

Tạo tế bào vi khuẩn *Escherichia coli* biểu hiện tái tổ hợp enzyme acyl thioesterase 2 (ALT2) có khả năng tổng hợp các 2-methylketone chuỗi carbon ngắn và trung bình

- Khuất Lê Uyên Vy
- Đỗ Phương Thảo
- Nguyễn Thị Hồng Thương

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 12 tháng 08 năm 2015)

TÓM TẮT

2-Methylketone là nhóm hợp chất hữu cơ có nhiều ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm với vai trò là chất tạo mùi, tạo hương. Một số methylketone được tìm thấy trong thực vật có vai trò như chất dẫn dụ sinh học và thuốc trừ sâu tự nhiên. Đặc biệt, gần đây methylketone được xem là một nguồn hợp chất hứa hẹn cho việc sản xuất năng lượng sinh học trong tương lai vì chúng có chỉ số kích nổ cetane cao, có tính ưa nước kém hơn và nhiệt độ nóng chảy thấp hơn các acid béo hiện đang được sử dụng nhiều trong sản xuất dầu diesel sinh học. Thêm vào đó, các methylketone có chuỗi carbon ngắn có nhiệt độ nóng chảy thấp hơn so với methylketone chuỗi carbon dài. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *Escherichia coli* C41(DE3) gen mã hóa enzym acyl thioesterase 2 (ALT2) được phân lập từ *Arabidopsis thaliana*. Khi được biểu hiện tái tổ

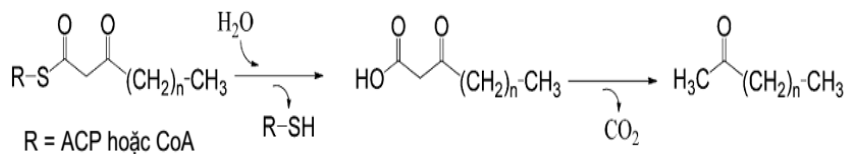
hợp trong tế bào vi khuẩn *E. coli* C41(DE3), enzyme ALT2 chủ yếu sử dụng cơ chất 3-ketoacyl-ACP, những hợp chất trung gian trong con đường chuyển hóa acid béo diễn ra trong tế bào vi khuẩn, để tổng hợp các 3-ketoacid. 3-Ketoacid là những hợp chất không bền, có thể bị decarboxyl hóa thành hợp chất methylketone tương ứng có chiều dài chuỗi carbon ngắn hơn một nguyên tử carbon. Các hợp chất methylketone thoát ra từ dịch môi trường nuôi cấy được ly trích bằng hexane và phân tích thành phần bằng kỹ thuật sắc ký khí với đầu dò FID (GC-FID). Kết quả cho thấy khi được nuôi cấy cảm ứng với IPTG 0,25 mM tại nhiệt độ 37 °C trong 3,5 giờ tế bào vi khuẩn *E. coli* C41(DE3) biểu hiện tái tổ hợp enzyme ALT2 có khả năng sản sinh ra các hợp chất 2-methylketone chuỗi carbon ngắn và trung bình bao gồm 2-nonanone (9C), 2-undecanone (11C) và 2-tridecanone (13C).

Từ khóa: 2-methylketone, acyl thioesterase 2 (ALT2), *Arabidopsis thaliana*, vector pETDuet-1, *E. coli* C41(DE3), sắc ký khí với đầu dò FID (GC-FID).

MỞ ĐẦU

2-Methylketone là nhóm hợp chất hữu cơ mang nhóm định chức ketone ở nguyên tử carbon thứ hai. Nhóm hợp chất này có nhiều ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp thực phẩm và mỹ phẩm với vai trò là chất tạo hương [1]. Một số 2-methylketone được tìm thấy trong thực vật có vai trò như chất dẫn dụ sinh học và thuốc trừ sâu tự nhiên [2, 3]. Những năm gần đây, methylketone bắt đầu nhận được nhiều sự quan tâm của các nhà nghiên cứu năng lượng sinh học vì các hợp chất này có trị số kích nổ cetane cao, được xem là một trong những nguồn năng lượng có thể tái sinh mới trong tương lai. Dựa trên cơ sở dữ liệu trình tự bộ gen và dữ liệu EST đã được công bố ở một số loài thực vật, những năm gần đây các nhà khoa học đã xác định được các gen mã hóa cho enzyme tham gia trong con đường sinh tổng hợp methylketone ở thực vật. Năm 2010, Yu và các cộng sự [4] đã

xác định được hai enzyme methylketone synthase 2 (ShMKS2) và methylketone synthase 1 (ShMKS1) tham gia trong con đường sinh tổng hợp methylketone ở loài cà chua hoang dại *Solanum habrochaites*. ShMKS2 có hoạt tính 3-ketoacyl-ACP thioesterase xúc tác sự thủy phân liên kết thioester của 3-ketoacyl-ACP (một hợp chất trung gian trong con đường sinh tổng hợp acid béo) thành 3-ketoacid. ShMKS1 có hoạt tính 3-ketoacid decarboxylase, xúc tác sự decarboxyl hóa các 3-ketoacid thành các methylketone có chiều dài chuỗi carbon ngắn hơn một nguyên tử carbon (Hình 1). Ngoài ra, 3-ketoacid là những hợp chất không bền, có thể bị decarboxyl hóa ở 75 °C thành các hợp chất methylketone, một lượng nhỏ 3-ketoacid cũng bị decarboxyl hóa ở nhiệt độ thường.



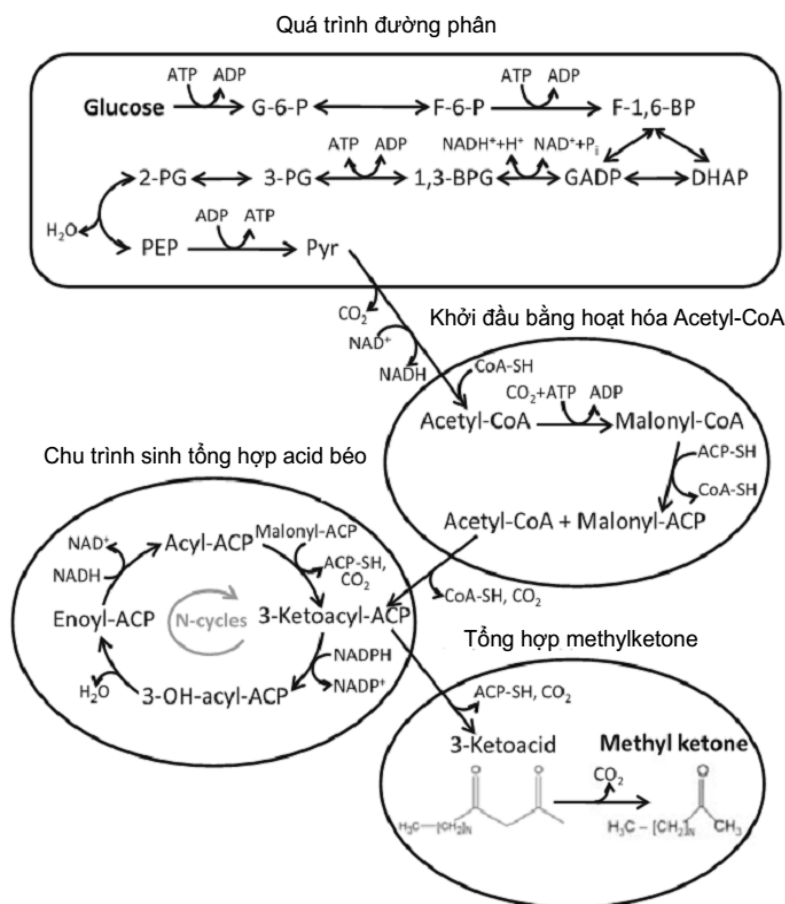
Hình 1. Sự tổng hợp methylketone [4].

ShMKS2 hoạt động hiệu quả nhất trên cơ chất 3-ketomyristoyl-ACP (C14) và 3-ketolauroyl-ACP (C12) tạo thành 3-ketoacid tương ứng là 3-ketomyristic acid (C14) và 3-ketolauric acid (C12), vì vậy methylketone được tổng hợp trong lông tiết của cà chua hoang dại cũng như trong dịch môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* siêu biểu hiện ShMKS2 và ShMKS1 chủ yếu bao gồm 2-tridecanone (13C) và 2-undecanone (11C) [4]. Hỗn hợp 2-tridecanone (C13) và 2-undecanone (C11) với tỉ lệ 1:1 dựa trên khối lượng có chỉ số kích nổ cetane cao (58,4) [5], tuy nhiên, nhiệt độ nóng chảy của chúng cũng tương đối cao là một điều bất lợi cho đặc tính của nhiên liệu nhiệt lạnh. Do các methylketone chuỗi

ngắn hơn hoặc có sườn carbon mang một liên kết đôi có nhiệt độ nóng chảy thấp hơn nhiều so với methylketone chuỗi dài hơn hoặc có sườn carbon bão hòa với cùng chiều dài chuỗi, các hướng nghiên cứu mới hiện nay đang tập trung vào việc tối ưu hóa các đặc tính của nhiên liệu bằng cách điều chỉnh chiều dài chuỗi hoặc mức độ không bão hòa trong sườn carbon của các hợp chất methylketone. Năm 2014, Pulsifer và cộng sự [6] đã phân lập được bốn gen thuộc họ acyl thioesterase từ *Arabidopsis thaliana* mã hóa cho các protein tương đồng 72-80 % với ShMKS2 và đặt tên lần lượt là acyl-lipid thioesterase 1 (*ALT1*), *ALT2*, *ALT3* và *ALT4*. Khi biểu hiện các gen này trong tế bào *E. coli* K27, là chủng khuyết gen

FadD – gen mã hóa enzyme acyl-CoA synthetase, các enzym ALT sử dụng cơ chất acyl-ACP để tạo thành các acid béo đa dạng về chiều dài chuỗi carbon (C8-C16), mức độ bão hòa của chuỗi và trạng thái oxy hóa. Đặc biệt, enzyme ALT2 có khả năng sử dụng cơ chất 3-ketoacyl-ACP để tổng hợp 3-ketoacid (acid béo có mang một nhóm chức ketone ở nguyên tử carbon thứ 3) chuỗi ngắn (8C, 10C) khi được biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* K27. Thêm vào đó, năm 2012, Auldreich và các cộng sự [7] đã chứng minh rằng ShMKS1G129W, dạng đột biến thay thế acid amine G (Glycine) tại vị trí 129 bằng acid amine W (Tryptophan) có hoạt động xúc tác hiệu quả gấp 44 lần so với ShMKS1 trên cơ chất 3-ketoacid chuỗi ngắn. Nhằm hướng tới việc tổng hợp được các methylketone chuỗi ngắn và trung bình ở quy

mô công nghiệp một cách chủ động, đáp ứng tiềm năng ứng dụng rộng rãi của nhóm hợp chất methylketone trong bảo vệ thực vật, trong công nghiệp tạo hương và trong lĩnh vực sản xuất năng lượng sinh học, chúng tôi mong muốn đưa con đường sinh tổng hợp methylketone chuỗi ngắn và trung bình vào tế bào vi khuẩn *E. coli* bằng cách biểu hiện đồng thời hai gen *ALT2* và *ShMKS1G129W* vào vector pETDuet-1 chứa hai vùng tạo dòng. Trong đó, gen *ShMKS1G129W* sẽ được tạo dòng vào vùng MSC1 và gen *ALT2* sẽ được tạo dòng vào vùng MSC2 của vector pETDuet-1. Như vậy, việc tạo dòng gen *ALT2* vào vùng MSC2 của vector pETDuet-1 là bước đầu tiên cần thực hiện và là nội dung chính của bài báo này.



Hình 2. Con đường sinh tổng hợp methylketone trong tế bào *E.coli* từ cơ chất ban đầu là glucose [8].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi sinh vật và vector

Vector pUNI51 mang cDNA mã hóa cho gen ALT2 (426 bp) từ *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Biological Resource Center). Vector pETDuet-1 thuộc hệ thống vector Duet (Novagen) có mang gen kháng kháng sinh ampicillin.

Chủng *E. coli* TOP10 (Invitrogen) được dùng để nhân bản plasmid. Chủng *E. coli* C41(DE3) (Invitrogen) được dùng để tạo dòng và biểu hiện protein mục tiêu với sự cảm ứng của IPTG. Tế bào khả nạp *E. coli* TOP10 và *E. coli* C41(DE3) được tạo ra bằng phương pháp CaCl₂ lạnh.

Phương pháp PCR kết hợp A-tailing

Phương pháp PCR được sử dụng để tổng hợp đoạn DNA mang gen ALT2 có gắn trình tự cắt giới hạn NdeI ở đầu 5' và XhoI ở đầu 3' (được gọi là đoạn NdeI-ALT2-XhoI trong bài báo này). Bước A-tailing được kết hợp ở cuối phản ứng PCR giúp gắn thêm Adenine vào đầu 5' của hai mạch của sản phẩm PCR.

Gen ALT2 được khuếch đại bằng Taq DNA Polymerase (BioLabs) từ khuôn là vector pUNI51 mang trình tự mã hóa ALT2. Mỗi xuôi (NdeI-ALT2-F: 5'-CATATGGGTGGGTTCCATGAG-3') và mỗi ngược (XhoI-ALT2-R: 5'-CTCGAGATCGACCAAGTGTGACA-3') được thiết kế có gắn thêm trình tự nhận biết của enzym cắt giới hạn NdeI và XhoI nhằm hỗ trợ việc chèn đoạn gen ALT2 vào vùng MCS2 của vector pETDuet-1 ở các bước sau. Để thu nhận hiệu quả đoạn NdeI-ALT2-XhoI, chúng tôi tiến hành gắn đoạn NdeI-ALT2-XhoI này vào vector pGEM-T (Promega) trước, và do đó cần gắn thêm Adenine vào đầu 5' của hai mạch đoạn DNA này thông qua phản ứng A-tailing được kết hợp vào giai đoạn kéo

dài ở bước cuối cùng trong phản ứng PCR. Chi tiết chu trình nhiệt cho phản ứng PCR kết hợp A-tailing như sau: 95 °C/30 giây; 36 x (95 °C/20 giây, 52 °C/20 giây, 72 °C/40 giây); bổ sung thêm 0,2 µl Taq DNA Polymerase và 0,2 µl dATP (10 mM); 72 °C/5 phút; 4 °C/∞.

Phương pháp thu hồi và tinh sạch DNA từ gel agarose

Sản phẩm của phản ứng PCR kết hợp A-tailing được chạy điện di trên gel agarose 1 %, đoạn NdeI-ALT2-XhoI có mang Adenine ở đầu 5' của hai mạch được tinh sạch từ gel bằng bộ kit Expin™ Gel SV (GenAll) và được bảo quản ở -20 °C để làm nguyên liệu tạo dòng ở các bước sau.

Phương pháp gắn đoạn NdeI-ALT2-XhoI vào vector pGEM-T

Đoạn NdeI-ALT2-XhoI có mang Adenine ở đầu 5' của hai mạch được chèn vào vector pGEM-T thông qua phản ứng nối được xúc tác bởi enzyme T4 DNA ligase, tạo plasmid pGEM-T-NdeI-ALT2-XhoI. Hỗn hợp phản ứng nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau đó, thể biến nạp *E. coli* TOP10/pGEM-T-NdeI-ALT2-XhoI được nuôi cấy trên đĩa môi trường LB rắn (10 g/L tryptone, 5 g/L cao nấm men và 5 g/L muối NaCl) có bổ sung ampicillin với nồng độ cuối là 100 µg/mL. Thu nhận các khuẩn lạc đơn mọc lên, tiến hành phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi NdeI-ALT2-F và XhoI-ALT2-R, với chu trình nhiệt 95 °C/30 giây; 36 x (95 °C/20 giây, 52 °C/20 giây, 72 °C/40 giây); 72 °C/5 phút; 4 °C/∞ để sàng lọc các khuẩn lạc của dòng tế bào *E. coli* TOP10 mang plasmid pGEM-T-NdeI-ALT2-XhoI. Dòng tế bào *E. coli* TOP10/pGEM-T-NdeI-ALT2-XhoI được nuôi nhân sinh khối và plasmid pGEM-T-NdeI-ALT2-

XhoI được tách chiết bằng bộ kit *StrataPrep Plasmid Miniprep Kit* (Agilent Technologies). Plasmid pGEM-T-NdeI-ALT2-XhoI được cắt mở vòng với enzyme NdeI và được điện di song song với thang DNA chuẩn 1 kb trên gel agarose 1 % để kiểm tra kích thước của plasmid.

Phương pháp tạo dòng gen ALT2 vào vector pETDuet-1

Plasmid pGEM-T-NdeI-ALT2-XhoI được cắt bởi hai enzyme cắt giới hạn NdeI và XhoI. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1 %. Đoạn NdeI-ALT2-XhoI được thu hồi và tinh sạch từ gel agarose, sau đó được nối với vector pETDuet-1 đã được cắt mở vòng với NdeI và XhoI. Hỗn hợp

Phương pháp biểu hiện ALT2 trong tế bào vi khuẩn *E. coli* C41(DE3)

Plasmid pETDuet-1-ALT2 được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* C41(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Khuẩn lạc đơn của dòng tế bào *E. coli* C41(DE3) đã được biến nạp pETDuet-1-ALT2 được cho vào 1 mL môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin với nồng độ cuối là 100 µg/mL và được nuôi cấy lắc hoạt hóa qua đêm. Cấy chuyển 0,1 mL dịch nuôi cấy sang 30 mL môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin với nồng độ cuối là 100 µg/ml và tiếp tục nuôi cấy ở 37 °C với tốc độ lắc 200

vòng/phút. Khi OD₆₀₀ đạt 0,6-1, bổ sung IPTG đến nồng độ cuối là 0,25 mM, và tiếp tục nuôi cấy lắc 200 vòng/phút ở 37 °C trong 3,5 giờ. Dịch nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* C41(DE3) mang vector pETDuet-1-ALT2 được thu nhận cho bước phân tích tiếp theo.

Thí nghiệm đối chứng được thực hiện tương tự với tế bào *E. coli* C41(DE3) được biến nạp vector pETDuet-1 trống, không mang gen ALT2.

phản ứng nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10. Các bước sàng lọc dòng tế bào *E. coli* TOP10 mang plasmid pETDuet-1-ALT2 và phương pháp tách chiết và kiểm tra kích thước plasmid pETDuet-1-ALT2 được thực hiện tương tự như mô tả trong mục “Phương pháp gắn đoạn NdeI-ALT2-XhoI vào vector pGEM-T”. Trình tự nucleotide của gen ALT2 trên vector pETDuet-1-ALT2 được xác định theo phương pháp cải tiến trên máy BigDye® Terminator v3.1 của công ty First BASE, Malaysia với mỗi T7 Terminator. Kết quả giải trình tự được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit để phát hiện các lỗi bất cập do enzym DNA Taq polymerase tạo ra trong quá trình PCR.

Phương pháp xác định thành phần methylketone trong dịch nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-ALT2

30 mL dịch môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-ALT2 được đun nóng ở 75 °C trong 30 phút và 1 mL hexane được thêm vào để chiết xuất các hợp chất methylketone vào pha hexane. Thành phần methylketone hòa tan trong pha hexane được phân tích bằng phương pháp sắc ký khí (GC). Hệ thống GC Agilent 6890 N được sử dụng với cột HP innowax, 30 m x 250 µm x 0,25 µm (chịu nhiệt độ cao nhất là 250 °C) và đầu dò FID. Chương trình nhiệt độ chạy trong 31 phút như sau: nhiệt độ tiêm (giải hấp) 250 °C, nhiệt độ đầu dò 250 °C, nhiệt độ đầu 50 °C, tăng 15 °C/1 phút đến 160 °C, tăng 5 °C/1 phút đến 240 °C giữ trong 10 phút. Các hợp chất methylketone thoát ra từ dịch nuôi cấy được xác định thông qua việc so sánh thời gian lưu với các chất chuẩn 2-nonanone (9C), 2-undecanone (11C), 2-tridecanone (13C) và 2-pentadecanone (Sigma-Aldrich).

Thí nghiệm đối chứng được thực hiện tương tự với dịch môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli*

C41(DE3) đã được biến nạp vector pETDuet-1 trống, không mang gen *ALT2*.

Kiểm tra sự biểu hiện gen *ALT2* bằng phương pháp điện di SDS-PAGE

10 ml dịch môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-*ALT2* được cảm ứng biểu hiện gen *ALT2* bằng IPTG được ly tâm thu sinh khối. Hòa tan sinh khối trong 500 μ L đệm ly giải (100 mM NaCl; 10 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 % glycerol; pH 8) và phá vỡ màng tế bào bằng sóng siêu âm. Dịch sau khi phá vỡ màng tế bào được chia làm hai phần: phần 1 (100 μ L) được sử dụng làm dịch protein tổng số, phần 2 (300 μ L) được ly tâm. Sau khi ly tâm, phần dịch nổi chứa protein

tan, còn phần tủa chứa các protein không tan được huyền phù lại trong 300 μ L đệm ly giải. Tiến hành điện di SDS-PAGE dung dịch chứa protein tổng số, protein tan, protein không tan để phân tích sự biểu hiện gen *ALT2* trong tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-*ALT2*.

Thí nghiệm đối chứng được thực hiện tương tự với dịch môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* C41(DE3) đã được biến nạp vector pETDuet-1 trống, không mang gen *ALT2* và dịch môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-*ALT2* không được cảm ứng biểu hiện gen *ALT2* bằng IPTG.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tổng hợp đoạn gen *ALT2* có gắn trình tự cắt giới hạn *NdeI* ở đầu 5' và *XhoI* ở đầu 3' (*NdeI-ALT2-XhoI*)

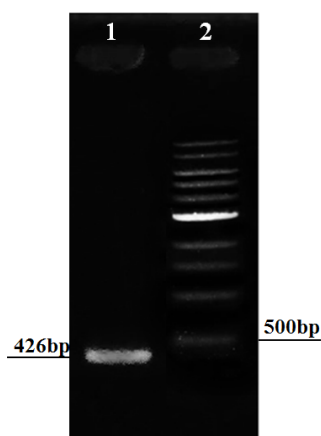
Kết quả khuếch đại đoạn DNA chứa trình tự mã hóa *ALT2* có gắn thêm trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn *NdeI* ở đầu 5' và *XhoI* ở đầu 3' bằng kỹ thuật PCR kết hợp A-tailing (Hình 3) cho thấy ở giếng 1 xuất hiện một vạch nằm dưới vạch 500 bp của thang chuẩn và được dự đoán là tương đương với kích thước 426 bp của gen *ALT2*. Đoạn *NdeI-ALT2-XhoI* đã được gắn thêm Adenine vào đầu 5' của hai mạch được chèn vào vector pGEM-T có mang Thymidine đầu 3' của

hai mạch nhờ sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase. Hỗn hợp phản ứng nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10. Kết quả sàng lọc dòng tế bào TOP10 có mang plasmid pGEM-T-*NdeI-ALT2-XhoI* bằng phản ứng PCR khuẩn lạc (Hình 4) cho thấy ở giếng 1 xuất hiện 1 vạch có kích thước tương đương với kích thước 426 bp của gen *ALT2* (dưới vạch 500 bp của thang chuẩn),

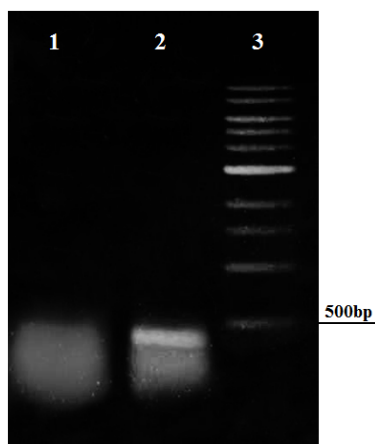
chứng tỏ khuẩn lạc được sử dụng tương ứng với dòng tế bào TOP10 mang plasmid pGEM-T-*NdeI-ALT2-XhoI*. Ngược lại, ở giếng 2 không xuất hiện một vạch nào, chứng tỏ khuẩn lạc được sử dụng tương ứng với dòng tế bào vi khuẩn không được biến nạp plasmid pGEM-T-*NdeI-ALT2-XhoI*.

Plasmid pGEM-T-*NdeI-ALT2-XhoI* được cắt mở vòng với enzyme cắt giới hạn *NdeI*, và được chạy điện di trên gel agarose 1 %. Kết quả điện di (Hình 5) cho thấy có 1 vạch (giếng 1) tại vị trí tương ứng giữa vạch 3000 bp và 4000 bp của thang chuẩn DNA (giếng 2) phù hợp với kích thước dự đoán của plasmid pGEM-T-*NdeI-ALT2-XhoI* là khoảng 3432 bp. Như vậy, chúng tôi đã gắn được đoạn *NdeI-ALT2-XhoI* vào vector pGEM-T tạo plasmid pGEM-T-*NdeI-ALT2-XhoI*.

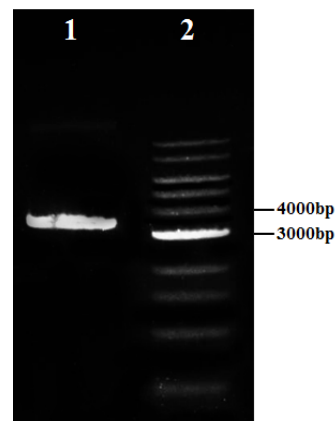
Plasmid pGEM-T-*NdeI-ALT2-XhoI* được cắt bởi hai enzym cắt giới hạn *NdeI* và *XhoI*. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1 %. Đoạn *NdeI-ALT2-XhoI* được thu hồi và tinh sạch từ gel agarose.



Hình 3. Kết quả phản ứng PCR kết hợp A-tailing khuếch đại gen *ALT2*. 1, sản phẩm PCR; 2, thang chuẩn DNA 1kb



Hình 4. Kết quả sàng lọc dòng tế bào TOP10/pGEM-T-NdeI-*ALT2*-XhoI bằng phản ứng PCR khuẩn lạc. 1, dòng tế bào TOP10 không được biến nạp plasmid pGEM-T-NdeI-*ALT2*-XhoI; 2, dòng tế bào TOP10 được biến nạp plasmid pGEM-T-NdeI-*ALT2*-XhoI; 3, thang chuẩn DNA 1 kb



Hình 5. Kết quả kiểm tra kích thước plasmid pGEM-T-NdeI-*ALT2*-XhoI. 1, plasmid pGEM-T-NdeI-*ALT2*-XhoI được cắt mở vòng bằng NdeI; 2, thang chuẩn DNA 1 kb

Tạo dòng gen *ALT2* vào vector pETDuet-1

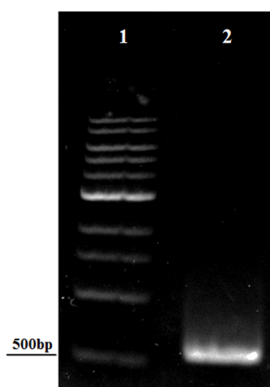
Đoạn trình tự *NdeI*-*ALT2*-*XhoI* được thu nhận bằng cách cắt plasmid pGEM-T-*NdeI*-*ALT2*-*XhoI* bằng cặp enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *XhoI*. Đoạn trình tự này sau đó được nối với vector pETDuet-1 đã được cắt mở vòng với hai enzyme cắt giới hạn trên. Hỗn hợp phản ứng nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* TOP10. Kết quả sàng lọc dòng tế bào *E. coli* TOP10 mang plasmid pETDuet-1-*ALT2* được thực hiện bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với mỗi xuôi DuetUP2 và mỗi ngược *XhoI*-*ALT2*-R (Hình 6) cho thấy ở giếng 2 xuất hiện 1 vạch có kích thước tương đương với kích thước dự đoán là 540 bp, chứng tỏ khuẩn lạc được sử dụng

là của dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* TOP10 được biến nạp thành công

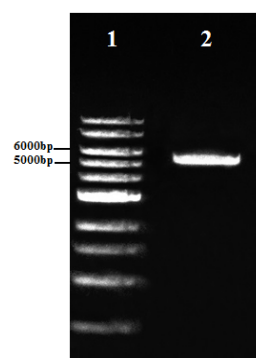
plasmid pETDuet-1-*ALT2*.

Plasmid pETDuet-1-*ALT2* được cắt mở vòng với enzyme cắt giới hạn *NdeI*, và được chạy điện di trên gel agarose 1 %. Kết quả điện di (Hình 7) cho thấy có 1 vạch (giếng 1) tại vị trí tương ứng giữa vạch 5000 và 6000 bp của thang chuẩn (giếng 2) phù hợp với kích thước dự đoán của plasmid pETDuet-1-*ALT2* là khoảng 5789 bp. Kết quả giải trình tự gene *ALT2* trong plasmid pETDuet-1-*ALT2* (Hình 8) cho thấy trong quá trình tạo dòng gene *ALT2* vào vector pETDuet-1 đã không xuất hiện đột biến nào làm thay đổi trình tự gene *ALT2*.

Như vậy, chúng tôi đã tạo dòng thành công gene *ALT2* từ *Arabidopsis thaliana* vào vùng MCS2 của vector pETDuet-1.



Hình 6. Kết quả sàng lọc dòng tế bào *E. coli* TOP10/pETDuet-1-ALT2 bằng phản ứng PCR khuôn lạc. 1, thang chuẩn DNA 1 kb; 2, sản phẩm PCR khuôn lạc của dòng tế bào *E. coli* TOP10 được biến nạp thành công plasmid pETDuet-1-ALT2



Hình 7. Kết quả kiểm tra kích thước vector pETDuet-1-ALT2. 1, thang chuẩn DNA 1 kb; 2, plasmid pETDuet-1-ALT2 được cắt mở vòng bằng *NdeI*

```

      DuetUP2 Primer          T7 promotor-2          lac operator
      TTGTACACGGCCGCATAATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAA
      CAATTCCCATCTTAGTATATTAGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGGGTGGGTTC
      ATGAGATTGAACTTAAAGTTCGTGATTATGAATTGGATCAGTTTGGTGTGTGTAACAATG
      CTGTTTACGCAAACACTACTGCCAACACGGTCGACACGAGTTTATGGATAGTATCGGTATC
      AACTGTAATGAAGTATCCCGTTCTGGTGGAGCCTTGGCAATTCCTGAGTTAACAATAAA
      GTTCCTTGCACCTTACGTAGTGGATGTAGGTTTGTGGTGAAAACGAGGATATCGGGGA
      TATCTTTGGTGCGCATTACTTTGAACAGTTCATCTTTAAACTTCCAAATCAAGAGCCTA
      TTTTGGAGGCAAAAGGAACGGCTGTGTGGCTTGACAACAAGTACCGGCCTACTCGTGTG
      CCATCTCATGTACGCTCATATTTTGGTCACTTCCAGTGTCAACACTTGGTTCGATCTCGAG
      TCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCGAAATTTGAACGCCAGCACATGGACTCGTCTACTAGCGC

```

S.Tag

Hình 8. Kết quả giải trình tự plasmid pETDuet-1-ALT2 với mỗi T7 Terminator. Đoạn trình tự được in đậm là trình tự mã hóa protein ALT2 được tạo dòng vào vector pETDuet-1

Biểu hiện tái tổ hợp protein ALT2 trong tế bào vi khuẩn *E. coli* C41(DE3) và xác định thành phần 2-methylketone thoát ra từ dịch nuôi cấy

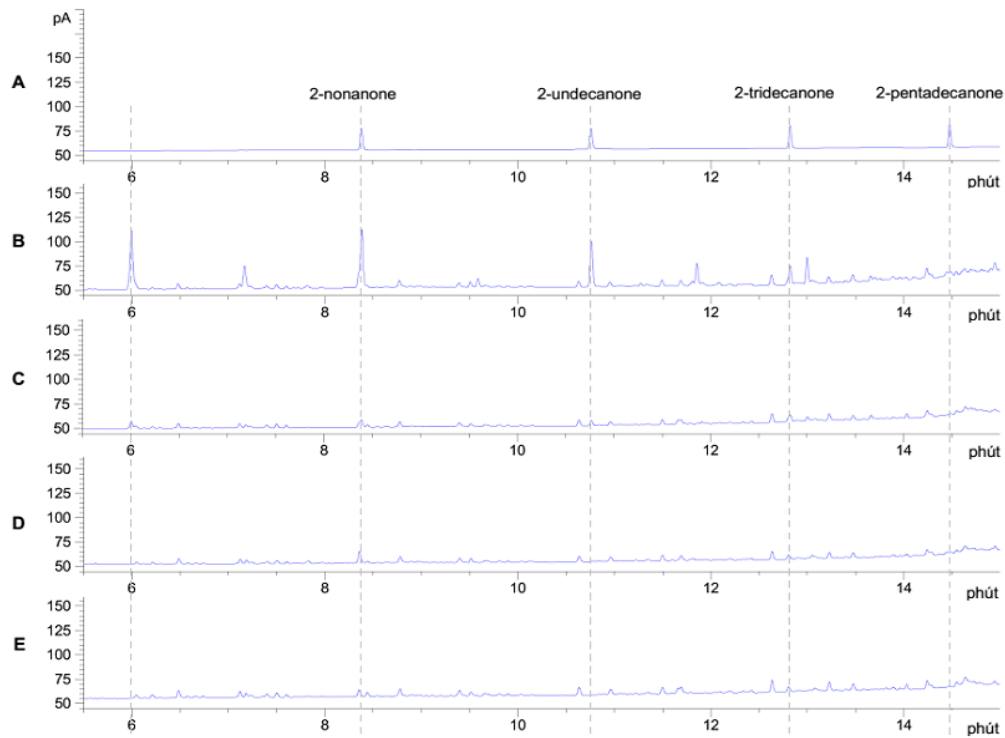
Plasmid pETDuet-1-ALT2 được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* C41(DE3). Dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* C41(DE3) có mang plasmid pETDuet-1-ALT2 có khả năng mọc trên môi trường LB có bổ sung ampicillin sẽ được chọn để nuôi cấy cảm ứng biểu hiện tái tổ hợp protein ALT2 bằng IPTG. Kết quả ở Hình 9 cho thấy khi

đun nóng dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn *E. coli* C41(DE3) mang vector trống pETDuet-1 không chứa gen *ALT2*, chỉ có một lượng không đáng kể 2-nonanone (9C) và 2-tridecanone (13C) được phát hiện, đồng thời không phát hiện được sự thoát ra 2-undecanone (11C) (Hình 9D, E). Kết quả phân tích GC-FID cũng cho thấy không có sự khác biệt rõ ràng giữa sắc ký đồ mô tả các hợp chất methylketone thoát ra từ dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1 đã được xử lý ở 75 °C

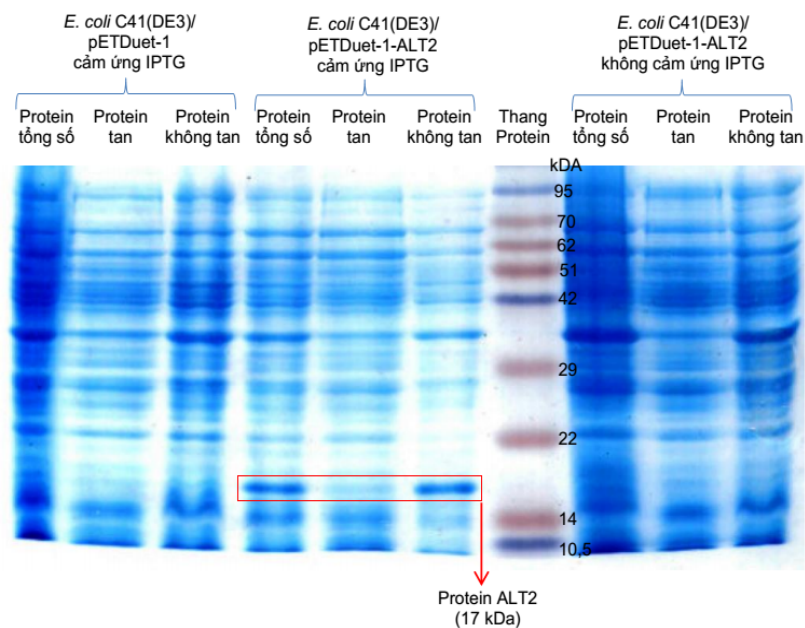
với dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1 chưa được xử lý nhiệt độ, đề nghị rằng không có hoặc có rất ít 3-ketoacid hiện diện trong dịch môi trường nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1. Những kết quả thu được từ thí nghiệm đối chứng này một lần nữa củng cố những dữ liệu thực nghiệm đã được công bố bởi Yu (2010) và Pulsifer (2014), chứng minh chủng vi khuẩn *E. coli* không được biến nạp gene mã hóa enzyme 3-ketoacyl-ACP thioesterase (ShMKS2 hoặc ALT2) không sinh ra hoặc chỉ tạo ra lượng không đáng kể các 3-ketoacid trong môi trường nuôi cấy. Trong khi đó, dịch môi trường nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3) có mang plasmid pET-Duet-1-ALT2 được cảm ứng biểu hiện tái tổ hợp protein ALT2 bằng IPTG khi được đun nóng ở 75 °C, sinh ra một lượng lớn các sản phẩm cuối methylketone chuỗi carbon ngắn và trung bình bao gồm 2-nonanone (9C), 2-undecanone (11C) và 2-tridecanone (13C) (Hình 9B) so với mẫu chưa được xử lý nhiệt độ (Hình 9C) và với mẫu đối chứng âm (Hình 9D). Sự hiện diện của 2-heptanone (7C) chưa được khẳng định trong thí nghiệm này do còn thiếu chất chuẩn tương ứng. Như vậy, ở tế bào vi khuẩn *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-ALT2, chính enzyme ALT2 đã sử dụng các cơ chất sẵn có trong tế bào vi khuẩn để tổng hợp và tiết ra môi trường nuôi cấy các 3-ketoacid và sự decarboxyl hóa các 3-ketoacid này ở nhiệt độ cao dẫn đến sự tạo thành các sản phẩm cuối methylketone tương ứng. Trong nghiên cứu của Pulsifer và cộng sự (2014), ALT2 được biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli* K27 khuyết gen *FadD*, gen mã hóa enzyme acyl-CoA synthetase [6]. Ở chủng vi khuẩn khuyết enzyme acyl-CoA synthetase, các acid béo tự do được tạo ra sẽ được tích lũy và phóng thích ra môi trường nuôi cấy thay vì được hoạt hóa thành acyl-CoA và phân hủy theo con đường β -oxy hóa. Nhóm nghiên cứu của Pulsifer đã sử dụng chủng vi khuẩn này

để biểu hiện các enzyme acyl-lipid thioesterase ALT nhằm gia tăng sự tiết ra môi trường nuôi cấy các acid béo tự do được tổng hợp bởi các enzyme ALT được khảo sát. Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu này sau đó đã chứng minh rằng ALT2 không thể hiện hoạt tính acyl-ACP thioesterase với cơ chất thử nghiệm lauroyl (12:0)-ACP như ALT1, 3 và 4 [6]. Như vậy, ý nghĩa của việc sử dụng chủng *E. coli* K27 khuyết gen *FadD* khi so sánh với việc sử dụng các dòng tế bào *E. coli* khác không mang đột biến gen trên làm tế bào chủ biểu hiện gene *ALT2* cũng chưa được thể hiện rõ qua những dữ liệu thực nghiệm được công bố bởi Pulsifer và cộng sự.

Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của protein ALT2 bằng phương pháp điện di SDS-PAGE cho thấy ở các mẫu protein tổng số và protein không tan thu nhận từ tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-ALT2 được cảm ứng biểu hiện bởi IPTG xuất hiện một vạch đậm và ở mẫu protein tan xuất hiện một vạch nhạt hơn nằm giữa vạch 14 và 22 kDa, phù hợp với kích thước dự đoán của protein ALT2 (17 kDa) trong khi chủng đối chứng *E. coli* C41(DE3) chứa vector pETDuet-1 không mang gene *ALT2* không cho vạch tương ứng ở vị trí trên. Bên cạnh đó, khi không được cảm ứng biểu hiện bởi IPTG, chủng *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-ALT2 không biểu hiện protein ALT2 này, chứng tỏ protein ALT2 chỉ được biểu hiện khi có sự cảm ứng của IPTG. Điều đáng chú ý trong kết quả chạy điện di phân tích protein SDS-PAGE là protein ALT2 đa số ở pha không tan và chỉ hiện diện rất ít ở pha tan mặc dù hoạt tính của enzyme ALT2 vẫn được thể hiện rõ qua kết quả phân tích sản phẩm cuối methylketone được tạo ra bằng kỹ thuật GC-FID (Hình 9). Những kết quả này sẽ cung cấp thêm cơ sở khoa học và minh chứng cho sự cần thiết tiến hành các thí nghiệm tối ưu hóa khả năng tổng hợp methylketone của chủng vi khuẩn trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 9. Sắc ký đồ mô tả các hợp chất methylketone thoát ra từ dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3) biểu hiện vector pETDuet-1 hoặc vector pETDuet-1-ALT2. A, các chất chuẩn methylketone. B, dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-ALT2 đã được xử lý ở 75 °C. C, dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1-ALT2 chưa được xử lý nhiệt độ. D, dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1 đã được xử lý ở 75 °C. E, dịch nuôi cấy tế bào *E. coli* C41(DE3)/pETDuet-1 chưa được xử lý nhiệt độ.



Hình 10. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện protein ALT2 bằng phương pháp điện di SDS-PAGE

KẾT LUẬN

Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, chúng tôi đã tạo thành công dòng tế bào *E. coli* C41(DE3) có mang vector tái tổ hợp pETDuet-1-ALT2. Dòng tế bào này biểu hiện tái tổ hợp enzyme acyl thioesterase 2 (ALT2) có khả năng

sử dụng cơ chất 3-ketoacyl-ACP được sinh ra trong con đường sinh tổng hợp acid béo của tế bào *E. coli* để tạo thành các 3-ketoacid chuỗi ngắn và trung bình. Sự tổng hợp protein ALT2 đã được kiểm chứng bằng điện di SDS-PAGE và các sản phẩm 3-ketoacid chuỗi ngắn và trung bình đã được xác định một cách gián tiếp thông qua xác định các hợp chất methylketone chuỗi ngắn và trung bình tương ứng được tạo thành sau khi đun nóng dịch

môi trường nuôi cấy ở nhiệt độ cao. Hiện nay, nhóm nghiên cứu đã và đang thực hiện biểu hiện gene *ShMKS2G129W* vào vùng MCS1 của vector tái tổ hợp pETDuet-1-ALT2 và sẽ khảo sát các điều kiện nuôi cấy và cảm ứng khác nhau nhằm tối ưu hóa khả năng sinh tổng hợp methylketone của chủng vi khuẩn, đặc biệt là các methylketone chuỗi ngắn hướng đến quy mô sản xuất lớn hơn cần cho các ứng dụng rộng rãi của nhóm hợp chất này.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.02-2013.35. Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn PTN Phân tích trung tâm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM đã hỗ trợ phân tích mẫu bằng kỹ thuật GC-FID.

Cloning and expression of the acyl thioesterase 2 (ALT2) gene in *Escherichia coli* for producing short- and medium-chain 2-methylketones

- Khuat Le Uyen Vy
- Do Phuong Thao
- Nguyen Thi Hong Thuong

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

2-Methylketones are organic compounds that are more widely used in the food industry and cosmetics. Some of methylketones found in plants act as pheromones and natural insecticides. Recently, methylketones have been recognized as strong candidates for the

production of renewable energy as they possess not only favourable cetane numbers but also lower hydrophilicity and melting points than fatty acids which have been used in biodiesel production. In addition, short chain methylketones have much lower

melting points than long chain methylketones. In this study, we cloned and expressed in *Escherichia coli* C41(DE3) cells a gene for acyl thioesterase 2 (ALT2) isolated from *Arabidopsis thaliana*. The ALT2 enzyme could hydrolyze 3-ketoacyl-ACP (also called β -ketoacyl-ACP) intermediates in the fatty acid biosynthetic pathway into the corresponding 3-ketoacid. The resulting 3-ketoacids are unstable compounds that will be decarboxylated to produce *n*-1

methylketones. Methylketones released in the growth medium of *E. coli* expressing ALT2 were extracted by hexane and analyzed by gas chromatography with the flame ionization detector (GC-FID). The results showed that the *E. coli* C41(DE3) cells expressing ALT2 recombinantly produced 2-nonanone (9C), 2-undecanone (11C) and 2-tridecanone (13C) in the spent medium when were induced with 0.25 mM IPTG at 37 °C for 3.5 hours.

Keywords: 2-methylketones, acyl thioesterase 2 (ALT2), *Arabidopsis thaliana*, pETDuet-1, *E. coli* C41(DE3), GC-FID.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. F.W. Forney, A.J. Markovetz, The biology of methyl ketones, *Journal of Lipid Research*, 12, 4, 383-395 (1971).
- [2]. M.S. Angela, D.T. Liane, L.J. Larry, (S)-2-pentadecyl acetate and 2-pentadecanone components of aggregation pheromone of *Drosophila busckii*, *Journal of Chemical Ecology*, 15, 11, 2577-2588 (1989).
- [3]. G.F. Antonious, Persistence of 2-tridecanone on the leaves of seven vegetables, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 73, 6, 1086-1093 (2004).
- [4]. G. Yu, T.T.H. Nguyen, Y. Guo, I. Schauvinhold, M.E. Auldridge, N. Bhuiyan, E. Fridman, Y. Iijima, J.P. Noel, E. Pichersky, The enzymatic functions of the wild tomato *Solanum habrochaites glabratum* methylketone synthases 1 and 2, *Plant Physiology*, 154, 1, 67-77 (2010).
- [5]. E.B. Goh, E.E.K. Baidoo, J.D. Keasling, H.R. Beller, Engineering of bacterial methyl ketone synthesis for biofuels, *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1, 70-80 (2012).
- [6]. I.P. Pulsifer, C. Lowe, S.A. Narayanan, A.S. Busuttil, S.J. Vishwanath, F. Domergue, O. Rowland, Acyl-lipid thioesterase 1-4 from *Arabidopsis thaliana* from a novel family of fatty acyl-acyl carrier protein thioesterases with divergent expression patterns and substrate specificities, *Plant Molecular Biology*, 84, 4, 549-563 (2014).
- [7]. M.E. Auldridge, Y. Guo, M.B. Austin, J. Ramsey, E. Fridman, E. Pichersky, J.P. Noel, Emergent decarboxylase activity and attenuation of alpha/beta-hydrolase activity during the evolution of methylketone biosynthesis in tomato, *Plant Cell*, 24, 4, 1596-1607 (2012).
- [8]. J. Park, M. Rodríguez-Moyá, M. Li, E. Pichersky, K.Y. San, R. Gonzalez, Synthesis of methyl ketones by metabolically engineered *Escherichia coli*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 39, 1703-1712 (2012).