

Biểu hiện và tinh sạch listeriolysin O của *Listeria monocytogenes* mang hai đột biến điểm E247M và D320K trong *Bacillus subtilis*

- Ngô Khắc Huy
- Nguyễn Lê Tuấn Anh
- Huỳnh Thị Kim Phương
- Nguyễn Văn Phúc
- Trần Linh Thước
- Nguyễn Đức Hoàng
- Phan Thị Phượng Trang

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 17 tháng 07 năm 2015, nhận đăng ngày 20 tháng 08 năm 2016)

TÓM TẮT

Listeriolysin O (LLO) từ *Listeria monocytogenes* có chức năng phân hủy màng phospholipid ở điều kiện pH thấp trong quá trình xâm nhiễm tế bào chủ. Yếu tố này có thể ứng dụng trong việc phân phối tác chất vào trong mô nếu như LLO hoạt động được ở điều kiện pH trung tính và không chứa độc tố trong quá trình thu nhận LLO. Nghiên cứu này nhằm biểu hiện LLO đột biến E247M và D320K trên hệ thống *Bacillus subtilis* nhằm thu nhận LLOE247M và D320K có hoạt tính ở điều kiện pH trung tính.

Từ khóa: Listeriolysin O, E247M, D320K, *Bacillus subtilis*, Pgrac, pHT vectors system

Nhằm tăng cường khả năng biểu hiện protein trong *B. subtilis* và dễ dàng thu nhận bằng phương pháp tinh chế qua cột sắc kí chứa ion Ni^{2+} , gen mã hóa protein LLOE247M và D320K được dung hợp với trình tự đuôi LysSRN-6xHis-TEVsite. Kết quả đã tinh chế được protein tái tổ hợp có độ tinh sạch cao và có hoạt tính tán huyết với 3 HU độc tố trong khoảng pH từ 5,0 đến 8,5. Kết quả nghiên cứu này làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng tiếp theo.

MỞ ĐẦU

Listeria monocytogenes là một tác nhân gây bệnh có khả năng ký sinh nội bào một cách tùy ý. Để xâm nhiễm, tồn tại và nhân lên bên trong tế bào chủ, vi khuẩn cần sử dụng nhân tố độc lực quan trọng là listeriolysin O (LLO) [15]. Các chủng *L. monocytogenes* đột biến thiếu LLO (*hlyA*-) sẽ mất tính gây độc trên mô hình tế bào chuột [10]. Ngược lại, một số chủng vi khuẩn khác như *Bacillus subtilis* khi mang gen *hlyA* lại có hoạt tính tán huyết như *L. monocytogenes* hoang dại [2]. LLO là một thành viên trong họ

Cholesterol Dependent Cytolysins (CDCs), bao gồm các độc tố có khả năng hình thành lỗ trên màng chứa cholesterol và chủ yếu được tìm thấy ở các vi khuẩn Gram dương [13]. Ngoài chức năng hình thành cấu trúc lỗ trên màng, nhiều nghiên cứu đến nay đã cho thấy rằng LLO là một độc tố đa tác động lên tế bào chủ [15, 5]. Độc tố ban đầu được vi khuẩn tiết ra dưới dạng monomer, sau khi nhận diện các thụ thể cholesterol, chúng có khả năng biến đổi cấu hình và hình thành các cấu trúc lỗ (dạng oligomer) để

phá vỡ màng phagolysosome giúp giải phóng vi khuẩn ra bên ngoài tế bào chất [15]. Chính nhờ đặc tính hình thành lỗ trên màng mà LLO rất có tiềm năng ứng dụng trong một số chiến lược hỗ trợ vận chuyển tác chất (phân tử thuốc, kháng nguyên – kháng thể, plasmid DNA, antisense oligonucleotide) vào trong tế bào chất của tế bào chủ [6, 11]. Tế bào chất hay nhân tế bào là nơi hoạt động tiềm năng của nhiều tác chất, tuy nhiên việc đưa các đại phân tử vào đây gặp một vài khó khăn, mà chủ yếu do các chất khi vào tế bào đều bị giữ lại và tiêu hủy bên trong phagosome. Các nghiên cứu sử dụng liposome đồng vận chuyển tác chất cùng với LLO đã chứng minh làm tăng hiệu quả phân phối vào tế bào chất hơn dạng phân phối không sử dụng LLO [7, 8].

Tuy nhiên, khác với các thành viên còn lại trong họ CDCs, LLO có hoạt tính tốt nhất ở pH hơi acid (5,5) và hoàn toàn bị ức chế bởi pH trung tính hay kiềm (pH > 7,0) [3]. Nghiên cứu của Schuerch và cộng sự [1, 14] đã đưa ra một số giải thích về cơ chế hoạt động phụ thuộc vào pH của LLO dựa trên sự tương tác của các acid amin bên trong cấu trúc nội phân tử. Trong đó, một số đơn vị mang tính acid ở chuỗi α -helice thuộc domain D3 có vai trò quan trọng trong việc cảm biến với pH. Nhìn chung, các protein trong họ CDCs có cấu trúc chung bao gồm 4 domain, với các vai trò đặc trưng riêng biệt trong quá trình hình thành lỗ. Vai trò gắn màng do một số acid amine quan trọng trong domain D4 ở vị trí đầu C của protein đảm nhiệm. Trong khi đó, quá trình oligomer hóa được xảy ra với sự phối hợp hoạt động của 3 domain còn lại. Trong đó, domain D2 và D3 có vai trò quan trọng tạo nên sự tái sắp xếp dẫn đến biến đổi cấu hình của protein. Kết quả của quá trình tái sắp xếp này tạo ra hai cấu trúc β -hairpin từ hai α -helice để xuyên qua màng phospholipid. Ở điều kiện pH trung tính hay kiềm và nhiệt độ trên 30 °C, sự vươn ra sớm hơn của các α -helice này dẫn đến sự biến tính không

thuận nghịch và gây nên sự kết tụ của protein làm giảm đáng kể hoạt tính của chúng.

Dựa trên các nghiên cứu về cấu trúc protein, Schuerch cũng đã mô tả một số dạng đột biến ở các domain khác nhau của LLO làm thay đổi một số đặc tính quan trọng của chúng, đặc biệt là tính chất hoạt động phụ thuộc pH. Các dạng đột biến điểm như E247M, D208S, D320K, E355H và L461T đã được mô tả có khả năng cải thiện tính bền của LLO ở pH trung tính. Glu-247, Asp-320 và Glu-208 là các thành phần quan trọng để hình thành bộ cảm biến pH cho LLO. Đột biến điểm E247M cho thấy có khả năng cải thiện tính bền của protein ở pH 7,4. Dạng LLO mang đột biến D208S hay khi kết hợp với E247M có thể gây độc cho tế bào *E. coli*. Dạng đột biến D320K riêng lẻ có rất ít tác động lên tính bền của LLO, nhưng khi kết hợp với E247M lại có tác động đáng kể đến tính bền của protein trong điều kiện biến tính của pH. Khác với các dạng đột biến ở vị trí bộ ba cảm biến, hai dạng đột biến E355H và L461T cũng tạo nên các dạng LLO có hoạt tính ít bị tác động bởi yếu tố pH và nhiệt độ. Giả thuyết cho rằng cả hai dạng đột biến giúp tăng nhanh tốc độ tái sắp xếp nội phân tử để hình thành cấu trúc lỗ, nhờ đó vượt qua tác động của quá trình biến tính do pH. Do đó các đột biến dạng này có xu hướng làm tăng tốc độ hoạt động của protein ngay cả trong môi trường trung tính chứ không bảo vệ protein khỏi quá trình biến tính trong môi trường này. Tuy nhiên, cơ chế phân tử của hai dạng đột biến này vẫn còn nhiều tranh cãi và chưa được làm sáng tỏ hoàn toàn [14].

Với đặc tính phụ thuộc pH, LLO dạng tự nhiên (LLO^{WT}) gặp phải một số khó khăn khi cần chúng hoạt động trong môi trường có pH trung tính như dịch ngoại bào, túi phagosome sớm hay bên trong tế bào chất. Hiện nay, để sử dụng LLO^{WT} cho mục tiêu phân phối tác chất, cần phải sử dụng thêm các thành phần hỗ trợ như các dạng liposome đặc biệt để bảo vệ chúng tránh tiếp xúc với môi trường có pH bất lợi. Điều này làm tăng

độ phức tạp cho việc thiết kế và làm giảm hiệu quả của việc phân phối. Ngược lại, dạng LLO mang hai đột biến kép (LLO^{E247M/D320K}) được mô tả bởi Schuerch cho thấy có nhiều tiềm năng để thay thế LL^{OWT} trong các trường hợp cần protein hoạt động trong điều kiện pH trung tính. Khi LLO có khả năng hoạt động không phụ thuộc vào pH sẽ đẩy nhanh tốc độ giải phóng tác chất khỏi túi phagosome mà không cần đợi quá trình giảm pH môi trường nhờ dung hợp với lysosome, nơi chứa nhiều enzyme phân giải giúp phân hủy nhanh chóng các tác chất. Mặt khác, dạng đột biến còn tạo nhiều thuận lợi hơn cho việc biểu hiện, tinh chế và bảo quản protein tái tổ hợp vốn sử dụng chủ yếu môi trường pH trung tính.

Ngoài ra, để có được những ứng dụng rộng rãi, protein LLO không thể thu nhận trực tiếp từ *L. monocytogenes* mà cần được sản xuất ở dạng tái tổ hợp với quy mô lớn. Tuy nhiên, hiện nay để biểu hiện protein LLO tái tổ hợp, đa số các tác giả sử dụng hệ thống *E. coli*. Trái với hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp truyền thống này, *B. subtilis* được xem như chủng vi sinh vật an toàn (GRAS). Do đó, với mục tiêu sản xuất protein ứng dụng trong y học, hệ thống *B. subtilis* phù hợp hơn do không lẫn nội độc tố như các chủng

vi khuẩn Gram âm và việc tinh sạch khi đó sẽ tiết kiệm chi phí hơn. Bên cạnh đó, hệ thống vector pHT sử dụng promoter mạnh *Pgrac* với sự kiểm soát biểu hiện bằng chất cảm ứng IPTG cho phép biểu hiện tốt các protein mục tiêu trong nội bào hay tiết ra môi trường ở *B. subtilis* [9]. Trong nghiên cứu này, vector biểu hiện các dạng protein LLO trong *B. subtilis* đã được tạo dòng từ khung sườn là hệ thống plasmid pHT. Gen *mhlyA* đột biến được tạo ra từ *hlyA* hoang dại bằng phương pháp đột biến đa điểm định hướng.

VẬT LIỆU - PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, plasmid và môi nhân bản gen

Chủng vi sinh vật gồm *E. coli* OmniMAXTM (Invitrogen) sử dụng để dòng hóa gene và *B. subtilis* 1012 [12] để biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pHT322, pHT364 và pHT358 được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM. Môi cho phản ứng PCR được tổng hợp bởi công ty Macrogen Inc. Trình tự các môi được thể hiện trong Bảng 1. Sơ đồ vị trí bắt cặp môi được thể hiện như trong Hình 1.

Bảng 1. Trình tự các môi được sử dụng trong bài báo
(in đậm nghiêng: trình tự gây đột biến điểm, in đậm và gạch dưới: trình tự enzyme cắt giới hạn)

Tên môi	Trình tự nucleotide
ON317 – LLO – E247M_F	5' – GGGAAAAATGCAAGAAATGGTCATTAGTTTTAAACAAATTT ACTAT – 3'
ON318 – LLO – E247M_R	5' – GTTTAAACTAATGACCATTTCTTGCATTTTCCCTTCACTG ATTGCGCC – 3'
ON319 – LLO – D320K_F	5' – CATAGTACTAAAGTAAAAGCTGCTTTTAAAGCTGCCGTAA GCGG – 3'
ON320 – LLO – D320K_R	5' – CCGCTTACGGCAGCTTTAAAGCAGCTTTTACTTTAGTAC TATG – 3'
ON387 – F	5' – AAAGGAGGAAGGATCCATGAGTCAAGAAGAACATAACCA TGA – 3'
ON388 – R	5' – ATGCATCCATGGATCCCTGGAAGTACAGGTTCTCACCGC – 3'
HlyA – R02 – AatII	5' – GGCCATGACGTCTTCGATTGGATTATCTACTTTATTACTA TA – 3'



Hình 1. Sơ đồ vị trí bắt cặp các mồi

Hóa chất và một số vật liệu sinh học khác

Enzyme *Pfu* DNA polymerase và các enzyme cắt giới hạn bao gồm *Bam*HI, *Aat*II được cung cấp bởi công ty Thermo Scientific, enzyme *Taq* DNA polymerase được cung cấp bởi công ty HT Biotech. Các bộ kit và hóa chất cơ bản sử dụng trong nghiên cứu sinh học phân tử và nuôi cấy vi sinh được cung cấp bởi các công ty Qiagen, GE Healthcare, Thermo Scientific, Sigma-Aldrich, Merck-Millipore và BioBasic. Máu cừu được cung cấp bởi công ty Nam Khoa Biotek ở dạng tuýp 10 mL được giữ lạnh ở 4 °C đến khi sử dụng.

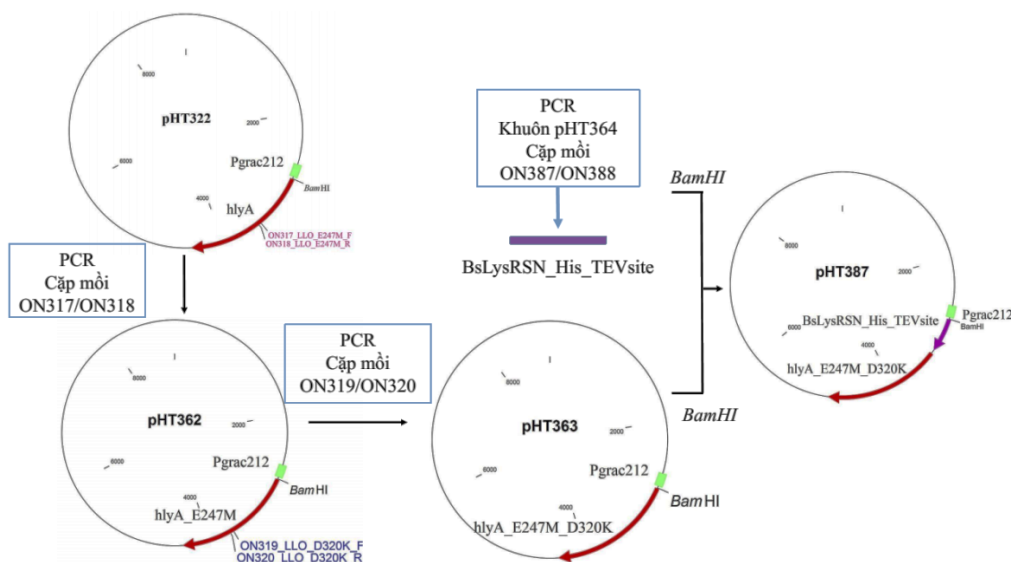
Tạo plasmid pHT363

Plasmid pHT362 mang gen *mhlyA* đột biến được tạo ra bằng cách gây đột biến điểm định hướng trên plasmid pHT322 mang gen *hlyA* hoang dại từ *L. monocytogenes* bằng phản ứng PCR với cặp mồi ON317 và ON318 chứa vị trí đột biến điểm E247M. Plasmid gốc sau đó được loại bỏ bằng enzyme *Dpn*I. Sản phẩm sau xử lý được biến nạp vào tế bào *E. coli* OmniMAX và sàng lọc trên đĩa kháng sinh chứa ampicillin 100 µg/mL và giải trình tự vùng gene đột biến. Tương tự như plasmid pHT362, plasmid pHT363 mang gen *mhlyA* chứa cả hai đột biến điểm E247M và

D320K, được tạo ra bằng phản ứng PCR với cặp mồi ON319 và ON320 và khuôn là plasmid pHT362.

Tạo plasmid pHT387

Plasmid pHT387 được tạo dòng từ plasmid pHT363 chèn thêm đoạn trình tự mã hóa đuôi tinh chế LysSRN-6xHis-TEV site giúp protein mục tiêu được biểu hiện tốt hơn trong *B. subtilis* và dễ dàng tinh sạch bằng sắc ký ái lực với ion Ni^{2+} . Đoạn trình tự gene *LysSRN-6xHis-TEVsite* được thu nhận bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu ON387/ON388 và khuôn pHT364. Sản phẩm PCR và plasmid pHT363 cùng được xử lý với enzyme cắt *Bam*HI và nối lại với nhau bằng T4 DNA ligase. Hỗn hợp sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* OmniMAX, sàng lọc bằng kháng sinh ampicillin 100 µg /mL, PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON387 và HlyA_R02_AatII (Hình 1) và giải trình tự kiểm tra đoạn DNA được chèn bằng mồi ON653. Các plasmid được tạo dòng thành công mang gen *mhlyA* đột biến dung hợp với trình tự đuôi tinh chế *LysSRN-6xHis-TEVsite* được đặt tên pHT387. Sơ đồ tóm tắt các bước tạo vector pHT387 được thể hiện trên Hình 2.



Hình 2. Sơ đồ tạo vector pHT387

Khảo sát biểu hiện và lên men thu nhận sinh khối chủng *B. subtilis* 1012 mang vector pHT387

Plasmid pHT387 sau khi dòng hóa thành công được biến nạp vào chủng *B. subtilis* 1012 bằng phương pháp biến nạp tự nhiên. Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường LB – agar chứa chloramphenicol 10 µg/mL được chọn để kiểm tra mức độ biểu hiện ở các nồng độ IPTG cảm ứng từ 0 đến 1 mM bằng phương pháp SDS-PAGE. Sau đó, protein được biểu hiện khi nuôi cấy ở các nhiệt độ 27 °C, 32 °C và 37 °C được kiểm tra tính tan. Sinh khối tế bào vi khuẩn được phá bằng sóng siêu âm. Ly tâm nhẹ ở 2000 g trong 1 phút để loại bỏ các tế bào chưa vỡ. Dịch protein tổng sau đó tiếp tục được ly tâm 13000 vòng/phút trong 5 phút để phân tách phân đoạn tủa và tan. Kiểm tra lượng protein trong các phân đoạn bằng phương pháp SDS-PAGE.

Tiến hành nuôi cấy 4 lít dịch vi khuẩn *B. subtilis* 1012 mang vector pHT387 trong hệ thống lên men 5 L. Các thông số cơ bản của quá trình lên men được kiểm soát như tốc độ khuấy 400 vòng/phút, tốc độ sục khí 4 lít/phút, pH 7,0

và nhiệt độ nuôi cấy cũng như nồng độ chất cảm ứng được tối ưu từ khảo sát trên. Thời điểm cảm ứng biểu hiện protein mục tiêu vào đầu pha log, khi giá trị OD_{600nm} của dịch nuôi cấy khoảng 2,0. Tiếp tục theo dõi đường cong tăng trưởng trong quá trình nuôi cấy và kết thúc mẻ lên men khi vào đầu pha cân bằng.

Tinh chế protein LLO^{E247M/D320K}

Hyền phù sinh khối với 3V (so với trọng lượng sinh khối) dung dịch đệm ly giải chứa 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol, 10 mM imidazole, 1 mg/mL lysozyme, 1 mg/mL DNaseI và 1 mM PMSF. Phá tế bào bằng sóng siêu âm trong bể đá, biên độ sóng (Amplitude) 70 trong 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 10 giây phá và 30 giây nghỉ. Ly tâm 13000 g trong 20 phút ở 4 °C, thu nhận phần dịch nổi cho chảy qua cột Histrap HP 5 mL (GE Healthcare). Rửa cột bằng đệm ly giải với thể tích gấp 10 lần thể tích cột và dung ly protein mục tiêu bằng dung dịch chứa 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 % glycerol và 40 - 250 mM imidazole.

Protein dung hợp LysSRN-6xHis-TEVsite-LLO^{E247M/D320K} sau khi được dung ly khỏi cột Histrap được cắt loại bỏ đuôi dung hợp bởi TEV protease (tỷ lệ LysSRN-6xHis-TEVsite-LLO^{E247M/D320K}: TEV protease là 30 : 1 wt/wt) trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng trong dung dịch cắt 50 mM PIPES pH 6,0, 300 mM NaCl, 15 % glycerol, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT. Protein LLO^{E247M/D320K} được thu nhận từ phân đoạn chảy qua cột Histrap HP 5 mL. Kiểm tra protein sau tinh chế bằng phương pháp SDS-PAGE. Dịch protein tinh sạch được bổ sung với 10 mM EDTA, 5 mM cystein và bảo quản ở -80 °C đến khi sử dụng.

Dạng LLO hoang dại (LLO^{WT}) được mã hóa bởi gene *hlyA* trên plasmid pHT358 cũng được biểu hiện trong *B. subtilis* và tinh sạch theo quy trình đã được công bố trong một nghiên cứu khác của nhóm.

Xác định khối lượng phân tử bằng LC-MS

Protein LLO^{E247M/D320K} 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.

Khảo sát hoạt tính tán huyết của protein LLO tinh sạch

Phương pháp phân tích hoạt tính tán huyết được thực hiện theo quy trình của Giammarini và cộng sự [4] có cải biên. Dịch máu cừu được rửa ba lần với PBS, pH 7,4 để loại bỏ huyết thanh và ly tâm ở 1.700 g trong 5 phút ở 4 °C để thu nhận tế bào hồng cầu. Pha loãng tế bào hồng cầu trong PBS về nồng độ sao cho 0,5 mL dịch tế bào hồng cầu được ly giải hoàn toàn với 1 mL Triton X-100 0,1 % cho phổ hấp thụ A_{541nm} đạt giá trị 2,0. Dịch tế bào hồng cầu cừu được bảo quản ở 4 °C không quá ba ngày trước khi sử dụng.

Hoạt tính tán huyết của độc tố được thể hiện bằng đơn vị tán huyết (HU) trên mỗi mg protein

độc tố. Một đơn vị hoạt tính tán huyết (1 HU) là lượng độc tố thấp nhất (hay độ pha loãng cao nhất) gây giải phóng một nửa hemoglobin (50 % ly giải) từ dung dịch hòa tan tế bào hồng cầu. Độ hấp thụ tối ưu của hemoglobin được xác định ở bước sóng $A_{541 nm}$. Các mẫu ly giải sử dụng làm đối chứng được chuẩn bị bằng phản ứng của 0,5 mL dịch pha loãng hồng cầu với một mL dung dịch Triton X-100 0,1 % (đối chứng dương) và 1 mL dung dịch PBS ở pH tương ứng dùng để pha loãng độc tố có bổ sung 0,1 % BSA và 1 mM DTT (đối chứng âm).

Protein LLO^{E247M/D320K} (được xem như độc tố đối với tế bào hồng cầu) nồng độ 1 mg/mL được pha loãng bậc 10 trong PBS được bổ sung với 0,1 % BSA và 1 mM DTT đến nồng độ 1 ng/mL (10⁻⁶). Ủ 1 mL dịch pha loãng độc tố với 0,5 mL dịch hồng cầu cừu trong 45 phút ở 37 °C. Ly tâm 1700 g trong 5 phút ở 4 °C và đo phổ hấp thụ A_{541nm} của dịch nổi thu được. Các thử nghiệm được lặp lại ba lần. Kết quả được thể hiện bằng đồ thị phần trăm tán huyết dựa trên giá trị đo A_{541nm} .

Hoạt tính tán huyết của hai dạng protein LLO^{WT} và LLO^{E247M/D320K} ở các giá trị pH khác nhau

Sử dụng 1 mL dịch pha loãng độc tố chứa 3 HU độc tố trong PBS có pH từ 5,0 đến 8,5 cho thí nghiệm khảo sát hoạt tính tán huyết của các dạng protein với pH. Quy trình tiến hành tương tự như được mô tả ở trên. Các thử nghiệm được lặp lại ba lần và giá trị sai số được thể hiện bằng thanh sai số trên đồ thị.

KẾT QUẢ - THẢO LUẬN

Kết quả dòng hóa vector pHT387

Sau khi gây đột biến điểm định hướng trên plasmid pHT322 và pHT362 để tạo thành plasmid pHT363 có chứa gen mã hóa cho protein LLO được thay thế amino acid glutamate (E) ở vị trí 247 thành methionine (M) và aspartate (D) ở vị trí 320 thành lysine (K) (Hình 3). Đoạn gen mã hóa đuôi dung hợp *LysSRN-6xHis-TEVsite* được

chèn vào plasmid pHT363 tạo thành pHT387. Plasmid này được biến nạp vào chủng *E. coli* OmniMAX và sàng lọc trên đĩa môi trường chứa kháng sinh ampicillin tiếp tục sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON387 và HlyA_R02_AatII. Chọn 1 khuẩn lạc cho phản ứng PCR khuẩn lạc dương tính (kích thước sản phẩm 2059 bp trên gel agarose 1,5 %) được nuôi

cấy để tách chiết plasmid và giải trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy sự tương đồng 100 % với trình tự lý thuyết trên vector pHT387 (kết quả không trình bày). Như vậy, vector pHT387 mang gen *mhlyA* có hai vị trí đột biến điểm và dung hợp với gen *LysSRN-6xHis-TEVsite* đã được dòng hóa thành công.

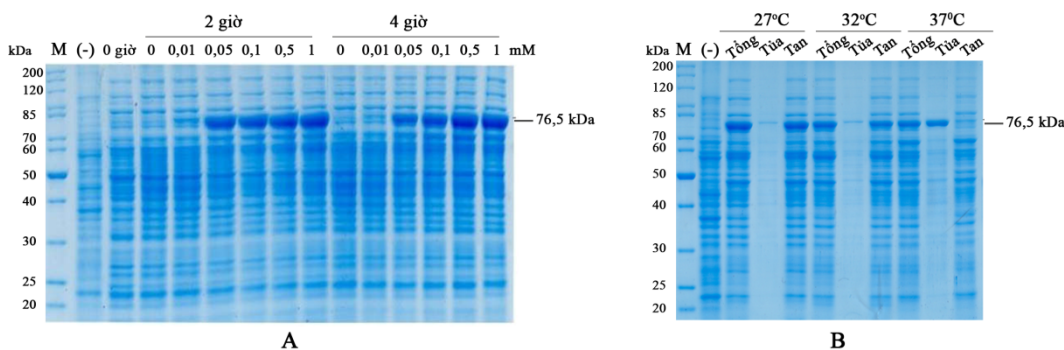
```

LLO_wt      241 egkmqeevisfkqiyyvnnvneptrpsrffgkavtkeqlqalgvnaenppayissvaygr
LLO_E247M_D320K 241 .....m.....

LLO_wt      301 qvylklstnshstkvkaafdaavsgksvsgdveltniiknssfakviygg sakdevqiid
LLO_E247M_D320K 301 .....k.....
    
```

Hình 3. Vị trí đột biến điểm thay thế trên protein LLO^{E247M/D320K}

Kết quả biểu hiện protein LLO^{E247M/D320K} dạng dung hợp với LysSRN-6xHis-TEVsite trong *B. subtilis*



Hình 4. Kết quả điện di SDS-PAGE khảo sát điều kiện cảm ứng biểu hiện của protein mục tiêu theo (A) Nồng độ IPTG cảm ứng khảo sát (B) Nhiệt độ nuôi cấy biểu hiện. M: thang protein, (-): Đối chứng âm, chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT01 không mang gen mục tiêu

Kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện của protein dung hợp trong chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT387 ở thời điểm 2 và 4 giờ sau cảm ứng cho thấy, khi tăng nồng độ chất cảm ứng từ 0 đến 1 mM, lượng protein mục tiêu được biểu hiện tăng dần. Tuy nhiên, khi so sánh mức độ biểu hiện ở nồng độ 0,5 và 1 mM không thấy có sự thay đổi đáng kể (Hình 4A). Như vậy nồng độ IPTG 0,5 mM là thích hợp cho việc cảm ứng biểu hiện protein mục tiêu.

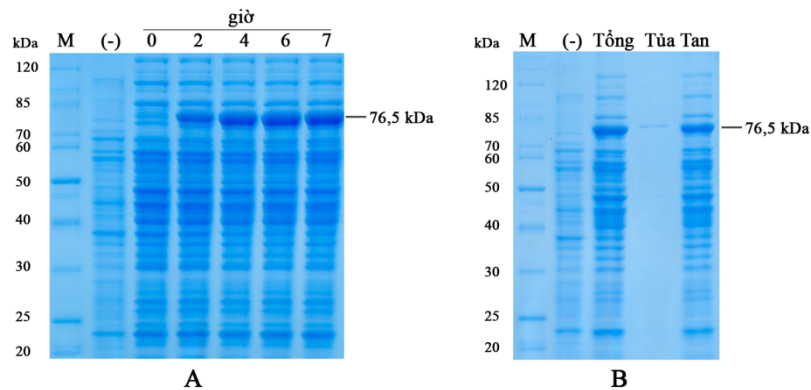
Tính tan là một trong những đặc tính quan trọng tạo thuận lợi cho bước tinh chế protein. Trong đó nhiệt độ nuôi cấy là thông số quan trọng ảnh hưởng đến tính tan của protein mục

tiêu. Kết quả điện di phân tích các phân đoạn tổng – tủa – tan của mẫu sinh khối được nuôi cấy ở 27 °C, 32 °C và 37 °C trên gel SDS-PAGE cho thấy ở 37 °C hầu hết vạch protein mục tiêu (76 kDa) nằm trong pha tủa. Ngược lại, ở nhiệt độ 27 °C và 32 °C hầu hết protein đều nằm trong pha tan (có thể do tốc độ tăng trưởng nhanh và biểu hiện mạnh ở 37 °C làm hạn chế quá trình gấp cuộn đúng của protein mục tiêu. Bên cạnh đó, kết quả theo dõi đường cong tăng trưởng của chủng vi khuẩn tái tổ hợp cho thấy khi nuôi cấy ở nhiệt độ 27 °C, pha tăng trưởng kéo dài hơn và OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy ở đầu pha cân bằng cao hơn, do đó thu được nhiều sinh khối hơn so với nuôi cấy

ở 32 °C (dữ liệu không trình bày). Như vậy, nhiệt độ 27 °C là thích hợp cho nuôi cấy và cảm ứng biểu hiện để thu được lượng protein mục tiêu nhiều nhất và có tính tan tốt nhất.

Kết quả nuôi cấy biểu hiện quy mô lớn trong bồn lên men được kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12 % cho thấy, mức độ biểu hiện của protein mục tiêu theo thời gian từ thời điểm 4 giờ sau cảm ứng đến khi kết thúc quá trình lên men (lúc 7 giờ) không có sự thay đổi đáng kể (Hình 5A). Như vậy, quá trình lên men nuôi cấy kết thúc ở đầu

pha cân bằng (7 giờ) là thích hợp, vì với lượng sinh khối thu được cao nhất trong khi lượng protein LLO^{E247M/D320K} biểu hiện trên một đơn vị sinh khối không bị ảnh hưởng. Để xác nhận lại mức độ tan của protein mục tiêu khi nuôi cấy lên men so với nuôi cấy khảo sát quy mô nhỏ trước đó, mẫu sinh khối ở thời điểm kết thúc mẻ lên men được thu nhận làm kiểm tra tổng – tủa – tan như trên. Kết quả SDS-PAGE cho kết quả tương tự như các khảo sát, phần lớn protein LLO^{E247M/D320K} tái tổ hợp ở dạng tan (Hình 5B).



Hình 5. Kết quả điện di SDS-PAGE khả năng biểu hiện protein trong quá trình nuôi cấy lên men; (A) Kết quả khảo sát biểu hiện theo thời gian (B) Kết quả tổng – tủa – tan. M: thang protein, (-): Đối chứng âm, chủng *B. subtilis* mang plasmid pHT01 không mang gen mục tiêu

Kết quả tinh chế protein LLO^{E247M/D320K}

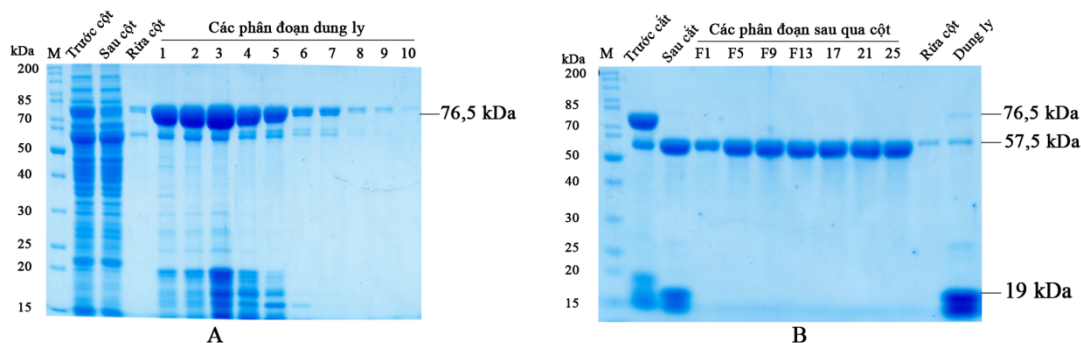
Với thiết kế mang trình tự dung hợp LysSRN-6xHis-TEVsite, trong đó đuôi 6xHis có ái lực cao với ion Ni²⁺ trên cột Histrap HP cho phép dễ dàng thu nhận protein LLO^{E247M/D320K} dung hợp và loại bỏ đáng kể các protein tạp của tế bào nhờ một bước qua cột sắc ký. Kết quả điện di các mẫu protein trước khi qua cột và sau khi qua cột cho thấy phần lớn lượng protein dung hợp đã được gắn và giữ lại trên cột, trong khi đó hầu hết các protein cơ bản của *B. subtilis* không có khả năng bắt lên cột nên bị loại bỏ trong phân đoạn sau cột. Kết quả dung ly với nồng độ imidazole tăng dần từ 40 đến 120 mM (Hình 6A, phân đoạn 1 đến 7) cho thấy gần như toàn bộ protein LLO^{E247M/D320K} dung hợp bám trên cột đã

được thu nhận, trong khi từ phân đoạn 160 mM imidazole (8 – 10) trở đi còn lại rất ít protein mục tiêu trên cột (Hình 6A). Như vậy, protein LysSRN-6xHis-TEVsite-LLO^{E247M/D320K} đã được tinh chế thành công. Tuy nhiên vẫn còn một lượng đáng kể protein tạp lẫn với protein mục tiêu trong các phân đoạn dung ly (1 – 5).

Protein tái tổ hợp sau khi tinh chế đã được cắt loại bỏ đuôi dung hợp khỏi protein mục tiêu tại vị trí nhận biết của enzyme TEV protease (ENLYFQ). So sánh kết quả điện di các phân đoạn trước cắt và sau cắt nhận thấy rằng vạch protein dung hợp ~ 76,5 kDa đã được cắt hầu như hoàn toàn thành hai vạch protein có kích thước 57,5 kDa và 19 kDa. Sau khi cắt không còn mang đuôi poly-histidine nên khi chảy lại qua cột

Histrap lần thứ hai sẽ không được giữ lại trên cột và được thu nhận thành các phân đoạn sau qua cột (Hình 6B, F1 – F25). Ngược lại, tất cả các thành phần còn lại trong hỗn hợp sau khi cắt gồm đuôi dung hợp, TEV protease và các protein tạp có khả năng bám với Ni^{2+} nên được giữ lại trên cột. Các phân đoạn này được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE, cho thấy các phân

đoạn sau qua cột F1 đến F25 chỉ còn 1 vạch protein có kích thước 57,5 kDa đúng với dự đoán. Phân đoạn dung ly sau đó cho thấy đuôi dung hợp, TEV protease và các protein tạp đã bám lại trên cột (Hình 6B). Kết quả từ 4 lít dịch nuôi cấy thu được 50 mg protein LLO^{E247M/D320K} tinh sạch.



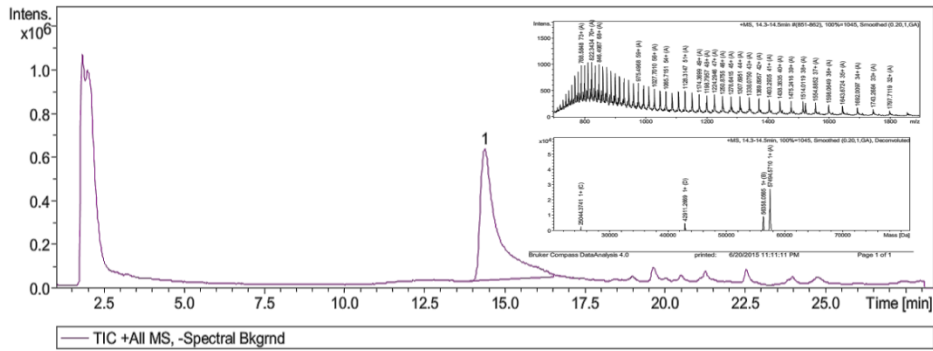
Hình 6. Kết quả SDS-PAGE phân tích quá trình tinh chế protein LLO^{E247M/D320K}. (A): Tinh chế protein dung hợp LysSRN-6xHis-TEVsite-LLO; (B): Cắt loại bỏ đuôi dung hợp và thu nhận LLO^{E247M/D320K} tinh sạch

Kết quả phân tích khối lượng phân tử bằng LC-MS

Dung dịch protein tinh sạch được pha loãng về nồng độ 1 mg/mL trước khi phân tích phổ LC-MS. Kết quả cho thấy một cấu tử protein có khối lượng phân tử 57, 494, 5710 Da (Hình 7) so với khối lượng 57, 492, 47 Da của protein LLO^{E247M/D320K} được tính toán lý thuyết dựa trên trình tự bằng công cụ phân tích PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/). Tương tự, kết quả phân tích phổ LC-MS của LLO dạng hoang dại cho kết cấu protein có khối lượng 57,479,4874 Da (so với 57,477,31 Da theo lý thuyết) (đã được công bố trước đó bởi chính nhóm nghiên cứu). Kết quả này cho thấy với độ sai số khối lượng không quá 2 Da, protein tinh

sạch thu nhận được trong dung dịch sau khi tinh chế chính xác là protein LLO^{E247M/D320K} mục tiêu. Đồng thời kết quả này cũng chứng minh rằng đã cắt loại bỏ thành công đuôi dung hợp ra khỏi protein mục tiêu.

Bên cạnh đó, với sự thay thế hai amino acid (Glu → Met và Aps → Lys) theo lý thuyết sẽ tạo ra protein LLO đột biến có khối lượng phân tử tăng thêm khoảng 15 Da so với dạng hoang dại. Và kết quả so sánh khối lượng thực tế của hai dạng protein theo phân tích LC-MS cho thấy hoàn toàn phù hợp với lý thuyết trên. Như vậy có thể kết luận rằng đã biểu hiện và tinh chế thành công protein mục tiêu với độ tinh sạch khá cao bằng hai bước qua cột Histrap.



Hình 7. Kết quả phân tích phổ LC-MS dạng LLO^{E247M/D320K}

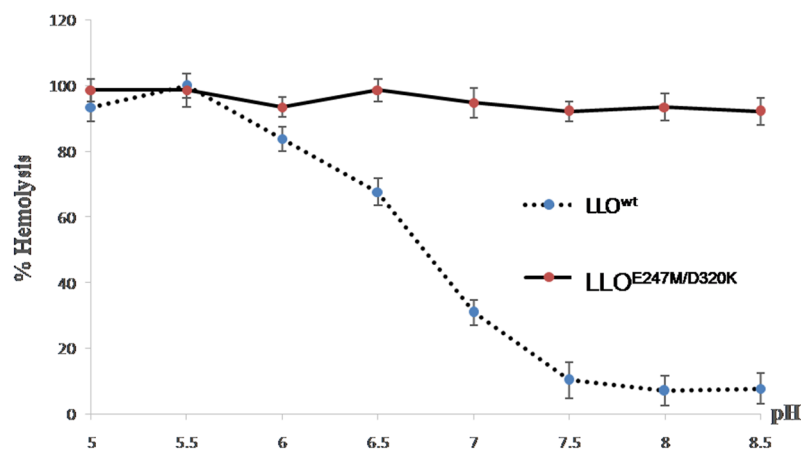
Hoạt tính tán huyết của hai dạng protein LLO^{wt} và LLO^{E247M/D320K}

Kết quả 1 HU của protein LLO^{wt} và LLO^{E247M/D320K} tương đương với lượng độc tố lần lượt 3,75 ng và 12 ng. Như vậy, theo quy trình đo hoạt tính trong nghiên cứu, hoạt tính riêng của hai dạng protein này lần lượt là $2,67 \times 10^5$ và $8,3 \times 10^4$ HU/mg protein. Với kết quả này có thể thấy protein đột biến có hoạt tính riêng thấp hơn khoảng 3 lần so với LLO dạng hoang dại.

Hoạt tính tán huyết ở các giá trị pH khác nhau

Một lượng HU bằng nhau của cả hai dạng protein (3 HU) được pha loãng trong 1 mL PBS

có pH từ 5,0 đến 8,5. Kết quả kiểm tra hoạt tính tán huyết theo pH cho thấy protein LLOWT cho hoạt tính tối ưu nhất ở khoảng 5,5 và hầu như protein bị mất hoàn toàn hoạt tính ở pH cao hơn 7,0 (Hình 8). Điều này là hoàn toàn phù hợp với đặc tính của protein LLO dạng hoang dại được công bố bởi nhiều nghiên cứu trước đây. Ngược lại, hoạt tính của dạng LLO mang hai đột biến điểm E247M và D320K vẫn giữ được trên 90 % hoạt tính ở pH kiềm. Kết quả này cho thấy rằng protein LLO mang hai đột biến có hoạt tính bền hơn hẳn so với dạng LLO hoang dại ở pH trung tính đến kiềm nhẹ như mong đợi.



Hình 8. Hoạt tính tán huyết ở các giá trị pH khác nhau

KẾT LUẬN

Đã tạo được chủng *B. subtilis* có khả năng biểu hiện LLO^{E247M/D320K} hiệu quả. Từ 30 g sinh khối vi khuẩn đã thu nhận được 50 mg protein LLO^{E247M/D320K} có độ tinh sạch cao qua hai bước tinh chế qua cột Histrap. Hoạt tính của LLO^{E247M/D320K} ở pH trên 7,0 tốt hơn hẳn LLO dạng tự nhiên. Tính chất này tạo nhiều thuận lợi cho việc ứng dụng protein này, cũng như đơn giản hóa các thao tác như thu nhận, tinh chế, bảo

quản vốn sử dụng thường xuyên môi trường pH trung tính. Bên cạnh đó, hệ thống *B. subtilis* hoàn toàn có thể biểu hiện tốt protein LLO dạng đột biến này và mở ra thêm lựa chọn cho các nghiên cứu ứng dụng liên quan.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ một phần kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP Hồ Chí Minh. Huỳnh Thị Kim Phương được hỗ trợ bởi Đại Học Quốc gia Tp. HCM từ kinh phí nhiệm vụ thường xuyên.

Expression and purification of listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* harbouring E247M and D320K mutations in *Bacillus subtilis*

- Ngo Khắc Huy
- Nguyen Le Tuan Anh
- Huỳnh Thị Kim Phương
- Nguyen Van Phuc
- Tran Linh Thuoc
- Nguyen Duc Hoang
- Phan Thi Phuong Trang

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Listeriolysin O (LLO) is an important extracellular toxin of *Listeria monocytogenes* which degrades the phospholipid membranes of the host cells' phagosomes at low pH during the intracellular survival. In contrast to the natural form, the mutant LLO carrying two replacements of amino acid E247M and D320K possesses stable activity at pH 7.4. In this study, we have constructed vectors that carry the *mhlyA* gene encoding double-mutated LLO^{E247M/D320K} express in *B. subtilis* 1012. The target gene was fused to the sequence of LysRN-6xHis-TEV site to enhance the recombinant protein expression in *B.*

subtilis and to ease the acquisition of protein by Ni²⁺-based affinity chromatography. As results, we have obtained the purified protein LLO^{E247M/D320K} with high purity. The activity measurement with 3 HU hemolytic toxins in the pH range from 5.0 to 8.5 suggested that the activity of LLO^{E247M/D320K} was much better than that of natural LLO at neutral pH and slightly alkaline. These results not only provided important scientific foundations for mutant LLO bases expression in *B. subtilis* but also supplied purified materials for research and medical applications based on this protein.

Key words: Listeriolysin O, *Listeria monocytogenes*, E247M, D320K, *Bacillus subtilis*, pHT vector system

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. Bavdek, R. Kostanjšek, V. Antonini, J.H. Lakey, M. Dalla Serra, R.J.C. Gilbert, G. Anderluh, pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability, *The FEBS Journal*, 279, 1, 126–141 (2012).
- [2]. J. Bielecki, P. Youngman, P. Connelly, D.A. Portnoy, *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells, *Nature*, 345, 6271, 175–176 (1990).
- [3]. C. Geoffroy, J.L. Gaillard, J.E. Alouf, P. Berche, Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*, *Infection and Immunity*, 55(7), 1641–1646 (1987).
- [4]. C. Giammarini, F. Andreoni, G. Amagliani, A. Casiere, S. Barocci, M. Magnani, High-level expression of the *Listeria monocytogenes* listeriolysin O in *Escherichia coli* and preliminary characterization of the purified protein, *Protein Expression and Purification*, 28, 1, 78–85 (2003).
- [5]. S. Kayal, A. Charbit, Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions, *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 4, 514–529 (2006).
- [6]. K.D. Lee, Y.K. Oh, D.A. Portnoy, J.A. Swanson, Delivery of macromolecules into cytosol using liposomes containing hemolysin from *Listeria monocytogenes*, *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 13, 7249–7252 (1996).
- [7]. M. Mandal, K.D. Lee, Listeriolysin O-liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecule antigen in vivo: enhancement of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte frequency, activity, and tumor protection, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1563, 1–2, 7–17 (2002).
- [8]. E. Mathew, G.E. Hardee, C.F. Bennett, K.D. Lee, Cytosolic delivery of antisense oligonucleotides by listeriolysin O-containing liposomes, *Gene Therapy*, 10(13), 1105–1115 (2003).
- [9]. T.T.P. Phan, H.D. Nguyen, W. Schumann, Novel plasmid-based expression vectors for intra - and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Protein Expression and Purification*, 46, 2, 189–195 (2006).
- [10]. D.A. Portnoy, P.S. Jacks, D.J. Hinrichs, Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*, *The Journal of Experimental Medicine*, 167, 4, 1459–1471 (1988).
- [11]. C.J. Provoda, K.D. Lee, Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41, 2, 209–221 (2000).
- [12]. H. Saito, T. Shibata, T. Ando, Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg, *Molecular & General Genetics: MGG*, 170(2), 117–122 (1979).
- [13]. P. Schnupf, D.A. Portnoy, Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin, *Microbes and Infection*, 9, 10, 1176–1187 (2007).
- [14]. D.W. Schuerch, E.M. Wilson-Kubalek, R.K. Tweten, Molecular basis of listeriolysin O pH dependence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 35, 12537–12542 (2005).
- [15]. S. Seveau, Multifaceted activity of listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytotoxin of *Listeria monocytogenes*, *Subcellular Biochemistry*, 80, 161–195 (2014).