



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002477

(51)⁷ **C12N 1/02; C12Q 1/68**

(13) **Y**

(21) 2-2018-00389

(22) 03/10/2018

(45) 25/11/2020 392

(43) 25/12/2018 369A

(73) **VIỆN HÓA SINH BIÊN - VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM (VN)**

18 - Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Nguyễn Thị Kim Cúc (VN); Vũ Thị Thu Huyền (VN); Phạm Việt Cường (VN); Trần Thị Hồng (VN); Lê Thị Hồng Minh (VN); Tôn Thất Hữu Đạt (VN); Nguyễn Thị Phương Hoa (VN); Nguyễn Mai Anh (VN).

(54) **NUCLEOTIT ĐƯỢC PHÂN LẬP MÃ HÓA PROTEIN ỨC CHẾ SERIN PROTEAZA PI-QT2 VÀ QUY TRÌNH SẢN XUẤT PROTEIN NÀY**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2, trong đó nucleotit này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 được nhân dòng trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp và chủng *E. coli* này được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biên với số lưu giữ *E. coli*(PI-QT2). Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến quy trình sản xuất protein ức chế serin proteaza PI-QT2 bao gồm các bước: a) tạo vectơ tái tổ hợp; b) thu vi khuẩn tái tổ hợp; c) cảm ứng biểu hiện protein ức chế proteaza; d) phá vỡ tế bào nuôi cấy; và e) thu hồi protein ức chế serin proteaza PI-QT2. Quy trình theo giải pháp cho phép sản xuất được protein ức chế proteaza làm nguyên liệu để phát triển sản phẩm hỗ trợ phòng chống các bệnh liên quan đến proteaza.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học và công nghệ gen ứng dụng trong y sinh, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến trình tự nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế serin proteaza từ metagenom vi sinh vật liên kết hải miên và quy trình sản xuất protein ức chế proteaza này nhằm tạo ra nguyên liệu để phát triển sản phẩm hỗ trợ phòng chống các bệnh liên quan đến proteaza.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Metagenomic là phương pháp mới cho phép nghiên cứu vật liệu di truyền phục hồi trực tiếp từ các mẫu môi trường. Cho đến nay, metagenomic đã được sử dụng cho việc tìm kiếm các hợp chất hoạt tính sinh học mới cũng như điều tra sự đa dạng của các vi sinh vật từ các môi trường khác nhau. Đặc biệt, các nghiên cứu tập trung vào phát hiện các gen mã hóa các hợp chất có khả năng hoạt tính sinh học cho lĩnh vực sinh học được phẩm từ các vi sinh vật biển. Nhiều chất ức chế proteaza và các chất chuyển hóa sinh học thứ hai khác đã tìm thấy từ cơ sở dữ liệu metagenom (Baharum và cộng sự, 2010; Culligan và cộng sự, 2014; He và cộng sự, 2013).

Khi so sánh tế bào bình thường và tế bào ác tính, người ta nhận thấy các tế bào ác tính chứa nhiều proteaza hơn tế bào bình thường. Sự tăng của các enzym proteaza đã được phát hiện thấy ở các tế bào ác tính cũng như ở máu, dịch tổ chức khác nhau của nhiều loại động vật mang khối u ác tính. Tế bào các khối u nuôi cấy bài tiết một proteaza đặc hiệu (chất hoạt hóa plasminogen) có hoạt tính tăng từ 10-100 lần so với tế bào bình thường. Proteaza này nằm ở bề mặt màng tế bào, được bài tiết và xuất hiện rất sớm trong các tế bào chuyển dạng ác tính. Các chất ức chế proteaza có mặt trong cơ thể sống hoặc được đưa từ bên ngoài vào có khả năng chống ung thư theo các cơ chế có thể sau:

- Ức chế proteaza có vai trò trong quá trình di căn và xâm lấn của tế bào ung thư.
- Ức chế sự giải phóng yếu tố phát triển cần thiết cho sự phát triển tế bào ung thư từ tiền chất.
- Chống lại sự hình thành các gốc tự do mà các gốc này có khả năng kích thích sự chuyển dạng tế bào dẫn tới ung thư.

- Khóa thụ thể AhR ở tế bào gan, vì vậy ức chế việc chuyển các chất có khả năng gây ung thư thành dạng có tác dụng gây ung thư thật sự.

Ngoài ra, vẫn có thể còn tồn tại những cơ chế khác ngoài những cơ chế đã nêu ở trên.

Một chất ức chế proteaza có khả năng ức chế hơn 80% hoạt tính toàn phần elastaza, collagenaza và một proteaza giống chymotrysin đã được tách chiết từ tế bào bạch cầu (Leucocyte Neutral Proteaza Inhibitor- LNPI) và sử dụng trong nghiên cứu chống ung thư. So sánh hai nhóm chuột cái được cấy ghép tế bào ung thư phổi Lewis, trong đó một nhóm có sử dụng LPNI trong 14 ngày sau khi cấy ghép thì khối lượng của khối u di căn nhóm này chỉ bằng khoảng 50% so với nhóm chứng.

Proteaza là enzym quan trọng trong tế bào vật chủ và chịu trách nhiệm cho nhiều chức năng sinh lý như kích hoạt zymogen, đông máu, xơ hóa nguyên bào sợi, hormon và phóng thích peptit hoạt tính sinh học.... Tuy nhiên, mất kiểm soát phân giải protein có thể gây ung thư và bệnh tim mạch, viêm, thoái hóa thần kinh cũng như các bệnh do vi khuẩn, virus và ký sinh trùng. Ngày nay, các chất ức chế proteaza thường được sử dụng để điều trị các bệnh liên quan đến proteaza. Do đó, việc khám phá ra các chất ức chế proteaza mới vẫn là một mối quan tâm đặc biệt đối với các nhà khoa học trên thế giới nói chung, cũng như các nhà khoa học Việt Nam nói riêng (Barrett và cộng sự, 1998; Agbowuro và cộng sự, 2017).

Hải miên biển được biết đến như một "mỏ vàng" của các sản phẩm tự nhiên từ môi trường biển. Nhóm nghiên cứu đã chọn một gen mã hóa chất ức chế serin proteaza PI-QT2 từ metagenom của vi sinh vật liên kết hải miên *Rhabdastrella* sp. được thu nhận tại vùng biển Quảng Trị Việt Nam tại tọa độ 107°07'06.0"E; 17°04'50.2"N, để tạo ra các hợp chất có hoạt tính sinh học ức chế proteaza, tiến hành biểu hiện gen mã hóa chất ức chế serin proteaza PI-QT2 trong *E. coli* BL21 (DE3), tinh chế thu hồi protein và thử hoạt tính ức chế của gen này.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, giải pháp hữu ích đề cập đến nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 và quy trình sản xuất protein ức chế serin proteaza PI-QT2 để tạo sản phẩm hỗ trợ phòng chống các bệnh liên quan đến proteaza.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế proteaza PI-QT2, trong đó nucleotit này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1.

Theo một phương án của khía cạnh này, trong đó nucleotit này được nhân dòng trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp và chủng *E. coli* này được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển với số lưu giữ *E. coli*(PI-QT2).

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất protein ức chế serin proteaza PI-QT2, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tạo vector tái tổ hợp bằng cách cắt gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 từ *E. coli* có số *E. coli*(PI-QT2) tại Viện Hóa sinh biển bằng enzym *Eco* RI và *Not* I, sau đó gắn vào vector biểu hiện pET32a (+) để thu được vector tái tổ hợp pET32a (+) /PI-QT2;

b) thu vi khuẩn tái tổ hợp bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pET32a (+) /PI-QT2 vào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3), sau đó chủng vi khuẩn tái tổ hợp BL21(DE3)/pET32a(+)/PI-QT2 được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB bổ sung 1μl ampicilin/ml và tiến hành nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện lắc đến khi OD đạt từ 0,6 đến 1,8;

c) cảm ứng biểu hiện protein ức chế serin proteaza bằng cách bổ sung isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) nồng độ 100mM/ml, sau khi nuôi ở nhiệt độ từ 20 đến 37°C trong khoảng từ 4 đến 6 giờ, ly tâm thu tế bào và bổ sung đệm SDS 1,5X và ủ ở 100°C trong 10 phút, sau khi ly tâm ở 10.000 vòng/phút, thu cặn tế bào nuôi cấy;

d) phá vỡ tế bào nuôi cấy bằng cách hòa tan cặn tế bào trong dung dịch đệm dung giải bao gồm 50mM Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 10μg/ml lysozym, pH=7,0 và ủ trong 30 phút rồi siêu âm với xung ngắn 200-300μA trong nước đá đến khi thu dịch tan đều rồi ly tâm ở 1400 vòng/phút ở 4°C thu phần dịch nổi; và

e) thu hồi protein ức chế serin proteaza PI-QT2 bằng cách cho phần dịch nổi qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA agarosa, rửa giải bằng imidazol theo nồng độ bậc thang 100 mM, 300mM và 500mM, sau khi loại bỏ dung môi, kết tinh thu được protein ức chế proteaza PI-QT2 tinh sạch.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh kết quả điện di kết quả cảm ứng tạo protein ức chế serin proteaza bằng IPTG theo giải pháp hữu ích trên gel polyacrylamit SDS ở nồng độ 12,5%. Trong đó (M) là giếng protein chỉ thị của Bio-basic. (1) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a+]. (2) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a+/PI-QT2] cảm ứng IPTG 1,5mM. Các giếng (3), (5), (7) và (9) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a+/PI-QT2] không cảm ứng IPTG. Các giếng (4), (6) và (8) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a+/PI-QT2] cảm ứng IPTG 1mM, 0,5mM, 0,1mM, tương ứng.

Hình 2 là hình ảnh kết quả điện di protein tan và không tan của *E. coli* BL21 mang gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 trên gel polyacrylamit 12,5% ở các nhiệt độ khác nhau. (1) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a(+) cảm ứng 37°C. Các giếng (2), (4), (6) và (8) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] trước cảm ứng. Các giếng (3), (5), (7) và (9) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] cảm ứng ở 37 °C, 30 °C, 20 °C và 25 °C, tương ứng.

Hình 3 là hình ảnh kết quả điện di protein tan và không tan của *E. coli* BL21 mang gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 biểu hiện ở 37 °C trên gel polyacrylamit 12,5%. (M) là protein chỉ thị của hãng Intron. (1) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] cảm ứng IPTG. (2) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] pha không tan. (3) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] pha tan.

Hình 4 là hình ảnh kết quả điện di protein tan và không tan của *E. coli* BL21 mang gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 biểu hiện ở 25°C trên gel polyacrylamit 12,5%. (A) là thang protein chỉ thị của hãng Intron. (1) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] không cảm ứng IPTG. (2) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] cảm ứng IPTG, (M) thang chuẩn, (3) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] pha không tan. (4) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2] pha tan.

Hình 5 là hình ảnh điện di của protein tan và không tan của *E. coli* BL21 mang gen mã hóa protein ức chế proteaza PI-QT2 biểu hiện ở 25 °C, mật độ tế bào OD₆₀₀= 0,6 và OD₆₀₀= 0,7 trên gel polyacrylamit 12,5%. (A) là kết quả điện di của protein tan và không tan của *E. coli* BL21 mang gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2

biểu hiện ở 25 °C, mật độ tế bào $OD_{600} = 0,7$, trong đó (M) là protein chỉ thị của hãng Intron, (1) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) pET32a(+)/PI-QT2, (2) là protein cận từ *E. coli* BL21 (DE3) pET32a(+)/PI-QT2, (3) là protein dịch từ *E. coli* BL21 (DE3) pET32a(+)/PI-QT2. (B) là kết quả điện di protein tan và không tan của *E. coli* BL21 mang gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 biểu hiện ở 25 °C, mật độ tế bào $OD_{600} = 0,6$, trong đó trong đó (M) là protein chỉ thị của hãng Intron, (4) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) pET32a(+)/PI-QT2, (5) là protein cận từ *E. coli* BL21 (DE3) pET32a(+)/PI-QT2, (6) là protein dịch từ *E. coli* BL21 (DE3) pET32a(+)/PI-QT2.

Hình 6 là hình ảnh kết quả điện di SDS-PAGE protein tổng số sau khi siêu âm phá tế bào. (M) là thang protein chuẩn; (1) là protein tổng số, (2) là protein dạng không hòa tan, (3) là protein dạng hòa tan.

Hình 7 là hình ảnh kết quả điện di SDS-PAGE các phân đoạn sắc ký ái lực. (M) là thang protein chuẩn. (1), (2) và (3) lần lượt là protein được giải hấp ra khỏi cột khi sử dụng đệm chảy cột imidazol 100 mM, 300mM, 500mM, tương ứng.

Hình 8 là hình ảnh kết quả thử hoạt tính ức chế serin proteaza trên đĩa. (A) protein có TRx-His tag, (B) protein không có TRx-His tag.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích mô tả chi tiết các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể, tuy nhiên, các phương án và các ví dụ thực hiện cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp chứ không nhằm hạn chế phạm vi bảo hộ của giải pháp.

Giải pháp hữu ích đề cập đến nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 và quy trình sản xuất protein ức chế serin proteaza PI-QT2 để tạo sản phẩm hỗ trợ phòng chống các bệnh liên quan đến proteaza.

Theo giải pháp hữu ích, các chủng vi khuẩn *E. coli* khả biến BL21 (DE3), vector nhân dòng pUC57, vector biểu hiện pET32a(+) và các kỹ thuật tái tổ hợp, biến nạp, chọn lọc là đã biết và được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Người có hiểu biết trung bình có thể sử dụng các vector, các chủng vi khuẩn khả biến cùng với các kỹ thuật tái tổ hợp theo hướng dẫn của nhà cung cấp để thực hiện giải pháp.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2, trong đó nucleotit này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1.

Trình tự nucleotit phân lập mã hóa protein PI-QT2 được phân lập từ metagenom từ sinh vật liên kết với hải miên *Rhabdastrella* sp.. Trong đó, mẫu hải miên *Rhabdastrella* sp. được thu nhận tại vùng biển Quảng Trị, Việt Nam tại tọa độ 107°07'06.0"E; 17°04'50.2"N bằng phương pháp lặn sử dụng bình khí (scuba). Mẫu hải miên sau khi được thu nhận, bảo quản trong hộp vô trùng chứa cồn tuyệt đối, giữ lạnh. Tiếp đó mẫu này được rửa qua nước muối sinh lý 0,9%, cắt và nghiền trong nước muối sinh lý 0,9%. Sau khi đảo nhẹ trong 10 phút, lọc lấy dịch thu vi sinh vật liên kết hải miên. Vật liệu ADN tổng số của vi sinh vật liên kết với hải miên được tách bằng kit Metagenomic DNA Isolation Kit của hãng Enpibio, Mỹ.

ADN tổng số được tinh sạch, giải trình tự, được sàng lọc trên các cơ sở dữ liệu bao gồm CAZy, GO, COG, SWISSPROT, KEGG và các công cụ như dbCAN, Prodigal và MetageneMark bởi hãng BaseClear (Hà Lan). Sau khi chọn lọc các đoạn nucleotit có độ tương đồng với gen mã hóa protein ức chế proteaza trên GeneBank, các gen này được chọn lọc để biểu hiện protein. Kết quả sàng lọc, biểu hiện thu được đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 mã hóa protein ức chế serin proteaza, được ký hiệu là PI-QT2.

Trình tự nucleotit phân lập theo giải pháp hữu ích nêu trong SEQ ID NO.1 bao gồm 1287 nucleotit mã hóa protein có hoạt tính ức chế proteaza. Đoạn trình tự phân lập này được thiết kế để chứa hai enzym giới hạn *Eco* RI và *Not* I được tổng hợp nhân tạo và chèn vào trong vector tách dòng pUC57 và biến nạp vào *E. coli*. Chủng *E. coli* này được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt với số lưu giữ là *E. coli*(PI-QT2).

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất protein ức chế serin proteaza PI-QT2, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tạo vector tái tổ hợp, b) thu vi khuẩn tái tổ hợp, c) cảm ứng biểu hiện protein ức chế serin proteaza, d) phá vỡ tế bào nuôi cấy; và e) thu hồi protein ức chế serin proteaza PI-QT2.

Trong bước tạo vector tái tổ hợp, ADN từ plasmid pUC57 thu được từ chủng *E. coli* có số lưu giữ *E. coli*(PI-QT2) tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và

Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội được cắt bằng enzym *Eco* RI và *Not* I để thu đoạn nucleotit có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1. Vector biểu hiện biểu hiện pET32a (+) cũng được cắt bằng enzym *Eco* RI và *Not* I và gắn với trình tự nucleotit được cắt nêu trên để thu được vector tái tổ hợp pET32a (+) /PI-QT2.

Trong bước thu vi khuẩn tái tổ hợp, tiến hành biến nạp vector tái tổ hợp pET32a (+) /PI-QT2 thu được ở trên vào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3). Chủng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp BL21(DE3)/pET32a(+)/PI-QT2 này được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB chọn lọc có bổ sung 1µl ampicilin/ml. Quá trình nuôi cấy được thực hiện trong điều kiện lắc, nhiệt độ nuôi cấy ở 37°C cho đến khi mật độ quang (OD) đạt từ 0,6 đến 1,8 thì tiến hành cảm ứng biểu hiện protein ức chế proteaza.

Trong bước cảm ứng biểu hiện protein ức chế serin proteaza, tiến hành bổ sung isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) vào môi trường nuôi cấy với nồng độ 1mM/ml. Sau khi nuôi ở nhiệt độ từ 20 đến 37°C trong khoảng từ 4 đến 6 giờ để cảm ứng tế bào sản sinh ra protein ức chế proteaza, tiến hành ly tâm thu tế bào. Sau đó, bổ sung đệm SDS 1,5X và ủ ở 100°C trong 10 phút rồi ly tâm ở 10 000 vòng/phút thu cặn tế bào nuôi cấy.

Trong bước phá vỡ tế bào nuôi cấy, tiến hành hòa tan cặn tế bào trong dung dịch đệm dung giải bao gồm 50mM Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 10µg/ml lysozym, pH=7,0 và ủ trong 30 phút. Quá trình phá vỡ tế bào bằng dung dịch dung giải được hỗ trợ bằng sóng siêu âm với xung ngắn 200-300µA trong nước đá đến khi thu dịch tan đều, hết nhầy. Tiếp đó, tiến hành ly tâm ở 1400 vòng/phút ở 4°C thu phần dịch nổi.

Bước thu hồi protein ức chế serin proteaza PI-QT2 được tiến hành bằng cách cho phần dịch nổi qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA agarosa, rửa giải bằng imidazol theo nồng độ bậc thang 100 mM, 300mM và 500mM, sau khi loại bỏ dung môi, kết tinh thu được protein ức chế proteaza PI-QT2 tinh sạch.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1. Tối ưu hóa nồng độ chất cảm ứng biểu hiện protein có hoạt tính ức chế proteaza PI-QT2

Chủng *E. coli* có số lưu giữ *E. coli*(PI-QT2) được cung cấp bởi Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội được cắt bằng enzym *Eco* RI và *Not* I để thu đoạn nucleotit có trình tự

nêu trong SEQ ID NO.1. Vector biểu hiện biểu hiện pET32a (+) cũng được cắt bằng enzym *Eco* RI và *Not* I và gắn với trình tự nucleotit được cắt nêu trên để thu được vector tái tổ hợp pET32a (+) /PI-QT2 theo quy trình tái tổ hợp chuẩn.

Nuôi hoạt hóa chủng BL21(DE3)/pET32a(+)/PI-QT2 qua đêm trong 4ml LB có bổ sung 4μl Amp (nồng độ 50 μg/ml), 37 °C, tốc độ khuấy 200 vòng/phút. Tiếp đó, cấy chuyển 1-4% dịch nuôi cấy sang môi trường LB mới và nuôi lắc 37 °C, 200 vòng/phút đến khi OD đạt 1,2 (4 giờ).

Để cảm ứng, tiến hành khảo sát các nồng độ chất cảm ứng IPTG với nồng độ từ 0,1mM; 0,5 mM; 1mM và 1,5 mM, ở 37 °C, mật độ tế bào OD₆₀₀=1, thời gian cảm ứng là 4h.

Tiến hành và nuôi lắc ở 30 °C, 200 vòng/phút sau 6 giờ thu mẫu, sau đó ly tâm N và I 10 000 vòng/phút trong 15 phút để thu tế bào. Bổ sung 100 μl đệm 1,5X SDS, trộn đều tế bào bằng pippet, ủ 100 °C trong 10 phút rồi ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút thu được cặn tế bào biểu hiện protein ức chế serin proteaza. Mẫu đối chứng không sử dụng chất cảm ứng.

Cặn tế bào được hòa tan trong dung dịch đệm dung giải bao gồm 50mM Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 10μg/ml lysozym, pH=7,0 và ủ trong 30 phút. Quá trình phá vỡ tế bào bằng dung dịch dung giải được hỗ trợ bằng sóng rời siêu âm với xung ngắn 200-300μA trong nước đá đến khi thu dịch tan đều, hết nhầy. Tiếp đó, tiến hành ly tâm ở 1400 vòng/phút ở 4°C thu phần dịch nổi. Phần dịch nổi được điện di trên gel polyacrylamit SDS ở nồng độ 12,5%. Kết quả được thể hiện trên Hình 1. Trong đó (M) là giếng protein chỉ thị của Bio-basic. (1) là protein tổng số từ *E. coli* BL2 (DE3) [pET32a+]. (2) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a+/PI-QT2] cảm ứng IPTG 1,5mM. Các giếng (3), (5), (7) và (9) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a+/PI-QT2] không cảm ứng IPTG. Các giếng (4), (6) và (8) là protein tổng số từ *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a+/PI-QT2] cảm ứng IPTG 1mM, 0,5mM, 0,1mM, tương ứng.

Theo đó cho thấy BL21(DE3)/pET32a(+)/PI-QT2 biểu hiện tối ưu với 1 băng kích thước khoảng 64 kDa khi cảm ứng IPTG 1mM/ml.

Ví dụ 2. Tối ưu hóa nhiệt độ và nồng độ trong biểu hiện protein có hoạt tính ức chế serin proteaza PI-QT2

Chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET32a(+)/PI-QT2 được tạo ra như Ví dụ 1 được nuôi cấy qua đêm trong 4ml LB có bổ sung 4μl ampicilin (nồng độ 50 μg/ml), 37 °C, tốc độ khuấy 200 vòng/phút. Tiếp đó, cấy chuyển 1-4% dịch nuôi cấy sang môi trường LB mới và nuôi lắc 37 °C, 200 vòng/phút đến khi OD đạt 1,2 (4 giờ).

Để khảo sát nhiệt độ biểu hiện tối ưu, tiến hành khảo sát các nhiệt độ biểu hiện từ 20°C, 25°C, 30°C và 37°C, nồng độ chất cảm ứng IPTG 1mM/ml, mật độ tế bào OD₆₀₀=1, thời gian cảm ứng là 4h (đối với biểu hiện ở 30°C, 37°C), 5h (25°C), 6h (20°C). Cặn tế bào được hòa tan trong dung dịch đệm dung giải bao gồm 50mM Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 10μg/ml lysozym, pH=7,0 và ủ trong 30 phút. Quá trình phá vỡ tế bào bằng dung dịch dung giải được hỗ trợ bằng sóng rời siêu âm với xung ngắn 200-300μA trong nước đá đến khi thu dịch tan đều, hết nhầy. Tiếp đó, tiến hành ly tâm ở 1400 vòng/phút ở 4°C thu phần dịch nổi. Phần dịch nổi được điện di trên gel polyacrylamit SDS ở nồng độ 12,5%. Kết quả được thể hiện trên hình 2 cho thấy chủng *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2 biểu hiện được ở hết các nhiệt độ nghiên cứu. Trong đó biểu hiện mạnh nhất ở 25 và 37°C.

Để kiểm tra khả năng tan và không tan của protein tái tổ hợp, tiến hành kiểm tra khả năng tan của protein tái tổ hợp, tế bào *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2 sau biểu hiện ở 25°C và 37°C nêu trên được lựa chọn đưa đi siêu âm và điện di trên gel SDS-PAGE 12,5% để kiểm tra. Kết quả nhuộm coomas cho thấy ở 37°C protein tồn tại ở trạng thái tan rất ít và tập trung chủ yếu ở thể vùi (Hình 3), còn ở 25°C protein tái tổ hợp tồn tại ở trạng thái thể tan nhiều hơn thể vùi (Hình 4).

Từ kết quả cho thấy, nhiệt độ tối ưu để thu hồi protein tái tổ hợp là 25°C để thu hồi protein tái tổ hợp hoàn toàn ở trạng thái tan.

Để kiểm tra mật độ tế bào trước khi biểu hiện tối ưu, tế bào *E. coli* BL21 (DE3) [pET32a(+)/PI-QT2 được biểu hiện ở 25°C, nồng độ chất cảm ứng IPTG 1mM, mật độ tế bào OD₆₀₀= 0,8, OD₆₀₀= 0,7 và OD₆₀₀= 0,6. Sau khi biểu hiện, cặn tế bào được phá siêu âm, sau đó ly tâm 13000 vòng trong 15p, cuối cùng điện di dịch phá, cặn phá và tổng số phá (trước ly tâm) trên gel SDS-PAGE 12,5%. Kết quả điện di cho thấy ở OD₆₀₀= 0,8 thu được kết quả giống OD₆₀₀= 1; Còn với OD₆₀₀= 0,7 và OD₆₀₀= 0,6 thu được protein tái tổ hợp hoàn toàn ở trạng thái tan (Hình 5a và Hình 5b).

Ví dụ 3: Thu hồi protein ức chế serin proteaza PI-QT2 từ tế bào E. coli tái tổ hợp

Thu 1L dịch tế bào nuôi cấy sau cảm ứng với chất cảm ứng, nhiệt độ và nồng độ tối ưu như được xác định ở trên theo, ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C loại môi trường. Cặn tế bào được rửa và hòa lại trong 100 mL dung dịch đệm ly giải (Tris/HCl 50mM, 0,5% Triton X-100, 10 µg/mL lysozym, pH=7,0) ủ ở 30°C trong 30 phút. Sau đó tế bào được phá vỡ bằng siêu âm với xung ngắn (200-300 µA) khoảng 3 giây trong nước đá. Siêu âm cho đến khi dịch tế bào hết nhầy và tan đều. Tiếp tục ly tâm dịch tế bào 14000v/p, 30 phút ở 4°C để tách phần dịch nổi và cặn tế bào.

Kiểm tra điện di phần dịch nổi và cặn tế bào bằng điện di SDS-PAGE. Đưa phần dịch nổi qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA agarosa và rửa các protein không hấp phụ bằng đệm Tris HCl 50 mM với 5mM imidazol. Protein hấp phụ được rửa giải bằng imidazol với các nồng độ, 100 mM, 300 mM và 500 mM. Các phân đoạn sau khi tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Sau đó băng protein quan tâm được băng bằng các phương pháp thủy phân trong gel, tách chiết và nhận diện protein mục tiêu bằng phân tích khối phổ MS.

Kết quả sau khi được siêu âm phá tế bào và ly tâm thu dịch nổi được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE được thể hiện trên hình 6. Kết quả là protein được hòa tan tốt (90%). Dịch nổi được cho qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA agarosa và protein được rửa giải bằng imidazol với các nồng độ theo bậc thang 100, 300 và 500 mM. Các phân đoạn thu được sau khi rửa giải được kiểm tra điện di SDS-PAGE. Kết quả được trình bày trên Hình 7.

Ví dụ 4: Thử hoạt tính ức chế proteaza

Protein tái tổ hợp thu được ở Ví dụ 3 được thêm vào hỗn hợp clorua, đệm phosphat và các dung dịch proteaza (trypsin, hoặc α -chymotrypsin, hoặc thermolysin). Sau khi điều chỉnh pH đến 7,5, BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilit) được thêm vào hỗn hợp và ủ ở 37°C trong 20 phút. Tiếp theo, 5% TCA được thêm vào dung dịch và ủ ở nhiệt độ phòng trong 20 phút. Cuối cùng, dung dịch được lọc với giấy lọc Whatman No. 1 và độ hấp thụ được đo ở 280 nm. Hoạt tính ức chế chất ức chế proteaza được tính theo công thức sau:

$$\text{Ức chế hoạt động (\%)} = C - T / C \times 100$$

Trong đó: C là giá trị hấp thụ của mẫu trắng và T là giá trị hấp thụ của mẫu có chất ức chế proteaza.

Kết quả khảo nghiệm hoạt động của protein biểu hiện với proteaza (trypsin, α -chymotrypsin, thermolysin) sử dụng đĩa sữa tách kem cho thấy protein PI-QT2 có hoạt tính ức chế trypsin (Hình 8), nhưng không ức chế α -chymotrypsin và thermolysin. Xét nghiệm ức chế proteaza chỉ ra rằng hoạt tính ức chế protein chống lại trypsin (một loại serin proteaza) đạt 84,62%.

Ví dụ 5. Nhận diện và phân tích protein bằng phương pháp proteomic/tin sinh học

Thủy phân protein trong gel bằng trypsin:

Băng protein trên gel được cắt, đưa vào ống eppendorf 1,5 ml và rửa bằng 500 μ l dung dịch (50% ACN, 50 mM amoni bicarbonat) cho đến khi thuốc nhuộm bị loại bỏ hết. Sau đó gel được loại nước bằng 100% ACN trong 5 phút và làm khô bằng máy làm khô chân không. Hỗn hợp protein trong gel được khử bằng 50 mM DTT ở 56°C trong 30 phút và alkyl hóa với 20 mM IAA trong 1 giờ ở điều kiện tối. Dung dịch sau khi làm khô được hòa lại trong 50 μ l amoni bicarbonat 50 mM. Trypsin được bổ sung vào dung dịch với tỷ lệ tương ứng enzym/cơ chất là 1:50 (theo khối lượng) và ủ ở 37°C trong 16 giờ. Sau khi thủy phân, hỗn hợp peptit trong gel được chiết ra bằng dung dịch chiết (50% ACN và 0,1% TFA). Hỗn hợp peptit sau đó được cô đặc và loại muối bằng cột ZipTip C18 trước khi tiến hành phân tách trên hệ thống sắc ký lỏng nano kết nối khối phổ.

Sắc ký lỏng một chiều:

Các peptit được loại muối, cô đặc trên cột TRAP C18 và phân tách trên cột sắc ký ngược pha C18. Mẫu được đưa lên cột với tốc độ dòng 0,2 μ l/phút bằng FA 0,1% và rửa giải khỏi cột C18 bằng gradient từ 0 đến 100% đệm B (85% ACN và 0,1% FA) trong 60 phút.

Nhận dạng protein bằng khối phổ: Quá trình thực hiện khối phổ liên tiếp được tiến hành trên máy khối phổ QSTAR - XL, vận hành ở chế độ IDA (Information Dependent Acquisition) để thực hiện việc chuyển từ quét phổ TOF MS đơn đối với các ion nằm trong dải khối (TOF mass) từ 400 đến 1200 sang khối phổ liên tiếp trên 3 ion phân tử có mật độ cao nhất và lớn hơn 15 được xác định tự động nhờ phần mềm BioAnalyst QS v1.4 (AppliedBiosystems, Mỹ). Sai số về khối (mass tolerance) được đặt ở mức 100 ppm, thời gian thực hiện không lặp lại MS/MS đối với mỗi mảnh là 90 giây. Hiệu điện thế được đặt để ion hoá mẫu trong dung dịch đi ra từ đầu Fused Silica

PicoTip là 2200V. Các protein được nhận dạng thông qua phần mềm Mascot v1.8 (MatrixScience Ltd., London, Anh).

Tìm kiếm protein bằng phần mềm Mascot v1.8 : Dữ liệu phổ khối (MS/MS) được phân tích bằng phần mềm Mascot v1.8. Đây là phần mềm có khả năng phân tích dữ liệu phổ MS/MS để nhận dạng protein dựa trên thuật toán Mowse được phát triển bởi Matrix Science (Matrix Science Ltd., London, Anh) (Pappin et al., 1993). Ngân hàng Dữ liệu được dùng để tìm kiếm trong Mascot là Uniprot, một Ngân hàng Dữ liệu các protein không lặp lại và toàn diện về hệ protein của người mới nhất được cài đặt trên một máy tính HP Proliant Server (s/n:2UA5100LXZ). Các thông số tìm kiếm bằng phần mềm Mascot như sau:

Enzym thủy phân: Trypsin;

Sai số khối lượng peptit: $\pm 0,5$ Da;

Sai số khối lượng của các mảnh ion trong phổ MS/MS: $\pm 0,5$ Da;

Trạng thái điện tích của ion phân tử được chọn: + 2, + 3, và +4;

Cải biến cố định: carbamidomethyl (C);

Cải biến biến đổi: oxy hóa (methionin) xảy ra trong quá trình thủy phân;

Mức độ chính xác được đặt mặc định: 99,5%.

Việc phân tích dữ liệu phổ khối giới hạn trong Ngân hàng Dữ liệu protein của vi sinh vật của toàn bộ Ngân hàng Dữ liệu Uniprot. Với các thông số như trên phần mềm Mascot đưa ra những protein/peptit có điểm số > 30 sẽ đảm bảo độ tương đồng cao giữa các phổ thực nghiệm và phổ lý thuyết với mức ý nghĩa $p < 0,05$. Sau đó, các protein được xác nhận lại bằng phần mềm Peak (Canada).

Kết quả cho thấy protein ức chế serin proteaza PI-QT2 là một protein mới, chưa được công bố trong các ngân hàng dữ liệu.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Giải pháp đề xuất trình tự gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 được phân lập từ dữ liệu metagenom của vi sinh vật liên kết hải miên *Rhabdastrella* sp. Đây là một phương pháp thu nhận dựa trên kỹ thuật thực nghiệm với cơ sở dữ liệu nhằm sàng lọc và phát triển được protein mong muốn với hoạt tính tối ưu, có thể biểu hiện được trong vi khuẩn. Với kỹ thuật phân lập

này, không cần xác định loài vi sinh vật thực tế nên giảm được các chi phí trong quá trình phân lập, sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi sinh chứa gen mong muốn.

Quy trình biểu hiện protein ức chế proteaza được tối ưu biểu hiện, có khả năng thu được protein ức chế proteaza làm nguyên liệu phát triển nguồn thuốc điều trị các bệnh liên quan đến proteaza. Với trình tự gen đặc hiệu, có khả năng biểu hiện tốt trong vi khuẩn, hoạt tính ức chế proteaza vượt trội, giải pháp cho phép đơn giản hóa quá trình từ phân lập đến sản xuất protein tái tổ hợp có hoạt tính mong muốn.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2, trong đó nucleotit này có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1.
2. Nucleotit theo điểm 1, trong đó nucleotit này được nhân dòng trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp và chủng *E. coli* này được lưu giữ tại Viện Hóa sinh biển với số lưu giữ *E. coli*(PI-QT2).
3. Quy trình sản xuất protein ức chế serin proteaza PI-QT2, trong đó quy trình này bao gồm các bước:
 - a) tạo vector tái tổ hợp bằng cách cắt gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO.1 từ *E. coli* có số lưu giữ *E. coli*(PI-QT2) tại Viện Hóa sinh biển bằng enzym *Eco* RI và *Not* I, sau đó gắn vào vector biểu hiện pET32a (+) để thu được vector tái tổ hợp pET32a (+) /PI-QT2;
 - b) thu vi khuẩn tái tổ hợp bằng cách biến nạp vector tái tổ hợp pET32a (+) /PI-QT2 vào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3), sau đó chủng vi khuẩn tái tổ hợp BL21(DE3)/pET32a(+)/PI-QT2 được nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB bổ sung 1μl ampicilin/ml và tiến hành nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện lắc đến khi OD đạt từ 0,6 đến 1,8;
 - c) cảm ứng biểu hiện protein ức chế serin proteaza bằng cách bổ sung isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosit (IPTG) nồng độ 1mM/ml, sau khi nuôi ở nhiệt độ từ 20 đến 37°C trong khoảng từ 4 đến 6 giờ, ly tâm thu tế bào và bổ sung đệm SDS 1,5X và ủ ở 100°C trong 10 phút, sau khi ly tâm ở 10.000 vòng/phút, thu cặn tế bào nuôi cấy;
 - d) phá vỡ tế bào nuôi cấy bằng cách hòa tan cặn tế bào trong dung dịch đệm dung giải bao gồm 50mM Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 10μg/ml lysozym, pH=7,0 và ủ trong 30 phút rồi siêu âm với xung ngắn 200-300μA trong nước đá đến khi thu dịch tan đều rồi ly tâm ở 1400 vòng/phút ở 4°C thu phần dịch nổi; và
 - e) thu hồi protein ức chế proteaza PI-QT2 bằng cách cho phần dịch nổi qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA agarosa, rửa giải bằng imidazol theo nồng độ bậc thang 100 mM, 300mM và 500mM, sau khi loại bỏ dung môi, kết tinh thu được protein ức chế serin proteaza PI-QT2 tinh sạch.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
 <120> Nucleotit được phân lập mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-
 QT2 và quy trình sản xuất protein này

<130>

<160> 1

<170>

<210> 1

<211> 1287

<212> ADN

<213> Trình tự phân lập từ metagenom

<220>

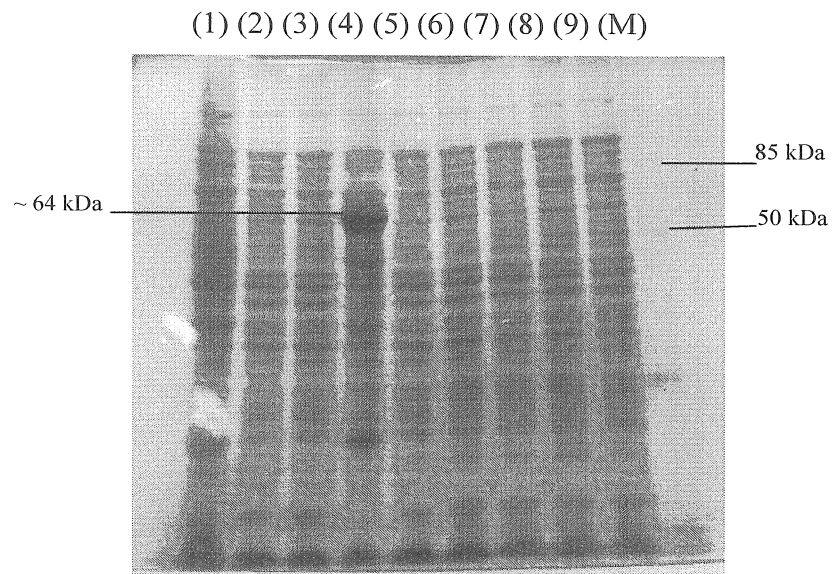
<223> Gen mã hóa protein ức chế serin proteaza PI-QT2

<220>

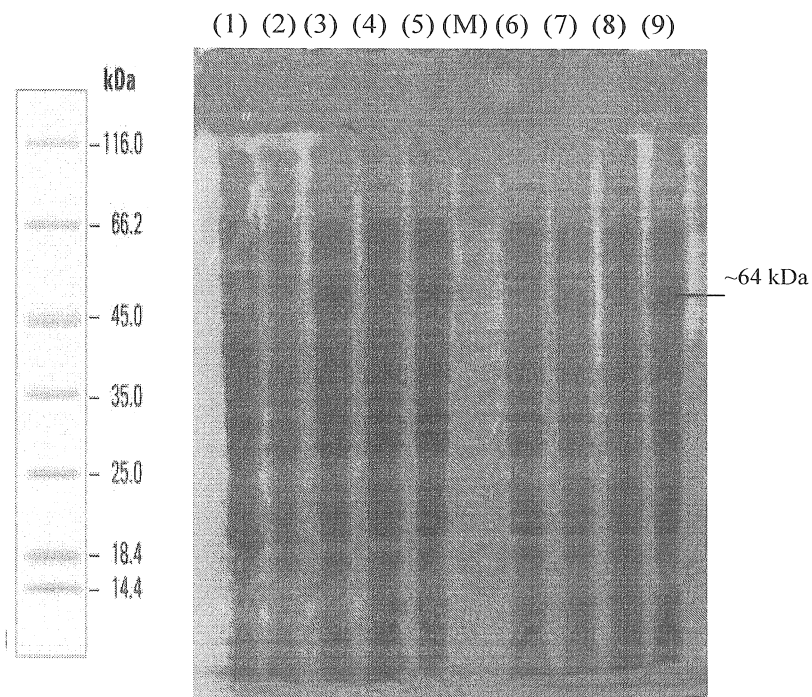
<400> 1

ATGACAAAAC	AGTTGATTAA	TGCAACGATC	ATCGCATGTG	TCGGATTGAT	TTATCTGCTT	60
GGGTGTTT	CAG GTGAAGAAGA	TGTGTTGCAT	GAGGATGAAC	TTCTTGAGAT	GTCTCTTGAA	120
GAAGGAGCCC	CAACGGCACC	TGATGGGTGT	GCAATTTTAG	CAAAGCCTGC	TGGTTTCACC	180
GATAATGCAC	TGTCCGAAGC	AAATGCAAAG	TTCTGGCTTTA	AACTACTCGC	CGAACTGTAT	240
AATCAAAAAC	CCAACAAAAA	CGTCTTTATC	TCCCCATTAA	GCATTTTCGAT	AGCTTTGACC	300
ATGACATATA	ATGGTGCCAG	AGGCGCAACA	AAACAGGCAA	TGGCAAAGAC	GCTAGAGATC	360
GAGGGAATGG	ACCTGGGTGC	GGTCAACCAA	GCTAACGCCG	AGTTACGAGA	AATCCTTAAG	420
AGCGCAGATC	CCCAGATTGA	ACTTGCCATC	GCCAACTCGA	TCTGGCTACG	GAACACGTTT	480
GATGAAGTAA	ATCCCGATTT	CCTTGACCGA	AATGATCGAT	TCTTTGGCGC	AGAGATTGCT	540
TCGCTTGATT	TTGACGATCC	GCAAACAGTA	GAGACCATCA	ACCAATGGGT	GAACACGAAC	600
ACACAGGGAA	AAATCAAGGA	GATTCTAGGT	GAAATTGAGG	AGCACGAAGT	TATGTTCTTG	660
ATTAACGCCA	TCTATTTTAA	GGGCGGCTGG	AAAGGAAAGT	TCGACGCATC	AAAAACACAG	720
GACGGTGTTT	TCCATCTGTT	GGATGGTGGC	GAGAAGCAGG	TGCCCCATGAT	GTCCCACACC	780
TGCAATTATT	CGTATCTTGA	GAGCGGAGAC	TTTAGGGCTG	TTGGCTTACC	TTATGGAGAG	840
GGACGTGTAA	GCATGTATAT	CTTTCTGCCG	GAGCATTCCT	CCAATCTTGA	CGAATTTCTT	900
GCAGATTTGA	ACGCCGAGAA	CTGGGAGAAC	TGGCTGTCGC	GGTTTTGGAA	TGAACGGGAT	960
TTGAGATTTA	TAATGCCTCG	CTTTAGACTA	GAGTATGGAA	TGCTTCTCAA	TGACGCGCTC	1010
AAAGCACTCG	GCATGGAAAT	TGCCTTTATT	CCGTACGTAG	CCAATCTTGA	GGGCATTGCG	1080
CCTCTTTTGT	TTATTGAAAA	AGTCATACAC	AAAACTTTTT	TGGAAGTCAA	CGAAGAAGGC	1140
ACCGAAGCGG	CTGCCGTAAC	GTTGGTTAGT	CCACCACCGG	CGAGCACTCC	GGGGCCCTTT	1200
GTTGTAAACC	GCCCCTTTTT	CTTCGCCATC	CATGACAATT	GGACAAACAC	AATATTGTTC	1260
ATGGGAATTG	TCGTCTGAACC	GATGTAG				1287

HÌNH 1

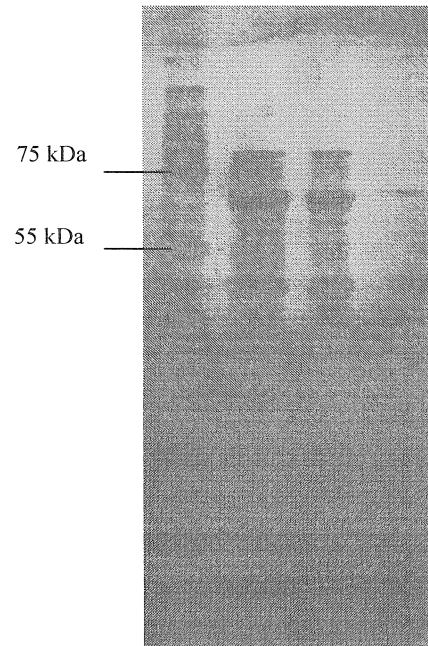


HÌNH 2



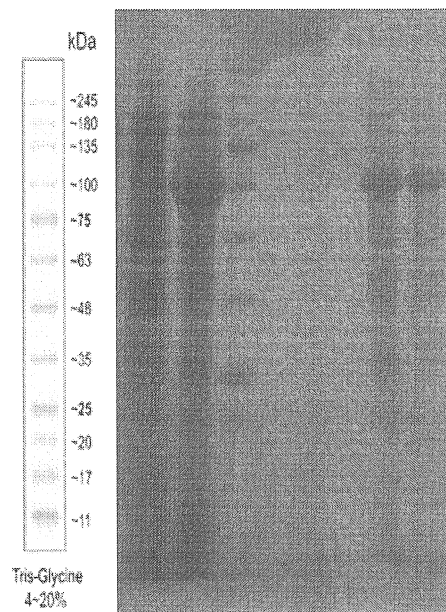
HÌNH 3

(M) (1) (2) (3)

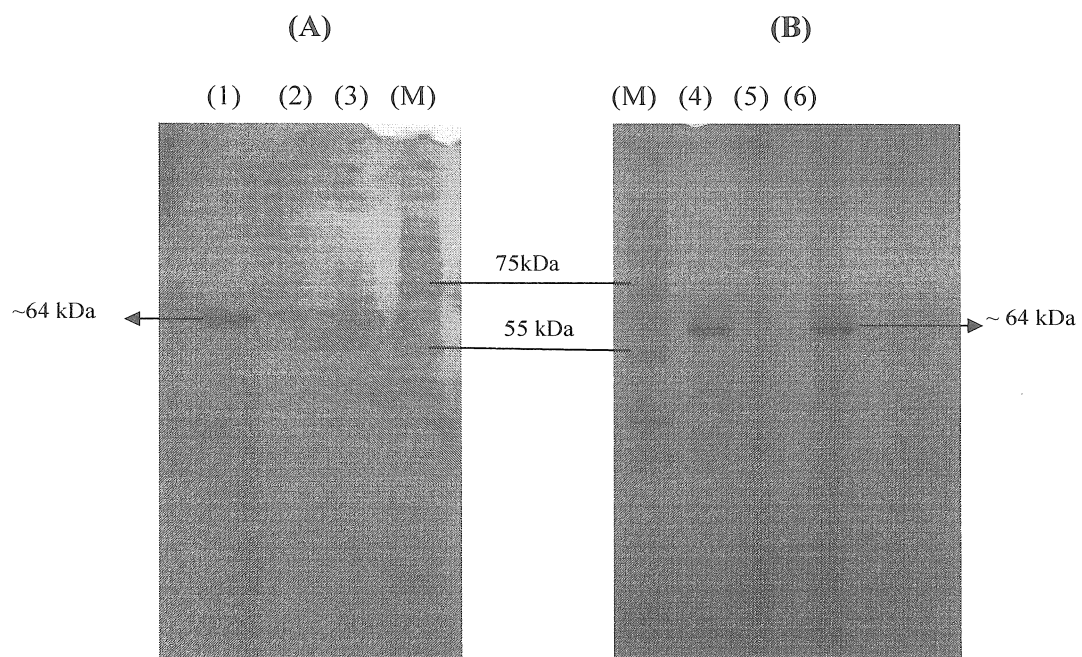


HÌNH 4

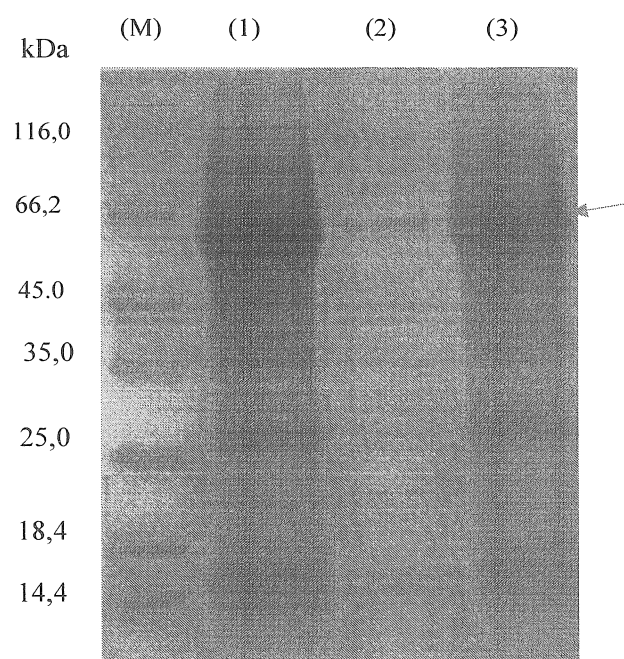
(A) (1) (2) (M) (3) (4)



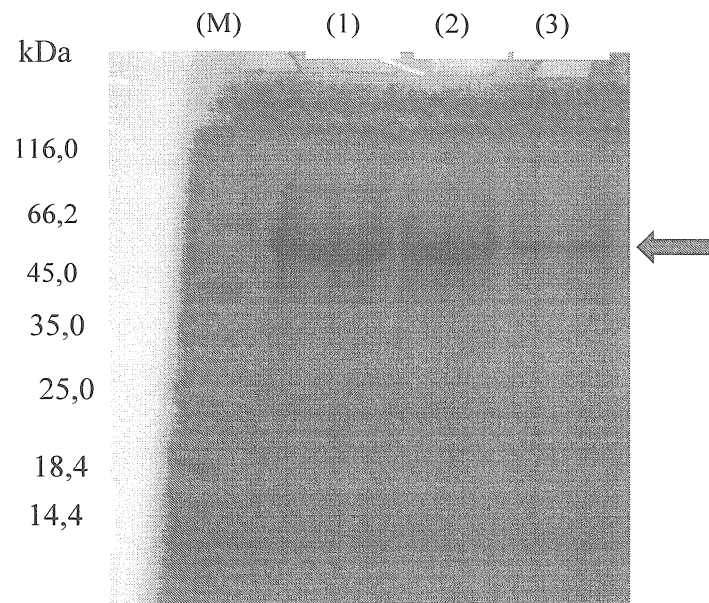
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

