

TẠO DÒNG VÀ PHÂN TÍCH TRÌNH TỰ GEN SERINE PROTEASE THỦY PHÂN FIBRIN TỪ GIUN QUẾ (*Perionyx excavatus*)

Trần Quốc Dung¹, Đặng Phước Hải², Nguyễn Quang Đức Tiến³

¹Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

²Trường Cao đẳng Y tế Huế

³Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Tóm tắt. Lumbrokinase của giun quế (*Perionyx excavatus*) là một enzyme thủy phân fibrin. Trong nghiên cứu này, cDNA mã hóa gen lumbrokinase được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa vào trình tự gen mã hóa lumbrokinase trên GenBank với mã số DQ234061. Đoạn cDNA có kích thước 726 bp được tạo dòng với vector pCR[®]2.1. Trình tự nucleotide của cDNA được so sánh với trình tự của gen lumbrokinase của các loài giun đất *Eisenia fetida* (mã số DQ234061), *Lumbricus bimastus* (mã số AY187629) và *Lumbricus rubellus* (mã số U25644) trên GenBank và có độ tương đồng lần lượt là 52,02%; 50,06% và 48,03%.

Từ khóa: cDNA, lumbrokinase, giun quế (*Perionyx excavatus*).

1. Mở đầu

Một số bệnh liên quan đến tim mạch đang là vấn đề được quan tâm nhiều ở Việt Nam và trên thế giới. Trong đó chứng nghẽn mạch do fibrin bị đóng cục, gây cản trở sự lưu thông máu là bệnh rất phổ biến ở người lớn tuổi. Hiện nay, ở một số nước châu Á như Nhật Bản, Trung Quốc, Hàn Quốc đã chiết xuất và tinh sạch được lumbrokinase từ một số loài giun đất như *Lumbricus rubellus* (Mihara, 1991; Sugimoto, 2001; Cho, 2004a; Liu, 2003), *Lumbricus bimastus* (Ge, 2005) và *Eisenia fetida* (Wang, 2003) có khả năng thủy phân được fibrin, làm tan các cục máu đông. Các enzyme này là các isozyme thuộc nhóm serine protease có đặc điểm chung là rất bền nhiệt và chịu được pH kiềm. Trình tự nucleotide của gen mã hóa lumbrokinase có hoạt tính thủy phân fibrin cao cũng được nghiên cứu nhằm tiến tới chủ động sinh tổng hợp enzyme này bằng phương thức tái tổ hợp (Cho, 2004b; Sugimoto, 2001).

Với các ưu điểm của lumbrokinase, một số nhà nghiên cứu Việt Nam đã khai thác và sử dụng enzyme này từ nguồn nguyên liệu tự nhiên. Họ đã tiến hành nghiên cứu hoạt tính thủy phân fibrin tách chiết từ một số loài giun đất ở phía Bắc Việt Nam và nhận thấy hoạt tính này cao nhất ở giun quế *Perionyx excavatus* (Thủy và cs, 2003; 2004). Ở vùng đồng bằng sông Cửu Long rất dồi dào nguồn giun quế này, vì vậy

lumbrokinase cũng được nghiên cứu tách chiết, tinh sạch và xác định hoạt tính thủy phân của nó (Trâm và cs, 2008a, 2008b). Để làm cơ sở cho việc nghiên cứu biểu hiện cũng như sản xuất lumbrokinase chúng tôi tiến hành tạo dòng gen mã hóa lumbrokinase từ giun quế (*P. excavatus*).

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và hóa chất

- Giun quế (*P. excavatus*) do Trung tâm Chăn nuôi-Thú y thuộc Trường đại học Nông lâm, Đại học Huế cung cấp. Các mẫu giun quế sử dụng trong nghiên cứu đã được GS. Thái Trần Bái định loại.

- Một số các hóa chất khác được sử dụng trong nghiên cứu có độ tinh khiết cao: dung dịch DEPC-treated (Ambion), TRI-reagent (Invitrogen), ethanol 70%; isopropyl alcohol; MOPS 1M (Bio-Rad); EDTA 0,5M, pH 8; NaOAc 3M; formaldehyde 37%; agarose (Bio-Rad); ethidium bromide (1 μ g/ μ L) (Bio-Rad); kanamycin; dung dịch I (50mM glucose, 25 mM Tris-HCl và 10 mM EDTA, pH 8,0); dung dịch II (0,2 N NaOH và 1% SDS); dung dịch III (5 M potassium acetate; 11,5 mL glacial acetic acid và 28,5 mL H₂O).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tổng hợp cDNA

RNA tổng số của giun quế được tiến hành tách chiết theo Sambrook và cộng sự (2001).

cDNA sợi đơn và cDNA sợi đôi được tổng hợp từ RNA tổng số bằng kit Access RT-PCR System (Promega) với chu trình nhiệt cho phản ứng RT-PCR là: 45°C/45'; 94°C/2'; 40× (94°C/30'', 55°C/1', 68°C/2'); 68°C/7'; 4°C/∞.

2.2.2. Khuếch đại PCR

Gen lumbrokinase được khuếch đại với khuôn cDNA; các cặp primer 1, 2 và 3 bằng kit PCR GoTaq® Green (Promega). Trình tự các cặp primer sử dụng:

+ Cặp primer 1:

Forward primer: 5'-AAGATGTTACTTCTCGCCCTTGCA-3'

Reverse primer: 5'-GTTATAATAGAGTCGTTCCAGC-3'

+ Cặp primer 2:

Forward primer: 5'-CGGAATTCAATGATTGTCGGAATTGAAG-3'

Reverse primer: 5'-CCATGCTTCTAGTTGTTGGTAATAATGTC-3'

+ Cặp primer 3:

Forward primer: 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3'

Reverse primer: 5'-GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

- Thành phần phản ứng: Trong tổng số 50 μ L dung dịch phản ứng gồm 100 ng cDNA; 0,1 μ M mỗi loại primer; 25 μ L GoTaq® Green Master Mix 2

- Chu trình nhiệt phản ứng: 95°C/5'; 40 \times (95°C/30", 55°C/1', 72°C/1'); 72°C/10'; 4°C/ ∞ .

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên agarose gel 0,8% ở 80V trong đệm TAE 1 \times . Nhuộm agarose gel 15 phút trong dung dịch EtBr và phân tích hình ảnh điện di sản phẩm bằng hệ thống Gel Documentation (Bio-Rad).

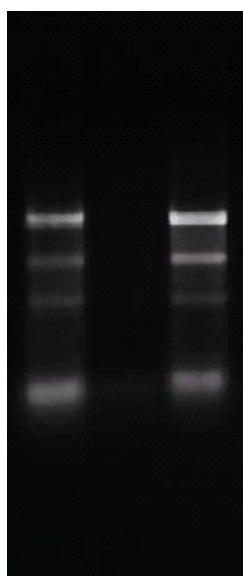
2.2.3. Tạo dòng và phân tích trình tự gen

Biến nạp vector tái tổ hợp mang sản phẩm PCR vào tế bào khả biến *E. coli*: Hỗn hợp phản ứng gắn của các sản phẩm PCR và vector pCR®2.1 (Invitrogen) được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α (Invitrogen) bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây và làm lạnh nhanh trong đá 3 phút. Sau đó tế bào khả biến được nuôi trên đĩa petri chứa môi trường chọn lọc LB + 1,5% agar + Km (50 g/ml) + 1 M IPTG + X-gal (20 g/ml) ở 37°C qua đêm. Chọn khuẩn lạc đơn màu trắng để nuôi cấy lắc trên môi trường LB lỏng + Km (50 g/ml) ở 37°C, 220 vòng/phút trong khoảng 15 giờ, thu sinh khối tế bào để tách chiết DNA plasmid tái tổ hợp.

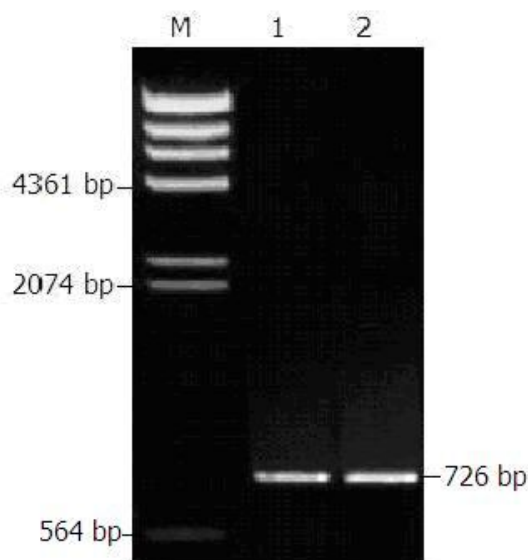
Trình tự nucleotide của gen được xác định theo phương pháp Sanger trên máy ABI 3130. Phân tích trình tự nucleotide được thực hiện bằng chương trình BioEdit.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tạo dòng gen lumbrokinase



Hình 1. Điện di RNA tổng số



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR. M: Marker; 1, 2: Sản phẩm PCR.



Hình 3. Điện di plasmid sau khi cắt bằng enzyme cắt hạn chế *EcoRI*. M: marker; 1: plasmid tái tổ hợp mang gen chưa cắt bằng enzyme *EcoRI*; 2: plasmid tái tổ hợp mang gen đã cắt bằng enzyme *EcoRI*.

mRNA tách chiết từ giun quế (*P. excavatus*) được tinh sạch, sử dụng làm khuôn để tạo cDNA (Hình 1). Để tổng hợp cDNA sợi đơn và cDNA sợi đôi chúng tôi thực hiện trên cùng một phản ứng RT-PCR. Trong 3 cặp primer sử dụng thì chỉ có cặp primer thứ 3 bắt cặp đặc hiệu với cDNA và khuếch đại đoạn cDNA này thành nhiều bản sao (Hình 2). Để tạo dòng gen mã hóa lumbrokinase, sản phẩm của phản ứng PCR được gắn vào vector pCR[®]2.1. Plasmid tái tổ hợp tạo thành được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α và sau đó tiến hành chọn lọc thể tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết và điện di kiểm tra trên gel agarose.

Để khẳng định tổ hợp được tách ra có phải là plasmid tái tổ hợp mang gen, plasmid tái tổ hợp thu được được cắt bằng enzyme cắt hạn chế *EcoRI*. Kết quả điện di sản phẩm cắt trên agarose gel được trình bày ở hình 3, cho thấy gen thu được có kích thước khoảng 700 bp. Để có thể kết luận đoạn gen đã tách từ giun quế là gen mã hóa lumbrokinase chúng tôi đã tiến hành phân tích trình tự nucleotide của gen này.

3.2. Phân tích trình tự gen lumbrokinase

Gen mã hóa lumbrokinase trong plasmid tái tổ hợp được phân tích trình tự bằng máy ABI-3130. Trình tự nucleotide của gen mã hóa lumbrokinase được trình bày ở hình 4 và được so sánh với một số trình tự của gen mã hóa lumbrokinase từ các loài giun khác đã công bố trên GenBank bằng chương trình BioEdit.

Trình tự nucleotide đoạn gen mã hóa lumbrokinase của giun quế được so sánh với một số trình tự gen mã hóa lumbrokinase của các loài giun đất trong GenBank, có độ tương đồng từ 48,03-52,02%: với *L. rubellus* (mã số U25644) là 48,03%; *L. bimastus* (mã số AY187629) là 50,06% và *E. fetida* (mã số DQ234061) là 52,02%.

Liu và cộng sự (2003) đã thực hiện nghiên cứu tạo dòng gen mã hóa lumbrokinase từ giun đất *E. fetida*. Primer đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự cDNA mã hóa một isoenzyme của lumbrokinase từ *L. bimastus* (mã số AF109648). Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa lumbrokinase được tách chiết từ *E. fetida* có độ tương đồng lần lượt là 99,6% với *L. bimastus* (mã số AF109648); 32,5% và 37,8% với *L. rubellus* (mã số AB045719 và AB045720). Trong nghiên cứu này primer đặc hiệu được thiết kế dựa vào trình tự của gen mã hóa lumbrokinase từ *L. bimastus*. Như vậy trình tự gen mã hóa lumbrokinase của giun đất *E. fetida* có độ tương đồng cao nhất với *L. rubellus*.

Guo và cộng sự (2004) đã thiết kế cặp primer dựa vào trình tự cDNA của gen mã hóa lumbrokinase từ *L. rubellus* (mã số U25643). Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa lumbrokinase cho thấy độ tương đồng cao của gen mã hóa lumbrokinase được nhóm nghiên cứu tách từ *E. fetida* so với gen từ các loại giun khác: 99% với gen mã hóa lumbrokinase *LrP-III-2* từ *L. rubellus* (mã số U25643); 98% với gen mã hóa lumbrokinase từ *L. bimastus* (mã số AF433650).

Trong nghiên cứu của Tao và cộng sự (2005), primer được thiết kế dựa trên trình tự gen mã hóa lumbrokinase *LrP-I* của *L. rubellus* (mã số U25643). Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa lumbrokinase được tách chiết từ *L. bimastus* có độ tương đồng như sau: 98,3% với *EfP-III* được tách chiết từ *E. fetida* (mã số AY438622); 88,5% với *LrP-III-1* từ *L. rubellus* (mã số U25648); 87,6% và 89,5% với *LrP-III-0* và *LrP-III-2* từ *L. rubellus* (mã số AB045719 và AB045720). Mặc dù primer được thiết kế dựa vào trình tự gen mã hóa lumbrokinase từ *L. rubellus* nhưng độ tương đồng cao nhất với gen mã hóa lumbrokinase được tách chiết từ *L. bimastus*.

Theo Nguyễn Đức Bách và cộng sự (2003), kết quả phân tích trình tự của sản phẩm PCR được tách chiết từ giun quế (*P. excavatus*) có độ tương đồng cao nhất với trình tự gen mã hóa lumbrokinase từ *L. rubellus* là 49,38%.

Với kết quả bước đầu thu được cho phép chúng tôi tiếp tục tìm điều kiện phù hợp để biểu hiện gen mã hóa lumbrokinase ở loài giun đất này.

```

      10          20          30          40          50          60
1  ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   CAAGGTCATC CATGACAAC TTAGACTATAG TACACGTTCT AACCGATCAC TTTCATCAA 60

      70          80          90          100         110         120
61 AATTCTCATT AGTTATGACA TCGGTAAGTT TTTCTTACTA TTACCGCTTT AAATCAAACA 120

      130         140         150         160         170         180
   ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|

```

```

121 ATTTTAGCAC ACCTCTTAGG CACCATTTAA TAAGAAAAAT CAATATTAAT TTCCCAAAAA 180
      190      200      210      220      230      240
181 ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
    GGTCAATACGT GCCCACTGCA CAACATCTAA CGCAATTAAA ATCGTCATAT GCGGCTACAG 240
      250      260      270      280      290      300
241 AGAATAAAAAT CTCAATAATA ATGCTTTTAT TCTATTACCT GTCTCCTTC TCAGCCCAT 300
      310      320      330      340      350      360
301 CAGGCGCACT ATCATTAACC TCTAAGCGAG CAAAACCGCC TAATCTCAAG ACGATTCCAG 360
      370      380      390      400      410      420
361 CACCGTCACT CAACCGAATA TTTTCAGCAA GACCACTAG ATTGCTTTC CAGCCGGCAT 420
      430      440      450      460      470      480
421 CTGGAAGAGA CAAAAACAA TCAACCTTAA TCGTATTCTG GAAGAACATC AACACACAAA 480
      490      500      510      520      530      540
481 AATTTTCAA TCAAAAATC AACAAAATTA AATTTATAAT AGTCGACACG ACAGAATGGA 540
      550      560      570      580      590      600
541 TGTCAAAGAT CCAGACTCAG CTTACGTCG CTGATCGTCG CAAGATTCCC GGCGTTTACG 600
      610      620      630      640      650      660
601 AAGAAATGAG TTCGGAAAAG GTCGCCGAAC GACCCTTTC CCGGCCGAA AGCGTAGCG 660
      670      680      690      700      710      720
661 AATCTGCGTC TGCAGACGTA AGCTGAGTCT GGATCTTTGA CATCCTACAG CAACAGGGTG 720
      ...|.
721 GTGGAC 726

```

Hình 4. Trình tự đoạn gen mã hóa lumbrokinase từ giun quế

4. Kết luận

4.1. Đã tạo dòng được đoạn gen mã hóa lumbrokinase từ giun quế (*Perionyx excavatus*) có kích thước là 726 bp.

4.2. Trình tự đoạn gen mã hóa lumbrokinase từ giun quế có độ tương đồng với gen mã hóa lumbrokinase của *Eisenia fetida* (GenBank accession number DQ234061) là 52,02%; với gen mã hóa lumbrokinase của *Lumbricus bimastus* (GenBank accession number AY187629) là 50,06% và với gen mã hóa lumbrokinase của *Lumbricus rubellus* (GenBank accession number U25644) là 48,03%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Nguyễn Đức Bách, Luyện Quốc Hải, Ngô Thị Hoài Thu, Lê Quang Huân, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Đặng Diễm Hồng, Nguyễn Văn Đồng, *Tách dòng gen mã hoá cho enzym lumbrokinase từ loài Giun quế của Việt Nam (Perionyx excavatus)*, Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc, (2003), 590-593.
- [2]. Võ Thị Hạnh, Lê Thị Bích Phượng, Trần Thanh Phong, Lê Thị Hương, Trương Thị Hồng Vân, Huỳnh thị Kim Hối, *Sử dụng trùn quế Perionyx excavatus để sản xuất chế phẩm sinh học dùng trong nông nghiệp*, Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ IV Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ Nông, Sinh, Y học và Công nghiệp thực phẩm, Hà nội, 15-17/10/2008, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, (2008), 174-176.
- [3]. Sugimoto M and Nakajima, *Molecular cloning, sequencing, and expression of cDNA encoding serine protease with fibrinolytic activity from earthworm*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (7), (2001), 1575-1580.
- [4]. Cho IH, Choi ES, Lim GH, Lee HH, *Purification and characterization of six fibrinolytic serine-protease from earthworm Lumbricus rubellus*, J. Biochem Mol Biol, 37 (2), (2004a), 199-205.
- [5]. Cho IH, Choi ES, Lim GH, Lee HH, *Molecular cloning, sequencing, and expression of a fibrinolytic serine-protease gene from the earthworm Lumbricus rubellus*, J. Biochem Mol Biol, 37 (5), (2004b), 574-581.
- [6]. Ge T, Sun ZJ, Fu SH and Liang GD, *Cloning of thrombolytic enzyme (lumbrokinase) from earthworm and its expression in the yeast Pichia pastoris*, Protein Expression and Purification 42, (2005), 20-28.
- [7]. Liu J, Wang X, Xu L, Zhang J, Liang D, Chang W, *cDNA cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme component A*, Chinese Science Bulletin, Vol.48 No.1, (2003), 68-71.
- [8]. Mihara H, Sumi H, Yoneta T, Mizumoto H, Ikeda R, Seiki M and Maruyama M, *A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, Lumbricus rubellus*, Japanese Journal of Physiology 41, (1991), 461-472.
- [9]. Sambrook and Russell, *Molecular Cloning a laboratory manual*, CSHL Press, Vol 1, 2, 3, 2001.
- [10]. Lại Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Ngọc Dao, *Tách chiết enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin từ một số loài giun quế Perionyx excavatus*, Nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống định hướng Y dược học, Báo cáo khoa học, Hội nghị Khoa học toàn quốc, Hà nội, 2004, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, (2004), 173-176.
- [11]. Lại Thị Bích Thủy, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Ngọc Dao, *Hoạt tính thủy*

phân fibrin của enzyme tách từ một số loài giun đất Việt Nam, Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong Khoa học sự sống, Báo cáo khoa học, Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ hai trong nghiên cứu cơ bản trong Sinh học, Nông nghiệp, Y học, Huế, 25-27/7/2003, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, (2003), 531-533.

- [12]. Phan Thị Bích Trâm, Dương Thị Hương Giang, Hà Thanh Toàn, Phan Thị Ánh Hồng, *Chiết tách và tinh sạch enzyme thủy phân fibrin từ trùn quế *Perionyx excavatus**, Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ IV Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ Nông, Sinh, Y học và Công nghiệp thực phẩm, Hà nội 15-17/10/2008, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, (2008a), 661-665.
- [13]. Phan Thị Bích Trâm, Dương Thị Hương Giang, Hà Thanh Toàn, Phan Thị Ánh Hồng, *Khảo sát đặc điểm các serine-protease từ trùn quế *Perionyx excavatus**, Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ IV Hóa sinh và Sinh học phân tử phục vụ Nông, Sinh, Y học và Công nghiệp thực phẩm, Hà Nội 15-17/10/2008, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội, (2008b), 123-127.
- [14]. Wang F, Wang C, Li M, Gui L, Zhang J and Chang W, *Purification, characterization and crystallization*, 2003.

CLONING OF LUMBROKINASE GENE FROM EARTHWORM (*Perionyx excavatus*)

Tran Quoc Dung¹, Dang Phuoc Hai², Nguyen Quang Duc Tien³

¹College of Education, Hue University

²Hue College of Medicine

³College of Sciences, Hue University

Abstract. The lumbrokinase from the earthworm *Perioyx excavatus*, is a component of earthworm fibrinolytic enzymes. In this study, cDNA encoding the lumbrokinase gene were amplified with the specific primer pair designed on the gene sequence coding lumbrokinase with GenBank accession number DQ234061. The cDNA size is 726 bp. This cDNA was cloned into pCR[®]2.1 vector (Invitrogen). The nucleotide sequence had identities of 52,02%; 50,06% and 48,03% in comparision with the corresponding sequences of *Eisenia fetida* (GenBank accession number DQ234061), *Lumbricus bimastus* (GenBank accession number AY187629) and *Lumbricus rubellus* (GenBank accession number U25644).

Keywords: cDNA, lumbrokinase, *Perioyx excavatus*.