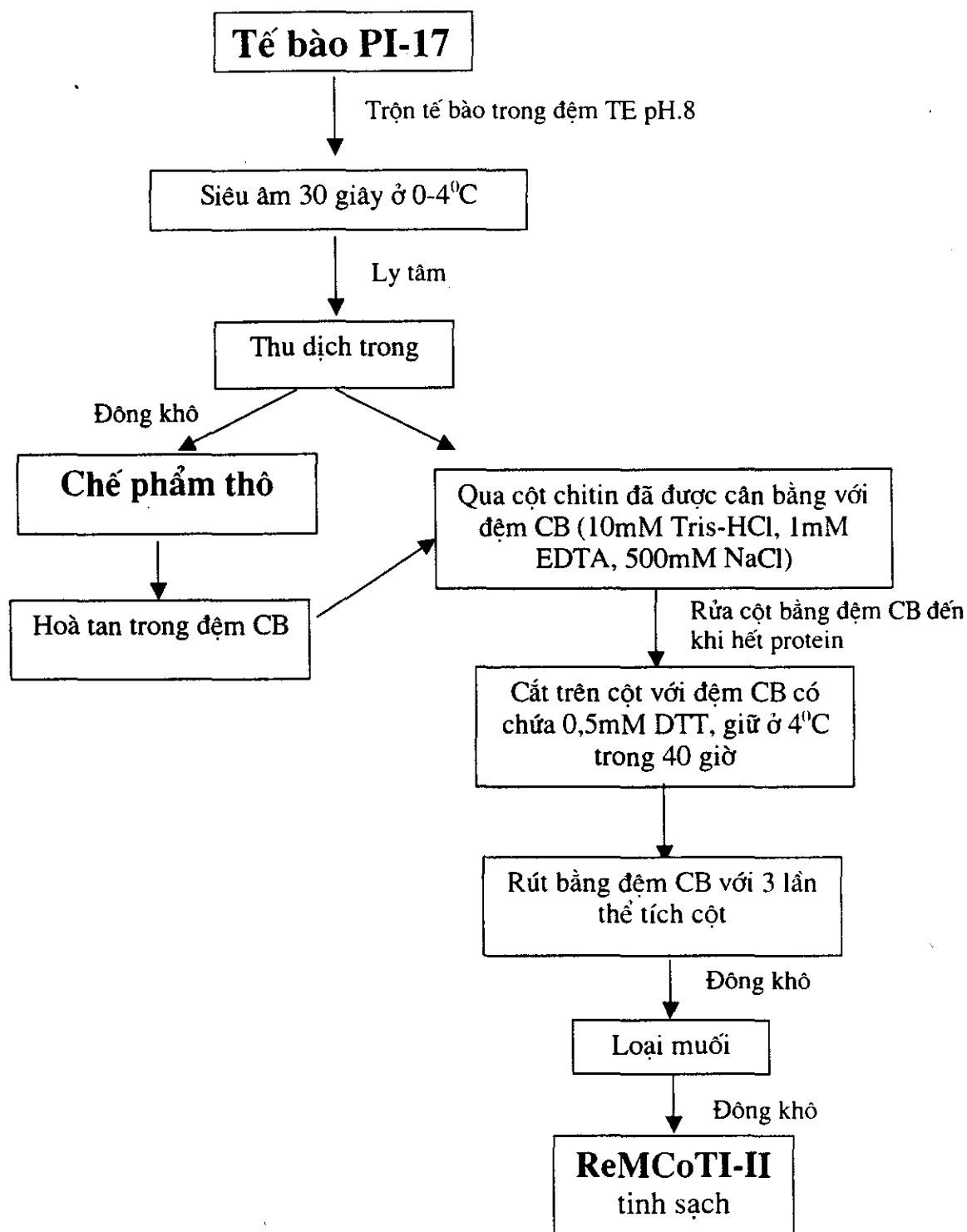
Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Thu nhận tế bào: Sau khi nuôi cấy (1 lít môi trường) vi khuẩn tái tổ hợp BL21-TI ở các điều kiện đã lựa chọn, li tâm 5000 vòng/phút ở 4°C. Loại bỏ dịch trong, thu tế bào, rửa tế bào bằng dung dịch đệm TE pH8 (10mM Tris pH8, 1mM EDTA) 1 lần, li tâm như trên, bỏ dịch trong, giữ tế bào ở -20°C.
2. Phá vỡ màng tế bào: trộn tế bào thu được trong 80ml đệm TE 8 (10mM Tris pH8, 1mM EDTA), siêu âm ở 0-4°C, 10 giây, lặp lại 3 lần, sau mỗi lần nghỉ 1 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4°C, thu dịch trong, thêm 20ml đệm TE pH8 vào phần xác tế bào, tiếp tục siêu âm lần thứ 2, ly tâm. Đôn dịch trong của 2 lần li tâm để phân tích tiếp.
3. Chỉnh pH dung dịch trong đến pH4,5. Ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C, thu dịch trong, loại bỏ cặn.
4. Đông khô dịch trong, chia vào các lọ. Thu được chế phẩm thô, bảo quản ở 4°C.
5. Hoà chế phẩm thô trong 60ml đệm Tris-HCl 0,015M pH 7,2 (đệm 1).
6. Chuẩn bị cột DEAE – xenluloz: gel DEAE – xenluloz đã được cân bằng với đệm 1. Dung dịch chế phẩm thô được cho qua cột với tốc độ 40ml/giờ để loại bỏ chất màu. Phần hứng xuống cột phải đảm bảo trong suốt.
7. Chuẩn bị cột HiTrap Q: cột HiTrap Q được cân bằng trong đệm Tris-HCl 0,015 M pH 9 (đệm 2). Dịch hứng xuống cột DEAE-xenluloza trên được cho qua cột HiTrap Q với tốc độ 2ml/min cho đến hết. Rửa cột bằng đệm 2 cho đến khi dịch hứng xuống cột hết protein (thử protein với thuốc thử Folin).
8. Loại protein tạp bằng dung dịch đệm 1 có 0,04 NaCl cho đến khi dịch qua cột hết protein.
9. Rút protein đích ra khỏi cột HiTrap Q bằng đệm 1 với 0,1M NaCl đến khi hết protein thì dừng lại (thử protein với thuốc thử Folin). Đông khô, cô đặc phần thu được.
10. Loại muối các phân cô đặc được bằng cột loại muối HiTrap: axit axetic 0,005M được dùng để cân bằng cột cũng như để rút protein. Thu các phân đoạn xuống cột, thử protein với thuốc thử Folin, thử muối bằng AgNO_3 1%. Thu các phân đoạn có protein mà không có NaCl để đông khô.

11. Điện di trên gel polyacrylamit 18% SDS để kiểm tra sản phẩm thu được: hoà tan một ít sản phẩm vào 20µl đệm TE pH8, thêm 4µl đệm mẫu 5X có SDS và β -mercaptoethanol, đun cách thuỷ trong 8 phút, ly tâm 14.000 vòng/phút, thu dịch trong để lên gel, nhuộm gel với dung dịch Coomassie brilliant blue R-250 1% trong metanol : axit axetic : nước (4:1:5), tẩy bằng dung môi trên cho đến khi xuất hiện các băng tím trên nền gel trong suốt.

12. Dồn sản phẩm đã khô vào lọ, đóng nắp, dán nhãn.

♣ Quy trình 2. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReMCoTI-II



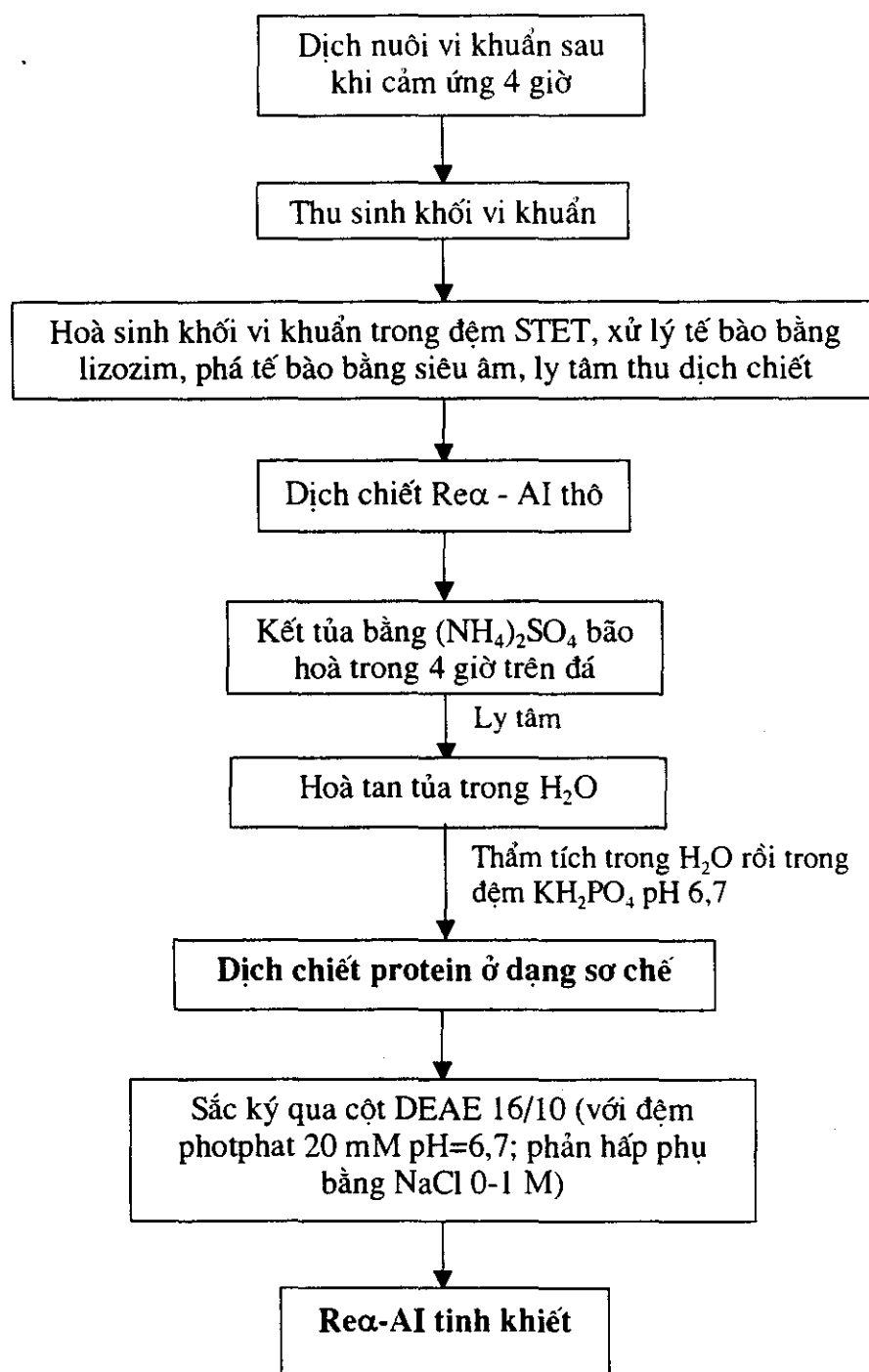
Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Thu nhận tế bào: Sau khi nuôi cấy (1 lít môi trường) vi khuẩn tái tổ hợp PI-17 ở các điều kiện đã lựa chọn, li tâm 5000 vòng/phút ở 4°C. Loại bỏ dịch trong, thu tế bào, giữ ở -20°C).
2. Phá vỡ màng tế bào: trộn tế bào thu được trong 60ml đệm TE 8 (10mM Tris pH8, 1mM EDTA), siêu âm ở 0-4°C, 10 giây, lặp lại 3 lần, sau mỗi lần nghỉ 1 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở 4°C. Loại bỏ xác tế bào, thu dịch trong để chuẩn bị cho qua cột chitin. Lấy 20µl dịch trong (ký hiệu LC) để điện di.
3. Chuẩn bị cột chitin: 15-20ml gel chitin có thể sử dụng cho tế bào thu được từ 1 lít dịch nuôi cấy. Cân bằng cột trong đệm CB (Column Buffer: 20mM Tris-HCl 1M pH8, 500 mM NaCl, 1mM EDTA) ở 4°C (với khoảng 10 lần thể tích cột). Lấy 20µl gel (ký hiệu N).
4. Lên cột: cho dịch trong thu được qua cột chitin với tốc độ từ 0,5-1ml/min. Lưu ý dịch lên cột phải luôn được làm lạnh ở 4°C.
5. Rửa cột: Sau khi kết thúc lên cột, rửa cột bằng đệm CB với tốc độ 6-8ml/min, thông thường, cần ít nhất 10 lần thể tích cột. Phần hứng qua cột được chia làm các phân đoạn, ký hiệu ft1, ft2... (flow through). Rửa đến khi dịch hứng hết protein (thử với thuốc thử Folin hoặc đo ở OD₂₈₀). Lấy 20µl gel chitin (ký hiệu N₁) để điện di.
6. Chuẩn bị đệm CB1: gồm đệm CB chứa 50mM DTT, với thể tích gấp 3 lần thể tích cột. Đệm CB1 chỉ được pha ngay trước khi dùng. Cho đệm CB1 đã được làm lạnh qua cột với tốc độ sao cho thời gian chảy qua cột không quá 30 phút. Cuối cùng giữ đệm trên cột cách mặt gel 1cm. Khi cho CB1 qua cột, hứng phần xuống cột với mỗi phân đoạn 10ml. Ký hiệu qf1, qf2.... để kiểm tra xem protein đích có bị đẩy xuống cột không. Cột được giữ ở 4°C trong 40 giờ. Trong quá trình này xảy ra phản ứng tự cắt protein đích (MCoTI) khỏi protein dung intein tag.
7. Rút protein đích ra khỏi cột bằng đệm CB: Rút hết phần đệm trên mặt gel hứng vào một ống, cho tiếp đệm CB lên cột gel và tiếp tục thu mỗi phân đoạn 2ml. Thể tích đệm CB dùng để rút protein đích vào khoảng 10 lần thể tích cột. Lấy 20µl gel chitin trên cột (ký hiệu N₂) để điện di.
8. Điện di trên gel poliacrilamit 12,5% SDS để kiểm tra quá trình tinh sạch qua cột chitin, tiến hành như sau: lấy 20µl các mẫu LC, ft1, ft2 ..., N1, qf1, qf2.... N2 trộn

với 4 μ l đệm mẫu 5X có SDS và β -mercaptoetanol, đun cách thủy trong 8 phút, ly tâm 14.000 vòng/phút, thu dịch trong để lên gel. nhuộm gel với dung dịch Coomassie brilliant blue R-250 1% trong metanol : axit axetic : nước (4:1:5), tẩy bằng dung môi trên cho đến khi xuất hiện các băng tím trên nền gel trong suốt.

9. Loại muối các phân đoạn bằng cột loại muối HiTrap: axit axetic 0,005M được dùng để cân bằng cột cũng như để rút protein. Thu các phân đoạn xuống cột, thử protein với thuốc thử Folin, thử muối bằng AgNO_3 1%. Thu các phân đoạn có protein mà không có NaCl để đông khô.
10. Đồn sản phẩm đã khô vào lọ, đóng nắp, dán nhãn.

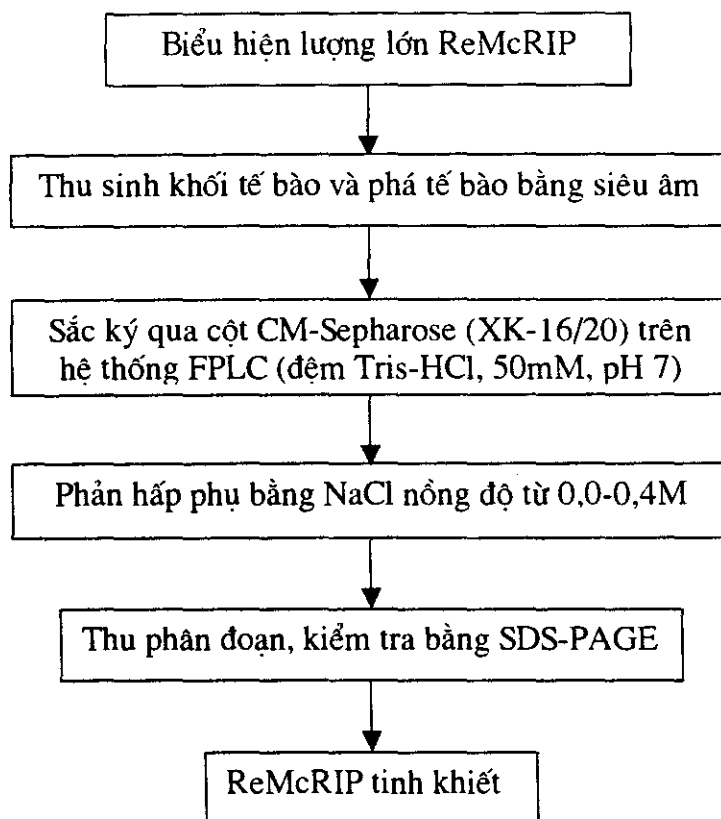
♣ Quy trình 3. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm Re α -AI



** Các bước tiến hành cụ thể như sau:*

1. Dịch nuôi vi khuẩn sau khi cảm ứng 4 giờ, ly tâm 6.000 vòng/phút trong 10 phút để thu sinh khối.
2. Trộn sinh khối vi khuẩn trong đệm STET.
3. Xử lý bằng lizozim (nồng độ 1µg/ml) ở 30°C trong 30 phút.
4. Tiến hành siêu âm phá tế bào theo chu kỳ 15 giây nghỉ 15 giây trong vòng 10 phút.
5. Ly tâm thu dịch chiết thô: 12.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C.
6. Kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 85% bão hoà trong 4 giờ ở $t^\circ < 0^\circ\text{C}$.
7. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C thu kết tủa.
8. Hoà tan tủa trong H_2O khử ion, ly tâm thu dịch trong.
9. Thẩm tích trong nước và đệm KH_2PO_4 20mM (pH=6,7) ít nhất 12 giờ ở 4°C, dịch chiết thu được là dạng chế phẩm sơ chế.
10. Tinh sạch dịch chiết protein ở dạng sơ chế trên cột sắc ký trao đổi ion DEAE cellulose 16/10. Quá trình tinh sạch được thực hiện trên hệ thống tinh sạch tự động FPLC, tốc độ 0,5ml/phút, phân đoạn 2ml/ống. Cột được cân bằng với đệm photphat 20 mM pH=6,7. Thể tích lên cột 5 ml. rửa cột bằng đệm cân bằng cột. Phản hấp phụ bằng đệm cân bằng có gradient NaCl từ 0-1M.

♣ Quy trình 4. Quy trình sản xuất và phương pháp tinh sạch chế phẩm ReMcRIP



Các bước tiến hành cụ thể như sau:

1. Sau khi biểu hiện lượng lớn ReMcRIP tiến hành ly tâm 6.000 vòng/phút trong 6 phút ở 4°C để thu sinh khối tế bào. Bổ sung 30 ml đệm (Tris.HCl 50 mM pH7, EDTA 20 mM pH7, Triton 0,01%, lizozim 0,3 µg/ml) vào 3g sinh khối tế bào. Ủ 37°C và vortex nhằm hòa tan các tế bào. Chuyển ống falcon có tế bào vào trong đá, để 30 phút. Phá tế bào bằng siêu âm trong 20 phút (cho đến khi dung dịch không còn nhớt). Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 20 phút. Chuyển phần dịch sang ống falcon mới và bỏ phần cặn.
2. Chuyển phần dịch lên cột CM-Sepharoz (XK-16/20) với tốc độ dòng chảy 60 ml/giờ trên hệ FPLC (Amersham Pharmacia Biotech). Sử dụng đệm Tris.HCl 50 mM pH 7.
3. Các chất không bám trên cột được rửa bằng đệm Tris.HCl 50 mM pH 7 cho đến khi giá trị A_{280nm} trở lại đường nền. Tốc độ dòng chảy vẫn duy trì ở 60 ml/giờ.

4. ReMcRIP được thổi ra khỏi cột bởi gradient nồng độ NaCl (0.0 M - 0.4 M) trong đệm Tris.HCl 50 mM pH 7 với tốc độ dòng chảy 60 ml/giờ và thể tích mỗi phân đoạn là 1 ml. Protein trong mỗi phân đoạn được kiểm tra bằng SDS-PAGE 12,5%.
5. Lựa chọn các phân đoạn có nồng độ ReMcRIP cao, chuyển vào các ống penicillin (có thể bảo quản ở - 20⁰C). Đông khô ReMcRIP ở áp suất khoảng 100 mtor và nhiệt độ khoảng - 102⁰C. Bảo quản ReMcRIP ở -20⁰C để giữ hoạt tính của ReMcRIP.

Vượt mức đăng ký một quy trình

♦ Hiệu suất tinh sạch các protein tái tổ hợp

ReCMTI-V:

Bảng 1. Tóm tắt kết quả tinh sạch ReCMTI-V

Số TT	Giải đoạn tinh sạch	Protein		TIA		HĐR (mIU/mg protein)	Số lần tinh sạch
		mg	%	mIU	%		
1	Dịch sonicate của tế bào tái tổ hợp thu được từ 1 lít	890,89	100	Protein tạp nhiều không xác định được			
2	Sau khi xử lý loại các protein tạp	142,54	16	76,0	100	0,533	1,0
3	Loại màu qua cột DEAE – xenluloz	133,63	15	75,5	99,3	0,565	1,06
4	Qua cột HiTrap Q phản hấp phụ ở 0,1 M NaCl, loại muối, đông khô	115,8	13	74,9	98,5	0,647	1,21

HĐR: Hoạt động riêng

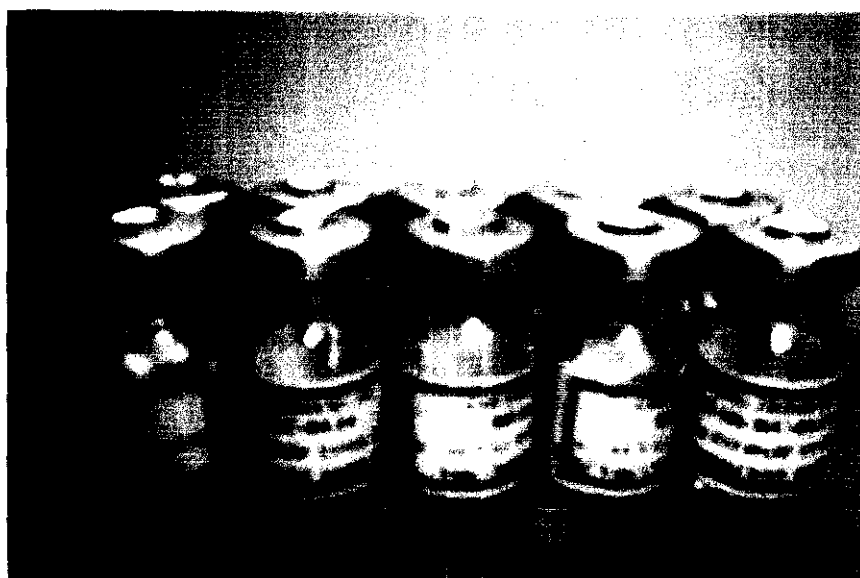
Reα-AI:

Bảng 2. Hoạt độ của Reα-AI qua các bước tinh sạch

Các bước tinh sạch	Tổng thể tích (ml)	Hàm lượng protein (mg)	Hoạt độ (U)	Hoạt độ riêng (U/mg protein)	Mức độ sạch (lần)	Hiệu suất (%)
Dịch thô	45	185,0	963,0	5,20	1,00	100
Sau kết tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15	56,4	900,0	15,95	3,00	93,45
Dịch sau sắc ký qua cột DEAE -Xelluloz	24	7,2	403,2	56,00	10,76	41,86

ReMcRIP:

- ReMcRIP chiếm khoảng 30% protein tổng số của vi khuẩn *E. coli*, trong đó khoảng 80% ReMcRIP ở dạng hoà tan trong dung dịch đệm Tris-HCl 50mM, pH 7; EDTA 20 mM, pH 7.
- ReMcRIP hấp phụ tốt trên cột CM-Sepharoz (XK-16/20): khoảng 90% ReMcRIP của 0,3 ml dịch nuôi được đưa lên cột dài 12-15 cm.
- ReMcRIP được phản hấp phụ ở nồng độ NaCl từ 0,15-0,27M.
- Kiểm tra độ sạch và nồng độ ReMcRIP: 1 lit dịch nuôi *E. coli* thu được khoảng 30 mg ReMcRIP tinh sạch.



Các chế phẩm: ReCMTI-V; Re α AI; ReRIP

2.2.3. Quy trình sử dụng thử nghiệm (qui mô phòng thí nghiệm) các chế phẩm protein tái tổ hợp

2.2.3.1. Thử nghiệm tác dụng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu

Nơi thực hiện: Khoa Đông- Cẩm máu – Viện Huyết học truyền máu trung ương

Người thực hiện: Thạc sĩ Y khoa – Bác sĩ Nguyễn Thị Nữ - Chủ nhiệm khoa

ReCMTI-V hoà tan trong dung dịch NaCl 0,9%, trộn với huyết tương bình thường (HTBT), xác định các chỉ số sau:

- APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) để đánh giá đường đông máu nội sinh.
- PT (Prothrombin Time) để đánh giá đường đông máu ngoại sinh.
- TT (Thrombin Time) để đánh giá đoạn trung chuyển từ fibrinogen thành fibrin dưới tác dụng của thrombin.

Mẫu đối chứng thay ReCMTI-V bằng dung dịch NaCl 0,9% với cùng thể tích.

Kết quả được trình bày trên bảng 3 và 4.

Bảng 3: Thử tác dụng của chế phẩm ReCMTI-V đến quá trình đông máu

Các chỉ số phân tích	Thí nghiệm Dung dịch ReCMTI-V (55mIU/ml) + HTBT (tỉ lệ 1:1)	Đối chứng Dung dịch NaCl 0,9% + HTBT
APTT (giây)	60,3	40,2
TT (giây)	18,3	22,3
PT (giây)	13,0	14,3

Kết quả trên bảng 3 cho thấy khi có ReCMTI-V giá trị APTT tăng lên rõ rệt nghĩa là kéo dài thời gian đông máu nội sinh so với đối chứng, như vậy ReCMTI-V có tác dụng ức chế đường đông máu nội sinh. Từ kết quả trên, đã tiến hành thử tác dụng các nồng độ khác nhau của ReCMTI-V đến APTT (bảng 4).

Bảng 4: Kết quả đánh giá tác dụng của ReCMTI-V đến con đường đông máu nội sinh (chỉ số ATTP)

Số TT	Mẫu pha trộn ReCMTI-V với HTBT		ATTP (giây)					
			Thí nghiệm (có ReCMTI-V)		Đối chứng (thay ReCMTI-V bằng NaCl)		HTBT	
			Không ủ	ủ ở 37°C/1giờ	Không ủ	ủ ở 37°C/1giờ	Không ủ	ủ ở 37°C/1giờ
	Thể tích ReCMTI-V	Thể tích HTBT	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1.	1	1	52,3	102,0	39,3	39,5	29,3	29,5
2.	1	2	44,5	80,2	36,1	36,6	29,3	29,5
3.	1	3	40,5	56,8	34,0	34,8	29,3	29,5
4.	1	4	35,5	48,5	32,2	33,0	29,3	29,5
5.	1	5	34,0	44,1	31,0	32,1	29,3	29,5

Chú thích: Mẫu ReCMTI-V: 1ml có 85mg protein, 55mIU ;

HTBT: Huyết tương bình thường ;

Đối chứng: Thay dung dịch ReCMTI-V bằng dung dịch NaCl 0,9% (cùng thể tích)

2.2.3.2. Thử nghiệm tác dụng của chế phẩm Re α - AI

Chúng tôi đã tiến hành thăm dò khả năng diệt một đục hạt (ngô, đậu) của chế phẩm Re α - AI theo các nội dung như sau :

- Khả năng diệt côn trùng, ấu trùng (một đục hạt, bọ cánh cứng, bọ cánh vẩy) trên các đối tượng ngô, đậu, thóc theo trọng lượng và thời gian. Chế phẩm Re α -AI được pha loãng theo các nồng độ khác nhau sau đó được phun lên các loại hạt ngũ cốc đã được nghiền nhỏ theo tỷ lệ 20 ml dịch pha loãng/ 1kg ngô. Kết quả cho thấy với hàm lượng 0,1 – 0,4% trong thời gian 5 – 7 ngày diệt được 50-60%.

- Nếu cho ăn trực tiếp với liều lượng 0,25%, sau 8 ngày mẫu thí nghiệm một chết hoàn toàn, còn mẫu đối chứng không có con nào chết (Kết quả thí nghiệm của Viện Cơ điện và Công nghệ sau thu hoạch).

2.2.3.3. Thử nghiệm tác dụng của chế phẩm ReMcRIP đến nấm mốc và vi khuẩn

Chúng tôi đã kết hợp với các nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Nguyễn Thuý Châu thuộc Viện Cơ khí nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch, Bộ Nông nghiệp và Phát

triển nông thôn tiến hành các nghiên cứu về tác động của ReMcRIP tinh sạch lên: một gạo; nấm mốc (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*). Ngoài ra, chúng tôi đã kết hợp với các nhóm nghiên cứu của Học viện Quân Y (GS. TS. Lê Bách Quang) và Phòng Vi sinh vật học phân tử - Viện Công nghệ Sinh học (TS. Nguyễn Thị Kim Cúc) tiến hành các nghiên cứu về tác động của ReMcRIP tinh chế lên vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas putida*). Kết quả bước đầu cho thấy ReMcRIP có khả năng ức chế mạnh sự sinh trưởng của hai loài vi khuẩn nói trên.

2.3. CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC ĐÃ CÔNG BỐ

2.3.1. Các bài báo

1. **Synthesis, cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for MCoTI-II.** Phạm Thị Trân Châu, M.K. Reddy, Đào Thị Thuý, Hoàng Thu Hà, Lê Nguyên Dũng, Laurent Chiche (2005). *VNU. Journal of science, Nat., Sci & Tech.* 1(20): 8-18.
2. **Tách dòng gen mã hoá một chất ức chế triplexin của hạt bí đỏ (*Cucurbita maxima*) CMTI-V và biểu hiện ở *E.coli*.** Đào Thị Thuý, Nguyễn Quỳnh Uyên, Nguyễn Thị Bích Hậu, Võ Thị Thương Lan và Phạm Thị Trân Châu (2004). *Tạp chí Khoa học, ĐHQGHN, KHTN & CN*, 3(20): 1-10.
3. **Thiết kế Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen TI mã hoá protein ức chế triplexin phân lập từ hạt gấc (*Momordica cochinchinensis*) – MCoTI-II.** Lê Thu Hiền, Đào Thị Thuý, Phan Thị Hà, Nguyễn Đăng Tôn, Nông Văn Hải, Phạm Thị Trân Châu (2004). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2(3): 335-344.
4. **Tinh chế và phân tích khối phổ protein bất hoạt ribosome tái tổ hợp từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.).** Nguyễn Đình Cường, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Đặng Thành Nam, Phan Văn Chi (2004). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(2): 217-226.
5. **Tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang gen mã hóa protein bất hoạt ribosome (RIP) từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.) để chuyển vào cây trồng.** Lê Thị Thu Hiền, Đào Minh Châu, Nguyễn Đình Cường, Phạm Thu Thủy, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình (2004). *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2(4): 461-470.
6. **Biểu hiện gen mã hoá protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn *Escherichia coli*.** Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thuỳ Dương, Lê Thị Thu Hiền, Lương Thị Thu Hương, Trần Thị Phương Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải (2003). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(4): 451-460.
7. **Điều tra sự phân bố và nghiên cứu một số tính chất của protein kìm hãm amylaz (α -AI) từ một số cây họ đậu (*Fabaceae*).** Đỗ Ngọc Liên, Đặng Thị Thu (2002). *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng*, 1: 39-44.

2.3.2. Các báo cáo tại Hội nghị trong và ngoài nước

1. **Synthesis, cloning and expression in *E. coli* of a gene coding for MCoTI-II.** Tran Chau Thi Pham *et. al...* (2004) *17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference. Genomics and Health in 21st Century Bangkok, Thailand November 22-26, 2004.* Program and abstracts OP-C9, pp. 87. (oral presentation).
2. **Purification of a recombinant trypsin inhibitor CMTI-V.** Dang Xuan Nghiem, Phan Thi Ha, Nguyen Phuong Nam and Pham Thi Tran Chau (2004). *17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting / 7th A-IMBN Conference. Genomics and Health in 21st Century Bangkok, Thailand November 22-26, 2004.* Ibid. OP-6.23, p.167 (poster).
3. **Expression of gene encoding α -amylase inhibitor from common bean (*Phaseolus vulgaris*) in *Escherichia coli*.** Đặng Thị Thu, Trương Quốc Phong, Nông Văn Hải (2003). *Proceeding of the 8th Asean food conference 8-11 October 2003, Ha noi, Vietnam*, 1: 30-34.
4. **Tripsin inhibitors (TIs) from *Momordica cochinchinensis*.** Pham Thi Tran Chau, Le Nguyen Dung, Laurent Chiche (2002). *16th FAOBMB Symposium, Taipei, Sept. 20-22, 2002. From genes to proteins: Frontiers in Biochemistry and Molecular Biology. Program Book* . OP. 22, p.33 (oral presentation).

2.4. ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

* Khoá luận tốt nghiệp

1. **Đề tài:** Thiết kế vectơ biểu hiện chất kìm hãm α -amilaza từ đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*) để sử dụng trong bảo quản sau thu hoạch.
Sinh viên : Phạm Ái Nhi
Năm bảo vệ: 2001.
2. **Đề tài:** Tổng hợp nhân tạo gen mã hoá cho protein ức chế tripsin ở bí ngô (*Cucurbita maxima*)
Sinh viên: Nguyễn Thị Bích Hậu (hệ cử nhân tài năng)
Năm bảo vệ: 2002.

3. Đề tài : Biểu hiện gen mã hoá protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn *Escherichia coli*.

Sinh viên: Phạm Minh Thu

Năm bảo vệ: 2003.

4. Đề tài: Biểu hiện và tinh chế protein lai ATS-TBK ở *E. coli*

Sinh viên *Giang Thị Hương Huyền*

Năm bảo vệ: 2003

5. Đề tài: Thiết kế vectơ Ti-plasmit mang gen mã hoá chất kìm hãm α -amilaza từ đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*) làm nguyên liệu chuyển gen thực vật.

Sinh viên : *Vi Quốc Hạnh*

Năm bảo vệ: 2004.

6. Đề tài: Tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumerfaciens* mang gen mã hóa protein bất hoạt ribosome (RIP) từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.) để chuyển vào cây trồng.

Sinh viên: *Đào Minh Châu*

Năm bảo vệ: 2005

* *Luận án thạc sĩ:*

1. Đề tài: Nghiên cứu biểu hiện và tinh chế minitricobakin

Học viên: *Trịnh Tất Cường*

Năm bảo vệ: 2003

2. Đề tài: Tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy và một số đặc tính của protein tái tổ hợp kìm hãm α -amilaza từ vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE23).

Học viên: *Đào Hồng Vân*

Năm bảo vệ: 2004

3. Đề tài: Nghiên cứu các phương pháp tinh sạch một chất ức chế tripxin tái tổ hợp.

Học viên: *Đặng Xuân Nghiêm*.

Năm bảo vệ: sẽ bảo vệ năm 2005 (do học viên tham gia lớp học DAAD, học tiếng Đức nên phải lùi thời gian bảo vệ).

2.4. BẢNG THỐNG KÊ KẾT QUẢ ĐỐI CHIẾU VỚI NỘI DUNG ĐÃ ĐĂNG KÝ CỦA SẢN PHẨM TẠO RA

S TT	Đã đăng ký		Kết quả đã đạt được		
	Tên sản phẩm và chỉ tiêu chất lượng chủ yếu	Mức số lượng và chất lượng cần đạt của cả đề tài	Số lượng sản phẩm tạo ra	Chất lượng sản phẩm tạo ra	Đánh giá
(1)	(2)	(4)	(5)	(6)	(7)
1.	VẬT LIỆU				
	* Gen tái tổ hợp	3 gen tái tổ hợp có hoạt lực ổn định	Tổng số là 04 gen tái tổ hợp - 01 gen tái tổ hợp mã hoá MCoTI -II từ cây gấc (<i>Momordica cochinchinesis</i>) - 01 gen tái tổ hợp mã hoá CMTI-V từ cây bí đỏ (<i>Cucurbita maxima</i>) - 01 gen tái tổ hợp mã hoá gen RIP từ cây mướp đắng Việt Nam (<i>Momordica charantia</i>) - 01 gen tái tổ hợp mã hoá gen α -AI từ cây đậu cove (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Cả 4 gen tái tổ hợp đều có hoạt lực ổn định Các chủng <i>E. coli</i> mang các gen trên đã được bảo quản lâu dài ở - 80°C	Vượt chỉ tiêu 01 gen TI Đạt yêu cầu kỹ thuật

(1)	(2)	(4)	(5)	(6)	(7)
	* Sinh khối VSV tái tổ hợp	3-4 kg	3 kg sinh khối vi sinh vật tái tổ hợp : - 0,2kg sinh khối vi sinh vật chứa ReMCoTI-II: nuôi cấy trên máy lắc và lên men nhiều đợt, mỗi đợt 5 – 7 lít.	Kiểm tra bằng điện di trên gel poliacrilamit (PAGE), có băng ReMCoTI-II (có Mr >3kD) ở dạng dung hợp với intein tag (có Mr=55kD), đúng theo tính toán lý thuyết (58kD)	Đạt yêu cầu Đã sử dụng hết để thăm dò các điều kiện phá vỡ tế bào và tạo chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật. Khi cần, có thể tạo sinh khối lớn bằng cách lên men các chủng nói trên.
			- 0,8 kg sinh khối vi sinh vật chứa ReCMTI-V: nuôi cấy trên máy lắc và lên men nhiều đợt, mỗi đợt 5 – 7 lít.	Kiểm tra bằng PAGE, có băng protein tái tổ hợp với khối lượng phân tử đúng theo tính toán lý thuyết, khoảng 7kD.	
			- 1,2 kg sinh khối vi sinh vật chứa ReRIP: lên men lượng lớn 10 lần, mỗi lần 10 lít dịch nuôi và thu được 100-130g sinh khối VSV.	Có chứa protein tái tổ hợp đúng kích thước khoảng 30kD	
			- 0,8 kg sinh khối vi sinh vật chứa α -AI: lên men lượng lớn 9 lần, mỗi lần 10 lít dịch nuôi và thu được 80-100g sinh khối VSV.	Kiểm tra bằng PAGE có chứa protein tái tổ hợp đúng theo tính toán lý thuyết (khoảng 16 kD).	

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật	0,5-1kg	0,5 kg: ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Reα-AI, ReRIP: - 0,05kg chế phẩm kỹ thuật ReMCoTI-II - 0,150 kg chế phẩm kỹ thuật ReCMTI-V. - 0,2kg chế phẩm kỹ thuật ReRIP - 0,1kg chế phẩm kỹ thuật Re α -AI	Đã loại được nhiều protein tạp của tế bào vi khuẩn.	Đạt yêu cầu kỹ thuật - Một phần chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật được sử dụng để thăm dò các phương pháp tinh sạch và chọn phương pháp thích hợp để tạo protein tái tổ hợp tinh sạch. - Phần còn lại dùng để tạo protein tái tổ hợp tinh sạch theo phương pháp tối thích.

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Chế phẩm protein tinh sạch	1-5 gam, có độ đồng nhất điện di	4g protein tái tổ hợp tinh sạch: - 0,2g ReMCoTI-II - 0,8g ReCMTI-V - 1g Reα-AI - 2g ReRIP	Có độ đồng nhất điện di, có khối lượng phân tử đúng, có hoạt tính sinh học.	Đạt yêu cầu kỹ thuật (các chế phẩm protein tinh sạch được sử dụng cho các thí nghiệm về thử hoạt tính sinh học trên các đối tượng sinh vật khác nhau)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Thiết kế các vectơ phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng	Có các chủng <i>Agrobacterium</i> thích hợp để chuyển gen vào cây trồng	+ <i>Đã thiết kế được 3 vectơ trung gian để chuyển gen vào cây trồng:</i> - 01 vectơ pC1300+TI mang gen MCoTI-II - 01 vectơ pNOA2819+RIP mang gen RIP - 01 vectơ pC1301+αAI mang gen αAI + <i>Đã tạo được 6 chủng Agrobacterium mang các gen đích để phục vụ chuyển gen vào cây trồng:</i> - 02 chủng: pCTI-5 và pCTI-6 mang gen MCoTI-II - 02 chủng: EHA105 và LBA4404 mang gen RIP - 02 chủng: pCHA6 và pCHA7 mang gen αAI	- Các vectơ tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng điện di, bảo quản lâu dài ở - 80°C - Các chủng <i>A. tumefaciens</i> mang các gen trên có đủ tiêu chuẩn để phục vụ cho nghiên cứu chuyển vào cây trồng, được bảo quản lâu dài ở - 80°C	Đạt yêu cầu đã đăng ký Đạt yêu cầu đã đăng ký

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
2.	QUI TRÌNH				
	* Qui trình thích hợp nuôi cấy <i>E.coli</i> tái tổ hợp	3 qui trình biểu hiện protein tái tổ hợp chiếm 30% protein tổng số	4 qui trình sản xuất ở qui mô PTN (lên men mỗi đợt từ 2-10 lít) - PI-17 biểu hiện ReMCoTI-II: amp: 100µg/ml; IPTG: 0,5mM; 16 giờ ở 15°C. - BL21-TI biểu hiện ReCMTI-V: amp: 200µg/ml; IPTG: 1mM; 6 giờ ở 37°C. - BL21-αAI biểu hiện Reα-AI amp: 100µg/ml ; IPTG: 1mM ; 4 giờ ở 37°C. - BL21-RIP biểu hiện ReRIP: amp: 50µg/ml, IPTG: 0,7mM, 4 giờ ở 37°C	Sinh khối vì sinh vật tái tổ hợp thu được ổn định về số lượng và chất lượng - Protein tái tổ hợp (ở dạng dung hợp) chiếm 45-50%. - Protein tái tổ hợp chiếm 15%. - Protein tái tổ hợp chiếm 30%. - Protein tái tổ hợp chiếm 30%.	* Vượt mức đăng ký 1 qui trình

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	* Qui trình sản xuất chế phẩm protein tái tổ hợp kỹ thuật	3 qui trình sản xuất ở qui mô PTN	4 qui trình : phá vỡ tế bào bằng siêu âm, thu dịch trong có chứa protein tái tổ hợp	- Tìm được một vài kỹ thuật đơn giản để loại protein tạp và các tạp chất (qui trình sản xuất chế phẩm protein ReCMTI-V)	* Vượt mức đăng ký 1 qui trình Đạt yêu cầu kỹ thuật
	* Qui trình sử dụng chế phẩm	3 qui trình sử dụng ổn định	3 qui trình sử dụng ổn định: - Tác dụng của ReCMTI-V đến quá trình đông máu - Tác dụng của Reα-AI đến côn trùng, ấu trùng (mọt đục hạt, bọ cánh cứng, bọ cánh vẩy) trên ngô, đậu. - Tác dụng của ReRIP trên các đối tượng mọt gạo, vi khuẩn (<i>Bacillus subtilis</i>, <i>P. putida</i>) và nấm mốc (<i>A. flavus</i>, <i>A. parasiticus</i>)	Quy trình sử dụng ổn định ở quy mô phòng thí nghiệm	Đạt

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
3.	PHƯƠNG PHÁP				
	* Phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp	3 phương pháp thích hợp để thu nhận protein tinh sạch có độ đồng nhất điện di	4 phương pháp để thu nhận 4 chế phẩm kỹ thuật và chế phẩm tinh sạch: ReMCoTI-II, ReCMTI-V, Re α -AI, ReRIP. Cụ thể như sau: - ReMCoTI-II : phương pháp sắc ký ái lực qua cột chitin và giữ ở những điều kiện thích hợp để thực hiện phản ứng tự cắt trên cột và rút ReMCoTI-II. - ReCMTI-V: chế phẩm kỹ thuật được loại mẫu qua cột DEAE-xenluloz, tiếp tục tinh sạch qua cột HiTrapQ; đông khô, loại muối, đông khô. - Toàn bộ chế phẩm RIP tái tổ hợp kỹ thuật được sử dụng để tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion qua cột CM-Sephadex. - Toàn bộ chế phẩm αAI tái tổ hợp kỹ thuật được sử dụng để tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion qua cột DEAE - xenluloz 16/10.	Phương pháp thích hợp thu để thu nhận chế phẩm tinh sạch có độ đồng nhất điện di	• <i>Vượt mức đăng ký 1 qui trình</i> • <i>xây dựng được phương pháp đơn giản, thích hợp để tinh sạch protein tái tổ hợp, có sử dụng phương pháp khá mới mẻ (tinh sạch 2 PPI)</i>

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
4	CÁC BÀI BÁO	5 công trình công bố trên các Tạp chí KH trong nước và quốc tế (QT)	- 7 bài báo công bố trên Tạp chí Khoa học trong nước - 4 báo cáo ở HNQT: 3 tại HN Hoá sinh và Sinh học phân tử tổ chức ở nước ngoài, 1 ở HNQT tổ chức tại Việt Nam	Đều là các tạp chí khoa học chuyên ngành có uy tín	Vượt
5.	ĐÀO TẠO	10 cử nhân, 3 thạc sỹ	6 cử nhân 2 thạc sỹ và 1 học viên cao học chưa bảo vệ		Chưa đạt
6.	SƠ ĐỒ		20 sơ đồ qui trình tạo sản phẩm protein tái tổ hợp, tách chiết ADN, tách chiết protein, thử hoạt tính.		
7.	BẢNG SỐ LIỆU		9 bảng số liệu, 60 hình minh hoạ về nghiên cứu, sản xuất các protein tái tổ hợp PPI, α -AI, RIP.		

CHƯƠNG 3. KẾT LUẬN

1. Đã tách chiết, tinh sạch ADN tổng số của gấc (*Momordica chochinensis*), bí đỏ (*Cucurbita maxima*), đậu cô ve (*Phaseolus vulgaris*) và mướp đắng (*Momordica charantia*) có độ sạch đạt 1,85-1,9. Sử dụng các ADN này để phân lập các gen tương ứng.
2. Đã phân lập (hoặc tổng hợp) được bốn gen: hai gen mã hoá PPI là gen MCoTI-II, gen CMTI-V; một gen mã hoá α -AI, một gen mã hoá RIP. Các gen có kích thước đúng như tính toán lý thuyết, theo thứ tự tương ứng vào khoảng 110bp, 230bp, 700bp, 800bp. Các gen có độ đồng nhất diện di.
3. Đã thiết kế 4 vectơ tái tổ hợp mang các gen đích: pTYB12 mang gen MCoTI-II, pET-14b mang gen CMTI-V, pET21d(+) mang gen α -AI, pET21d(+) mang gen RIP. Các vectơ tái tổ hợp đã được biến nạp thành công vào vi khuẩn *E. coli* BL21, kí hiệu là: PI-17 (mang gen MCoTI-II); BL21-TI (mang gen CMTI-V); BL21- α AI (mang gen α -AI); BL21-RIP (mang gen RIP).
4. Đã lựa chọn được điều kiện nuôi cấy tối ưu các vi khuẩn tái tổ hợp như sau:

Vi khuẩn tái tổ hợp	Nồng độ ampicillin (μ g/ml)	Nồng độ IPTG trong môi trường (mM)	Thời gian nuôi sau khi + IPTG (giờ)	Nhiệt độ nuôi ($^{\circ}$ C)
PI-17(mang gen MCoTI-II)	100	0.5	16	15
BL21-TI(mang gen CMTI-V)	200	1.0	06	37
BL21- α AI (mang gen α AI)	100	1.0	04	37
BL21 – RIP (mang gen RIP)	50	0.7	04	37

5. Thiết lập được 4 qui trình tinh sạch các protein tái tổ hợp như sau:

- 5.1. Tinh sạch ReMCoTI-II: sắc kí qua cột kitin ở điều kiện có chất khử DTT 0.05 mM trong đệm Tris-HCl 0,02 M có 0,5 M NaCl, 4 $^{\circ}$ C trong 40 giờ, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm trên nhưng không có DTT.
- 5.2. Tinh sạch ReCMTI-V: loại protein tạp bằng cách điều chỉnh pH đến 4,5; sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, tinh sạch qua cột HiTrap Q, phản hấp phụ bằng dung dịch Tris-HCl 0,015M, nồng độ NaCl 0,1M.

- 5.3. Tinh sạch Re α -AI: kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà, sắc kí qua cột DEAE-xenluloz, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm photphat 20mM pH 6,7; 0,6M NaCl.
- 5.4. Tinh sạch ReRIP: sắc kí qua cột CM-Sepharoz trên hệ thống FPLC, phản hấp phụ bằng dung dịch đệm Tris-HCl 0,05 M pH 7,2; nồng độ muối 0,4 M.
6. Các sản phẩm sau khi tinh sạch có độ đồng nhất điện di, có kích thước đúng như dự tính: ReMCoTI-II khoảng 3kD, ReCMTI-V khoảng 7kD, Re α -AI khoảng 18kD, ReRIP khoảng 30kD.
7. Các protein tái tổ hợp đã tinh sạch có các hoạt tính sau:
 - ReMCoTI-II: ức chế tripxin, ức chế proteinaz sâu khoang
 - ReCMTI-V: ức chế tripxin, ức chế con đường đông máu nội sinh
 - Re α -AI: có tác dụng diệt được một ngô (*Sitophilus zeamays*), một đậu (*Callosobruchus chinensis*)
 - ReRIP: ức chế mạnh sự sinh trưởng của *B. subtilis*, *P. putida* và *A. flavus*, *A. parasiticus*.
8. Đã thiết kế được các Ti-plasmit tái tổ hợp: pC1300-TI mang gen MCoTI-II, pC1301- α AI mang gen α -AI, pNOA-RIP mang gen RIP.
9. Đã tạo được các chủng *Agrobacterium tumefaciens* chứa các Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen đích phục vụ việc chuyển gen kháng sâu vào cây trồng. Cụ thể:
 - 2 chủng EHA105 là pCTI-5 và pCTI-6 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen TI-II.
 - 2 chủng pCHA6 và pCHA7 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen α -AI
 - 2 chủng EHA105 và LBA4404 chứa Ti-plasmit tái tổ hợp mang gen RIP.

**PHỤ LỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC
ĐÃ CÔNG BỐ**

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
VIETNAM NATIONAL UNIVERSITY, HANOI

ISSN 0866 - 8612



TẠP CHÍ KHOA HỌC

JOURNAL OF SCIENCE

KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ
NATURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

T. XXI, No1, 2005

MỤC LỤC

1.	Phạm Thị Trân Châu, M.K.Reddy, Đào Thị Thuý, Hoàng Thu Hà, Lê Nguyên Dung, Laurent Chiche, Tổng hợp, tách dòng gen mã hóa MCoTI-II của hạt gác (<i>Momordica cochinchinensis</i>) và biểu hiện ở vi khuẩn <i>E.coli</i>	1
2.	Nguyễn Hương Điển, Công thức bán lí thuyết tính vận tốc rơi bão hoà của các hạt mưa.....	12
3.	Nguyễn Mộng Hùng, Theo dõi tế bào gốc sinh dục trong phát triển phôi sớm ở gà và chim cú.....	19
4.	Hoàng Xuân Huấn, Lập luận dựa trên tình huống với đặc trưng thô.....	24
5.	Nguyễn Hồng Khánh, Quan hệ giữa phát thải khí lưu huỳnh và tổng lắng lưu huỳnh trong không khí ở miền Bắc.....	32
6.	Ngô Sỹ Lương, Điều chế canxi cacbonat kết tủa siêu mịn bằng cách sử dụng sacaroza và glucoza làm phụ gia trong quá trình cacbonat hoá.....	40
7.	Vũ Đức Minh, Ứng dụng phương pháp đo sâu điện đối xứng cải tiến để khai thác thêm thông tin hữu ích từ số liệu đo sâu điện đã có.....	48
8.	Nguyễn Thị Nhung, Nguyễn Thị Kim Thường, Nghiên cứu sự tạo phức của mangan với 1-(2-PYRIDYLAZO)-2-NAPHTOL(PAN) trong môi trường nước - etanol và ứng dụng để Chế tạo KIT xác định hàm lượng Mn(II) trong môi trường nước.....	56

SYNTHESIS, CLONING AND EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI* OF A GENE CODING FOR MCoTI-II

Pham Thi Tran Chau ^(1*), M.K.Reddy ⁽²⁾, Dao Thi Thuy ⁽¹⁾, Hoang Thu Ha ⁽¹⁾,
Le Nguyen Dung ⁽³⁾, Laurent Chiche ⁽³⁾

(1) Center for Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

(2) Plant Molecular Biology Lab., International Center for Genetic Engineering
and Biotechnology, India.

(3) Centre de Biochimie Structurale, faculte de Pharmacia, UMR5048-CNRS-INSERM -
Universite Montpellier, France.

1. Introduction

Proteinases are involved in different crucial living processes such as digestion, germination, growth, development, metamorphism, fertilisation, blood clotting, infection diseases, cancer etc. Therefore their protein inhibitors (PPIs) – an effective regulation factors have been used in medicine for treatment of diseases and in agriculture to improve plant resistance to pest insects.

The dormant seeds of *Cucurbitaceae* plant family contain small well characterized serine proteinase inhibitors [16,23,30]. Their molecule consist of about 30 amino acids, three disulfide bridges forming a compact structure, resistant to the action of various biological and physico – chemical agents.

Momordica cochinchinensis (MCo) belongs to *Cucurbitaceae* family. Their seeds are found to be the PPI – richest source among the tested *Cucurbitaceae* plants growing in Vietnam [17,21]. We have prepared a crude PPI preparation from MCo seeds named Momosertatin (Mo) which showed insecticidal and antibacterial activities [12,17,18,19,22]. A partly purified peptides from Mo (designated as MCoPIs) reduced inflammatory processes in both acute and chronic inflammatory models [14]. Moreover, none toxic effect of MCoPIs was found on tested animals [14].

Three trypsin inhibitors (TIs) named MCoTI-I,-II,-III from MCo seeds were isolated [15], purified, characterized and sequenced [5]. All of them are small polypeptides with molecular weight of about 3 kD and very stable. MCoTI-II is the most abundant inhibitor, consisting of 34 amino acid residues with 3 disulfide bridges, resistant to cleavage by thermolysin for more than 48 hours at 50°C. Its conformational structure was also

(*) To whom correspondence should be addressed: chaupht@vnu.edu.vn

determined [1,10]. Although chemical synthesis of some squash TIs was found possible [11,27], but the overall procedure costly. Recombinant DNA technology was employed by several scientists groups to produce these inhibitors [2,3,26]. In this work, chemical synthesis, cloning and expression of the gene coding for MCoTI-II are presented.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Qiagen kit, *E.coli* strain BL21(DE3), PCR reagents were purchased from Promega. Oligonucleotides were custom synthesized by Alpha DNA. pTYB12 vector, chitin beads were from New England Biolabs. Dithiothreitol, IPTG, DNA markers were from MBI Fermentas. PAGE reagents from Amersham. Other used chemicals were of highest purity grade.

2.2. Methods

Isolation of total DNA from MCo leaves was carried out as described in [4].

DNA techniques: plasmid isolation [24, 25, 29], plasmid transformation [6] and standard protocols were used as described by Sambrook et al [28]. PCR was preformed according to PCR protocol [8].

The inhibitory activity was determined by diffusion method as previously described [13]. Proteins was detected on polyacrylamide gel by Laemmli method [9].

Cells culture and fusion protein expression: use LB medium containing 100µg/ml ampicillin, incubated in shakers at 37°C until the OD₆₀₀ reached 0.6. Induction by IPTG.

Expression and purification of recombinant MCoTI-II were followed the manufactures instruction of IMPACT-CN System, using chitin beads column chromatography [7].

3. Results

3.1. Design and construction of the gene coding for MCoTI-II

The nucleotide sequence coding for MCoTI-II was reversely translated from its amino acid sequence (fig 1, fig 2).

SGSDGGVCPKILKKCRDSDCPGACICRGNGYCG

Fig 1: The amino acid sequence of MCoTI-II [5]

agcggcagcgatggcggcgtgtgccggaanattctgaaaaaatgccgcgcgatatgcgattgccggggcgcgt
gcatttgccgcggcaacggctattgcggc

Fig 2: The nucleotide sequence derived from MCoTI-II amino acid sequence

Based on the above nucleotide sequence four overlapping synthetic oligo nucleotides were designed. While desingning the oligo nucleotide primers Nde I restricions site was introduced on the 5' end, stop codon and Xho I restriction site was introduced on the 5' end of the proposed synthetic trypsin inhibitor gene. The sequences of the forward and reversed primers are shown on fig 3 and of the synthetic gene is on fig 4.

Forward primer:

5' GAATTCCATATGAGCGGCAGCGATGGCGGCGTGTGCCCCGA 3'

Reverse primer:

5' CGGCTCGAGTTAGCCGCAATAGCCGTTGCCGCGGCAAAT 3'

Fig 3: The sequences of the forward and reversed primers for MCoTI-II gene

```

cttaaggtatactcgccgtcggtaccgcccacacgggcttt
gaattccatatgagcggcagcgatggcggcgtgtgccgaaa
      M S G S D G G V C P K
taagactttttacggcggcgctatcgctaacgggcccgcgc
attctgaaaaaatgccgcgcgatagcgattgccggggcgcg
      I L K K C R R D S D C P G A

acgtaaacggcgcggttgccgataacgccgattgagctcggc
tgcatttgccgggcaacggctattgcggctaactcgagccg
      C I C R G N G Y C G

```

Fig 4: The sequence of synthetic MCoTI-II gene

Amplification of MCoTI-II gene by PCR. The PCR conditions were established as :94°C,3 min ; 61°C 1min30;72°C ,2 min for 40 cycles. The PCR product showed a single band corresponding to about 114bp as expected (fig 5)

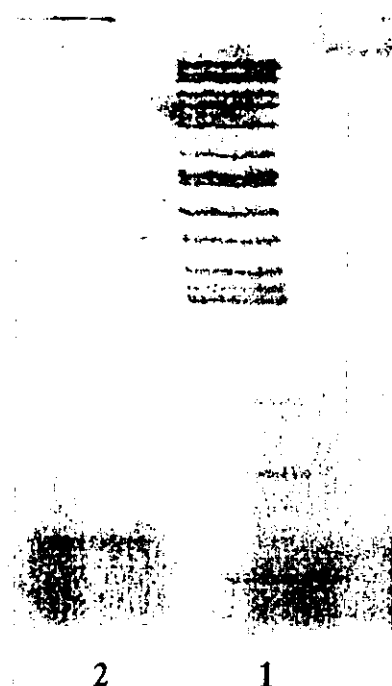


Fig 5: Analysis of MCoTI-II gene on 5%polyacrylamide gel

Lane 1: DNA Marker 100 bp (100-1031)
(#SMO241/2/3)

Lane 2 : PCR product of MCoTI-II gene .

MCoTI-II gene was also successfully prepared by using forward , reverse primers and the purified total MCo DNA as template. The conditions for this experiment were established as: 150ng of each primer; 200 μ M of dNTPs ;400ng of the purified total MCo DNA .

Cloning of the synthetic MCoTI-II .

The PCR amplified gene was double digested with NdeI and XhoI restriction enzymes (fig 6) and ligated with pTYB12 vector had been digested by the same restriction enzymes, then transformed into *E.coli* BL21 (DE3). The resulting recombinant *E.coli* was named PI-17 (fig 7).

atactcgccgtcgcgtaacgcgcgattg
tgagcggca..... attgcggctaactcga

Fig 6: Synthetic inhibitor gene digested by Nde I and Xho I

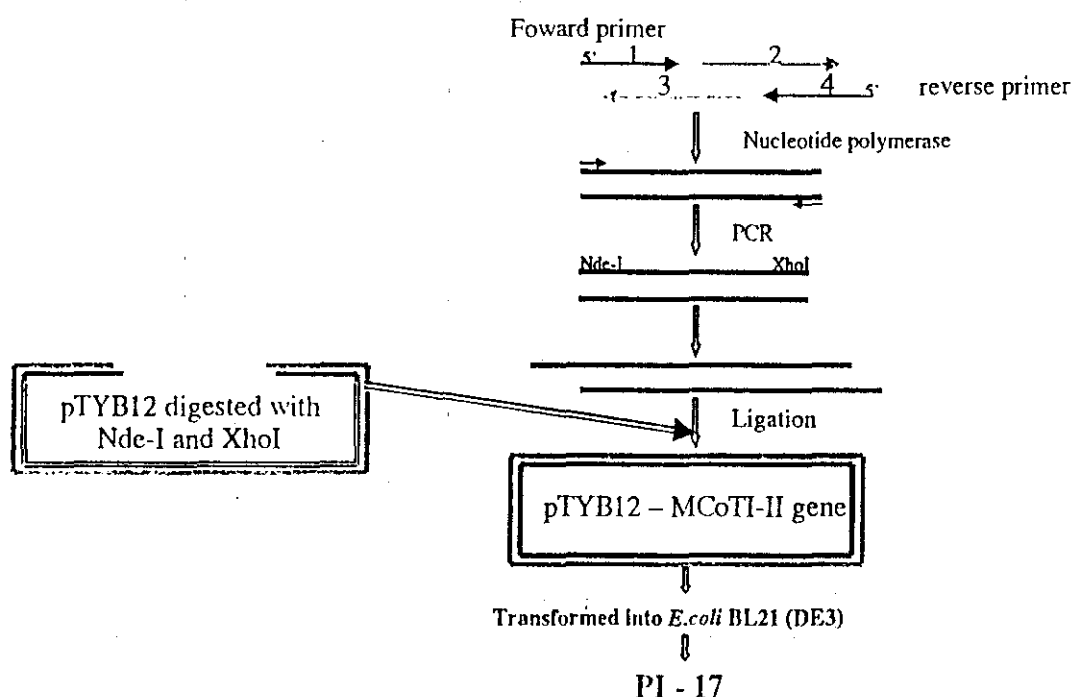


Fig 7: Scheme summarizing the steps in obtaining a construct system for expression of MCoTI-II

To identify the insert gene, we isolated plasmid from PI- 17, checking TI gene by PCR technique and sequencing . PCR product of recombinant plasmid DNA was shown on Fig 8, it corresponded to the expected size (#114bp) and showing correct sequence (Fig 9).

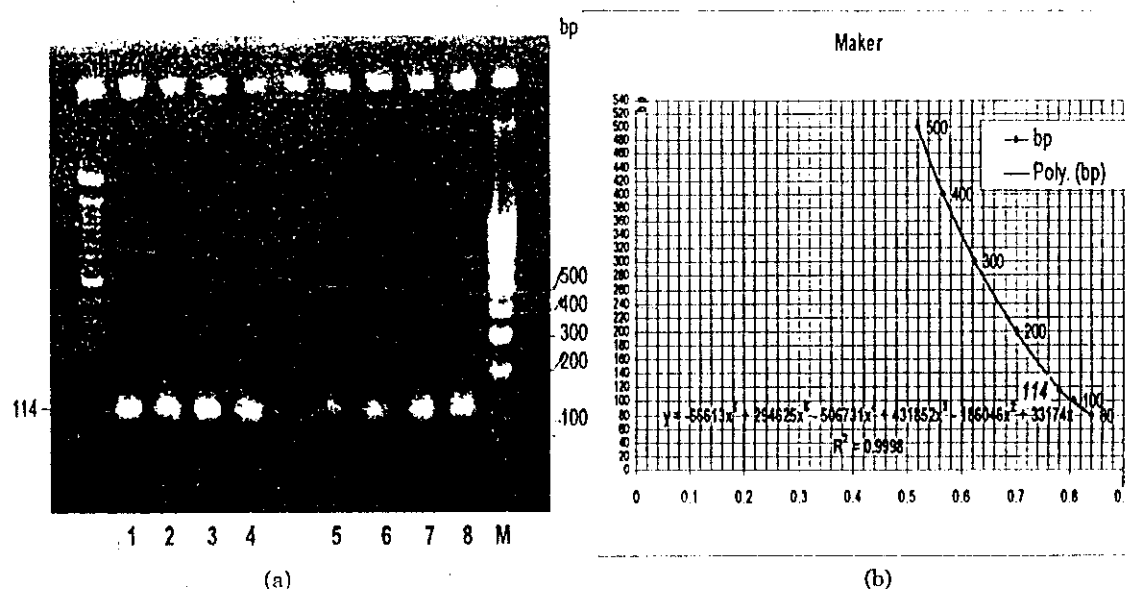


Fig 8: Electrophoresis of the PCR product of MCoTI-II gene on 2% agarose gel (a) and estimation of its size by using SHARP JX-330 scanner (b)

M: DNA Marker 100bp (80-1031bp)(#SMO241/2/3)

1→8: PCR products of MCoTI-II gene

1	GCTCGCGGAT	TTATTTTCGAG	TTCAGACCTG	TTCAGACCTG	40
41	TTATTATGGG	TATTACTTTA	TCTGATGATT	CTGATCATCA	80
81	GTITTTTGCTT	GGATCCCAGG	TTGTTGTACA	GAATGCTGGT	120
121	<u>CATATGAGCG</u>	GCAGCGATGG	CGGCGTGTGC	CGAAAATTCT	160
161	GAAAAAATGC	CGCCGCGATA	GCGATTGCCC	GGGCGCGTCA	200
201	TTTGCCGCGG	CAACGGCTAT	TGCGGCTAAC	<u>TCGAGCCCGG</u>	240
241	GTGACTGCAG	GAAGGGGATC	CGGCTGCTAA	CAAAGCCCGA	280
281	AAGGAAGCTG	AGTTGGCTGC	TGCCACCGCT	GAGCAATAAC	320
321	TAGCATACCC	CTTGGGGCCT	CTAAACGGGT	CTTGAGGGGT	360
361	TTTTTGCTGA	AAGGAGGAAC	TATATCCGGA	TATCCCGCAA	400
401	GAGCCCGGCA	GTACCGGCAT	AACCAAGCCT	ATGCCTACAG	440
441	CATCCAGGGT	GACGGTGCCG	AGGATGACGA	TGAAGCGCCA	480
	TTG				

Fig 9. Sequence of recombinant plasmid DNA containing TI gene fragment

Expression of recombinant MCoTI-II (ReMCoTI-II)

The expression conditions such as ampicillin and IPTG concentrations, temperature and time of induction were tested. The growth and induction conditions of PI-17 giving maximal yield of the recombinant fusion protein established as follows: cells were grown

in shaker flasks at 37°C in LB medium with ampicillin (100µg/ml), induction at the mid-log phase with 0.5mM IPTG at 15°C for 16h.

As mentioned in the methods, cloning and expression procedures were followed

the IMPACT-CN system and pTYB12 vector was used, so it was expected to produce 55kD fusion of the cleavable intein tag to N-terminus of a synthetic inhibitor. As known, Mr of MCoTI-II is about 3.4kD, hence Mr of the obtained recombinant fusion protein should be about 58 kD (the sum of 55 + 3.4kD of MCoTI-II). As seen on Fig. 10 the 58 kD protein band was found in induced sample as the major band, accounted for 80% of total protein (lane 1,3,5 and 6).

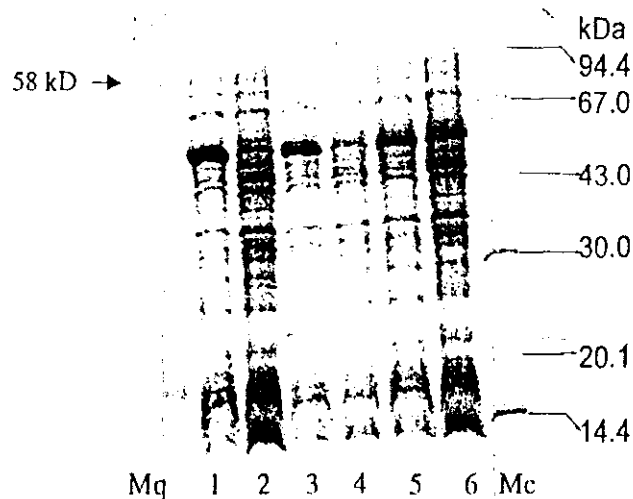


Fig 10. SDS – PAGE pattern of PI-17 proteins

Mc. Standard molecular markers
2, 4. Uninduced
1, 3, 5, 6. Induced (containing
58kD fusion protein band)

Cells were broken by sonication in 10mM Tris-HCl buffer pH8 containing 1mM EDTA (TE buffer). After centrifugation, the clarified supernatant was loaded onto chitin column.

On-column cleavage induction by 50mM 1,4 – dithiothreitol in TE buffer containing 500mM NaCl, at 4°C for 40 hours (Fig 11).

Purification scheme of recombinant MCoTI-II following IMPACT™ - CN system using chitin beads column chromatography comprised the following steps

- 1) Chitin beads column was equilibrated with 10mM Tris-HCl buffer pH=8.0 containing 1 mM EDTA, 500mM NaCl (CB buffer).
- 2) Loading cells clarified extract on the column.
- 3) Washing column by CB buffer until no trace of proteins were detected
- 4) On-column cleavage: CB buffer containing 50 mM DTT. After quick flush, stop the flow in the column, left at 4°C for 40 hrs.
- 5) Elution of the target protein by CB buffer.

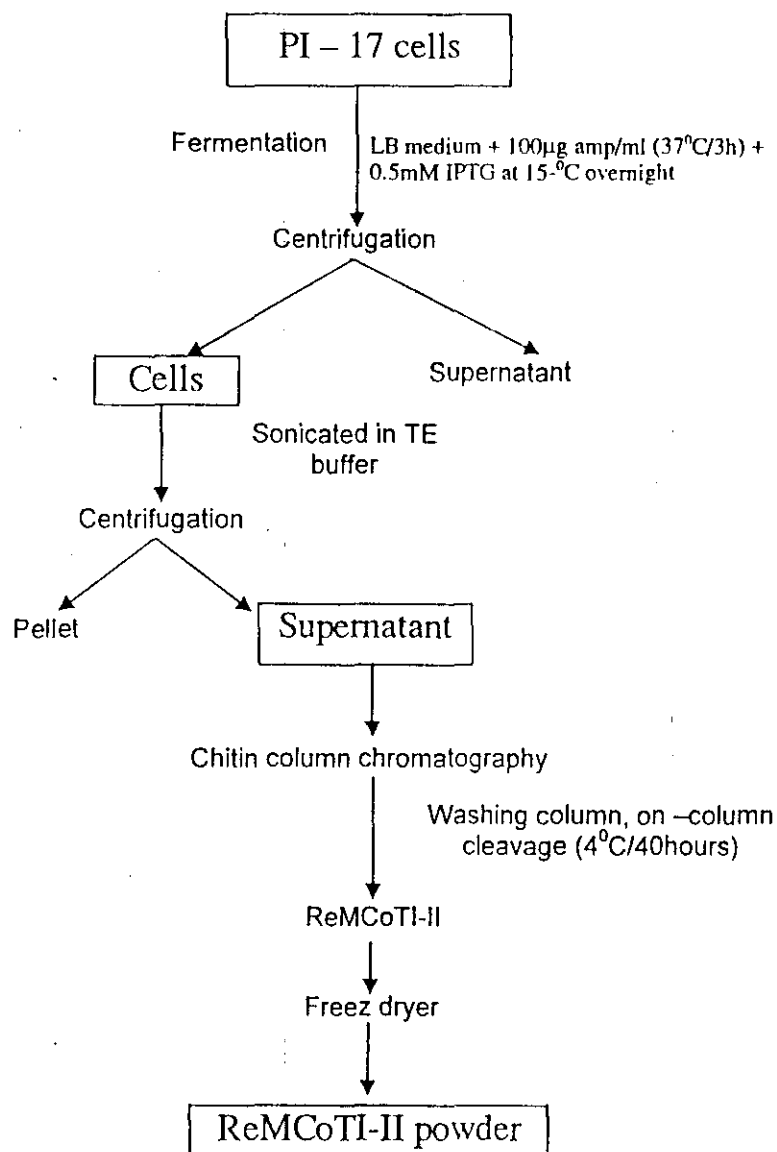


Fig 11: Purification scheme of recombinant MCoTI-II using chitin beads column chromatography

The target protein was released from the chitin column when the chitin-bound intein tag undergoes self-cleavage in the presence of DTT. Fig 12 showed chitin gel before (N1) and after (N2) releasing MCoTI-II.

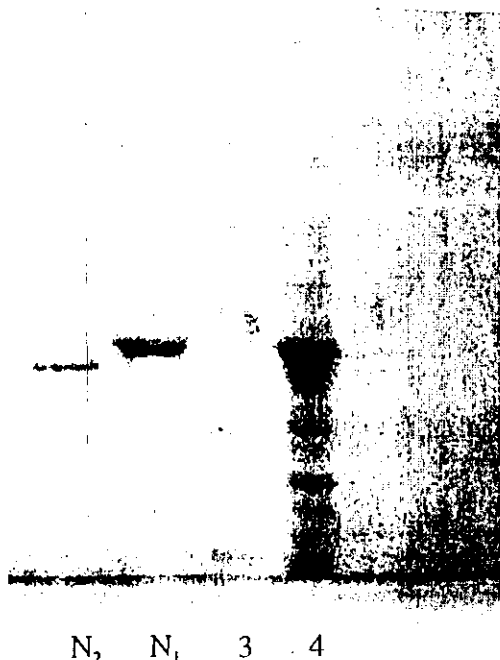


Fig 12. Changing in SDS-PAGE protein pattern of chitin gel before and after releasing ReMCoTI-II.

- 1,2: N1, N2 (chitin gel before and after on column cleavage, respectively)
 3: Marker LMW electrophoresis 17-0446 (14,4-94)
 4: PI-17 cells extract

Eluted fractions from chitin column were pooled, lyophilysed, desalted and freeze-dried. The obtained protein showed a single band of Mr about 3 kD (Fig 13).

ReMCoTI showed inhibitory activity against trypsin as well as proteinase from *Spodoptera litura* (Fig 14).

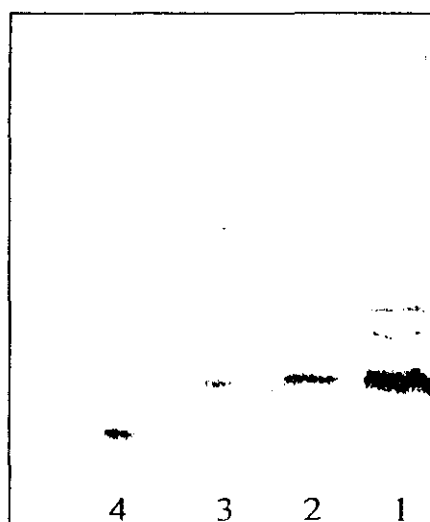


Fig 13. Checking the purity and size of ReMCoTI-II by SDS - PAGE
 1. Marker
 2, 3. Aprotinin
 4. Re MCoTI-II

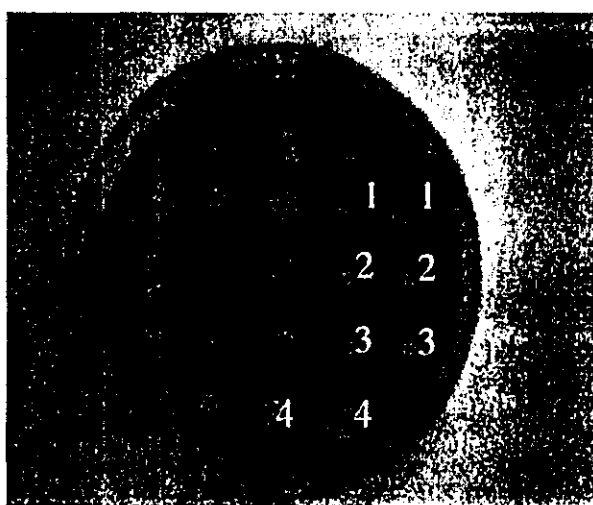


Fig 14. Checking the inhibiting activity of ReMCoTI-II by using diffusion method
 1. PA from *S. litula*
 2. PA of *S. litula* + ReMoTI-II
 3. Trypsin
 4. Trypsin + ReMCoTI-II

4. Conclusion

♦ The MCoTI-II gene was synthesized by four overlapping primers, transformed into pTYB12 vector.

♦ *E. coli* BL21(DE3) strain was used as the host for cloning and expression of the recombinant gene.

♦ The recombinant MCoTI-II was firstly synthesized in a 58kD fusion protein, then released from it and purified following IMPACT-CN system manufactures instruction by using chitin beads column chromatography.

♦ The obtained purified recombinant MCoTI-II showing inhibitory activity against trypsin, and proteinases from *Plutela xylostella*.

REFERENCES

1. Annie Heitz, Jean-Francois Hernandez, Jean Gagnon, T.H. Thai, Pham Thi Tran Chau, N.T.Mai, L.N. Dung and Laurent Chiche. *Solution Structure of the Macrocyclic Squash Trypsin Inhibitor MCoTI-II, the first member of a new family of cyclic Knottins*. *Peptides: The Wave of the Future*. Michal Lebl and Richard A. Houghten (Editors). American Peptide Society, 2001, pp: 387-388.
2. Bozenna Rempola, T-Wilusz, W. Markiewicz and M.Fkus. *Synthesis, cloning and expression in E.coli of the gene coding for the Trypsin inhibitor from Cucurbita pepo*. *Acta Biochimica Polonica* 42(1), 1995. pp: 109-114.
3. Chen, X-M., Qian Y-W., Chi C-W., Gan K-D. E., Zhang M-F., Chen C-Q., *Chemical synthesis, molecular cloning and expression of the gene coding for the Trichosantes trypsin inhibitor*. *J. Biochem* 112, 1991. pp: 45-51.
4. Deana Namuth, Kimmo Koivu, Jelena Arbatova, Viktor Kuvshinov and Eija Pehu. *Advanced plant Molecular Biology Laboratory Manual*, University of Helsinki, Finland, 1998, pp: 4-7.
5. Hernandez, J.F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T.M, Andrieu, J.P., Heitz, A., Trinh H.T., Pham T.T. Chau., and Le Nguyen D., V. *Squash trypsin inhibitors from Momordica cochinchinensis exhibit an atypical macrocyclic structure*. *Biochemistry*, V. 39 (2000), pp: 5722-5730.
6. Hioraki Inoue, Hiroshi Nojima and Hiroto Okayama, *Transformation of E. coli with plasmids*, *Gene* 96 (1990), pp: 23-28.
7. *IMPACTTM-CN. Instruction Manual*, New England BioLabs Inc. Version 1.9, 7/2001 (50pp).
8. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J and White T.J., eds. *PCR Protocols. A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., Harcourt Brace Jovanovich, Publ. San Diego, New York, Berkeley, Boston 1990.
9. Laemmli U.K., *Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227 (1970) pp 680-685
10. Laurent Chiche, A. Heitz, J. C. Gelly, J.Gracy, T.C. Pham, T. H, Phan, J. F. Hernandez and Le nguyen, D. *Squash Inhibitors: From Structural Motifs to Macrocyclic Knottins*. *Current Protein and Peptide Science* 5(2004), pp: 341 -349.
11. Le nguyen, D., L.G., Barry, J.P.Tam, A. Heitz, L. Chiche, J. F. Hernandez, T.C. Pham. In *"Peptides" 2002* (Benedelii, E., and Pedone, C., Eds), Endizioni Ziino, Napoli, Italy, pp: 182 -183.

12. Le nguyen, D., A. Heitz, L. Chiche, J. F. Hernandez, T. H. Phan, T.C. Pham. *Antimicrobial and insecticidal effects of crude extract momosertatin from Momordica cochinchinensis*. in "Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics" Michael Chorev & Tomi K. Sawyer (Eds). American Peptide Society, (2003).
13. Leluk J., and Pham T.T.C. „Zastosowanie edestyny do badania aktywnosc proteinaz i ich inhibitorow (Polish) in XXI Meeting of Polish Biochemical Society pp. 139 (1985), Krakow, Poland .
14. N.V.Nguyên, V.Hà, L.Năm, D.L.Tuấn, P.t.Trần Châu, P.t.Hà: *Nghiên cứu khả năng ứng dụng chế phẩm protein ức chế proteinaz trong điều trị viêm*. Trong quyển: *Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống Y-Dược học*. Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà nội 2004 (507 trang), tr. 287-290.
15. Nguyễn Tuyết Mai, Phạm thị Trần Châu. *So sánh các chất ức chế tripxin (TI) của hạt gấc chín sinh lý trước (Go) và sau khi xử lý nhiệt*. Tạp chí Khoa học-Đại học Quốc gia Hà nội. Vol. XII, N°3 (1996), tr. 33-41.
16. Pham thi Tran Chau. *Trypsin inhibitors of white bush (Cucurbita pepo var. patisonina) fruits and seeds* (Doctor habilitatus thesis, 1985). Acta Universitatis Wratislaviensis N°- 912, Wroclaw University, Wroclaw, 1987 (110 pp).
17. Pham thi Tran Chau, V. T . Hien, P.T. Ha, N. H. M. Quyen, N. T. Mai. *Preliminary of trypsin inhibitors (TIs) from squash seeds of Viet nam 10th FAOB symposium on Protein Resarch*. Taipei 7 – 10/12/1993. Abstracts PIH – 21.
18. Pham thi Tran Chau, M. N. Toan, T. Q. Tan. *Effect of Momosertatin on the growth and mortality of insect pests, Plutella xylostella (PX) and Spodoptera litura (SL)*. 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Annual Meeting of the American Society of Biochenistry and Molecular Biology. August 24 – 29, San Franciso, California. Program N° - 2130; 1997.
19. Pham thi Tran Chau, M. T. Hang, V. T. Hao, N. H. Ha, N. L. Dung. *Effect of Momosertatin on the growth of microorganisms*. 8th FAOBMB Congress, Kula Lumpur, Malaysia. Abstract C 26, November 22 – 27/1998.
20. Phạm thị Trần Châu, T. Q. Tấn , P.T. Hà, H. T. Việt, M. N. Toàn. N. Đ. Toàn, T. H. Thái, P. T. Hạnh . *Tác dụng trừ sâu hại rau của chế phẩm Momosertatin tách từ hạt gấc (Momordica cochinchinensis)*. Tạp chí khoa học. Khoa học Tự nhiên. ĐHQGHN. T XVI, N°1, (2000) tr: 1 -11.
21. Phan Tuấn Nghĩa, Phạm thị Trần Châu. *Sự biến đổi hoạt độ kim hãm tripxin (TIA) ở quả và hạt mướp đắng trong quá trình phát triển của chúng*. Tạp chí Sinh học, Vol.9, N°-3 (1987), tr. 12-17.
22. Phan thị Hà, Phạm thị Trần Châu. *Tác dụng của Momosertatin đến proteinaz ngoại bào của Pseudomonas phân lập từ mủ bông*. Tạp chí Sinh học Vol.22, N°-3 , (2000), tr : 31 – 37.
23. Polanowski, A., Otlewski, J., Leluk, J., Wilimowska – Pelc, A., and Wilusz, T., . *A new family of serine proteinase inhibitors from squash seeds*. Biol. Zentralbl Vol. 107 (1988) pp: 45-49.
24. *Promega Protocols and Applications Guide* (1989), pp: 52-56.
25. *Qiagen Mini Hand book* (1999).
26. Rempola B., *Trypsin inhibitor gene cloned and expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Acta Biochim.Polon. 40(1993). pp: 8-11.
27. Rolka, K., Kupryszewski G., Ragnarsson U., Otlewski J., Krokoszynska I., Wilusz T.E. *Chemical synthesis of new trypsin, chymotrypsin and elastase inhibitors by amino acid substitutions in a trypsin inhibitor from squash seeds (CMTI-V)* Biol. Chem. Hoppe-Seyler 372 (1991). pp: 63-58.

28. Sambrook J., Fritsch E.J. and Maniatis T. in: *Molecular cloning: Laboratory Manual*, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989. Cold Spring Harbor.
29. Ulrike Schindler and Anthony R. Cashmore. *Methods in Plant Molecular Biology A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor laboratory Press in USA, (1995), pp: 275-297.
30. Wieczorek M., Otlewski J., Cook J., Parks, K., Leluk J., Wilimowska-Pelc A., Polanowski A., Wilusz T., and Laskowski M., Jr. *The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino acid sequences and association equilibrium constants of inhibitors from squash, summer squash, zucchini and cucumber seeds*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126 (1985). pp: 646-652.

This work was granted by the National Biotechnology Research Project KC-04-14.

TẠP CHÍ KHOA HỌC ĐHQGHN, KHTN & CN, T.XXI, SỐ 1, 2005

TỔNG HỢP, TÁCH DÒNG GEN MÃ HÓA MCoTI-II CỦA HẠT GẮC (*MOMORDICA COCHINCHINENSIS*) VÀ BIỂU HIỆN Ở VI KHUẨN *E. COLI*

Phạm Thị Trân Châu⁽¹⁾, M.K.Reddy⁽²⁾, Đào Thị Thuý⁽¹⁾, Hoàng Thu Hà⁽¹⁾,
Lê Nguyên Dung⁽³⁾, Laurent Chiche⁽³⁾.

(1): Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà nội, Việt nam; (2): Phòng công nghệ Sinh học phân tử thực vật, Trung tâm Quốc tế Công nghệ Sinh học và Kỹ thuật
Phrynology New Delhi, Ấn độ; (3): Phòng Nghiên cứu thuốc, Trung tâm Nghiên cứu Hoá sinh
cấu trúc, UMR5048-CNRS-INSERM, Đại học Tổng hợp Montpellier, Pháp.

Các nghiên cứu trước đây của chúng tôi cho thấy hạt gấc là loại giàu các chất ức chế tripixin (TI) nhất trong số các cây họ bầu bí ở Việt nam. Ba TI của hạt gấc là MCoTI-I, -II, -III đã được tách, tinh sạch, nghiên cứu cấu trúc. MCoTI-II là TI chủ yếu, rất bền, có tác dụng ức chế proteinaz của sâu tơ (*Plutela xylostella*). Công trình này nhằm sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp để tạo vi khuẩn *E.coli* có khả năng tổng hợp MCoTI-II.

Dựa vào trình tự a.amin của MCoTI-II đã dịch ngược thành trình tự nucleotit tương ứng, từ đó thiết kế 4 đoạn nucleotit để tổng hợp gen MCoTI-II. Đã tổng hợp thành công gen mã hoá MCoTI-II từ 4 đoạn nucleotit nối đầu nhau, sau khi nhận bản gen và xử lý với các enzyme giới hạn tương ứng đã biến nạp thành công vào vectơ pTYB12.

Kiểm tra kết quả bằng phương pháp điện di trên agarose, gel poliacrilamit, xác định trình tự nucleotit của gen tách từ plasmit tái tổ hợp. Vectơ tái tổ hợp được biểu hiện ở *E.coli* BL21 (DE3).

Tách, tinh sạch MCoTI-II tái tổ hợp theo qui trình của hệ thống IMPACT-CN, sắc ký ái lực qua cột kitin. MCoTI-II tái tổ hợp có hoạt tính ức chế tripixin và proteinaz của sâu tơ.

Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ của đề tài KC-04-14 thuộc chương trình nghiên cứu Công nghệ Sinh học cấp Nhà nước.

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ

() Mọi liên hệ xin gửi đến địa chỉ: chauppt@vnu.edu.vn*

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIETNAMESE ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1811-4989

TẠP CHÍ

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tập (Volume) 2 Số (Number) 3 2004

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
TẠP CHÍ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẬP 2, SỐ 3 - 2004
=====

MỤC-LỤC
CONTENTS

- Quyên Đình Thi, Phạm Anh Tuấn - Ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử trong chọn giống cá rô phi (*Oreochromis sp.*): Hiện trạng và triển vọng 265-278
Using molecular biological techniques in stock selection of tilapia (*Oreochromis sp.*): Current status and perspective
- Nguyễn Tiến Minh, Bạch Thị Như Quỳnh, Nguyễn Thị Ngọc Diệp, Bùi Hoàng Anh, Dương Hồng Quân, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Thanh Liêm, Nông Văn Hải, Lê Thanh Hòa, Đinh Duy Kháng, Lê Trần Bình - Tách dòng và phân tích trình tự gen mã hóa Hemagglutinin (HA) của virus cúm A (H5N1) từ một bệnh nhân 279-286
Cloning and sequence analysis of the gene encoding Hemagglutinin (HA) of an influenza A (H5N1) virus isolated from a patient with a acute respiratory illness
- Vu Minh Thiết, Nguyen Nam Long, Dang Thanh Nam, Nguyen Thanh Dam, Nguyen Van Mui, Phan Van Chi - Discovery of MLL-AF4 fusion protein in serum of actute lymphoblastic leukemia patients 287-297
Phát hiện protein lai MLL-AF4 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư máu dòng lympho
- Lê Quang Huân, Lã Thị Huyền, Nguyễn Trung Chính - Thiết kế vector biểu hiện kháng nguyên CD25 tái tổ hợp từ bệnh phẩm ung thư máu 299-306
Construction of an expression vector for gene encoding recombinant antigen CD25 specific for blood cancer
- Nguyễn Văn Cường, Nguyễn Thu Thúy, Nguyễn Thị Diệu Thúy, Đặng Thanh Hà, Phạm Anh Tuấn - Phát triển chỉ thị AFLP đối với tính trạng sinh trưởng cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) 307-313
Development of AFLP markers for growth in catfish (*Pangasius hypophthalmus*)
- Nguyễn Thị Thảo, Quyên Đình Thi, Đào Thị Tuyết, Lê Thị Thu Giang, Phạm Anh Tuấn - Đánh giá tính đa hình của ba quần dân tôm sú (*Penaeus monodon*) nuôi ở Việt Nam bằng phương pháp microsatellite 315-324
Genetic variation of three populations of cultured Vietnam black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by microsatellite

- Vũ Đăng Khánh, Vũ Văn Độ, Nguyễn Tiến Thắng - Khảo sát hoạt tính ức chế sinh trưởng một số loài nấm gây bệnh cây của cao chiết từ nhân hạt xoan chịu hạn (*Azadirachta indica* A. Juss) trồng tại Việt Nam 325-334
Antifungal activity of neem seed kernel extracts from neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss) planted in Vietnam on some phytopathogenic fungi
- Lê Thị Thu Hiền, Đào Thị Thu Hà, Phan Thị Hà, Nguyễn Đăng Tôn, Nông Văn Hải, Phạm Thị Trân Châu - Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa protein ức chế trypsin (MCoTI-II) phân lập từ hạt gấc (*Momordica cochinchinensis*) 335-344
Construction of a recombinant Ti-plasmid carrying trypsin inhibitor (MCoTI-II) gene from *Momordica cochinchinensis*
- Lê Trần Bình, Đinh Kim Xuyên - Đánh giá mức độ đồng đều di truyền các dòng vải thiều (*Litchi chinensis* Sonn.) Thanh Hà, Hải Dương bằng kỹ thuật RAPD 345-358
Assessment of genetic uniformity of Thanh Ha lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) lines by using RAPD
- Trần Tấn Nhứt, Trần Ngọc Thủy Tiên, Mai Thị Ngọc Hương, Nguyễn Thị Thanh Hiền, Phan Xuân Huyền, Bùi Văn Lệ, Đỗ Năng Vịnh - Một số kết quả nghiên cứu về hạt nhân tạo của hoa Lily (*Lilium* spp.) 359-370
Some results in study on artificial seeds of *Lilium* spp.
- Bùi Văn Thắng, Đinh Thị Phòng, Chu Hoàng Hà - Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) phục vụ cho chuyển gen 371-379
An efficient protocol for plant regeneration in peanut (*Arachis hypogaea* L.) via somatic embryogenesis induction
- Nguyễn Thanh Thủy, La Thị Thanh Phương, Đặng Thị Cẩm Hà - Sử dụng phương pháp điện di gel gradient biến tính để xác định mức độ đa dạng của vi sinh vật trong các công thức thử nghiệm xử lý đất ô nhiễm chất độc hóa học 381-388
Using denaturing gradient gel electrophoresis for detection of microbial community in toxic chemicals - contaminated soils
- Mai Anh Tuấn, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà - Nghiên cứu phân loại và khả năng sử dụng hydrocarbon thơm đa nhân, dibenzofuran của chủng XKDN19 389-396
Identification of strain XKDN19 that degrades polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzofuran

THIẾT KẾ TI-PLASMID TÁI TỔ HỢP MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ỨC CHẾ TRYPSIN (MCoTI-II) PHÂN LẬP TỪ HẠT GẮC (*MOMORDICA COCHINCHINENSIS*)

Lê Thị Thu Hiền¹, Đào Thị Thu Hà¹, Phan Thị Hà², Nguyễn Đăng Tôn¹, Nông Văn Hải¹, Phạm Thị Trân Châu²

¹*Viện Công nghệ Sinh học*

²*Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia, Hà Nội*

TÓM TẮT

Hiện nay, một số gen mã hóa các protein ức chế proteinase có nguồn gốc thực vật với hoạt tính diệt côn trùng gây hại đã được các nhà công nghệ gen thực vật quan tâm nghiên cứu để tạo các cây trồng biến đổi gen có khả năng tự kháng côn trùng. Trong đó, gen mã hóa protein ức chế trypsin (trypsin inhibitor - TI) với khả năng ức chế proteinase hệ tiêu hóa của côn trùng gây hại đã được phân lập từ các loài thực vật khác nhau và được chuyển vào cây trồng. MCoTI-II là chất ức chế trypsin chủ yếu của hạt gấc, có tác dụng ức chế proteinase của sâu xanh và sâu tơ. Nghiên cứu này nhằm sử dụng Ti-plasmid để chuyển gen MCoTI-II phân lập từ cây gấc (*Momordica cochinchinensis*) vào cây trồng Việt Nam. Chúng tôi đã tiến hành thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI mang gen MCoTI-II. Vector này được tạo ra trên cơ sở vector gốc pC1300+HAL1 chứa đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS và gen MCoTI-II. Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI sau khi thiết kế đã được chuyển vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng EHA105. Đây là vật liệu quan trọng phục vụ các thí nghiệm chuyển gen TI có hoạt tính kháng côn trùng vào cây trồng.

Từ khóa: Agrobacterium tumefaciens, gen TI, MCoTI-II, Momordica cochinchinensis, protein ức chế proteinase, protein ức chế trypsin, Ti-plasmid

MỞ ĐẦU

Các protein hạt đóng vai trò quan trọng đối với sự tồn tại của thực vật (duy trì khả năng phát triển của hạt, cung cấp dinh dưỡng cho quá trình nảy mầm, bảo vệ hạt khỏi tác động của vi nấm và côn trùng). Các protein này có thể được phân thành protein dự trữ, protein cấu trúc và protein có hoạt tính sinh học. Trong đó, protein có hoạt tính sinh học chính bao gồm: Lectin, enzyme và các chất ức chế enzyme (như chất ức chế trypsin - Trypsin Inhibitor; TI). Rất nhiều cơ quan dự trữ của thực vật như hạt và củ chứa từ

1 đến hơn 10% trong các protein tan của chúng là các TI. Ngoài chức năng dự trữ, TI còn có chức năng bảo vệ thực vật chống lại côn trùng và bệnh hại. Nhờ vậy, TI là đối tượng được đặc biệt quan tâm nghiên cứu. Đến nay, hàng loạt gen mã hóa protein có độc tính ảnh hưởng đến trao đổi chất của côn trùng (gen kháng côn trùng), trong đó có TI đã được chuyển vào thực vật nhờ các phương pháp thích hợp tạo những cây trồng biến đổi gen có khả năng tự kháng côn trùng. Gen TI đã được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới chuyển vào thực vật nhằm tạo cây trồng có tính chống chịu cao với sâu bệnh hoặc

các loại ký sinh gây hại (Chen *et al.*, 1999; Chrispeels, Sadava, 2000; Mandal *et al.*, 2002). Chúng tôi đã tách được 3 gen mã hóa TI từ hạt gấc, đặt tên là MCoTI-I, -II, -III (Nguyễn Tuyết Mai, Phạm Thị Trân Châu, 1996), xác định cấu trúc bậc I và nghiên cứu tính chất (Hernandez *et al.*, 2000). MCoTI-II chiếm tỷ lệ lớn trong số các chất ức chế của hạt gấc vì vậy đã được nghiên cứu cấu trúc không gian (Chiche *et al.*, 2004), phân lập gen của nó và biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *Escherichia coli* (Phạm Thị Trân Châu *et al.*, 2004). MCoTI-II dạng tự nhiên cũng như dạng tái tổ hợp không chỉ ức chế trypsin mà còn ức chế proteinase của sâu tơ. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu chuyển gen MCoTI-II vào cây trồng nhằm tăng cường khả năng kháng sâu bệnh cho cây. Để sử dụng Ti-plasmid phục vụ việc chuyển gen, chúng tôi đã tiến hành thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI. Trong đó, gen MCoTI-II phân lập từ hạt gấc được điều khiển biểu hiện bởi đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Ti-plasmid tái tổ hợp này có nguồn gốc từ vector pC1300+HAL1 mang kết cấu gen: Đoạn khởi động 35S 2X enhancer + gen HAL1 + đoạn kết thúc NOS.

Công trình này giới thiệu kết quả thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen MCoTI-II, nguyên liệu có giá trị trong chuyển gen thực vật.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Ti-plasmid pC1300+HAL1 mang kết cấu gen: Đoạn khởi động 35S 2X enhancer + gen HAL1 + đoạn kết thúc NOS do Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

Các chủng vi khuẩn *E. coli* và *A.*

tumefaciens EHA105 được mua của hãng Clontech và Life Technologies (Mỹ).

Cặp môi nhận gen TI có chứa điểm nhận biết của enzyme hạn chế *Bam*HI do chúng tôi thiết kế và đặt tổng hợp tại hãng Alpha (Canada).

Phương pháp

Các kỹ thuật sinh học phân tử để tạo DNA tái tổ hợp như: Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid, xử lý DNA plasmid bằng enzyme hạn chế, gắn nối các đoạn DNA vào vector, điện di DNA trên gel agarose... được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001). Ti-plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* theo Draper và cộng sự (1988). Phương pháp xung điện để chuyển Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen MCoTI-II vào *A. tumefaciens* được tiến hành theo Hoster và cộng sự (1987).

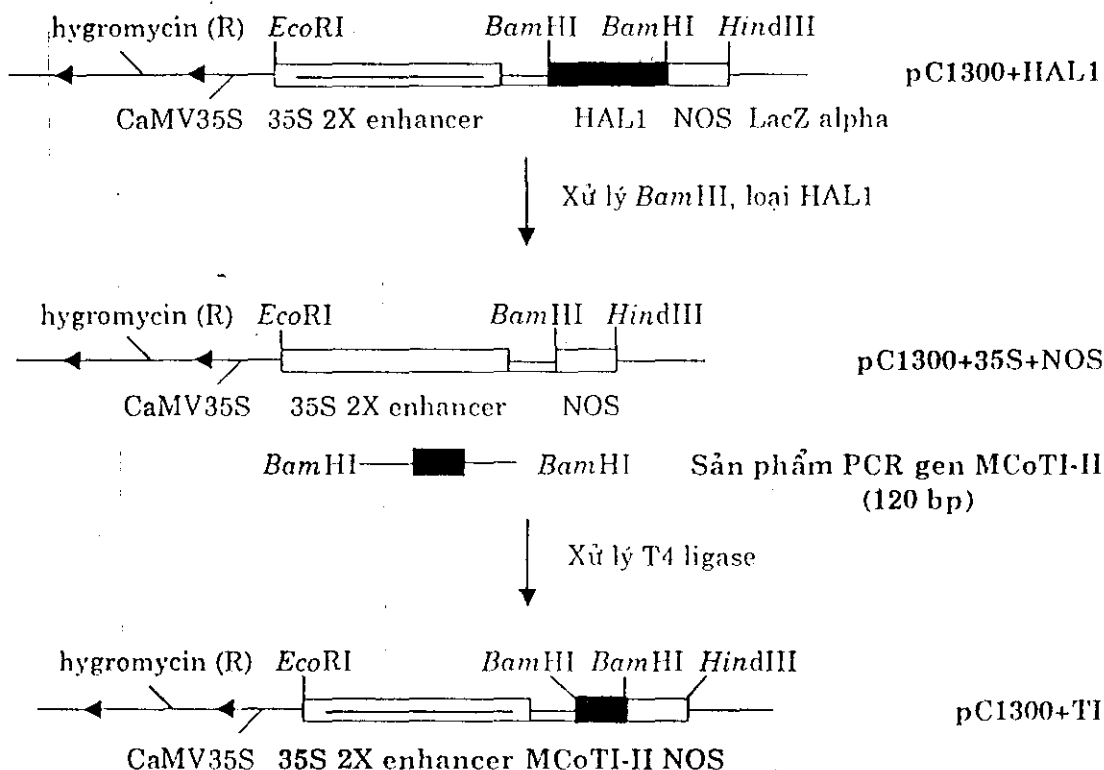
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sơ đồ thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI mang gen MCoTI-II dưới sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer

Đoạn gen MCoTI-II muốn được chuyển vào cây trồng thông qua phương pháp *A. tumefaciens* thì cần được gắn vào vùng T-DNA trên Ti-plasmid. Hơn nữa, để biểu hiện được trong tế bào thực vật thì gen phải nằm trong một kết cấu hoàn chỉnh với đoạn khởi động và đoạn kết thúc. Vì vậy, sau khi nghiên cứu bản đồ một số Ti-plasmid tái tổ hợp trên cơ sở vector pCAMBIA, chúng tôi nhận thấy Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+HAL1 mang kết cấu gen: Đoạn khởi động 35S 2X enhancer + gen HAL1 + đoạn kết thúc NOS phù hợp với yêu cầu thiết kế gen MCoTI-II. Trong pC1300+HAL1, gen HAL1 đã được kết nối với đoạn khởi động

và đoạn kết thúc bởi enzyme hạn chế *Bam*HI. Điểm nhận biết của enzyme này cũng không có mặt trong vùng mang mã của gen MCoTI-II. Như vậy, về lý thuyết, gen HAL1 có thể được loại khỏi kết cấu gen và thay thế gen MCoTI-II

vào vị trí HAL1 nhờ sử dụng enzyme *Bam*HI. Do đó, chúng tôi đã lựa chọn pC1300+HAL1 làm vật liệu khởi đầu cho các thí nghiệm thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen MCoTI-II. Sơ đồ thí nghiệm được trình bày trên hình 1.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI.

Thiết kế cặp mồi đặc hiệu và nhân gen MCoTI-II

Thiết kế cặp mồi đặc hiệu để nhân gen MCoTI-II

Trên cơ sở trình tự gen MCoTI-II đã công bố trong ngân hàng gen quốc tế, chúng tôi đã thiết kế cặp mồi đặc hiệu để nhân đoạn gen MCoTI-II (dạng đoạn

*Bam*HI) với kích thước ~ 120 bp. Cặp mồi thiết kế được ký hiệu là TI-F/TI-R. Để kết nối gen MCoTI-II vào vị trí *Bam*HI ở giữa đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS (như đã trình bày trên Hình 1), chúng tôi đã thiết kế điểm nhận biết của enzyme *Bam*HI ở cả hai mồi TI-F và TI-R. Tuy nhiên, đối với mồi TI-R, ngoài điểm nhận biết của *Bam*HI, chúng tôi cũng đưa thêm điểm nhận biết của

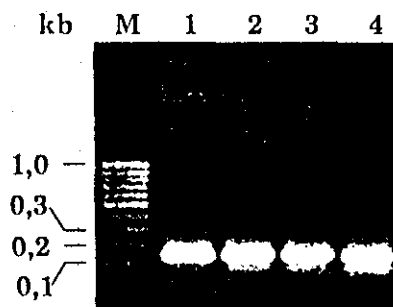
enzyme *Hind*III ở mỗi TI-R tạo cơ sở để kiểm tra chiều gắn của gen MCoTI-II. Trình tự của cặp mỗi như sau:

TI-F: 5'- GCGGATCCATGAGCGGCAGC-
BamHI
GATGGCGG -3';

TI-R: 5'- GCGGATCCAAGCTTAGCCGC-
BamHI HindIII
AATAGCCG -3'.

Nhân gen MCoTI-II

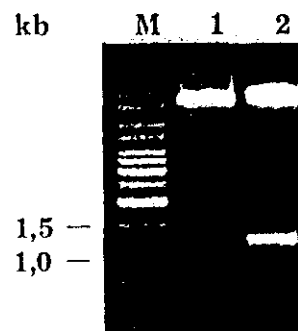
Sử dụng cặp mỗi TI-F/TI-R và DNA plasmid tách dòng pTI-17 mang gen MCoTI-II với các nồng độ khác nhau, chúng tôi đã tiến hành PCR nhân gen MCoTI-II (dạng đoạn *Bam*HI). Sản phẩm PCR thu được rất đặc hiệu có kích thước ~ 120 bp phù hợp với tính toán lý thuyết (Hình 2).



Hình 2. Sản phẩm PCR nhân gen MCoTI-II sử dụng khuôn là plasmid pTI-17 với các nồng độ khác nhau. M: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pTI-17 (1X); 2: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pTI-17 (pha loãng 5X); 3: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pTI-17 (pha loãng 10X); 4: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pTI-17 (pha loãng 20X).

Thiết kế Ti-plasmid trung gian pC1300+35S+NOS khuyết gen HAL1 và mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer

Trên cơ sở phân tích lý thuyết, chúng tôi đã xử lý pC1300+HAL1 mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + HAL1 + NOS bằng *Bam*HI, loại bỏ gen HAL1 nhưng giữ lại đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS nhằm tạo ra một vector trung gian pC1300+35S+NOS (khuyết gen HAL1 nhưng vẫn mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS) (Hình 3). Vector này là nguyên liệu để lai ghép với gen MCoTI-II. Gen MCoTI-II, khi được thay thế vào vị trí của gen HAL1 sẽ chịu sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer này.



Hình 3. Thiết kế vector trung gian pC1300+35S+NOS. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1: pC1300+35S+NOS/*Bam*HI; 2: pC1300+HAL/*Bam*HI.-

Về lý thuyết, sản phẩm thu được khi xử lý pC1300+HAL1 mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + HAL1 + NOS bằng *Bam*HI là hai đoạn có kích thước ~ 1,2 kb (tương ứng với gen HAL1) và ~ 10 kb (tương ứng với pCAMBIA1300 + 35S 2X enhancer + NOS). Đoạn DNA có kích thước ~ 10 kb được chúng tôi tinh chế và xử lý với enzyme T4 ligase nhằm đóng vòng vector. Kết quả

chọn dòng tế bào mang vector trung gian pC1300+35S+NOS được trình bày trên hình 3.

Rõ ràng, sản phẩm xử lý DNA plasmid tái tổ hợp sau khi chọn lọc sơ bộ bằng *Bam*HI là một băng duy nhất (Cột 1, Hình 3). Trong khi, mẫu đối chứng pC1300+HAL xử lý bằng *Bam*HI có mặt gen HAL1 kích thước ~ 1,2 kb (Cột 2, Hình 3). Vector trung gian pC1300+35S+NOS khuyết gen HAL1 được chúng tôi tinh chế lượng lớn. Sản phẩm tinh chế được sử dụng cho phản ứng lai ghép với gen MCoTI-II tạo Ti-plasmid tái tổ hợp.

Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI mang gen MCoTI-II dưới sự điều khiển của 35S 2X enhancer

Tinh chế gen MCoTI-II

Sản phẩm PCR (lượng lớn) nhân gen MCoTI-II sử dụng cặp mồi TI-F/TI-R và khuôn là plasmid pTI-17 được chúng tôi xử lý bằng enzyme hạn chế *Bam*HI và tinh sạch phục vụ cho thí nghiệm thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp.

Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI

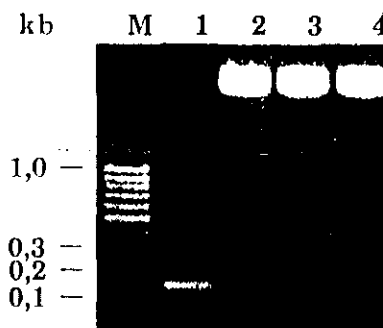
Sản phẩm PCR nhân gen MCoTI-II sau khi xử lý bằng *Bam*HI, tinh sạch, được gắn trực tiếp vào vector trung gian pC1300+35S+NOS (trước đó đã mở vòng bằng *Bam*HI) và biến nạp vào *E. coli* chủng DH5 α để chọn lọc, nhân Ti-plasmid tái tổ hợp với lượng lớn phục vụ thí nghiệm chuyển plasmid này vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*.

Dòng các tế bào *E. coli* thu nhận được sau khi biến nạp sản phẩm lai giữa pC1300+35S+NOS với gen MCoTI-II được chúng tôi tiến hành tách chiết plasmid và

chọn lọc các plasmid có kích thước nhỏ hơn plasmid đối chứng (pC1300+35S+NOS).

Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI có kích thước khoảng 10,2 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 10 dòng tế bào chứa các plasmid có kích thước nhỏ hơn DNA plasmid đối chứng là vector trung gian. Các plasmid này được ký hiệu là pCTI-1, 2, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 21 và pCTI-22. Các dòng tế bào này được nuôi cấy và tách chiết plasmid để sử dụng trong các thí nghiệm kiểm tra tiếp theo.

Kiểm tra sự có mặt của gen MCoTI-II trong các Ti-plasmid tái tổ hợp bằng enzyme hạn chế



Hình 4. Kiểm tra Ti-plasmid tái tổ hợp pCTI bằng enzyme hạn chế *Bam*HI. M: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: Sản phẩm PCR nhân gen MCoTI-II sử dụng khuôn là plasmid pTI-17 (đối chứng); 2: Plasmid pCTI-1/*Bam*HI; 3: Plasmid pCTI-5/*Bam*HI; 4: Plasmid pCTI-6/*Bam*HI.

Như đã trình bày, trong vector pC1300+35S+NOS, điểm nhận biết của enzyme *Bam*HI nằm giữa đoạn khởi động 35S X2 enhancer và đoạn kết thúc NOS. Như vậy, nếu gen MCoTI-II được gắn vào vector tại vị trí *Bam*HI thì khi xử lý bằng enzyme này sản phẩm sẽ là hai băng: Một

bằng tương ứng với kích thước của vector trung gian (mở vòng) và một bằng tương ứng với kích thước của gen MCoTI-II (khoảng 120 bp).

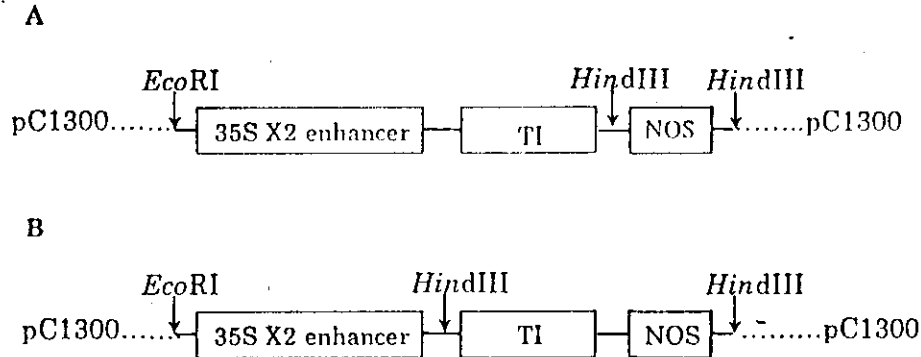
Kết quả xử lý enzyme hạn chế *Bam*HI đối với 3 dòng pCTI-1, pCTI-5, pCTI-6 được trình bày trên hình 4. Sản phẩm xử lý bởi enzyme này là 2 băng hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Như vậy, chúng tôi đã sơ bộ chọn lọc được 3 dòng tế bào có mang gen MCoTI-II.

Kiểm tra chiều gắn của gen MCoTI-II trong Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI

Các Ti-plasmid tái tổ hợp có chứa gen MCoTI-II như pCTI-1, pCTI-5 và pCTI-6 tiếp tục được kiểm tra bằng cách cắt đơn với enzyme hạn chế *Hind*III và cắt kép với hai enzyme *Hind*III và *Eco*RI. Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI có hai điểm nhận biết của

*Hind*III: Một điểm nằm cuối gen MCoTI-II (thuộc mỗi ngược TI-R) và một điểm ở cuối đoạn kết thúc NOS. Đối với enzyme *Eco*RI, có một điểm nhận biết của enzyme này nằm ngay đầu đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Sản phẩm xử lý bởi *Hind*III, *Eco*RI theo tính toán lý thuyết được trình bày trên hình 5.

Trường hợp gắn xuôi chiều (Hình 5A): sản phẩm cắt bởi *Hind*III của pC1300+TI sẽ là 2 băng, trong đó có một băng kích thước ~ 0,3 kb tương ứng với đoạn kết thúc NOS và một băng kích thước ~ 9,9 kb tương ứng với phần còn lại của vector tái tổ hợp (plasmid gốc pCAMBIA1300+35S 2X enhancer + gen MCoTI-II). Sản phẩm cắt bởi *Hind*III + *Eco*RI sẽ là 3 băng: Một băng kích thước ~ 0,9 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X enhancer + gen MCoTI-II, một băng kích thước ~ 0,3 kb tương ứng với đoạn kết thúc NOS và băng còn lại ~ 9 kb tương ứng với vector pCAMBIA1300.



Hình 5. Sơ đồ các vị trí cắt của pC1300+TI bởi *Hind*III và *Eco*RI. A: Gen MCoTI-II gắn xuôi chiều; B: Gen MCoTI-II gắn ngược chiều.

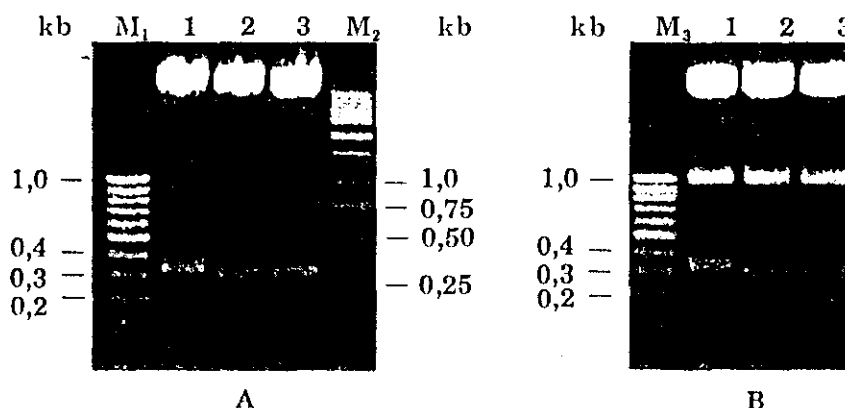
Trường hợp gắn ngược chiều (Hình 5B): Sản phẩm cắt bởi *Hind*III của pC1300+TI cũng sẽ là 2 băng nhưng với kích thước khác: Một băng kích thước ~ 0,4 kb tương ứng với gen MCoTI-II và

đoạn kết thúc NOS; băng còn lại ~ 9,8 kb tương ứng với pCAMBIA1300+35S 2X enhancer. Sản phẩm cắt bởi *Hind*III + *Eco*RI sẽ là 3 băng: Một băng ~ 0,8 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X

enhancer, một băng ~ 0,4 kb tương ứng với đoạn kết thúc NOS + gen MCoTI-II và băng còn lại ~ 9 kb tương ứng với vector pCambia1300.

Rõ ràng, đối với trường hợp cắt đơn bằng *Hind*III, sự khác biệt giữa hai cách gắn chủ yếu được nhận biết thông qua sự xuất hiện của băng có kích thước khoảng 300 bp (cách gắn xuôi chiều) và 400 bp (cách gắn ngược chiều). Tương tự, khi cắt kép bằng *Eco*RI + *Hind*III, sản phẩm cắt của trường hợp gắn xuôi chiều và ngược chiều có một băng giống nhau về kích

thước (~ 9 kb), hai băng khác biệt nhau về kích thước: ~ 0,3 kb và 0,9 kb (trường hợp gắn xuôi chiều); ~ 0,4 kb và 0,8 kb (trường hợp gắn ngược chiều). Kết quả thí nghiệm trên hình 6 cho thấy, ở các dòng pCTI-5 và pCTI-6 (Cột 2, 3, Hình 6A, B), gen MCoTI-II đã được gắn vào trong vector trung gian pC1300+35S+NOS theo kiểu xuôi chiều so với đoạn khởi động và đoạn kết thúc. Trong khi, ở các dòng pCTI-1 (Cột 1, Hình 6A, B), gen MCoTI-II đã được gắn vào vector trung gian pC1300+35S+NOS theo kiểu ngược chiều.



Hình 6. Kết quả kiểm tra chiều gắn của gen MCoTI-II trong pC1300+TI. (A) M₁: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: pCTI-1/*Hind*III: Ngược chiều; 2: pCTI-5/*Hind*III: Xuôi chiều; 3: pCTI-6/*Hind*III: Xuôi chiều; M₂: Thang DNA chuẩn 1 kb. (B) M₃: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: pCTI-1/*Hind*III + *Eco*RI: Ngược chiều; 2: pCTI-5/*Hind*III + *Eco*RI: Xuôi chiều; 3: pCTI-6/*Hind*III + *Eco*RI: Xuôi chiều.

Như vậy, chúng tôi đã thiết kế được Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI, trong đó gen MCoTI-II được điều khiển biểu hiện bởi đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Các dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp này được chúng tôi giữ trong glycerol, ở -75°C để làm nguyên liệu chuyển Ti-plasmid này vào vi khuẩn *A. tumefaciens*.

Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmid tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6

Ti-plasmid tái tổ hợp pCTI-5, pCTI-6

sau khi thiết kế thành công được chúng tôi tiến hành chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện. Đây là phương pháp khá hiệu quả, có thời gian thí nghiệm ngắn (từ 2 - 3 ngày) và các thể sau biến nạp hoàn toàn không có khả năng bị nhiễm các tế bào *E. coli*.

Để có tế bào khả biến *A. tumefaciens* dùng cho xung điện, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy lại chủng *A. tumefaciens* gốc trên môi trường thạch đặc YEP, sau

đó nuôi lắc trong 2 ml môi trường LB trong khoảng 6 giờ ở 29°C. Dịch vi khuẩn này (100 µl) được tiếp tục nuôi cấy qua đêm trong 100 ml môi trường LB có bổ sung 0,1% glucose.

Tế bào khả biến *A. tumefaciens* chủng EHA105 (40 µl) có bổ sung 1 µl Ti-plasmid tái tổ hợp (đối với hai mẫu thí nghiệm) được chúng tôi xử lý bằng xung điện ở điều kiện 25 µF; 400 Ω; 2,5 kV; 8-

10 ms. Sau khi xung điện, mẫu được bổ sung ngay 1 ml môi trường SOC, lắc ở 29°C trong 2 giờ và cấy trải trên đĩa petri chứa các môi trường chọn lọc thích hợp: YEP + Km 50 µg/ml (cho chủng EHA105). Tương ứng, các mẫu đối chứng (không bổ sung Ti-plasmid tái tổ hợp) cũng được xung điện và cấy trải trên đĩa petri chứa môi trường YEP, YEP + Km 50 µg/ml. Kết quả xung điện được trình bày trên bảng 1.

Bảng 1. Kết quả thí nghiệm xung điện chuyển pCTI-5 và pCTi-6 vào *A. tumefaciens* chủng EHA105.

	EHA105			
	Đối chứng		Thí nghiệm	
			pCTI-5	pCTI-6
Số lượng khuẩn lạc trung bình/1 đĩa petri chứa môi trường chọn lọc thích hợp sau thí nghiệm xung điện	YEP	+++		
	YEP + Km	-	++	+++

Chú thích: (++) : Xuất hiện khuẩn lạc; (+++) : Khuẩn lạc mọc dày đặc; (-) : Không xuất hiện khuẩn lạc.

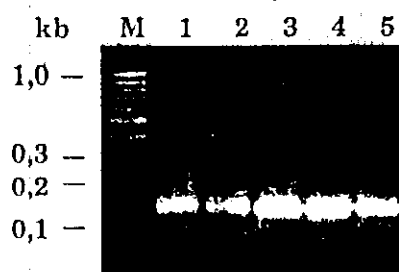
Kết quả trên bảng 1 cho thấy, tế bào khả biến *A. tumefaciens* (mẫu đối chứng) hoạt động rất tốt. Chúng phát triển mạnh trên môi trường YEP và không phát triển trên môi trường có bổ sung Km. Đối với mẫu thí nghiệm, số lượng khuẩn lạc thu được rất nhiều. Trong đó, ở mẫu thí nghiệm pCTI-6, số lượng khuẩn lạc xuất hiện sau xung điện nhiều hơn so với mẫu pCTI-5.

Các khuẩn lạc *A. tumefaciens* có chứa plasmid tái tổ hợp được chúng tôi phát hiện bằng phương pháp tách chiết DNA plasmid, biến nạp trở lại tế bào *E. coli*, cắt bằng enzyme hạn chế, PCR và điện di. Sở dĩ cần phải biến nạp trở lại DNA plasmid vào *E. coli* do số lượng bản sao của vector tái tổ hợp này trong tế bào *A. tumefaciens* rất ít, không đủ để tiến hành các thí nghiệm kiểm tra sự có mặt

của kết cấu gen này.

Kiểm tra sự có mặt của gen MCoTI-II trong tế bào *A. tumefaciens* bằng kỹ thuật PCR

Ở thí nghiệm kiểm tra bằng kỹ thuật PCR, DNA plasmid của tế bào *A. tumefaciens* chủng EHA105: pCTI-5 và chủng EHA105: pCTI-6 được tạo ra nhờ xung điện sau khi biến nạp trở lại vào *E. coli* DH5α được chúng tôi tách chiết lại và sử dụng làm khuôn để nhân gen MCoTI-II với cặp mồi TI-F/TI-R. Kết quả kiểm tra (Hình 7) cho thấy, chúng tôi đã nhận được các dòng *A. tumefaciens* chủng EHA105: pCTi-5, EHA105: pCTI-6 có chứa Ti-plasmid tái tổ hợp pCTI-5 và pCTi-6 dùng làm nguyên liệu để chuyển gen MCoTI-II vào cây trồng.



Hình 7. Kiểm tra sự có mặt của gen MCoTI-II trong các dòng tế bào *A. tumefaciens* chủng EHA105: pCTI-5, EHA105: pCTI-6 tái tổ hợp bằng kỹ thuật PCR. M: Thang DNA chuẩn 100 bp; 1: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pCTI-5 (1X); 2: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pCTI-5 (pha loãng 10X); 3: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pCTI-6 (1X); 4: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pCTI-5 (pha loãng 10X); 5: Sản phẩm PCR nhân gen MCoTI-II từ DNA plasmid tách dòng pTI-17 (đối chứng).

Rõ ràng, đoạn gen MCoTI-II đã được nhân rất đặc hiệu, với kích thước khoảng 120 bp phù hợp với mẫu đối chứng. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc đưa đoạn gen TI vào vector trung gian pC1300+35S+NOS và tạo được hai chủng *A. tumefaciens* EHA105: pCTI-5, EHA105: pCTI-6 tái tổ hợp mang gen MCoTI-II phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.

KẾT LUẬN

Đã thành công trong việc thiết kế vector pC1300+35S+NOS. Đây là Ti-plasmid trung gian khuyết gen quan tâm nhưng mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS.

Đã thiết kế được Ti-plasmid tái tổ hợp pC1300+TI mang gen MCoTI-II dưới sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer.

Đã tạo được hai chủng *A. tumefaciens* EHA105: pCTI-5 và EHA105: pCTI-6 chứa Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen TI phục vụ cho việc chuyển gen kháng sâu vào các giống cây trồng của Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Nhà nước KC.04-14 và một phần của Đề tài 82.12.04 thuộc Chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong lĩnh vực Khoa học Tự nhiên (nội dung: "Thiết kế Ti-plasmid trung gian pC1300+35S+NOS khuyết gen HAL1 và mang đoạn khởi động 35S 2X enhancer").

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen ZY, Brown RL, Lax AR, Cleveland TE, Russin JS (1999) Inhibition of plant - pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 65(3): 1320-1324.
- Chiche L, Heitz A, Gelly GC, Gracy J, Pham TC, Phan TH, Hernandez JF, Le Nguyen D (2004) *Squash Inhibitors: From Structural Motifs to Macroyclic Knottins*. *Current Protein and Peptide Science* 5: 341-349.
- Chrispeels MJ, Sadava DE (2000) *Plants, genes, and crop biotechnology*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts: 390-444.
- Draper J, Scott R, Armitage P (1988) Plant genetic transformation and gene expression. *A Laboratory Manual*. Blackwell Scientific Publications, London: 3-63.
- Heitz A, Hernandez JF, Gagnon J, Thai TH, Pham Thi Tran Chau, Mai NT, Dung LN, Chiche L (2001) Solution structure of the macrocyclic squash trypsin inhibitor MCoTI-II, the first member of a new family of cyclic knottins. *Peptides: The Wave of the Future*. Lebl M, Houghten RA (eds). American Peptide Society: 387-388.
- Hernandez JF, Gagnon J, Chiche L, Nguyen TM, Andrieu JP, Heitz A, Trinh HT, Pham TT Chau, Le Nguyen D (2000) Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry* 39: 5722-5730.
- Holster M, De Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J (1987) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163: 181-187.

- Mandal S, Kudu P, Roy B, Mandal RK (2002) Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian Mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor: Characterization, post - translational processing studies, and transgenic expression to develop insect-resistance plants. *J Biol Chem* 277(40): 37161-37168.
- Nguyễn Tuyết Mai, Phạm Thị Trần Châu (1996) So sánh các chất ức chế tripsin (TI) của hạt gạo chín sinh lý trước (Go) và sau khi xử lý nhiệt. *Tạp chí Khoa học - Đại học Quốc gia, Hà Nội* XII(3): 33-41.
- Phạm Thị Trần Châu, Reddy MK, Dao Thị Thuy, Hoàng Thu Hà, Lê Nguyễn Dung, Chiche L (2004) *Synthesis, cloning and expression in Escherichia coli of a gene coding for MCoTI-II*. 17th FAOBMB Symposium/2nd IUBMB Special Meeting/7th A-IMBN Conference. Bangkok, November 22 - 26, 2004. Program and Abstracts OP-C9: 87.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning I, III. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

CONSTRUCTION OF A RECOMBINANT TI-PLASMID CARRYING TRYPSIN INHIBITOR (MCoTI-II) GENE FROM *MOMORDICA COCHINCHINENSIS*

Lê Thị Thu Hiền¹, Dao Thị Thu Hà¹, Phan Thị Hà², Nguyễn Đăng Tôn¹, Nông Văn Hải¹, Phạm Thị Trần Châu^{2,*}

¹*Institute of Biotechnology*

²*Center of Biotechnology, Hanoi National University*

SUMMARY

Many plant-derived inhibitors play an important role in the protection of plants against pests and diseases. This function has made a number of plant genes including trypsin inhibitor (TI) gene attractive for extensive studies on their transfer into crops. MCoTI-II is the major trypsin inhibitor purified from *Momordica cochinchinensis* seeds. Both wild and recombinant forms of MCoTI-II showed inhibitory activity against proteinase(s) of *Plutela xylostella* larvae. For the purpose of introducing TI gene into plants using Ti-plasmid-derived system, the MCoTI-II gene was isolated from *Momordica cochinchinensis* plant and a recombinant vector containing TI gene was constructed based on a pC1300+HAL1 Ti-plasmid. The HAL1 gene within pC1300+HAL1 was firstly eliminated and then replaced by a 120 bp *Bam*HI fragment of the MCoTI-II gene. The gene of interest in the new pC1300+TI Ti-plasmid construct was placed under the control of 35S 2X enhancer promoter. The recombinant Ti-plasmid (pC1300+TI) was successfully transferred into EHA105 *A. tumefaciens* strain that is ready to use for plant transformation experiments.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, MCoTI-II, *Momordica cochinchinensis*, proteinase inhibitor, TI gene, Ti-plasmid, trypsin inhibitor

*Author for correspondence: Tel: 04. 7680638; Fax: 04. 7680907; E-mail: chauptht@vnu.edu.vn

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
VIỆT NAM NATIONAL UNIVERSITY, HANOI

ISSN 0866 - 8612



TẠP CHÍ KHOA HỌC

JOURNAL

KHOA HỌC TỰ N
NATURAL SCIEN

T.XX, No3, 2004

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TẠP CHÍ KHOA HỌC
 KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ
 T. XX, Số 3 - 2004

MỤC LỤC

1. Đào Thị Thuý, Nguyễn Quỳnh Uyên, Nguyễn Thị Bích Hậu, Võ Thị Thương Lan và Phạm Thị Trân Châu. Tách dòng gen mã hoá một chất ức chế tripxin của hạt bí đỏ (<i>cucurbita maxima</i>) CMTI-V và biểu hiện ở <i>E. coli</i>	1
2. Trịnh Hồng Thái, Trịnh Thị Thanh Hương, Lương Thuỳ Dương, Phan Thị Hà. Thành phần proteinaz ngoại bào của vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng (<i>Xenorhabdus</i> sp. CA)	11
3. Phạm Ngọc Lâm, Nguyễn Thu Hằng. Tổng hợp và khảo sát tính chất của các Polyuretan phân đoạn (PU) trên cơ sở polyetylen glycol và polytetrametylen glycol (Phần II: Nghiên cứu tính chất cơ lý và độ trương)	19
4. Nguyễn Văn Hải, Vũ Đức Lợi. Nghiên cứu sự tích lũy chì trong môi trường của cây rau cải xanh bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.....	25
5. Nguyễn Thị Minh Ngọc, Mai Trọng Nhuận, Đặng Văn Luyện. Tiến hoá địa hoá trầm tích trong quá trình hình thành, phát triển và thoái hoá rừng ngập mặn khu vực cửa Sông Hồng (lấy ví dụ huyện Giao Thuỷ, tỉnh Nam Định)	33
6. Phan Kế Long. Về một loài chưa được mô tả thuộc steinernema (rhabditida: steinernematidae) phân lập được từ đất rừng của vườn quốc gia Chư Mom Ray (Việt Nam)	43
7. Tạ Hoà Phương, Nguyễn Công Thuận. Đặc điểm cổ sinh thái và phân bố của hoá thạch Răng nón, Vỏ nón trong các trầm tích D_3-C_1 ở một số vùng thuộc Bắc Bộ.....	51
8. Nguyễn Hữu Khải, Lê Xuân Cầu. Ứng dụng mô hình mạng thần kinh nhân tạo ANN trong mô phỏng và dự báo lũ quét	57
9. Lê Trung Thành. Phương pháp tính công suất bù BER thiết kế các hệ thống truyền tín hiệu M-QAM qua tuyến thông tin cáp sợi quang.....	65
10. Nguyễn Thành Hiếu, Nguyễn Viết Kính. Giảm tỷ số PAR trong hệ OFDM bằng phương pháp dành riêng tần.....	74
11. Lê Xuân Hồng, Phan Ngọc Vinh. Đặc điểm địa mạo bờ biển của sông vùng Lý Hoà, tỉnh Quảng Bình.....	82

TÁCH DÒNG GEN MÃ HOÁ MỘT CHẤT ỨC CHẾ TRIPXIN CỦA HẠT BÍ ĐỎ (*CUCURBITA MAXIMA*) CMTI-V VÀ BIỂU HIỆN Ở *E. COLI*

Đào Thị Thuý, Nguyễn Quỳnh Uyên, Nguyễn Thị Bích Hậu,
Võ Thị Thương Lan và Phạm Thị Trân Châu

Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

1. Mở đầu

Các protein ức chế tripxin (TI) của hạt các cây họ bầu bí (*Cucurbitaceae*) tuy được phát hiện muộn hơn các TI thực vật khác nhưng đã được quan tâm nghiên cứu nhiều vì chúng có những đặc tính quý về mặt khoa học và có tiềm năng ứng dụng lớn.

Hạt của hầu hết các loại bầu bí kể cả 2 TI có cấu trúc vòng mới được phát hiện từ hạt gấc [4] đều có TI với khối lượng phân tử vào khoảng 3 kDa, có 3 cầu disunfua, chúng được xếp thành một họ mới, họ TI bầu bí (squash inhibitor) [9]. Trong số các TI họ bầu bí, các TI phân tử thấp của hạt bí đỏ (CMTI-I, III) được phát hiện sớm hơn cả và ngoài tác dụng ức chế tripxin các TI này còn ức chế factor XIIa [6] (proteinase-xerin xúc tác cho phản ứng đầu tiên trong quá trình đông máu). Gần đây [7] người ta còn phát hiện thêm một TI khác từ hạt bí đỏ, CMTI-V khác với các CMTI đã biết, CMTI-V bao gồm 68 axit amin, và chỉ có 1 cầu disunfua, có khối lượng phân tử là 7,1kDa, có tính kiềm và cũng có tác dụng ức chế đặc hiệu factor XIIa. Tuy nhiên hàm lượng TI này ở hạt bí đỏ tương đối thấp, vì vậy đã có một số công trình nghiên cứu sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để tách dòng gen mã hoá chúng [1,2,13,14] với hy vọng có thể sản xuất bằng các biện pháp Công nghệ Sinh học.

Công trình này tách gen mã hoá CMTI-V từ hạt bí đỏ, sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp để tách dòng và biểu hiện gen CMTI-V ở *E.coli*.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

- Lá bí đỏ (*Cucurbita maxima*) cần non tươi được sử dụng làm nguyên liệu để tách ADN tổng số.

- Chủng *E.coli* DH5 α (MBI Fermentas) được dùng làm tế bào chủ để nhân bản plasmit tái tổ hợp. Chủng *E.coli* BL21 (DE3) của Life Technologies (Mỹ) được dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Các môi do Invitrogen life technologies tổng hợp theo thiết kế của chúng tôi. Các hoá chất thông dụng trong Sinh học phân tử của các hãng Sigma, Bio.Rad, Promega, dNTPs, Mix ladder, Taq DNA polimeraz, λ DNA ladder của Finnzymes, BamHI, T₄ DNA ligaz của Promega, Tripxin tụy tạng bò và cơ chất BApNA (N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride) của Sigma; Plasmit pET 14b của hãng Invitrogen; Kit để tách ADN tổng số và tách plasmit của Qiagen; X-gal (Bromo-4-chloro-3 indolyl- β -D-galactopyranoside) của MBI Fermentas; Glass microfibre filters của Whatman, Anh.

2.2. Phương pháp

- Tách ADN toàn phần từ lá bí đỏ:

ADN tổng số của lá bí đỏ non làm khuôn trong phản ứng PCR được tách theo phương pháp của Eija Pehu và cộng sự [3]. Kiểm tra hàm lượng và độ sạch của ADN bằng phương pháp đo độ hấp thụ ở bước sóng 260nm, 280nm; phương pháp điện di trên gel agaroz.

- Tách dòng và nhân gen của CMTI-V

Đã sử dụng 2 cặp mồi sau:

Mồi xuôi (forward primer) có chứa trung tâm nhận biết của NdeI:

5'CATATGCATATGTCCTCCTGCCCAGGTAAGTC 3'

Mồi ngược (reverse primer) có chứa trung tâm nhận biết của BamHI:

5'CGCGGATCCGCGTTAACCGATCCTCGG 3'

Phản ứng PCR để tổng hợp và kiểm tra lại gen CMTI-V được thực hiện như sau: thể tích hỗn hợp phản ứng 25 μ l bao gồm: 2 μ l ADN genom bí đỏ (520ng ADN), 1,25 μ l mồi xuôi (225ng), 1,25 μ l mồi ngược (225ng), 0,5 μ l dNTPs (200 μ M), 0,5 μ l Taq polymeraz (0,5IU), 19,5 μ l đệm PCR 1 lần.

Chương trình chạy PCR: biến tính ADN khuôn ở 94°C trong 3 phút, nhiệt độ gắn mồi ở 63°C trong 1 phút, tổng hợp ở 72°C trong 1 phút, tổng số là 30 chu kỳ, nhân lại gen CMTI-V trong 8 phút ở 72°C, cuối cùng sản phẩm PCR được giữ ở 4°C cho tới khi kiểm tra trên agaroz.

Kiểm tra sản phẩm PCR bằng phương pháp điện di trên agaroz 2%, tinh sạch qua Glass Microfibre filters (GF/D, GF/C, Whatman, UK).

- Phương pháp điện di ADN trên gel poliacrilamit 5% [12]: Đệm điện di TAE, tiến hành điện di ở điều kiện 90 phút, 150V. Sau khi điện di, cố định trong etanol 10% trong 5 phút, rửa bằng dung dịch HNO₃ 3% trong 3 phút, rửa bằng nước Milli Q 1 phút, nhuộm bằng AgNO₃ 0,2% trong 20 phút, rửa sạch AgNO₃ bằng nước Milli Q, cuối cùng hiện bằng ADN bằng dung dịch Na₂CO₃ 3% và 0,1% formaldehit trong khoảng 3 phút, giữ gel trong axit acetic 10%.

- Điện di trên gel poliacrilamit 15% phát hiện bằng TI theo phương pháp đã mô tả trước đây [8].

2.3. Thiết kế vectơ tái tổ hợp

Plasmid pET-14b có chứa trung tâm nhận biết của BamHI và NdeI được mở vòng bằng cách xử lý với 2 enzym này ở điều kiện: 37°C trong 2 giờ.

Sản phẩm PCR nhân bản ADN genom bí đỏ với mỗi xuôi và mỗi ngược đặc hiệu đã được tinh sạch, cắt với BamH I và Nde I (ở điều kiện 37°C trong 2 giờ), đưa vào plasmid pET-14b đã mở vòng bằng 2 enzym trên.

Phản ứng gắn được thực hiện ở 4°C trong thời gian 16 giờ nhờ T₄ ligaz [10].

Vectơ tái tổ hợp pET-14b – CMTI-V viết tắt (pET-TI-V) được biến nạp vào chủng *E.coli* DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt [5].

Các thể biến nạp được sàng lọc trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB) (1% tripton, 0.5% cao nấm men, 1% NaCl) có bổ sung ampicilin (100µg/ml), nuôi qua đêm ở 37°C. Chọn các khuẩn lạc màu trắng (có mang ADN ngoại lai) cấy chuyển sang các đĩa thạch trong môi trường LB có ampicilin (100µg/ml) để dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Nuôi vi khuẩn *E.coli* DH5α tái tổ hợp, tách plasmid tái tổ hợp, tinh sạch (theo phương pháp Qiagen [11]). Cắt bằng 2 enzym giới hạn BamH I và Nde I, kiểm tra bằng phương pháp PCR, sản phẩm được kiểm tra kích thước bằng cách điện di trên gel agaroz 2% với thang chuẩn ADN.

Dòng vectơ mang gen CMTI-V đã qua kiểm tra như trên, được giải trình tự vùng có ADN theo phương pháp Sanger.

2.4. Biểu hiện protein tái tổ hợp ở *E.coli*

Vectơ tái tổ hợp pET-14b-TI-V được biến nạp vào chủng *E.coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt [5].

Sàng lọc vi khuẩn tái tổ hợp trên môi trường thạch LB có ampicilin, X-gal, các khuẩn lạc trắng được nuôi trên môi trường lỏng có chứa ampicilin (100µg/ml) ở 37°C đến khi đạt giá trị OD₆₀₀ = 0.6. Thêm IPTG (isopropyl β-thiogalactoside) để cảm ứng biểu hiện protein đích.

Thu sinh khối tế bào, phá màng tế bào bằng siêu âm (máy Sonicprep 150 của Đức), 1 thể tích tế bào + 50 thể tích dung dịch đệm TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8.0), li tâm 12.000 vòng /phút ở 4°C trong 30 phút, thu dịch trong giữ ở -20°C để cho các thí nghiệm tiếp theo. Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp bằng phương pháp PAGE có chứa cơ chất [8].

3. Kết quả và thảo luận

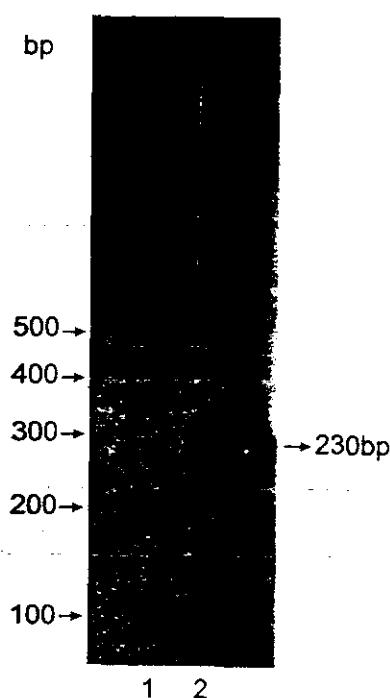
3.1. Tách và tinh chế ADN tổng số

Lá bí đỏ non nghiền trong nitơ lỏng, chiết theo tỉ lệ 1:4 (mg/µl) dung dịch AP₁, nồng độ RNase cuối cùng là 100µg/ml, giữ ở 65°C trong 10 phút, thêm 130 µl AP₂, giữ trong nước đá 5

phút, li tâm, thu dịch nổi, cho qua cột QIA shredder (QIAsMC), thu dịch qua cột. Thêm dung dịch AP₁, etanol vào dung dịch nhận được qua cột theo tỉ lệ thể tích 0.5:1:1, trộn đều cho toàn bộ hỗn dịch này qua cột Dneasy MC, rửa cột 2 lần bằng dung dịch đệm AW. Thải ADN khỏi cột bằng 100 μ l dung dịch đệm AE. Kiểm tra nồng độ và độ sạch của ADN tổng số bằng điện di trên agaroz và trên máy quang phổ (spectronic Unicam). Kết quả nhận được tỉ lệ OD_{260}/OD_{280} là 1.86-1.90, chứng tỏ chế phẩm có độ sạch đạt yêu cầu. Điện di trên gel agaroz 0.8% với thang chuẩn λ . ADN các nồng độ khác nhau cho thấy hàm lượng ADN tổng số thu được là 260ng/ml. Như vậy, ADN thu được có chất lượng tốt và hàm lượng đủ cho các nghiên cứu tiếp.

3.2. Nhân bản đoạn gen CMTI-V từ ADN genom bí đỏ bằng kỹ thuật PCR

Sử dụng ADN đã tinh sạch làm khuôn trong phản ứng PCR, với mỗi xuôi, mỗi ngược và các điều kiện phản ứng như đã nêu trong phần phương pháp. Theo tính toán lí thuyết sẽ nhận được sản phẩm phản ứng có kích thước 230bp. Kết quả điện di trên gel poliacrilamit 5% (hình 1) cho thấy sản phẩm PCR thu được có 1 băng với kích thước đúng như tính toán lí thuyết vào khoảng 230bp.

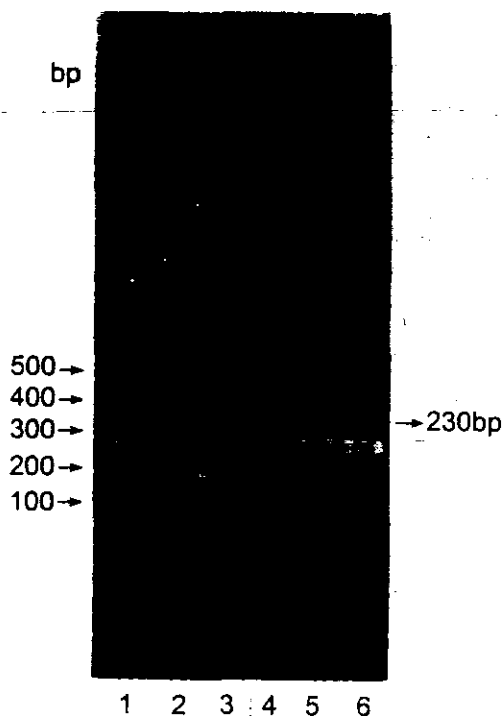


Hình 1: Điện di đồ sản phẩm PCR sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn

- 1 - Thang ADN chuẩn (100-10000bp)
- 2 - Sản phẩm PCR ~ 230bp

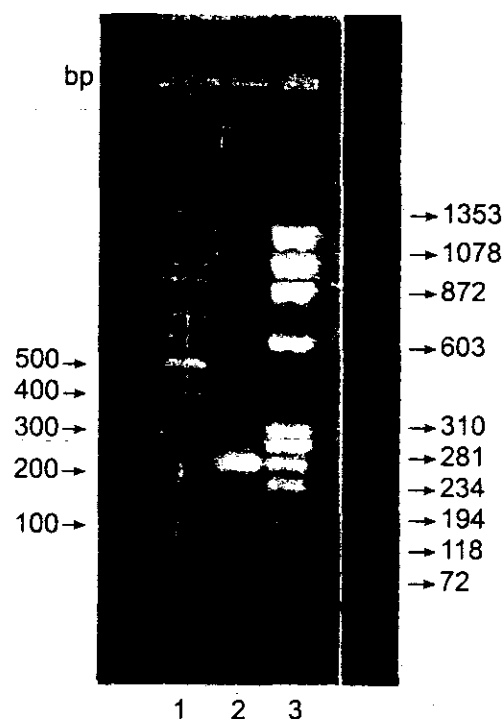
Phân tích trình tự nucleotit chứng tỏ đúng là gen CMTI-V (kết quả không trình bày ở đây). Ngoài ra, chúng tôi cũng đã tổng hợp gen mã hoá CMTI-V theo phương pháp đã mô tả trước đây [14] và nhân đoạn gen đã được tổng hợp bằng kỹ thuật PCR với 2 phản ứng PCR

nối tiếp nhau, phản ứng sau sử dụng sản phẩm của phản ứng trước làm khuôn, với 2 mỗi xuôi và ngược. Kết quả trên hình 2 cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng 230bp, đúng theo tính toán lý thuyết. Sản phẩm PCR được tinh sạch qua màng Recochip, nhận được một băng ADN sắc nét, có kích thước tương ứng 230bp (hình 3).



Hình 2: Kết quả tổng hợp gen CMTI-V

- 1 - Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi mẫu là 200ng
- 2- Sản phẩm PCR 1 với nồng độ của mỗi mẫu là 250ng
- 3 - Thang ADN chuẩn (100bp)
- 4.5- Sản phẩm PCR 2, mỗi xuôi, mỗi ngược, khuôn là sản phẩm PCR1.



Hình 3: Kết quả tinh sạch sản phẩm

PCR của gen CMTI-V

- 1- Thang ADN chuẩn (100bp)
- 2- Sản phẩm PCR (của cột 4, 5 ảnh 3) sau khi tinh sạch
- 3- Thang ADN chuẩn λ /Hae III (100bp)

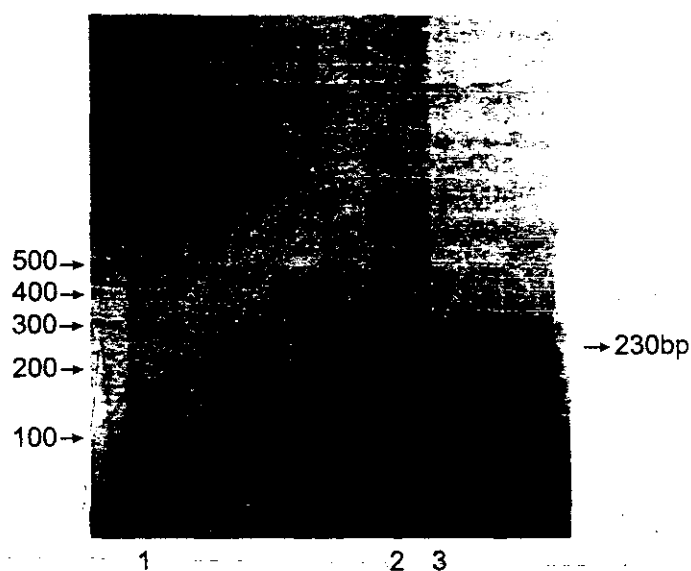
3.3. Tách dòng gen CMTI-V

Để thu được đủ số lượng gen CMTI-V dùng trong biến nạp, sản phẩm PCR nhân bản từ genom bí đỏ đã được tinh sạch, cắt bằng BamHI và NdeI, điện di trên gel agaroz 2% để tách và tinh sạch gen CMTI-V, nối vào plasmit pET 14b cũng đã được cắt với 2 enzym BamHI và NdeI. Quá trình gắn gen vào plasmit được thực hiện nhờ T₄ ligaz. Vectơ mang gen CMTI-V (được kí hiệu là pET-TI-V) được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5 α để nhân vectơ tái tổ hợp. Kết quả biến nạp được sàng lọc trên môi trường LB-agar có

ampixilin, X-gal và IPTG, các khuẩn lạc màu trắng (khuẩn lạc dương tính) là các vi khuẩn tái tổ hợp có chứa pET-TI-V.

3.4. Kiểm tra tiếp sản phẩm biến nạp bằng PCR

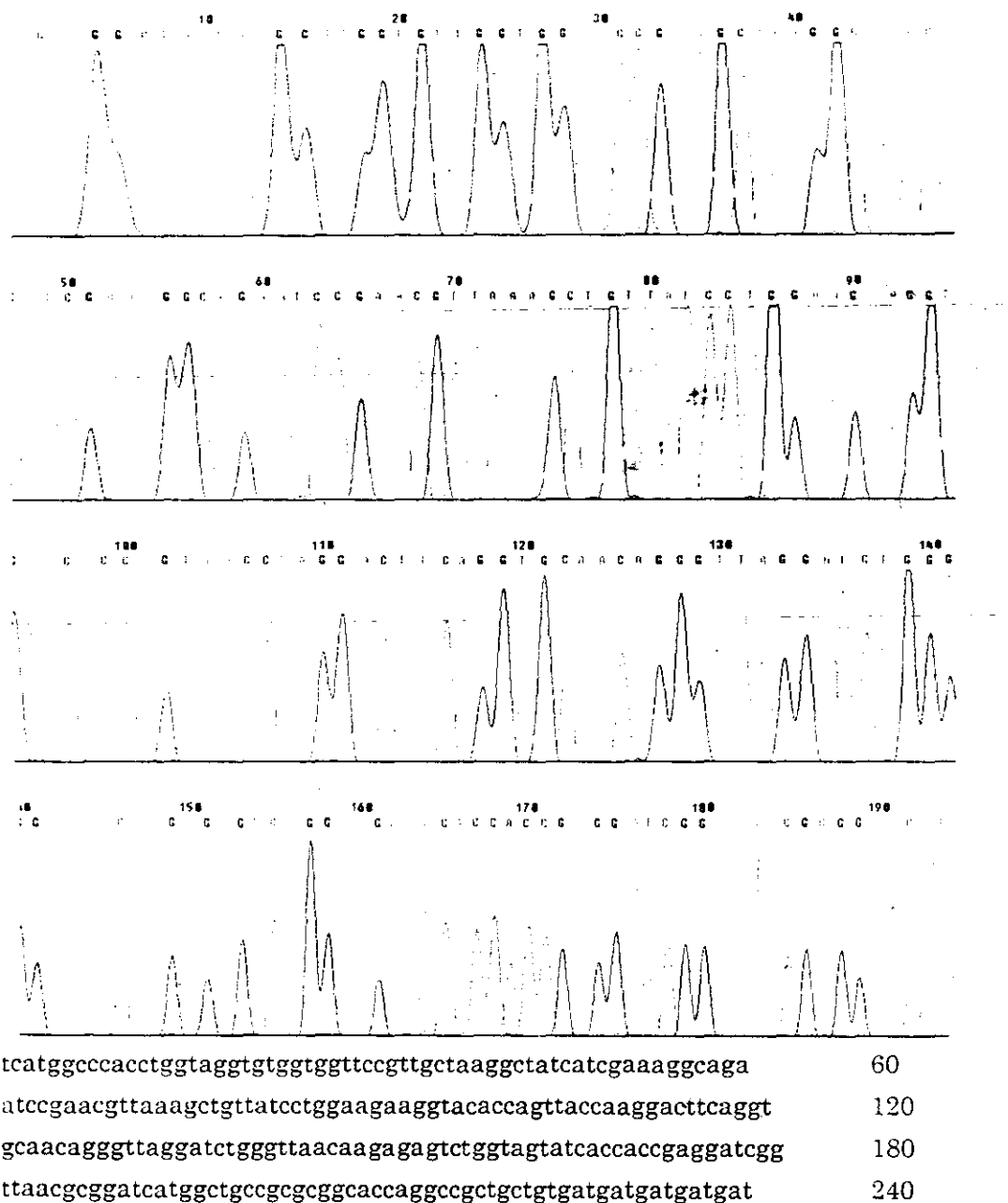
Tách ADN plasmid từ các khuẩn lạc dương tính dùng làm khuôn trong PCR với cặp mồi xuôi, ngược đặc hiệu của gen CMTI-V. Kết quả trên hình 4 cho thấy sản phẩm PCR có 1 băng ADN sắc nét được nhân bản từ các vectơ tái tổ hợp có kích thước tương ứng với sản phẩm PCR khi sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn, đã được tách dòng trong *E.coli*.



Hình 4: Điện di đồ sản phẩm PCR trên PAGE 5% ADN plasmid tách từ các khuẩn lạc dương tính

- 1- Thang ADN chuẩn (100-10000bp)
- 2- Sản phẩm PCR sử dụng ADN plasmid tái tổ hợp làm khuôn với cặp mồi đặc hiệu cho gen CMTI-V
- 3- Sản phẩm PCR sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn

Để tiếp tục kiểm tra sản phẩm biến nạp, plasmid của các khuẩn lạc dương tính đã được tinh sạch và xác định trình tự nucleotit của đoạn gen đích nối vào plasmid pET14b. Kết quả được trình bày ở hình 5.

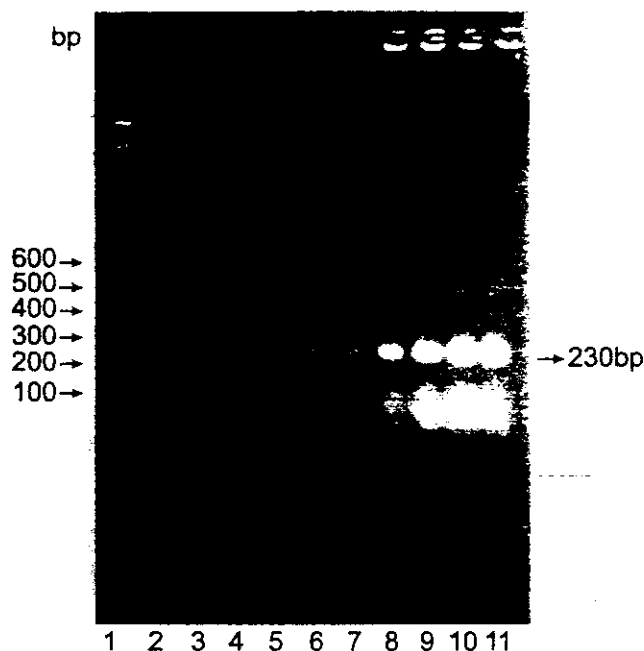


Hình 5: Kết quả xác định trình tự đoạn ADN plasmit tái tổ hợp có chứa gen CMTI-V

3.5. Biểu hiện gen CMTI-V trong E.coli BL21

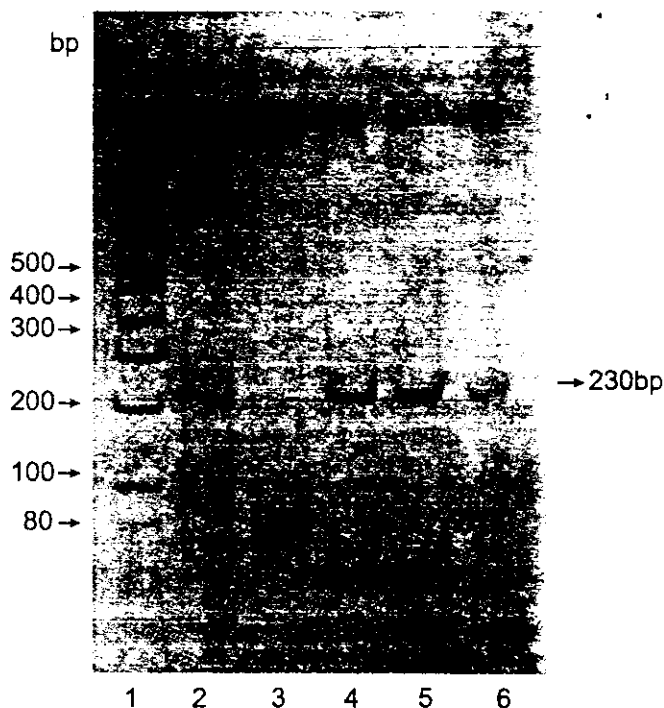
Plasmid tái tổ hợp pET-TI-V được biến nạp vào *E.coli* BL21 (DE3), kí hiệu là BL21-pET-TI-V. Sau khi biến nạp, cấy trải vi khuẩn tái tổ hợp trên môi trường LB đặc có ampicilin và X-gal, chọn các khuẩn lạc trắng (khuẩn lạc dương tính, đã được biến nạp) nuôi cấy tiếp trên môi trường LB lỏng có ampicilin ở 37°C qua đêm, tách plasmid và kiểm tra

bằng kỹ thuật PCR. Kết quả trên hình 6 và 7 cho thấy các khuẩn lạc đều cho sản phẩm PCR đúng kích thước đã dự tính.



Hình 6: Điện di đồ sản phẩm PCR trên gel agaroz 2% (sử dụng ADN plasmit tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc khác nhau của BL21-pET-TI-V làm khuôn).

- 1-Thang ADN chuẩn (Marker Mix: từ 100-10000bp)
- 2-11: sản phẩm PCR của ADN plasmit của các khuẩn lạc dương tính khác nhau



Hình 7: Điện di đồ sản phẩm PCR trên PAGE 5% (sử dụng ADN plasmit tái tổ hợp tách từ các khuẩn lạc khác nhau của BL21-pET-TI-V làm khuôn).

- 1 - Thang ADN chuẩn (Marker 100bp: từ 80-1031bp)
- 2,3 - Đối chứng: sản phẩm PCR ban đầu (sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn với mỗi xuôi, ngược (1μl và 0,5μl))
- 4,5,6 - Sản phẩm PCR của các ADN plasmit tách từ các khuẩn lạc khác nhau của BL21-pET-TI-V.

Các khuẩn lạc dương tính được nuôi trên môi trường LB lỏng, cảm ứng bằng IPTG để biểu hiện gen CMTI-V. Chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng nồng độ chất cảm ứng, thời gian, nhiệt độ nuôi cấy v.v... đến quá trình biểu hiện (kết quả không trình bày ở đây). Ở các điều kiện đã lựa chọn tiến hành nuôi vi khuẩn trên máy lắc hoặc lên men. Sau khi thu tế bào vi khuẩn, phá vỡ màng tế bào và ly tâm.

Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp có trong dịch nổi sau ly tâm bằng phương pháp điện di trên gel poliacrilit không có SDS, có cơ chất [8]. Kết quả trên hình 8 cho thấy có một băng TI chủ yếu (băng màu xanh trên nền trắng).



Hình 8: Điện di trên gel poliacrilamit 15% không SDS, có cơ chất, băng TI có màu xanh

4. Kết luận

1. Đã tách tinh chế ADN genom của bí đỏ có độ sạch đạt tỉ lệ OD_{260}/OD_{280} là 1,86-1,90.
2. Gen mã hoá CMTI-V đã được nhân lên bằng kỹ thuật PCR khi sử dụng ADN genom bí đỏ làm khuôn, đã tinh sạch và xác định trình tự.
Gen mã hoá CMTI-V cũng đã được tổng hợp thành công từ 4 môi gôi nhau.
3. Đã thiết kế vectơ tái tổ hợp mang gen CMTI-V (pET-TI-V) và nhân dòng trong *E.coli* DH5 α .
4. Biểu hiện gen CMTI-V trong *E.coli* BL21, nhận được protein tái tổ hợp có hoạt tính ức chế trypsin.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bolewska, K., Krowarsch, D., Otlewski, J., Jaroszewski, L., Bierzynski, A., Synthesis, cloning and expression in *E.coli* of a gene coding for the Met 8 $\rightarrow$ Leu CMTI-I- a representative of squash inhibitors of serine proteinases *FEBS Letters* V.377 (1995), pp 172-174.
2. Botes DP., Qobose MD., Corfield VA. Synthesis of wild type and three mutant *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor encoding genes by a single-strand approach. *Gene* V. 105 N^o 2 (1991), pp 243-247.
3. Deana Namuth, Kimmo Koivu, Jelena Arbatova, Viktor Kuvshinov and Eija Pehu. *Advanced plant Molecular Biology Laboratory Manual*, University of Helsinki, Finland (1998), pp 4-7
4. Hernandez, J.F., Gagnon, J., Chiche, L., Nguyen, T.M, Andrieu, J.P., Heitz, A., Trinh H.T., Pham T.T. Chau., and Le Nguyen D., V. Squash trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* exhibit an atypical macrocyclic structure. *Biochemistry*, V. 39 (2000), pp 5722-5730.
5. Hioraki Inoue, Hiroshi Nojima and Hiroto Okayama, Transformation of *E. coli* with plasmids, *Gene*, 96 (1990), pp 23-28.

6. Hojima, Y., Pierce, J.V., and Pisano, J.J., Pumpkin seeds inhibitor of human Factor XIIa. (activated Hageman factor) and bovine trypsin. *Biochemistry* V.21, (1982), pp 3741-3746.
7. Krishnamoorthi, R., Gong, Y.-X., and Richardson, M. A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *FEBS Letter*. V. 273, (1990), pp 163-167.
8. Pham Tran Chau, Konopska L., Leluk J., Trypsin inhibitors in the aleurone grains of *Cucurbita pepo* var. patissonina (white bush) cotyledons. *Biochem. Physiol. pflanz* V. 181 (1986), pp 565-569.
9. Polanowski, A., Otlewski, J., Leluk, J., Wilimowska – Pelc, A., and Wilusz, T., A new family of serine proteinase inhibitors from squash seeds. *Biol. Zentralbl* V. 107, (1988), pp 45-49.
10. *Promega Protocols and Applications Guide* (1989), pp 52-56.
11. *Qiagen Mini Hand book* (1999), pp 9-11.
12. Ulrike Schindler and Anthony R. Cashmore. *Methods in Plant Molecular Biology A Laboratory Course Manual*, (1995), Cold Spring Harbor laboratory Press in USA, pp 275-277.
13. Võ Thị Thương Lan, Phạm Thị Trần Châu, Phân lập gen mã cho trypsin inhibitor (TI-IV) từ một số cây thuộc họ bầu bí bằng kỹ thuật PCR. *Di truyền và ứng dụng. Chuyên san CNSH* (2000), pp. 32-36.
14. Wen L., Kim S.-S., Tinn T.T., Hoang J.-K., Krishnamoorthi Gong Y., Lwin Y. N., and Kyin S. Chemical synthesis, Molecular cloning, overexpression and site-directed mutagenesis of the gene coding for pumpkin (*Cucurbita maxima*) trypsin inhibitor CMTI-V. *Protein Expression and purification* V.4 (1993), pp. 215-222.

VNU. JOURNAL OF SCIENCE, Nat., Sci., & Tech., T.XX, N^o3, 2004

CLONING AND EXPRESION IN *E.COLI* OF THE GENE CODING FOR PUMPKIN (*CUCURBITA MAXIMA*) TRYPSIN INHIBITOR, CMTI-V

Dao Thi Thuy, Nguyen Quynh Uyen, Nguyen Thi Bich Hau,
Vo Thi Thuong Lan and Pham Thi Tran Chau

Centre of Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

CMTI-V is a trypsin inhibitor discovered in 1990. from pumpkin seeds. It consists of 68 amino acid residues in a single chain and one didulfide bridge, Mr of 7.1kDa. The CMTI-V also specifically inhibits factor XIIa. However the content of CMTI-V in pumpkin seeds is rather low, therefore it is worthy to study the gene encoding CMTI-V, cloning and expression of the gene in *E.coli*.

For this purpose, the total genomic DNA from pumpkin (*Cucurbita maxima*) was isolated and purified. The CMTI-V gene was sucessfully cloned from genomic DNA of pumpkin by PCR technique, using its specific forward and reverse primers containing restriction enzyme specific sites. The PCR amplified product was inserted into plasmid pET-14b to form pET-14b-CMTI-V and transformed into *E.coli* DH5 α . Selection and checking the positive clones by PCR and the target gene in recombinant vector was sequenced. The obtained results indicated that the gene was sucessfully cloned. The target gene was expressed in *E.coli* BL21 (DE3) and the recombinant protein was tested for inhibitory activity against trypsin on PAGE containing substrate. One major TI band was found.

CONTENTS

1.	Dao Thi Thuy, Nguyen Quynh Uyen, Nguyen Thi Bich Hau, Vo Thi Thuong Lan and Pham Thi Tran Chau. Cloning and expresion in <i>E.coli</i> of the gene coding for pumpkin (<i>Cucurbita maxima</i>) Trypsin inhibitor, CMTI-V.....	1
2.	Trinh Hong Thai, Trinh Thi Thanh Huong, Luong Thuy Duong, Phan Thi Ha. Composition of extracellular proteinase produced by entomopathogenic bacteria (<i>Xenorhabdus</i> sp. ca)	11
3.	Pham Ngoc Lan, Nguyen Thu Hang. Synthesis and characterization of segmented polyurethanes based on polyethylene and polytetramethylene glycols. Part 2: Thermo-mechanical and sweling properties	19
4.	Nguyen Van Hai, Vu Đức Lợi. A research on Lead accumulation of green cabbage in the environment using atom absorbing spectrum method	25
5.	Nguyen Thi Minh Ngoc, Mai Trong Nhuan, Dang Van Luyen. Geochemical sedimentary evolution during process of mangrove forest formation, development and degradation in Red river mouth (on example of Giaothuy mangrove forest, Namdinh province)	33
6.	Phan Ke Long. An undescribed species of <i>steinernema</i> (rhabditida: steinernematidae) from Chumomray national park (Vietnam)	43
7.	Ta Hoa Phuong, Nguyen Cong Thuan. Paleoecological features and the distribution of conodonts and tentaculites in D ₃ :C ₁ sediments in some areas of Bac Bo region	51
8.	Nguyen Huu Khai, Le Xuan Cau. Applying Artificial Neural Networks (ANN) model in flash flood simulation and forecast	57
9.	Le Trung Thanh. A new method of BER compensative Power calculation for designing M-QAM signals transmission systems over optic- fiber communications systems.....	65
10.	Nguyen Thanh Hieu, Nguyen Viet Kinh. Par reduction in OFDM using tone reservation.....	74
11.	Le Xuan Hong, Phan Ngoc Vinh. Characteristics of the coastal geomorphology of Lyhoa, Quangbinh province.....	82

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIETNAMESE ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN 1811-4989

TẠP CHÍ

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tập (Volume) 2 Số (Number) 2 2004

TẠP CHÍ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tổng biên tập (Editor-in-Chief)

Lê Trần Bình

Phó Tổng biên tập (Associate Editors)

Nông Văn Hải

Trần Linh Thuộc

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP (EDITORIAL BOARD)

Lê Trần Bình

Ngô Đình Bính

Bùi Chí Bửu

Phan Văn Chi

Nguyễn Văn Cường

Đặng Thị Cẩm Hà

Trương Nam Hải

Nông Văn Hải

Lại Thúy Hiền

Lê Thanh Hòa

Đinh Duy Kháng

Hoàng Thủy Long

Phan Tuấn Nghĩa

Bùi Xuân Nguyên

Hồ Hữu Nhị

Nguyễn Quang Thạch

Nguyễn Tiến Thắng

Trần Linh Thuộc

Nguyễn Thị Hoài Trâm

Trần Duy Quý

Nguyễn Đăng Vang

Thư ký Tòa soạn (Editorial Office Secretary): Lê Thị Vân Anh

Tòa soạn Tạp chí Công nghệ Sinh học: Số 70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội

Điện thoại: (04) 9422825 hoặc (04) 7564333 xin 1077, E-mail: ujbt@ibt.ac.vn

Tổng biên tập/Phó Tổng biên tập (thường trực): Số 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

Điện thoại: (04) 7564691/7562934. E-mail: binh@ibt.ac.vn / vhnong@ibt.ac.vn

TÍNH CHẾ VÀ PHÂN TÍCH KHỐI PHỔ PROTEIN BẤT HOẠT RIBOSOME TÁI TỔ HỢP TỪ CÂY MUỚP ĐẮNG (*MOMORDICA CHARANTIA* L.)

Nguyễn Đình Cường, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Đặng Thành Nam, Phan Văn Chi

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Protein bất hoạt ribosome của mướp đắng (*Momordica charantia* L.) (gọi tắt là McRIP) bao gồm 3 loại: α , β và γ - momorcharin. Tương tự như các loại RIP từ các loài thực vật khác, McRIP tham gia vào hệ thống tự bảo vệ của thực vật (kháng nấm, vi khuẩn, virus ...). McRIP được quan tâm nghiên cứu nhiều do có khả năng kìm hãm hoạt động của một số virus (HIV, Epstein-Barr, herpes, SARS...) và ức chế hoạt động của các tế bào ung thư. Việc sử dụng RIP tự nhiên từ cây mướp đắng (nMcRIP) có những hạn chế về nguồn nguyên liệu, hiệu suất tách chiết và chi phí sản xuất. Vì vậy, hướng tạo McRIP tái tổ hợp (rMcRIP) để sử dụng trong các nghiên cứu về hoạt tính sinh học cũng như cấu trúc - chức năng của protein quý này là một giải pháp lựa chọn hợp lý. Mới đây, chúng tôi đã phân lập và đọc trình tự một gen mã hóa McRIP. Chúng tôi cũng đã thiết kế thành công vector biểu hiện McRIP trong vi khuẩn *E. coli*, trên cơ sở vector pET21d(+). Trong công trình này, chúng tôi thông báo quy trình tinh chế rMcRIP bằng sắc ký trao đổi ion trên cột CM-Sephadex. Một lượng lớn rMcRIP tinh sạch thu được trong điều kiện sử dụng đệm Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 với gradient nồng độ muối NaCl 0,0 M - 0,4 M. Kết quả phân tích khối phổ (MALDI-TOF MS và MS/MS) của rMcRIP cho thấy, 7 đoạn peptide có trình tự từ 6 - 13 gốc amino acid trùng khớp hoàn toàn với trình tự amino acid suy diễn từ gen mã hóa McRIP đã được công bố tại Cơ sở dữ liệu protein của NCBI. Các nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính của rMcRIP tinh chế đang được tiến hành.

Từ khóa: MALDI-TOF, mướp đắng (*Momordica charantia* L.), RIP, RIP tái tổ hợp (rMcRIP)

MỞ ĐẦU

Mướp đắng (*Momordica charantia* L.) từ lâu đã được người dân Trung Quốc, Ấn Độ và một số nước Châu Á, Châu Phi sử dụng làm thuốc dân gian như làm thuốc ra thai, thuốc duy trì huyết áp, thuốc điều trị bệnh thấp khớp và một số bệnh liên quan tới gan, lách. Các nghiên cứu gần đây còn cho thấy tác dụng chống các tế bào ung thư, các virus HIV, Epstein-Barr, herpes và SARS của mướp đắng. Có được những tác dụng hữu hiệu đó là do mướp

đắng có khả năng tạo ra một số chất "đặc biệt", trong đó có protein bất hoạt ribosome (RIP).

Các nghiên cứu đầu tiên về RIP của mướp đắng (McRIP) đã được tiến hành từ năm 1982 (Foa-Tomasi *et al.*, 1982; Falasca *et al.*, 1982). Cho tới nay, 3 loại RIP tự nhiên α , β và γ - momorcharin đã được tách chiết từ hạt mướp đắng, trong đó 2 loại RIP đầu được nghiên cứu nhiều hơn. Cũng giống như các loại RIP tách chiết từ các loài thực vật khác, α và β - momorcharin (còn gọi là momordin I, II

tương ứng) là những chất có hoạt tính N-glycosidase, có khả năng kháng nấm, vi khuẩn, virus ... Trình tự nucleotide gen mã hóa α và β - momorcharin cũng như trình tự amino acid của chúng đã được nghiên cứu (Montecucchi *et al.*, 1989; Funatsu *et al.*, 1991; Minami, Funatsu, 1993; Pu *et al.*, 1996). Cấu trúc tinh thể của α và β - momorcharin tự nhiên được xác định cho thấy, các trung tâm hoạt tính, vị trí liên kết với nhánh hexasaccharide (Husain *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1999). Đồng thời, gen mã hóa MAP30 (thuộc loại β - momorcharin) đã được tách dòng và biểu hiện trong *E. coli* sử dụng hệ vector pRSET. MAP30 tái tổ hợp (re-MAP30) có đầy đủ các hoạt tính sinh học (kháng virus HIV, các tế bào ung thư) như MAP30 tự nhiên (nMAP30) (Lee-Huang *et al.*, 1995).

Trong nghiên cứu trước (Nguyễn Đình Cường *et al.*, 2003), chúng tôi đã thành công trong việc thiết lập vector biểu hiện gen mã hóa RIP từ mướp đắng Việt Nam kết cấu pET21d(+)+McRIP và biểu hiện protein tái tổ hợp này (rMcRIP) trong vi khuẩn *E. coli*. rMcRIP và re-MAP30 có độ tương đồng cao (chỉ có sai khác ở vị trí amino acid 165 I $\rightarrow$ T) nên giả thuyết được đặt ra là rMcRIP có những hoạt tính sinh học quý giá tương tự MAP30. Sử dụng hệ vector pET21d(+) và vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3), rMcRIP được biểu hiện mạnh và chiếm trên 50% protein tổng số của vi khuẩn *E. coli*. Điều này đã tạo ra một lượng protein tái tổ hợp đầy đủ phục vụ cho các nghiên cứu về cấu trúc, chức năng sinh học của rMcRIP cũng như những dạng rMcRIP được thay đổi về mặt cấu trúc bậc 1.

Trong công trình này, chúng tôi trình bày những kết quả nghiên cứu về tinh chế rMcRIP bằng sắc ký trao đổi ion qua cột CM-Sepharose (XK-16/20) trên hệ FPLC

và phân tích cấu trúc protein tinh chế được bằng khối phổ liên tục MALDI-TO MS/MS. Công trình này được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các loại MALDI matrix được mua từ hãng Sigma (Mỹ), trypsin (hãng Promega Mỹ), acetonitrile, methanol (hãng Fisher Scientific, Anh), ... Hệ thống khối phổ QSTAR[®] XL (MDS Sciex, Toronto Canada) được trang bị nguồn MALDI và ESI.

CM-Sepharose, cột sắc ký XK-16/20 và hệ thống FPLC của hãng Amersham Pharmacia Biotech.

Phương pháp

Tinh chế rMcRIP

Tinh chế RIP tái tổ hợp chủ yếu dựa trên phương pháp của Phan Văn Chi và cộng sự (2001) dùng để tinh chế Trichobakin tái tổ hợp - RIP của *Trichosanthes* sp. Bac Kan 8-98 - với một số cải tiến nhỏ.

Tiến hành biểu hiện lượng lớn rMcRIP theo phương pháp đã mô tả (Nguyễn Đình Cường *et al.*, 2003), ly tâm 6000 vòng/phút trong 6 phút để thu sinh khối tế bào. Hòa tế bào trong đệm Tris.HCl 50 mM pH7, EDTA 20 mM pH 7, Triton 0,01%, Lysozyme 0,3 μ g/ml, phá tế bào bằng siêu âm. Ly tâm 12000 vòng/phút để tách riêng phần dịch chứa rMcRIP và phần cặn. Phần dịch được đưa lên cột CM-Sepharose với tốc độ dòng chảy 1 ml/giờ trên hệ FPLC. Các chất không bám trên cột được rửa bằng đệm Tris.HCl 50

M pH 7 cho đến khi giá trị $A_{280\text{ nm}}$ trở lại đường nền. rMcRIP được thổi ra khỏi cột bởi gradient nồng độ NaCl (0,0 M - 0,4 M) trong đệm Tris.HCl 50 mM pH 7 với tốc độ dòng chảy 60 ml/giờ và thể tích mỗi phân đoạn là 1 ml. Protein trong mỗi phân đoạn được kiểm tra trên SDS-PAGE 12,5 %.

Thủy phân rMcRIP bằng trypsin

rMcRIP tinh sạch được thủy phân trực tiếp với trypsin trong dung dịch theo các chỉ dẫn về hoạt tính của enzyme. Dịch chiết có chứa các peptide được làm khô. Hỗn hợp peptide được hòa lại bằng 5 μ l dung dịch có chứa 50% acetonitrile, 0,1% TFA (Cohen, Chait, 1997; Shevchenko *et al.*, 2000; Stensballe, Jensen, 2001).

Chuẩn bị mẫu cho MALDI-TOF MS

Mẫu được đưa lên khay theo phương pháp 3 lớp: Đầu tiên đưa 1 μ l dung dịch matrix lên trên đĩa mẫu và để khô ở nhiệt độ phòng; sau đó đưa 1 μ l dung dịch mẫu lên lớp matrix, để khô ở nhiệt độ phòng. Mẫu lại được phủ bằng 1 μ l matrix rồi để khô hoàn toàn ở nhiệt độ phòng. Dung dịch matrix gồm 10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid trong 60% acetonitrile, 40% H_2O , 0,1% TFA.

Ghi phổ MALDI-TOF MS và MS/MS

Dưới tác dụng của xung laser, các phân tử matrix nhanh chóng phân ly ra các proton. Những proton này sẽ làm thăng hoa và ion hóa các phân tử peptide đã được kết tinh trong matrix. Khi chịu tác dụng của điện trường, các ion protein/peptide sẽ bay về phía điện cực trái dấu và được phát hiện bằng bộ phận nhận biết tín hiệu (detector).

Các ion có năng lượng như nhau nhưng khác nhau về khối lượng nên các

ion sẽ va vào detector tại các thời điểm khác nhau (đây là cơ sở của phương pháp phân tích theo thời gian bay (Time-Of-Flight: TOF)). Các ion có khối lượng nhỏ hơn sẽ tới detector trước bởi chúng có vận tốc lớn hơn so với các ion có khối lượng lớn hơn. Dựa trên thời gian này, có thể tính được khối lượng của ion. Thời gian bay của ion tới detector phụ thuộc vào khối lượng, diện tích và động năng (W) của hạt. Do động năng $W = 1/2mv^2$ hay $v = (2W/m)^{1/2}$ nên các ion sẽ bay tới detector trong khoảng thời gian t , với t phụ thuộc vào tỷ lệ giữa khối lượng và diện tích của nó (m/z) (Karas, Hillenkamp, 1988; Mann *et al.*, 2001).

So sánh và tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu của NCBI

Chương trình BioanalystTM 1.1 cho phép tự động tính toán, đánh dấu các mảnh ion trong phổ ghi. Chương trình MATRIX SCIENCE MASCOTTM v1.8 sử dụng thuật giải "xác suất trên cơ sở phù hợp" để so sánh phổ MALDI-TOF MS và MS/MS với cơ sở dữ liệu về protein của NCBI (Perkins *et al.*, 1999). Phổ tìm kiếm được định dạng theo kiểu MASCOT. Sai số khối cho phép trong tìm kiếm dữ liệu được đặt ở 100 ppm đối với những mảnh peptide gốc và 0,5 Da đối với những mảnh ion.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh chế RIP tái tổ hợp

β - momocharin tự nhiên đã được tinh chế từ hạt mướp đắng với việc sử dụng đồng thời nhiều loại cột sắc ký như S-Sepharose, Sephadex G-50, CM-Sepharose và Red Sepharose (Valbonesi *et al.*, 1999) hay DEAE-cellulose và Mono-S (Fong *et al.*, 1996). Còn đối với các loại RIP tái tổ

hợp thì việc tinh sạch chúng đơn giản hơn, re-MAP30 được tinh sạch qua cột ái lực được nhồi bằng NiCl_2 (Lee-Huang et al., 1995), Trichobakin (TBK - RIP của *Trichosanthes* sp. Bac Kan 8-98) được tinh sạch qua cột sắc ký trao đổi ion qua cột CM-Sepharose (Phan Van Chi et al., 2001). Do rMcRIP có tính chất tương tự với TBK nên chúng tôi đã lựa chọn phương pháp tinh chế rMcRIP bằng sắc ký trao đổi ion qua cột CM-Sepharose (XK-16/20).

Theo tính toán lý thuyết, rMcRIP có giá trị pI 8,86. rMcRIP tan trong đệm Tris.HCl 50 mM pH 7 nên đã tạo điều kiện thuận lợi khi tiến hành tinh chế. Đệm Tris.HCl 50 mM pH 7 đã được sử dụng để đảm bảo cho rMcRIP mang điện tích dương và có thể liên kết với các nhóm chức năng ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$) của CM-Sepharose. Hơn nữa, với giá trị pH này thì các nhóm trao đổi của CM-Sepharose vẫn mang điện tích dương và cấu trúc hạt của CM-Sepharose ổn định.



Hình 1. Điện di đồ rMcRIP tinh sạch. M: Thang protein chuẩn; 1-8: rMcRIP ở các phân đoạn khác nhau.

rMcRIP được tách ra khỏi cột dưới dạng một đỉnh duy nhất bởi gradient nồng độ NaCl (0,0 M - 0,4 M). Kết quả phân tích các phân đoạn thu được ở xung quanh đỉnh phổ sắc ký bằng SDS-PAGE

cho thấy protein thu được có dạng một băng duy nhất có kích thước tương ứng với kích thước lý thuyết của rMcRIP. Như vậy, chỉ cần sử dụng một cột CM-Sepharose với các thông số kỹ thuật thích hợp chúng tôi đã thu được rMcRIP tinh sạch. rMcRIP đã được tinh sạch với lượng lớn (3 - 5 g) và đông khô để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Xác định rMcRIP

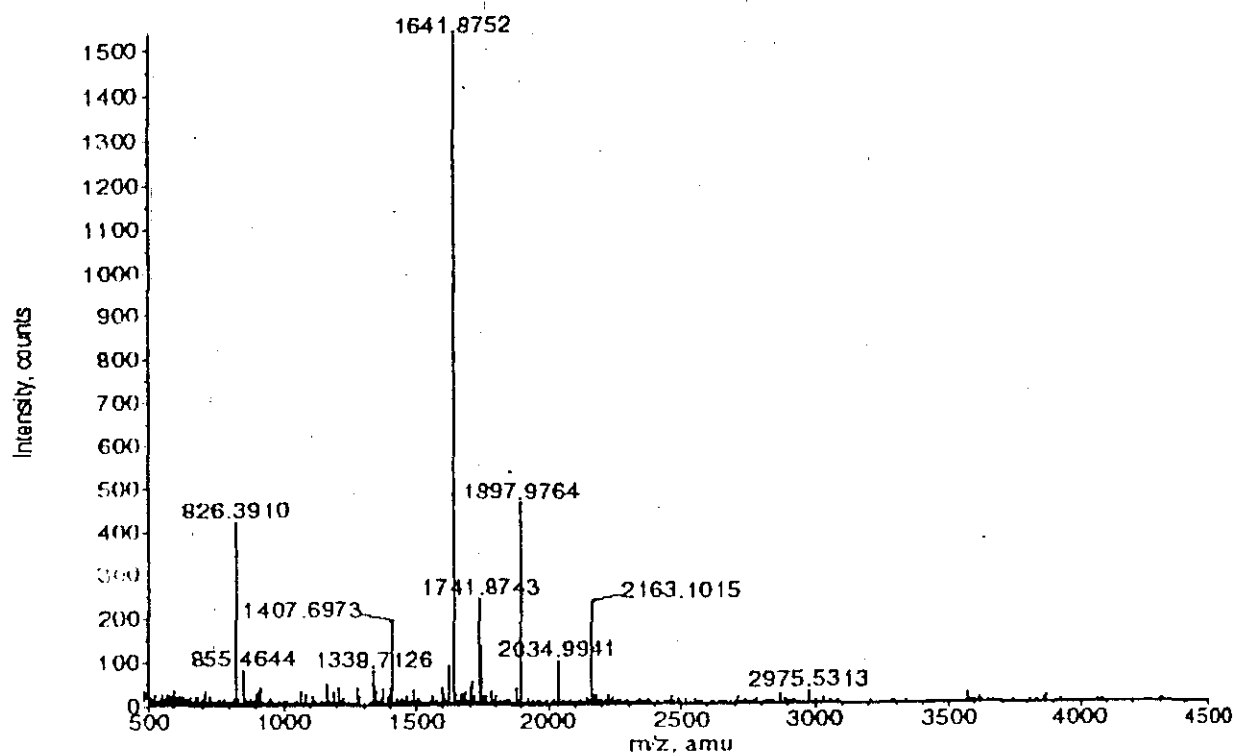
Dựa trên trình tự nucleotide của đoạn gen mã hóa RIP trong *pMcRIP6* (mã số AJ748278 trên Ngân hàng EMBL), chúng tôi thu được trình tự amino acid suy diễn của rMcRIP bao gồm 264 amino acid. Để nghiên cứu khối phổ của rMcRIP, protein này đã được xử lý bằng trypsin. Đây là enzyme thủy phân protein tạo ra các peptide có lysine (K) hoặc arginine (R) tại đầu C. Theo tính toán lý thuyết, rMcRIP bị thủy phân hoàn toàn sẽ tạo thành 24 peptide và 2 amino acid đơn (K và R) trong đó peptide lớn nhất có kích thước 4307,2809 Da và nhỏ nhất là 4 dipeptide với kích thước từ 276,1666 - 322,1873 Da. Trong đoạn peptide kích thước 2707,445 Da có amino acid K nhưng do K liên kết với P (proline) nên trypsin không cắt peptide này thành 2 peptide nhỏ hơn. Các đoạn peptide được tạo ra theo lý thuyết được trình bày trên bảng 1.

Kết quả thực nghiệm thu được trên hình 2 cho thấy, các peptide sau khi thủy phân đều được ghi lại rõ nét. Trên phổ MALDI-TOF MS xuất hiện các đoạn peptide có khối lượng phân tử (KLPT) của các đoạn peptide có điện tích $z = 1$, nên KLPT $m = m/z$ trùng với KLPT của các đoạn peptide được tạo ra theo lý thuyết (826,3910 Da; 1338,7126 Da; 1407,697 Da; 1641,8752 Da; 1741,8743 Da; 2034,9941 Da). Trên hình 2, phổ MS của

peptide kích thước 1641,8752 lớn nhất hoàn toàn đoạn peptide từ 208 - 221
 nhưng trong bảng 1 không xuất hiện thành 2 peptide kích thước 322,1873 và
 peptide này. Có thể đoạn peptide này 1338,7375 (cả 2 peptide này đều có mặt
 được tạo thành do sự phân cắt không trong bảng 1).

Bảng 1. Các đoạn peptide thu được theo lý thuyết khi xử lý rMcRIP bằng trypsin.

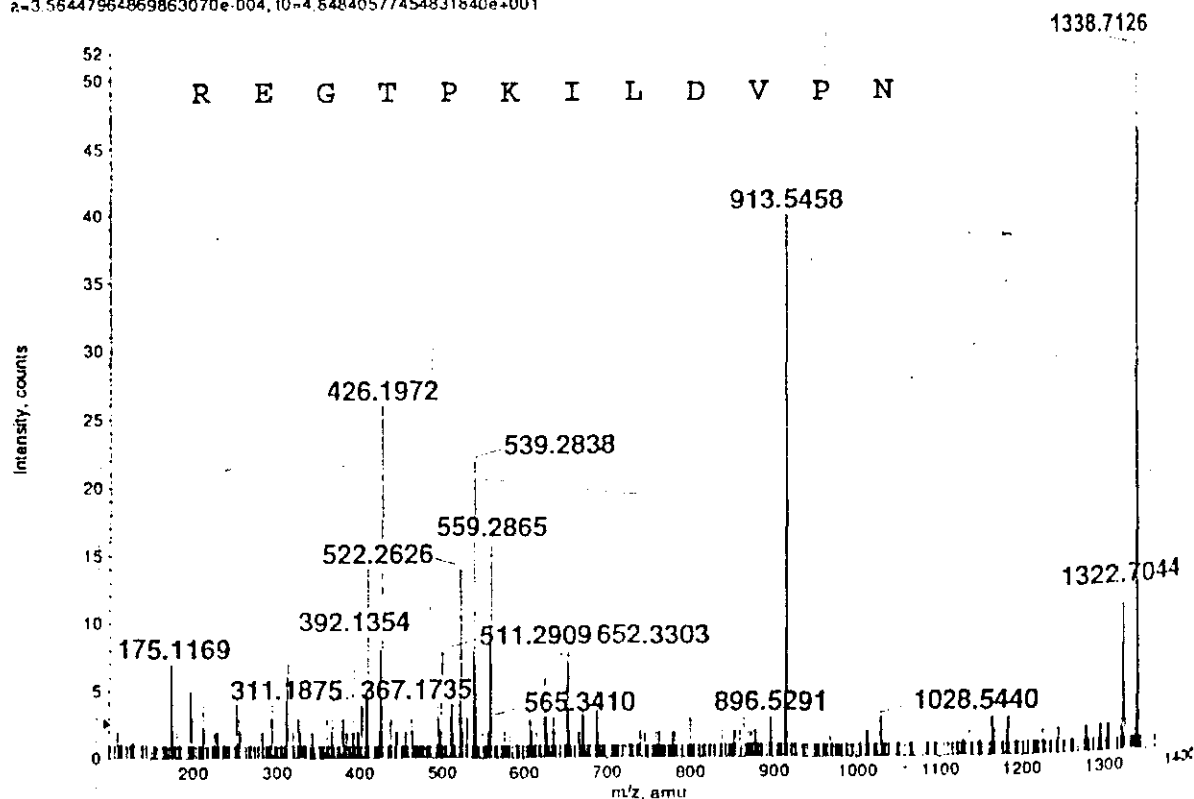
STT	KLPT (Da)	Vị trí	Trình tự đoạn peptide
1	4307,2809	122 - 162	ENIDLGLPALSSAITTLFYY NAQSAPSALLVLIQTAEAA R
2	3310,7609	48 - 76	FILLNLTSYAYETISVAIDV TNAVYVAYR
3	2707,4453	173 - 196	YVATNFKPNLAISLENQWS ALSK
4	2213,0642	244 - 264	ASTADENFITTMTLLGESVV N
5	2034,0290	102 - 119	ITLPYTGNYENLQTAHAK
6	1741,9007	32 - 46	VYDIPLLYSTISDSR
7	1412,6726	1 - 13	MDVNFDLSTATAK
8	1407,7154	86 - 97	ESPPEAYNILFK
9	1350,6899	222 - 233	FQVTNVDSDVVK
10	1338,7375	210 - 221	NPVDLIKPTGER
11	1203,6480	197 - 207	QIFLAQNQGGK
12	905,4403	79 - 85	DVSYFFK
13	900,4937	24 - 31	ATLPFSHK
14	826,4093	18 - 23	FIEDFR
15	715,4461	238 - 243	LLNSR
16	580,3089	165 - 168	YIER
17	512,2715	14 - 17	TYTK
18	454,2772	169 - 172	HVAK
19	431,2612	234 - 237	GNIK
20	333,1881	98 - 100	GTR
21	322,1873	208 - 209	FR
22	294,1812	163 - 164	FK
23	288,2030	120 - 121	IR
24	276,1666	77 - 78	TR
25	175,1189	47 - 47	R
26	147,1128	101 - 101	K



Hình 2. Phổ MALDI-TOF MS của rMcRIP sau khi xử lý bằng trypsin.

+TOF Product (1338,7): 96 MCA scans from Sample 12 (1338.7)
 $\lambda=3.56447964869863070e-004$, $10=4.84840577454831840e+001$

Max. 52.0 counts



Hình 3. Phổ MALDI-TOF MS/MS của mảnh peptide có giá trị m/z 1338,7126 amu.

Tuy nhiên, để có thể kết luận chắc chắn về protein đã biểu hiện và tinh chế được, chúng tôi tiến hành đo khối phổ liên tục MALDI TOF MS/MS của các đoạn peptide KLPT giống như tính toán lý thuyết. Phổ MALDI-TOF MS/MS của các đoạn peptide này cũng rất rõ nét và đặc trưng (Hình 3).

Toàn bộ phổ MALDI-TOF MS/MS của hỗn hợp peptide thu được đã dùng để so sánh với cơ sở dữ liệu về protein của NCBI bằng chương trình tìm kiếm MATRIX SCIENCE MASCOT™ v1.8. Kết quả cho thấy, các protein tìm được có số điểm (score) cao nhất (239, 219) đều là RIP (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu của NCBI.

1. gi 6573485	Mass: 29583	Total score: 239	Peptides matched: 8					
Chain A, The Restrained And Minimized Average Nmr Structure Of Map30								
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<u>3</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	(30)	2	FIEDFR
<u>4</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	44	1	FIEDFR
<u>5</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	(27)	4	FIEDFR
<u>7</u>	905,40	904,39	904,43	-0,04	0	17	2	DVSYFFK
<u>8</u>	1203,60	1202,59	1202,64	-0,05	0	72	1	QIFLAQNQGCK
<u>9</u>	1338,70	1337,69	1337,73	-0,04	0	41	4	NPVDLIKPTGER
<u>10</u>	1350,70	1349,69	1349,68	0,01	0	26	1	FQVTNVDSDVVK
<u>11</u>	1407,70	1406,69	1406,71	-0,02	0	39	3	ESPPEAYNILFK

Proteins matching the same set of peptides:

gi|2119758 Mass: 31999 Total score: 236 Peptides matched: 8

rRNA N-glycosidase (EC 3.2.2.22) map30 precursor - balsam pear

gi|11225518 Mass: 32011 Total score: 236 Peptides matched: 8

MAP30I [*Momordica charantia*]

gi|132581 Mass: 32012 Total score: 236 Peptides matched: 8

Ribosome-inactivating protein momordin II precursor (rRNA N-glycosidase)

gi|10129818 Mass: 29742 Total score: 219 Peptides matched: 8

ribosome inactivating protein, RIP, type I [*Momordica charantia*]

2. gi 10129818		Mass: 29742		Total score: 219			Peptides matched: 8	
ribosome inactivating protein, RIP, type I [<i>Momordica charantia</i>]								
Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Rank	Peptide
<u>3</u>	826,40	82539	825,40	-0,01	0	(30)	2	FIEDFR
<u>4</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	44	1	FIEDFR
<u>5</u>	826,40	825,39	825,40	-0,01	0	(27)	4	FIEDFR
<u>7</u>	905,40	904,39	904,43	-0,04	0	17	2	DVSYFFK
<u>9</u>	1338,70	1337,69	1337,73	-0,04	0	41	4	NPVDLIKPTGER
<u>10</u>	1350,70	1349,69	1349,68	0,01	0	26	1	FQVTNVDSDVVK
<u>11</u>	1407,70	1406,69	1406,71	-0,02	0	39	3	ESPPEAYNILFK
<u>12</u>	1412,70	1411,69	1411,67	0,03	0	52	1	MDVNFDLSTATAK

KẾT LUẬN

rMcRIP đã được tinh chế bằng sắc ký trao đổi ion qua cột CM-Sepharose (XK-16/20) trên hệ FPLC và cho thấy khả năng tinh sạch lượng lớn bằng quy trình này. Các kết quả phân tích khối phổ liên tục MALDI-TOF MS và MS/MS đã tìm thấy ít nhất 7 đoạn peptide có từ 6 đến 13 gốc amino acid trùng khớp hoàn toàn với trình tự amino acid suy diễn từ gen mã hóa McRIP và các gen khác từ mướp đắng trong Ngân hàng của NCBI. Điều này khẳng định chắc chắn rằng protein tái tổ hợp nhận được chính là rMcRIP.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ Đề tài cấp Nhà nước KC.04-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cohen SL, Chait BT (1997) Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels. *Anal Biochem* 247(2): 257-267.
- Citores L, De Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, Argueso P, Jimenez P, Testera A, Camafeita E, Mendez E, Girbes T (1997) Characterization of a new non-toxic two-chain ribosome-inactivating protein and a structurally-related lectin from rhizomes of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). *Cell Mol Biol* 43(4): 485-499.
- de Benito FM, Iglesias R, Ferreras JM, Citores L, Camafeita E, Mendez E, Girbes T (1998) Constitutive and inducible type 1 ribosome-inactivating proteins (RIPs) in elderberry (*Sambucus nigra* L.). *FEBS Lett* 428(1-2): 75-79.
- di Maro A, Valbonesi P, Bolognesi A, Stirpe F, de Luca P, Siniscalco Gigliano G, Gaudio L, delli Bovi P, Ferranti P, Malorni A, Parente A (1999) Isolation and characterization of four type-1 ribosome-inactivating proteins, with polynucleotide: Adenosine glycosidase activity, from leaves of *Phytolacca dioica* L. *Planta* 208(1): 125-131.
- di Maro A, Ferranti P, Mastronicola M, Polito L, Bolognesi A, Stirpe F, Malorni A, Parente A (2001) Reliable sequence determination of ribosome-inactivating proteins by combining electrospray mass spectrometry and Edman degradation. *J Mass Spectrom* 36(1): 38-46.
- Đặng Thành Nam, Lê Thị Bích Thảo, Phan Văn Chí (2003) Nhận dạng và xác định những biến đổi về trình tự của trichobakin và các dẫn xuất bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF MS/MS. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(2): 161-168.
- Falasca A, Gasperi-Campani A, Abbondanza A, Barbieri L, Stirpe F (1982) Properties of the ribosome-inactivating proteins gelonin, *Momordica charantia* inhibitor, and dianthins. *Biochem J* 207(3): 505-509.
- foa-Tomasi L, Campadelli-Fiume G, Barbieri L, Stirpe F (1982) Effect of ribosome-inactivating proteins on virus-infected cells. Inhibition of virus multiplication and of protein synthesis. *Arch Viro* 71(4): 323-332.
- Fong WP, Poon YT, Wong TM, Mock JW, Ng T, Wong RN, Yao QZ, Yeung HW (1996) A highly efficient procedure for purifying the ribosome-inactivating proteins alpha- and beta-momorcharin from *Momordica charantia* seeds, N-terminal sequence comparison and establishment of their N-glycosidase activity. *Life Sci* 59(11): 901-909.
- Funatsu G, Islam MR, Minami Y, Sung-Sil K, Kimura M (1991) Conserved amino acid residues in ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimie* 73(7-8): 1157-1161.
- Huang Q, Liu S, Tang Y, Jin S, Wang Y (1999) Studies on crystal structures, active-centre geometry and depurinating mechanism of two ribosome-inactivating proteins. *Biochem J* 309(1): 285-298.
- Husain J, Tickle II, Wood SP (1994) Crystal structure of momordin, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *Momordica charantia*. *FEBS Lett* 342(2): 154-158.
- Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption/ionization of proteins with molecular mass exceeding 10000 daltons. *Anal Chem* 60: 2299-2301.
- Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, Huang F, Bourinbaiar A, Huang HI, Kung HF (1995) Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene* 161(2): 151-156.
- Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70: 437-473.
- Minami Y, Funatsu G (1993) The complete amino acid sequence of momordin-a, a ribosome-inactivating protein from the seeds of bitter melon (*Momordica charantia*). *Biosci Biotechnol Biochem* 57(7): 1141-1144.

Montecucchi PC, Lazzarini AM, Barbieri L, Stirpe F, Lippa M, Lippi D (1989) N-terminal sequence of some ribosome-inactivating proteins. *Int J Pept Protein Res* 33(4): 263-267.

Muthing J, Meisen I, Bulau P, Langer M, Witthohn K, Lentzen H, Neumann U, Peter-Katalinic J (2004) Castillejo lectin I is a sialic acid-specific lectin with strict preference to gangliosides and glycoproteins with terminal Neu5Ac alpha 2-6Gal beta 1-4GlcNAc residues. *Biochemistry* 43(11): 2996-3007.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.

Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thùy Dương, Lê Thị Thu Hiền, Lương Thị Thu Hương, Trần Thị Phương Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải (2003) Biểu hiện gen mã hóa protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(4): 451-460.

Phan Van Chi, Hoang Quoc Truong, Nguyen Thuy Ha, Won-II Chung, Le Tran Binh (2001) Characterization of trichobakin, a type I ribosome-inactivating protein from *Trichosanthes* sp. *Bac Kan* 3-98. *Biotechnol Appl Biochem* 34: 85-92.

Phan Văn Chi (2003) Khởi phở trong nghiên cứu proteomics. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(1): 11-24.

Pu Z, Lu BY, Liu WY, Jin SW (1996)

Characterization of the enzymatic mechanism of gamma-momorcharin, a novel ribosome-inactivating protein with lower molecular weight of 11,500 purified from the seeds of bitter gourd (*Momordica charantia*). *Biochem Biophys Res Commun* 229(1): 287-94.

Shevchenko A, Chernushevich I, Vilm M, Mann M (2000) *In Protein and Peptide Analysis*. Chapman JR, Ed, Humana Press, Tot.

Stensballe A, Jensen ON (2001) Simplified sample preparation method for protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: In gel digestion on the probe surface. *Proteomics* 1: 955-966.

Thomas B, Andreas H (2001) MALDI-TOF-MS analysis of protein and DNA. *Neuroscientist* 7(1): 6-12.

Trịnh Tất Cường, Đặng Thành Nam, Nguyễn Bích Nhi, Đặng Thị Thu, Phan Văn Chi (2003) Biểu hiện và tinh chế mini-trichobakin (mini-TBK) tái tổ hợp. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(2): 183-188.

Valbonesi P, Barbieri L, Bolognesi A, Bonora E, Polito L, Stirpe F (1999) Preparation of highly purified momordin II without ribonuclease activity. *Life Sci* 65(14): 1485-1491.

Yuan YR, He YN, Xiong JP, Xia ZX (1999) Three-dimensional structure of beta-momorcharin at 2.55 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55(6): 1144-1151.

PURIFICATION AND MASS SPECTROMETRY ANALYSIS OF A RECOMBINANT RIBOSOME INACTIVATING PROTEIN FROM BITTER MELON (*MOMORDICA CHARANTIA* L.)

Nguyen Dinh Cuong, Le Thi Thu Hien, Nong Van Hai*, Dang Thanh Nam, Phan Van Chi

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) from bitter melon (*Momordica charantia* L.), namely McRIPs, consist of three types: α , β (MAP30) and γ -momorcharins. Like the other RIPs from different plant species, McRIPs are thought to involve in the plant defense system against fungi, bacteria and viruses, etc. Due to its inhibiting effects against dangerous human pathogenic viruses such as HIV, EBV, herpes, SARS and

Author for correspondence: Tel: 04. 7562934; Fax: 04. 8363144; E-mail: uhnong@ibt.ac.vn

the cytotoxicity towards tumour cells, McRIPs have attracted special interests of scientists from many countries. Production of native McRIPs (nMcRIPs) has a number of limitations such as less availability of plant materials, low effectivity and high costs. Therefore, DNA technology is an alternative and reasonable approach to produce recombinant McRIPs (rMcRIPs) for investigations on its structure, function and/or different biological activities. Recently, we have successfully cloned, sequenced a gene encoding McRIP. We further constructed an expression vector in *E. coli* for the McRIP based on pET21d(+) and obtained it in highly soluble form. We here report on the purification procedure for the rMcRIP using the ion exchange chromatography on CM-Sephrose column. A large quantity of purified rMcRIP was obtained when a 50 mM Tris buffer, pH 7.0 and a NaCl gradient of 0 to 0.4 M were applied. MALDI-TOF MS and MS/MS analyses of the purified rMcRIP showed that at least, 7 peptides of its digestion product with 6 to 13 amino acid residues in length, were perfectly matched with those of the deduced McRIPs in the NCBI Protein Database. Investigation on biological activities of the purified rMcRIP is in underway.

Key words: MALDI-TOF, bitter melon (*Momordica charantia* L.), RIP, recombinant RIP (rMcRIP)

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

TẠP CHÍ CÔNG NGHỆ SINH HỌC TẬP 2, SỐ 2 - 2004

=====

MỤC LỤC

CONTENTS

Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình - Công nghệ sinh học nano Nanobiotechnology	133-148
Huỳnh Ngọc Vi Ca, Lê Thái Hoàng, Đặng Thị Phương Thảo, Trần Linh Thuộc - Tạo dòng và biểu hiện gen mã hóa đoạn peptide PreS ₂ 26 của virus gây bệnh viêm gan B trong <i>E. coli</i> Cloning and expression of the PreS ₂ 26 peptide encoding gene of hepatitis B virus (HBV) in <i>E. coli</i>	149-155
Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Hoàng Dũng, Trần Linh Thuộc - Nghiên cứu độc lực trên chuột của các chủng <i>Salmonella</i> có nguồn gốc từ bệnh phẩm và thực phẩm Study on the virulence against mice of <i>Salmonella</i> strains isolated from foods and clinical specimen	157-168
Đặng Tất Thế, Lê Xuân Cảnh, Nông Văn Hải - Tiến hóa phân tử của vọc vá và vọc mũi hếch Molecular evolution of douc langur and snub-nosed monkey	169-176
Nguyễn Thị Thanh Bình, Hoàng Thị Hằng - Phân tích trình tự chuỗi nặng gen fibroin của một số giống tằm <i>Bombyx mori</i> L. Việt Nam A sequence analysis of the fibroin heavy chain gene from the Vietnamese silkworm <i>Bombyx mori</i> L. strains	177-183
Lê Thị Thùy Dương, Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Ngọc Dao - Tách chiết và tinh sạch cephalosporin acylase ở chủng <i>Serratia</i> sp. DT3 Purification of cephalosporin acylase from <i>Serratia</i> sp. DT3	185-192
Nguyễn Thị Hoài Trâm, Phạm Thị Thu, Đỗ Thị Thủy Lê - Nghiên cứu khả năng tổng hợp β -carotene của hai chủng nấm sợi <i>Blakeslea trispora</i> WH ₁ và WH ₂ Study on biosynthesis of β -carotene by two filamentous fungal strains WH ₁ and WH ₂ <i>Blakeslea trispora</i>	193-204
Nguyễn Thị Thảo, Quyền Đình Thi - Ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên quá trình sinh trưởng và sinh tổng hợp protease của chủng <i>Serratia</i> sp. DT3 Effect of culturing factors on the growth and production of an extracellular protease from <i>Serratia</i> sp. DT3	205-216

Nguyễn Đình Cường, Lê Thị Thu Hiền, Nông Văn Hải, Đặng Thành Nam, Phan Văn Chi - Tinh chế và phân tích khối phổ protein bất hoạt ribosome tái tổ hợp từ cây mướp đắng (*Momordica charantia* L.) 217-226

Purification and mass spectrometry analysis of recombinant ribosome inactivating protein from bitter melon (*Momordica charantia* L.)

Dương Tấn Nhật, Lê Thị Thanh Xuân, Nguyễn Hồng Vũ, Nguyễn Văn Bình, Nguyễn Trí Minh, Nguyễn Thị Thanh Hằng - Cải tiến hệ thống nhân giống cây Dâu tây bằng nuôi cấy trong túi nylon 227-234

Improvement of culture system for *in vitro* propagation of *Fragaria vesca* using nylon bag

Nguyễn Thị Thu Hằng, Đinh Thị Phòng, Nguyễn Thị Hồng Châu, Lê Thị Muội - Phân tích các dòng cây tái sinh từ mô sẹo giống lúa C71 sau khi biến nạp gen *TPS* 235-244

Analysis of the salt and drought tolerance of rice C71 lines regenerated from the *TPS* transgenic calli

Nghiêm Ngọc Minh, Nguyễn Thành Đức - Phân loại chủng vi khuẩn HDG1 phân lập từ mẫu nước thải nhà máy giấy Hải Dương 245-252

Identification of bacterial strains HDG1 isolated from wastewater sample of paper mill in Hai Duong

Nguyễn Xuân Hưng, Nghiêm Ngọc Minh, Đặng Thị Cẩm Hà - Khả năng phân hủy dầu của chủng vi khuẩn BSHL5 phân lập từ vịnh Cửa Lục, Quảng Ninh 253-264

Biodegradation of oil by the strains BSHL5 bacteria isolated from Cua Luc bay in Quang Ninh

TẠO CHỦNG VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN BẤT HOẠT RIBOSOME (RIP) TỪ CÂY MƯỚP ĐẮNG (*MOMORDICA CHARANTIA* L.) ĐỂ CHUYỂN VÀO CÂY TRỒNG

Lê Thị Thu Hiền, Đào Minh Châu, Nguyễn Đình Cường, Phạm Thu Thủy, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Protein bất hoạt ribosome - Ribosome Inactivating Protein (RIP) của mướp đắng (*Momordica charantia* L.) đóng vai trò quan trọng trong hệ thống bảo vệ của cây. RIP mướp đắng được quan tâm nghiên cứu nhiều vì có hoạt tính kháng HIV, ức chế ung thư, virus... nên có triển vọng lớn dùng làm thuốc. Từ cây mướp đắng Việt Nam, chúng tôi đã phân lập, đọc trình tự được một gen mã hóa RIP (ký hiệu là *McRIP*) và đã biểu hiện thành công trong *E. coli*. Với mục đích tạo cây trồng có khả năng tự kháng sâu bệnh, chúng tôi đã thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP làm vật liệu chuyển gen. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector chuyển gen thực vật pNOA+RIP mang gen mã hóa RIP đã nghiên cứu. Đây là Ti-plasmid tái tổ hợp được tạo ra trên cơ sở vector thể hệ mới pNOV2819 và vector trung gian pC1300+35S+NOS. Trong đó, kết cấu đoạn khởi động + đoạn kết thúc (35S 2X enhancer + NOS) được tách ra khỏi vector pC1300+35S+NOS bằng enzyme hạn chế *HindIII* + *EcoRI* và được gắn với adaptor thích hợp (đầu nối *HindIII* và *EcoRI*). Sau đó, kết cấu 35S 2X enhancer + NOS gắn với adaptor vừa được thiết kế (đoạn *HindIII*) được chuyển vào vector pNOV2819 (đã xử lý bằng *HindIII*) để tạo vector trung gian mới pNOA+35S+NOS. Gen mã hóa RIP được khuếch đại từ vector tách dòng tương ứng, xử lý bằng *BamHI* và gắn nối vào vector trung gian để tạo Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP. Sau khi thiết kế, Ti-plasmid tái tổ hợp đã được chuyển vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng EHA105. Đây là vật liệu có giá trị phục vụ các thí nghiệm chuyển gen mã hóa RIP vào cây trồng.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, gen mã hóa protein bất hoạt ribosome (RIP), mướp đắng, Ti-plasmid tái tổ hợp, vector thể hệ mới

MỞ ĐẦU

Hiện nay, hàng loạt gen mã hóa protein có hoạt tính diệt côn trùng gây hại (gen kháng côn trùng), trong đó có gen mã hóa protein bất hoạt ribosome (RIP) đã được nghiên cứu chuyển vào thực vật nhờ các phương pháp thích hợp với sản phẩm là những cây trồng có khả năng tự kháng sâu bệnh. Gen mã hóa

Trichosanthin (một loại gen mã hóa RIP phân lập từ cây thuốc *Trichosanthes kirilowii*) đã được biểu hiện ở cây thuốc lá tạo khả năng kháng lại sự xâm nhiễm của virus khảm củ cải và virus khảm thuốc lá (Lam *et al.*, 1996; Krishnan *et al.*, 2002). Thông qua vi khuẩn đất *Agrobacterium tumefaciens*, các gen mã hóa RIP thu nhận từ cây củ cải *Phytolacca americana* (PAP) cũng đã được chuyển vào thuốc lá

và khoai tây tạo ra các dòng cây có khả năng kháng lại phổ rộng các virus gây bệnh thực vật lây truyền thông qua rệp như: virus X và Y gây bệnh khoai tây (PVX và PVY), virus khảm thuốc lá (PMV), virus gây bệnh xoắn lá ở khoai tây (PLRV) (Jernnifer *et al.*, 1993; Nilgun *et al.*, 1997). Gen mã hóa RIP phân lập từ ngô (*Zea mays*), lúa (*Oryza sativa*), lúa mì (*Triticum aestivum*), lúa mạch đen (*Hordeum vulgare*) và yến mạch đã được biểu hiện ở các giống lúa khác nhau tạo khả năng kháng nấm và vi khuẩn (Aoki *et al.*, 2003; Oldach *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003). Hơn nữa, RIP còn được cải biến để tạo ra các dạng hoạt tính kháng virus cao mà không ảnh hưởng tới thực vật chuyển gen như PAP II (dòng dạng của PAP thu được từ lá) và PAPc (dạng đột biến của PAP) (Wang *et al.*, 1998).

Ở Việt Nam, trong những năm gần đây, một số công trình nghiên cứu RIP phân lập các thực vật bản địa đã được tiến hành. Đặc điểm của Trichobakin (RIP từ *Trichosanthes* sp. Bac Kan 8-98), sự phân bố RIP ở các thực vật họ bầu bí cũng đã được nghiên cứu (Hoàng Quốc Trường *et al.*, 2000; Phan Van Chi *et al.*, 2001). Gen mã hóa RIP từ *Trichosanthes* và cây mướp đắng được nghiên cứu biểu hiện ở vi khuẩn *E. coli* (Nguyễn Thúy Hà *et al.*, 1999; Nguyễn Đình Cường *et al.*, 2003) và nấm men *Pichia pastoris* (Nguyễn Văn Đạt *et al.*, 2000, Đinh Duy Kháng *et al.*, 2000). Với mục đích chuyển gen mã hóa RIP của cây mướp đắng vào các đối tượng cây trồng của Việt Nam nhằm tạo ra giống cây nông nghiệp kháng bệnh, chúng tôi đặt vấn đề thiết kế vector chuyển gen thực vật Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP mang gen mã hóa RIP trên cơ sở vector thể hệ mới pNOV2819 và vector trung gian pC1300+35S+NOS. Trong đó, gen mã hóa RIP nằm dưới sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vector tách dòng mang gen mã hóa RIP và vector trung gian pC1300+35S+NOS đã được chúng tôi thiết kế trước đây (Nguyễn Đình Cường *et al.*, 2003; Lê Thị Thu Hiền *et al.*, 2004). Vector thể hệ mới pNOV2819 do hãng Syngenta (Thụy Sĩ) cung cấp. Các chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α , *A. tumefaciens* EHA105 được mua của hãng Clontech và Life Technologies (Mỹ). Cặp mồi RIP-FB/RIP-RB được thiết kế và đặt tổng hợp tại hãng Alpha (Canada). Các hóa chất dùng để tách DNA plasmid và PCR, các enzyme hạn chế được mua của các hãng Amersham Biosciences (Anh), Sigma (Hoa Kỳ), Merck (Đức).

Phương pháp

Các kỹ thuật sinh học phân tử cơ bản để tạo DNA tái tổ hợp như: Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid, xử lý DNA bằng enzyme hạn chế, gắn nối các đoạn DNA vào vector, điện di DNA trên gel agarose... được tiến hành theo Sambrook và Russell (2001). PCR được tiến hành với chu trình nhiệt như sau: 94°C - 1 phút; (94°C - 1 phút; 54°C - 1 phút; 72°C - 1 phút 20 giây) lặp lại 32 chu kỳ; 72°C - 10 phút và kết thúc ở 4°C. Ti-plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* theo Draper và cộng sự (1988). Phương pháp xung điện để chuyển Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP vào *A. tumefaciens* được tiến hành theo Hoster và cộng sự (1987).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sơ đồ thiết kế vector pNOA+RIP mang kết cấu gen 35S 2X enhancer + RIP + NOS

Gen quan tâm muốn được chuyển vào

cây trồng thông qua *A. tumefaciens* thì cần được gắn vào vùng T-DNA trên Ti-plasmid. Hơn nữa, để có thể hoạt động trong tế bào thực vật thì gen phải nằm trong một kết cấu hoàn chỉnh với đoạn khởi động và đoạn kết thúc. Vì vậy, sau khi tiến hành nghiên cứu bản đồ một số vector Ti-plasmid tái tổ hợp thuộc hệ thống pCAMBIA (một trong những thế hệ vector hai nguồn mới nhất) và pNOV (thế hệ vector chọn lọc tích cực đang được ưa chuộng hiện nay), chúng tôi nhận thấy pC1300+35S+NOS và pNOV2819 là vật liệu đáp ứng yêu cầu thiết kế vector.

Trong đó, vector pNOV2819 thuộc hệ thống vector chọn lọc tích cực chứa gen PMI cho phép chọn lọc một cách dễ dàng các tế bào thực vật tái tổ hợp mà không sử dụng các chất kháng sinh hoặc chất diệt cỏ. Đoạn khởi động cơ định CMPS (Cestrium Yellow Leaf Curling Virus) đã được xác định điều khiển gen PMI biểu hiện mạnh ở nhiều loài cây trồng thử nghiệm như ngô, lúa, lúa mì, đậu tương, thuốc lá, cà chua, hướng dương và cây cà. Vì vậy, chúng tôi cho rằng pNOV2819 là vector nguồn thích hợp cho việc mang và chuyển kết cấu gen mã hóa RIP vào cây trồng.

Bên cạnh đó, khi tìm kiếm các đoạn khởi động và đoạn kết thúc phù hợp để thiết kế kết cấu gen mã hóa RIP hoàn chỉnh có thể biểu hiện trong thực vật, chúng tôi đã nhận thấy pC1300+35S+NOS có rất nhiều đặc điểm phù hợp với yêu cầu: (1) Đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS ở vector này là đoạn khởi động và kết thúc đang được sử dụng phổ biến hiện nay trên thế giới do khả năng hoạt động mạnh ở rất nhiều loại mô của cả cây một lá mầm và hai lá mầm; (2) Gen mã hóa RIP có thể được đưa vào vị trí nằm giữa đoạn khởi động 35S 2X enhancer và đoạn kết thúc NOS nhờ enzyme hạn chế *Bam*HI.

Như vậy, trên cơ sở vector nguồn

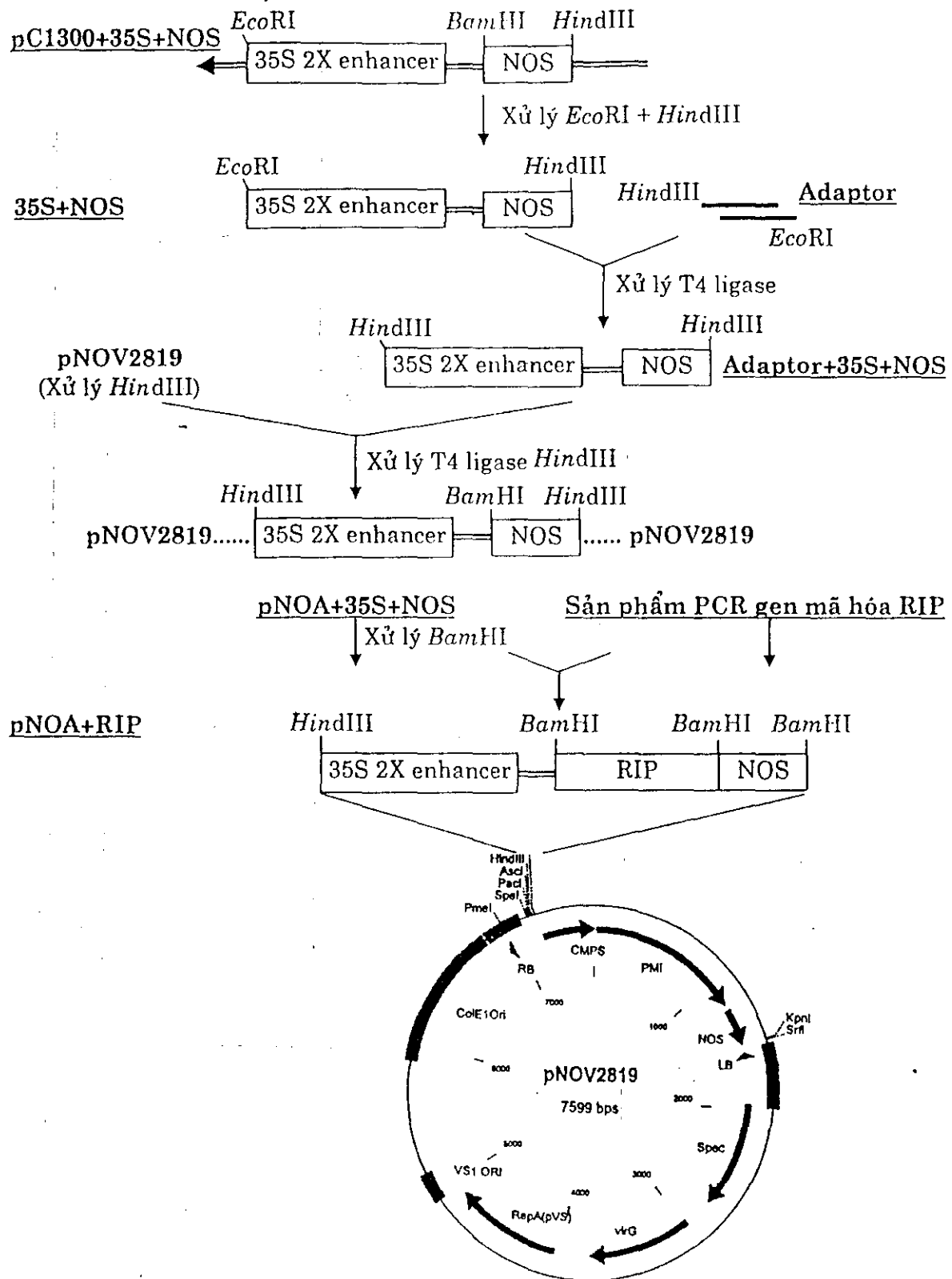
pNOV2819 và kết cấu bao gồm đoạn khởi động 35S 2X enhancer + đoạn kết thúc NOS tách từ vector pC1300+35S+NOS, chúng tôi đã thiết kế Ti-plasmid trung gian pNOA+35S+NOS. Đây là vector cơ sở để tạo Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP phục vụ cho công tác chuyển gen vào các đối tượng cây trồng ở nước ta. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP được trình bày trên hình 1.

Thiết kế vector trung gian pNOA+35S+NOS mang kết cấu 35S 2X enhancer+NOS

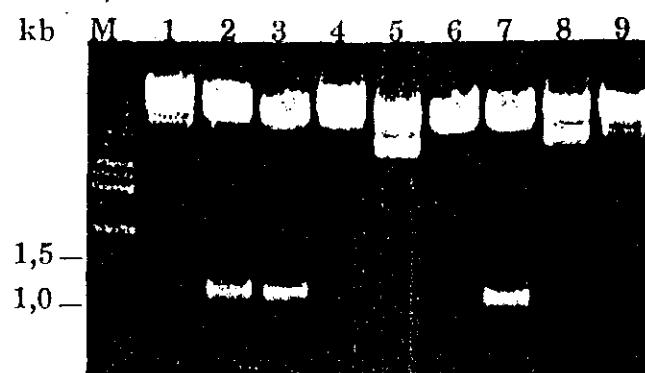
Kết cấu 35S+NOS trong vector trung gian pC1300+35S+NOS được chúng tôi nghiên cứu chuyển vào vector pNOV2819. Do vùng MCS của vector pNOV2819 chỉ có 4 điểm nhận biết của các enzyme hạn chế *Hind*III, *Asc*I, *Pac*I và *Spe*I, cho nên để lắp ghép kết cấu 35S+NOS có dạng đoạn *Eco*RI - *Hind*III thu nhận được nhờ phương pháp tinh sạch bằng DNA từ trong gel vào vùng MCS của vector pNOV2819, chúng tôi đã thiết kế đoạn nối (adaptor) *Hind*III - *Eco*RI nhằm tạo điểm cắt gắn thích hợp. Adaptor có trình tự như sau:

Ad1: 5'- AGCTTCCATGGAGCTCG -3';
Ad2: 3'- AGGTACCTCGAGCTTAA -5'.

Việc ghép nối kết cấu 35S+NOS (đoạn *Eco*RI - *Hind*III) với adaptor đoạn *Hind*III - *Eco*RI sẽ tạo nên kết cấu mới Adaptor+35S+NOS có đầu cắt *Hind*III. Đây là vật liệu có thể ghép nối được vào vị trí *Hind*III trong vùng MCS của vector pNOV2819. Kết quả kiểm tra sản phẩm ghép nối tổ hợp Adaptor+35S+NOS vào pNOV2819 trước đó đã xử lý bằng *Hind*III để tạo vector trung gian chuyển gen thực vật thế hệ mới pNOA+35S+NOS được trình bày trên hình 2.



Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP.



Hình 2. Kiểm tra vector trung gian pNOA+35S+NOS. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1 → 9: Các plasmid tái tổ hợp pNOA1 → pNOA9/*Hind*III.

Kết quả phân tích enzyme hạn chế trên hình 2 cho thấy, sản phẩm xử lý các plasmid pNOA2, 3, 4 và 7 bằng *Hind*III xuất hiện hai băng, trong đó có băng ~ 1,1 kb tương ứng với kích thước của tổ hợp Adaptor+35S+NOS (cột 2, 3, 4 và 7). Như vậy, 4 dòng tế bào chứa plasmid tái tổ hợp pNOA+35S+NOS đã được chọn lọc sơ bộ. Tiếp theo, plasmid pNOA3 được kiểm tra cấu trúc bằng enzyme hạn chế *Bam*HI. Sản phẩm xử lý *Bam*HI là một băng duy nhất chứng tỏ plasmid đã được mở vòng.

Các kết quả trên cho thấy, vector trung gian pNOA+35S+NOS mang tổ hợp adaptor + đoạn khởi động 35S 2X enhancer + đoạn kết thúc NOS đã được thiết kế thành công. Plasmid pNOA3 đáp

ứng yêu cầu làm vật liệu để thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP.

Tạo đoạn gen mã hóa RIP thích hợp để ghép nối vào vector trung gian

Song song với việc thiết kế vector trung gian pNOA+35S+NOS, chúng tôi đã tiến hành nhân đoạn gen mã hóa RIP trên cơ sở vector tách dòng mang gen mã hóa RIP đã được phân lập trước đây (Nguyễn Đình Cường *et al.*, 2003). Cặp mồi đặc hiệu RIP-FB/ RIP-RB được thiết kế mới, mang điểm nhận biết của enzyme hạn chế *Bam*HI (GGATCC) và *Nco*I (CCATGG) tạo cơ sở cho việc gắn đoạn gen mã hóa RIP vào vector trung gian. Trình tự cặp mồi như sau:

RIP-FB: 5'- GCCGGATCCATGGATGTTAACTTG -3'

↓
*Bam*HI ↓
*Nco*I

RIP-RB: 5'- GGATTATTATGGATCCTTCAATTCACAACAG -3'

↓
*Bam*HI

Sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi RIP-FB/RIP-RB là một băng đặc hiệu có kích thước ~ 0,8 kb. Sản phẩm này sau đó được

xử lý bằng *Bam*HI, tinh chế lượng lớn làm vật liệu cho quá trình chuyển gen mã hóa RIP vào pNOA+35S+NOS/*Bam*HI.

Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP mang gen mã hóa RIP dưới sự điều khiển của 35S 2X enhancer

Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa RIP sau khi xử lý bằng *Bam*HI, tinh sạch, được gắn trực tiếp vào vector trung gian pNOA+35S+NOS (trước đó đã mở vòng bằng *Bam*HI) và biến nạp vào *E. coli* chủng DH5a để chọn lọc, nhân Ti-plasmid tái tổ hợp với lượng lớn phục vụ thí nghiệm chuyển plasmid này vào tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*.

Các dòng tế bào *E. coli* thu nhận được sau khi biến nạp sản phẩm lai giữa pNOA+35S+NOS với gen mã hóa RIP được dùng để tách chiết plasmid và chọn lọc các plasmid có kích thước lớn hơn plasmid đối chứng (pNOA+35S+NOS).

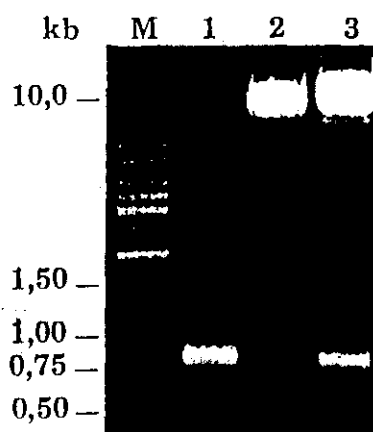
Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP có kích thước ~ 9,4 kb. Sau khi chọn lọc sơ bộ, chúng tôi đã thu được 6 dòng tế bào chứa các plasmid có kích thước lớn hơn DNA plasmid đối chứng là vector trung gian. Các plasmid này được ký hiệu là pNOA+RIP-3, 4, 7, 9, 14 và pNOA+RIP-18. Các dòng tế bào này được nuôi cấy và tách chiết plasmid để sử dụng trong các thí nghiệm kiểm tra tiếp theo.

Kiểm tra sự có mặt của gen mã hóa RIP trong các Ti-plasmid tái tổ hợp bằng enzyme hạn chế

Trong vector pNOA+35S+NOS, điểm nhận biết của enzyme *Bam*HI nằm giữa đoạn khởi động 35S X2 enhancer và đoạn kết thúc NOS. Như vậy, nếu gen mã hóa RIP được gắn vào vector tại vị trí *Bam*HI thì khi xử lý bằng enzyme này sản phẩm sẽ là hai băng: một băng tương ứng với kích thước của vector mở vòng và một băng tương ứng với kích thước của gen

mã hóa RIP (~ 0,8 kb).

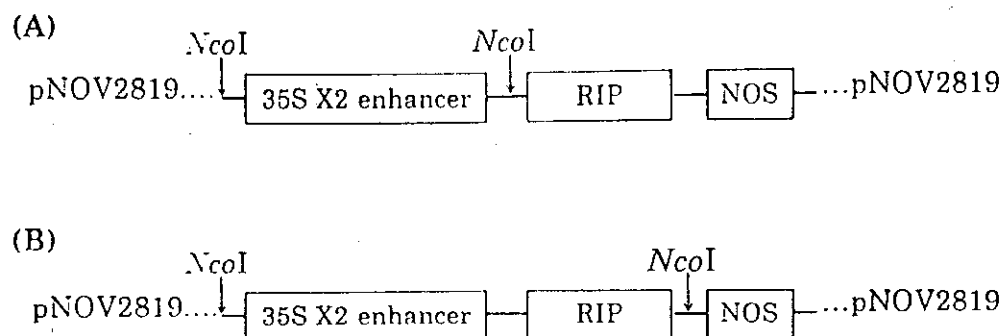
Sản phẩm xử lý bởi enzyme hạn chế *Bam*HI đối với dòng pNOA+RIP-9 (Cột 3, Hình 3) là 2 băng hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Việc kiểm tra bằng enzyme *Bam*HI cho phép chọn lọc được 4 dòng tế bào có mang gen mã hóa RIP trong các plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP-4, 9, 14 và 18.



Hình 3. Kiểm tra sự có mặt của gen mã hóa RIP trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp bằng enzyme hạn chế. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1: Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa RIP sử dụng khuôn là plasmid tách dòng (đối chứng); 2: Plasmid pNOA+35S+NOS/*Bam*HI; 3: Plasmid pNOA+RIP-9/*Bam*HI.

Kiểm tra chiều gắn của gen mã hóa RIP trong Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP

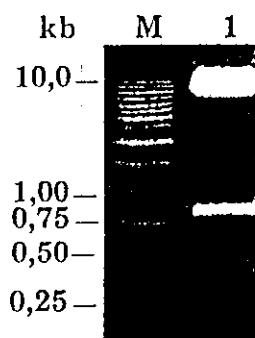
Các Ti-plasmid tái tổ hợp có chứa gen mã hóa RIP như pNOA+RIP-4, 9, 14 và 18 tiếp tục được kiểm tra bằng cách cắt đơn với enzyme hạn chế *Nco*I. Theo tính toán lý thuyết, Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP có hai điểm nhận biết của *Nco*I: Một điểm nằm đầu đoạn khởi động 35S 2X enhancer (thuộc vùng adaptor) và một điểm ở đầu gen mã hóa RIP (thuộc mỗi RIP-FB). Sản phẩm xử lý bởi *Nco*I theo tính toán lý thuyết được trình bày trên hình 4.



Hình 4. Sơ đồ các vị trí cắt của pNOA+RIP bởi *NcoI*. (A): Gen mã hóa RIP gắn xuôi chiều; (B): Gen mã hóa RIP gắn ngược chiều.

Trường hợp gắn xuôi chiều (Hình 4A): Sản phẩm cắt bởi *NcoI* của pNOA+RIP sẽ là 2 băng, trong đó có một băng kích thước ~ 0,8 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X enhancer và một băng kích thước ~ 8,6 kb tương ứng với phần còn lại của vector tái tổ hợp (plasmid gốc pNOV2819 + gen mã hóa RIP + NOS). Trường hợp gắn ngược chiều (Hình 4B): Sản phẩm cắt bởi *NcoI* của pNOA+RIP cũng sẽ là 2 băng nhưng với kích thước khác: một băng kích thước ~ 1,6 kb tương ứng với đoạn khởi động 35S 2X enhancer và gen mã hóa RIP; băng còn lại ~ 7,8 kb tương ứng với pNOA+NOS.

Kết quả thí nghiệm trên hình 5 cho thấy, ở dòng pNOA+RIP-9 (Cột 1, Hình 5), gen mã hóa RIP đã được gắn vào trong vector trung gian pNOA+35S+NOS theo kiểu xuôi chiều so với đoạn khởi động và đoạn kết thúc. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế được Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP, trong đó gen mã hóa RIP được điều khiển biểu hiện bởi đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Các dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp này được chúng tôi giữ trong glycerol, ở -75°C để làm nguyên liệu chuyển Ti-plasmid này vào vi khuẩn *A. tumefaciens*.



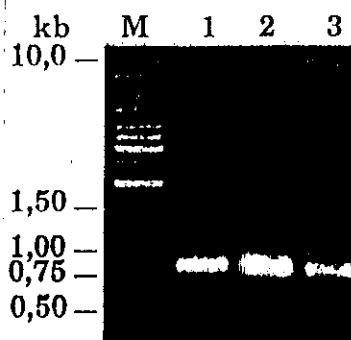
Hình 5. Kết quả kiểm tra chiều gắn của gen mã hóa RIP trong pNOA+RIP. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1: pNOA+RIP-9/*NcoI*.

Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP-9

Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP-9 sau khi thiết kế thành công được chúng tôi tiến hành chuyển vào *A. tumefaciens* chủng EHA105 thông qua phương pháp xung điện. Các khuẩn lạc *A. tumefaciens* sau xung điện có chứa plasmid tái tổ hợp được chúng tôi phát hiện bằng phương pháp tách chiết DNA plasmid, biến nạp trở lại tế bào *E. coli*, cắt bằng enzyme hạn chế, PCR và điện di. Ở thí nghiệm kiểm tra bằng kỹ thuật PCR, DNA plasmid pNOA+RIP-9 của tế bào *A. tumefaciens*

được tạo ra nhờ xung điện sau khi biến nạp trở lại vào *E. coli* chủng DH5 α được chúng tôi tách chiết lại và sử dụng làm khuôn để nhân gen mã hóa RIP với cặp mồi RIP-FB/RIP-RB. Kết quả kiểm tra (Hình 6) cho thấy chúng tôi đã nhận được các dòng *A. tumefaciens* chủng EHA105:pNOA+RIP-9 có chứa gen mã hóa RIP.

Rõ ràng, đoạn gen mã hóa RIP đã được nhân rất đặc hiệu, với kích thước ~ 0,8 kb phù hợp với mẫu đối chứng. Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc đưa đoạn gen mã hóa RIP vào vector trung gian pNOA+35S+NOS và tạo được chủng *A. tumefaciens* EHA105:pNOA+RIP-9 tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP phục vụ cho công tác chuyển gen vào cây trồng.



Hình 6. Điện di sản phẩm PCR của gen mã hóa RIP trong các dòng tế bào *A. tumefaciens* tái tổ hợp. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; 1: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid tách dòng (đối chứng); 2: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pNOA+RIP-9 (1X); 3: Sản phẩm PCR sử dụng khuôn là plasmid pNOA+RIP-9 (pha loãng 10X).

KẾT LUẬN

Đã thiết kế được vector trung gian pNOA+35S+NOS mang cấu trúc đoạn khởi động 35S 2X enhancer + đoạn kết thúc NOS. Đã thiết kế được vector biểu hiện thực vật, Ti-plasmid tái tổ hợp

pNOA+RIP mang gen mã hóa RIP từ cây mướp đắng dưới sự điều khiển của đoạn khởi động 35S 2X enhancer. Đã tạo được chủng *A. tumefaciens* EHA105:pNOA+RIP-9 chứa Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa RIP phục vụ cho việc chuyển gen kháng sâu vào các giống cây trồng Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Nhà nước KC.04-14 và một phần của Đề tài 82.12.04 thuộc Chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong lĩnh vực Khoa học Tự nhiên (nội dung: "Thiết kế vector trung gian pNOA+35S+NOS mang kết cấu 35S 2X enhancer+NOS").

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aoki H, Toshihiko N, Tsuyoshi Y, Kouichi M, Kimizu M, Matsumura Y, Shigemune A, Kuroda S, Yatou O (2003) Ribosome-inactivating proteins highly enhanced the disease resistance of rice plants against rice blast and bacterial leaf blight disease. *Plant and Animal Genomes XI Conference*, January 11-15, San Diego.
- Draper J, Scott R, Armitage P (1988) Plant genetic transformation and gene expression. *A Laboratory Manual*, Blackwell Scientific Publications, London, 3-63.
- Dinh Duy Kháng, Đồng Văn Quyên, Bach Như Quỳnh, Phan Văn Chi, Lê Trần Bình (2000) Thiết kế vector để biểu hiện gen mã hóa cho protein bất hoạt ribosome ở *Pichia pastoris*. *Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội: 103-106.
- Hoàng Quốc Trường, Tống Quỳnh Mai, Phan Văn Chi (2000) Nghiên cứu sự phân bố của RIP nhóm I ở một số thực vật thuộc họ bầu bí bằng kỹ thuật Western blotting. *Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Sinh học*, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội: 172-174.
- Holster M, De Waele D, Depicker A, Messens E, van Montagu M, Schell J (1987) Transfection and transformation of *A. tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 163: 181-187.
- Jernnifer KL, Wojciech KK, Nilgun ET (1993) Broad spectrum virus resistance in transgenic plants

expressing pokeweed antiviral protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7089-7093.

Kim JK, Jang IC, Wu R, Zuo WN, Boston RS, Lee YH, Ahn IP, Nahm BH (2003) Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Res* 12(4): 475-484.

Krishnan R, McDonald KA, Dandekar AM, Jackman AP, Falk B (2002) Expression of recombinant trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, in transgenic tobacco. *J Biotechnol* 97(1): 69-88.

Lam YH, Wong YS, Wang B, Wong RNS, Yeung HW, Shaw PC (1996) Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. *Plant Sci* 114:111-117.

Lê Thị Thu Hiền, Đào Thị Thu Hà, Phan Thị Hà, Nguyễn Đăng Tồn, Nông Văn Hải, Phạm Thị Trân Châu (2004) Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa protein ức chế trypsin (McoTI-II) phân lập từ hạt gấc (*Momordica cochinchinensis*). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 2(3):

Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thùy Dương, Lê Thị Thu Hiền, Lương Thị Thu Hương, Trần Thị Phương Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Phan Văn Chí, Nông Văn Hải (2003) Biểu hiện gen mã hóa protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 1(4): 451-460.

Nguyễn Thủy Hà, Hoàng Quốc Trường, Tống Quỳnh Mai, Nguyễn Thị Ty, Nguyễn Hữu Hiền, Phan Quốc Kinh, Lê Trần Bình, Phan Văn Chí (1999) Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa protein bất hoạt ribosome

nhóm I ở *Escherichia coli*. *Báo cáo Khoa học Hội nghị Công nghệ Sinh học Toàn quốc*: 1121-1128.

Nguyễn Văn Đạt, Nguyễn Thanh Thủy, Nguyễn Huy Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Trương Nam Hải (2000) Biểu hiện gen mã hóa cho protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng trong nấm men *Pichia pastoris*. *Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Sinh học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội: 44-47.

Nilgun ET, Hwang DJ, Bonness M (1997) C-terminal deletion mutant of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3866-3871.

Oldach K, Becker D, Lörz H, Leckband G (1998) Transformation and expression of antifungal genes in wheat, *Triticum aestivum* and barley, *Hordeum vulgare* to increase their fungal resistance-two strategies. *ICPP98 Paper number 5.3.18*. <http://www.bspp.org.uk/icpp98/5.3/18.html>.

Phan Văn Chí, Hoàng Quốc Trường, Nguyễn Thủy Hà, Won-II Chung, Lê Trần Bình (2001) Characterization of trichobakin, a type I ribosome-inactivating protein from *Trichosanthes* sp. *Bac Kan* 8-98. *Biotechnol Appl Biochem* 34(2): 85-92.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning I, III. *A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Wang P, Zoubenko O, Tumer NE (1998) Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II. *Plant Mol Biol* 38(6): 957-964.

CONSTRUCTION OF AN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* STRAIN CARRYING THE GENE ENCODING RIBOSOME INACTIVATING PROTEIN FROM *MOMORDICA CHARANTIA* L. FOR PLANT TRANSFORMATION

Le Thi Thu Hien, Dao Minh Chau, Nguyen Dinh Cuong, Pham Thu Thuy, Nong Van Hai*, Le Tran Binh

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Ribosome-inactivating proteins (RIPs) found in *Momordica charantia* L. play an important role in plant defense against pests, pathogens and are useful for treating

*Author for correspondence: Tel: 04. 7562934; Fax: 04. 8363144; Email: uhnong@ibt.ac.vn

cancer, autoimmune diseases and also against HIV infection, etc. By virtue of their antiviral properties, RIPs have been used to improve defense mechanisms of transgenic plants of interest. Here, we report results in the construction of a plant expression vector pNOA+RIP containing the RIP gene isolated from Vietnamese *M. charantia*. This recombinant Ti-plasmid was constructed based on pNOV2819, a positive selective vector and pC1300+35S+NOS, a pCAMBIA1300 binary vector carrying the 35S 2X enhancer + NOS construct. From pC1300+35S+NOS, the 35S 2X enhancer + NOS region was cleaved as a *Hind*III - *Eco*RI fragment and ligated with a suitable designed adaptor containing recognition sites for a *Hind*III restriction enzyme in one terminal and for an *Eco*RI in other terminal. As a *Hind*III fragment, this modified 35S 2X enhancer + NOS construct was ligated directly into pNOV2819 treated by *Hind*III restriction enzyme to form an intermediate vector pNOA+35S+NOS. After digestion with *Bam*HI, the gene encoding RIP amplified from a cloned plasmid was inserted into pNOA+35S+NOS vector to create a pNOA+RIP recombinant Ti-plasmid. The resulting vector was successfully transformed into EHA105 *A. tumefaciens* strain which is ready to use for plant transformation experiments.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, *Momordica charantia*, new generation vector, recombinant Ti-plasmid, ribosome inactivating protein (RIP), Ti-plasmid vector

VIỆN KHOA HỌC TỰ NHIÊN VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
NATIONAL CENTER FOR NATURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY

TẠP CHÍ

CÔNG NGHỆ SINH HỌC

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tập (Volume) 1 Số (Number) 4 2003

TẠP CHÍ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY

Tổng biên tập (Editor-in-Chief)
Phó tổng biên tập (Associate Editors)

Lê Trần Bình
Nông Văn Hải
Trần Linh Thuộc

HỘI ĐỒNG BIÊN TẬP (EDITORIAL BOARD)

Lê Trần Bình
Ngô Đình Bình
Bùi Chí Bui
Phan Văn Chi
Nguyễn Văn Cường
Đặng Thị Cẩm Hà
Trương Nam Hải
Nông Văn Hải
Lại Thúy Hiền
Lê Thanh Hòa
Đinh Duy Kháng

Hoàng Thủy Long
Phan Tuấn Nghĩa
Bùi Xuân Nguyên
Hồ Hữu Nhị
Nguyễn Quang Thạch
Nguyễn Tiến Thắng
Trần Linh Thuộc
Nguyễn Thị Hoài Trâm
Trần Duy Quý
Nguyễn Đăng Vang

Thư ký Tòa soạn (Editorial office Secretary): Lê Thị Vân Anh

Tòa soạn Tạp chí Công nghệ Sinh học: Số 70 Trần Hưng Đạo, Hà Nội
Điện thoại: (04) 9422825 hoặc (04) 7564333 xin 1077, E-mail: vjbt@ibt.ac.vn
Tổng biên tập/Phó tổng biên tập (thường trực): Số 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội
Điện thoại: (04) 7564691/7562934. E-mail: binh@ibt.ac.vn/yhnong@ibt.ac.vn

BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA PROTEIN BẤT HOẠT RIBOSOME CỦA CÂY MƯỚP ĐẮNG Ở VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI*

Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thùy Dương,
Lê Thị Thu Hiền, Lương Thị Thu Hường,
Trần Thị Phương Liên, Nguyễn Huy Hoàng,
Phan Văn Chi, Nông Văn Hải

Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Protein bất hoạt ribosome (Ribosome Inactivating Protein - RIP) được tìm thấy ở nhiều loài thực vật, đặc biệt là ở các loài thuộc họ bầu bí (Cucurbitaceae). RIP là các glycoprotein có hoạt tính N - glycosidase, với chức năng có thể tham gia vào hệ thống bảo vệ của thực vật (kháng bệnh nấm, bệnh virus...). Các nghiên cứu cho thấy, chế phẩm RIP tự nhiên được tách chiết từ thực vật hoặc tái tổ hợp cổ tác dụng kháng virus HIV, kìm hãm các tế bào ung thư, nhưng không gây hại đối với tế bào bình thường... Vì vậy, RIP được các phòng thí nghiệm trên thế giới quan tâm nghiên cứu nhằm sản xuất thuốc chữa bệnh. Với mục đích tạo RIP tái tổ hợp, chúng tôi đã phân lập gen mã hóa RIP từ cây mướp đắng (*Momordica charantia*) bằng kỹ thuật PCR. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định trình tự nucleotide của 1 dòng mới (*pMcRip6*) có kích thước 795 bp, mã hóa cho polypeptide hoàn chỉnh của RIP mướp đắng (McRIP). Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn của đoạn gen này có độ tương đồng cao (> 99,5%) so với các trình tự của gen và protein tương ứng có tên là MAP30 (beta-momomorpharin) từ cây mướp đắng (*M. charantia*) và Momordin II từ cây *M. balsamina*. Gen mã hóa McRIP đã được ghép nối vào vector pET-21d(+) và biểu hiện cao trong vi khuẩn *E. coli* chủng BL21(DE3). Kết quả kiểm tra protein tổng số (tan trong đệm Tris-HCl, pH 7) bằng SDS-PAGE cho thấy, băng protein đậm nét có kích thước khoảng 30 kDa tương ứng với kích thước của McRIP theo tính toán lý thuyết. Bằng phương pháp khối phổ MS/MS MALDI-TOF, bước đầu đã khẳng định được protein này có trình tự amino acid trùng khớp với các trình tự RIP mướp đắng có trong các Ngân hàng gen quốc tế. Việc tách chiết, tinh chế và nghiên cứu đặc tính của McRIP tái tổ hợp (rMcRIP) đang được tiến hành.

Từ khóa: Biểu hiện gen trong *E. coli*, mướp đắng (*Momordica charantia*), RIP (Ribosome Inactivating Protein), RIP mướp đắng tái tổ hợp (rMcRIP), trình tự nucleotide

MỞ ĐẦU

Trong tự nhiên, nhiều loài thực vật tạo ra các protein có khả năng ức chế hoạt động của các ribosome - protein bất hoạt ribosome (Ribosome Inactivating Protein - RIP) (Barbieri *et al.*, 1993). Chúng là những chất hoạt tính N - glycosidase (Endo, Tsumagi, 1987; Endo *et al.*, 1987) có khả năng nhận biết và cắt gốc adenine đặc hiệu trên cấu trúc "loop" bảo thủ của rRNA ở cả prokaryote và eukaryote (vị trí A⁴³²⁴ ở rRNA gan chuột cống). Ngoài ra, RIP còn có tác động trực tiếp trên các nucleic acid không phải là rRNA nên còn được coi là có hoạt tính adenosine glycosidase (Li *et al.*, 1991; Barbieri *et al.*, 1997; Hudak *et al.*, 2000)), dẫn tới ức chế quá trình sinh tổng hợp protein. Dựa vào cấu trúc phân tử, có thể chia RIP thành 3 nhóm: RIP nhóm 1 chỉ có một chuỗi polypeptide A, có khối lượng phân tử khoảng 23 - 32 kDa, pI ở vùng kiềm 8 - 10 (đôi khi ở dạng glycosyl hóa) với hoạt tính N - glycosidase (Willy *et al.*, 2001); RIP nhóm 2 gồm hai chuỗi polypeptide A và B được liên kết với nhau bằng cầu nối disulfide, trong đó chuỗi A có trình tự amino acid tương tự như RIP nhóm 1 và có hoạt tính N - glycosidase, còn chuỗi B có vị trí liên kết với carbohydrate và không có hoạt tính enzyme, pI dao động từ 4 - 8 (Frankel *et al.*, 1996; Steeves *et al.*, 1999); RIP nhóm 3 có khối lượng phân tử khoảng 60 kDa (còn được gọi là JIP60), gồm một vùng đầu amino có hoạt tính tương tự như RIP nhóm 1 liên kết với một vùng đầu carboxyl chưa rõ chức năng (Reinbothe *et al.*, 1994).

Cho tới nay, đã có nhiều loại RIP được tìm thấy, như là abrin, curcin, ricin, momorcharin, MAP30 (*Momordica anti-HIV protein of 30 kDa*)... Các loại RIP này đã nhận được sự chú ý trong các nghiên cứu sinh học và y sinh học bởi hoạt tính của chúng đối với các tế bào động vật và người

như: Sử dụng làm thuốc ra thai (Yeung *et al.*, 1988), thuốc chống HIV (McGrath *et al.*, 1989; Zarling *et al.*, 1990), chống ung thư (Lin *et al.*, 1970), độc tố đối với hệ thống miễn dịch (Sandvig, van Deurs, 2000). Ngoài ra, RIP còn đóng vai trò trong hệ thống bảo vệ của thực vật bởi hoạt tính kháng nấm, virus (Lam *et al.*, 1996; Wang, Turner, 2000).

Những nghiên cứu về RIP trên thế giới tập trung nhiều vào các loại RIP ở các loài thực vật thuộc họ bầu bí (Cucurbitaceae). Một số loại RIP như alpha-momorcharin, beta-momorcharin, MAP30 đã được tinh chế, thử các hoạt tính sinh học (Lee-Huang *et al.*, 1990; 1995; Ho *et al.*, 1991; Au *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2001) cũng như mô hình hóa cấu trúc (Husain *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 1999).

Ở Việt Nam, trong mấy năm gần đây đã có một số công trình nghiên cứu về RIP ở thực vật. Trước đây, chúng tôi đã nghiên cứu khả năng kháng một gao của dịch chiết từ hạt mướp đắng (Nguyễn Huy Hoàng *et al.*, 1999), về tách dòng và biểu hiện gen mã hóa RIP từ cây mướp đắng trong nấm men *Pichia pastoris* (Nguyễn Huy Hoàng *et al.*, 2000; Nguyễn Văn Đạt *et al.*, 2000). Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của các dòng đó còn chưa đạt yêu cầu. Ngoài ra, đã có các nghiên cứu về sự phân bố của RIP ở một số thực vật thuộc họ bầu bí (Hoàng Quốc Trường *et al.*, 2000) và về đặc điểm của trichobakin (Phan Văn Chi *et al.*, 2001).

Trong công trình này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu về nhân gen mã hóa protein bất hoạt ribosome từ cây mướp đắng (*Momordica charantia*), thiết kế vector pET-21d(+) chứa gen này, xác định trình tự của một dòng (được đặt tên là pMcRip6) và biểu hiện McRIP tái tổ hợp (rMcRIP) trong tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng BL21(DE3). Công trình này được thực hiện tại Phòng Công nghệ ADN ứng

Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm
Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Lá của cây mướp đắng được thu thập tại Hà Nội. Cặp mồi MAP65F/MAP859R được thiết kế và đặt tổng hợp tại hãng Invitrogen (Mỹ). Vi khuẩn *E. coli* chủng BL21(DE3), vector biểu hiện pET-21d(+) được mua từ hãng Novagen (Thụy Sĩ). Các hóa chất PCR được mua của hãng Perkin Elmer (Mỹ), hóa chất xác định trình tự của hãng Applied Biosystems (Mỹ), hóa chất điện di SDS-PAGE được mua của hãng BioRad (Mỹ).

Phương pháp

DNA genome của mướp đắng được tách chiết theo phương pháp của Becker và cộng sự (1995) với một số cải tiến cho phù hợp với mô lá. Cặp mồi MAP65F/MAP859R dùng để nhân gen mã hóa RIP được thiết kế có chứa các trình tự nhận biết của 2 enzyme hạn chế là *Nco*I và *Bam*HI.

MAP65F: 5'-CCTACTGCCACCATGGATG
NcoI

TTAACTTCG -3'

MAP859R: 5'-GGATTATTATGGATCCTT
BamHI

CAATTCACAACAG -3'

Thành phần và chu trình nhiệt của PCR được tiến hành như các phương pháp đã được mô tả (Nguyễn Huy Hoàng *et al.*, 2000).

Sản phẩm PCR được xử lý với 2 enzyme *Nco*I và *Bam*HI rồi gắn vào vector pET-21d(+) tại các vị trí cắt tương ứng trong vùng MCS (Multiple Cloning Site). Các

vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%, kỹ thuật PCR, xử lý với enzyme hạn chế. Đồng thời, dòng *pMcRip6* đã được xác định trình tự nucleotide với việc sử dụng mồi T7 promoter.

Một khuẩn lạc đơn *E. coli* chủng BL21(DE3) mang *pMcRip6* được cấy chuyển vào môi trường LB lỏng có chứa ampicillin (Amp) (nồng độ 50 µg/ml), nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C cho tới khi OD_{600nm} của dịch nuôi cấy đạt 0,5 - 0,7. Bổ sung isopropyl thio-β-D-galactoside (IPTG) cho tới nồng độ 0,7 mM. Tiến hành thu dịch nuôi cấy tại các thời điểm 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ sau khi cảm ứng. Ly tâm 5000 vòng/phút để thu sinh khối tế bào. Hòa tế bào trong đệm thích hợp và phá tế bào bằng phương pháp sốc nhiệt. Quá trình biểu hiện gen mã hóa RIP được kiểm tra bằng SDS-PAGE 12,5% và nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R250. Kiểm tra tính tan của RIP tái tổ hợp (rMcRIP): Các tế bào sau khi được hòa tan trong đệm (Tris.HCl 50 mM pH 7, EDTA 20 mM pH 7, Triton 0,01%, Lysozyme 0,3 µg/ml), phá bằng siêu âm sau đó được ly tâm để tách riêng phần dịch và phần cặn. Kiểm tra lượng protein trong hai phần này bằng SDS-PAGE.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách chiết DNA genome và nhân gen mã hóa RIP bằng kỹ thuật PCR

DNA genome từ mô lá của cây mướp đắng được sử dụng làm khuôn để nhân gen mã hóa RIP.

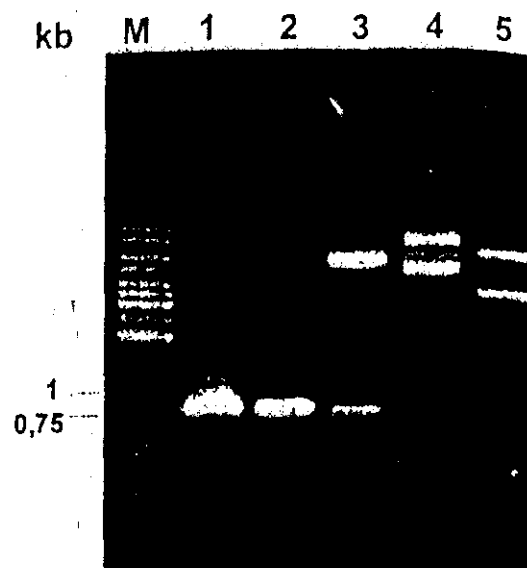
Sử dụng cặp mồi đã thiết kế để tiến hành PCR với phương pháp trên đã thu được sản phẩm PCR đặc hiệu với kích thước khoảng 0,8 kb. Kích thước của sản phẩm PCR đúng với tính toán lý thuyết và tương đương với

kích thước của cDNA gen MAP30, chứng tỏ đoạn gen này không có intron. Kết quả được trình bày trên hình 1.

Thiết kế vector pET-21d(+) mang gen mã hóa RIP của mướp đắng

Sau khi nhận được sản phẩm PCR đặc hiệu, chúng tôi đã tiến hành tạo dòng gen mã hóa RIP trong vector biểu hiện pET-21d(+). Sau khi gắn sản phẩm PCR được xử lý bằng enzyme hạn chế *NcoI* và *BamHI* được ghép nối vector biểu hiện pET-21d(+). Đã thu được một số plasmid với kích thước lớn hơn pET-21d(+). Để kiểm tra các đoạn DNA gắn vào plasmid có phải là gen mã hóa RIP hay không, chúng tôi đã tiến hành xử lý các plasmid đó bằng enzyme hạn chế *NcoI*, *BamHI* và đã thu được 2 băng với kích thước 5,4 kb và 0,8 kb. Như vậy, kết quả thực nghiệm là phù hợp với tính toán lý thuyết. Các plasmid tái tổ hợp cũng được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi MAP65F/MAP859R. Sản phẩm thu được có kích thước khoảng 0,8 kb tương đương với kích thước của sản phẩm thu được khi sử dụng cặp mồi này với khuôn là DNA genome của cây mướp đắng.

Đoạn gen mã hóa RIP trong plasmid *pMcRip6* cũng được xác định trình tự. Đoạn gen này bao gồm 795 bp mã hóa cho phân tử protein gồm 264 amino acid (protein này được đặt tên là McRIP) với khối lượng phân tử khoảng 30 kDa. So với trình tự trước đây chúng tôi đã công bố về gen này (mã số AJ 294541) (Nguyễn Huy *et al.*, 2000), đoạn gen mã hóa RIP trong *pMcRip6* có một số thay đổi nucleotide ở các vị trí 375 (G->T), 438 (G->T) và 617 (C->G) dẫn tới những thay đổi amino acid tương ứng ở các vị trí 124 (Glu->Asp) và 205 (Ala->Gly). Có thể đây là hai allele khác nhau của RIP ở mướp đắng.



Hình 1. Thiết kế vector pET-21d(+) mang gen mã hóa RIP từ cây mướp đắng

M: Thang DNA chuẩn

- 1: Sản phẩm PCR với khuôn là DNA genome
- 2: Sản phẩm PCR với khuôn là plasmid tái tổ hợp
- 3: Plasmid tái tổ hợp cắt bằng *NcoI* và *BamHI*
- 4: Plasmid tái tổ hợp chứa gen mã hóa RIP
- 5: Vector pET-21d(+)

So với các trình tự về gen mã hóa RIP được phân lập từ các thực vật thuộc chi *Momordica* đã được công bố (Ortigao, Better, 1992; Lee-Huang *et al.*, 2000; Quanhong *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2004), đoạn gen mã hóa RIP trong *pMcRip6* có mức độ tương đồng cao (trên 99%). Trong đó, đáng chú ý là các nghiên cứu về momordin II (còn gọi là beta-momorcharin) của Ortigao và MAP30 của Lee-Huang. Đoạn gen mã hóa RIP trong *pMcRip6* sai khác 4 nucleotide so với gen mã hóa momordin II và 6 nucleotide so với gen mã hóa MAP30, dẫn tới những thay đổi tương ứng trong trình tự amino acid (Hình 2). MAP30 đã được tách dòng trong vector pRSET và biểu hiện thành công trong *E. coli* (Lee-Huang *et al.*, 1995). Hơn nữa MAP30 tái tổ hợp cũng có đầy đủ các hoạt tính sinh học giống như MAP30 tự nhiên (được tinh chế từ các mô của mướp

dáng). Do đó, chúng tôi đã quyết định sử dụng *pMcRip6* để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo. Trình tự amino acid suy diễn của McRIP không chứa cysteine giống như trichosanthin (một loại RIP được phân lập từ *Trichosanthes kirilowii*) (Yuan *et al.*, 2004). Trong khi đó, một số loại RIP khác có chứa cysteine như là curcin (Lin *et al.*, 2002), abrin A-chain (Hung *et al.*, 1996),

ricin A-chain (Evensen *et al.*, 1991), trichoanguin (Chow *et al.*, 1999). Amino acid này có thể trực tiếp tham gia vào tạo liên kết disulfide với một kháng thể đã được hoạt hóa. McRIP không chứa đoạn peptide tín hiệu (gồm 23 amino acid ở đầu N), trong tự nhiên đoạn peptide này được cắt bỏ trong quá trình tạo thành RIP hoàn chỉnh.

		Met. nhân tạo	
		1	
McRIP	-23	-----M	DVNFDLSTAT AKTYTKFIED FRATLPFSHK 30
AJ294541		-----M	
MAP30		MVK CLLLSFLIIA IFIGVPTAKG	
Momordin II		G	
Beta-momorcharin		G	
		--- Peptide tín hiệu ---	
McRIP		VYDIPLLYST ISDSRRFILL NLTSYAYETI SVAIDVTNVY VVAYRTRDVS YFFKESFPEA	90
AJ294541			
MAP30			
Momordin II		D.....	
Beta-momorcharin			
McRIP		YNILFKGTRK ITLPYTGNYE NLQTAHKIR ENIDLGLPAL SSAITTLFYY NAQSAPSALL	150
AJ294541		E.....	
MAP30			
Momordin II			
Beta-momorcharin			
McRIP		VLIQTAEAA RFKYIERHVA KYVATNFKPN LAIISLENQW SALSQIFLA QNQGKFRNP	210
AJ294541		T.....	A.....
MAP30			
Momordin II			
Beta-momorcharin			
McRIP		VDLIKPTGER FQVTNVDSOV VKGNIKLLN SRSTADENF ITTMTLLGES VVN	263
AJ294541			
MAP30			
Momordin II			
Beta-momorcharin			

Hình 2. So sánh trình tự amino acid suy diễn của McRIP với MAP30, momordin-II, beta-momorcharin và RIP có mã số AJ 294541

Biểu hiện gen mã hóa RIP trong vi khuẩn *E. coli*

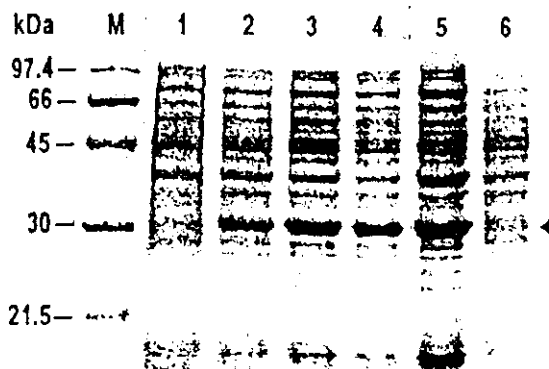
Để nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa RIP, chúng tôi đã biến nạp *pMcRip6* vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Nhằm xác

định điều kiện tối ưu hóa cho quá trình biểu hiện gen mã hóa RIP, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm tại các nồng độ cảm ứng IPTG khác nhau: 0,3 mM, 0,7 mM, 1,5 mM và 2 mM (nồng độ cuối). Các mẫu tế bào nuôi cảm ứng IPTG nồng độ khác nhau được thu

tại cùng các thời điểm và kiểm tra bằng SDS-PAGE.

Chúng tôi nhận thấy: Lượng rMcRIP tạo ra tại nồng độ IPTG 0,3 mM ít hơn tại nồng độ IPTG là 0,7 mM ở cùng thời điểm. Trong khi đó, tại nồng độ IPTG là 1,5 mM và 2 mM, băng protein trên điện di đồ không có sự khác biệt đáng kể so với băng protein ở nồng độ IPTG 0,7 mM. Kết quả này phản ánh cơ chế cảm ứng IPTG ở hệ vector pET-21d(+) mang gen mã hóa RIP trong *E. coli* chủng BL21(DE3): Nồng độ IPTG đủ lớn mới kìm hãm được hoàn toàn *lac* repressor. Như vậy, với điều kiện nuôi cấy 200 vòng/phút trong môi trường LB lỏng có bổ sung Amp (50 µg/ml) ở nhiệt độ 37°C, chúng tôi đã xác định được nồng độ chất cảm ứng tối ưu cho quá trình biểu hiện gen mã hóa RIP trong *pMcRip6* ở *E. coli* chủng BL21(DE3) là 0,7 mM IPTG.

Kết quả kiểm tra protein tổng số của chủng biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) có mang vector *pMcRip6* bằng SDS-PAGE cho thấy rõ động học của quá trình biểu hiện gen mã hóa RIP.



Hình 3. RIP tái tổ hợp (rMcRIP) từ mướp đắng được biểu hiện trong tế bào *E. coli*

M: Thang protein chuẩn
1: Trước khi cảm ứng
2-5: 1-4 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG nồng độ 0,7 mM
6: Không cảm ứng bằng IPTG

Sau khi cảm ứng bằng IPTG đã thu được băng protein có khối lượng phân tử khoảng 30 kDa và độ đậm của băng này tăng dần từ 1 - 4 giờ sau khi cảm ứng do lượng protein biểu hiện được nhiều hơn; còn băng protein tương ứng ở các mẫu đối chứng (đường chạy số 1 và 6) rất mờ nhạt. Khối lượng phân tử của protein biểu hiện được cũng bằng với khối lượng phân tử của rMcRIP suy diễn. Thời điểm tích lũy tối đa rMcRIP trong tế bào *E. coli* (ở nhiệt độ nuôi cấy là 37°C, IPTG 0,7 mM) là 4 giờ sau cảm ứng.

Tính tan của rMcRIP cũng được kiểm tra theo phương pháp đã mô tả. Kết quả cho thấy, phần lớn rMcRIP nằm trong phần dịch có pH = 7. Điều này sẽ tạo thuận lợi khi tiến hành tinh sạch rMcRIP.

Chúng tôi cũng đã tiến hành sơ chế rMcRIP bằng sắc ký trao đổi ion qua cột CM Sepharose (XK-16/20) trên hệ FPLC và đã được phân tích khối phổ MALDI-TOF MS. Kết quả cho thấy, rMcRIP đã biểu hiện được có trình tự peptide giống với các trình tự về RIP đã được công bố. Các nghiên cứu về tính chế và xác định phối phổ liên tục MALDI-TOF MS/MS của rMcRIP đang được tiến hành và sẽ được trình bày trong một bài báo khác.

KẾT LUẬN

Đã khuếch đại gen mã hóa RIP từ DNA genome của mướp đắng (*Momordica charantia*) bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi MAP65F/MAP859R.

Đã thiết kế vector pET-21d(+) mang gen mã hóa RIP mướp đắng (*pMcRip6*). Trình tự của *pMcRip6* đã được xác định, bao gồm 795 bp mã hóa cho phân tử protein gồm 264 amino acid (McRIP). RIP mướp đắng tái tổ hợp (rMcRIP) đã được biểu hiện trong khuẩn *E. coli* chủng BL21(DE3).

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện trong khuôn khổ của Đề tài cấp Nhà nước KC 04-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Au TK, Collins RA, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DC (2000) The plant ribosome inactivating proteins ruffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett* 471(2-3): 169-172.
- Barbieri L, Battelli MG, Stirpe F (1993) Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochem Biophys Acta* 1154: 237-282.
- Barbieri L, Valbonesi P, Bonora E, Gorini P, Bolognesi A, Stirpe F (1997) Polynucleotide: Adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: Effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res* 25: 518-522.
- Becker C, Shutov AD, Nong VH, Senyuk VL, Jung R, Horstmann C, Fischer J, Nielsen NC, Muntz K (1995) Purification, cDNA cloning and characterization of proteinase B - an asparagine-specific endopeptidase. *Eur J Biochem* 228: 456-462.
- Chow LP, Chou MH, Ho CY, Chuang CC, Pan FM, Wu SH, Lin JY (1999) Purification, characterization and molecular cloning of trichoanguin, a novel type I ribosome-inactivating protein from the seeds of *Trichosanthes anguina*. *Biochem J* 318: 211-219.
- Endo Y, Tsurugi K (1987) RNA N-glycosidase activity of ficin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem* 262: 8128-8130.
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, Tsurugi K (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 262: 5908-5912.
- Evensen G, Mathiesen A, Sundan A (1991) Ricin A-chain type 72 (*Abrus precatorius*). *EMBL/Genbank/DDBJ Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: CAA 38654.
- Frankel AE, Burbage C, Fu T, Tagge E, Chandler J, Willingham MC (1996) Ricin toxin contains at least three galactose-binding sites located in B chain subdomains 1 α , 1 β and 2 γ . *Biochemistry* 35: 14749-14756.
- Ho WK, Liu SC, Shaw PC, Yeung HW, Ng TB, Chan WY (1991) Cloning of the cDNA of alpha-momorcharin: A ribosome inactivating protein. *Biochem Biophys Acta* 1088(2): 311-314.
- Hoàng Quốc Trường, Tống Quỳnh Mai, Phan Văn Chi (2000) Nghiên cứu sự phân bố của RIPs nhóm I ở một số thực vật thuộc họ bầu bí bằng kỹ thuật Western blotting. *Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong sinh học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội: 172-174.
- Hudak KA, Wang P, Tumer NE (2000) A novel mechanism for inhibition of translation by pokeweed antiviral protein: Depurination of the capped RNA template. *RNA* 6: 369-380.
- Hung CH, Lee MC, Chen JK, Lin JY (1996) Abrin A-chain (*Abrus precatorius*). *EMBL/Genbank/DDBJ Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: CAA 54138.
- Husain J, Tickle IJ, Wood SP (1994) Crystal structure of momordin, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *Momordica charantia*. *FEBS Lett* 342(2): 154-158.
- Lam YH, Wong YS, Wang B, Wong RNS, Yeung HW, Shaw PC (1996) Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. *Plant Sci* 114: 111-117.
- Lee-Huang S, Huang PL, Nara PL, Chen HC, Kung HF, Huang P, Huang HI, Huang PL (1990) MAP 30: A new inhibitor of HIV-1 infection and replication. *FEBS Lett* 272(1-2): 12-18.
- Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, Huang PL, Bourinbaier A, Huang HI, Kung HF (1995) Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene* 161(2): 151-156.
- Lee-Huang S, Huang PL, Chen HC, Huang PL, Bourinbaier A, Huang HI, Kung HF (2000) Map30 anti-HIV protein/anti-tumor protein. *EMBL/Genbank/DDBJ Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: S 79450.
- Li MX, Yeung HW, Pan LP, Chan SI (1991) Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoiled DNA in vitro. *Nucleic Acids Res* 19: 6309-6312.

- Lin JY, Tserng KY, Chen CC, Lin LT, Tung TC (1970) Abrin and ricin: New anti-tumour substances. *Nature* 227: 292-293.
- Lin J, Li Y, Li Y, Xu Y, Yan F, Tang L, Chen F (2002) Curcin precursor (*Jatropha curcas*). *EMBLGenbank/DBI Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: AAL 58089.
- McGrath MS, Hwang KM, Caldwell SE, Gaston I, Luk KC, Wu P, Ng VL, Crowe S, Daniels J, Marsh J, Deihart T, Lekas PU, Uennaari JC, Yeung HW, Lifson JF (1989) GLQ223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2844-2848.
- Nguyễn Huy Hoàng, Trần Thị Phương Liên, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Thùy Châu, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải (1999) Nghiên cứu hoạt tính kháng một gao của dịch chiết protein từ hạt mít, gấc và mướp đắng. *Tạp chí Sinh học* 21(3): 199-202.
- Nguyễn Huy Hoàng, Đào Huy Phong, Nghiêm Ngọc Minh, Lê Trần Bình, Nông Văn Hải (2000) Phân lập và đọc trình tự gen mã hóa protein bất hoạt ribosome từ cây mướp đắng (*Momordica charantia*). *Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong sinh học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội: 84-88.
- Nguyen Huy H, Nghiem Ngoc M, Dao Huy P, Le Tran B, Nong Van H (2000) *Momordica charantia* partial RIP gene for ribosome inactivating protein, type I. *EMBLGenbank/DBI Nucleotide Sequence Databases*, Accession number: AJ 294541.
- Nguyễn Văn Đạt, Nguyễn Thanh Thủy, Nguyễn Huy Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Trương Nam Hải (2000) Biểu hiện gen mã hóa cho protein bất hoạt ribosom của cây mướp đắng trong nấm men *Pichia pastoris*. *Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong sinh học*. Nhà xuất bản Đại học Quốc gia, Hà Nội: 44-47.
- Ortigao M, Better M (1992) *Momordica balsamina* mRNA for momordin II. *EMBLGenbank/DBI Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: Z 12175.
- Phan Van Chi, Hoang Quoc Truong, Nguyen Thuy Ha, Won-II Chung, Le Tran Binh (2001) Characterization of trichobakin, a type I ribosome-inactivating protein from *Trichosanthes* sp. *Bac Kan* 8-98. *Biotechnol Appl Biochem* 34(2): 85-92.
- Quanhong Y, Rihe P, Aisheng X (2001) *Momordica charantia* MAP30I gene, complete cDNA. *EMBLGenbank/DBI Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: AF 284811.
- Reinbothe S, Reinbothe C, Lehmann J, Becker V, Apel K, Parthier B (1994) JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7012-7016.
- Sandvig K, van Deurs B (2000) Entry of ricin and shiga toxin into cells: Molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J* 19: 5943-5950.
- Sun Y, Huang PL, Li JJ, Huang YQ, Zhang L, Huang PL, Lee-Huang S (2001) Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma associated virus. *Biochem Biophys Res Commun* 287(4): 983-994.
- Steeves RM, Denton ME, Barnard FC, Henry A, Lambert JM (1999) Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. *Biochemistry* 38: 11677-11685.
- Wang YX, Neamati N, Jacob J, Palmer I, Stahl S, Kaufman JD, Huang PL, Huang PL, Winslow HE, Pommier Y, Wingfield PT, Lee-Huang S, Bax A, Torchia DA (1999) Solution structure of anti-HIV-1 and anti-tumor protein MAP30: Structural insight into its multiple functions. *Cell* 99(4): 433-442.
- Wang P, Tumer NE (2000) Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv Virus Res* 55: 325-355.
- Wei YF, Cai LB, Zhuang W (2004) *Momordica charantia* Rip (rip) mRNA, complete cDNA. *EMBLGenbank/DBI Nucleotide Sequence Databases*. Accession Number: AY 523412.
- Willy JP, Qiang H, Els JM (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: More than RNA N-glycosidases? *FASEB J* 15: 1493-1506.
- Yeung HW, Li WW, Feng Z, Barbicri L, Surpe F (1988) Trichosanthin, alpha-momorcharin and beta-momorcharin: Identity of abortifacient and ribosome-inactivating proteins. *Int J Pept Protein Res* 31: 265-268.
- Yuan YR, He YN, Xiong JP, Xia ZX (1999) Three-dimensional structure of beta-momorcharin at 2.55 Å

resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55: 1144-1151.

Yuan H, Wang L, Wang Y, An C, Chen Z (2004) Trichosanthin precursor (*Trichosanthes kirilowii*). *EMBL/Genbank/DBI Nucleotide Sequence*

Databases. Accession Number: AAK 52960.

Zarling JM, Moran PA, Haffar O, Sias J, Richman DD, Spina CA, Myers DE, Kuebelbeck V, Ledbetter JA, Uckun FM (1990) Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies. *Nature* 347: 92-95.

EXPRESSION OF A GENE ENCODING RIBOSOME INACTIVATING PROTEIN (RIP) FROM BITTER MELON (*Momordica charantia*)

Nguyen Dinh Cuong, Nguyen Thuy Duong,
Le Thi Thu Hien, Luong Thi Thu Huong,
Tran Thi Phuong Lien, Nguyen Huy Hoang,
Phan Van Chi, Nong Van Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) occur in many plant species, especially in those of the Family Cucurbitaceae. RIPs are glycoproteins having N-glycosidase activity and they are thought to involve in plant defense system (with antifungal, antiviral activities, etc.). Researches showed that native RIP preparations and/or recombinant RIPs exhibited anti-HIV, anti-tumor and other activities without known toxicity for normal cells. Therefore, RIPs are of special interest in many laboratories in terms of possible development of appropriate drugs. In order to produce a recombinant RIP, we have cloned a gene encoding RIP from bitter melon (*Momordica charantia*) by polymerase chain reaction (PCR). In this paper, we report on the sequence of a new clone (*pMcRip6*), with 795 bp in length, that encodes a mature polypeptide of the RIP. The nucleotide and/or the deduced amino acid sequences of the gene fragment are highly homologous (> 99,5% identity) to those of MAP30 (beta-momorcharin) from *M. charantia* and Momordin II from *M. balsamina*. The coding sequence of the gene was inserted into the expression pET-21d(+) vector and over expressed in *E. coli* strain BL21(DE3). The recombinant protein was soluble in the Tris-HCl buffer, pH 7, and could be detected by SDS-PAGE as a major band with a molecular mass of about 30 kDa, that is in accordance with the theoretically calculated size. Preliminarily, it was identified by the MS/MS MALDI-TOF that the amino acid sequence of the recombinant

*Author for correspondence: Tel: 04. 7562934, Fax: 04. 8363144, Email: vnong@ibt.ac.vn

M. charantia RIP (rMcRIP) is completely matched with those of the corresponding genes deposited in the databases. Works on the extraction, purification and characterization of the rMcRIP are in progress.

Key words: *Expression in E. coli, bitter melon (Momordica charantia), RIP (Ribosome Inactivating Protein), recombinant RIP (rMcRIP), nucleotide sequence*

MỤC LỤC

CONTENTS

Phan Văn Chí - Proteomics và những nghiên cứu ứng dụng	397-414
Proteomics and its application researches	
Lê Thanh Hòa, Phạm Việt Cường - Nguyên lý vaccine DNA và hướng ứng dụng phòng bệnh Gumboro tại Việt Nam	415-432
Principles for generation of DNA vaccine and strategy for its application in prevention against Gumboro disease in Vietnam	
Nguyễn Tiến Minh, Bùi Hoàng Anh, Bạch Thị Như Quỳnh, Lê Thị Tâm, Đồng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng - Biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên lõi của virus viêm gan B ở <i>Escherichia coli</i>	433-438
Expression of the gene encoding hepatitis B core antigen (HBcAg) in <i>Escherichia coli</i>	
Quyên Đình Thị, Hideo Ohkawa - Chức năng đồng hóa phenylurea, sulfonylurea và các chất diệt cỏ khác của CYP71B11 từ <i>Arabidopsis thaliana</i>	439-450
Function of an <i>Arabidopsis thaliana</i> cytochrome P450 (CYP71B11) metabolizing phenylureas, sulfonylureas and other herbicides	
Nguyễn Đình Cường, Nguyễn Thùy Dương, Lê Thị Thu Hiền, Lương Thị Thu Hường, Trần Thị Phương Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Phan Văn Chí, Nông Văn Hải - Biểu hiện gen mã hóa protein bất hoạt ribosome của cây mướp đắng ở vi khuẩn <i>Escherichia coli</i>	451-460
Expression of a gene encoding ribosome inactivating protein (RIP) from bitter melon (<i>Momordica charantia</i>)	
Đoàn Thu Thủy, Trương Quốc Cần, Hồ Hữu Nhị - Đánh giá sàng lọc một số phương pháp nhận biết cây lúa chuyển gen kháng sâu đục thân	461-468
Screening methods to identify transgenic rice resistant to stem borers	
Nguyễn Hạnh Phúc, Trần Thị Nguyệt Lan - Chế tạo cột sắc ký ái lực Ovomucoid cho tinh sạch lectin <i>Phaseolus vulgaris</i>	469-475
Preparation of Ovomucoid affinity chromatography column for isolation of <i>Phaseolus vulgaris</i> lectin	

- Trần Thanh Thủy, Tống Kim Thuận** - Phân loại 2 chủng nấm men sinh màng nhầy *Lipomyces* PT2.3 và PT7.1 phân lập từ đất trồng đồi trọc tỉnh Phú Thọ 477-486
Identification of two capsule - producing yeast strains PT2.1 and PT7.1 isolated from hill soils of Phutho province
- Lê Quang Huân, Lã Thị Huyền, Nguyễn Thị Nhã, Nguyễn Thị Thanh Bình, Lê Trần Bình** - Xác định virus trong cây bông bị bệnh xanh lùn 487-492
Identification of a virus in the cotton plant showing symptom of blue disease
- Lê Xuân Đắc, Bùi Văn Thắng, Lê Trần Bình, Lê Duy Thành, Lê Thị Muội** - Đánh giá đa dạng di truyền của một số giống lúa *Tám* ở Việt Nam 493-501
Genetic diversity among *Tam* rice cultivars using RAPD markers
- Nguyen Minh Tam, To Van Vinh, Vu Thi Ha Giang, Nguyen Thi Phuong Trang, Nguyen Tien Hiep, Ludwig Triest** - Population genetics of *Cycas chevalieri* and *Cycas simplicipinna* in tropical forests of Vietnam 503-518
Di truyền quần thể của hai loài tuế *Cycas chevalieri* và *Cycas simplicipinna* trong rừng nhiệt đới Việt Nam
- Nguyễn Quốc Việt, Nguyễn Bá Hữu, Đặng Thị Cẩm Hà** - Phân loại và nghiên cứu khả năng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học của chủng KC3-2 được phân lập từ hệ thống xử lý nước thải nhiễm dầu 519-528
Classification and study on the capability in producing biosurfactant of the KC3-2 strain isolated from a treatment plant for oil contaminated wastewater



GENETICS
SOCIETY
OF
VIETNAM

GENETICS SOCIETY OF VIETNAM

DI TRUYỀN HỌC & ỨNG DỤNG

GENETICS AND APPLICATIONS

2002

TRẠNG THÁI VÀ TƯƠNG TÁC CỦA CÁC ĐƠN VỊ

ISSN: 0866 - 8566

HỘI DI TRUYỀN HỌC VIỆT NAM
GENETICS SOCIETY OF VIETNAM

DI TRUYỀN HỌC
&
ỨNG DỤNG
GENETICS AND APPLICATIONS

2

2002

TẠP CHÍ XUẤT BẢN ĐỊNH KỲ 3 THÁNG 1 SỐ

MỤC LỤC

	Trang
1. Phạm Thành Hồ Một số đặc tính sinh học và hệ thống chọn dòng nấm rơm lụa bạc <i>Volvariella bombycina</i> phân lập tại Việt Nam	1
2. Phạm Thành Hồ Nghiên cứu nuôi trồng 4 dòng đơn bào tử của nấm rơm lụa bạc <i>Volvariella bombycina</i> và bước đầu ứng dụng vào chọn giống	7
3. Phạm Xuân Hội, Trần Duy, Quý Phan Tuấn Nghĩa, Narendra Tuteja Biểu hiện và tính sạch ADN helicase tái tổ hợp (PDH45) của cây đậu Hà Lan (<i>Pisum sativum</i> L.)	16
4. Đỗ Anh Tuấn, Trần Linh Thuộc Phát hiện <i>Escherichia coli</i> O157:H7 trong mẫu thực phẩm bằng phản ứng MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION	23
5. Chu Thị Thu Trang, Trần Linh Thuộc Phát hiện đồng thời <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> sp. và <i>Vibrio cholerae</i> bằng phản ứng multiplex PCR	29
6. Hà Thị Quyển, Dương Hồng Quân, Lê Thị Tâm, Bạch Như Quỳnh, Phùng Dắc Cam, Đinh Duy Kháng Tách dòng gen mã hoá hemolysin (hly) của <i>Vibrio cholerae</i> phân lập ở Việt nam	36
7. Đỗ Ngọc Liên, Đặng Thị Thu Điều tra sự phân bố và nghiên cứu một số tính chất của protein kìm hãm amylase (α AI) từ một số loài cây họ đậu (Fabaceae).	39
8. Nguyễn Văn Mùi, Nguyễn Đức Thành, Phạm Quang Chung, Nghiên cứu những biến động ở mức phân tử của một số dòng lai giữa 2 giống lúa nương Khẩu nu sậy (DB09) và Khẩu mèo	44
9. L.V. Avërianốp, Phan Kế Lộc, Đỗ Tiến Đoàn, Nguyễn Tiến Hiệp Tính đa dạng của hệ thực vật việt nam 11. Phát hiện Lan lều hoa to <i>Pleione grandiflora</i> (Rolfe) Rolfe ở tỉnh Lào Cai và sự biến dạng tự nhiên của nó	50
10. Nguyễn Quốc Khang, Lê Doãn Diên, Nguyễn Thị Hương Thủy, Vũ Tuyền Hoàng Đánh giá ưu thế của lúa lai P4 từ dòng bố IR.64 và dòng mẹ IET.2938 bằng các chỉ tiêu hoá sinh	54
11. Nguyễn Nghĩa Thìn, Hồ Thị Tuyết Sương, Trần Đình Đại Phân tích tính đa dạng nguồn gen thực vật vùng núi đá vôi Sơn La	62

SUMMARY

Molecular cloning of the gene encoding hemolysin of Vibrio cholerae (hly) isolated in Vietnam

Ha Thi Quyen et al.

Vibrio cholerae, the causative agent of major epidemics of diarrheal disease in Bangladesh, South America, Southeastern Asia and Africa was isolated from clinical samples and from aquatic environments during and between epidemics over the past 20 years. *V. cholerae* is a noninvasive organism affecting the small intestine through secretion of an enterotoxin.

In 1961, *V. cholerae* biotype El Tor caused a major epidemic in Philippines. Then, this biotype has spread across Asia, the Middle East, Africa and parts of Europe.

Being different from classic biotypes, this biotype produced hemolysin. Hemolysin of *V. cholerae* has not only hemolytic activity but also, as it is found, causes vacuolation in mammalian cells. The vacuoles became prominent 18h after introduction of culture supernatant, and vacuolated cells survived for 48h and then died. The vacuolating activity of the *V. cholerae* hemolysin is a new property of this protein. Hemolysin is also used to differentiate the biotypes of *V. cholerae*.

In this report, a hemolysin-coding gene (hly) of *V. cholerae* serotype Inaba was amplified by PCR and isolated using the primers HLYA1 and HLYA2. The nucleotide sequence of the primers is:

HLYA1: 5'-GCCAAAACCTCAATCGTTGCG-3'

HLYA2: 5'-TGTAAGCTAACCGCTTGCG-3'

The PCR procedures: 94°C in 3 minutes, (94°C in 1 minute, 52°C in 1 minute, 72°C in 1 minute 20 seconds), 30 cycles, 72°C in 10 minutes, keeping in 4°C. The length of the hly is 1096 bp in theory. PCR products were cloned in *E. coli* DH5 α by using vector pCMT 2.1 of TA cloning Kit. Two clones *E. coli* containing hly was chosen to use for researches on hemolytic, vacuolating activities and biodiversity of *V. cholerae* biotypes isolated from different regions of Vietnam.

Người thẩm định nội dung khoa học: TS. Lê Quang Huân

ĐIỀU TRA SỰ PHÂN BỐ VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ TÍNH CHẤT CỦA PROTEIN KÌM HÂM AMYLASE (α AI) TỪ MỘT SỐ LOÀI CÂY HO DẬU (FABACEAE).

Đỗ Ngọc Liên

Đại học Quốc gia Hà Nội

Đặng Thị Thu

Đại học Bách Khoa Hà Nội

MỞ ĐẦU

Các chất kìm hãm α amylase (α AI) từ nguồn thực vật đặc biệt là cây đậu *Phaseolus vulgaris* thuộc họ Fabaceae lần đầu tiên đã được Ishimoto và cộng sự nghiên cứu vào năm 1988 [3]. Tiếp theo Kaotaru và cộng sự đã sử dụng dịch chiết của hạt đậu xử lý hoạt

động α amylase in vitro cùng với việc cho chuột ăn hạt đậu sống đã chứng minh được khả năng kìm hãm của α AI trong hạt đậu đối với α amylase của chuột, đồng thời cũng chứng minh được chuột ngừng sinh trưởng khi ăn hạt đậu sống có chứa chất α AI [4]. Trong những năm 1990 giáo sư Huipels [5]

đã nghiên cứu rất nhiều về đặc tính của α AI và hệ thống gen mã hoá cho α AI ở các loài cây họ đậu cũng như khả năng kìm hãm hoạt động α amylase của một số loài động vật đặc biệt là côn trùng sâu hại. Theo đánh giá của FAO, hàng năm tổn thất về ngũ cốc trên toàn thế giới vào khoảng 10% do sâu một phá hoại nghĩa là vào khoảng 13 triệu tấn ngũ cốc bị phá hủy hoàn toàn cùng với 100 triệu tấn ngũ cốc bị mất giá trị dinh dưỡng[1]. Biện pháp phòng trừ côn trùng phá hoại bằng thuốc hoá học sẽ gây nhiễm độc cho thực phẩm và môi trường đưa tới việc nghiên cứu phương pháp sinh học là điều kiện cần thiết. Nhiều công trình nghiên cứu khoa học trên thế giới và bước đầu ở trong nước theo hướng bảo vệ sinh học trong sản xuất và trong bảo quản sau thu hoạch đang được tiến hành rất mạnh mẽ. Xuất phát từ đó chúng tôi tiến hành đề tài: "Điều tra sự phân bố và nghiên cứu một số tính chất của protein kìm hãm α amylase (α AI) từ một số loài cây họ đậu (*Fabaceae*).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Các hạt đậu thu hoạch tại Việt Nam đã được tiến sĩ Nguyễn Đăng Khởi định loại, được phơi khô và nghiền thành bột mịn. Các loài đậu gồm:

- Đậu son *Phaseolus coccineus*
- Đậu gao *Vigna umbellata*
- Đậu trắng Sài Gòn *Vigna sinensis*
- Đậu rạ *Canavalia ensiformis*
- Đậu mè xanh *Mucuna utilis*

Các hoá chất cho điện di gel polyacrylamit (SDS-PAGE) do hãng BIORAD và SIGMA cung cấp. Các thiết bị như ly tâm lạnh *Sorval RC5B* của Mỹ, máy đo quang phổ của Nhật, máy điện di Hoefer của Mỹ. Các dụng cụ hoá chất khác đều chuẩn quốc tế.

Dùng đệm PBS pH 7,4 để chiết rút mẫu 3 lần. Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry, kết tủa protein α AI bằng 70% $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ bão hoà, thu kết tủa sau ly tâm 14.000 vòng/phút.

Điện di protein trên bản gel polyacrylamit 15% theo kỹ thuật Laemmli.

Xác định hoạt động α AI theo kỹ thuật khuếch tán trên đĩa thạch.

Tinh chế α AI nhờ cột trao đổi ion CM-trisacryl.

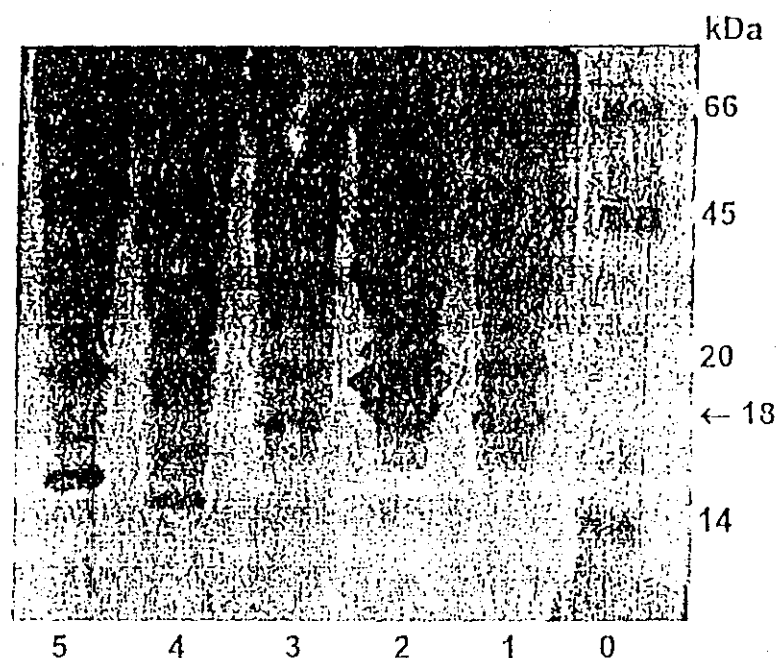
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1 Khả năng kìm hãm của α AI đối với amylase của một đậu xanh (*Callosobruchus chinensis* L)

Khả năng kìm hãm của α AI được xác định dựa vào diện tích vòng phản giải amylase đối với tinh bột sau khi xử lý với α AI của các loại đậu. Khả năng này được biểu thị bằng phần trăm hoạt động còn lại của α amylase một đậu xanh sau khi xử lý với α AI ở các nhiệt độ thích hợp. Từ kết quả nghiên cứu chúng tôi thấy rằng trong 5 mẫu đậu nghiên cứu biểu hiện hoạt tính α AI của đậu mè xanh là cao nhất (α AI làm mất đi gần 58,9% hoạt tính α amylase của một đậu xanh). Ngoài ra chúng tôi còn nhận thấy dịch chiết đậu rạ không những không kìm hãm hoạt tính α amylase của một mà còn kích thích hoạt động của nó.

2 Phân tích phổ protein của các kết tủa dịch chiết đậu bằng 70% ammon sulphat bão hoà.

Mục đích của việc nghiên cứu này nhằm phát hiện một số băng protein có mặt trong điện di SDS-PAGE nằm ở vị trí khoảng 14 và 18 kDa là những băng có hoạt tính α AI theo Chrispeels [5]. Các kết quả phân tích điện di cho biết các băng 14 và đặc biệt là băng 18 kDa bắt mắt đậm đều xuất hiện ở những mẫu đậu biểu hiện hoạt tính α AI rõ ràng, đặc biệt là mẫu đậu mè xanh, đậu thận đỏ, đậu son. Riêng mẫu đậu gao và đậu rạ các băng protein ở vị trí này rất mờ và khó phát hiện (hình 1). Từ các kết quả này chúng tôi cho rằng các loài thận đỏ, đậu son và đậu mè xanh đều có chứa các protein α AI trong đó đậu mè xanh có hàm lượng α AI cao nhất. Kết quả cũng cho biết lần đầu tiên chúng tôi đã phát hiện ra protein α AI có mặt ở một chi khác với chi *Phaseolus*. Đó là chi *Mucuna* thuộc họ đậu trồng rất nhiều ở Miền Bắc Việt nam. Điều này chưa có tài liệu nào trong nước và quốc tế đề cập đến. Xuất phát từ kết quả trên chúng tôi bước đầu tiến hành việc nghiên cứu thâm dò khả năng tinh sạch protein α AI từ loài đậu *Mucuna utilis*.



Hình 1: Ảnh điện di đồ protein dịch chiết của 5 loài đậu nghiên cứu được kết tủa bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

- 0) Protein chuẩn huyết thanh bò 66 kDa, Ovalbumin 45kDa, Protein kìm hãm trypsin 20kDa, Lysozim 14,3kDa
 1) Protein dịch chiết đậu son
 2) Protein dịch chiết đậu mè xám
 3) Protein dịch chiết đậu thận đỏ
 4) Protein dịch chiết đậu gạo
 5) Protein dịch chiết đậu rựa

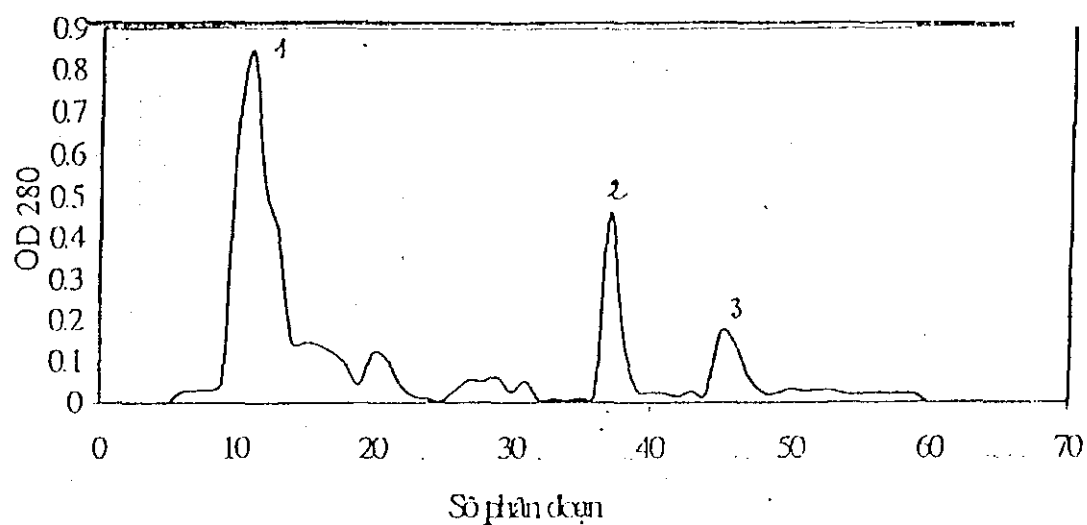
3. Tinh chế protein α AI từ hạt đậu *Mucuna utilis*.

Bột đậu mè xám được chiết rút bằng PBS, pH 7,4, kết tủa bằng 70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hoà, thẩm tách và tiến hành sắc ký trên cột CM- Trysacryl. Tốc độ rửa cột là 20ml/h. Protein được rửa chiết khỏi cột bằng gradient NaCl từ 0,15 - 1M ở pH 5,5. Qua kết quả sắc ký chúng tôi rút ra một số kết luận sau: Hiệu

suất gắn cột của protein thô là 44,76 %. Protein thu được sau khi qua cột gồm 3 đỉnh chính trong đó đỉnh thứ 2 là có hoạt tính kìm hãm α AI. Hiệu suất thu hồi của đỉnh 1 và 2 tương ứng là 19,2 % và 4,84 %. Các phân đoạn chiết rút từ cột đã được đánh giá bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE. Kết quả sắc kí được trình bày ở hình 3 và được tổng kết ở bảng 2.

Bảng 2: Tóm tắt kết quả sắc ký dịch chiết đậu mè xám qua cột CM-Trysacryl

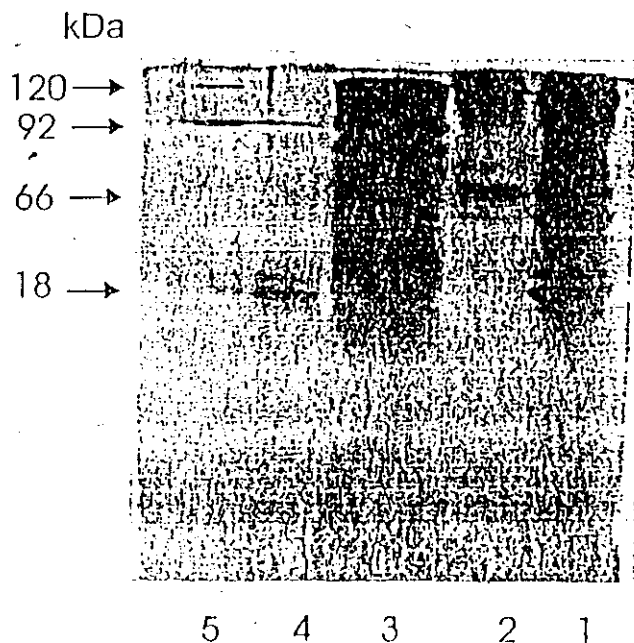
Mẫu	Thể tích (ml)	Hàm lượng protein (mg)
Protein lên cột	1,5	31,5
Dịch rửa	58	17,4
Đỉnh D1	12	6,053
Đỉnh D2	6	1,5275



Hình 2 : Sắc ký đồ qua cột CM - Trysacryl

Phân tích kết quả bằng điện di trên gel polyacrylamit thấy đường chạy số hai là đỉnh protein thứ nhất gồm ít nhất 3 băng protein không có hoạt tính α AI có khối lượng từ 60, 66, 120-130 kDa. Đáng chú ý là đỉnh thứ hai

chủ yếu 1 băng đậm có khối lượng khoảng 18 kDa có hoạt tính α AI. Kết quả này cho thấy protein α AI có khả năng được tinh sạch nhờ cột trao đổi ion CM-Trysacryl (hình 4).



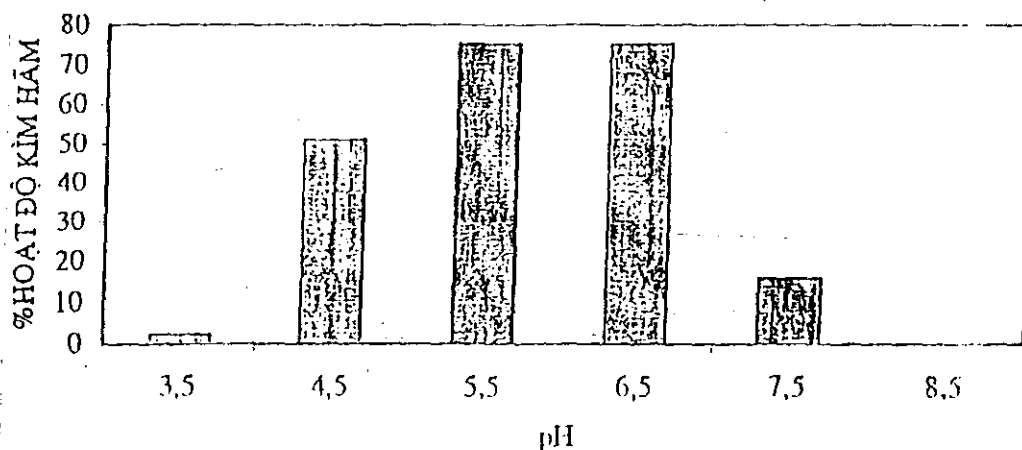
Hình 3 : Điện di đồ protein qua cột CM - Trysacryl

Đường 1 và 3 là dịch chiết thô ; Đường 2 là đỉnh D1 ;
Đường 4 là đỉnh D2 ; Đường 5 là protein tiêu chuẩn

4. Một số tính chất của α AI của đậu *Mucuna utilis*

4.1 Ảnh hưởng của pH đến hoạt động α AI

Để biết ảnh hưởng của pH đối với hoạt động α AI chúng tôi đã sử dụng phương pháp khuếch tán đĩa thạch. Đây là phương pháp bán định lượng nhưng có độ nhạy cao và thời gian xác định tương đối nhanh. Kết quả được trình bày ở biểu đồ (hình 4).



Hình 4: Biểu đồ trình bày ảnh hưởng của pH đến hoạt động của α AI

Từ kết quả này cho thấy hoạt động kim hãm của α AI thích hợp nhất ở vùng pH từ 5,5 đến 6,5 và biểu hiện cao nhất ở pH 5,5. ở các vùng pH axit hoặc kiềm hoạt động α AI hầu như bị mất hoạt tính.

4.2 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt động α AI của *Mucuna utilis*.

Chúng tôi tiến hành xử lý α AI của đậu ở các điều kiện nhiệt độ: 30° C, 40° C, 50° C, 60° C, 70° C trong vòng 15 phút trước khi cho kết hợp với amilase một đậu xanh trong các xét nghiệm. Các mẫu đối chứng không có α AI chỉ có amilase không xử lý nhiệt cho hoạt động phân giải tinh bột ở điều kiện tối ưu. Từ kết quả nghiên cứu cho thấy protein α AI có hoạt động thích hợp nhất ở nhiệt độ từ 30° → 40° C. Với mẫu xử lý α AI ở 50° C, 60° C và đặc biệt là ở 70° C thì hoạt động α AI hầu như bị kim hãm hoàn toàn. Điều đó chứng tỏ rằng protein α AI không hoạt động ở nhiệt độ cao và thí nghiệm này đã chứng minh chất kim hãm α AI trong các hạt đậu đã nấu chín hoàn toàn không cản trở quá trình tiêu hoá của người và động vật.

KẾT LUẬN

Các kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy:

1. Trong 5 loài đậu nghiên cứu có 3 loài đậu là đậu son, đậu thận đỏ và đậu mè xoáy có hoạt động α AI rõ rệt, trong đó hoạt động α AI của đậu mè xoáy cao nhất.
2. Các phân tích phổ điện di protein tan trong PBS cũng cho thấy 3 loại đậu có hoạt tính α AI đều có một các băng protein rõ nét có khối lượng khoảng 18 kDa.
3. Việc tinh sạch protein α AI nhờ cột CM-Trisacryl cho thấy thu được 1 băng protein có khối lượng khoảng 18 kDa có hoạt tính α AI.
4. Một số tính chất hoá sinh của α AI đã được nghiên cứu cho thấy: hoạt động α AI thích hợp ở nhiệt độ 30°, 40° C và pH thích hợp là 5,5 tới 6,5.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Công Hiến (1995). Cờn trùng hại kho. NXB KHKT Hà Nội.
2. Nguyễn Đăng Khởi (1977). Nghiên cứu về cây thức ăn gia súc ở Việt Nam. Tập I.

những loài cây họ đậu khác nhau. Viện KHKT Hà Nội.

3. Chikama, A., K. Kato, K. (1988). Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor from seeds of job's tea. Japanese Journal of Entomology, 38: 367-369.

4. Mirkov TE., Z. delizan JM., Hagiwara K., Finardi-Filho F., Jensenrup S. and Christensen MJ (1991). Relationship

relationships amongs proteins in the phytohemagglutinin- arcelin- α -amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. Plant Mol. Biol. 26:1103-1103.

5. Moreno J., Altabella T., Christensen MJ. (1990). Characterization of α amylase inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 92(3) : 703-709.

SUMMARY

Investigation of distribution and properties of α -amylase inhibitor protein from seeds of some species of Leguminous family (Fabaceae).

Do Ngọc Lien and Dang Thi Thu

The investigation of α - Amylase Inhibitor (α - AI) activity from seeds of 5 species of Leguminous family (Fabaceae): *Phaseolus coccineus*, *Vigna umbellata*, *Vigna sinensis*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna utilis*. The result of this studies showed that 3 species: *Phaseolus coccineus*, *Mucuna utilis*, *Phaseolus vulgaris* expressed obviously α - AI activity. In there the α - AI activity of *Mucuna utilis* is strongest (it take out roughly 58,9% α - amylase of mung bean - weevil (*Callosobruchus chinensis* L.)). In the contrary, the tissue fluids that was isolated from *Canavalia ensiformis* activate the α - amylase of mung bean - weevil (*Callosobruchus chinensis* L.).

One step purification of α - AI protein by ion exchange chromatography on CM - Trisacryl celam and the study α - AI protein by the protein electrophoresigram on 3 species which has α - amylase inhibitor activity showed a fraction of 18KDa to be expressed α - AI activity. In there, amount of α - AI from *Mucuna utilis* is highest. This result showed that: It is first time we have detected the present of α - AI protein in *Mucuna*. It have been grown a lot in North of Vietnam.

Some biochemical properties of α - AI which were studied showed that T_{opt} (optimal temperature) for activity of α - AI are 30°C, 40°C and pH_{opt} (optimal pH) are 5,5 to 6,5.

Người thẩm định nội dung khoa học : PGS. Trịnh Đình Đại

NGHIÊN CỨU NHỮNG BIẾN ĐỘNG Ở MỨC PHÂN TỬ CỦA MỘT SỐ DÒNG LAI GIỮA 2 GIỐNG LÚA NUỜNG KHIAU NU SẢY (DB09) VÀ KHIAU MÈO

Nguyễn Văn Mùi,
Đại học Quốc gia Hà Nội

Nguyễn Đức Thành, Phạm Quang Chung,
Viện Công nghệ sinh học, TT KHKT và CNQG

**17th FAOBMB Symposium / 2nd IUBMB Special Meeting /
7th A-IMBN Conference**

Genomics and Health in the 21st Century

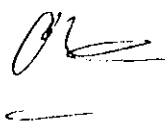
BANGKOK, THAILAND

PROGRAM AND ABSTRACTS

The Imperial Queen's Park Hotel

Bangkok, Thailand

November 22-26, 2004

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'O' followed by a series of horizontal strokes.

- OP-B8** Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity without hemolytic activity based on the antimicrobial peptide derived from N-terminal sequence of *Helicobacter pylori* ribosomal protein L1
Kyung-Soo Hahn (Korea)
- 13.30 - 15.10 **SESSION Q: Gene and Genome II** *Panorama I*
Chairpersons: *Jacques-Henry Well (France)*
Thararat Supasiri (Thailand)
- IL-C9** Shrimp EST project: the discovery of genes involved in immune functions
Anchalee Tassanakajon (Thailand)
- IL-C10** Molecular cloning and functional study of Na,K-ATPase $\beta 3$ subunit expressed on leukocytes by using a specific mAb, P-3E10
Watchara Kasinrerk (Thailand)
- OP-C6** Defflp cooperates with yKu to protect telomeres
Zhou Jin-Qiu (China)
- OP-C7** Chemical mechanism of protein splicing: biochemical and crystallographical studies
Yasuhiro Anraku (Japan)
- 15.10 - 16.00 Coffee-Tea Break
- 16.00 - 17.30 **SESSION R: Protein Expression, Structure & Function** *Panorama I*
Chairpersons: *Holland R. Cheng (Sweden)*
Watanalai Panbangred (Thailand)
- IL-C11** Structural studies on glutathione S-transferases from *Anopheles dirus*
Albert Kettermann (Thailand)
- OP-C8** Structure-function relationships of a *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ -endotoxin revealed by reversion mutagenesis
Boonhiang Promdonkoy (Thailand)
- OP-C9** Synthesis, cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene coding for mOTI-II
Tran Chau Thi Pham (Vietnam)
- POSTER PRESENTATION**
- 9:30-10:30 **SESSION 3: Biochemistry of Disease, Metabolic Disease and Antioxidant**
- SESSION 4: Genomics, Polymorphism & Genetics Disease**
- 15:00-16:00 **SESSION 5: Molecular Biology, Gene Regulation and Expression**
- SESSION 6: Proteomics, Protein Folding Structure, Function and Purification**

OP-C9

SYNTHESIS, CLONING AND EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI* OF A GENE CODING FOR mCOTI-II

Pham thi Tran Chau¹, M.K. Reddy², Dao thi Thuy¹, Hoang Thu Ha¹, Le nguyen Dung³, Laurent Chiche³.

¹Center of Biotechnology, Viet nam National University, Ha noi, Viet nam; ²Plant Molecular Biology Lab., International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, India; ³Centre de Biochimie Structurale, Faculte de Pharmacia, UMR5048-CNRS-INSERM-Universite Montpellier, France Tel: 84-4-7680638; Fax:84-4-7680907; E-mail: chauptt@vnu.edu.vn

Momordica chochinensis (MCo) are very rich in serine proteinase inhibitors. Three trypsin inhibitors namely MCoTI-I,-II,-III from MCo seeds have been purified, characterized and sequenced (Biochemistry 2000, 39: 5722). The conformational structure of the major inhibitor MCoTI-II was determined (Biochemistry 2001, 40:7973).

The gene coding for MCoTI-II was programmed according to its amino acid sequence. Basing on the nucleotide sequence, four overlapping synthetic oligonucleotide primers were designed. While designing the primers NdeI restriction site was introduced on the 5' end and stop codon and XhoI restriction site was introduced on the 3'end of the proposed synthetic gene. The synthetic gene was amplified by PCR, the PCR product showed a single band with a size around 110 bp on 2% agarose gel or on 5% acrylamide gel. After treatment with NdeI and XhoI, it was cloned into pTYB12 vector, which had been treated with the same enzymes. The recombinant vector was expressed in *E. coli* (BL-21 DE3) as a fusion protein. The optimal conditions for expression of the target fusion protein were: induction by 0.5 mM IPTG, after 16 hrs the cells were harvested and lysed by sonication in Tris-HCl buffer containing EDTA. The expression and purification of the recombinant inhibitor polypeptide followed the instruction of IMPACT-CN system. The expression recombinant product was a 55 kDa fusion of the intein tag to N-terminus of a synthetic inhibitor. It was detected on 12.5% SDS-PAGE as a protein band of molecular weight around 58 kDa, while in uninduced sample this protein band was not observed. The recombinant inhibitor was purified to homogeneity in a single step by using chitin beads column, the obtained inhibitor showed a single protein band on 18% SDS-PAGE with *M_r* of a bit higher than 3 kDa and showing antitrypsin activity.

Granted by the National Biotechnology Research Project, Code number: KC-04-14

PO-6.23

PURIFICATION OF A RECOMBINANT TRYPSIN INHIBITOR CMTI-V

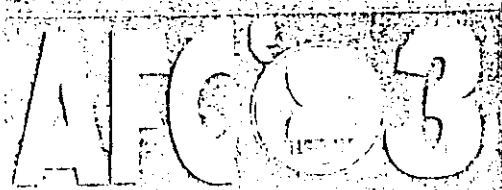
Dang Xuan Nghiem, Phan thi Ha, Nguyen Phuong Nam and Pham thi Tran Chau

Center for Biotechnology, Viet nam National University, Ha noi
Tel: 84-4-76806; Fax: 84-4-7680907; E-mail: chaupth@vnu.edu.vn

CMTI-V is a small polypeptide with Mr of 7.160 kDa, containing one disulfide bridge. In 1990, it was discovered to be an inhibitor of trypsin and of factor XIIa. However, the content of CMTI-V in pumpkin seeds is rather low, so it is worthwhile to study the gene encoding CMTI-V, and to cloning and express the gene in *E.coli*.

Previously, we have reported the synthesis, cloning and expression of the gene coding for CMTI-V (VNU Journal of Science - Natural Sciences T XX N^o3, 2004). The optimal conditions for expression of CMTI-V gene were: induction by 1mM IPTG for 6 hrs at 37°C. The cells were lysed by sonication on ice and centrifuged. The clarified lysate showed one distinct trypsin inhibitor (TI) band on PAGE containing edestin substrate. However, there were many protein bands detected on SDS- PAGE. In order to purify the target recombinant inhibitor, different methods were tested, such as: gel filtration on Sephadex G-50, Superdex 30, Superdex 75; ion exchange chromatography on QAE-Sephadex A-25, SP-Sephadex C-25, and affinity chromatography. The efficiency of the tested purification procedures was evaluated by determination of trypsin inhibitory activity, and by PAGE with and without proteinase substrate. The appropriate procedure chosen was as follows: precipitation by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, desalting on Sephadex G-25 column, and applying the pooled protein fractions onto SP-Sephadex C-25, TI fractions were collected and loaded on Trypsin - Sepharose 4B.

This work was granted by the National Biotechnology Research Programme, Project Code N^o KC-04-



ASEAN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY COOPERATION AND INTEGRATION FOR DEVELOPMENT

PROCEEDINGS OF THE 6TH ASEAN FOOD CONFERENCE
8-11 OCTOBER 2003 Hanoi, Vietnam

Edited by
Le Thanh Binh, Nguyen Kim Vu, Nguyen Duy Phan



Organization



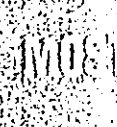
ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)



ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)



ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)



ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)

ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)

ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)
ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)
ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)
ASEAN Food Science and Technology
Cooperation and Integration for Development
(AFCOS)

ASEAN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY: COOPERATION AND INTEGRATION FOR DEVELOPMENT

PROCEEDINGS OF THE 8th ASEAN FOOD CONFERENCE

8-11 October 2003, Hanoi, Vietnam

Edited by

Le Doan Dien, Nguyen Kim Vu, Nguyen Duy Lam

Volume 1

AGRICULTURE PUBLISHING HOUSE
HANOI - 2003

CONTENTS

Papers

PLENARY SESSIONS

1. Regional perspectives on food industry development and food demand in the 21st century
Alastair Hicks 3
2. Emerging food processing technologies of potential interest to ASEAN countries
James H. Mey 10
3. Functional food of interest to ASEAN: from traditional experience to modern production and trading
Chen Hsiao-Tse 15
4. Nutritional changes in the ASEAN: Current situation, challenges and opportunities
Khatijah Idris, Lee U-Sung 17

SESSION 1: GENE TECHNOLOGY, GM FOOD AND BIOSAFETY

Oral Papers:

5. Gene transfer in food fishes: a way forward for food biotechnology
Zohrah Hapri Sabarnah, Lee Kok-Sung, Shahrudin bin Kasah 25
6. Expression of gene coding for cellulase inhibitor from common bean (*Phaseolus vulgaris*) in *Escherichia coli*
Dang Thi Thu, Huong Quoc Phong, Xong Van Hai 30
7. Stimulation of phenolic antioxidants in seeds germination by carbohydrate elicitor
Nuri Andarwulan, Purwiyanto Hartiyadi, Anggraeni, Yuli Sukmawati, Anna Yuhana 35
8. Characterization of α -amylase producing yeasts and yeast bile fungi
Vu Nguyen Thanh, Nguyen Huong Giang, Dinh My Hang, Dao Anh Hoa, Duong Anh Tuan, Tran Minh Duc, Tran To Chau 40
9. In silico screening for food allergens
Cristel C. Decourty 43
10. Detection of endopolysaccharidase genes among yeast species
Nguyen La Anh, Honi Wheeler 48

Poster Papers:

11. Creating *Saccharomyces cerevisiae* strain harboring rDNA cluster released from chromosome XII by chromosome splitting
He Phu Ha, Yoshimichi Kameko and Satoshi Harashima 53

SESSION 2: NOVEL FOOD BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY

Oral Papers:

12. Novel enzymatic processes for the production of the prebiotic ketose D-tagatose
Diemmar Hahnrich, Birgit Felber, Magdalena Kijawa, Christian Leitner, Klaus D. Kulbe 63
13. Transglycosylation of daidzin by *Thermotoga maritima* maltosyl transferase
Dan Li, Jin Hee Park, Jong Tae Park, Cheon Seok Park and Kwan Hwa Park 68
14. Isolation and identification of α -glucosidase inhibitor of red oncom Indonesian traditional mold *Neurospora* sp. fermented food
Leonardus R. S. Kardono, R. Triandawati, Sofina I. Nasution and Wahyudi P. Santosa 71
15. Triacylglycerols of piliut (*Camellia ovata* Engl.), coconut (*Cocos nucifera* L.) and their enzymatic modification for specialty fats and oils production
Lanna J. Pham and Precy M. Rasco 74
16. Color stability of natural pigment from Secang wood (*Caesalpinia sappan* Linn.)
Dede R. Adawish and Hermina Indriati 79
17. Extraction, purification and characterization of β -glucosidase enzyme from apricot kernel and applying this enzyme in treatment of fruit juice
Nguyen Thi Hien Tu Viet Phu, Hoang Thi Le Hung, Tran Duy Long 84

EXPRESSION OF GENE CODING FOR α -AMYLASE INHIBITOR FROM COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*) IN *ESCHERICHIA COLI*

Dang Thi Thu, Truong Quoc Phong

Institute of Biological and Food Technology, Hanoi University of Technology

134010 Viet Nam, Hanoi, dangthi@vnu.edu.vn

Nong Van Hai

Institute of Biotechnology, National Centre of Science and Technology

18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam

Abstract: Total genomic DNA from white and brown bean seeds (*Phaseolus vulgaris*) have been isolated and purified. The gene coding for alpha amylase inhibitor (α -AI) from white bean was amplified and purified. The expression vector pT21d was inserted with studied gene and transferred into *E. coli* BL21(DE3) for expression of recombinant α -AI. α -AI protein from *Phaseolus vulgaris*, the recombinant protein is expected to be used for cereal preservation by its specific inhibition of α -amylase of bruchids, beetles and other insects.

Key words: α -amylase inhibitor, cereal, common bean, recombinant, worm.
Abbreviations: α -AI, alpha-amylase inhibitor; RHP, ribosome inhibitory protein; PPI, proteinase protein inhibitor; SDS, sodium dodecyl sulfate; T, chloroform; isoamylalcohol (2:1:1); TE, Tris-EDTA

1. INTRODUCTION

Annually, the worm have altered of approximately of 20-28% quantity of harvested cereals and food products. A variety of chemical insecticides have been using to avoid this loss but accompanying disadvantages of toxicity and environmental pollution. At the present, many scientists pay attention to search safe insecticides from other sources such as bacteria, virus, fungi and plants. These biological preparations are specifically toxic to worms, not to human being and these can be degraded rapidly under normal conditions.

The bio-insecticides have been studied intensively included: crystal proteins (*Bacillus thuringiensis*), Ribosome inhibitive proteins (RHP), proteinase protein inhibitors (PPI), alpha-amylase inhibitor (α -AI)...

Proteous α -amylase inhibitors (α -AIs) are widespread in microorganisms (*Sarcomyces*) and higher plants, and specifically inhibit α -amylase (Okuda *et al.*, 1997; Power *et al.*, 1977). These α -AIs are relatively small proteins with molecular weight of 14 - 18 kDa (Awon *et al.*, 1998; Chispe *et al.*, 1998). The α -AI can inhibit the α -amylase of bruchids, beetles and other insects (Chispe *et al.*, 1998).

II. MATERIALS AND METHODS

Materials

The white and brown bean seeds was provided by Vietnam cultivar company. The bud was collected from two days seedling and stored at -20°C for DNA isolation.

Plasmid pT21d and *E. coli* BL21(DE3) for expression were purchased from Novagen. *E. coli* strain DH5 α used for cloning were obtained from Life Technology (USA). Restriction endonuclease and other enzymes were purchased from Fermentas. QIA prep[®] Miniprep used for purifying recombinant plasmids were obtained from QIAGEN. All chemicals used in this study were reagent grade.

Methods

Isolation of total genomic DNA

Total genomic DNA was extracted according to the modified method of Becker (Becker *et al.*, 1995). The buds of white and brown bean species were grind to fine powder in liquid nitrogen.

The powder was homogenised with extraction buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl and 2% SDS. The extract was centrifuged at 12000 rpm for 20 min. The supernatant was collected and treated by protease K (100 ug/ul) and extracted with equal volume of CT to remove proteins and other contaminants. The mixture was vortexed and centrifuged for 20 min at 12000 rpm. The upper phase was transferred to a new tube and added with 0.1 volume of 3M CH₃COONa and three volume of chilled absolute ethanol. The tube was incubated for at least 3 hours at -20°C, centrifuged at 14000 rpm for 20 min at 4°C. Then, the DNA pellet was collected and washed with 70% ethanol. The obtained DNA pellet was dissolved in TE buffer.

- The α -AI gene was amplified by PCR technique (Sambrook *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1992)
- Construction of the expression vector for α -AI gene (Sambrook *et al.*, 1989; Watson *et al.*, 1992; Weaver, 2002).

The strategy for construction of the expression vector was shown in Figure 1. The expression vector pET21d (5.4 kb) and PCR product of α -AI gene were digested with *Nco*I and *Bam*III. Two restriction enzyme digested products were ligated together. The obtained expression vector for α -AI gene was assigned as pET- α AI.

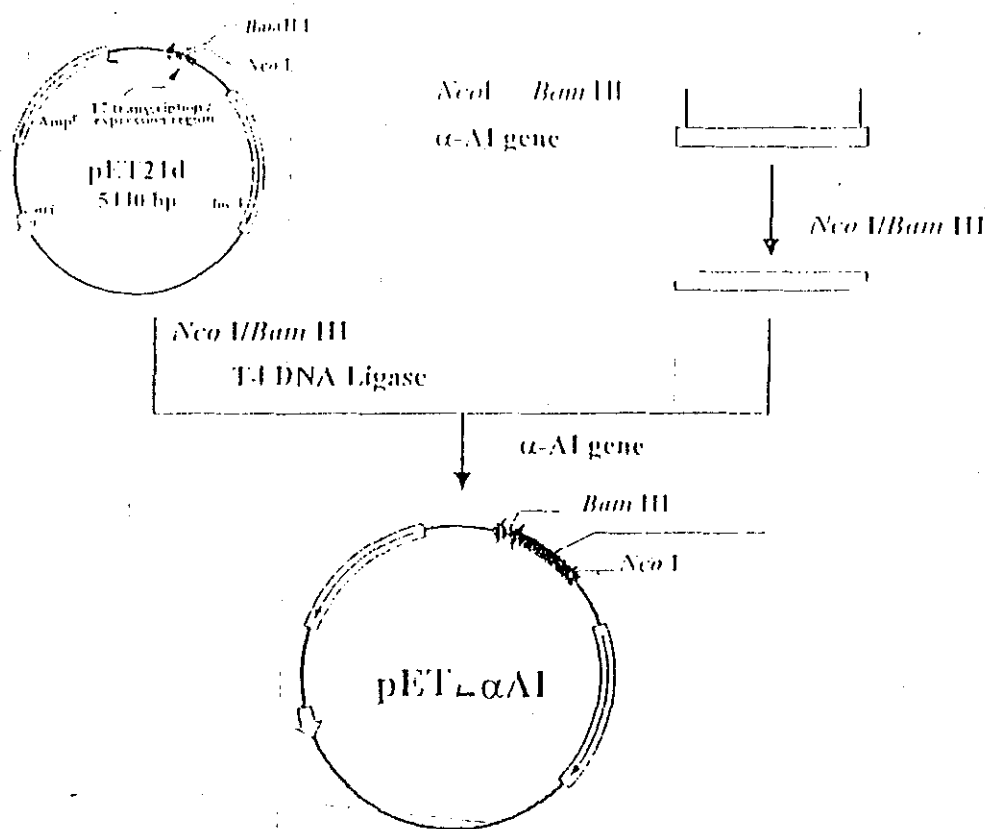


Figure 1. Construction of the expression vector for α -AI gene

III. RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and purification of total DNA

Total genomic DNA was extracted according to protocol as described in "Materials and methods". The result of DNA isolation was checked by electrophoresis on 0.8% agarose gel (Figure 2). Figure 2 showed that in lane 2 and 4 there were strong bands of about 21.2 kb. However, the extract still contained RNA and other contaminants. To remove RNA from total DNA extract, the sample was treated with

RNase (25µg/ml) at 37°C for 1 hour. The result DNA shown in lane 2 and 5 were completely eliminate of RNA smearing. Thus, obtained total DNA was intact, pure and qualified for the following experiment

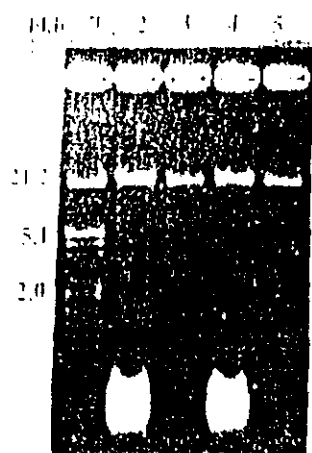


Figure 2. Total genomic DNA

Lane 1. DNA marker (Eco RI + Hind III/λ DNA)
 Lane 2. Total genomic DNA of brown common bean;
 Lane 3. Total genomic DNA of brown common bean without RNA; Lane 4. Total genomic DNA of white common bean. Lane 5. Total genomic DNA of white common bean without RNA

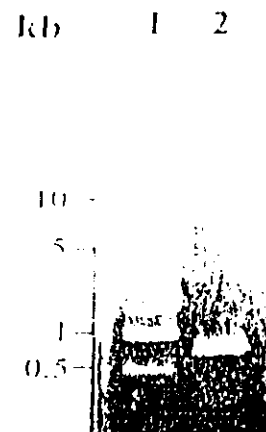


Figure 3. PCR product

Lane 1: 100 bpladder
 Lane 2: PCR product of α-AI gene from white common bean.

Amplification of the gene coding for α-AI from total DNA by PCR technique.

The specific primer pairs for α-AI gene were designed and synthesized to amplify the gene coding for α-AI from total DNA of common bean (*Phaseolus vulgaris*). The pair of primers was assigned as AIF/AIR:

AIF : 5'-GGC CAT GGC TTC CTC CAA CTT AC -3'
 AIR : 5'-GCG GAT CCT AGA GGA TTT TGT TG -3'

Two restriction sites of *Nco* I and *Bam* HI were located at 5' ends of the forward and revert primer pairs, respectively. This created the initial and terminal codons for the translation.

PCR components consisted of total genomic DNA as template, Taq polymerase, Buffer for Taq, dNTPs and specific pair of primers. PCR was performed with thermocycle of 95°C - 5 min, (95°C - 1 min, 54°C - 1 min, 72°C - 80 sec) x 30 times, 72°C - 10 min and hold at 4°C.

The PCR product was examined by electrophoresis on 0.8% agarose gel (Figure 3). The electrophoresis pattern showed a strong single band. The size of α-AI gene PCR product coincided with the predicted value of α-AI gene (about 0.7 kb). This illustrated that α-AI gene have been specifically amplified.

Insertion of α-AI gene into expression vector pET21d

To express the α-AI gene in *E. coli* BL21(DE3), the studied gene needed to be introduced at the downstream of the T7 promoter in plasmid vector pET21d (Figure 1). The obtained PCR product was treated with two restriction enzymes *Nco* I and *Bam* HI. At the same time, the expression vector was also cut by the same restriction enzymes; the samples were incubated with RE at 37°C for 1 hour. The enzyme digested products were ligated together overnight at 4°C in the present of T4 DNA ligase. The product of ligation was introduced into competent *E. coli* DH5α and the result transformants was spreaded on the LB agar plate containing Amp (100 µg/ml) and incubated at 37°C overnight. There were 15 colonies grown up on the LB agar plate. In order to confirm the positive colonies (containing recombinant vectors), each colony was grown in 2 ml LB overnight then plasmid DNA was isolated according to the method of alkali lysis. The result of isolation showed in the fig 4.

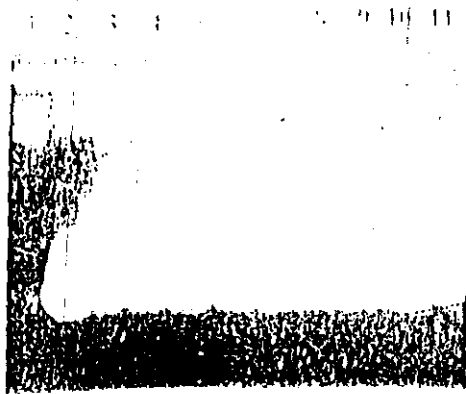


Figure 4. The electrophoresis pattern of plasmid DNA isolated from 12 colonies
Lane 1: pET21d
Lanes: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11: plasmid DNA of different colonies.

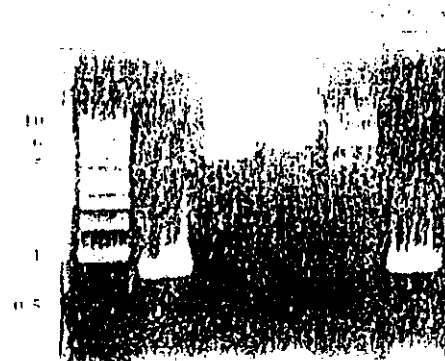


Figure 5. Checking DNA plasmid by treated with RE and amplified by PCR.
Lane 1, 1 kb DNA ladder; Lane 2, PCR product from genomic DNA; Lane 3, pET21d; Lane 4, recombinant pET21d vector (pET21d + α -AI) from clone 2; Lane 5, pET21d treated with Bam HI and Nco I; Lane 6, PCR product from recombinant pET21d vector.

The result of electrophoresis, it could be noted that all lanes showed two major bands of which the lower band was stronger. Thus, the obtained plasmid DNA was essential supercoil and quite intact. The migration of the plasmid DNA in lanes 2, 4, 5, 6, 9 and 11 were slower than in the control lane 1. While the plasmid DNA in lanes 1, 3, 7, 8, and 10 are at the same migrant speed. The plasmid DNA of clones 2, 4, 5, 6, 9 and 11 were larger than those of the control samples (pET21d). Thus, these may be the combinant plasmids (contained α -AI gene). To confirm that these plasmid DNA were treated with restriction enzymes and amplified by PCR.

Checking the positive clones by PCR and cutting with restriction enzymes

If the plasmid DNA were recombinants, two bands of 5.4 kb and 0.7 kb should be showed on the agarose gel after the recombinants were treated with restriction enzymes *Bam* HI and *Nco* I (the 0.7 kb fragment was the gene coding for α -AI). When these clones were checked by PCR with the pair of primers AII/AIR will be in the present of 0.7 kb band. The result of the treatments of the recombinants with restriction enzyme and PCR was shown on Figure 5. Clone 2 was confirmed to be positive. For further confirmation, clones 2 was examined by PCR with primer pairs AII/AIR and checking PCR products on agarose 0.8%. The PCR product showed a band of 0.7 kb. This coincided with our prediction. We could say the recombinant vector (pET21d + α -AI) have been completely cloned. These recombinant vector was used for transforming into *E. coli* BL21(DE3) in the next experiment.

Transformation of recombinant vector pET- α -AI into *E. coli* BL21(DE3)

Recombinant vector pET- α -AI was introduced into competent *E. coli* BL21(DE3) and transformants were spreaded on the LB agar plate containing Amp (100 ug/ml) and incubated overnight at 37°C. There were many single colonies grown up on the LB agar plate. Five single colonies were selected to isolate plasmid DNA. The plasmid DNA of five selected clones were larger than those of the control sample pET21d (lane 1) and migrated at the same position as original recombinant plasmid (Figure 6, lane 7). Therefore, I could be confirmed that these selected colonies carried recombinant plasmids.

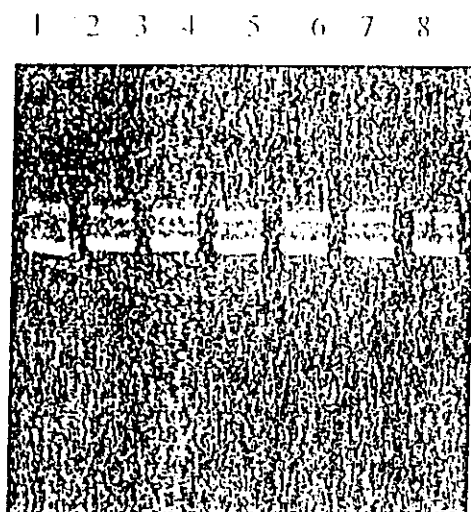


Figure 6. The electrophoresis pattern of plasmid DNA isolated from different colonies (*E. coli* BL 21).

Lane 1: pl. F21d

Lane 2, 3, 4, 5, 6: plasmid DNA from different colonies.

Lane 7: original recombinant plasmid

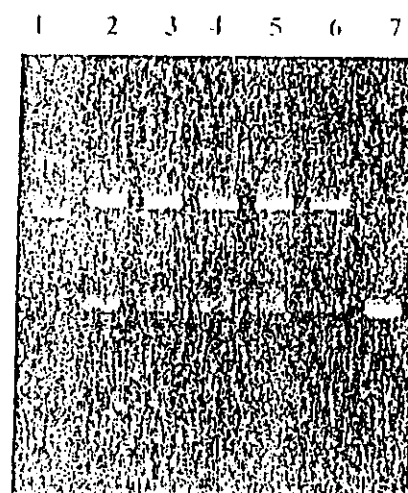


Figure 7. Checking DNA plasmid by treated with RE (Neo I + Bam III).

Lane 1: pl. F21d

Lane 2, 3, 4, 5, 6: plasmid DNA from five clones treated with RE.

Lane 7: PCR product from genomic DNA with primer pairs MF/ABR

REFERENCES

1. Awton, V and Rouge, P., (1998): Etude fonctionnelle et structurale de l'inhibiteur de l'alpha-amylase (alpha-AI) isole du haricot *Phaseolus vulgaris*. Université de Toulouse.
2. Becker, C., Shutoy, A. D., Nong Van Hai., Senyok, V. T., Jung, R., Horstmann, C., Fischer, J., Nielsen, R. C., Muntz, K., (1995). *Eur. J. Biochem.* 228: 456-462.
3. Chispeel, M., Grossi de Sa, E., Higgins, T. J. V., (1998): Genetic engineering with α -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. *Seed Science Research* 8: 257-263.
4. Okuda, M., Satoh, T., Salunai, N., Shibuya, K., Kaji, H., Samejima, T., (1997): Overexpression in *Escherichia coli* of Chemically synthesized Gene for Active 0.19 α -Amylase Inhibitor from Wheat Kernel. *J. Biochem.* 122(5):918-926.
5. Power, J. R and Whitaker, J. R., (1977): Purification and characterization of an α -amylase inhibitor from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Biochem.* 1:239-260.
6. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, E., (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory
7. Wilson, J. D., Gilman, M., Wilkowski, J., Zoller, M., (1992): *Recombinant DNA*. W. H. Freeman and company, New York. 626 pp.
8. Weaver, R. F., (2002): *Molecular Biology*. The McGraw-Hill companies, Inc. 859pp.

Sept 20-22, 2002

Organized by :

Society for Biochemistry and Molecular Biology, Taipei
Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica

Co-Organized by :

Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica
Institute of Molecular Biology, Academia Sinica
Institute of Zoology, Academia Sinica

Sponsored by :

Academia Sinica
National Science Council
FAOBMB
IUBMB

FAOBMB

Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists Inc

16th FAOBMB Symposium Committee

c/o Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica

128, Academia Road Sec 2, Nankang, Taipei 11529, Taiwan

Fax : +886 2 2788 9759 Tel : +886 2 2785 5696

Program Book

From genes to proteins :
Frontiers in Biochemistry and Molecular Biology

Sept 20-22, 2002
FAOBMB Symposium
Taipei

- 09:40 IL15: Rho GTPase Signaling Pathways: Involvement of Specific S/T Kinases and Phosphatases in Cytoskeletal Reorganization
Thomas Leung, Glaxo-IMCB Group, Singapore
- 10:20 Coffee Break
- 10:35 IL16: DAPK Induces Apoptosis by Regulating Cytoskeletal Organization and Integrin Activity
Ruey-Hwa Chen, National Taiwan University, Taipei
- 11:15 OP19: Putative Inhibitory Role of Abl-Abi Interaction on Cdc2 Activity.
Tzu-Yang Lin, National Tsing-Hua University, Hsinchu
- 11:30 OP20: Nopp140 is a Mediator of the protein kinase A Signaling Pathway that Activates the Acute Phase Response α 1-Acid Glycoprotein Gene.
Chi-Ming Chiu, National Taiwan University, Taipei
- 11:45 OP21: Glycosylation of an α -Helical Hairpin Peptide: A Model System for Studying the Possible Role of Glycosylation in Signal Transduction.
Fu-Cheng Liang, Academia Sinica, Taipei

Sept 22, Sunday, 2:00 pm - 5:00 pm, IBMS

Chair: Jei-Fu Shaw, Academia Sinica, Taipei

- 14:00 IL17: Interaction of Chromatin, Transcription Factors and Negative Regulators in Spatial Control of Phaseolin Expression.
Timothy Hall, Texas A&M University, College Station
- 14:30 IL18: Molecular Responses to Drought, Salt and Cold Stress in Plants
Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Ibaraki
- 15:00 OP22: Trypsin Inhibitors (Tis) from *Momordica cochinchinensis* seeds
Pham Thi Tran Chau, Vietnam National University, Hanoi

- 15:20 Coffee Break
- 15:40 IL19: The Application of Proteomics to Provide a Practical Assessment of Grain Quality
Bradley J. Walsh, Macquarie University, Harbord
- 16:10 OP23: Basic Luciferase Reporter Proteins Mediate Sugar Regulation of α Amy3 Gene Expression
Yi Ching Lee, Academia Sinica, Taipei
- 16:25 OP24: cDNA Cloning and Expression Analysis of psr12 Gene, Encoding an Acid Phosphatase
Kasra Esfahani, NRCGEB, Tehran
- 16:40 OP25: Biochemistry and Biotechnology of *Candida rugosa* Lipase.
Guan-Chiun Lee, Academia Sinica, Taipei

B3. Structural Biology: Protein Folding and Biomolecular Interactions

Sept 22, Sunday, 2:00 pm - 5:00 pm, IBC

Chair: Shan-Ho Chou, National Chung-Hsing University, Taichung

- 14:00 IL20: mdr-ABC Transporter Homolog MsbA
Geoffrey Chang, Scripps Research Institute, La Jolla
- 14:30 IL21: Identification and Characterization of Novel Catalytic Triad in a New Serine Hydrolase Family.
Byung-Ha Oh, Pohang University of Science and Technology, Pohang
- 15:00 OP26: Protein Folding by Quasi-static-like Process - A First Order State Transition
Chia-Ching Chang, National Dong Hwa University, Hualien
- 15:20 Coffee Break
- 15:40 IL22: Proteins: Design and Disease.
Lynne Regan, Yale University, New Haven
- 16:10 OP27: Hydrophobic Domains of Human Tropoelastin Interact in a Context-Dependent Manner.
Prachumpom Toonkool, Kasetsart University, Bangkok

P033

Trypsin Inhibitors (TIs) from *Momordica cochinchinensis* Seeds

Pham thi Tran Chau* ¹, Le nguyen Dung², Laurent Chiche²

¹*Vietnam National University, Hanoi, Vietnam.*

²*CNRS - INSERM. Universite' Montpellier I*

Momordica cochinchinensis (MCo) belonging to Cucurbitaceae family. MCo seeds were found to be the TIs-richest source.

In this report a summary of our study on TIs from MCo seeds will be presented.

- 1) Qualitative and quantitative change in **TIs** during seed formation: Using PAGE containing casein showed that TI bands could be detected in seeds at day 25th after flowering (aff.). The major TI(s) of the lowest Mr in the mature seeds were also existed in the 25th day seeds. Trypsin inhibitor activity (TIA) per dry substances of the seeds was strongly increased to day 70-80th aff. , then slowly changed.
- 2) Molecular structure of MCoTIs: three TIs from the dormant seeds of MCo were sequenced namely MCoTI-I, -II and -III. The first two TIs contain 34 amino acid residues with 3 disulfide bridges, cyclic polypeptide backbone. They are the 1st known macrocyclic squash TIs, forming a new family for cyclic "knottins". MCoTI-III is the minor inhibitor, containing 30 amino acid residues with Mr of 3379.6 and possesses a linear backbone with a blocked N-terminus.
- 3) In the 25th day seed extract there exist the TIA peaks fractionated on MonoS column corresponding to the MCoTI-II and -III of the mature seeds. However in 25th day seeds the TIA peak corresponding to MCoTI-III is the major one.
- 4) The crude preparation of MCoTIs (Momosertatin) inhibits the growth and development of *S.litura* and *P.xylostela* 2nd and 3rd instar larvae. Momosertatin (Mo) also inhibits the growth of various G⁺ and G⁻ bacteria, including those isolated from burn wound pus. Using Mo to treat an artificial inflamed burn wound made on rabbits, obtained a good effect.

Co-authors: Jean-Francois Hernandez, Annie Heitz, Jean gagnon, Jean-pier-Andrieu, Thai T. H, Mai N. T, Ha P.T, Uyen N.Q, Quang L.T, Tan T.Q, Viet H.T, Pha T.D, Tuan P.A, Cu L.T.

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC - CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

BỘ MÔN CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM - CÔNG NGHỆ SAU THU HOẠCH

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

ĐỀ TÀI:

**THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN CHẤT KÌM HÃM α -AMYLASE
TỪ ĐẬU CÔ VE (*PHASEOLUS VULGARIS*) ĐỂ SỬ DỤNG
TRONG BẢO QUẢN SAU THU HOẠCH**

Sinh viên : Phạm Ái Nhi

Lớp: Lương thực thực phẩm k41

Cán bộ hướng dẫn:

PGS.TS. Đặng Thị Thu

TS. Nông Văn Hải

TS. Nguyễn Thị Xuân Sâm

Hà nội, 5 - 2001

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN
KHOA SINH HỌC

Nguyễn Thị Bích Hậu

TỔNG HỢP NHÂN TẠO GEN MÃ HÓA CHO
PROTEIN ỨNG CHẾ TRYPSIN Ở BÍ NGÔ
(*CURCUBITA MAXIMA*)

KHOA LUẬN TỐT NGHIỆP
HỆ ĐÀO TẠO CỬ NHÂN KHOA HỌC TÀI NĂNG
Ngành Sinh học

Cán bộ hướng dẫn: TS. Võ Thị Thương Lan
GS.TSKH. Phạm Thị Trân Châu

Hà Nội - 2002

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TSKH. Phạm Thị Trần Châu - người thầy đã tạo dựng trong tôi những ý tưởng khoa học đầu tiên và hết lòng giúp đỡ tôi trong suốt quá trình hoàn thành luận văn.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Võ Thị Thượng Lan, Bộ môn Lý sinh - Tế bào và Mô phổi học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Hà Nội - người đã truyền thụ cho tôi niềm đam mê khoa học và trực tiếp dìu dắt, hướng dẫn tôi trong suốt quá trình làm luận văn.

Trong thời gian học tập và nghiên cứu vừa qua, tôi đã nhận được sự giúp đỡ, động viên, tạo điều kiện thuận lợi của CN. Nguyễn Quỳnh Uyên và tập thể các anh chị phòng Công nghệ Enzim-Protein, Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Nhân dịp này, tôi xin chân thành cảm ơn những sự giúp đỡ quý báu đó.

Tôi cũng xin được bày tỏ lời cảm ơn đến gia đình và bạn bè, những người đã luôn động viên và góp ý cho tôi trong suốt thời gian học tập và nghiên cứu.

Hà Nội ngày 20 tháng 5 năm 2002.

Nguyễn Thị Bích Hậu

MỤC LỤC

Mở đầu	1
Chương 1 Tổng quan tài liệu	2
1.1 Đại cương về PPI	2
1.1.1. Một số tính chất, cơ chế hoạt động và cấu trúc phân tử của PPI	3
1.1.2. Ứng dụng của PPI	4
1.2. Đại cương về TI ở họ bầu bí	4
1.2.1. Cấu trúc và tính chất của các TI họ bầu bí	5
1.2.2. Cấu trúc bậc một và cấu trúc không gian của CMTI-V	7
1.3. Cấu trúc của vector pUC19	9
Chương 2 Đối tượng và phương pháp nghiên cứu	9
2.1. Đối tượng	9
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu	9
2.1.2. Hoá chất	9
2.1.3. Thiết bị	9
2.2. Phương pháp	9
2.2.1. Tách chiết ADN genome từ lá bí ngô theo phương pháp của Trần Hữu Quang và cộng sự	9
2.2.2. Tách chiết ADN genome từ lá bí ngô theo phương pháp của Yao-Guang Liu và cộng sự	10
2.2.3. Phản ứng PCR	10
2.2.4. Điện di ADN trên gel agaroz	11
2.2.5. Tinh sạch sản phẩm PCR	11
2.2.6. Chuẩn bị vector và gen cần đưa vào vector (insert)	11

2.2.7. Biến nạp vector vào <i>E.Coli</i>	12
2.2.8. Tách chiết ADN plasmid từ <i>E.Coli</i> theo phương pháp của Sambrook và cộng sự.	13
2.2.9. Định lượng ADN trong mẫu	13
Chương 3 Kết quả và thảo luận	14
3.1. Kết quả tách chiết ADN tổng số từ lá bí ngô	14
3.2. Kết quả nhân gen sử dụng cặp mồi CMTI với khuôn là genome bí ngô	15
3.3. Kết quả tổng hợp nhân tạo gen mã cho CMTI-V dựa trên bốn đoạn mồi gối nhau	17
3.4. Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR tổng hợp nhân tạo gen mã cho CMTI-V qua màng recochip	20
3.5. Kết quả biến nạp sản phẩm PCR tương ứng với gen mã cho CMTI-V vào tế bào vi khuẩn DH5 α	21
3.6. Kiểm tra sản phẩm biến nạp bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi CMTI với khuôn là plasmid tái tổ hợp	22
Chương 4 Kết luận và kiến nghị	24
Tài liệu tham khảo	25

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC-CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
BỘ MÔN HOÁ SINH-SINH HỌC PHÂN TỬ

PHẠM MINH THU

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

Đề tài:

BIỂU HIỆN GEN MÃ HOÁ PROTEIN BẤT HOẠT RIBOSOM
CỦA CÂY MƯỚP ĐĂNG Ở VI KHUẨN *Escherichia coli*

NGÀNH CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn:

TS. Nông Văn Hải

PGS.TS. Đặng Thị Thu

HÀ NỘI, 5-2003

MỤC LỤC

PHẦN 1. MỞ ĐẦU	1
PHẦN 2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
2.1. Protein bất hoạt ribosom (RIP) ở thực vật	3
2.1.1. Đại cương về RIP	3
2.1.1.1. Khái niệm	3
2.1.1.2. Sự phân bố của RIP trong giới thực vật	3
2.1.1.3. Cấu trúc phân tử và đặc tính lý hoá	4
2.1.2. Hoạt tính sinh học của RIP	7
2.1.2.1. Tác động lên ribosom	7
2.1.2.2. Tương tác với tế bào	8
2.1.2.3. Hoạt tính kháng nấm và côn trùng	10
2.1.3. Protein bất hoạt ribosom ở cây mướp đắng	10
2.1.3.1. Đặc điểm sinh học của cây mướp đắng	10
2.1.3.2. RIP ở mướp đắng	11
2.2. Biểu hiện protein tái tổ hợp ở vi khuẩn <i>E. coli</i>	12
2.2.1. Vectơ biểu hiện mang promoter cảm ứng IPTG	13
2.2.2. Vectơ biểu hiện mang promoter thực khuẩn T7	14
PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
3.1. Nguyên liệu	15
3.2. Phương pháp nghiên cứu	16
3.2.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số	16
3.2.2. Phương pháp điện di trên gel agarosa	16
3.2.3. Nhân gen RIP bằng phương pháp PCR	17
3.2.4. Gắn đoạn gen RIP vào vectơ	18
3.2.4.1. Xử lý sản phẩm PCR bằng enzym giới hạn	18
3.2.4.2. Phản ứng mở vòng vectơ	18

3.2.4.3. Tách tinh sạch đoạn gen từ gel agarosa	19
3.2.4.4. Phản ứng nối ghép gen	20
3.2.5. Biến nạp vào <i>E. coli</i>	20
3.2.5.1. Chuẩn bị tế bào khả biến	20
3.2.5.2. Biến nạp bằng phương pháp sốc nhiệt	21
3.2.6. Tách chiết ADN plasmid lượng nhỏ	21
3.2.7. Xử lý ADN plasmid bằng enzym giới hạn	22
3.2.8. Biểu hiện protein tái tổ hợp ở <i>E. coli</i>	22
3.2.9. Điện di protein trên gel polyacrylamit (SDS-PAGE)	23
PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	24
4.1. Tách chiết và tinh sạch ADN tổng số	25
4.2. Nhân đoạn gen RIP bằng phương pháp PCR	27
4.3. Chọn dòng gen RIP trong vectơ pET- 21d(+)	30
4.3.1. Tách tinh sạch đoạn gen từ gel agarosa	31
4.3.2. Kết quả chọn dòng plasmid	32
4.3.3. Kiểm tra vectơ mang gen RIP bằng enzym giới hạn và phản ứng PCR	33
4.4. Biểu hiện protein tái tổ hợp ở <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	35
PHẦN 5. KẾT LUẬN	38
Tài liệu tham khảo	39

PHẦN II: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- 2.2.1. Nuôi cấy và lưu giữ các chủng vi khuẩn
- 2.2.2. Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid
- 2.2.3. Thiết kế và tổng hợp các đoạn mồi
- 2.2.4. Nhãn gen bằng kỹ thuật PCR
- 2.2.5. Xử lý DNA bằng enzyme hạn chế
- 2.2.6. Điện di DNA trên gel agarose
- 2.2.7. Loại bỏ nhóm 5' phosphate của vector
- 2.2.8. Gắn nối các đoạn DNA
- 2.2.9. Chuẩn bị tế bào khả biến
- 2.2.10. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào vi khuẩn

PHẦN III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

- 3.1. Thiết kế vector trung gian
- 3.2. Nhân đoạn gen mã hoá RIP
- 3.3. Thiết kế vector Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hoá RIP
- 3.4. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các Ti-plasmid tái tổ hợp
- 3.5. Kiểm tra chiều gắn của gen RIP trong Ti-plasmid tái tổ hợp
- 3.6. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmid tái tổ hợp

TẠO CHỦNG VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MANG
GEN MÃ HÓA PROTEIN BẤT HOẠT RIBOSOME (RIP) TỪ CÂY MƯỚP ĐẮNG
(*MOMORDICA CHARANTIA* L.) ĐỂ CHUYỂN VÀO CÂY TRỒNG

PHẦN I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Vi khuẩn đất *Agrobacterium* và phương pháp chuyển gen thực vật

1.1.1. Vi khuẩn đất *Agrobacterium* và hiện tượng biến nạp gen thực vật trong tự nhiên

*1.1.1.1. Vi khuẩn *Agrobacterium**

1.1.1.2. Cấu trúc và chức năng của Ti-plasmid

1.1.1.3. Cấu trúc, chức năng của đoạn ADN chuyển (T-ADN)

1.1.1.4. Quá trình chuyển T-ADN vào tế bào thực vật

1.1.2. Kỹ thuật chuyển gen nhờ *Agrobacterium*

1.1.2.1. Khái niệm chung

1.1.2.2. Các loại vector Ti-plasmid nhân tạo

1.1.2.3. Vector liên hợp

1.1.2.4. Vector hai nguồn

*1.1.2.5. Thành tựu chuyển gen vào cây trồng nhờ phương pháp *Agrobacterium**

1.2. Protein bất hoạt ribosom (RIP) ở thực vật:

1.2.1. Đại cương về RIP

1.2.2. Hoạt tính sinh học của RIP

1.2.3. RIP ở cây mướp đắng

PHẦN II: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- 2.2.1. Nuôi cấy và lưu giữ các chủng vi khuẩn
- 2.2.2. Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid
- 2.2.3. Thiết kế và tổng hợp các đoạn mồi
- 2.2.4. Nhân gen bằng kỹ thuật PCR
- 2.2.5. Xử lý DNA bằng enzyme hạn chế
- 2.2.6. Điện di DNA trên gel agarose
- 2.2.7. Loại bỏ nhóm 5' phosphate của vector
- 2.2.8. Gắn nối các đoạn DNA
- 2.2.9. Chuẩn bị tế bào khả biến
- 2.2.10. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào vi khuẩn

PHẦN III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

- 3.1. Thiết kế vector trung gian
- 3.2. Nhân đoạn gen mã hoá RIP
- 3.3. Thiết kế vector Ti-plasmid tái tổ hợp mang gen mã hoá RIP
- 3.4. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các Ti-plasmid tái tổ hợp
- 3.5. Kiểm tra chiều gắn của gen RIP trong Ti-plasmid tái tổ hợp
- 3.6. Tạo chủng *A. tumefaciens* mang Ti-plasmid tái tổ hợp

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI

ĐÀO THỊ HỒNG VÂN

TỐI ƯU HOÁ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY VÀ MỘT SỐ ĐẶC
TÍNH CỦA PROTEIN KÌM HÃM α -AMYLASE TỪ VI
KHUẨN *E.coli* BL21(DE3)

CHUYÊN NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

LUẬN VĂN THẠC SỸ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
PGS.TS. ĐẶNG THỊ THU

HÀ NỘI - 2004

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

GIANG THỊ HƯƠNG HUYỀN

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

NGÀNH: CÔNG NGHỆ SINH HỌC

BIỂU HIỆN VÀ TINH CHẾ PROTEIN LAI
ATF-TBK Ở VI KHUẨN *Escherichia coli*

Cán bộ hướng dẫn : TS. Phan Văn Chi

PGS. TS. Đặng Thị Thu

Kính tặng cô Thu

học trò GHZ

Giang Thị Hương Huyền

HÀ NỘI, THÁNG 5-2003

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương I- TỔNG QUAN	2
1.1. Đại cương về các protein bất hoạt ribosome (RIPs)	2
1.1.1. Khái niệm, sự phân bố của RIPs	2
1.1.2. Phân loại và cấu trúc của RIPs.....	3
1.2. Độc tố miễn dịch (Immunotoxin-Its)	4
1.2.1. Khái niệm và cấu tạo ITs	4
1.2.2. Cơ chế tác động của ITs	7
1.2.3. Một số ứng dụng.....	8
1.2.3.1. Điều trị bệnh ung thư.....	8
1.2.3.2. Điều trị một số bệnh về miễn dịch.....	8
1.2.3.3. Kháng HIV.....	9
1.3. Hệ vector biểu hiện puPA-TBK	11
1.3.1. Vai trò của T7-ARN polymerase.....	11
1.3.2. Vector biểu hiện pET 21d(+).....	11
1.3.3. Chủng biểu hiện <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	13
Chương II- VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	15
2.1. Vật liệu	15
2.1.1. Nguyên liệu.....	15
2.1.2. Hoá chất.....	15
2.1.3. Trang thiết bị.....	16
2.2. Phương pháp nghiên cứu	17
2.2.1. Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào vi khuẩn <i>E. coli</i>	17
2.2.2. Tách chiết ADN plasmid từ <i>E. coli</i>	18

2.2.3. Phản ứng cắt kiểm tra gen.....	19
2.2.4. Điện di ADN trên gel agarose.....	20
2.2.5. Biểu hiện ATF-TBK trong <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	21
2.2.6. Điện di biến tính SDS-PAGE.....	22
2.2.7. Sắc ký trao đổi ion trên hệ FPLC.....	23
2.2.8. Western-Blotting.....	24
Chương III- KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	26
Sơ đồ tóm tắt quá trình thí nghiệm.....	26
3.1. Kết quả phân tích plasmid tái tổ hợp.....	27
3.1.1. Biến nạp vector biểu hiện puPA-TBK vào tế bào <i>E. coli</i> và tách ADN plasmid.....	27
3.1.2. Kiểm tra ADN plasmid.....	28
3.2. Biểu hiện ATF-TBK.....	29
3.2.1. Sự tích lũy protein ATF-TBK ở <i>E. coli</i>	29
3.2.2. Khảo sát tính tan và ảnh hưởng của nhiệt độ	31
Sơ đồ tối ưu hoá quá trình biểu hiện protein lai ATF-TBK ở <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	33
3.3. Tinh chế protein tái tổ hợp.....	34
3.4. Western-Blotting.....	36
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	37
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	38
A- Phần tiếng Việt.....	38
B- Phần tiếng Anh.....	38

BẢNG CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ADN	Acid Deoxyribonucleic
Amp ^r	Ampicillin
ATF	Amino Terminal Fragment (đoạn đầu của phân tử urokinase plasminogen activator)
ATF-TBK	Amino Terminal Fragment-TrichoBaKin (độc tố miễn dịch được tạo bởi hai thành phần là ATF: tác nhân hướng đích và TBK: thành phần độc tố)
bp	base pair (cặp bazơ nitơ)
CD	Cluster of differentiation (nhóm biệt hoá)
DT	Diphtheria toxin
EF	Elongation Factor (yếu tố kéo dài)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtBr	Ethidium bromide
GVHD	Graft-versus-host disease (Phản ứng mô ghép chống lại túc chủ)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Virus gây suy giảm miễn dịch ở người)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
ITs	Immunotoxins (các độc tố miễn dịch)
kDa	kilodalton
MoAb	Monoclonal Antibody (kháng thể đơn dòng)
OD	Optical density (mật độ quang học)
PE	<i>Pseudomonas</i> exotoxin
pET	Plasmid for expression by T7-ARN polymease (plasmid dùng để biểu hiện dựa trên hoạt động của enzyme T7-ARN polymerase)

puPA-TBK	Plasmide of amino terminal fragment-Trichobakin (plasmid mang gen mã hoá cho độc tố miễn dịch ATF-TBK)
rARN	Acid Ribonucleic của ribosome
RIPs	Ribosome inactivating proteins (nhóm protein bất hoạt ribosome)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (điện di biến tính nhờ SDS trên gel polyacrylamid)
TBK	Trichobakin (độc tố được tách chiết từ cây <i>Trichosanthes</i> sp. Bac Kan 8-98', thuộc nhóm protein bất hoạt ribosome)
TBS	Tris Buffered Saline
TTBS	Tris Buffered Saline + Tween-20
uPA	urokinase plasminogen activator (chất hoạt hoá plasminogen)
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor (thụ thể bề mặt của uPA)

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1-Cấu trúc phân tử của RIPs.....	4
Hình 2-Độc tố miễn dịch với tác nhân hướng đích là kháng thể hai thành phần.....	7
Hình 3-Cơ chế tác động bằng con đường ức chế tổng hợp protein của ITs.....	8
Hình 4-Sơ đồ cấu trúc vector pET-21d(+).	12
Hình 5-Cơ chế cảm ứng biểu hiện protein lai ở <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	14
Hình 6-Vector biểu hiện puPA-TBK.....	15
Hình 7-Sơ đồ tóm tắt quy trình thí nghiệm.....	26
Hình 8-Kết quả phân tích phân tích vector tái tổ hợp puPA-TBK.....	28
Hình 9-Sự tích lũy độc tố miễn dịch ATF-TBK ở tế bào <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS.....	30
Hình 10-Ảnh hưởng của nhiệt độ đến độ tan của protein lai ATF-TBK..	32
Hình 11-Sơ đồ tối ưu hoá quá trình biểu hiện protein lai ATF-TBK ở vi khuẩn <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	33
Hình 12-Phổ sắc ký tinh chế ATF-TBK từ cột CM-Sepharose (XK16/20) trên hệ FPLC.....	34
Hình 13-Tinh chế ATF-TBK.....	35
A-Phổ điện di SDS-PAGE (12,5% acrylamide) của các phân đoạn thu được qua sắc ký trao đổi ion.....	35
B-Kết quả Western-Blotting.....	35

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1- Một số độc tố được sử dụng để thiết kế ITs.....	5
Bảng 2- Một số tác nhân hướng đích thường dùng.....	6
Bảng 3- Kết quả điều trị lâm sàng ở người khi sử dụng phương pháp điều trị bằng ITs.....	10
Bảng 4- Thành phần của phản ứng xử lý enzyme giới hạn.....	20
Bảng 5- Thành phần đồ gel polyacrylamid.....	23

LỜI CẢM ƠN

Trong thời gian làm đồ án tốt nghiệp vừa qua, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, hướng dẫn quý báu của các thầy cô, các anh chị trong và ngoài phòng thí nghiệm, tôi xin được bày tỏ lời cảm ơn đến những sự giúp đỡ quý báu đó.

Tôi xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Phan Văn Chi, trưởng phòng Hoá Sinh- Protein, Viện Công nghệ Sinh học, Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia; PGS.TS. Đặng Thị Thu, Viện phó viện Công nghệ Sinh học, trường Đại học Bách Khoa Hà Nội- những người thầy đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các cô, chú, anh chị ở phòng Hoá sinh- Protein, Viện công nghệ Sinh học, FTKHTN & MQG, đặc biệt là anh Hà Văn Huân đã tận tình giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong thời gian làm đồ án tốt nghiệp.

Tôi cũng xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thầy, cô, gia đình và bạn bè những người đã động viên và ủng hộ tôi trong suốt thời gian vừa qua.

Một lần nữa, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới tất cả sự giúp đỡ quý báu trên.

Sinh viên

Giang Thị Hương Huyền

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI**

.....

Trình Tất Cường

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ TÍNH CHẾ
MINI-TRICHOBAKIN**

Chuyên ngành : Công nghệ Sinh học

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

TS. Phan Văn Chi

PGS.TS.Đặng Thị Thu

HÀ NỘI - 2003

MỤC LỤC

	Trang
Mở đầu.....	1
Chương 1: TỔNG QUAN	
1.1. Đại cương về protein bất hoạt ribosom.....	3
1.1.1. Khái niệm	3
1.1.2. Phân bố	4
1.1.3. Phân loại, cấu trúc, cơ chế	5
1.1.4. Đặc tính hoá lý	13
1.1.5. Đặc tính sinh học phân tử	14
1.2. Trichobakin	15
1.2.1. Gen mã hoá cho trichobakin	15
1.2.2. Hoạt tính sinh học của trichobakin	18
1.3. Một số ứng dụng của protein bất hoạt ribosom.....	19
1.3.1. Tác động của các protein bất hoạt ribosom tới động vật thí nghiệm và người	19
1.3.2. Ức chế sự phát triển tế bào ung thư	21
1.3.3. Gây sảy thai.....	22
1.3.4. Kháng HIV	22
1.4. Mini-Trichobakin.....	23
 Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	
2.1. Đối tượng nghiên cứu	25
2.2. Vật liệu, thiết bị	25
2.3. Phương pháp.....	27

2.3.1. Nhân gen mã hoá <i>mini-tbk</i> bằng kỹ thuật PCR.....	27
2.3.2. Tách dòng gen mã hoá <i>mini-tbk</i>	28
2.3.3. Biến nạp ADN plasmid vào <i>E.coli</i> bằng phương pháp sốc nhiệt...	29
2.3.4. Tách chiết ADN plasmid từ <i>E.coli</i>	29
2.3.5. Điện di ADN trên gel agarose.....	30
2.3.6. Tách chiết ADN ra khỏi gel điện di agarose sử dụng Kit QIAquick Gel extracti.....	31
2.3.7. Xác định trình tự gen bằng máy phân tích trình tự gen tự động....	32
2.3.8. Thiết kế vectơ biểu hiện gen mã hóa <i>mini-tbk</i>	32
2.3.9. Biểu hiện protein tái tổ hợp <i>mini-tbk</i> ở <i>E.coli</i>	34
2.3.10. Phân tích protein bằng kỹ thuật điện di biến tính trên gel polyacrylamid (SDS-PAGE).....	34
2.3.11. Kỹ thuật Western blot	35
2.3.12. Sắc ký trao đổi ion trên hệ FPLC.....	36
2.3.13. Xác định <i>mini-tbk</i> bằng phương pháp khối phổ với nguồn MALDI.....	37

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Gen mã hóa cho <i>mini-tbk</i>	39
3.1.1. Nhân gen mã hoá cho <i>mini-trichobakin</i> bằng kỹ thuật PCR.....	39
3.1.2. Tách dòng gen mã hoá <i>mini-tbk</i>	40
3.1.3. Trình tự gen mã hoá cho <i>mini-tbk</i>	45
3.1.4. Độ tương đồng của <i>mini-tbk</i> và trichobakin.....	48
3.2. Vectơ biểu hiện <i>mini-tbk</i>	50
3.3. Biểu hiện <i>mini-tbk</i> tái tổ hợp ở <i>E.coli</i>	53
3.3.1. Biểu hiện <i>mini-tbk</i> tái tổ hợp ở <i>E.coli</i>	53
3.3.2. Kiểm tra <i>mini-tbk</i> bằng phản ứng Western-blotting	

với kháng thể kháng Trichobakin.....	55
3.3.3. Khảo sát tính tan của mini-trichobakin tái tổ hợp.....	57
3.4. Tinh chế <i>mini-tbk</i>	59
3.5. Nhận dạng và xác định <i>mini-tbk</i>	63
 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	68
Kết luận	68
Kiến nghị.....	68
 TÀI LIỆU THAM KHẢO	69
A- Phần tiếng Việt.....	69
B- Phần tiếng Anh.....	70

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin chân thành bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Phan Văn Chi, Phó viện trưởng, Trưởng Phòng Hóa sinh protein - Viện Công nghệ Sinh học và PGS. TS. Đặng Thị Thu Phó viện trưởng - Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, đã tận tình dìu dắt, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Trong thời gian học tập và nghiên cứu, tôi đã nhận được sự hướng dẫn, chỉ bảo tận tình của CN.Đặng Thành Nam và tập thể cán bộ nghiên cứu Phòng Hóa sinh protein - Viện Công nghệ Sinh học, cùng các thầy cô giáo trong Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội, tôi xin chân thành cảm ơn những sự giúp đỡ quý báu đó.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lời cảm ơn đến bạn bè, người thân và đồng nghiệp đã luôn động viên, góp ý cho tôi trong suốt thời gian học tập và hoàn thành luận văn.

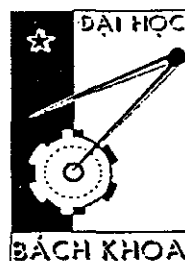
Hà Nội, tháng 10 năm 2003

Tác giả

Trịnh Tất Cường

TRƯỜNG ĐẠI HỌC BÁCH KHOA HÀ NỘI
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC VÀ CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM

--00000--



Nông Văn Hải
Dr. rer. nat.

ĐỒ ÁN TỐT NGHIỆP

Đề tài

Tạo chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*
mang gen mã hoá protein bất hoạt ribosome (RIP)
từ cây mướp đắng để chuyển vào cây trồng

Sinh viên : Đào Minh Châu

Lớp : CN Sinh học - K45

Gv. hướng dẫn : PGS.TS. Nông Văn Hải
PGS.TS. Đặng Thị Thu

HÀ NỘI, 5-2005

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS. TS. Nông Văn Hải**, Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam và **PGS. TS. Đặng Thị Thu**, Phòng Hoá Sinh và Sinh học Phân tử - Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm - Trường Đại học Bách khoa Hà Nội đã tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong quá trình hoàn thành bản đồ án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn **GS. TSKH. Phạm Thị Trân Châu** - Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, đồng thời là Chủ nhiệm Đề tài cấp Nhà nước **KC. 04-14** đã tạo điều kiện cho tôi thực hiện khóa luận trong khuôn khổ của Đề tài.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các anh chị trong Phòng Công nghệ ADN ứng dụng - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đặc biệt là **TS. Lê Thị Thu Hiền** đã tận tình giúp đỡ tôi rất nhiều trong lý thuyết cũng như thực nghiệm.

Tôi cũng chân thành cảm ơn gia đình, các thầy cô, các bạn đã động viên, ủng hộ tôi nhiệt tình trong thời gian học tập và nghiên cứu vừa qua.

Hà Nội, tháng 5 năm 2005

Đào Minh Châu

MỤC LỤC

	Trang
Lời mở đầu	1
PHẦN 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Phương pháp chuyển gen thực vật thông qua <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3
1.1.1. Hiện tượng biến nạp gen thực vật nhờ <i>A. tumefaciens</i> trong tự nhiên	3
1.1.2. Kỹ thuật chuyển gen bằng <i>A. tumefaciens</i>	7
1.1.2.1. Hệ thống chuyển gen nhờ <i>A. tumefaciens</i>	7
1.1.2.2. Các loại vector Ti-plasmid nhân tạo	8
1.1.3. Thành tựu chuyển gen vào cây trồng nhờ phương pháp <i>A. tumefaciens</i>	13
1.2. Protein bất hoạt ribosom (RIP)	14
1.2.1. Đại cương về RIP	14
1.2.2. Hoạt tính sinh học của RIP	17
1.2.2.1. Hoạt tính enzyme N-glycosidase	17
1.2.2.2. Hoạt tính kháng virus, kháng nấm và kháng côn trùng	18
1.2.3. RIP ở cây mướp đắng	20
PHẦN 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	22
2.1. Vật liệu và hoá chất sử dụng	22
2.1.1. Nguyên liệu	22
2.1.2. Hoá chất	23
2.1.3. Thiết bị	23

2.2. Phương pháp	23
2.2.1. Nuôi cấy và lưu giữ các chủng vi khuẩn	23
2.2.2. Tách chiết và tinh sạch DNA plasmid	24
2.2.3. Thiết kế và tổng hợp đoạn mồi	27
2.2.4. Phản ứng dây chuyền polymerase	27
2.2.5. Xử lý DNA bằng enzyme hạn chế	28
2.2.6. Điện di DNA trên gel agarose	29
2.2.7. Tinh chế DNA từ bản gel agarose	29
2.2.8. Loại bỏ nhóm 5' phosphate của vector	30
2.2.9. Ghép nối các đoạn DNA	31
2.2.10. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào vi khuẩn <i>E.coli</i>	32
2.2.11. Biến nạp DNA plasmid vào tế bào vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	33

PHẦN 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN **34**

3.1. Thiết kế vector trung gian pNOA+35S+NOS mang kết cấu 35S 2X enhancer + NOS	37
3.2. Tạo đoạn gen mã hoá RIP thích hợp để ghép nối vào vector trung gian	43
3.3. Thiết kế Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP mang gen mã hóa RIP dưới sự điều khiển của 35S 2X enhancer	45
3.4. Kiểm tra sự có mặt của gen RIP trong các Ti-plasmid tái tổ hợp bằng enzyme hạn chế	46
3.5. Kiểm tra chiều gán của gen RIP trong Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP	48

3.6. Tạo chủng <i>A. tumefaciens</i> mang Ti-plasmid tái tổ hợp pNOA+RIP	50
--	----

Kết luận và đề nghị	53
----------------------------	-----------

Tài liệu tham khảo	54
---------------------------	-----------

CÁC TỪ VIẾT TẮT

DNA	Deoxyribonucleic Acid
RNA	Ribonucleic Acid
kb	kilobase
bp	base pair
kDa	kiloDalton
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ti-plasmid	Tumour-inducing plasmid
T-DNA	Transferred-DNA
VIR	Virulence
RIP	Ribosome Inactivating Protein
CaMV35S	Cauliflower Mosaic Virus
NOS	Nopaline Synthase
PMI	PhosphoMannose Isomerase
MCS	Multi Cloning Site
EtBr	Ethidium Bromide
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
TAE	Tris-acetate EDTA
LB	Luria and Bertani medium
YEP	Yeast Extract + Peptone
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate