

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC CÔNG NGHỆ

NGUYỄN VĂN TỤNG

**TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA
CYTOCHROME P450 TỪ DNA METAGENOME
SUỐI NƯỚC NÓNG BÌNH CHÂU**

Chuyên ngành: Công nghệ nano sinh học

Mã số: Chuyên ngành đào tạo thí điểm

TÓM TẮT LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ NANO SINH HỌC

HÀ NỘI - 2017

MỞ ĐẦU

Cytochrome P450 (P450) là họ enzyme phân bố rộng rãi và đa dạng nhất nhất, đóng vai trò quan trọng trong rất nhiều con đường chuyển hóa vật chất trong cơ thể cũng như trong tự nhiên. P450 có mặt ở hầu hết các giới trong hệ thống sinh vật học, rất đa dạng về cấu trúc và chức năng, thậm chí các P450 của một loài cũng có thể có cấu trúc, chức năng và tính chất khác nhau, đặc biệt là tính đặc hiệu cơ chất. Chính vì vậy P450 được ứng dụng rộng rãi nhất trong tất cả lĩnh vực nông nghiệp, công nghiệp, môi trường, y dược...

Để đáp ứng được yêu cầu của các quy trình sản xuất một số các sản phẩm sinh học ở quy mô công nghiệp như thực hiện phản ứng ở nhiệt độ cao, trong sự có mặt của một số loại dung môi đòi hỏi các enzyme tham gia vào các quy trình này phải có tính chất đặc biệt như bền nhiệt, chịu dung môi, chịu áp... Vì vậy, việc tìm kiếm các P450 bền nhiệt mới từ tự nhiên hoặc gây đột biến định hướng để nâng cao tính bền nhiệt của các P450 đã được đặc biệt quan tâm nghiên cứu.

Các enzyme bền nhiệt thường được thu nhận từ các vùng địa nhiệt như suối nước nóng, miệng núi lửa, giàn khoan dầu khí... Một trong những lợi thế của Việt Nam là có một mạng lưới hơn ba trăm suối nước nóng vô cùng phong phú, trải dài từ Bắc tới Nam. Tuy nhiên, các nghiên cứu đánh giá về khu hệ vi sinh vật ưa nhiệt ở các suối nước nóng để có thể thấy được tiềm năng và vai trò của chúng đối với hệ sinh thái và con người còn hạn chế. Cho đến nay, những nghiên cứu về vi sinh vật ưa nhiệt và hệ enzyme của chúng đã được nghiên cứu tại Việt Nam, chủ yếu tập trung vào nhóm vi sinh vật phân lập được cũng như hệ enzyme thủy phân của chúng như amylase, protease, cellulase... Mặt khác, suối nước nóng thường có số lượng vi sinh vật rất thấp, chỉ 0,1% tổng số vi sinh vật có thể phân lập được trực tiếp bằng phương pháp truyền thống. Kỹ thuật metagenomic ra đời cho phép các nhà nghiên cứu tiếp cận sâu hơn với hệ gen của vi sinh vật không thông qua nuôi cấy. Trong những năm gần đây đã có rất nhiều công bố khai thác những gen mới, protein/enzyme mới của vi sinh vật nhờ kỹ thuật này. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi đặt mục tiêu tìm kiếm gen mới mã hóa cho cytochrome P450 từ suối nước nóng Bình Châu – một trong những suối nước nóng có nhiệt độ nóng nhất tại Việt Nam với hy vọng sẽ tìm thấy P450 bền nhiệt mới bằng kỹ thuật không nuôi cấy. Để thực hiện được mục tiêu này, chúng tôi đã thực hiện những nội dung nghiên cứu như sau:

- Thu nhận, tách chiết DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu, giải trình tự và xây dựng cơ sở dữ liệu về nhóm gen mã hóa cho P450.

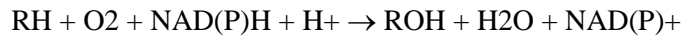
- Biểu hiện gen mã hóa P450 mới, tinh sạch và nghiên cứu một số tính chất của P450 tái tổ hợp.

- Nghiên cứu hệ thống truyền điện tử và xác định phổ cơ chất tiềm năng của enzyme thu được.

Chương 1: TỔNG QUAN

1.1. Hệ enzyme cytochrome P450

Cytochrome P450 (P450) là họ enzyme lớn nhất, đóng vai trò quan trọng trong một số con đường chuyển hóa vật chất trong cơ thể cũng như trong tự nhiên. P450 có mặt ở hầu hết các giới trong hệ thống sinh vật học: vi khuẩn, nấm, thực vật, động vật. Các P450 là các monooxygenase bên ngoài, do đó, chúng cần một chất cho điện tử để khởi động quá trình oxi hóa và hydroxyl hóa cơ chất như sơ đồ phản ứng sau:



Số lượng các gen mã hóa cho các P450 ở tất cả các loài trong hệ thống sinh vật học hiện nay là khoảng hơn 37.000 trình tự được công bố trên Ngân hàng gen và số lượng này tiếp tục được tăng lên khi các nhóm nghiên cứu tìm ra được các gen P450 mới ở các loài sinh vật khác nhau.

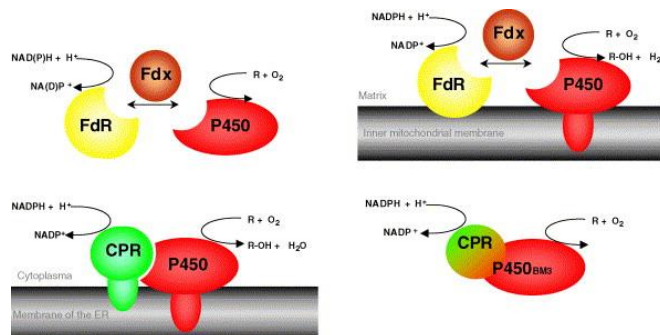
1.1.1. Hệ enzyme cytochrome P450 ở vi sinh vật

Với các đặc trưng như tốc độ phản ứng nhanh, có khả năng hòa tan và biểu hiện được trong tế bào *E. coli* nên các enzyme P450 của vi khuẩn thu hút sự quan tâm nghiên cứu của các nhóm nhà khoa học vì có thể dựa vào hệ enzyme P450 của vi khuẩn để phát triển các mô hình chuyển hóa sinh học trong tự nhiên hoặc để nghiên cứu cấu trúc và chức năng các hệ enzyme P450 của các loài eukaryote. P450 của vi sinh vật đóng vai trò quan trọng trong việc chuyển hóa các cơ chất khác nhau như sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học ứng dụng trong tái tạo môi trường, dược phẩm và nông nghiệp.

Các xạ khuẩn thường mang các gen P450 thuộc CYPome (cytochrome P450 complement) tham gia vào các quá trình sinh tổng hợp các hợp chất có hoạt tính sinh học tự nhiên ứng dụng trong y dược. Mặc dù số lượng các P450 của vi sinh vật không ngừng tăng lên, tuy nhiên các nhà khoa học dự đoán rằng rất nhiều P450 từ vi sinh vật vẫn đang tồn tại trong tự nhiên và chưa được khai thác, đặc biệt ở những vùng có hệ sinh thái môi trường cực trị mà không thể thu nhận các vi sinh vật hoặc enzyme bằng cách nuôi cấy thông thường.

1.1.2. Hệ thống truyền điện tử của P450

Vì các P450 là các monooxygenase bên ngoài, do vậy chúng cần chất cho điện tử để khởi động chuỗi truyền điện tử và chuyển hóa cơ chất. Các P450 có hệ thống truyền điện tử thuộc nhóm II đại diện cho các P450 thuộc nhóm eukaryote. Hệ thống monooxygenase của nhóm này được tìm thấy ở mạng lưới nội chất (ER) của tế bào eukaryote bao gồm hai protein liên kết màng: P450 và reductase phụ thuộc NADPH (Hình 1C). Reductase chứa cả nhóm FAD và FMN, đóng vai trò truyền điện tử từ NADPH tới một trong các isozyme của P450.



Hình 1.1: Sơ đồ một số hệ thống truyền điện tử điển hình của các nhóm P450. A) Hệ thống P450 của vi khuẩn (Nhóm Ia); B) Hệ thống P450 ty thể (Nhóm Ib); C) Hệ thống P450 tế bào (Nhóm II); D) Hệ thống tự xúc tác CYP102A1 (Nhóm VIII)

1.1.3. Hệ enzyme cytochrome P450 bền nhiệt ở vi sinh vật

Một trong số các tiêu chí đối với các enzyme triển khai ở quy mô công nghiệp là tính bền, trong đó có tính bền nhiệt. Tuy nhiên, sự không ổn định của các P450 trong các điều kiện sản xuất công nghiệp ở nhiệt độ cao, xúc tác trong sự có mặt của dung môi đã hạn chế những ứng dụng của hệ enzyme này ở quy mô sản xuất lớn. Chính vì vậy, việc tìm kiếm các P450 bền nhiệt từ tự nhiên hoặc gây đột biến định hướng để nâng cao tính bền nhiệt của các P450 đã biết đã được quan tâm nghiên cứu.

Cho đến nay, chỉ có 5 enzyme P450 bền nhiệt thu nhận từ các chủng cổ khuẩn phân lập được ngoài tự nhiên bao gồm CYP119A1, CYP119A2, CYP175A1, CYP231A2 và CYP154H1 được công bố. Từ những kết quả nghiên cứu trên Thế giới có thể thấy rằng số lượng các P450 bền nhiệt từ các nhóm vi sinh vật vẫn còn khá hạn chế mặc dù có tiềm năng ứng dụng trong công nghiệp rất lớn. Chính vì thế việc tìm kiếm, khai thác để thu nhận, nghiên cứu cấu trúc, tính chất và ứng dụng các P450 bền nhiệt mới từ tự nhiên là cần thiết và có ý nghĩa.

1.1.4. Ứng dụng của cytochrome P450

Các P450 có thể tham gia xúc tác rất nhiều loại phản ứng sinh hóa khác nhau, do đó ứng dụng của họ enzyme này rất rộng rãi. Quá trình gắn nhóm hydroxyl vào cơ chất của họ enzyme P450 thường dẫn đến việc thay đổi tính chất của cơ chất như thay đổi tính hòa tan, tính đặc hiệu và độc tính. Do vậy họ enzyme này thường được sử dụng để tổng hợp các hợp chất hữu cơ khó thu nhận bằng con đường hóa học hoặc để phân giải các chất hữu cơ khó phân hủy ngoài môi trường ô nhiễm. Bên cạnh các hợp chất steroid, các P450 của vi khuẩn cũng được sử dụng để xúc tác quá trình tổng hợp các hợp chất như axit epoxyeicosatrienoic, leukotoxin B và các epoxide eicosanoid khác

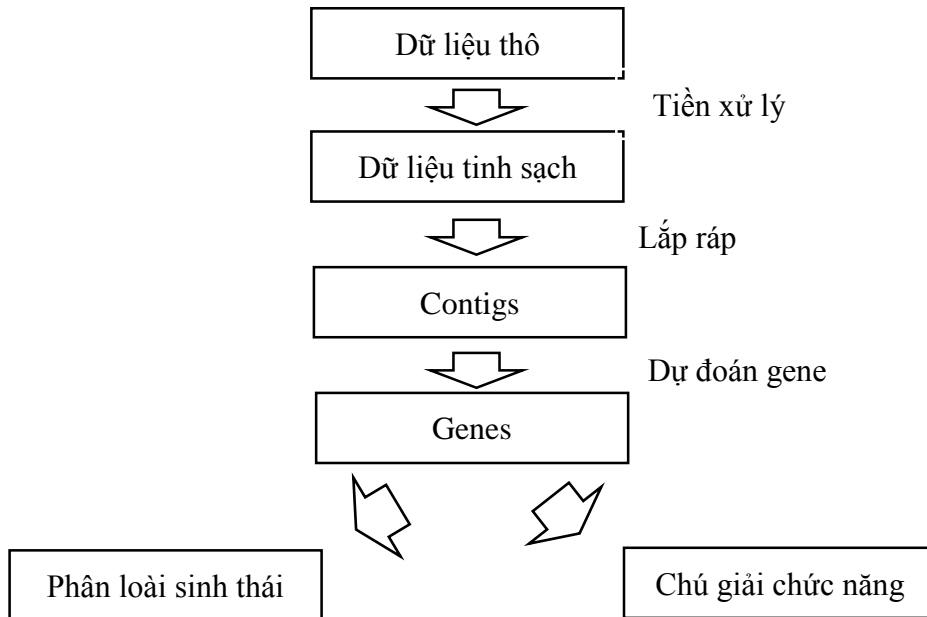
1.2. Kỹ thuật metagenomic trong quá trình khai thác các gen mới

Kỹ thuật metagenomic được sử dụng lần đầu tiên bởi Jo Handelsman và cộng sự. Metagenomic được định nghĩa là một ứng dụng của kỹ thuật di truyền hiện đại để nghiên cứu một hệ sinh thái vi sinh vật trực tiếp từ môi trường sống mà không cần phân lập riêng rẽ các chủng như các kỹ thuật truyền thống, là phương pháp phân tích hệ gen của một quần xã vi sinh vật. Kỹ thuật metagenomic nghiên cứu metagenome quần xã sinh vật thông qua ba bước chính, bao gồm: (i) tách chiết nucleic acid từ mẫu thu thập; (ii) thiết lập thư viện metagenome hoặc giải trình tự DNA metagenome sử dụng thiết bị giải trình tự thế hệ mới; (iii) phân tích, sàng lọc gen bằng các kỹ thuật tin sinh học hoặc phân lập gen dựa vào số liệu giải trình tự, qua đó tạo tiền đề cho việc tách dòng và biểu hiện gen. Các bộ dữ liệu metagenome chỉ có thể được phân tích hiệu quả khi sử dụng các công cụ tin sinh học.

1.3. Khai thác DNA metagenome bằng công cụ tin sinh

Tin sinh học là một lĩnh vực khoa học sử dụng các công nghệ của ngành toán học ứng dụng, tin học, thống kê, khoa học máy tính và toán sinh học để giải quyết các vấn đề sinh học. Máy giải trình tự thế hệ mới tạo ra các đoạn trình tự đọc ngắn thông qua các phản ứng tổng hợp song song và tạo ra một lượng lớn dữ liệu trong mỗi thí nghiệm, bên cạnh đó còn giảm đáng kể chi phí giải trình tự. Tuy nhiên, các đoạn đọc do các hệ thống này tạo ra ngắn hơn rất nhiều so với hệ máy đầu tiên, nên cần độ bao phủ cao hơn để thỏa mãn

tiêu chí xác định bằng sự chồng lặp. Thuật toán lắp ráp de novo và các ứng dụng của nó đang được xây dựng để đáp ứng các thách thức tồn tại đối với dữ liệu giải trình tự mới. Rất nhiều thuật toán lắp ráp de novo đã được thực thi, mỗi loại có những ưu điểm, điểm mạnh yếu riêng. Mỗi chương trình lắp ráp mang tính chất đặc thù riêng, tuy nhiên chúng đều có cơ sở chung và tất cả đều giải quyết sự phức tạp của dữ liệu giải trình tự thế hệ mới.



Hình 1.2: Quy trình xây dựng và phân tích hệ gen từ dữ liệu giải trình tự

Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu

- Mẫu nước thu từ suối nước nóng Bình Châu.

2.1.2. Vi sinh vật

- Chủng *Escherichia coli* TOP10F' (sử dụng trong thí nghiệm nhân dòng gen)
- Chủng *Escherichia coli* C43(DE3) (sử dụng trong thí nghiệm biểu hiện gen)
- Chủng *Escherichia coli* BL21(DE3) (sử dụng trong thí nghiệm biểu hiện gen).
- Chủng *Escherichia coli* JM109(DE3) (sử dụng trong thí nghiệm biểu hiện gen).

2.1.3. Vector

- Vector pUC19 gắn gen tổng hợp nhân tạo trình tự đoạn ORF denovo_35152 (ký hiệu là P450-T2) (Phù Sa Biochem Ltd.)
- Vector pET17b (Novagen, USA).

2.1.4. Môi sử dụng

- 35152f: gatcCATatgggccttgagcagcttcca

- 35152f: gatcAAGCTTAGTGGTGATGGTGATGATGctgggccttgagctgcagca

Cặp môi được đặt tại Phù sa Biochem Ltd. (Việt Nam)

2.1.5. Các môi trường sử dụng

Môi trường LB (g/L):

Peptone	5
Cao nấm men	5
NaCl	3

Môi trường TB (g/L)

Bacto Tryptone	12
Cao nấm men	5
Glycerin	4 ml
H ₂ O	900 mL
Sau khi khử trùng, bổ sung 100 ml:	
K ₂ HPO ₄	0,72 M
KH ₂ PO ₄	0,17 M

Môi trường SOC (g/L)

Bacto Tryptone	20
Cao nấm men	5
NaCl	0,5
H ₂ O	980 mL

Sau khi khử trùng bổ sung 20 ml dung dịch glucose 1M vô trùng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Các phương pháp sinh học phân tử

2.2.1.1. Tách chiết DNA metagenome

Quy trình tách chiết được thực hiện theo kit PowerWater® DNA Isolation.

DNA metagenome được kiểm tra chất lượng bằng cách chạy điện di trên gel agarose 0,8%. Nồng độ và độ tinh sạch DNA được xác định trên máy quang phổ NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) ở bước sóng 260 và 280 nm. Độ tinh sạch của DNA được đánh giá thông qua tỷ lệ A₂₆₀/A₂₈₀. Protein được coi là sạch, đủ chất lượng cho các thí nghiệm tiếp theo khi tỷ lệ này nằm trong khoảng 1,8 ÷ 2,0.

2.2.1.2. Giải trình tự DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu

DNA metagenome của khu hệ vi sinh vật ở suối nước nóng Bình Châu được gửi đi giải trình tự bằng thiết bị giải trình tự thế hệ mới Hiseq Illumina tại công ty BGI (Hongkong). Dữ liệu sau khi đọc trình tự sẽ được lưu ở dạng file fastq.

2.2.1.3. Thiết kế môi

Môi khuếch đại gen được thiết kế dựa trên cơ sở dữ liệu bao gồm trình tự các gen mã hóa cytochrome P450 bền nhiệt đã của khu hệ vi sinh vật suối nước nóng Bình Châu. Các cặp môi được tổng hợp tại công ty sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ).

2.2.1.4. Khuếch đại gen P450-T2

Đoạn khung đọc mở của gen nhân tạo P450-T2 được khuếch đại từ vector pUC19 mang đoạn gen này.

Thành phần phản ứng cho tổng thể tích 50 μ l như sau:

5X Phusion HK Buffer	10 μ l
Môi 35152f (10 pmol)	2 μ l
Môi 35152r (10 pmol)	2 μ l
Khuôn pUC19-T2 (10 ng)	2,5 μ l
5 mM dNTPs	1 μ l
DMSO	1,5 μ l
Phusion polymerase	1,5 μ l
dH ₂ O	29,5 μ l

Phản ứng được thực hiện ở điều kiện sau:

98°C	30 s	} 35 chu kỳ
98°C	10 s	
60°C	10 s	
72°C	20 s	
72°C	5 min	
10°C	∞	

Sản phẩm PCR chạy kiểm tra trên gel agarose 0,8% và được làm sạch theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất Kit GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher Scientific).

2.2.1.5. Chuẩn bị tế bào *Escherichia coli* khả biến xung điện

Một khuẩn lạc *E. coli* mới được hoạt hóa lại trên đĩa môi trường LB thạch được lựa chọn để cấy vào 10 ml môi trường LB lỏng. Nuôi vi khuẩn qua đêm ở 37°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Hôm sau, dịch tế bào được chuyển vào bình tam giác thể tích 2 L chứa 1 L môi trường LB với tỷ lệ giống 1% và tiếp tục nuôi ở 37°C, lắc 200 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4-0,6. Đặt bình nuôi tế bào vào đá 15 phút trước khi ly tâm thu tế bào ở tốc độ 4000 vòng/phút, 4°C trong 15 phút. Cặn tế bào được rửa sạch trong nước cất vô trùng lạnh 2 lần và trong 20 ml dung dịch 10% glycerol lạnh. Ly tâm thu cặn tế bào ở tốc độ 4000 vòng/phút, 4°C trong 15 phút. Hòa cặn tế bào vào 1,5-2 ml dung dịch 10% glycerol và chia vào các ống eppendorf vô trùng, mỗi ống 50 μ l dịch. Làm đông tế bào đột ngột trong nitơ lỏng và bảo quản tế bào ở -80°C cho đến khi sử dụng.

2.2.1.6. Tạo vector biểu hiện pET17b gắn đoạn gen P450-T2 (pET17b-T2)

Vector pET17b (Novagen) mang T7 promoter ở đầu N, vùng tạo vòng, T7 terminator, pBR322 origin được cắt mở vòng với hai enzyme giới hạn *HindIII* và *NdeI* (NEB) và loại gốc phosphate với CIP (NEB). Thành phần phản ứng mở vòng như sau:

Đệm Smart cutter:	2 μ l
<i>NdeI</i> :	1 μ l
<i>HindIII</i> :	1 μ l
Plasmid (152 ng/ μ l):	6 μ l
dH ₂ O:	10 μ l

Phản ứng được ủ ở 37°C trong 1 giờ. Bất hoạt 2 enzyme giới hạn bằng cách nâng nhiệt độ phản ứng lên 65°C trong 20 phút. Tiếp tục loại gốc phosphate với thành phần phản ứng như sau:

Đệm Smart cutter:	10 μ l
Plasmid đã mở vòng:	20 μ l
CIP:	5 μ l
dH ₂ O:	15 μ l

Phản ứng ủ ở 37°C trong 30 phút. Làm sạch plasmid bằng Kit GenJET Gel extraction (Thermo Fisher Scientific).

Mặt khác, sản phẩm khuếch đại gen trong mục 2.2.1.4 cũng được cắt tạo đầu dính với 2 enzyme tương ứng *Hind III* và *NdeI* (NEB). Làm sạch đoạn gen bằng Kit GenJET Gel extraction (Thermo Fisher Scientific).

Đoạn gen *P450-T2* được gắn vào vector pET17b đã mở vòng tại 2 vị trí *HindIII* và *NdeI* bằng Kit Fast Link DNA ligation (Epicenter) với thành phần phản ứng như sau:

Đệm 10x Fast-link ligation:	1,5 μ l
10 mM ATP:	0,75 μ l
pET17b mở vòng:	3 μ l
Đoạn gen <i>P450-T2</i> :	4 μ l
dH ₂ O:	4,75 μ l
Fast link ligase:	1 μ l

Hỗn hợp được ủ 15 phút ở nhiệt độ phòng trước khi bất hoạt enzyme ở 70°C trong 15 phút.

2.2.1.7. Biến nạp vào *E. coli* bằng phương pháp xung điện

Hỗn hợp gắn ở mục 2.2.1.6 (3 μ l) được trộn vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10F' và để trên đá 5-10 phút. Đồng thời các cuvette cũng được đặt trên đá. Chuyển dịch tế bào trộn hỗn hợp gắn vào cuvette và tiến hành xung điện ở điện thế 1800-2000V. Phục hồi tế bào trong 1 ml môi trường SOC, lắc trong 1 giờ ở 37°C. Dịch biến nạp sau đó được cấy trải trên đĩa môi trường LB có bổ sung ampicillin (100 μ g/ml).

2.2.1.8. Chọn lọc dòng *E. coli* mang vector pET17b-T2

Khuẩn lạc mọc trên đĩa môi trường LB (sản phẩm mục 2.2.1.7) được tách sạch và nuôi riêng rẽ trên môi trường LB lỏng có kháng sinh qua đêm ở 37°C. Tách plasmid bằng Kit GeneJET Plasmid miniprep

(Thermo Fisher Scientific) và cắt kiểm tra bằng hai enzyme giới hạn *HindIII* và *NdeI*. Những dòng plasmid nào có xuất hiện hai băng (kích thước tương ứng khoảng hơn 3000 bp và 1000 bp) thì được giữ lại và gửi đi đọc trình tự gen tại Phù sa Biochem Ltd.

2.2.1.9. Biểu hiện gen P450-T2

Dòng plasmid pET17b-T2 đã xác định trình tự đảm bảo đủ và đúng mã di truyền sẽ được biến nạp vào các tế bào *E. coli* BL21(DE3), JM109(DE3) và C43(DE3) bằng phương pháp xung điện.

Các dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp ban đầu được nhân trong bình tam giác chứa môi trường LB bổ sung ampicillin (100 µg/ml) ở 37°C qua đêm làm giống. Chuyển 1% giống vào môi trường TB và tiếp tục lắc ở 37°C trong 3-4h cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,8 – 1 thì bổ sung 1 mM IPTG và 0,5 mM δ-amino levulinic acid và hạ nhiệt độ xuống 30°C. Sau 48 giờ, ly tâm thu cặn tế bào và bảo quản cặn tế bào ở -20°C cho thí nghiệm sau.

2.2.2. Các phương pháp hóa sinh

2.2.2.1. Tinh sạch protein P450-T2 tái tổ hợp

Cặn tế bào được rửa đông và được hòa tan trong 50 ml đệm A (50 mM Kpi pH 7,4; 500 mM Na-acetate; 0,1 mM EDTA; 1,5% Na-Cholate; 0,1 mM PMSF và 0,1 mM DTE). Tế bào sau đó được phá bằng sóng siêu âm trong 15 phút. Dịch phá tế bào được ly tâm ở 35.000 vòng/phút trong 30 phút để thu dịch thô enzyme. Xác định nồng độ của enzyme tái tổ hợp theo phương pháp của Omura và Sato.

Cột sắc ký IMAC-Ni²⁺ được cân bằng bằng đệm B (50 mM Kpi pH 7,4; 500 mM Na-acetate; 1% Na-Cholate; 0,1 mM PMSF và 0,1 mM DTE). Đưa mẫu enzyme thô vào cột và rửa bằng 50 ml đệm B. Tiếp tục rửa bằng 50 ml đệm C (50 mM Kpi pH 7,4; 0,1 mM EDTA; 1% Na-Cholate; 0,1 mM PMSF và 0,1 mM DTE; 0,1 mM ATP). Protein tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột bằng đệm D (50 mM Kpi pH 7,4; 400 mM Imidazol AcO; 1% Na-Cholate; 0,1 mM PMSF và 0,1 mM DTE) thành các phân đoạn (2 ml/phân đoạn) với tốc độ 1 ml/phút.

Các phân đoạn được đo quang phổ UV-Vis từ bước sóng 700 đến 200 nm. Thu nhận các phân đoạn có tỉ lệ A₄₁₇/A₂₈₀ từ 1,6-1,8. Các phân đoạn được lựa chọn sẽ được hòa chung, loại imidazol bằng phương pháp thẩm tích và cô lại đến thể tích mong muốn bằng Centriprep 30 kDa. Mẫu protein tinh sạch được kiểm tra trên bản điện di SDS-PAGE và xác định nồng độ cytochrome P450.

2.2.2.2. Điện di SDS-PAGE

Điện di SDS-PAGE được thực hiện theo phương pháp của Laemmli

Nồng độ cytochrome P450 được xác định bằng máy đo quang phổ CO-Difference được tính toán bằng công thức $\epsilon_{(459-490)} = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dựa theo phương pháp của Omura and Sato. Phổ UV-vis của cytochrome P450 được ghi lại ở nhiệt độ phòng bằng máy đo quang phổ UV2101PC, Shimadzu, Kyoto, Japan.

2.2.2.3. Xác định phổ hấp thụ phân tử UV-Vis và phương pháp xác định nồng độ cytochrome P450

Enzyme tinh sạch được đo trên máy quang phổ Shimadzu Photometer (UV2101PC, Kyoto, Japan) ở bước sóng từ 200-700 nm nhằm xác định phổ hấp thụ phân tử UV-Vis.

Nồng độ cytochrome P450 được xác định dựa theo phương pháp của Omura và Sato. Cytochrome P450 hấp thụ cực đại ở bước sóng 450 nm khi chúng bị khử thành phức hợp Fe-CO. Nồng độ P450 được tính theo công thức:

$$C(\text{P450}) = \frac{(A_{450} - A_{490}) \times \text{hệ số pha loãng}}{\epsilon \times d}$$

C(P450): nồng độ cytochrome P450 [mM]

$A_{450} - A_{490}$: Hiệu số độ hấp thụ ở 2 bước sóng 450 nm 490 nm

ϵ : Độ hấp thụ phân tử (molar extinction coefficient) [$91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d : Đường kính hoặc chiều dài của cuvette [cm]

2.2.2.4. Xác định pH tối ưu và nhiệt độ tối ưu của P450-T2 tái tổ hợp

Enzyme tái tổ hợp tinh sạch được hoà trong đệm 50 mM Kpi với dải pH từ 2-9 trong 15 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút thu dịch trong. Xác định hoạt tính của enzyme theo phương pháp của Omura và Saito để xác định giá trị pH cho nồng độ P450 cao nhất.

Enzyme tiếp tục được hoà trong đệm 50 mM Kpi ở pH tối ưu và ủ ở các nhiệt độ 40, 50, 60 và 70°C trong 15 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút thu dịch trong. Xác định hoạt tính của enzyme theo phương pháp của Omura và Saito để xác định giá trị nhiệt độ cho nồng độ P450 cao nhất.

2.2.2.5. Xác định độ bền nhiệt của P450-T2 tái tổ hợp

Giá trị T_{50} được xác định bằng cách ủ protein tinh sạch tại các nhiệt độ 40°C, 50°C và 60°C đồng thời xác định hoạt tính enzyme còn lại sau mỗi khoảng thời gian 15 phút.

Đường cong biến tính của enzyme được xác định thông qua đặc điểm của vùng hấp thụ tia UV xa (far UV) sử dụng hệ thống quang phổ lưỡng sắc tròn (Circular dichroism - CD) JASCO J-715. Enzyme tinh sạch được hoà trong đệm 10 mM Kpi pH 7,4 đến nồng độ cuối cùng là 2 μM . Phổ hấp thụ được đo trong vùng UV xa từ bước sóng 190 đến 260 nm. Mỗi lượt đo cách nhau 1 phút với tốc độ 0,5s/nm và chiều rộng của băng 5 nm.

2.2.2.6. Xác định các redox partner trong hệ thống truyền điện tử của P450-T2

Enzyme tái tổ hợp tinh sạch P450-T2 được trộn chung với các hệ ferredoxin reductase và ferredoxin khác nhau, bao gồm: (i) hệ adrenodoxin reductase/ adrenodoxin rút gọn (4-108) của người; (ii) hệ ferredoxin reductase arh1/ ferredoxin etp1 của nấm men; (iii) hệ ferredoxin reductase BmCPR/ ferredoxin Fdx2 và (iv) hệ ferredoxin reductase BmCPR/ ferredoxin Fdx3 từ *Bacillus megaterium*. Tính tương thích được xác định dựa trên khả năng truyền electron (tính khử) từ NADPH đến ferredoxin reductase, tiếp đến ferredoxin và cuối cùng là đến P450. Các hệ redox partner tương thích sẽ khử P450 và hình thành nên phức Fe-CO và có peak hấp phụ tối đa ở bước sóng 450 nm.

Phản ứng được thực hiện trong đệm HEPES pH 7,2 với tỷ lệ P450:Fdx:FdR là 1:20:3 (μM). Bổ sung 1mM NADPH, trộn đều và chia vào hai cuvette thạch anh CV10Q700 (Thorlabs). Sau thời gian 1

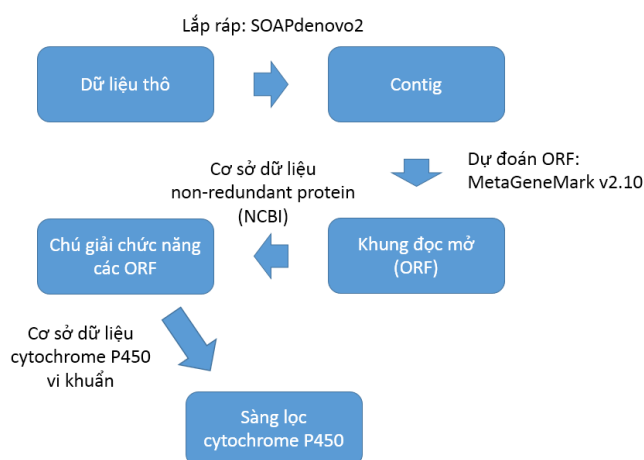
phút, một cuvette được súc bão hòa CO. Đo mức độ hấp thụ của mẫu từ bước sóng 400-500 nm bằng máy quang phổ Shimadzu Photometer (UV2101PC, Kyoto, Japan).

2.2.2.7. Xác định các phổ cơ chất tiềm năng của P450-T2

Một số hợp chất bao gồm: Caffeic acid, L-Mimosine, Piceatamol, L-Resveratro, Butein, Emodin, Luteolin, Morine, Isoscopoletine, Nalixic acid, Scopoletin được lựa chọn để thử nghiệm xác định phổ cơ chất tiềm năng của P450-T2. Cơ chất tiềm năng của P450-T2 được đánh giá dựa trên sự thay đổi phổ hấp thụ cực đại UV-Vis của P450 từ dạng *low-spin* (hấp thụ cực đại ở 415-417 nm) khi không có mặt cơ chất chuyển thành dạng *high spin* (hấp thụ cực đại ở 390-394 nm) khi có mặt cơ chất.

2.2.3. Các phương pháp tin sinh học

Chất lượng đọc trình tự được đánh giá bằng phần mềm FastQC. Quá trình tiền xử lý dữ liệu được thực hiện bằng công cụ Trimmomatic. Dữ liệu DNA metagenome của khu hệ vi sinh vật ở suối nước nóng Bình Châu được lắp ráp để tạo thành contigs bằng phần mềm SOAPdenovo2 với các thông số mặc định. Công cụ Bowtie2 được sử dụng nhằm giống hàng các đoạn đọc ngắn với những contig được lắp ráp, qua đó những đoạn trình tự lỗi được loại bỏ. Kết quả lắp ráp được đánh giá bằng phần mềm QUAST.



Hình 2.1: Quy trình lắp ráp và xử lý số liệu

MetaGeneMark v2.10 được sử dụng để dự đoán khung đọc mở (ORFs) dựa trên kết quả lắp ráp. Tất cả khung đọc mở sau đó được so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ Blast++ nhằm dự đoán chức năng của các protein và sàng lọc ORF mã hóa cytochrome P450. Gen tiềm năng mã hóa cytochrome P450 được đối chiếu với cơ sở dữ liệu cytochrome P450 của vi khuẩn. Công cụ Tm Index được sử dụng để dự đoán nhiệt độ mà tại đó 50% cấu trúc một protein bị duỗi xoắn, qua đó loại bỏ những gen mã hóa cytochrome P450 không bền nhiệt. Gen mã hóa cytochrome P450 được dịch mã sang axit amin bằng phần mềm ExPASy. Trình tự axit amin của gen được phân lập từ DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu và các cytochrome P450 tương đồng được sắp hàng bằng Clustal Omega và thể hiện thành hình ảnh nhờ công cụ ESPript3. Cây phả hệ giữa các cytochrome P450 được xây dựng bằng phần mềm MEGA7.

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

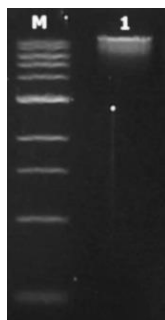
Suối nước nóng Bình Châu thuộc xã Bung Riềng, huyện Xuyên Mộc, tỉnh Bà Rịa có nhiệt độ ở gần miệng giếng phun là 82-84°C, pH 7,5 – 7,7. Vị trí lấy mẫu có tọa độ 10°36'03.9" Bắc và 107°33'30.0" Đông. Chỉ tiêu hoá lý của mẫu nước thu nhận từ suối nước nóng Bình Châu được trình bày tại phụ lục 1.



Hình 3.1: Vị trí các điểm sôi của suối nước nóng Bình Châu được lựa chọn để lấy mẫu

3.1. Tách chiết DNA metagenome từ mẫu suối nước nóng Bình Châu

Quá trình tách chiết DNA metagenome được thực hiện theo hướng dẫn sử dụng kit PowerWater® DNA Isolation (MO BIO). Kết quả tách chiết DNA metagenome của mẫu nước suối nước nóng Bình Châu được thể hiện trong ảnh điện di ở hình 3.2 cho thấy DNA metagenome của mẫu nước suối nước nóng Bình Châu có chất lượng tốt, DNA không bị đứt gãy. Nồng độ của mẫu được đo bằng máy quang phổ Nano Drop 1000 đạt 139,3 ng/μl, A₂₆₀:A₂₈₀ đạt 1,84 đủ điều kiện để giải trình tự.



Hình 3.2: DNA metagenome của mẫu nước suối nước nóng Bình Châu (Giếng 1). M: thang DNA chuẩn 1kb.

3.2. Giải trình tự DNA metagenome bằng thiết bị HiSeq Illumina

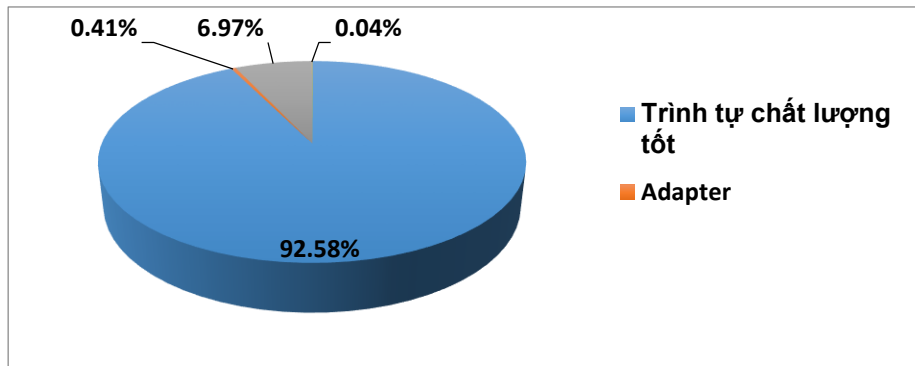
DNA metagenome của suối nước nóng Bình Châu được gửi đi giải trình tự tại Công ty BGI (Hongkong)

3.3. Xây dựng cơ sở dữ liệu metagenome suối nước nóng Bình Châu các gen mã hóa cytochrome P450 bằng các công cụ tin sinh học

3.3.1. Giải trình tự và tiền xử lý dữ liệu

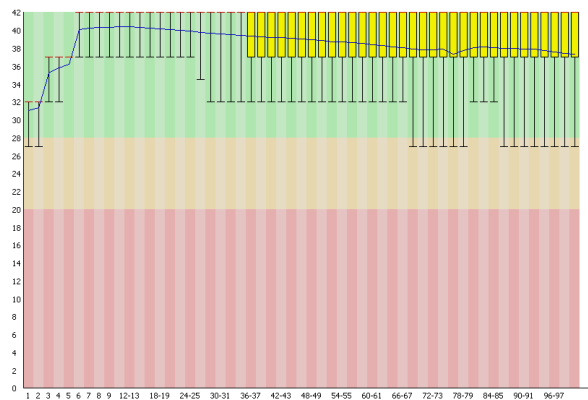
Kết quả giải trình tự DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu ở công ty BGI (Hongkong) thu được 10.2 Gb dữ liệu thô. Phân tích bằng phần mềm FastQC cho thấy có 0.04% dữ liệu không xác định

được là A,T,G hay C; 0,41% là trình tự mỗi đọc trình tự, 6,97% dữ liệu có chất lượng kém ($Q < 20$) (Hình 3.3).



Hình 3.3: Thành phần các đoạn đọc thô trong mẫu đọc trình tự DNA metagenome của suối nước nóng Bình Châu

Sử dụng phần mềm Trimmomatic nhằm loại bỏ trình tự chất lượng kém, kết quả thu được 93.999.534 đoạn trình tự (9,4 Gb dữ liệu) chất lượng cao, phần lớn trình tự có điểm chất lượng $Q > 30$ (Hình 3.4).



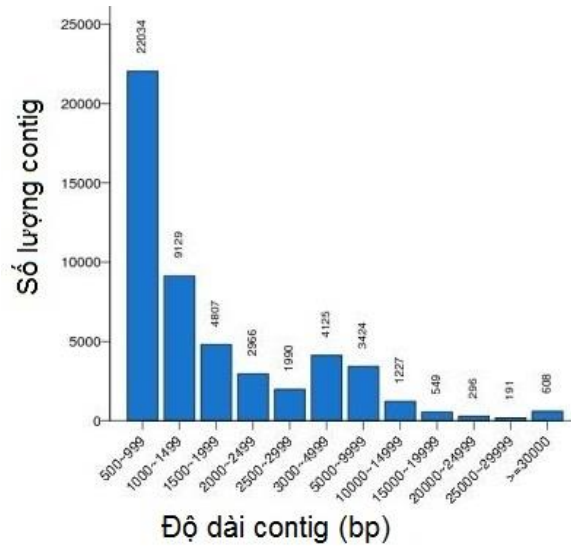
Hình 3.4: Chất lượng dữ liệu sau khi tiền xử lý bằng Trimmomatic

3.3.2. Lắp ráp de novo metagenome

Dữ liệu được lắp ráp để tạo thành contigs bằng phần mềm SOAPdenovo2 và đánh giá chất lượng lắp ráp bằng công cụ Quast (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies). SOAPdenovo2 lắp ráp 61.212.496 đoạn trình tự tạo ra 51.346 contigs có độ dài trên 500 bp, trong đó contig dài nhất là 1.767.609 bp (Bảng 3.1).

Bảng 3.1: Kết quả lắp ráp de novo metagenome suối nước nóng Bình Châu

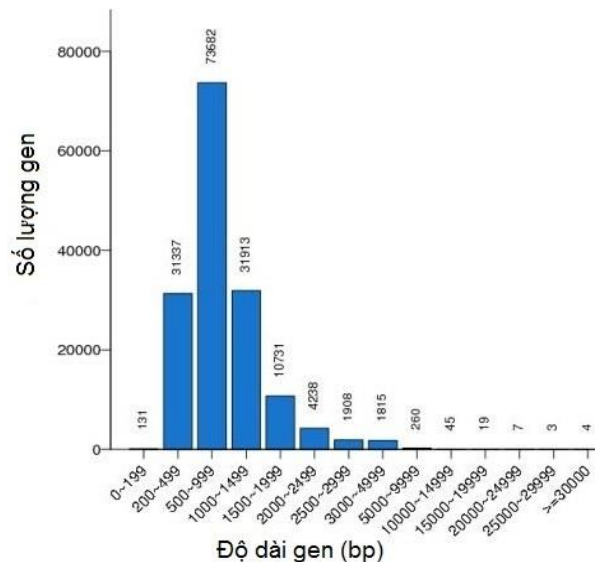
Tổng số đoạn trình tự	93.999.534
Số đoạn trình tự được lắp ráp	61.212.496
Tổng số contig	51.346
Contig dài nhất (bp)	1.767.609
Độ dài trung bình các contig (bp)	3.351
Độ dài contig N50 (bp)	9.791
Độ dài contig N90 (bp)	1.059



Hình 3.5: Phân bố độ dài contig sau khi lắp ráp bằng phần mềm SOAPdenovo2

3.3.3. Dự đoán gen và xây dựng cơ sở dữ liệu metagenome suối nước nóng Bình Châu cụm gen mã hoá cytochrome P450

Sử dụng chức năng dự đoán ORF dành cho dữ liệu metagenomic của phần mềm MetaGeneMark v2.10 với 51.346 contig thu được 156.093 khung đọc mở tiềm năng. Phân bố độ dài của các khung đọc mở được thể hiện trong hình 3.6. cho thấy các đoạn gen có độ dài từ 500-999 bp có tỉ lệ 47,2%, tiếp theo là các đoạn gen có chiều dài 1000-1499 bp và chiều dài từ 1500-1999 bp có tỷ lệ lần lượt là 20,4% và 6,9%.



Hình 3.6: Phân bố độ dài các gen được dự đoán từ cơ sở dữ liệu DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu

Tất các khung đọc mở sau đó được so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI bằng công cụ Blast++. Có tất cả 106.903 khung đọc mở tiềm năng đã được chú giải, trong đó có 68 gen tiềm năng mã hóa cytochrome

P450 bao gồm 38 gen hoàn chỉnh, 14 gen thiếu mã mở đầu, 9 gen thiếu mã kết thúc và 7 gen thiếu cả hai đầu (Bảng 3.2)

Bảng 3.2: Cơ sở dữ liệu metagenome suối nước nóng Bình Châu cụm gen mã hóa cytochrome P450.

Loại gen	Số lượng
Gen hoàn chỉnh	38
Gen thiếu mã mở đầu	14
Gen thiếu mã kết thúc	9
Gen thiếu cả mã mở đầu và mã kết thúc	7
Tổng số	68

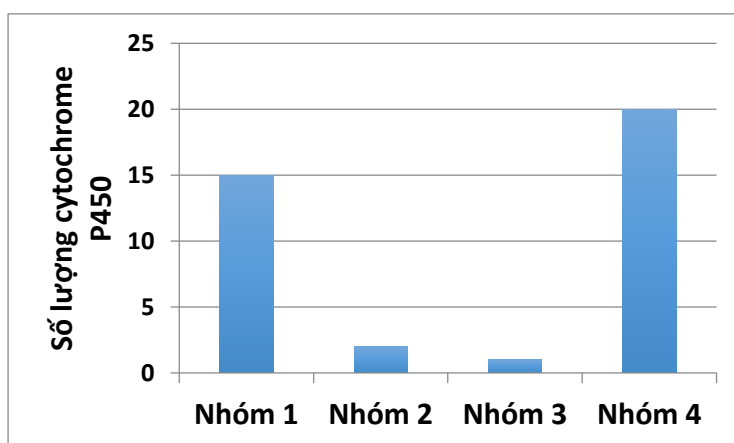
Cơ sở dữ liệu metagenome cụm gen mã hóa cho cytochrome P450 có mang 38 ORF hoàn chỉnh. Các trình tự này được phân tích và dự đoán chức năng protein theo con đường KEGG. Kết quả phân tích cho thấy các protein P450 của cơ sở dữ liệu được chia thành 4 nhóm (Hình 3.7):

- Nhóm 1 bao gồm 15 enzyme tham gia chuyển hóa Terpenoid và Polyketides hoặc tham gia vào quá trình phân hủy Limonene và pinene với mức độ tương đồng protein với các cytochrome P450 đã công bố từ 41-81%.

- Nhóm 2 bao gồm 2 enzyme tham gia chuyển hóa lipid và các chất béo với mức độ tương đồng lần lượt là 42 và 61%

- Nhóm 3 bao gồm 1 protein có độ tương đồng 61% với cytochrome P450 của người (CYP4V)

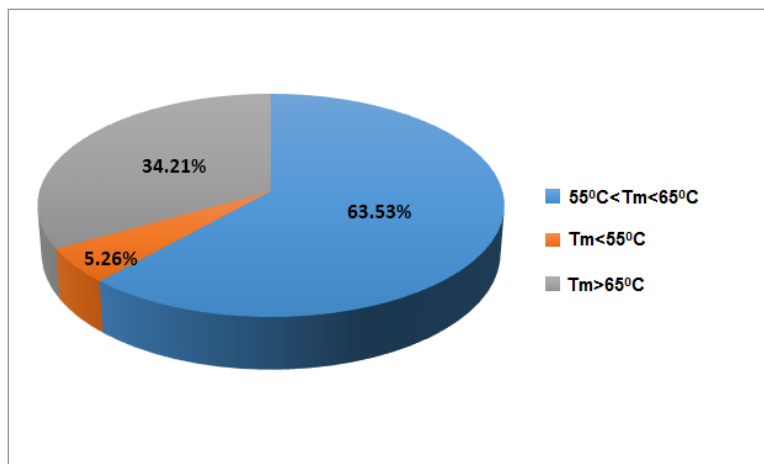
- Nhóm 4 bao gồm 20 cytochrome P450 chưa rõ chức năng có mức độ tương đồng protein với các cytochrome P450 đã công bố từ 28-100%.



Hình 3.7: Số lượng các cytochrome P450 trong cơ sở dữ liệu metagenome suối nước nóng Bình Châu được chia thành 4 nhóm: Nhóm 1 - enzyme tham gia chuyển hóa Terpenoid và Polyketides hoặc tham gia vào quá trình phân hủy Limonene và pinene; Nhóm 2 - enzyme tham gia chuyển hóa lipid và các chất béo; Nhóm 3- enzyme tương đồng với CYP4V; Nhóm 4- nhóm chưa rõ chức năng.

3.3.4. Dự đoán nhiệt độ nóng chảy (T_m) của các P450 tiềm năng trong cơ sở dữ liệu metagenome suối nước nóng Bình Châu

T_m của 38 ORF hoàn chỉnh mã hóa cho các cytochrome P450 tiềm năng được dự đoán trực tiếp từ trình tự protein của gen đó thông qua phần mềm T_m Index. Kết quả cho thấy có 13 đoạn ORF (34,21%) được dự đoán có T_m của protein cao hơn 65°C, 23 ORF (60,53%) mã hoá cho các protein có T_m nằm trong khoảng từ 55°C đến 65°C và 2 ORF (5,26%) mã hoá cho các protein có T_m thấp hơn 55°C (Hình 3.8).



Hình 3.8: Phân bố T_m của các cytochrome P450 tiềm năng được mã hoá bởi 38 ORF hoàn chỉnh từ cơ sở dữ liệu metagenome suối nước nóng Bình Châu.

3.4. Tách dòng và biểu hiện gen mã hóa cytochrome P450 từ DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu

3.4.1. Phân lập gen mã hóa cytochrome P450

Với mục tiêu tìm kiếm gen mã hóa cytochrome P450 bền nhiệt, những ORF có $T_m < 55^\circ\text{C}$ bị loại bỏ, 36 ORF có $T_m > 55^\circ\text{C}$ được sử dụng làm đối tượng để khuếch đại gen. Sử dụng 36 cặp mồi có trình tự được thiết kế ở phụ lục 3 để khuếch đại các ORF trong cơ sở dữ liệu metagenome.

Phương pháp thông dụng để làm giàu số bản sao gen đích là làm giàu mật độ vi sinh vật sinh tổng hợp sản phẩm được mã hóa bởi gen đích trên cơ chất đặc hiệu, đặc biệt đối với nhóm enzyme thủy phân (amylase, cellulase...). Tuy nhiên cytochrome P450 là nhóm enzyme oxy hóa, cần phải có sự tham gia của rất nhiều cofactor để thực hiện quá trình xúc tác. Hơn nữa, phổ cơ chất của các cytochrome P450 khác nhau là rất khác nhau, do vậy việc lựa chọn cơ chất để làm giàu số bản sao gen mã hóa cytochrome P450 trong DNA metagenome là bất khả thi.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã không thành công trong việc khuếch đại gen mã hóa cytochrome P450 trực tiếp từ DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu. Do vậy chúng tôi lựa chọn phương pháp tổng hợp nhân tạo 1 ORF trong cơ sở dữ liệu metagenome để biểu hiện và nghiên cứu tính chất của nó.

3.4.2. Lựa chọn ORF hoàn chỉnh mã hóa cytochrome P450

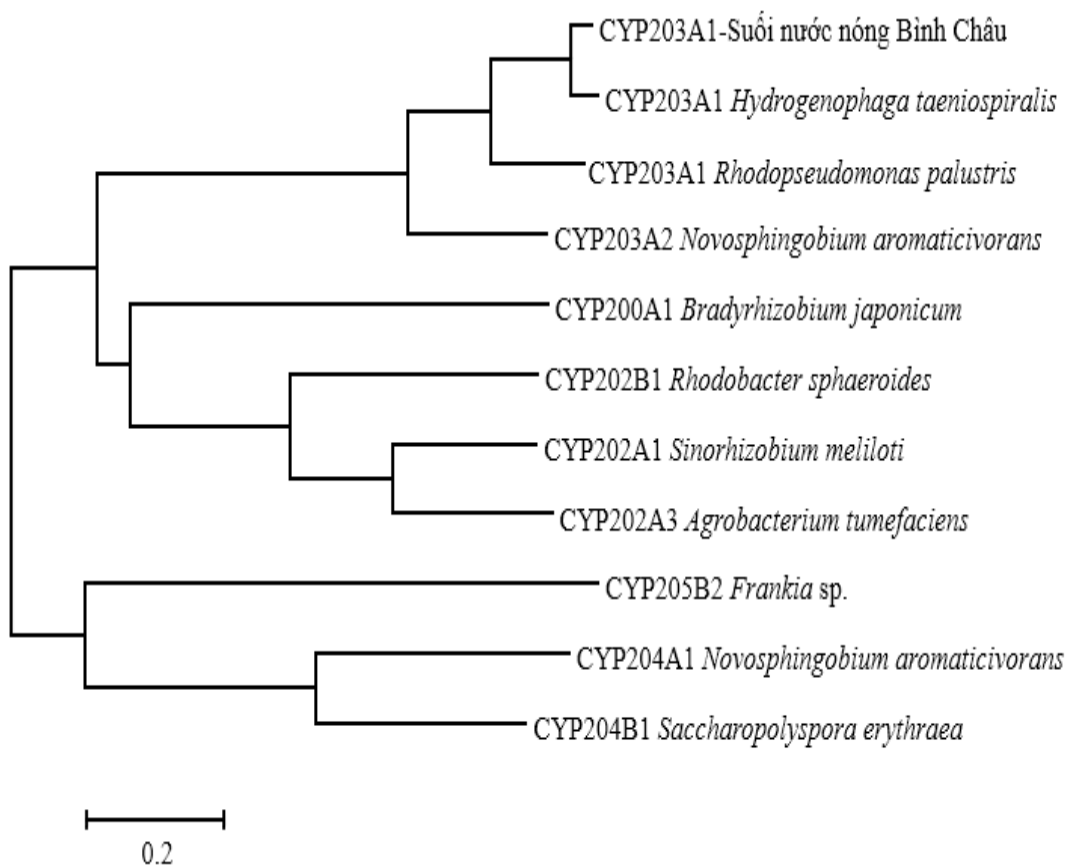
Do bất cập về tính tương thích nhiệt độ tối ưu của các enzyme trong chuỗi truyền điện tử, chúng tôi không có các hệ redox partner (ferredoxin reductase, ferredoxin) chịu nhiệt, do vậy tiêu chí đặt ra để lựa chọn ORF bao gồm:

- Là ORF hoàn chỉnh (có trình tự nucleotide mã hoá Methionine khởi đầu và kết thúc ở Stop codon)
- Có T_m dự kiến nằm trong khoảng 55 – 65°C
- Có độ tương đồng với các P450 đã biết < 85%
- Tham gia vào con đường chuyển hoá terpenoid và polyketide

Trong số các ORF được sàng lọc, chúng tôi đã lựa chọn ORF thuộc contig [denovogenes]_35152 đáp ứng được các tiêu chí trên để tổng hợp nhân tạo tại Công ty TNHH MTV Phù Sa (Việt Nam).

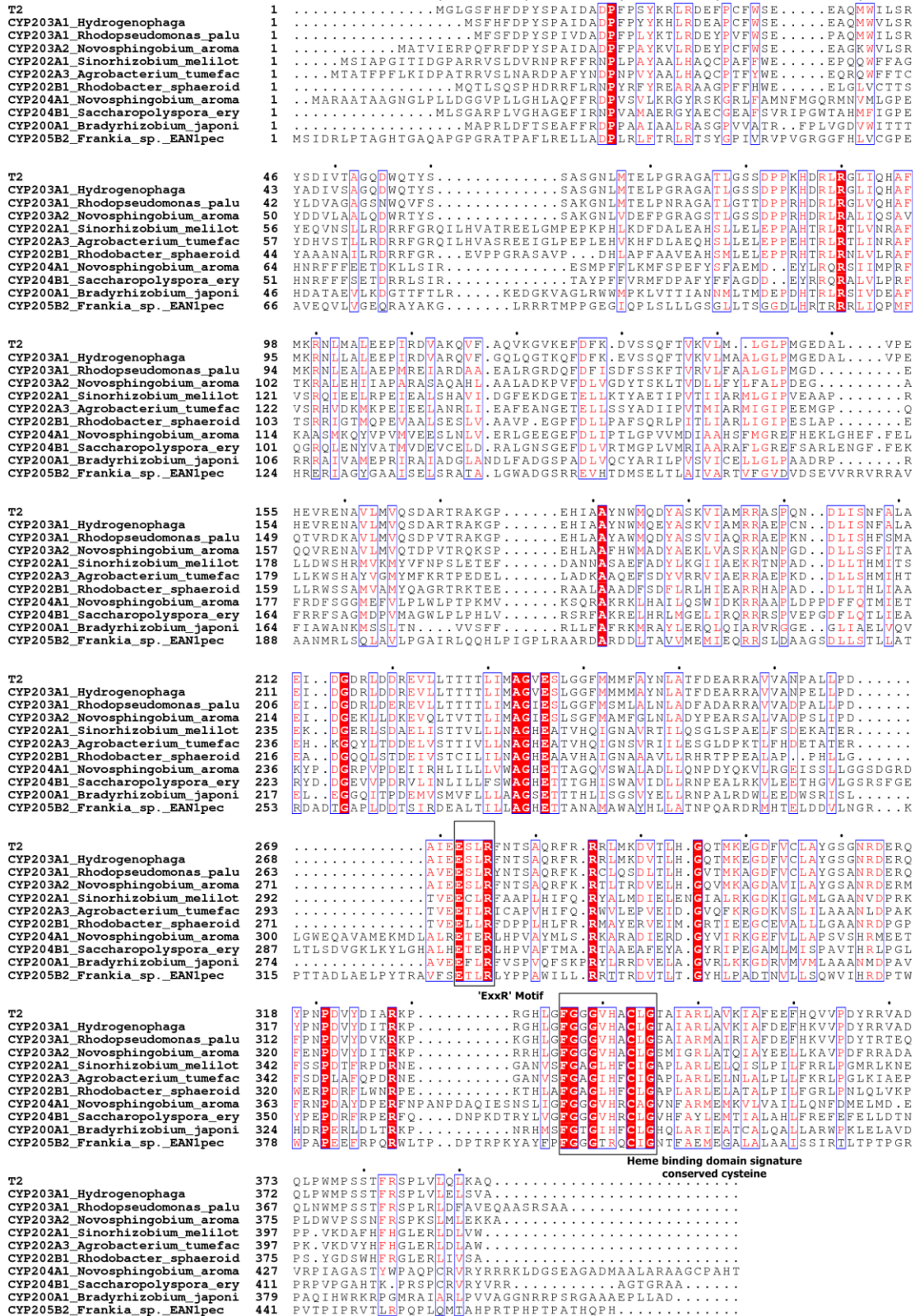
3.4.3. Phân tích trình tự gen mã hoá cytochrome P450 tổng hợp nhân tạo (P450-T2)

Gen tổng hợp có ký hiệu P450-T2 có chiều dài 1188 bp mã hóa cho 395 axit amin. P450-T2 có mức độ xác định 70,8% và độ tương đồng 81,4% với trình tự axit amin CYP203A1 của chủng *Hydrogenophaga taeniospiralis*. Do đó, có thể xếp enzyme cytochrome P450 được mã hóa gen mới tìm được vào nhóm CYP203A1. Kết quả này được xác định thông qua cây phả hệ neighbor-joining giữa trình tự của gen mã hóa P450-T2 và các cytochrome P450 khác (Hình 3.9).



Hình 3.9: Cây phả hệ giữa cytochrome P450 mã hóa bởi gen phân lập từ DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu và một số cytochrome P450 khác

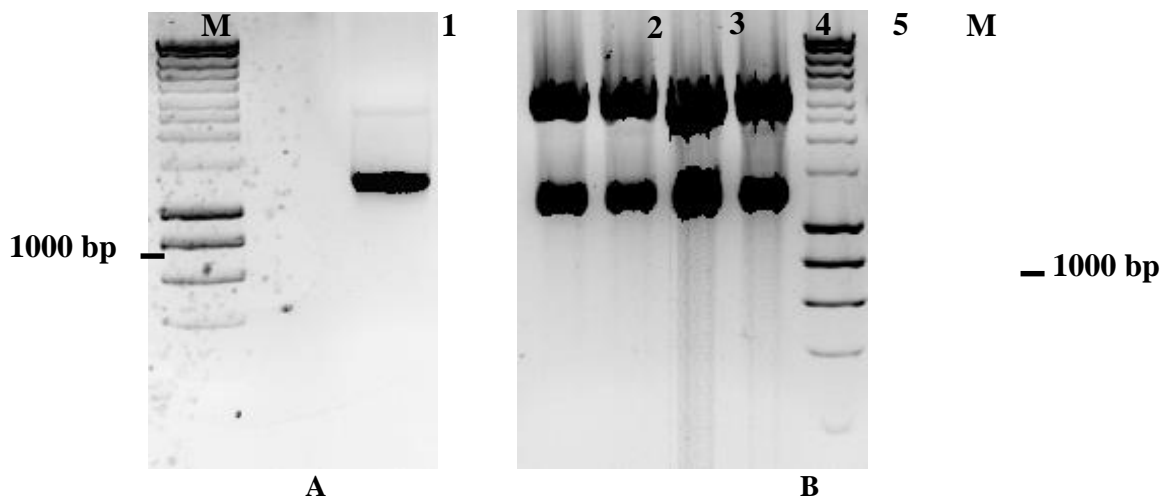
Cytochrome P450 là một hemoprotein, nó có đặc trưng là các motif như EXR, CXG và heme binding domain. Một số cấu trúc đặc trưng của cytochrome P450 như EXXR motif và heme binding domain (FGHGIHFCLG) được thể hiện trong hình 3.10.



Hình 3.10: Kết quả so sánh trình tự axit amin của P450-T2 và một số cytochrome P450 khác.

3.4.4. Thiết kế hệ vector biểu hiện gen mã hóa P450-T2

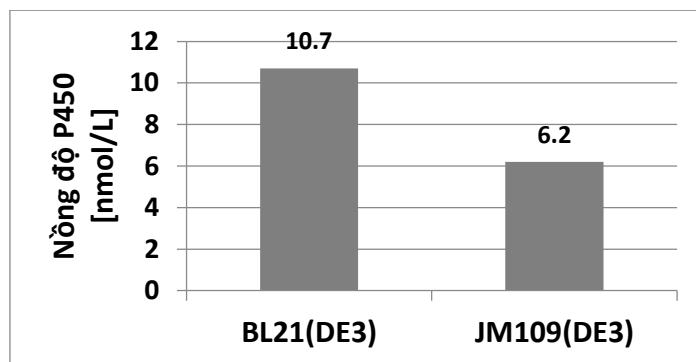
Gen mã hoá P450-T2 được gắn trong vector pUC19. Sử dụng cặp mồi 35152f và 35152r để khuếch đại đoạn gen theo phương pháp trình bày ở mục 2.2.1.4 (Hình 3.11A). Sau đó, vector pET17b (Novagen) và sản phẩm PCR cùng được xử lý bằng *NdeI* và *HindIII* trước khi gắn đoạn ORF của P450-T2 vào vector bằng enzyme Fast link ligase (Epicenter). Vector tái tổ hợp pET17b mang đoạn gen P450-T2 được nhân lên trong *E. coli* TOP10F⁺ và cắt kiểm tra bằng *NdeI* và *HindIII*



Hình 3.11: Điện di đồ sản phẩm khuếch đại gen mã hoá P450-T2 (A) và các dòng vector pET17b mang các đoạn gen mã hoá P450-P2 sau khi cắt bằng *NdeI* và *HindIII* (B). M: 1 kb ladder.

3.4.5. Biểu hiện gen mã hóa P450-T2

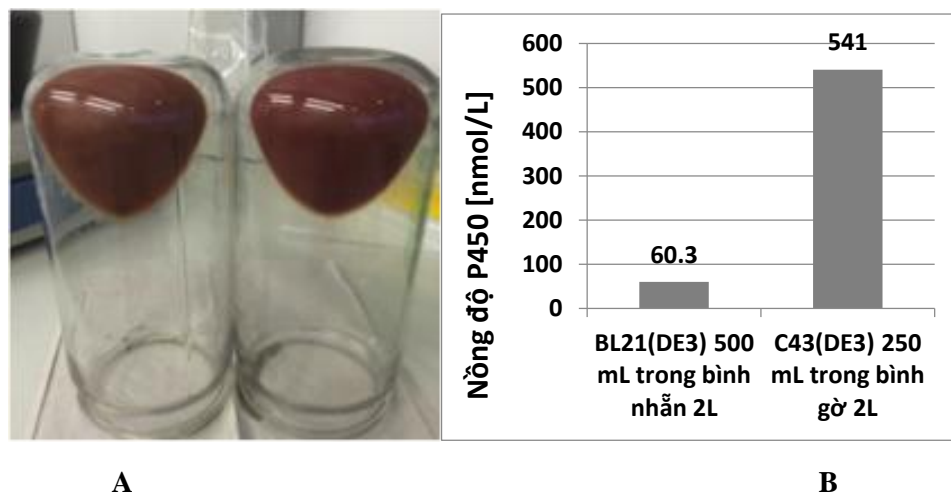
Các chủng tái tổ hợp sau đó được biểu hiện trong bình tam giác nhẵn có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường TB. Quá trình cảm ứng được thực hiện với 1 mM IPTG và 0,5 mM δ -Aminolevulinic acid. Sau 48 giờ mức độ biểu hiện P450-T2 chỉ đạt ở mức 10,7 nmol/L quá thấp.



Hình 3.12: Nồng độ P450-T2 tái tổ hợp trong *E. coli* BL21(DE3) và JM109(DE3). Mô hình biểu hiện được thực hiện trong bình tam giác nhẵn có thể tích 250 mL chứa 50 mL môi trường TB.

Do hiệu suất biểu hiện ban đầu quá thấp nên chúng tôi tiếp tục nghiên cứu nâng cao hiệu suất biểu hiện trong bình tam giác nhẵn dung tích 2000 ml chứa 500 ml môi trường. Chủng *E. coli* được lựa chọn là BL21(DE3). Mặc dù hiệu suất biểu hiện đã được nâng lên 60,3 nmol/L nhưng hiệu suất biểu hiện vẫn thấp cho các bước nghiên cứu tiếp theo.

Chúng tôi tiếp tục thử nghiệm biểu hiện ở quy mô bình tam giác có gờ dung tích 2000 mL chứa 250 mL môi trường TB sử dụng dòng tế bào *E. coli* C43(DE3) mang plasmid pET-T2. Kết quả ở Hình 3.13 cho thấy mức độ biểu hiện đã tăng lên rõ rệt, tế bào *E. coli* có màu đỏ, nồng độ cytochrome P450-T2 đã đạt 541 nmol/L, gấp gần 9 lần so với hệ thống biểu hiện trước.

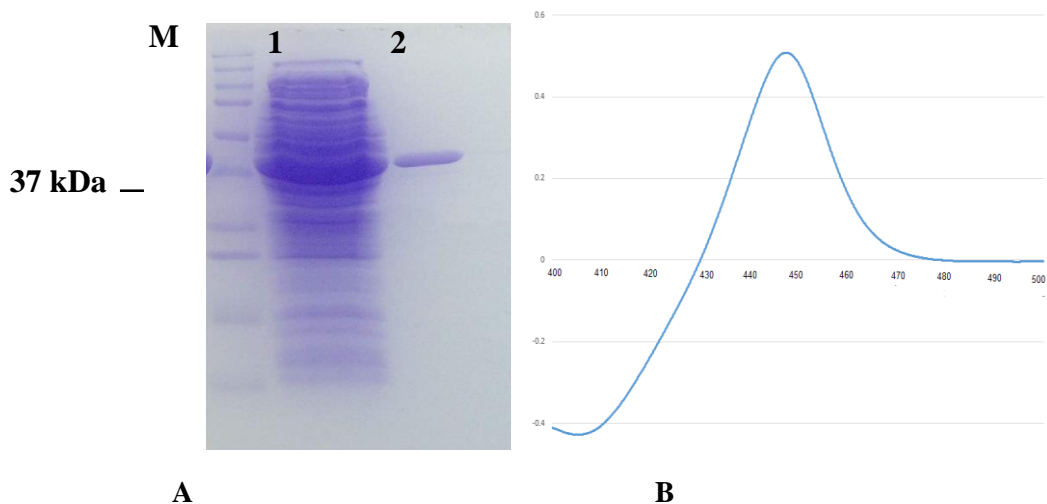


Hình 3.13: Màu sắc tế bào *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp mang vector pET17b-T2 (A) và hiệu suất biểu hiện P450-T2 của hai hệ thống bình tam giác và chủng *E. coli* khác nhau.

3.5. Tinh sạch P450-T2 tái tổ hợp

Cặn tế bào *E. coli* C43(DE3) tái tổ hợp được phá vỡ bằng sóng siêu âm để thu dịch enzyme thô. Toàn bộ quy trình tinh sạch enzyme qua cột sắc ký ái lực IMAC-Ni²⁺ được thực hiện theo mô tả ở phần 2.2.2.1.

Dịch protein thô và protein tinh sạch được chạy trên điện di SDS PAGE, đồng thời xác định nồng độ của enzyme tinh sạch theo phương pháp của Omura và Sato. (Hình 3.14). Enzyme tinh sạch có hoạt độ là 1120 $\mu\text{mol/L}$, trọng lượng phân tử 44,3 kDa như tính toán lý thuyết. Sản phẩm này chỉ có 1 đỉnh duy nhất ở bước sóng 450 nm khi bị khử bởi Na-dithionite và bão hoà trong CO, không có đỉnh ở bước sóng 420 nm. Do đó, enzyme này là enzyme ở trạng thái hoạt động.

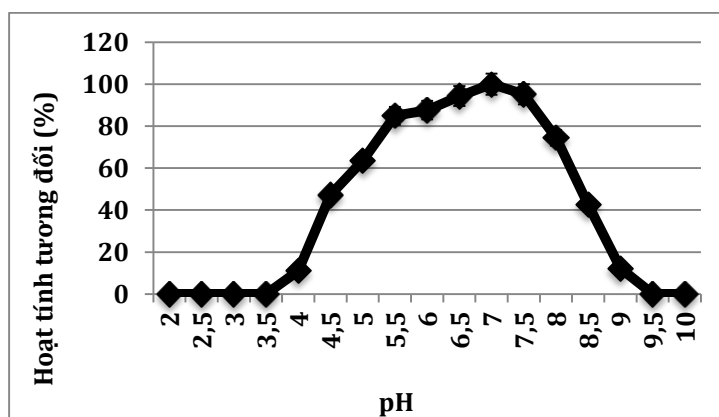


Hình 3.14A: Điện di đồ SDS-PAGE của dịch enzyme P450-T2 thô (1) và dịch enzyme tinh sạch (2). M: protein ladder 10-250 kDa (Biorad). **Hình 3.14B:** Phổ đặc trưng của cytochrome P450 của enzyme tái tổ hợp P450-T2 khi bị khử bởi Na-dithionite và bão hoá trong CO.

3.6. Xác định một số tính chất của P450-T2

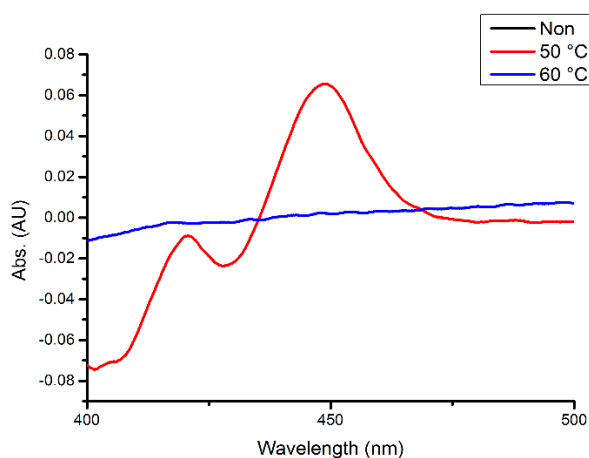
3.6.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH lên hoạt tính của enzyme tái tổ hợp

Dịch enzyme được hòa trong đệm 50 mM Kpi ở các pH khác nhau 2-10, ủ trong 15 phút rồi xác định hoạt độ của cytochrome P450 theo phương pháp của Omura và Sato (1964). Kết quả ở Hình 3.15 cho thấy hoạt tính cao nhất của P450-T2 ở pH 7.



Hình 3.15: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của P450-T2

Do mong muốn thu nhận được các P450 ưa nhiệt và/hoặc bền nhiệt nên chúng tôi xác định ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của enzyme từ 40-70°C trong 15 phút. Kết quả được trình bày ở Hình 3.16 cho thấy P450-T2 tái tổ hợp thể hiện hoạt tính cao nhất ở 50°C. Tuy nhiên khi nâng nhiệt độ lên 60°C thì P450-T2 mất hoàn toàn hoạt tính.

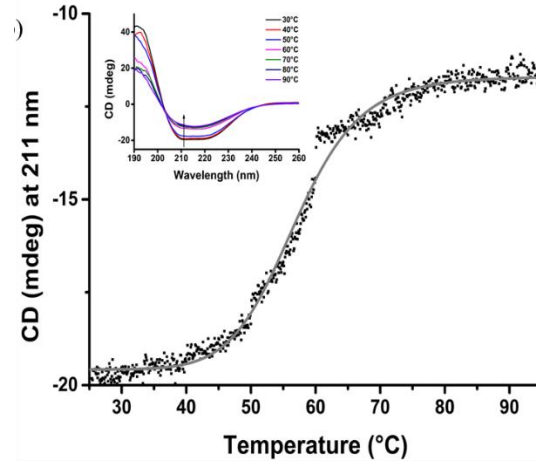


Hình 3.16: Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính P450-T2

3.6.2. Độ bền nhiệt và nhiệt độ biến tính toàn phần (T_m) của P450-T2

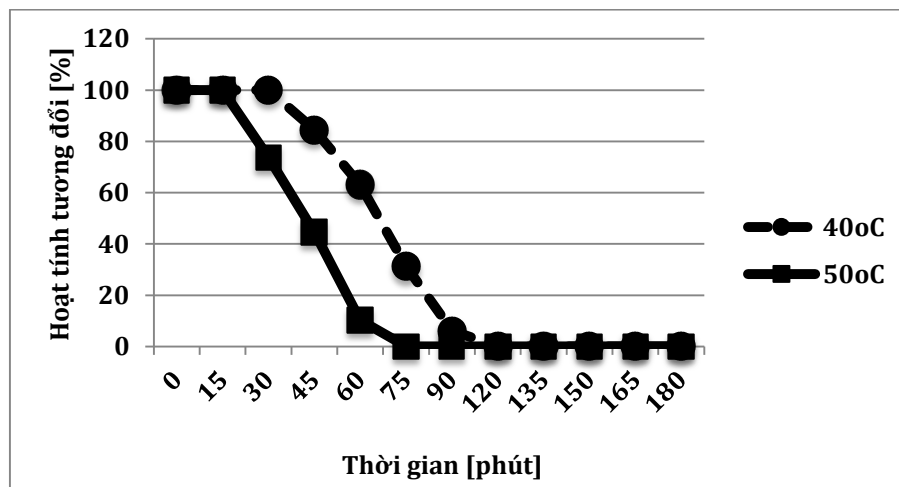
Trong bước dự đoán tính bền nhiệt của enzyme P450 thông qua phần mềm T_m index, trình tự axit amin của P450-T2 được dự đoán có hệ số T_m ở 60,2°C. Độ bền nhiệt của P450-T2 thực tế được xác định thông qua hai thông số T_m và T_{50} . Nhiệt độ nóng chảy của P450-T2 được đo bằng phổ lưỡng sắc tròn - CD.

Kết quả được thể hiện ở Hình 3.17 cho thấy nhiệt độ nóng chảy của P450-T2 là $56,8^{\circ}\text{C} \pm 0,08$ ($R^2 = 0,99$), gần với giá trị dự đoán. Ở 50°C , tín hiệu CD bị giảm không đáng kể so với phổ CD của enzyme ở 30°C nhưng khi nâng nhiệt độ lên $>50^{\circ}\text{C}$, enzyme cytochrome P450 được biểu hiện bị mất cấu trúc bậc 2. Điều này được thể hiện rõ ràng hơn tại nhiệt độ 60°C .



Hình 3.17: Đường cong biểu diễn các giá trị hấp thụ ở bước sóng 211 nm của P450-T2 khi thay đổi nhiệt độ từ $30-90^{\circ}\text{C}$. Điểm giữa đường cong thể hiện sự thay đổi trạng thái của các chuỗi α từ trạng thái gấp nếp sang duỗi xoắn. Giá trị nhiệt độ tương ứng với điểm giữa của đường cong chính là hệ số nhiệt độ nóng chảy của protein.

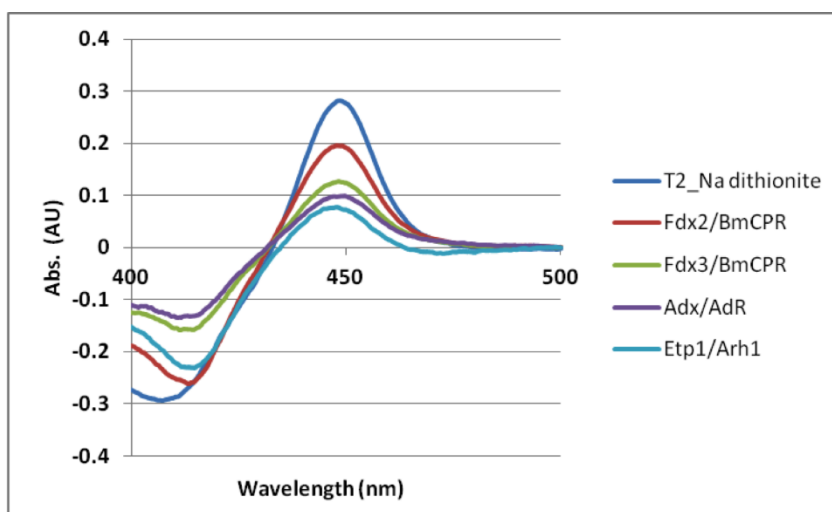
Đồng thời, dịch enzyme được hòa trong đệm 50 mM Kpi ở pH 7 và được ủ ở $40-50^{\circ}\text{C}$. Cứ 15 phút lại lấy mẫu đo hoạt tính để xác định thời gian biến tính 50%. Kết quả được trình bày ở Hình 3.18 cho thấy giá trị T_{50} của P450-T2 là 50 phút ở 50°C . Kết quả từ Hình 3.16, 3.17 và 3.18 có thể tạm kết luận P450-T2 không phải là enzyme bền nhiệt nhưng là enzyme ưa nhiệt khi nó có thể hoạt động ở nhiệt độ $40-50^{\circ}\text{C}$, cao hơn so với hầu hết các P450 hiện nay chỉ hoạt động ở ngưỡng $30-37^{\circ}\text{C}$.



Hình 3.18: Đường cong biểu diễn biến thiên hoạt tính P450-T2 ở 40 và 50°C theo thời gian.

3.7. Redox partner thích hợp trong chuỗi truyền điện tử của P450-T2

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi không có thông tin về FdR và Fdx tự nhiên của P450-T2, do đó chúng tôi thử nghiệm tính tương thích của P450-T2 với một số hệ thống FdR/Fdx có sẵn tại Khoa Hoá sinh, Trường Đại học Tổng hợp Saarland (CHLB Đức) bao gồm (i) adrenodoxin (Adx) rút gọn (4-108) và adrenodoxin reductase (AdR) của người; (ii) ferredoxin reductase (BmCPR), ferredoxin Fdx 2 của *Bacillus megaterium*, ferredoxin reductase (BmCPR), ferredoxin Fdx 3 của *Bacillus megaterium*, ferredoxin reductase (arh1), ferredoxin (etp1) của nấm men với tỷ lệ nồng độ P450:Fdx:FdR là 1:20:3.



Hình 3.19: Sàng lọc các hệ redox partner thích hợp cho P450-T2

Kết quả ở Hình 3.19 cho thấy P450-T2 có thể tương tác thích hợp nhất với hệ Fdx2/BmCPR của *B. megaterium* và cũng có thể tương tác với cả 3 hệ ferredoxin reductase/ ferredoxin khác

3.8. Phổ cơ chất tiềm năng của P450-T2

Cơ chất tiềm năng của P450-T2 được đánh giá dựa trên sự thay đổi phổ hấp thụ cực đại UV-Vis của P450 từ dạng *low-spin* (hấp thụ cực đại ở 415-417 nm) khi không có mặt cơ chất chuyển thành dạng *high-spin* (hấp thụ cực đại ở 390-394 nm) khi có mặt cơ chất.

Bảng 3.3: Sàng lọc cơ chất của P450-T2 dựa trên sự thay đổi UV-Vis từ trạng thái LS sang trạng thái HS.

Hợp chất	Thay đổi UV-Vis từ dạng LS sang dạng HS
Caffeic	+
Citrinin	-
L-Mimosine	+
Piceatamol	-
L-Resveratro	-
Butein	-
Emodin	+

Luteolin	+
Morine	+
Isoscooletine	+
axit Nalixic	-
Scopoletin	+

KẾT LUẬN

1. Tách chiết được DNA metagenome của khu hệ vi sinh vật suối nước nóng Bình Châu có chất lượng cao: nồng độ DNA là 139,3 ng/ μ l, $A_{260}:A_{280}$ đạt 1,84. Giải trình tự DNA metagenome suối nước nóng Bình Châu bằng máy giải trình tự gen thế hệ mới Hiseq Illumina thu được bộ dữ liệu sạch 9.4 GB. Xây dựng được bộ cơ sở dữ liệu của những gen liên quan đến họ cytochrome P450 bao gồm 68 gen tiềm năng mã hóa cytochrome P450, trong đó 38 gen hoàn chỉnh, 14 gen thiếu mã mở đầu, 9 gen thiếu mã kết thúc và 7 gen thiếu cả hai đầu.
2. Biểu hiện được gen mã hoá P450-T2 thuộc họ CYP203A1 trong *E. coli* C43(DE3) đạt nồng độ 541 nmol/L. Tinh sạch được enzyme tái tổ hợp bằng hệ thống sắc ký IMAC, enzyme tinh sạch có nồng độ 1120 μ mol/L. Xác định được một số tính chất của P450-T2 tái tổ hợp: pH_{opt} ở 7, T_m ở $56,8^{\circ}C \pm 0,08$ ($R^2=0.99$), T_{50} của P450-T2 là 50 phút ở $50^{\circ}C$. P450-T2 không phải là enzyme bền nhiệt nhưng là enzyme ưa nhiệt.
3. P450-T2 có thể nhận điện tử được từ một số redox partner khác nhau để khởi động chuỗi truyền điện tử bao gồm Adx (4-108)/AdR của người; Fdx2/BmCPR, Fdx3/BmCPR của *B. megaterium*, arh1/etp1 của nấm men.
4. Phổ cơ chất tiềm năng của P450-T2 là các hợp chất vòng thơm đa dạng, bao gồm: axit caffeic, mimosine, isoscooletine, scopoletine, emodin, luteolin, và morine.

KIẾN NGHỊ

1. Chuyển hoá các cơ chất tiềm năng in vitro
2. Phân tích sản phẩm của quá trình chuyển hoá in vitro bằng các kỹ thuật phù hợp