

DOI:10.22144/ctu.jvn.2023.135

TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN F18 DUNG HỢP PEPTIDE ĐỊNH HƯỚNG TẾ BÀO M

Mai Quốc Gia, Nguyễn Thị Phương Thảo và Trần Văn Hiếu*

Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: tvhieu@hcmus.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 09/12/2022

Ngày nhận bài sửa: 15/02/2023

Ngày duyệt đăng: 14/03/2023

Title:

Cloning and expression of antigen F18 fused with M cell targeting peptide

Từ khóa:

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), f18, IMAC, PEP, vaccine đường uống

Keywords:

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), f18, IMAC, oral vaccine, PEP

ABSTRACT

F18 fimbria plays an important role in Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) colonization and enterotoxin secretion on gut mucosa that causes post-weaning diarrhea (PWD). The vaccine offers a powerful, cost-effective, and possible approach to protect pigs against ETEC. Recently, many studies have focused on oral vaccine, which can induce mucosal immunity by targeting M cell. A body of evidence shows that protein Hsp60 is able to interact with PrPC on M cell surface. Based on Hsp60 structure model, a peptide named PEP was predicted to interact with receptor PrPC by bioinformatic calculations. To construct pET22b-pep-f18 vector, *gfp* gene was swapped for *f18* gene from pET22b-pep-gfp vector. After digestion by *Xho*I and *Bam*HI, *f18* gene and pET22b-pep-gfp vector were ligated by T4 DNA Ligase. The pET22b-pep-f18 vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3) strain, and induced by 0.5 mM IPTG. The expression of PEP-GFP protein was confirmed by SDS-PAGE Coomassie Blue staining, and Western blot probed with anti-6xHis antibody. Finally, PEP-F18 protein was purified by using immobilized-metal affinity chromatography (IMAC). The results showed that the pET22b-pep-f18 vector was successfully cloned. PEP-F18 protein was collected, and purified with high purity. This is an essential material for later immunological evaluation.

TÓM TẮT

Tiêm mao F18 đóng vai trò quan trọng giúp Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) bám vào ruột và tiết độc tố gây bệnh tiêu chảy heo con sau cai sữa (post-weaning diarrhea, PWD). Vaccine là một cách thức hữu hiệu, kinh tế và khả thi giúp phòng chống ETEC trên heo. Việc phát triển vaccine uống, tạo miễn dịch niêm mạc thông qua nhắm trúng đích tế bào M đang được quan tâm. Nhiều nghiên cứu cho thấy Hsp60 có khả năng tương tác với PrPC trên bề mặt tế bào M. Dựa trên cấu trúc của Hsp60 và tin sinh học, peptide PEP được dự đoán có khả năng tương tác với thụ thể PrPC. Vector pET22b-pep-f18 được cấu trúc bằng cách thế gene *gfp* trong vector pET22b-pep-gfp bằng gene *f18*. Sau khi xử lý với cặp enzyme cắt hạn chế *Xho*I và *Bam*HI, gene *f18* và vector pET22b-pep-gfp được nối với nhau bằng T4 DNA Ligase. Vector pET22b-pep-f18 được hóa biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3), cảm ứng biểu hiện với IPTG 0,5 mM. Sự biểu hiện của protein PEP-GFP được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie Blue và Western blot với kháng thể kháng 6xHis. Cuối cùng, protein PEP-F18 được tinh sạch bằng sắc ký ái lực ion kim loại (IMAC). Kết quả cho thấy vector pET22b-pep-f18 đã được tạo thành công. Protein PEP-F18 được thu nhận, tinh sạch với độ tinh sạch cao. Đây là nguồn nguyên liệu quan trọng cho các thử nghiệm miễn dịch sau này.

1. GIỚI THIỆU

Ngành chăn nuôi heo có vai trò quan trọng trong việc cung ứng nguồn thực phẩm dinh dưỡng ở Việt Nam. Tuy nhiên, từ khi ngành chăn nuôi heo xuất hiện, bệnh tiêu chảy sau cai sữa (post-weaning diarrhea, PWD) là một trong những bệnh thường gặp nhất ở heo con. Bệnh ảnh hưởng đến heo con hai tuần đầu sau cai sữa, gây chết đột ngột hoặc chậm phát triển ở heo còn sống. Bệnh mang tính chất cục bộ nhưng cũng có thể phát thành dịch với tỷ lệ tử vong gần 30% (Rhouma et al., 2017). Triệu chứng bệnh là heo con tiêu chảy nặng, mất nước và chết do sốc giảm thể tích hoặc do suy tim (Holland, 1990). Có nhiều nguyên nhân gây bệnh như: điều kiện môi trường, khẩu phần ăn và quan trọng nhất là tác nhân vi sinh vật (Morin et al., 1983). Trong các tác nhân vi sinh vật, Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) là vi khuẩn gây bệnh chiếm tỷ lệ cao nhất (Do et al., 2006). ETEC tiết ra các độc tố, gây ra sự tăng tiết nước, chất điện giải, hạn chế sự hấp thụ nước, dẫn đến mất nước, tiêu chảy và tử vong. Chủng *E. coli* này gồm hai yếu tố gây độc là các độc tố và nhân tố bám dính. Các độc tố được tìm thấy chủ yếu là Heat-labile enterotoxin (31,9%), Heat-stable enterotoxin A (38,1%) và Heat-stable enterotoxin B (59,1%). Nhân tố bám dính được tìm thấy phổ biến là tiêm mao F4 (45,1%), và tiêm mao F18 (33,9%) (Luppi et al., 2016). Nhân tố bám dính có vai trò rất quan trọng, việc liên kết chặt kết dính với phôi tử của nó trên thành ruột cho phép ETEC tồn tại và gây tiêu chảy (Xia et al., 2015).

Phương pháp điều trị chủ yếu là sử dụng kháng sinh. Tuy nhiên, phương pháp này tồn tại một số nhược điểm như chi phí cao, tỷ lệ tử vong cao nếu không được điều trị kịp thời hoặc không đúng cách, cũng như hiện tượng kháng kháng sinh. Các báo cáo về kháng colistin ở *E. coli* cùng với việc phát hiện cơ chế chuyên khả năng kháng colistin theo chiều ngang đòi hỏi chúng ta cần có các liệu pháp điều trị mới, hoặc xây dựng biện pháp phòng ngừa hiệu quả, đơn cử là vaccine (Kempf et al., 2013). Vaccine là chế phẩm có chứa kháng nguyên, có thể tạo miễn dịch đặc hiệu chủ động. Có hai loại vaccine chủ yếu hiện nay là vaccine tiêm với khả năng kích thích miễn dịch hệ thống và vaccine uống với ưu điểm kích thích miễn dịch niêm mạc. Các loại vaccine chống lại PWD được thương mại hóa hiện nay chỉ bảo vệ heo con khỏi ETEC/F4, hoàn toàn không thể chống lại ETEC/F18 (Fairbrother et al., 2017). Nguyên nhân của vấn đề này đến từ tính sinh miễn dịch kém, sự bất ổn định về cấu trúc của kháng

nguyên (Verdonck et al., 2007; Tiels, 2007). Do đó, F18 là kháng nguyên đang thu hút được sự quan tâm.

PWD là bệnh lây nhiễm qua đường ruột, vì vậy vaccine uống là phương pháp phòng ngừa hoàn hảo. Tuy nhiên, việc phát triển vaccine uống gặp phải rất nhiều rào cản như: điều kiện khắc nghiệt ở ruột, sự phân tán vaccine và dung nạp miễn dịch (Zhu & Berzofsky, 2013). Việc nâng cao hiệu quả của vaccine uống có thể thực hiện thông qua việc vận chuyển kháng nguyên nguyên vẹn đến tế bào M. Tế bào M (Microfold cells) là tế bào thu nhận kháng nguyên ở ruột. Với cấu trúc đặc biệt như lớp glycocalyx mỏng, ít các enzyme tiêu hóa, cấu trúc vòm, tế bào M sẽ duy trì cấu trúc, thu nhận và vận chuyển kháng nguyên vào bên trong lòng ruột. Tuy nhiên, số lượng tế bào M ở ruột là rất thấp (khoảng 5%), đòi hỏi phải nhắm trúng đích thông qua các thụ thể trên bề mặt tế bào. Hiện nay, có nhiều cặp phối tử - thụ thể được biết đến như: lectin, kháng thể đơn dòng và các protein có nguồn gốc từ vi sinh vật (Kim & Jang, 2014). Với các ưu điểm như an toàn, dễ thu nhận, giá thành thấp, protein từ vi sinh vật nhận được nhiều sự quan tâm. Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng protein có nguồn gốc vi sinh vật như Heat Shock Protein 60 (Hsp60) từ *Brucella abortus* tương tác với thụ thể Cellular Prion Protein (PrPC) trên tế bào M. Tuy nhiên, kích thước lớn của Hsp60 (60 kDa) là một trở ngại cho việc dung hợp với kháng nguyên, cũng như có khả năng ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của kháng nguyên. Với tiêu chí “nhỏ nhưng còn hoạt tính”, dựa trên cấu trúc Hsp60 và các công cụ dự đoán tính sinh học như: SWISS-MODEL, ClusPro2.0, GROMACS, peptide PEP được dự đoán là có khả năng tương tác với PrPC (dữ liệu không được trình bày).

Nhằm phát triển hệ thống vaccine uống chống lại ETEC/F18, kháng nguyên F18 dung hợp với peptide PEP được tiến hành dòng hóa và biểu hiện trên vi khuẩn *E. coli*. Sau đó, protein tái tổ hợp PEP-F18 được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực ion kim loại (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC). Kết quả của nghiên cứu này sẽ mở ra một kỉ nguyên vaccine uống mới, sử dụng dễ dàng hơn với hiệu quả cao hơn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng chủ và vector

Chủng *E. coli* DH5 α được sử dụng làm chủng để nhân bản vector. Chủng *E. coli* BL21(DE3) được sử dụng làm chủng biểu hiện protein tái tổ hợp. ETEC/F18 được dùng làm khuôn thu nhận gene *f18*. Vector pET22b-*pep-gfp* (dữ liệu không được trình

bày) được sử dụng để dòng hóa. Các chủng vi sinh vật và vector được cung cấp bởi nhóm nghiên cứu Y sinh học GMIF, Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Cấu trúc vector pET22b-pep-f18

Vector pET22b-pep-gfp được thu nhận từ *E. coli* DH5α bằng phương pháp SDS-kiểm. SDS giúp phá màng tế bào, tạo điều kiện để NaOH gây biến tính DNA bộ gen và plasmid. Sau đó, KOAc được bổ sung vào nhằm trung hòa kiềm tính, giúp plasmid hồi tính và tan vào dịch nổi, DNA bộ gen và protein tạo thành một hỗn hợp tủa với potassium sodocyl sulfate và được loại bỏ bằng ly tâm. Dịch nổi chứa plasmid sau đó tiếp tục được tinh sạch bằng cột EZ-10. Gene *f18* được thu nhận từ chủng ETEC/F18 bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 34FbamHI (GGATCCGGTCAGCAAGGGGATGTTAAATT) và 192R_{hoI} (CTCGAGCTTGTAAGTAACCGC GTAAGCC). Dựa trên quy trình dòng hóa AIO, gene *f18* và vector pET22b-pep-gfp được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt hạn chế *XhoI* và *BamHI* (Thermo Scientific) và nối với nhau bằng enzyme T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) (Mai et al., 2022). Sản phẩm nối được được hóa biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α khả nạp và được nuôi cấy trên môi trường LB (peptone: 10 g/L, cao nấm men: 5 g/L, NaCl: 10 g/L, pH 7,0) có chứa ampicillin (Biobasic) nồng độ cuối 100 µg/mL. Vừa tương tác với DNA vừa tương tác với thành phần mang điện tích âm trên lipopolysaccharide của vi khuẩn, ion Ca²⁺ trong phương pháp hóa biến nạp trở thành trung gian, giúp tăng lượng sản phẩm nối tồn tại gần tế bào. Sau đó, quy trình sốc nhiệt làm lỏng lẻo màng, giúp plasmid có thể dễ dàng xâm nhập vào tế bào *E. coli* khả nạp. Các thể biến nạp sau đó được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với một mồi trên gene (34FbamHI) và một mồi trên plasmid pET22b (T7ter–GGGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCG). Khuẩn lạc dương tính được tiến hành giải trình tự.



Hình 1. Cấu trúc phức hợp gene biểu hiện protein PEP-F18

2.3. Tạo chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-pep-f18

Sau khi xác nhận đã cấu trúc thành công, vector pET22b-pep-f18 được thu nhận bằng phương pháp SDS-kiểm và biến nạp vào chủng *E. coli*

BL21(DE3), nuôi cấy trên môi trường LB có chứa ampicillin (Biobasic) nồng độ cuối 100 µg/mL. Các khuẩn lạc được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 34FbamHI và T7ter. Khuẩn lạc dương tính được tiến hành nuôi cấy lắc trong môi trường LB có chứa ampicillin (Biobasic) nồng độ cuối 100 µg/mL, ở 37°C, trong 16 giờ. Sau đó, sinh khối được cấy chuyển với tỉ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 37°C cho đến khi độ hấp thụ (Absorbance) A_{600 nm} đạt giá trị 0,6–0,8. Tiếp theo, chất cảm ứng Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đến nồng độ cuối là 0,5 mM và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 16°C. Ở *E. Coli* BL21(DE3), gene mã hóa protein tái tổ hợp được kiểm soát bởi T7 promoter và gene mã hóa T7 RNA polymerase chịu sự kiểm soát của promoter *lacUV5*. Chất cảm ứng IPTG liên kết với Lac repressor, làm giải phóng promoter *LacUV5*, phiên mã T7 RNA polymerase. T7 RNA polymerase liên kết với T7 promoter kích hoạt phiên mã protein tái tổ hợp.

2.4. Kiểm tra biểu hiện protein PEP-F18

Sau 16 giờ cảm ứng, sinh khối vi khuẩn được thu nhận, ly giải bằng sóng siêu âm để thu protein ở các pha tổng, tan, tủa. Các pha của protein được kiểm tra biểu hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie Blue và Western blot với kháng thể kháng polyHis-HRP (Proteintech). Trong phương pháp điện di SDS-PAGE, tác động của điện trường giúp protein di chuyển từ cực âm sang cực dương. Cấu trúc lỗ trong gel acrylamide giúp protein kích thước nhỏ di chuyển nhanh hơn protein kích thước lớn. Các đối chứng bao gồm pha tổng *E. coli* BL21(DE3) cảm ứng IPTG và pha tổng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-pep-f18 không cảm ứng IPTG. Nhằm đảm bảo tính khách quan cho kết quả, lượng protein nạp vào các giếng khi điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie Blue và Western blot là như nhau. Ở phương pháp nhuộm Coomassie Blue, sau khi điện di, gel acrylamide được ủ với thuốc nhuộm Coomassie Blue trong 1 giờ. Sau đó, gel được giải nhuộm bằng dịch giải nhuộm (ethanol tuyệt đối: 100 mL, acetic acid: 100 mL, dH₂O: 800 mL). Ở phương pháp Western blot, protein được tiến hành hóa chuyển thâm sang màng nitrocellulose. Tiếp theo, màng được khóa bằng dung dịch BSA 5%. Sau nhiều bước rửa bằng PBS-T (Na₂HPO₄: 11,5 g, NaH₂PO₄: 2,96 g, NaCl: 5,84 g, Tween-20: 0,05%, dH₂O: 1 L), màng được ủ trong kháng thể kháng polyHis-HRP ở tỷ lệ 1:30.000 trong PBS-T. Cuối cùng, cơ chất TMB được bổ sung để kiểm tra sự biểu hiện của protein mục tiêu (Mahmood & Yang, 2012).

2.5. Tinh sạch protein PEP-F18

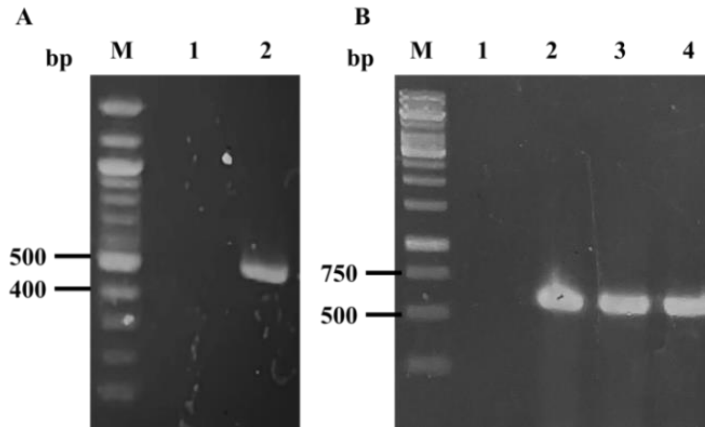
Sau cảm ứng biểu hiện, ở pha tan của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18* được thu nhận làm nguồn nguyên liệu. Protein PEP-F18 được tinh sạch bằng phương pháp tinh sạch sắc ký ái lực ion kim loại (IMAC) với cột Hitrap HP (GE Healthcare). Phương pháp sắc ký này giúp loại bỏ protein tạp và chỉ giữ lại protein mục tiêu. Thông qua đuôi dung hợp 6xHis, protein mục tiêu sẽ liên kết với ion kim loại chuyển tiếp (Co^{2+} , Ni^{2+}) và được giữ lại trong cột, những protein không có 6xHis sẽ đi ra khỏi cột. Chất cạnh tranh imidazole sẽ phá vỡ liên kết, giúp dung ly protein mục tiêu ra khỏi cột (Hengen, 1995). Sau khi được cân bằng với dịch nạp cột (phosphate: 20 mM, pH 7,4), cột được nạp dịch protein pha tan. Sau đó, cột được rửa với dịch rửa cột (phosphate: 20 mM, imidazole: 75 mM, pH 7,4). Cuối cùng, protein mục tiêu được thu nhận bằng dịch dung ly (phosphate: 20 mM, imidazole: 84

mM, pH 7,4). Kết quả tinh sạch protein được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE, nhuộm bạc. Nhuộm bạc là phương pháp có độ nhạy rất cao, dựa trên sự gắn của ion Ag^+ lên protein, sau đó Ag^+ bị khử thành Ag kim loại, giúp phát hiện protein (Chevallet et al., 2006).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cấu trúc vector pET22b-*pep-f18*

Gene *f18* được thu nhận từ chủng ETEC/F18 bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR được kiểm tra thông qua điện di trên gel agarose 1,5%. Kết quả điện di cho thấy đã thu nhận được duy nhất một đoạn gene có kích thước 450 bp, phù hợp với kích thước gene *f18* (Hình 2A, giếng 2). Bên cạnh đó, đối chứng âm với đầy đủ tất cả các thành phần ngoại trừ khuôn thì không xuất hiện bất kì vạch DNA nào, cho thấy phản ứng PCR không bị ngoại nhiễm (Hình 2A, giếng 1).



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR thu nhận gene *f18* (A) và sàng lọc thể biến nạp (B)

A. M: thang DNA 1 kb, 1: đối chứng âm, 2: sản phẩm PCR thu gene;

B. M: thang DNA 1 kb, 1: đối chứng âm, 2-4: các khuẩn lạc sàng lọc

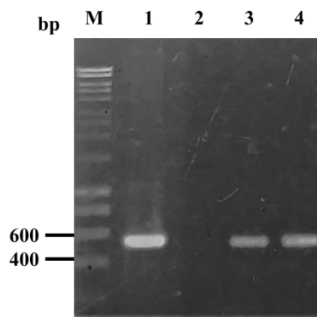
Sau khi được xử lý tạo các đầu dính bằng hai enzyme cắt hạn chế là *Bam*HI và *Xho*I, gene *f18* và plamid (đã cắt loại bỏ gene *gfp*) được nối lại với nhau thông qua T4 DNA Ligase và biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 α . Trên plasmid pET22b có mang gene kháng kháng sinh ampicillin nên các thể biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường có chứa ampicillin. Các khuẩn lạc này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 34FBamHI và T7ter. Sản phẩm PCR của khuẩn lạc chứa vector pET22b-*pep-f18* có kích thước 550 bp. Điện di trên gel agarose cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển có sự xuất hiện vạch DNA nằm giữa vạch 500 bp và 750 bp của thang, phù hợp với kích thước dự đoán (Hình 2B, giếng 2-4). Hơn nữa, đối chứng âm bổ sung plasmid

pET22b không xuất hiện vạch (Hình 2B, giếng 1). Kết quả giải trình tự cho thấy sự tương đồng 100%, đồng khung dịch mã với trình tự thiết kế (Kết quả không được trình bày). Tóm lại, vector pET22b-*pep-f18* đã được cấu trúc thành công.

3.2. Tạo chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18*

Sau khi xác nhận cấu trúc thành thông, vector pET22b-*pep-f18* được hóa biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) khả nạp và nuôi cấy trên môi trường có chứa ampicillin. Chỉ những thể biến nạp chứa vector mới có khả năng tồn tại và phát triển trên môi trường chứa kháng sinh. Các khuẩn lạc được sàng lọc bằng PCR với cặp mồi 34FBamHI và

T7ter. Kết quả cho thấy, chứng dương bổ sung vector pET22b-*pep-f18* xuất hiện vạch sáng giữa vạch 400 bp và 600 bp của thang (Hình 3, giếng 1), đối chứng âm bổ sung plasmid pET22b không xuất hiện vạch (Hình 3, giếng 2). Các khuẩn lạc dự tuyển dương tính có sự xuất hiện vạch DNA cũng nằm giữa vạch 400 bp và 600 bp của thang (Hình 3, giếng 3, 4), bằng với kích thước vạch chứng dương. Kết quả trên cho thấy chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18* đã được tạo thành công.

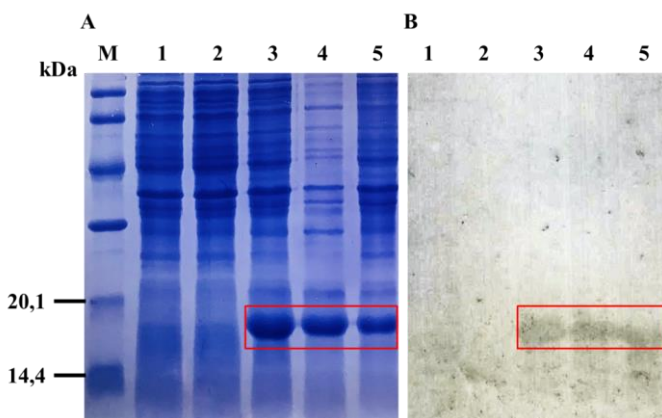


Hình 3. Sàng lọc thể biến nạp bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc

M: thang DNA 1 kb, 1: chứng dương, 2: đối chứng âm, 3-4: các khuẩn lạc sàng lọc

3.3. Kiểm tra biểu hiện protein PEP-F18

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18* được nuôi cấy lắc ở 37°C, trong 16 giờ. Sau đó, sinh khối được cấy chuyển theo tỷ lệ 1:20 và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 37°C. Sau khi độ hấp thụ $A_{600\text{ nm}}$ đạt giá trị 0,6–0,8, tế bào vi khuẩn được cảm ứng biểu hiện với IPTG 0,5 mM và nuôi cấy lắc ở 16°C trong 16 giờ. Protein được phân thành các pha tổng, tan, tủa và phân tích bằng điện di SDS-PAGE. Kết quả cho nhuộm Coomassie Blue cho thấy, có sự biểu hiện vượt mức của protein có kích thước khoảng 18 kDa (Hình 4A, giếng 3), phù hợp với kích thước dự đoán. Đây có thể là protein tái tổ hợp PEP-F18. Vạch protein vượt mức này có mặt ở cả pha tủa, lẫn pha tan với tỷ lệ gần như bằng nhau (Hình 4A, giếng 4-5). Không có sự xuất hiện vạch protein vượt mức ở đối chứng âm *E. coli* BL21(DE3) có cảm ứng IPTG (Hình 4A, giếng 1). Ngoài ra, vạch protein vượt mức cũng không xuất hiện ở đối chứng âm *E. coli* BL21(DE3) có cảm ứng IPTG (Hình 4A, giếng 1) và đối chứng âm *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18* không cảm ứng IPTG (Hình 4A, giếng 2).



Hình 4. Kiểm tra, xác nhận biểu hiện protein PEP-F18 bằng SDS-PAGE, nhuộm Coomassie Blue (A), và Western blot (B)

M: thang protein, 1: *E. coli* BL21(DE3) (+IPTG) pha tổng,

2: *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18* (-IPTG) pha tổng,

3-5: *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18* (+IPTG): 3, pha tổng, 4, pha tủa, 5, pha tan. Protein biểu hiện vượt mức được viền khung đỏ.

Với thiết kế dung hợp đuôi 6xHis ở vùng đầu C, sự biểu hiện protein PEP-F18 có thể được xác nhận thông qua sự hiện diện của đuôi 6xHis này. Điều này có được thực hiện bằng kỹ thuật Western blot với

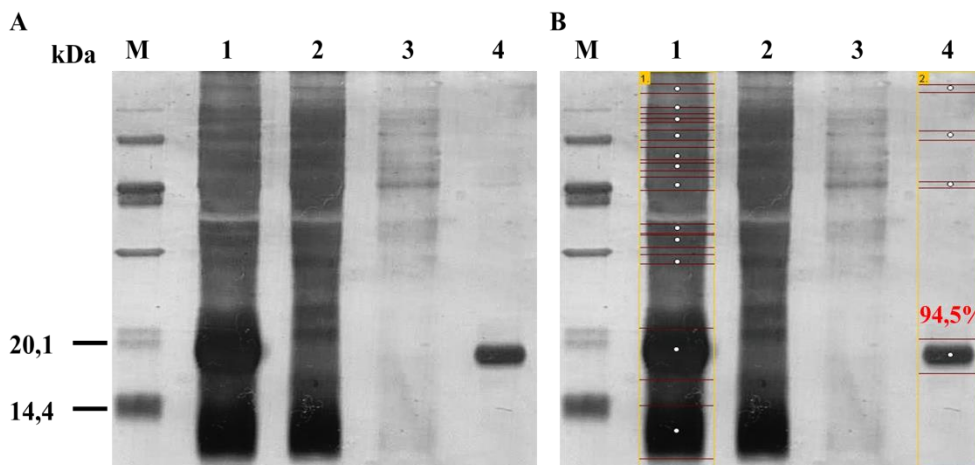
kháng thể kháng polyHis-HRP. Tín hiệu trên màng nitrocellulose cho thấy, có vạch tín hiệu tương ứng với vạch protein vượt mức ở kết quả nhuộm Coomassie Blue. Từ các kết quả trên, vạch protein

vượt mức ở kích thước khoảng 18 kDa có thể là protein tái tổ hợp PEP-F18.

3.4. Tinh sạch protein PEP-F18

Protein PEP-F18 được thiết kế dung hợp với đuôi 6xHis, có ái lực cao với Ni²⁺, từ đó hỗ trợ việc

tinh sạch protein bằng IMAC. Khi pha tan được đưa vào cột, protein mục tiêu sẽ được giữ lại, các protein khác đi ra khỏi cột và nằm trong dịch protein qua cột. Sau khi các protein tương tác yếu được rửa ra khỏi cột, protein PEP-F18 được dung ly và thu nhận bằng dung dịch có nồng độ imidazole cao.



Hình 5A. Tinh sạch protein PEP-F18 (A) và phân tích độ tinh sạch (B)

M: thang protein, 1: dịch protein pha tan, 2: dịch protein qua cột, 3: dịch rửa cột, 4: dịch dung ly

Kết quả cho thấy, vạch protein PEP-F18 khoảng 18 kDa hiện diện ở dịch protein pha tan (Hình 5A, giếng 1) và không xuất hiện ở dịch protein qua cột (Hình 5A, giếng 2), cho thấy protein này bám cột tốt. Dịch rửa cột với nồng độ 75 mM imidazole đã loại bỏ một số protein tạp và không rửa trôi protein mục tiêu (Hình 5A, giếng 3). Dịch dung ly protein có sự xuất hiện một vạch lớn protein mục tiêu và hầu như không có bất kì vạch protein nào khác (Hình 5A, giếng 4). Như vậy, sau quá trình tinh sạch, nhiều protein tạp đã loại bỏ và protein PEP-F18 được thu nhận thành công. Dựa trên các phân tích bằng phần mềm Gel Analyzer, độ tinh sạch của PEP-F18 trong dịch dung ly có thể đạt trên 90% (Hình 5B).

4. KẾT LUẬN

Vector tái tổ hợp pET22b-*pep-f18* mã hóa cho protein PEP-F18 đã được cấu trúc thành công, trong đó peptide PEP có nguồn gốc từ Hsp60 và F18 là kháng nguyên mục tiêu từ ETEC. Xây dựng thành công chủng biểu hiện *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pep-f18* mang vector tái tổ hợp pET22b-*pep-f18*. Protein tái tổ hợp PEP-F18 đã biểu hiện dạng tan với nồng độ IPTG 0,5 mM, ở 16°C, trong 16 giờ. Cuối cùng, protein này được thu nhận và tinh sạch với độ tinh sạch cao, đủ điều kiện để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols*, 1(4), 1852–1858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
- Do, T. N., Cu, P. H., Nguyen, H. X., Au, T. X., Vu, Q. N., Driesen, S. J., Townsend, K. M., Chin, J. J., & Trott, D. J. (2006). Pathotypes and serogroups of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pre-weaning pigs in north Vietnam. *Journal of medical microbiology*, 55(1), 93-99. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46247-0>
- Fairbrother, J. M., Nadeau, É., Bélanger, L., Tremblay, C. L., Tremblay, D., Brunelle, M., Wolf, R., Hellmann, K., & Hidalgo, Á. (2017). Immunogenicity and protective efficacy of a single-dose live non-pathogenic *Escherichia coli* oral vaccine against F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in pigs. *Vaccine*, 35(2), 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.045>
- Hengen, P. (1995). Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(7), 285–286. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)89045-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)89045-3)

- Holland, R. E. (1990). Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin Microbiol Rev*, 3(4), 345-375. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.4.345>
- Kempf, I., Fleury, M. A., Drider, D., Bruneau, M., Sanders, P., Chauvin, C., Madec, J. Y., & Jouy, E. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(5), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012>
- Kim, S. H., & Jang, Y. S. (2014). Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines. *Experimental & Molecular Medicine*, 46(3), e85. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.165>
- Luppi, A., Gibellini, M., Gin, T., Vangroenweghe, F., Vandenbroucke, V., Bauerfeind, R., Bonilauri, P., Labarque, G., & Hidalgo, Á. (2016). Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Management*, 2, 20. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0039-9>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mai, Q-G., Vo-Nguyen, H-V., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2022). All-in-One Molecular Cloning as a New Gene Manipulation Method. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 9(1), 511-515. <https://doi.org/10.30491/jabr.2021.289097.1395>
- Morin, M., Turgeon, D., Jollette, J., Robinson, Y., Phaneuf, J. B., Sauvageau, R., Beaugard, M., Teuscher, E., Higgins, R., & Larivière, S. (1983). Neonatal diarrhea of pigs in Quebec: infectious causes of significant outbreaks. *Canadian journal of comparative medicine : Revue Canadienne de Medecine Comparee*, 47(1), 11–17.
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., & Letellier, A. (2017). Post-weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand*, 59(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7>
- Tiels, P., Verdonck, F., Coddens, A., Ameloot, P., Goddeeris, B., & Cox, E. (2007). Monoclonal antibodies reveal a weak interaction between the F18 fimbrial adhesin FedF and the major subunit FedA. *Veterinary Microbiology*, 119(2-4), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.08.032>
- Verdonck, F., Tiels, P., van Gog, K., Goddeeris, B. M., Lycke, N., Clements, J., & Cox, E. (2007). Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ *Escherichia coli* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120(3-4), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.06.018>
- Xia, P., Zou, Y., Wang, Y., Song, Y., Liu, W., Francis, D. H., & Zhu, G. (2015). Receptor for the F4 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4953–4959. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6643-9>
- Zhu, Q., & Berzofsky, J. A. (2013). Oral vaccines: directed safe passage to the front line of defense. *Gut Microbes*, 4(3), 246–252. <https://doi.org/10.4161/gmic.24197>