

NGHIÊN CỨU TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH CỦA ENTEROKINASE TÁI TỔ HỢP

Lương Kim Phượng^{1,3}, Đỗ Thị Huyền^{1,2,✉}, Lê Thị Thu Hồng^{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: 21.11.2020

Ngày nhận đăng: 26.5.2021

TÓM TẮT

Enterokinase là một serine protease trong đó chuỗi nhẹ chứa vùng xúc tác có khả năng nhận biết và cắt đặc hiệu đoạn trình tự peptide nên thường được ứng dụng nhiều nhất trong nghiên cứu để cắt đoạn protein dung hợp trong chuỗi polypeptide giải phóng protein đích. Trong công bố trước, vùng xúc tác của enterokinase đã được biểu hiện dưới dạng dung hợp với thioredoxin (Trx) để tạo protein lai Trx-Ent. Protein Trx-Ent ở pha không tan đã bước đầu được tái cấu trúc tạo enzyme có hoạt tính tự cắt khỏi Trx để giải phóng Ent hoàn thiện. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả nghiên cứu tinh chế và đánh giá hoạt tính của enterokinase chuỗi nhẹ tái tổ hợp. Protein pha không tan đã được tái cấu trúc với phương pháp biến tính bằng guanidin và được tái cuộn gấp trong các đệm phù hợp. Mẫu enterokinase sau đó đã được tinh chế bỏ Trx và dạng dung hợp bằng tua phân đoạn ethanol ở nồng độ 20%. Enterokinase sau tinh chế có độ tinh sạch 82%, hàm lượng là 15,6 mg trong 1 lit lên men với hiệu suất thu hồi đạt 8,2%. Kết quả xác định hoạt tính enterokinase sử dụng cơ chất là protein dung hợp Trx-FliC đạt là 230 unit/ μ g, giá trị này tính tương đương với hoạt tính enterokinase của hãng Invitrogen. Kết quả này là cơ sở để ứng dụng enterokinase tái tổ hợp này trong nghiên cứu sản xuất protein tái tổ hợp.

Từ khoá: cơ chất Trx-Flic, enterokinase, hoạt tính, tinh chế, tái tổ hợp

MỞ ĐẦU

Enterokinase là một trong những protease được lựa chọn cho cắt các protein được tổng hợp ở dạng dung hợp với một protein khác phía đầu N. Đây là enzyme nhận biết đặc hiệu trình tự peptide gồm 5 amino acid (Asp-Asp-Asp-Lys-X) và phân cắt tại vị trí carboxyl của lysine. Sự phân cắt ở các góc khác nhau như ở mức rất thấp, tùy thuộc vào cấu tạo của protein (Young *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2001). 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 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 trong các đơn vị pro- và xúc tác của enzyme. Dạng trưởng thành của enterokinase là một serine protease (EC 3.4.21.9) bao gồm 2 chuỗi polypeptide liên kết với nhau bằng một cầu disulfide,

trong đó chuỗi nặng có kích thước khoảng 82–140 kDa, có chức năng neo giữ enterokinase vào màng ngoài ruột non và chuỗi nhẹ có kích thước 35–62 kDa chứa đơn vị xúc tác. Enzyme này có thể hoạt động ở dải nhiệt độ 4–45°C và phổ pH dao động trong khoảng 4,5–9,5. Như vậy, enterokinase được xem là một công cụ hiệu quả và được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu hóa sinh và công nghệ sinh học (Gasparian *et al.*, 2006).

Việc tách chiết enterokinase tự nhiên thường bị hạn chế do giá thành cao và thường nhiễm các protease khác có khả năng phân cắt 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* (Niu *et al.*, 2015; Skala *et al.*, 2013; Chun *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2007; Gasparian *et al.*, 2006; Yuan, Hua 2002; Collins-Racie *et al.*, 1995;

Kitamoto *et al.*, 1994) và trong nấm men (Melicherová *et al.*, 2017; Smith, Johnson 2013; Pepeliaev *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2004). Tuy nhiên, enzyme tái tổ hợp thường được biểu hiện và khả năng thu protein ở mức độ rất thấp. Trong công trình trước, chúng tôi đã thông báo kết quả nghiên cứu tạo enterokinase trong *E. coli* dưới dạng dung hợp với thioredoxin (TrxEnt). Kết quả đánh giá hoạt tính ban đầu cho thấy enterokinase tái tổ hợp có hoạt tính sinh học khi được biểu hiện dạng không tan kết hợp với tái cuộn gấp protein (Lê Thị Thu Hồng *et al.*, 2020). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thông báo kết quả tinh chế enterokinase tái tổ hợp và đánh giá hoạt tính trên các cơ chất protein tái tổ hợp dung hợp với trx.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng *E. coli* BL21 Rosetta (Invitrogen, Mỹ) mang plasmid pET32a(+)/ent dùng để biểu hiện enterokinase dạng lai Trx-Ent (Nguyễn Thị Mai Phượng *et al.*, 2018).

Hóa chất sử dụng cho nghiên cứu APS, TEMED, glucose, glycerol, glycine, ethanol, tryptone, yeast extract, meat extract, SDS, Tris, acrylamide, bis-acrylamide, agar, agarose, coomassie brilliant blue (Merck, Đức); kháng sinh ampicilin, oxidized glutathione (GSH), reduced glutathione (GSSG) (Sigma, Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Tái gấp cuộn và tinh chế enterokinase tái tổ hợp

Mẫu protein Trx-Ent ở dạng không tan này được nghiên cứu tinh chế tái gấp cuộn theo phương pháp được mô tả trong nghiên cứu của Lê Thị Thu Hồng và cộng sự (2020). Về cơ bản, mẫu protein ở 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) và 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 để phân cắt protein dung hợp thành enterokinase và thioredoxin.

Tinh chế enterokinase tái tổ hợp

Mẫu protein được tinh sạch bằng phương pháp tủa với ethanol hoặc (NH₄)₂SO₄ bão hòa. Mẫu protein sau tái cấu trúc được tủa phân đoạn với ethanol hoặc (NH₄)₂SO₄ bão hòa trong điều kiện lạnh. Về cơ bản, mẫu protein sau tái cấu trúc được bổ sung ethanol đạt nồng độ cuối cùng là 10% sau đó ủ 1 giờ và ly tâm 12000 v/p trong 10 phút, tách pha tan và pha tủa. Pha tan này tiếp tục được bổ sung ethanol để đạt nồng độ 20 % rồi tiếp tục thực hiện như các bước ở trên cho đến khi nồng độ ethanol đạt 50 %. Các pha tan và tủa đều được kiểm tra bằng điện di và đánh giá hoạt tính. Tương tự, mẫu cũng được tủa với (NH₄)₂SO₄ bão hòa ở các nồng độ từ 30 % đến 70 %.

Xác định hoạt tính của enterokinase tái tổ hợp

Cơ chất sử dụng cho phản ứng enzyme là protein dung hợp thioredoxin với flagellin FliC của *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Trx-FliC) tái tổ hợp đã được biểu hiện trong *E. coli* (Đỗ Thị Huyền *et al.*, 2008, 2009). Lượng enzyme khác nhau với các lượng cơ chất khác nhau được thực hiện trong phản cắt với tổng thể tích 10 µL đệm chứa Tris-HCl 100 mM pH 8, CaCl₂ 1 mM và thử nghiệm với các điều kiện phản ứng khác nhau. Sản phẩm của phản ứng cắt được kiểm tra bằng SDS-PAGE (Laemmli 1970). Nồng độ protein được xác định bằng phương pháp Bradford (Bradford 1976).

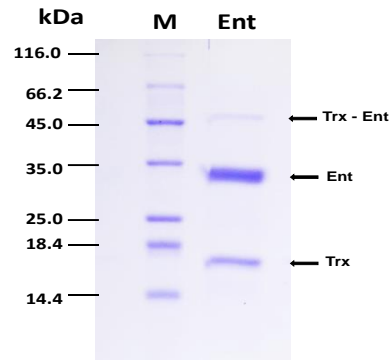
KẾT QUẢ

Tinh chế enterokinase tái tổ hợp

Protein dung hợp Trx-Ent được phá vỡ cấu trúc bậc 3, bậc 4 bằng phương pháp biến tính với guanidine 6 M và tái cấu trúc với các đệm oxi hóa khử như đã trình bày trong phần phương pháp. Kết quả cho thấy trong 1 lít dịch lên men, thu mẫu sau 5 giờ cảm ứng với OD₆₀₀ đạt được là 4,5, hàm lượng protein không tan là 275 mg. Sau quá trình tái cấu trúc, Trx-Ent thu được là 160 mg, hiệu suất thu hồi đạt được 58% (Bảng 1, Hình 1).

Enzyme tái tổ hợp sau khi được tái gấp cuộn được tiếp tục tinh sạch theo các phương pháp tinh sạch bằng tủa ethanol hoặc (NH₄)₂SO₄ bão hòa. Với tủa phân đoạn bằng (NH₄)₂SO₄, enterokinase đã được phân tách tốt hơn nhưng

vẫn lẫn nhiều Trx (Hình 2A). Với tủa bằng ethanol, các protein trong mẫu đã được phân tách ra theo nồng độ ethanol. Enterokinase được tủa tập trung chủ yếu ở nồng độ ethanol 10% và 20%, còn protein Trx được tủa ở nồng độ ethanol cao hơn từ khoảng 50% (Hình 2B). Do đó, chúng tôi lựa chọn phương pháp tủa phân đoạn bằng ethanol để tinh sạch protein enterokinase tái tổ hợp. Hàm lượng enterokinase tinh sạch thu được là 15,6 mg trong 1 lit dịch nuôi cấy. Như vậy, hiệu suất thu hồi enterokinase sau quá trình tinh chế là 8,2%. Bằng sử dụng phần mềm Quantity one để xác định độ sạch tương đối cho thấy mẫu enterokinase tinh sạch có độ sạch khoảng 82%.

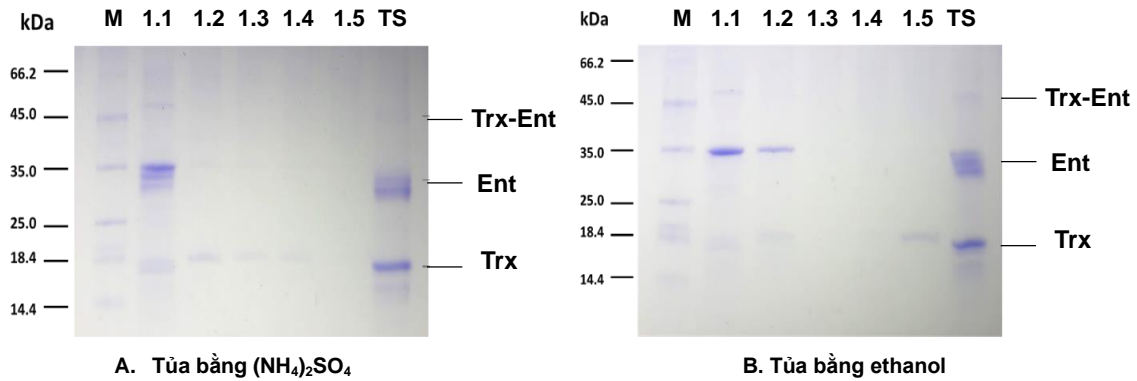


Hình 1. Tách chiết và tái cấu trúc protein enterokinase. Ent: Mẫu protein sau khi tái cấu trúc, M: thang protein chuẩn

Bảng 1. Hàm lượng protein tái tổ hợp thu được qua các bước tái cấu trúc enterokinase.

TT	Bước tách chiết protein	Hàm lượng protein mg*	Hiệu quả thu hồi (%)
1	Protein không tan hòa guanidin 6 M	275	100
2	Protein được oxi hóa	256	93
3	Trx-enterokinase sau refolding	248	90
4	Enterokinase tự cắt khỏi Trx sau bước thẩm tích	160	58

*Ghi chú: hàm lượng protein được tính theo 1 lit dịch lên men



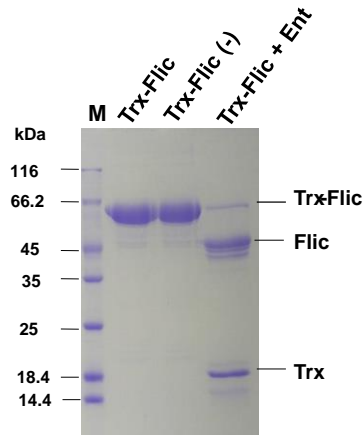
Hình 2. Tinh chế enterokinase bằng phương pháp tủa phân đoạn bằng $(NH_4)_2SO_4$ hoặc ethanol. Mẫu enterokinase sau quá trình tái cấu trúc được tủa phân đoạn với $(NH_4)_2SO_4$ theo các nồng độ tăng dần từ 30% đến 70% của $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa (A) và với ethanol theo các nồng độ tăng dần từ 10% đến 50% (B). Đường chạy 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5: tương ứng với mẫu được tủa với các nồng độ tăng dần của từ 30% đến 70% của $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa (hoặc ethanol từ 10% đến 50%); TS. Mẫu được tủa trực tiếp 70% $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa hoặc 50% ethanol tương ứng; M: thang protein chuẩn.

Đánh giá hoạt tính của enterokinase tái tổ hợp trên cơ chất Trx-FliC

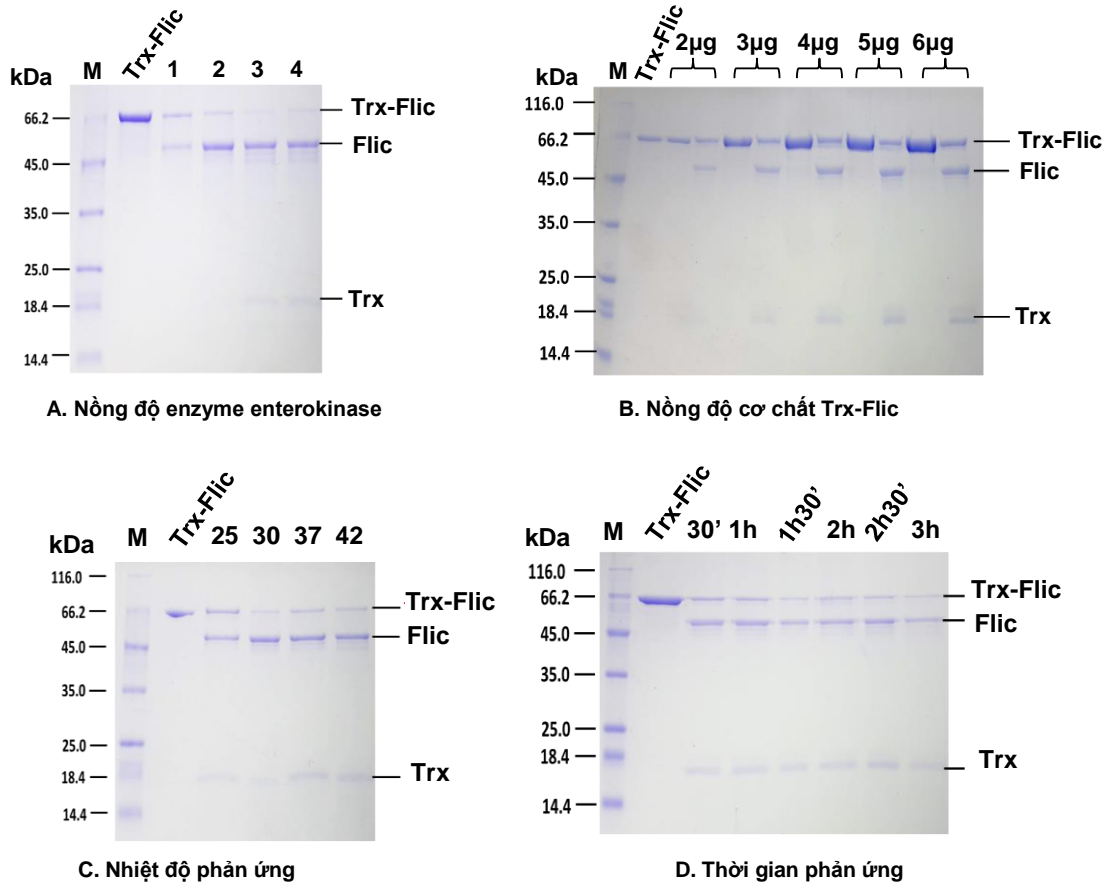
Để đánh giá hoạt tính enzyme, ngoài sử dụng cơ chất đặc hiệu của enzyme enterokinase là Gly-Asp-Asp-Asp-Lys- β -naphthylamide (GD4K-na) các nghiên cứu còn sử dụng một số cơ chất khác. Điển hình là cơ chất thioredoxin-human interleukin-13 (Trx/hIL-13) và thioredoxin-human epidermal growth factor (Trx/hEGF) (Gasparian *et al.*, 2003)

hay FLAGTM-Bacterial alkaline phosphatase fusion protein (FLAG-BAP) (Sigma).

Hoạt tính của enterokinase tái tổ hợp trong nghiên cứu này được kiểm tra trên cơ chất protein tái tổ hợp dung hợp Trx – FliC. Những đánh giá ban đầu khi sử dụng 30 ng enzyme và 7 μ g Trx – FliC cho thấy rằng enzyme enterokinase tái tổ hợp thể hiện hoạt tính cắt tốt với Trx – FliC (Hình 3).



Hình 3. Kiểm tra khả năng cắt của enterokinase tái tổ hợp với cơ chất Trx-FliC. Trx-flic: mẫu protein cơ chất Trx-flic gốc ban đầu; Trx-flic (-): mẫu protein cơ chất Trx-flic ù phản ứng nhưng không bổ sung enzyme enterokinase tái tổ hợp; Trx-flic + Ent: mẫu Trx-flic được cắt với enterokinase tái tổ hợp; M: thang protein chuẩn.



Hình 4. Kiểm tra các điều kiện phản ứng của enzyme enterokinase tái tổ hợp. (A). Phản ứng cắt của Trx-FliC với các nồng độ enterokinase tái tổ hợp khác nhau. 1, 2, 3, 4 tương ứng với các hàm lượng enzyme từ 5 ng, 10 ng, 15 ng và 20 ng. (B). Phản ứng cắt của enterokinase tái tổ hợp với các hàm lượng Trx – FliC khác nhau. Các đường chạy lần lượt là đối chứng với hàm lượng cơ chất Trx-FliC từ 2 μg đến 6 μg và Trx-FliC có bổ sung enterokinase 15 ng, tương ứng; (C). Phản ứng Trx-FliC với enterokinase ở các nhiệt độ lần lượt là 25°C, 30°C, 37°C, 42°C; (D). Xác định thời gian phản ứng từ 30 phút đến 3 giờ.

Từ kết quả này, các điều kiện cho phản ứng enzyme đó là hàm lượng enzyme, nồng độ cơ chất, điều kiện nhiệt độ và thời gian thích hợp đối với enzyme đã được xác định. Với cùng một hàm lượng cơ chất Trx-FliC là 3,5 μg , các lượng enzyme enterokinase khác nhau từ 5 ng đến 20 ng được sử dụng. Kết quả cho thấy, với hàm lượng enzyme 15 ng đã cắt gần hoàn toàn 3,5 μg cơ chất (Đường chạy 3, Hình 4A). Như vậy, lượng enzyme 15 ng được sử dụng để nghiên cứu xác định hàm lượng cơ chất. Với cơ chất sử dụng từ 2 μg đến 6 μg , kết quả kiểm tra cho thấy với lượng cơ chất 2 và 3 μg được cắt hết đến 4 μg thì lượng cơ chất đã bị dư so với lượng enzyme (Hình 4B). Trong khoảng nhiệt độ từ 37 °C, 42 °C, hoạt tính enzyme thể hiện tương đương nhau thể hiện ở băng Trx được tạo ra tương tự nhau và ở 25 °C, 30 °C hoạt tính enzyme thấp hơn, băng Trx được tạo ra mờ hơn so với nhiệt độ 37 °C và 42 °C. Như vậy, nhiệt độ 37 °C là phù hợp cho phản ứng enzyme enterokinase tái tổ hợp (Hình 4C). Với các điều kiện nồng độ enzyme, cơ chất và nhiệt độ đã được lựa chọn, chúng tôi xác định thời gian cho phản ứng enzyme. Thời gian phản ứng enzyme được khảo sát là từ 30 phút đến 3 giờ. Kết quả cho thấy từ sau 1 giờ 30 phút thì cơ chất gần như đã được cắt hoàn toàn (Hình 4D).

Dựa theo định nghĩa đơn vị hoạt tính enzyme enterokinase của hãng Sigma (một đơn vị hoạt tính được định nghĩa là lượng enterokinase có khả năng phân cắt trên 95% 1 μg cơ chất protein dung hợp tinh sạch FLAG-BAP trong 18 giờ ở 37 °C). Ở đây chúng tôi xác định 1 đơn vị enzyme enterokinase tái tổ hợp là lượng enzyme cần thiết để cắt trên 95% 1 μg cơ chất protein dung hợp tinh sạch Trx-Flic trong 3 giờ ở 37 °C.

Trong phản ứng 15 ng enzyme thì cắt được 3,5 μg cơ chất. Do đó, để cắt được 1 μg cơ chất Trx-Flic cần 4,3 ng protein enterokinase tái tổ hợp tương đương với 1 đơn vị hoạt tính của enzyme. Theo đó, 1 μg có 230 đơn vị enzyme. Như vậy, chúng tôi đã xác định được hoạt tính enterokinase tái tổ hợp là 230 unit/ μg .

THẢO LUẬN

E. coli là hệ biểu hiện thường được biểu hiện các protein ngoại lai do có nhiều ưu điểm như dễ dàng trong thao tác, môi trường nuôi cấy đơn giản, rẻ tiền, có thể sản xuất được lượng lớn protein ngoại lai, đã được nghiên cứu khá kỹ về đặc tính di truyền. Có khoảng 30% các được phẩm sinh học, 50% các

protein thương mại và hơn 70% các protein sử dụng cho nghiên cứu được sản xuất trong *E. coli* (Bill, 2014). Tuy nhiên, hệ biểu hiện này cũng bộc lộ những hạn chế đối với biểu hiện protein có nguồn gốc từ các tế bào nhân chuẩn cần có những biến đổi sau dịch mã như là quá trình glycosyl hóa, quá trình hình thành đúng cầu disulfide (Rosano, Ceccarelli, 2014). Hầu hết các protein giàu cầu disulfide thường khó để hình thành cầu disulfide trong *E. coli* do trong tế bào chất của vi khuẩn là môi trường khử. Đối với nhiều protein tái tổ hợp, sự hình thành cầu disulfide đúng là quan trọng để đảm bảo cấu trúc bậc ba có hoạt tính sinh học. Việc tạo ra các liên kết disulfide sai có thể dẫn đến cuộn gập của protein không chính xác và tạo ra sự kết cụm của protein dẫn đến hình thành protein thể vùi. Do đó, một trong những hướng giải quyết vấn đề này là cần tổng hợp các protein này trong tế bào *E. coli* dạng không tan sau đó sẽ được tái cấu trúc nhân tạo trong các điều kiện cũng như nồng độ các chất phù hợp để tạo ra được protein có hoạt tính sinh học.

Nghiên cứu của Gasparian và cộng sự thấy rằng enterokinase biểu hiện dung hợp ở dạng tan nhưng không có khả năng tự phân cắt và phần không tan có hoạt tính sau quá trình tái cấu trúc (Gasparian *et al.*, 2003). Tan và cộng sự cũng đã biểu hiện enterokinase dạng dung hợp với GST trong *E. coli*. Protein dung hợp được tạo ra ở dạng không tan, tiếp theo được biến tính bằng urea rồi được tái cấu trúc và protein sau đó có khả năng tự phân cắt (Tan *et al.*, 2007). Gần đây, Skala và cộng sự cũng thông báo tái cấu trúc của enterokinase (Skala *et al.*, 2013). Nhìn chung, các phương pháp tinh chế và tái cấu trúc protein dạng không tan dựa theo các bước chính như sau: đầu tiên, protein tái tổ hợp dạng không tan được hòa tan trong đệm có chứa các chất biến tính nồng độ cao như là 6 M guanidine, 6M-8M urea, các chất tẩy rửa khác như là SDS, CTAC, CTAB, N-lauroylsarcosine hay là đệm có pH phân cực mạnh cũng như bổ sung tác nhân khử trong đệm hòa tan như là DTT hay cysteine,...; tiếp theo là lựa chọn chiến lược tái cấu trúc phù hợp đối với mỗi loại protein trong đó có thể hòa loãng mẫu hay thêm tích mẫu có bổ sung các hệ đệm oxi hóa khử như là chất oxi hóa và chất khử của glutathione, DTT, hệ cystamine/cysteamine, cystein/cystine, di β -hydroxyethyl disulfide/2-mercaptoethanol; Cu^{2+} , các hóa chất liên quan đến hình thành S-sulfonation. Ngoài ra, đệm tái cấu trúc cũng có thể được bổ sung các chất tăng cường cấu trúc tự nhiên của protein hoặc hạn chế sự kết cụm của protein như là L-arginine, glycine, sucrose hoặc glycerol, N-lauroylsarcosine, CHAPS, lauryl-maltoside, PEG 3500.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy sau khi tái cấu trúc và tinh chế bằng tủa phân đoạn với ethanol 20% thì lượng mẫu enterokinase thu được là 15,6 mg protein enterokinase được tinh sạch từ 1 lit dịch nuôi cấy. Như vậy, hiệu suất thu hồi enterokinase sau quá trình tinh chế là 8,2%. Cho đến nay, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng mặc dù mức độ biểu hiện của enzyme này cao trong *E. coli* tuy nhiên hiệu quả thu hồi sau tinh chế là thấp. Theo nghiên cứu của Gasparian và cộng sự, hiệu quả thu hồi đạt được là 2% tương đương với 10 mg protein enterokinase thu được trong 1 lit dịch nuôi cấy (Gasparian *et al.*, 2003). Nghiên cứu của Simeonov và cộng sự cho thấy hiệu quả thu hồi cũng chỉ đạt 3% và thu được 9 mg enzyme trên 1 lit lên men (Simeonov *et al.*, 2011). Sự khác nhau về hiệu suất thu hồi chủ yếu do việc sử dụng các phương pháp tinh chế khác nhau để thu enterokinase sau khi enterokinase được cắt ra khỏi protein dung hợp Trx-ent. Protein thu được bằng tinh sạch qua cột ít hơn bằng tủa phân đoạn.

Đối với việc đánh giá hoạt tính enterokinase, từ các kết quả nghiên cứu đạt được, chúng tôi đã tính số mole phân tử cơ chất để so sánh hoạt tính của enzyme của nghiên cứu này với các nghiên cứu khác. Kích thước phân tử của Trx-Flic là 66 kDa như vậy 1 μ g cơ chất này tương ứng với 15,15 pmol. Theo cách so sánh này thì hoạt tính riêng của enzyme enterokinase trong nghiên cứu thấp hơn 4,82 lần so với hoạt tính riêng trong nghiên cứu của Gasparian và cộng sự nghiên cứu trên cơ chất Trx/hIL13 và Trx/hEGF (Gasparian *et al.*, 2003). Trong nghiên cứu đó, các tác giả cũng đã so sánh hoạt tính enterokinase của họ tạo ra và enterokinase của hãng Invitrogen trên cơ chất Trx/hEGF, kết quả cho thấy enzyme của hãng Invitrogen có hoạt tính thấp hơn 5 lần. Như vậy, enterokinase của chúng tôi có hoạt tính tương đương với enterokinase của hãng Invitrogen.

KẾT LUẬN

Enterokinase tái tổ hợp đã được tinh chế từ tế bào *E. coli*. Trong 1 lit dịch lên men, hàm lượng enterokinase thu được là 15,6 mg với hiệu suất thu hồi 8,2%. Enterokinase tái tổ hợp thu được có độ tinh sạch là 82%. Hoạt tính của enterokinase với cơ chất là protein dung hợp Trx-Flic đạt 230 unit/ μ g.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng nguồn kinh phí của đề tài cấp cơ sở “Nghiên cứu tinh chế và xác định hoạt tính của enterokinase tái tổ hợp”, Mã số:

CS19-17 của Viện Công nghệ sinh học năm 2019 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

- Bill RM (2014) Playing catch-up with escherichia coli: Using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Front Microbiol* 5(85): 1–5.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Choi S II, Song HW, Moon JW, Seong BL (2001) Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: Expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. *Biotechnol Bioeng* 75(6): 718–724.
- 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.
- Đỗ Thị Huyền, Lê Quỳnh Giang, Trần Ngọc Tân, Văn Thị Như Ngọc, Nguyễn Thị Trung, Sven-Olof Enfors, Tô Long Thành, Trương Nam Hải (2009) Nghiên cứu sản xuất kháng nguyên bằng chủng *E. coli* tái tổ hợp để chế vaccine dưới đơn vị phòng Salmonella cho gà. *Hội nghị Quốc Gia về sinh vật biến đổi gen và quản lý an toàn sinh học*: 29-37.
- Đỗ Thị Huyền, Lê Quỳnh Giang, Văn Thị Như Ngọc, Tô Long Thành, Trương Nam Hải (2008) Protein FliC của *Salmonella Typhimurium* biểu hiện mạnh trong *E. coli* dưới dạng dung hợp với Thioredoxin. *Tạp Chí Khoa học và Công nghệ* 46(2): 49-57.
- Gasparian ME, Ostapchenko VG, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP (2006) Biochemical characterization of human enteropeptidase light chain. *Biochem Mosc* 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.
- Lê Thị Thu Hồng, Lương Kim Phượng, Trịnh Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Mai Phương, Trương Nam Hải, Đỗ Thị Huyền (2020) Nghiên cứu tạo enterokinase tái tổ hợp có hoạt tính được biểu hiện trong *E. coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 18(3): 611-618.

- 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): 205-217.
- 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 U S A* 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.
- Mukhopadhyay A (1997) Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 56: 61-109.
- Niu LX, Li JY, Ji XX, Yang BS (2015) Efficient expression and purification of recombinant human enteropeptidase light chain in *Escherichia coli*. *Braz 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.
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol* 5(172): 1-17.
- Simeonov P, Berger-Hoffmann R, Hoffmann R, Sträter N, Zuchner T (2011) Surface supercharged human enteropeptidase light chain shows improved solubility and refolding yield. *Protein Eng Des Sel* 24(3): 161-168.
- 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.
- Vozza 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*. *Biotechnol Nat Publ Co* 14(1): 77-81.
- Young CL, Britton ZT, Robinson AS (2012) Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol J* 7(5): 620-634.
- Yuan LD, Hua ZC (2002) Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 25(2): 300-304.

PURIFICATION AND DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF A RECOMBINANT ENTEROKINASE

Luong Kim Phuong^{1,3}, Do Thi Huyen^{1,2}, Le Thi Thu Hong^{1,2}

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

³*Hanoi University of Science, Vietnam National University*

SUMMARY

Enterokinase is a serine protease in which the light chain containing catalytic domain plays a role for recognition and digestion of a specific peptide of tetra-amino acids. Thus, it has been commonly used in biotechnology to cleave a fusion partner in chimeric protein for releasing target protein. In previous publication, the light chain of enterokinase was expressed in fusion form with thioredoxin to generate chimeric protein Trx-ent. The insoluble Trx-ent was primarily refolded for biological activity of auto-digestion to release enterokinase. In this study, we purified and examined biological activity of light chain recombinant

enterokinase. The Trx-ent was refolded in process with denaturation in guanidin and then suitable buffers. Subsequently, the enterokinase was purified by fractionation with ethanol precipitation at concentration of 20% to achieve purity of 82%. The content of enterokinase obtained was 15.6 mg in 1 liter of fermentation and thus the recovery efficiency reached 8.2%. The activity of the recombinant enterokinase using Trx-FliC fusion protein as substrate was 230 units/ μg , equivalent to the enterokinase activity of Invitrogen. This result is potential for application of the recombinant enterokinase in recombinant protein production.

Keywords: substrateTrx-Flic, enterokinase, activity, purification, recombinant.