

BÀI TỔNG QUAN

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT STREPTOKINASE TÁI TỔ HỢP: HIỆN TRẠNG VÀ TRIỂN VỌNG

Quỳnh Đình Thi

Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Tắc nghẽn mạch (thrombosis) là tình trạng ứ đọng mạch máu với cục máu đông, có thể dẫn tới nhồi máu cơ tim cấp tính và đột quỵ do thiếu máu cục bộ, cả hai đều dẫn tới tử vong. Khác với việc can thiệp phẫu thuật để lấy hoặc thông tắc nghẽn, hoặc tạo ra mạch phụ để cấp mới máu, chỉ có cách xử lý uống thuốc thông tắc để phân hủy cục máu đông như streptokinase, tPA (thể hoạt hóa plasminogen dạng mô), urokinase, staphylokinase, nattokinase. Streptokinase (SK, EC 3.4.99.22) là một protein ngoại bào, nhưng không phải là enzyme, do các chủng tan huyết beta *Streptococcus* sinh tổng hợp ra. SK là chuỗi đơn, có khối lượng phân tử 47 kDa, 414 amino acid, điểm đẳng điện pH 4,7. Enzyme hoạt động tối thích ở dải pH 7,3 - 7,6. SK tự nó không có hoạt tính thủy phân protein và vì vậy, hoạt hóa plasminogen (PG) thành plasmin (PN) gián tiếp trước hết, qua việc tạo ra phức hợp ái lực cao tương đương phân tử lượng với PG (phức hợp hoạt hóa SK-PG). SK được sử dụng làm chất tan huyết khối rộng rãi trong bệnh viện. Nó được tiết tự nhiên từ một số chủng *Streptococcus* tan huyết beta. Do năng suất sinh tổng hợp SK thấp và mức độ nguy hiểm của chủng tự nhiên, nên người ta tìm cách sản xuất protein thuốc quan trọng này bằng con đường tái tổ hợp. Trên thế giới, đã có nhiều công trình nghiên cứu về nhân dòng, biểu hiện và sản xuất SK từ *S. equimilis*, *S. pyrogenes*, *S. uberis* ở *E. coli*, *B. subtilis*, *S. sanguis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces lividans*. Trong những năm gần đây, ở Việt Nam cũng đã xuất hiện một số công trình nghiên cứu phức tạp điều trị tắc nghẽn mạch máu bằng SK. Chúng tôi đã nhân dòng, biểu hiện và đang đánh giá các tính chất của SK tái tổ hợp ở *E. coli*. Các thể tPA và lumbrokinase cũng đang được một số nhóm khác nghiên cứu.

Từ khóa: Biểu hiện gen, cơ chế, nhân dòng, *Streptococcus*, streptokinase, tái tổ hợp

TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRÊN THẾ GIỚI

Tắc nghẽn mạch (thrombosis) là tình trạng ứ đọng mạch máu với cục máu đông, có thể dẫn tới nhồi máu cơ tim cấp tính và đột quỵ do thiếu máu cục bộ, cả hai đều dẫn tới tử vong. Khác với việc can thiệp phẫu thuật để lấy hoặc thông tắc nghẽn, hoặc tạo ra mạch phụ để cấp mới máu, chỉ có cách xử lý uống thuốc thông tắc để phân hủy cục máu đông. Streptokinase (SK) là một lựa chọn như thể (Kunamneni *et al.*, 2007) (ngoài tissue-type plasminogen activator (tPA), urokinase (UK), single chain urokinase-type-plasminogen activator (SCUPA), acylated plasminogen-streptokinase activator-complex (APSAC)). Trên thế giới, các nhà khoa học đã nghiên cứu nhiều về sinh tổng hợp SK, tính chất lý hóa, cấu trúc, cơ chế tác dụng, lên men sản xuất, điều trị lâm sàng. Trong nghiên cứu sinh tổng hợp SK, người ta đã nhân dòng, biểu hiện và sản xuất SK từ các chủng *Streptococcus equisimilis*, *S. pyrogenes*, *S. uberis* ở các hệ thống tế bào chủ như

E. coli, *B. subtilis*, *S. sanguis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces lividans*.

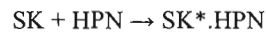
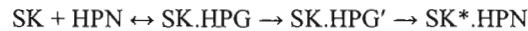
Streptokinase (SK, EC 3.4.99.22) là một protein ngoại bào, không phải là enzyme, do các chủng tan huyết beta *Streptococcus* sinh tổng hợp ra. SK có cấu trúc chuỗi đơn, khối lượng phân tử 47 kDa, 414 amino acid, điểm đẳng điện pH 4,7. Enzyme hoạt động tối thích ở dải pH 7,3 - 7,6. Lần đầu tiên, Tillett và Garner (1933) đã mô tả tác dụng của SK phá vỡ các cục máu đông và họ cho rằng nó có hoạt tính enzyme trực tiếp đối với fibrin (Tillett, Garner, 1933). Tới năm 1941, Milstone mới giải thích rằng SK có tác dụng thông qua hoạt động của protein plasma. Đầu tiên SK được gọi là fibrinolysin, cho đến khi người ta tìm thấy nó cảm ứng phân hủy fibrin không trực tiếp mà thông qua hoạt động của protein plasma trong hệ thống ly giải fibrin ở người. Sau đó, Christensen (1945) đã đặt tên streptokinase để mô tả dịch chiết vi khuẩn *Streptococcus* (Christensen, 1945).

Không giống như UK và TPA, SK tự nó không có hoạt tính thủy phân protein và vì vậy hoạt hóa plasminogen (PG) thành plasmin (PN) gián tiếp trước hết qua việc tạo ra phức hợp ái lực cao với PG theo tỷ lệ phân tử tương đương (phức hợp hoạt hóa SK-PG).

Cơ chế hoạt động của SK

Tính chất hấp dẫn đặc biệt của thể hoạt hóa plasminogen này là chính nó không có hoạt tính thủy phân protein và bởi vậy hoạt hóa HPG thành PN gián tiếp qua việc tạo ra một phức hợp ái lực cao với PG (SK-HPG) theo tỷ lệ phân tử tương đương. Summaria và đồng tác giả (1974) đã giải thích khả năng của SK tạo ra phức hợp phân tử lượng tương đương với HPG.

Hoạt động xúc tác SK của plasminogen có hai bước quan trọng (Schick, Castellino 1973). Bước đầu tiên liên quan tới sự hình thành dạng ly giải protein làm chất xúc tác phản ứng cắt liên kết peptide Arg560-Val561 cần thiết cho sự hoạt hóa của plasminogen. Sự hình thành thể kích hoạt này được tóm tắt như sau:



[SK*: dạng cải biến ly giải protein của SK]

Ở đây, SK và HPG liên kết tạo ra một phức hợp SK.HPG theo tỷ lệ phân tử lượng tương đương. Kết quả của sự tương tác này dẫn tới thay đổi cấu dạng phức hợp, tạo ra SK.HPG', có trung tâm hoạt động, nằm ở nua plasminogen của phức hợp.

Phức hợp này không bền và biến đổi nhanh chóng thành phức hợp (SK*.HPN) của SK và HPN (human plasmin). Dẫn tới phản ứng cắt nội phân tử của liên kết peptide Arg560-Val561 trong phức hợp SK.HPG*, được xúc tác bởi trung tâm hoạt động trong nua plasminogen của phức hợp (Bajaj, Castellano, 1977). Tiếp theo sự hình thành HPN, trong phức hợp, SK được cải biến cắt protein thành dạng SK* đã thay đổi (Brockway, Castellino 1974). Dạng SK* đã thay đổi này có khối lượng phân tử 36 kDa, như vậy peptide cắt đi có khối lượng phân tử khoảng 9 kDa. SK* cũng có các tính chất chức năng như SK tự nhiên.

Các tính chất hóa lý của SK

De Renzo và đồng tác giả (1967), Taylor và Botts (1968) đã đánh giá các tính chất hóa học và vật

lý của SK. SK là một protein đơn, khối lượng phân tử 45 - 50 kDa được xác định bằng độ lắng cân bằng. SK chạy trên gel điện di như α -globulin và có hệ số hấp thụ ánh sáng 9,49, với điểm đẳng điện 4,7. Thành phần của SK không có cystine, cysteine, phosphorus, carbohydrate và lipid. Hàm lượng nitrogen là 14,5%. Các nghiên cứu tán quay quang học cho thấy tỷ lệ helix là 10 - 12%. Độ nhớt đặc trưng là 0,1 (De Renzo *et al.*, 1967; Taylor, Botts, 1968).

Cấu trúc SK

Jackson và Tang (1982) đã xác định toàn bộ trình tự amino acid của SK đầu tiên bằng phương pháp phân hủy Edman tự động sử dụng cynogen bromide và các phân đoạn cắt protease. Malke và đồng tác giả (1985) đã xác định trình tự nucleotide hoàn chỉnh của gen *skc* chủng *S. equisimilis* H46A, sau khi nhân dòng một phân đoạn 2568 bp *Pst*I chứa gen *skc* từ genome của *S. equisimilis* H46A vào *E. coli*. Các nhà nghiên cứu cũng nhận dạng các trình tự nucleotide của các vùng lân cận liên quan tới kiểm soát phiên mã và dịch mã của gen *skc*. Các gen *skc* (Huang *et al.*, 1989b) cũng như trình tự amino acid (Malke, 1993) từ các nhóm khác nhau của *Streptococcus* cũng được phân tích về độ tương đồng để so sánh và làm rõ các vùng thay đổi trong trình tự SK. Cả hai nghiên cứu đều cho rằng độ không tương đồng lớn giữa các SK khác nhau đã tạo ra một nhóm khác của *Streptococcus*.

Các domain cấu trúc (tính chất cấu dạng) của SK

Để nghiên cứu về cấu trúc SK, các nhà khoa học đã sử dụng các kỹ thuật lý sinh học khác nhau như CD, NMR, FT-IR và đo nhiệt lượng quét (Beldarrain *et al.*, 2001), hoặc nghiên cứu gián tiếp qua việc xác định tính chất hóa lý của các phân đoạn khác nhau của SK (Reed *et al.*, 1995). Một số nhà nghiên cứu cho biết có nhiều domain trong SK với các tính chất cấu trúc - chức năng khác nhau. Phân tích đo nhiệt lượng quét SK cho thấy protein có cấu tạo từ hai domain khác nhau (Welfle *et al.*, 1992).

Để tìm hiểu vai trò của domain đầu N của SK (gốc số 1 - 59 của SK), Nihalani và đồng tác giả (1998) đã tổng hợp phân đoạn peptide này và thấy rằng domain đầu N làm tăng khả năng hoạt hóa plasminogen thấp của phân đoạn SK 60-414 lên vài trăm lần. Ngoài ra, domain đầu N được cấu tạo từ hai domain đặc trưng PG nhỏ hơn. Hiện nay, người ta

đang nghiên cứu cấu trúc tinh thể của phức hợp SK với chuỗi nhẹ HPN (Wang *et al.*, 1998) và cấu trúc tinh thể của SK beta domain (Lizano, Johnston 2005). Các nhà khoa học vẫn đang tiếp tục nghiên cứu biến tính nhiệt của SK (Azuaga *et al.*, 2002), tính bền nhiệt của các domain đặc trưng của enzyme (Conejero-Lara *et al.*, 1996), cơ chế hoạt hóa của plasminogen bằng SK (Sazonova *et al.*, 2004; Boxrud, Bock, 2004).

Nhân dòng gen *skc* mã hóa SK

Streptokinase (SK) là thể kích hoạt plasminogen tiềm năng, được sử dụng làm chất tan huyết rộng rãi trong bệnh viện. SK được tiết tự nhiên từ một số chủng *Streptococcus* tan huyết beta. Do năng suất sinh tổng hợp thấp và mức độ nguy hiểm của các chủng tự nhiên, cho nên người ta tìm cách sản xuất protein thuốc quan trọng này bằng con đường tái tổ hợp.

Nhân dòng gen *skc* từ *Streptococcus equisimilis*

Lần đầu tiên, Malke và Ferretti (1984) đã nhân dòng DNA genome từ *S. equisimilis* chủng H46A ở *E. coli* sử dụng vector L47. Họ sàng lọc thư viện phage trên đĩa thạch trắng lớp casein/plasminogen, phân lập và phân tích mười dòng tái tổ hợp chứa *skc* (Malke, Ferretti 1984). Gen *skc* đã biểu hiện trên vector pBR322 với sự có mặt của promoter của chính nó ở *E. coli* và được nhận dạng bằng kỹ thuật dung hợp miễn dịch. Dịch nổi nuôi cấy, dịch shock thẩm thấu và dịch phá tế bào đều có hoạt tính SK, như vậy tế bào *E. coli* có khả năng tiết ra một lượng SK đáng kể trong dịch nuôi cấy (Malke, Ferretti, 1984).

Huang và đồng tác giả (1989) đã sử dụng trình tự gen *skc* mã hóa SK của chủng H46A nhóm C (trên plasmid pNC1) làm mẫu dò DNA để xác định sự phân bố của gen *skc* ở *Streptococcus* nhóm A của các type M khác nhau và trong các chủng liên cầu khuẩn khác. Chỉ có các chủng liên cầu khuẩn độc nhóm A, C và G chứa gen *skc*; 12 chủng nhóm Lancefield khác không có. Tất cả 134 chủng nhóm A (61 type M và 6 type T) đều chứa gen *skc* (lai mạnh với mẫu dò pNC1) nhưng chỉ có 83 chủng (62%) có hoạt tính SK trên đĩa thạch casein-plasminogen (Huang *et al.*, 1989a).

Nhân dòng gen *skc* từ *Streptococcus pyrogenes* và *S. uberis* NCTC 3858

Đến năm 1989, Walter và đồng tác giả đã nhân

dòng thành công gen mã hóa SK từ chủng *S. pyrogenes* (Walter *et al.*, 1989) và Johnsen và đồng tác giả đã nhân dòng gen *skc* mã hóa SK từ chủng *S. uberis* NCTC 3858 bằng phương pháp PCR suy biến. Đầu tiên, họ tinh sạch thể kích hoạt plasminogen bò (32 kDa) từ dịch nổi nuôi cấy chủng bệnh bò *S. uberis* NCTC 3858 bằng sắc ký lỏng cao áp HPLC pha ngược cuối cùng. Trình tự mỗi suy biến được thiết kế từ trình tự peptide để khuếch đại phân đoạn gen mã hóa thể kích hoạt. Tiếp theo, PCR ngược được sử dụng để thu nhận gen đầy đủ. Gen thể kích hoạt plasminogen (*skc*) *S. uberis* mã hóa một protein dài 286 aa gồm một peptide tín hiệu 25 aa. So sánh trình tự aa, SK nhân dòng có độ tương đồng ~26% với SK tinh sạch từ *S. equisimilis* và *S. pyrogenes*. SK từ *S. uberis* không có domain đầu C như SK chủng *S. equisimilis*. Đây là một tính chất chung của SK chủng này; phân tích hóa sinh và di truyền cho thấy 9/10 chủng *S. uberis* nữa tương tự như chủng NCTC 3858. Trình tự gen *skc* của ba chủng này cho thấy trình tự aa của protein bảo thủ cao ở trong những chủng này (Johnsen *et al.*, 1999).

Biểu hiện SK tái tổ hợp

Biểu hiện SK ở *S. sanguis*

Sau khi đã nhân dòng gen mã hóa SK từ chủng *S. equisimilis*, Malke và đồng tác giả (1984) đã biểu hiện SK ở chủng Challis *S. sanguis* (nhóm H) dưới sự kiểm soát của chính promoter và SK tái tổ hợp có các tính chất sinh học như SK tự nhiên. Tuy nhiên, khối lượng phân tử của SK nhân dòng (42 kDa) biểu hiện ở *S. sanguis* thấp hơn so với SK tự nhiên (47 kDa) (Malke *et al.*, 1984). Mặc dù, gen nhân dòng mã hóa một protein thuần thực 47 kDa nhưng khối lượng phân tử của SK ở *S. sanguis* vẫn thấp hơn có thể là do quá trình cắt protein hậu dịch mã, tạo ra một SK vẫn có hoạt tính sinh học và phản ứng huyết thanh mạnh.

Biểu hiện SK ở *S. sanguis* và *E. coli*

Để có thể biểu hiện được ở cả chủng *Streptococcus* spp. lẫn *E. coli*, Dao và Ferretti (1985) đã thiết kế một vector con thoi pSA3 bằng cách nối plasmid pACYC184 cho *E. coli* (kháng chloramphenicol và tetracycline) với plasmid pGB305 giành cho liên cầu khuẩn (kháng erythromycin). Vector pSA3 được sử dụng để sàng lọc một thư viện genome của chủng *S. mutans* GS5 ở *E. coli* bằng kháng huyết thanh *S. mutans*. Gen mã hóa *skc* trên plasmid pSA3 được biểu hiện ổn định

và có hoạt tính SK ở *E. coli*, *S. sanguis* (Challis) và *S. mutans* (Dao, Ferretti, 1985).

Avilan và đồng tác giả (1997) đã biểu hiện vượt mức gen *skc* chủng *S. equisimilis* trong một vector ở *E. coli* dưới sự kiểm soát của promoter *tac*. Tất cả SK tái tổ hợp được tiết ra vùng chất bao và thu được sau khi xử lý tế bào cảm ứng với lysozyme. SK được tinh sạch bằng sắc ký DEAE sepharose và phenyl-agarose với thang nồng độ tuyến tính 4,5 - 0% ammonium sulfate. Trong ba dẫn xuất SK chính 47,5 kDa, 45 kDa và 32 kDa lai Western với một kháng thể đa dòng, SK 32 kDa không có hoạt tính mặc dù cũng tạo ra một phức hợp với plasminogen người. SK 47,5 kDa và 45 kDa đều có hoạt tính và SK 47,5 kDa tương ứng với SK tự nhiên được xác định trình tự peptide. Đây là các phân đoạn SK do bị phân hủy từng phần trong quá trình tiết hoặc tinh sạch (Avilan *et al.*, 1997).

Biểu hiện SK ở *Pichia pastoris*

SK thường bị phân hủy khi sinh tổng hợp ở quy mô lớn cũng như khi không được cuộn gấp hoàn toàn. Để giải quyết về vấn đề này, Pratap và đồng tác giả (2000) đã biểu hiện SK dạng glycosyl hóa, ngoại bào ở nấm men *P. pastoris*. Tín hiệu tiết gốc của SK được thay bằng tín hiệu peptide dẫn yếu tố alpha và biểu hiện protein dung hợp này dưới sự kiểm soát của promoter alcohol oxidase (ox) được cảm ứng với methanol sau khi hội nhập vào nhiễm sắc thể *P. pastoris*.

SK glycosyl hóa tiết ra từ chủng *P. pastoris* tái tổ hợp di chuyển chậm hơn và tương ứng với một protein 55 kDa so với SK gốc 47 kDa qua phân tích lai Western và enzyme đồ. SK glycosyl hóa giữ nguyên khả năng hoạt hóa plasminogen như dạng không glycosyl hóa. SK dạng glycosyl hóa có độ bền ở 25°C và 37°C cao hơn và kháng lại protease tốt hơn so với dạng SK không bị glycosyl hóa được tiết ra từ *P. pastoris* sau khi xử lý tunicamycin hoặc tiết ra từ *E. coli* tái tổ hợp. Các kết quả này cho thấy rằng sự glycosyl hóa liên kết N của SK tăng 30 - 40% độ bền protein và khả năng kháng lại sự phân hủy protein nhưng không ảnh hưởng gì tới chức năng thủy phân fibrin (Pratap *et al.*, 2000).

Biểu hiện SK ở *Bacillus subtilis*

Lần đầu tiên, năm 1986, Klessen và Malke đã biểu hiện gen *skc* chủng *S. equisimilis* H46A ở *B. subtilis*. Gen *skc* được biểu hiện sử dụng các tín hiệu phiên mã và dịch mã của chính nó, đáp ứng các yêu

cầu nghiêm ngặt của chủng *B. subtilis* để biểu hiện gen lạ có hiệu quả. Hoạt tính SK tiết ra giảm xuống đến cuối pha sinh trưởng lũy thừa cho thấy các protease tiết ra của *B. subtilis* đã thủy phân và bất hoạt protein lạ (Klessen, Malke, 1986). Để khắc phục tình trạng này, Wong và đồng tác giả (1994) đã sử dụng chủng *B. subtilis* WB600 đột biến mất sáu protease ngoại bào và đã cải thiện năng suất sinh tổng hợp SK tiết ra.

Gen *skc* cải biến được thay trình tự promoter và tín hiệu tiết gốc bằng trình tự promoter và tín hiệu tiết của levansucrase từ chủng *B. subtilis*. *B. subtilis* mang *skc* tự nhiên hay cải biến sinh tổng hợp SK ở mức độ thấy được. Ngay cả với chủng chủ biểu hiện WB600, cũng có thể quan sát thấy SK được cải biến đầu C. Qua đột biến tổ hợp đặc hiệu vùng đầu C, các dẫn xuất SK được cải biến không bị thủy phân đầu C. Một dẫn xuất tăng 2,5 lần hoạt tính đặc hiệu và có thể dùng làm chất tan huyết tốt hơn (Wong *et al.*, 1994).

Biểu hiện SK ở *Schizosaccharomyces pombe*

Cho tới nay, người ta đã thử biểu hiện SK ở *P. pastoris*, *E. coli* và *B. subtilis* và thu được một protein bị glycosyl hóa hoặc bị phân hủy nhiều. Do nấm men phân đôi *Sz. pombe* có chung một số tính chất phân tử như các tế bào nhân chuẩn bậc cao, nên Kumar và Singh (2004) đã biểu hiện gen *skc* ở nấm men này.

Gen dung hợp gồm trình tự tín hiệu của Plus pheromone chủng *Sz. pombe* và gen *skc* thành thực từ *Streptococcus* sp. được chèn vào vector biểu hiện mang promoter điều hòa bởi thiamine. SK được biểu hiện ở mức độ cao như ở *E. coli* và *P. pastoris*, với 50 - 100% SK thành thực được cất trình tự tín hiệu và tiết xuất vào vùng chất bao. SK thành thực được biểu hiện ở mức độ cao và không bị phân hủy ở chủng *Sz. pombe* mới đột biến mất hoạt tính protease ngoại bào. Hệ thống biểu hiện *Sz. pombe* này có ưu điểm dễ sinh tổng hợp các protein tiền nhân ở quy mô lớn mà không cần cải biến hoặc bị phân hủy (Kumar, Singh, 2004).

Biểu hiện SK ở *Lactococcus lactis*

Năm 2006, Sriraman và Jayaraman đã biểu hiện SK dạng protein tiết ở *L. lactis* dưới sự kiểm soát của P170 promoter. Tuy nhiên, SK bị thủy phân, tạo ra sản phẩm bất hoạt dẫn đến hiệu suất thấp. Mức độ thủy phân cao và hiệu suất SK thấp là do chủng *L. lactis* phản ứng thích nghi acid và phụ thuộc vào pH

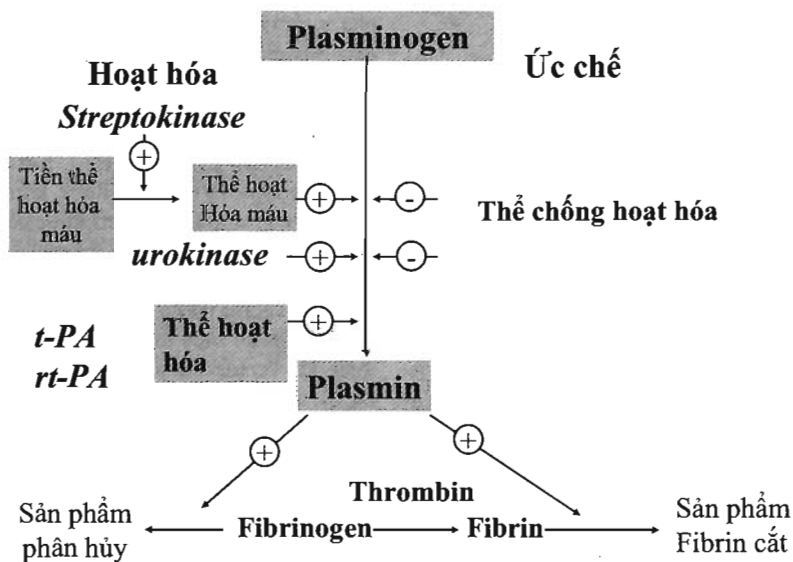
và nồng độ phosphate ban đầu của môi trường nuôi cấy. pH và nồng độ phosphate ban đầu cao sẽ ức chế khả năng thích nghi acid làm tăng hiệu suất SK lên ít nhất 2,5 lần và giảm SK thủy phân đáng kể (Sriraman, Jayaraman, 2006).

Biểu hiện SK ở *Streptomyces lividans*

Pimienta và đồng tác giả (2007) đã biểu hiện SK chủng *S. equisimilis* ATCC9542 tiết xuất ở vi khuẩn Gram dương *St. lividans* với trình tự tín hiệu của thể ức chế subtilisin từ chủng *St. venezuelae* CBS762.70 (vsi) hoặc với trình tự tín hiệu của xylanase C (xlnC) từ chủng *St. lividans*. Năng suất sinh tổng hợp protein dung hợp Vsi-SK cao hơn 30 lần so với XlnC-SK và đạt tới 15 mg SK/l trong nổi lên men

1,5 l (Pimienta *et al.*, 2007). SK tinh sạch bằng sắc ký DEAE-Sephacel cho hai băng protein: Sản phẩm thủy phân 44 kDa và SK thành thực 47 kDa. Các gốc aa đầu tiên của SK do *St. lividans* sinh tổng hợp được xác định đúng trình tự đầu N như mong muốn. Tín hiệu peptide Vsi được bẻ gãy đúng điểm và đầu N của protein dung hợp Vsi-SK thành thực do *St. lividans* tiết ra giữ nguyên vẹn. Kết quả này cho thấy, việc cải biến SK tái tổ hợp do *Streptomyces* tiết ra có lẽ xảy ra ở đầu C của nó, như trong chủng gốc *S. equisimilis*. Hoạt tính đặc hiệu của SK tinh sạch một phần từ *Streptomyces* được xác định là 2661 IU/mg protein. Như vậy chủng *St. lividans* là một chủng chủ có giá trị để sinh tổng hợp sản phẩm được thuốc quan trọng trên thế giới ở dạng hoạt hóa sinh học (Pimienta *et al.*, 2007).

Các thể làm tan fibrin FIBRINOLYTICS



Hình 1. Cơ chế hoạt hóa của SK.

TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU TRONG NƯỚC

Trong nước, đã có hai hướng nghiên cứu về SK đó là nghiên cứu điều trị bệnh tim mạch bằng SK và nghiên cứu sản xuất SK bằng con đường tái tổ hợp.

Có một số đề tài nghiên cứu trong nước đã được thực hiện, đánh giá hiệu quả sử dụng thuốc SK để

điều trị bệnh nhồi máu cơ tim cấp. Năm 2001 - 2002, Bệnh viện Hữu nghị Việt Tiệp, Hải Phòng đã nghiên cứu ứng dụng điều trị bệnh nhồi máu cơ tim cấp bằng SK (Sở Khoa học và Công nghệ Hải Phòng, <http://www.haiphong.gov.vn/sokhcn/vn/index>).

Lê Văn Nam và Lê Thị Cẩm Dung (2003) đã nghiên cứu cách điều trị huyết khối trong tai biến

mạch máu não, đã đưa ra công thức và phác đồ điều trị huyết khối. Các thuốc ly giải huyết khối gồm: SK, urokinase, scu-PA, rTPA (Lê Văn Nam, Lê Thị Cẩm Dung, 2003).

Trần Minh Tâm và đồng tác giả (2005) đã nghiên cứu điều trị tiêu sợi huyết bằng SK trong nhồi máu cơ tim cấp cho 27 ca bị nhồi máu cơ tim ở Bệnh viện Đa khoa tỉnh Phú Yên từ 5/2001 đến 12/2004 (Trần Minh Tâm *et al.*, 2005). Tiêu sợi huyết bằng SK trong nghiên cứu này có tỷ lệ thành công là 63%. Theo dõi trong 30 ngày, bệnh nhân phục hồi tốt, ít biến chứng, chi phí điều trị chấp nhận được.

Các nghiên cứu khác liên quan tới các enzyme tương tự như tPA, nattokinase, urokinase, lumbrokinase còn rất hạn chế. Đa số là các nghiên cứu sử dụng các enzyme này như thế nào trong điều trị bệnh nhồi máu như “*Áp dụng thuốc rTPA trị liệu bốn trường hợp thiếu máu não cấp tại Bệnh viện Nhân dân Gia Định*” của Phan Công Tân, Nguyễn Cảnh Nam và Nguyễn Văn Mừng?

Nhóm nghiên cứu của PGS. TS. Nguyễn Thị Ngọc Dao (Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã nghiên cứu và sản xuất thành công chế phẩm tương tự như Lumbrokinase (sản phẩm tách từ giun đất Nhật Bản có tên khoa học *Lumbricus rubellus*) từ giun quế Việt Nam (tên khoa học *Perionyx escavatus*) có tác dụng làm tan cục máu đông làm nghẽn động mạch, tạo ra vết thương bị tụ máu (Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Ngọc Dao, 2004; Lý Thị Bích Thủy *et al.*, 2006). Sau khi thử nghiệm trên động vật, chế phẩm đã được thử nghiệm trên 30 bệnh nhân tình nguyện tại Hà Nội bị tai biến mạch máu do viêm tắc động mạch, và cho kết quả tốt. Trong thời gian qua, nhóm nghiên cứu này cũng đang tìm cách nhân dòng và tạo ra enzyme này bằng công nghệ tái tổ hợp gen để thu được enzyme tinh khiết hơn, thuận lợi cho việc làm thuốc chữa bệnh.

Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã nhân dòng thành công gen mã hóa subtilisin từ hai chủng *Bacillus subtilis* có độ tương đồng 99% (378 và 379/381 aa) trình tự amino acid của một enzyme khác cũng đã được làm thuốc chống tắc nghẽn mạch máu Nattokinase (P35835|SUBN_BACNA, Subtilisin NAT precursor Nattokinase). Trình tự gen mã hóa subtilisin của hai chủng *Bacillus subtilis* phân lập ở Việt Nam đã được đăng ký trên GenBank với mã số EF061457 và EF061456 lần lượt cho chủng G1 và DR23 (Quyền Đình Thi *et al.*, 2007).

Gen mã hóa subtilisin trưởng thành đã biểu hiện thành công trong *Bacillus subtilis* và đã được đánh giá tính chất và lên men để có thể chuyển giao công nghệ sản xuất. Hiện nay, chúng tôi đã được đăng ký độc quyền sáng chế mã số SC 1-2009-00749: Chủng *Bacillus subtilis* WB800 tái tổ hợp sinh tổng hợp subtilisin ngoại bào và quy trình sản xuất subtilisin tái tổ hợp.

Nông Văn Hải và đồng tác giả (Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam) đã và đang nghiên cứu tạo chất hoạt hóa plasminogen mô (tissue plasminogen activator, tPA) tái tổ hợp trong vi khuẩn *E. coli* (Đề tài KC10/06-20.28, 2009 - 2010; Đề tài NCCB, 614206). Đây là nhóm đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu về sản xuất rTPA.

Nghiên cứu về rTPA trong hệ tế bào động vật nuôi cấy đang được triển khai trong đề tài “*Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm enzyme tái tổ hợp streptokinase và yếu tố hoạt hóa plasminogen mô (tPA) sử dụng trong điều trị*” (KC10/06-10.28, 2009-2010).

Gen mã hóa streptokinase (SK) từ chủng *Streptococcus pyogenes* DT7 (*Streptococcus* nhóm A) phân lập ở Việt Nam được khuếch đại bằng cặp mồi thiết kế dựa trên các trình tự gen tương đồng mã hóa SK từ các chủng *S. pyogenes* trong GenBank. Gen thu được dùng để nhân dòng trong *E. coli* DH5α sử dụng vector pTZ57R tạo thành plasmid tái tổ hợp pTSK. Vector biểu hiện pET22b(+) được sử dụng để thiết kế vector tái tổ hợp biểu hiện trong *E. coli* BL21. Plasmid tái tổ hợp pTSK và vector biểu hiện pET22b(+) được cắt bằng 2 enzyme hạn chế *NcoI* và *XhoI* để thu nhận gen *sk* và vector biểu hiện đã mở vòng. Vector tái tổ hợp pESK được hình thành thông qua phản ứng nối ghép sử dụng T4 ligase. Gen mã hóa SK từ khuôn pESK được đọc trình tự trên máy ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Gen thu được có độ dài 1323 bp với trình tự amino acid suy diễn dài 440 amino acid. So sánh trình tự gen mã hóa SK từ chủng *S. pyogenes* DT7 với các dữ liệu trong GenBank cho thấy độ tương đồng đạt 84 - 99%. Trình tự protein suy diễn của SK từ *S. pyogenes* DT7 được so sánh với trình tự protein đã đăng ký trong GenBank cũng thấy độ tương đồng tương đối cao giữa các chủng *Streptococcus* nhóm A, C và G, đạt 78 - 99%. Gen mã hóa SK từ chủng *S. pyogenes* DT7 được đăng ký trong GenBank với mã số EU872448 (Vũ Hồng Diệp *et al.*, 2008).

Trong nước có bán một số dược phẩm có chứa streptokinase như Strase/Sang A Strase (Hãng dược phẩm Hàn Quốc, Sang-A Pharm. Co., Ltd - Korea), Durakinase (hãng Cheil Jedang Corporation), Mutose (Binex Co., Ltd), Mucopan (Cellart Pharm. Korea Co., Ltd.), Streptase (Hoechst-Marion-Roussel), Dortonase, Dornase (Hàn Quốc).

Strase hoặc Sang A Strase chứa phức hợp cùng một lúc hai enzyme streptokinase (phân hủy fibrin) và streptodornase (phân hủy protein) (<http://merap.com.vn/San-Pham/Sang-A-Strase/>).

Streptokinase là enzyme chiết xuất từ chủng *Streptococcus haemolyticus*, có tác dụng làm tan cục máu đông (phân hủy fibrin) do hoạt hóa plasminogen nội sinh thành plasmin. Streptodornase cũng được lấy từ các chủng *S. haemolyticus*, là enzyme xúc tác quá trình giải trùng hợp các deoxyribonucleoprotein trùng hợp hóa. Nó hóa lỏng nucleoprotein đặc quánh của các tế bào chết một cách chọn lọc, không có tác dụng trên tế bào sống.

Trong các hướng nghiên cứu về enzyme SK nói riêng và các loại enzyme làm thuốc tan huyết khối nói chung trên thế giới hiện nay và trong tương lai gần thì Việt Nam có một khoảng cách rất xa so với họ. Có một số hướng Việt Nam đã thực hiện trong một thời gian tương đối dài là đánh giá tác dụng chữa trị và tác dụng phụ của những enzyme này khi điều trị cho bệnh nhân Việt Nam. Tuy nhiên, những nghiên cứu này cũng ở quy mô khảo sát nhỏ lẻ. Do đó, ngay trong hướng đi này, chúng ta vẫn còn cách xa. Cụ thể là các công trình trong nước không đủ khả năng đề công bố trên các tạp chí quốc tế vì hàm lượng khoa học thấp.

Các hướng nghiên cứu sinh tổng hợp SK hoặc enzyme làm thuốc tan huyết khối khác tự nhiên và tái tổ hợp ở Việt Nam đang ở thời kỳ đầu. Hiện nay, một số nhóm nghiên cứu ở Việt Nam đã và đang tạo ra các enzyme tái tổ hợp nhằm mục đích sử dụng làm thuốc tan huyết khối như nhóm nghiên cứu của Nông Văn Hải về tPA, nhóm nghiên cứu của Quyền Đình Thi về nattokinase và SK, nhóm nghiên cứu của Nguyễn Thị Ngọc Dao về lumbrokinase.

Các hướng nghiên cứu khác về cấu trúc, cơ chế tác động của enzyme này và những enzyme làm thuốc tan huyết khối khác hầu như là không có ở Việt Nam. Rất ít các công trình nghiên cứu cơ bản về những hướng đi này.

Lời cảm ơn: Công trình có liên quan đến đề tài:

"Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất chế phẩm enzyme tái tổ hợp streptokinase và yếu tố hoạt hóa plasminogen mô (tPA) sử dụng trong điều trị", mã số K10.28/06-10, 2009 - 2010 và đề tài "Nghiên cứu quy trình nhân dòng, biểu hiện cao sản và định hướng ứng dụng enzyme tái tổ hợp streptokinase làm thuốc uống chống tắc nghẽn mạch máu" cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2008 - 2009.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Avilán L, Yarzabal A, Jürgensen C, Bastidas M, Cruz J, Puig J (1997) Cloning, expression and purification of recombinant streptokinase: partial characterization of the protein expressed in *Escherichia coli*. *Brazil J Med Biologic Res* 30: 1427-1430.

Azuaga AI, Dobson CM, Mateo PL, Conejero-Lara F (2002) Unfolding and aggregation during the thermal denaturation of streptokinase. *Eur J Biochem* 269: 4121-4133.

Bajaj AP, Castellano FJ (1977) Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase. *J Biol Chem* 252: 492-498.

Beldarrain A, Lopez-Lacomba JL, Kutysenko VP, Serrano R, Cortijo M (2001) Multidomain structure of a recombinant streptokinase. A differential scanning calorimetry study. *J Protein Chem* 20: 9-17.

Boxrud PD, Bock PE (2004) Conformational and proteolytic activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by streptokinase. *J Biol Chem* 279: 36642-36649.

Brockway WJ, Castellino FJ (1974) A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. *Biochemistry* 13: 2063-2070.

Christensen LR (1945) Streptococcal fibrinolysis: a proteolytic reaction due to serum enzyme activated by streptococcal fibrinolysin. *J Gen Physiol* 28: 363-383.

Conejero-Lara K, Parrado J, Azuaya AI, Smith RAG, Ponting CP, Dobson CM (1996) Thermal stability of the three domains of streptokinase studied by circular dichroism and nuclear magnetic resonance. *Protein Sci* 5: 2583-2591.

Dao ML, Ferretti JJ (1985) *Streptococcus-Escherichia coli* shuttle vector pSA3 and its use in the cloning of streptococcal genes. *Appl Environ Microbiol* 49: 115-119.

De Renzo EC, Siiteri PK, Hutchings BL, Bell PH (1967) Preparation and certain properties of highly purified

streptokinase. *J Biol Chem* 242: 533-542.

Huang T-T, Malke H, Ferretti JJ (1989a) Heterogeneity of the streptokinase gene in group A Streptococci. *Infect Immun* 57: 502-506.

Huang TT, Malke H, Ferretti JJ (1989b) Heterogeneity of the streptokinase gene in group A Streptococci. *Infect Immun* 57: 502-506.

Jackson KW, Tang J (1982) Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine proteases. *Biochemistry* 21: 6620-6625.

Johnsen LB, Poulsen K, Kilian M, Petersen TE (1999) Purification and cloning of a streptokinase from *Streptococcus uberis*. *Infect Immun* 67: 1072-1078.

Klessen C, Malke H (1986) Expression of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* in *Bacillus subtilis*. *J Basic Microbiol* 26: 75-81.

Kumar R, Singh J (2004) Expression and secretion of a prokaryotic protein streptokinase without glycosylation and degradation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 21: 1343-1358.

Kunamneni A, Abdelghani TT, Ellaiah P (2007) Streptokinase-the drug of choice for thrombolytic therapy. *J Thromb Thrombolysis* 23: 9-23.

Lê Văn Nam, Lê Thị Cẩm Dung (2003) Điều trị chống huyết khối trong tai biến mạch máu não. *Tạp chí Y học thành phố Hồ Chí Minh* 7: 14-19.

Lizano S, Johnston KH (2005) Structural diversity of streptokinase and activation of human plasminogen. *Infect Immun* 73: 4451-4453.

Lý Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2004) Tách chiết enzyme có hoạt tính thủy phân fibrin từ loài giun quế *Perionyx excavatus*. In: *Báo cáo Khoa học, Hội nghị Khoa học Toàn quốc 2004. Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học sự sống định hướng Y Dược học*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 173-17.

Lý Thị Bích Thủy, Phạm Công Hoạt, Nguyễn Thị Kim Xuyên, Nguyễn Thị Ngọc Dao (2006) Tác dụng chống đông máu của bột giun quế trên thỏ thực nghiệm. *Tạp chí Dược liệu* 11: 74-76.

Malke H (1993) Polymorphism of the streptokinase gene-implications for the pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis. *Zentralbl Bakteriell* 278: 246-257.

Malke H, Ferretti JJ (1984) Streptokinase: Cloning, expression, and excretion by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3557-3561.

Malke H, Gerlach D, Kohler W, Ferretti JJ (1984) Expression of a streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* in *Streptococcus sanguis*. *Mol Gen Genet* 196:

360-363.

Malke H, Roe B, Ferretti J (1985) Nucleotide sequence of the streptokinase gene from *Streptococcus equisimilis* H46A. *Gene* 34: 357-362.

Nihalani D, Kumar R, Rajagopal K, Sahni G (1998) Role of the amino-terminal region of streptokinase in the generation of a fully functional plasminogen activator complex probed with synthetic peptides. *Protein Sci* 7: 637-64.

Pimienta E et al., (2007) Recombinant production of *Streptococcus equisimilis* streptokinase by *Streptomyces lividans*. *Microb Cell Fact* 6: 20.

Pratap J, Rajamohan G, Dikshit KL (2000) Characteristics of glycosylated streptokinase secreted from *Pichia pastoris*: enhanced resistance of SK to proteolysis by glycosylation. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 469-475.

Quyền Đình Thi, Nguyễn Thị Thảo, Cao Lan Phương (2007) Nhân dòng, phân tích trình tự và biểu hiện gen mã hóa subtilisin từ các chủng *Bacillus subtilis* G1 và RD23. In: *Hội nghị Khoa học, Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, Quy Nhơn*.

Reed GL, Lin LF, Parhami-Seren B, Kussie P (1995) Identification of a plasminogen binding region in streptokinase that is necessary of the creation a functional streptokinase-plasminogen activator complex. *Biochemistry* 34: 10266-10271.

Sazonova IY, Robinson BR, Gladysheva IP, Castellino FJ, Reed GL (2004) a-Domain deletion converts streptokinase into a fibrin-dependent plasminogen activator through mechanisms akin to staphylokinase and tissue plasminogen activator. *J Biol Chem* 279: 24994-25001.

Schick LA, Castellino FJ (1973) Interaction of streptokinase and rabbit plasminogen. *Biochemistry* 12: 4315-4321.

Sriraman K, Jayaraman G (2006) Enhancement of recombinant streptokinase production in *Lactococcus lactis* by suppression of acid tolerance response. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 1202-1209.

Summaria L, Arzadon L, Bernabe P, Robbins KC (1974) The interaction of streptokinase with human, cat, dog, and rabbit plasminogens. The fragmentation of streptokinase in the equimolar plasminogen-streptokinase complexes. *J Biol Chem* 249: 4760-4769.

Taylor FB, Botts J (1968) Purification and characterization of streptokinase with studies of streptokinase activation of plasminogen. *Biochemistry* 7: 232-24.

Tillett WS, Garner RL (1933) Fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 58: 485-502.

Trần Minh Tâm, Lê Phái, Châu Khắc Toàn, Cao Văn Diệu, Nguyễn Thị Hồng Ngọc, Nguyễn Thành Huy (2005) Điều

trị tiêu sợi huyết bằng Streptokinase trong nhồi máu cơ tim cấp. *Tạp chí Y học thực hành* 8: 15-18.

Vũ Hồng Diệp, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Quyền Đình Thi (2008) Nhân dòng, phân tích trình tự và biểu hiện gen mã hóa streptokinase từ chủng *Streptococcus pyogenes* ở *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6: 757-763.

Walter F, Siegel M, Malke H (1989) Nucleotide sequence of the streptokinase gene from a *Streptococcus pyogenes* type 1 strain. *Nucleic Acids Res* 17: 1261

Wang X, Lin X, Loy JA, Tang J, Zhang XC (1998) Crystal

structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* 281: 1662-1665.

Welfle K, Pfeil W, Misselwitz R, Welfle H, Gerlach D (1992) Conformational properties of streptokinase-differential scanning calorimetric investigations. *Int J Biol Macromol* 14: 19-22.

Wong S-L, Ye R, Nathoo S (1994) Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system. *Appl Environ Microbiol* 60: 517-523.

INVESTIGATION ON PRODUCTION OF RECOMBINANT STREPTOKINASE: PRESENT AND PROSPECT

Quyên Đình Thi*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Thrombosis, the blockage of blood vessels with clots, can lead to acute myocardial infarction and ischemic stroke, both leading causes of death. Other than surgical interventions to remove or by pass the blockage, or the generation of collateral vessels to provide a new blood supply, the only treatment available is the administration of thrombolytic agents to dissolve the blood clot including streptokinase, tPA (tissue-type plasminogen activator), urokinase, staphylokinase, nattokinase. Streptokinase (SK) (EC 3.4.99.22) is an extracellular non-enzymatic protein produced by various strains of β -haemolytic *Streptococci*. SK is a single-chain protein of molecular weight 47 kDa containing 414 amino acids, having isoelectric pH 4.7. The enzyme has maximum activity between pH 7.3 and 7.6. SK has no proteolytic activity of its own and thus activates PG to PN indirectly by firstly forming a high affinity equimolar complex with PG (SK-PG activator complex). SK is used broadly as fibrinolytic agents in hospitals. It is secreted naturally by several β -haemolytic *Streptococci*. Low production yield of SK and high risk of natural *Streptococci* are the major reasons to produce recombinant SK as an important protein drug. There were many reports about cloning, expression and characterization of SK from *S. equimilis*, *S. pyogenes*, *S. uberis* in *E. coli*, *B. subtilis*, *S. sanguis*, *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Lactococcus lactis*, *Streptomyces lividans*. Recently, in Vietnam there are also some research on thrombotic therapy using SK. Quyên Đình Thi *et al.*, has cloned, expressed and characterized a recombinant SK in *E. coli*. Other thrombotic agents including tPA and lumbrokinase have been also investigated by some other research groups in Vietnam.

Keywords: Cloning, expression, mechanism, recombinant, *Streptococcus*, streptokinase

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37568260; Fax: 84-4-38363144; E-mail: quyen@ibt.ac.vn