

ĐẠI HỌC QUỐC GIA TP. HCM
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

LÊ DƯƠNG VƯƠNG

**TẠO CÁC PROTEASE TEV VÀ HRV3C Ở *Bacillus subtilis* DÙNG CẮT LOẠI ĐUÔI DUNG HỢP TRONG
TINH CHẾ PROTEIN TÁI TỔ HỢP**

Ngành: Vi sinh vật học

Mã số ngành: 9420107

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

TP. Hồ Chí Minh- năm 2025

Công trình được hoàn thành tại: Trường ĐH Khoa học Tự nhiên,
ĐHQG-HCM

Người hướng dẫn khoa học:

1. HDC: PGS.TS. Nguyễn Đức Hoàng
2. HDP: PGS.TS. Phan Thị Phụng Trang

Phản biện 1: PGS.TS. Trịnh Ngọc Nam

Phản biện 2: PGS.TS. Hồ Viết Thế

Phản biện 3: TS. Trần Nhật Phương

Phản biện độc lập 1: PGS.TS. Nguyễn Thị Phương Thảo

Phản biện độc lập 2: TS. Trần Nhật Phương

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp cơ sở đào tạo họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, vào hồi ... giờ ngày tháng ... năm 2025

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP.HCM
- Thư viện Đại học Quốc gia TP.HCM
- Thư viện Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

CHƯƠNG 1. MỞ ĐẦU

1.1. Cơ sở lý luận

Đuôi dung hợp (fusion tag hay affinity tag) là một công cụ được sử dụng rộng rãi trong công nghệ sản xuất, tinh chế protein tái tổ hợp hiện nay. Nguyên nhân là bên cạnh việc hỗ trợ quá trình tinh chế, sự đồng biểu hiện các đuôi dung hợp có khả năng bảo vệ protein mục tiêu khỏi sự phân cắt của protease, tăng tính tan, tăng cường sự biểu hiện vượt mức hay hỗ trợ tốt quá trình gấp cuộn sau dịch mã của protein mục tiêu. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu cho thấy các đuôi dung hợp với kích thước nhỏ hay lớn đều có ảnh hưởng nhất định đến cấu trúc và hoạt tính sinh học của protein mục tiêu. Hơn nữa, việc gắn với đuôi dung hợp sẽ ảnh hưởng đến khả năng ứng dụng của protein mục tiêu như tinh thể hóa và sản xuất kháng thể. Vì những khó khăn đã đề cập, chiến lược phát triển các phương pháp nhằm loại bỏ đuôi dung hợp là thật sự cần thiết.

Trong các phương pháp loại đuôi dung hợp hiện hữu như sử dụng các hợp chất hữu cơ, các exoprotease hay các endoprotease; Tobacco Etch Virus (TEV) Protease và Human Rhinovirus 3C (HRV3C) Protease nổi lên là hai công cụ hiệu quả, phổ biến nhất để loại đuôi dung hợp trong quá trình tinh chế sắc ký ái lực do có trình tự nhận biết, cắt tại các vị trí chuyên biệt cũng như khả năng phân cắt ở nhiệt độ thấp. Tuy nhiên, cho đến hiện nay, hầu hết các công trình nghiên cứu về TEV, HRV3C protease đã và đang được thực hiện dựa trên chủng chủ mô hình *E. coli*. Điều này dẫn đến khi sử dụng TEV và HRV3C từ *E. coli*, các sản phẩm tinh sạch (đã loại đuôi dung hợp) cần tốn thêm thời gian và chi phí để loại bỏ các nội độc tố thì mới có thể sử dụng trong các lĩnh vực như y dược, thực phẩm, chăn nuôi... Hiện nay, với đặc tính không sinh nội độc tố của mình, *B. subtilis* đã và đang nổi lên là một chủng chủ tiềm năng để thay thế *E. coli*. Chủng *B. subtilis* đã được FDA công

nhận là chủng chủ an toàn GRAS (Generally regarded as safe). Các hệ thống vector biểu hiện trên *B. subtilis* cũng đang được phát triển, trong đó nổi bật là hệ thống pHT với các promoter *Pgrac* và *Pgrac212*. Do đó, việc sử dụng chủng chủ *B. subtilis* thay thế *E. coli* để biểu hiện TEV, HRV3C và cơ chất có chứa trình tự nhận biết cắt của hai enzyme này nhằm xây dựng mô hình ứng dụng loại đuôi dung hợp là hoàn toàn khả thi.

1.2. Mục tiêu nghiên cứu

Luận án được thực hiện nhằm hướng tới mục tiêu “Tạo các protease TEV và HRV3C ở *Bacillus subtilis* dùng cắt loại đuôi dung hợp trong tinh chế protein tái tổ hợp”

1.3. Đối tượng nghiên cứu

Các protease His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C được biểu hiện ở dạng dung hợp với đuôi BsLysSN và trình tự nhận biết cắt tương ứng của từng protease trên *B. subtilis*. Ngay trong tế bào chất, các phân tử protease này nhận biết vị trí cắt lẫn nhau và loại đuôi BsLysSN. Cả ba protease và hai protein cơ chất BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP, BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP được biểu hiện nội bào ở *B. subtilis* dựa trên hệ thống pHT và promoter *Pgrac212*.

1.4. Nội dung nghiên cứu

Để đạt được mục tiêu nghiên cứu, đề tài đã thực hiện ba nội dung nghiên cứu chính. Trong đó, nội dung 1 là “Tạo dòng, thu nhận và tinh chế các protein tái tổ hợp His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C trong tế bào *B. subtilis*”. Nội dung 2 là “Tạo dòng, thu nhận protein GFP tái tổ hợp chứa đuôi dung hợp có vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C làm cơ chất và xác định hoạt tính protease, các giá trị động học phản ứng cắt của các protease này”. Cuối cùng, nội dung 3 là “Ứng dụng His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C trong tinh chế protein GFP tái tổ hợp chứa đuôi dung hợp có vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C”

Chương 2. TỔNG QUAN

2.1. Đuôi dung hợp

2.1.1. Đuôi dung hợp

Hiện nay, việc sử dụng đuôi dung hợp và phương pháp sắc ký ái lực là công cụ hiệu quả nhất để tinh chế protein tái tổ hợp. Đuôi dung hợp (affinity tag hay fusion tag) là những đoạn peptide hoặc protein đặc trưng được dung hợp với protein tái tổ hợp để hỗ trợ quá trình tinh chế, tăng tính bền, tính tan của protein mục tiêu. Bên cạnh việc hỗ trợ quá trình tinh chế, sự đồng biểu hiện các đuôi dung hợp có khả năng bảo vệ protein mục tiêu khỏi sự phân cắt của protease, tăng cường sự biểu hiện vượt mức hay hỗ trợ tốt quá trình gấp cuộn sau dịch mã của protein mục tiêu.

2.1.2. Các đuôi dung hợp thường gặp

Khi xét về mục tiêu sử dụng, đuôi dung hợp thường chia làm 3 nhóm chính: đuôi tinh chế, đuôi tăng cường sự biểu hiện và đuôi vừa hỗ trợ tinh chế vừa tăng cường sự biểu hiện. Trong đó, đuôi His (polyhistidine) là đuôi tinh chế được sử dụng rộng rãi nhất trong biểu hiện và tinh sạch protein do có nhiều ưu điểm như: kích thước nhỏ (khoảng 6-10 Histidine) nên giảm thiểu các ảnh hưởng lên hoạt tính, tính miễn dịch của protein mục tiêu; ái lực giữa His và ion kim loại không phụ thuộc vào cấu trúc bậc ba của protein, cho phép tinh sạch protein tái tổ hợp ngay cả dưới các điều kiện biến tính.

Đối với nhóm thứ hai là đuôi tăng cường sự biểu hiện, nếu chỉ xét trên *B. subtilis*, đuôi BsLysSN là lựa chọn tốt. Đuôi dung hợp này được phát triển dựa trên vùng N-terminal của enzyme Lysyl tRNA Synthetase có nguồn gốc từ chính *Bacillus subtilis*. Trong nghiên cứu của Ngan *et al.* (2023), việc dung hợp BsLysSN giúp tăng cường biểu hiện của protein EGFP lên 23,5 lần so với khi không có đuôi dung hợp.

Còn về nhóm thứ ba, đuôi GST (Glutathione S-transferase) chính là đại diện tiêu biểu. Đuôi GST là có kích thước khoảng 26 kDa và có nguồn gốc

từ isoform của *Schistosoma japonicum*. Bên cạnh việc hỗ trợ quá trình tính chế nhờ có ái lực cao với glutathione, đuôi GST còn giúp tăng tính tan, tăng tính bền và bảo vệ protein mục tiêu khỏi sự phân cắt.

2.1.3. Nhược điểm của đuôi dung hợp

Mặc dù có nhiều ưu điểm, đuôi dung hợp vẫn có một số nhược điểm. Bất kể kích thước lớn hay nhỏ, đuôi dung hợp có thể ảnh hưởng đến cấu trúc bậc ba hoặc hoạt tính sinh học của protein mục tiêu. Điều này có thể đặc biệt quan trọng trong các nghiên cứu liên quan đến tương tác kháng nguyên-kháng thể. Mức độ ảnh hưởng phụ thuộc vào vị trí gắn, thành phần amino acid, cũng như kích thước của đuôi dung hợp. Ngoài ra, trong một số trường hợp, đuôi dung hợp có thể gây cản trở cho các ứng dụng như tinh thể hóa hoặc sản xuất kháng thể. Vì những hạn chế này, việc phát triển các phương pháp để loại bỏ đuôi dung hợp sau quá trình tinh sạch là rất cần thiết.

2.2. Các phương pháp loại đuôi dung hợp

Hiện nay, nhiều phương pháp loại đuôi dung hợp đã và đang được phát triển như việc sử dụng các hoá chất vô cơ như Cyanogen Bromide, Hydroxylamide, các enzyme exoprotease như Metalloprotease, Aminopeptidase đến các endoprotease với thể hệ thứ nhất gồm Enterokinase, Factor Xa, Thrombin và thể hệ thứ hai là TEV, HRV3C protease. Tùy vào mục tiêu sử dụng, loại đuôi dung hợp cần cắt bỏ, các nhà nghiên cứu có thể chọn lựa hoặc kết hợp nhiều loại phương pháp nêu trên. Trong đó, TEV và HRV3C đã và đang là hai công cụ nổi bật, được sử dụng rộng rãi.

TEV protease, được mã hóa bởi gen trong polyprotein của Tobacco Etch Virus (TEV), là một enzyme endopeptidase có vai trò quan trọng trong vòng đời của virus này. Về mặt cấu trúc, TEV protease có sự tương đồng với các serin protease như chymotrypsin, trypsin và protease 3C của virus Picorna. Điểm khác biệt nổi bật của TEV protease so với các protease khác chính là ở tính đặc hiệu cao. Trình tự nhận biết tối ưu của TEV protease được xác

định là Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln*(Gly/Ser), với vị trí cắt xảy ra giữa Gln và Gly/Ser. TEV protease hoạt động hiệu quả nhất ở nhiệt độ 30°C và vẫn duy trì được hoạt tính ở 4°C, mặc dù hiệu suất giảm. Enzyme này ổn định trong khoảng pH từ 6 đến 9 và hoạt động tốt trong môi trường có nồng độ NaCl từ 0,2 đến 2 M... Đặc biệt, TEV protease không bị ảnh hưởng bởi các chất ức chế protease như PMSF, AEBSF, pepstatin A, aprotinin (ở nồng độ dưới 0,3 mg/ml), leupeptin (dưới 100 μ M) và urea (dưới 0,5 M). Tuy nhiên, một hạn chế đáng kể của TEV protease là vấn đề tự phân cắt, dẫn đến sự hình thành các enzyme bị cắt nhỏ, làm giảm hoạt tính và gây khó khăn trong quá trình tinh sạch. Vấn đề này đã được giải quyết vào năm 2001 bởi Kapust *et. al* thông qua việc gây đột biến S219V tại vùng nhận diện của TEV. Sự điều chỉnh này không chỉ loại bỏ hiện tượng tự bất hoạt mà còn tăng gấp đôi hoạt tính cắt của TEV protease.

HRV3C (hay Human Rhinovirus 3C protease) có nguồn gốc từ Human Rhinovirus, đây là nguyên nhân chính gây bệnh cảm lạnh ở người và liên quan đến một số bệnh nguy hiểm như bại liệt, viêm gan A, SARS ... Virus này thuộc nhóm (+) ssRNA và bộ mã di truyền của chúng mã hóa cho một polyprotein lớn chứa 12 protein cấu trúc và chức năng khác nhau. Quá trình cắt để tạo ra các protein riêng biệt đa phần nhờ vào HRV3C (cắt 8/10 vị trí trong chuỗi polyprotein). Do đó, mặc dù những tài liệu ban đầu nghiên cứu về HRV3C chủ yếu tập trung vào việc ức chế protease này nhưng khi nhận thấy được tiềm năng của HRV3C protease, nhiều nghiên cứu tiếp theo về hoạt tính cắt cũng như tính chất hóa lý của HRV3C đã được triển khai. Theo nghiên cứu của Bjorndah *et. al* (2007), vùng C-terminal của HRV3C là vùng chịu trách nhiệm chính trong việc nhận biết cũng như phân cắt trình tự nhận biết trên cơ chất. Trình tự nhận biết tối ưu của HRV3C protease được xác định trình tự LEVLFQ/GP. Như các cysteine protease khác, HRV3C không cần các ion kim loại hay các co-factor để hoạt động. Các nghiên cứu trước

đây về khảo sát các đặc tính sinh hóa cho thấy HRV3C protease có vùng pH hoạt động trung tính, nhiệt độ hoạt động tối ưu từ 22-37°C và ít bị ức chế bởi các tác chất, chất tẩy rửa hữu cơ. Đặc biệt, HRV3C protease là vẫn cho hoạt tính cắt tốt ngay khi ở nhiệt độ thấp (4°C). Ưu thế này giúp HRV3C có thể ứng dụng để phân cắt ở nhiệt độ thấp, tránh sự tác động của protein mục tiêu nhạy nhiệt trong quá trình phân cắt.

2.3. Các nghiên cứu về TEV, HRV3C protease

Do có nhiều ưu điểm giúp loại đuôi dung hợp trong quá trình tinh chế, TEV và HRV3C đã và đang được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm về định hướng sản xuất và ứng dụng. Về định hướng sản xuất, trong những nghiên cứu gần đây, TEV protease đạt tới 400 mg/L dịch nuôi cấy (hoặc 15 mg từ mỗi gam sinh khối) còn HRV3C protease đã được dung hợp với đuôi NT* và cho sản lượng biểu hiện lên đến 300 mg/L môi trường nuôi cấy. Về mảng ứng dụng, nhờ đặc tính cắt đặc hiệu và khả năng hoạt động ở nhiệt độ thấp, TEV và HRV3C đã và đang là những công cụ chính trong các ứng dụng loại đuôi dung hợp như đồng biểu hiện, đồng lên men, nhận diện vị trí hoạt động... Trong đó, nổi bật là mô hình tinh chế kết hợp loại đuôi dung hợp được Waugh *et. al* mô tả.

Cho đến hiện nay, hầu hết các công trình nghiên cứu về TEV, HRV3C protease đã và đang được thực hiện dựa trên chủng chủ mô hình *E. coli*. Điều này dẫn đến khi sử dụng TEV và HRV3C từ *E. coli*, các sản phẩm tinh sạch (đã loại đuôi dung hợp) cần tốn thêm thời gian và chi phí để loại bỏ các nội độc tố thì mới có thể sử dụng trong các lĩnh vực như y dược, thực phẩm, chăn nuôi... Để giải quyết vấn đề tồn đọng này, đề tài hướng tới việc sử dụng chủng chủ an toàn, không chứa nội độc tố *B. subtilis* để biểu hiện TEV và HRV3C protease cũng như xây dựng mô hình ứng dụng 2 protease này trong tinh chế protein tái tổ hợp.

2.4. *Bacillus subtilis*

B. subtilis là chủng vi sinh vật an toàn GRAS, có khả năng tiết protein mạnh (hàm lượng enzyme có thể đạt 20 - 25 g/L dịch lên men) cùng với các ưu điểm khác như đặc điểm di truyền được hiểu rõ, có khả năng đạt mật độ cao trong điều kiện nuôi cấy đơn giản và rẻ tiền. Chính vì vậy, *B. subtilis* được lựa chọn và trở thành một chủng chủ phổ biến để sản xuất protein tái tổ hợp, đặc biệt trong sản xuất enzyme ngoại bào (như amylase, cellulase, protease, xylanase, và lipase...). Tuy nhiên, đối với biểu hiện protein nội bào, rất ít nghiên cứu trên *B. subtilis* cho thấy sự biểu hiện của protein mục tiêu lớn hơn 10% tổng số protein.

Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, đề tài sẽ tiến hành biểu hiện các protein TEV và HRV3C trong *B. subtilis* và tiến hành tinh chế các protein này. Việc sản xuất được các protein tái tổ hợp này ở *B. subtilis* sẽ tận dụng được ưu điểm không tạo nội độc tố ở *B. subtilis* so với *E. coli*. Lợi thế này có tiềm năng sẽ làm giảm thời gian tinh chế do không phải qua bước loại bỏ nội độc tố, sẽ làm giảm giá thành sản phẩm và có khả năng ứng dụng rộng rãi. Đồng thời, đề tài sẽ là minh chứng cho tiềm năng của *B. subtilis* trong việc biểu hiện nội bào các enzyme có hoạt tính.

2.5. Hệ thống vector biểu hiện pHT và promoter *Pgrac*212

2.5.1. Hệ thống vector pHT

Cùng với chủng chủ, vector biểu hiện cũng là một nhân tố quan trọng, ảnh hưởng trực tiếp tới sự biểu hiện của protein mục tiêu. Đối với chủng chủ *B. subtilis*, nhiều hệ thống vector biểu hiện đã và đang được phát triển. Trong đó, nổi bật là hệ thống vector biểu hiện pHT (một hệ thống thuộc nhóm vector sao chép kiểu theta, có khả năng tồn tại bền vững trong *B. subtilis* và *E. coli*). Hệ thống này đã và đang được nhóm nghiên cứu chúng tôi (thuộc TT Khoa học và CNSH, trường ĐH KHTN TpHCM) xây dựng và phát triển dựa trên hệ thống promoter mạnh: promoter *Pgrac* có khả năng biểu hiện mạnh hơn 50 lần so với một promoter mạnh khác đã tồn tại trước đó là *Pspac*. Promoter

Pgrac này bao gồm promoter mạnh *PgroESL* của *B. subtilis* được dung hợp với trình tự *lacO* có nguồn gốc từ *lac* operon của *E. coli*. Trong những nghiên cứu đầu tiên, promoter *Pgrac* được cảm ứng bằng IPTG và cho phép protein đích được tổng hợp bên trong tế bào lên đến 16% protein tổng số.

2.5.2. Promoter *Pgrac212*

Promoter *Pgrac212* là một trong những promoter tiêu biểu được phát triển từ thế hệ đầu tiên *Pgrac01*, được cải tiến giúp làm tăng độ bền của mRNA thông qua những đặc điểm được biến đổi là: (i) mRNA tạo thành sẽ có một cấu trúc kẹp tóc (stem - loop) ở đầu 5' cùng với (ii) khoảng cách tối ưu giữa *lacO* và RBS là 13 nucleotide. Với những thay đổi này, *Pgrac212* cho phép tăng thời gian bán rã của mRNA hơn 60 phút, gấp 2 lần so với *Pgrac01* (29,4 phút).

Tóm lại, dựa vào các đặc tính tốt, khả năng ứng dụng và vấn đề còn tồn đọng của TEV, HRV3C protease và khả năng sử dụng *B. subtilis* để biểu hiện các protease này được mô tả trong phần Tổng quan, đề tài hướng tới “Tạo các protease TEV và HRV3C ở *Bacillus subtilis* dùng cắt loại đuôi dung hợp trong tinh chế protein tái tổ hợp”. Để giải quyết mục tiêu trên, nội dung nghiên cứu của đề tài được chia làm 3 phần chính. Trong đó, nội dung 1 là “Tạo dòng, thu nhận và tinh chế các protein tái tổ hợp His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C trong tế bào *B. subtilis*”. Nội dung 2 là “Tạo dòng, thu nhận protein GFP tái tổ hợp chứa đuôi dung hợp có vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C làm cơ chất và xác định hoạt tính protease, các giá trị động học phản ứng cắt của các protease này”. Cuối cùng, nội dung 3 là “Ứng dụng His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C trong tinh chế protein GFP tái tổ hợp chứa đuôi dung hợp có vị trí cắt chuyên biệt của TEV/ HRV3C”

Chương 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

3.1. Vật liệu

3.1.1. Chứng vi sinh vật

3.1.2. Các plasmid

Các plasmid trong đề tài đều thuộc hệ thống vector biểu hiện pHT và sử dụng promoter *Pgrac212* để điều hòa sự biểu hiện. Trong đó, đề tài thiết kế, tạo dòng 4 plasmid để biểu hiện His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C và cơ chất BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP trên *B. subtilis*. Plasmid pHT1224 biểu hiện BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP có sẵn từ nghiên cứu trước của nhóm.

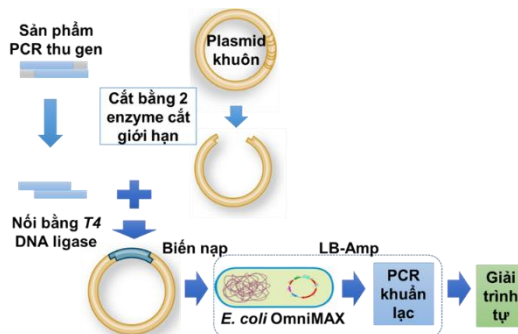
3.1.3. Các enzyme, kháng sinh, hóa chất, bộ kit, thang

Các vật liệu này được cung cấp bởi các hãng : QIAGEN, Sigma-Aldrich Bio-basic, Merck, HT Biotech và Thermo Scientific.

3.2. Phương pháp

3.2.1. Tạo dòng

Quá trình tạo dòng các plasmid được thực hiện theo quy trình được mô tả ở **Hình 3.7**. Các gen mục tiêu lần lượt được nối với plasmid khuôn nhờ phản ứng cắt bởi các enzyme cắt giới hạn và enzyme nối *T4* DNA Ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* OmniMAX, sàng lọc trên môi trường LB-Amp-Agar và phương pháp PCR khuẩn lạc với các cặp mồi đặc hiệu trước khi giải trình tự.



Hình 3.7. Quy trình tạo dòng trên *E. coli*

3.2.2. Biến nạp vào *B. subtilis*

Các plasmid tạo dòng thành công trong đề tài được biến nạp vào *B. subtilis* dựa trên khả năng khả nạp tự nhiên của chủng chủ này và sàng lọc bằng môi trường LB-Cm-Agar

3.2.3. Khảo sát các điều kiện biểu hiện His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C trên *B. subtilis*

Các chủng chủ *B. subtilis* 1012 lần lượt mang các plasmid biểu hiện His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C được cấy hoạt hóa và cấy truyền trên môi trường LB-Cm. Khi OD₆₀₀ nm đạt khoảng 0,8-1, mẫu được cảm ứng bằng IPTG và tiến hành khảo sát các điều kiện theo thứ tự: kiểm tra sự biểu hiện (23°C; 0,5 mM IPTG, 10 giờ sau cảm ứng); nhiệt độ biểu hiện (23°C, 30°C, 37°C); IPTG (từ 0 đến 1 mM) và thời điểm thu mẫu sau cảm ứng (từ 0 đến 12 giờ sau cảm ứng). Trừ thí nghiệm kiểm tra biểu hiện, ba khảo sát điều kiện còn lại được khảo sát theo dạng từng bước một theo thứ tự đã trình bày. Điều kiện cho kết quả biểu hiện trước sẽ được ứng dụng cho thí nghiệm sau. Các mẫu khảo sát được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE. Riêng các mẫu kiểm tra sự biểu hiện của His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C được thực hiện thêm phần Western Blot với kháng thể sơ cấp là kháng thể kháng đuôi Histidine từ chuột, kháng thể thứ cấp là kháng thể kháng IgG chuột liên kết Peroxidase từ thỏ và cơ chất TMB tạo màu

3.2.6. Phương pháp tinh chế protein bằng cột HisTrapTM HP

Phương pháp tinh chế protein bằng cột HisTrapTM HP được tiến hành dựa trên liên kết ái lực giữa đuôi His và ion Ni²⁺ gắn trên các hạt NTA (Nitrilotriacetic acid) resin.

3.2.7. Phương pháp đánh giá hoạt tính protease dựa trên SDS-PAGE

Phương pháp đánh giá hoạt tính của His-TEV protease được xây dựng dựa trên các phản ứng cắt của His-TEV (dãy nồng độ giảm dần từ 20 đến 0,1 µg/ml) với 30 µg cơ chất BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP để xác định nồng độ His-

TEV thấp nhất tương ứng 10 U theo định nghĩa: Một đơn vị hoạt tính (unit) của TEV protease là lượng protease này có thể cắt được hơn 85% của 3 μ g cơ chất trong buffer cắt pH 8 sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ 30°C (Invitrogen).

Tương tự, các phản ứng cắt của His-HRV3C (dãy nồng độ 60-0,3 μ g/ml) và His-GST-HRV3C (dãy nồng độ 136-0,68 μ g/ml) với 100 μ g cơ chất BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP để tìm ra các nồng độ protease thấp nhất tương ứng 1 U theo định nghĩa: Một đơn vị hoạt tính (unit) của HRV3C protease là lượng protease này có thể cắt được hơn 95% của 100 μ g cơ chất trong buffer cắt pH 8 sau 16 giờ ủ ở nhiệt độ 4°C (Thermo Sciencetific).

3.2.8. Phương pháp xác định động học của phản ứng His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C protease với cơ chất GFP tương ứng

Trước tiên, khả năng ức chế phản ứng cắt His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C protease của ZnSO₄ (50 mM) được khảo sát bằng 3 nghiệm thức: bổ sung 50 mM ZnSO₄ từ đầu (FZn), sau 10 phút (10Zn) và không bổ sung (C). Mẫu khảo sát được kiểm tra bằng SDS-PAGE

Quy trình xác định động học các phản ứng phân cắt cơ chất BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP của His-TEV; BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP của His-HRV3C và His-GST-HRV3C tạo ra các sản phẩm riêng biệt là BsLysSN-His-CS và protein GFP (có thể định lượng bằng sự phát huỳnh quang). Dựa vào lượng sản phẩm GFP (đã loại đuôi His) được tạo thành, các giá trị tốc độ phản ứng tương ứng với từng nồng độ cơ chất được xác định để dựng các đồ thị động học Michaelis-Menten. Từ đó, đề tài xác định các giá trị hiệu suất xúc tác K_{cat}/K_m với giá trị K_m bằng với nồng độ cơ chất mà trong phản ứng thì tốc độ bằng một nửa v_{max} . Giá trị K_{cat} bằng V_{max} chia cho nồng độ enzyme từng phản ứng.

Chương 4. KẾT QUẢ-BIỆN LUẬN

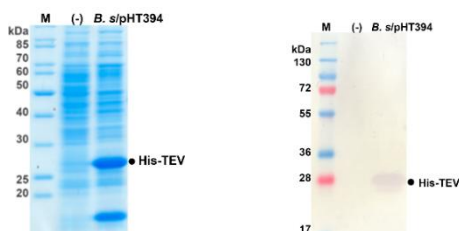
4.1. Tạo dòng các vector để biểu hiện His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C protease trên *B. subtilis*

Sau quá trình tạo dòng, các kết quả sắp giống cột giải trình tự với trình tự thiết kế lý thuyết (Phụ lục 2, 3 & 4) có độ tương đồng 100 % chứng tỏ đề tài đã tạo dòng thành công 3 plasmid biểu hiện His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C protease trên *B. subtilis*.

4.2. Khảo sát sự biểu hiện His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C protease trong *B. subtilis*

4.2.1. Khảo sát sự biểu hiện His-TEV trong *B. subtilis*

4.2.1.1. Kiểm tra sự biểu hiện protein His-TEV



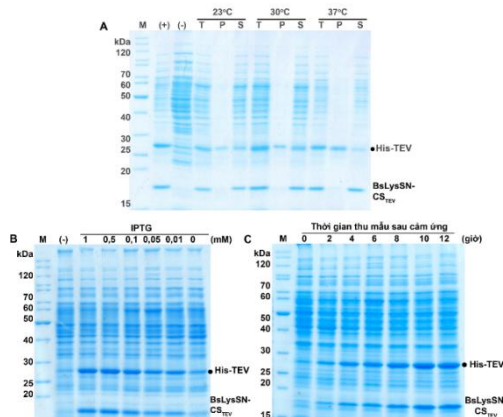
(A) Kết quả SDS-PAGE (B) Kết quả Western Blot

Hình 4.7. Sự biểu hiện của His-TEV trên *B. subtilis* 1012/pHT394

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4.7.A) và kết quả Western Blot (Hình 4.7.B) cho thấy: so với chứng âm, mẫu *B. subtilis* 1012/pHT394 đều có sự xuất hiện của vạch tín hiệu khoảng 28,6 kDa tương ứng với kích thước dự đoán lý thuyết của His-TEV protease. Đồng thời, các kết quả cũng chứng tỏ: các phân tử BsLysSN-CS_{TEV}-His-TEV protease được biểu hiện bởi *B. subtilis* 1012/pHT394 (khoảng 47 kDa) đã nhận diện và phân cắt trình tự cắt CS_{TEV} lẫn nhau để tạo nên sản phẩm sau cùng là His-TEV (28,6 kDa). Điều này chứng tỏ vạch protein chính là protein mục tiêu His-TEV và protein này có hoạt tính cắt lại vị trí chuyên biệt của TEV ngay trong tế bào *B. subtilis*.

4.2.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự biểu hiện protein His-TEV

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4.8) cho thấy so sánh với chứng âm, ở cả ba nhiệt độ khảo sát đều xuất hiện vạch protein đậm có kích thước tương ứng với kích thước của protein mục tiêu là 28,6 kDa. Các vạch protein His-TEV ở các pha tổng cho thấy lượng protein biểu hiện ở 23°C thấp hơn so với 30°C và 37°C. Tuy nhiên, hai điều kiện 23°C và 30°C lại có protein His-TEV ở dạng tan nhiều hơn.



Hình 4.8-10. Kết quả SDS - PAGE khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên sự biểu hiện TEV protease của *B. subtilis* 1012/pHT394

Khi tiến hành phân tích kỹ hơn bằng phần mềm phân tích AlphaEaseFC (Hình 4.9), ở 23°C, về lượng protein His-TEV tan, điều kiện 23°C thấp hơn và chỉ bằng 64% lượng His-TEV tan thu nhận ở điều kiện 30°C. Khi xét về phần trăm protein tổng số tan, mẫu khảo sát ở 23°C và 30°C có lượng His-TEV lần lượt chiếm khoảng 7,9% và 10% tổng số protein nội bào tan trong *B. subtilis*. Do đó, với mục đích tinh chế protein ở dạng tan, nhiệt độ 30°C được chọn là điều kiện phù hợp để thu nhận His-TEV dạng tan từ chủng *B. subtilis* 1012/pHT394.

4.2.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên sự biểu hiện protein His-TEV

Kết quả điện di SDS-PAGE (**Hình 4.9**) cho thấy chủng *B. subtilis* 1012/pHT394 tái tổ hợp khi được cảm ứng bằng IPTG với các nồng độ tăng dần từ 0,01 mM đến 1 mM đều cho thấy biểu hiện vạch protein mục tiêu với kích thước 28,6 kDa, mà ở chứng âm không có. Mẫu khảo sát có nồng độ IPTG 0,5 mM có lượng His-TEV cao nhất chiếm khoảng 13,3% tổng số protein nội bào của *B. subtilis*. Do đó, đề tài xác định điều kiện cảm ứng IPTG 0,5 mM ở 30°C là phù hợp để biểu hiện His-TEV protease trong chủng *B. subtilis* 1012/pHT394.

4.2.1.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thu mẫu sau cảm ứng lên sự biểu hiện protein His-TEV

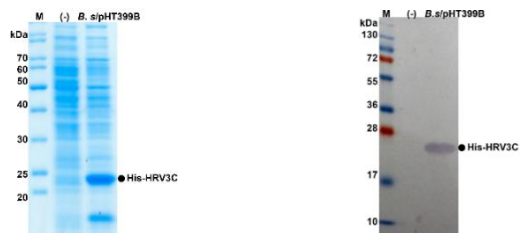
Kết quả SDS-PAGE (**Hình 4.10**) cho thấy vạch protein His-TEV (28,6 kDa) càng đậm dần theo thời gian và đạt đỉnh tại thời điểm 12 giờ sau cảm ứng. Tại thời điểm này, protein His-TEV chiếm khoảng 18% tổng số protein nội bào của chủng *B. subtilis* 1012/pHT394. Giá trị này tương đương với phần trăm His-TEV trong tổng số protein nội bào của *E. coli* trong nghiên cứu của Miladi *et. al.* Do đó, thời điểm 12 giờ sau cảm ứng IPTG là phù hợp để thu nhận protein His-TEV mục biểu hiện bởi chủng *B. subtilis* 1012/pHT394.

4.2.2. Khảo sát sự biểu hiện His-HRV3C trong *B. subtilis*

4.2.2.1. Kiểm tra sự biểu hiện protein His-HRV3C

Kết quả điện di SDS-PAGE (**Hình 4.11.A**) và kết quả lai Western Blot (**Hình 4.11.B**) cho thấy: so với chứng âm không có sự xuất hiện của vạch protein mục tiêu, mẫu *B. subtilis* 1012/pHT399B có sự xuất hiện của vạch tín hiệu (kích thước khoảng 22 kDa tương ứng với kích thước dự đoán lý thuyết của His-HRV3C) trên cả hai phương pháp. Điều này chứng tỏ vạch protein chính là protein mục tiêu His-HRV3C và protein này có hoạt tính cắt lại vị trí chuyên biệt của HRV3C ngay trong tế bào *B. subtilis*. Nguyên nhân đưa đến kết luận này là do protease được biểu hiện bởi *B. subtilis* 1012/pHT399B là

BsLysSN-CS_{HRV3C}-His-HRV3C. Các phân tử protease này đã nhận diện và phân cắt trình tự cắt CS_{HRV3C} của nhau để tạo nên sản phẩm sau cùng là His-HRV3C. Tóm lại, chủng *B. subtilis* 1012/pHT399B có khả năng biểu hiện His-HRV3C có hoạt tính đã được thu nhận, lưu trữ ở -80°C

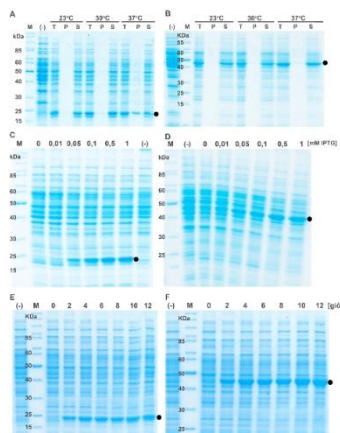


(A) Kết quả SDS-PAGE

(B) Kết quả Western Blot

Hình 4.11. Sự biểu hiện của His-HRV3C trên *B. subtilis* 1012/pHT399B

4.2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự biểu hiện protein His-HRV3C



Hình 4.12-18. Kết quả khảo sát sự biểu hiện của hai dạng protein HRV3C dung hợp ở các điều kiện khảo sát

Kết quả điện di (Hình 4.12) cho thấy so với chứng âm thì ở các nhiệt độ khảo sát đều có xuất hiện vạch protein ngoại lai với khối lượng phân tử khoảng 22 kDa) tương ứng với kích thước lý thuyết của protein dung hợp

His-HRV3C protease. Theo số liệu phân tích AlphaEaseFC, khoảng 45% protein His-HRV3C ở 37°C được biểu hiện ở pha tủa trong khi ở hai điều kiện nhiệt độ còn lại thì lượng protein ở pha tủa chỉ khoảng 10%. Ngoài ra, giữa 3 điều kiện, mẫu tổng và mẫu tan thu nhận ở 30°C có giá trị định lượng Area cao nhất. Do đó, 30°C được nhận định là điều kiện phù hợp để thu nhận protein His-HRV3C biểu hiện bởi chủng *B. subtilis* 1012/pHT399B.

4.2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên sự biểu hiện protein His-HRV3C

Kết quả điện di (**Hình 4.13**) cho thấy vạch protein His-HRV3C (22 kDa) có kích thước và độ đậm tăng dần khi nồng độ 0,05 mM đến 0,5 mM và giá trị Area đạt đỉnh tại điều kiện này. Điều này chứng tỏ, lượng protein His-HRV3C được biểu hiện nhiều hơn khi tăng nồng độ chất cảm ứng IPTG và nồng độ IPTG 1 mM là điều kiện thích hợp để thu nhận His-HRV3C biểu hiện bởi chủng *B. subtilis* 1012/ pHT399B.

4.2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thu mẫu sau cảm ứng lên sự biểu hiện protein His-HRV3C

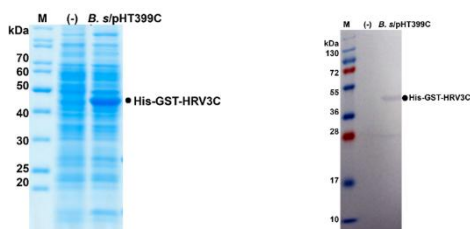
Kết quả điện di trên gel SDS-PAGE (**Hình 4.14**) cho thấy vạch protein His-HRV3C hầu như không xuất hiện ở chứng âm, thời điểm 0 giờ và bắt đầu xuất hiện từ thời điểm 2 giờ nuôi cấy sau cảm ứng. Kích thước và độ đậm của vạch protein His-HRV3C gia tăng theo thời gian giờ nuôi cấy và giá trị Area đạt cực đại tại mẫu thu nhận ở thời điểm 12 giờ. Tại thời điểm này, protein His-HRV3C mục tiêu chiếm khoảng 11% tổng số protein nội bào của, chủng *B. subtilis* 1012/pHT399B. Do đó, 12 giờ sau cảm ứng được xem là thời điểm phù hợp để thu nhận His-HRV3C.

Tóm lại, dựa vào các kết quả khảo sát điều kiện nuôi cấy: 30°C, 1 mM IPTG và thời điểm 12 giờ sau cảm ứng là điều kiện thích hợp để chủng *B. subtilis* 1012/pHT399B biểu hiện lượng lớn protease His-HRV3C dạng tan nhằm phục vụ cho quá trình tinh chế.

4.2.3. Khảo sát sự biểu hiện của His-GST-HRV3C trong *B. subtilis*

4.2.3.1. Kiểm tra sự biểu hiện protein His-GST-HRV3C

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4.15.A) và kết quả lai Western Blot (Hình 4.15.B) cho thấy: so với chứng âm, mẫu *B. subtilis* 1012/pHT399C có sự xuất hiện của vạch tín hiệu (kích thước khoảng 49 kDa tương ứng với kích thước dự đoán lý thuyết của His-GST-HRV3C). Điều này chứng tỏ vạch protein chính là protein mục tiêu His-GST-HRV3C và protein này có hoạt tính cắt lại vị trí chuyên biệt của HRV3C ngay trong tế bào *B. subtilis*. Điều này là do protease được biểu hiện bởi *B. subtilis* 1012/pHT399C là BsLysSN-CS_{HRV3C}-His-GST-HRV3C đã nhận diện và phân cắt trình tự cắt CS_{HRV3C} của nhau để tạo nên sản phẩm sau cùng là His-GST-HRV3C. Chúng *B. subtilis* 1012/pHT399C có khả năng biểu hiện His-GST-HRV3C có hoạt tính đã được thu nhận.



(A) Kết quả SDS-PAGE

(B) Kết quả Western Blot

Hình 4.15. Sự biểu hiện của His-GST-HRV3C trên *B. subtilis* 1012/pHT399C

4.2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự biểu hiện protein His-GST-HRV3C

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4.16) cho thấy so với chứng âm, mẫu ở các nhiệt độ khảo sát đều có xuất hiện vạch protein tái tổ hợp với khối lượng phân tử khoảng 49 kDa tương ứng với kích thước lý thuyết của dạng protein dung hợp His-GST-HRV3C. Khi so sánh pha tổng và pha tan của protein trong tế bào chất ở ba nhiệt độ khảo sát, kết quả cho thấy 37°C có giá trị Area

(định lượng sự biểu hiện His-GST-HRV3C) cao hơn hai điều kiện còn lại. Do đó, 37°C được chọn để thu nhận protein His-GST-HRV3C từ chủng *B. subtilis* 1012/ pHT399C.

4.2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên sự biểu hiện protein His-GST-HRV3C

Kết quả điện di (**Hình 4.17**) cho thấy vạch protein His-GST-HRV3C (49 kDa) hiện diện rõ rệt ở những mẫu nuôi cấy được cảm ứng bằng IPTG từ nồng độ 0,05 mM đến 1 mM. Kết quả phân tích AlphaEaseFC cho thấy vạch protein mục tiêu ở nồng độ IPTG 1 mM có giá trị Area cao nhất nên đề tài chọn nồng độ IPTG là 1 mM là nồng độ thích hợp cho chủng *B. subtilis* 1012/ pHT399C cảm ứng biểu hiện protein His-GST-HRV3C.

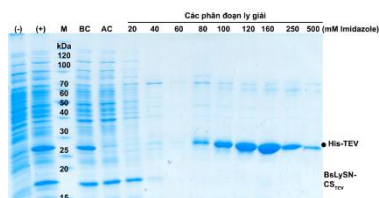
4.2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian cảm ứng lên sự biểu hiện protein His-GST-HRV3C

Kết quả điện di trên gel (**Hình 4.18**) cho thấy vạch protein mục tiêu xuất hiện từ thời điểm 2 giờ nuôi cấy sau cảm ứng, có độ đậm và kích thước gia tăng theo thời gian giờ nuôi cấy và đạt giá trị Area cực đại ở 12 giờ. Đồng thời, kết quả phân tích AlphaEaseFC cũng khẳng định thời điểm 12 giờ sau cảm ứng là điều kiện phù hợp để thu nhận His-GST-HRV3C. Tại thời điểm này, protein His-GST-HRV3C chiếm khoảng 16% tổng số protein nội bào của chủng *B. subtilis* 1012/pHT399C. So với His-HRV3C (chiếm 10%), His-GST-HRV3C có tỷ lệ cao hơn hẳn.

4.3. Tình chế His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C biểu hiện bởi *B. subtilis*

4.3.1. Tình chế protein His-TEV

Trong quá trình tinh chế bằng HisTrap™ HP, protein His-TEV và một số protein tạp sẽ được giữ lại trong cột nhờ liên kết ái lực với Ni-NTA. Protein His-TEV được thu nhận bằng dung dịch dung ly chứa Imidazole với các nồng độ từ 20 đến 500 mM và kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS- PAGE. Kết quả điện di (**Hình 4.19**) cho thấy từ phân đoạn 80 mM đến 500 mM, protein mục tiêu bắt đầu được dung ly ra khỏi cột, trong đó, ở phân đoạn 160 mM là vạch protein mục tiêu đậm nhất. Các phân đoạn ly giải có nồng độ 100, 120, 160 mM Imidazole được gộp lại và thẩm tách loại Imidazole bằng Storage buffer.



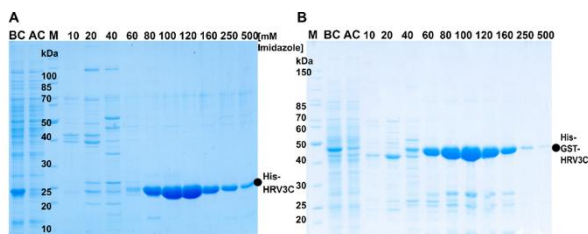
Hình 4.19. Kết quả SDS - PAGE kiểm tra tinh chế protein His-TEV protease.

Kết quả thu được protein His-TEV với nồng độ 2,75 mg/ml với độ tinh sạch được phân tích bằng phần mềm AlphaEase FC là 95%. Sản lượng His-TEV thu nhận từ *B. subtilis* 1012/pHT394 là 27,5 mg/L môi trường LB.

4.3.2. Tinh chế protein His-HRV3C

Đối với kết quả tinh chế His-HRV3C (**Hình 4.20.A**), các phân đoạn dung ly 80, 100, 120 và 160 có lượng protein His-HRV3C nhiều và có độ tinh sạch cao nhất nên được gộp lại và thẩm tách để lưu trữ. Kết quả đo nồng độ cho thấy đề tài đã thu nhận protease His-HRV3C được biểu hiện bởi chủng *B. subtilis* 1012/pHT399B với nồng độ là 2,68 mg/ml, tinh sạch 98%. Sản lượng

His-HRV3C protease thu nhận từ *B. subtilis* 1012/pHT399B là khoảng 16,2 mg/L môi trường LB.



Hình 4.20. Kết quả tinh chế HRV3C bằng cột HisTrapTm Hp:

A. His-HRV3C; B. His-GST-HRV3C.

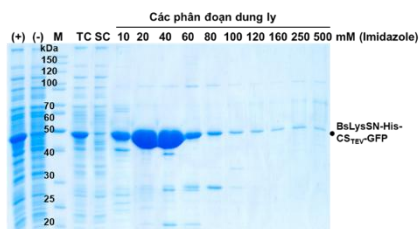
4.3.3. Tinh chế protein His-GST-HRV3C

Kết quả **Hình 4.20B** cho thấy các phân đoạn dung ly với nồng độ Imidazole từ 60-160 mM có nồng độ và độ tinh sạch cao nhất được gộp lại và bằng thẩm tách để lưu trữ. Protease His-GST-HRV3C được biểu hiện bởi chủng *B. subtilis* 1012/pHT399C với nồng độ là 0,69 mg/ml, độ tinh sạch khoảng 95,5%. Sản lượng His-GST-HRV3C thu nhận từ *B. subtilis* 1012/pHT399C là khoảng 10,8 mg/L môi trường LB. So sánh với sản lượng HisTEV và His-HRV3C, sản lượng của His-GST-HRV3C là thấp hơn cả và có thể giải thích là do việc biểu dạng dung hợp trước cắt BsLysSN-CS_{HRV3C}-His-GST-HRV3C (67 kDa) đã làm ảnh hưởng đến tổng số lượng tế bào.

4.4. Tạo các cơ chất có chứa trình tự nhận biết cắt của TEV và HRV3C protease

4.4.1. Thu nhận protein BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP

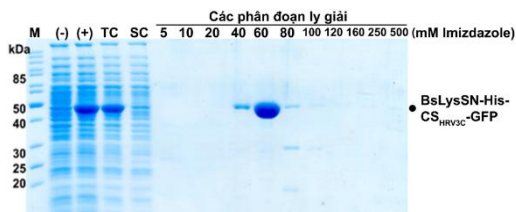
Kết quả điện di SDS-PAGE (**Hình 4.21**) các phân đoạn 20 và 40 mM là vạch protein mục tiêu đậm nhất, tiếp theo là đến vạch ở phân đoạn 10 mM, 60 mM. Protein cơ chất BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP được thu nhận với nồng độ 1,75 mg/ml với độ tinh sạch là 90,2% (phân tích bằng AlphaEase FC). Sản lượng thu nhận là 23,4 mg/L.



Hình 4.21. Kết quả tinh chế protein *BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP*

4.4.2. Thu nhận protein *BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP*

Sau quá trình tạo dòng, kết quả sắp giống cột (Phụ lục 5) cho thấy kết quả giải trình tự tương đồng 100% so với trình tự lý thuyết, chứng tỏ plasmid pHT400B biểu hiện protein dung hợp BlysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP đã được thu nhận. Trong bước tinh chế, kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4.25) cho thấy phân đoạn 40 mM đến 60 mM có nhiều protein mục tiêu được dung ly nên gộp lại được mẫu BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP với nồng độ 3,3 mg/ml với độ tinh sạch là 90,4%.

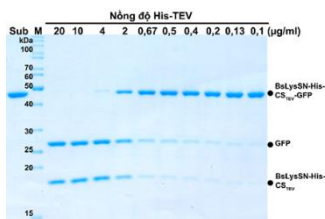


Hình 4.25. Kết quả tinh chế protein *BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP*

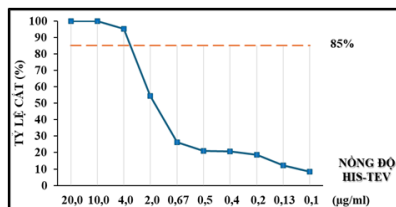
4.5. Hoạt tính của His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C protease

4.5.1. Hoạt tính His-TEV biểu hiện bởi *B. subtilis*/pHT394

Kết quả điện di SDS – PAGE (Hình 4.26.A) và kết quả định lượng bằng phẩm mềm AlphaEase FC (Hình 4.26.B) cho thấy nồng độ His-TEV 0,4 µg/ml là nồng độ thấp nhất mà tỷ lệ cắt 30 µg cơ chất BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP lớn hơn 85% (tương ứng với 10 Unit TEV protease). Do đó, hoạt tính riêng của His-TEV protease được thu nhận từ *B. subtilis*/pHT394 là 8,3 U/µg hay 8300 U/mg.



(A) Gel SDS-PAGE

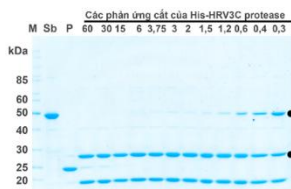


(B) Đồ thị tỷ lệ cắt

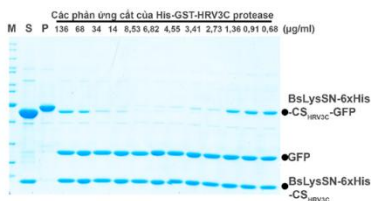
Hình 4.26. Sản phẩm cắt của His-TEV thu nhận từ *B. subtilis*/pHT394.

4.5.2. Hoạt tính cắt của His-HRV3C và His-GST-HRV3C

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 4.27.A&B) và kết quả phân tích AlphaEase FC cho thấy nồng độ protease thấp nhất cho tỷ lệ cắt lớn hơn 95% của His-HRV3C và His-GST-HRV3C lần lượt là 1,2 và 2,73 $\mu\text{g/ml}$ (đều là 56,4 nM), chứng tỏ khả năng phân cắt cơ chất BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP của cả hai loại protease là tương đương nhau. Đối với His-HRV3C, dựa vào định nghĩa hoạt tính HRV3C ở mục 3.2.7, nồng độ 1,2 $\mu\text{g/ml}$ His-HRV3C (hay 0,12 μg do $V_{\text{phản ứng}} = 100 \mu\text{l}$) tương đương 1 U. Từ đó, hoạt tính riêng của His-HRV3C là 8,33 U/ μg (hay 8330 U/mg). Đối với His-GST-HRV3C, nồng độ 2,73 $\mu\text{g/ml}$ His-HRV3C (hay 0,273 μg do $V = 100 \mu\text{l}$) tương đương 1 U thì hoạt tính riêng của His-GST-HRV3C là 3,66 U/ μg (hay 3660 U/mg).



(A) His-HRV3C

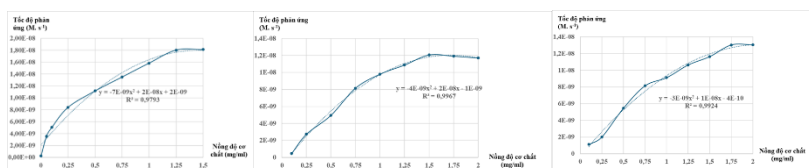


(B) His-GST-HRV3C

Hình 4.29. Sản phẩm cắt của His-HRV3C và His-GST-HRV3C với cơ chất

4.6. Động học của các phản ứng giữa His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C protease với các cơ chất tương ứng

Kết quả khảo sát (**Hình 4.28**) cho thấy 50 mM ZnSO₄ có khả năng ức chế phần lớn khả năng cắt của TEV và HRV3C protease. Đồ thị động học (**Hình 4.30**) cho thấy: phản ứng cắt giữa protease His-TEV và cơ chất BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP tuân theo phương trình động học Michaelis-Mentenvaf có giá trị K_m đạt 0,312 mg/ml = 6,756 x 10⁻⁶M và K_{cat} là 0,0181 s⁻¹. Hiệu suất xúc tác (K_{cat}/K_m) phản ứng cắt giữa His-TEV protease với cơ chất BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP là 2680 M⁻¹.s⁻¹



Hình 4.30.His-TEV ;Hình4.31.His-HRV3C;Hình 4.32. His-GST-HRV3C

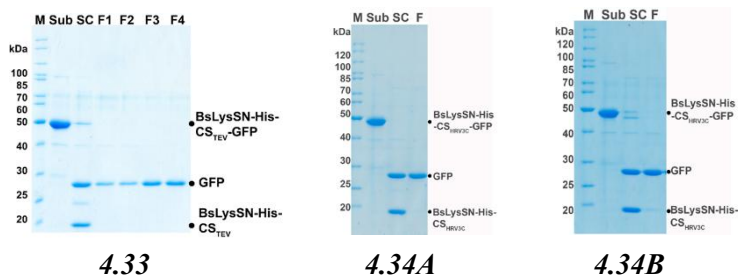
Đồ thị động học (**Hình 4.32**) cho thấy: phản ứng của His-HRV3C protease biểu hiện bởi *B. subtilis* với cơ chất BsLysSN-His-giá trị của K_m là 0,593 mg/ml = 1,276 x 10⁻⁵ M; K_{cat} = 0,012 s⁻¹ và hiệu suất xúc tác (K_{cat}/K_m) CS_{HRV3C}-GFP là 946,68 M⁻¹.s⁻¹.

Đồ thị động học (**Hình 4.32**) cho thấy: phản ứng xúc tác giữa protease His-HRV3C và cơ chất BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP giá trị của K_m là 0,609 mg/ml=1,31 x 10⁻⁵ M, giá trị K_{cat} = 0,0131 s⁻¹ và hiệu suất xúc tác (K_{cat}/K_m) là 995,07 M⁻¹.s⁻¹.

4.7. Ứng dụng His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C biểu hiện bởi *B. subtilis* trong quá trình tinh chế kết hợp loại đuôi dung hợp

Trong các nội dung đã trình bày, các nội dung 4.4 (tạo các cơ chất có trình tự nhận biết của TEV và HRV3C), nội dung 4.5 (về hoạt tính cắt) thì đề tài đã đi qua cả hai bước của mô hình tinh chế hai bước (Waugh *et.al*). Các kết quả SDS-PAGE (Hình 4.35 và 4.36) cho thấy lần qua cột HisTrap của các mẫu sản phẩm cắt của cả 3 loại protease với cơ chất tương ứng đã thu về sản phẩm GFP có độ tinh sạch cao (>95%). Điều này chứng tỏ ứng dụng His-

TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C trong tinh chế protein GFP tái tổ hợp chứa đuôi dung hợp có vị trí cắt chuyên biệt tương ứng là hoàn toàn khả thi.



Hình 4.33-34. SDS-PAGE mẫu tinh chế protein GFP sau cắt bằng His-TEV(4.33), His-HRV3C (4.33A) và His-GST-HRV3C (4.33B)

Chương 5. KẾT LUẬN

Sau quá trình hoàn thành luận án, đề tài đã đạt được những kết quả sau:

- Đã tạo dòng 3 plasmid để biểu hiện; thu nhận và tinh chế thành công 3 protease mang đuôi dung hợp là His-TEV, His-HRV3C và His-GST-HRV3C trong tế bào *B. subtilis*.
- Đã tạo dòng 1 plasmid và thu nhận được 2 protein GFP tái tổ hợp dung hợp với đuôi BsLysSN-His có vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C là BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP, BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP. Từ đó, đề tài đã đánh giá được hoạt tính, xác định các giá trị động học của phản ứng giữa các protease His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C với cơ chất tương ứng.
- Quá trình tinh chế các cơ chất kiểu mẫu như BsLysSN-His-CS_{TEV}-GFP, BsLysSN-His-CS_{HRV3C}-GFP đã cho thấy các protease His-TEV, His-HRV3C, His-GST-HRV3C có thể được dùng để tinh chế protein tái tổ hợp mục tiêu có đuôi dung hợp chứa vị trí cắt chuyên biệt của TEV/HRV3C, đặc biệt là các protein dạng “BsLysSN-His-CS-Protein”.

Các kết quả nghiên cứu của đề tài là một minh chứng cho tiềm năng của chủng chủ *B. subtilis* để biểu hiện nội bào các enzyme có hoạt tính.

DANH MỤC BÀI BÁO KHOA HỌC

(Trang này được xếp sau trang bìa và trước bản sao các bài báo của NCS)

1. Vuong Duong Le, Trang Thi Phuong Phan, Tri Minh Nguyen, Luc Brunsveld, Wolfgang Schumann, Hoang Duc Nguyen (2019). Using the IPTG-Inducible Pgrac212 Promoter for Overexpression of Human Rhinovirus 3C Protease Fusions in the Cytoplasm of Bacillus subtilis Cells. Current Microbiology, 76(12):1477-1486. DOI: 10.1007/s00284-019-01783-9
2. Vuong Duong Le, Trang Thi Phuong Phan, Hoang Duc Nguyen (2024). Production of Tobacco Etch Virus Protease (TEV) Expressed in the Endotoxin-Free Bacillus subtilis and Its Application. Current Microbiology, 81(11):376. DOI: 10.1007/s00284-024-03907-2