

NGHIÊN CỨU TẠO ENTEROKINASE TÁI TỔ HỢP CÓ HOẠT TÍNH ĐƯỢC BIỂU HIỆN TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Lê Thị Thu Hồng^{1,2,✉}, Lương Kim Phượng^{1,3}, Trịnh Thị Thu Hiền¹, Nguyễn Thị Mai Phương¹, Trương Nam Hải^{1,2}, Đỗ Thị Huyền^{1,2,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: lethuhong@ibt.ac.vn; dohuyen@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 13.12.2019

Ngày nhận đăng: 06.3.2020

TÓM TẮT

Enterokinase là một serine protease thường được ứng dụng ở một số lĩnh vực nghiên cứu công nghệ sinh học. Để sử dụng cho các mục đích đó, chuỗi nhẹ của enterokinase mang hoạt tính xúc tác của enzyme được nghiên cứu để biểu hiện tái tổ hợp vì việc tách chiết enterokinase tự nhiên thường không hiệu quả. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu tạo enterokinase chuỗi nhẹ tái tổ hợp có hoạt tính trong *Escherichia coli*. Protein dung hợp thioredoxin-enterokinase (trx-ent) được biểu hiện trong *E. coli* chỉ thể hiện hoạt tính bằng khả năng tự phân cắt khi được biểu hiện ở dạng không tan với điều kiện biến tính bằng guanidine và tái gấp cuộn phù hợp. Trong khi đó, enzyme biểu hiện ở dạng tan cũng như là dạng không tan được biến tính bằng urea thì không có hoạt tính. Nồng độ guanidine được sử dụng là 6M cùng với các điều kiện tái gấp cuộn tuần tự là các đệm oxi hóa chứa glutathione oxi hóa, tiếp theo là điều kiện khử sử dụng glutathione khử cùng với chất làm tăng khả năng tan arginine, protein dung hợp Trx-ent sau đó đã có khả năng tự phân cắt. Protein enterokinase chuỗi nhẹ tái tổ hợp có hoạt tính với kích thước khoảng 35 kDa trên điện di biến tính Tris-glycine. Những thử nghiệm ban đầu cho thấy enterokinase có khả năng phân cắt cơ chất trx-sumoprotease thành thioredoxin và sumoprotease. Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu tinh chế enterokinase có hoạt tính để ứng dụng trong công nghệ biểu hiện protein tái tổ hợp.

Keywords: enterokinase, *E. coli*, khả năng tự phân cắt, protein dung hợp, tái tổ hợp

MỞ ĐẦU

Enterokinase, còn được gọi là enteropeptidase, là enzyme đầu tiên được biết đến có vai trò phân giải các tiền protein enzyme thủy phân để tạo thành trạng thái hoạt động. Nó được xem là một ví dụ điển hình về việc các serine protease đã được tạo ra như thế nào để điều hòa quá trình trao đổi chất. Vai trò chính của enterokinase là chuyển hóa tiền chất trypsinogen thành dạng enzyme trypsin hoạt động bằng cách nhận biết và phân cắt trình tự peptide đặc hiệu, Asp-Asp-Asp-Lys (Zheng *et al.* 2009). Dạng hoạt động của trypsin kích hoạt các

zymogen tiêu hóa khác như chymotrypsinogen, proelastase, procarboxypeptidase và prolipase trong ruột. Sự suy giảm chức năng sinh học quan trọng của enterokinase bẩm sinh ở ruột dẫn đến triệu chứng tiêu chảy nặng, không phát triển, giảm tiểu cầu và phù nề.

Enterokinase được tổng hợp dưới dạng các zymogen đơn chuỗi với trình tự của đầu N-propeptide có độ dài khác nhau. Các enzyme này được kích hoạt bởi sự phân cắt ở phía đầu carboxyl của axit amin lysine hoặc arginine có trong motif nhận biết của enzyme trypsin. Khi được kích hoạt, enzyme này vẫn còn vùng liên

kết màng tế bào thông qua một liên kết disulfide bảo tồn các đơn vị pro- và xúc tác của enzyme. Enterokinase thuộc nhóm chymotrypsin và có cấu trúc tương tự như các protein của nhóm này (Sadler, 2013). Dạng trưởng thành của enterokinase là một serine protease (EC 3.4.21.9) bao gồm 2 chuỗi liên kết với bằng một cầu disulfide, trong đó chuỗi nặng có kích thước khoảng 82-140 kDa, có chức năng làm neo enterokinase bám vào màng ngoài của màng ruột non và chuỗi nhẹ có kích thước 35-62 kDa chứa đơn vị xúc tác.

Việc tách chiết enterokinase tự nhiên thường bị hạn chế do giá thành cao và thường nhiễm các protease khác dẫn đến phân hủy protein enzyme (Vozza *et al.* 1996). Do đó, biểu hiện protein ngoại lai dùng cho nghiên cứu và ứng dụng là giải pháp được lựa chọn. Các nghiên cứu đã biểu hiện và tinh chế chuỗi nhẹ mang hoạt tính xúc tác có nguồn gốc từ bò, chuột và người trong các hệ biểu hiện như *E. coli* (Chun *et al.* 2011; Collins-Racie *et al.* 1995; Gasparian *et al.* 2006; Huang *et al.* 2007; Kitamoto *et al.* 1994; Niu *et al.* 2015; Skala *et al.* 2013; Yuan, Hua 2002) và trong nấm men (Melicherová *et al.* 2017; Peng *et al.* 2004; Pepeliaev *et al.* 2011; Smith, Johnson 2013). Tuy nhiên, enzyme tái tổ hợp thường được biểu hiện và khả năng thu protein ở mức độ rất thấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu tạo enterokinase tái tổ hợp có hoạt tính sử dụng hệ thống *E. coli* với thử nghiệm các điều kiện biểu hiện dạng tan hay dạng không tan kết hợp với tái cuộn gập protein.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng vi sinh vật, plasmid

Chủng *E. coli* BL21 Rosetta (Invitrogen, Hoa Kỳ) sử dụng để biểu hiện gen, plasmid pET32a(+)/ent được thiết kế trong nghiên cứu trước (Phuong *et al.* 2018).

Hóa chất, enzyme

Hóa chất, enzyme sử dụng cho nghiên cứu

APS, TEMED, chloroform, ethidium bromide, glucose, glycerol, glycine, isoamyl-alcohol, ethanol, methanol, peptone, yeast extract, SDS, Tris, acrylamide, bis-acrylamide, agar, agarose, coomassie brilliant blue (Merck, Đức); kháng sinh ampicilin, GSH, GSSG, kháng thể kháng thioredoxin được sản xuất từ thỏ, kháng thể 2 anti rabbit IgG-peroxidase, TMB (Sigma, Hoa Kỳ).

Phương pháp

Biểu hiện enterokinase

Chủng *E. coli* Rosetta mang vector biểu hiện pET32a/ent được nuôi cấy trong môi trường LBA, nuôi lắc 200 vòng/phút ở 37°C qua đêm. Sau đó, dịch tế bào nuôi qua đêm được chuyển sang môi trường LBA mới với OD₆₀₀ khoảng 0,1, nuôi tiếp ở 37°C, lắc 200 vòng/phút đến khi OD₆₀₀ đạt 1. Dịch nuôi cấy được cảm ứng với các nồng độ isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) và chuyển sang nuôi lắc 200 vòng/phút ở các nhiệt độ thử nghiệm khác nhau và thời gian thu mẫu khác nhau.

Tách chiết protein tái tổ hợp từ tế bào E. coli

Tế bào *E. coli* tái tổ hợp sau khi lên men được thu lại bằng ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Tế bào được huyền phù trong đệm thích hợp để đưa mẫu về OD₆₀₀ = 10. Dịch tế bào được siêu âm trong 10 phút (3 giây/xung, nghỉ 3 giây giữa các xung) với cường độ 85 Amp. Sau siêu âm, mẫu được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để phân thành pha tan và pha tủa. Pha tủa được hòa lại về thể tích ban đầu trong đệm phù hợp. Các mẫu tan và tủa đều được điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12,6% (Laemmli, 1970).

Tinh chế enterokinase tái tổ hợp ở dạng tan

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã nghiên cứu biểu hiện protein dung hợp trx-ent ở dạng tan (Phuong *et al.* 2018). Mẫu protein pha tan được bổ sung thêm NaCl và imidazol để đạt nồng độ cuối cùng là 0,1 M NaCl và 10 mM imidazole (tương ứng với đệm gắn mẫu lên cột). Quá trình tinh chế được thực hiện với cột HisTrap loại 5 ml (Amersham). Sau khi cân bằng cột với 5 thể tích cột (CV) đệm gắn mẫu chứa Tris HCl 20 mM, NaCl 0,1 M, imidazole 10 mM, pH 8, mẫu

protein được đưa lên cột với tốc độ 1,5 ml/phút. Để loại các protein gắn không đặc hiệu lên cột, cột được rửa với 10 CV đệm rửa 1 chứa Tris HCl 20 mM, NaCl 0,1 M, imidazole 50 mM, pH 8, tiếp theo là 5 CV đệm rửa 2 chứa Tris HCl 20 mM, NaCl 0,1 M, imidazole 100 mM, pH 8. Cuối cùng, mẫu protein được tách ra khỏi cột bằng 5 CV đệm thu mẫu chứa Tris HCl 20 mM, NaCl 0,1 M, imidazole 250 mM, pH 8.

Tinh chế enterokinase tái tổ hợp được biểu hiện ở dạng không tan

- Trường hợp xử lý biến tính với Urea

Tế bào *E. coli* sau khi biểu hiện enterokinase được hòa trong đệm Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0 sao cho OD₆₀₀=10 và được siêu âm trong 10 phút (3 giây/xung, nghỉ 3 giây giữa các xung) với cường độ 85 Amp. Mẫu được ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút để thu tủa là các protein không tan. Tủa này được rửa 1 lần với đệm nêu trên. Mẫu protein được tái gấp cuộn bằng đệm có chứa urea theo phương pháp của Tan và đồng tác giả (2007). Về cơ bản, mẫu protein pha không tan được tiếp tục rửa trong đệm (urea 2 M, mercaptoethanol 0,25% và triton X-100 1%), thu tủa protein. Sau đó, mẫu protein được hòa tan trong đệm biến tính urea 8M, 2-mercaptoethanol 1%. Tiếp theo, pha loãng mẫu 5 lần trong đệm A đã để lạnh (NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8.0) có bổ sung glycerol 20%. Mẫu sau đó được thẩm tích trong 200 ml đệm A và đổi đệm 3 lần cứ sau 4 giờ thẩm tích. Cuối cùng, thẩm tích trong đệm B (CaCl₂ 2 mM, NaCl 100 mM và Tris-HCl 20 mM, pH8) ở 15-18°C trong 48 giờ.

Ngoài ra, mẫu tủa protein cũng đã được thử nghiệm tái gấp cuộn theo quy trình: Siêu âm phá tế bào trong đệm Tris 20 mM, pH8. Mẫu tủa protein ở nồng độ 4 mg/ml được làm tan trong đệm Tris 20 mM, pH8, urea 8 M, DTT 20 mM. Sau đó, pha loãng mẫu 100 lần trong đệm Tris 20 mM, urea 1 M, GSSG 1 mM, GSH 3 mM, pH 8.0 và được ủ ở 20°C trong 24 giờ. Bên cạnh đó, mẫu protein cũng được thử nghiệm pha loãng trong đệm có bổ sung arginine 0,5 M và CaCl₂ 20 mM (Woldicke *et al.* 2013).

- Trường hợp xử lý biến tính bằng guanidine

Tế bào *E. coli* sau khi biểu hiện enterokinase được thu lại bằng ly tâm và được hòa trong đệm Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 10 mM, triton X-100 1% sao cho OD₆₀₀=10. Tế bào được phá vỡ bằng siêu âm trong 10 phút (3 giây/xung, nghỉ 3 giây giữa các xung) với cường độ 85 Amp. Dịch phá tế bào được phân pha bằng ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C và cặn được rửa 1 lần với đệm phá tế bào ở trên. Mẫu protein Trx-ent ở dạng không tan này được nghiên cứu tinh chế tái gấp cuộn theo phương pháp của Gasparian và đồng tác giả với một số thay đổi (Gasparian *et al.* 2003). Pha không tan chứa protein dung hợp Trx-ent được hòa tan trong đệm biến tính Tris 0,1 M, pH 8, EDTA 1 mM, dithiothreitol 20 mM và guanidine 6 M. Phần không tan được loại bỏ bằng ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Protein tan trong đệm biến tính được thẩm tích trong guanidine 3 M, pH 3 trong 3 giờ và thu phần dịch. Dịch protein được bổ sung với lượng tương đương đệm oxi hóa (Tris 100 mM, pH8, guanidine 6 M, oxidized glutathione 100 mM) được ủ qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau đó, mẫu được thẩm tích trong guanidine 3 M, pH 8 trong 3 giờ. Mẫu được pha loãng 10 lần hoặc 30 lần trong đệm tái gấp cuộn (arginine 0,7 M, pH 8,5, reduced glutathione 2 mM, EDTA 1 mM, glycerol 10%) ủ 72 giờ ở 4°C. Cuối cùng, mẫu protein Trx-ent được thẩm tích trong đệm Tris 50 mM, pH 8 và CaCl₂ 2 mM trong 8 giờ ở 25°C.

SDS-PAGE và Western blot

Sau khi điện di biến tính protein trên gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970), protein được chuyển sang màng PVDF ở 18 V trong 30 phút trên hệ thống chuyển màng Trans-blot Semi-dry (Biorad, Hoa Kỳ). Protein Trx-ent được nhận biết bằng kháng thể kháng thioredoxin theo phương pháp như mô tả (Hà *et al.* 2017). Về cơ bản, màng được phủ với kháng thể 1 (kháng thể kháng thioredoxin) được sản xuất từ thỏ pha loãng 500 lần trong 10 ml sữa tách bơ 5% lên màng trong 1 giờ. Kháng thể 2 (anti rabbit IgG-peroxidase) pha loãng 5000 lần trong 10 ml sữa

tách bơ, ủ 1 giờ. Hiện màu protein bằng dung dịch cơ chất TMB.

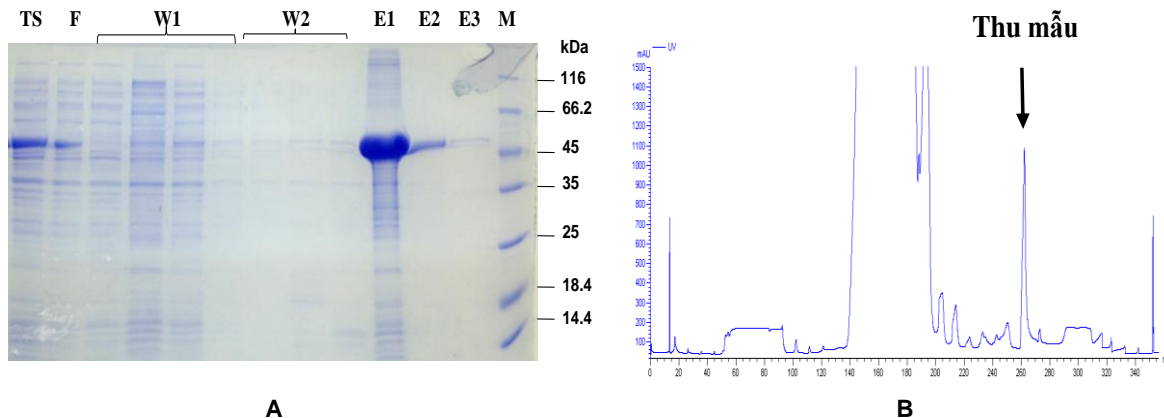
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tinh chế protein enterokinase dung hợp với thioredoxin được tổng hợp ở dạng tan

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã công bố kết quả biểu hiện enterokinase dung hợp với Trx. Mục đích của việc dung hợp với trx là để tạo ra protein enterokinase có hoạt tính thì sẽ có hiện tượng tự cắt tại vị trí nối giữa Trx và enterokinase. Kết quả nghiên cứu các điều kiện biểu hiện cho thấy, protein dung hợp có thể được tổng hợp ở dạng tan tốt trong môi trường LBA có bổ sung 0,5 M sorbitol và 1 mM betaine trong điều kiện sốc thẩm thấu với nhiệt độ 20°C cũng như việc biểu hiện đồng thời với chaperone có thể làm tăng tính tan của protein tái tổ hợp. Kết quả tách chiết protein tái tổ hợp cũng chỉ ra rằng, ở nhiệt độ lên men 20°C, Trx-ent chiếm khoảng 70% ở phân đoạn tan khi hòa dịch tế bào trong đệm Tris 20 mM pH 8. Các điều kiện đệm còn

lại, protein tái tổ hợp tan với hàm lượng rất ít chỉ khoảng 10% trong đệm Tris 50 mM pH 8 hoặc không tan trong H₂O và Tris HCl 20 mM pH 8 có bổ sung 50 mM NaCl và 2 mM CaCl₂. Như vậy, đệm phá tế bào Tris 20 mM pH8 là phù hợp để thu protein Trx-ent dạng tan (Phuong *et al.* 2018).

Những nghiên cứu về tinh chế enterokinase tái tổ hợp đã được chúng tôi thử nghiệm. Theo thiết kế protein Trx-ent có chứa trình tự 6 histidine dùng cho tinh chế protein bằng sắc ký ái lực. Vì vậy, cột sắc ký ái lực với Ni²⁺ đã được sử dụng để tinh chế protein tái tổ hợp Trx-ent. Kết quả cho thấy so với mẫu protein tan tổng số, phân đoạn thu được sau tinh sạch có hàm lượng protein Trx-ent cao (Hình 1). Như vậy, mẫu protein được bám lên cột khá tốt và protein Trx-ent được thổi ra tập trung chủ yếu ở phân đoạn thu mẫu với nồng độ imidazole 250 mM. Mẫu protein này được loại imidazole và được dùng cho thử nghiệm đánh giá hoạt tính enzyme enterokinase.



Hình 1. Trx-ent dạng tan được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực histidine. A: kiểm tra kết quả tinh chế bằng SDS-PAGE. TS: Mẫu protein tổng số ở pha tan; F: Mẫu protein không bám cột; W1, W2: Các phân đoạn tương ứng với đệm rửa 1 và 2; E1, E2, E3: Các phân đoạn thu mẫu. B: Sắc ký đồ tinh chế protein Trx-ent trên hệ thống sắc ký FPLC, cột Histrap 5 ml.

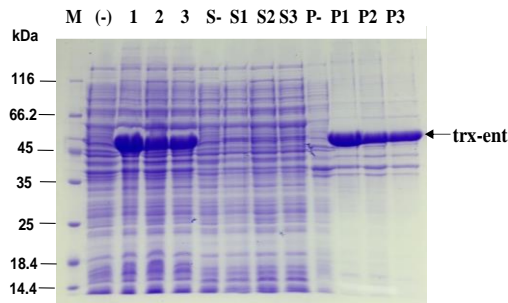
Theo các nghiên cứu, ion kim loại cần thiết cho hoạt động của enzyme enterokinase. Chúng tôi đã bổ sung thêm ion kim loại hóa trị II (Ca²⁺) vào các mẫu enzyme thô cũng như enzyme tinh chế được thử nghiệm. Tuy nhiên, các kết quả đánh giá hoạt tính cho thấy Trx-ent đã không xảy

ra hiện tượng tự cắt để tạo ra enterokinase và thioredoxin. Sau nhiều nỗ lực tối ưu điều kiện lên men, điều kiện tách chiết làm tăng khả năng tan cũng như điều kiện phản ứng cắt để cho Trx-ent tan có khả năng tự cắt của enzyme dạng tan nhưng hoạt tính của enzyme enterokinase không

được thể hiện. Một trong những lý do là rất có thể trong phân tử enzyme enterokinase có chứa nhiều cầu disulfide nên mặc dù protein có thể được tạo ra ở dạng tan nhưng cấu trúc hoạt tính với các cầu disulfide chính xác vẫn chưa đảm bảo vì vậy protein vẫn không có hoạt tính của enzyme enterokinase.

Biểu hiện và tinh chế protein enterokinase ở dạng không tan

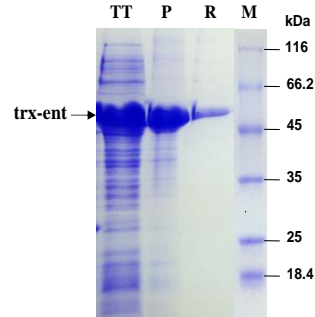
Việc biểu hiện và tinh chế enterokinase tái tổ hợp ở dạng tan không thành công có thể do enterokinase có chứa nhiều cầu disulfide. Phân tử enterokinase có 9 gốc cysteine trong đó có 4 cầu disulfide. Có thể trong tế bào chất của tế bào *E. coli* không đảm bảo hình thành đúng liên kết disulfide để tạo đúng cấu trúc cuộn gấp đảm bảo hoạt tính của enzyme. Vì vậy, chúng tôi chuyển sang nghiên cứu enterokinase không tan sau đó biến tính và hồi tính để tìm kiếm điều kiện thích hợp cho enzyme có cấu trúc đúng, có hoạt tính sinh học. Với điều kiện biểu hiện thông thường, protein dung hợp trx-ent được tổng hợp hoàn toàn ở dạng không tan (Hình 2).



Hình 2. Biểu hiện protein dung hợp trx-ent dạng không tan. Các chủng mang gen và đối chứng được nghiên cứu biểu hiện và được kiểm tra mẫu protein pha tan và pha tủa. M: Thang protein chuẩn, (-): protein tổng số đối chứng âm; 1,2,3: các dòng tế bào mang gen biểu hiện trx-ent, S, P: các mẫu protein pha tan, pha tủa ở các dòng tương ứng.

Một số phương pháp đã được thử nghiệm dựa trên chất biến tính là urea và guanidine (trình bày trong phần phương pháp). Với những phương

pháp thử nghiệm, điều kiện biến tính và hồi tính dựa trên chất biến tính urea không cho kết quả mong đợi. Protein trx-ent sau bước hồi tính không có khả năng tự phân cắt để tạo ra thioredoxin và enterokinase (Hình 3).



Hình 3. Tinh chế protein Enterokinase dạng không tan bằng chất biến tính urea. TT: Mẫu protein tổng số; P: Mẫu protein ở pha không tan; R: protein sau khi biến tính và hồi tính bằng urea.

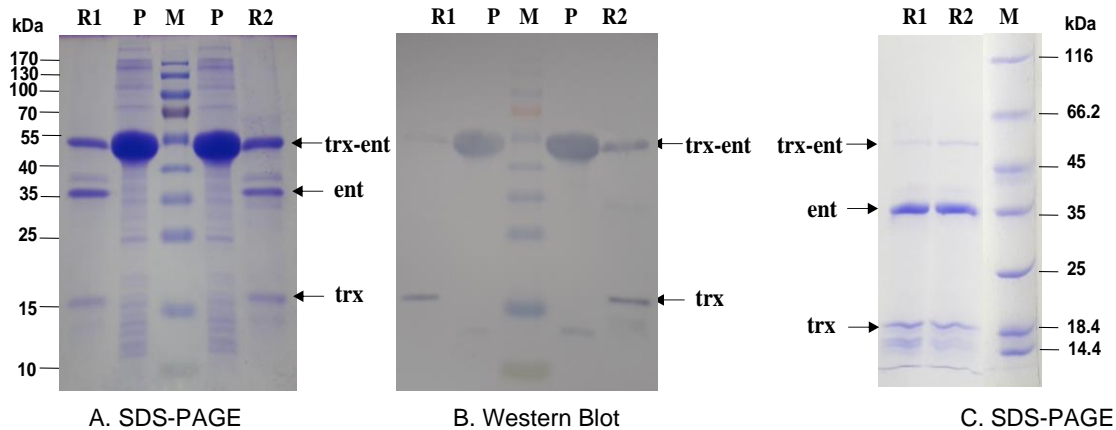
Đối với mẫu protein Trx-ent không tan được làm biến tính bằng guanidine, sau bước thẩm tích protein hồi tính trong đệm Tris 50 mM pH8 và CaCl₂ 2 mM trong thời gian 8 giờ ở nhiệt độ phòng với việc thay đổi đệm và không thay đổi đệm trong quá trình thẩm tích, hiện tượng tự phân cắt của protein dung hợp Trx-ent đều đã xảy ra tuy nhiên chưa cắt hết phân tử protein dung hợp (Hình 4A). Sau đó, kiểm tra mẫu sau 24 giờ thì bằng protein dung hợp này còn lại rất mờ và hầu hết đã được cắt thành enterokinase và trx (Hình 4C). Kết quả này cho thấy, việc thay đổi đệm là không cần thiết trong quá trình thẩm tích trong giai đoạn phản ứng tự phân cắt xảy ra. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu của nhóm Gasparian và cộng sự khi biểu hiện chuỗi nhẹ enterokinase từ người trong *E. coli* (Gasparian *et al.* 2003). Như vậy với điều kiện oxi hóa khử phù hợp, enterokinase đã tái cuộn gấp được cấu trúc chính xác có hoạt tính phân cắt của protease.

Western blot với kháng thể kháng trx cũng cho thấy protein dung hợp trx-ent đã bắt cặp với kháng thể trong mẫu tổng số. Đối với mẫu sau khi hồi tính, kháng thể được nhận biết tại vị trí của băng trx-ent cắt chưa hết và băng trx sau khi được cắt khỏi enterokinase (Hình 4B). Như vậy,

chúng tôi có thể khẳng định được rằng enterokinase đã có hoạt tính phân cắt.

Bằng protein enterokinase di chuyển với kích thước khoảng 35 kDa trên gel điện di Tris-glycine SDS-PAGE. Kết quả này giống với các nghiên cứu đã được công bố về biểu hiện enterokinase chuỗi nhẹ của người hay

protein của bò được biểu hiện tái tổ hợp trong *E. coli* (Gasparian *et al.* 2003; Hermon Taylor *et al.* 1977). Các tác giả cũng đã chứng minh khi điện di trên gel tris-tricine, SDS-PAGE thì protein enterokinase di chuyển với kích thước 26,5 kDa đúng với với kích thước tính toán lý thuyết.



Hình 4. Tinh chế và phân tích khả năng tự phân cắt của trx-ent sau khi tái gấp cuộn protein với mẫu xử lý biến tính bằng guanidine. Mẫu protein dung hợp trx-ent ở pha không tan được tiến hành biến tính bằng guanidin và tái cấu trúc với các loại đệm oxi hóa khử phù hợp. Sau đó được kiểm tra bằng SDS-PAGE, Western blot với kháng thể kháng trx sau thời gian ủ 8 giờ (A, B) và 24 giờ (C). P. Mẫu protein ở pha không tan; R1, R2. Tương ứng là mẫu protein sau khi biến tính và hồi tính bằng đệm chứa guanidine với việc thay đổi đệm khi thẩm tích nhiều lần hay 1 lần; M. thang protein chuẩn.

KẾT LUẬN

Tóm lại, chúng tôi đã biểu hiện và tái cấu trúc được enterokinase có hoạt tính trong điều kiện biến tính với guanidine 6 M và được hồi tính với các đệm oxi hóa và khử phù hợp. Kết quả này là cơ sở cho nghiên cứu chế tạo enzyme enterokinase sử dụng cho mục đích cắt các protein tái tổ hợp khỏi dạng dung hợp với thioredoxin trong vector pET32.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng nguồn kinh phí của đề tài cấp cơ sở “Nghiên cứu biểu hiện enterokinase tái tổ hợp trong *Escherichia coli*”, Mã số: CS18-17 của Viện Công nghệ sinh học năm 2018 và sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chun H, Joo K, Lee J, Shin HC (2011) Design and efficient production of bovine enterokinase light chain with higher specificity in *E. coli*. *Biotechnol Lett* 33(6): 1227-1232.
- Collins-Racie LA, McColgan JM, Grant KL, Diblasio-Smith EA, McCoy JM, Lavallie ER (1995) Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner dsba. *Bio/Technology* 13(9): 982-987.
- Gasparian ME, Ostapchenko VG, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP (2006) Biochemical characterization of human enteropeptidase light chain. *Biochem* 71(2): 113-119.
- Gasparian ME, Ostapchenko VG, Schulga AA, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP (2003) Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*.

Protein Expr Purif 31(1): 133-139.

Đặng Thị Ngọc Hà, Lê Thị Thu Hồng, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải (2017) Nghiên cứu lựa chọn điều kiện biểu hiện kháng thể đơn chuỗi tái tổ hợp nhận biết kháng nguyên nhóm máu A trong chủng *Escherichia coli*. *Tạp chí Sinh học* 39(2): 191-198.

Hermon Taylor J, Perrin J, Grant DAW, Appleyard A, Bubel M, Magee AI (1977) Immunofluorescent localisation of enterokinase in human small intestine. *Gut* 18(4): 259-265.

Huang L, Ruan H, Gu W, Xu Z, Cen P, Fan L (2007) Functional expression and purification of bovine enterokinase light chain in recombinant *Escherichia coli*. *Prep Biochem Biotechnol* 37(3): 205217.

Kitamoto Y, Yuan X, Wu Q, McCourt DW, Sadler JE (1994) Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(16): 7588-7592.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Melicherová K, Krahulec J, Šafránek M, Lišková V, Hopková D, Szélieová D, Turňa J (2017) Optimization of the fermentation and downstream processes for human enterokinase production in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101(5): 1927-1934.

Niu L-X, Li J-Y, Ji X-X, Yang B-S (2015) Efficient expression and purification of recombinant human enteropeptidase light chain in *Escherichia coli*. *Brazilian Arch Biol Technol* 58(2): 216-221.

Peng L, Zhong X, Ou J, Zheng S, Liao J, Wang L, Xu A (2004) High-level secretory production of recombinant bovine enterokinase light chain by *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 108(2): 185-192.

Pepeliaev S, Krahulec J, Černý Z, Jílková J, Tlustá M,

Dostálová J (2011) High level expression of human enteropeptidase light chain in *Pichia pastoris*. *J Biotechnol* 156(1): 67-75.

Nguyễn Thị Mai Phương, Trịnh Thị Thu Hiền, Lê Thị Thu Hồng, Trương Nam Hải, Đỗ Thị Huyền (2018) Nghiên cứu biểu hiện enterokinase tái tổ hợp dung hợp với thioredoxin trong *Escherichia coli*. *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc 2018*: 114-119.

Sadler JE (2013) Chapter 586 - Enteropeptidase. In *Handbook of Proteolytic Enzymes*: 2648-2653.

Skala W, Goettig P, Brandstetter H (2013) Do-it-yourself histidine-tagged bovine enterokinase: A handy member of the protein engineer's toolbox. *J Biotechnol* 168(4): 421-425.

Smith ET, Johnson DA (2013) Human enteropeptidase light chain: Bioengineering of recombinants and kinetic investigations of structure and function. *Protein Sci* 22(5): 577-585.

Tan H, Wang J, Zhao ZK (2007) Purification and refolding optimization of recombinant bovine enterokinase light chain overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 56(1): 40-47.

Voza LA, Wittwer L, Higgins DR, Purcell TJ, Bergseid M, Collins-Racie LA, LaVallie ER, Hoeffler JP (1996) Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology NY* 14(1): 77-81.

Woldicke HF, Zhang X, Liu Y, Weiwei T (2013) Modified enterokinase light chain. *WO 2013/092855 A1*.

Yuan L-D, Hua Z-C (2002) Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 25(2): 300-304.

Zheng XL, Kitamoto Y, Sadler JE (2009) Enteropeptidase, a type II transmembrane serine protease. *Front Biosci (Elite Ed)*: 242-249.

FORMING ACTIVE RECOMBINANT ENTEROKINASE EXPRESSED IN *ESCHERICHIA COLI*

Le Thi Thu Hong^{1,2}, Luong Kim Phuong^{1,3}, Trinh Thi Thu Hien¹, Nguyen Thi Mai Phuong¹,
Truong Nam Hai^{1,2}, Do Thi Huyen^{1,2}

¹*Institute of Biotechnology (IBT), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

²*Graduate University of Science and Technology (GUST), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

³*University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam*

SUMMARY

Enterokinase is a serine protease commonly used in some biotechnology researches. For these purposes, the light chain containing enterokinase activity has usually been expressed as recombinant protein in different expression systems because natural enterokinase extraction is often ineffective. In this study, we examined the formation of recombinant enterokinase expressed in *Escherichia coli* with biological activity. The thioredoxin-enterokinase (trx-ent) fusion protein was autocleaved into thioredoxin and enterokinase when expressed under insoluble form, denatured with guanidine and then refolded with suitable oxidation and reduction steps. Meanwhile, soluble expression as well as insoluble form denatured by urea had not enzymatic activity. Denaturant solution of 6 M guanidine along with the re-folding conditions in oxidized glutathione oxidation buffers followed by the reduced glutathione buffer with arginine was applied to produce trx-ent protein capable of self-cleavage. The recombinant light-chain enterokinase protein had a size of about 35 kDa on the Tris-glycine gel. Initial assessment on substance had shown that enterokinase was capable of cleaving thioredoxin-sumoprotease into thioredoxin and sumoprotease. This result provides the base for the production of active recombinant enterokinase to be used in recombinant protein expression technology.

Keywords: autocleavage, enterokinase, *E. coli*, fusion protein, recombinant