

Nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch chaperone AcrH của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* sử dụng vật chủ *Escherichia coli*

Nguyễn Văn Sáng*, Nguyễn Thị Uyên

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

Ngày nhận bài 4/3/2021; ngày chuyển phản biện 8/3/2021; ngày nhận phản biện 23/4/2021; ngày chấp nhận đăng 29/4/2021

Tóm tắt:

Vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* là vi khuẩn gram âm, sử dụng hệ tiết loại III (T3SS). Đây là hệ tiết đóng vai trò quan trọng trong các tương tác của vi khuẩn với tế bào vật chủ, đặc biệt là quá trình xâm nhập vào tế bào vật chủ. Vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh cho nhiều đối tượng sinh vật khác nhau, bao gồm cả người và thủy sản (đặc biệt là các vật nuôi có giá trị kinh tế cao ở Việt Nam và thế giới như các loại cá, tôm, lưỡng cư). Protein chaperone AcrH có vai trò giúp translocator chính AopB và translocator phụ AopD tồn tại trong tế bào chất của *A. hydrophila* ở trạng thái ổn định trước khi chúng tham gia hình thành cấu trúc của T3SS. Các nghiên cứu trước đây mới chỉ phân tích được cấu trúc của protein AcrH ở dạng kết hợp với protein AopB, nhưng ở dạng không liên kết với protein AopB vẫn chưa được làm sáng tỏ. Điều này làm cho hiểu biết về cơ chế hình thành T3SS bị hạn chế. Do đó, mục đích của nghiên cứu là tinh sạch chaperone AcrH với độ tinh sạch cao, giúp phát triển nghiên cứu cấu trúc của protein này, góp phần làm sáng tỏ cơ chế hình thành kênh chuyển vị xuyên màng của T3SS ở vi khuẩn *A. hydrophila* cũng như ở nhiều vi khuẩn gram âm khác. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã thiết kế thành công vector biểu hiện pET-28a mang gen mã hóa cho chaperone AcrH từ axit amin 21 đến 158 và biểu hiện thành công trên chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3). Protein tái tổ hợp AcrH được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng hạt niken với độ tinh sạch đạt trên 99%. Protein AcrH được tinh sạch với độ tinh sạch cao sẽ tiếp tục được sử dụng cho các nghiên cứu cấu trúc, góp phần hoàn thiện cơ chế gây bệnh của các vi khuẩn gram âm, từ đó có thể phát triển các nghiên cứu về cơ chế điều trị bệnh do các vi khuẩn này gây ra.

Từ khóa: biểu hiện gen, chaperone AcrH, protein tái tổ hợp, sắc ký ái lực.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Hệ tiết loại 3 (T3SS) là hệ thống vi tiêm siêu nhỏ được nhiều vi khuẩn gram âm sử dụng để xâm nhập vào tế bào vật chủ và gây bệnh. Vi khuẩn *A. hydrophila* sử dụng T3SS để gây bệnh trên nhiều đối tượng sinh vật khác nhau [1, 2], bao gồm cả người và thủy sản, đặc biệt là các vật nuôi có giá trị kinh tế cao đối với một nước nông nghiệp như Việt Nam, đó là các loại cá, tôm, lưỡng cư, gia súc [3-5]. Để tìm ra được các loại chất ức chế nhằm ngăn chặn và tiêu diệt các loại vi khuẩn này thì trước hết cần hiểu rõ được cấu trúc và chức năng của T3SS.

T3SS cấu tạo từ hơn 20 loại protein, gồm 3 phần chính: phần thân gốc ở màng tế bào vi khuẩn; phần kim tiêm có cấu tạo dạng ống rỗng có một đầu hướng ra ngoài môi trường và gắn vào tế bào vật chủ; phần kênh chuyển vị tiếp nối giữa phức hệ đầu mút và xuyên qua màng tế bào vật chủ [2, 6]. Khi có tín hiệu từ phức hệ đầu mút, kênh chuyển

vị được hình thành trên màng tế bào vật chủ và được cấu tạo từ 2 loại protein chuyển vị chính và phụ (ở vi khuẩn *A. hydrophila*, hai protein này được ký hiệu là AopB và AopD) [7]. Các protein chuyển vị chính và phụ đều chứa các vùng xuyên màng có tính kỵ nước rất cao. Do đó, trước khi được vận chuyển đến bề mặt tế bào vật chủ để hình thành nên kênh chuyển vị xuyên màng, thì các protein này được bảo vệ bởi protein chaperone lớp II tồn tại trong tế bào chất. Ở vi khuẩn *A. hydrophila*, protein chaperone lớp II là AcrH [8]. Hiện nay, cơ chế phân tử của quá trình hình thành nên phức hệ kênh chuyển vị vẫn chưa được làm sáng tỏ. Công bố năm 2015 của Nguyễn Văn Sáng và cộng sự đã chỉ ra cấu trúc tinh thể của phức hệ AcrH kết hợp với vùng xuyên màng của AopB. Cấu trúc này giải thích được sự tương tác AcrH với AopB, và AcrH có vai trò làm ổn định vùng xuyên màng của AopB [9]. Tuy nhiên, cấu trúc của AcrH ở dạng không liên kết vẫn chưa được làm sáng tỏ, và hạn chế sự hiểu biết về cơ chế biến đổi tương tác giữa dạng không liên

*Tác giả liên hệ: Email: nvsangynu@gmail.com

Cloning, expression, and purification of chaperone AcrH from *Aeromonas hydrophila* using *Escherichia coli* host cells

Van Sang Nguyen*, Thi Uyen Nguyen

Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi

Received 4 March 2021; accepted 29 April 2021

Abstract:

Aeromonas hydrophila (*A. hydrophila*) is a gram-negative bacterium, using the type III secretion system (T3SS). In the T3SS, a key structure is a translocon that inserts into the target membrane and forms a channel for bacterial toxins into the host cell. *A. hydrophila* is pathogenic to different organisms, including humans and aquatic animals (especially domestic animals with high economic value in Vietnam and the world, such as fishes, shrimps, amphibians). The pore completes the channel from bacteria to host, is composed of a major translocator (AopB) and minor translocator (AopD). These translocators are bound by a small chaperone (AcrH) in bacterial cytosol. AcrH chaperone plays an important role in keeping the high stability of translocators and prevents nonspecific interactions of hydrophobic domains before the pore formed in the host cell membrane. Previous studies only analysed the structure of the AcrH in combination with the AopB, but in a non-binding form with the AopB has not been elucidated. That limits the understanding of the formation mechanism of T3SS. Therefore, the authors aimed to clone, express, and purify the AcrH recombinant protein which can be used for the structural study and elucidation of T3SS pore formation. In this study, the authors cloned a fragment of the gene encoding for AcrH chaperone from *A. hydrophila* and inserted the gene into the pET-28a expression vector. AcrH protein from amino acids 21 to 158 was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified using a nickel bead column with high purity (over 99%). As a result, the obtained AcrH protein can be used for studies of structure and function that contribute to perfecting the pathogenesis of gram-negative bacteria and developing research on the treatment mechanism caused by these bacteria.

Keywords: affinity chromatography, chaperone AcrH, expression, recombinant protein.

Classification number: 1.6

kết và liên kết của AcrH. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch chaperone AcrH ở vi khuẩn *A. hydrophila* để phục vụ cho nghiên cứu cấu trúc của protein AcrH.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân dòng gen mã hóa cho chaperone AcrH của vi khuẩn *A. hydrophila* và chèn vào vectơ biểu hiện pET-28a. Vectơ tái tổ hợp mang gen AcrH được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) và biểu hiện trong tế bào này. Protein tái tổ hợp AcrH được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng hạt niken.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Gen mã hóa cho protein AcrH từ axit amin 21 đến 158 (AcrH₂₁₋₁₅₈) nhân lên từ ADN tổng số của vi khuẩn *A. hydrophila*. Vectơ biểu hiện pET-28a được cung cấp từ Phòng thí nghiệm sinh học phân tử và tế bào, Trung tâm Khoa học sự sống, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. Chủng *E. coli* DH5α và *E. coli* BL21(DE3) được chọn là vật chủ tách dòng và vật chủ biểu hiện protein AcrH₂₁₋₁₅₈. Các môi trường, vật liệu và hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu này đều được mua từ các hãng hóa chất uy tín như Sigma, Qiagen, Merk, Fermentas.

Phương pháp nghiên cứu

Nhân dòng gen mã hóa cho chaperone AcrH:

Trình tự gen mã hóa cho chaperone AcrH được nhân dòng từ khuôn là hệ gen của vi khuẩn *A. hydrophila* AH-1 (bằng phản ứng PCR - polymerase chain reaction), sử dụng mỗi xuôi có vị trí cắt của enzyme giới hạn *Bam*HI và mỗi ngược có vị trí cắt của enzyme giới hạn *Eco*RI (bảng 1). Thành phần của phản ứng PCR gồm 10 μl 5x Phusion HF Buffer, 1 μl dNTPs (10 mM), 1 μl ADN khuôn (100 ng/μl), 1,5 μl mỗi xuôi (10 μM), 1,5 μl mỗi ngược (10 μM) và thêm H₂O cho đủ tổng thể tích 50 μl. Phản ứng PCR thực hiện trên máy PCR Eppendorf với thời gian biến tính 20 giây ở 98°C, thời gian gắn mỗi là 15 giây ở 55°C và 15 giây kéo dài chuỗi ở 72°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%. DNA có kích thước tương ứng với gen mã hóa AcrH (414 bp) được tinh sạch sử dụng bộ kit Gel Extraction Kit của QIAGEN (Đức).

Bảng 1. Trình tự mỗi sử dụng trong phản ứng PCR.

Mỗi	Trình tự
AcrH ₂₁₋₁₅₈ F	5' GCGATCCGGCACCCTCGCCATGCTC 3'
AcrH ₂₁₋₁₅₈ R	5' CGGAATTCACATATCCTTTTGGTTTGGAC 3'

Chèn gen vào vector biểu hiện pET-28a:

Đoạn gen AcrH và vector biểu hiện pET-28a cùng được cắt bởi 2 enzyme giới hạn *Bam*HI và *Eco*RI. 40 μ l hỗn hợp phản ứng cắt plasmid gồm 3 μ l plasmid (150 ng/ μ l), 2 μ l 10X FastDigest™, 1 μ l (10U) enzyme *Bam*HI FastDigest™, 1 μ l (10U) enzyme *Eco*RI FastDigest™ (Fermentas) và 33 μ l H₂O được ủ ở 37°C trong 2 giờ. 40 μ l hỗn hợp phản ứng cắt DNA gồm 5 μ l DNA (100 ng/ μ l) thu được từ bước tinh sạch, 4 μ l 10X FastDigest™, 1 μ l (10U) enzyme *Bam*HI, 1,5 μ l (10U) enzyme *Eco*RI và 28,5 μ l H₂O được ủ ở 37°C trong 2 giờ, sau đó enzyme được bất hoạt bằng cách ủ 10 phút ở 65°C. Plasmid và đoạn gen đã được cắt sau đó được nối bởi enzyme T4 DNA ligase ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ với tỷ lệ plasmid và gen là 1:3 (tỷ lệ mol). Vector tái tổ hợp được biến nạp vào vật chủ tách dòng là tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Các khuẩn lạc của tế bào DH5 α chứa vector đã chèn gen được chọn lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi T7 promoter và T7 terminator.

Giải trình tự gen:

Các khuẩn lạc được xác định có chứa đoạn gen AcrH được chuyển sang nuôi cấy trong môi trường LB khoảng 16 giờ. Dung dịch nuôi cấy chứa tế bào DH5 α sử dụng để tách chiết plasmid bằng bộ kit Miniprep Kit của QIAGEN theo các bước hướng dẫn bởi nhà sản xuất. Plasmid sau đó được gửi đi giải trình tự ở Công ty 1st Base (Malaysia) theo phương pháp Sanger.

Biểu hiện protein tái tổ hợp:

Vector biểu hiện chứa gen AcrH được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) và nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung ampicillin (100 μ g/ml) ở 37°C đến khi mật độ tế bào ở OD₆₀₀ đạt tới 0,6. Sau đó bổ sung chất cảm ứng IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) với nồng độ 300 μ M và nuôi cấy ở 20°C khoảng 16 giờ để biểu hiện protein tái tổ hợp. Sự biểu hiện protein được kiểm tra bằng phương pháp điện di gel SDS-PAGE 15% (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

Tinh sạch protein tái tổ hợp:

Tế bào chứa protein tái tổ hợp từ 1 lít môi trường LB được thu lại bằng phương pháp ly tâm 8000 vòng/phút ở 4°C trong 5 phút, được hòa tan trong 25 ml đệm binding chứa 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole. Tế bào sau đó được phá vỡ bằng máy siêu âm trên đá lạnh và ly tâm 8000 vòng/phút ở 4°C khoảng 30 phút.

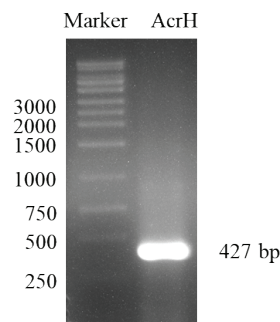
Dịch nổi thu được cho lên cột chứa 2 ml Ni-NTA Agarose đã được ủ sẵn với dung dịch đệm binding. Sau đó, rửa cột 3 lần bằng đệm binding và 10 lần bằng đệm rửa chứa

50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole để loại bỏ protein tạp. Protein được tách khỏi cột bằng dung dịch Elution (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole).

Kết quả và thảo luận

Nhân dòng gen AcrH bằng kỹ thuật PCR

Đoạn gen mã hóa cho protein chaperone AcrH từ axit amin 21 đến 158 có kích thước 414 bp được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu AcrH₂₁₋₁₅₈-F và AcrH₂₁₋₁₅₈-R chứa vị trí nhận biết của 2 enzyme cắt giới hạn *Bam*HI, *Eco*RI và khuôn là ADN của vi khuẩn *A. hydrophila* AH-1. Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,5%. Kết quả điện di sản phẩm PCR được thể hiện ở hình 1. Thang ADN chuẩn giúp xác định kích thước tương đối của các băng ADN trong mẫu cần phân tích. Đường chạy AcrH là sản phẩm PCR có duy nhất một băng kích thước khoảng 414 bp, tương đương với kích thước của gen mã hóa cho protein AcrH₂₁₋₁₅₈. Điều này chứng minh rằng, chúng tôi đã nhân dòng thành công đoạn gen mã hóa cho protein AcrH sử dụng kỹ thuật PCR.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân dòng gen AcrH. Thang ADN marker được phân tách tốt và hiển thị ở giếng đầu tiên. Giếng 2 là kết quả nhân dòng gen AcrH bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu. Đoạn gen mã hóa cho chaperone AcrH đã được nhân lên thành công với kích thước 414 bp.

Chèn đoạn gen mã hóa AcrH vào vector biểu hiện pET-28a

Sau khi nhân dòng được gen mã hóa cho chaperone AcrH, chúng tôi đã tiến hành cắt và chèn đoạn gen này vào vector biểu hiện pET-28a. Sau khi sàng lọc được các vector mang gen, các vector tái tổ hợp này được tách chiết và được giải trình tự bởi Công ty 1st Base (Malaysia). Sau đó, trình tự này được dịch mã sang trình tự axit amin sử dụng phần mềm SnapGene và so sánh với trình tự axit amin của AcrH đã công bố trên ngân hàng gen. Kết quả so sánh 2 trình tự sử dụng phần mềm CLUSTALW thể hiện trên hình 2 cho thấy, trình tự được chèn vào vector là tương đồng với trình tự của AcrH được công bố. Chỉ có sự khác biệt duy nhất ở trình tự 16 axit amin ở đầu N của chuỗi polypeptide, đó là trình tự

axit amin của đuôi His-tag và đuôi Thrombin giúp cho quá trình tinh sạch protein. Điều đó chứng tỏ rằng, chúng tôi đã thiết kế được vector tái tổ hợp pET-28a/AcrH.

AcrH-Clone	MHHHHHSSGLVPRGSGTLAMLNDVSTDITLQLYTLGFNQYHAGKHDEAHKIFQALCVLD 60	
AcrH-Genbank	-----GTLAMLNDVSTDITLQLYTLGFNQYHAGKHDEAHKIFQALCVLD 44	

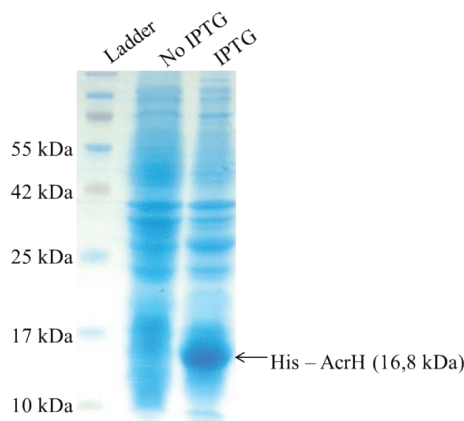
AcrH-Clone	HYEARFFLLGLGACRQALGQFRLAIDSSYSYGAMMDLQEPFRFPFHAAECLLQLEGEAEGS 120	
AcrH-Genbank	HYEARFFLLGLGACRQALGQFRLAIDSSYSYGAMMDLQEPFRFPFHAAECLLQLEGEAEGS 104	

AcrH-Clone	FHSAQLLAAAKPELAELAARAGIMLEVVKTKDM* 154	
AcrH-Genbank	FHSAQLLAAAKPELAELAARAGIMLEVVKTKDM* 138	

Hình 2. So sánh trình tự axit amin của AcrH với trình tự AcrH của vi khuẩn *A. hydrophila* AH-1 trên ngân hàng gen. AcrH-Clone: trình tự axit amin nhận được sau khi giải trình tự. AcrH-Genbank: trình tự axit amin của protein AcrH (vi khuẩn *A. hydrophila* AH-1) được công bố trên ngân hàng gen (AAR26340.1).

Biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào *E. coli* BL21(DE3)

Tế bào *E. coli* BL21(DE3) chứa vector tái tổ hợp pET-28a/AcrH được biểu hiện trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicillin với nồng độ chất cảm ứng IPTG là 300 μ M trong 16 giờ. Kết quả biểu hiện được phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE thể hiện trên hình 3. Ở giếng IPTG, có một băng đặc trưng kích thước 16,8 kDa tương ứng với kích thước của AcrH xuất hiện, trong khi ở giếng đối chứng No IPTG không có băng này. Điều đó khẳng định rằng, protein AcrH đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3).

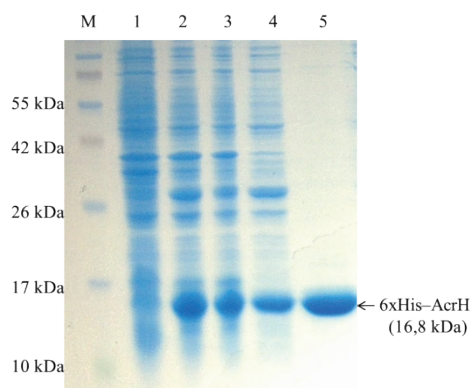


Hình 3. Kết quả biểu hiện chaperone AcrH trên tế bào *E. coli* BL21(DE3). Mẫu IPTG là mẫu cảm ứng biểu hiện bằng IPTG được so sánh với mẫu đối chứng là No IPTG (mẫu không có chất cảm ứng IPTG). Ở mẫu có chất cảm ứng xuất hiện một băng đặc trưng có kích thước 16,8 kDa, tương ứng với kích thước của chaperone AcrH.

Tinh sạch protein tái tổ hợp sử dụng sắc ký ái lực với niken

Sau khi biểu hiện thành công nhân tố phiên mã, chúng tôi tiếp tục tinh sạch protein này sử dụng phương pháp sắc

ký ái lực với cột có gắn ion niken. Do được biểu hiện bằng hệ thống vector biểu hiện pET-28a nên protein tạo ra sẽ có thêm 1 trình tự gồm 6 axit amin Histidin. Trình tự His-tag này giúp protein tái tổ hợp có thể bám với hạt niken trên cột, còn các protein khác sẽ bị rửa trôi bởi dung dịch đệm rửa (washing buffer) với 30 mM imidazole. Sau khi rửa các protein tạp, protein tái tổ hợp được thu lại bằng dung dịch đệm Elution chứa 500 mM imidazole. Kết quả tinh sạch thể hiện trên bản điện di SDS-PAGE (hình 4) cho thấy protein AcrH đã được thu lại với độ tinh sạch cao, có một băng duy nhất trên đường chạy 5.



Hình 4. Kết quả tinh sạch protein AcrH phân tích bằng điện di SDS-PAGE. M: thang chuẩn protein. 1: mẫu protein không có chất cảm ứng IPTG, 2: mẫu protein có bổ sung chất cảm ứng IPTG 300 μ M, 3-4: protein không tan và tan trong dung dịch sau khi phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm, 5: protein AcrH thu được sau khi tinh sạch sử dụng cột sắc ký ái lực với niken.

Thảo luận

Vi khuẩn *A. hydrophila* là một trong những vi khuẩn gram âm gây ra nhiều bệnh nguy hiểm cho các sinh vật, từ động vật cho đến con người. *A. hydrophila* nói riêng và một số vi khuẩn gram âm nói chung đều sử dụng T3SS để tiêm các protein độc tố hoặc các protein hiệu ứng vào tế bào vật chủ [1]. Mặc dù đã có nhiều công bố về các cấu trúc phức tạp của hệ tiết này, đặc biệt là phần thân gốc và kim tiêm, nhưng đến nay vẫn còn rất ít hiểu biết về cấu trúc của kênh chuyển vị (là kênh xuyên qua màng tế bào vật chủ của T3SS, giúp các protein của vi khuẩn có thể dễ dàng đi qua màng vào tế bào chất của vật chủ). Trong cấu trúc này, 2 protein chuyển vị chính (AopB) và phụ (AopD) hình thành phức hệ trên màng tế bào chủ [7]. Trong đó, chaperone AcrH (ở vi khuẩn *A. hydrophila*) có vai trò quan trọng giúp duy trì trạng thái ổn định của các translocator trong tế bào chất và ngăn chặn các tương tác không đặc hiệu do các vùng kỵ nước gây ra, trước khi được vận chuyển đến bề mặt tế bào vật chủ để hình thành kênh chuyển vị. Một số nghiên cứu trước đây đã chỉ ra mỗi một phân tử chaperone có thể tương tác trong phức hệ với một phân tử protein chuyển vị và hình thành nên phức hệ dị dimer như chaperone IpgC với IpaB(51-72), PcrH(21-160) với PopD(47-56), SycD(21-163) với

YopD(56-65), hay chaperone AcrH với AopB(1-264) [9-11]. Đặc biệt, đã có một số cấu trúc của các chaperone trong lớp II được công bố như SycD (*Yersinia enterocolitica*), IpgC (*Shigella flexneri*), PcrH (*Pseudomonas aeruginosa*) và LcrH (*Yersinia pestis*). Các cấu trúc này đều chỉ ra các chaperone được hình thành từ các đoạn lặp tetratricopeptide. Tuy nhiên, mỗi cấu trúc lại có các cấu trúc dị dimer khác nhau, điều này cho thấy sự linh động trong cấu trúc của các chaperone khác nhau. Do đó, việc nghiên cứu biểu hiện và xác định cấu trúc của chaperone AcrH giúp làm sáng tỏ cơ chế hình thành nên kênh chuyên vị của T3SS ở vi khuẩn *A. hydrophila*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tinh sạch được protein tái tổ hợp AcrH với lượng lớn và độ tinh sạch cao. Protein này có thể được tiếp tục nghiên cứu về cấu trúc và chức năng như đánh giá cấu trúc bậc 2 và bậc 3 của protein bằng phương pháp CD (circular dichroism) hay với độ tinh sạch cao có thể sử dụng để kết tinh protein và đánh giá bằng phương pháp tinh thể học tia X.

Kết luận

Chúng tôi đã tách dòng và thiết kế được vector biểu hiện pET-28a mang gen mã hóa cho chaperone AcrH. Vector tái tổ hợp pET-28a/AcrH được biến nạp thành công vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) và biểu hiện thành công protein AcrH bằng chất cảm ứng IPTG với mức độ biểu hiện cao. Chaperone AcrH được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột niken đạt độ tinh sạch cao. Với kết quả này, protein có thể được tinh sạch lượng lớn với độ tinh sạch cao để nghiên cứu về cấu trúc của protein này, giúp làm sáng tỏ được cấu trúc của phức hệ kênh chuyên vị.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) theo tài trợ số 106-NN.02-2016.58. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Coburn, I. Sekirov, and B.B. Finlay (2007), "Type III secretion systems and disease", *Clin. Microbiol. Rev.*, **20**(4), pp.535-549.
- [2] R.Q. Notti and C.E. Stebbins (2016), *The structure and function of type III secretion systems*, Wiley Online Library, pp.241-264.
- [3] A. Dacanay, et al. (2006), "Contribution of the type III secretion system (TTSS) to virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*", *Microbiology*, **152**(6), pp.1847-1856.
- [4] R. Son, et al. (1997), "Antibiotic resistance and plasmid profile of *A. hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*)", *Letters in Applied Microbiology*, **24**(6), pp.479-482.
- [5] P.K. Praveen, et al. (2016), "Incidence of *Aeromonas* spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: a review", *Veterinary World*, **9**(1), p. 6.
- [6] S. Müller, M.F. Feldman, and G.R. Cornelis (2001), "The type III secretion system of Gram-negative bacteria: a potential therapeutic target?", *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **5**(3), pp.327-339.
- [7] H. Yu, et al. (2004), "A type III secretion system is required for *A. hydrophila* AH-1 pathogenesis", *Infection and Immunity*, **72**(3), pp.1248-1256.
- [8] J.C. Bennett, and C. Hughes (2000), "From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones", *Trends in Microbiology*, **8**(5), pp.202-204.
- [9] Van Sang Nguyen, et al. (2015), "Structure of AcrH-AopB chaperone-translocator complex reveals a role for membrane hairpins in type III secretion system translocon assembly", *Structure*, **23**(11), pp.2022-2031.
- [10] V. Job, et al. (2010), "Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins", *Journal of Biological Chemistry*, **285**(30), pp.23224-23232.
- [11] P.R. Adam, et al. (2012), "Binding affects the tertiary and quaternary structures of the *Shigella* translocator protein IpaB and its chaperone IpgC", *Biochemistry*, **51**(19), pp.4062-4071.