

CẢI THIỆN MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA GEN *NATC10* MÃ HÓA NATTOKINASE TRONG *BACILLUS SUBTILIS* BD170 TÁI TỔ HỢP

Tô Tuyết Trinh¹, Đặng Thị Thùy Trang¹, Phạm Tăng Phong¹,
Đoàn Phước Minh Đức¹, Nguyễn Thị Anh Thư^{1,2*}

¹ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa Học, Đại học Huế

² Trường Đại học Y- Dược, Đại học Huế

* Email: ntathu@huemed-univ.edu.vn

Ngày nhận bài: 24/02/2021; ngày hoàn thành phản biện: 6/3/2021; ngày duyệt đăng: 02/11/2021

TÓM TẮT

Nattokinase, một serine protease có trong sản phẩm Natto truyền thống của Nhật Bản, có khả năng làm tan đặc hiệu các sợi fibrin gây đông máu, rất có ích trong việc phân hủy huyết khối nội sinh ở người. Nghiên cứu này nhằm mục đích khảo sát các điều kiện nuôi cấy thích hợp để nâng cao mức độ biểu hiện của chủng *Bacillus subtilis* BD170 mang gen *natC10* mã hóa nattokinase. Các điều kiện nuôi cấy để biểu hiện gen đã được tối ưu bao gồm mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng, tốc độ lắc, nhiệt độ cảm ứng, thời gian cảm ứng, nồng độ chất cảm ứng và môi trường nuôi cấy. Mức độ biểu hiện cao nhất của gen *natC10* được xác định ở nồng độ IPTG 1,2 mM, 12 giờ sau khi cảm ứng ở 39°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút với mật độ tế bào ở OD₆₀₀ đạt giá trị 0,8 và khi được nuôi cấy trong môi trường LB lỏng.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, nattokinase, *natC10*, biểu hiện.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đột quy não là bệnh lý mạch máu não nguy hiểm và phổ biến nhất hiện nay bởi nguyên nhân tử vong đứng hàng thứ 3 trên thế giới. Nguyên nhân chính là những cục máu đông chặn lưu lượng máu đến các tế bào não gây bệnh đột quy, đó là căn bệnh rất nguy hiểm, khó cấp cứu và chữa trị, khả năng hồi phục sức khỏe như ban đầu là rất khó, đa số bệnh nhân đột quy đều gặp phải những di chứng nặng nề, ảnh hưởng đến cuộc sống và sinh hoạt của người bệnh, tổn chi phí điều trị của gia đình và xã hội. Phân giải fibrin đóng vai trò quan trọng trong liệu pháp điều trị các bệnh tắc mạch máu. Do bản chất fibrin là các protein, fibrin sẽ bị phân hủy bằng enzyme protease. Các protease thường được sử dụng trong điều trị gồm có nattokinase, urokinase, streptokinase và plasmin. Urokinase và plasmin luôn hiện diện trong cơ thể người nhưng sự tích lũy

Cải thiện mức độ biểu hiện của gen *natC10* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp

plasmin có thể gây ra hiện tượng xuất huyết trong. Streptokinase có nguồn gốc từ vi sinh vật, có giá thành sản xuất rẻ tuy nhiên gây ra đáp ứng miễn dịch khi đưa vào cơ thể gây ra hiệu ứng không mong muốn như xuất huyết trong, dị ứng. Hiện nay, nattokinase là liệu pháp chính được sử dụng để chống lại các bệnh máu đông [4], [5].

Nattokinase là một enzyme thủy phân fibrin mạnh được tạo ra bởi quá trình lên men bằng cách bổ sung *Bacillus natto*. Hiện nay, đã có những nghiên cứu tạo nattokinase tái tổ hợp bước đầu cho thấy hiệu quả cao vì enzyme tái tổ hợp được biểu hiện có hoạt tính cao và là enzyme ngoại bào [1], [2], [3].

Sumi và cs (1987) [6] lần đầu tiên đã phát hiện nattokinase, một serine protease, có trong sản phẩm Natto truyền thống của Nhật Bản. So sánh khả năng làm tan huyết tụ với các dược phẩm thông thường khác, nattokinase có nhiều ưu điểm như tính an toàn, hiệu quả đã được chứng minh lâm sàng, hoạt tính cao và tồn tại ở nội mạc trong thời gian dài bằng liều uống nên hiệu quả điều trị các bệnh máu đông được duy trì. Hơn nữa, nattokinase còn hỗ trợ tăng cường sản sinh ra plasmin (enzyme do cơ thể sản sinh làm tan huyết khối bám chặt nội mạc). Nattokinase thực sự có hiệu quả cao hơn những loại làm tan huyết tụ thông thường khác như urokinase, streptokinase và tissue plasminogen activator (t-PA).

Hiện nay, nhu cầu sử dụng nattokinase ngày càng tăng do nhiều lợi ích mà nó mang lại. Việc tìm hiểu và tối ưu điều kiện biểu hiện của nattokinase tái tổ hợp từ các chủng *B. subtilis* là thực sự cần thiết để tạo ra nguồn cung cấp nattokinase rẻ với hoạt tính cao. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả của các điều kiện biểu hiện tối ưu gen *natC10* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp ở quy mô phòng thí nghiệm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* BD170 mang vector pHT43 có chứa gen *natC10* mã hoá nattokinase (pHT43/*natC10*) do Bộ môn Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy vi khuẩn

Chủng *B. subtilis* BD170 mang vector pHT43/*natC10* được nuôi cấy qua đêm trong 5 ml môi trường LB lỏng (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl) có bổ sung kháng sinh 50µg/ml chloramphenicol ở 37°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Quy trình cảm ứng sinh tổng hợp nattokinase được tiến hành như khuyến cáo của nhà sản xuất (Mobitec, Germany). Sau 12 giờ đến 14 giờ, 2,5ml dịch tế bào nuôi cấy qua đêm

được cấy vào bình 250ml có chứa 50ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, 220 vòng/phút cho đến khi mật độ tế bào ở OD₆₀₀ đạt giá trị tối ưu. Mật độ tế bào tại thời điểm cảm ứng (OD₆₀₀) được thử nghiệm trong khoảng từ 0,4 đến 1,0. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy trộn đến sự biểu hiện của gen được đánh giá trên máy nuôi cấy có tốc độ lắc từ 160 vòng/phút đến 220 vòng/phút. Nhiệt độ cảm ứng được khảo sát từ 33°C đến 39°C. Thời gian của ứng được khảo sát ở 4 giá trị khác nhau từ 8 đến 14 giờ. Sự cảm ứng của gen *natC10* được thực hiện bằng cách bổ sung Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ở các nồng độ khác nhau từ 0,6mM đến 1,4mM. Môi trường nuôi cấy được khảo sát trên 2 loại môi trường là LB lỏng và YPD lỏng (2% D-glucose, 2% peptone và 1% dịch chiết nấm men). Đối chứng là *B. subtilis* BD170 dạng chủng hoang dại. Kết quả tối ưu của các điều kiện đã được khảo sát trước đó được sử dụng cho những thí nghiệm sau.

2.2.2. Điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide

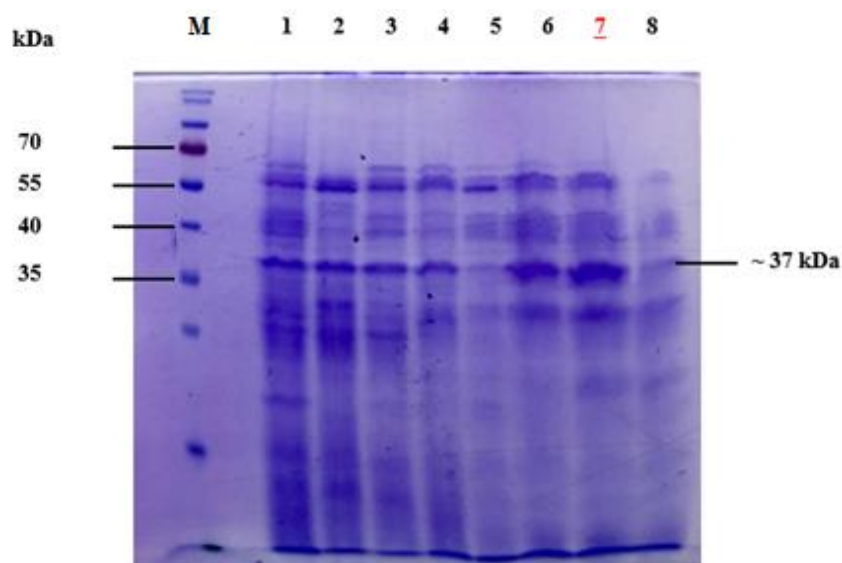
Dịch nuôi cấy *B. subtilis* BD170 có vector pHT43/*natC10* được ly tâm lạnh ở 13000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu dịch nổi và kết tủa nattokinase bằng acetone theo tỷ lệ 1 mẫu : 4 acetone, tiếp tục ly tâm lạnh 13000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C, loại bỏ dịch nổi và kết tủa được hòa tan bằng đệm PBS pH 7,5 (phosphate- buffered saline). Mẫu sau đó được điện di SDS-PAGE 12% (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) để đánh giá mức độ biểu hiện của gen *natC10*. Sau khi điện di xong, bản gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue để quan sát các băng protein.

3. KẾT QUẢ

3.1. Ảnh hưởng của mật độ tế bào

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh thời điểm cảm ứng khi nuôi cấy tế bào có ảnh hưởng đáng kể đến sự tổng hợp và hoạt động của protein tái tổ hợp. Vì vậy, cần phải tối ưu hóa mật độ tế bào để biểu hiện protein cao trước khi bổ sung chất cảm ứng. Chúng tôi đã nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ tế bào ở 4 giá trị khác nhau của OD₆₀₀ (0,4;0,6;0,8;1,0). Sau đó, dịch nuôi cấy được bổ sung 1mM IPTG, được nuôi cấy ở 37°C trên máy lắc với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 8 giờ. Sự biểu hiện của gen *natC10* được mong đợi để tạo ra protein khoảng 37,5 kDa (Hình 1).

Cải thiện mức độ biểu hiện của gen *natC10* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp

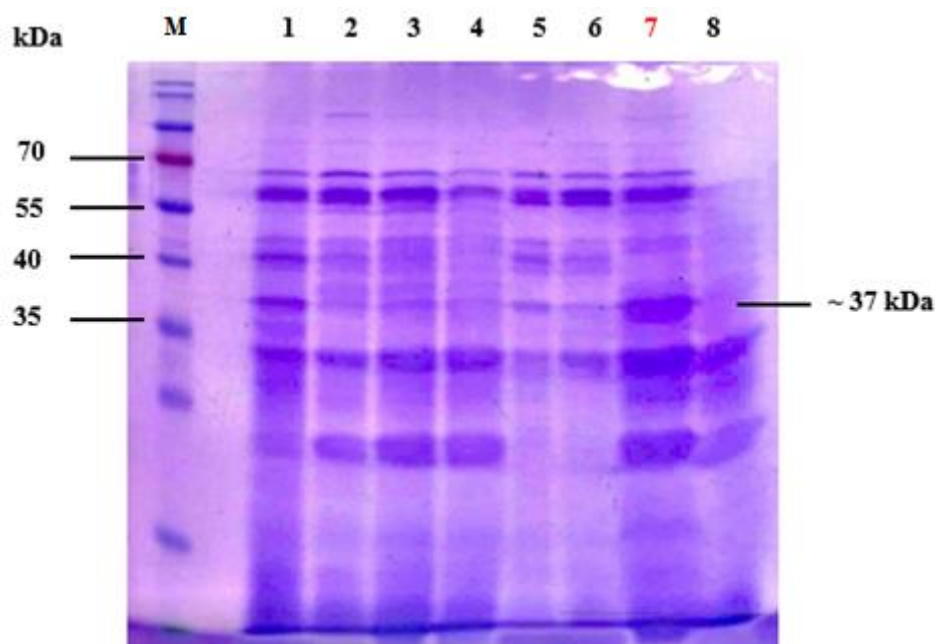


Hình 1. Ảnh hưởng của cỡ mẫu lên sự biểu hiện của gen *natC10* trong *Bacillus subtilis* BD170. M: marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific). 1-4: mẫu đối chứng khi nuôi cấy không có cảm ứng IPTG tương ứng với các cỡ mẫu có OD₆₀₀ từ 0,4-1,0 (gia số 0,2). 5-8: mẫu TC3 khi nuôi cấy có cảm ứng IPTG tương ứng với các cỡ mẫu có OD₆₀₀ từ 0,4-1,0 (gia số 0,2).

Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp biểu hiện cao ở giá trị OD₆₀₀ từ 0,6 đến 0,8. So sánh cường độ của các băng protein cho thấy ở OD₆₀₀ đạt 0,8 là thích hợp cho sự biểu hiện cao nhất của gen *natC10*. Chủng NC (negative control) biểu hiện nattokinase yếu hơn chủng *B. subtilis* tái tổ hợp.

3.2. Ảnh hưởng của tốc độ khuấy trộn

Để đánh giá ảnh hưởng của tốc độ lắc đến sự sản xuất protein, khi mật độ tế bào ở OD₆₀₀ đạt 0,8, các thử nghiệm ở các tốc độ lắc khác nhau (160 vòng/phút, 180 vòng/phút, 200 vòng/phút, 220 vòng/phút) có bổ sung 1mM IPTG được thực hiện ở 37°C trong 8 giờ. Kết quả được thể hiện ở hình 2.



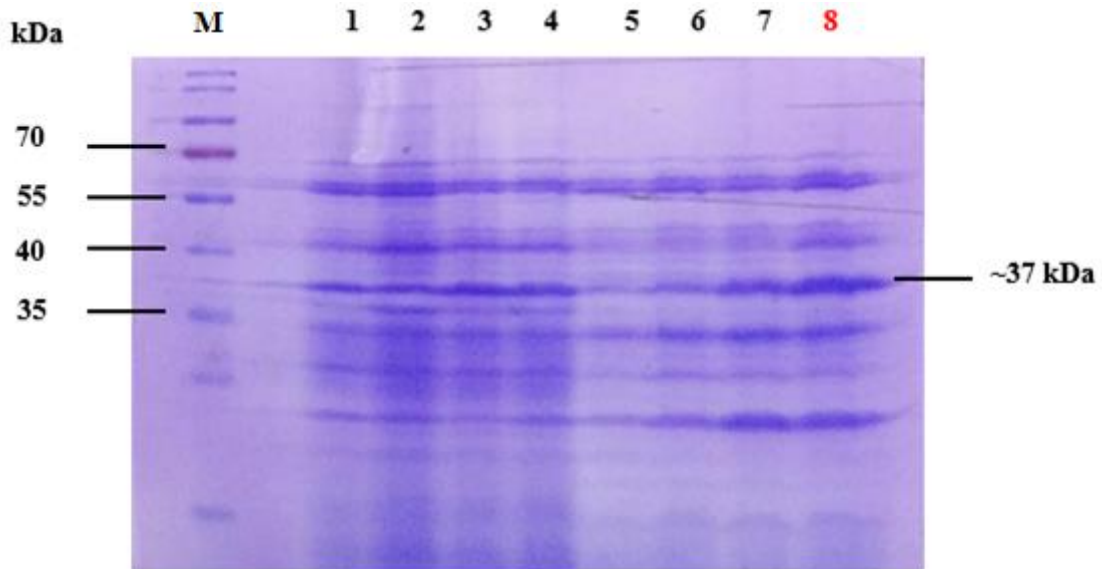
Hình 2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên biểu hiện của gen *natC10* trong *Bacillus subtilis* BD170 dòng TC3. M: marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific). 1-4: mẫu đối chứng không có cảm ứng IPTG tương ứng với các tốc độ lắc lần lượt là 160 vòng/phút, 180 vòng/phút, 200 vòng/phút, 220 vòng/phút. 5-8: mẫu TC3 có cảm ứng IPTG tương ứng với các tốc độ lắc lần lượt là 160 vòng/phút, 180 vòng/phút, 200 vòng/phút, 220 vòng/phút.

Từ hình ảnh điện di SDS-PAGE ở hình 2 cho thấy kích thước băng protein tăng dần từ 160 vòng/phút đến 200 vòng/phút, băng protein lớn nhất tại giá trị 200 vòng/phút, sau đó giảm dần. Chúng NC biểu hiện nattokinase yếu hơn chủng *B. subtilis* tái tổ hợp. Do đó, chúng tôi chọn tốc độ lắc tối ưu là 200 vòng/phút cho lần khảo sát tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng

Đối với sự ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng đến sự sản xuất protein, các giá trị nhiệt độ khác nhau đã được nghiên cứu từ 33°C đến 39°C. Khi mật độ tế bào ở OD₆₀₀ đạt 0,8, các mẫu dịch nuôi cấy được cảm ứng ở 33°C, 35°C, 37°C, 39°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút có bổ sung 1mM IPTG trong 8 giờ. Kết quả được trình bày ở hình 3.

Cải thiện mức độ biểu hiện của gen *natC10* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp

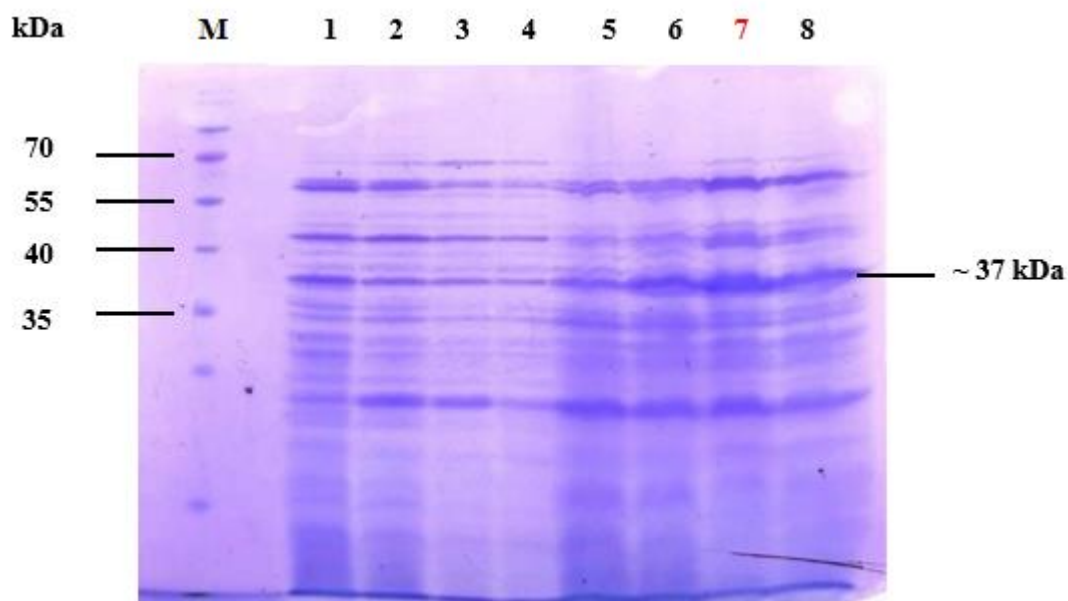


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ cảm ứng lên sự biểu hiện của gen *natC10* trong *Bacillus subtilis* BD170 dòng TC3. M: marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific). 1-4: mẫu đối chứng không có cảm ứng IPTG tương ứng với các nhiệt độ lần lượt 33°C, 35°C, 37°C, 39°C. 5-8: mẫu TC3 có cảm ứng IPTG tương ứng với các nhiệt độ lần lượt 33°C, 35°C, 37°C, 39°C.

Dựa vào kết quả ở hình 3 cho thấy kích thước băng protein tăng dần từ 33°C đến 39°C, băng protein lớn nhất tại giá trị 39°C. Chúng NC biểu hiện nattokinase yếu hơn chủng *B. subtilis* tái tổ hợp. Vì vậy, mẫu có nhiệt độ 39°C cho mức biểu hiện của gen *natC10* mã hóa enzyme nattokinase trong TC3 mạnh nhất.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng

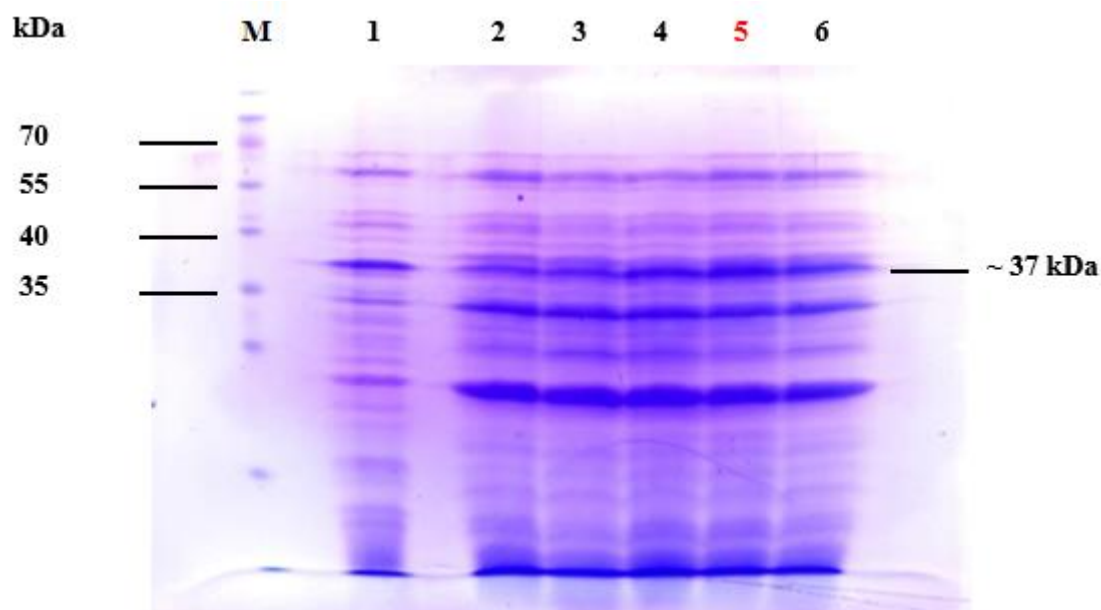
Các thời gian cảm ứng khác nhau (8 giờ, 10 giờ, 12 giờ, 14 giờ) được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của chúng đối với sự biểu hiện gen *natC10* bằng cách sử dụng IPTG 1mM ở 39°C và tốc độ lắc 200 vòng/phút. Kết quả điện di SDS-PAGE đã chỉ ra rằng gen *natC10* biểu hiện protein cao nhất sau 12 giờ (hình 4).



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian cảm ứng lên sự biểu hiện của gen *natC10* trong *Bacillus subtilis* BD170 dòng TC3. M: marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific). 1-4: mẫu đối chứng không có cảm ứng IPTG tương ứng với các thời gian lần lượt 8 giờ, 10 giờ, 12 giờ, 14 giờ. 5-8: mẫu TC3 có cảm ứng IPTG tương ứng với các thời gian cảm ứng lần lượt 8 giờ, 10 giờ, 12 giờ, 14 giờ.

3.5. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng IPTG

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên sự biểu hiện của gen *natC10* đã được thực hiện ở 39°C, 200 vòng/phút trong 12 giờ. Nồng độ IPTG được sử dụng là 0,6mM; 0,8mM; 1mM; 1,2mM; 1,4mM. Kết quả được thể hiện ở hình 5.



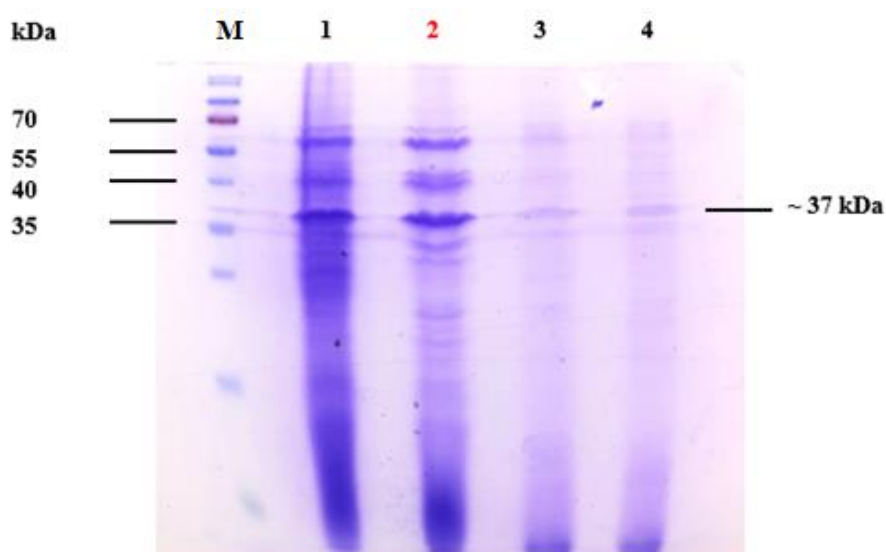
Cải thiện mức độ biểu hiện của gen *natC10* mã hóa nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 tái tổ hợp

Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên sự biểu hiện của gen *natC10* mã hóa enzyme nattokinase trong *Bacillus subtilis* BD170 dòng TC3. M: marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific). 1: mẫu đối chứng không có cảm ứng IPTG. 2-6: mẫu TC3 có cảm ứng IPTG với nồng độ lần lượt là 0,6mM; 0,8mM; 1mM; 1,2mM; 1,4mM.

Từ hình ảnh điện di SDS-PAGE ở hình 5 cho thấy kích thước băng protein tăng dần từ nồng độ IPTG 0,6mM đến 1,2mM, băng protein lớn nhất khi nồng độ IPTG là 1,2mM. Chúng NC biểu hiện nattokinase yếu hơn chủng *B. subtilis* tái tổ hợp. Vì vậy, mẫu có nồng độ IPTG là 1,2mM cho mức biểu hiện của gen *natC10* mã hóa enzyme nattokinase trong TC3 mạnh nhất.

3.6. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy

Để đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự sản xuất protein, nghiên cứu được thực hiện trên 2 môi trường khác nhau là LB lỏng và YPD lỏng khi mật độ tế bào ở OD₆₀₀ đạt 0,8 có bổ sung 1mM IPTG ở tốc độ lắc 200 vòng/phút, 37°C trong 8 giờ. Kết quả được thể hiện ở hình 6.



Hình 6. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự biểu hiện của gen *natC10* trong *Bacillus subtilis* BD170 dòng TC3. M: marker Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (hãng Thermo Fisher Scientific). 1: là mẫu đối chứng không có cảm ứng nuôi trong môi trường LB lỏng. 2: là mẫu TC3 có cảm ứng IPTG nuôi trong môi trường LB lỏng. 3: là mẫu đối chứng không có cảm ứng nuôi trong môi trường YPD lỏng. 4: là mẫu TC3 có cảm ứng IPTG nuôi trong môi trường YPD lỏng.

Dựa vào kết quả ở hình 6 ta thấy kích thước băng protein khi nuôi cấy trong môi trường LB lỏng lớn hơn. Trong khi đó kích thước băng protein của mẫu khi nuôi cấy trong môi trường YPD rất mờ. Chúng NC biểu hiện nattokinase yếu hơn chủng *B. subtilis* tái tổ hợp. Vì vậy, môi trường LB lỏng là môi trường thích hợp cho sự biểu

hiện của gen *natC10* mã hóa enzyme nattokinase trong TC3. Ngược lại, môi trường YPD không phù hợp cho thí nghiệm này.

4. KẾT LUẬN

Qua quá trình nghiên cứu chúng tôi đã tối ưu hóa các điều kiện cho biểu hiện của gen *natC10*, bao gồm mật độ tế bào ở OD₆₀₀ là 0,8, nhiệt độ cảm ứng ở 39°C, tốc độ lắc là 200 vòng/phút, nồng độ là IPTG là 1,2mM, thời gian nuôi cấy là 12 giờ sau khi cảm ứng và trong môi trường nuôi cấy là môi trường LB.

Những kết quả này có thể được áp dụng để cải thiện sinh tổng hợp enzyme nattokinase trong nghiên cứu tinh sạch protein.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Chen PT, Chiang CJ, Chao YP (2007). Strategy to approach stable production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis*, *Biotechnology progres*, vol. 23, pp. 808-813.
- [2]. Liang X, Zhang L, Zhong J, Huan L (2007). Secretory expression of a heterologous nattokinase in *Lactococcus lactis*, *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 75, pp. 95-101.
- [3]. Liu J, Xing J, Chang T, Ma Z, Liu H (2005). Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods, *Process Biochemistry*, vol. 40(8), pp. 2757–2762.
- [4]. Peng Y, Yang X, Zhang Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Applied microbiology and biotechnology* 2005;69:126-32.
- [5]. Selvarajan E, Bhatnagar N. Nattokinase: an updated critical review on challenges and perspectives. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry* 2017.
- [6]. Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet, *Experientia*, vol. 43(10), pp. 1110-1111.

ENHANCEMENT OF EXPRESSION OF *NATC10* GENE ENCODING NATTOKINASE IN RECOMBINANT *BACILLUS SUBTILIS* BD170

To Tuyet Trinh¹, Dang Thi Thuy Trang¹, Pham Tang Phong¹,
Doan Phuoc Minh Duc¹, Nguyen Thi Anh Thu^{1,2*}

¹Faculty of Biology, University of Sciences, Hue University

² University of Medicine and Pharmacy, Hue University

* Email: ntathu@huemed-univ.edu.vn

ABSTRACT

This study aims to investigate the appropriate culture conditions for enhancing expression level of *natC10* gene encoding nattokinase in recombinant *Bacillus subtilis* BD170. Nattokinase is a serine protease found in traditional Japanese Natto product, has the ability to specifically dissolve fibrin fibers causing coagulation, useful in endogenous thrombolysis. Currently, nattokinase is produced by traditional fermentation as well as recombinant DNA technology approaches. The culture conditions for gene expression were optimized including cell density at the time of induction, shaking speed, induction temperature, induction time, inducer concentration and culture medium. Highest level for *natC10* was determined at IPTG concentration of 1.2 mM, 12 hours after induction at 39°C, shaking speed of 200 rpm with cell density at OD₆₀₀ reached a value of 0.8 and suitable culture medium is LB.

Keywords: *Bacillus subtilis*, expression, nattokinase, *natC10*.



Nguyễn Thị Anh Thu sinh ngày 25/02/1985 tại Thừa Thiên Huế. Năm 2008, bà tốt nghiệp cử nhân Sinh học tại trường ĐH Khoa học, ĐH Huế. Năm 2010, bà nhận bằng thạc sĩ Sinh học thực nghiệm tại trường ĐH Khoa học, ĐH Huế. Hiện bà đang là NCS chuyên ngành Công nghệ sinh học tại trường ĐH Khoa học, ĐH Huế, và công tác tại Khoa Cơ bản, trường ĐH Y Dược, ĐH Huế.

Lĩnh vực nghiên cứu: Công nghệ sinh học, Sinh lý người và động vật.