

Dòng hóa và biểu hiện enzyme carbapenemase KPC-2 tái tổ hợp trong tế bào chất của *E. coli*

- **Trần Nhật Phương**
- **Huỳnh Thị Kim Phương**
- **Phan Thị Phượng Trang**
- **Trần Linh Thuộc**

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

- **Phạm Hùng Vân**

Công ty Nam Khoa, Đại Học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

(Bài nhận ngày 12 tháng 08 năm 2015, nhận đăng ngày 14 tháng 04 năm 2016)

TÓM TẮT

Cơ chế đề kháng kháng sinh carbapenem thuộc nhóm β -lactam phổ biến nhất ở *Klebsiella pneumoniae* là tiết ra enzyme KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase). Các chủng tiết enzyme này thường biểu hiện ở nhiều mức độ khác nhau và cần phải có sự phối hợp với các yếu tố khác như mất porin hay cùng biểu hiện với các enzyme đề kháng kháng sinh phổ rộng (ESBL) thì mới có khả năng biểu hiện mức độ đề kháng cao. Để tìm hiểu rõ hơn sự biểu hiện của enzyme này trong cơ chế đề kháng carbapenem và để phục vụ nghiên cứu ứng dụng trong việc phát hiện nhanh vi sinh vật đề kháng ESBL, gene mã hóa enzyme KPC-2 từ hai chủng *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu bệnh phẩm được tạo dòng vào plasmid pET28a. Các plasmid tái tổ hợp mang gene kpc-2 được biến nạp vào tế bào

E. coli BL21 và hoạt tính của enzyme được kiểm tra thông qua theo dõi khả năng sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy có bổ sung kháng sinh ertapenem 4 $\mu\text{g/mL}$. Khả năng cảm ứng biểu hiện enzyme KPC-2 dạng nội bào cũng được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di SDS-PAGE. Protein tái tổ hợp được gấp cuộn và tan một nửa so với tổng số protein tái tổ hợp tạo ra ở nhiệt độ 23 °C. Protein tái tổ hợp được thu nhận thành công từ phân đoạn tan bằng sắc ký ái lực với cột Histrap-HP. Phân đoạn protein sau khi tinh sạch được xác định khối lượng phân tử bằng phân tích LC-MS cho thấy KPC-2 thu nhận được có trọng lượng phân tử 28,8 kDa, đúng với dự đoán và có độ tinh sạch cao. Nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng tiếp theo của KPC-2.

Từ khóa: KPC-2, carbapenem, tạo dòng, tái tổ hợp, pET28a, pHT2008

MỞ ĐẦU

Carbapenem là kháng sinh có phổ kháng khuẩn rộng nhất và có hoạt tính ổn định đối với các vi khuẩn tiết enzyme AmpC β -lactamase và các enzyme đề kháng kháng sinh phổ rộng ESBL. Do vậy, kháng sinh này được xem là nguồn dự phòng trong điều trị các bệnh nhiễm khuẩn gây

nên bởi các vi khuẩn gram âm đề kháng đa kháng sinh [7]. Ngay khi được sử dụng rộng rãi trong điều trị, nhiều trường hợp đề kháng kháng sinh này đã được công bố chủ yếu qua trung gian plasmid mang gene mã hóa cho enzyme thủy phân carbapenem là carbapenemase.

Carbapenemase chủ yếu được phát hiện trong những năm gần đây ở *K. pneumoniae* gọi là *K. pneumoniae* Carbapenemase (KPC) [3].

KPC được phát hiện lần đầu tiên tại Hoa Kỳ vào năm 2001 trên *K. pneumoniae* phân lập từ mẫu bệnh phẩm [4] và đã lan truyền đến rất nhiều quốc gia khác trên toàn thế giới. Mặc dù được phát hiện chủ yếu ở *K. pneumoniae*, enzyme này cũng đã được phát hiện ở *Salmonella enterica*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* và *Pseudomonas aeruginosa*, chúng tỏ gene đề kháng kháng sinh nói chung và gene *kpc* nói riêng có khả năng lan truyền và phát tán rất nhanh giữa các chủng cùng hay khác loài. Ngoài ra sự biểu hiện tính kháng của KPC đối với kháng sinh carbapenem còn phụ thuộc vào sự tác động cộng gộp của các enzyme có hoạt tính kháng các loại kháng sinh khác nhau. Do vậy, có trường hợp giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của nhiều chủng *K. pneumoniae* mang gene mã hóa cho enzyme KPC thấp hơn giá trị biện luận được khuyến cáo bởi CLSI dẫn đến việc trả kết quả sai [6].

Tại Việt Nam, gene mã hóa cho carbapenemase được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2010 và đã có sự gia tăng đáng kể, chủ yếu vẫn là KPC-2 và NDM-1 [5, 8]. Đến nay, chưa có nghiên cứu nào trên diện rộng và chi tiết về sự đề kháng carbapenem do tiết enzyme KPC, cũng như chưa có thông tin về hoạt tính và mức độ biểu hiện của enzyme này trong hiện tượng đề kháng carbapenem. Hiện nay, có nhiều phương pháp xác định hoạt tính carbapenemase KPC trong chẩn đoán như phương pháp Hodge cải biên phát hiện enzyme carbapenemase ở các chủng sản xuất enzyme này, nhưng phương pháp này cần thời gian đủ để các chủng mọc và biểu hiện, cần sử dụng chủng chuẩn theo khuyến cáo, đồng thời độ nhạy và độ đặc hiệu cũng phụ thuộc vào kỹ năng kỹ thuật viên xét nghiệm. Phương pháp phát hiện với chất ức chế là boronic acid được cho là chuyên biệt cho enzyme KPC ở *K.*

pneumoniae thực hiện trên imipenem và meropenem nhưng không đặc hiệu cho ertapenem, đặc biệt là khi có thêm cơ chế tiết enzyme AmpC β -lactamase. Phương pháp đo quang phổ cũng là một phương pháp hay được sử dụng để phát hiện hoạt tính carbapenemase nhưng cần kỹ thuật viên có kỹ năng, thời gian lâu và không phân biệt được là KPC hay loại khác. Tương tự, các phương pháp sinh học phân tử được cho là phương pháp tối ưu để phát hiện các gene mã hóa cho các carbapenemase nhưng cần có thiết bị hiện đại và nhân viên phải được đào tạo. Vì vậy, cần một phương pháp để xác định và phát hiện nhanh và đơn giản carbapenemase KPC. Việc phát hiện nhanh các vi khuẩn mang gene *kpc* đề kháng carbapenem là một vấn đề cần thiết trong việc đưa đúng phát đồ điều trị, giảm chi phí cho bệnh nhân, giảm tỷ lệ tử vong. Bên cạnh đó, việc xác định nhanh cũng giúp nhanh chóng cách ly bệnh nhân nhiễm các tác nhân này nhằm tránh việc lây lan ra môi trường bệnh viện và cộng đồng. Nghiên cứu này nhằm tìm hiểu khả năng biểu hiện gene mã hóa cho enzyme KPC hiện diện ở *K. pneumoniae* trên các mẫu bệnh phẩm phân lập được tại các bệnh viện ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các bước nghiên cứu tiếp theo trong việc phát triển phương pháp phát hiện nhanh các chủng vi khuẩn sinh enzyme đề kháng kháng sinh carbapenem bằng ELISA và western blot nhằm rút ngắn thời gian xét nghiệm để có thể đưa ra phát đồ điều trị chính xác nhất đối với các chủng mang gene *kpc* đề kháng carbapenem.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Hai chủng *K. pneumoniae* KLP02 và KLP03 đề kháng carbapenem mang gene mã hóa cho carbapenemase KPC-2 phân lập từ mẫu bệnh phẩm được sử dụng trong nghiên cứu này. Các chủng chuẩn chứng âm *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706, chứng dương *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 được sử dụng để làm đối chứng và

kiểm tra chất lượng kết quả thí nghiệm. Chủng vi khuẩn khả nạp *E. coli* OmniMax (Invitrogen) được sử dụng để tạo dòng và chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (Invitrogen) được sử dụng để biểu hiện gene *kpc-02*.

Các đĩa kháng sinh có nồng độ: imipenem 10 µg/mL, meropenem 10 µg/mL, ertapenem 10 µg/mL, colistin 10 µg/mL, doxycycline 30 µg/mL, rifampin 5 µg/mL, ciprofloxacin 5 µg/mL, ampicillin 10 µg/mL, amoxicillin/clavulanic acid 20/10 µg/mL, ceftriaxon 30 µg/mL, cefotaxime 30 µg/mL, ceftazidime 30 µg/mL, amikacin 30 µg/mL và ceftazidime 30 µg/mL được sử dụng trong thử nghiệm độ nhạy kháng sinh của các chủng.

Các enzyme *Pfu* DNA polymerase, T4 DNA ligase (Fermentas), Tag DNA polymerase (HT

Biotech) và các enzyme cắt hạn chế *Nco*I, *Eco*RI, *Sma*I (Fermentas) được sử dụng trong khuếch đại và tạo dòng các gene mục tiêu vào plasmid pET28a (+).

Các bộ kit thông dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử được cung cấp bởi nhà cung cấp Qiagen, HT Biotech và NK Biotek.

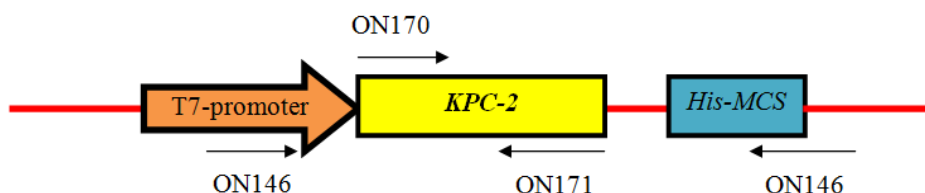
Plasmid pET28a (+) (Novagen) được sử dụng để tạo dòng các gene mã hóa cho enzyme KPC-2.

Trình tự DNA bộ gene của *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain 354 plasmid KPC-2 gene, complete cds; GenBank: KJ151293.1 được dùng để thiết kế mỗi dùng trong nghiên cứu. Danh sách các môi sử dụng được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Danh sách các môi được thiết kế sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự môi từ 5' đến 3'	Mô tả
1	ON1709	AGGAGATATACCATGGAACCATTCGCTAAACTCGAACAG	Nhân bản gene <i>kpc-2</i> và PCR khuẩn lạc
2	ON1714	GACGGAGCTCGAATTCTTAGTGATGATGATGATGCTGCCCGTTGACGCCCCAATC	Nhân bản gene <i>kpc-2</i>
3	ON1461	GGTGATGTCGGCGATATAGGC	Giải trình tự
4	ON1462	CCGTTTAGAGGCCCAAGG	PCR khuẩn lạc và giải trình tự

Sơ đồ vị trí bắt cặp môi trên plasmid trong phản ứng PCR khuẩn lạc được mô tả trên Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ vị trí bắt cặp môi trên plasmid

Phương pháp nghiên cứu

Độ nhạy kháng sinh và MIC của các chủng nghiên cứu

Phương pháp Kirby Bauer được sử dụng để xác định độ nhạy kháng sinh của các chủng được cấy trên môi trường Mueller Hinton Agar, ủ ở

37 °C trong 18 giờ và đường kính vòng vô khuẩn được đánh giá theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute [2]. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các kháng sinh carbapenem được thực hiện bằng đĩa ^{NK}MIC-MDA [1].

Tách chiết plasmid và nhân bản gene mã hóa cho carbapenemase KPC-2

DNA plasmid của các chủng nghiên cứu được tách chiết bằng kit tách chiết plasmid QuickLyse Miniprep Kit (QIAGEN), được tinh sạch và dùng làm khuôn cho phản ứng PCR thu nhận gene mục tiêu.

Các đoạn gene mã hóa cho protein KPC-2 được ký hiệu là *kpc-2* được thu nhận bằng phương pháp PCR với cặp mồi ON1709 và ON1714 (Bảng 1) trên khuôn là DNA plasmid đã được tách chiết từ các chủng trên. Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 100 μ L bao gồm 10 μ L các dNTP (2 mM); 10 μ L đệm PCR (10X); 2 μ L DNA khuôn từ plasmid ở nồng độ 100 ng/ μ L; 2,5 μ L mỗi mồi ON1709 và ON1714 (10 pmol); 2,5 μ L enzyme *Pfu* DNA polymerase (Fermentas) và 61,5 μ L nước cất. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR bao gồm 94 °C trong 5 phút, 30 chu kỳ ba giai đoạn 94 °C trong 30 giây, 55 °C trong 30 giây và 72 °C trong 2 phút; cuối cùng là một chu kỳ 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm khuếch đại được phân tích trên gel agarose 1,5 %.

Tạo plasmid tái tổ hợp cho phép biểu hiện trong tế bào chất

Sản phẩm khuếch đại gene *kpc-2* được xử lý với enzyme cắt giới hạn *Nco*I và *Eco*RI được nối vào plasmid pET28a đã mở vòng với chính 2 enzyme đó bằng enzyme T4 DNA ligase (Fermentas) để tạo plasmid được ký hiệu là pHT2008. Vùng cấu trúc gene trong plasmid pHT2008 là T7 Promoter-*kpc-2*-His-tag.

Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* OmniMAX theo phương pháp hóa biến nạp và được trải lên đĩa thạch LB có chứa kanamycin 30 μ g/mL, ủ 37 °C qua đêm.

Các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-Agar có chứa kanamycin được chọn để thực hiện phản ứng PCR khuẩn lạc nhằm sàng lọc vector pHT2008 với thành phần phản ứng tương tự như phản ứng khuếch đại gene *kpc-2* nhưng khuôn

DNA chính là DNA của tế bào *E. coli* mọc trên đĩa môi trường sau biến nạp. Phản ứng PCR được thực hiện bởi enzyme Taq DNA polymerase (HT biotech) với các mồi đặc hiệu ON1709 và ON1462 (Bảng 1). Sản phẩm PCR có kích thước dự đoán là 979 bp. Các khuẩn lạc *E. coli* OmniMAX mang plasmid tái tổ hợp dương tính với phản ứng PCR khuẩn lạc được tách chiết plasmid giải trình tự vùng gene *kpc-2* với cặp mồi ON1461 và ON1462 (Bảng 1).

Biểu hiện protein KPC-2 tái tổ hợp

Biến nạp các plasmid tái tổ hợp vào chủng biểu hiện *E. coli* BL21 bằng phương pháp hóa biến nạp. Các chủng mang plasmid tái tổ hợp được cấy hoạt hóa qua đêm trên 5 mL môi trường LB có bổ sung kanamycin và được cấy chuyển sang ống nghiệm chứa 10 mL môi trường LB có bổ sung kanamycin sao cho OD_{600nm} đạt 0,1. Nuôi cấy lắc ở 37 °C đến khi giá trị OD_{600nm} đạt 0,8 và cảm ứng biểu hiện bằng IPTG ở nồng độ 0,5 mM trong 2 giờ.

Kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp thông qua tính đề kháng carbapenem bằng cách cấy chuyển 10 μ L dịch nuôi cấy đã cảm ứng bằng IPTG sang môi trường LB có bổ sung kanamycin và IPTG cùng với kháng sinh ertapenem ở nồng độ 4 μ g/mL (được tính là thời điểm T = 0 giờ). Nuôi cấy lắc và đọc kết quả sau 2 giờ (T = 2 giờ) ở OD_{600nm}.

Tương tự, tế bào vi khuẩn cũng được nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung kanamycin và cảm ứng biểu hiện bằng IPTG 0,5 mM ở 23 °C trong 6 giờ. Tế bào vi khuẩn được thu nhận sau 6 giờ nuôi cấy cảm ứng. Sau đó, tiến hành phân tích khả năng biểu hiện bằng phương pháp SDS-PAGE.

Tế bào vi khuẩn được phá vỡ bằng phương pháp sóng siêu âm để kiểm tra khả năng biểu hiện gene và tính hòa tan của protein dung hợp trên gel SDS-PAGE.

Phân đoạn tan của protein được tinh chế bằng sắc ký ái lực thông qua cột Histrap HP 5 mL (GE healthcare). Sinh khối vi khuẩn sau khi lên men được huyền phù trong 150 mL dung dịch đệm ly giải chứa 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 10 mM imidazole, 1 mg/mL DnaseI và 1 mM PMSF. Ly giải tế bào bằng sóng siêu âm, biên độ sóng (Amplitude) 70 % trong 10 chu kì, mỗi chu kì gồm 10 giây phá và 20 giây nghỉ. Ly tâm 13000 g trong 20 phút ở 4 °C thu nhận phần dịch nổi. Phần dịch nổi này được cho chảy qua cột Histrap HP 5 mL (GE healthcare). Rửa cột bằng đệm ly giải với thể tích gấp 3 lần thể tích dịch protein qua cột và dung ly protein mục tiêu bám trên cột bằng dung dịch chứa 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol và 40-250 mM imidazole. Độ tinh sạch của protein sau khi dung ly khỏi cột được phân tích trên SDS-PAGE.

Xác định khối lượng phân tử bằng LC-MS

Protein KPC-2 sau khi tinh sạch được pha loãng về nồng độ 1 mg/mL và gửi phân tích LC-MS tại Phòng thí nghiệm Phân tích Trung tâm, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Kết quả được xử lý bằng phần mềm Bruker Compass Data Analysis 4.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Độ nhạy kháng sinh và MIC của các chủng nghiên cứu

Cả hai chủng dùng trong nghiên cứu đều có MIC với imipenem, meropenem và ertapenem tương tự nhau và đều rất cao so với tiêu chuẩn được đề nghị bởi CLSI, lên đến 32 µg/mL. Các chủng đều đề kháng ampicillin, các cephalosporin, kháng sinh phối hợp với chất ức chế β -lactamase, aminoglycoside, tetracycline, và chỉ còn nhạy cảm với kháng sinh polypeptide là colistin được thể hiện trong Bảng 2.

Bảng 2. Độ nhạy kháng sinh và MIC của các chủng trong nghiên cứu

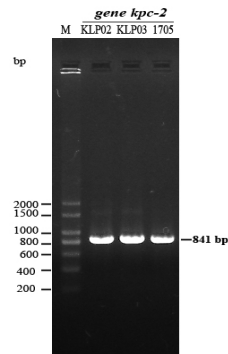
ID	MIC (mg/mL)			Độ nhạy kháng sinh (mm)/ kết quả theo CLSI													
	IM	ME	EN	IM	ME	EN	CO	DX	RF	CI	AM	AC	CX	CT	CZ	AK	CN
KLP 02	16	16	32	16	12	12	12	10	0	0	0	0	0	0	10	13	12
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
KLP 03	16	8	32	17	14	12	12	10	0	0	0	0	0	10	0	0	0
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

IM: imipenem, ME: meropenem, EN: ertapenem, CO: colistin, DX: doxycycline, RF: Rifamicine, CI: ciprofloxacin, AM: Ampicillin, AC: Ampicillin/ Clavulanic acid, CX: ceftriaxone, CT: cefotaxim, CZ: ceftazidim, AK: amikacin, CN: ceftazidim, CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute, R: Kháng, S: Nhạy.

Tách chiết plasmid và nhân bản gene mã hóa KPC-2

Kết quả phân tích đoạn gene *kpc-2* mã hóa cho enzyme KPC-2 bằng phương pháp PCR trên khuôn là DNA plasmid tách chiết từ hai chủng trên cho thấy môi thiết kế để thu nhận đoạn gene

này là chính xác với kết quả dự đoán. Sản phẩm khuếch đại từ đoạn gene này có kích thước là 841 bp (Hình 2) tương đương với kết quả PCR nhân bản gene *kpc-2* từ khuôn plasmid tách từ chủng chuẩn 1705 (Hình 2, 1705).

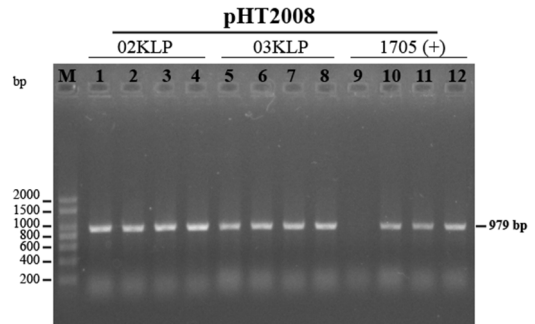


Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm nhân bản gene mã hóa KPC-2, có kích thước 841 bp. M: thang DNA; KLP02, KLP03, 1705 (+): sản phẩm PCR nhân gene *kpc-2* từ DNA plasmid tách lần lượt từ chủng KLP02, KLP03 và 1705 (+).

Tạo plasmid tái tổ hợp pHT2008

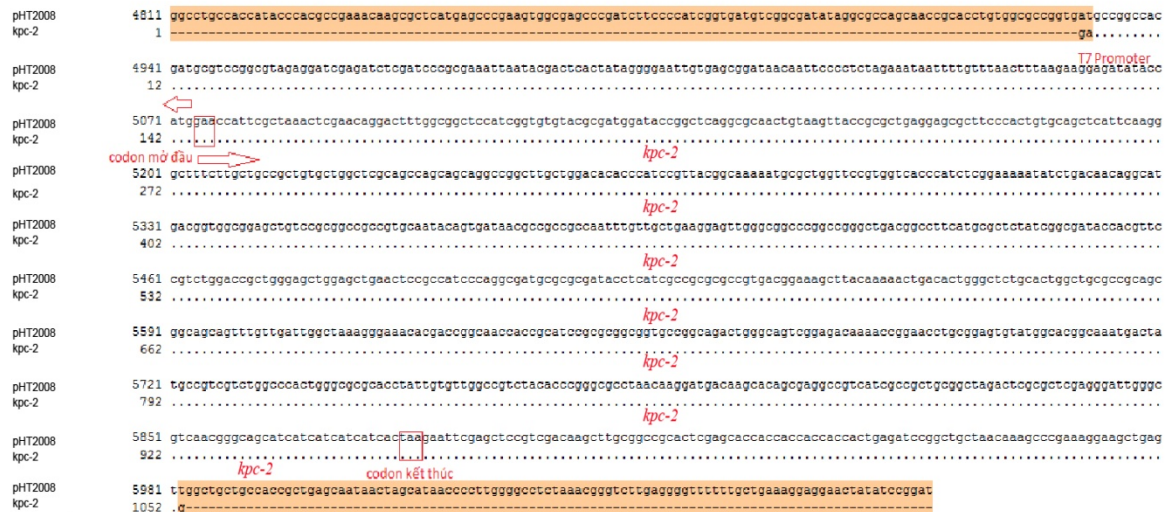
Các sản phẩm PCR nhân gene *kpc-2* và plasmid pET28a (+) được xử lý bằng enzyme cắt giới hạn *NcoI/EcoRI* để tạo ra các plasmid tái tổ hợp pHT2008 có mang gene mã hóa KPC-2. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-kanamycine được sàng lọc bằng phản ứng PCR khuẩn lạc nhằm chọn các dòng biến nạp đúng plasmid mục tiêu là pHT2008 với đoạn DNA được khuếch đại

có kích thước dự đoán khoảng 979 bp. Kết quả điện di trên gel agarose 1 % trên Hình 3 cho thấy sản phẩm khuếch đại đoạn gene *kpc-2* là một vạch có kích thước như dự đoán.



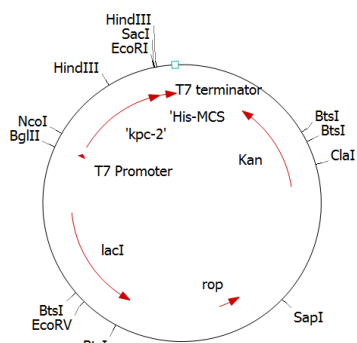
Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc của chủng mang plasmid tái tổ hợp pHT2008 có chứa trình tự *kpc-2* từ các chủng vi khuẩn KPL-02, KPL-03 và 1705

Chọn khuẩn lạc 1, 5 và 10 để tách chiết plasmid và giải trình tự đoạn DNA được chèn với cặp mồi ON1461 và ON1462, kết quả so sánh cho thấy có sự tương đồng 100 % so với trình tự lý thuyết của gene *kpc-2* (Hình 4).



Hình 4. Kết quả phân tích trình tự của plasmid tái tổ hợp pHT2008

Như vậy, chúng tôi đã dòng hóa thành công plasmid pHT2008 mang gene *kpc-2* từ các chủng *K. pneumoniae* chuẩn (+) ATCC BAA 1705 và hai chủng phân lập từ mẫu bệnh phẩm là *K. pneumoniae* KLP02 và KLP03 được ký hiệu lần lượt là pHT2008-1705, pHT2008-KLP02 và pHT2008-KLP03. Đại diện plasmid pHT2008 có sơ đồ như Hình 5.



Hình 5. Sơ đồ cấu trúc plasmid pHT2008

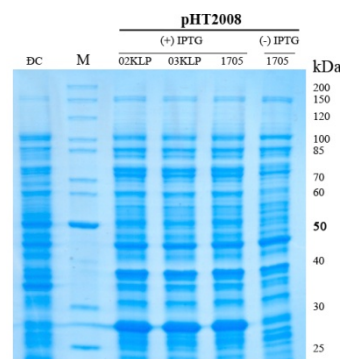
Biểu hiện protein KPC-2

Việc biểu hiện protein có hoạt tính của enzyme KPC-2 tái tổ hợp được kiểm tra thông qua khả năng kháng ertapenem, bằng việc khảo sát khả năng sinh trưởng của các chủng *E. coli* BL21 có mang plasmid tái tổ hợp pHT2008 và chủng mang plasmid gốc pET28a (làm đối chứng âm) trên môi trường chứa kháng sinh ertapenem. Kết quả khảo sát giá trị OD_{600nm} sau 2 h nuôi cấy như Bảng 3. Giá trị OD_{600nm} cho thấy chủng *E. coli* BL21 có mang plasmid chứa gene mã hóa cho KPC-2 có khả năng tăng trưởng tốt trên môi trường chứa kháng sinh ertapenem. Trong khi mẫu đối chứng âm là chủng *E. coli* BL21 có mang plasmid pET28a (+) không chứa gene mã hóa KPC-2 thì không tăng trưởng được mà còn giảm giá trị OD_{600nm} . Như vậy gene *kpc-2* có khả năng biểu hiện thành enzyme trong tế bào *E. coli* và có hoạt tính phân cắt kháng sinh ertapenem.

Bảng 3. Khảo sát hoạt tính kháng ertapenem của enzyme KPC-2 thông qua kiểm tra mật độ tế bào

<i>E. coli</i> BL21 mang plasmid	OD_{600nm} / kháng sinh ertapenem 4 $\mu g/mL$	
	Trước khi bổ sung ($T=0$ h)	Sau khi bổ sung ($T=2$ h)
pHT2008-1705	2,31	3,49
pHT2008-02KPL	2,25	3,27
pHT2008-03KPL	2,43	3,65
pET28a	2,46	0,59

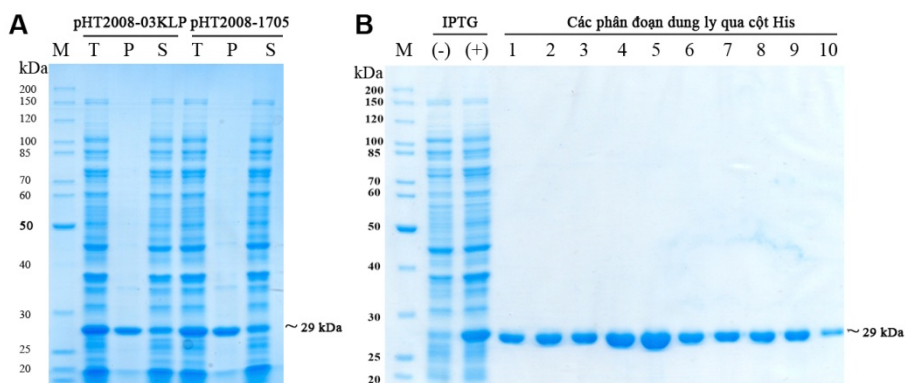
Kết quả khảo sát sự tăng trưởng của vi sinh vật trong môi trường có kháng sinh ertapenem chứng tỏ các chủng *E. coli* có mang plasmid tái tổ hợp pHT2008 có hiện tượng đề kháng với kháng sinh ertapenem ở nồng độ 4 $\mu g/mL$ hay nói cách khác, thí nghiệm này đã khẳng định gene đề kháng kháng sinh carbapenem *kpc-2* được tạo dòng từ các vi khuẩn *K. pneumoniae* đề kháng carbapenem phân lập trên các mẫu bệnh phẩm tại Việt Nam chính là tác nhân góp phần gây nên hiện tượng đề kháng carbapenem ở các chủng này. Kết quả này được xác nhận khi phân tích trên SDS-PAGE (Hình 6).



Hình 6. Kết quả kiểm tra cảm ứng biểu hiện KPC-2 với IPTG. M: thang protein chuẩn; DC: chủng đối chứng (-) mang plasmid pET28a; (-) IPTG: *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pHT2008-*kpc-2* không được cảm ứng với IPTG; 02KLP, 03KLP và 1705: *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pHT2008-*kpc-2* lần lượt từ các chủng 02KLP, 03KLP và 1705 được cảm ứng bằng 0,5 mM IPTG.

Phân tích SDS-PAGE trên Hình 6 cho thấy, ở các giếng pHT2008-02KPL, 03KPL, và 1705 đều xuất hiện một vạch protein đậm có kích thước khoảng 29 kDa, kích thước này hoàn toàn phù hợp với kích thước dự đoán của protein đích là 29,5 kDa. Trong khi đó, mẫu đối chứng là chủng *E. coli* BL21 mang plasmid gốc pET28a không cho vạch protein tương ứng. Tương tự vậy, đối với mẫu có mang plasmid chứa gene *kpc-2* nhưng không cảm ứng bằng IPTG thì vạch protein mục tiêu cũng có hiện diện nhưng rất mảnh. Như vậy, mức độ biểu hiện protein KPC-2 từ 3 chủng chứa gene *kpc* của 02KPL, 03KPL và 1705 là như nhau. Do vậy, trong thí nghiệm kiểm tra tính tan của protein chỉ tiến hành trên mẫu 03KPL và mẫu

đối chứng dương 1705. Kết quả kiểm tra tính tan của protein tái tổ hợp KPC-2 trên Hình 7A cho thấy protein mục tiêu hiện diện trong cả pha tủa (P) và pha tan (S). Tuy nhiên, lượng protein hiện diện trong pha tan cũng còn khá cao nên có thể sử dụng protein trong pha tan để tiếp tục tinh chế protein tái tổ hợp trong quy trình tinh chế protein theo phương pháp sắc ký ái lực. Do mức độ biểu hiện và tính tan của protein KPL là như nhau giữa hai chủng mang plasmid pHT2008-03KPL và pHT2008-1705, thêm vào đó trình tự gene *kpc-2* giữa ba chủng là như nhau nên trong nghiên cứu này chỉ chọn chủng mang plasmid pHT2008-03KPL để tinh chế protein KPC-2.

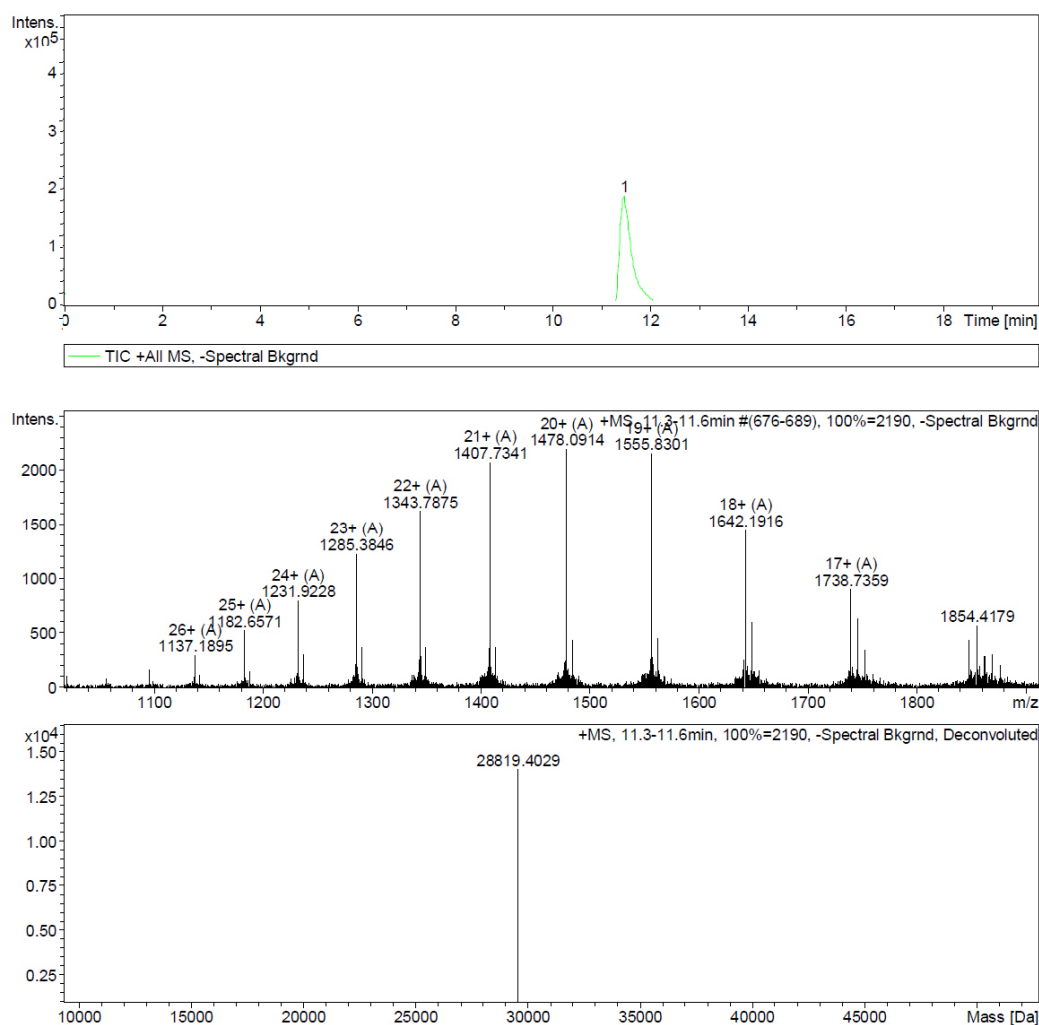


Hình 7. Kết quả điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12 %. (A) Kiểm tra tính tan của protein KPC-2 được biểu hiện trong tế bào chất của tế bào *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pHT2008-KLP03 và pHT2008-1705; (B) Kiểm tra độ tinh sạch của protein sau khi tinh chế protein bằng sắc ký ái lực. M: Thang protein chuẩn, T: protein tổng số, P: protein tủa và S: protein hòa tan, E: các phân đoạn dung ly qua cột để thu nhận protein.

Kết quả tinh chế protein KPC-2 trên Hình 7B cho thấy các phân đoạn dung ly rất tinh sạch, chỉ còn duy nhất một vạch protein mục tiêu với kích thước khoảng 29 kDa. Như vậy, protein KPC-2 đã được tinh chế với mức độ tinh sạch rất cao, protein này có thể được sử dụng cho các mục đích nghiên cứu tiếp theo như việc sử dụng làm kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột và thử nghiệm sản xuất kháng thể.

Xác định khối lượng phân tử của protein KPC-2

Các phân đoạn sau cột chứa protein KPC-2 mục tiêu được đồng nhất với nhau, sau đó pha loãng về nồng độ 1 mg/mL và phân tích LC-MS. Kết quả cho thấy chỉ có 1 cấu tử protein duy nhất với khối lượng phân tử khoảng 28.819 Da (tương ứng với khối lượng protein KPC-2 trong tự nhiên) (Hình 8) và không thấy các sản phẩm phụ. Điều này khẳng định protein KPC-2 đã được tinh chế thành công với độ tinh sạch cao và có trọng lượng phân tử chính xác.



Hình 8. Kết quả phân tích LC-MS của phân đoạn protein KPC-2 tái tổ hợp sau khi tinh sạch

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã tạo dòng thành công tế bào *E. coli* có mang plasmid tái tổ hợp chứa gene mã hóa cho carbapenemase *kpc-2*, các gene *kpc-2* từ 2 chủng vi khuẩn 02KPL, 03KPL đã phân lập ở Việt Nam có sự tương đồng 100 % so với chủng chuẩn 1705 và có mức độ biểu hiện của gene là như nhau. Protein KPC-2 có trọng lượng phân tử 28,8 kDa và có hoạt tính phân cắt ertapenem. Tuy khả năng tan trong tế bào chất của protein này chỉ khoảng 50 % nhưng do protein được biểu hiện vượt mức nên lượng protein tan cũng đủ để tinh chế được protein KPC-2 tinh sạch thông qua phương pháp sắc ký

ái lực. Protein này sẽ được sử dụng như một kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch trên chuột tạo ra kháng thể phục vụ cho các nghiên cứu kiểm chứng, phát hiện vi sinh vật sinh ESBL.

Lời cảm ơn: Báo cáo này là một phần trong đề tài của NCS. Trần Nhật Phương “Nghiên cứu đặc điểm sinh học phân tử của *Klebsiella pneumoniae* đề kháng carbapenem qua cơ chế KPC”. Các thí nghiệm được thực hiện tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Huỳnh Thị Kim Phương được hỗ trợ kinh phí NVTX bởi Đại học Quốc gia TP. HCM, Mã số TX2015-18-07.

Cloning and expression of recombinant carbapenemase KPC-2 enzyme in *E. coli* cytoplasm

- **Tran Nhat Phuong**
- **Huynh Thi Kim Phuong**
- **Phan Thi Phuong Trang**
- **Tran Linh Thuoc**

University of Science, VNU-HCM

- **Phạm Hùng Vân**

Nam Khoa Biotek Co. Ltd., Medicine & Pharmacy University of Ho Chi Minh City

ABSTRACT

Production of KPC-type carbapenemase is the most common carbapenem resistant mechanism in Klebsiella pneumoniae. The expression level of KPC in these strains is different and is mostly required other mechanisms to reach the higher resistant level such as porin lost or co-expression of extended spectrum β -lactamase (ESBL). To better understand the expression of KPC enzyme, the KPC-2 encoding genes from clinical isolated K. pneumoniae were cloned into pET28a plasmid. The recombinant plasmids containing of kpc-2 gene were subsequently transformed into E. coli OmniMax and were screened in kanamycin added LB media to select E. coli possessing of

recombinant plasmid. Carbapenemase activity in the broth culture was checked in LB broth supplemented with 4 μ g/mL of ertapenem and the expression induced with IPTG was checked by SDS-PAGE method. The results showed that this recombinant vector was capable of effective expression of KPC-2 protein in E. coli and this strain could be grown in LB broth supplemented with 4 μ g/mL of ertapenem. A half of the target protein was soluble in the supernatant however it could be successfully collected from a Histrap-HP affinity chromatography column. The result of this report is one of resources for further studies and applications of this KPC-2 protein in clinical research.

Key words: KPC, carbapenem, cloning, recombinant, pET28a, pHT2008

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. P.T. Binh, L.L.B. Ngan, N.T.H. Thuy, P.H. Van, Develop the kit using the broth micro-dilution method to carry out the MIC detecting antibiotic sensitivity testing in the clinical microbiology laboratory. Proceeding of the 2nd National Conference in Medical Molecular Biology, 200 – 202. (2010).
- [2]. Clinical and Laboratory Standard Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty Information Supplement, 30, M100-S20 (2010).
- [3]. L.M. Deshpande, P.R. Rhomberg, H.S. Sader, R.N. Jones, Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States medical centers: report from the MYSTIC Program (1999–2005), *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 56, 367–372 (2006).

-
- [4]. H. Yigit, A.M. Queenan, R.J. Kamile, J.W. Biddle, A. Antonio Domenech-Sanchez, S. Alberti, B. Karen, F.C. Tenover, Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -Lactamase KPC-2, *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 12, 3881–3889 (2003).
- [5]. H.H. Tran, S. Ehsani, K. Shibayama, M. Matsui, S. Suzuki, M.B. Nguyen, D.N. Tran, V.P. Tran, D.L. Tran, H.T. Nguyen, D.A. Dang, H.S. Trinh, T.H. Nguyen, H.F.L. Wertheim, Common isolation of New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae in a large surgical hospital in Vietnam, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 34, 1247–1254 (2015).
- [6]. J. Walther-Rasmussen*, N. Hoiby, Class A carbapenemases, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 470 – 482 (2007).
- [7]. P. Shen, Z. Wei, Y. Jiang, X. Du, S. Ji, Y. Yu, L. Li, Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4333–4338 (2009).
- [8]. T.N. Phương, P.H. Vân, T.L. Thuốc, Xác định sự hiện diện của gene mã hóa carbapenemase KPC-2 ở *Klebsiella pneumoniae* kháng kháng sinh carbapenem phân lập tại Việt Nam, *Tạp chí Y học Thực hành*, Bộ Y Tế, 78, 58 – 62 (2011).
- [9]. T.D. Gootz et al., Genetic Organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York city hospital, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 5, 1998 – 2004 (2009).
-