

## THIẾT KẾ PLASMID TÁI TỔ HỢP TỪ VECTOR BIỂU HIỆN PAC7 MANG GEN *ENTP* DUNG HỢP VỚI CÁC PHẦN ĐOẠN *BAAMYLF1* VÀ *BAAMYLF2* ĐỂ TỔNG HỢP ENTEROCIN P TRONG *BACILLUS SUBTILIS* 168

Nguyễn Thanh Nhân<sup>1</sup>, Phạm Thị Minh Đức<sup>2</sup>, Lê Thu Ngọc<sup>3</sup>, Lê Văn Trường<sup>1</sup>, Đỗ Thị Huyền<sup>1</sup>, Trần Ngọc Tân<sup>1</sup>, Phạm Thùy Linh<sup>4</sup>, Trương Nam Hải<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Bách Khoa Đà Nẵng

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>4</sup>Viện Hóa học

### TÓM TẮT

Với hoạt tính kháng khuẩn mạnh và phổ tác dụng rộng trên nhiều vi khuẩn gây bệnh như *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, enterocin P của chủng *Enterococcus faecium* P13 đã được sản xuất tái tổ hợp trong các hệ biểu hiện khác nhau như *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Lactococcus lactis*, *Methylobacterium extorquens*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi biểu hiện enterocin P của chủng *E. faecium* P13 trong vi khuẩn *Bacillus subtilis* 168, một trong những chủng biểu hiện đã được nghiên cứu kỹ, đảm bảo tính an toàn khi ứng dụng, và có khả năng tiết một lượng lớn protein ra môi trường nuôi cấy. Để tránh hiện tượng phân cắt peptide tái tổ hợp do tác động của protease của tế bào chủ, đoạn gen *entP* dài 132 bp được dung hợp với các phân đoạn gen *baamylF1* (~0,7 kb) và *baamylF2* (~1,0 kb) trước khi đưa vào vector pAC7 để tạo thành plasmid tái tổ hợp pAC-amyl1-entP và pAC-amyl2-entP. Các đoạn gen dung hợp *baamylF1-entP* và *baamylF2-entP* sau khi tích hợp vào hệ gen của *B. subtilis* được biểu hiện trong môi trường LB bổ sung 10µg/ml kanamycin. Protein tái tổ hợp BaamylF1-Enterocin P và BaamylF2-Enterocin P thu được từ môi trường sau 24 h nuôi cấy được xử lý với 50% formic acid để phân cắt enterocin P khỏi dạng dung hợp. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn đối với các vi sinh vật chỉ thị là *S. aureus*, *B. cereus* cho thấy, enterocin P sau khi được phân cắt từ đoạn peptide dung hợp có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của các vi khuẩn này. Như vậy, enterocin P được biểu hiện ở dạng có hoạt tính sinh học trong chủng vi khuẩn *B. subtilis* 168, tuy nhiên, mức độ biểu hiện còn thấp.

**Từ khóa:** *Bacillus subtilis*, bacteriocin, enterocin P, pAC-amyl1-entP, pAC-amyl2-entP

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Hầu hết sinh vật trong tự nhiên đều có khả năng tổng hợp các đoạn peptide có hoạt tính kháng khuẩn nhằm bảo vệ cơ thể trước sự xâm nhập của vi khuẩn. Các đoạn peptide này khi được sản xuất ở vi khuẩn thì được gọi là bacteriocin. Trong khoảng ba thập niên gần đây, số lượng bacteriocin được phân lập từ vi khuẩn sinh lactic acid (lactic acid bacteria, LAB) ngày một tăng.

Dựa vào những thuộc tính chung, đặc biệt là cấu trúc, bacteriocin được phân loại thành 3 lớp (Klaenhammer, 1993). Lớp I gồm các đoạn peptide có kích thước nhỏ (< 5 kDa), bền nhiệt và có cải biến sau dịch mã để tạo thành thioether amino acid biến đổi như lanthionine, β-methylanthionine và các amino acid α, β chưa bão hòa như dehydroalanine và dehydrobutyrine, các đoạn peptide này còn được gọi là lantibiotic (Chatterjee *et al.*, 2005).

Lớp II gồm các đoạn peptide nhỏ (30 - 70 amino acid), bền nhiệt nhưng không bị cải biến sau dịch mã, và được chia thành 3 phân lớp, phân lớp IIa gồm các bacteriocin giống pediocin, có hoạt tính kháng *Listeria* mạnh, có tính tương đồng đạt khoảng 40 - 60% với đoạn trình tự peptide tương đối bảo thủ YGNGVXCXXXXCXV (còn gọi là hộp pediocin, pediocin box) với hai cysteine hình thành nên cầu nối disulfide ở đoạn peptide phía đầu N; phân lớp IIb gồm các bacteriocin hai thành phần, hoạt tính của bacteriocin IIb phụ thuộc vào hoạt động của hai chuỗi peptide, khả năng kháng khuẩn của từng đoạn peptide riêng lẻ rất thấp, gần như không có; phân lớp IIc gồm các bacteriocin dạng vòng, có phổ tác dụng tương đối rộng (Deegan *et al.*, 2005; Ennahar *et al.*, 1999).

Lớp III gồm các bacteriocin có kích thước lớn và không bền nhiệt, chẳng hạn như helveticin J và enterolysin A. Bacteriocin ức chế sự sinh trưởng

của vi khuẩn bằng cách đính vào thành tế bào hoặc màng sinh chất của vi khuẩn đích, ức chế sự sinh tổng hợp thành tế bào hoặc hình thành lỗ trên màng tế bào, dẫn đến sự rò rỉ các chất trong tế bào (Hécharđ *et al.*, 2002).

Trong số các LBA, Enterococci là vi khuẩn sinh lactic acid và nhiều loại bacteriocin khác nhau về tính đặc hiệu với sinh vật đích, cấu trúc, quá trình cải biến và cơ chế tiết. Enterocin P, được tổng hợp trong *Enterococcus faecium* P13, là một bacteriocin thuộc phân lớp IIa, ban đầu được tổng hợp ở dạng tiền peptide với 71 amino acid. Peptide tín hiệu sau khi bị cắt bỏ đã tạo ra enterocin P hoàn chỉnh với 44 amino acid. Peptide này được tiết ra ngoài bào bằng con đường vận chuyển phụ thuộc vào các yếu tố tiết (sec-dependent pathway) (Cintas *et al.*, 1997). Enterocin P có hoạt tính kháng khuẩn mạnh và phổ tác dụng rộng đối với nhiều vi khuẩn gram dương gây bệnh như *S. aureus* hay *B. cereus*. Enterocin P phá vỡ thể màng của tế bào, gắn với màng sinh chất của vi khuẩn đích và hình thành lỗ trên màng này, dẫn đến việc giải phóng các ion K<sup>+</sup> và mất cân bằng ion giữa môi trường trong và ngoài tế bào (Herranz *et al.*, 2001 a, b). Gen cấu trúc mã hóa cho enterocin P (*entP*) có mặt ở nhiều chủng thuộc chi *Enterococcus*.

Với khả năng ức chế mạnh các vi khuẩn gây bệnh thường có mặt trong thực phẩm, tính kháng nhiệt và khả năng giữ hoạt tính trong những điều kiện khắc nghiệt (pH 2 - 10, bảo quản ở nhiệt độ thấp), enterocin P có tiềm năng ứng dụng trong bảo quản nông sản thực phẩm (Cintas *et al.*, 1997). Tuy nhiên, *Enterococci* là tác nhân gây các bệnh nguy hiểm như nhiễm khuẩn máu, viêm van tim do có khả năng sống sót cao và lưu hành trong môi trường bệnh viện (nosocomial infection), chứa các yếu tố gây độc như haemolysin, hyaluronidase, gelatinase, và thường có tính trạng kháng kháng sinh nên khó ứng dụng để sản xuất enterocin P tự nhiên. Do đó, việc nghiên cứu sản xuất enterocin P theo con đường tái tổ hợp đã thu hút sự chú ý của các nhà khoa học.

Mức độ biểu hiện của enterocin P ngoại lai trong các hệ vi khuẩn như *E. coli*, *P. pastoris*, *L. lactis*, *M. extorquens* là không cao (Gutiérrez *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c; 2006). Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã biểu hiện enterocin P của chủng *E. faecium* P13 trong vi khuẩn *B. subtilis* 168. Hiện nay, vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp sản xuất enzyme, chất kháng sinh hay thuốc trừ sâu. Chủng biểu hiện *Bacillus* có nhiều ưu điểm như: (i) là chủng an toàn, không gây bệnh; (ii) có khả năng tiết một lượng lớn protein trực tiếp

vào môi trường nuôi cấy (g/l); (iii) trình tự hệ gen của *Bacillus* đã được giải mã; (iv) điều kiện nuôi cấy đơn giản và dễ thao tác (Harwood, 1992; Serrano-Heras, 2005). Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành tách dòng và biểu hiện gen *entP* trong vi khuẩn *B. subtilis* 168.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng vi sinh vật

Vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 $\Delta$  lac U169 ( $\phi$ 80 lacZM15)*] (Invitrogen) được sử dụng để tách dòng gen. Vi khuẩn *B. subtilis* 168 dùng để biểu hiện gen. Chủng *S. aureus*, *B. cereus* do PGS. TS. Nguyễn Thùy Châu, Viện Cơ điện nông nghiệp và Công nghệ sau thu hoạch cung cấp, được dùng làm sinh vật chỉ thị để đánh giá khả năng kháng khuẩn của enterocin P tái tổ hợp. Các đoạn mồi oligonucleotide sử dụng trong phản ứng khuếch đại gen (PCR) được đặt ở hãng Amersham Pharmacia Biotech.

### DNA và hệ vector

Vector pAC7 dùng để biểu hiện gen trong vi khuẩn *B. subtilis* 168. Đoạn gen *entP* dài 132 bp (Nguyễn Thanh Nhân *et al.*, 2009).

### Dung hợp gen *entP*, *baamyf1*, *baamyf2*

Đoạn gen *entP* dài 132 bp được khuếch đại bằng PCR từ khuôn là gen *entP* được tổng hợp bằng PCR tự mồi (Nguyễn Thanh Nhân *et al.*, 2009). Cặp mồi dùng để nhân gen có trình tự như sau:

entP-pastoris F2/*Xho*I: 5'- tcttctcgaggaccggctactctg-3';

entP-xynATermi.R/*Sac*I: 5'- gcggagctcgtagaaaa agagcatttttgaacaaaactcaaaaatacagagaaaacgaataattt taatgtccatacctgcca -3'.

Các phân đoạn *baamyf1*, *baamyf2* được tổng hợp bằng kỹ thuật PCR sử dụng khuôn là hệ gen của *B. amyloliquefaciens* và sử dụng cặp mồi đặc hiệu tương ứng:

AmyBA F1/*Bam*HI: 5'- agaggatccccgcacatacga aaagactg -3';

AmyBA R1/*Xho*I: 5'- tcttctcgagctgatt tctattgg ccggat -3'.

AmyBA F1/*Bam*HI: 5'- agaggatccccgcacatacga aagactg -3'.

AmyBA R2/*Xho*I: 5'- tcttctcgagctgaacccaatcag cagaa -3'.

Để nối gen *entP* vào đầu 3' của gen amylase phân đoạn 0,7 kb (gọi là *baamyf1*) và 1 kb (được gọi là *baamyf2*), sản phẩm PCR khuếch đại gen *entP* và gen *baamyf1*, *baamyf2* được cắt bằng enzyme *XhoI* và nối lại với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase để tạo thành đoạn gen dung hợp *baamyf1-entP* và *baamyf2-entP*.

### Thiết kế plasmid biểu hiện pAC-amyl1-entP và pAC-amyl2-entP và biểu hiện gen

Các đoạn gen dung hợp *baamyf1-entP* và *baamyf2-entP* thu được ở trên được đưa vào vector pAC7 bằng phản ứng ghép nhờ xúc tác của T4 DNA ligase. Sản phẩm ghép được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$  và chọn lọc trên đĩa LB chứa 100  $\mu$ g/ml ampicillin. Plasmid tách từ thể biến nạp được kiểm tra bằng PCR và đọc trình tự gen. Plasmid tái tổ hợp pAC-amyl1-entP và pAC-amyl2-entP sau khi được cắt mở vòng bằng *ScaI* được biến nạp vào tế bào *B. subtilis* 168 bằng phương pháp tự nhiên: tế bào *B. subtilis* 168 được nuôi cấy trong môi trường SPII (10 ml Tbase (1 l Tbase chứa 2 g (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ ; 18,3 g K $_2$ HPO $_4$ .3H $_2$ O; 6 g KH $_2$ PO $_4$ ; 1 g Tri-sodium citrate.2H $_2$ O); 0,2 ml glucose 25%; 0,1 ml Cazamino acid 1%; 0,1 ml cao nấm men 10%; 0,035 ml MgCl $_2$  1 M; 0,05 ml CaCl $_2$  0,1 M) qua đêm ở 37°C; sau đó pha loãng dịch nuôi cấy qua đêm bằng môi trường SPII đến khi OD $_{600}$  0,1 và nuôi tiếp ở 37°C trong vòng 3 h; tế bào từ 1 ml dịch nuôi cấy được thu lại bằng ly tâm, bỏ 0,9 ml dịch nổi, lắc nhẹ để làm tan tế bào; DNA plasmid đã được cắt bằng *ScaI* được trộn đều với tế bào và lắc tiếp ở 37°C trong 30 phút; bổ sung 0,5 ml môi trường LB và lắc tiếp ở 37°C trong khoảng 1 h. Sau đó, tế bào nuôi cấy được trải lên đĩa môi trường LB bổ sung 10  $\mu$ g/ml kanamycin (LBK).

Sự có mặt của đoạn gen *baamyf1-entP* và *baamyf2-entP* trong thể biến nạp được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu. Một khuẩn lạc

mang gen sau đó được nuôi cấy trong môi trường LBK ở 37°C qua đêm trong điều kiện lắc ở 200 vòng/phút. Dịch nuôi cấy qua đêm được chuyển sang môi trường LBK mới theo tỷ lệ 1:100 và lắc ở 37°C với tốc độ 200 vòng/phút. Sau 4 h, 24 h nuôi cấy, thu dịch nuôi cấy, ly tâm ở 6000 vòng/ phút trong 15 phút. Dịch môi trường thu được được giữ ở -20°C.

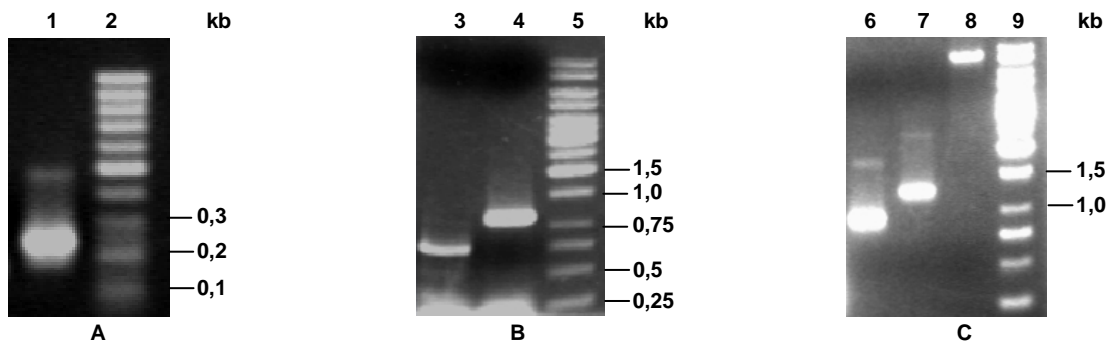
### Kiểm tra khả năng kháng khuẩn của EntP tái tổ hợp

Dịch nuôi cấy thu được từ chủng *B. subtilis* tái tổ hợp được tủa bằng 50% (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ , sau đó được ủ với 50% formic acid để phân cắt enterocin P khỏi dạng dung hợp. Sản phẩm cắt được sử dụng để kiểm tra khả năng kháng khuẩn của enterocin P tái tổ hợp. Hoạt tính kháng khuẩn của EntP tái tổ hợp được thử nghiệm theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Đĩa thạch sử dụng để thử hoạt tính được chuẩn bị bằng môi trường LB chứa 1,5% agar. Sau đó, 3 ml môi trường LB có nồng độ agar thấp 0,6% và chứa 10 $^4$  tế bào *S. aureus* hoặc *B. cereus* (vi sinh vật chỉ thị) được phủ lên bề mặt đĩa LB. Dịch protein tái tổ hợp được bổ sung vào giấy thấm đặt trên đĩa LB chứa vi sinh vật chỉ thị. Đĩa được ủ ở 4°C trong 2 h trước khi ủ ở 37°C qua đêm.

### KẾT QUẢ

#### Khuếch đại gen *entP*, *baamyf1*, *baamyf2*

Đoạn gen *entP* sau khi khuếch đại bằng kỹ thuật PCR được lai ghép với các phân đoạn của gen amylase, *baamyf1* và *baamyf2*, và đưa vào vector pAC7 như đã trình bày trong phần vật liệu và phương pháp. Sản phẩm PCR thu được là những đoạn DNA có kích thước đúng như tính toán (~0,2 kb), *baamyf1* (~0,7 kb), *baamyf2* (~1 kb), *baamyf1-entP* (~0,9 kb) và *baamyf2-entP* (~1,2 kb) được trình bày trong hình 1.



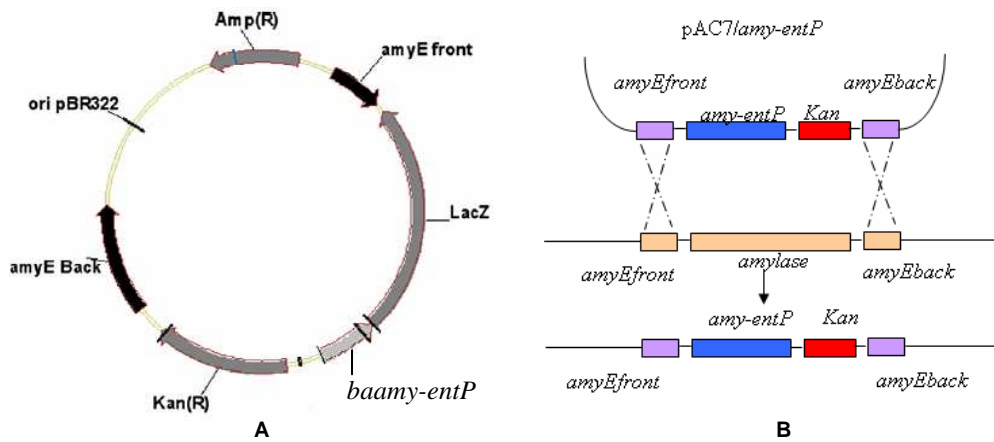
Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR trên gel 1% agarose. 1: *entP*; 2, 5, 9: Thang DNA chuẩn; 3: *baamyf1*; 4: *baamyf2*; 6: *baamyf1-entP*; 7: *baamyf2-entP*; 8: pCA7 cắt bằng *Bam*HI và *Sac*I.

**Thiết kế plasmid biểu hiện pAC7 mang *baamyF1-entP*, *baamyF2-entP***

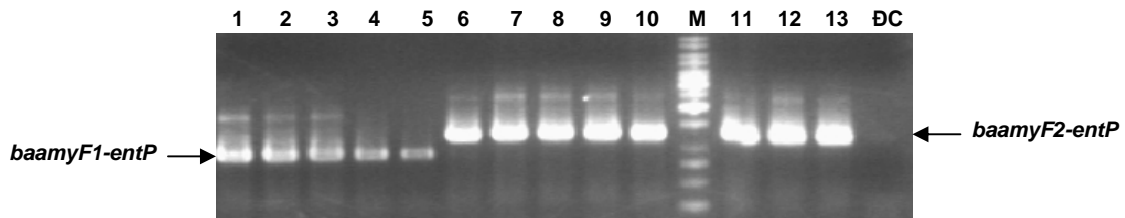
Sau khi được khuếch đại bằng PCR, các đoạn gen dung hợp được đưa vào vector pAC7 mở vòng bằng cặp enzyme hạn chế *Bam*HI và *Sac*I. Gen trong vector biểu hiện đã được kiểm tra bằng một số enzyme hạn chế và giải trình tự gen (kết quả không trình bày).

pAC7 là vector tích hợp, có thể tự sao chép trong *E. coli* nhưng không tự sao chép trong *B. subtilis*. Ngoài các thành phần cơ bản của một vector như điểm khởi đầu sao chép, dấu chuẩn chọn lọc (gen kháng kanamycin) và vị trí nối đa điểm, vector pAC7 còn chứa các phân đoạn gen *amylase*, *amyE* trước và *amyE* sau. Đoạn gen ngoại lai sau khi được tách dòng trong vector này có thể được tích hợp vào hệ gen của vi khuẩn *B. subtilis* khi có sự trao đổi chéo giữa các phân đoạn gen *amyE* trước và *amyE* sau có mặt trên vector pAC7 với một bản sao của gen *amyE* trên DNA nhiễm sắc thể của *B. subtilis* (Lebrun *et al.*, 2007). Việc tích hợp vào hệ gen của vi khuẩn giúp gen ngoại lai được sao chép và biểu hiện ở trạng thái ổn định về mặt di truyền trong vi khuẩn.

Sau khi được cắt mở vòng bằng *Sca*I, pAC-*baamyF1-entP* và pAC-*baamyF2-entP* được biến nạp vào tế bào *B. subtilis*. Trên đĩa môi trường có kanamycin, chỉ những tế bào thu nhận gen ngoại lai mới có khả năng sinh trưởng và phát triển. Tuy nhiên, để kiểm tra chắc chắn sự có mặt của gen *baamyF1-entP* và *baamyF2-entP* trong hệ gen của *B. subtilis* 168, chúng tôi đã khuếch đại gen lai bằng PCR sử dụng khuôn là DNA hệ gen tách từ các thể biến nạp thu được và sử dụng mỗi xuôi *amyBA F1/Bam*HI hay *amyBA F2/Bam*HI và mỗi ngược *entP-Ba R2/Sac*I. Quan sát kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel 0,8 % agarose, chúng tôi nhận thấy ở các mẫu PCR có sử dụng khuôn là DNA hệ gen thu được từ các khuẩn lạc trên đĩa biến nạp với pAC-*amyIF1-entP/Sca*I và pAC-*amyIF2-entP/Sca*I có xuất hiện băng DNA tương ứng với kích thước của đoạn gen dung hợp *baamyF1-entP* và *baamyF2-entP* (khoảng 0,9 kb và 1,2 kb), trong khi đó mẫu PCR sử dụng khuôn là DNA hệ gen của *B. subtilis* 168 thì không xuất hiện các băng DNA này. Do đó, có thể kết luận rằng đoạn gen dung hợp giữa *entP* với *baamyF1* và *baamyF2* đã được tích hợp thành công vào hệ gen của *B. subtilis* 168.



**Hình 2. A.** Plasmid tái tổ hợp pAC7 mang gen dung hợp; **B.** Cơ chế tích hợp gen ngoại lai vào nhiễm sắc thể của *B. subtilis* 168.



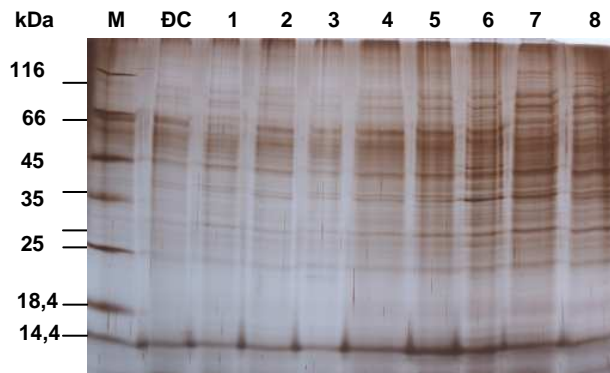
**Hình 3.** Điện di đồ của sản phẩm PCR khuếch đại gen lai từ hệ gen của các thể biến nạp. 1 - 5. thể biến nạp mang gen *baamyF1-entP*; 6 - 10; 11 - 13: thể biến nạp mang gen *baamyF2-entP*; M. Thang DNA chuẩn; ĐC. *B. subtilis* 168.

**Biểu hiện các đoạn gen dung hợp trong *B. subtilis* 168**

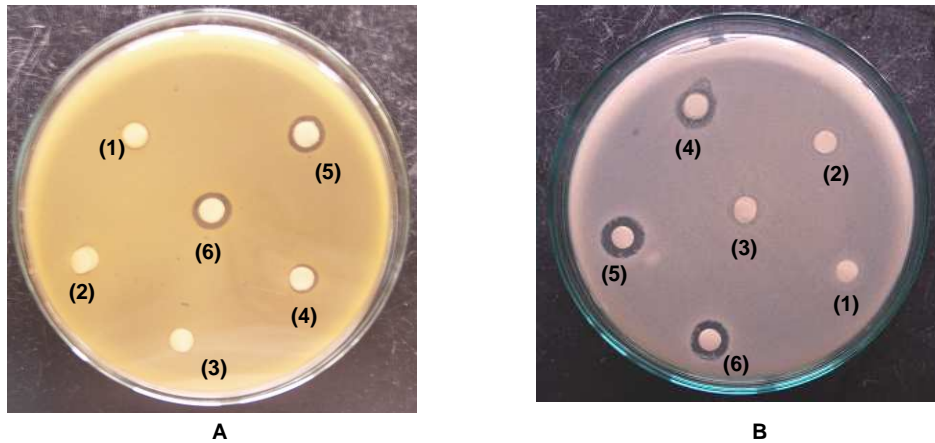
Việc kiểm tra khả năng biểu hiện của đoạn gen dung hợp được thực hiện thông qua việc nuôi cấy các thể biến nạp trong môi trường LB lỏng bổ sung 10 µg/ml kanamycin và điện di dịch protein tiết ra môi trường trên gel 12% polyacrylamide có sử dụng chất biến tính SDS (SDS-PAGE).

Kết quả điện di cho thấy, protein ngoại lai không được quan sát rõ so với đối chứng là dịch protein thu được khi nuôi cấy *B. subtilis* 168

không mang gen. Tuy nhiên, do được tích hợp vào hệ gen của vi khuẩn và không có chất cảm ứng để kích thích quá trình dịch mã của đoạn gen dung hợp *baamyF1-entP* hay *baamyF2-entP* nên các đoạn gen ngoại lai này được biểu hiện ở cùng mức độ với các protein khác của tế bào vật chủ. Do đó, khó có thể quan sát bằng protein ngoại lai trên SDS-PAGE khi mà các protein khác nhau có kích thước giống nhau sẽ di chuyển với cùng một tốc độ và sẽ có một vị trí trên gel polyacrylamide. Hơn nữa, hàm lượng protein ngoại lai thu được từ dịch nuôi cấy không nhiều.



**Hình 4.** Điện di protein trên gel 12 % polyacrylamide. DC. Dịch protein tiết ra môi trường thu được từ *B. subtilis* 168; 1- 4. Các thể biến nạp pAC-amyIF1-entP; 5 - 8. Các thể biến nạp pAC-amyIF2-entP; M. Marker.



**Hình 5.** Hoạt tính kháng *S. aureus* (a) và *B. Cereus* (b) của protein tái tổ hợp. (1) dịch protein của *B. subtilis* sau 4 h; (2) amyIF1-entP sau 4 h; (3) amyIF2-entP sau 4 h; (4) dịch protein của *B. subtilis* 168 sau 24 h; (5) amyIF1-entP sau 24 h; (6) amyIF2-entP sau 24 h.

**Hoạt tính kháng khuẩn của protein tái tổ hợp**

Trước khi thử hoạt tính kháng khuẩn, dịch protein tái tổ hợp thu được từ môi trường nuôi cấy

được tủa bằng 50%  $(NH_4)_2SO_4$ . Sau đó enterocin P tái tổ hợp được phân cắt khô dạng dung hợp bằng formic acid (asparagine-proline) (trình tự gen mã hóa cho vị trí nhận biết này được thiết kế nhân tạo nằm

giữa *entP* và gen dung hợp). Khi ủ dịch protein đã tủa ở trên với 50% formic acid ở 50°C trong 24 h, enterocin P được cắt khỏi dạng dung hợp và được sử dụng trong thí nghiệm thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch sử dụng các vi sinh vật chỉ thị là *S. aureus* và *B. cereus*.

Kết quả quan sát được trên hình 5 cho thấy, các mẫu thu được ở 4 h không có hoạt tính ức chế sinh trưởng của vi khuẩn *S. aureus* và *B. cereus*. Các mẫu thu được từ môi trường nuôi cấy *B. subtilis* mang gen *baamylF2-entP*, *baamylF1-entP* sau 24 h nuôi cấy có khả năng ức chế *S. aureus* và *B. cereus*. Dịch nuôi cấy chủng *B. subtilis* 168 cũng kháng *B. cereus* nhưng hoạt tính kháng khuẩn này không rõ ràng bằng hoạt tính kháng khuẩn của dịch *B. subtilis* tái tổ hợp.

### Thảo luận

Trong nghiên cứu này, đoạn gen *entP* đã được ghép với các phân đoạn gen amylase của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens*. Việc biểu hiện một đoạn peptide ngắn như enterocin P (44 amino acid) ở dạng dung hợp có thể giúp tăng hàm lượng protein tái tổ hợp thu được từ dịch nuôi cấy. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của enterocin P trong *B. subtilis* ở dạng dung hợp trong nghiên cứu này đạt được còn thấp.

Với khả năng tiết một lượng lớn protein vào môi trường nuôi cấy (có thể lên tới 5 g/l) (Ferrari *et al.*, 1993), vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học trong việc sản xuất protein ngoại lai ở dạng tiết ra ngoại bào. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, sản lượng protein tái tổ hợp thu được là rất thấp. Nguyên nhân có thể do (1) *B. subtilis* 168 giải phóng một protease vào môi trường nuôi cấy và chính protease đã nhận biết protein lạ so với tế bào chủ và làm giảm sản lượng protein tái tổ hợp thu được. Sự có mặt của các protease này có thể khiến protein tái tổ hợp bị phân cắt và dẫn đến hàm lượng protein tái tổ hợp thu được tương đối thấp, đây được xem là một trong những điểm hạn chế của hệ biểu hiện này. (2) Hơn nữa, trong quá trình lên men, một số vi khuẩn như *Bacillus* có thể sản xuất ra hỗn hợp các acid như lactic acid, acetic acid, formic acid, succinate và ethanol (Todar, 2009). Vì vậy, có thể một phần BaamylF1-EntP hay BaamylF2-EntP đã bị cắt để giải phóng ra EntP nhưng do EntP có hàm lượng quá thấp, kích thước phân tử quá bé nên khó phát hiện được bằng điện di trên gel polyacrylamide. Do protein enterocin P tái tổ hợp biểu hiện trong *B. subtilis* 168 không được phát hiện rõ ràng trên gel

polyacrylamide, có thể do một trong hai nguyên nhân nói trên nên chúng tôi chưa thể đánh giá hiệu suất tổng hợp enterocin P trong chủng biểu hiện *B. subtilis* này so với các hệ biểu hiện đã được nghiên cứu trước đây (*E. coli*, *P. pastoris*, *L. lactis*, *M. extorquens*).

Ngoài ra, khi enterocin P được giải phóng ra ngoài môi trường, chúng có thể tác động ngược trở lại với tế bào và làm ảnh hưởng tới sự phát triển của vi khuẩn chủ. Sở dĩ, bản thân vi khuẩn sản xuất *E. faecium* P13 không bị ảnh hưởng bởi hoạt tính của enterocin P này là do vi khuẩn này có thể tổng hợp một protein miễn dịch (immunity protein, được mã hóa bởi gen *entPi*) dài 88 amino acid với khối lượng phân tử theo lý thuyết vào khoảng 9,886 kDa (Cintas *et al.*, 1997), protein này ngoài việc bảo vệ vật chủ tránh khỏi tác động của bản thân enterocin P mà còn có khả năng miễn dịch với các bacteriocin khác thuộc nhóm IIa (Eijsink *et al.*, 1998). Công trình nghiên cứu của Gutiérrez và đồng tác giả năm 2006 đã cho thấy, việc biểu hiện gen *entP* đồng thời với đoạn gen *entPi* trong *L. lactis* có thể giúp tăng cường khả năng bảo vệ vật chủ trước tác động của enterocin P tái tổ hợp được biểu hiện (Gutiérrez *et al.*, 2006). Tuy nhiên, việc protein tái tổ hợp thu được từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với hai vi khuẩn chỉ thị, *S. aureus* và *B. cereus*, cho thấy, enterocin P đã được biểu hiện trong hệ biểu hiện *B. subtilis* 168, mặc dù mức độ biểu hiện còn tương đối thấp. Một trong những nỗ lực nhằm hạn chế nhược điểm của hệ biểu hiện *B. subtilis* 168 để nâng cao hàm lượng protein ngoại lai được tiết ra môi trường nuôi cấy là tạo các chủng *B. subtilis* trong đó bất hoạt những gen mã hóa cho các protease ngoại bào.

### KẾT LUẬN

Enterocin P của *E. faecium* P13 đã được biểu hiện thành công trong *B. subtilis* 168 dưới dạng lai với một phần gen amylase của *B. amyloliquefaciens*. Sau khi cắt bỏ protein lai, enterocin P thu được có hoạt tính kháng lại *S. aureus* và *B. cereus*.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí của đề tài “Nghiên cứu công nghệ sản xuất và sử dụng chất diệt khuẩn sinh học (Nisin và Enterocin) dùng trong bảo quản nông sản thực phẩm” thuộc chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn chủ trì. Công trình này được thực hiện tại Phòng Kỹ

thuật di truyền và có sử dụng trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bruckner R, Shoseyov O, Doi RH (1990) Multiple active forms of a novel serine protease from *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* 221: 486-490.
- Chatterjee C, Paul M, Xie L, van der Donk WA (2005) Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev* 105: 633-641.
- Cintas LM, Casaus L, Havarstein LS, Hernandez PE, Nes IF (1997) Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl Environ Microbiol* 63(11): 4321-4330.
- Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P (2005) Bacteriocin: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J* 16: 1058-1071.
- Eijsink VGH, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB, Nes IF (1998) Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 64: 3275-3281.
- Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A (1999) Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* 24: 85-106.
- Ferrari E, Jarnagin AS, Schmidt BF (1993) Commercial production of extracellular enzymes. In: *Bacillus Subtilis and Other Gram-Positive Bacteria. Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics* Sonenshein AL, Hoch JA & Losick R), pp. 917-937. Washington D.C., American Society for Microbiology.
- Gutiérrez J, Bourque D, Criado R, Choi YJ., Cintas LM., Hernández PE., Míguez Carlos B (2005a), Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS Microbiology* 248(1): 125-131.
- Gutiérrez J, Criado R, Martín M, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE (2005b), Production of Enterocin P, an Antilisterial Pediocin-Like Bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13, in *Pichia pastoris*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7): 3004-3008.
- Gutiérrez J, Criado R, Citti R, Martín M, Herranz C, Nes IF, Cintas LM, Hernández PE (2005c) Cloning, production and functional expression of enterocin P, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13 in *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 103(3): 239-250.
- Gutiérrez J, Larsen R, Cintas LM, Kok J, Hernández PE (2006) High-level heterologous production and functional expression of the sec-dependent enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(1): 41-51.
- Harwood CR (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol* 10: 247-256.
- Hécharde Y, Salh HG (2002) Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 84: 545-557.
- Herranz C, Chen Y, Chung HJL, Cintas M, Hernández PE, Montville TJ, Chikindas ML (2001) Enterocin P selectively dissipates the membrane potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microbiol* 67(4): 1689-1692.
- Herranz C, Cintas LM, Hernández PE, Moll GN, Driessen AJM (2001) Enterocin P causes potassium ion efflux from *Enterococcus faecium* T136 cells. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3): 901-904.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12: 39-85.
- Lebrun M, Filée P, Galleni M, Mainil JG, Linden A, Taminau B (2007) Purification of the recombinant beta2 toxin (CPB2) from an enterotoxaemic bovine *Clostridium perfringens* strain and production of a specific immune serum. *Protein Expr Purif* 55: 119-131.
- Nguyễn Thanh Nhân, Lê Thu Ngọc, Đỗ Thị Huyền, Trần Ngọc Tân, Phạm Thùy Linh, Lê Văn Trường, Trương Nam Hải (2009) Tách dòng và biểu hiện gen enterocin P ở dạng dung hợp với CBD-SsP intein trong *Escherichia coli* ER2566. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 7(1): 27-33.
- Serrano-Heras G, Salas M, Bravo A (2005) A new plasmid vector for regulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 54(3): 278-282.
- Sloma A, Ally A, Ally D, Pero J (1988) Gene encoding a minor extracellular protease in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 170: 5557-5563.
- Todar K (2009) Diversity of Metabolism in Prokaryotes. Text book of Bacteriology. University of WisconsinMadison, USA.

## CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMID FROM EXPRESSION VECTOR PAC7 CONTAINING *ENTP* GENE FUSED WITH FRAGMENTS OF *BAAMYF1* AND *BAAMYF2* FOR PRODUCTION OF ENTEROCIN P IN *BACILLUS SUBTILIS* 168

Nguyen Thanh Nhan<sup>1</sup>, Pham Thi Minh Duc<sup>2</sup>, Le Thu Ngoc<sup>3</sup>, Le Van Truong<sup>1</sup>, Do Thi Huyen<sup>1</sup>, Tran Ngoc Tan<sup>1</sup>, Pham Thuy Linh<sup>4</sup>, Truong Nam Hai<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology*

<sup>2</sup>*Da Nang University of Technology*

<sup>3</sup>*Hanoi University of Science*

<sup>4</sup>*Institute of Chemistry*

### SUMMARY

With high antimicrobial activity against a broad range of spoilage and food-borne gram positive pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, enterocin P, a class IIa bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* P13, has been studied in expression in different heterologous systems recently. In this work, enterocin P was expressed in host cells of *B. subtilis* 168. Enterocin P was produced in the chimeric form with fragments of amylase from *B. amyloliquefaciens* (BaamylF1, BaamylF2) in order to avoid degradative activity of host proteases. The fusion genes of *entP* and *baamylF1* or *baamylF2* were ligated to pAC7, resulting in recombinant plasmids pAC-amyF1-entP and pAC-amyF2-entP. These linearized plasmids were transformed to the competent cells *B. subtilis* 168 and integrated into the host genome. The chimeric proteins, BaamylF1-Enterocin P and BaamylF2-Enterocin P heterologously secreted from the recombinant *B. subtilis* strains were concentrated with 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and then treated with 50% formic acid to cleave enterocin P from the fusion forms. As a result from antimicrobial activity test, recombinant Enterocin P obtained after cleavage of fusion proteins showed an inhibitory effect on growth of indicator microorganisms, *S. aureus* and *B. cereus*, food-borne gram positive pathogenic bacteria. Thus, enterocin P was produced heterologously with biological activity, despite low expression level.

**Keywords:** *Bacillus subtilis*, bacteriocin, enterocin P, fusion gene, BaamylF1-Enterocin P, BaamylF2-Enterocin P

---

\* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37562790; E-mail: [tnhai@hn.vnn.vn](mailto:tnhai@hn.vnn.vn)