

phòng phẫu thuật – Kháng sinh trị liệu trong thực hành lâm sàng, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 330-341.

6. **CDC Guideline (1999).** Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, American Journal of Infection Control, 27(2), pg. 247-260.

7. **Nguyễn Quốc Anh (2008).** Nghiên cứu một số yếu tố nguy cơ nhiễm khuẩn vết mổ tại bệnh viện Bạch Mai, Luận án tiến sỹ Y học, Hà Nội, tr. 40-56.

8. **WHO (2012).** The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. WHO Press, Geneva.

## TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN KOJA DUNG HỢP VỚI SUMO TRÊN ESCHERICHIA COLI

Nguyễn Quốc Thái<sup>1</sup>, Dương Mai Hồng<sup>1</sup>, Vũ Thanh Thảo<sup>1</sup>, Trương Phương<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Acid kojic là một tác nhân làm trắng da được sử dụng phổ biến trong mỹ phẩm. Acid kojic được sản xuất bằng phương pháp lên men từ nấm, quá trình này tốn nhiều thời gian và giá sản phẩm tạo ra khá cao. Nghiên cứu gần đây trên *Aspergillus oryzae* đã chỉ ra sản phẩm mã hoá từ gen *kojA* có liên quan đến phản ứng tổng hợp acid kojic từ glucose.

**Mục đích:** tạo được protein KojA tái tổ hợp dạng dung hợp với SUMO trên *Escherichia coli*.

**Phương pháp:** Tạo dòng chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-*kojA* có khả năng biểu hiện protein KojA ở dạng dung hợp với SUMO. Hòa tan thể vùi KojA và tinh chế thu nhận KojA bằng IMAC.

**Kết quả:** Chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-*kojA* có khả năng tạo KojA với hiệu suất cao ở dạng thể vùi (môi trường TB, thêm 0,1 mM IPTG ở 25°C). Thể vùi có khả năng hòa tan trong dung dịch ure 6 M, pH 12 ở 25°C và được tinh chế bằng IMAC với hiệu suất 37 mg/L dịch nuôi cấy. **Kết luận:** Nghiên cứu đã tạo dòng thành công chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-*kojA* có khả năng tạo KojA với hiệu suất cao ở dạng thể vùi. Tinh chế protein KojA thành công bằng cột sắc ký ái lực trên cột Ni Sepharose.

**Từ khóa:** acid kojic, gen *kojA*, pET-SUMO, protein tái tổ hợp

### SUMMARY

#### EXPRESSION OF PROTEIN KOJA FUSED WITH SUMO IN ESCHERICHIA COLI

**Background:** Kojic acid is a skin-lightening agent extensively used in cosmetic products. Kojic acid is produced by fungal fermentation, which is time-consuming, thus elevating the product's price. Recent studies in *Aspergillus oryzae* indicated that gene *kojA* encodes for a protein involved in the synthesis of kojic acid using glucose as substrate. **Objectives:** This study aims to express recombinant KojA fused with SUMO in *Escherichia coli*. **Methods:** Plasmid pET-SUMO-KojA was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for

the expression of KojA protein with SUMO tag. KojA as inclusion bodies was dissolved and purified by IMAC.

**Results:** The transformed bacteria can express KojA with high yield, nevertheless as inclusion bodies (TB medium, 0.1 mM IPTG at 25°C). Inclusion bodies could be dissolved in buffer containing 6 M urea, pH 12 at 25°C and purified by IMAC with the final yield of 37 mg/L culture. **Conclusions:** In this study, we have successfully transformed *E. coli* BL21(DE3) with the recombinant plasmid pET-SUMO-*kojA*. The bacteria expressed KojA with high amount in inclusion bodies. The insoluble protein could be completely dissolved and the pure protein obtained by 1-step purification using Ni-Sepharose column.

**Keywords:** kojic acid, *kojA* gene, pET-SUMO, recombinant protein

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cùng với sự phát triển của xã hội, nhu cầu về làm đẹp ngày càng được quan tâm, đặc biệt là các sản phẩm làm đẹp và trắng da. Trong các thành phần làm trắng da có nguồn gốc tự nhiên, không thể không kể đến acid kojic—một chất chuyển hóa thứ cấp, sinh ra bởi các loài nấm thuộc chi *Aspergillus*. Tác dụng làm trắng da của acid kojic là do ức chế tyrosinase, một enzym then chốt trong quá trình hình thành sắc tố da melanin. Hiện nay acid kojic chủ yếu được tổng hợp bằng phương pháp lên men với chủng nấm phù hợp. Phương pháp sản xuất này vẫn tốn nhiều thời gian (10-20 ngày), dẫn tới giá thành acid kojic còn khá cao [1]. Việc cải tiến sản xuất acid kojic theo xu hướng sinh học tổng hợp (synthetic biology) hoặc cải tiến chuyển hóa (metabolic engineering) đòi hỏi phải hiểu rõ về con đường sinh tổng hợp của acid kojic.

Năm 2010, Terabayashi và các cộng sự đã xác định trong con đường sinh tổng hợp acid kojic ở *Aspergillus oryzae* gen *kojA* có thể mã hóa cho enzym oxy hóa nhóm hydroxyl ở vị trí C<sub>3</sub> của glucose thành nhóm ceton [2]. Đây là một enzym rất có tiềm năng sử dụng làm chất xúc tác sinh học trong nhóm carbohydrat oxidase.

Để góp phần hiểu rõ vai trò của KojA trong con đường sinh tổng hợp acid kojic từ glucose,

<sup>1</sup>Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh  
 Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Quốc Thái  
 Email: quocthaipharm@gmail.com  
 Ngày nhận bài: 3.3.2023  
 Ngày phản biện khoa học: 24.4.2023  
 Ngày duyệt bài: 10.5.2023

đồng thời nghiên cứu ứng dụng KojA làm xúc tác sinh học, nhóm nghiên cứu tiến hành biểu hiện gen kojA tái tổ hợp trên *Escherichia coli*. Nghiên cứu dự đoán độ tan của KojA trước đây cho thấy đây là một protein khó tan do đó nhóm nghiên cứu đã thiết kế vector biểu hiện gen kojA có gắn His-SUMO tag và sử dụng tối ưu hóa codon cho biểu hiện trên *E. coli* [3].

## II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-kojA.** Plasmid pET-SUMO-kojA được tối ưu hoá cho biểu hiện trên *E. coli* [3] được tổng hợp bởi công ty GeneScript (Piscataway, NJ, Hoa Kỳ). Tế bào *E. coli* BL21(DE3) khả nạp được biến nạp với 2  $\mu$ L dung dịch plasmid 10 ng/ $\mu$ L bằng cách sốc nhiệt ở 42°C. Tế bào sau biến nạp được nuôi cấy trong môi trường LB bổ sung kanamycin 50  $\mu$ g/mL, glucose 1%, lắc ở 37°C qua đêm.

**2.2. Khảo sát biểu hiện protein tái tổ hợp.** *E. coli* BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp được sau khi cấy hoạt hóa trong LB (mục 2.1) được cấy chuyển sang môi trường TB bổ sung kanamycin 50  $\mu$ g/mL, glucose 1%, lắc ở 37 °C, 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào đạt OD<sub>600</sub> = 0,8, cảm ứng bằng isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) 0,5mM. Tiếp tục nuôi cấy qua đêm trong cùng điều kiện. Ly tâm thu sinh khối tế bào ở tốc độ 6000  $\times$  g trong 10 phút. Phân tán sinh khối trong dung dịch đệm A chứa natri phosphat 50 mM pH 7,8; NaCl 400 mM; KCl 100 mM; glycerol 10%. Tán siêu âm phá tế bào, ly tâm ở 13000  $\times$  g, 30 phút ở 10°C. Phân tích sự biểu hiện protein bằng SDS-PAGE.

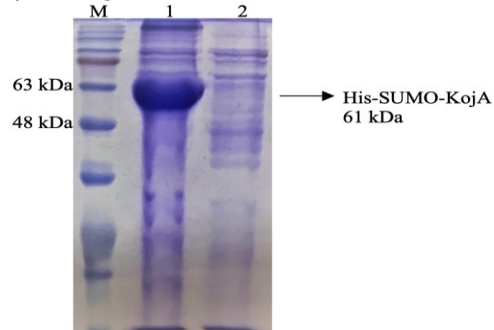
**2.3. Khảo sát điều kiện nuôi cấy.** Tiến hành khảo sát các điều kiện sau đây: Nhiệt độ nuôi cấy sau khi cảm ứng với IPTG (mục 2.2) trong môi trường TB ở nhiệt độ 25°C và 30°C; Nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,1 mM và 0,5 mM trong môi trường TB (mục 2.2) và môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 [4]; Môi trường nuôi cấy: LB, TB (0,5 mM IPTG), ZYP-5052. Sau khi nuôi cấy, theo dõi và thu sinh khối tế bào và phân tích biểu hiện protein bằng SDS-PAGE theo mục 2.2.

**2.4. Hoà tan thể vùi và tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột Ni Sepharose.** Hoà tan 0,2 g protein KojA tái tổ hợp ở dạng thể vùi (thu được từ phần tủa sau khi phá tế bào và ly tâm, mục 2.2) trong 5 ml dung dịch đệm urê 6 M, pH 12 ở 25°C trong vòng 3 giờ. Dịch protein hoà tan được nạp lên cột Ni Sepharose 1,0 mL và được rửa giải lần lượt với 2 mL các dung dịch pha trong đệm A (mục 2.2) có chứa urê và imidazol

như sau: A1: urê 6 M, imidazol 10 mM; A2: urê 4 M, imidazol 50 mM; A3: urê 4 M, imidazol 50 mM; A4: urê 3 M, imidazol 100 mM; A5: urê 2 M, imidazol 100 mM; A6: urê 2 M, imidazol 250 mM; A7: urê 2 M, imidazol 500 mM. Các phân đoạn được phân tích bằng SDS-PAGE và nồng độ protein được định lượng bằng phương pháp Bradford [5].

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

**3.1. Tạo dòng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-kojA và biểu hiện protein của KojA.** Sau khi tế bào *E. coli* BL21(DE3) được biến nạp với vector tái tổ hợp pET-SUMO-kojA, được nuôi cấy để biểu hiện protein tái tổ hợp trong môi trường TB cảm ứng bằng IPTG 0,5 mM. Qua kết quả điện di SDS-PAGE (Ảnh 1) cho thấy vạch protein to đậm có kích thước khoảng 61 kDa—tương ứng với kích thước protein His-SUMO-KojA ở dạng dung hợp với SUMO (khối lượng phân tử của KojA và tag SUMO lần lượt là 47,8 và 13 kDa). Kết quả này cũng cho thấy protein KojA chủ yếu nằm ở phần protein tủa và cũng có thể một phần nhỏ nằm ở dịch protein tan của dịch chiết tế bào *E. coli*. Với kết quả trên, KojA đã được cảm ứng biểu hiện thành công với hiệu suất biểu hiện rất cao, xấp xỉ 70% tổng lượng protein toàn phần nếu đánh giá kết quả bằng SDS-PAGE.



**Ảnh 1: Biểu hiện protein ở *E. coli* BL21(DE3)/pET-SUMO-kojA**

**M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng; 2: protein tan**

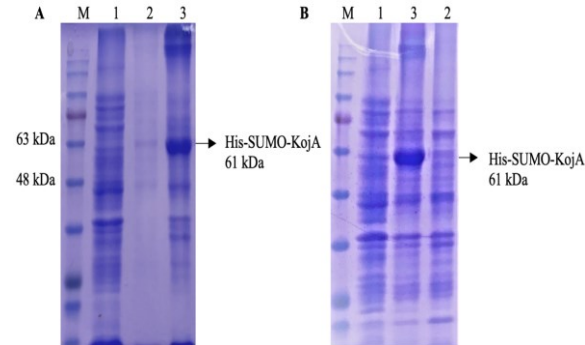
**3.2. Khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu protein tan**

**Nhiệt độ nuôi cấy sau khi cảm ứng với IPTG.** Tiến hành khảo sát nuôi cấy trong 50 mL môi trường TB ở nhiệt độ 25 °C và 30 °C sau khi cảm ứng IPTG, qua đêm. Kết quả thu hoạch sinh khối tế bào và SDS-PAGE được trình bày trong Bảng 1 và ảnh 2.

**Bảng 1: Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh khối tế bào**

Nhiệt độ	25 °C	30 °C
OD <sub>600</sub> 16-20 giờ	13-14	9-10
Tổng sinh khối (g) thu được từ 50 mL dịch nuôi cấy	1,2	1

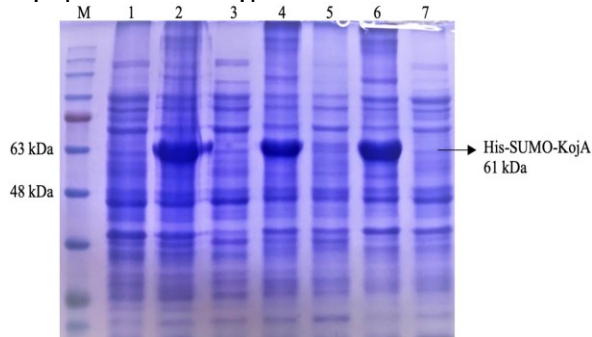
Sau 16-20 giờ ở nhiệt độ 25 °C mật độ tế bào ổn định, không thay đổi, trong khi ở nhiệt độ 30 °C mật độ tế bào có dấu hiệu giảm xuống, OD<sub>600</sub> đo được thấp hơn so với nhiệt độ 25 °C, trong khi lượng protein thu được tính trên cùng lượng tế bào tương tự nhau (Ảnh 2). Do đó, nhiệt độ 25°C được chọn để nuôi cấy E. coli biểu hiện protein trong những thử nghiệm sau.



**Ảnh 2: Biểu hiện protein khi nuôi cấy ở (A) 25 °C và (B) 30 °C**

M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng khi chưa cảm ứng bằng IPTG; 2 và 3 lần lượt protein tan và protein tổng cộng khi có mặt IPTG

**Nồng độ chất cảm ứng.** Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy cả ba điều kiện khảo sát (IPTG ở 0,1 mM và 0,5 mM; ZYP-5052) đều có thể cảm ứng biểu hiện thành công protein KojA (Ảnh 3). Do IPTG có giá thành cao và có thể độc tế bào nên chỉ cần sử dụng IPTG với nồng độ 0,1 mM trong môi trường cần chất cảm ứng. Ở môi trường ZYP-5052 có chứa lactose, khi vi khuẩn E. coli BL21(DE3) sử dụng hết glucose nó sẽ chuyển qua sử dụng lactose, đồng thời cảm ứng quá trình phiên mã xảy ra, lúc đó vi khuẩn bắt đầu biểu hiện protein tái tổ hợp.



**Ảnh 3: Biểu hiện protein ở các nồng độ chất cảm ứng khác nhau**

M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng khi chưa cảm ứng bằng IPTG; 2, 3: IPTG 0,5 mM protein tủa, protein tan; 4, 5: IPTG 0,1 mM protein tủa, protein tan; 6, 7: ZYP-5052 protein tủa, protein tan

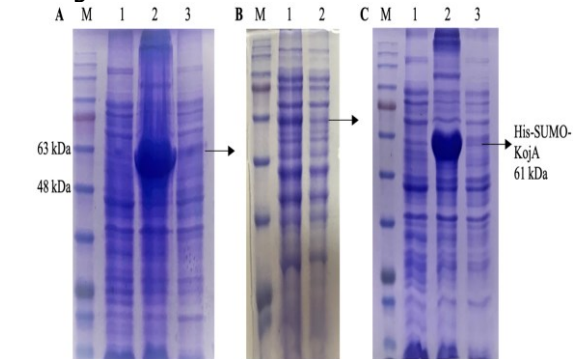
Môi trường nuôi cấy

Kết quả khảo sát cảm ứng biểu hiện protein ở nhiệt độ 25°C, trong 50 mL 3 môi trường được trình bày trong bảng 2 và ảnh 4.

**Bảng 2: Sinh khối thu được từ 3 môi trường nuôi cấy**

Môi trường	TB	LB Broth	ZYP-5052
Tổng sinh khối thu được (g)	1,15	0,6	0,73

Ở cả ba môi trường His-SUMO-KojA xuất hiện phần lớn ở protein tủa của dịch chiết tế bào. Sau 16-20 giờ nuôi cấy, sinh khối nuôi trong 50 mL môi trường TB là 1,15 g cao hơn nhiều so với LB, ZYP-5052, do đó lựa chọn môi trường TB cho các nghiên cứu sau.



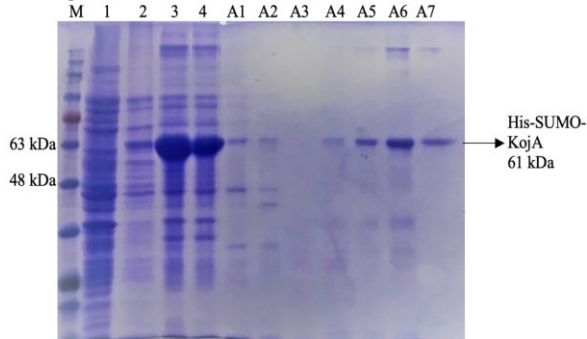
**Ảnh 4: Biểu hiện protein ở các môi trường (A) TB, (B) LB và (C) ZYP-5052**

M: Thang chuẩn protein; (A) 1: protein tổng cộng khi chưa cảm ứng bằng IPTG; 2,3: 0,1 mM IPTG protein tủa, protein tan; (B) 1, 2: protein tủa, protein tan; (C) 1: protein tổng cộng khi OD<sub>600</sub>=0,8-1,0; 2,3: protein tủa, protein tan. Mũi tên chỉ vị trí vạch tương ứng với His-SUMO-KojA.

**3.3. Hoà tan thể vùi và tinh chế bằng sắc ký ái lực trên cột Ni Sepharose.** Thể vùi protein His-SUMO-KojA được hoà tan trong dung dịch đệm chứa ure 6 M và được tinh chế qua cột Ni Sepharose 1 mL (mục 2.4). Kết quả phân tích protein từ các phân đoạn dịch rửa giải chứa nồng độ ure giảm dần được trình bày trong ảnh 5.

Kết quả cho thấy dịch protein sau khi qua cột, KojA được giữ lại một phần, một phần lớn protein không bám cột. Sau phân đoạn rửa loại tạp, dịch thôi protein có xuất hiện bằng protein tương ứng với kích thước His-SUMO-KojA (61 kDa) có độ tinh sạch khá cao ở phân đoạn A5, A6, A7. Hàm lượng protein ở phân đoạn A6 được

xác định bằng phương pháp Bradford là 0,22 mg/mL, tương ứng khả năng thu được từ thể vùi ban đầu là  $2,2 \times 10^{-3}$  mg/mg, từ dịch nuôi cấy là 37 mg/L.



**Ảnh 5: Tinh chế His-SUMO-KojA từ cột Ni Sepharose**

M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng khi chưa cảm ứng bằng IPTG; 2: Thể vùi hoà tan trong Triton X-100 1%, urê 1M; 3: Thể vùi hoà tan trong urê 6 M; 4: Protein không bám cột; A1–A7: Phân đoạn rửa bằng dung dịch từ A1–A7 (mục 2.4).

#### IV. BÀN LUẬN

Chủng *E. coli* BL21(DE3) là chủng vi khuẩn được thiết kế chứa gen T7 sử dụng hệ thống vector pET, do đó sử dụng chủng này để biểu hiện gen kojA chịu sự kiểm soát bởi promoter T7. Ngoài ra môi trường tăng trưởng, nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng, số lượng bản sao plasmid, hệ thống vector cũng ảnh hưởng đến khả năng biểu hiện protein hòa tan. Trong khuôn khổ của đề tài, chúng tôi chỉ tiến hành khảo sát các điều kiện: nhiệt độ nuôi cấy sau khi cảm ứng với IPTG, nồng độ chất cảm ứng, môi trường nuôi cấy.

Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid là một chất cảm ứng có tính ổn định và hiệu quả cao trên hệ thống T7 promoter, được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, IPTG là một chất cảm ứng có độc tính tiềm tàng và chi phí cao. Do đó nghiên cứu đã điều kiện cảm ứng tối ưu, tiết kiệm và hiệu quả trong quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp.

LB là môi trường được sử dụng phổ biến nhất để nuôi cấy *E. coli*, tuy nhiên sinh khối thu được thường không cao (Bảng 2). Những môi trường như TB (Terrific Broth) đã chứng minh tạo được mật độ tế bào cao hơn LB. Một môi trường tối ưu cũng được biết đến là môi trường tự cảm ứng như ZYP-5052. Môi trường này sử dụng glucose, lactose và glycerol để tối ưu hóa điều kiện cảm ứng. Kết quả khảo sát cho thấy nuôi cấy trong môi trường TB, thêm IPTG 0,1

mM ở 25°C cho lượng protein lớn nhất nhưng protein KojA vẫn biểu hiện chủ yếu ở dạng thể vùi. Từ 50 mL dịch nuôi cấy thu được 1,15 g tổng sinh khối và 0,85 g thể vùi.

Trong đề tài này, chúng tôi thực hiện hoà tan thể vùi KojA bằng phương pháp pha loãng giảm dần nồng độ urê kết hợp sắc ký ái lực với cột Ni Sepharose 1 mL để thu protein tinh khiết.

#### V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tạo dòng, biểu hiện thành công chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-SUMO-kojA có khả năng tạo His-SUMO-KojA ở dạng thể vùi. Khảo sát điều kiện nuôi cấy trong quy mô phòng thí nghiệm cho kết quả nuôi cấy trong môi trường TB, thêm IPTG 0,1 mM ở 25°C cho lượng protein lớn nhất. Thể vùi có thể hòa tan trong dung dịch urê 6 M, pH 12 ở 25°C trong vòng 3 giờ và tinh chế thành công bằng cột sắc ký ái lực trên cột Ni-Sepharose. Protein tinh khiết thu được ở 3 phân đoạn rửa bằng dung dịch urê 2 M, nồng độ imidazol lần lượt là 100, 250, 500 mM. Khả năng tinh chế protein KojA bằng IMAC có hiệu suất là 37 mg/L dịch nuôi cấy.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu cảm ơn Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài này thông qua hợp đồng nghiên cứu khoa học số 227/2020/HĐ-ĐHYD ngày 15/10/2020.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Mohamad R., Mohamed M. S., Suhaili N. et al. (2010)**, "Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production", *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **5** (2), pp. 24-37.
2. **Terabayashi Y., Sano M., Yamane N. et al. (2010)**, "Identification and characterization of genes responsible for biosynthesis of kojic acid, an industrially important compound from *Aspergillus oryzae*", *Fungal Genetics and Biology*, **47** (12), pp. 953-961.
3. **Nguyễn Quốc Thái, Nguyễn Duy Thạch (2023)**, "Dự đoán khả năng hoà tan và thiết kế vector biểu hiện protein KojA trong con đường sinh tổng hợp acid kojic", *Tạp chí Y học Việt Nam*, Tập **526**, tháng 5, số 2, tr.
4. **Studier, F. W. (2005)** "Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures", *Protein expression and purification*, **41** (1), pp. 207-234.
5. **Bradford, M. M. (1976)**. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical biochemistry*, **72** (1-2), pp. 248-254.