

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Phạm Thị Lan Anh**

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN TÁI TỔ HỢP TRONG *E. COLI* VÀ ĐÁNH  
GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY NHỰA PET CỦA ENZYME PETASE**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC THỰC NGHIỆM**

***Hà Nội - 2023***

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC  
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Phạm Thị Lan Anh**

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN TÁI TỔ HỢP TRONG *E. COLI* VÀ ĐÁNH  
GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN HỦY NHỰA PET CỦA ENZYME PETASE**

Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm  
Mã số: 8 42 01 14

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC**

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:  
TS. Lê Thị Bích Thảo

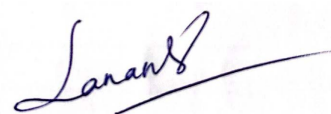
**Hà Nội - 2023**

**LỜI CAM ĐOAN**

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

*Hà Nội, ngày 15 tháng 8 năm 2023*

**Tác giả luận văn**



**Phạm Thị Lan Anh**

## LỜI CẢM ƠN

Luận văn này được hoàn thành tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, đóng góp quý báu của Quý Thầy Cô, các nhà khoa học, các đồng nghiệp, gia đình và bạn bè.

Trước tiên, tôi xin bày tỏ sự biết ơn sâu sắc đến TS. Lê Thị Bích Thảo – người đã tận tâm định hướng, chỉ dẫn cho tôi về chuyên môn, đồng thời động viên, khích lệ và tạo mọi điều kiện thuận lợi nhất cho tôi trong suốt thời gian thực hiện luận văn.

Và tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành đến các anh, chị, em đồng nghiệp phòng Hóa sinh – Protein, Viện Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện giúp đỡ, chia sẻ kinh nghiệm, đưa ra những lời khuyên bổ ích trong suốt thời gian tôi tiến hành thực nghiệm.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ, Phòng Đào tạo, Khoa Công nghệ sinh học và Quý Thầy Cô giáo đã giảng dạy và tạo điều kiện thuận lợi giúp tôi thực hiện luận văn cũng như hoàn thành chương trình đào tạo.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ sự biết ơn sâu sắc đến gia đình và bạn bè đã luôn bên cạnh động viên, khuyến khích để tôi vững vàng trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

*Hà Nội, ngày 15 tháng 8 năm 2023*

**Tác giả luận văn**



**Phạm Thị Lan Anh**

## MỤC LỤC

|  |    |
|--|----|
| MỞ ĐẦU.....  | 1  |
| Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....   | 3  |
| 1.1. Nhựa PET.....   | 3  |
| 1.1.1. Khái niệm nhựa PET.....   | 3  |
| 1.1.2. Cấu tạo của nhựa PET.....   | 3  |
| 1.1.3. Tính chất của nhựa PET.....   | 3  |
| 1.1.4. Ứng dụng của nhựa PET.....  | 4  |
| 1.1.5. Tình hình sử dụng nhựa PET.....   | 5  |
| 1.1.6. Tái chế nhựa PET phế thải.....  | 6  |
| 1.2. PETase.....   | 7  |
| 1.2.1. Thông tin chung.....  | 7  |
| 1.2.2. Cấu trúc không gian của enzyme PETase.....  | 9  |
| 1.2.3. Hoạt tính phân rã nhựa PET của enzyme PETase .....  | 10 |
| 1.3. Hệ thống vector pET biểu hiện protein tái tổ hợp.....   | 11 |
| 1.3.1. Thông tin chung.....  | 11 |
| 1.3.2. Cấu trúc hệ vector pET .....  | 12 |
| 1.3.3. Hệ vector pET-22b(+)......  | 13 |
| 1.3.4. Hệ vector pET-28a(+)......  | 14 |
| Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....   | 16 |
| 2.1. Đối tượng nghiên cứu.....   | 16 |
| 2.1.1. Vật liệu sinh học .....   | 16 |
| 2.1.2. Hóa chất .....  | 16 |
| 2.1.3. Thiết bị.....   | 16 |
| 2.2. Phương pháp nghiên cứu.....   | 17 |
| 2.2.1. Phương pháp thu thập thông tin lựa chọn gen mã hóa protein PETase, tối ưu mã biểu hiện..... | 17 |
| 2.2.2. Nhân gen <i>petase</i> bằng kỹ thuật PCR .....  | 17 |
| 2.2.3. Tách dòng gen mã hóa PETase.....  | 18 |
| 2.2.4. Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào <i>E. coli</i> bằng phương pháp sốc nhiệt.....              | 18 |
| 2.2.5. Tách chiết DNA từ các tế bào <i>E. coli</i> .....   | 19 |
| 2.2.6. Điện di DNA trên gel agarose.....   | 20 |
| 2.2.7. Tách chiết DNA ra khỏi gel agarose.....   | 20 |

|  |    |
|--|----|
| 2.2.8. Xác định trình tự gen bằng máy phân tích trình tự gen tự động.....          | 20 |
| 2.2.9. Thiết kế vector biểu hiện gen mã hoá cho PETase.....                        | 20 |
| 2.2.10. Biểu hiện PETase ở <i>E. coli</i> .....                                    | 21 |
| 2.2.11. Khảo sát các điều kiện biểu hiện PETase ở <i>E. coli</i> .....             | 21 |
| 2.2.12. Phân tích protein bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE và Western Blot .....     | 22 |
| 2.2.13. Tinh chế protein nội bào bằng sắc ký ái lực Ni-NTA .....                   | 23 |
| 2.2.14. Thu nhận protein ngoại bào bằng rửa muối và rửa acetone .....              | 23 |
| 2.2.15. Định lượng protein bằng phương pháp Bradford .....                         | 24 |
| 2.2.16. Đánh giá hoạt tính phân hủy PET của enzyme tái tổ hợp.....                 | 24 |
| Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....  | 25 |
| 3.1. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa enzyme PETase.....                  | 27 |
| 3.1.1. Thu thập thông tin, tối ưu mã biểu hiện của gen mã hóa PETase .....         | 27 |
| 3.1.2. Tách dòng gen mã hóa protein PETase .....                                   | 29 |
| 3.1.3. Thiết kế các vector biểu hiện protein PETase .....                          | 32 |
| 3.2. Biểu hiện PETase tái tổ hợp ở <i>E. coli</i> .....                            | 36 |
| 3.2.1. Biểu hiện PETase ngoại bào .....  | 36 |
| 3.2.2. Biểu hiện PETase nội bào .....  | 37 |
| 3.3. Nhận diện PETase bằng phản ứng Western-blotting .....                         | 39 |
| 3.4. Khảo sát điều kiện biểu hiện tối ưu PETase nội bào.....                       | 40 |
| 3.4.1. Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy cảm ứng tới sự biểu hiện protein PETase.....     | 41 |
| 3.4.2. Khảo sát nồng độ cảm ứng IPTG ảnh hưởng tới khả năng biểu hiện PETase ..... | 42 |
| 3.5. Tinh sạch PETase nội bào bằng sắc ký ái lực Ni-NTA .....                      | 43 |
| 3.7. Đánh giá khả năng phân hủy nhựa PET của PETase ngoại bào .....                | 44 |
| KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....   | 47 |
| DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ .....  | 48 |
| DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO .....  | 49 |
| PHỤ LỤC .....  | 54 |

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

| Ký hiệu             | Tên tiếng Anh                                | Tên tiếng Việt                                   |
|---------------------|--|--|
| Amp                 | Ampicillin                                   | Ampicillin                                       |
| APS                 | Ammonium persulfate                          | Ammonium persulfate                              |
| bp                  | Base pair                                    | Base pair  |
| CBB                 | Coomassie Brilliant Blue                     | Coomassie Brilliant Blue                         |
| DNA                 | Deoxyribonucleic acid                        | Deoxyribonucleic acid                            |
| <i>E. coli</i>      | <i>Escherichia coli</i>                      | <i>Escherichia coli</i>                          |
| EDTA                | Ethylene diamine tetra acetic acid           | Ethylene diamine tetra acetic acid               |
| IMD                 | Imidazole                                    | Imidazole  |
| IPTG                | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside        | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside            |
| <i>I.sakaiensis</i> | <i>Ideonella sakaiensis</i>                  | <i>Ideonella sakaiensis</i>                      |
| kDa                 | Kilo Dalton                                  | Kilo Dalton                                      |
| LB                  | Luria – Bertani                              | Luria – Bertani                                  |
| OD                  | Optical density                              | Mật độ quang học                                 |
| PCR                 | Polymerase chain reaction                    | Phản ứng trùng hợp chuỗi                         |
| PET                 | Polyethylene terephthalate                   | Polyethylene terephthalate                       |
| SDS                 | Sodium dodecyl sulfate                       | Sodium dodecyl sulfate                           |
| SDS-PAGE            | Sodium dodecyl sulfate<br>polyacrylamide gel | Điện di biến tính SDS trên gel<br>polyacrylamide |
| SEM                 | Scanning electron microscope                 | Kính hiển vi điện tử quét                        |
| TEMED               | Tetramethyl ethylene diamine                 | Tetramethyl ethylene diamine                     |
| v/v                 | Volume/ volume                               | Thể tích/ thể tích                               |
| w/v                 | Weight/ volume                               | Khối lượng/ thể tích                             |

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

| Tên bảng   | Trang |
|--|-------|
| Bảng 2.1. Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu                | 16    |
| Bảng 2.2. Các thiết bị được sử dụng chính trong nghiên cứu | 16    |
| Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR                          | 17    |
| Bảng 2.4. Chu trình thực hiện phản ứng PCR                 | 18    |
| Bảng 2.5. Thành phần hỗn hợp phản ứng ghép nối             | 18    |
| Bảng 2.6. Thành phần dung dịch tách chiết DNA              | 19    |
| Bảng 2.7. Thành phần hỗn hợp phản ứng ghép nối             | 21    |
| Bảng 2.8. Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE         | 22    |



## DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

| Tên hình  | Trang |
|---|-------|
| Hình 1.1. Mã nhận diện nhựa PET   | 3     |
| Hình 1.2. Công thức cấu tạo của Polyethylene terephthalate  | 3     |
| Hình 1.3. Ứng dụng của nhựa PET   | 4     |
| Hình 1.4. Sản phẩm monomer sau khi cắt chuỗi polyethylene terephthalate bằng enzyme PETase và MHETase                                       | 8     |
| Hình 1.5. Cấu trúc tổng thể của PETase  | 9     |
| Hình 1.6. Hình ảnh chụp màng film PET bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)  | 10    |
| Hình 1.7. Hộp nhựa bị phân hủy trong vòng 48 giờ bởi FAST-PETase  | 11    |
| Hình 1.8. Cấu trúc điển hình của vector pET   | 12    |
| Hình 1.9. Sơ đồ vector pET-22b(+)   | 14    |
| Hình 1.10. Sơ đồ vector pET-28a(+)  | 15    |
| Hình 3.1. Quy trình thí nghiệm sản xuất PETase tái tổ hợp tiết ngoại bào và nội bào   | 26    |
| Hình 3.2. Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa PETase trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở <i>E. coli</i> bằng phần mềm Bioedit            | 28    |
| Hình 3.3. Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein PETase trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở <i>E. coli</i> bằng phần mềm Bioedit | 29    |
| Hình 3.4. Điện di DNA sản phẩm PCR gen <i>petase</i> bằng cặp môi thiết kế  | 29    |
| Hình 3.5. Kết quả biến nạp sản phẩm ghép nối giữa gen <i>petase</i> và pLUG-Prime® TA-Cloning Vector Kit II                                 | 30    |
| Hình 3.6. Tách chiết plasmid chọn dòng mang vector TA-cloning/ <i>petase</i> tái tổ hợp   | 31    |
| Hình 3.7. Điện di DNA cắt kiểm tra vector TA-cloning/ <i>petase</i> tái tổ hợp bằng các cặp enzyme cắt giới hạn                             | 31    |

|  |    |
|--|----|
| Hình 3.8. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện protein PETase tiết ngoại bào  | 33 |
| Hình 3.9. Kết quả tách chiết DNA chọn dòng mang plasmid pET-22b(+)/ <i>petase</i>  | 33 |
| Hình 3.10. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện protein PETase tiết nội bào   | 34 |
| Hình 3.11. Kết quả tách chiết DNA chọn dòng mang plasmid pET-28a(+)/ <i>petase</i>   | 33 |
| Hình 3.12. Dòng hóa gen <i>petase</i> vào hai vector biểu hiện pET-22b(+) và pET-28a(+)  | 35 |
| Hình 3.13. Điện di SDS-PAGE protein ngoại bào sau khi tủa làm giàu protein   | 37 |
| Hình 3.14. Điện di SDS-PAGE protein nội bào  | 37 |
| Hình 3.15. Nhận diện PETase bằng Western-blotting với kháng thể kháng His•Tag  | 40 |
| Hình 3.16. Sự biểu hiện của PETase theo nồng độ chất cảm ứng IPTG  | 41 |
| Hình 3.17. Điện di protein PETase tái tổ hợp được biểu hiện ở <i>E. coli</i> theo nhiệt độ nuôi cấy và thời gian thu sau 16 tiếng cảm ứng với IPTG | 43 |
| Hình 3.18. Tinh sạch PETase tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực Ni-NTA   | 44 |
| Hình 3.19. Kết quả chụp kính hiển vi điện tử quét SEM  | 45 |
| Hình 3.20. Một số hình ảnh phân hủy màng film PET của PETase tiết ngoại bào  | 46 |

---

## MỞ ĐẦU

Ô nhiễm rác thải nhựa được xem như là một trong những thách thức lớn nhất của thế kỉ XXI, gây ảnh hưởng trực tiếp tới sức khỏe các sinh vật và đòi hỏi những nỗ lực xử lý kịp thời nhằm giảm tải các tác hại của chúng trên toàn cầu. Chiếm thị phần lớn trong ngành nhựa, polyethylene terephthalate (PET) đã và đang thu hút nhiều sự quan tâm của giới chuyên môn trong việc nghiên cứu tìm ra phương thức tiêu hủy, tái chế tối ưu. Những phương pháp xử lý hóa – lý truyền thống bộc lộ nhiều khuyết điểm như: đòi hỏi điều kiện về nhiệt độ, áp suất cao; tiêu tốn nhiều năng lượng và chi phí; thậm chí có thể gây ra ô nhiễm thứ phát. Gần đây, phương pháp tái chế sinh học (sử dụng các chất xúc tác sinh học như các enzyme thủy phân- hydrolase) đã mở ra con đường mới trong việc xử lý nhựa PET phế thải một cách hiệu quả, nhẹ nhàng và thân thiện với môi trường.

Cho đến nay, nhiều enzyme thủy phân PET (PET hydrolase) đã được nhận biết như: esterases, lipases hoặc cutinases, trong đó, enzyme cutinase chiếm chủ yếu. Trừ một số ngoại lệ thuộc nhóm cutinase, đa số các enzyme PET hydrolase chỉ có khả năng biến đổi bề mặt của PET mà không thể phá vỡ cấu trúc khối tảng PET. Thêm vào đó, những cutinase này có thể phân rã nhựa PET đến một vài mức độ nhưng phải thực hiện ở 50°C còn ở nhiệt độ phòng không đạt hiệu quả. Năm 2016, một phát hiện mới của Yoshida và cộng sự về một loài vi khuẩn (*Ideonella sakaiensis* 201-F6) đã sản sinh ra enzyme poly(ethylene terephthalate) hydrolase (được đặt tên là PETase; EC 3.1.1.101) có thể phá vỡ các liên kết ester, phân rã PET thành sản phẩm đơn phân (monomer) là terephthalate (TPA) and ethylene glycol (EG) ở nhiệt độ từ 20 đến 40°C. Đáng chú ý là PETase có hoạt tính phân rã cấu trúc polymer của màng film PET ở điều kiện sinh lý (30°C, pH 7) cao hơn rất nhiều (từ 5-120 lần) so với các enzyme phân rã PET ưa nhiệt tương đồng đã được báo cáo trước đó. Chính vì vậy, PETase đang thu hút được rất nhiều sự quan tâm và được nhìn nhận như một công cụ đầy hứa hẹn cho phân hủy rác thải nhựa PET.

Bên cạnh *I. sakaiensis*, *E. coli* cũng được xem xét sử dụng để biểu hiện protein PETase tái tổ hợp vì thao tác đơn giản, khả năng biểu hiện tốt, thời gian ngắn và chi phí thấp. Ở vi khuẩn *E. coli*, các peptide tín hiệu đầu-cuối chẳng hạn như: pelB, ompA, phoA, maIE, lamB và ompC, ... làm trung gian cho sự chuyển vị của các protein qua màng tế bào chất, thường được sử dụng để sản xuất protein tiết ngoại bào.

Xuất phát từ thực tiễn và tiềm năng xử lý môi trường của loại enzyme này, đề tài “Nghiên cứu biểu hiện tái tổ hợp trong *E. coli* và đánh giá khả năng phân hủy nhựa PET của enzyme PETase” được thực hiện nhằm tạo ra enzyme có khả năng khử trùng hợp trên màng film PET, tiết trực tiếp ra ngoài môi trường mà không cần trải qua phá tế bào. Bên cạnh đó, PETase tiết nội bào cũng được nghiên cứu để tối ưu khả năng biểu hiện và

tạo ra nguồn protein với độ tinh khiết cao làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

### **Mục đích nghiên cứu**

Nghiên cứu tạo ra enzyme PETase tái tổ hợp có khả năng phân hủy nhựa PET nhằm ứng dụng trong việc xử lý rác thải nhựa.

### **Nội dung nghiên cứu**

*Nội dung 1:* Nghiên cứu thiết kế tối ưu và tổng hợp gen mã hóa cho PETase nhằm mục đích biểu hiện, sản xuất protein tái tổ hợp ở *E. coli*.

*Nội dung 2:* Nghiên cứu tạo các enzyme PETase tái tổ hợp ở *E. coli*.

*Nội dung 3:* Đánh giá khả năng phân rã PET của các enzyme tái tổ hợp trên màng film PET.

### **Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài**

Các mảnh vụn của chất thải nhựa, đặc biệt là vi nhựa, có thể gây hại cho sinh vật và đe dọa đến cuộc sống, sức khỏe của con người. Do đó, việc phát triển các công nghệ tiên tiến để xử lý và tái chế nhựa sau tiêu dùng nhằm đạt được cả giá trị về kinh tế và bảo vệ môi trường là đặc biệt quan trọng. Phương pháp tái chế sinh học sử dụng enzyme thủy phân được chứng minh mang lại hiệu quả phân hủy tốt và không gây ô nhiễm thứ phát. Việc tách dòng, biểu hiện PET hydrolase (PETase) tái tổ hợp tiết ngoại bào có hoạt tính phân cắt các liên kết ester của chuỗi polyethylene terephthalate ở điều kiện sinh lý (30°C, pH 7) đã cung cấp cơ sở khoa học, quy trình sản xuất protein tiềm năng ứng dụng trong lĩnh vực xử lý môi trường.

## Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

### 1.1. Nhựa PET

#### 1.1.1. Khái niệm nhựa PET

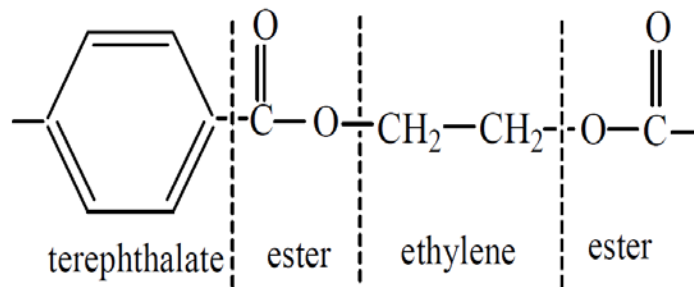
PET là tên viết tắt của Polyethylene terephthalate, còn biết đến với nhiều tên gọi khác như PETE hoặc PETP hoặc PET-P, được hình thành từ phản ứng trùng hợp giữa các monomer ethylen terephthalat với công thức hóa học  $C_{10}H_8O_4$ . Nó là một loại nhựa trong, dẻo, bền, nhẹ thuộc họ polyester [1].



Hình 1.1. Mã nhận diện nhựa PET

#### 1.1.2. Cấu tạo của nhựa PET

Polyethylene Terephthalate được hình thành từ các acid trung gian terephthalic (TPA) và ethylene glycol (EG).



Hình 1.2. Công thức cấu tạo của Polyethylene terephthalate [1]

#### 1.1.3. Tính chất của nhựa PET

Nhựa polyester chứa các đặc tính tuyệt vời như: độ bền cơ học, kháng hóa chất, ổn định về mặt hóa học.

Về tính chất quang học, PET là một loại polymer nhiệt dẻo không màu và các đặc tính của PET được quyết định bởi quá trình xử lý nhiệt. Nó có thể tồn tại ở các dạng: vô định hình (amorphous), kết tinh (crystalline) và bán kết tinh (semi-crystalline) [2]. Ở dạng vô định hình, các phân tử của PET sắp xếp không có trật tự, trong suốt. Ở dạng kết tinh, các phân tử sắp xếp theo một trật tự nhất định, màu đục (không trong suốt), tính chịu nhiệt và độ bền cao hơn so với dạng vô định hình. Sự mất đi độ trong suốt như vậy

trong các vật liệu polymer kết tinh là do sự hình thành các quả cầu tinh thể làm tán xạ ánh sáng [3]. Dạng bán kết tinh có màu đục, cấu trúc tinh thể có 50% kết tinh.

Về tính chất cơ học, độ bền kéo của màng PET tương đương màng nhôm và gấp ba lần màng polycarbonate và màng polyamide. Polyethylene terephthalate chống ăn mòn, độ bền cao, dễ gia công ngay cả khi ở nhiệt độ thấp ( $< 70^{\circ}\text{C}$ ). Điều này giúp loại nhựa này trở thành nguyên liệu phổ biến trong các ngành công nghiệp thực phẩm, chế tạo máy móc, ... Bên cạnh đó, PET không thấm nước và ít thấm khí hơn so với hầu hết các loại nhựa khác nên nó được sử dụng rộng rãi trong ngành sản xuất bao bì [4].

Về tính chất hóa học, PET có khó bị hòa tan trong dung môi hữu cơ, bền hóa học với cả HF,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , axit béo... không bền với axit đậm đặc  $\text{HNO}_3$  và  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (do tác dụng với gốc este).

#### 1.1.4. Ứng dụng của nhựa PET

Polyethylene terephthalate được ứng dụng rộng rãi trong hầu hết các lĩnh vực: công nghiệp thực phẩm, dệt may, y tế, công nghiệp điện tử, công nghiệp ô tô và công nghiệp cơ khí chế tạo, ...



Hình 1.3. Ứng dụng của nhựa PET

Nhựa PET được ứng dụng chủ yếu nhất làm chai/ lọ, khay đựng thực phẩm, đồ uống. Bên cạnh đó, chúng còn được sử dụng trong việc sản xuất sợi thủ công, trong các

ngành công nghiệp dệt may, túi xách. Vải polyester chắc chắn, linh hoạt và có thêm lợi ích là ít nhăn và co rút hơn vải cotton. Vải polyester có trọng lượng nhẹ, giảm gió, chống kéo và chống rách tốt hơn. Sợi monofilament PET chủ yếu được sử dụng để sản xuất vải lưới để in lụa, lọc dầu và lọc cát, dây giăng cho các ứng dụng nông nghiệp (nhà kính, v.v.), dây đai dệt/ đan, vải lọc, ...

PET có đặc tính cách điện tốt, độ ổn định về cấu trúc và kích thước cao cho phép sử dụng chúng trong ngành công nghiệp điện và điện tử. Nó là một polymer hiệu quả để thay thế các kim loại đúc khuôn và nhiệt rắn trong các ứng dụng như: bọc điện, điện tử, máy đo thông minh, bộ phận quang điện, hộp nối năng lượng mặt trời, ...

Ngoài ra, PET còn được sử dụng để sản xuất các bộ phận trong ngành công nghiệp ô tô như: thảm, vải bọc ghế ngồi, mặt bên, mái, sàn và cửa, dây an toàn, lốp xe, túi khí, bộ lọc không khí, bộ lọc nhiên liệu, giá đỡ đèn pha ô tô, vỏ động cơ, vỏ đầu nối, cần gạt nước và vỏ bánh răng ... nhờ tính ổn định nhiệt, tính chất điện, độ hấp thụ nước rất thấp và đặc tính bề mặt tuyệt vời cho phương tiện này.

Đối với lĩnh vực y tế, sợi PET được sử dụng trong các sinh vật sống ở dạng sợi dệt, bện hoặc sợi rỗng trong các lĩnh vực ứng dụng của gân nhân tạo, dây chằng nhân tạo, mảnh ghép mạch máu, van tim, thận nhân tạo, chỉ khâu, lưới phẫu thuật, ống thông đường tiết niệu [5].

### **1.1.5. Tình hình sử dụng nhựa PET**

Sự phát triển của các vật liệu nhựa tổng hợp đã mang lại những thay đổi rõ rệt cho nền kinh tế thế giới từ nửa cuối thế kỷ trước và trở nên không thể thiếu được trong xã hội hiện đại [6]. Bằng chứng là từ năm 1950 tới nay, sản lượng nhựa đã tăng hơn 20 lần và đạt tới 390,7 triệu tấn vào năm 2021 [7].

Vật liệu PET là vật liệu có nhu cầu tiêu dùng tăng trưởng tương đối nhanh. Sản phẩm PET tiêu dùng ở Liên minh Châu Âu tăng từ 1.9 lên 2.9 triệu tấn trong giai đoạn 2001 – 2008 sau đó tăng mạnh từ 42 triệu tấn lên 73 triệu tấn trong giai đoạn 2014 - 2020. Châu Á là khu vực có lượng tiêu thụ nhựa PET lớn nhất thế giới và gấp đôi các khu vực khác với sản lượng 10 triệu tấn/ năm vào năm 2018. Nhu cầu về lượng tiêu thụ nhựa PET được dự đoán sẽ phát triển nhanh chóng với mức tăng trưởng 30% ở Châu Á và 20% ở Châu Âu, còn ở khu vực Trung Đông và Châu Phi là 33% trong giai đoạn 2018 - 2022. Sản xuất PET ở Nam Mỹ chỉ có thể đáp ứng 50% nhu cầu tiêu dùng trong khu vực, phần sản lượng thiếu hụt được Châu Á cung cấp. Đặc biệt Trung Quốc là nước xuất khẩu vật liệu PET lớn nhất thế giới do có lợi thế về chi phí sản xuất từ nguyên liệu than đá [8].

Việt Nam hiện đang là một trong những quốc gia có lượng tiêu thụ nhựa cao hàng đầu thế giới. Khoảng 2.8 đến 3.1 triệu tấn rác thải nhựa trên đất liền mỗi năm [9]. Theo thống kê của Bộ Tài nguyên và Môi trường, mỗi năm Việt Nam thải ra môi trường khoảng 1.8 triệu tấn rác thải nhựa, trong đó, 280 000 – 730 000 tấn là thải ra biển (chiếm khoảng 6% tổng lượng rác thải nhựa ra đại dương trên toàn thế giới). Điển hình như Hà Nội và thành phố Hồ Chí Minh thải ra khoảng 80 tấn nhựa và nylon mỗi ngày [10]. Tại các địa điểm khảo sát, tỷ lệ các loại nhựa được tìm thấy là bao bì và chai PET (18%), nắp và nhựa nhỏ (19%), polystyrene - hộp đựng thực phẩm (40%) [11].

Với thực trạng mức độ tiêu thụ nhựa PET ngày càng nhiều, vòng đời sử dụng tương đối ngắn nên lượng rác thải từ nhựa PET thải ra môi trường hàng năm là rất lớn. Vì vậy, việc ứng dụng công nghệ tái chế hoặc tái sử dụng nhựa PET phế thải là hết sức cần thiết, giúp tận dụng tối ưu nguồn tài nguyên, kèm với đó ngăn ngừa ô nhiễm môi trường.

### **1.1.6. Tái chế nhựa PET phế thải**

Trong báo cáo của Tổ chức Hợp tác và Phát triển kinh tế (OECD) công bố ngày 22/02/2022 cho biết: Thế giới đang tạo ra lượng rác thải nhựa gấp đôi so với hai thập kỉ trước. Tuy nhiên, chỉ có khoảng 9% lượng rác thải nhựa được tái chế, 19% được tiêu hủy và gần 50% được chôn lấp tại các hố rác đạt tiêu chuẩn [13].

Thay vì phân hủy, nhựa bị phong hóa bởi ánh sáng mặt trời và nước thành vi nhựa (các mảnh có chiều dài dưới 5 mm), đủ nhỏ để các động vật nuốt phải, dẫn đến thay đổi hành vi và thậm chí tử vong nếu tích tụ số lượng lớn các hạt này. Không chỉ dừng lại ở đó, con người là mắt xích cuối cùng trong chuỗi thức ăn cũng bị ảnh hưởng rất lớn. Phơi nhiễm vi nhựa có thể gây rối loạn chuyển hóa, nhiễm độc thần kinh, tăng nguy cơ mắc các bệnh ung thư [14][15]. Tồi tệ hơn, trong một nghiên cứu được công bố vào năm 2021, Ragusa và cộng sự đã phát hiện ra các hạt vi nhựa có thể truyền tới nhau thai người [16]. Có thể thấy, bên cạnh những lợi ích kinh tế, ngành nhựa cũng đặt ra vô vàn những thách thức trong việc bảo vệ môi trường sống và sức khỏe các sinh vật.

Các phương pháp đang được sử dụng phổ biến để tái chế nhựa bao gồm cả PET là phương pháp hóa học và cơ học. Phương pháp tái chế rác thải nhựa cơ học (thu gom, phân loại, làm sạch và nghiền) gặp phải thử thách rất lớn do rác thải nhựa sau khi sử dụng có lẫn các tạp chất cả vô cơ và hữu cơ [17][18]. Còn tái chế hóa học (các polymer nhựa có thể được chuyển đổi thành các vật liệu thô để sử dụng cho tổng hợp các chất hóa học, các loại nhiên liệu hoặc các nhựa mới lại đòi hỏi các điều kiện về nhiệt độ, áp suất rất cao và tiêu tốn nhiều năng lượng [19][20][21]. Ngoài ra, cách giải quyết này tạo ra một lượng lớn các hợp chất độc gây tổn hại đối với môi trường và có khả năng gây ra ô nhiễm thứ phát [19] [22] [23].



Bắt đầu từ những năm 1990, nghiên cứu phân hủy sinh học (tái chế sinh học) các polymer tổng hợp đã được thúc đẩy mạnh mẽ do sự khủng hoảng môi trường toàn cầu. Từ đó, phương pháp tái chế sinh học với tác động nhẹ nhàng, thân thiện với môi trường hơn nhờ sử dụng các chất xúc tác sinh học như các enzyme thủy phân đang nhận được quan tâm ngày càng lớn [18][23]. Hiện nay đã có một số ứng dụng của enzyme vi khuẩn và nấm được phân loại thuộc nhóm polyesterase, lipase, cutinase cho thấy khả năng phân hủy chuỗi polyethylene terephthalate [24].

Theo Chương trình Môi trường Liên hợp quốc (UNEP) báo cáo: Việt Nam đứng thứ 4 trong 20 quốc gia có lượng rác thải nhựa xả ra biển nhiều nhất trên thế giới trong năm 2018 [12]. Vì vậy, việc nghiên cứu tái chế PET đã nhận được sự quan tâm nhiều hơn, chủ yếu vẫn bằng các phương pháp hóa học và cơ học [25]. Đã có các đề tài nghiên cứu cơ bản, các chương trình khoa học công nghệ cấp Nhà nước về tái chế nhựa truyền thống để thu hồi và bảo tồn sản phẩm có nguồn gốc từ dầu mỏ. Hiện nay, nhiều nhà khoa học đã nỗ lực nghiên cứu nhằm tìm ra phương pháp hiệu quả và kinh tế nhất để tái chế rác thải PET. Một số công trình nghiên cứu về tái chế PET đã được công bố như phản ứng cắt mạch PET bằng diethylene glycol, chế tạo phụ gia chống cháy từ nhựa PET thải, nhiều dự án cũng xây dựng thành công công nghệ tái chế nhựa PET phế thải thành nhựa polyester không no để chế tạo vật liệu composite ứng dụng trong nhiều lĩnh vực như: giao thông vận tải, xây dựng, thủy sản và buro chính viễn thông [26][27]. Tuy nhiên, chúng vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu sử dụng ngày càng cao của con người.

Với phương pháp tái chế sinh học, nhóm nghiên cứu của Đặng Thị Cẩm Hà và cộng sự đã tạo ra các chế phẩm vi sinh giúp đẩy nhanh quá trình phân hủy sinh học của một số loại rác thải nhựa nói chung [28]. Chế phẩm được tạo ra từ tổ hợp của 4 chủng nấm đảm mới được phân lập và phân loại định danh, các enzyme ngoại bào do nấm đảm sinh ra đã phân hủy được các loại túi polymer, plastic có cấu trúc hóa học khác nhau với hiệu suất phân hủy thể hiện ở khối lượng suy giảm, sự thay đổi hình thái cấu trúc bề mặt, sự xuất hiện các nhóm chức mới và liên kết mới...[29]. Hiện nay chưa có nhóm nghiên cứu nào nghiên cứu về các enzyme PET hydrolase cho xử lý nhựa PET bằng phương pháp tái chế sinh học.

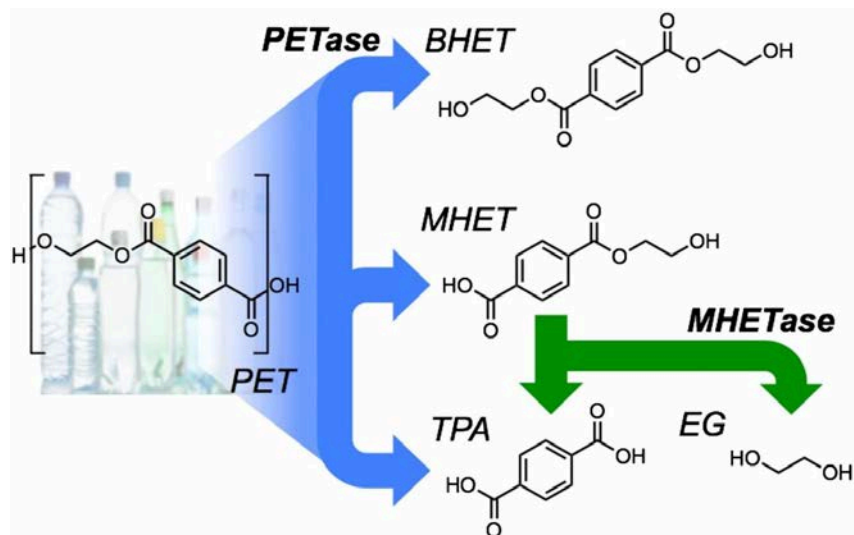
Vì vậy, việc ứng dụng công nghệ ADN tái tổ hợp để sản xuất thành công PETase có hoạt tính phân hủy nhựa, phục vụ xử lý môi trường, là cần thiết trong bối cảnh nước ta hiện tại và cập nhật với xu thế toàn cầu.

## **1.2. PETase**

### **1.2.1. Thông tin chung**

Cho đến nay, nhiều enzyme thủy phân PET (PET hydrolytic enzymes, PHEs) gọi chung là PET hydrolase đã được nhận biết như: esterases, lipases hoặc cutinases, trong đó, enzyme cutinase chiếm chủ yếu [23] [30] [31]. Đa số các enzyme PET hydrolase chỉ có khả năng biến đổi bề mặt của PET mà không thể phá vỡ cấu trúc khối tảng PET. Hiện nay chỉ một số cutinase được phát hiện có thể phân rã khối PET là cutinase từ một số loài *Thermobifida fusca*, *Fusarium solani pisi* và các cutinase này có thể phân rã PET đến một vài mức độ nhưng phải thực hiện ở 50°C còn ở nhiệt độ phòng không đạt hiệu quả [31][33].

Năm 2016, phát hiện của Yosida và cộng sự về một loài vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* 201-F6 được phân lập từ rác thải nhựa tại một nhà máy nhỏ ở Nhật Bản, đã sản sinh ra hai loại enzyme là poly(ethylene terephthalate) hydrolase (được đặt tên là PETase; EC 3.1.1.101) và mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate hydrolase (MHETase, EC 3.1.1.102) có thể phân rã PET thành sản phẩm đơn phân (monomer) là terephthalate (TPA) and ethylene glycol (EG) ở nhiệt độ từ 20 đến 40°C [34]. Trong quá trình phản ứng, enzyme phá vỡ các liên kết ester trong chuỗi polyethylene terephthalate. Đáng chú ý là PETase có hoạt tính phân rã cấu trúc polymer của film PET ở điều kiện sinh lý (30°C, pH 7) cao hơn rất nhiều (từ 5-120 lần) so với các enzyme phân rã PET ưa nhiệt tương đồng đã được báo cáo trước đó [24] [34]. Chính vì vậy, PETase đang thu hút được rất nhiều sự quan tâm và được nhìn nhận như một công cụ đầy hứa hẹn cho phân hủy rác thải nhựa PET.

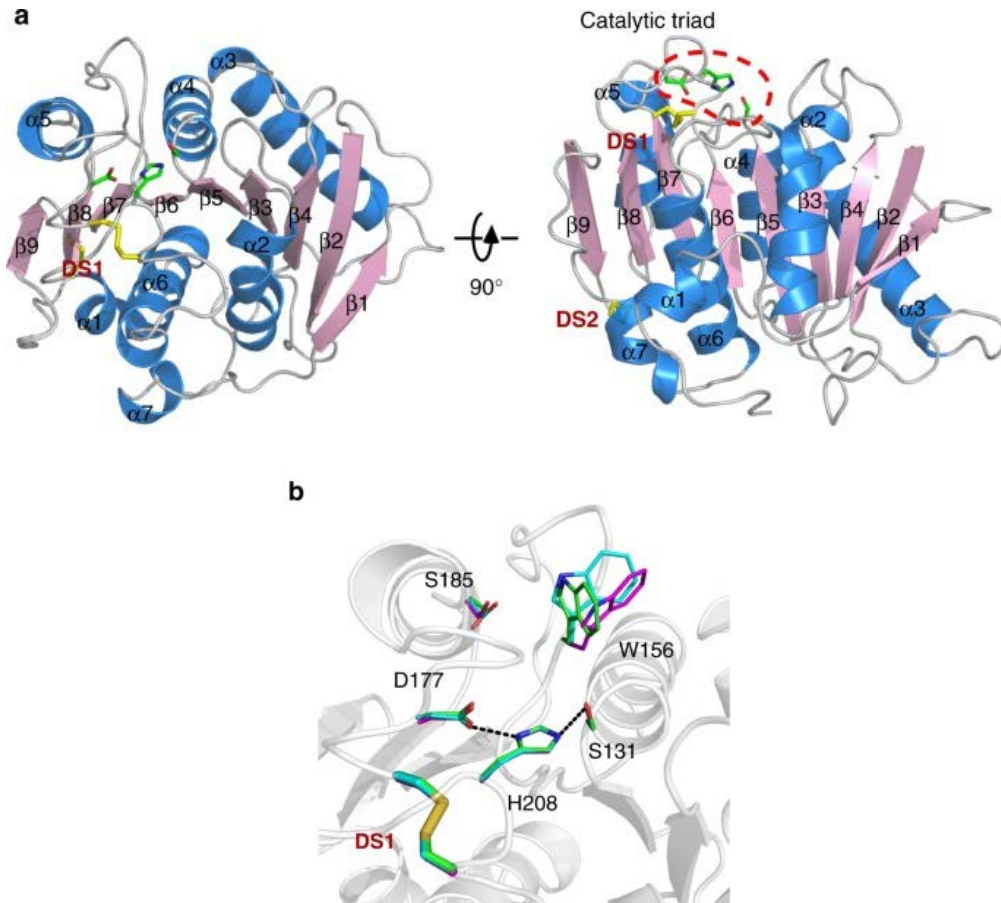


Hình 1.4. Sản phẩm monomer sau khi cắt chuỗi polyethylene terephthalate bằng enzyme PETase và MHETase [35]

*PETase* xúc tác quá trình khử polymer hóa PET thành bis(2-hydroxyethyl)-TPA (BHET), MHET và TPA. *MHETase* chuyển đổi MHET thành TPA và EG.

### 1.2.2. Cấu trúc không gian của enzyme PETase

Kể từ khi được phát hiện cho đến nay, PETase đã được làm sáng tỏ cấu trúc không gian 3 chiều liên quan đến các quy trình sinh hóa và cơ chế phân rã PET đã được hiểu biết rõ ràng hơn [24][36][37][38].



Hình 1.5. Cấu trúc tổng thể của PETase [36]

*a.* Cấu trúc PETase được trình bày dưới dạng mô hình. Bộ ba xúc tác (catalytic triad – vòng tròn nét đứt màu đỏ) và cầu disulfide (màu đỏ) được hiển thị dạng que;

*b.* Ba chuỗi polypeptide trong cùng một đơn vị không đối xứng được xếp chồng lên nhau. W156, S185 và bộ ba xúc tác của chuỗi A (xanh lá), B (lục lam) và C (đỏ) được hiển thị. Các đường gạch ngang biểu thị khoảng cách <math>< 3.5\text{\AA}</math>.

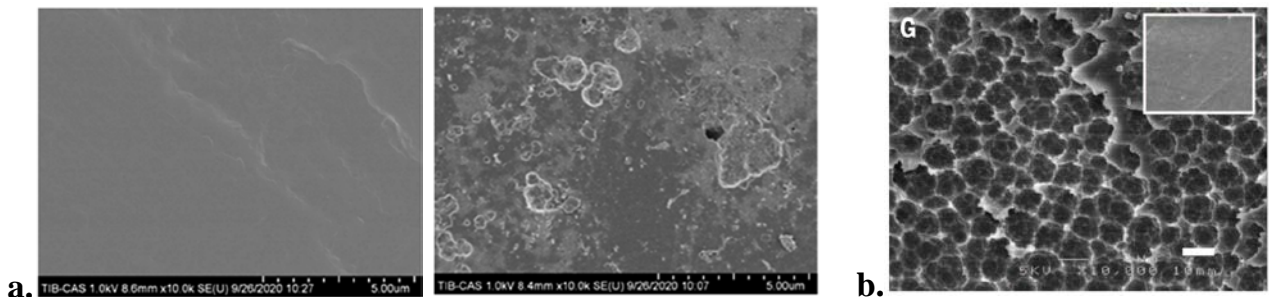
PETase thông qua một nếp gấp  $\alpha/\beta$ -hydrolase điển hình, có chứa vòng xoắn  $\beta$  trung tâm bao gồm 9 chuỗi  $\beta$  được kẹp bởi 6- $\alpha$ -helices. Do sự đồng nhất cao về trình tự với các cutinases nên có thể dễ dàng xác định được vị trí của bộ ba xúc tác enzyme S131-H208-D177 trên bề mặt protein. S131 đóng vai trò là nucleophile và nằm trong khoảng liên kết hydro phân cực bởi bazơ H208 và được ổn định bởi axit D177 [36].

Enzyme PETase hình thành hai cầu nối disulfua trong phân tử (DS1 và DS2) trong khi các enzyme tương đồng khác chỉ có một. Cầu nối disulfua DS2 liên kết với vòng cuối C và vòng xoắn cuối cùng, được bảo vệ nghiêm ngặt trong các cấu trúc tương đồng [39]. Bên cạnh đó, DS1 nằm gần vị trí hoạt động và kết nối các vòng  $\beta 7 - \alpha 5$  và  $\beta 8 - \alpha 6$  chứa axit xúc tác D177 và gốc xúc tác H208 (Hình 1.5a và Hình 1.5b). DS1 có thể ảnh hưởng tới khoảng cách giữa các gốc của bộ ba xúc tác và do đó ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của vị trí hoạt động.

Những đặc tính cấu trúc duy nhất của PETase so sánh với cấu trúc của các cutinase khác (có 1 liên kết disulfide) gồm có: thêm một liên kết disulfide để nâng cao tính ổn định ở vị trí hoạt động của histidine, cho phép tăng khả năng linh hoạt của vùng loop mở rộng liền kề, tạo điều kiện thuận lợi cho sự tương tác của enzyme với polymer [40]. Dựa vào công nghệ sinh học cấu trúc, các nhà nghiên cứu đã phát hiện ra các vị trí acid amin và các vùng chức năng có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme PETase từ đó nhiều dạng đột biến (biến thể) khác nhau của PETase đã được tạo ra bằng công nghệ ADN tái tổ hợp sử dụng các kỹ thuật đột biến điểm có định hướng hay thiết kế các hệ thống biểu hiện protein ngoại bào và sản lượng lớn để sử dụng trong tái tạo môi trường [41][42]. Các biến thể enzyme này cũng đã làm tăng hoạt tính phân rã PET gấp 3 lần so với enzyme gốc.

### 1.2.3. Hoạt tính phân rã nhựa PET của enzyme PETase

Để xác định hoạt tính của PETase lên bề mặt nhựa PET các nhà khoa học đã tiến hành thí nghiệm với các mảnh film PET được ủ trong dịch chứa enzyme PETase ở điều kiện 30°C. Sau khi ủ, bề mặt của các mảnh film sẽ được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) [34] [41] [43] [44]. Kết quả cho thấy, bề mặt màng film PET bị phân rã từng mảng và xuất hiện các lỗ nhỏ sau khi ủ với enzyme này.

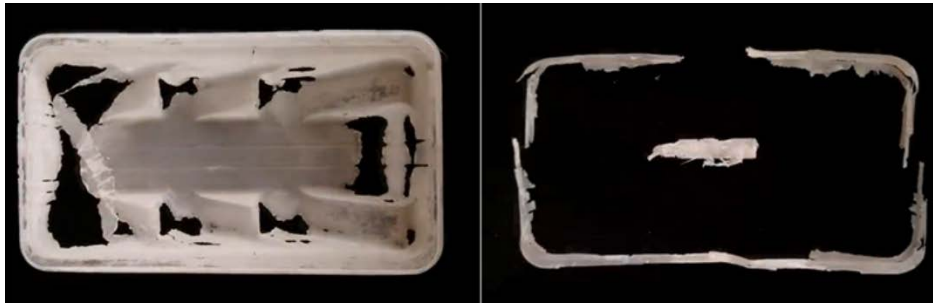


Hình 1.6. Hình ảnh chụp màng film PET bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM)

*a. Hình bên trái là bề mặt màng film PET khi chưa có mặt của PETase. Hình bên phải là bề mặt màng film PET sau khi ủ với PETase ở 30°C trong 168 giờ [44].*

*b. Bề mặt màng film PET gần như bị phân rã hoàn toàn sau 6 tuần ủ PETase ở 30°C [34].*

Mới đây nhất, các nhà khoa học tại Đại học Texas, Austin, Hoa Kỳ đã tạo ra một 1 biến thể PETase (FAST-PETase) có thể phân hủy hộp nhựa polyethylene terephthalate trong vòng vài giờ đến vài ngày thay vì hàng trăm năm ngoài tự nhiên [45]. Nghiên cứu này đã rút ngắn khoảng cách sản xuất PET hydrolase có hoạt tính từ quy mô phòng thí nghiệm tới quy mô công nghiệp, ứng dụng trong xử lý môi trường.



Hình 1.7. Hộp nhựa bị phân hủy trong vòng 48 giờ bởi FAST-PETase [45]

### 1.3. Hệ thống vector pET biểu hiện protein tái tổ hợp

Các vector pET ban đầu được xây dựng bởi Studier và các đồng nghiệp năm 1986 và đã trở thành hệ thống mạnh mẽ nhất được phát triển để biểu hiện protein tái tổ hợp ở *E. coli* [46].

#### 1.3.1. Thông tin chung

Có hai loại vector là vector phiên mã và vector dịch mã. Các vector phiên mã được thiết kế để biểu hiện các gen mục tiêu đã mang vị trí liên kết ribosome của sinh vật nhân sơ và codon khởi đầu ATG của riêng chúng. Các vector dịch mã chứa vị trí liên kết ribosome hiệu quả cao từ capsid chính của phage T7. Tên vector dịch mã được phân biệt với tên vector phiên mã bằng cách thêm hậu tố chữ cái sau tên, ví dụ: pET-21a(+), biểu thị khung đọc so với trình tự nhận dạng vị trí nhân bản *BamHI* GGATCC. Tất cả các vector có hậu tố “a” biểu thị từ bộ ba GGA, tất cả các vector có hậu tố “b” biểu thị từ bộ ba GAT và tất cả các vector có hậu tố “c” biểu thị từ bộ ba ATC của trình tự nhận dạng *BamHI*. Các vector có hậu tố “d” cũng biểu thị từ khung “c” nhưng chứa vị trí nhân bản ngược dòng *NcoI* thay cho vị trí *NdeI* trong chuỗi đó để chèn trực tiếp vào codon khởi đầu ATG của gen đích.

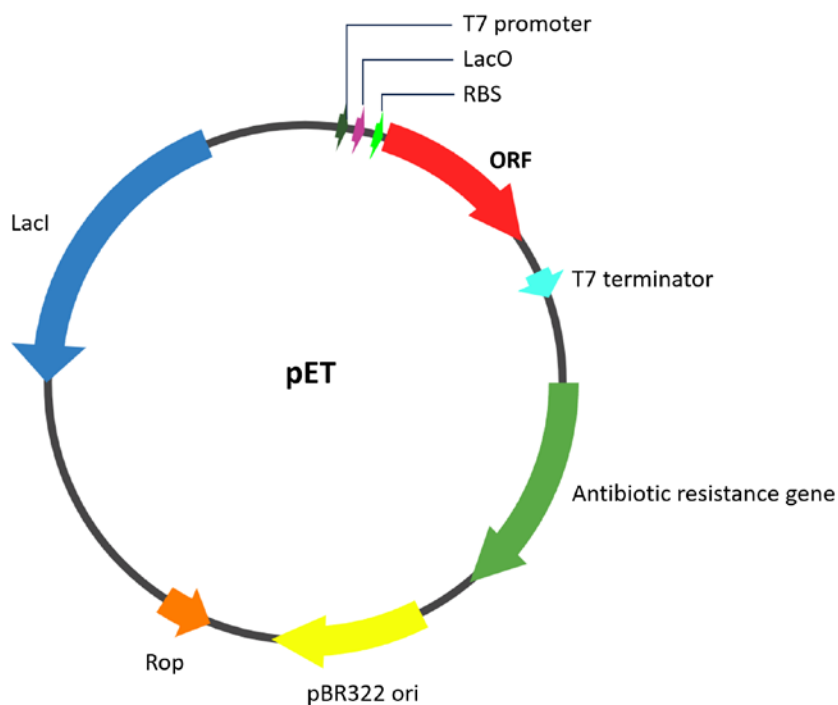
Các gen mục tiêu được sao chép trong các plasmid pET dưới sự kiểm soát của các tín hiệu phiên mã và dịch mã (tùy chọn) của bacteriophage. Sự biểu hiện được tạo ra bằng cách cung cấp một nguồn T7 RNA polymerase trong tế bào chủ. T7 RNA polymerase có tính chọn lọc và hiệu quả đến mức hầu như tất cả các nguồn nguyên liệu

của tế bào được chuyển đổi để biểu hiện gen mục tiêu. Chỉ sau vài giờ cảm ứng, protein tái tổ hợp có thể chiếm hơn 50% tổng số protein của tế bào.

Vector pET tồn tại dưới dạng plasmid có số lượng bản sao thấp trong vật chủ *E. coli*, làm giảm biểu hiện rò rỉ trước khi cảm ứng. Vector sử dụng hệ thống T7 lac promoter để biểu hiện gen mạnh mẽ và được kiểm soát chặt chẽ. Trong hệ thống này, một T7 promoter có thể được tác động bởi T7 RNA polymerase để thúc đẩy sự biểu hiện ở mức độ cao của gen quan tâm. Ngoài ra, có một trình tự toán tử lac (LacO) ngay phía sau của T7 promoter có thể được protein ức chế lac (LacI) tác động để ngăn chặn quá trình phiên mã của T7 promoter. Plasmid cũng mang promoter tự nhiên và trình tự mã hóa cho LacI. Protein LacI hoạt động tại LacUV5 promoter trong tế bào chủ để ức chế sự biểu hiện của gen polymerase T7 RNA bởi polymerase chủ và cũng có chức năng tại T7lac promoter trên vector pET để ngăn chặn phiên mã của gen quan tâm bởi bất kỳ T7 RNA polymerase nào có thể được tạo ra do biểu hiện rò rỉ.

Việc bổ sung *isopropyl β-D-thiogalactosidase* (IPTG) ngăn chặn hoạt động ức chế của LacI, T7 RNA polymerase được biểu hiện và cũng loại bỏ sự ức chế LacI của gen quan tâm. Mặc dù hệ thống biểu hiện pET được thiết kế để biểu hiện protein tái tổ hợp ở mức độ cao nhưng có thể giảm mức độ biểu hiện bằng cách giảm lượng IPTG cung cấp cho tế bào chủ. Điều này giúp thuận lợi khi biểu hiện các protein có độ hòa tan hạn chế.

### 1.3.2. Cấu trúc hệ vector pET



Hình 1.8. Cấu trúc điển hình của vector pET



Cấu trúc hệ vector pET bao gồm:

**T7 promoter:** Thúc đẩy quá trình phiên mã ở mức độ cao của gen quan tâm khi có mặt T7 RNA polymerase. Khi được đặt ngay phía trên phần tử LacO, toàn bộ vùng này được gọi là T7lac promoter.

**LacO:** Vị trí liên kết cho LacI. Yếu tố này ức chế hoạt động của T7 promoter khi có mặt protein LacI, ngăn chặn sự rò rỉ biểu hiện của gen quan tâm.

**RBS:** Vị trí gắn ribosome và yếu tố khởi đầu dịch mã từ T7 bacteriophage. Điều này cho phép sản xuất hiệu quả protein quan tâm.

**ORF:** Khung đọc mở của gen quan tâm được đặt ở đây. **T7 terminator:** Trình tự tín hiệu để kết thúc quá trình phiên mã được tạo ra từ gen quan tâm, ngăn chặn quá trình run-on transcription.

**Antibiotic resistant gene:** Gen kháng kháng sinh.

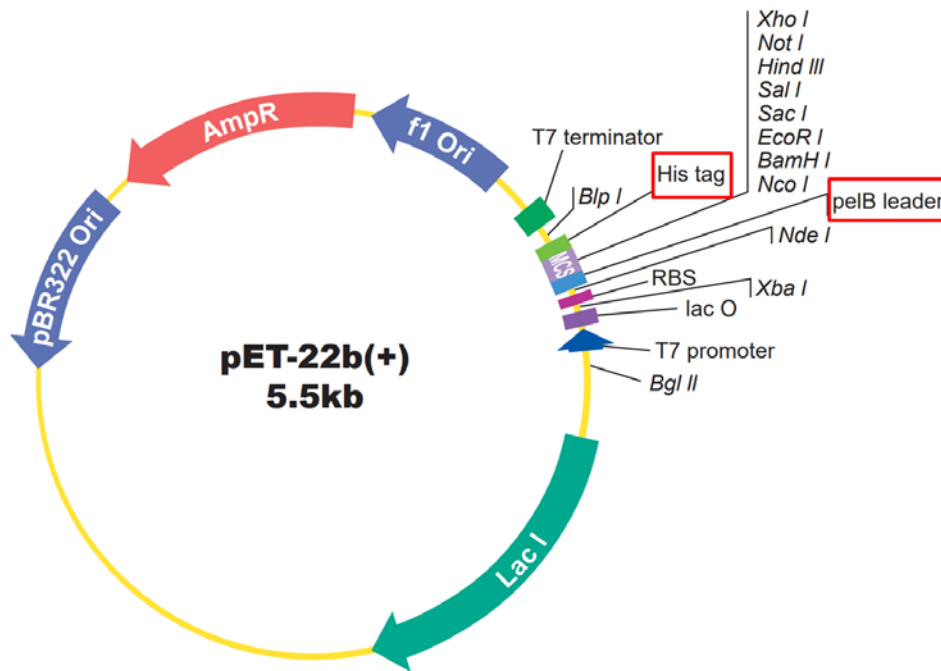
**pBR322 ori:** nguồn gốc tái bản. Các plasmid mang nguồn gốc này cũng như gen Rop tồn tại với số lượng bản sao thấp ở *E. coli*.

**Rop:** Chất ức chế primer. Nó mã hóa một loại protein nhỏ điều chỉnh số lượng bản sao của plasmid. Sự hiện diện của protein Rop, kết hợp với pBR322 ori trên plasmid, dẫn đến số lượng bản sao của plasmid thấp.

**LacI:** Trình tự khởi động tự nhiên của *E. coli* và trình tự mã hóa cho lac repressor. Trong trường hợp không có sự cảm ứng của hệ thống (không có IPTG), protein LacI sẽ ức chế quá trình phiên mã của gen quan tâm từ T7lac promoter, cũng như phiên mã của T7 RNA polymerase từ LacUV5 promoter trong các chủng vật chủ được sử dụng để sản xuất protein tái tổ hợp.

### 1.3.3. Hệ vector pET-22b(+)

Ở vi khuẩn *E. coli*, các peptide tín hiệu đầu-cuối chẳng hạn như: pelB, ompA, phoA, maIE, lamB và ompC, ... làm trung gian cho sự chuyển vị của các protein qua màng tế bào chất, thường được sử dụng để sản xuất protein tiết ngoại bào. Vector pET-22b(+) mang chuỗi tín hiệu pelB ở đầu N gồm 22 gốc axit amin, khi được gắn vào một protein, sẽ hướng protein đến chu chất của vi khuẩn, nơi trình tự này bị loại bỏ bởi một peptidase tín hiệu [47]. Thêm vào đó, hệ thống này còn có đuôi His•Tag® ở đầu C, thuận tiện cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực Ni-NTA.



Hình 1.9. Sơ đồ vector pET-22b(+). Nguồn: Genscript

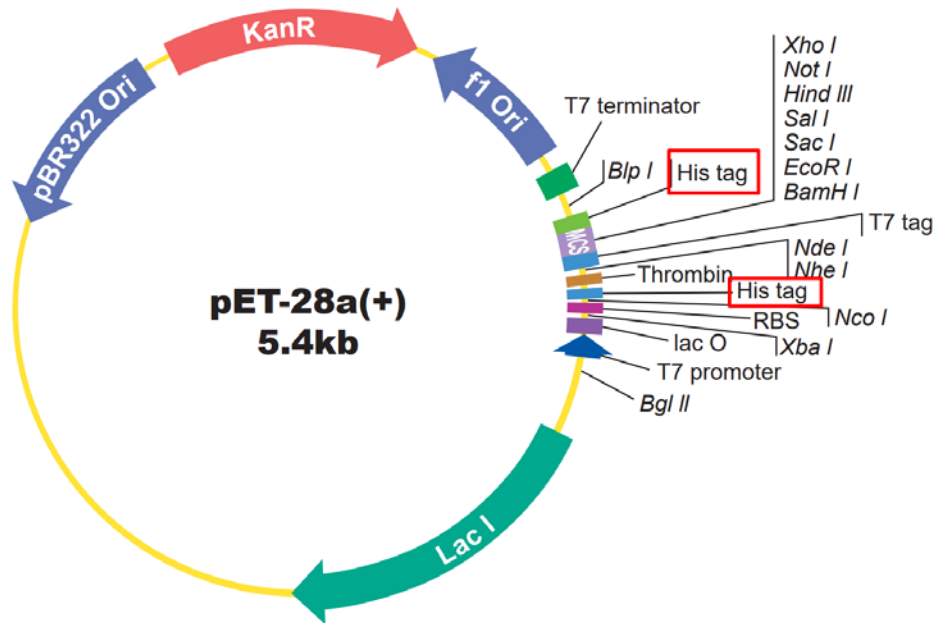
Khả năng của PET hydrolase từ *Ideonella sakaiensis* 201-F6 (*IsPETase*) để phân hủy PET ở nhiệt độ vừa phải đã được nghiên cứu rộng rãi. Tuy nhiên, do tính ổn định cấu trúc và độ hòa tan thấp nên rất khó áp dụng các quy trình tinh chế và biểu hiện *IsPETase* ở cấp độ phòng thí nghiệm cho quy mô công nghiệp. Để khắc phục khó khăn này, biểu hiện của *IsPETase* có thể được cải thiện bằng cách sử dụng hệ thống bài tiết. Seo và cộng sự đã báo cáo lần đầu tiên về việc sản xuất *IsPETase* ngoại bào, có hoạt tính phân rã màng PET, sử dụng các peptide tín hiệu chuyển vị Sec-dependent trong hệ thống pET-22b(+) ở vi khuẩn *E. coli* [42]. Một nghiên cứu gần đây năm 2021, Shi và cộng sự đã cải thiện khả năng tiết PETase ngoại bào bằng việc cải biến tín hiệu pelB trên hệ vector pET-22b(+) [44].

Trong nghiên cứu này, với mục đích tạo ra enzyme tiết trực tiếp ra ngoài môi trường mà không cần trải qua phá tế bào, trình tự gen thiết kế *petase* được chúng tôi chèn vào hệ thống vector pET-22b(+) có chứa peptide tín hiệu pelB, biểu hiện và đánh giá khả năng khử trùng hợp trên màng film PET của PETase tái tổ hợp.

#### 1.3.4. Hệ vector pET-28a(+)

Vector pET-28a(+) mang trình tự His•Tag®/thrombin/T7•Tag® đầu N cộng với một trình tự His•Tag® ở đầu C được tối ưu thuận lợi cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực NI-NTA.





Hình 1.10. Sơ đồ vector pET-28a(+). Nguồn: Genscript

Chiến lược sử dụng hệ thống pET-28a biểu hiện PETase nội bào đã được thực hiện để dễ dàng phục vụ các mục đích như cải thiện hoạt động và khả năng ổn định nhiệt của PETase từ *I. sakaiensis* thông qua điều chỉnh sửa đổi glycan sau dịch mã tạo ra *IsPETase* tăng cường hoạt tính và ổn định nhiệt từ *P. pastoris* thông qua kỹ thuật glycosyl hóa [41][48].

Bên cạnh sử dụng hệ thống biểu hiện ngoại bào, hệ vector pET-28a(+) biểu hiện protein tiết nội bào cũng được nghiên cứu để tối ưu khả năng biểu hiện của PETase tái tổ hợp, tinh sạch protein ở mức độ cao làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

## Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

#### 2.1.1. Vật liệu sinh học

*Chủng vi sinh vật:* Các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ các hãng Invitrogen và Novagen của Mỹ bao gồm: Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng để tách dòng gen mã hoá cho protein PETase. Chủng *E. coli* BL21(DE3) được sử dụng làm chủng biểu hiện protein tái tổ hợp.

*Plasmid:* Plasmid được sử dụng để tách dòng là pLUG-Prime® TA-Cloning Vector Kit II (2728 bp, Intron, Hàn Quốc) và vector pET-22b(+) (5493 bp, Promoter LacI, Ampr), vector pET-28a(+) (5369 bp, Promoter LacI, KanR) (Novagen).

Gen *petase* được tổng hợp bởi hãng Biomatik (Canada).

#### 2.1.2. Hóa chất

Các hoá chất và thiết bị máy móc sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp bởi các hãng uy tín trên thế giới, được trình bày trong Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

| Nhà sản xuất                  | Hóa chất  |
|-------------------------------|---|
| Thermo fisher scientific (Mỹ) | Enzyme cắt giới hạn <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> , <i>NcoI</i> , Dreamtaq green PCR master mix (2X), agarose, marker DNA chuẩn, T4 ligase, kit thổi gel GeneJET Gel Extraction, thang protein chuẩn, Ni-NTA agarose, 1-Step-TMB blotting |
| Merck (Đức)                   | Môi trường nuôi cấy vi sinh: cao nấm men, Bacto™ tryptone, ethanol, chloroform, isoamyl alcohol, sodium chloride, ammonium sulfate  |
| Oxoid (Anh)                   | Ampicillin, kanamycin   |
| Sigma-aldrich (Mỹ)            | APS, IPTG, X-gal, TMB   |
| Intron (Hàn Quốc)             | Redsafe   |

#### 2.1.3 Thiết bị

Bảng 2.2. Các thiết bị được sử dụng chính trong nghiên cứu

| Nhà sản xuất                 | Thiết bị                             |
|------------------------------|--------------------------------------|
| Thermo fisher Scientific, Mỹ | Máy ly tâm, Hệ thống SpeedVac        |
| Hirayama, Nhật Bản           | Nồi hấp tiệt trùng                   |
| Amerex Instruments, Mỹ       | Tủ ấm vi sinh                        |
| Sanyo, Nhật Bản              | Tủ lạnh -20°C, -80°C, Tủ cấy vi sinh |
| OHAUS, Mỹ                    | Máy vortex, máy khuấy từ             |

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp thu thập thông tin lựa chọn gen mã hóa protein PETase, tối ưu mã biểu hiện

Thông tin về trình tự gen mã hóa cho enzyme PETase của *I. sakaiensis* được thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI với số đăng ký BBYR01000074.1 trong ngân hàng GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=BBYR01000074.1%20>) làm cơ sở để thiết kế gen *petase* biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*. Trình tự gen mã hóa sau khi lựa chọn sẽ được bổ sung trình tự nhận biết của các enzyme cắt giới hạn cho mục đích chèn gen vào vector chuyển gen, sau đó được tối ưu mã thích hợp cho sự biểu hiện protein ở *E. coli* sử dụng phần mềm cung cấp bởi hãng Biomatik (Canada). Phần mềm sẽ lựa chọn các bộ mã ưu tiên tương thích để cải biến trình tự gen mã hóa PETase của *I. sakaiensis* sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện ở *E. coli* mà không làm thay đổi trình tự axit amin. Sau đổi mã, trình tự nucleotide này sẽ được so sánh với trình tự nucleotide gốc, đồng thời dịch mã thành chuỗi polypeptide để so sánh với trình tự axit amin gốc. Trình tự gen *petase* sau khi tối ưu mã được tổng hợp nhân tạo tại hãng Biomatik (Canada).

### 2.2.2. Nhân gen *petase* bằng kỹ thuật PCR

Gen *petase* được khuếch đại sử dụng enzyme Dreamtaq (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) và cặp môi đặc hiệu được thiết kế cho sản phẩm PCR có thêm vùng trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *XhoI* (cho chuyển gen vào vector pET-28a(+)) và enzyme cắt giới hạn *NcoI* và *XhoI* (chuyển gen vào vector pET-22b(+)) ở đầu 5' và 3'. Trình tự của các cặp primer như sau:

❖ Cặp môi chuyển gen vào vector pET-22b(+):

PETASE01F: 5' CTGGCGGTGACCATGGGCATGAACTTC 3'

PETASE02R: 5' TATCCGCTCGAGGCTGCAATTTGC 3'

❖ Cặp môi chuyển gen vào vector pET-28a(+):

PETASE03F: 5' CTGGCGGTGACATATGGGCATGAACTTC 3'

PETASE04R: 5' TATCCGCTCGAGGCTGCAATTTGC 3'

Màu xanh là các nucleotide thêm vào, màu đỏ là trình tự nucleotide của enzyme cắt giới hạn, màu đen là các nucleotide bắt cặp với gen.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR

| Thành phần                         | Thể tích (μl) |
|------------------------------------|---------------|
| DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) | 12,5          |
| PETASE01F/PETASE03F (10 pmol)      | 1,0           |
| PETASE02R/PETASE04R (10 pmol)      | 1,0           |
| DNA mẫu (50-100 ng)                | 1,0           |
| H <sub>2</sub> O                   | 9,5           |

|      |    |
|------|----|
| Tổng | 25 |
|------|----|

Phản ứng PCR được thực hiện theo chu trình nhiệt như sau:

Bảng 2.4. Chu trình thực hiện phản ứng PCR

| Bước | Phản ứng          | Nhiệt độ (°C) | Thời gian (phút) | Số chu kỳ |
|------|-------------------|---------------|------------------|-----------|
| 1    | Biến tính         | 94            | 3                | 1         |
| 2    | Biến tính         | 94            | 0,5              | x 25      |
| 3    | Bắt cặp           | 58            | 0,5              |           |
| 4    | Kéo dài           | 72            | 1                |           |
| 5    | Hoàn tất kéo dài  | 72            | 8                | 1         |
| 6    | Kết thúc phản ứng | 4             | 10               |           |

Sản phẩm PCR được kiểm tra kích thước bằng DNA bằng điện di trên gel agarose 1%.

### 2.2.3. Tách dòng gen mã hóa PETase

Vector pLUG-Prime® TA-Cloning Kit II sử dụng phục vụ cho chiến lược tách dòng hiệu quả, nhanh và cho phép chèn trực tiếp sản phẩm PCR vào vector plasmid. Sản phẩm PCR nhân lên bằng Taq polymerase do enzyme này có hoạt tính gắn với đầu cuối 3' một nucleotide A, liên kết bổ sung với nucleotide T của vector (vector tách dòng có phần T-overhang nhô ra ở vị trí đầu 3'). Sản phẩm PCR được kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose 1%, sau đó được ghép nối trực tiếp vào vector tách dòng pLUG-Prime® TA-Cloning Vector Kit II (Intron, Hàn Quốc) bằng enzyme T4 ligase, theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 30 giây. Thể biến nạp được nuôi trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB) có bổ sung ampicillin 100  $\mu$ g/mL, X-gal 20  $\mu$ g/ml để chọn lọc xanh-trắng, sau đó tách plasmid và cắt kiểm tra plasmid tách dòng với 2 cặp enzyme giới hạn tương thích *Nde*I, *Xho*I và *Nco*I, *Xho*I.

Bảng 2.5. Thành phần hỗn hợp phản ứng ghép nối

| Thành phần  | Thể tích ( $\mu$ l) |
|---|---------------------|
| Sản phẩm PCR (50 ng)                                  | 2                   |
| pLUG-Prime® TA-Cloning Vector Kit II (25 ng/ $\mu$ l) | 2                   |
| 10X Ligation buffer A (1X)                            | 1                   |
| 10X Ligation buffer B (1X)                            | 1                   |
| H <sub>2</sub> O                                      | 3                   |
| T4 DNA ligase   | 1                   |
| Tổng  | 10                  |

### 2.2.4. Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt

Dựa trên phương pháp biến nạp plasmid vào vi khuẩn bằng sốc nhiệt của Froger

và Hall năm 2007 [49].

Trước khi biến nạp plasmid tái tổ hợp vào vi khuẩn *E. coli* cần chuẩn bị tế bào khả biến. 50 mL môi trường LB được cấy với dịch tế bào đã nuôi cấy qua đêm theo tỷ lệ 1%, ủ ở 37°C, lắc 200 v/p cho đến khi đạt giá trị OD<sub>600nm</sub> đạt đến 0,5 – 0,6 (pha log của vi sinh vật).

Sau khi ly tâm 5000 v/p trong 10 phút, cặn tế bào được hòa lại trong 50mL dung dịch CaCl<sub>2</sub> 100mM, giữ trên đá 30 phút. Tiếp tục ly tâm ở 5000 v/p trong 10 phút để thu tế bào rồi hoà lại trong 2,5 ml CaCl<sub>2</sub> 100 mM. Chia dịch tế bào thành 50 µl/ một ống và giữ trong đá 2 giờ. Sau đó, hút 2 µl hỗn hợp dịch nối ghép bổ sung trực tiếp vào ống tế bào khả biến và ủ ổn định trong đá 30 phút.

Để biến nạp DNA vào tế bào, mẫu được sốc nhiệt ở 42°C trong 30 giây rồi ổn định tế bào trong đá 2 phút. Bổ sung 250 µl môi trường LB lỏng và ủ ở 37°C, lắc 200 v/p trong 1 giờ. Cấy trải 100 µl dịch tế bào lên đĩa môi trường LB thạch chứa ampicillin và X-gal với nồng độ cuối cùng lần lượt là 100 µg/ml và 20 µg/ml rồi ủ ở 37°C qua đêm.

### 2.2.5. Tách chiết DNA từ các tế bào *E. coli*

Plasmid sau khi được biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α được nuôi trong môi trường LB lỏng chứa ampicillin nồng độ cuối 100 µg/ml, lắc 200 v/p ở 37°C qua đêm. Chuyển dịch tế bào nuôi cấy sang các ống eppendorf 1.5 ml và li tâm 4000 v/p trong vòng 10 phút để thu tế bào. Cặn tế bào vi khuẩn sau đó được hòa vào 150 µl/ml dung dịch I, hoà tan hoàn toàn bằng máy vortex. Tiếp tục bổ sung 150 µl/ml dung dịch II và đảo đều nhẹ nhàng. Bổ sung tiếp 150 µl/ml dung dịch III và đảo đều. Sau đó ly tâm 11500 v/p, 15 phút ở nhiệt độ phòng và loại cặn tủa, chuyển pha lỏng sang các ống eppendorf mới. Bổ sung mỗi ống 10µl RNase 1mg/ml, ủ ở 37°C trong 3 giờ để loại sạch RNA trong mẫu. Hỗn hợp dịch sau đó được trộn đều với 450 µl/ml dung dịch [chloroform:isoamyl alcohol] theo tỷ lệ [24:1]. Sau đó ly tâm 11500 v/p, 15 phút ở nhiệt độ phòng. Lúc này hỗn hợp sẽ tách thành hai pha, thu dung dịch pha trên và chuyển sang ống eppendorf mới để tủa DNA. Dung dịch sodium acetate 3M, pH 5,3 được bổ sung vào dung dịch chứa mẫu theo tỷ lệ thể tích 1:10 và trộn đều. Tiếp tục hoà vào ethanol 100% theo tỷ lệ thể tích 25:10. Hỗn hợp dung dịch được ủ ở - 20°C, 2 giờ. Sau đó ly tâm 12000 v/p trong 10 phút ở 4°C, cặn ly tâm được rửa bằng ethanol 70% đã giữ lạnh ở - 20°C và ly tâm 12000 v/p, 10 phút, 4°C. Cặn ly tâm được làm khô bằng Speedvac đến khi khô hoàn toàn. Cuối cùng DNA được hoà tan bằng nước cất đã khử trùng và bảo quản ở nhiệt độ - 20°C.

Bảng 2.6. Thành phần dung dịch tách chiết DNA

| Dung dịch | Thành phần   |
|-----------|--|
| I         | 25mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA pH 8,0; 50mM glucose |

|     |  |
|-----|--|
| II  | 0,2M NaOH; 1% SDS                            |
| III | 3M potassium acetate; 11,5 (v/v) acetic acid |

---

Quy trình dựa trên phương pháp tách chiết plasmid bằng các dung môi hữu cơ phenol: isoamylalcohol của Kirby S. Barker và cộng sự năm 1957 [50].

### 2.2.6. Điện di DNA trên gel agarose

Kỹ thuật điện di được thực hiện để phân tích và tách chiết DNA theo Sambrook và cộng sự [51]. Các đoạn DNA lớn hơn 0,5 kb có thể được phân tách trên gel agarose 0,8-1% (w/v). Đệm điện di chứa Tris-HCl 40mM, acid acetic 20mM, EDTA 2mM, pH 8,3. Hiệu điện thế 100V được sử dụng cho quá trình điện di. DNA được nhuộm bằng Redsafe (Intron) và được quan sát dưới máy soi UV.

### 2.2.7. Tách chiết DNA ra khỏi gel agarose

Tách chiết DNA ra khỏi gel agarose bằng bộ kit GeneJET Gel Extraction theo quy trình hướng dẫn của nhà sản xuất: Sau khi xác định được băng DNA quan tâm trên bản gel điện di DNA, tách mảnh gel chứa đoạn này và cân trong ống eppendorf 2 ml, sau đó bổ sung Binding Buffer theo tỷ lệ 1:1 (thể tích đệm : trọng lượng gel chứa mẫu) và ủ phản ứng ở 50°C trong 10 phút cho tới khi mảnh gel hoà tan hoàn toàn. Để thu DNA, hỗn hợp gel hòa tan ở trên được cho lên cột tinh sạch GeneJET đã được đặt trong ống thu nhận 2 ml và ly tâm 12000 v/p, 1 phút. Loại bỏ phần dịch chảy xuống ống thu nhận và rửa cột tinh sạch GeneJET bằng 0,7 ml Washing Buffer, ly tâm 12000 v/p, 1 phút. Tiếp tục loại bỏ phần dịch chảy xuống ống thu nhận và ly tâm cột GeneJET trống thêm 1 phút nữa để loại bỏ hoàn toàn dung dịch đệm rửa còn sót lại. Các cột GeneJET được đặt vào các ống thu mẫu 1,5 ml. Để thu mẫu DNA, 20 µl đệm thôi mẫu (Elution Buffer) được cho vào phần tâm cột và giữ đứng trong 1 phút. Ly tâm, tổ hợp cột/ ống 12000 v/p, 1 phút. Loại bỏ cột và giữ các ống thu mẫu ở - 20°C. Kiểm tra DNA thôi gel bằng cách điện di trên gel agarose 0,8%.

### 2.2.8. Xác định trình tự gen bằng máy phân tích trình tự gen tự động

Toàn bộ DNA chèn vào pLUG-Prime® TA-Cloning Vector Kit II được giải trình tự tự động trên máy ABI PRISM® 3700 Avant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystems. Trình tự gen được xử lý phân tích bằng phần mềm Bioedit 7.0.

### 2.2.9. Thiết kế vector biểu hiện gen mã hoá cho PETase

Sau khi được làm sạch từ gel agarose, gen *petase* và vector pET-28a(+) được xử lý với hai enzyme giới hạn *NdeI* và *XhoI* rồi nối ghép với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Bảng 2.7) và ủ ở 22°C qua đêm. Tương tự, gen

*petase* và vector pET-22b(+) được xử lý với cặp enzyme *NcoI* và *XhoI*. Tiếp đến, các sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$  để chọn dòng những vector có chứa gen *petase*. Các vector tái tổ hợp này được ký hiệu là pET-22b(+)/*petase*, pET-28a(+)/*petase* và được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) để biểu hiện.

Bảng 2.7. Thành phần hỗn hợp phản ứng ghép nối

| Thành phần             | Thể tích ( $\mu$ l) |
|------------------------|---------------------|
| Gen <i>petase</i>      | 2                   |
| Vector                 | 1                   |
| Dung dịch đệm T4 (10X) | 1                   |
| H <sub>2</sub> O       | 5                   |
| T4 DNA ligase          | 1                   |
| Tổng                   | 10                  |

### 2.2.10. Biểu hiện PETase ở *E. coli*

Sau khi vector tái tổ hợp được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3), tế bào này được nuôi trong môi trường LB có bổ sung ampicillin nồng độ cuối cùng 100  $\mu$ g/ml (đối với pET-22b(+)) hoặc kanamycin 50  $\mu$ g/ml (đối với pET-28a(+)), lắc 200 v/p ở 37°C cho đến khi OD<sub>600</sub> của dịch tế bào đạt 0,5 – 0,7 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,2 mM và tiếp tục nuôi tế bào 16 giờ ở 37°C. Dịch tế bào sẽ được thu ở các thời điểm 0 giờ (trước khi cảm ứng) và 16h sau cảm ứng. Mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE.

### 2.2.11. Khảo sát các điều kiện biểu hiện PETase ở *E. coli*

#### Nhiệt độ

Để xác định nhiệt độ biểu hiện tối ưu cho sinh tổng hợp PETase, chủng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp mã hóa PETase được nuôi trong môi trường LB lỏng, bổ sung kháng sinh chọn lọc (kanamycin nồng độ cuối cùng là 50  $\mu$ g/ml) ở 37° C. Khi OD<sub>600nm</sub> của dịch tế bào đạt 0,5 – 0,7 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,5 mM. Duy trì sự cảm ứng biểu hiện protein ở các nhiệt độ khác nhau 22°C, 28°C và 37°C. Dịch nuôi cấy được thu nhận sau 16h cảm ứng, sau đó được phân tách thành phần dịch nổi (chứa các protein ngoại bào) và phần sinh khối (chứa các protein nội bào) bằng ly tâm 4000 v/p trong 20 phút. Mức độ biểu hiện của PETase tái tổ hợp ở các điều kiện nhiệt độ được kiểm tra và so sánh bằng điện di SDS-PAGE.

#### Nồng độ chất cảm ứng IPTG

Để xác định nồng độ IPTG có ảnh hưởng như thế nào đến quá trình cảm ứng tổng hợp PETase, chủng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp được nuôi ở 37° C trong môi trường LB lỏng có bổ sung các kháng sinh chọn lọc với nồng độ cuối cùng là kanamycin 50

$\mu\text{g/ml}$ . Khi  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  của dịch tế bào đạt 0,5 – 0,7 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,2; 0,4; 0,5; 0,75mM và tiếp tục nuôi ở 22°C. Phần dịch nổi và sinh khối tế bào được thu lại sau 16h cảm ứng. Mức độ biểu hiện của PETase tái tổ hợp được kiểm tra và so sánh trên điện di SDS-PAGE.

### 2.2.12. Phân tích protein bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE và Western Blot

#### SDS-PAGE

Điện di SDS-PAGE được thực hiện theo phương pháp của Laemmli và cộng sự sử dụng gel polyacrylamide 12,6% [52]. Để phân tích mức độ biểu hiện của protein, các bản gel được nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue (CBB). Sau khi ủ với dung dịch nhuộm [CBB 0,1% (w/v), methanol 30% (v/v), acid acetic 10% (v/v)] trong 30 phút, bản gel được tẩy rửa bằng dung dịch tẩy (methanol 30% (v/v), acid acetic 10% (v/v)) cho đến khi quan sát thấy các băng protein.

Bảng 2.8. Thành phần và các dung dịch đệm SDS-PAGE

|                      | Thành phần   |
|----------------------|--|
| Gel cô mẫu 5%        | 0,8 ml: 0,45 ml H <sub>2</sub> O; 0,2 ml Tris – HCl 0,5M pH 6,8; 0,14 ml Bis- Acrylamid 30%; 4 $\mu\text{l}$ SDS 10%; 8 $\mu\text{l}$ APS 10%; 1 $\mu\text{l}$ TEMED         |
| Gel phân tách 12.6 % | 4,5ml: 0,55ml H <sub>2</sub> O; 1,125 ml Tris – HCl 1,5 M pH 8,8; 1,89 ml Bis-Acrylamid 30%; 0,9 ml Glycerol 50%, 45 $\mu\text{l}$ SDS 10%; APS 10%; 3 $\mu\text{l}$ TEDMED. |
| Đệm mẫu 5X           | 25% (v/v) glycerol; 14,4 mM $\beta$ -mecraptoethanol; 2% (w/v) SDS; 0,1(w/v) bromophenol blue; 60 mM Tris – HCl pH 6,8   |
| Đệm điện di          | 25 mM Tris – HCl; 192 mM glycine; 0,1% (w/v) SDS   |

#### Western-blotting

Các bản gel sau khi điện di được chuyển lên màng PVDF bằng hệ thống chuyển màng Trans-Blot SD semi-dry (Bio-Rad). Sau khi chuyển, màng được ủ với dung dịch khóa (Blocking) (dung dịch sữa tách béo 5% với 1 $\times$  TBS-T) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau đó, màng này được ủ với dung dịch Blocking có bổ sung kháng thể đơn dòng kháng His•tag của thỏ (Anti-His-Tag antibody, Rabbit monoclonal recombinant) được pha loãng theo tỷ lệ 1:2000 (Sigma Aldrich) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Sau khi gắn kháng thể, màng được rửa bằng 1 $\times$  TBS-T ba lần (20 phút/lần rửa) để loại bỏ kháng thể sơ cấp bám không đặc hiệu trên màng. Tiếp theo đó, ủ màng với kháng thể thứ cấp Anti-Rabbit IgG (Promega) pha loãng theo tỷ lệ 1:2500 trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng và lặp lại bước rửa màng bằng 1 $\times$  TBS-T năm lần. Để quan sát các băng protein, màng được xử lý bằng 1-Step TMB Blotting (Thermo scientific).



### 2.2.13. Tinh chế protein nội bào bằng sắc ký ái lực Ni-NTA

Gen mã hóa PETase được thiết kế vào vector pET-22b(+) và pET-28a(+) có chứa trình tự 6xHistidine thuận lợi cho việc tinh sạch protein bằng sắc ký ái lực Ni-NTA. Tuy nhiên, đối với PETase biểu hiện ngoại bào (hệ vector pET22b(+)-*petase*), chúng tôi không thực hiện tinh sạch protein mà thực hiện các bước rửa, cô đặc dịch chiết rồi đi thử hoạt tính trực tiếp.

Chủng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pET28a(+)-*petase* được nuôi trong môi trường LB lỏng, bổ sung kanamycin nồng độ cuối cùng là 50 µg/ml ở 37°C. Khi OD<sub>600</sub> của dịch tế bào đạt 0,5 – 0,7 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,5 mM. Quá trình lên men được thực hiện ở 22°C. Dịch nuôi cấy được thu nhận sau 16h cảm ứng. Sau khi ly tâm 4000 v/p trong 20 phút, phần sinh khối tế bào (chứa các protein biểu hiện nội bào) được thu nhận.

Đối với protein biểu hiện nội bào, tế bào sau khi được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 4000 v/p trong 20 phút được hòa lại trong dung dịch đệm ly giải có chứa Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M, lysozyme 10 µg/ml. Sau đó, tế bào bị phá vỡ bởi sóng siêu âm. Các mảnh vụn tế bào được loại bỏ bằng cách ly tâm 13000 v/p trong 30 phút ở 4°C. Dịch trong chứa protein hòa tan được cho lên cột gel Ni-NTA. Cân bằng cột sắc ký với đệm Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M sau đó bổ sung imidazole (IMD) có nồng độ lần lượt là 40mM, 60mM, 80mM, 100 mM, 250mM để thu hồi protein tái tổ hợp. Kết quả tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE. Sau khi tinh chế bằng sắc ký ái lực, hàm lượng PETase được xác định bằng phương pháp Bradford [53]. Độ tinh sạch của PETase tái tổ hợp được đánh giá bằng phần mềm ImageJ.

### 2.2.14. Thu nhận protein ngoại bào bằng rửa muối và rửa acetone

Chủng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pET22b(+)-*petase* được nuôi trong môi trường LB lỏng, bổ sung ampicillin nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml ở 37°C. Khi OD<sub>600nm</sub> của dịch tế bào đạt 0,5 – 0,7 thì bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 0,2 mM. Quá trình lên men được thực hiện ở 22°C. Dịch nuôi cấy được thu nhận sau 16h cảm ứng.

Đối với protein biểu hiện ngoại bào, protein được tiết ra môi trường nuôi cấy, phần dịch nổi thu được sau khi ly tâm 4000 v/p trong 20 phút dịch nuôi cấy sẽ được rửa với muối ammonium sulfate đến nồng độ 75% (có bổ sung Tris-HCl 50mM và EDTA 5mM để hòa tan muối hoàn toàn) hoặc acetone tỉ lệ 4:1 (v/v) với mục đích làm giàu protein. Sau khi rửa với muối ammonium sulfate, hòa tan rửa trong 1,5 ml đệm Tris-HCl 50mM. Đối với mẫu rửa acetone, hòa tan rửa trong 1,5 ml muối amoni carbonat 50mM. Sau đó, các mẫu protein ngoại bào đã được làm giàu sẽ đi đánh giá hoạt tính phân hủy màng film PET. Sau bước rửa muối ammonium sulfate và rửa acetone, các mẫu protein dung hợp sẽ được định lượng bằng phần mềm ImageJ/ Fiji.

### **2.2.15. Định lượng protein bằng phương pháp Bradford**

Để xác định nồng độ protein trong mẫu, trước tiên phải xây dựng một đường chuẩn từ dung dịch BSA đã biết trước nồng độ (0,125; 0,25; 0,5 ; 0,75; 1,5 và 2 mg/ml). Trộn đều 20  $\mu$ l dung dịch BSA ở từng nồng độ trên với 980  $\mu$ l dung dịch Bradford 1X và giữ 5 phút ở nhiệt độ phòng. Hỗn hợp này sau đó được chuyển vào cuvette 1 ml và xác định giá trị OD<sub>595nm</sub>. Các mẫu cần xác định nồng độ protein cũng được xử lý tương tự để xác định giá trị OD<sub>595nm</sub>. Dựa vào đường chuẩn BSA đã xây dựng để tính nồng độ protein của mẫu.

### **2.2.16. Đánh giá hoạt tính phân hủy PET của enzyme tái tổ hợp**

Để đánh giá hoạt tính phân hủy PET của enzyme tái tổ hợp PETase, màng film PET được cắt thành các mảnh 1cm x 1cm. Tất cả các tấm film được rửa theo 3 bước liên tiếp, mỗi bước kéo dài 30 phút: dung dịch 1% SDS, ethanol 70% và cuối cùng bằng nước khử ion. Thí nghiệm được bố trí như sau: (1) Một tấm film PET được ủ trong 1.5ml dung dịch (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.NaCl 50mM được sử dụng làm mẫu đối chứng. (2) Một tấm film PET khác được ủ trong 1.5ml dung dịch (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.NaCl 50mM có chứa 5 $\mu$ g PETase. Ủ hai mẫu ở điều kiện nhiệt độ 30°C trong 7 ngày. Sau đó, các mảnh film PET được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét phân giải cao Hitachi S-4800 (FE-SEM, Hitachi, Nhật Bản).

### Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hiện nay, vấn đề môi trường và bảo vệ môi trường không chỉ là vấn đề của riêng từng quốc gia mà còn là vấn đề chung của toàn cầu, đang thu hút sự quan tâm đặc biệt của khắp các quốc gia trên thế giới. Tại các hội thảo quốc tế, nhiều biện pháp về bảo vệ môi trường đã được đưa ra và thu hút được sự quan tâm của những người tham dự. Bởi nó không chỉ ảnh hưởng đến sự phát triển của một quốc gia, mà còn quyết định sự tồn tại của con người trên thế giới hôm nay và các thế hệ tương lai.

Xã hội ngày càng phát triển nên nhu cầu tiêu thụ hàng hoá tiêu dùng của mọi người cũng ngày càng tăng kéo theo lượng rác thải thải ra môi trường ngày càng lớn, đặc biệt là rác thải nhựa. Chiếm thị phần lớn trong số đó là polyethylene terephthalate (PET) - một trong những polyme nhựa nhiệt dẻo được sử dụng phổ biến cho sản xuất chai nước giải khát và bao bì thực phẩm [54].

Việc tìm kiếm các phương án mới trong giải quyết vấn đề ô nhiễm từ rác thải nhựa vẫn đang là nỗ lực của các nhà khoa học trong nhiều năm qua. Vào năm 2016, một nhóm nghiên cứu từ Đại học Keio đã xác định được một loại enzyme thủy phân PET mới có tên là PETase từ vi khuẩn *Ideonella sakaiensis* 201-F6 hứa hẹn nâng cao khả năng tái chế nhựa PET.

Cho đến nay, PETase thường được tổng hợp bằng con đường hoá học. Tuy nhiên phương pháp tổng hợp hoá học bị hạn chế bởi cách thức tổng hợp thường qua nhiều khâu và giá thành sản xuất cao. Vì vậy PETase đang được chú trọng nghiên cứu, tạo ra bằng công nghệ DNA tái tổ hợp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tách dòng trình tự gen *petase* (đã được tối ưu mã biểu hiện trên vi khuẩn *E. coli*) và hệ thống vector pET-22b(+) và pET-28a(+) để biểu hiện PETase ở dạng ngoại bào và nội bào. Đối với PETase ngoại bào, protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện thành công được thu hồi bằng các phương pháp tủa (tủa muối, tủa aceton) và tiến hành nhận diện bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western-Blotting. Sau đó, protein tái tổ hợp được đánh giá hoạt tính khử trùng hợp trên màng film PET. Đối với PETase nội bào, do khả năng kiểm soát quá trình biểu hiện dễ dàng hơn nên chúng tôi tiến hành khảo sát các điều kiện nhiệt độ, nồng độ IPTG cảm ứng để tối ưu biểu hiện của protein tái tổ hợp. Sau khi nhận diện được protein PETase, tiến hành phá tế bào và đưa dịch chứa protein hòa tan lên cột sắc ký ái lực. Các phân đoạn sau khi tinh sạch được xác định hàm lượng bằng phương pháp Bradford và là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo. Quy trình thí nghiệm được mô hình hóa trên Hình 3.1.



Hình 3.1. Quy trình thí nghiệm sản xuất PETase tái tổ hợp tiết ngoại bào và nội bào

### 3.1. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa enzyme PETase

#### 3.1.1. Thu thập thông tin, tối ưu mã biểu hiện của gen mã hóa PETase

Sau khi thu thập dữ liệu trên Ngân hàng GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), chúng tôi đã sử dụng trình tự gen mã hóa PETase từ *I.sakaiensis* với mã số đăng ký BBYR01000074.1 làm cơ sở thiết kế gen *petase* biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*.

Các protein từ các sinh vật khác nhau có bộ mã đặc thù khác nhau. Vì vậy, để biểu hiện tốt trong vi khuẩn *E. coli*, bộ mã của gen cần được cải biến. Để tối ưu mã sao cho thích hợp với mô hình sản xuất protein đặc trưng của hệ thống biểu hiện, căn cứ vào bảng tần suất sử dụng các codon ở vi khuẩn *E. coli* trên ngân hàng dữ liệu mã di truyền Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>) kết hợp với việc sử dụng phần mềm Codon Optimization 2.0 (Twist Bioscience, Mỹ), chúng tôi đã loại bỏ và thay thế các codon hiếm trong gen mã hóa protein PETase.

Việc đổi mã được thực hiện dựa trên cơ sở các bộ mã thay đổi sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện ở *E. coli* nhưng không làm thay đổi trình tự của axit amin. Trình tự gen *petase* đã đổi mã và thiết kế thêm các điểm cắt của enzyme giới hạn *NdeI*, *NcoI* vào vị trí đầu 5' và *XhoI* ở vị trí đầu 3'.

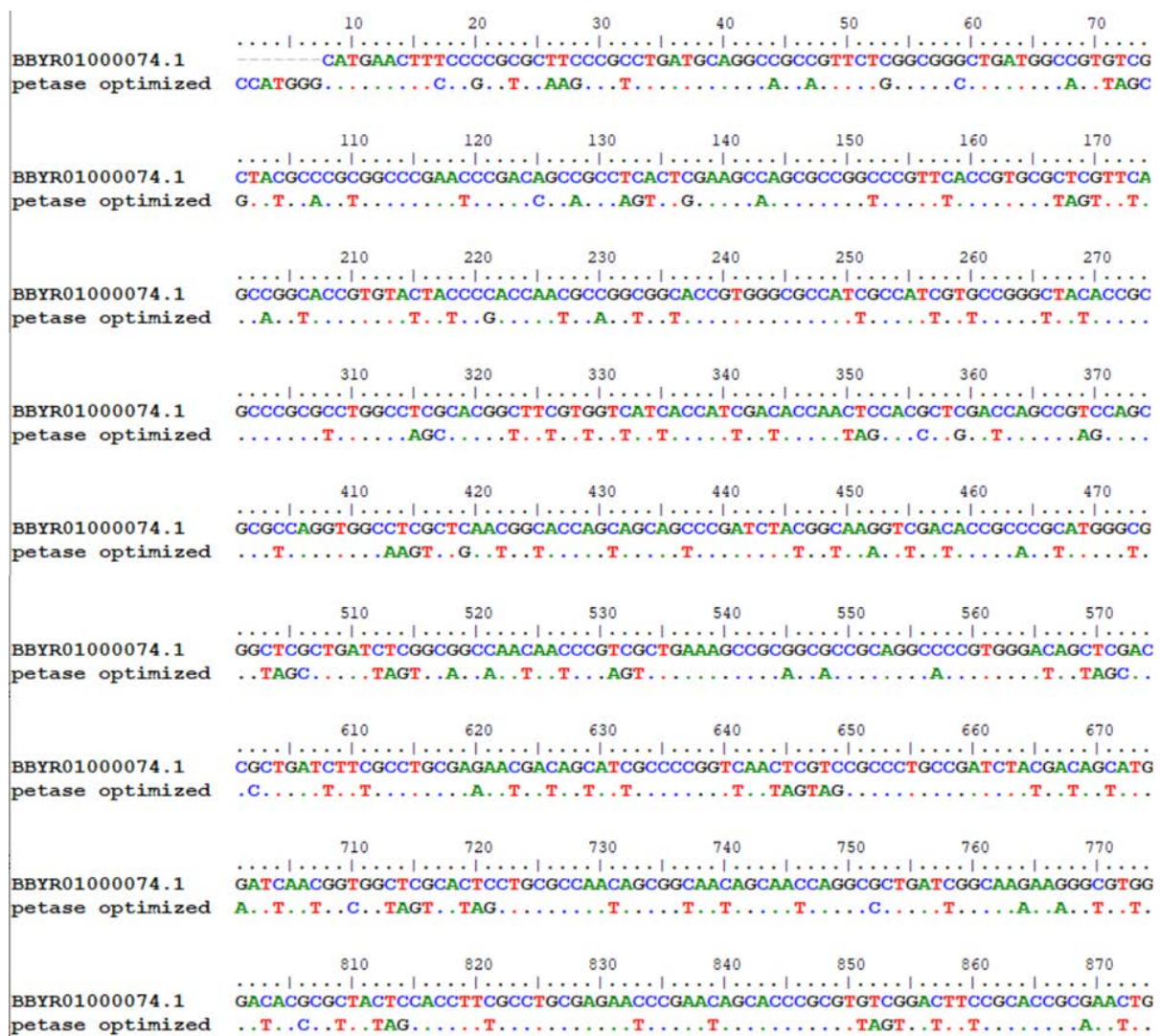
>petase optimized

```
CCATGGGCATGAACTTCCCGCGTGCAAGCCGTCTGATGCAGGCAGCAGTTCTGGG
CGGCCTGATGGCAGTTAGCGCAGCAGCCACCGCCCAGACCAATCCGTATGCACGT
GGCCCGAATCCGACCGCAGCCAGTCTGGAAGCAAGCGCCGGTCCGTTTACCGTGC
GTAGTTTTTACCGTTAGTCGCCCCGAGTGGTTATGGTGCAGGTACCGTGTATTATCC
GACCAATGCAGGTGGTACCGTGGGCGCCATTGCCATTGTTCCGGGTTATAACCGCC
CGCCAGAGCAGCATTAAAGTGGTGGGGCCCGCGTCTGGCCAGCCACGGTTTTGTTG
TTATTACCATTGATACCAATAGCACCCTGGATCAGCCGAGCAGCCGCAGCAGCCA
GCAGATGGCCGCCCTGCGTCAGGTGGCAAGTCTGAATGGTACCAGTAGCAGTCCG
ATCTATGGTAAAGTTGATACCGCACGTATGGGTGTTATGGGTTGGAGCATGGGCG
GTGGTGGTAGCCTGATTAGTCAGCAAATAATCCGAGTCTGAAAGCCGCAGCACCG
CAGGCACCGTGGGATAGTAGCACC AATTTTAGCAGTGTGACCGTTCCGACCCTGA
TTTTTGCCTGCGAAAATGATAGTATTGCCCGGTTAATAGTAGCGCCCTGCCGAT
CTATGATAGTATGAGCCGTAATGCAAAACAGTTTCTGGAAATTAATGGCGGTAGT
CATAGCTGCGCCAATAGCGGTAATAGCAATCAGGCCCTGATTGGCAAAAAAGGTG
TTGCATGGATGAAACGCTTTTATGGATAATGATACCCGTTATAGCACCTTTGCCTG
CGAGAATCCGAATAGCACCCGCGTTAGTGATTTTTCGCACCGCAAATTGCAGCTAA
TAAGGATCC
```

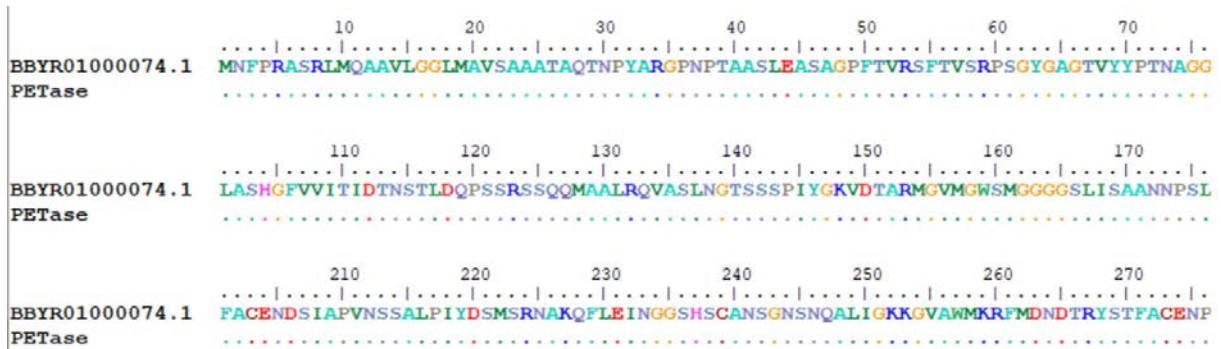
Trình tự nucleotide của gen mã hóa PETase trong vi khuẩn *I. sakaiensis* (số đăng ký BBYR01000074.1) được so sánh với trình tự gen *petase* cải biến sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện *E. coli* và thuận lợi cho việc thiết kế vector (petase optimized) bằng phần mềm Bioedit (Hình 3.2).

Sau khi tối ưu mã biểu hiện ở vi khuẩn *E. coli*, chúng tôi tiến hành so sánh trình tự amino axit của protein PETase trước và sau khi cải biến (Hình 3.3). Kết quả cho thấy rằng, có sự tương đồng 100% giữa trình tự axit amin của protein PETase trước và sau khi đổi mã.

Trình tự gen mã hóa protein PETase đã đổi mã được đặt tổng hợp nhân tạo bởi hãng Biomatik (Canada).



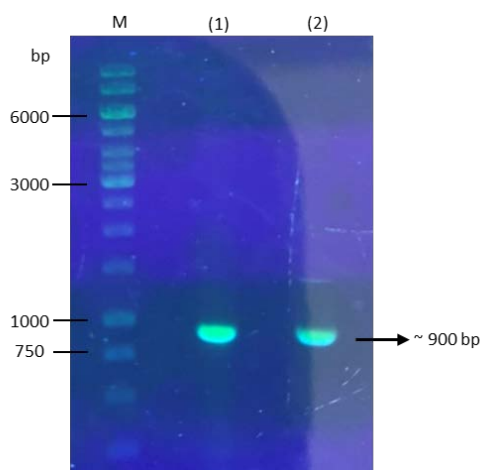
Hình 3.2. Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa PETase trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở *E. coli* bằng phần mềm Bioedit



Hình 3.3. Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein PETase trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở *E. coli* bằng phần mềm Bioedit

### 3.1.2. Tách dòng gen mã hóa protein PETase

Đầu tiên, gen *petase* thiết kế được khuếch đại bằng phản ứng PCR với hai cặp mồi PETASE01F/ PETASE02R và PETASE03F/ PETASE04R. Trong đó, cặp mồi PETASE01F/ PETASE02R được tổng hợp gồm: mồi xuôi với trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *NcoI* mang mã khởi đầu dịch mã ở *E. coli* nối với đoạn trình tự nucleotide bổ sung của gen *petase*, mồi ngược là trình tự nucleotide liên kết bổ sung với gen *petase* nối tiếp với trình tự của enzyme giới hạn *XhoI* không chứa mã kết thúc. Tương tự, cặp mồi PETASE03F/ PETASE04R được thiết kế với mồi xuôi có trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *NdeI* mang mã khởi đầu dịch mã ở *E. coli* nối với đoạn trình tự nucleotide bổ sung của gen *petase*, mồi ngược là trình tự nucleotide liên kết bổ sung với gen *petase* nối tiếp với trình tự của enzyme giới hạn *XhoI* không chứa mã kết thúc. Gen *petase* tạo thành có kích thước 891 bp.



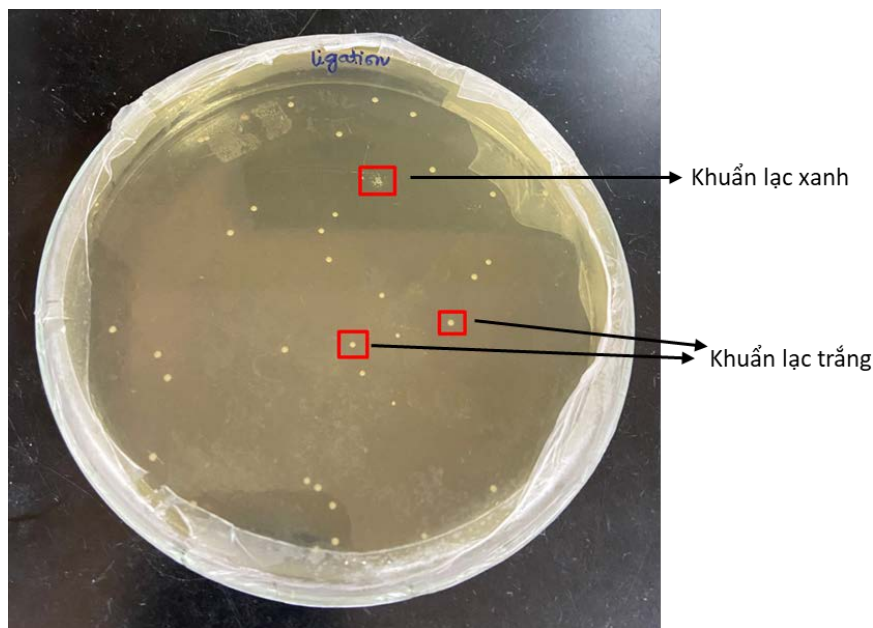
Hình 3.4. Điện di DNA sản phẩm PCR gen *petase* bằng cặp mồi thiết kế

Đường chạy số 1 là sản phẩm PCR gen *petase* bằng cặp mồi chứa trình tự của enzyme giới hạn *NcoI* và *XhoI*, đường chạy số 2 là sản phẩm PCR gen *petase* bằng cặp mồi chứa trình tự của enzyme giới hạn *NdeI* và *XhoI*, M là thang DNA chuẩn 1kb.



Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 1% được thể hiện trên Hình 3.4 cho thấy, cả hai đường chạy số 1 và 2 (tương ứng với gen *petase* khuếch đại bằng hai cặp mồi PETASE01F/ PETASE02R và PETASE03F/ PETASE04R) đều xuất hiện một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 900 bp, xấp xỉ kích thước của gen *petase* theo tính toán lý thuyết.

Sản phẩm PCR sau đó được nối vào vector tách dòng pLUG-Prime® TA-Cloning Kit II mở vòng dưới xúc tác của enzyme T4 DNA ligase để tạo thành các plasmid tái tổ hợp TA-Cloning/*petase*. Tổ hợp gen mới được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp sốc nhiệt, nuôi cấy và tiến hành tách chiết DNA để chọn ra dòng plasmid có khả năng mang gen mã hóa cho PETase.



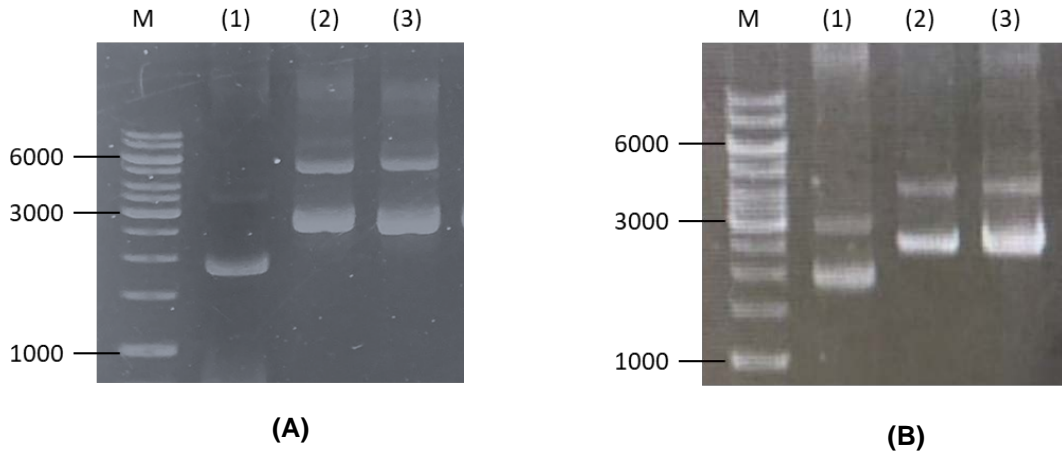
Hình 3.5. Kết quả biến nạp sản phẩm ghép nối giữa gen *petase* và pLUG-Prime® TA-Cloning Vector Kit II

Tế bào vi khuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  chứa tổ hợp gen được nuôi cấy trên môi trường LB đặc có bổ sung ampicillin và X-gal. Kết quả Hình 3.5 thu được hai dòng khuẩn lạc xanh và trắng. Khuẩn lạc xanh không có khả năng chứa gen đích do vùng gen mã hóa  $\beta$ -galactosidase không bị gián đoạn, enzyme này được tổng hợp và thủy phân cơ chất X-gal tạo thành 5-bromo-4-chloro-indoxyl, chất này tự động dimer hóa để tạo ra sắc tố màu xanh lam. Khuẩn lạc trắng là những khuẩn lạc có khả năng cao chứa vector TA-cloning mang đoạn gen đích. Do gen đích chèn vào khiến gen mã hóa  $\beta$ -galactosidase bị gián đoạn, enzyme không được tổng hợp để phân hủy cơ chất dẫn đến khuẩn lạc có màu trắng.

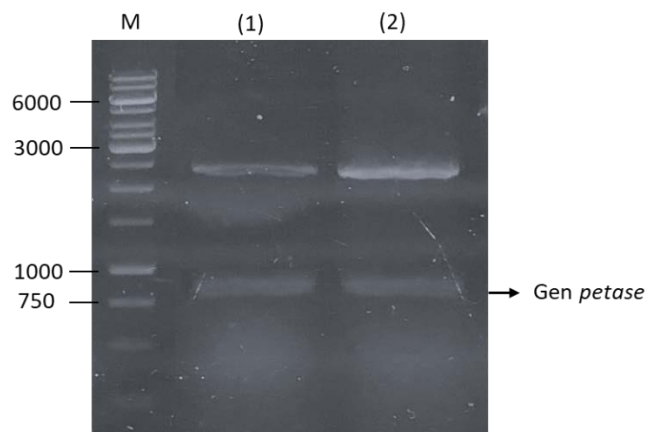
Kết quả tách chiết DNA (Hình 3.6A và 3.6B) cho thấy đã thu được hai loại plasmid



có kích thước khác nhau. Đoạn có kích thước nhỏ hơn (2728 bp) là plasmid từ khuẩn lạc xanh – vector TA-cloning Kit II tự đóng vòng, nằm ở vị trí thấp hơn trên điện di đồ (đường chạy số 1), còn đoạn nằm ở vị trí cao hơn có kích thước lớn hơn (đường chạy số 2 và 3) là vector TA-cloning đã được chèn thêm một đoạn gen mới. Các plasmid tái tổ hợp này được kiểm tra cấu trúc bằng cách cắt với hai cặp enzyme giới hạn vì trong vùng cắt đa vị của vector TA-cloning/*petase* có vị trí nhận biết của các enzyme này.



Hình 3.6. Tách chiết plasmid chọn dòng mang vector TA-cloning/*petase* tái tổ hợp  
 (A) Kết quả tách chiết DNA plasmid chọn dòng mang vector TA-cloning/*petase* tái tổ hợp trong đó gen *petase* được nhân lên từ phản ứng PCR với cặp mồi chứa trình tự của enzyme *NcoI*, *XhoI*. (B) Kết quả tách chiết DNA plasmid chọn dòng mang vector TA-cloning/*petase* tái tổ hợp trong đó gen *petase* được nhân lên từ phản ứng PCR với cặp mồi chứa trình tự của enzyme *NdeI*, *XhoI*.



Hình 3.7. Điện di DNA cắt kiểm tra vector TA-cloning/*petase* tái tổ hợp bằng các cặp enzyme cắt giới hạn

(1) Xử lý vector TA-cloning/*petase* với cặp enzyme *NcoI*, *XhoI*. (2) Xử lý vector TA-cloning/*petase* với cặp enzyme *NdeI*, *XhoI*.

Kết quả trên Hình 3.7 cho thấy tại đường chạy mẫu, plasmid sau khi xử lý bằng các cặp enzyme giới hạn đã xuất hiện 2 băng: băng thứ nhất có kích thước 2728 bp chính là vector pLUG-Prime® TA-Cloning Kit II nguyên gốc đã được mở vòng thành dạng mạch thẳng; băng thứ hai có kích thước khoảng 900 bp tương đương với kích thước của sản phẩm PCR so với thang DNA chuẩn. Như vậy, bước đầu có thể nhận định các plasmid tái tổ hợp này có mang gen mã hoá cho PETase.

Trình tự gen *petase* trong vector TA-cloning/*petase* tái tổ hợp được xác định trình tự trên máy xác định trình tự tự động ABI PRISM® 3700 Avant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystems và phân tích bằng phần mềm Bioedit. Kết quả khẳng định đoạn gen chèn vào có kích thước đúng như thiết kế là 891 bp mã hóa cho 290 axit amin, thêm mã ATG của methionine nằm ở đầu 5' của gen và mã TAA kết thúc nằm ở đầu 3'. Trình tự nhận biết của các enzyme giới hạn *NcoI*, *NdeI*, *XhoI* đúng như vị trí thiết kế. Sự sai khác về trình tự nucleotide của gen *petase* optimized so với gen mã hóa cho *petase* với mã số BBYR01000074.1 từ vi khuẩn *I. sakaiensis* là 20,74% (dựa trên phần mềm BLAST, NCBI). Tuy nhiên sự sai khác này không dẫn tới việc thay đổi axit amin sau dịch mã của enzyme PETase.

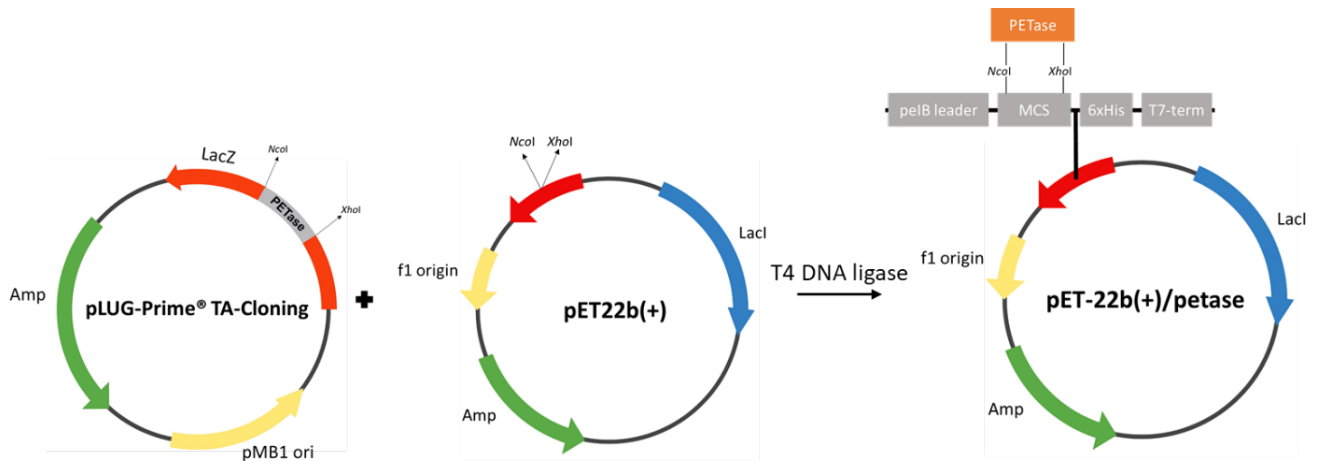
Để tiến hành biểu hiện đoạn gen này trong vi khuẩn *E. coli*, gen *petase* được chuyển từ vector tách dòng TA-cloning/*petase* sang hệ thống vector biểu hiện pET.

### 3.1.3. Thiết kế các vector biểu hiện protein PETase

Hệ thống pET (plasmid for Expression by T7 RNA polymerase) hiện nay là một trong các hệ vector có nhiều đặc tính ưu việt đã được phát triển để tách dòng và biểu hiện các protein tái tổ hợp ở *E. coli*. Các gen nghiên cứu được tách dòng và gắn vào hệ thống pET dưới sự kiểm soát của các dấu hiệu phiên mã và dịch mã của thực thể khuẩn khỏe mạnh. Khi có mặt của T7 RNA polymerase trong tế bào chủ yếu xảy ra hoạt động phiên mã của gen đích, còn sự phiên mã của các gen khác do RNA polymerase xúc tác của tế bào xảy ra yếu. Sản phẩm phiên mã của gen đích có thể chiếm hơn một nửa tổng số protein của tế bào.

#### 3.1.3.1. Thiết kế vector biểu hiện PETase ngoại bào

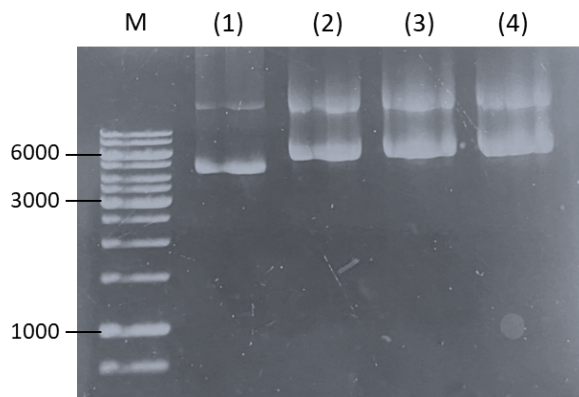
Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho PETase tiết ngoại bào được thể hiện trong Hình 3.8.



Hình 3.8. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện protein PETase tiết ngoại bào

Các vector TA-cloning/*petase* và pET-22b(+) được xử lý bằng hai enzyme cắt giới hạn *NcoI* và *XhoI* để tạo đầu dính tương hợp. Sản phẩm cắt sau đó được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET Gel Extraction. Phản ứng ghép nối gen *petase* với vector pET-22b(+) mở vòng được thực hiện nhờ sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase để tạo plasmid pET-22b(+)/*petase* tái tổ hợp và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Các dòng khuẩn lạc lựa chọn được tiến hành tách chiết DNA plasmid và cắt kiểm tra với cặp enzyme giới hạn *NcoI* và *XhoI*. Sản phẩm cắt được điện di gel agarose 0,8%.



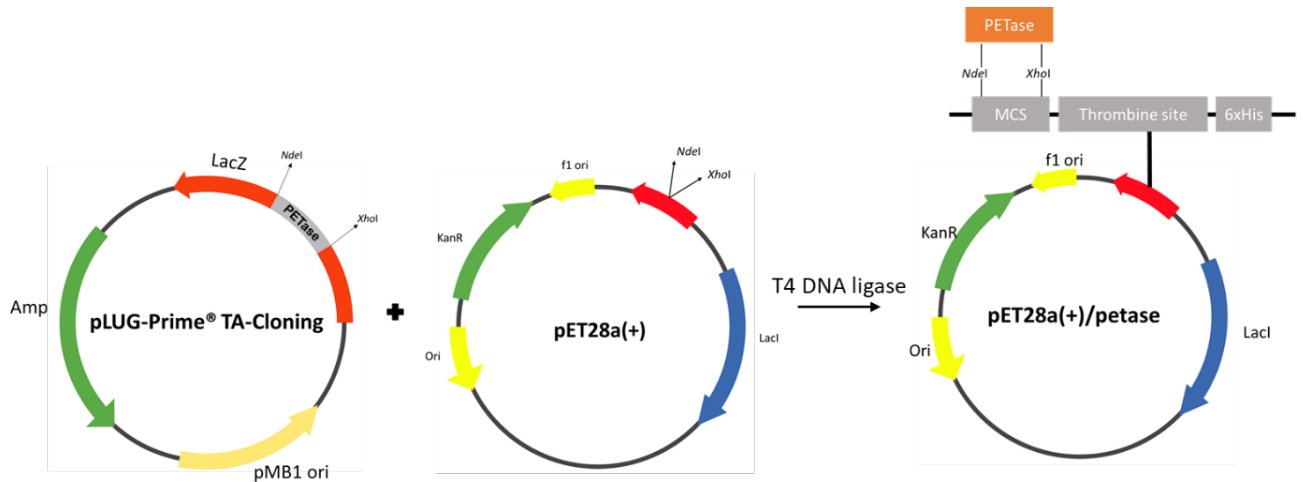
Hình 3.9. Kết quả tách chiết DNA chọn dòng mang plasmid pET-22b(+)/*petase*  
Đường chạy số 1 là vector pET-22b(+) nguyên bản. Đường chạy số 2-4 là các dòng mang plasmid tái tổ hợp pET-22b(+)/*petase*. M là thang DNA chuẩn 1kb.

Kết quả tách chiết DNA (Hình 3.9) cho thấy đã thu được hai loại plasmid có kích thước khác nhau. Đoạn có kích thước nhỏ hơn là vector pET-22b(+) nguyên bản, nằm ở vị trí thấp hơn trên điện di đồ (đường chạy số 1), còn đoạn nằm ở vị trí cao hơn có kích thước lớn hơn (đường chạy 2-4) là vector pET-22b(+) đã được chèn thêm một đoạn gen mới.

Các plasmid tái tổ hợp này được kiểm tra cấu trúc bằng cách cắt với cặp enzyme giới hạn *NcoI* và *XhoI* vì trong vùng cắt đa vị của vector pET-22b(+)/*petase* có vị trí nhận biết của các enzyme này (Kết quả thể hiện trong Hình 3.12).

### 3.1.3.2. Thiết kế vector biểu hiện PETase nội bào

Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho PETase tiết nội bào được thể hiện trong Hình 3.10.

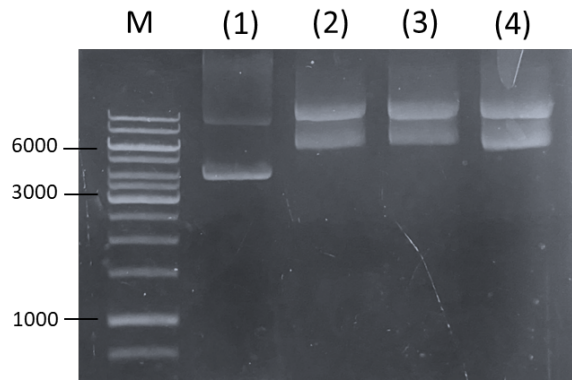


Hình 3.10. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện protein PETase tiết nội bào

Các vector TA-cloning/*petase* và pET-28a(+) được xử lý bằng hai enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *XhoI* để tạo đầu dính tương hợp. Sản phẩm cắt sau đó được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET Gel Extraction. Phản ứng ghép nối gen *petase* với vector pET-28a (+) mở vòng được thực hiện nhờ sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase để tạo plasmid pET-28a (+)/*petase* tái tổ hợp và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Các dòng khuẩn lạc lựa chọn được tiến hành tách chiết DNA plasmid và cắt kiểm tra với cặp enzyme giới hạn *NdeI* và *XhoI*. Sản phẩm cắt được điện di gel agarose 0,8%.

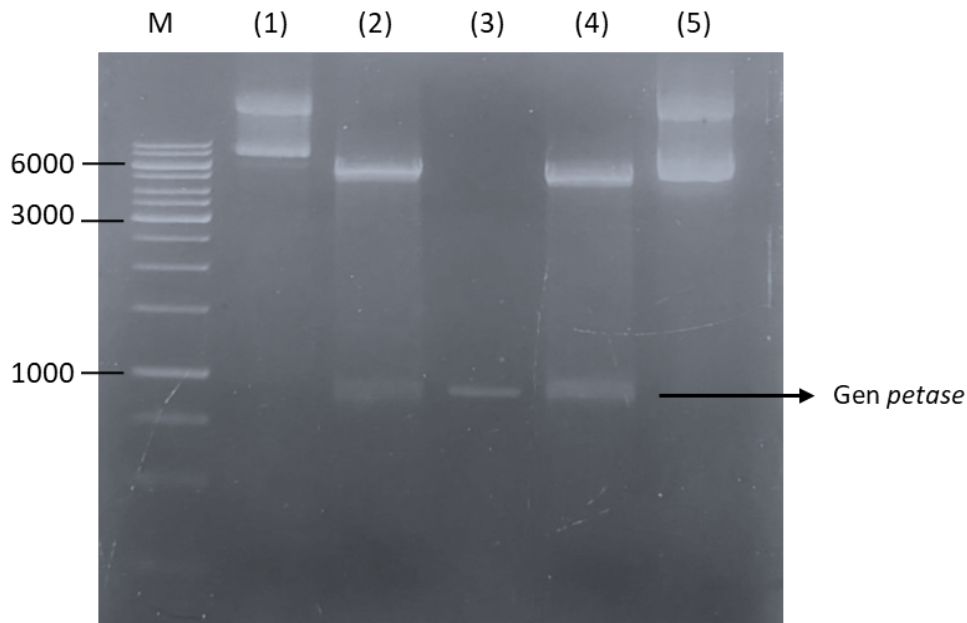
Kết quả tách chiết DNA (Hình 3.11) cho thấy đã thu được hai loại plasmid có kích thước khác nhau. Đoạn có kích thước nhỏ hơn là vector pET-28a(+) nguyên bản, nằm ở vị trí thấp hơn trên điện di đồ (đường chạy số 1), còn đoạn nằm ở vị trí cao hơn có kích thước lớn hơn (đường chạy 2-4) là vector pET-28a(+) đã được chèn thêm một đoạn gen mới.



Hình 3.11. Kết quả tách chiết DNA chọn dòng mang plasmid pET-28a(+)/*petase*

Đường chạy số 1 là vector pET-28a(+) nguyên bản. Đường chạy số 2-4 là các dòng mang plasmid tái tổ hợp pET-28a(+)/*petase*. M là thang DNA chuẩn 1kb.

Các plasmid tái tổ hợp này được kiểm tra cấu trúc bằng cách cắt với cặp enzyme giới hạn *NdeI* và *XhoI* vì trong vùng cắt đa vị của vector pET-28a(+)/*petase* có vị trí nhận biết của các enzyme này (Kết quả thể hiện trong Hình 3.12).



Hình 3.12. Dòng hóa gen *petase* vào hai vector biểu hiện pET-22b(+) và pET-28a(+)

(1) Plasmid tái tổ hợp pET-22b(+)/*petase*, (2) vector pET-22b(+)/*petase* cắt bằng *NcoI* và *XhoI*, (3) gen *petase*, (4) vector pET-28a(+)/*petase* cắt bằng *NdeI* và *XhoI*, (5) plasmid tái tổ hợp pET-28a(+)/*petase*, M là thang DNA chuẩn 1kb.

Phân tích kết quả trên Hình 3.12 cho thấy, plasmid tái tổ hợp pET-22b(+)/*petase* sau khi được cắt bằng cặp enzyme *NcoI*, *XhoI* (đường chạy số 2) và pET-28a(+)/*petase*

(đường chạy số 4) cắt bằng cặp *NdeI*, *XhoI* đều xuất hiện 2 băng DNA. Ở đường chạy số 2, băng phía trên bản điện di đồ có kích thước khoảng 5500 bp chính là vector pET-22b(+) nguyên gốc đã được mở vòng thành dạng mạch thẳng, ngoài ra đã xuất hiện thêm một băng DNA thấp hơn nằm ngang bằng với vị trí gen *petase* đối chứng ở đường chạy số 3. Tương tự, ở đường chạy số 4, băng phía trên có kích thước khoảng 5400 bp chính là vector pET-28a(+) mở vòng, còn băng DNA có kích thước nhỏ hơn nằm ở vị trí ngang bằng với gen *petase* đối chứng và băng DNA thấp hơn ở đường chạy số 2. Điều đó có thể khẳng định là đã dòng hóa được gen *petase* vào vector pET-22b(+) và pET-28a(+).

Như vậy, vector biểu hiện gen mã hóa cho PETase đã được thiết kế thành công. Hai hệ vector tái tổ hợp pET-22b(+)/*petase* và pET-28a(+)/*petase* sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) để tiến hành biểu hiện protein ngoại bào và nội bào.

### 3.2. Biểu hiện PETase tái tổ hợp ở *E. coli*

Do sự đơn giản và tiện lợi nên *E. coli* là hệ thống biểu hiện được sử dụng rộng rãi nhất để tạo ra lượng lớn protein ngoại lai. Đây là các tế bào chủ biểu hiện mà bộ gen của chúng có chứa bản sao của gen T7 RNA polymerase dưới sự kiểm soát của gen *Lac-UV5* và sự cảm ứng được tiến hành bằng cách bổ sung IPTG. Lúc này trong tế bào chủ xảy ra quá trình phiên mã và dịch mã để sinh tổng hợp nên các protein nghiên cứu.

Để biểu hiện PETase, chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) do hãng Novagen cung cấp đã được lựa chọn với đặc tính là chúng có tốc độ sinh trưởng nhanh, đồng thời nó đã được gây đột biến làm thiết hụt gen *lon* và gen *ompT* (mã hóa cho các protease) cho nên tạo sự ổn định cho protein ngoại lai nội bào cũng như trong khoang chu chất [55]. Do đó, quá trình biểu hiện cũng như tinh sạch protein thu được kết quả tốt.

#### 3.2.1. Biểu hiện PETase ngoại bào

Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) chứa tổ hợp gen mới pET-22b(+)/*petase* được nuôi cấy 3 giờ trong môi trường LB có kháng sinh ampicillin sau đó cảm ứng với IPTG nồng độ 0,2 mM trong 16 giờ. Sinh khối tế bào sau đó được đem đi ly tâm và thu phần dịch nổi.

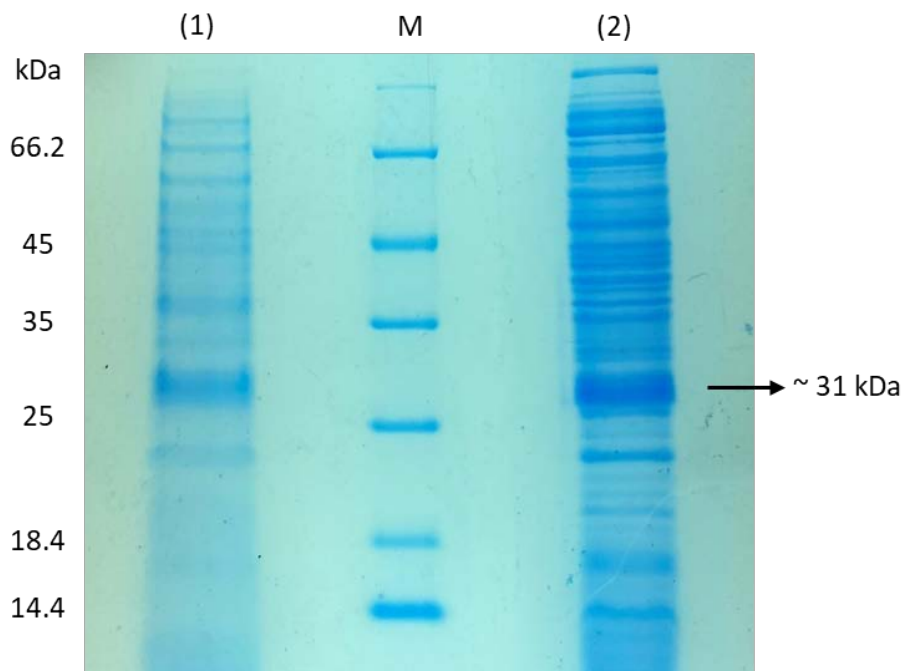
Đối với protein biểu hiện ngoại bào, protein được tiết ra môi trường nuôi cấy. Do đó, phần dịch nổi thu được sau khi ly tâm sẽ được rửa với muối ammonium sulfate đến nồng độ 75% hoặc acetone tỉ lệ 4:1 (v/v) với mục đích làm giàu protein. Trước khi so sánh hiệu suất của hai phương pháp rửa muối và rửa aceton trong việc thu hồi protein ngoại bào ở nghiên cứu này, chúng tôi đã thực hiện khảo sát thực nghiệm nồng độ muối ammonium sulfate và aceton trước đó để lựa chọn ra nồng độ thích hợp nhất.

Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 3.13) chỉ ra rằng: trong dịch protein tổng số

ngoại bào, xuất hiện một băng protein chiếm tỉ trọng nổi trội, có kích thước khoảng 31 kDa so với thang protein chuẩn. Điều này phù hợp với khối lượng phân tử theo tính toán và tương đương với enzyme PETase phân lập từ vi khuẩn *I. sakaiensis* của Yoshida và đồng tác giả [34]. Bên cạnh đó, hiệu suất quá trình rửa protein bằng muối ammonium sulfate trong nghiên cứu này tốt hơn so với phương pháp rửa bằng acetone (đánh giá trên phần mềm ImageJ).

Protein dung hợp biểu hiện ở dạng ngoại bào do hệ thống vector pET-22b(+) có chứa peptide tín hiệu pelB (trình tự gồm 22 gốc axit amin đầu N). Khi được gắn vào một protein, tín hiệu này sẽ hướng protein tới khoang chu chất của vi khuẩn gram (-), nơi trình tự này được loại bỏ bởi một peptidase tín hiệu.

So sánh với các nghiên cứu biểu hiện PETase trên *E. coli* sử dụng hệ vector pET-22b(+) với peptide tín hiệu pelB, khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp trong nghiên cứu này tốt hơn so với nghiên cứu của Seo và đồng tác giả nhưng vẫn chưa đạt được mức độ biểu hiện như trong nghiên cứu của Shi và cộng sự [42][44]. Do đó, chúng tôi cần tiếp tục tiến hành tối ưu biểu hiện của PETase tái tổ hợp.



Hình 3.13. Điện di SDS-PAGE protein ngoại bào sau khi rửa làm giàu protein (1) Mẫu rửa protein bằng acetone, (2) Mẫu rửa protein bằng muối ammonium sulfate, M là thang protein chuẩn SM0431.

### 3.2.2. Biểu hiện PETase nội bào

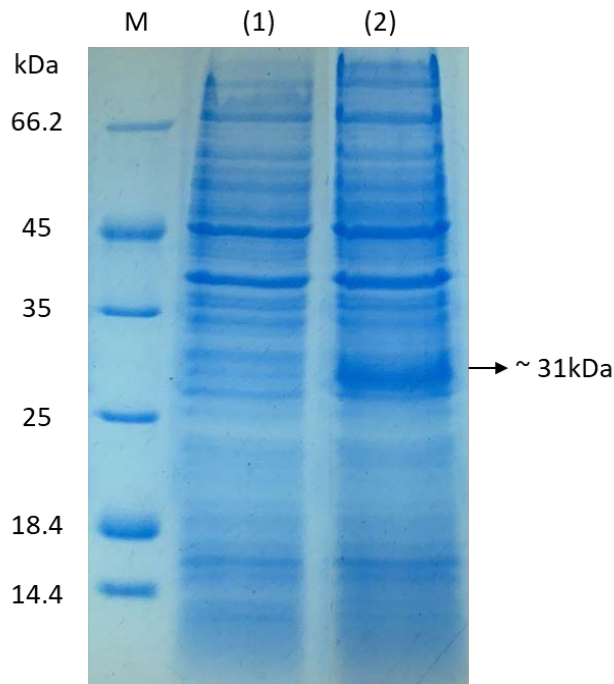
Sau khi vector pET-28a(+)/petase tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21(DE3), nuôi cấy trong môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin đến khi OD<sub>600nm</sub>



đạt từ 0,5 – 0,7 thì được cảm ứng bởi IPTG đến nồng độ cuối cùng 0,2 mM. Sinh khối tế bào được thu ở các thời điểm 0h (trước khi cảm ứng) và 16h (sau khi cảm ứng) để tiến hành điện di kiểm tra sự biểu hiện của protein dung hợp mới. Protein tổng số được biểu hiện từ các dòng tế bào cảm ứng và đối chứng không cảm ứng của cùng một dòng tế bào được kiểm tra điện bằng điện di biến tính trên gel polyacrylamide (Hình 3.14).

Kết quả điện di trên Hình 3.14 cho thấy, đường chạy số 2 là protein tổng số tại thời điểm sau khi cảm ứng IPTG, xuất hiện một băng protein mới so với đường chạy số 1 là protein tổng số tại thời điểm trước khi cảm ứng, có kích thước khoảng 31 kDa so với thang protein chuẩn, xấp xỉ kích thước băng protein nổi trội thu được khi biểu hiện ngoại bào (mục 3.2.1).

Có thể thấy rằng, hệ biểu hiện của vector pET-28a(+) mang gen *petase* đã hoạt động ổn định và được biểu hiện khá tốt trong chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) dẫn đến sự sinh tổng hợp một loại protein mới.



Hình 3.14. Điện di SDS-PAGE protein nội bào

(1) Protein tổng số trước khi cảm ứng IPTG, (2) Protein tổng số tại thời điểm sau cảm ứng, M là thang protein chuẩn SM0431.

Tiếp theo, chúng tôi tiếp tục phân tích protein mới được biểu hiện bằng phản ứng lai miễn dịch Western-blotting với kháng thể kháng His-tag nhằm khẳng định chính xác đã tạo ra được protein PETase.



### 3.3. Nhận diện PETase bằng phản ứng Western-blotting

Western-blotting là một kỹ thuật rất nhạy có thể nhận dạng protein trong một hỗn hợp sau khi chúng được phân tách dựa trên trọng lượng phân tử (SDS-PAGE), kích thước và điện tích (điện di không biến tính trên gel) hoặc điểm đẳng điện (isoelectric focusing). Kỹ thuật này dựa trên phản ứng miễn dịch đặc hiệu giữa kháng nguyên với kháng thể và phản ứng hiện màu nhờ enzyme với cơ chất.

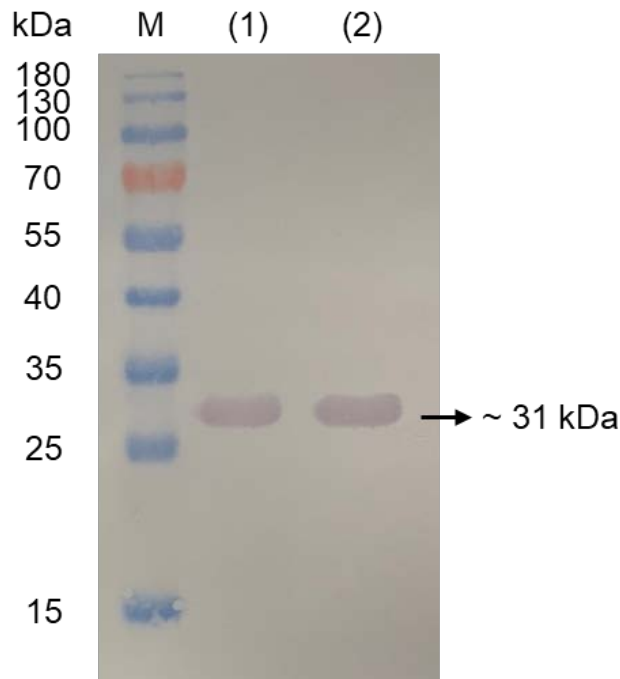
Để khẳng định protein được biểu hiện là PETase, phản ứng lai miễn dịch được thực hiện với kháng thể thứ nhất là kháng thể đơn dòng tái tổ hợp kháng His•tag ở thỏ (Anti-His-Tag antibody, Rabbit monoclonal recombinant). Trong phản ứng này, đuôi His•tag trong phân tử PETase đóng vai trò là kháng nguyên.

Với kháng thể thứ hai (kháng thể thứ cấp Anti-Rabbit IgG) được cộng gộp với enzyme horseradish peroxidase (HRP) của hãng BioRad, các protein được phát hiện với nồng độ rất thấp (khoảng 10 picogram) trong thời gian ngắn. Nếu băng protein mới cho kết quả dương tính với kháng thể kháng His•tag thì điều đó chứng tỏ PETase đã được biểu hiện trong tế bào *E. coli*.

Dịch chiết protein tổng số của tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET-22b(+)/petase và dịch protein hòa tan sau khi phá tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp pET-28a(+)/petase được phân tách trên gel polyacrylamide trong điều kiện điện di biến tính. Sau đó các protein trong gel được thấm chuyển sang màng PVDF và tiến hành phản ứng gắn kháng thể kháng His•tag trong huyết thanh thỏ (Sigma Aldrich). Tiếp đến, màng được gắn với kháng thể thứ hai và hiện màu bằng 1-Step™ TMB-Blotting (Thermo Scientific), chứa cơ chất có thể bị phân hủy bởi peroxidase. Phản ứng này tạo ra kết tủa xanh lam trên bề mặt màng, từ đó định vị được vị trí xảy ra phản ứng.

Kết quả là trong dung dịch protein tổng số và dịch protein hòa tan sau khi phá tế bào của vi khuẩn xuất hiện duy nhất một băng protein có kích thước khoảng 31 kDa cho thấy có phản ứng dương tính và đặc hiệu với kháng thể kháng His•tag (Hình 3.15).

Như vậy bằng phản ứng lai miễn dịch Western-blotting, có thể khẳng định protein mới được biểu hiện này chính là PETase. Từ đó, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu các điều kiện biểu hiện protein này nhằm thu được protein tái tổ hợp với hiệu suất cao nhất.



Hình 3.15. Nhận diện PETase bằng Western-blotting với kháng thể kháng His•Tag  
 (1) Dịch chiết protein tổng số của các tế bào *E. coli* mang vector *pET-22b(+)/petase*,  
 (2) Dịch protein hòa tan sau khi phá các tế bào *E. coli* mang vector *pET-28a(+)/petase*,  
 M là thang protein chuẩn Prestained 26616.

### 3.4. Khảo sát điều kiện biểu hiện tối ưu PETase nội bào

Cho đến nay, vẫn chưa có một mô hình chung nào cho phép biểu hiện tối ưu đối với các loại protein ngoại lai trong cùng một hệ biểu hiện. Vì vậy, để đạt mức biểu hiện cao đối với một protein ngoại lai, thường phải nghiên cứu thăm dò các điều kiện khác nhau để tìm ra điều kiện tối ưu.

Một vấn đề hay gặp khi biểu hiện protein nội bào ở tế bào vi khuẩn *E. coli* là chúng thường hay tạo thành thể vùi (inclusion bodies). Mặc dù biểu hiện protein dưới dạng thể vùi cũng có một số ưu điểm nhất định nhưng protein tạo ra thường bị mất hoạt tính sinh học và quá trình tái gấp nếp lại cấu trúc (refolding) tương đối phức tạp và tốn kém. Hơn nữa, để có thể tinh sạch được protein dễ dàng thì cần phải biểu hiện protein đúng như mong muốn, đó là tiến hành song song với việc biểu hiện chaperone phân tử, giảm tỉ lệ tổng hợp protein, nuôi cấy tế bào ở nhiệt độ thấp ...

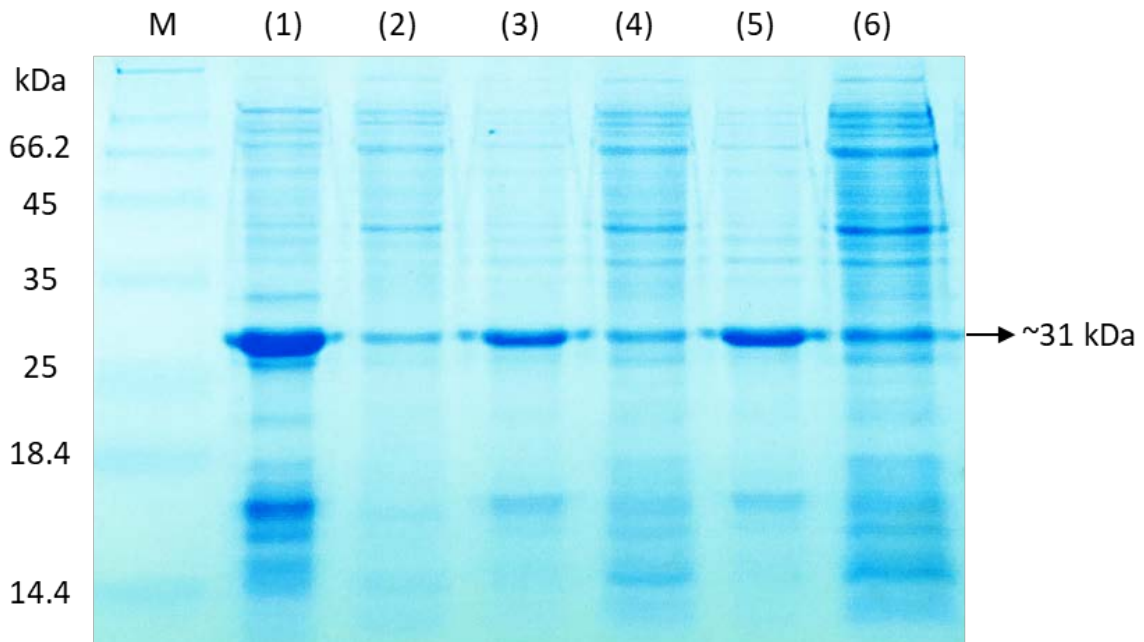
Đối với protein tiết ngoại bào phải tiến hành thu hồi bằng phương pháp tủa và hiệu suất tủa cũng ảnh hưởng tới khả năng đánh giá sự biểu hiện của protein dung hợp nên chúng tôi tiến hành khảo sát nhiệt độ và nồng độ IPTG cảm ứng của PETase nội bào trong khuôn khổ luận văn này. Tuy nhiên, việc tối ưu quy trình tủa và thời gian, nồng độ chất cảm ứng IPTG cho quá trình tiết PETase ngoại bào vẫn tiếp tục được tiến hành

trong các nghiên cứu kế tiếp.

### 3.4.1. Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy cảm ứng tới sự biểu hiện protein PETase

Một số công trình nghiên cứu đã chỉ ra rằng điều kiện nuôi cấy và cảm ứng ảnh hưởng rất lớn đến mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng hòa tan, đặc biệt là nhiệt độ nuôi cấy [56]. Bởi vậy, sau khi đã biểu hiện được protein mong muốn, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khảo sát nuôi cấy vi khuẩn ở các nhiệt độ khác nhau nhằm nâng cao lượng protein được biểu hiện, đồng thời có mức độ hòa tan cao nhất.

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) chứa vector biểu hiện PETase được nuôi ở nhiệt độ 37°C trong 3 bình nón, các điều kiện khác là như nhau đã mô tả trong mục 2.2.12 (nuôi vi sinh vật trong môi trường LB có bổ sung kanamycin nồng độ cuối cùng là 50 µg/ml, lắc 200 vòng/ phút). Khi OD<sub>600nm</sub> của dịch nuôi cấy đạt 0,5 – 0,7, IPTG được bổ sung với nồng độ cuối cùng trong dung dịch là 0,5 mM và tiếp tục nuôi cấy ở các nhiệt độ 22, 28, 37°C. Sinh khối tế bào được thu sau 16 giờ cảm ứng và sau đó protein tổng số của vi khuẩn được chiết ra khỏi tế bào bằng siêu âm và lysozyme. Quá trình phá tế bào được tiến hành ở 4°C để tránh gây biến tính protein. Huyền dịch tế bào sau khi siêu âm được ly tâm để tách riêng phần dịch nổi (phần tan) và phần cặn tế bào (không tan). Kết quả biểu hiện được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE (Hình 3.16).



Hình 3.16. Điện di protein PETase tái tổ hợp được biểu hiện ở *E. coli* theo nhiệt độ nuôi cấy và thời gian thu sau 16 tiếng cảm ứng với IPTG

Đường chạy số 1, 3, 5: phần dịch nổi thu ở 22, 28 và 37°C; Đường chạy số 2, 4, 6: phần protein không tan thu ở 22, 28 và 37°C; M là thang protein chuẩn SM0431.

Kết quả điện di ở Hình 3.16 cho thấy protein tái tổ hợp sinh tổng hợp trong vi khuẩn được nuôi ở các điều kiện trên chủ yếu ở dạng hòa tan (các băng protein có kích thước khoảng 31 kDa). Tuy nhiên, khi tiến hành nuôi tế bào cả trước và sau khi cảm ứng bằng IPTG ở 37°C và thu tế bào sau 16 giờ cảm ứng, lượng protein PETase ở phần không tan (đường chạy số 6, nuôi tiết ở 37°C) thu được khá nhiều. Điều này có thể là do ở nhiệt độ nuôi cấy này, vi khuẩn sinh trưởng quá nhanh dẫn đến sự quá tải của các bộ máy tổng hợp của vi khuẩn và kích hoạt sự hình thành thể vùi không tan [46]. Còn ở các nhiệt độ nuôi cấy sau khi cảm ứng thấp hơn là 22 và 28°C, lượng protein PETase tái tổ hợp thu được nhiều hơn và chủ yếu ở dạng hòa tan hơn (đường chạy số 1-4). Như vậy, để tối ưu sự biểu hiện protein tái tổ hợp PETase có thể tiến hành nuôi cấy cảm ứng vi khuẩn ở nhiệt độ thấp (22°C, 28°C) và các điều kiện nuôi cấy khác đã được lựa chọn là khá phù hợp. Do vậy, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ trước cảm ứng là 37°C và sau cảm ứng là 22°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

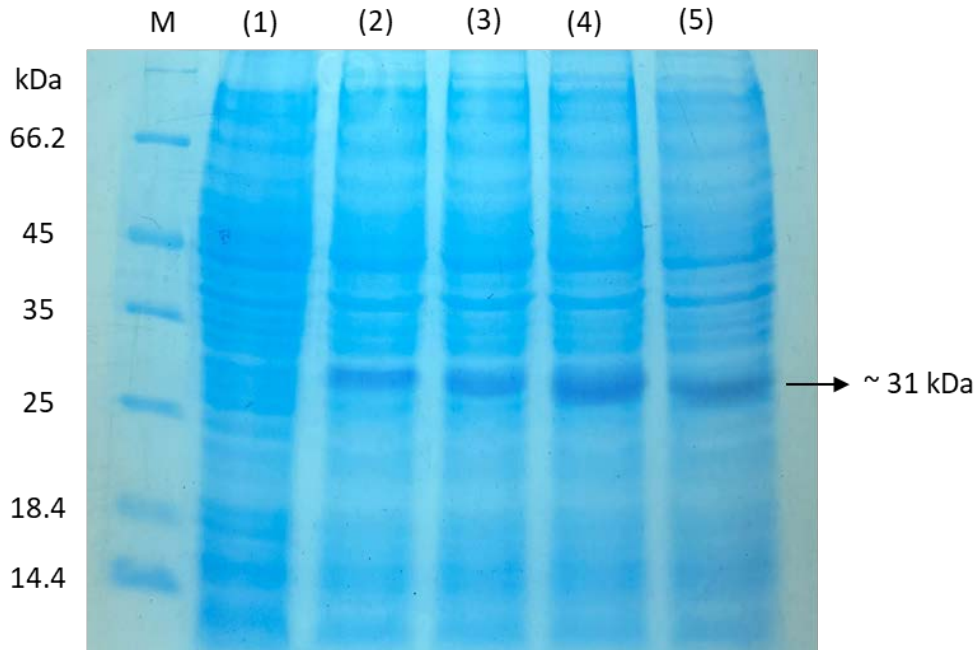
#### **3.4.2. Khảo sát nồng độ cảm ứng IPTG ảnh hưởng tới khả năng biểu hiện PETase**

Khi *isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosidase* (IPTG) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sẽ cảm ứng quá trình phiên mã mRNA để sinh tổng hợp protein ngoại lai chịu sự điều phối của T7 promoter. Đầu tiên, IPTG liên kết với chất ức chế lacI, khởi động quá trình phiên mã để tổng hợp T7 polymerase, từ đó tiếp tục kích hoạt T7 promoter để khởi động quá trình sinh tổng hợp protein dung hợp. Do đó, lượng IPTG cảm ứng chỉ cần vừa đủ để trung hòa chất ức chế [57].

Kết quả khảo sát (Hình 3.17) cho thấy, sự biểu hiện của PETase thay đổi theo các nồng độ chất cảm ứng IPTG. Với chế độ nuôi cấy không cảm ứng (đường chạy số 1), không xuất hiện băng protein tái tổ hợp. Bắt đầu cảm ứng từ nồng độ 0,2 mM IPTG thì thấy xuất hiện băng protein mới so với chế độ nuôi không cảm ứng.

Đánh giá trên điện di SDS-PAGE cho thấy, tại nồng độ 0,5 mM IPTG, PETase nội bào được biểu hiện tốt nhất. Sự biểu hiện của PETase tăng dần khi bổ sung tăng dần nồng độ chất cảm ứng từ 0,2 mM tới 0,5 mM sau đó giảm đi ở nồng độ 0,75 mM IPTG. Điều này cho thấy, chất cảm ứng dư thừa đã ức chế sự sinh tổng hợp protein dung hợp.

Từ các kết quả khảo sát cho thấy, PETase tái tổ hợp được biểu hiện tốt nhất ở điều kiện 22°C, 0,5 mM nồng độ chất cảm ứng IPTG.



Hình 3.17. Sự biểu hiện của PETase theo nồng độ chất cảm ứng IPTG

*Đường chạy số 1 là protein tổng số trước khi cảm ứng IPTG; Đường chạy số 2-5 lần lượt là protein tổng số khi bổ sung nồng độ cuối cùng 0,2; 0,4; 0,5; 0,75 mM IPTG; M là thang protein chuẩn SM0431.*

### 3.5. Tinh sạch PETase nội bào bằng sắc ký ái lực Ni-NTA

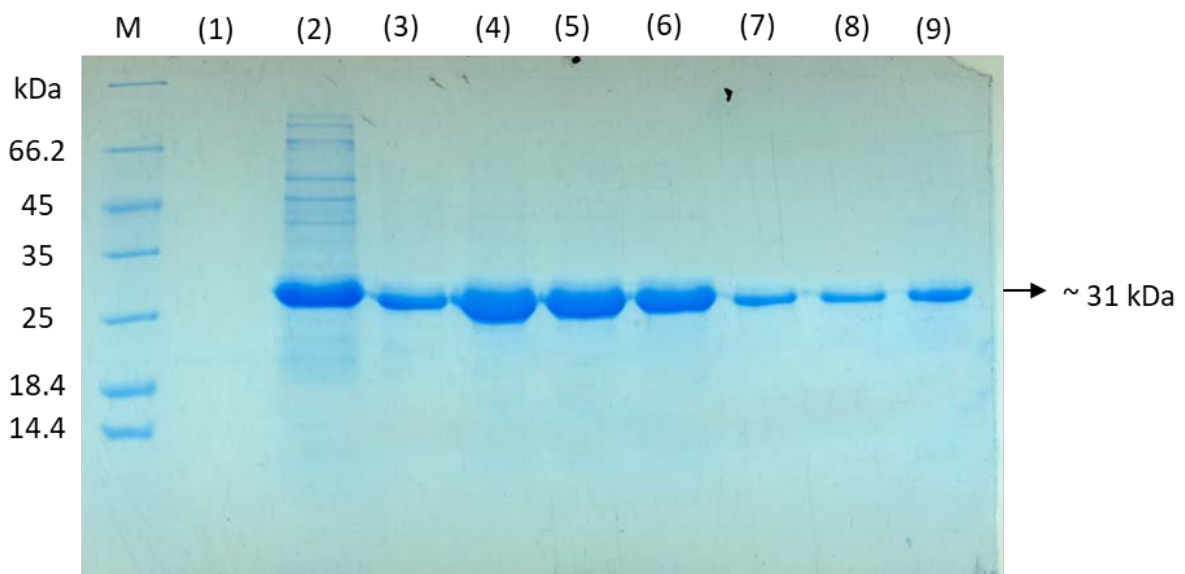
Việc tinh sạch protein tái tổ hợp là điều kiện tiên quyết trong rất nhiều ứng dụng để nghiên cứu cấu trúc, chức năng và thử hoạt tính của protein đó. Protein tái tổ hợp có chứa His•tag (gồm 6-9 Histidine) ở đầu N hoặc đầu C giúp cho việc phát hiện và tinh sạch dễ dàng và thuận tiện. Vì kích thước nhỏ (chỉ khoảng 0,84 kDa) nên thẻ His•tag không làm thay đổi đáng kể độ tích điện hay thường không làm ảnh hưởng đến việc hình thành gập xoắn, do đó không làm ảnh hưởng tới cấu trúc và chức năng của protein.

Tinh sạch PETase có gắn thẻ His bằng phương pháp sắc ký ái lực Ni-NTA dựa vào liên kết ái lực giữa nhóm axit amin Histidine và ion kim loại  $Ni^{2+}$ . Các ion kim loại này được cố định trên ma trận sắc ký bằng nitrilotriacetic acid (NTA). Khi cho hỗn hợp protein gắn lên cột, chỉ có protein đặc hiệu (mang thẻ His) được bám cột, còn các protein khác bị trôi ra khỏi cột sắc ký. Protein đặc hiệu sau đó được rửa giải bằng chất chứa phối tử tự do có khả năng cạnh tranh với phối tử ở trạng thái liên kết với protein.

Tế bào *E. coli* BL21(DE3) sau khi thu hoạch được hòa lại trong dung dịch đệm ly giải, phá tế bào bởi lysozyme và sóng siêu âm. Các mảnh vụn tế bào được loại bỏ, dịch trong chứa protein hòa tan được cho lên cột sắc ký Ni-NTA. Cân bằng cột bằng đệm Tris-HCl 50 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M và rửa giải bằng cách bổ sung nồng độ 40 mM,

60 mM, 80 mM, 100 mM, 250 mM imidazole để thu hồi các phân đoạn có chứa protein tái tổ hợp. Sau đó, các phân đoạn rửa giải được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE để đánh giá độ tinh sạch và nồng độ IMD thu được nhiều protein PETase nhất.

Trên Hình 3.18 là các phân đoạn protein thu được từ 100 ml dịch nuôi cấy tế bào khi đi qua cột sắc ký ái lực Ni-NTA. Đường chạy số 2-9 xuất hiện một băng đậm ở vị trí 31 kDa so với thang protein chuẩn (băng protein PETase) với nồng độ tăng dần từ phân đoạn số 2 cho tới phân đoạn số 4, sau đó giảm dần đến phân đoạn số 9. Có thể thấy, ở nồng độ 60 mM imidazole, ta thu được lượng protein tái tổ hợp nhiều nhất. Ở nồng độ rửa giải 100 mM và 250 mM IMD, chúng tôi không thu nhận được PETase tái tổ hợp.



Hình 3.18. Tinh sạch PETase tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực Ni-NTA

*Đường chạy số 1-3: các phân đoạn sắc ký thu ở nồng độ 40mM IMD; Đường chạy số 4-6: các phân đoạn sắc ký thu ở nồng độ 60mM IMD; Đường chạy số 7-9: các phân đoạn sắc ký thu ở nồng độ 80mM IMD; M là thang protein chuẩn SM0431.*

Protein tái tổ hợp sau khi tinh sạch có hàm lượng là 2,6 mg/ 100 ml (được xác định bằng phương pháp Bradford). Độ tinh sạch 92%. Như vậy, hiệu suất của quá trình lên men biểu hiện và tinh sạch PETase nội bào đạt 0,26 mg/ml dịch tế bào nuôi cấy.

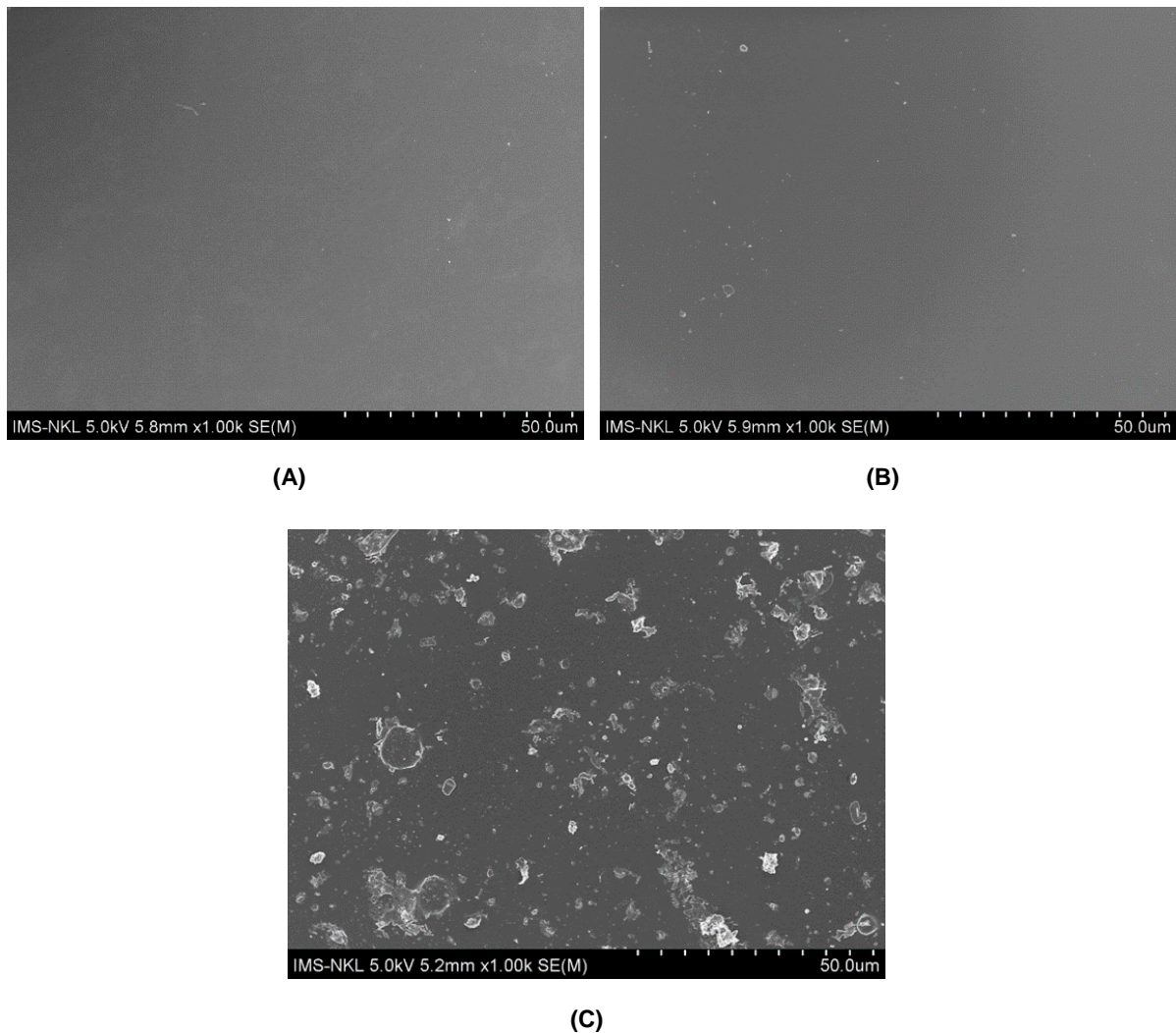
### 3.7. Đánh giá khả năng phân hủy nhựa PET của PETase ngoại bào

Các màng film PET sau khi rửa bằng 1% SDS, ethanol và nước deionized thì được ủ song song 2 điều kiện: (1) trong 1,5ml dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{NaCl}$  50mM không có chứa PETase và (2) trong 1,5ml dung dịch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{NaCl}$  50mM có chứa 5 $\mu\text{g}$  enzyme PETase, nhiệt độ và thời gian ủ tương tự nhau (30°C, 7 ngày). Sau khi ủ, hình thái bề



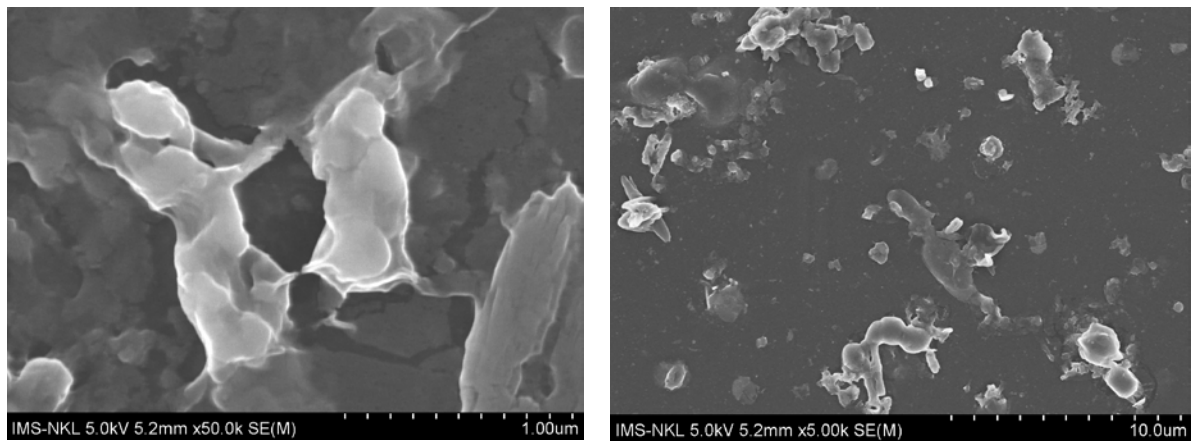
mặt của các mảnh film được phân tích bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM) để nghiên cứu hoạt tính của PETase tái tổ hợp.

Kết quả chụp SEM cho thấy: ở Hình 3.19A và 3.19B, bề mặt màng film PET không có dấu hiệu bị tổn hại. Trong khi đó, các lỗ thủng xuất hiện thành từng đám ở hình 3.19C. Như vậy, so với mẫu đối chứng bề mặt film PET không bổ sung enzyme PETase (Hình 3.19A), dung dịch muối  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{NaCl}$  50mM không gây ảnh hưởng tới bề mặt màng film (Hình 3.19B). Ngược lại, với sự biểu hiện của PETase, trên bề mặt các tấm PET đã xuất hiện những vết bào mòn và lỗ thủng nhỏ (Hình 3.19C). Hiện tượng này tương tự với thí nghiệm đánh giá hoạt tính của PETase trong nghiên cứu của Kim và Shi [43][44]. Đáng chú ý, khả năng phân rã màng film PET của PETase tái tổ hợp tương đương với hai nghiên cứu kể trên và thời gian ủ rút ngắn hơn 3 tuần so với nghiên cứu của Kim và cộng sự [43]. Tuy nhiên nhận định trên vẫn cần phải chứng minh bằng thực nghiệm để xác định hoạt độ của enzyme tái tổ hợp, đánh giá các điều kiện nhiệt độ, độ pH, ... tối ưu.



Hình 3.19. Kết quả chụp kính hiển vi điện tử quét SEM

(A) Bề mặt màng film PET trước khi ủ. (B) Màng PET sau khi ủ trong dung dịch  $(NH_4)_2SO_4.NaCl$  50mM không có PETase. (C) Màng film PET sau khi được xử lý với hỗn hợp muối  $(NH_4)_2SO_4.NaCl$  50mM có bổ sung enzyme PETase. Độ phóng đại 1000X



Hình 3.20. Một số hình ảnh phân hủy màng film PET của PETase tiết ngoại bào với độ phóng đại 5000X và 50000X.

Như vậy, nghiên cứu này đã đóng góp một quy trình tạo ra PET hydrolase có hoạt tính ở vi khuẩn *E. coli* và thúc đẩy chúng tôi tiếp tục thực hiện các nghiên cứu tối ưu mức độ biểu hiện, cải thiện hiệu suất thu hồi protein và tăng cường hoạt tính phân hủy nhựa của protein tái tổ hợp trong tương lai.



## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Đã thiết kế, tạo dòng và xác định được gen *petase* có kích thước 891 bp, mã hóa cho protein PETase với 290 axit amin biểu hiện ở vi khuẩn *E. coli* từ cơ sở gen mã hóa cho PETase ở *I.sakaiensis* với số đăng ký BBYR01000074.1 trên ngân hàng GenBank.
2. Biểu hiện thành công PETase ngoại bào và nội bào với kích thước khoảng 31 kDa trong vi khuẩn *E. coli* và nhận diện bằng Western-Blotting. Tối ưu các điều kiện biểu hiện PETase tiết nội bào ở *E. coli*: nhiệt độ nuôi cấy cảm ứng là 22°C, cảm ứng với nồng độ IPTG cuối cùng là 0,5 mM. Tinh sạch được PETase nội bào tái tổ hợp với độ tinh khiết 92% và hàm lượng 2,6 mg/100ml.
3. Đã bước đầu khẳng định được PETase ngoại bào có hoạt tính khử trùng hợp trên màng film PET ở điều kiện 30°C, trong thời gian 7 ngày.

### KIẾN NGHỊ

1. Tiến hành tối ưu hiệu suất thu hồi và khảo sát các điều kiện biểu hiện protein tái tổ hợp ở dạng ngoại bào.
2. Đánh giá khả năng phân hủy nhựa PET của PETase nội bào.
3. Xác định hoạt độ của enzyme tái tổ hợp và đánh giá điều kiện tối ưu về: nhiệt độ, độ pH, thời gian khử trùng hợp, ... của enzyme này.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ**

**Phạm Thị Lan Anh, Lê Thị Bích Thảo**, “Tách dòng, biểu hiện và đánh giá khả năng phân hủy nhựa PET của PETase tái tổ hợp trên *E. coli*”, *Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2023*, pp. 204-209.

## DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Văn Phạm Đan Thủy, Trương Hà Phương Ân, Nguyễn Thanh Việt, 2011, Tái Chế Nhựa Polyethylene Terephthalate (PET) Và Ứng Dụng Nhựa Đã Qua Tái Chế, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 13(1), tr. 26-35.
- [2] Murthy NS, C. S., 1991, Structure of the amorphous phase in crystallizable polymer: Poly(ethylene terephthalate), *Macromolecules*, pp.1185-1189.
- [3] Jabarin, S. A., 1982, Optical Properties of Thermally Crystallized, *Polymer Engineering and Science*, 22(13), pp. 815-820.
- [4] Nistico R, 2020, Polyethylene terephthalate (PET) in the packaging industry, *Polymer Testing*, 90 (106707).
- [5] Jang P, Han F, Li Y, Chen J, 2016, Local delivery of controlled-release simvastatin to improve the biocompatibility of polyethylene terephthalate artificial ligaments for reconstruction of the anterior cruciate ligament, *International Journal of Nanomedicine*, pp. 465-476.
- [6] Lebreton L, Andrarty A, 2019, Future scenarios of global plastic waste generation and disposal, *Palgrave Communications*, 5, pp.6.
- [7] Statista Research Department, 2023, Global plastic production 1950-2021.
- [8] Tạ Việt Phương, 2019, Báo Cáo Ngành Nhựa, Công ty chứng khoán FPT, 8424, tr. 64.
- [9] Jambeck J, G. R., 2015, Plastic waste inputs from land into the ocean, *Science*, 347(6223), pp. 768-771.
- [10] Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Diệp Linh, 2021, Vấn đề rác thải nhựa ở Việt Nam, *OSF Preprints*, tr. 8-11.
- [11] Asia E, R. P., 2020, Phân tích về ô nhiễm rác thải nhựa tại Việt Nam, *The World Bank*.
- [12] Vietnam Global, 2022, Vietnam among 20 countries with largest plastic waste discharge.
- [13] Organization for Economic Cooperation and Development, 2022, Plastic pollution is growing relentlessly as waste management and recycling fall short.
- [14] Lv L, Yan X, Feng L, Jiang S, et al., 2021, Challenge for the detection of microplastics in the environment, *Water Environment Research*, 93(1), pp.5–15.

[15] Rahman A, Sarkar A, et al., 2021, Potential human health risks due to environmental exposure to nano- and microplastics and knowledge gaps: A scoping review, *Science of The Total Environment*, 757 (143872).

[16] Ragusa A, Svelato A, Santacroce C, Catalano P, et al., 2021, Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta, *Environmental International*, 146.

[17] Ragaert K, Delva L, Geem K M V, 2017, Mechanical and chemical recycling of solid plastic waste, *Waste Management*, 69, pp. 24-58.

[18] Drzyzga O, Prieto A, 2019, Plastic waste management, a matter for the 'community', *Microbial Biotechnology*, 12, pp. 66-68.

[19] Al-Sabagh A M, Yehia F, et al., 2016, Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate, *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), pp. 53-64.

[20] Geyer B, Lorenz G, Kandelbauer A, 2016, Recycling of poly(ethylene terephthalate) a review focusing on chemical methods, *Express Polymer Letters*, 10(7), pp. 559-586.

[21] Sinha V, Patel M R, 2010, PET waste management by chemical recycling: a review, *Journal of Polymers and the Environment*, 18(1), pp. 8-25.

[22] Webb HK, Arnott J, et al., 2020, Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate), *Polymers Basel*, 5(1), pp. 1-18.

[23] Wei R, Zimmermann W, 2017, Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate, *Microbial Biotechnology*, 10(6), pp. 1302-1307.

[24] Joo S, Cho I, et al., 2018, Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation, *Nature Communications*, 9(1), pp. 382.

[25] Văn Phạm Đan Thủy, T. H., 2015, Tái chế nhựa polyethylene terephthalate (PET) và ứng dụng nhựa đã qua tái chế, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Phần Khoa học Tự nhiên, Công nghệ & Môi trường*, 39, tr. 57-65.

[26] Võ Thị Hai, Hoàng Ngọc Cường, 2008, Phản ứng cắt mạch poly(ethylen terephthalat) (PET) từ vỏ chai bằng dietylen glycol (DEG), *Science & Technology Development*, 11(6).

[27] Hoàng Thị Đông Quỳ, Phạm Huỳnh Trâm Anh, Nguyễn Ngọc Như Hương, Thiêm Trí Viễn, Trịnh Thị Kim Vy, 2012, Phụ gia chống cháy phi halogen ứng dụng vào các loại vật liệu polyme chống cháy trên cơ sở polyeste không no, *Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ*.

- [28] Thi Cam Ha Dang, Dang Thang, Hoang Thai, Thuy Chinh Nguyen, 2018, Plastic degradation by thermophilic *Bacillus* sp. BCBT21 isolated from composting agricultural residual in Vietnam, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(1).
- [29] Cục thông tin KH&CN Quốc gia, Bộ Khoa học và Công nghệ, 2019, Nhà khoa học Việt công bố 3 chế phẩm sinh học xử lý rác thải nhựa.
- [30] Kawai F, Kawabata T, 2019, Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, pp. 4253-4268.
- [31] Zimmermann W, Billig S, 2010, Advances in Biochemical Engineering, *Biotechnology*, 125, pp. 97-120.
- [32] Müller RJ, Kleeberg I, Deckwer W D, 2005, Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*, *Macromolecular Rapid Communications*, 26(17), pp.1400-1405.
- [33] Silva C, Da S, Silva N, Matama T, 2011, Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates, *Biotechnology Journal*, 6(10), pp. 1230-1239.
- [34] Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, et al., 2016, A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate), *Science*, 351(6278), pp.1196-1199.
- [35] Harry P, Austin M D, 2018, Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase, *The Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19), pp. 4350-4357.
- [36] Han X, Liu W, Huang J W, et al., 2017, Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase, *Nature Communications*, 8(1), pp. 2106.
- [37] Liu B, He L, Wang L, et al., 2018, Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(ethylene terephthalate) hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*, *ChemBioChem*, 19, pp. 1471-1475.
- [38] Taniguchi I, Yoshida S, Hiraga K, et al., 2019, Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects, *ACS Catalysis*, 9, pp. 4089-4105.
- [39] Chen C C, Han X, Ko T P, et al., 2018, Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase, *The FEBS Journal*, pp. 3717-3723.
- [40] Fecker T, Engelberger F, Galaz-Davison P, et al., 2018, Active Site Flexibility as a Hallmark for Efficient PET Degradation by *I. sakaiensis* PETase, *Biophysical Journal*, 114(6), pp.1302-1312.

[41] Ma Y, Yao M, Ding M, Li B Z, 2018, Enhanced Poly(ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering, *Engineering*, 4(6), pp. 888-893.

[42] Seo H, Kim S, Son H F, et al., 2019, Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 8(1), pp. 250-255.

[43] Kim JW, Park S, et al., 2020, Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (PETase), *Microbial Cell Factories*, 19, pp. 97.

[44] Shi L, Liu H, Gao S, Weng Y, Zhu L, 2021, Enhanced Extracellular Production of IsPETase in *Escherichia coli* via Engineering of the pelB Signal Peptide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, pp. 2245-2252.

[45] Lu H, Diaz D J, Czanecki N J, et al., 2022, Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization, *Nature*, 604.

[46] Studier F W, Moffatt B, 1986, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *Journal of Molecular Biology*, 189(1), pp. 113-130.

[47] Sockolosky J T, Szoka F, 2012, Periplasmic production via the pET expression system of soluble, bioactive human growth hormone, *Protein Expression and Purification*, 87(2), pp. 129-135.

[48] Deng B, Yue Y, Yang J, et al., 2023, Improving the activity and thermostability of PETase from *Ideonella sakaiensis* through modulating its post-translational glycan modification, *Communications Biology*, 6(39).

[49] Froger A, Hall J E, 2007, Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method, *Journal of Visualized Experiments*, 6, doi:10.3791/253.

[50] Barker K, 1998, Phenol-Chloroform Isoamyl Alcohol (PCI) DNA Extraction, *At the Bench*.

[51] Sambrooks J, Fritsch E, et al., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition, *New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press*.

[52] Laemmli UK, 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, pp. 680-685.

[53] Bradford M, 1976, A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), pp. 248-254.

[54] Puspitasari N, Tsai S, Lee C K, 2021, Fungal Hydrophobin RolA Enhanced PETase Hydrolysis of Polyethylene Terephthalate, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(5), pp. 1284-1295.

[55] Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J, Dubendorff J W, 1990, Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods in Enzymology*, 185, pp. 60-89.

[56] Weickert M J, Doherty D, Best E A, Olins P O, 1996, Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*, *Current Opinion in Biotechnology*, 7(5), pp. 494-499.

[57] Shin C S, Hong M S, Bae C S, Lee J, 1997, Enhanced production of human mini-proinsulin in fed-batch culture at high cell density of *Escherichia coli* BL21(DE3)[pET-3aT2M2], *Biotechnology Progress*, 13(3), pp. 249-257.

**PHỤ LỤC**

Bảng 1. Khả năng thu hồi PETase ngoại bào sau khi rửa muối và rửa acetone

| Tên mẫu       | Giá trị vùng | Nồng độ tương đương (mg/ml) |
|---------------|--------------|-----------------------------|
| Protein chuẩn | 20831,229    | 0,100                       |
| Tủa muối      | 59388,279    | 0,285                       |
| Tủa acetone   | 48533,940    | 0,233                       |

Bảng 2. Sự biểu hiện của PETase theo nồng độ IPTG định lượng bằng phần mềm ImageJ

| Tên mẫu       | Giá trị vùng | Nồng độ tương đương (mg/ml) |
|---------------|--------------|-----------------------------|
| Protein chuẩn | 6071,376     | 0,100                       |
| 0,2 mM IPTG   | 13153,794    | 0,216                       |
| 0,4 mM IPTG   | 13415,442    | 0,221                       |
| 0,5 mM IPTG   | 61355,818    | 1,010                       |
| 0,75 mM IPTG  | 22361,693    | 0,368                       |

Bảng 3. Các phân đoạn PETase sau khi tinh sạch sắc ký ái lực được định lượng bằng phần mềm ImageJ

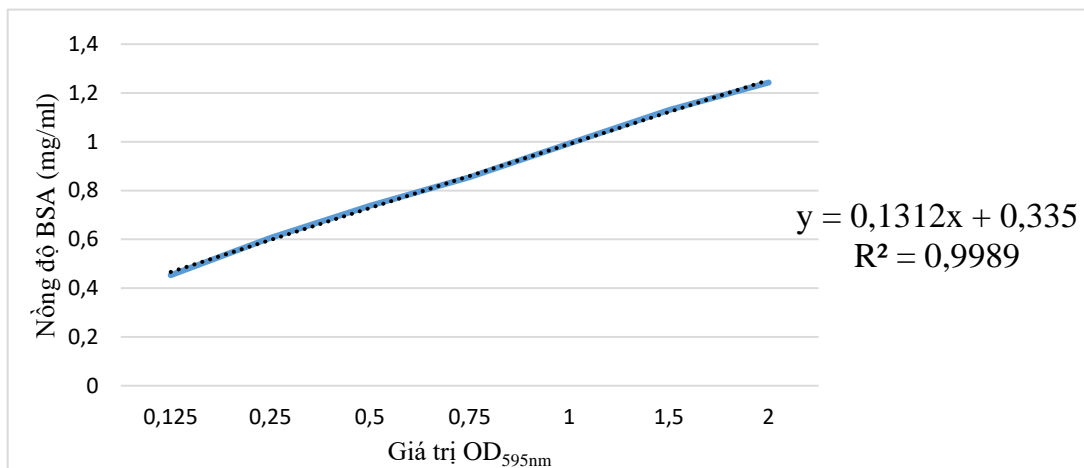
| Tên mẫu        | Giá trị vùng | Nồng độ tương đương (mg/ml) |
|----------------|--------------|-----------------------------|
| Protein chuẩn  | 6031,475     | 0,100                       |
| Phân đoạn số 2 | 21153,288    | 0,351                       |
| Phân đoạn số 3 | 13654,388    | 0,226                       |
| Phân đoạn số 4 | 51387,413    | 0,850                       |
| Phân đoạn số 5 | 23364,066    | 0,387                       |



|                |           |       |
|----------------|-----------|-------|
| Phân đoạn số 6 | 18436,288 | 0,305 |
| Phân đoạn số 7 | 10152,317 | 0,168 |
| Phân đoạn số 8 | 7654,175  | 0,127 |
| Phân đoạn số 9 | 9613,004  | 0,159 |

Bảng 4. Kết quả xây dựng đường chuẩn BSA định lượng PETase sau khi tinh sạch

|                             |       |       |       |       |       |      |       |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| Nồng độ BSA<br>(mg/ml)      | 0,125 | 0,25  | 0,5   | 0,75  | 1,0   | 1,5  | 2,0   |
| Giá trị OD <sub>595nm</sub> | 0,586 | 0,606 | 0,738 | 0,855 | 0,993 | 1,13 | 1,243 |



Phổ trình tự nucleotide của gen *petase* trong vector TA-cloning/*petase* tái tổ hợp:

