

XÁC ĐỊNH VAI TRÒ VÀ CƠ CHẾ ĐIỀU HÒA GEN MÃ HÓA PROTEIN BLI03719 TRONG *BACILLUS LICHENIFORMIS* DSM13

Nguyễn Thành Trung

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển, Trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng

TÓM TẮT

Dưới các điều kiện đối phosphate, tế bào *B. licheniformis* DSM13 tổng hợp và tiết ra protein BLI03719 được cho là một loại ribonuclease ngoại bào. Những phân tích trình tự nucleotide chỉ ra rằng gen *BLI03719* trong *B. licheniformis* và gen mã hóa enzyme barnase trong *B. amyloliquefaciens* có sự tương đồng lớn về trình tự nucleotide ở trong gen và trong vùng promoter. Thí nghiệm bất hoạt gen *BLI03719* cho thấy nồng độ RNA tổng số thu được từ chủng đột biến cao hơn hẳn so với chủng gốc khi tế bào bước vào pha cân bằng. Các phân tích về chức năng chỉ ra rằng gen *BLI03719* mã hóa cho một loại ribonuclease ngoại bào và chủng được tiết vào môi trường ngoại bào khi tế bào vi khuẩn được nuôi trong các điều kiện đối phosphate. Ngoài ra, nghiên cứu còn chỉ ra rằng hoạt tính của enzyme này ở trong nội bào bị ức chế một phần bởi một loại protein ức chế giống với barstar.

Từ khóa: *Bacillus licheniformis*, *BLI03719*, điều kiện đối phosphate, ribonuclease.

MỞ ĐẦU

Bacillus licheniformis DSM13 là vi khuẩn Gram dương sinh bào tử được sử dụng trong công nghiệp công nghệ sinh học để sản xuất các enzyme, chất kháng sinh và rất nhiều các hợp chất hóa học quan trọng khác. Gần đây, hệ gen của *B. licheniformis* đã được giải trình tự (Veith et al., 2004) và những đặc tính sinh lý của vi khuẩn này trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau cũng đã được xác định. Khi nuôi cấy trong điều kiện đối phosphate, tế bào *B. licheniformis* cảm ứng sự biểu hiện các gen thuộc *Pho regulon*, cho phép chúng sử dụng các nguồn phosphate hữu cơ thay thế (Hoi et al., 2006). Bên cạnh việc tăng cường sự biểu hiện các gen thuộc *Pho regulon*, điều kiện đối phosphate cũng dẫn tới sự biểu hiện mạnh các gen mã hóa cho các enzyme nuclease nội, ngoại bào chẳng hạn như *yhcR*, *yfjN*, *nucB*, *yurI*, *rph* và *BLI03719*. Các loại enzyme nuclease như *NucB*, *YfjN* và *BLI03719* thuộc nhóm những protein có hàm lượng cao dựa trên những phân tích proteome ngoại bào (Hoi et al., 2006).

Trong hệ gen *B. licheniformis* DSM13 (Mã trên ngân hàng gen: NC_006270.3), gen *BLI03719* được chú thích là mã hóa cho enzyme ribonuclease thuộc siêu họ RNase vi sinh vật (EC.3.1.27.3). Những thành viên được nghiên cứu kỹ trong siêu họ này là RNase T1 từ *Aspergillus oryzae*, barnase từ *Bacillus amyloliquefaciens* và binase từ *Bacillus intermedius* (Yoshida, 2001). Trong đó, hai enzyme barnase và binase có sự tương đồng cao về cấu trúc, đặc tính lý hóa cũng như các đặc tính xúc tác (Ulyanova et al., 2011). Trong *B. amyloliquefaciens*, barnase là một protein ngoại bào có kích thước nhỏ với 110 gốc amino acid. Enzyme này có vai trò phân giải các phân tử RNA thu nhận được từ môi trường ngoại bào thành các phân tử ribonucleotide cung cấp cho tế bào. Tuy nhiên, hoạt tính của enzyme barnase trong môi trường nội bào bị kim hàm đặc hiệu bởi barstar, một phân tử protein nhỏ chứa 89 gốc amino acid (Hartley, 1989).

Gần đây, dựa trên những phân tích trình tự nucleotide, gen *BLI03719* trong *B. licheniformis* được cho là mã hóa enzyme ribonuclease ngoại bào, có kích thước, trình tự nucleotide tương tự như gen mã hóa enzyme barnase trong *B. amyloliquefaciens*. Ngoài ra, trình tự amino acid của protein barstar trong vi khuẩn này cũng đã được xác định (Nijland et al., 2010). Tuy nhiên, hiện nay những nghiên cứu về chức năng cũng như cơ chế điều hòa biểu hiện gen mã hóa enzyme này vẫn chưa được tiến hành. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung vào phân tích cơ chế điều hòa biểu hiện cũng như vai trò của protein BLI03719 trong vi khuẩn *B. licheniformis* DSM13 nhằm mục đích chọn lọc loại promoter thích hợp cho việc thiết kế hệ vector biểu hiện trong *B. licheniformis*.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật và điều kiện nuôi cấy

Tất cả các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu này được trình bày trong bảng 1. Môi trường Belitzky Minimal Medium được sử dụng cho các nghiên cứu trong điều kiện đối phosphate. Tế bào *B. licheniformis* được nuôi cấy lắc ở 37°C trong môi trường BMM chứa 15 mM (NH₄)₂SO₄, 8 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 27 mM KCl, 7 mM Na-citrate x 2 H₂O, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) có bổ sung thêm 0,6 mM KH₂PO₄, 2 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 1 μM FeSO₄ x 7 H₂O, 10 μM MnSO₄ x 4 H₂O và 11 mM glucose. Trong các thí nghiệm nuôi cấy trong điều kiện đối phosphate, hàm lượng phosphate và glucose được giảm xuống tương ứng còn 0,15 mM và 4,4 mM (Voigt et al., 2006).

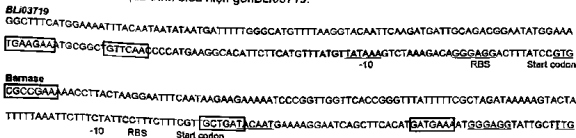
Bảng 1. Chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu

Tên chủng	Kiểu gen	Nguồn
<i>B. licheniformis</i> DSM13	Wild type	DSMZ
<i>B. licheniformis</i> MW3	Δ <i>hdsR1</i> , Δ <i>hdsR2</i>	(Waschkau et al. 2008)
<i>B. licheniformis</i> Δ <i>BLI03719</i>	Δ <i>hdsR1</i> , Δ <i>hdsR2</i> , Δ <i>BLI03719</i>	Nghiên cứu này

Phương pháp gây đột biến gen

Trong nghiên cứu này, đoạn gen *BLI03719* được loại bỏ bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Cụ thể, các sản phẩm PCR có kích thước 700 bp thuộc vùng phía trước (FA) và vùng phía sau (FB) của gen *BLI03719* được nhân lên bằng cặp mồi 1/2 và 3/4 tương ứng. Đoạn trình tự 900 bp chứa gen mã hóa chất kháng sinh erythromycin (*erm*) từ plasmid pAX01 được nhân lên bằng cặp mồi 5/6. Gen *erm* sau đó được nối với hai đoạn FA và FB nhờ phương pháp

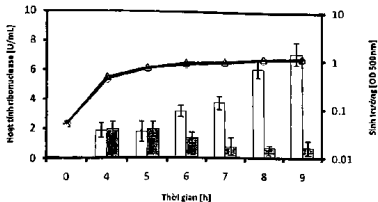
Dựa trên sự tương đồng về vùng mã hóa protein trên, chúng tôi tiến hành khảo sát và so sánh vùng promoter điều khiển sự hoạt động của hai gen này. Theo Ulyanova và đồng tác giả (2011), vùng promoter của gen mã hóa barnase được nhận biết bởi nhân tố Sigma σ^A dựa trên vị trí nhận biết đặc hiệu -10 (TATAAT). Ngoài ra, tác giả cho rằng sự biểu hiện của gen còn phụ thuộc vào protein điều hòa Spo0A dựa trên sự có mặt của các vị trí nhận biết đặc hiệu (TGTCGAA) của protein này trên vùng promoter của gen (Hình 2). Spo0A là một protein điều hòa đa chức năng, tham gia vào kiểm soát các phản ứng stress như quá trình hình thành bào tử, hình thành màng sinh học (Molle *et al.* 2003). Kết quả so sánh cho thấy trên cả hai vùng promoter đều xuất hiện những vị trí liên kết đặc hiệu của của σ^A và Spo0A. Điều này cho thấy sự biểu hiện của gen *BLI03719* trong *B. licheniformis* DSM13 cũng có thể chịu sự điều hòa bởi nhân tố Sigma σ^A , đồng thời có sự tham gia điều hòa bởi protein Spo0A. Để có kết luận chính xác hơn, cần tiến hành thí nghiệm gây đột biến thay thế nucleotide đơn tại các vị trí nhận biết đặc hiệu của các nhân tố điều hòa đồng thời xác định sự ảnh hưởng của những thay đổi đó tới quá trình biểu hiện gen *BLI03719*.



Hình 2. Vùng promoter của gen *BLI03719* trong *B. licheniformis* và gen mã hóa barnase trong *B. Amylaliqefaciens*. RBS: Vị trí gắn kết của Ribosome. Các vị trí liên kết của protein điều hòa Spo0A được đóng khung. Dấu gạch chân chỉ vị trí nhận biết -10 của nhân tố Sigma σ^A

Đánh giá hoạt tính ribonuclease ngoại bào

Để xác định liệu gen *BLI03719* có phải mã hóa enzyme ribonuclease ngoại bào hay không, chúng tôi tiến hành nuôi cấy chủng đột biến *B. licheniformis* Δ *BLI03719* trong môi trường đối phosphate với đối chứng là chủng gốc *B. licheniformis* DSM13 (Hình 3). Dịch nuôi cấy vi khuẩn được thu ở các pha sinh trưởng khác nhau và sau đó được sử dụng cho phản ứng thử hoạt tính enzyme ribonuclease ngoại bào như đã mô tả trong phần nguyên liệu và phương pháp. Ngoài ra, tế bào vi khuẩn tại các pha sinh trưởng này cũng được thu lại phục vụ cho thí nghiệm tách chiết RNA tổng số.



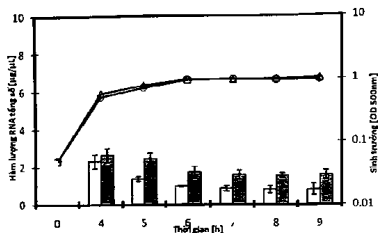
Hình 3. Hoạt tính enzyme ribonuclease ngoại bào của chủng đột biến Δ *BLI03719* và chủng gốc DSM13. Đường liền chỉ đường cong sinh trưởng của tế bào, các cột biểu đồ chỉ hoạt tính enzyme ribonuclease ngoại bào. Cột màu trắng: hoạt tính ribonuclease của chủng gốc; Cột màu đen: hoạt tính ribonuclease của chủng đột biến. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Kết quả thử phản ứng enzyme cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về hoạt tính ribonuclease ngoại bào giữa chủng đột biến và chủng đối chứng. Ở chủng đột biến *B. licheniformis* Δ *BLI03719*, hoạt tính ribonuclease duy trì ở giá trị thấp ở toàn bộ các pha sinh trưởng khác nhau, trong khi chủng đối chứng có hoạt tính ribonuclease tăng dần và đạt giá trị cao nhất ở thời điểm 2h sau khi tế bào bước vào pha chuyển tiếp (sau 8h nuôi cấy) (Hình 3). Theo Hoi và đồng tác giả (2006), khi nuôi cấy tế bào *B. licheniformis* trong điều kiện đối phosphate, sự biểu hiện gen *BLI03719* ở mức độ phiên mã tăng dần và đạt giá trị lớn nhất ở khoảng 2h sau khi tế bào bước vào pha chuyển tiếp. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với mức độ biểu hiện gen ở cấp độ dịch mã mà chúng tôi thu được ở chủng đối chứng. Việc thiếu hụt gen *BLI03719* trong hệ gen của chủng đột biến dẫn tới kết quả hoạt tính ribonuclease ngoại bào của chủng này suy giảm rõ rệt so với chủng gốc chứng tỏ rằng gen *BLI03719* có chức năng mã hóa enzyme ribonuclease tham gia vào quá trình chuyển hóa nguồn phosphate từ môi trường ngoại bào. Ngoài ra, trong số các enzyme nuclease ngoại bào biểu hiện ở điều kiện đối phosphate thì *BLI03719* là một trong những protein có hàm lượng cao tích lũy trong dịch nuôi cấy (Hoi *et al.* 2006). Điều này chứng tỏ *BLI03719* là một trong những enzyme ribonuclease chủ yếu tham gia vào quá trình phân giải nguồn cơ chất RNA từ môi trường ngoài, cung cấp lượng phosphate thiếu hụt cho tế bào trong điều kiện đối phosphate. Tuy nhiên, việc thiếu hụt gen *BLI03719* không làm ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của chủng đột biến so với đối chứng (Hình 3).

Xác định hàm lượng RNA tổng số

RNA tổng số từ các mẫu thu được ở các pha sinh trưởng khác nhau được tách chiết và xác định hàm lượng theo phương pháp như mô tả ở phần nguyên liệu và phương pháp. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng RNA tổng số

chúng đột biến cao hơn hẳn so với chủng gốc chúng tở ở chủng gốc enzyme này vẫn hoạt động trong môi trường nội bào (Hình 4).



Hình 4. Hàm lượng RNA tổng số trong chủng gốc DSM13 và chủng đột biến $\Delta BLI03719$. Đường lên chỉ đường cong sinh trưởng của tế bào, các cột biểu đồ chỉ hàm lượng RNA tổng số. Cột màu trắng: RNA tổng số của chủng gốc; Cột màu xám: RNA tổng số của chủng đột biến. Thí nghiệm lặp lại 3 lần

Theo Hartley (1989), trong *B. amyloliquefaciens* bamase là một enzyme ribonuclease ngoại bào và hoạt tính nội bào của nó bị kìm hãm bởi protein có tên barstar. Tuy nhiên, chỉ có khoảng 30-40% bamase được duy trì bên trong nội bào trong khoảng thời gian 90 phút ở trạng thái liên kết với barstar (Chen, Nagarajan 1993). Tuy nhiên, theo Ulyanova và đồng tác giả (2011), gen mã hóa protein barstar chỉ có mặt trong hệ gen của *B. amyloliquefaciens*. Ngoài ra, hệ gen của vi khuẩn này còn mã hóa một protein kìm hãm Rnase, YrdF, có độ tương đồng 49% so với barstar. Bằng phần mềm BLAST, tác giả cũng chỉ ra sự tồn tại của gen YrdF trong một số loài thuộc chi *Bacillus* như *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cereus* và *B. licheniformis*. Trong vi khuẩn *B. licheniformis*, hiện chưa có nghiên cứu nào xác định vai trò của protein YrdF. Tuy nhiên, trong hệ gen của vi khuẩn này, gen YrdF được cho là mã hóa protein ức chế enzyme ribonuclease. Như vậy, YrdF có thể là protein tham gia vào quá trình kìm hãm một phần sự hoạt động của protein BLI03719 bên trong tế bào *B. licheniformis*.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp gây đột biến loại bỏ gen mục tiêu và so sánh hoạt tính enzyme giá dinh giữa chủng đột biến và chủng gốc, chúng tôi khẳng định rằng gen *BLI03719* có vai trò mã hóa protein có hoạt tính ribonuclease. Enzyme này được tổng hợp và tiết ra môi trường ngoại bào, tham gia vào quá trình phân giải các nguồn RNA nhằm cung cấp một lượng phosphate thiếu hụt cho vi khuẩn *B. licheniformis* khi chúng gặp điều kiện đói phosphate. Dựa trên sự có mặt của những trình tự nhận biết đặc hiệu của các nhân tố điều hòa, chúng tôi cho rằng sự biểu hiện gen *BLI03719* trong *B. licheniformis* ở điều kiện đói phosphate được điều khiển bởi nhân tố Sigma σ^A và protein điều hòa Spo0A. Đây là những nhân tố cảm ứng sự biểu hiện của các gen có vai trò giúp tế bào vượt qua những điều kiện môi trường stress, thiếu hụt dinh dưỡng, hình thành bào tử. Ngoài ra, sự khác biệt về hàm lượng RNA tổng số giữa chủng đột biến và chủng gốc chúng tôi protein BLI03719 vẫn thể hiện hoạt tính phân giải RNA bên trong môi trường nội bào.

Lời cảm ơn

Tôi xin chân thành cảm ơn Prof. Dr. Thomas Schweder, trường Đại học tổng hợp Greifswald, CHLB Đức đã cung cấp cho tôi một số chủng vi sinh vật, plasmid và cho phép thực hiện một số nội dung nghiên cứu trên trong phòng thí nghiệm của mình. Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia Nafosted. Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới lãnh đạo trường Đại học Duy Tân, Đà Nẵng đã đầu tư phòng thí nghiệm SHPT hiện đại để tôi hoàn thiện nghiên cứu này

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chen M, Nagarajan V (1993). The roles of signal peptide and mature protein in RNase (bamase) export from *Bacillus subtilis* *Mol Gen Genet* 239(3): 409-415.

Hartley RW (1989). Bamase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem Sci* 14(11): 450-454.

Hoffmann K, Wolherr A, Larsen M, Rachinger M, Liesegang H, Ehrenreich A, Meinhardt F (2010). Facilitation of direct conditional knock-out of essential genes in *Bacillus licheniformis* DSM13 by comparative genetic analysis and manipulation of genetic competence. *Appl Environ Microbiol* 76(15): 5046-5057

Hoi LT, Voigt B, Jurgen B, Ehrenreich A, Gottschalk G, Evers S, Feesche J, Maurer KH, Hecker M, Schweder T (2006) The phosphate starvation response of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics* 6(12): 3582-3601.

Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-Pastor JE, Liu JS, Losick R (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 50(5): 1683-1701

Mossakowska DE, Nyberg K, Fersht AR (1989). Kinetic characterization of the recombinant ribonuclease from *Bacillus amyloliquefaciens* (Bamase) and investigation of key residues in catalysis by site-directed mutagenesis *Biochem* 28(9): 3843-3850.

Nijland R, Hall MJ, Burgess JG (2010). Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PLoS ONE* 5(12): e15866.

Ulyanova V, Vershinina V, Ilinskaya O (2011). Bamase and binase: twins with distinct fates. *FEBS J* 278(19): 3633-3643

- Veith B, Herzberg C, Stackel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Baumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, Ehrenreich A, Gottschalk G (2004). The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7(4): 204-211.
- Voigt B, Schweder T, Sibbald MJJB, Albrecht D, Ehrenreich A, Bernhardt J, Feesche J, Maurer KH, Gottschalk G, van Dijk JM, Hecker M (2006). The extracellular proteome of *Bacillus licheniformis* grown in different media and under different nutrient starvation conditions. *Proteomics* 6(5): 268-281.
- Yoshida H (2001) The ribonuclease T1 family. *Methods Enzymol* 341: 28-41.
- Waschkau B, Waldeck J, Wieland S, Eichstadt R, Meinhardt F (2008). Generation of readily transformable *Bacillus licheniformis* mutants. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(1): 181-188.

IDENTIFICATION OF THE ROLE AND THE EXPRESSION OF *BLi03719* GENE IN *BACILLUS LICHENIFORMIS* DSM13

Nguyen Thanh Trung

Center for research and development, Duy Tan University, Danang

SUMMARY

Under phosphate starvation conditions, *B. licheniformis* DSM13 cells secrete the protein BLi03719 which is annotated as a putative ribonuclease. Sequence analyses indicated that *BLi03719* from *B. licheniformis* and gene encoded barnase from *B. amyloliquefaciens* are almost identical both in gene structure and promoter region. The inactivation of *BLi03719* resulted in higher total RNA concentration in mutant strain when cells come into stationary phases. Functional analysis showed that *BLi03719* encodes for an extracellular ribonuclease which is secreted into extracellular medium when bacteria were grown under phosphate limitation conditions. Additionally, the intracellular ribonuclease activity of BLi03719 is partially inhibited by an inhibitor protein.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, *BLi03719*, phosphate starvation conditions, putative ribonuclease.

Author for correspondence: Tel: +84-511-3827111; Email: trungnt@duytan.edu.vn