

Tạo chủng *Escherichia coli* có khả năng chịu nồng độ ethanol cao để nâng cao hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp

Trần Thị Hậu, Trần Hồng Diễm, Phùng Thị Thu Hường

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Đại học Nguyễn Tất Thành
tthau@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Vi khuẩn *Escherichia coli* là một trong những vật chủ được sử dụng phổ biến nhất trong biểu hiện protein tái tổ hợp nhờ thời gian nuôi cấy ngắn và hiệu suất sinh khối cao. Tuy nhiên, các chủng *E. coli* thông thường thường không có sẵn các khả năng chịu với các chất ức chế hóa học hay các yếu tố bất lợi trong môi trường nuôi cấy, gây cản trở sự tăng sinh tế bào và giảm hiệu quả biểu hiện protein mục tiêu. Do đó, nghiên cứu đã phát triển chủng *E. coli* có khả năng đáp ứng trực tiếp với nồng độ ethanol cao nhằm tạo ra những biến đổi của tế bào liên quan đến thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp DNA và tăng hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp. Khả năng chịu nồng độ ethanol cao (7-8) % của chủng *E. coli* BL21(DE3) và *E. coli* C41(DE3) đã được cải thiện bằng phương pháp tiến hóa đáp ứng trong môi trường Luria-Bertani và môi trường muối cơ bản M9. Khi ứng dụng các chủng vi khuẩn đáp ứng làm vật chủ biểu hiện protein tái tổ hợp PETase, bước đầu đánh giá được hiệu quả biểu hiện protein đã được nâng cao đáng kể so với chủng chưa đáp ứng. Phát triển chủng *E. coli* có khả năng chịu nồng độ ethanol cao sẽ là yếu tố tiềm năng góp phần phát triển hệ thống biểu hiện hiệu quả trong sản xuất protein tái tổ hợp.

Nhận 06/09/2022
Được duyệt 27/10/2022
Công bố 02/11/2022

Từ khoá

tính chịu ethanol,
E. coli BL21(DE3),
E. coli C41(DE3),
PETase,
protein tái tổ hợp,
tiến hóa đáp ứng

© 2022 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Giới thiệu

Trên thế giới, nghiên cứu và ứng dụng công nghệ protein tái tổ hợp để sản xuất các loại enzyme công nghiệp đã phát triển mạnh mẽ trong nhiều thập kỷ qua. Các hệ thống biểu hiện protein bằng *E. coli* đã được phát triển và ứng dụng để tái tổ hợp các protein công nghiệp quan trọng vì chúng có nhiều ưu điểm nổi bật như điều kiện sinh trưởng dễ dàng, tích lũy sinh khối nhanh chóng và không yêu cầu các biến đổi sau dịch mã [1-3]. Tuy nhiên, các chủng *E. coli* truyền thống thường không có các khả năng chịu với các yếu tố bất lợi của môi trường nuôi cấy như các sản phẩm trao đổi chất (ethanol, axit,...) sinh ra trong quá trình tăng sinh hay độc tố từ quá trình biểu hiện protein của tế bào vi khuẩn. Những yếu tố bất lợi này có thể làm giảm hiệu

suất sinh khối và hiệu suất tổng hợp protein tái tổ hợp. Ở Việt Nam, các nghiên cứu mới tập trung vào vấn đề công nghệ để tạo ra protein mong muốn mà chưa chú ý đến việc cải thiện hệ thống vi sinh vật biểu hiện để nâng cao hiệu suất sản xuất protein tái tổ hợp.

Hiện nay, kỹ thuật tiến hóa đáp ứng trong phòng thí nghiệm (Adaptive Laboratory Evolution – ALE) đã và đang được áp dụng rộng rãi trong các nghiên cứu trên thế giới về tạo chủng tiến hóa đáp ứng [4]. Nhiều nghiên cứu gần đây đã khai thác thành công kỹ thuật này trên đối tượng vi khuẩn *E. coli* với các đặc điểm như hiệu quả sử dụng nguồn carbon được cải thiện, vi khuẩn có khả năng chịu các chất ức chế hóa học trong môi trường nuôi cấy như dung môi ethanol, butanol,...[5-8]. Tuy nhiên, kết quả đạt được chỉ dừng ở mức cải thiện tốc độ sinh trưởng, tăng lượng sinh khối thu được và đáp ứng mục

đích ứng dụng trực tiếp trong sản xuất nhiên liệu sinh học. Trong khi các nghiên cứu ngoài nước đã cho thấy hiệu quả và tiềm năng của việc sử dụng các chủng vi sinh tiến hóa đáp ứng thì tại Việt Nam chưa có công bố nào về xây dựng hệ thống vi sinh vật qua quá trình tiến hóa đáp ứng để tăng hiệu quả sản xuất sinh khối.

Thêm vào đó, một số nghiên cứu đã cho thấy việc bổ sung ethanol ở một mức độ không gây ức chế sự tăng trưởng của *E. coli* vào môi trường nuôi cấy biểu hiện có thể dẫn đến tăng biểu hiện của một số loại protein tái tổ hợp [9-11]. Khả năng thích ứng của *E. coli* với môi trường có chứa ethanol có thể được tạo ra từ những biến đổi của tế bào để thích nghi với yếu tố bất lợi đó và những biến đổi này được cho là có sự ảnh hưởng đến hiện tượng liên kết màng, như sao chép DNA, dẫn đến tăng cường sinh tổng hợp DNA và thúc đẩy tổng hợp protein của tế bào [12]. Giả thuyết đặt ra là chủng vi khuẩn *E. coli* được tạo ra từ quá trình tiến hóa đáp ứng lâu dài với những điều kiện bất lợi cũng có thể có những biến đổi tương tự trên tế bào. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu cụ thể nào liên quan đến việc tạo chủng vi khuẩn *E. coli* đáp ứng với nồng độ ethanol cao có thể làm tăng khả năng nâng cao hiệu quả biểu hiện các loại protein/enzyme tái tổ hợp.

Trong nghiên cứu này, kỹ thuật tiến hóa đáp ứng trong phòng thí nghiệm được áp dụng trên chủng *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* C41(DE3) được sử dụng phổ biến trong biểu hiện protein tái tổ hợp với mục tiêu chính là (1) tạo chủng vi khuẩn *E. coli* có khả năng chịu nồng độ ethanol cao, nhằm tăng khả năng thích ứng của tế bào vi khuẩn dưới điều kiện áp lực môi trường với nồng độ ethanol cao và (2) sử dụng chủng *E. coli* đã đáp ứng để đánh giá khả năng nâng cao hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Chủng vi khuẩn, môi trường

Hai chủng vi khuẩn *E. coli* là BL21(DE3) và *E. coli* C41(DE3) lưu trữ tại phòng thí nghiệm Sinh học phân tử tại Viện Kỹ thuật Công nghệ cao Nguyễn Tất Thành là đối tượng nghiên cứu chính. *E. coli* BL21(DE3) là vật chủ điển hình cho hệ thống biểu hiện protein bằng vi khuẩn [13-15]. Chúng sử dụng enzyme T7 RNA polymerase để phiên mã gen mục tiêu nằm sau vùng T7 promoter trên vector chuyển gen pET [16]. Chủng *E. coli* C41(DE3) là chủng đột biến từ *E. coli* BL21(DE3),

được chứng minh có thể nâng cao tính ổn định của plasmid trong quá trình biểu hiện của các protein sinh độc tố và có thể biểu hiện thành công các protein mà *E. coli* BL21(DE3) không biểu hiện được [17].

Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường Luria-Bertani (LB) (Peptone: 10 g/L, NaCl: 5 g/L, cao chiết nấm men: 5 g/L) và môi trường muối cơ bản M9 (Na₂HPO₄: 12,8 g/L; KH₂PO₄: 3,0 g/L; NaCl: 0,5 g/L; NH₄Cl: 1,0 g/L).

Plasmid mang gen mã hóa cho enzyme PETase

PETase là enzyme phân cắt đặc hiệu cơ chất nhựa polyethylene terephthalate (PET) [18]. Trong nghiên cứu này, enzyme PETase được sử dụng để đánh giá hiệu quả nâng cao biểu hiện protein tái tổ hợp của các chủng vi khuẩn thử nghiệm đáp ứng ethanol. Vector tái tổ hợp pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F mang gen mã hóa cho enzyme PETase được tổng hợp từ GenScript, Mỹ.

*Kháng thể kháng 6*His*

Kháng thể kháng 6*His (Proteintech, Singapore) được sử dụng trong nghiên cứu là kháng thể đơn dòng được sản xuất từ chuột, nhận diện đặc hiệu đuôi polyhistidine (6*His). Kháng thể được thiết kế gắn trực tiếp với một phân tử tín hiệu phát quang là enzyme horseradish peroxidase (HRP). Do đó, có thể phát hiện vị trí protein mục tiêu trên màng lai ngay sau một lần ủ kháng thể mà không cần đến bước ủ kháng thể thứ cấp.

2.2 Phương pháp

Thử nghiệm khoảng chịu ethanol

Chủng *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) từ dịch khuẩn lưu trữ ở -80 °C được nuôi cấy phục hồi trong môi trường LB/M9 lỏng ở điều kiện nuôi cấy là 37 °C, lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ. Cây chuyển theo tỉ lệ pha loãng 1 % và nuôi ở 37 °C trong 16 giờ, sau đó đo giá trị mật độ quang OD₆₀₀ và pha loãng dịch nuôi cấy để đạt OD₆₀₀ = 0,01. Bổ sung ethanol 99 % theo các nồng độ (3, 4, 5, 6, 7 và 8) % (v/v) vào mỗi ống và kèm theo mẫu đối chứng âm không chứa ethanol, đóng kín nắp và nuôi ở 37 °C, đo mật độ tế bào sau 24 giờ nuôi cấy. Xác định khoảng chịu ethanol của *E. coli* BL21(DE3) và *E. coli* C41(DE3).

Tạo chủng đáp ứng

Một khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) và *E. coli* C41(DE3) được cấy vào môi trường LB/M9 lỏng, ủ 37 °C trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy tiếp tục được chuyển vào môi trường LB/M9 mới để đạt giá trị OD₆₀₀ = 0,01, bổ sung X % ethanol 99 % (v/v) (X là nồng độ ethanol tối thiểu

trong môi trường nuôi cấy ức chế sự sinh trưởng của vi khuẩn). Lặp lại quy trình cấy chuyển ba lần ở ethanol nồng độ X % và mỗi nồng độ ethanol tăng dần 0,2 % ($X + 0,2$ %).

Sau mỗi nồng độ ethanol được đáp ứng, một thể tích nuôi cấy thích hợp được trải trên môi trường thạch LB/M9 để chọn khuẩn lạc. Bất kì khuẩn lạc nào có hình thái bất thường được lưu ý để tránh nhiễm. Các tế bào có khả năng chịu ethanol tốt nhất được giữ trong glycerol 25 % (đã khử trùng) ở -80 °C.

Thử thách khả năng chịu ethanol nồng độ cao

Một khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) được cấy vào môi trường LB/M9 lỏng và nuôi lắc ở 37 °C trong 3 giờ. Dịch nuôi cấy (0,5 mL) được thêm vào 4,5 mL môi trường LB/M9 sạch có chứa 14 % ethanol (đối với chủng nuôi trong môi trường LB) và 12 % ethanol (đối với môi trường M9), giữ ở nhiệt độ phòng trong 2 phút. Chuẩn bị bốn độ pha loãng liên tiếp (1:10) của dịch nuôi cấy trên trong môi trường LB/M9 sạch. Dung dịch pha loãng được trải đều lên đĩa thạch LB/M9 và ủ ở 37 °C qua đêm để đếm số lượng các tế bào sống sót (theo số khuẩn lạc). Quy trình pha loãng và đếm khuẩn lạc được áp dụng tương tự cho các mẫu cấy không trải qua thử thách ethanol, được sử dụng làm mẫu đối chứng. Tỷ lệ sống sót của tế bào là tỷ lệ số khuẩn lạc của môi trường nuôi cấy thử thách với ethanol với số lượng khuẩn lạc của môi trường nuôi cấy đối chứng.

Đánh giá khả năng nâng cao hiệu quả biểu hiện enzyme PETase

Vector tái tổ hợp pET21b(+)-Is-PETase-W159H-S238F mang gen mã hóa cho protein PETase được chuyển vào trong tế bào nhận thông qua phương pháp chuyển gen bằng sốc nhiệt. Thí nghiệm thực hiện đồng thời với chủng đối chứng là chủng *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) chưa qua đáp ứng. Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp giữa chủng vi khuẩn đáp ứng và chủng gốc được so sánh để đánh giá sự khác biệt.

Tế bào *E. coli* khả nạp được tạo ra bằng cách xử lý tế bào với CaCl_2 [19]. Sau khi trở nên khả nạp, tế bào *E. coli* được chuyển qua giai đoạn sốc nhiệt ở 42 °C giúp kích thích chuyển phân tử plasmid vào trong tế bào. Cụ thể, thêm vào ống chứa 100 μL tế bào khả nạp (đã được rửa đông trên đá) khoảng 5 ng plasmid mang gen mã hóa cho các protein PETase. Giữ các ống tế bào trên đá trong 30 phút. Chuyển ống tế bào vào máy ủ nhiệt ở 42 °C, ủ tế bào trong vòng 1 phút, sau đó đưa vào đá lạnh trong 5 phút. Thêm 1 mL LB vô trùng và ủ tế bào ở 37

°C trong 60 phút. Môi trường dưỡng chất LB cho phép tế bào hồi phục và plasmid tiến hành sao chép, phiên mã và dịch mã tạo nên protein mục tiêu. Trải dịch tế bào lên đĩa thạch LB có chứa 100 $\mu\text{g/mL}$ kháng sinh ampicillin.

Chủng *E. coli* BL21(DE3), C41(DE3)/pET21b(+)-Is-PETase được nhân lên trong môi trường LB/M9 có bổ sung 3 % ethanol và kháng sinh ampicillin nồng độ 100 $\mu\text{g/mL}$, nuôi cấy lắc 30 °C, 150 vòng/phút đến khi OD_{600} đạt giá trị từ 0,4 đến 0,5. Ngay sau đó, chất cảm ứng IPTG được bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng biểu hiện protein mong muốn, tiếp tục nuôi cấy lắc ở 30 °C. Dãy nồng độ IPTG khảo sát là (0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; và 0,1) mM. Sinh khối vi khuẩn được thu nhận sau (1, 2, và 4) giờ cảm ứng IPTG và ly giải tế bào bằng phương pháp xử lý nhiệt. Tế bào thu được được rửa một lần với PBS 1X và hòa tan lại trong PBS 1X để đạt giá trị $\text{OD}_{600} = 10$. Một tỉ lệ của mẫu, SDS 10 %, protein loading dye 4X (9:3:4) được vortex và đun ở 100 °C trong vòng 10 phút. Lượng protein thu được được đánh giá ở các điều kiện IPTG và thời gian cảm ứng khác nhau.

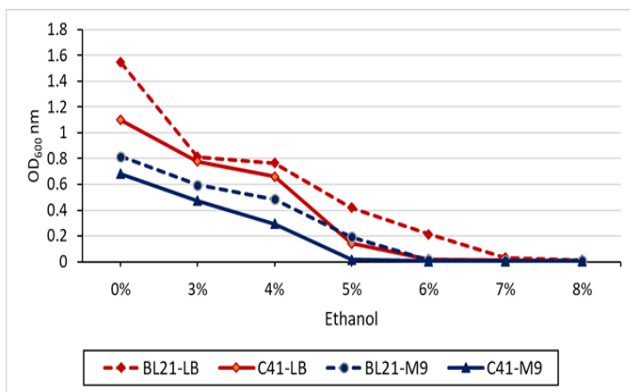
Kết quả biểu hiện PETase được xác nhận bằng phương pháp điện di Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel Electrophoresis (SDS-PAGE) và phương pháp lai miễn dịch Western blot với kháng thể kháng 6*His [20].

3 Kết quả

3.1 Khoảng chịu ethanol của *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3)

Khảo sát khoảng chịu ethanol của *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) ở các nồng độ ethanol (3, 4, 5, 6, 7, và 8) % cho thấy *E. coli* BL21(DE3) trong môi trường nuôi cấy LB có chứa 5 % ethanol và trong môi trường M9 có chứa 4 %, tế bào vi khuẩn vẫn sinh trưởng tốt (giá trị OD_{600} từ 0,4 đến 0,5). Ở các nồng độ ethanol cao hơn, vi khuẩn bắt đầu sinh trưởng kém và gần như không có sự phân chia tế bào vi khuẩn ở nồng độ từ 6 % đến 8 % ethanol (Hình 1). Đối với chủng *E. coli* C41(DE3), tế bào vi khuẩn vẫn sinh trưởng tốt trong môi trường LB có chứa 4 % ethanol và trong môi trường M9 có chứa 3 % ethanol; sự ức chế sinh trưởng xảy ra tương tự như chủng *E. coli* BL21(DE3) khi nồng độ ethanol tăng dần (Hình 1). Ở thí nghiệm khảo sát ban đầu, chủng *E. coli* BL21(DE3) có tốc độ tăng trưởng và khả năng chịu ethanol cao hơn so với chủng *E. coli* C41(DE3).





Hình 1 Khả năng chịu ethanol của *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) ở các nồng độ (3, 4, 5, 6, 7 và 8) % trong môi trường nuôi cấy LB/M9.

3.2 Tạo chủng *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) đáp ứng với môi trường có nồng độ ethanol cao

Sau khi khảo sát khoảng chịu ethanol của các chủng vi khuẩn, các nồng độ ethanol được đánh giá là nồng độ ức chế đáng kể sự sinh trưởng của vi khuẩn sẽ được chọn để thực hiện thí nghiệm tạo chủng đáp ứng. Dịch khuẩn được cấy chuyển lặp lại 3 lần ở mỗi nồng độ ethanol. Sau mỗi nồng độ ethanol đã đáp ứng, vi khuẩn được chuyển sang môi trường có nồng độ ethanol cao hơn nồng độ cũ 0,2 %. Kết quả ghi nhận được sự sinh trưởng của vi khuẩn ngày càng giảm theo dãy nồng độ ethanol đáp ứng tăng dần và duy trì ở mức thấp hơn so với sự tăng trưởng của vi khuẩn ở môi trường nuôi cấy bình thường (dữ liệu không trình bày). Điều này chứng minh rằng nồng độ ethanol cao trong môi trường nuôi cấy đã ức chế đáng kể sự sinh trưởng và phân chia tế bào vi khuẩn, qua quá trình đáp ứng, chỉ những tế bào đã có sự thay đổi để thích nghi với môi trường bất lợi mới có khả năng sống sót. Tuy nhiên, nghiên cứu của Wang và cộng sự đã cho thấy, khi tăng thời gian đáp ứng của chủng *E. coli* KC01 ở mỗi nồng độ ethanol lên 7 ngày. Trong (3-4) ngày đầu, sự tăng trưởng của vi khuẩn chậm nhưng ở ngày nuôi cấy thứ 6, thứ 7, vi khuẩn có thể tăng trưởng tốt, mật độ tế bào tăng cao [7]. Do đó, ở thử nghiệm này, tăng thời gian nuôi cấy đáp ứng tại mỗi nồng độ ethanol có thể có khả năng cải thiện sự tăng trưởng và thích nghi của tế bào với môi trường có nồng độ ethanol cao.

3.3 Đánh giá khả năng chịu ethanol của chủng đáp ứng

Khả năng chịu ethanol trong môi trường nuôi cấy của vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) được đánh giá bằng cách xác định tỉ lệ sống sót của các tế bào trong

môi trường có nồng độ ethanol cao gấp hai lần mức đáp ứng trong 2 phút. Kết quả cho thấy tế bào đã đáp ứng với ethanol ít bị thiệt hại hơn so với tế bào chưa đáp ứng (Bảng 1). Đối với chủng *E. coli* BL21(DE3) đáp ứng, tỉ lệ sống sót của tế bào qua thử thách nồng độ ethanol cao (14 %) trong môi trường LB/M9 lần lượt là 66,75 % và 65,13 %, trong khi tỉ lệ sống sót của chủng đối chứng trong điều kiện thách thức ethanol tương tự thấp hơn đáng kể so với chủng đáp ứng với các tỉ lệ lần lượt là 34,97 % và 42,19 %. Đối với chủng *E. coli* C41(DE3) đáp ứng, tỉ lệ sống sót của tế bào vi khuẩn trong môi trường LB/M9 có bổ sung 12 % ethanol là 90,24 % và 97,16 %, tỉ lệ này cao hơn so với chủng đối chứng là 65,6 % và 69,23 %. Nồng độ ethanol cao trong môi trường nuôi cấy đã ức chế sự sinh trưởng và phân chia của tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) chưa đáp ứng. Chỉ những tế bào có khả năng chịu ethanol mới có khả năng sống sót và nhân lên. Do đó, tỉ lệ sống sót của tế bào vi khuẩn đã thích nghi với môi trường có ethanol cao hơn so với chủng chưa đáp ứng. Kết quả này tương tự với kết quả từ nghiên cứu của Wang và cộng sự năm 2011 [7].

Sau quá trình thử nghiệm tạo chủng đáp ứng, nghiên cứu đã tạo được hai chủng *E. coli* BL21(DE3) mới (*E. coli* BL21-LE và *E. coli* BL21-ME) có khả năng chịu ở nồng độ ethanol 8 % và 7 % tương ứng trong môi trường nuôi cấy LB và M9, nồng độ ethanol đáp ứng cao hơn so với mức chịu ban đầu của chủng gốc là 2 %. Đồng thời, thử nghiệm đáp ứng cũng tạo ra hai chủng *E. coli* C41(DE3) mới (*E. coli* C41-LE và *E. coli* C41-ME) được cải thiện khả năng chịu ethanol và có thể sống sót trong môi trường LB có chứa 7 % ethanol và môi trường M9 có chứa 6 % ethanol, mức chịu ethanol cao hơn so với chủng gốc 2 %. Một khuẩn lạc của mỗi chủng đáp ứng được lưu trữ trong glycerol 25 % trong môi trường LB/M9 ở điều kiện -80 °C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

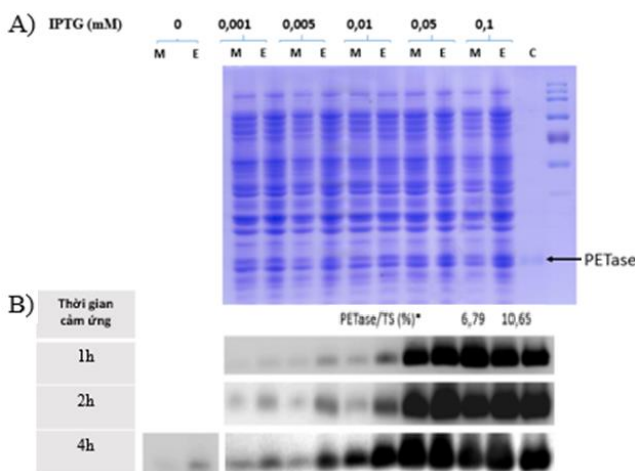
Bảng 1 Tỉ lệ sống sót của tế bào vi khuẩn trong môi trường nồng độ ethanol cao

Chủng	Đối chứng (số khuẩn lạc)	Ethanol nồng độ cao (số khuẩn lạc)	Tỉ lệ sống sót (%)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	366	128	34,97
<i>E. coli</i> BL21-LE	418	279	66,75
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	128	54	42,19
<i>E. coli</i> BL21-ME	218	142	65,13

<i>E. coli</i> C41(DE3)	157	103	65,60
<i>E. coli</i> C41 - LE	82	74	90,24
<i>E. coli</i> C41(DE3)	143	99	69,23
<i>E. coli</i> C41 - ME	106	103	97,16

3.4 Đánh giá khả năng nâng cao hiệu quả biểu hiện enzyme PETase của chủng *E. coli* BL21(DE3) đáp ứng ethanol nồng độ cao

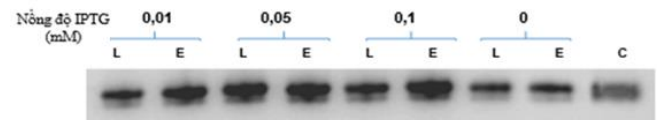
Chủng *E. coli* BL21-ME đã đáp ứng với môi trường nuôi cấy M9 có chứa 7 % ethanol được sử dụng để biểu hiện enzyme PETase ở các điều kiện khác nhau. Ở tất cả các điều kiện khảo sát bao gồm nồng độ IPTG từ (0,001 đến 0,1) mM, thời gian cảm ứng trong (1, 2, và 4) giờ, *E. coli* BL21-ME đều biểu hiện enzyme PETase tốt hơn so với chủng gốc (Hình 2). Kết quả Western blot cho thấy lượng protein PETase biểu hiện bằng chủng đáp ứng *E. coli* BL21-ME (kí hiệu “E”) cao hơn so với chủng chưa đáp ứng (kí hiệu “M”). Sự khác biệt về hiệu quả biểu hiện protein PETase giữa chủng đáp ứng *E. coli* BL21-ME và chủng gốc *E. coli* BL21(DE3) khác biệt rõ ràng nhất ở nồng độ IPTG là 0,01 mM sau 4 giờ cảm ứng. Dựa trên kết quả phân tích từ phần mềm ImageJ, tính toán được lượng protein PETase tạo ra từ chủng đáp ứng cao hơn so với chủng gốc 1,8 lần. Ở nồng độ IPTG (0,001 và 0,005) mM, lượng protein PETase tạo ra thấp, thể hiện thông qua các vạch protein mờ trên màng lai. Ở cả hai chủng vi khuẩn đáp ứng và chủng đối chứng, nồng độ IPTG (0,05 và 0,1) mM là nồng độ phù hợp để PETase biểu hiện tốt nhất.



*Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ

Hình 2 Biểu hiện enzyme PETase của chủng *E. coli* BL21-ME kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (A) và phương pháp lai Western blot (B). M: chủng *E. coli* BL21(DE3) đối chứng; E: chủng *E. coli* BL21-ME đã đáp ứng; C: enzyme PETase tinh sạch.

Trong môi trường nuôi cấy biểu hiện LB, chủng *E. coli* BL21-LE có khả năng chịu 8 % ethanol cũng cho thấy hiệu quả nâng cao biểu hiện protein PETase so với chủng gốc (Hình 3). Ở nồng độ IPTG 0,1 mM, sự khác biệt về hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp của chủng đáp ứng và chủng gốc thể hiện rõ ràng nhất và hiệu suất biểu hiện PETase từ chủng đáp ứng là cao nhất, gấp 1,5 lần so với chủng gốc (dữ liệu phân tích bằng phần mềm ImageJ). Ở nồng độ IPTG 0,05 mM, mức độ biểu hiện PETase không có sự khác biệt đáng kể.

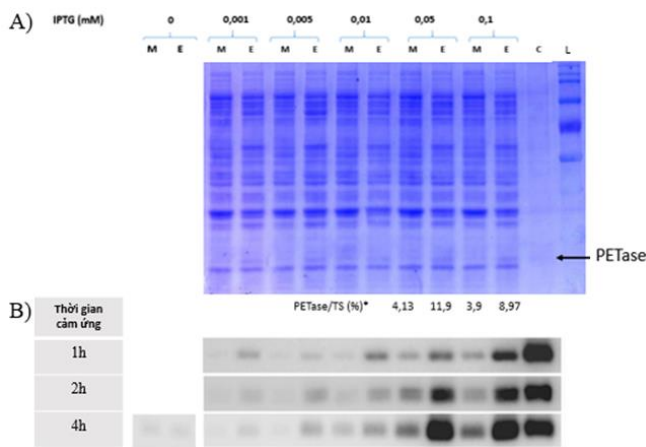


Hình 3 Biểu hiện enzyme PETase của chủng *E. coli* BL21-LE. L: chủng *E. coli* BL21(DE3) đối chứng; E: chủng *E. coli* BL21-LE đáp ứng; C: enzyme PETase tinh sạch.

Như vậy, chủng *E. coli* BL21(DE3) đã đáp ứng với môi trường có nuôi cấy LB/M9 có nồng độ ethanol cao cho hiệu suất biểu hiện protein PETase cao hơn so với chủng gốc.

3.5 Đánh giá khả năng nâng cao hiệu quả biểu hiện enzyme PETase của chủng *E. coli* C41(DE3) đáp ứng ethanol nồng độ cao

Chủng *E. coli* C41-ME đã đáp ứng với môi trường nuôi cấy M9 có chứa 6 % ethanol được sử dụng làm vật chủ biểu hiện để khảo sát biểu hiện của enzyme PETase. Đồng thời hiệu quả biểu hiện cũng đã được so sánh với sự biểu hiện PETase của chủng gốc *E. coli* C41(DE3) thực hiện ở điều kiện thí nghiệm tương tự. Kết quả thu được cho thấy lượng enzyme PETase tạo ra từ chủng *E. coli* C41-ME vượt trội hơn so với chủng gốc (Hình 4). Ở tất cả các nồng độ IPTG được khảo sát từ (0,001 đến 0,1) mM, vạch hiển thị kết quả lượng protein PETase thu được sau (1, 2, và 4) giờ nuôi cấy biểu hiện ở chủng *E. coli* C41-ME (kí hiệu “E”) luôn cao hơn so với chủng gốc *E. coli* C41(DE3) đối chứng (kí hiệu “M”). Lượng protein thu được từ chủng đáp ứng và chủng đối chứng khác biệt rõ nhất ở nồng độ IPTG là (0,05 và 0,1) mM sau 4 giờ cảm ứng biểu hiện, lượng protein PETase do *E. coli* C41-ME biểu hiện cao hơn lần lượt là 3,5 lần và 2,9 lần so với chủng đối chứng (dữ liệu phân tích từ phần mềm ImageJ). Ở các nồng độ còn lại bao gồm (0,001; 0,005; và 0,01) mM, lượng protein tạo ra ít, vạch protein mục tiêu hiển thị trên màng lai mờ.



*Dữ liệu được phân tích bằng phần mềm ImageJ

Hình 4 Kiểm tra biểu hiện enzyme PETase của chủng *E. coli* C41-ME bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (A) và phương pháp lai Western blot (B). M: chủng *E. coli* C41(DE3) đối chứng; E: chủng *E. coli* C41-ME đáp ứng; C: enzyme PETase tinh sạch; L: thang protein.

Chủng *E. coli* C41-LE đã đáp ứng với môi trường LB có chứa 7 % ethanol cũng được sử dụng để đánh giá hiệu quả biểu hiện enzyme PETase. Thử nghiệm được khảo sát ở các nồng độ IPTG là (0,01; 0,05 và 0,1) mM, thời gian cảm ứng là 4 giờ. Kết quả thể hiện Western blot trên cho thấy hiệu quả biểu hiện PETase bằng chủng *E. coli* C41-LE đã đáp ứng cao hơn so với chủng gốc (Hình 5). Ở nồng độ IPTG là 0,05 mM, lượng enzyme PETase biểu hiện giữa chủng đáp ứng *E. coli* C41-LE và chủng gốc *E. coli* C41(DE3) có sự khác biệt rõ ràng nhất, hiệu suất tổng hợp protein mục tiêu của *E. coli* C41-LE cao hơn 2,1 lần (dữ liệu phân tích từ phần mềm ImageJ). Tuy nhiên, sự khác biệt về hiệu quả biểu hiện PETase của chủng *E. coli* C41-LE đáp ứng trong môi trường LB không nổi bật như chủng *E. coli* C41-ME.



Hình 5 Kết quả biểu hiện enzyme PETase của chủng *E. coli* C41-LE. L: chủng *E. coli* C41(DE3) đối chứng; E: chủng *E. coli* C41-LE đáp ứng; C: enzyme PETase tinh sạch

4 Thảo luận

Nghiên cứu “Tạo chủng *Escherichia coli* có khả năng chịu nồng độ ethanol cao để nâng cao hiệu quả biểu

hiện protein tái tổ hợp” đã tạo ra chủng vi khuẩn *E. coli* BL21-LE có khả năng chịu 8 % ethanol trong môi trường LB và *E. coli* BL21-ME có khả năng chịu 7 % ethanol trong môi trường M9. Đồng thời, nghiên cứu cũng tạo ra chủng *E. coli* C41-LE có khả năng sống sót ở nồng độ ethanol 7 % trong môi trường LB và C41-ME có khả năng sống sót ở 6 % ethanol trong môi trường M9. Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy *E. coli* BL21(DE3) có khả năng sinh trưởng tốt hơn và có khả năng chịu với ethanol cao hơn so với chủng *E. coli* C41(DE3). Trong thí nghiệm thử thách khả năng chịu ethanol nồng độ cao của chủng *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3), nồng độ ethanol cao ít gây thiệt hại cho tế bào đã đáp ứng hơn so với tế bào chưa đáp ứng. Điều này cho thấy nồng độ ethanol cao trong môi trường nuôi cấy đã ức chế sự sinh trưởng, phân chia và có thể gây chết tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) chưa đáp ứng, chỉ những tế bào có khả năng chịu ethanol mới có khả năng sống sót và nhân lên.

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) đã đáp ứng cũng được ứng dụng để làm vật chủ biểu hiện cho enzyme PETase nhằm đánh giá khả năng nâng cao hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp của chúng so với chủng gốc. Kết quả cho thấy, chủng vi khuẩn đáp ứng với môi trường có chứa nồng độ ethanol cao đã góp phần nâng cao hiệu quả biểu hiện enzyme PETase. Đối với chủng *E. coli* BL21-ME, sự khác biệt về hiệu quả biểu hiện PETase thể hiện rõ nhất ở nồng độ chất cảm ứng là 0,01 mM sau 4 giờ cảm ứng trong môi trường nuôi cấy biểu hiện M9. Đối với chủng *E. coli* C41(DE3), chủng đáp ứng mang lại hiệu quả biểu hiện enzyme PETase cao hơn rõ rệt so với chủng gốc ở tất cả các nồng độ IPTG được khảo sát. Đặc biệt, trong điều kiện môi trường nuôi cấy LB, nồng độ chất cảm ứng IPTG là (0,05 và 0,1) mM, thời gian cảm ứng là 4 giờ, lượng enzyme PETase biểu hiện từ chủng đáp ứng cao nhất và cho thấy sự khác biệt rõ so với chủng đối chứng.

Nhìn chung, việc sử dụng các chủng *E. coli* đáp ứng với môi trường nuôi cấy có chứa nồng độ ethanol cao đã nâng cao hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp PETase so với chủng gốc. Mức độ cải thiện biểu hiện tùy thuộc vào chủng vi khuẩn biểu hiện, môi trường nuôi cấy, nồng độ chất cảm ứng IPTG và thời gian cảm ứng biểu hiện khác nhau. Trong quá trình tạo đáp ứng của chủng *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) với môi trường có nồng độ ethanol cao, ethanol có thể tạo ra ảnh hưởng

lớn đến môi trường sống của tế bào vi khuẩn và gây ra những biến đổi về tính lưu động của màng, vận chuyển qua màng, thành phần lipid màng và sự sắp xếp của các protein màng [21-23]. Những thay đổi này có thể ảnh hưởng đến hiện tượng liên kết màng, chẳng hạn như quá trình sao chép DNA, dẫn đến tăng cường tổng hợp DNA [12]. Việc tăng cường tổng hợp DNA có thể dẫn đến tăng quá trình phiên mã và dịch mã protein mong muốn trong các tế bào được xử lý bằng ethanol. Do đó, lượng enzyme PETase được biểu hiện từ chủng đáp ứng cao hơn so với chủng gốc. Ngoài ra, trong quá trình nuôi cấy biểu hiện, việc tăng sinh và biểu hiện protein của vi khuẩn có thể sản sinh ra các loại độc tố, các sản phẩm trao đổi chất hoặc xuất hiện các yếu tố bất lợi trong quá trình nuôi cấy như sự không ổn định về nhiệt độ, thay đổi pH, nồng độ các chất dinh dưỡng thấp, ..., gây ức chế ngược lại sự sinh trưởng và khả năng biểu hiện protein của vi khuẩn. Do đó, việc tạo ra các chủng vi khuẩn có khả năng thích ứng trực tiếp với các yếu tố bất lợi trong môi trường sinh trưởng có thể sẽ làm tăng khả năng sống sót và cải thiện hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp.

5 Kết luận

Đây là nghiên cứu đầu tiên trong nước tạo chủng vi khuẩn tiến hóa đáp ứng với nồng độ ethanol cao trong phòng thí nghiệm và ứng dụng làm chủng chủ biểu hiện

trong công nghệ sản xuất protein tái tổ hợp. Bước đầu nghiên cứu đã mang lại những kết quả nổi bật. Qua nhiều thế hệ nuôi cấy đáp ứng, chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) và C41(DE3) có khả năng chịu với nồng độ ethanol cao trong môi trường LB/M9 được tạo ra và khi ứng dụng làm chủng chủ trong biểu hiện protein tái tổ hợp đã góp phần nâng cao hiệu quả biểu hiện protein PETase. Tuy nhiên, ở thí nghiệm tạo chủng đáp ứng, thời gian cấy chuyển ở mỗi nồng độ ethanol đáp ứng ngắn (3 ngày), do đó, chưa thể thấy rõ được sự đáp ứng của tế bào với môi trường bất lợi, những tế bào chưa hoàn toàn thích nghi vẫn tiếp tục bị ức chế sự sinh trưởng bởi ethanol. Vì vậy nghiên cứu cần tăng thêm thời gian nuôi cấy đáp ứng tại mỗi nồng độ ethanol để có thể đánh giá rõ sự tăng trưởng và thích nghi của tế bào với môi trường có nồng độ ethanol cao. Đối với thử nghiệm đánh giá hiệu quả nâng cao biểu hiện protein tái tổ hợp, cần sử dụng chủng đáp ứng để biểu hiện thêm một số enzyme có giá trị ứng dụng nhằm đánh giá toàn diện về hiệu quả nâng cao biểu hiện protein tái tổ hợp của chủng vi khuẩn đáp ứng với môi trường có nồng độ ethanol cao.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2021.01.106/HĐ-KHCN.



Tài liệu tham khảo

1. Chen, S., Pan, L., Liu, S., Pan, L., Li, X., & Wang, B. (2021). Recombinant Expression and Surface Display of a Zearalenone Lactonohydrolase from *Trichoderma Aggressivum* in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif*, *187*, 105933. <https://DOI.org/10.1016/j.pep.2021.105933>.
2. Seyfi, R., Babaeipour, V., Mofid, M. R., & Kahaki, F. A. (2019). Expression and Production of Recombinant Scorpine as a Potassium Channel Blocker Protein in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem*, *66(1)*, 119-129. <https://DOI.org/10.1002/bab.1704>.
3. Janatunaim, R. Z., & Fibrani, A. (2020). Construction and Cloning of Plastic-Degrading Recombinant Enzymes (MHETase). *Recent Pat. Biotechnol*, *14(3)*, 229–234. <https://DOI.org/10.2174/1872208314666200311104541>.
4. Dragosits, M., & Mattanovich, D. (2013). Adaptive Laboratory Evolution - Principles and Applications for Biotechnology. *Microb. Cell Fact*, *12(1)*, 1. <https://DOI.org/10.1186/1475-2859-12-64>.
5. Matsusako, T., Toya, Y., Yoshikawa, K., & Shimizu, H. (2017). Identification of Alcohol Stress Tolerance Genes of *Synechocystis* Sp. PCC 6803 Using Adaptive Laboratory Evolution. *Biotechnol. Biofuels*, *10(1)*, 1-9. <https://DOI.org/10.1186/s13068-017-0996-5>.
6. Horinouchi, T., Suzuki, S., Hirasawa, T., Ono, N., Yomo, T., Shimizu, H., & Furusawa, C. (2015). Phenotypic Convergence in Bacterial Adaptive Evolution to Ethanol Stress. *BMC Evol. Biol*, *15(1)*, 1–14. <https://DOI.org/10.1186/s12862-015-0454-6>.
7. Wang, Y., Manow, R., Finan, C., Wang, J., Garza, E., & Zhou, S. (2011). Adaptive Evolution of Nontransgenic *Escherichia coli* KC01 for Improved Ethanol Tolerance and Homoethanol Fermentation from Xylose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, *38(9)*, 1371-1377. <https://DOI.org/10.1007/s10295-010-0920-5>.
8. Horinouchi, T., Tamaoka, K., Furusawa, C., Ono, N., Suzuki, S., Hirasawa, T., Yomo, T., & Shimizu, H. (2010). Transcriptome Analysis of Parallel-Evolved *Escherichia coli* Strains under Ethanol Stress. *BMC Genomics*, *11(1)*, 579. <https://DOI.org/10.1186/1471-2164-11-579>.
9. Basu, T., & Poddar, R. K. (1997). Over Expression of Inducible Proteins in *Escherichia coli* by Treatment with Ethanol. *Biochem. Mol. Biol. Int*, *41(6)*, 1093-1100. <https://DOI.org/10.1080/15216549700202171>.
10. Zheng, H., Yu, Z., Shu, W., Fu, X., Zhao, X., Yang, S., Tan, M., Xu, J., Liu, Y., & Song, H. (2019). Ethanol Effects on the Overexpression of Heterologous Catalase in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Appl. Microbiol. Biotechnol*, *103(3)*, 1441-1453. <https://DOI.org/10.1007/s00253-018-9509-0>.
11. Chhetri, G., Kalita, P., & Tripathi, T. (2015). An Efficient Protocol to Enhance Recombinant Protein Expression Using Ethanol in *Escherichia coli*. *MethodsX*, *2*, 385–391. <https://DOI.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>.
12. Basu, T., & Poddar, R. K. (1994). Effect of Ethanol on *Escherichia coli* Cells. Enhancement of DNA Synthesis Due to Ethanol Treatment. *Folia Microbiol. (Praha)*, *39(1)*, 3-6. <https://DOI.org/10.1007/BF02814520>.
13. Liu, C., Zheng, K., Xu, Y., Stephen, L. T., Wang, J., Zhao, H., Yue, T., Nian, R., Zhang, H., Xian, M., & Liu, H. (2017). Expression and Characterization of Soybean Seed Coat Peroxidase in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Prep. Biochem. Biotechnol*, *47(8)*, 768-775. <https://DOI.org/10.1080/10826068.2017.1342258>.
14. Lopes, C., Dos Santos, N. V., Dupont, J., Pedrolli, D. B., Valentini, S. R., de Carvalho Santos-Ebinuma, V., & Pereira, J. F. B. (2019). Improving the Cost Effectiveness of Enhanced Green Fluorescent Protein Production Using Recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3): Decreasing the Expression Inducer Concentration. *Biotechnol. Appl. Biochem*, *66(4)*, 527-536. <https://DOI.org/10.1002/bab.1749>.
15. Yu, B., Sun, W., Huang, Z., Sun, G., Li, L., Gu, J., Zheng, M., Li, X., Chun, C., Hui, Q., & Wang, X. (2021). Large-Scale Preparation of Highly Stable Recombinant Human Acidic Fibroblast Growth Factor in *Escherichia coli* BL21(DE3) PlyS Strain. *Front. Bioeng. Biotechnol*, *9*, 641505. <https://DOI.org/10.3389/fbioe.2021.641505>.
16. PET System Manual. No. 11th Edition.
17. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., & Vuillard, L. (2004). The Toxicity of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*: A Comparison of Overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif*, *37(1)*, 203-206. <https://DOI.org/10.1016/j.pep.2004.04.025>.

18. Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A Bacterium That Degrades and Assimilates Poly (Ethylene Terephthalate). *Science*, *351*(6278), 1196-1199. <https://DOI.org/10.1126/science.aad6359>.
19. Chung, C. T., & Miller, R. H. (1993). Preparation and Storage of Competent *Escherichia coli* Cells. *Academic Press*, *218*, 621-627. [https://DOI.org/https://DOI.org/10.1016/0076-6879\(93\)18045-E](https://DOI.org/https://DOI.org/10.1016/0076-6879(93)18045-E).
20. Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western Blotting: An Introduction. *Methods Mol. Biol*, *1312*, 17-30. <https://DOI.org/10.1007/978-1-4939-2694-7-5>.
21. Ingram, L. O. (1986). Microbial Tolerance to Alcohols: Role of the Cell Membrane. *Trends Biotechnol*, *4*(2), 40-44. [https://DOI.org/https://DOI.org/10.1016/0167-7799\(86\)90152-6](https://DOI.org/https://DOI.org/10.1016/0167-7799(86)90152-6).
22. Ingram, L. O., & Buttke, T. M. (1985). Effects of Alcohols on Micro-Organisms. *Academic Press*, *25*, 253-300. [https://DOI.org/https://DOI.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60294-5](https://DOI.org/https://DOI.org/10.1016/S0065-2911(08)60294-5).
23. Dombek, K. M., & Ingram, L. O. (1984). Effects of Ethanol on the *Escherichia coli* Plasma Membrane. *J. Bacteriol*, *157*(1), 233-239. <https://DOI.org/10.1128/jb.157.1.233-239.1984>.

Enhancing ethanol tolerance of *Escherichia coli* to improve the efficiency of recombinant protein expression

Tran Thi Hau, Tran Hong Diem, Phung Thi Thu Huong
NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University
tthau@ntt.edu.vn

Abstract *Escherichia coli* is one of the most common hosts to produce recombinant proteins due to its short culturing time and high biomass yield. However, the traditional strains often lack the resistance against chemical inhibitors or environmental stresses which impact on cell division and lessen the effectiveness of target protein expression. In this study, the *E. coli* strains with direct ethanol tolerance was developed to promote the cellular alterations associated with the enhancement of DNA synthesis and the improvement of the production of recombinant proteins. The result showed that the *E. coli* BL21(DE3) and *E. coli* C41(DE3) have been improved in ethanol tolerance (7-8) % by applying laboratory adaptive evolution in Luria Bertani medium and M9 minimal medium. Additionally, the protein expression efficiency has been significantly increased when using them as a host for PETase protein expression compared to the original strains. The evolution of *E. coli* with high ethanol tolerance might be a potential factor contributing to the development of an effective expression system for recombinant protein production.

Keywords adaptive evolution, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* C41(DE3), ethanol tolerance, PETase, recombinant protein.