

BIỂU HIỆN HOẠT TÍNH NATTOKINASE CỦA CHỦNG *BACILLUS SUBTILIS* C10 TRONG VECTOR pHT43

Nguyễn Thị Anh Thu^{1,2}, Nguyễn Trần Mễ Khuê¹

(1) Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

(2) Trường Đại học Y Dược Huế

Tóm tắt

Natto một loại thực phẩm chức năng có giá trị đã được chứng minh là giúp phòng các bệnh tim mạch, tai biến. Hoạt chất chính trong natto là một subtilisin có tên gọi nattokinase (EC 3.4.21.62). Nattokinase do *Bacillus subtilis* natto, một loại vi khuẩn có lợi có mặt trong nhiều thực phẩm lên men tiết ra. Nattokinase hiện nay được sản xuất bằng phương pháp lên men lẫn công nghệ DNA tái tổ hợp. Trong nghiên cứu này chúng tôi báo cáo việc biểu hiện hoạt tính Nattokinase của chủng *Bacillus subtilis* C10 trong vector pHT43.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, nattokinase, natC10

Abstract

EXPRESSION OF NATTOKINASE ACTIVATION FROM *BACILLUS SUBTILIS* C10 IN VECTOR pHT43

Nguyen Thi Anh Thu^{1,2}, Nguyen Tran Me Khue¹

(1) Hue University of Sciences

(2) Hue University of Medicine and Pharmacy

Natto is a kind of functional food that is highly valued in Asia, and has been proved to significantly reduce the risk of cardiovascular accidents as well as cerebral stroke. The main bioactive component in natto is a kind of subtilisin called nattokinase (EC 3.4.21.62). Nattokinase is produced by various *Bacillus subtilis* natto strains, a beneficial bacterium that is present in many fermented foods. In this study, we reported expression of active Nattokinase from *Bacillus subtilis* C10 in vector pHT43.

Keywords: *Bacillus subtilis*, nattokinase, natC10

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, tỉ lệ mắc bệnh nghẽn động mạch do các cục máu đông như chứng nhồi máu cơ tim hay nhồi máu não đang tăng cao ở Việt Nam và các nước trên thế giới. Theo tổ chức Y tế Thế giới (WHO) hàng năm có khoảng 17 triệu người chết do các bệnh tim mạch mà nguyên nhân là do hậu quả của chứng huyết khối. Căn bệnh này thật sự trở thành mối đe dọa đối với sức khỏe con người. Trước đây, người ta thường điều trị bệnh này bằng phẫu thuật hoặc dùng một số loại enzyme như urokinase, streptokinase... làm tan huyết khối có hiệu quả tức thì nhưng không lâu, đắt tiền có nguy cơ biến chứng gây xuất huyết.

Nattokinase là một serine protease có trong sản phẩm Natto truyền thống của Nhật Bản, lần đầu tiên Sumi và cộng sự (năm 1980) đã thu nhận và phát hiện khả năng làm tan đặc hiệu fibrin bởi từ *Bacillus subtilis* natto. So sánh với các dược phẩm thông thường khác, nattokinase có nhiều ưu điểm như tính an toàn, hiệu quả đã được chứng minh lâm sàng, hoạt tính cao và tồn tại ở nội mạc trong thời

gian dài bằng liều uống nên hiệu quả điều trị được duy trì. Hơn nữa, nattokinase còn hỗ trợ tăng cường sản sinh ra plasmin (enzyme do cơ thể sản sinh làm tan huyết khối bám chặt nội mạc). Nattokinase thực sự có hiệu quả cao hơn những loại làm tan huyết tự thông thường khác như urokinase, streptokinase và tissue plasminogen activator (t-PA).

Nattokinase được thu nhận chủ yếu bằng con đường lên men bán rắn chủng *Bacillus subtilis* natto trên cơ chất đậu nành nấu chín hay lên men dịch thể. Thực tế, nattokinase được ly trích từ cơ chất hay môi trường lỏng thường có hàm lượng không cao và hoạt tính ít ổn định. Sự tổng hợp nattokinase trong tự nhiên ở *Bacillus subtilis* natto khá phức tạp và chỉ đạt mức độ giới hạn. Hay nói cách khác, cách tiếp cận trên thường chỉ hiệu quả nếu đi kèm công nghệ lên men hoàn hảo với các thông số đã được nghiên cứu tối ưu hóa. Tuy nhiên, các công nghệ này thường ít được công bố. Hiện nay đã có những nghiên cứu bước đầu tạo nattokinase tái tổ hợp có hoạt tính bằng hệ thống vi khuẩn (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* *Lactococcus*

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Thị Anh Thu, email: thu.dhyhue@gmail.com

Ngày nhận bài: 17/12/2017, Ngày đồng ý đăng: 12/1/2018; Ngày xuất bản: 18/1/2018

sp.) Hướng nghiên cứu nattokinase tái tổ hợp bước đầu cho thấy hiệu quả vì enzyme tái tổ hợp được biểu hiện có hoạt tính và tiết ngoại bào [3, 4, 5]. Tuy nhiên nghiên cứu trong nước theo hướng nattokinase tái tổ hợp vẫn còn rất ít và chỉ có một vài nghiên cứu của: Nguyễn Thị Thảo và Quyền Đình Thi (2013) đã nhân dòng, phân tích trình tự và biểu hiện gen mã hóa nattokinase từ chủng *B. subtilis* VTCC-DVN-12-01 và biểu hiện trên *B. subtilis* WB800 [6], Trần Quốc Tuấn và cộng sự (2014) đã tạo dòng và biểu hiện vượt mức enzyme phân hủy huyết khối nattokinase từ chủng *B. subtilis* [2].

Trong nước, các công ty dược phẩm cũng bắt đầu cho ra các sản phẩm từ nattokinase với nguyên liệu ngoại nhập chủ yếu từ Nhật Bản với giá thành cao. Việc tìm kiếm nguồn nguyên liệu nattokinase có hoạt tính ổn định và giá cả phù hợp là định hướng của nhiều công ty trong nước. Do vậy, việc tìm hiểu và thu nhận nguồn gen mã hóa nattokinase tốt từ các chủng *B. subtilis* và xây dựng hệ thống tái tổ hợp là tiếp cận mở ra triển vọng cho công nghệ sản xuất và thu nhận nattokinase hoạt tính cao nhằm làm nguyên liệu cho dược phẩm, thực phẩm chức năng.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Là chủng *B. subtilis* C10 đã được phân lập và cất giữ ở -80°C trong phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Biến nạp vector pHT43/natC10 vào *Bacillus subtilis* WB800

2.2.1.1. Chuẩn bị vector tái tổ hợp pHT43/natC10

Chủng *E. coli* TOP10 mang vector tái tổ hợp pHT43/natC10 được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl) qua đêm ở 37°C với tốc độ lắc 185 vòng/phút. Sinh khối tế bào được thu hồi bằng ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Vector tái tổ hợp sau đó được tách chiết bằng GeneJET Vector Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và cắt bằng 2 enzyme hạn chế *Xma*I và *Bam*HI để kiểm tra sự hiện diện của gen *natC10* trước khi biến nạp chúng vào chủng *B. subtilis* WB800. Thành phần phản ứng cắt gồm có: 1× đệm tango, 1 U *Bam*HI hoặc 1U *Xma*I, 1 µg DNA vector trong tổng thể tích 50 µl, hỗn hợp được ủ 37°C trong 1 giờ. Sản phẩm cắt sau đó được điện di trên gel agarose 0,8%.

2.2.1.2. Chuẩn bị tế bào khả biến của chủng *Bacillus subtilis* WB800

Để chuẩn bị cho quá trình biến nạp vector tái tổ hợp pHT43/natC10 vào *B. subtilis* WB800, chủng vi khuẩn này đã được xử lý khả biến bằng đệm EP

(0,5 mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , 0,5 mM $MgCl_2$, và 272 mM sucrose). Khuẩn lạc đơn *B. subtilis* WB800 được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl) ở 37°C qua đêm với tốc độ lắc 185 vòng/phút. Sau đó, 200 µl dịch nuôi cấy được chuyển qua bình tam giác 250 ml chứa 50 ml môi trường LB lỏng và nuôi đến khi OD_{600} đạt giá trị 0,3. Dịch nuôi cấy sau đó được làm lạnh bằng cách ủ 10 phút trong đá và sinh khối *B. subtilis* WB800 được thu hồi bằng ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Dịch nổi được loại bỏ và tiểu thể được tái huyền phù với 15 ml đệm EP lạnh rồi thu hồi bằng ly tâm như trên. Quá trình được lặp lại thêm một lần trước khi tái huyền phù tiểu thể bằng 300 µl đệm EP. Tế bào *B. subtilis* WB800 sau khi xử lý khả biến được sử dụng ngay cho quá trình biến nạp vector pHT43/natC10.

2.2.1.3. Biến nạp vector pHT43/natC10 vào *Bacillus subtilis* WB800

Vector pHT43/natC10 được chuyển vào *B. subtilis* WB800 bằng phương pháp xung điện với thiết bị biến nạp của Hãng Bio-Rad. Khoảng 300 ng của vector tái tổ hợp được ủ với 100 µl tế bào khả biến *B. subtilis* WB800 trong 5 phút, sau đó được chuyển vào cuvet 2 mm. Quá trình chuyển gen được thực hiện với xung 1 kV trong thời gian 8.6 ms. Sau quá trình chuyển gen, hỗn hợp được bổ sung vào 900 µl môi trường LB lỏng và nuôi 37°C, tốc độ lắc 250 vòng/phút trong 2 giờ. Sinh khối tế bào được thu hồi và cấy chuyển trên môi trường chọn lọc LB-agar có bổ sung kháng sinh nuôi ở 28°C. Vi khuẩn *B. subtilis* WB800 tái tổ hợp được kiểm tra bằng khuếch đại PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *natC10*.

2.2.2. Kiểm tra sự biểu hiện nattokinase ngoại bào trong hệ thống vector pHT43

Chủng *B. subtilis* mang vector tái tổ hợp pHT43 và gen *natC10* được kiểm tra khả năng tiết nattokinase ra môi trường bên ngoài thông qua so sánh vòng phân giải với cơ chất skim milk.

Các khuẩn lạc đơn tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường LB ở 37°C qua đêm, lắc ở 220 vòng/phút. Pha loãng dịch nuôi cấy qua đêm với môi trường LB đến $OD_{600}=0,15$ và nuôi đến khi OD_{600} đạt 0,7-0,8. Sinh tổng hợp nattokinase ngoại bào được cảm ứng với Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) với nồng độ 1 mM và ủ ở 37°C. Thu mẫu sau mỗi hai giờ nuôi cấy để kiểm tra hoạt tính nattokinase.

Sau khi cảm ứng sinh tổng hợp nattokinase, chuẩn bị đĩa môi trường LB có bổ sung 1,5% agar và 2% skim milk, tạo các lỗ trên bề mặt đĩa môi trường có đường kính 4 mm. Hút 50 µl dịch nuôi cấy cho vào lỗ, ủ ở 37°C qua đêm. Vòng phân giải skim milk của các khuẩn lạc khác nhau được quan sát.

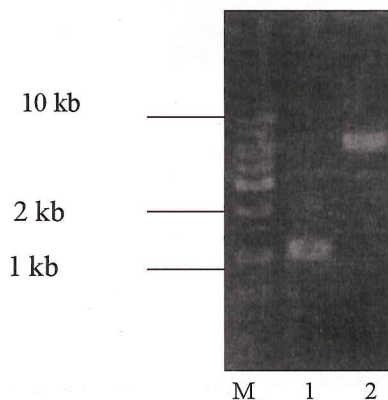
3. KẾT QUẢ

3.1. Biến nạp vector tái tổ hợp PHT43/NATC10 vào *Bacillus subtilis* wb800

3.1.1. Chuẩn bị vector pHT43 và gen natC10

Gen *natC10* của chủng *B. subtilis* C10 sau khi tinh sạch được chèn vector biểu hiện pHT43. Trước đó, vector pHT43 cũng đã được mở vòng bằng *Bam*HI

và *Xma*I rồi tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit. Chất lượng DNA của gen và vector được kiểm tra trên gel agarose 0,8% và kết quả được trình bày ở hình 3.6. Nhìn chung, các mẫu sau tinh sạch có hàm lượng và chất lượng tốt, đáp ứng yêu cầu của phản ứng gắn (Hình 3.1).



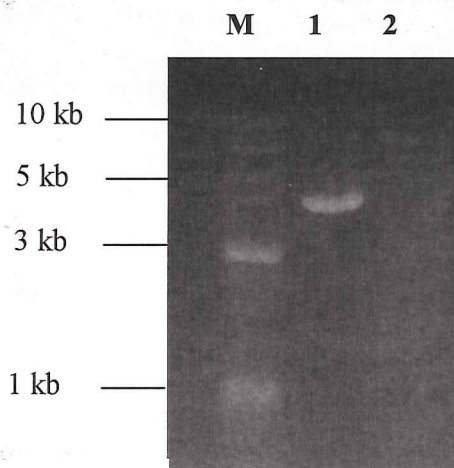
Hình 3.1. Cắt hạn chế gen *natC10* và vector pHT43 bằng *Bam*HI và *Xma*I.

M: thang chuẩn DNA 1 kb, 1: gen *natC10*, 2: vector pHT43.

3.1.2. Chuẩn bị vector tái tổ hợp pHT43/natC10

Vector tái tổ hợp pHT43/*natC10* được tách chiết và kiểm tra trước khi tiến hành chuyển vào *B. subtilis*

WB800. Kết quả điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy chúng có chất lượng tốt và hàm lượng đủ cho thí nghiệm biến nạp.



Hình 3.2. Điện di agarose gel 0,8% của các vector tái tổ hợp pHT43/*natC10*. M: thang chuẩn DNA 1 kb, 1: Vector tái tổ hợp pHT43/*natC10*, 2: Vector tái tổ hợp pHT43/*natC10* được cắt bằng *Bam*HI, 3: Vector tái tổ hợp pHT43/*natC10* được cắt bằng *Xma*I.

3.1.3. Biến nạp vector pHT43/*natC10* vào *Bacillus subtilis* WB800

Vector tái tổ hợp pHT43/*natC10* được biến nạp vào chủng *B. subtilis* WB800 như mô tả ở phần

phương pháp. Sự hiện diện của gen *natC10* đã được kiểm tra bằng phương pháp PCR. Kết quả của phản ứng khuếch đại cho thấy sự có mặt của gen *natC10* trong tế bào *B. subtilis* WB800 tái tổ hợp (Hình 3.3).

SỬ DỤNG CHITOSAN TAN VÀ POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) LÀM CHẤT ỔN ĐỊNH ĐỂ CHẾ TẠO BẠC NANO VÀ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM

Đặng Xuân Dục¹, Phan Tử Quý², Trịnh Lan Vy¹, Ngô Thùy Trang¹, Lê Văn Trung Hiếu¹

(1) Trường Đại học Sài Gòn

(2) Trường Đại học Tây Nguyên

Tóm tắt

Bài báo trình bày kết quả nghiên cứu chế tạo dung dịch keo bạc nano bằng cách dùng chất khử axit ascorbic khử ion Ag^+ với các chất ổn định là chitosan tan trong nước và polyethylene glycol (PEG). Tính chất đặc trưng của keo bạc nano được phân tích bằng các phương pháp như TEM, XRD và UV-Vis. Kích thước hạt bạc nano chế tạo được khoảng 2 - 9 nm. Dung dịch keo bạc nano chế tạo được có khả năng kháng nấm rất hiệu quả ở nồng độ khá thấp khoảng 20 ppm.

Từ khóa: bạc nano, chitosan tan trong nước, hoạt tính kháng nấm

Abstract

PREPARATION OF SILVER NANOPARTICLES USING WATER SOLUBLE CHITOSAN AND POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) AS STABILIZING AGENTS AND ITS ANTIFUNGAL ACTIVITY

Dang Xuan Du¹, Phan Tu Quy², Trinh Lan Vy¹, Ngo Thuy Trang¹, Le Van Trung Hieu¹

(1) Sai Gon University

(2) Tay Nguyen University

This paper presented the research result of preparing silver nanoparticle solution by reducing Ag^+ ion using ascorbic acid as reducing agent with water soluble chitosan and polyethylene glycol (PEG) as stabilizing agents. The characteristic of silver nanoparticles was determined by TEM, XRD and UV – Vis methods. Results showed that silver nanoparticles had the size of 2 - 9 nm. The obtained silver nanoparticle solution exhibit good antifungal activity at the quite low concentration, ~20 ppm.

Keywords: silver nanoparticles, water soluble chitosan, antifungal activity.

1. MỞ ĐẦU

Từ hàng ngàn năm trước, bạc đã được xem như một kim loại quý với nhiều ứng dụng khác nhau như làm đồ trang sức, đồng xu,... Thời cổ đại, bình bạc đã được sử dụng để giữ nước hoặc rượu vang. Vào thế kỷ XVII và XVIII, bạc nitrat đã được sử dụng để điều trị viêm loét. Hoạt tính kháng khuẩn của bạc vì thế cũng đã được công nhận vào thế kỷ XIX. Các ứng dụng có ý nghĩa của bạc là khử trùng và làm lành vết thương. Tuy nhiên, sau khi thuốc kháng sinh được đưa vào sử dụng thì việc sử dụng muối bạc giảm dần [1]. Ngày nay, các vi sinh vật trở nên kháng thuốc ở phổ rộng, nên tác dụng của thuốc kháng sinh đã trở nên hạn chế đối với vi sinh vật. Vì vậy, việc ứng dụng hoạt tính kháng khuẩn của bạc vào y học ngày càng được quan tâm hơn. Bạc và các hợp chất của bạc thể hiện tính độc với vi khuẩn, vi rút, tảo và nấm [2] nhưng hầu như không thể hiện tính độc với con người. Đây là

điểm khác biệt của bạc với các kim loại khác như Pb, Hg,... Những năm gần đây, công nghệ nano đã tạo nên những bước đột phá trong ngành điện tử, tin học, y sinh... làm thay đổi đời sống nhờ các ứng dụng thực tế như kem đánh răng nano, bình sữa nano, tủ lạnh và máy điều hòa không khí ứng dụng công nghệ nano... Đối với công nghệ nano thì bạc nano được chú ý nhờ hoạt tính kháng khuẩn tăng lên khoảng 50.000 lần so với bạc khối. Như vậy, 1 gam bạc nano có thể sát khuẩn cho hàng trăm mét vuông chất nền [3]. Các sản phẩm chứa bạc nano như dung dịch khử mùi cơ thể, nước sát khuẩn, băng gạc y tế... cũng đã được thương mại hóa.

Có nhiều phương pháp chế tạo bạc nano như khử hóa học, ăn mòn laser, sinh học, hóa lý hay vật lý. Trong đó phương pháp ăn mòn laser, sinh học hay vật lý mang lại hiệu quả khá cao nhưng khá đắt tiền và điều kiện về thiết bị chưa phổ biến. Phương

Địa chỉ liên hệ: Đặng Xuân Dục, email: dangxuandu@gmail.com

Ngày nhận bài: 17/12/2017, Ngày đồng ý đăng: 11/1/2018; Ngày xuất bản: 18/1/2018