

**KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY BIỂU HIỆN CHUỖI NHẹ
ĐỘC TỔ THẦN KINH TYPE HUYẾT THANH B TÁI TỔ HỢP
CỦA VI KHUẨN *Clostridium botulinum* TRONG TẾ BÀO
Escherichia coli BL21 (DE3)**

TRỊNH VĂN TOÀN⁽¹⁾, LÊ NGỌC DIỆP⁽²⁾, HOÀNG ĐĂNG HIẾU⁽¹⁾,
PHẠM VIỆT HÙNG⁽¹⁾, VÕ VIỆT CƯỜNG⁽¹⁾, LÊ THỊ LAN ANH⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Độc tố Botulinum (BoNTs) là chất độc thần kinh do vi khuẩn *Clostridium botulinum* sản sinh, gây ngộ độc, đe dọa nghiêm trọng đến tính mạng của con người và động vật [1]. Bệnh có tỷ lệ ngộ độc thấp, nhưng tỷ lệ tử vong cao (5-10%) nếu không được chẩn đoán và điều trị kịp thời [2]. Độc tố BoNTs được xếp vào tác nhân sinh học loại “A”, độc gấp 100 lần so với xyanua, liều gây chết đối với người trưởng thành qua đường tiêu hóa ước tính là 30 ng [3]. Độc tố BoNTs gồm có 8 type A, B, C, D, E, F, G, H và được phân biệt bằng đặc tính kháng nguyên [4]. Hầu hết các trường hợp ngộ độc ở người đều do độc tố type A, B, E (độc nhất là type A, B) và tỷ lệ gây bệnh của các type độc khác cho con người là rất thấp [4, 5].

Độc tố BoNTs được mã hóa bởi gen có chiều dài khoảng 3900 bp. Protein BoNTs được tạo thành từ 2 chuỗi: chuỗi nặng (HC) có khối lượng khoảng 100 kDa gồm vùng chuyển vị (HN) và miền gắn thụ thể (RBD); chuỗi nhẹ LC là một metalloprotease phụ thuộc Zn^{2+} , có khối lượng khoảng 50 kDa và là miền gây độc của BoNTs [6]. Dạng hoạt động của BoNTs có được nhờ liên kết giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ qua một cầu nối disulfide và tương tác không cộng hóa trị giữa protein-protein [7]. Sự liên kết này là cần thiết cho tính chất gây độc thần kinh của BoNTs [8, 9]. Bằng công nghệ DNA tái tổ hợp, độc tố BoNTs đã được biểu hiện thành công và được ứng dụng trong chẩn đoán, điều trị bệnh. Trong số các phương pháp chẩn đoán *C. botulinum*, phương pháp miễn dịch như ELISA, test nhanh được quan tâm nhiều nhất do có tính đơn giản và hiệu quả cao. Việc nghiên cứu chế tạo được chuỗi nhẹ độc tố BoNTs (đặc biệt là type A, B) là tiền đề cho việc phát triển vắc-xin dự phòng và các kit chẩn đoán miễn dịch trên người [10].

Trong nghiên cứu này, để tạo được chuỗi nhẹ độc tố thần kinh botulinum type B (BoNT/B-LC), chúng tôi đã tổng hợp gen mã hóa chuỗi nhẹ, sau đó gen được chuyển vào plasmid pET-32a(+) và biểu hiện thành công trong *Escherichia coli* BL21 (DE3). Nhằm cải thiện khả năng hòa tan và hiệu suất tổng hợp protein tái tổ hợp trong chủng *E. coli* mang gen, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát lựa chọn điều kiện biểu hiện thích hợp, bao gồm: môi trường nuôi cấy, nhiệt độ biểu hiện, nồng độ chất cảm ứng IPTG và thời gian thu mẫu sau cảm ứng với IPTG ở quy mô phòng thí nghiệm. Kết quả thu được là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen cải biến mã hóa chuỗi nhẹ type B.

Hóa chất cho lên men: Môi trường LB: 0,5% dịch chiết nấm men, 1% tryptone và 1% NaCl. Môi trường YJ: 2% glycerol, 1,5% tryptone, 2% dịch chiết nấm men, 0,16% $K_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0,16% KH_2PO_4 , 0,05% NaCl, và 0,025% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Môi trường TB: 1,2% peptone, 2,4% dịch chiết nấm men, 72 mM K_2HPO_4 , 17 mM KH_2PO_4 , và 0,4% glycerol. Môi trường HSG: 1,49% glycerol, 0,7% dịch chiết nấm men, 1,35% tryptone, 0,14% $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0,15% KH_2PO_4 , 0,23% K_2HPO_4 và 0,5% glycine. Chất cảm ứng Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Meridian Bioscience, Mỹ), kháng sinh ampicillin (Alfa-Thermo). Hóa chất cho điện di protein: Trisbase (ABT, Việt Nam), bis-acrylamide (Serva, Đức), APS, TEMED, coomassie brilliant blue, methanol, acid acetic, SDS, glycine (Sigma, Mỹ), thang protein chuẩn (Thermo, Mỹ).

Các trang thiết bị: Tủ lạnh gia nhiệt NB-205VL (N-biotek, Hàn Quốc), hệ thống chụp ảnh Gel Doc EZ imager (Biorad, Mỹ), bộ điện di đứng protein mini (Clever scientific - Anh) và trang thiết bị thiết yếu khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy lên sự sinh tổng hợp protein TrxB_oNT/B-LC

Nuôi cấy khởi động tế bào: Chủng *E. coli* BL21 chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi trong 10 ml môi trường LB chứa ampicillin 100 μ g/ml (môi trường LBamp) ở nhiệt độ 37°C, lắc ở tốc độ 250 vòng/phút trong 16 giờ.

Dịch nuôi được cấy chuyển sang 100 ml môi trường LBamp mới với tỉ lệ tiếp giống là 1% và được nuôi cấy cùng điều kiện. Khi nồng độ tế bào tương ứng OD₆₀₀ khoảng 0,6 thì tiến hành cảm ứng biểu hiện protein với 500 μ M IPTG và tiến hành nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau: 20, 25, 30 và 37°C. Các bình được lắc ở tốc độ 250 vòng/phút trong 8 giờ. Sinh khối thu được bằng ly tâm 5000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Tế bào được hòa lại trong đệm 20 mM PBS, pH=7,4 để đạt OD₆₀₀=10. Sau đó, tế bào được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Tiến hành phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm ở công suất 20 KHz trong 20 phút (thời gian bật/tắt = 20/10) trên đá lạnh. Mức độ biểu hiện protein TrxB_oNT/B-LC được xác định bằng đo Bradford kết hợp phân tích kết quả điện di trên gel polyacrylamide 12,6% bằng phần mềm Image J (Biorad) để lựa chọn nhiệt độ biểu hiện thích hợp. Hàm lượng protein tương đối được tính bằng công thức = (kết quả đo nồng độ protein tổng số bằng phương pháp Bradford) x (tỷ lệ % của băng protein BoNTs/LC đo bằng ImageJ).

Khảo sát ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sự sinh tổng hợp protein TrxB_oNT/B-LC

Chủng *E. coli* BL21 được nuôi cấy khởi động tế bào. Dịch nuôi được cấy chuyển sang các môi trường LB, YJ, TB và HSG có bổ sung ampicillin đến nồng độ cuối cùng 100 μ g/ml với tỉ lệ tiếp giống là 1%. Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, 250 vòng/phút đến khi nồng độ tế bào đạt OD₆₀₀ bằng 0,6 thì tiến hành cảm ứng biểu hiện protein với 500 μ M IPTG. Tế bào được tiếp tục nuôi cấy ở nhiệt độ biểu hiện tối ưu, lắc 250 vòng/phút và thu mẫu ở thời điểm 8 giờ sau cảm ứng. Tiến hành phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm ở công suất 20 KHz trong 20 phút (thời gian bật/tắt = 20/10) trên đá lạnh. Lượng protein TrxB_oNT/B-LC biểu hiện được xác định bằng đo Bradford kết hợp phân tích kết quả điện di trên gel polyacrylamide 12,6% bằng phần mềm Image J (Biorad).

Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng lên sự sinh tổng hợp protein TrxBoNT/B-LC

Chúng *E. coli* BL21 được nuôi cấy khởi động tế bào. Dịch nuôi cấy được chuyển sang 100 ml môi trường nuôi cấy sau tối ưu có bổ sung ampicillin đến nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml với tỷ lệ tiếp giống là 1%. Dịch tế bào được tiếp tục nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, lắc ở tốc độ 250 vòng/phút đến khi giá trị OD₆₀₀ đạt khoảng 0,6. Chuyển dịch nuôi cấy sang 6 bình tam giác dung tích 100ml (10 ml/bình), mỗi bình tiến hành cảm ứng với IPTG ở các nồng độ 0; 100; 250; 500; 750 và 1000 µM. Tiếp tục nuôi lắc ở nhiệt độ tối ưu và thu mẫu ở thời điểm 8 giờ sau cảm ứng. Lượng protein TrxBoNT/B-LC biểu hiện được xác định bằng đo Bradford kết hợp phân tích kết quả điện di trên gel polyacrylamide 12,6% bằng phần mềm Image J (Biorad).

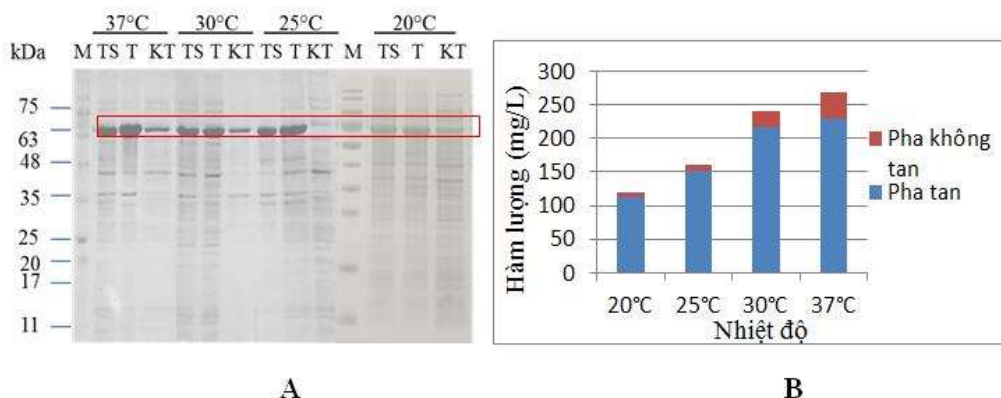
Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thu mẫu sau cảm ứng lên sự sinh tổng hợp protein TrxBoNT/B-LC

Sau khi lựa chọn được môi trường nuôi cấy, nhiệt độ cảm ứng, nồng độ chất cảm ứng thì tiến hành kiểm tra thời gian thu mẫu sau cảm ứng phù hợp. Quy trình được thực hiện như sau: Chúng *E. coli* BL21 chứa plasmid tái tổ hợp được nuôi trong 10 ml môi trường LB chứa ampicillin 100 µg/ml (môi trường LBamp) ở nhiệt độ 37°C, lắc ở tốc độ 250 vòng/phút trong 16 giờ. Dịch nuôi cấy được chuyển sang 100 ml môi trường nuôi cấy sau tối ưu có bổ sung ampicillin đến nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml với tỷ lệ tiếp giống là 1%. Dịch tế bào được tiếp tục nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C, lắc ở tốc độ 250 vòng/phút đến khi giá trị OD₆₀₀ đạt khoảng 0,6. Tiến hành cảm ứng tế bào với nồng độ IPTG tối ưu và nuôi cấy tiếp, nhiệt độ cảm ứng tối ưu, lắc 250 vòng/phút và thu mẫu ở các thời điểm 0 - 14 giờ sau cảm ứng. Lượng protein TrxBoNT/B-LC biểu hiện được xác định bằng đo Bradford kết hợp phân tích kết quả điện di trên gel polyacrylamide 12,6% bằng phần mềm Image J (Biorad).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Lựa chọn nhiệt độ cảm ứng phù hợp cho sự sinh tổng hợp protein TrxBoNT/B-LC tái tổ hợp

Việc sử dụng nhiệt độ tối ưu có thể giúp cho quá trình lên men tạo sinh khối diễn ra thuận lợi đạt hiệu quả cao, đồng thời cũng giúp tăng khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp cũng như tăng cường tính ổn định và giảm sự tích tụ của protein không tan. Các nghiên cứu trước đây cho thấy protein tái tổ hợp biểu hiện ở nhiệt độ thấp thường tồn tại ở dạng tan có hoạt tính, tuy nhiên tế bào sinh trưởng chậm, cần thời gian thu mẫu dài [10]. Ngược lại, protein biểu hiện ở nhiệt độ cao như 30, 37 và 40°C, đây là nhiệt độ phù hợp cho vi khuẩn phát triển do vậy sinh khối thu được nhiều, nhưng phần lớn protein tạo ra tồn tại ở dạng thể vùi (không tan). Do vậy, tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu mà lựa chọn nhiệt độ biểu hiện phù hợp. Trong nghiên cứu này, để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh tổng hợp TrxBoNT/B-LC tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành thử nghiệm nuôi cấy cảm ứng chủng *E. coli* tái tổ hợp ở các nhiệt độ cảm ứng khác nhau gồm 20, 25, 30 và 37°C. Quy trình được trình bày chi tiết trong phần phương pháp. Kết quả được trình bày trong Hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy cảm ứng lên khả năng sinh tổng hợp TrxBONT/B-LC

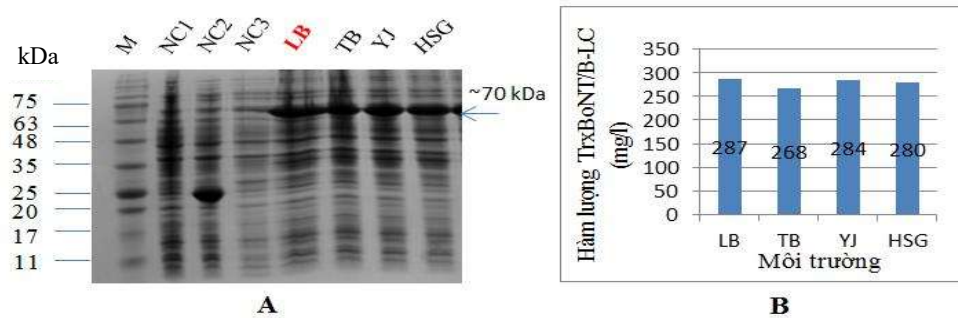
A: Điện di đồ SDS-PAGE phân tích protein tổng số (TS), pha tan (T) và không tan (KT) thu được từ tế bào *E. coli* được nuôi cấy biểu hiện protein tái tổ hợp ở các nhiệt độ khác nhau: 20°C, 25°C, 30°C và 37°C, M: Thang chuẩn protein. **B:** Hàm lượng TrxBONT/B-LC biểu hiện ở các nhiệt độ khác nhau: 20°C, 25°C, 30°C và 37°C được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

Phân tích kết quả điện di SDS-PAGE trên Hình 1A cho thấy, protein TrxBONT/B-LC biểu hiện tốt ở các nhiệt độ khảo sát và phần lớn protein biểu hiện ở dạng tan, hàm lượng protein và sinh khối tế bào đạt tốt nhất ở 37°C (Hình 1B). Tại nhiệt độ 37°C, hàm lượng protein tổng số đạt 230 mg/L môi trường, trong đó hàm lượng protein BoNT/B-LC ở dạng tan chiếm khoảng 85% protein tổng số. Để thu được lượng protein TrxBONT/B-LC pha tan cao nhất, nhiệt độ 37°C được lựa chọn làm điều kiện nuôi cấy cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo. Hiệu suất tổng hợp protein TrxBONT/B-LC trong nghiên cứu này cao hơn so với nghiên cứu của Jain và đồng tác giả năm 2011. Ở đó, chuỗi nhẹ BoNT/B cũng đã được tối ưu hóa mã bộ ba cho phù hợp với mã bộ ba của chủng vi khuẩn chủ. Tuy nhiên, protein BoNT/B-LC chủ yếu tồn tại ở thể vùi dẫn đến hiệu suất tinh sạch protein kém, chỉ đạt ≥ 15 mg protein tinh sạch từ 1 lít môi trường nuôi cấy [11]. Nghiên cứu của Gilsdorf và đồng tác giả (2006) đã chỉ ra hoạt tính của chuỗi nhẹ BoNT/B duy trì ổn định ở nhiệt độ lên đến 40°C và nhiệt độ 37°C đã được lựa chọn là nhiệt độ thích hợp cho sản xuất [12].

3.2. Lựa chọn môi trường nuôi cấy phù hợp cho sự sinh tổng hợp protein TrxBONT/B-LC tái tổ hợp

Sự tổng hợp protein trong tế bào *E. coli* chịu ảnh hưởng bởi các thành phần trong môi trường nuôi cấy như axit amin, vitamin, khoáng và các nguyên tố vi lượng cho sự sinh trưởng. Mỗi protein khác nhau sẽ có hiệu suất tổng hợp khác nhau trong các môi trường nuôi cấy khác nhau. Nghiên cứu đánh giá mức độ biểu hiện protein TrxBONT/B-LC tái tổ hợp ở các môi trường khác nhau: LB, YJ, TB và HSG. Quy trình nuôi cấy được thực hiện theo mô tả ở phần phương pháp, nhiệt độ cảm ứng thích hợp được tối ưu cho TrxBONT/B-LC là 37°C.

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 2A) đã cho thấy, tế bào *E. coli* BL21 (làn NC1) và BL21_pET-32a(+) (làn NC3) không cảm ứng IPTG không có sự biểu hiện protein BoNTs/LC; đối chứng NC2 là tế bào BL21 mang plasmid pET-32a(+) sau cảm ứng IPTG cho thấy có sự biểu hiện Thioredoxin 1 (trxA). Quan sát trên gel điện di ở Hình 2 cho thấy không có sự khác nhau nhiều về độ đậm của protein TrxBoNT/B-LC biểu hiện ở các môi trường LB, TB, YJ, HSG. Kết quả hàm lượng protein TrxBoNT/B-LC đạt cao nhất ở môi trường LB (287 mg/L môi trường), tiếp đến là môi trường YJ (284 mg/L môi trường), HSG (280 mg/L môi trường) và thấp nhất là TB (268 mg/L môi trường), tuy nhiên sự khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Lí giải cho việc này do các môi trường lựa chọn đều là môi trường giàu dinh dưỡng cho tế bào sinh trưởng tốt nên mức độ biểu hiện protein đích không có sự khác biệt lớn [13, 14]. Trong nghiên cứu nuôi cấy vi sinh, LB là môi trường giàu dinh dưỡng và phổ biến cho nuôi cấy nhiều chủng vi khuẩn khác nhau, với ưu điểm thành phần đơn giản, dễ chuẩn bị, giá thành rẻ, do vậy, chúng tôi lựa chọn LB là môi trường biểu hiện sinh tổng hợp TrxBoNT/B-LC.

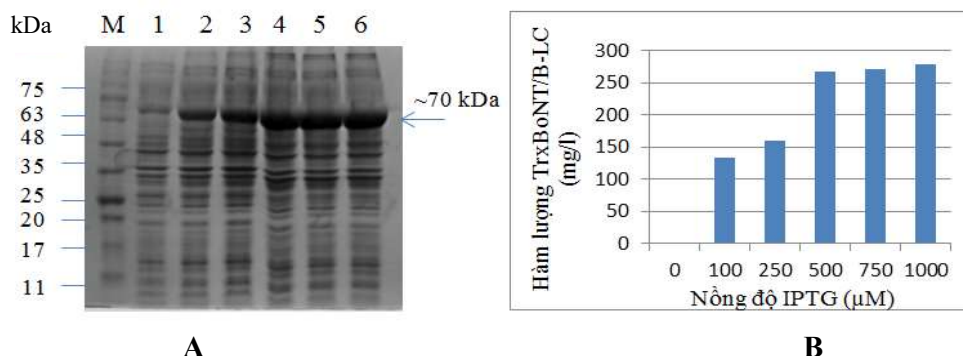


Hình 2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng biểu hiện TrxBoNT/B-LC tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3)

- A:** Điện di đồ SDS-PAGE phân tích protein tổng số thu được từ tế bào *E. coli* nuôi cấy trong các môi trường LB, TB, YJ và HSG, NC1: Protein tổng số chủng BL21_pET-32a(+) không cảm ứng IPTG, NC2: Protein tổng số chủng BL21_pET-32a(+) cảm ứng IPTG, NC3: Protein tổng số chủng BL21.
- B:** Hàm lượng TrxBoNT/B-LC biểu hiện khi nuôi cấy chủng ở các môi trường LB, TB, YJ và HSG được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

3.3. Lựa chọn nồng độ IPTG phù hợp cho sự sinh tổng hợp protein TrxBoNT/B-LC tái tổ hợp

IPTG là chất cảm ứng đối với T7 lac promoter giúp làm tăng sinh khối tế bào và sản xuất protein tái tổ hợp [15]. Đây là một cơ chất đắt tiền và có khả năng gây độc và ức chế sinh trưởng của tế bào ở nồng độ cao [16]. Việc điều chỉnh nồng độ IPTG, protein tái tổ hợp có thể được biểu hiện ở mức độ thấp hơn giúp làm tăng khả năng hòa tan và đảm bảo hoạt tính sinh học [17]. Để kiểm tra, chúng tôi đã nuôi cấy tế bào trong điều kiện có chất cảm ứng IPTG ở các nồng độ 0; 100; 250; 500; 750 và 1000 μM ở OD₆₀₀ đạt 0,6 trong môi trường nuôi cấy LB, nhiệt độ cảm ứng với TrxBoNT/B-LC là 37°C, thời gian nuôi cấy sau cảm ứng là 8 giờ.



Hình 3. Ảnh hưởng của IPTG lên khả năng sinh tổng hợp TrxBonT/B-LC
A: Điện di đồ SDS-PAGE phân tích protein tổng số thu được từ tế bào được nuôi cấy ở các nồng độ chất cảm ứng khác nhau, M: Protein chuẩn. Làn 1-6: Nồng độ IPTG khảo sát: 0; 100; 250; 500; 750 và 1000 μM. **B:** Hàm lượng TrxBonT/B-LC biểu hiện khi nuôi cấy chủng ở các nồng độ IPTG khác nhau được phân tích bằng phần mềm ImageJ.

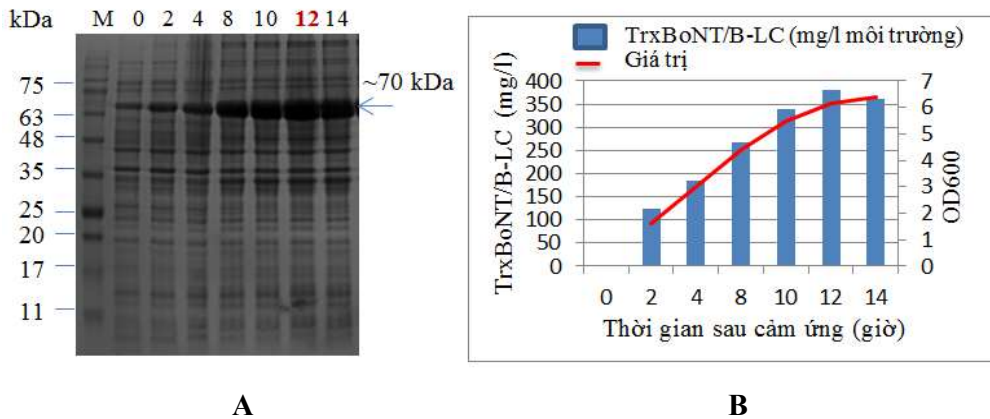
Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 3) cho thấy, protein TrxBonT/B-LC tái tổ hợp bắt đầu biểu hiện ở nồng độ 100 μM IPTG và hàm lượng protein tăng dần khi tăng nồng độ IPTG từ 100-500 μM. Không có sự khác biệt nhiều về hàm lượng protein TrxBonT/B-LC khi tăng nồng độ IPTG từ 500 lên 1000 μM, cụ thể hàm lượng protein TrxBonT/B-LC cảm ứng ở các nồng độ 500; 750 và 1000 μM IPTG lần lượt là 268, 271 và 277 mg/l. Do vậy, trong nghiên cứu này để tiết kiệm chi phí sản xuất, chúng tôi lựa chọn nồng độ chất cảm ứng IPTG cho sinh tổng hợp protein TrxBonT/B-LC là 500 μM.

3.4. Lựa chọn thời gian thu mẫu cho sinh tổng hợp TrxBonT/B-LC tái tổ hợp

Tế bào *E. coli* nuôi cấy chỉ sinh trưởng đến một nồng độ nhất định rồi dừng lại. Thời gian nuôi cấy quá dài sẽ dẫn đến tế bào sinh trưởng trong điều kiện dinh dưỡng hạn chế. Các tế bào già sẽ chết khi bước vào pha cân bằng, dẫn đến giảm hàm lượng protein tái tổ hợp trong tế bào [14]. Nhằm tối ưu hóa sản phẩm protein tái tổ hợp, một dải thời gian nuôi cấy sau cảm ứng IPTG được thực hiện bao gồm: 0, 2, 4, 8, 12, 14 giờ với các điều kiện nuôi cấy đã được tối ưu: tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp mang gen TrxBonT/B-LC được nuôi cấy trong môi trường LB, nhiệt độ cảm ứng là 37°C, nồng độ chất cảm ứng 500 μM IPTG. Kết quả điện di kiểm tra được trình bày ở Hình 4.

Trong thời gian đầu từ 0 đến 8 giờ tế bào tăng trưởng ổn định và bắt đầu tiến vào pha cân bằng. Lúc này, quá trình tổng hợp TrxBonT/B-LC diễn ra rất mạnh và mật độ tế bào gần như đạt đỉnh tại 12 giờ sau cảm ứng (đạt 380 mg/L môi trường nuôi cấy). Tại thời điểm 14 giờ sau cảm ứng, lượng TrxBonT/B-LC thu được giảm xuống khoảng 6% so với thời điểm 12 giờ. Nguyên nhân dẫn đến mật độ tế bào giảm có thể là do cạn kiệt nguồn dinh dưỡng và sự thay đổi pH môi trường. Nghiên

cứu này đã lựa chọn được thời gian thu mẫu là 12 giờ sau cảm ứng. Như vậy, sau khi tối ưu các điều kiện (nhiệt độ, môi trường, nồng độ IPTG và thời gian thu mẫu, mật độ tế bào biểu hiện) giá trị OD₆₀₀ tăng từ 5,2 lên 6,5, hàm lượng protein TrxB_oNT/B-LC tái tổ hợp thu được tăng từ khoảng 268 lên 380 mg/l môi trường nuôi cấy, gấp 1,7 lần trước tối ưu.



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy cảm ứng lên biểu hiện protein TrxB_oNT/B-LC tái tổ hợp theo thời gian

A: Điện di đồ SDS-PAGE phân tích protein tổng số thu được từ chủng *E. coli* tái tổ hợp được nuôi cấy đến các thời điểm khác nhau từ 0 đến 14 giờ sau cảm ứng.

B: Hàm lượng TrxB_oNT/B-LC thu được sau cảm ứng được phân tích bằng phần mềm ImageJ

4. KẾT LUẬN

Chủng *E. coli* BL21 sinh tổng hợp chuỗi nhẹ độc tố thần kinh botulinum type huyết thanh B với hiệu suất cao nhất đạt 380 mg/L khi được nuôi cấy trong môi trường LBA có bổ sung chất cảm ứng IPTG 500 μM ở 37°C, 250 vòng/phút trong 12 giờ. Sản lượng protein tái tổ hợp tăng 1,7 lần so với trước khảo sát.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Peck M. W., Stringer S. C., Carter A. T., *Clostridium botulinum in the post-genomic era*, Food Microbiol., 2011, **28**:183-191. DOI: 10.1016/j.fm.2010.03.005
2. Rasetti E. C., Popoff M. R., *Antibodies and vaccines against botulinum toxins: Available measures and novel approaches*, Toxins, 2019, **11**:528. DOI: 10.3390/toxins11090528
3. Peck M. W., *Clostridium botulinum and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue?*, J. Appl. Microbiol., 2006, **101**(3):556-70. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02987.x
4. Massimo C., Francesco I., *Botulinum neurotoxins (BoNTs) and their biological, pharmacological, and toxicological issues: A scoping review*, Appl. Sci., 2021, **11**(19). DOI: 10.3390/app11198849

5. Natalia V., Carmen L., *Human poisoning from marine toxins: Unknowns for optimal consumer protection*, Toxins (basel), 2018, **10**(8): 324. DOI: 10.3390/toxins10080324
6. Lacy D. B., Tepp W., Cohen A. C., DasGupta B. R., Stevens R.C., *Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity*, Nature Structural Biology, 1998, **5**:898-902. DOI: 10.1038/2338
7. Kriegstein K. G., DasGupta B. G., *Covalent structure of botulinum neurotoxin type A: location of sulfhydryl groups, and disulfide bridges and identification of C-termini of light and heavy chains*, J. Protein Chem., 1994, **13**(1):49-57. DOI: 10.1007/BF01891992
8. Giampietro G. S., Fabio B., *Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin*, Nature, 1992, **359**:832-835. DOI: 10.1038/359832a0
9. Paiva A., Poulain B., *A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly*, J. Biol. Chem., 1993, **268**(28):20838-44. DOI:10.1016/S0021-9258(19)36861-9
10. Rosano G. L., Ceccarelli E. A., *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*, Frontiers in Microbiology, 2014, **5**:172-172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
11. Jain S., Ponmariappan S., Kumar O., *Development of immunodetection system for botulinum neurotoxin type B using synthetic gene based recombinant protein*, Indian J. Med. Res., 2011, **134**(1):33-9. DOI:10.4103/ijmr.IJMR_1375_16
12. Gilsdorf J., Gul N., Smith L. A., *Expression, purification, and characterization of Clostridium botulinum type B light chain*, Protein Expr. Purif., 2006, **46**(2):256-67. DOI: 10.1016/j.pep.2005.09.024
13. Lindqvist B. H., Haggard E., Calendar R., *Giuseppe Bertani (1923-2015)*, Bacteriophage, 2015, **5**(2): e1054060. DOI: 10.1080/21597081.2015.1054060
14. Rosano G. L., Ceccarelli E. A., *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*, Frontiers in Microbiology, 2014, **5**:172-172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
15. Grabski A., Mehler M., Drott D., *The overnight express autoinduction system: high-density cell growth and protein expression while you sleep*, Nat. Meth., 2005, **2**:233-235. DOI:10.1038/nmeth0305-233
16. Pushkar M., *Effect of substrate and IPTG concentrations on the burden to growth of Escherichia coli on glycerol due to the expression of Lac proteins*, Microbiology and Biotechnology, 2012, **93**(6):2543-9. DOI: 10.1007/s00253-011-3642-3
17. Dormiani K., Khazaie K., Rabbani M., Moazen F., *Cloning and expression of a human tissue plasminogen activator variant: K2S in Escherichia coli*, Pakistan J. Biol. Sci., 2007, **10**:946-949. DOI: 10.3923/pjbs.2007.946.949

SUMMARY

INVESTIGATION OF CULTURE CONDITION FOR EXPRESSION OF RECOMBINANT *Clostridium botulinum*'s LIGHT CHAIN NEUROTOXIC TYPE B IN *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Botulinum neurotoxin (BoNT) was a protein known to cause poisoning through the gastrointestinal tract. Despite the low incidence rate of the disease, it exhibited a high mortality rate (5-10%) if not promptly diagnosed and treated. Most human poisoning cases were attributed to toxin types A, B, and E (with types A and B being the most toxic), while incidences involving other toxin types were infrequent. The BoNT protein was composed of two chains: the heavy chain (HC, approximately 100 kDa) and the light chain (LC, approximately 50 kDa), the latter being the toxic domain of BoNT. Research into creating BoNT toxin light chains established the scientific basis for developing preventive vaccines and immune diagnostic kits. To generate the botulinum neurotoxin type B light chain (BoNT/B-LC), a modified gene encoding the light chain from positions 1-450 amino acids was synthesized. This gene was then inserted into the plasmid pET-32a(+) and expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). To improve recombinant protein expression productivity, the study optimized the process for expressing recombinant BoNT/B protein at the laboratory flask scale. The *E. coli* strain BL21 carrying the BoNT/B-LC gene was cultured at 37°C in LB medium with an IPTG concentration of 500 µM and sampled at 12 hours. The optimized process increased recombinant TrxBoNT/B-LC protein content from approximately 268 mg/L to 380 mg/L of culture medium, a 1.7-fold increase compared to the previous optimization.

Keywords: Optimize expression, *Escherichia coli*, *Botulinum neurotoxin* (BoNTs), BoNT/B-LC, tối ưu biểu hiện.

Nhận bài ngày 10 tháng 7 năm 2024

Phản biện xong ngày 06 tháng 8 năm 2024

Hoàn thiện ngày 22 tháng 8 năm 2024

⁽¹⁾ Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Liên hệ: **Trịnh Văn Toàn**

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

Số 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

Điện thoại: 0983394016; Email: tvtoan.210594@gmail.com