

**BỘ GIÁO DỤC VÀ
ĐÀO TẠO**

**VIỆN KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

PHÙNG THU NGUYỆT

**PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU TÍNH CHẤT CỦA
LIPASE A TÁI TỔ HỢP CÓ HAI HOẠT TÍNH
LIPASE - GELATINASE TỪ *Bacillus subtilis* FS2**

Chuyên ngành: **Vi sinh vật học**

Mã số: **62 42 40 01**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2010

Công trình được hoàn thành tại:

1. Viện Công nghệ sinh học
2. Trung tâm Sinh học Y dược Uppsala,
Trường Đại học Uppsala, Thụy Điển

Người hướng dẫn khoa học

1. **PGS.TS. TRƯƠNG NAM HẢI**
Viện Công nghệ sinh học
2. **GS. JAN-CHRISTER JANSON**
Trường Đại học Uppsala - Thụy Điển

Phản biện 1: **GS. TS. Nguyễn Đình Quyến**

Trường ĐH Khoa học Tự nhiên – ĐH Quốc gia HN

Phản biện 2: **GS. TS. Nguyễn Thành Đạt**

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Phản biện 3: **PGS. TS. Nguyễn Thị Hoài Trâm**

Viện Công nghiệp thực phẩm

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước
họp tại: Viện Công nghệ sinh học
vào hồi 8h30 giờ , ngày 09 tháng 07 năm 2010

Có thể tìm hiểu luận án tại: Viện Công nghệ sinh học

Và thư viện Quốc gia Hà Nội

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CÓ LIÊN QUAN ĐẾN NỘI DUNG LUẬN ÁN

1. **Phung Thu Nguyet**, Tran Minh Tri, Nguyen Hong Thanh, To Kim Anh, Truong Nam Hai. (2005) Cloning and expression of gene encoding for collagenase from *Bacillus subtilis* FS2, *Proceeding of International Vietnam – Korea Symposium*, 16-21.
2. Nguyễn Hồng Thanh, **Phùng Thu Nguyệt**, Trương Nam Hải, (2007), “Biểu hiện gen mã hóa lipase A (*lipA*) từ chủng *Bacillus subtilis* FS2”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 5 (1): 41-46.
3. **Phung Thu Nguyet**, Nguyen Hong Thanh, Jan-Christer Janson, Truong Nam Hai (2007) “Study on a novel property of recombinant lipase A of *Bacillus subtilis* FS2”. *Asian Journal on Science and Technology for Development*, 25(2): 333-340.
4. **Phùng Thu Nguyệt**, Nguyễn Hồng Thanh, Jan-Christer Janson, Trương Nam Hải (2009) “Nghiên cứu lên men lượng lớn chủng *Escherichia coli* BL21 tái tổ hợp mang gen mã hóa lipase của *Bacillus subtilis* FS2”. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 47 (2): 109-116.
5. **Phùng Thu Nguyệt**, Nguyễn Hồng Thanh, Karl Hult, Trương Nam Hải (2009) “Phân lập và nghiên cứu tính chất lipase A có hai hoạt tính lipase và gelatinase từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* FS2”. *Báo cáo khoa học hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2009*, pp. 671-675.
6. Nguyễn Hồng Thanh, **Phùng Thu Nguyệt**, Karl Hult, Trương Nam Hải (2010) “Nghiên cứu ảnh hưởng của các đột biến tại trung tâm hoạt động của lipase A tái tổ hợp từ *Bacillus subtilis* FS2 lên hai hoạt tính lipase và gelatinase”. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8 (1): 1-8.

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

& đtg	và đồng tác giả
AcN	Acetonitrile
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
ĐC	Đường chạy
DNA	Deoxyribonucleic acid
dO ₂	Dissolved oxygen
E-S	Enzyme - substrate
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HCDC	High cell density culture
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosidase
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Betani
LBA	Luria-Betani Ampicillin
MU	4-methylumbelliferyl heptylphosphonate
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Pyrenedecanoic acid
PDB	Protein Data Bank
PNPB	p-nitrophenylbutyrate
rLipA	Recombinant lipase A
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của đề tài

Thông thường mỗi enzyme chỉ đặc hiệu với một kiểu phân cắt hoặc tạo thành liên kết nhất định, tuy nhiên một số enzyme vừa có khả năng tham gia phản ứng thủy phân lại vừa tham gia phản ứng tổng hợp tạo liên kết. Các enzyme này đã được biết đến với khả năng xúc tác cho nhiều hơn một kiểu phản ứng hoá học và chúng thường được gọi là các enzyme đa xúc tác (enzyme promiscuity). Ngoài hoạt tính cơ bản, enzyme còn xuất hiện một số hoạt tính khác là do sự thay đổi điều kiện phản ứng, thay đổi cơ chất hay thay đổi tính xúc tác của enzyme. Đây là những đặc điểm ngẫu nhiên của enzyme trong tự nhiên giúp cho các sinh vật thích nghi với điều kiện khác nhau và góp phần vào quá trình tiến hóa đa dạng sinh học của các enzyme.

Trong những năm gần đây, các enzyme đa xúc tác ngày càng được quan tâm bởi các enzyme này không chỉ đóng vai trò quan trọng trong quá trình tiến hóa mà nó còn có vai trò trong quá trình chuẩn bị enzyme để tổng hợp các hợp chất hữu cơ và trong công nghiệp dược phẩm. Việc nghiên cứu về enzyme đa xúc tác không chỉ góp phần hiểu biết về cơ chế hoạt động của enzyme mà còn có vai trò trong việc ứng dụng vào các ngành công nghiệp. Ngày nay, với sự phát triển của công nghệ sinh học, việc sử dụng các kỹ thuật di truyền như tạo đột biến điểm kết hợp với phân tích cấu trúc protein, người ta có thể chủ động làm tăng hoặc giảm hoạt tính của enzyme nhiều lần trong điều kiện phòng thí nghiệm, phục vụ cho các mục đích ứng dụng trong thực tiễn. Những thay đổi nhỏ trong trình tự axit amin cũng có thể làm thay đổi hoạt tính xúc tác của enzyme dẫn đến thay đổi tính đặc hiệu với cơ chất.

Trong quá trình sàng lọc gen mã hoá gelatinase của *Bacillus*

subtilis FS2 phân lập từ nguồn nước mắm truyền thống ở Việt Nam, chúng tôi đã phát hiện ra lipase A (LipA) ngoài hoạt tính lipase còn có hoạt tính thứ hai là hoạt tính gelatinase. LipA bên cạnh khả năng thủy phân cơ chất của lipase là tributyrin thì enzyme này còn có thể thủy phân cơ chất của gelatinase là collagen biến tính dạng gelatin trên đĩa thạch. Như vậy, LipA của *B. subtilis* FS2 có đặc điểm của một enzyme đa xúc tác với hai hoạt tính lipase và gelatinase. Dựa vào đặc điểm này của LipA, chúng tôi tiến hành biểu hiện LipA dưới dạng tái tổ hợp và nghiên cứu về tính chất của enzyme này. Các nghiên cứu tạo đột biến điểm trong trung tâm hoạt động của LipA nhằm làm sáng tỏ vai trò của từng gốc axit amin đối với mỗi hoạt tính và cơ chế xúc tác của enzyme. Hiện nay, lipase và gelatinase là các enzyme đang được quan tâm nhiều bởi khả năng ứng dụng rộng rãi của chúng trong một số ngành công nghiệp đặc biệt trong y dược. Xuất phát từ nhu cầu ứng dụng enzyme này trong thực tiễn và từ đặc điểm của LipA, chúng tôi đã tiến hành đề tài “Phân lập và nghiên cứu tính chất của lipase A tái tổ hợp có hai hoạt tính lipase - gelatinase từ *B. subtilis* FS2”.

Mục đích nghiên cứu

Nghiên cứu đặc điểm và tính chất của LipA tái tổ hợp (rLipA) từ *B. subtilis* FS2 có hai hoạt tính lipase và gelatinase. Xác định ảnh hưởng của các gốc axit amin trong trung tâm hoạt động lên hai hoạt tính của rLipA.

Nội dung nghiên cứu

- Phân lập và biểu hiện gen *lipA* mã hóa cho LipA của *B. subtilis* FS2. Nghiên cứu xác định hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA và ảnh hưởng của các yếu tố như nhiệt độ, pH, các ion kim loại tới hai hoạt tính. Xác định các thông số động học của enzyme.
- Tạo đột biến điểm ở các gốc xúc tác trong trung tâm hoạt động của enzyme để xác định vai trò của các gốc axit amin này lên hai hoạt tính lipase và gelatinase.

- Nghiên cứu lên men và tăng hiệu suất tổng hợp lipase tái tổ hợp từ chủng *E. coli* BL21 (DE3) để có thể ứng dụng vào sản xuất ở Việt Nam.

Những đóng góp mới của luận án

1. Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu về LipA tái tổ hợp từ *B. subtilis* FS2 có hai hoạt tính lipase và gelatinase. Công trình đã chứng minh được gelatinase là hoạt tính thứ hai của rLipA bằng phương pháp xác định hoạt tính trên đĩa thạch và bằng các kit xác định hoạt tính.
2. Đã sử dụng phương pháp Mega-primer để tạo đột biến điểm tại các gốc xúc tác là Ser77, Asp133 và His156 trong trung tâm hoạt động của rLipA. Hai đột biến S77C và H156N được tạo ra đều có hoạt tính lipase bị giảm đi nhưng hoạt tính gelatinase lại được tăng lên. Công trình nghiên cứu lần đầu tiên sử dụng chương trình phần mềm PYMOL để nghiên cứu cấu trúc protein rLipA từ *B. subtilis* dựa trên cơ sở dữ liệu của ngân hàng protein RCSB PDB.
3. Đã lên men thành công chủng *E. coli* BL21-*lipA* trong các hệ thống lên men 1 lít, 10 lít và 200 lít. Hiệu quả tổng hợp lipase tái tổ hợp đã tăng lên gấp 10 lần bằng phương pháp lên men fed-batch HCDC. Kết quả này mở ra triển vọng có thể ứng dụng rLipA tái tổ hợp vào sản xuất công nghiệp ở Việt Nam.

2. Bố cục của luận án

Luận án gồm 143 trang trong đó có 19 bảng và 67 hình;

Mở đầu (3 trang);

Chương 1. Tổng quan tài liệu (38 trang);

Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (19 trang);

Chương 3. Kết quả và thảo luận (66 trang); Kết luận và kiến nghị (2 trang);

Các công trình khoa học liên quan đến luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo (14 trang : 6 tài liệu tiếng Việt, 118 tài liệu tiếng Anh và 12 tài liệu Internet).

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

- 1.1. Giới thiệu chung về enzyme
- 1.2. Đặc điểm của một số enzyme đa xúc tác
 - 1.2.1. Giới thiệu chung về enzyme đa xúc tác
 - 1.2.2. Phân loại enzyme đa xúc tác
 - 1.2.3. Các enzyme đa xúc tác góp phần vào sự tiến hóa đa dạng enzyme
- 1.3. Giới thiệu chung về lipase
 - 1.3.1. Đặc điểm chung của lipase
 - 1.3.2. Các lipase của *Bacillus*
 - 1.3.3. Các ứng dụng của lipase trong sản xuất công nghiệp
- 1.4. Giới thiệu chung về gelatinase
 - 1.4.1. Các cơ chất của gelatinase
 - 1.4.2. Cấu trúc của gelatinase
 - 1.4.3. Những ứng dụng của gelatinase
- 1.5. Kỹ thuật tạo đột biến làm thay đổi tính chất của enzyme
 - 1.5.1. Các phương pháp tạo đột biến bằng kỹ thuật di truyền
 - 1.5.2. Ứng dụng các phương pháp tạo đột biến làm thay đổi hoạt tính enzyme
- 1.6. Tình hình nghiên cứu lipase ở Việt Nam

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị máy móc

- 2.1.1. *Vật liệu*: Chủng *B. subtilis* FS2 được cung cấp từ PGS. TS Tô Kim Anh, Viện CNSH-CNTTP, Trường ĐH Bách Khoa, Hà Nội. Chủng *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21(DE3) và các plasmid pBluescriptSK(+), pUC18, pET22b(+) được sử dụng để tách dòng và biểu hiện gen.
- 2.1.2. *Hóa chất và thiết bị máy móc*: Tất cả các loại hóa chất được cung cấp bởi các hãng Sigma, Bio-Rad, New England Bio-Labs (Mỹ); Merck, Fermentas (Đức). Các thiết bị máy móc được sản xuất tại các nước Mỹ, Nhật Bản, Thụy Điển và Đức.

2.2. Phương pháp

2.2.1. *Phương pháp vi sinh*: nuôi cấy và lưu trữ chủng vi khuẩn theo Sambrook & đtg, 1989.

2.2.2. *Phương pháp sinh học phân tử*: tách chiết DNA hệ gen từ *B. subtilis* FS2, điện di DNA trên gel agarose, tách chiết DNA plasmid, kỹ thuật PCR, tinh sạch DNA từ gel agarose, phản ứng cắt và gắn DNA, biến nạp DNA plasmid vào tế bào *E. coli*, biểu hiện gen trong tế bào *E. coli* theo Sambrook & đtg, 1989; xác định trình tự gen theo Sanger & đtg, 1977; điện di protein trên SDS-PAGE theo Hames & đtg, 1989; tinh chế protein bằng sắc ký ái lực, định lượng protein theo phương pháp Bradford, 1976; tạo đột biến điểm bằng phương pháp Mega-primer theo Sarkar G, 1990.

2.2.3. *Phương pháp xác định hoạt tính*: hoạt tính lipase được xác định trên đĩa thạch theo Beisson & đtg, 2000 và bằng kit xác định hoạt tính lipase. Hoạt tính gelatinase xác định trên đĩa thạch theo phương pháp của Tran & đtg, 2002 và bằng kit xác định hoạt tính gelatinase.

2.2.4. *Phương pháp lên men*: lên men batch chủng *E. coli* BL21-*lipA* theo Sambrook & đtg, 1989. Phương pháp lên men fed-batch HCDC theo phương pháp của Lee S.Y, 1996.

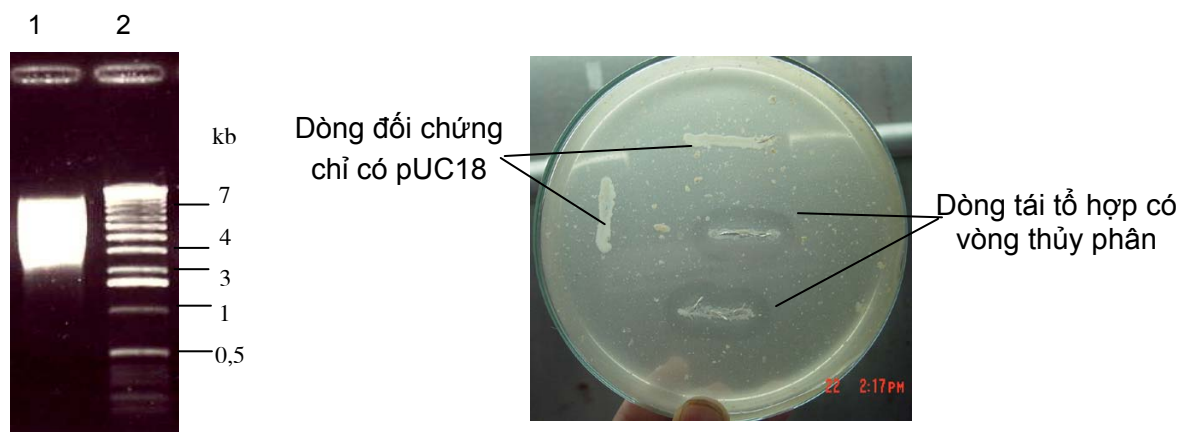
2.2.5. *Phương pháp tin sinh và xử lý số liệu bằng phần mềm sinh học*: phần mềm BioEdit, Expasy Swiss-Model tool và phần mềm PYMOL (DeLano Scientific LLC Version 4.0, Mỹ).

Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tạo ngân hàng DNA hệ gen và phân lập gen mã hóa gelatinase

Mục đích ban đầu của chúng tôi là phân lập gen mã hóa gelatinase từ vi khuẩn *B. subtilis* FS2 để tổng hợp enzyme tái tổ hợp. Do trình tự gen gelatinase của *B. subtilis* FS2 chưa được xác định trên ngân hàng gen Genbank nên chúng tôi phải tiến hành sàng lọc gen này từ ngân

hàng DNA hệ gen. Trước hết DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2 được tách chiết và xử lý bằng enzyme hạn chế *Sau3A* I để tạo ra các đoạn DNA có kích thước khoảng 3 - 7 kb (hình 3.1). Các đoạn DNA này được đưa vào vector pUC18 tạo ngân hàng DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2. Trong quá trình sàng lọc 10000 khuẩn lạc từ ngân hàng DNA hệ gen, chúng tôi đã chọn được một dòng tái tổ hợp có hoạt tính gelatinase (hình 3.2). Dòng tế bào này được ký hiệu là pUC-Gel.

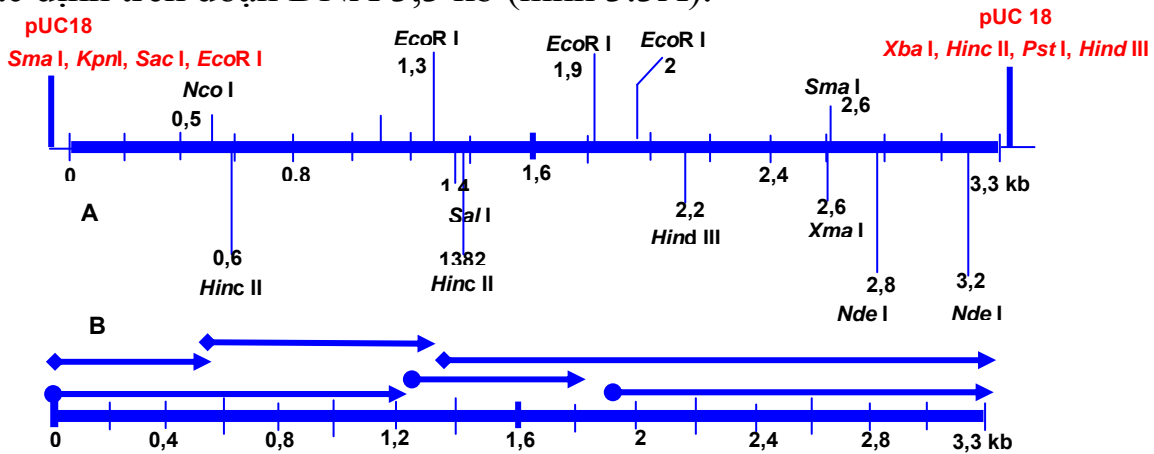


Hình 3.1. DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2 xử lý bằng *Sau3A* I
ĐC 1: DNA hệ gen cắt bằng *Sau3A* I,
ĐC 2: Thang DNA chuẩn 1kb

Hình 3.2. Dòng *E. coli* DH5 α tái tổ hợp sàng lọc từ ngân hàng DNA hệ gen có hoạt tính gelatinase trên môi trường đĩa thạch chứa collagen biến tính 0,3%.

Đoạn DNA trong plasmid pUC-Gel có kích thước khoảng 3,3 kb. Để xác định được gen mã hóa gelatinase trong đoạn DNA 3,3 kb, trước hết phải xác định được trình tự gen của đoạn DNA này. Do đoạn DNA có kích thước tương đối lớn nên quá trình đọc trình tự gen thường không hiệu quả và chính xác. Chúng tôi đã thiết kế lập bản đồ các vị trí cắt của enzyme hạn chế để có thể chia nhỏ đoạn gen tạo thuận lợi cho quá trình đọc trình tự gen. Bản đồ enzyme hạn chế trên đoạn gen được xác định dựa vào việc phân cắt đoạn DNA bằng các enzyme hạn chế khác nhau. Các enzyme hạn chế được lựa chọn là *Kpn* I, *Sac* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Xba* I, *Pst* I, *Sma* I, *Hinc* II nằm ở vùng đa nối của pUC18 và các enzyme *Bcl* I, *Bgl* II, *Not* I, *Nco* I, *Cla* I, *Nde* I, *Dpn* I, *Xho* I, *Alu* I, *Rsa* I không có điểm cắt trên vector. Đoạn DNA 3,3 kb đã được xử lý

với 18 loại enzyme hạn chế khác nhau. Sau khi tính toán kích thước của các đoạn gen và xác định vùng có trình tự gôi lên nhau, các đoạn DNA được ghép nối với nhau và vị trí cắt của enzyme hạn chế đã được xác định trên đoạn DNA 3,3 kb (hình 3.3A).



Hình 3.3. Bản đồ enzyme hạn chế của đoạn DNA 3,3 kb

A: Vị trí cắt của các enzyme hạn chế, B: Các đoạn gen được cắt bằng *EcoR I* và *Hinc II* để đọc trình tự

Dựa vào các điểm cắt của các enzyme hạn chế trên hình 3.3A, chúng tôi tiến hành phân chia đoạn gen bằng từng enzyme hạn chế *EcoR I* và *Hinc II* thành các đoạn gen ngắn hơn có kích thước khoảng 0,4 đến 1,2 kb để dễ dàng cho việc đọc trình tự gen (hình 3.3B). Sau khi đọc trình tự gen, chúng tôi tiến hành ghép các đoạn gen ngắn và phân tích đoạn DNA 3,3 kb. Sử dụng phần mềm ORF Finder để phân tích trình tự nucleotide, chúng tôi đã xác định có 4 khung đọc trong đoạn DNA 3,3 kb, đó là *lipA*, *YczC*, *YccF* và *YccG* (hình 3.4).



Hình 3.4. Sơ đồ các khung đọc mở của đoạn DNA 3,3 kb

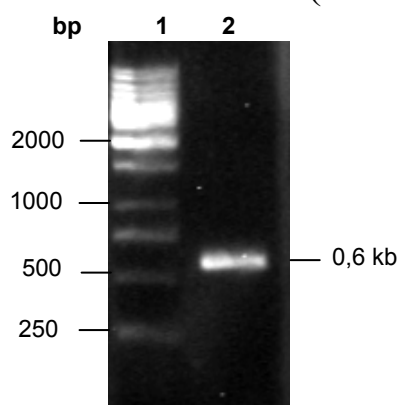
Để xác định được khung đọc nào mã hóa cho gelatinase, chúng tôi đã sử dụng enzyme hạn chế thích hợp để loại bỏ từng khung đọc và sàng lọc sơ bộ hoạt tính trên đĩa thạch chứa collagen biến tính 0,3%. Kết quả cho thấy sau khi đã loại bỏ lần lượt các khung đọc là *YccG*, *YccF* và *YczC* thì dòng tái tổ hợp có chứa khung đọc *lipA* vẫn có hoạt

tính gelatinase. Tuy nhiên, khi sử dụng *Hinc* II để cắt vào giữa khung đọc *lipA* thì hoạt tính này đã bị mất đi. Điều này chứng tỏ hoạt tính gelatinase của dòng tái tổ hợp được quyết định bởi khung đọc *lipA*. Do đó, chúng tôi đã tiến hành tách dòng và biểu hiện gen *lipA* để nghiên cứu tính chất của enzyme này.

3.2. Tách dòng và biểu hiện gen *lipA*

3.2.1. Tách dòng gen *lipA* bằng kỹ thuật PCR

Gen *lipA* mã hóa cho lipase của *B. subtilis* FS2 có kích thước khoảng 0,6 kb được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR (hình 3.5). Sản phẩm PCR được ghép nối vào plasmid pBluescriptSK(+) tạo vector tái tổ hợp pBlue-*lipA*. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. DNA plasmid được tách từ thể biến nạp và dòng tái tổ hợp chứa gen ngoại lai được chọn lọc để tiến hành xác định trình tự. Gen *lipA* sau khi đọc trình tự đã được so sánh với trình tự nucleotide trên ngân hàng Genbank. Kết quả cho thấy gen *lipA* của *B. subtilis* FS2 có độ tương đồng khoảng 98% so với gen *lipA* của *B. subtilis* 168 (AL009126).

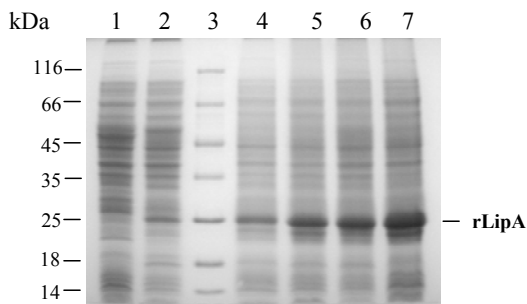


Hình 3.5. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%
ĐC 1: Thang DNA chuẩn 1 kb;
ĐC 2: Sản phẩm PCR

3.2.2. Biểu hiện gen *lipA* trong *E. coli* BL21(DE3)

Gen *lipA* từ vector pBlue-*lipA* được chuyển vào vector pET22b(+). Sản phẩm của quá trình ghép nối này là vector pET22-*lipA* được biến nạp vào trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Chúng tái tổ hợp được ký hiệu là *E. coli* BL21-*lipA* và protein tái tổ hợp được ký hiệu là rLipA.

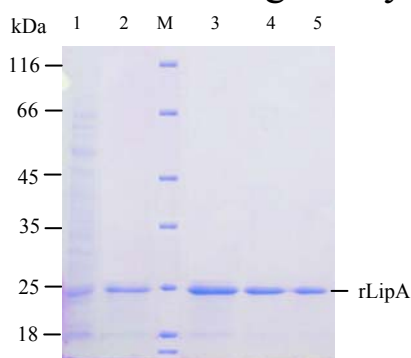
Chúng tôi đã tiến hành kiểm tra khả năng biểu hiện rLipA ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau 28°C, 30°C, 37°C và ở các nồng độ chất cảm ứng IPTG khác nhau là 0,2 mM; 0,5 mM và 1 mM. Kết quả cho thấy rLipA biểu hiện tốt nhất ở 28°C, nồng độ IPTG là 0,2 mM và sau 5 giờ nuôi cấy. Protein rLipA được tổng hợp có khối lượng khoảng 24 kDa đúng như tính toán lý thuyết (hình 3.6).



Hình 3.6. Điện di khảo sát thời gian thu mẫu rLipA trên gel SDS-PAGE 12,6%
ĐC 1: Dòng đối chứng chứa plasmid pET22b(+) sau 3 giờ cảm ứng, ĐC 2: Dòng tế bào *E. coli* BL21-*lipA* không cảm ứng, ĐC 3: Thang protein chuẩn, ĐC 4-7: Dòng tế bào *E. coli* BL21-*lipA* sau 1, 2, 3, 5 giờ cảm ứng.

3.2.3. Tinh chế protein tái tổ hợp

rLipA sau khi tổng hợp trong *E. coli* BL21 (DE3) được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực (hình 3.7). Protein tái tổ hợp biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3) với hệ vector có thiết kế các gốc His ở đầu C cho nên nó có khả năng liên kết với ion Ni^{2+} trên các cột sắc ký ái lực. Toàn bộ protein tổng số đã được đưa lên cột sắc ký ái lực His-Trap trên hệ thống sắc ký FPLC-AKTA.



Hình 3.7. Điện di protein tinh sạch trên gel SDS-PAGE 12,6%

ĐC 1: Dịch phá tế bào sau khi biểu hiện.

ĐC M: Thang protein chuẩn.

ĐC 2-5: Protein tinh sạch thu ở các phân đoạn khác nhau.

Kết quả trên hình 3.7 cho thấy protein rLipA đã được tinh sạch với 1 băng protein duy nhất khoảng 24 kDa (ĐC 4,5). Các protein tinh sạch này được loại muối trước khi xác định hoạt tính.

3.3. Xác định các hoạt tính của LipA tái tổ hợp

Các hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA đã được xác định hoạt

tính trên đĩa thạch và bằng các kit xác định hoạt tính.

3.3.1. Xác định hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA trên đĩa thạch

Hoạt tính lipase được xác định trên đĩa thạch có chứa cơ chất tributyrin 0,1% và hoạt tính gelatinase của rLipA được xác định trên đĩa thạch có chứa collagen biến tính 0,3% (dạng gelatin). Kết quả trên hình 3.8 và 3.9 cho thấy có sự xuất hiện vòng thủy phân xung quanh các giếng thạch có bổ sung rLipA, chứng tỏ enzyme này có khả năng thủy phân được hai loại cơ chất khác nhau trong khi đối chứng âm không chứa rLipA thì không thấy có hiện tượng này. Ngoài ra, kết quả trên cho thấy một số enzyme khác như lysozyme, trypsin và protease đều không có khả năng thủy phân cơ chất collagen biến tính dạng gelatin như rLipA (hình 3.9).



Hình 3.8. Kiểm tra hoạt tính lipase của rLipA trên đĩa thạch chứa tributyrin 0,1%
1: Đối chứng không chứa lipase,
2-9: rLipA tinh sạch đã loại muối.



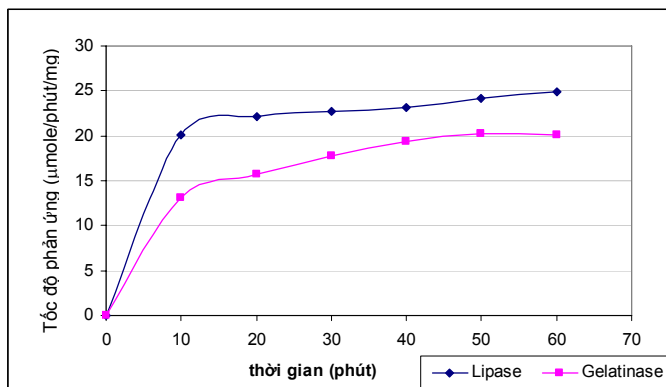
Hình 3.9. Kiểm tra hoạt tính gelatinase của rLipA trên đĩa thạch có chứa collagen biến tính 0,3%
1: Lysozyme, 2: Trypsin, 3, 4, 6: rLipA tinh sạch đã loại muối, 5: Protease, 7: Đối chứng âm không chứa lipase.

Bên cạnh đó, chúng tôi cũng tiến hành xác định hoạt tính lipase và gelatinase bằng các kit xác định hoạt tính.

3.3.2. Xác định các hoạt tính của rLipA bằng kit xác định hoạt tính

Hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA được xác định bằng các kit xác định hoạt tính trong đó cơ chất được gắn với nhóm huỳnh quang. Khi phản ứng E-S xảy ra thì nhóm huỳnh quang của phân tử cơ chất được giải phóng và phát xạ ở bước sóng xác định. Dựa vào cường độ phát xạ của nhóm huỳnh quang, có thể xác định được tốc độ phản ứng

và từ đó xác định được hoạt độ riêng của rLipA đối với từng hoạt tính. Hoạt tính lipase được đo ở bước sóng phát xạ 470 nm và hoạt tính gelatinase được đo ở bước sóng phát xạ 535 nm (hình 3.10).



Hình 3.10. Xác định các hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA

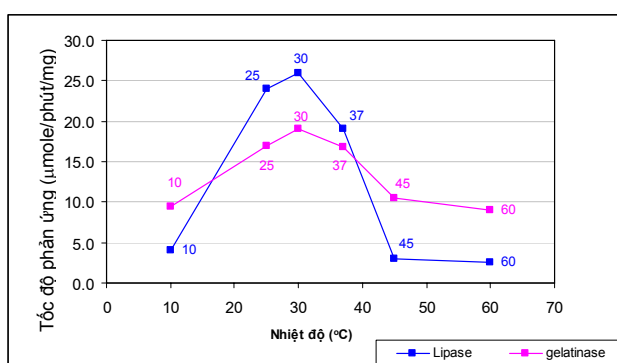
Dựa vào tốc độ phản ứng đo được khi sử dụng các kit xác định hoạt tính lipase và gelatinase, chúng tôi đã xác định được hoạt độ riêng của rLipA với DPG (cơ chất của lipase) là 19814 U/mg và hoạt độ riêng của rLipA với DQ-gelatin (cơ chất của gelatinase) là 1245 U/mg. Như vậy, hoạt độ riêng của rLipA đối với hoạt tính lipase cao hơn gấp khoảng 15 lần so với hoạt độ riêng đối với hoạt tính gelatinase.

Các kết quả xác định hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA trên đĩa thạch và bằng kit xác định hoạt tính cho thấy rLipA là một enzyme đa xúc tác do nó có khả năng phân cắt 2 liên kết hóa học khác nhau: liên kết ester C=O (của cơ chất DPG) và liên kết amide C-N (của cơ chất DQ-gelatin). Hiện tượng enzyme có khả năng xúc tác cho nhiều hơn một phản ứng hóa học liên quan tới sự đa dạng về cấu hình không gian ở trung tâm hoạt động của enzyme. Sự thay đổi một cách linh động vùng trung tâm hoạt động cho phép enzyme có khả năng liên kết với các cơ chất có cấu hình khác nhau. Đây là quan điểm trung tâm đóng vai trò giải thích cơ chế hoạt động của enzyme đa xúc tác. Sự ăn khớp cấu hình không gian của cơ chất và enzyme ở trạng thái chuyển tiếp đóng vai trò quyết định tính đặc hiệu của enzyme đối với từng cơ chất. Mặc dù trạng thái chuyển tiếp E-S giống nhau nhưng quá trình

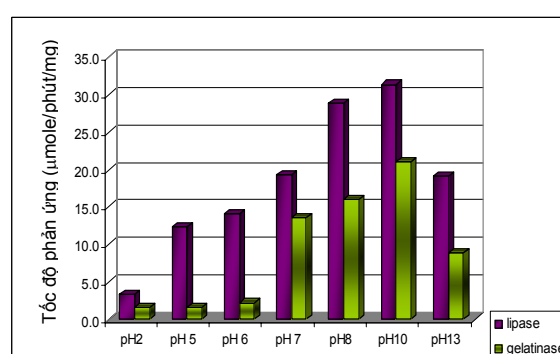
chuyển điện tử để tấn công vào các nguyên tử carbon ở vị trí khác nhau dẫn đến sự phân cắt các kiểu liên kết khác nhau. Do vậy, enzyme đa xúc tác có thể thủy phân các cơ chất khác nhau.

3.3.3. Xác định ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và các ion kim loại đối với hai hoạt tính lipase và gelatinase

Để xác định ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và các ion kim loại lên hai hoạt tính của enzyme, chúng tôi đã tiến hành phản ứng E-S ở các điều kiện nhiệt độ, pH và các ion kim loại khác nhau.

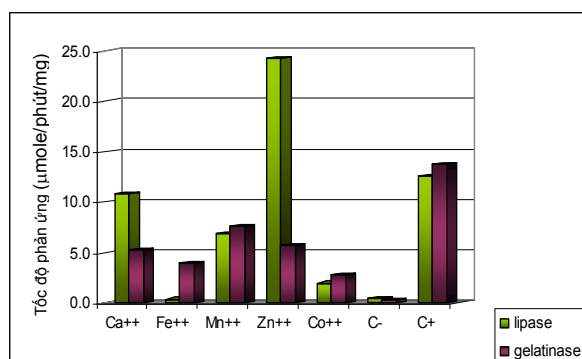


Hình 3.11. Ảnh hưởng của nhiệt độ đối với hoạt tính lipase và gelatinase



Hình 3.12. Ảnh hưởng của pH đối với hoạt tính lipase và gelatinase

Kết quả trên hình 3.11 và 3.12 cho thấy cả hai hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA đều có nhiệt độ tối ưu ở 30°C và pH tối ưu ở pH 10. Các hoạt tính này đều bị ức chế mạnh bởi các ion Fe^{++} , Co^{++} và Mn^{++} , Ca^{++} (hình 3.13). Tuy nhiên ion Zn^{++} lại làm tăng hoạt tính lipase và giảm hoạt tính gelatinase. Sự khác nhau về ảnh hưởng của các ion kim loại lên từng hoạt tính của enzyme chứng tỏ sự liên kết của các ion kim loại ở một số gốc axit amin nhất định đối với từng hoạt tính là không giống nhau.



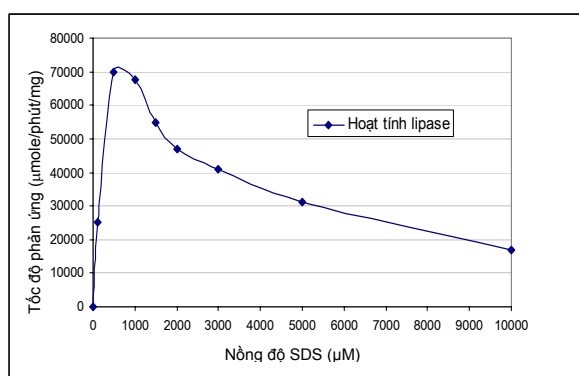
Hình 3.13. Ảnh hưởng của các ion kim loại lên hoạt tính lipase và gelatinase
 C -: Đối chứng âm (thành phần phản ứng không có enzyme).
 C +: Đối chứng dương (thành phần phản ứng có enzyme nhưng không có các ion kim loại).

3.4. Xác định các thông số động học

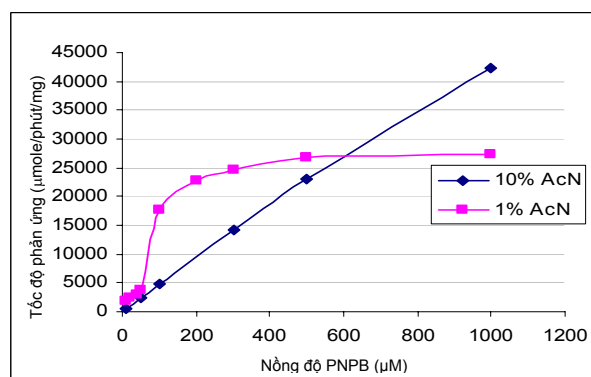
Lipase là enzyme có khả năng tham gia rất nhiều phản ứng và xúc tác chuyển hóa nhiều loại cơ chất khác nhau, vì vậy việc lựa chọn cơ chất tối ưu nhất cho hoạt tính lipase để xác định các thông số động học là rất cần thiết. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng cơ chất PNPB ($C_{10}H_{11}NO_4$) là cơ chất điển hình của lipase để xác định các thông số động học của enzyme.

3.4.1. Ảnh hưởng của SDS và Acetonitrile lên hoạt tính lipase

Theo Pouderoyen & đtg, 2001 thì LipA của *B. subtilis* không có cấu trúc nắp che phủ trung tâm hoạt động, vì vậy mà các vị trí xúc tác thường nằm bộc lộ ra bề mặt ngoài để liên kết trực tiếp với phân tử cơ chất. Tuy nhiên cơ chất của lipase là lipid thường có xu hướng kết tụ với nhau, do đó rất khó kết hợp với enzyme. Để phản ứng giữa lipase với cơ chất đạt hiệu quả thì trong các phản ứng E-S, người ta thường sử dụng SDS là chất làm tăng sức căng bề mặt. Kết quả trên hình 3.14 cho thấy tốc độ phản ứng E-S tăng dần ở nồng độ SDS từ 100 μ M cho đến 500 μ M và ở nồng độ SDS là 500 μ M thì hoạt tính thủy phân cơ chất PNPB thể hiện mạnh nhất. Ở nồng độ SDS cao hơn thì tốc độ phản ứng giảm dần và phản ứng E-S bắt đầu bị ức chế.



Hình 3.14. Ảnh hưởng của SDS lên hoạt tính lipase



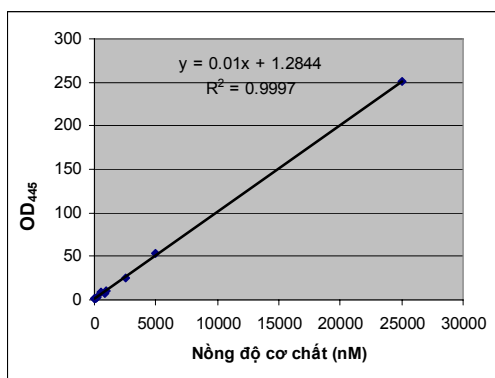
Hình 3.15. Ảnh hưởng của nồng độ AcN lên hoạt tính thủy phân PNPB

Ngoài ra, còn một nhân tố khác cũng ảnh hưởng tới phản ứng E-S, đó là khả năng hòa tan của cơ chất PNPB. Acetonitrile (AcN) là dung

môi hữu cơ có khả năng hòa tan cơ chất lipid, do vậy khi có mặt của AcN thì cơ chất PNPB được hòa tan tốt hơn và phản ứng E-S hiệu quả hơn. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của AcN trên hình 3.15 cho thấy trong điều kiện phản ứng có 1% AcN thì tốc độ phản ứng rất thấp ở nồng độ PNPB khoảng từ 10-50 μM . Điều này chứng tỏ PNPB vẫn tồn tại ở dạng không tan, do vậy phản ứng diễn ra kém hiệu quả. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ AcN 10% thì tốc độ phản ứng đã được tăng lên nhanh chóng do cơ chất PNPB đã được hòa tan hoàn toàn.

3.4.2. Xác định phần trăm (%) enzyme hoạt động

Để xác định các thông số động học của enzyme, trước hết cần phải xác định phần trăm số phân tử enzyme thực sự tham gia vào phản ứng trên tổng lượng enzyme ban đầu. Để xác định được thông số này, người ta thường sử dụng phương pháp chuẩn độ enzyme bằng phản ứng liên kết enzyme và chất ức chế. Chất ức chế ethyl 4-methylumbelliferyl heptylphosphonate được sử dụng làm cơ chất cho phản ứng chuẩn độ của rLipA, Fujii & đtg, 2003. Phản ứng xúc tác thủy phân bởi lipase giải phóng ra nhóm 4-methylumbelliferone (4 MU) gắn nhóm huỳnh quang và tốc độ phản ứng tỷ lệ với nhóm 4 MU được đo ở bước sóng phát xạ 445 nm (hình 3.16).



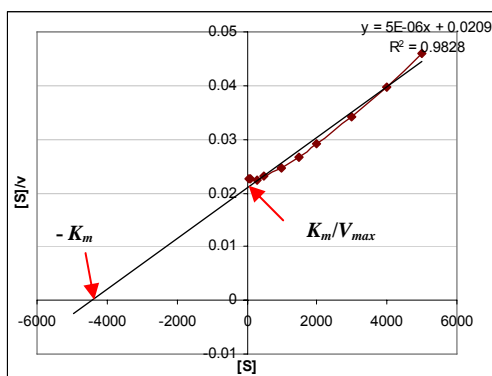
Hình 3.16. Đồ thị chuẩn dựa vào nồng độ 4MU được giải phóng

Dựa vào đồ thị chuẩn trong hình 3.16, chúng tôi đã xác định được nồng độ của nhóm giải phóng 4 MU và từ đó xác định được nồng độ enzyme hoạt động là khoảng 95%. Kết quả này chứng tỏ enzyme

rLipA hoạt động tương đối hiệu quả vì hầu hết các phân tử enzyme đều được liên kết với chất ức chế ethyl 4-methylumbelliferyl heptylphosphonate.

3.4.3. Xác định giá trị K_m , V_{max}

Các thông số động học của enzyme được tính toán dựa vào tốc độ phản ứng của enzyme tại các nồng độ cơ chất PNPB khác nhau. Thành phần của phản ứng bao gồm Na-PO₄ 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5 trong 10% AcN và 500 μ M SDS. Sản phẩm tạo thành là *p*-nitrophenol được đo ở bước sóng 405 nm. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã xây dựng đồ thị theo mô hình của Hanes-Wilkinson để biểu diễn các thông số động học của rLipA (hình 3.17).



Bảng 3.1. Các thông số động học enzyme

K_m (mM)	V_{max} (μ mole/phút/mg)	k_{cat}	k_{cat}/K_m
4,18	200000	82,5 (s^{-1})	$19,7 \times 10^3$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)

Hình 3.17. Phương trình động học Hanes-Wilkinson đối với hoạt tính lipase

Hằng số K_m thể hiện ái lực giữa enzyme với cơ chất, giá trị K_m càng nhỏ thì ái lực giữa enzyme và cơ chất càng lớn. Kết quả trên bảng 3.1 cho thấy giá trị K_m của lipase là 4,18 mM tương đối thấp, do đó ái lực của rLipA với cơ chất PNPB là tương đối lớn. Giá trị k_{cat} phản ánh hoạt độ phân tử được xác định là 82,5/giây. Như vậy trong một giây 1 phân tử enzyme có khả năng thủy phân nhiều nhất 82,5 phân tử cơ chất ở điều kiện enzyme bão hòa cơ chất. Giá trị k_{cat}/K_m là $19,7 \times 10^3$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) cho thấy rLipA có tính đặc hiệu cao với cơ chất PNPB.

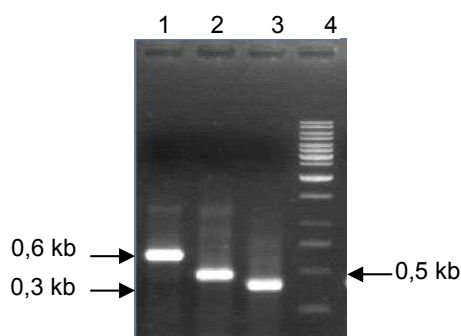
3.5. Gây đột biến điểm tại trung tâm hoạt động của enzyme

Trong cấu trúc của LipA từ *B. subtilis* có 3 gốc xúc tác trong trung tâm hoạt động nằm ở các vị trí Ser77, Asp133 và His156, Pouderoyen

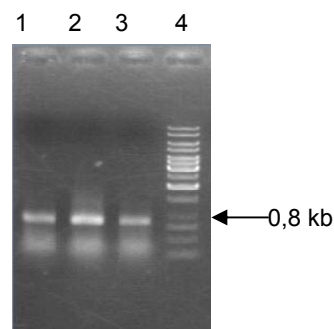
& đtg, 2001. Để nghiên cứu vai trò các gốc xúc tác ảnh hưởng tới hoạt tính của rLipA, chúng tôi đã tạo các đột biến điểm ở ba gốc axit amin là Ser77, Asp133 và His156 và tiến hành xác định hoạt tính lipase và gelatinase của từng đột biến. Dựa vào thành phần cấu trúc hóa học của các axit amin, chúng tôi đã lựa chọn các axit amin là Cys (C) thay thế cho Ser77 (ký hiệu là S77C), Asn (N) thay thế cho Asp133 (ký hiệu là D133N) và Asn thay thế cho His156 (ký hiệu là H156N).

3.5.1. Tạo đột biến bằng phương pháp Mega-primer

Plasmid pET22-*lipA* được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR tạo Mega-primer. Sản phẩm PCR lần 1 tạo ra các Mega-primer H156N, D133N và S77C có kích thước tương ứng khoảng 0,3 kb, 0,5 kb và 0,6 kb (hình 3.18). Các Mega-primer này được sử dụng cho phản ứng PCR lần 2 để nhân toàn bộ đoạn gen *lipA* mang các đột biến mong muốn. Sản phẩm PCR lần 2 cho một băng đặc hiệu kích thước khoảng 0,8 kb, đúng như tính toán theo lý thuyết chứng tỏ toàn bộ gen *lipA* chứa các đột biến đã được nhân lên thành công (hình 3.19).



Hình 3.18. Kết quả điện di sản phẩm Mega-primer trên gel agarose 0,8 %
ĐC 1-3: Các Mega-primer S77C, D133N, H156N, ĐC 4: Thang DNA chuẩn

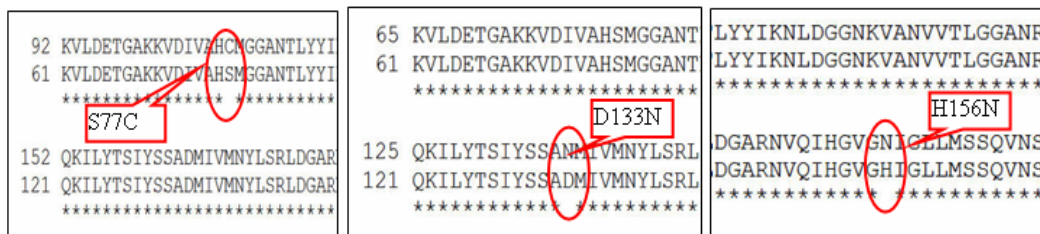


Hình 3.19. Kết quả PCR nhân dòng gen đột biến
ĐC 1-3: Các dòng đột biến S77C, D133N, H156N, ĐC 4: Thang DNA chuẩn

3.5.2. Tách dòng và biểu hiện các đột biến

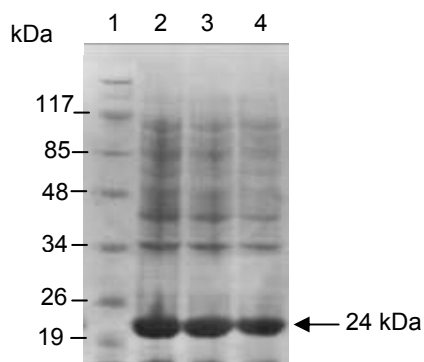
Các gen đột biến được tách dòng vào pBluescriptSK(+) và biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Một số dòng tái tổ hợp mang gen ngoại lai được chọn lọc để xác định trình tự gen. Kết quả đọc trình tự các dòng gen *lipA* đột biến cho thấy đã có sự thay đổi của các mã bộ ba như lý thuyết. Dựa vào

phần mềm dịch mã tự động, toàn bộ trình tự axit amin của các dòng đột biến được dịch mã và so sánh với trình tự axit amin ban đầu của rLipA. Kết quả so sánh trình tự trên hình 3.20 cho thấy đã có sự thay thế axit amin ở các vị trí S77C, D133N và H156N như mong muốn.



Hình 3.20. So sánh trình tự axit amin của các dòng đột biến với dòng chưa đột biến

Sau khi tách dòng thành công các đột biến S77C, D133N và H156N chúng tôi đã chuyển các gen bị đột biến vào vector pET22b(+) và biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3). Quá trình biểu hiện được cảm ứng bởi IPTG nồng độ cuối cùng 0,2 mM ở 28°C trong 5 giờ. Cả 3 dòng đột biến S77C, D133N và H156N đều được biểu hiện tốt với băng protein có kích thước khoảng 24 kDa đúng như tính toán lý thuyết (hình 3.21).



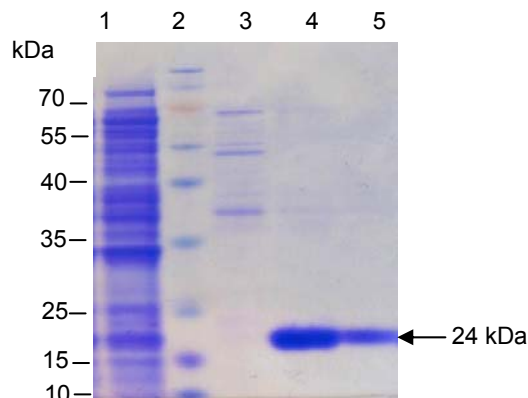
Hình 3.21. Điện di kết quả biểu hiện các dòng đột biến trên gel SDS-PAGE 12,6%
ĐC 1: Thang protein chuẩn, ĐC 2-4: Các dòng đột biến S77C, D133N và H156N.

3.5.3. Tinh sạch các dòng đột biến

Các dòng đột biến S77C, D133N và H156N được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực. Các enzyme đột biến tái tổ hợp cũng có đuôi His-tag, do vậy nó có ái lực với các ion Ni²⁺ trên cột sắc ký ái lực. Kết quả trên hình 3.22 cho thấy chỉ có hai dòng đột biến S77C và H156N tinh chế được có kích thước khoảng 24 kDa (ĐC4, ĐC5), còn dòng đột biến D133N không thấy xuất hiện băng protein ở vị trí mong

muôn (ĐC3), chứng tỏ không thu được sản phẩm enzyme tinh sạch.

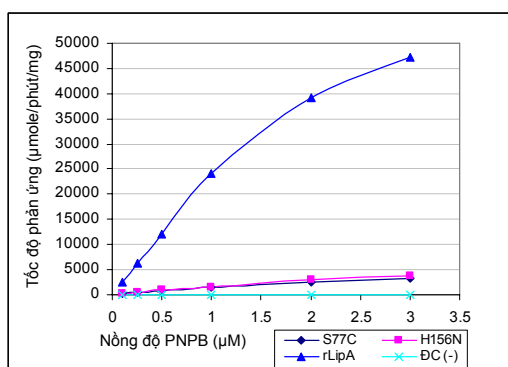
Hình 3.22. Điện di kết quả tinh sạch các dòng đột biến trên gel SDS-PAGE 12,6%
 ĐC 1: Protein tổng số của rLipA, ĐC 2: Thang protein chuẩn, ĐC 3: Tinh sạch dòng đột biến D133N, ĐC 4: Tinh sạch dòng đột biến S77C, ĐC 5: Tinh sạch dòng đột biến H156N.



Chúng tôi đã kiểm tra khả năng biểu hiện của đột biến này và kết quả là D133N bị biểu hiện ở dạng không tan, vì vậy không thể tinh sạch enzyme này bằng phương pháp thông thường. Đột biến thay thế Asp thành Asn ở vị trí 133 có thể đã làm tăng tính kỵ nước của enzyme, do đó ảnh hưởng đến khả năng tan của rLipA. Hai dòng đột biến S77C và H156N được sử dụng để xác định các hoạt tính enzyme.

3.5.4. So sánh hoạt tính lipase của rLipA và các dòng đột biến

Hoạt tính xúc tác phản ứng thủy phân cơ chất PNPB được tiến hành tương tự đối với các đột biến đã chọn. Kết quả so sánh hoạt tính của các dòng S77C và H156N với dòng tái tổ hợp (rLipA) cho thấy hoạt tính lipase của rLipA cao hơn hẳn so với các dòng đột biến (hình 3.23).



Hình 3.23. So sánh hoạt tính lipase của dòng tái tổ hợp và dòng đột biến

Bảng 3.8. Các thông số động học đối với hoạt tính lipase của rLipA và các dòng đột biến

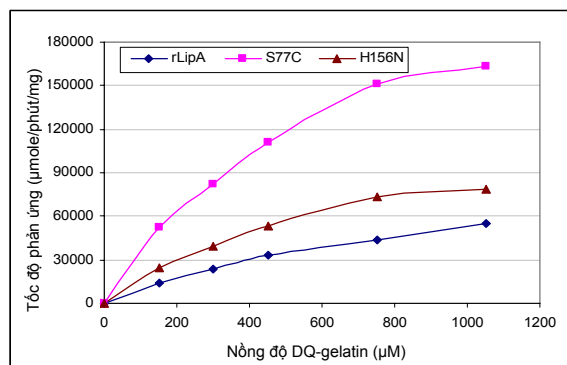
Thông số	S77C	H156N	rLipA
V_{max} ($\mu\text{mole/phút/mg}$)	10000	11111,11	200000
K_m (mM)	6	5,55	4,18

Các thông số động học xác định tốc độ phản ứng V_{max} cho thấy hai đột biến S77C và H156N đều làm giảm hoạt tính lipase đi khoảng 20 lần (bảng 3.8). Kết quả này chứng tỏ đột biến các gốc axit amin trong trung tâm hoạt động đã ảnh hưởng lớn đến khả năng xúc tác của enzyme. Sự thay đổi các gốc xúc tác đã làm giảm khả năng tương thích về mặt cấu hình không gian giữa enzyme và cơ chất. Theo cơ chế xúc tác của lipase, gốc Ser77 liên kết trực tiếp với cơ chất và được hoạt hóa. Khi đó, gốc His156 chuyển một proton từ nhóm -OH của Ser77 và cắt nhóm alcohol ra khỏi cơ chất. Vì vậy, khi thay đổi nhóm chức của các gốc xúc tác này thì khả năng liên kết của enzyme với cơ chất đã bị giảm đi một cách rõ rệt, từ đó làm giảm hoạt tính xúc tác của enzyme.

3.5.5. So sánh hoạt tính gelatinase của rLipA và các dòng đột biến

Hoạt tính gelatinase của các dòng đột biến được xác định trong cùng một điều kiện và so sánh với hoạt tính gelatinase của rLipA (hình 3.24).

Hình 3.24. So sánh hoạt tính gelatinase của dòng tái tổ hợp và dòng đột biến



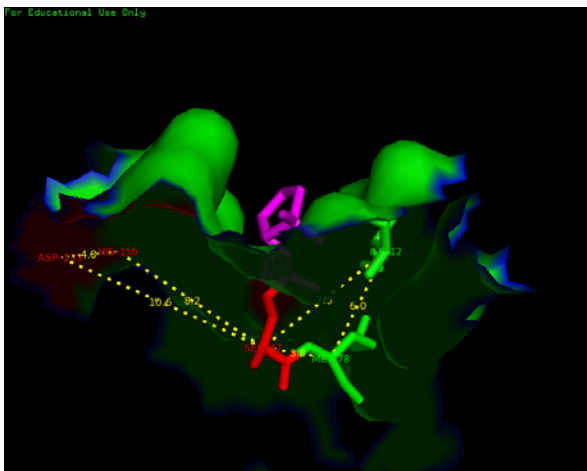
Bảng 3.9. Các thông số động học đối với hoạt tính lipase của rLipA và các dòng đột biến

Thông số	S77C	H156N	rLipA
V_{max} ($\mu\text{mole/phút/mg}$)	250000	125000	111111
K_m (mM)	0,6	0,637	1,066

Kết quả trên bảng 3.9 cho thấy hai đột biến S77C và H156N đều làm tăng hoạt tính gelatinase (giá trị V_{max} cao) và ái lực của các dòng đột biến với cơ chất của gelatinase đã tăng lên (giá trị K_m thấp) so với dòng tái tổ hợp. Kết quả này đã phản ánh khả năng liên kết của enzyme với cơ chất gelatin đã tăng lên, do đó làm tăng hoạt tính thủy

phân liên kết amide. Như vậy, đột biến ở các gốc xúc tác có thể làm thay đổi cấu hình không gian tạo nên cấu hình tương thích với cơ chất gelatin, dẫn đến làm tăng hoạt tính gelatinase của enzyme.

Kourist & đtg, 2008 lại cho rằng các liên kết hydro tạo vùng anion oxy đóng vai trò quan trọng duy trì trạng thái chuyển tiếp khi enzyme liên kết với cơ chất. Trạng thái chuyển tiếp của LipA và cơ chất được bền vững bởi các liên kết hydro giữa nguyên tử O⁻ tích điện âm của gốc Ser77 với hai nhóm -NH của 2 axit amin chuỗi bên như Ile12 và Met78. Dựa trên mô hình liên kết E-S từ dữ liệu trên ngân hàng protein RCSB PDB (1R4Z) chúng tôi đã xác định được vị trí của 2 axit amin chuỗi bên Ile12, Met78 và hiển thị vùng anion oxy hình thành với gốc xúc tác Ser77 bằng chương trình phần mềm PYMOL (hình 3.25).



Hình 3.25. Cấu trúc vùng anion oxy được hình thành bởi gốc xúc tác Ser77 và 2 axit amin chuỗi bên Ile12 và Met78 hiển thị bằng chương trình PYMOL.

Trung tâm hoạt động bao gồm ba gốc xúc tác Ser77, His156 và Asp133 (màu đỏ), chất ức chế Sc-IPG-phosphonate (màu tím), hai gốc axit amin chuỗi bên là Ile12 và Met78 (màu xanh). Gốc Ser77 liên kết trực tiếp với phân tử cơ chất. Đường nối thể hiện khoảng cách tính theo Å giữa các gốc axit amin.

Từ các kết quả trên chúng tôi đã đưa ra giả thuyết về trạng thái hình thành phức E-S của rLipA và cơ chất gelatin. Hoạt tính gelatinase của đột biến S77C đã tăng lên 2,5 lần chứng tỏ trạng thái chuyển tiếp E-S vẫn được hình thành. Thay vì nhóm OH⁻ của Ser77 tham gia liên kết với phân tử cơ chất thì nhóm SH⁻ của Cys đã tham gia liên kết trực tiếp với phân tử cơ chất gelatin. Trong cấu trúc không gian của gelatinase thì vùng xúc tác của enzyme bao gồm 3 gốc His và gốc Cys tham gia phản ứng phân cắt

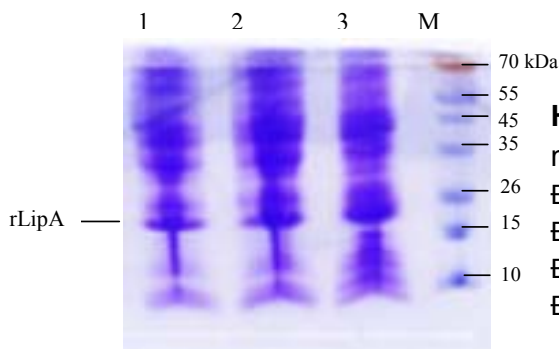
liên kết amide. Việc thay thế gốc Ser77 thành Cys ở trung tâm hoạt động của LipA đã làm tăng khả năng liên kết của enzyme đối với cơ chất gelatin, dẫn đến làm tăng hoạt tính gelatinase của LipA. Còn đối với đột biến H156N thì khi thay thế gốc His156 bằng Asp thì đột biến này không những làm cho hoạt tính gelatinase bị giảm đi mà hoạt tính này còn được tăng lên. Điều này chứng tỏ có một gốc His khác đóng vai trò tương tự như gốc His156 đối với hoạt tính gelatinase trong quá trình chuyển proton. Bằng phương pháp nghiên cứu cấu trúc protein và sử dụng chương trình phần mềm PYMOL, chúng tôi đã xác định được vị trí 3 gốc His nằm ở gần His156 trong cấu trúc không gian là His10, His76 và His152. Các gốc His này chỉ cách His156 khoảng từ 9-12 Å. Ngoài ra, còn một gốc His3 nằm ở rất xa His156, vì vậy gốc His3 này không thể tham gia vào phản ứng tạo phức liên kết E-S. Để xác định được gốc His nào ảnh hưởng lên hoạt tính gelatinase thì chúng tôi phải tiến hành nghiên cứu tạo đột biến tại các gốc His này và xác định hoạt tính gelatinase của từng dòng đột biến. Từ đó đưa ra các cơ sở khoa học để giải thích sâu hơn về cơ chế hình thành liên kết E-S giữa rLipA với cơ chất gelatin.

3.6. Lên men chủng *E. coli* BL21-*lipA* tái tổ hợp

3.6.1. Lên men chủng *E. coli* BL21-*lipA* trong các hệ thống lên men

Chủng *E. coli* BL21-*lipA* được nuôi cấy trong 4 loại môi trường khác nhau là môi trường giàu, môi trường affibody, môi trường LB và môi trường GE. Kết quả lên men cho thấy môi trường LB là môi trường thích hợp nhất để lên men chủng *E. coli* BL21-*lipA*. Ngoài ra, chủng *E. coli* BL21-*lipA* được lên men trong các hệ thống lên men có dung tích khác nhau 1 lít, 10 lít và 200 lít. Các thông số trong các hệ thống lên men đã được nghiên cứu là nồng độ oxy hoà tan 30%, nồng độ glucose được bổ sung là 3 g/l, pH 7,0, tốc độ khuấy 200-250 v/p và nhiệt độ sinh trưởng cho chủng *E. coli* tái tổ hợp là 37°C. Quá trình sinh tổng hợp lipase tái tổ hợp được cảm ứng bởi IPTG nồng độ cuối

cùng là 0,2 mM, nhiệt độ cảm ứng là 28°C sau 5 giờ nuôi cấy.



Hình 3.26. Điện di protein rLipA biểu hiện sau khi lên men trên gel polyacrylamide gradient nồng độ 8-25%
 ĐC 1: Protein rLipA biểu hiện trong hệ thống lên men 1 lít
 ĐC 2: Protein rLipA biểu hiện trong hệ thống lên men 10 lít
 ĐC 3: Protein rLipA biểu hiện trong hệ thống lên men 200 lít
 ĐC M: Thang protein chuẩn

Kết quả trên hình 3.26 cho thấy có xuất hiện băng protein khoảng 24 kDa đúng với kích thước của rLipA, chứng tỏ protein tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong các hệ thống lên men dung tích khác nhau.

Bảng 3.10. Kết quả lên men chủng *E. coli* BL21-*lipA* trong các hệ thống lên men

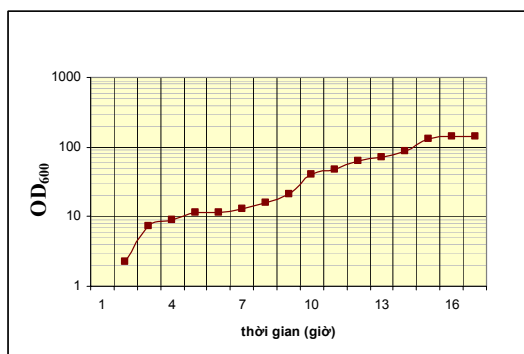
Thể tích bình lên men (lít)	OD thu mẫu	Sinh khối tế bào ướt (g/l)	Protein tổng số (g/l)	Protein tái tổ hợp (g/l)	Hiệu suất tổng hợp protein (%)
1	13,90	20,00	5,00	0,68	13,6
10	13,50	18,75	4,69	0,57	12,1
200	13,32	18,66	4,67	0,66	14,1

Kết quả lên men chủng *E. coli* BL21-*lipA* trên bảng 3.10 cho thấy sinh khối được tổng hợp trong các hệ thống lên men đạt được gần tương đương nhau khoảng từ 18 - 20 (g/l). Hiệu suất tổng hợp protein tái tổ hợp trong các hệ thống lên men tính toán được là khoảng 12 - 14% so với protein tổng số. Protein tái tổ hợp được tạo thành khoảng 570 - 680 (mg/l). Đây là kết quả khả quan cho thấy chủng *E. coli* BL21-*lipA* phát triển tương đối tốt và đồng đều trong các hệ thống lên men khác nhau.

3.6.2. Nghiên cứu quá trình lên men chủng *E. coli* BL21-*lipA* bằng phương pháp lên men fed-batch HCDC

Ngoài việc khảo sát nghiên cứu lên men rLipA trong các hệ thống lên men, hiện nay người ta còn sử dụng phương pháp fed-batch HCDC để làm tăng sinh khối tế bào lên gấp nhiều lần mà không cần phải lên men với dung tích lớn. Đa số các protein tái tổ hợp được tổng

hợp trong tế bào *E. coli* BL21 đều được tích lũy ở dạng nội bào, do vậy hiệu suất tổng hợp protein tái tổ hợp tỉ lệ với sinh khối tế bào sau khi lên men. Trong phương pháp lên men fed-batch, glucose là nguồn cơ chất được bổ sung liên tục để cho vi sinh vật luôn được phát triển ổn định. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng phương pháp lên men fed-batch HCDC để làm tăng sinh khối của *E. coli* BL21-*lipA* và thu nhận lượng lớn enzyme tái tổ hợp rLipA. Quá trình lên men chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21-*lipA* sau 18 giờ nuôi cấy cho thấy giá trị OD₆₀₀ đo mật độ tế bào có thể lên tới 143 trong môi trường LB (hình 3.27). Protein rLipA được tổng hợp đạt khoảng 6 mg/ml gấp 10 lần so với phương pháp lên men thông thường.



Hình 3.27. Đường cong sinh trưởng của chủng *E. coli* BL21-*lipA* khi bổ sung glucose theo phương pháp HCDC.

Protein tái tổ hợp sau khi lên men đã được tinh sạch thành công bằng phương pháp sắc ký ái lực. Kết quả này mở ra triển vọng để có thể tổng hợp lượng lớn lipase tái tổ hợp ứng dụng vào một số ngành sản xuất công nghiệp ở Việt Nam.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận

1. Đã sàng lọc được một dòng tái tổ hợp chứa đoạn DNA dài khoảng 3,3 kb từ ngân hàng DNA hệ gen của *B. subtilis* FS2 có hoạt tính gelatinase. Kết quả phân tích đoạn DNA 3,3 kb cho thấy khung đọc *lipA* mã hóa cho hoạt tính lipase đồng thời quyết định cho hoạt tính gelatinase. Gen *lipA* đã được tách dòng và biểu hiện trong *E.*

- coli* BL21 (DE3). Protein rLipA đã được tinh sạch thành công.
2. Cả hai hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA đều tối ưu ở pH 10, nhiệt độ 30°C và bị ức chế bởi các ion Fe^{++} , Co^{++} , Mn^{++} và Ca^{++} . Tuy nhiên, ion Zn^{++} lại làm tăng hoạt tính lipase và giảm hoạt tính gelatinase. Đã xác định được các thông số động học K_m , V_{max} đối với hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA.
 3. Đã thiết kế thành công 3 đột biến điểm là S77C, D133N và H156N bằng phương pháp Mega-primer và tinh sạch thành công hai đột biến S77C và H156N. Cả hai đột biến S77C và H156N đều làm giảm hoạt tính lipase nhưng lại làm tăng hoạt tính gelatinase, chứng tỏ cả hai gốc Ser77 và His156 đều có vai trò quan trọng đối với các hoạt tính lipase và gelatinase của rLipA. Các đột biến này đã làm thay đổi cấu hình không gian của trung tâm hoạt động để phù hợp với cơ chất gelatin hơn trong phản ứng E-S.
 4. Đã sử dụng chương trình phần mềm PYMOL để nghiên cứu cấu trúc của rLipA dựa trên cơ sở dữ liệu trên ngân hàng protein RCSB PDB.
 5. Kết quả nghiên cứu lên men cho thấy đã tìm ra được quy trình và công nghệ lên men phù hợp để tổng hợp lipase tái tổ hợp từ tế bào *E. coli* BL21-*lipA* trong các hệ thống lên men 1 lít, 10 lít và 200 lít. Hiệu suất tổng hợp protein rLipA bằng phương pháp lên men fed-batch HCDC tăng gấp 10 lần so với phương pháp lên men thông thường. Kết quả này mở ra triển vọng có thể ứng dụng rLipA tái tổ hợp vào sản xuất công nghiệp ở Việt Nam.

Kiến nghị

1. Tiếp tục nghiên cứu và xác định một số gốc axit amin quan trọng ảnh hưởng tới hoạt tính gelatinase của rLipA bằng phương pháp tạo đột biến điểm và tạo đột biến ngẫu nhiên để làm tăng hoạt tính gelatinase.
2. Nghiên cứu thử nghiệm ứng dụng rLipA tái tổ hợp vào một số ngành công nghiệp sản xuất ở Việt Nam.