

# HOÀN THIỆN QUY TRÌNH SẢN XUẤT ENZYME TAQ DNA POLYMERASE Ở QUY MÔ PHÒNG THÍ NGHIỆM

Hồ Viết Thế\*, Nguyễn Minh Phương, Ngô Thị Kim Anh

Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

\*Email: thehv@hufi.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/9/2019; Ngày chấp nhận đăng: 12/11/2019

## TÓM TẮT

Enzyme chịu nhiệt *Thermus aquaticus* DNA polymerase (Taq pol) là một thành phần quan trọng trong phản ứng khuếch đại gen (PCR). Trong nghiên cứu này, plasmid pAKTaq chứa gen mã hóa Taq pol được biến nạp thành công vào vi khuẩn *E. coli* BL21. Tiếp sau đó, điều kiện biểu hiện của Taq pol được xác định bằng cách cảm ứng với IPTG 1 mM trong 6 giờ ở 30 °C. Phản ứng PCR được sử dụng để đánh giá hoạt tính tương đối của enzyme thu được, kết quả cho thấy enzyme thu được có thể sử dụng trong phản ứng PCR để khuếch đại các DNA mục tiêu từ vi khuẩn, thực vật và động vật. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề để sản xuất enzyme Taq pol có giá thành rẻ ở quy mô phòng thí nghiệm.

*Từ khóa:* *E. coli*, enzyme, PCR, Taq DNA polymerase.

## 1. MỞ ĐẦU

Polymerase chain reaction (PCR) là một kỹ thuật phổ biến trong sinh học phân tử nhằm khuếch đại đoạn DNA mong muốn dưới tác dụng của enzyme DNA polymerase để tạo ra hàng nghìn đến hàng triệu bản sao DNA. Kỹ thuật PCR được Kary Mullis phát minh năm 1985 [1]. Phản ứng PCR sử dụng enzyme DNA polymerase để khuếch đại vùng DNA mục tiêu. Trong đó, DNA polymerase phân lập từ vi khuẩn suối nước nóng *Thermus aquatitus* (Taq pol) có trọng lượng phân tử dao động trong khoảng 66-94 kDa được sử dụng phổ biến do việc sản xuất đơn giản [2]. Trong đó enzyme với kích thước 94 kDa có hoạt tính cao nhất và có thời gian bán phân hủy khoảng 3 phút ở 95 °C. Việc phát hiện ra khả năng bền với nhiệt độ cao khi tổng hợp DNA của enzyme này đã thúc đẩy sự ra đời của kỹ thuật PCR tự động. Năm 1989, Saiki và cộng sự đã phân lập và biểu hiện được Taq pol trong tế bào vi khuẩn *E. coli* [2], đây là một bước tiến rất lớn để tăng quy mô sản xuất cũng như giảm giá thành sản xuất loại enzyme này. Tuy nhiên, giá thành của Taq pol thương mại vẫn còn cao so với mặt bằng chi phí hoạt động của các phòng thí nghiệm có nhu cầu sử dụng số lượng nhiều enzyme này. Chính vì vậy, nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đã tiến hành nghiên cứu để làm chủ quy trình sản xuất Taq pol sử dụng cho công việc học tập và nghiên cứu.

Năm 1989, nhóm nghiên cứu của Lawyer đã phân lập và xác định được hoạt tính bền ở nhiệt độ của Taq pol [2], sau đó đến năm 1990, nhóm nghiên cứu của Engelke đã tinh sạch Taq pol bằng việc kết tủa với polyethylenimine và tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion [3]. Tuy nhiên, quy trình này vẫn còn đòi hỏi nhiều thời gian và công sức, với khoảng 36 giờ để hoàn thành quá trình nuôi cấy và thu nhận. Năm 1995, Jin và cộng sự đã biểu hiện được Taq pol trong vector pBV221 [4]. Cũng trong năm này, nhóm nghiên cứu của Desa và Pfaffle đã biểu hiện thành công Taq pol trong vector pUC18 [5]. Việc ứng dụng chất cảm ứng đã cho thấy hiệu quả cao trong việc tăng cường biểu hiện của enzyme Taq pol [6].

Ở Việt Nam, năm 2015, nhóm tác giả từ viện Di truyền Nông nghiệp kết hợp với công ty Genbody Hàn Quốc đã báo cáo quy trình sản xuất Taq pol ở quy mô phòng thí nghiệm [7]. Trong đó nhóm tác giả sử dụng hệ thống vector chứa gen mã hóa cho Taq pol có nguồn gốc từ Hàn Quốc. Kết quả đã thu được Taq pol có hoạt tính phù hợp cho phản ứng PCR. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả nghiên cứu hoàn thiện quy trình sản xuất Taq pol đơn giản ở quy mô phòng thí nghiệm sử dụng vector pAKTaq có nguồn gốc từ công ty Addgene (Mỹ). Đây là tổ chức chuyên cung cấp vector miễn phí và không bị ràng buộc bởi bản quyền nên các nhóm nghiên cứu có thể dễ dàng tiếp cận.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Vector pAKTaq được công ty Addgene (<https://www.addgene.org>) cung cấp. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được sản xuất từ hãng Biotum (Anh); Biotum (Mỹ), Applied Biosystem (Mỹ). Các primer được tổng hợp bởi công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Biến nạp

Plasmid pAKTaq được chuyển vào vi khuẩn *E. coli* BL21 theo quy trình của Sambrook và cộng sự [8] sau đó vi khuẩn được trải trên môi trường thạch Luria Bertani (LB) (Biobasic, Canada) có bổ sung ampicilin nồng độ 100 µg/mL. Khuẩn lạc đơn sau đó được nuôi ở 37 °C trên môi trường (LB) lỏng có chứa kháng sinh ampicillin 100 mg/mL. Sinh khối vi khuẩn được thu hồi bằng ly tâm và sử dụng để ly trích plasmid bằng ISOLATE II Plasmid Mini Kit (Bioline, UK) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các plasmid được phân tách bằng enzyme cắt giới hạn enzyme *Eco* RV và enzyme *Bam* HI theo quy trình của nhà sản xuất (New England Biolabs, Mỹ).

Sự hiện diện chính xác của gen mã hóa Taq pol được xác định bằng phản ứng PCR với cặp primer Taq1F 5'-CTCCTGGACCCTTCCAACAC-3', Taq1R 5'-AGGTTGGGATCGGAGCTACT-3'. Phản ứng PCR được thực hiện trong tổng thể tích 20 µL bao gồm 1 khuẩn lạc đơn; 1 µL primer xuôi, 1 µL primer ngược; 10 µL MyTaq TM HS Mix White; 7 µL nước PCR (Bioline, Anh). Phản ứng khuếch đại DNA được tiến hành trong máy PCR Agilent Cyclor 8800 (Agilent, Mỹ) theo quy trình sau: biến tính ban đầu ở 94 °C trong 1 phút; 35 chu kỳ tiếp theo: biến tính ở 94 °C trong 1 phút, bắt cặp ở 60 °C trong 45 giây, kéo dài ở 72 °C trong 1 phút; hoàn thiện phản ứng ở 72 °C trong 5 phút, và giữ ở 4 °C cho đến khi phân tích. Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 1,5% trong thời gian 60 phút, điện thế 110 V trên máy điện di Muid-one (Takara-Advance, Nhật Bản). Gel được quan sát và chụp hình ảnh tại máy chụp gel (Quantum ST4-3000, Nhật Bản). Sản phẩm PCR được giải trình tự DNA bằng phương pháp Sanger tại công ty TNHH MTV Sinh hóa Phù Sa. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng công cụ online NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Khuẩn lạc chứa gen mã hóa Taq pol được bảo quản trong glycerol (Biobasic, Canada) ở -80 °C đến khi sử dụng.

#### 2.2.2. Cảm ứng và thu nhận enzyme

Khả năng sản xuất enzyme Taq pol trong vi khuẩn *E. coli* BL21 được thực hiện theo Vũ Tuấn Nam và cộng sự [7], với một số thay đổi như sau: thời gian khảo sát ở 6 giờ và 18 giờ trong điều kiện có và không sử dụng chất cảm ứng Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Bioline, Anh) ở nồng độ 1 mM. Khuẩn lạc đơn được tăng sinh trong 100 mL môi trường LB có chứa ampicillin 100 µg/mL (Biobasic, Canada), nuôi lắc qua đêm trong điều kiện nhiệt độ 37 °C. Tế bào được thu bằng cách ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút

ở nhiệt độ phòng. Sau đó tế bào được hòa tan trong dung dịch chứa Tris 20 mM (Biobasic, Canada) và Tween 20 1% (Biobasic, Canada). Dung dịch vi khuẩn được ủ trong nước đá trong 15 phút và sau đó phá màng tế bào bằng nhiệt ở 75 °C trong 5 phút có lắc thường xuyên. Dung dịch vi khuẩn sau đó được ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dịch nổi chứa protein được thu hồi và bảo quản ở -80 °C cho đến khi sử dụng. Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Bradford. Sau đó 1 µg protein tổng số được điện di trên gel SDS-PAGE (Biobasic, Canada) với nồng độ gel gom 4% và gel phân tách 12,5%, và được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue (Sigma-Aldrich, Mỹ).

### 2.2.3. Đánh giá hoạt tính của enzyme

Hoạt tính tương đối của enzyme Taq pol được so sánh với enzyme thương mại BIOTAQ DNA polymerase (Bioline, Anh) thông qua phản ứng PCR sử dụng cặp primer Taq800, thành phần phản ứng như sau: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, dNTP 2 mM, 1 µL primer xuôi, 1 µL primer ngược, plasmid DNA 50 ng; BIOTAQ 0,5 µL (2,5 Unit), nước PCR cho đủ thể tích 25 µL (Bioline, Anh). Trình tự primer Taq800 được trình bày trong Bảng 1. Trong thí nghiệm này, plasmid vector pAKTaq được sử dụng làm mạch khuôn cho phản ứng. Trong phản ứng kiểm tra hoạt tính enzyme Taq pol tự sản xuất, phản ứng PCR sử dụng 0,5 µL protein tổng thay thế cho 0,5 µL BIOTAQ. Tiếp theo đó nồng độ enzyme Taq pol phù hợp cho phản ứng PCR được khảo sát thông qua việc sử dụng lần lượt 0,5 µL, 0,25 µL, 0,125 µL, 0,065 µL, và 0,0325 µL protein tổng cho phản ứng PCR. Sau đó enzyme Taq pol được sử dụng trong phản ứng PCR để khuếch đại các đoạn DNA ly trích từ đậu nành và thịt bò. Trình tự các primer được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các primer được sử dụng để kiểm tra hoạt tính tương đối của Taq pol.

Tên primer	Trình tự (5'-3')	DNA mục tiêu	Kích thước (bp)	Nguồn
Taq800_F Taq800_R	CATCGGCAAGACGGAGAAGA AGAGCTTACCATAGCCAGC	Plasmid pAKTaq	800	Nghiên cứu này
Lectin-F3 Lectin-R3	GGCAAACCTCAGC GGAAAC TGT TTAGATGGCCTCATGCAACAC	Đậu nành	772	[9]
Bos-F6 Uni-R	CATCAACTTCATTACAACAATTATC AACATAAAG CCGAATGGTTCY TTTTTYCCYGAGTAGTA	Bò	311	[10]

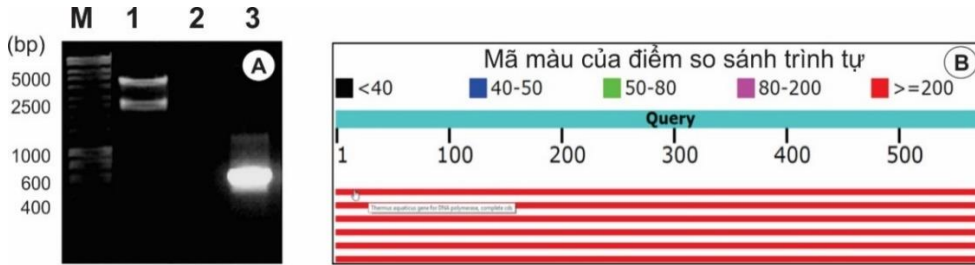
Hai cặp primer Taq1 và Taq800 được thiết kế sử dụng trình tự plamid pAKTaq từ Addgene (Addgene, Mỹ) và các thông số mặc định của chương trình Primer BLAST (NCBI, Mỹ). Nhiệt độ bắt cặp của các primer phát hiện DNA đậu nành và DNA bò là 60 °C và sử dụng 50 ng/µL DNA trong mỗi phản ứng. Sản phẩm PCR được xác định bằng điện di và so sánh với thang chuẩn 1 kb HyperLadder™ (Bioline, Anh). Quy trình nhiệt của phản ứng PCR và phân tích kết quả được tiến hành tương tự như mô tả như trên.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả biến nạp

Enzyme DNA polymerase có nguồn gốc từ vi khuẩn *Thermus aquaticus* đóng vai trò quan trọng trong các nghiên cứu về sinh học phân tử và chẩn đoán. Hiện nay, bản quyền về thương mại loại enzyme này đã hết, vì vậy có nhiều cơ quan và tổ chức đã tập trung nghiên

cứu loại enzyme này nhằm chủ động lượng enzyme sử dụng. Trong nghiên cứu này, sau quá trình biến nạp vector pAKTaq vào vi khuẩn *E.coli* BL21, sự hiện diện của gen mã hóa cho enzyme Taq pol trong vector này được kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn enzyme *Bam* HI và enzyme *Eco* RV và sau đó thực hiện phản ứng PCR với cặp primer chuyên biệt. Các sản phẩm sau đó được điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả điện di trên Hình 1A.

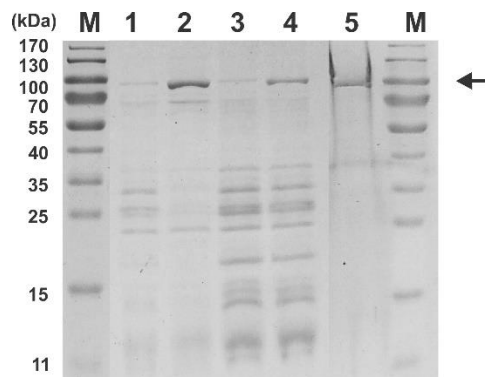


Hình 1. Kết quả phản ứng cắt plasmid pAKTaq (A), và kết quả xác định plasmid pAKTaq (B). (M: Ladder 1kb; 1: Plasmid sau khi cắt; 2: phản ứng PCR đối chứng âm; 3: sản phẩm PCR)

Kết quả cắt enzyme cho thấy sản phẩm plasmid sau khi cắt xuất hiện hai băng vạch sáng rõ ràng, với băng vạch thứ nhất có kích thước lý thuyết 4413 bp nằm giữa 2 vạch 4000 bp và 5000 bp, băng vạch thứ hai có kích thước lý thuyết 2630 bp nằm giữa hai vạch nằm từ 2500 bp đến 3000 bp của thang chuẩn. Kích thước sản phẩm cắt đúng với kích thước theo tính toán của lý thuyết tương ứng băng vạch một có kích thước khoảng 5500 bp và băng vạch 2 có kích thước khoảng 2800 bp. Sử dụng primer chuyên biệt cho gen Taq pol, sản phẩm thu được sáng rõ và có kích thước 600 bp. Sản phẩm PCR sau khi được giải trình tự, kết quả so sánh với các trình tự trên Genbank thông qua chương trình BLAST cho thấy có sự tương đồng tuyệt đối với các trình tự của gen *Taq* từ vi khuẩn *Thermos aquaticus* đã được công bố trước đó. Như vậy, trong nội dung này, nhóm tác giả đã thành công trong việc biến nạp vector pAKTaq vào vi khuẩn *E.coli* BL21. Dòng vi khuẩn này được sử dụng để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2. Kết quả tối ưu điều kiện cảm ứng

Sau khi chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 đã được khẳng định chứa vector pAKTaq. Khả năng sản xuất Taq pol của vi khuẩn này được khảo sát trong 2 điểm thời gian bao gồm 6 giờ và 18 giờ với cảm ứng của IPTG 1 mM. Kết quả được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Kết quả điện di SDS-PAGE khảo sát thời gian cảm ứng

(1: 6 giờ không bổ sung IPTG; 2: 6 giờ bổ sung IPTG 1 mM;

3: 18 giờ không bổ sung IPTG; 4: 18 giờ bổ sung IPTG 1 mM; 5: Enzyme thương mại).

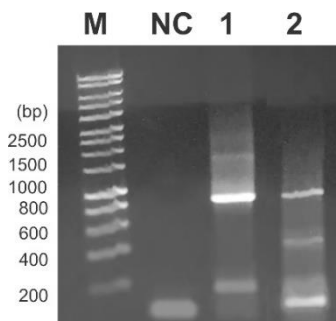
Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy lượng lớn enzyme tập trung ở vùng có kích thước gần 100 kDa, tương đương với kích thước của Taq thương mại (giếng số 5). Đây là vùng kích

thước lý thuyết của Taq pol với 94 kDa. Điều này chứng tỏ rằng đây là điều kiện phù hợp cho sự biểu hiện của gen Taq. Sự khác nhau rõ rệt giữa 2 mốc thời gian cảm ứng, mức độ biểu hiện của protein mục tiêu khi thực hiện thời gian cảm ứng IPTG 1 mM ở 6 giờ tốt hơn so với cảm ứng ở 18 giờ. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu trước đây của Pluthero tại Canada, khi ông đã chỉ ra rằng thời gian cảm ứng với IPTG có vai trò quan trọng trong quá trình sản xuất Taq, bởi vì thời gian cảm ứng dài quá sẽ làm cho Taq polymerase bị phân hủy, đặc biệt giai đoạn khoảng 24 giờ sau cảm ứng [11]. Thậm chí trong nghiên cứu tại Hàn Quốc năm 2014, Kim và Park đã xác định mức độ cảm ứng tốt nhất ở 4 giờ nuôi cấy [12].

Sau cảm ứng IPTG 6 giờ, nồng độ protein mục tiêu chiếm đa số (cột số 2), tuy nhiên vẫn còn một lượng nhỏ các protein khác bị lẫn tạp. Cùng một điểm thời gian, mức độ biểu hiện của protein mục tiêu ở các nghiệm thức được bổ sung IPTG 1 mM (giếng 2 và 4) cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (giếng 1 và 3). Điều này thể hiện hiệu quả của IPTG trong cảm ứng tạo Taq pol. Kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước đây về nồng độ chất cảm ứng IPTG và thời gian cảm ứng. Năm 1990, Engelke và cộng sự đã khảo sát IPTG trong khoảng thời gian 6-24 giờ và kết quả cho thấy sau 16 giờ cảm ứng hàm lượng protein thu được vẫn không thay đổi đáng kể [3]. Gần đây, năm 2015 Vũ Tuấn Nam và cộng sự đã sử dụng chất cảm ứng IPTG 1 mM thực hiện thời gian cảm ứng là 5 giờ với nhiệt độ cảm ứng 30 °C và cho kết quả cảm ứng tốt nhất [7].

### 3.3. Kết quả kiểm tra hoạt tính enzyme

Sau khi thu nhận và cô đặc enzyme tái tổ hợp từ chủng vi khuẩn *E. coli* nhóm tác giả tiến hành kiểm tra hoạt tính tương đối của enzyme bằng phương pháp PCR. Kết quả PCR được thể hiện ở Hình 3.



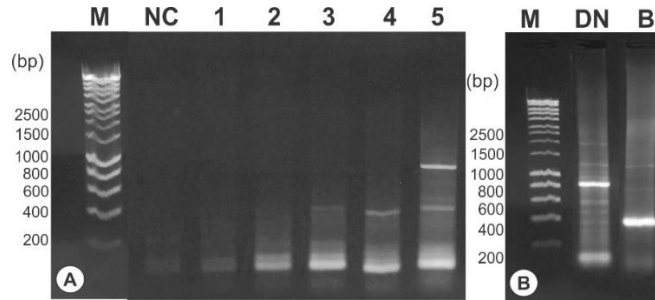
Hình 3. So sánh hoạt tính của enzyme tự sản xuất với enzyme thương mại.

(M: Thang chuẩn DNA 1 kb; NC: Đối chứng âm không chứa DNA, 1: phản ứng PCR với enzyme thương mại BIOTAQ, 2: phản ứng PCR với enzyme Taq pol tự sản xuất).

Kết quả cho thấy, enzyme Taq pol có khả năng khuếch đại đoạn DNA ở hàm lượng 1 µL/ phản ứng. Tuy nhiên, hiệu suất của phản ứng vẫn còn thấp hơn so với hiệu suất của enzyme thương mại. Mặc dù đã trải qua quá trình biến tính để loại bỏ các protein ít bền với nhiệt ở 70 °C trong quá trình ly trích, một số nghiên cứu trước đây vẫn xác định vi khuẩn *E. coli* cũng có những enzyme khác bền ở mức nhiệt độ 70 °C [13]. Điều này có thể là lý do làm giảm hiệu quả của phản ứng PCR. Trong thời gian sắp tới, sự lẫn tạp của các protein này sẽ được loại bỏ bằng các phương pháp hiện đại hơn.

Sau đó, ngưỡng nồng độ enzyme Taq pol phù hợp với phản ứng PCR được xác định thông qua việc bố trí các phản ứng có sử dụng enzyme với lượng khác nhau từ 0,025 µL đến 0,5 µL enzyme cho mỗi phản ứng. Kết quả cho thấy, sản phẩm chuyên biệt với kích thước 800 bp chỉ xuất hiện rõ ở phản ứng có sử dụng 0,5 µL enzyme. Ở phản ứng với lượng enzyme 0,25 µL, kết quả cho sản phẩm mờ, ở các phản ứng với lượng enzyme ít hơn, nhóm tác giả không thấy xuất hiện sản phẩm mục tiêu (Hình 4A). Hàm lượng Taq pol 0,5 µL/phản ứng được sử dụng

trong các phản ứng PCR để khuếch đại các gen đặc trưng từ đậu nành và thịt bò. Kết quả thu được là các sản phẩm sáng rõ theo kích thước lý thuyết của sản phẩm đậu nành (772 bp) và DNA bò (311 bp) (Hình 4B).



Hình 4. Kết quả kiểm tra nồng độ enzyme Taq pol tự sản xuất (A) và ứng dụng trong PCR từ với một số DNA mục tiêu khác nhau (B). (M: Thang chuẩn DNA 1kb; NC: Đối chứng âm không bổ sung enzyme,

1: nồng độ enzyme 0,025  $\mu\text{L}$ ; 2: nồng độ enzyme: 0,05  $\mu\text{L}$ ; 3: nồng độ enzyme: 0,1  $\mu\text{L}$ ;  
4: nồng độ enzyme: 0,25  $\mu\text{L}$ ; 5: nồng độ enzyme 0,5  $\mu\text{L}$ ; DN: đậu nành, B: bò).

Như vậy, enzyme Taq pol trong nghiên cứu này có khả năng sử dụng để phát hiện DNA ở plasmid vi khuẩn, thực vật và động vật. Mặc dù hoạt tính của Taq pol được thể hiện qua việc khuếch đại thành công nhiều loại DNA, sản phẩm PCR vẫn còn xuất hiện sản phẩm phụ, điều này có thể do các đoạn DNA của vi khuẩn *E.coli* còn sót lại và đóng vai trò như các primer ngẫu nhiên sau đó khuếch đại các sản phẩm khác nhau trong phản ứng PCR. Đây cũng là vấn đề thường gặp phải ở một số nghiên cứu trước đây [14]. Các nghiên cứu tiếp theo đang được tiến hành để loại bỏ sự lẫn tạp của DNA trong enzyme Taq và nâng cao chất lượng của sản phẩm này.

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này nhóm tác giả đã biến nạp thành công vector pAKTaq vào vi khuẩn *E. coli* BL21. Sau đó xác định được điều kiện cảm ứng phù hợp cho gen mã hóa Taq pol. Enzyme sau đó được thử nghiệm thông qua phản ứng PCR và kết quả ban đầu cho thấy enzyme có khả năng sử dụng trong phản ứng PCR khi sử dụng với các loại DNA mạch khuôn khác nhau từ nhiều nguồn khác nhau. Quy trình sản xuất enzyme ở quy mô lớn hơn đang tiếp tục được hoàn thiện để cung cấp lượng enzyme cho các phản ứng PCR sử dụng trong học tập và nghiên cứu tại đơn vị.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này do Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh hỗ trợ và cấp kinh phí theo Hợp đồng số 57/HĐ-DCT. Nhóm tác giả cũng gửi lời cảm ơn tới các sinh viên Lê Thị Huyền, Phạm Thị Linh Huệ và Nguyễn Thị Hương đã hỗ trợ kỹ thuật cho nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Mullis K.B., Faloona F.A. - Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology* **155** (1987) 335-350.
2. Lawyer F.C., Stoffel S., Saiki R.K., Myambo K., Drummond R., Gelfand D.H. - Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*, *The Journal of Biological Chemistry* **264** (1989) 6427-6437.

3. Engelke D.R., Krikos A., Bruck M.E., Ginsburg D. - Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*, Analytical Biochemistry **191** (1990) 396-400.
4. Jin C., Liu H., Yang S., Zhang S. - Cloning and overexpression of thermostable DNA polymerase in *Escherichia coli*, Chinese Journal of Biotechnology **11** (3) (1995) 185-191.
5. Desai U.J., Pfaffle P.K. - Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*, Biotechniques **19** (5) (1995) 780-784.
6. Roayaei M., Galehdari H. - Cloning and expression of *Thermus aquaticus* DNA polymerase in *Escherichia coli*, Jundishapur Journal of Microbiology **1** (2008) 1-5.
7. Vũ Tuấn Nam, Chong C.K., Lê Tiến Dũng - Quy trình đơn giản sản xuất DNA polymerase và chế phẩm 'Hotstart' ở quy mô phòng thí nghiệm, Tạp chí Sinh học **37** (1) (2015) 124-132.
8. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. - Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
9. Xia Y., Chen F., Du Y., Liu C., Bu G., Xin Y., Liu, B. - A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean, Bioscience Reports **39** (2) (2019) 1-10.
10. Kitpipit T., Sittichan K., Thanakiatkrai P. - Direct-multiplex PCR as-say for meat species identification in food products, Food Chemistry **163** (2014) 77-82.
11. Pluthero F.G. - Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase, Nucleic acids research **21** (20) (1993) 4850-4951.
12. Kim S.G., Park J.T. - Production of DNA polymerase from *Thermus aquaticus* in recombinant *Escherichia coli*, CNU Journal of Agricultural Science **41** (3) (2014) 245-249.
13. Mishra M.N., Mohanraj J., Nisshanthini S., Bhat S. - High- level expression and purification of DNA and DNase free taq DNA polymerase, Asian Journal of Research in Biochemistry **2** (4) (2018) 1-10.
14. Sadeghi H.M.M., Rabbani M., Moezen F. - Amplification and cloning of Taq DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus* strain YT-1, Research in Pharmaceutical Sciences **1** (2006) 49-52.

## ABSTRACT

### COMPLETE ENZYME DNA POLYMERASE PRODUCTION PROCESS AT LABORATORY SCALE

Ho Viet The\*, Nguyen Minh Phuong, Ngo Thi Kim Anh  
*Ho Chi Minh City University of Food Industry*  
\*Email: thehv@hufi.edu.vn

*Thermus aquaticus* DNA polymerase (Taq pol) is an important component of gene amplification technique (PCR). In this study, the pAKTaq plasmid containing Taq pol coding gene was successfully transformed into *E. coli* BL21. Subsequently, Taq pol expression conditions were determined by using IPTG 1 mM for 6 hours at 30 °C. The PCR reaction was used to evaluate the relative activity of the obtained enzyme, the results showed that the obtained enzyme could be used in the PCR reactions to amplify the target DNA from bacteria plasmid, plants and animals. This research result is a potential for producing cheap Taq pol enzyme at laboratory scale.

**Keywords:** *E. coli*, enzyme, PCR, Taq DNA polymerase.