

BIỂU HIỆN LƯỢNG LỚN PROTEIN SEFA CỦA *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS TRONG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* BL21

Đỗ Thị Huyền¹, Lê Quỳnh Giang¹, Trần Ngọc Tân¹, Tô Long Thành², Trương Nam Hải¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương

TÓM TẮT

Kháng nguyên fimbriae SEF14 của *S. Enteritidis* đóng vai trò quan trọng trong việc kích thích hệ thống miễn dịch sản xuất lympho T và miễn dịch bảo hộ. Gen *sefA* mã hóa cho protein SefA- protein cấu thành nên SEF14, không chứa trình tự mã hóa peptide tín hiệu đã được nhân lên bằng PCR và tách dòng trong vector pCR2.1. Gen được tách dòng có 432 nucleotide, tương đồng 99,3% với gen *sefA* của chủng *S. Enteritidis* PT4 - chủng gây ra phần lớn các vụ ngộ độc thực phẩm ở người. Sau đó, gen được đưa vào vector biểu hiện pET32a(+) và biến nạp vào *E. coli* BL21 để biểu hiện gen. Trong chủng biểu hiện, SefA được tạo ra với lượng lớn dưới dạng dung hợp, chứa peptide Trx, S-tag ở đầu N, hexahistidine ở đầu C và được gọi tắt là TrxSef. Protein này được biểu hiện tốt nhất ở 30°C (hơn 500 mg/l môi trường), nhưng một nửa số protein tồn tại dưới dạng thể vùi. Sử dụng nhiệt độ thấp trong quá trình biểu hiện gen đã làm giảm lượng protein không tan tạo ra. Ở 22, 25 và 30°C, hàm lượng TrxSef dạng tan được tổng hợp là tương đương nhau (trên 200 mg/l môi trường). Lượng TrxSef không tan tăng lên là do tốc độ biểu hiện tăng. Tuy nhiên, ở 25°C, chủng tái tổ hợp vẫn có thể sinh trưởng được và lượng TrxSef tan cũng đạt được tương đối, chiếm 76% TrxSef tổng số. Nồng độ IPTG không ảnh hưởng tới sự sinh trưởng của tế bào nhưng ảnh hưởng không nhiều lắm đến sinh tổng hợp TrxSef. Lượng lớn TrxSef được sinh ra khi tế bào được cảm ứng với 300 μ M IPTG. Ở quy mô bình tam giác, mức độ biểu hiện TrxSef phụ thuộc vào pha sinh trưởng của tế bào. Trong suốt pha log (từ 0 đến 3 h sau cảm ứng), TrxSef được tạo ra chiếm khoảng 60 mg/l g tế bào khô, nhưng khi sự sinh trưởng của tế bào đạt đến pha cân bằng (4 h sau khi cảm ứng), TrxSef được tổng hợp mạnh, tốc độ tăng gấp đôi so với tế bào ở pha log và duy trì tốc độ này trong khoảng 1 h. Vì vậy, lượng TrxSef thu được nhiều nhất là sau 5 h nuôi cấy cảm ứng. Protein tái tổ hợp rất ổn định không bị protease của tế bào chủ phân cắt. Sau khi tối ưu, lượng TrxSef pha tan thu được khoảng hơn 200 mg/ 1 l môi trường, tương đương với 130 mg/1 g tế bào.

Từ khóa: *E. coli* BL21, pET32a(+), protein tái tổ hợp, *sefA*, *S. Enteritidis*

MỞ ĐẦU

Trong hai thập kỷ qua, *Salmonella enterica* type huyết thanh Enteritidis đã gia tăng đột biến trên toàn thế giới và trở thành nguyên nhân đứng đầu trong các vụ ngộ độc thực phẩm, ảnh hưởng lớn tới sức khỏe cộng đồng. Theo thống kê dịch tễ học, ở nước ta các ca ngộ độc do thức ăn nhiễm khuẩn *Salmonella* xảy ra lẻ tẻ quanh năm và tăng mạnh từ tháng 6 đến tháng 9 hàng năm. Đây là lúc thời tiết nóng bức, vi khuẩn sinh sôi nảy nở rất nhanh nên thực phẩm rất dễ nhiễm khuẩn.

Nguyên nhân chính dẫn đến nhiễm khuẩn *Salmonella* là do con người ăn phải thức ăn được chế biến từ thịt, trứng gia cầm chưa được nấu chín đặc biệt là kem. Vì vậy, việc tiêm chủng phòng *Salmonella* cho gia cầm là cần thiết để giảm thiểu

nguy cơ lây bệnh sang người và là một biện pháp để ngăn chặn sự lan tràn *Salmonella* trong môi trường sống. Hơn nữa, trong những năm gần đây, nguồn lợi thu từ xuất khẩu thực phẩm đang bị giảm do thực phẩm bị nhiễm *Salmonella*. Vì vậy, việc tiêm phòng *Salmonella* cho gia cầm cũng là một biện pháp để bảo vệ môi trường, tăng thu nhập cho người dân thông qua xuất khẩu thịt, trứng gia cầm.

Gần đây, có nhiều nghiên cứu sản xuất vaccine theo con đường tái tổ hợp gen. Theo con đường này, vaccine được điều chế là protein có khả năng sinh miễn dịch bảo hộ được sản xuất từ vi khuẩn, nấm men, côn trùng, ... và gần đây là thực vật. Vaccine này đã được WHO công nhận là có độ an toàn cao. Để tạo vaccine tái tổ hợp, các nghiên cứu đi đầu là phải tìm được ra kháng nguyên có khả năng gây miễn dịch phòng hộ. *S. Enteritidis* có nhiều kháng

nguyên, trong đó các kháng nguyên chính phải kể đến là kháng nguyên thân (kháng nguyên O), kháng nguyên roi (Kháng nguyên H:gm) và kháng nguyên fimbriae (hay còn gọi là kháng nguyên tua riềm, kháng nguyên lông). Trong số kháng nguyên fimbriae được biết, kháng nguyên SEF14 (được tạo thành từ protein SefA), Sef17 (tạo thành từ protein AgfA), Sef18 (tạo thành từ protein SefD) và Sef21 (tạo từ FimA) là kháng nguyên được nghiên cứu nhiều (Ugarski *et al.*, 2001; Kuczkowski *et al.*, 2004). Trong số các kháng nguyên fimbriae kể trên, kháng nguyên SEF14 được chứng minh là có khả năng sinh đáp ứng miễn dịch rất mạnh ở gia cầm (Thiagarajan *et al.*, 1996; Kuczkowski *et al.*, 2004). Đặc biệt, khi gây miễn dịch cho chuột với kháng thể kháng SEF14 tách chiết từ trứng, kháng thể này đã bảo vệ chuột chống lại *S. Enteritidis* (Peralta *et al.*, 1994). Các đáp ứng miễn dịch sinh ra do SEF14 là tương đương với miễn dịch khi động vật tiêm vaccine được điều chế từ toàn bộ vi khuẩn (Kuczkowski *et al.*, 2004). Vì vậy, kháng nguyên này có thể được sử dụng để nghiên cứu tạo vaccine cho gia cầm.

Mặc dù trình tự mã hóa cho SefA đã được xác định từ năm 1993, nhưng việc nghiên cứu sử dụng và thử nghiệm kháng nguyên này vẫn chưa được triển khai. Nguyên nhân một phần là do SefA khó được tổng hợp với lượng lớn và tinh sạch. Hơn nữa, sự biểu hiện của kháng nguyên ở chủng *S. Enteritidis* phụ thuộc nhiều vào thành phần môi trường (United States Patent No 6495334). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc biểu hiện một lượng lớn kháng nguyên SefA dùng để phối hợp tạo vaccine dưới đơn vị tái tổ hợp phòng *S. Enteritidis* cho gia cầm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng *E. coli* DH5 α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169* (ϕ 80 *lacZM15*)] được sử dụng để chọn dòng và nhân dòng gen.

Chủng *E. coli* BL21 [*F-omp hsd SB* (*rBmB*) *gel dcm* (*DE3*) *plysS* (*Caml*)] được sử dụng làm tế bào chủ cho biểu hiện gen.

Plasmid pCR2.1 do hãng Invitrogen sản xuất được sử dụng làm vector tách dòng trong tế bào *E. coli* DH5 α .

Plasmid pET32a(+) do hãng Novagen sản xuất được sử dụng làm vector biểu hiện.

Chủng *S. Enteritidis* ATCC13076 là chủng mang gen *sefA* do Viện Thú y cung cấp.

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện

Gen *sefA* được nhân lên bằng phương pháp PCR sử dụng hệ gen *S. Enteritidis* làm khuôn (Đỗ Thị Huyền *et al.*, 2003) và sử dụng cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự gen *sefA* mã số X98516 trên ngân hàng gen quốc tế. Trình tự của mồi như sau:

Sef14f: 5'- ACCATGGATGCTGGCTTTGTTGGT AACAAA -3';

Sef14r: 5'- ACTCGAGGTTTTGATACTGCTGAA CGTA -3'.

Gen *sefA* không chứa trình tự mã hóa peptide tín hiệu có mang vị trí nhận biết của *Nco*I ở đầu 5' và *Xho*I ở đầu 3' được khuếch đại bằng PCR. Mỗi mẫu PCR được tiến hành với tổng thể tích 25 μ l chứa 1x dung dịch đệm chạy PCR, 1 pmol mồi mỗi loại, 0,2 mM dNTP mỗi loại, 1 mM MgCl₂, 1 U Taq (Perkin-Elmer, USA) và khoảng 200 ng DNA khuôn. Phản ứng được bắt đầu bằng biến tính sợi khuôn ở 94°C trong 3 phút sau đó được tiến hành tiếp với 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm: biến tính sợi khuôn ở 94°C trong 30 giây, điều kiện để mồi bắt cặp với sợi khuôn ở 51°C trong 30 giây, mồi được kéo dài để sinh tổng hợp gen ở 72°C trong 30 giây. Sau khi kết thúc các chu kỳ, các sợi tổng hợp chưa hoàn thiện sẽ được kéo dài tiếp tục ở 72°C trong khoảng 7 phút.

Gen *sef14* được nhân lên bằng PCR và tách dòng trong vector pCR2.1. Gen trong vector pCR2.1 đã được kiểm tra bằng các enzyme hạn chế và giải trình tự gen. Vector pCR2.1 mang gen *sefA* được đặt tên là pCRsefA. Sau đó, gen *sefA* được thu nhận lại bằng cách cắt vector pCRsefA với hai enzyme hạn chế *Nco*I và *Xho*I và được nối vào vector biểu hiện pET32a(+) cũng được cắt bởi hai enzyme hạn chế trên. Trong vector pET32a(+), gen được dung hợp với gen *trx* mã hóa thioredoxin và trình tự S-tag và his-tag ở phần đầu 5' và dung hợp với gen mã hóa cho 6 histidine ở đầu 3'. Vì vậy protein SefA được tạo ra là dạng dung hợp, được tinh chế dễ dàng bằng cột sắc ký ái lực với histidine và được định lượng bằng bộ kit định lượng thông qua S-tag. Sau khi kiểm tra gen bằng một số enzyme hạn chế, plasmid

pET32a(+) mang đúng gen được đặt tên là pET32Sef và được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để biểu hiện gen.

Biểu hiện gen *sefA* trong tế bào *E. coli* BL21

Chủng tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường LB có chứa 100 µg/ml ampicillin (gọi tắt là LBA) đến khi OD₆₀₀ nm đạt khoảng 0,4 - 1 thì được để vào nhiệt độ lạnh (4°C) qua đêm. Sau đó tế bào được cảm ứng với 1 mM IPTG và nuôi cấy ở 28°C trong khoảng 5 h. Tế bào được thu lại bằng ly tâm và hòa vào nước. Protein tổng số được chuẩn bị bằng cách bổ sung thêm đệm xử lý mẫu có chứa β-mecarptoethanol, SDS trực tiếp vào mẫu đã được hòa trong nước. Protein pha tan được chuẩn bị bằng sốc nhiệt và siêu âm.

Phân tích protein

Hàm lượng protein được xác định sơ bộ bằng máy VersaDoc Imaging system Model 4000 (Bio-Rad, USA) dựa trên hàm lượng protein chuẩn và được phân tích bằng phần mềm Quantity One, Version 4.6.1 (Bio-Rad, USA). Hàm lượng chính xác được xác định bằng bộ kit S.tag Rapid Assay Kit (Novagen, USA).

Các phương pháp về sinh học phân tử

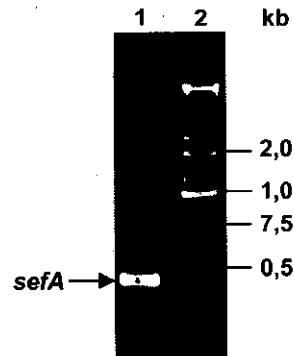
Phương pháp cắt, nối các đoạn gen, biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*, ... được tiến hành theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện gen

Dựa trên DNA khuôn là hệ gen *S. Enteritidis* và cặp môi đặc hiệu, gen *sefA* đã được khuếch đại thành công bằng phương pháp PCR. Gen *sefA* được nhân lên có kích thước khoảng 0,4 kb đúng kích thước của gen *sefA* trong ngân hàng gen quốc tế (Hình 1). Kết quả giải trình tự gen *sefA* trong vector tách dòng pCR2.1 cho thấy, gen *sefA* có chứa 432 nucleotide mã hóa cho protein gồm 144 amino acid với phân tử lượng khoảng 14,5 kDa. Trình tự gen *sefA* tương đồng 100% so với gen *sefA* mã số X98516 trong ngân hàng gen quốc tế. Trình tự amino acid của protein suy từ gen tương đồng 100% với kháng nguyên fimbriae (mã số AA71892) của *S. Enteritidis* 27655-3b (Trường Đại học Nông nghiệp, Uppsala, Thụy Điển), SefA của *S.*

Enteritidis (mã số ABQ44510), tương đồng 99% so với fimbriae (mã số P12061) của *S. Enteritidis*, tương đồng 96% so với kháng nguyên fimbriae (mã số YP_153345, AAV80031.1) của *S. Paratyphi A* ATCC 9150, và tương đồng khoảng 45% so với protein gây kết dính CS22 ở *E. coli*. Điều đáng chú ý ở đây là trình tự amino acid của SefA trong nghiên cứu này tương đồng 100% so với SefA được dùng sản xuất kháng thể đơn dòng sử dụng để phát hiện *S. Enteritidis*, *S. Dublin* (United states patent năm 1996, số 5510241) và cũng tương đồng 99,3% (tương đồng 143/144 amino acid) so với SefA của *S. Enteritidis* PT4-chủng gây ra phần lớn các vụ ngộ độc thực phẩm hàng năm ở Mỹ (United states patent, số 6495336 B1). Như vậy, kháng nguyên này khá bảo thủ ở chủng *S. Enteritidis*. Sau khi chuyển gen từ vector tách dòng sang vector biểu hiện, gen được kiểm tra lại bằng một số enzyme hạn chế (kết quả không thông báo). Dòng plasmid pET32a(+) mang đúng gen được đặt tên là pET32sef. Các plasmid này được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để biểu hiện gen.

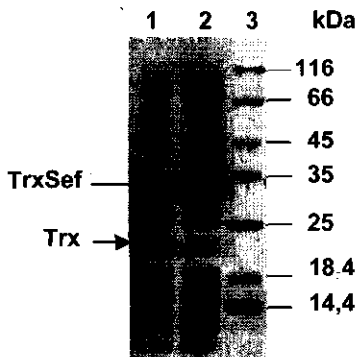


Hình 1. Phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%. 1: Sản phẩm PCR khuếch đại gen *sefA*; 2: Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas).

Biểu hiện gen *sefA*

Quy trình nuôi cấy biểu hiện gen được tiến hành theo mô tả ở phần vật liệu và phương pháp. Theo tính toán lý thuyết, SefA được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp với Trx (gọi tắt là TrxSef) và protein tạo ra sẽ có khối lượng phân tử khoảng 32,3 kDa. Kết quả (Hình 2) cho thấy, dòng tế bào tái tổ hợp mang gen *sefA* tổng hợp một protein ngoại lai có kích thước đúng như tính toán lý thuyết. Đáng chú ý là TrxSef được tạo ra với một lượng khá lớn, chiếm trên 50% protein tổng số của tế bào.

Trước đây, chúng tôi cũng đã tiến hành đưa gen *sefA* vào vector pET22b(+) và tiến hành biểu hiện gen trong chủng *E. coli* BL21. Khi sử dụng hệ vector này, SefA được biểu hiện dưới dạng riêng rẽ, không được dung hợp với protein khác. Tuy nhiên, gen *sefA* đã không được biểu hiện thành công trong pET22b(+) (kết quả không thông báo). Đối với chủng tái tổ hợp này, sau khi nuôi cấy cảm ứng, tế bào vẫn sinh trưởng. Điều đó chứng tỏ SefA không gây độc tế bào. Khi kiểm tra protein trên gel acrylamide, hầu như không thấy xuất hiện băng protein khác so với mẫu đối chứng âm được tiến hành song song. Như vậy, có thể khi biểu hiện dưới dạng riêng rẽ, protein tái tổ hợp dễ bị các protease của vi khuẩn chủ nhận biết và cắt bỏ. Hiện nay, chưa có tài liệu nghiên cứu nào chỉ ra các vị trí nhận biết của protease sinh ra từ *E. coli* trên SefA nhưng một số tài liệu đã biểu hiện gen thành công dưới dạng dung hợp. Nhóm nghiên cứu thuộc Đại học Nông nghiệp Wrocław, Ba Lan đã biểu hiện thành công SefA trong tế bào *E. coli* dưới dạng dung hợp với một số đoạn peptide nhỏ trong vector pTrcHis2b (Invitrogen) (Kuczokowski *et al.*, 2004; Kisiela *et al.*, 2003). Tuy nhiên, protein được biểu hiện với lượng nhỏ và được tiết ra khoang chu chất. Protein dung hợp tạo ra có khả năng sinh đáp ứng miễn dịch tốt ở gà.



Hình 2. Protein tổng số từ các chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21. 1: *E. coli* BL21 mang vector pET32a(+); 2: *E. coli* BL21 mang vector pET32sef; 3: Thang Protein chuẩn (Fermentas).

Tối ưu biểu hiện gen *sefA* trong *E. coli*

Ảnh hưởng của nhiệt độ tới sự biểu hiện của *sefA*

Nhiệt độ thường có ảnh hưởng rất lớn tới sinh tổng hợp và hình thành cấu trúc bậc ba của protein tái tổ hợp. 37°C là nhiệt độ tối ưu cho sự sinh trưởng của chủng chủ *E. coli* nhưng ở nhiệt độ này, protease

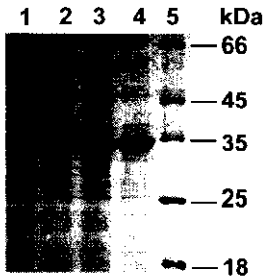
được sinh ra nhiều và hoạt tính rất mạnh, xuất phát từ đòi hỏi nguồn dinh dưỡng cho sự sinh trưởng tối đa. Vì vậy, để tránh bị thủy phân bởi protease, biện pháp tối ưu nhất là kiểm tra khả năng biểu hiện các protein nhạy cảm với protease ở nhiệt độ thấp. Bên cạnh đó có thể bổ sung thêm các chất ức chế hoạt tính protease trong quá trình nuôi cấy sinh tổng hợp protein ngoại lai. Đối với nhiều loại protein khi được biểu hiện quá mạnh ở trong tế bào, các protein giúp hình thành cấu trúc đúng của protein tái tổ hợp không đáp ứng đủ, dẫn đến protein tạo ra không có hoạt tính sinh học do hình thành cấu trúc bậc ba sai lệch. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã tiến hành biểu hiện SefA ở 22, 25, 30 và 37°C trong điều kiện cảm ứng với 1 mM IPTG. Kết quả nhiệt độ quá cao hoặc quá thấp đều ảnh hưởng tới khả năng biểu hiện protein. Ở 30°C, TrxSef được tạo ra nhiều nhất đạt 525 mg/l và chiếm 47,3% protein tổng số. Khi biểu hiện gen ở 37°C lượng protein tái tổ hợp giảm chỉ còn 276 mg/l và ở 22, 25°C, TrxSef14 đạt khoảng 280; 338 mg/l và tương ứng khoảng 16; 27% protein tổng số (Hình 3). TrxSef được biểu hiện với hàm lượng khá lớn ở 30°C. Mức độ biểu hiện quá cao này có thể ảnh hưởng đến chất lượng protein tái tổ hợp do cấu trúc protein không được hình thành đúng. Theo lý thuyết, protein được biểu hiện dưới dạng không tan thường có cấu trúc sai lệch. Để thu được protein pha tan và không tan, chúng tôi đã phá tế bào bằng sốc nhiệt và siêu âm. Dịch nổi thu được dùng để phân tích protein tan và phần cặn được hòa ra với lượng nước tương ứng để kiểm tra protein không tan. Kết quả (Hình 4) cho thấy, khi nuôi cấy chủng để sinh tổng hợp TrxSef ở nhiệt độ càng cao, protein tạo ra càng lớn thì lượng protein không tan càng nhiều. Điển hình ở 22°C, lượng TrxSef dạng tan đạt xấp xỉ 84% trong khi đó ở 25 và 30°C, lượng TrxSef tan chỉ còn tương ứng là 76 và 50 và ở nhiệt độ 37°C, lượng TrxSef tan chỉ còn 6%. Như vậy, nhiệt độ ảnh hưởng rất lớn đến sinh tổng hợp TrxSef. Để thu được lượng lớn TrxSef cho các nghiên cứu tiếp theo, chủng *E. coli* tái tổ hợp mang gen *sefA* nên được nuôi cấy trong điều kiện có chất cảm ứng ở 25°C. Vì TrxSef không tan không có ý nghĩa để nghiên cứu nên từ các thí nghiệm tối ưu biểu hiện sau, chúng tôi chỉ quan tâm đến việc tối ưu để thu được lượng protein TrxSef dạng tan cao nhất.

Ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên khả năng sinh tổng hợp TrxSef

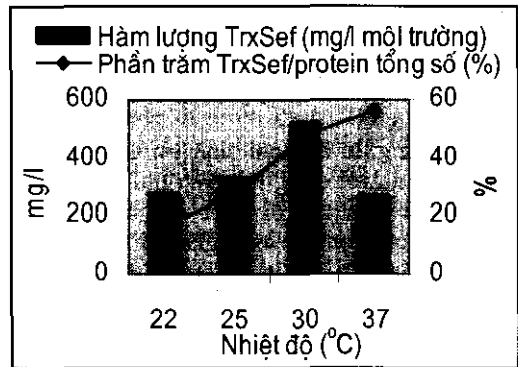
IPTG là chất cảm đắt tiền và ở nồng độ cao có thể gây độc tế bào. Đối với TrxSef, IPTG không bị

ảnh hưởng quá lớn tới khả năng sinh tổng hợp protein. Qua kiểm tra sơ bộ, lượng protein tái tổ hợp được tổng hợp khi chủng được cảm ứng với 400, 600, 800, 1000, 2000 μM gần như tương đương nhau (kết quả không được trình bày). Vì thế, để kiểm tra kỹ hơn, chúng tôi đã tiến hành cảm ứng chủng tái tổ hợp ở các nồng độ IPTG thấp hơn và protein TrxSef dạng tan được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide và định lượng sơ bộ bằng chương trình Quantitative one. Kết quả (Hình 5) cho thấy, IPTG không ảnh hưởng tới tốc độ sinh trưởng của tế bào. Sinh khối tế bào sau 5 h nuôi cấy cảm ứng là gần như nhau ở nồng độ IPTG khoảng trên 300 μM

và lượng tế bào không thay đổi nhiều khi tăng lượng IPTG. Điều đáng ngạc nhiên là khi chủng được cảm ứng bởi IPTG, tế bào sinh trưởng tốt hơn và sinh khối tế bào thu được nhiều hơn. Tuy nhiên, nếu tính hàm lượng tổng số của TrxSef trên một lít môi trường nuôi cấy thì không có sự chênh nhau nhiều sau khi tế bào được cảm ứng ở nồng độ IPTG lớn hơn 300 μM (nếu coi lượng TrxSef tạo ra khi được cảm ứng với 700 μM IPTG là 100%). Vì vậy, để giảm giá thành IPTG mà vẫn thu được một lượng tương đối lớn TrxSef cho các nghiên cứu tiếp theo, nồng độ IPTG thích hợp được lựa chọn cho cảm ứng chủng *E. coli* BL21 mang gen *sefA* là 300 μM .

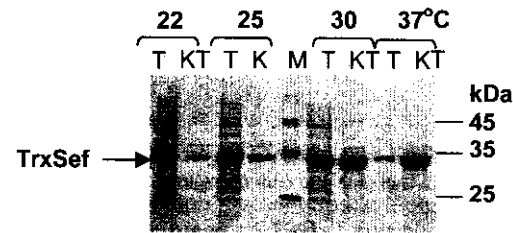


A

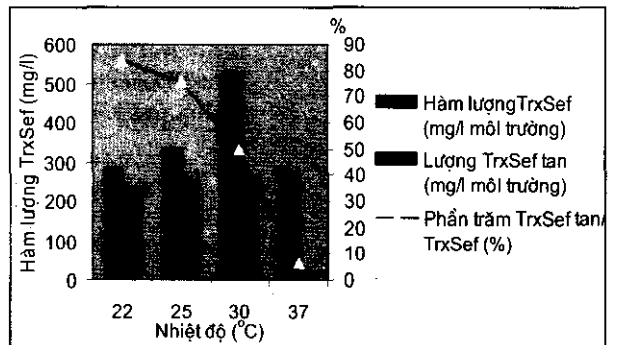


B

Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng biểu hiện TrxSef. **A:** Protein tổng số tách chiết từ chủng *E. coli* BL21 mang pET32sef được nuôi cấy trong điều kiện cảm ứng ở các nhiệt độ khác nhau: 1: 22°C; 2: 25°C; 3: 30°C, 4: 37°C. 5: Protein chuẩn. **B:** Hàm lượng TrxSef được sinh ra khi nuôi cấy chủng ở 22, 25, 30, 37°C được phân tích bằng phần mềm Quantity One.

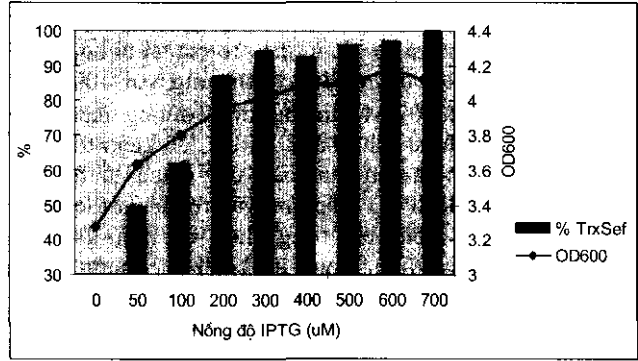
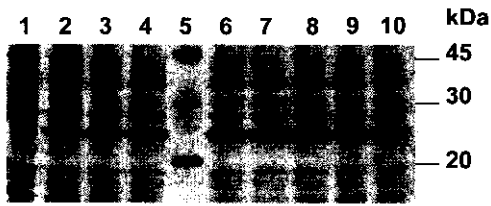


A



B

Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nền khả năng sinh tổng hợp TrxSef14 dưới dạng tan trong chủng *E. coli* BL21 mang pET32sef. **A:** Protein pha tan (T) và không tan (KT) trên gel điện di polyacrylamide. **B:** Lượng TrxSef dạng tan được tổng hợp ở các nhiệt độ khác nhau. M: Protein chuẩn (Fermentas).

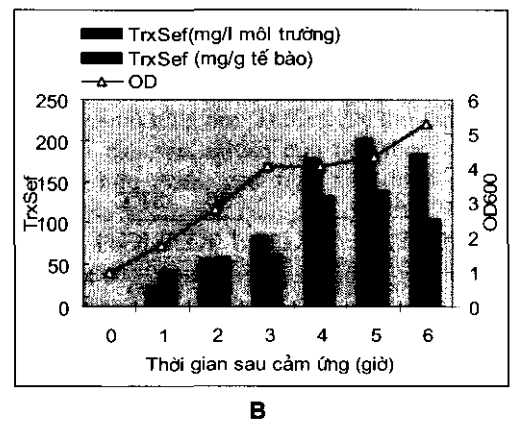
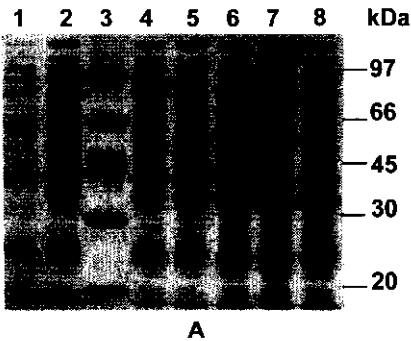


Hình 5. Ảnh hưởng của IPTG lên khả năng sinh tổng hợp TrxSef. 1-4, 6-10: TrxSef14 pha tan được sinh ra từ chủng *E. coli* BL21 mang pET32sef khi nuôi cấy cảm ứng với 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 μM IPTG. 5: Protein chuẩn (Amersham).

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy cảm ứng lên hàm lượng TrxSef được tổng hợp

Thông thường, tế bào chỉ sinh trưởng đến một nồng độ nhất định rồi dừng lại. Nếu thu tế bào quá muộn, nhiều tế bào già bị chết nên hàm lượng protein tái tổ hợp trong tế bào giảm đi. Trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành thu tế bào theo thời gian để kiểm tra lượng TrxSef pha tan. Lượng tế bào thu từ 1ml môi trường nuôi cấy được hòa vào lượng nước nhất định và tế bào được phá bằng sốc nhiệt, siêu âm để thu pha tan. Kết quả (Hình 6) cho thấy, tế bào bắt đầu sinh tổng hợp protein ngay sau khi promoter T7lac được cảm ứng bởi IPTG. Tuy nhiên, trong thời gian đầu (từ 0 h đến 3 h) tế bào sinh trưởng mạnh để tăng sinh khối và tốc độ sinh tổng

hợp protein tái tổ hợp chậm. Trong 3 h đầu, tốc độ tổng hợp TrxSef chỉ đạt 63 μg/g tế bào. Sau 4 h nuôi cấy cảm ứng, tế bào trong môi trường đã sinh trưởng tối đa và đạt đến pha cân bằng, lúc này quá trình sinh tổng hợp TrxSef diễn ra mạnh (đạt 177 mg/l môi trường, tương ứng với 132 mg/g tế bào) và sau đó tốc độ tổng hợp gần như đạt đỉnh điểm. Như vậy, khả năng sinh tổng hợp TrxSef phụ thuộc vào pha sinh trưởng của tế bào. Lượng protein tái tổ hợp thu được cao nhất sau 5 h nuôi cấy cảm ứng (khoảng hơn 200 mg/l môi trường, tương ứng 139 mg/g tế bào). Nguyên nhân dẫn đến tốc độ sinh tổng hợp protein giảm có thể do pH môi trường. Sau 3 h nuôi cấy, pH môi trường là 7,7 và sau đó tiếp tục tăng. Sau 5 h nuôi cấy cảm ứng, pH môi trường lên đến 8,2 và sau 6 h là 8,3.

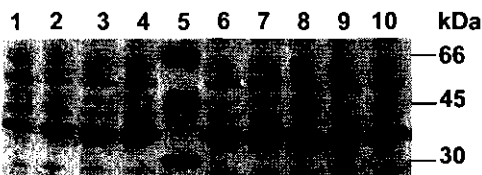


Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy cảm ứng lên hàm lượng protein TrxSef. A: Protein pha tan chiết từ *E. coli* BL21 mang pET32sef được nuôi cấy cảm ứng với 0,3 mM IPTG sau khoảng thời gian khác nhau: 1, 2, 4 - 8: tương ứng với 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h; 3: Protein chuẩn (Amersham). B: Lượng TrxSef thu được sau khoảng thời gian nuôi cấy cảm ứng.

Ảnh hưởng của hoạt tính protease lên sản lượng TrxSef

Protease là một trong những nguyên nhân làm giảm hàm lượng protein tái tổ hợp thu được trong quá trình lên men. Hiện nay, chloramphenicol là chất được sử dụng rất rộng rãi để nghiên cứu ảnh hưởng protease lên sản lượng protein tái tổ hợp được tổng hợp ở *E. coli* xuất phát từ thực tế chloramphenicol có khả năng ức chế sinh tổng hợp protein trong tế bào chủ nhưng không ảnh hưởng tới hoạt tính của protease (Urech *et al.*, 2000; Nagashima *et al.*, 2006). Vì vậy, để kiểm tra tính ổn định của TrxSef, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy cảm ứng chủng tái tổ hợp ở 28°C, sau 4 h nuôi cấy cảm ứng, chloramphenicol được bổ sung vào môi trường với nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml và tiếp tục nuôi chủng ở cùng điều kiện. Cứ sau mỗi 30 phút, tế bào được thu lại để kiểm tra protein pha tan được tạo ra. Kết quả (Hình 7), TrxSef khá ổn định sau 7 h nuôi cấy trong môi trường cảm ứng. Lượng TrxSef sau 7 h nuôi cấy tương đương với lượng TrxSef sau 4 h nuôi cấy, chứng tỏ TrxSef đã khá ổn định trong tế bào chủ và không bị protease sinh ra từ *E. coli* phân cắt. Điều đáng chú ý là, đối với chủng tái tổ hợp này, mặc dù được bổ sung với chloramphenicol nhưng tế bào vẫn tiếp tục sinh trưởng nhưng với tốc độ rất chậm và có tạo thêm một lượng nhỏ TrxSef. Đây là điều hết sức thuận lợi để có thể thu được lượng lớn protein tái tổ hợp dùng trong nghiên cứu tiếp theo.

Sau khi tối ưu, chủng được nuôi cấy trong điều kiện tối ưu: ở 25°C với nồng độ chất cảm ứng IPTG là 300 µM và thu mẫu sau 5 h, lượng TrxSef pha tan đạt 130 mg/g tế bào, tương đương với 208 mg/l môi trường nuôi cấy. Hàm lượng protein trong thí nghiệm này được định lượng bằng bộ sinh phẩm định lượng chuẩn cho protein dung hợp với S-tag do Mỹ sản xuất.



Hình 7. Phân tích protein pha tan tách chiết từ chủng *E. coli* BL21 mang pET32sef sau khoảng thời gian nuôi cấy trong môi trường cảm ứng khác nhau. 1-3: mẫu thu sau 2, 3, 4 h nuôi cấy; 4, 6 - 10: mẫu được thu sau 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7 h nuôi cấy; 5: Protein chuẩn (Amersham).

KẾT LUẬN

Protein SefA đã được biểu hiện với hàm lượng lớn trong tế bào *E. coli* dưới dạng dung hợp với Trx. Nhiệt độ, nồng độ IPTG và pha sinh trưởng tế bào ảnh hưởng lớn tới hàm lượng protein tái tổ hợp tạo ra. Khi nuôi cấy chủng ở 25°C trong môi trường có 300 µM IPTG, sau 5 h nuôi cấy, chủng sản xuất được 130 mg TrxSef/g tế bào, tương đương 208 mg/l môi trường nuôi cấy

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện bằng kinh phí Dự án hợp tác Việt Nam - Thụy Điển: "Sản xuất các protein tái tổ hợp sử dụng trong Nông nghiệp và Y dược" do tổ chức SIDA/SARECT tài trợ và Chương Trình nghiên cứu do UNU-KIRIN, Nhật Bản tài trợ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Thị Huyền, Nguyễn Thành Trung, Nguyễn Thị Thu Hằng, Phạm Thúy Hồng, Trương Văn Dung, Trương Nam Hải, Lê Đình Lương (2003) Tách dòng và biểu hiện gen *gml* mã hóa cho epitope kháng nguyên H:gm của *Salmonella enteritidis* ATCC13076. *Tạp chí Di truyền học và Ứng dụng* 1: 34-39.

Kisiela D, Kuczkowski M, Wieliczko A, Sambor I, Mazurkiewicz M, Ugorski M (2003) Comparison of SefA, FimA and AgfA fimbrial proteins of *Salmonella* Enteritidis in their abilities to elicit humoral immune response in hens. *Bull Vet Inst Pulawy* 47: 95-150.

Kuczkowski M, Wieliczko A, Kisiela D, Mazurkiewicz M, Ugorski M (2004) Cellular response and protective effect in hens immunized with *Salmonella* Enteritidis recombinant fimbrial SefA, FimA and AgfA proteins. *Bull Vet Inst Pulawy* 48: 375-382.

Kuczkowski M, Wieliczko A, Kisiela D, Mazurkiewicz M, Ugorski M (2004) Cellular response and protective effect in hens immunized with *Salmonella* Enteritidis recombinant fimbrial SefA, FimA and AgfA proteins. *Bull Vet Inst Pulawy* 48: 375-382.

Nagashima K, Kubota Y, Shibata T, Sakaguchi C, Shinagawa H, Hishida T (2006) Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance. *J Biol Chem* 281(41): 30941-30946.

Peralta RC, Yokoyama H, Ikemori Y, Kuroki M, Kodoma Y (1994) Passive immunization against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg-yolk antibodies specific for 14-kD fimbriae of *Salmonella* Enteritidis. *J Med Microbiol* 41: 29-35

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Thiagarajan D, Thacker HL, Saeed AM (1996) Experimental infection of laying hens with *Salmonella* Enteritidis strains that express different type of fimbriae. *Poult Sci* 75: 1365-1372.

Ugorski M, Kisiela D, Wieliczko A (2001) Fimbriae *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Medycyna Wet* 57: 714-718.

Urech C, Koby S, Oppenheim AB, Munchbach M, Hennecke H, Narberhaus F (2000) Differential degradation of *Escherichia coli* sigma32 and *Bradyrhizobium japonicum* RpoH factors by the FtsH protease. *Eur J Biochem* 267(15): 4831-4839.

OVEREXPRESSION OF PROTEIN SEFA DERIVED FROM *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS IN *ESCHERICHIA COLI* BL21

Do Thi Huyen¹, Le Quynh Giang¹, Tran Ngoc Tan¹, To Long Thanh², Truong Nam Hai^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²National Center for Veterinary Diagnosis

SUMMARY

SEF14 of *S. Enteritidis* fimbriae plays important roles for strong induction of T-lymphocyte response and protective immunity. The *sefA* coding for protein SefA, which comprises thin aggregative fimbriae SEF14, lacking signal peptide sequence was amplified by PCR and cloned into pCR2.1. The gene of 432 nucleotides was 99.3% homology with the *sefA* of *S. Enteritidis* PT4 - the dominant strain caused the major gastroenteritis in humans. Then, the gene was inserted into expression vector pET32a(+) and transformed into *E. coli* BL21 for SefA expression. In this recombinant strain, SefA was expressed at very high level under the chimeric form with Trx, S-tag at N terminal, hexahistidine at C terminal then abbreviated to TrxSef. This protein was produced at the highest amount at 30°C (over 500 mg/l broth), but half of them was inclusion body. The use of low temperature for TrxSef production decreased the ratio of insoluble TrxSef fraction to total TrxSef. At 22, 25, 30°C, soluble TrxSef were synthesized at similar amount (over than 200 mg/l broth), thus productivity of insoluble TrxSef increased owing to the significant increase of expression rate. However, at 25°C, the recombinant strain grew reasonably and produced 76% soluble TrxSefA. IPTG concentrations did not affect to the cell growth but lightly influenced the TrxSef production. A large amount of TrxSef was obtained when the cells were induced with 300 µM. At the flask scale production, expression rate of TrxSef depended on the cells growth phase. During exponential phase (2 - 3 hours after induction), TrxSef was produced about 60 mg/g dried cells, but when the cell density reached to stationary phase (4 hours after induction), TrxSef was explosively expressed by 2-fold compared to the TrxSef production during exponential phase and then kept nearly stable for 1 hour. Thus, the largest amount of TrxSef was harvested at hour 5 after induction. This chimeric recombinant protein had high stability with the host proteases. At optimal condition, over 200 mg of TrxSef per broth correlating approximately 130 mg TrxSef/g dried cells was achieved.

Keywords: *E. coli* BL21, pET32a(+), recombinant protein, *sefA*, *S. Enteritidis*

* Author for correspondence: Tel/Fax: 84-4-37562790; E-mail: tnhai@hn.vnn.vn