

THỬ NGHIỆM CHIẾT TÁCH KHÁNG NGUYÊN F4 VÀ F18 CỦA VI KHUẨN *E. COLI*

Võ Thành Thìn, Đặng Văn Tuấn, Nguyễn Trọng Hải và Lê Lập
Phân viện thú y miền Trung

TÓM TẮT

Kháng nguyên bám dính F4, F18 đã được chiết tách từ chủng vi khuẩn *E.coli* GIS26 và F107/86 bằng phương pháp phá vỡ cơ học kết hợp với ly tâm và kết tủa. Nồng độ kháng nguyên sau chiết tách đạt 0,68mg/ml (kháng nguyên F4) và 0,46mg/ml (kháng nguyên F18). Điện di sản phẩm trên thạch SDS-polyacrylamide cho thấy chỉ có 1 vạch với trọng lượng phân tử 26kDa đối với kháng nguyên F4 và 1 vạch với 15kDa đối với kháng nguyên F18.

Từ khóa: Vi khuẩn *E.coli*, Kháng nguyên bám dính F4, Kháng nguyên bám dính F18, Chiết tách

Purification of F4 and F18 fimbriae from *E.coli* strains

Vo Thanh Thin, Dang Van Tuan, Nguyen Trong Hai and Le Lap

SUMMARY

F4 and F18 fimbriae had been purified from *E.coli* strains GIS26 and F107/86, respectively, using mechanical shearing method combined with centrifugation and precipitation. The concentration of purified fimbriae were 0,68mg/ml (F4 fimbriae) and 0,46mg/ml (F18 fimbriae). Separated these fimbrial on SDS-polyacrylamide and then stained with 0,1% Coomassie blue shown that there is only one band at 26kDa for F4 fimbriae and one band at 15kDa for F18 fimbriae.

Key words: *E.coli*, F4 fimbriae, F18 fimbriae, Purification

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Khả năng gây bệnh của vi khuẩn *E.coli* ở lợn phụ thuộc rất lớn vào sự có mặt của các kháng nguyên bám dính, đặc biệt là kháng nguyên F4 và F18 (Osek, 1999; Frydendahl, 2002; Zhang và cs, 2007). Các kháng nguyên này có cấu trúc giống sợi lông, có bản chất là protein bao phủ trên toàn bộ bề mặt tế bào vi khuẩn và có vai trò giúp vi khuẩn bám lên các điểm tiếp nhận trên lớp tế bào biểu mô niêm mạc ruột (Saulino và cs, 1998; Thanassi và Hultgren, 2000). Thành phần chính của kháng nguyên F4 là tiểu phân tử FaeG và ở kháng nguyên F18 là tiểu phân tử FedA (Van den Broeck và cs, 1999; Tiels và cs, 2007). Các tiểu phân tử protein này có khả năng kích thích hệ thống miễn dịch của cơ thể gia súc sản sinh

kháng thể nên được nhiều nhà nghiên cứu sử dụng làm kháng nguyên trong chế tạo vaccin phòng bệnh (Van de Stede và cs, 2003; Verdonck và cs, 2004; Tiels và cs, 2008). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thử nghiệm chiết tách kháng nguyên F4 và F18 dùng trong phản ứng ELISA phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên này trong huyết thanh lợn.

II. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

- Chủng vi khuẩn *E.coli* GIS26 và F107/86 do Phòng thí nghiệm miễn dịch, Khoa thú y, Trường Đại học Gent, Vương quốc Bỉ cung cấp.

- Môi trường, hóa chất dùng để chiết tách kháng nguyên F4 và F18: TSB (Tryptic soy

broth), ammonium sulfate, đệm PBS, túi thẩm tích với cut-off là 10kDa.

- Hóa chất thực hiện phản ứng BCA (Bicinchoninic acid reaction): bộ kit BCA (Sigma) và BSA (bovine serum albumin, Sigma).

- Hóa chất điện di protein: acrylamide, bisacrylamide, Tris-HCl, SDS (Sodium dodecyl sulfate), APS (ammonium persulfate), thuốc nhuộm (Coomassie brilliant blue) và dung dịch điện di protein (Tris-glycine).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Kháng nguyên F4 và F18 được chiết tách từ chủng vi khuẩn *E.coli* GIS26 và F107/86 dựa theo phương pháp của Van den Broeck và cs (1999), Verdonck và cs (2002).

- Nồng độ kháng nguyên F4 và F18 sau khi chiết tách được xác định bằng phản ứng BCA với mẫu protein chuẩn là BSA.

- Trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của sản phẩm F4/F18 chiết tách được kiểm tra bằng phương pháp điện di protein trên thạch SDS-polyacrylamide 12% (SDS-PAGE). Sản phẩm sau điện di được nhuộm bằng thuốc nhuộm đồng

0,1% (Coomassie brilliant blue) pha trong methanol và acid acetic.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

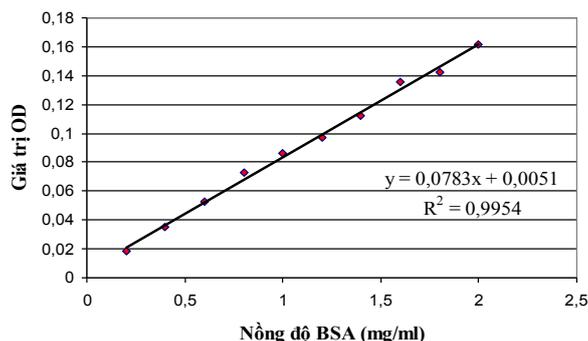
Kháng nguyên F4 và F18 được chiết tách trực tiếp từ chủng vi khuẩn GIS26 và F107/86. Đây là kỹ thuật được chuyển giao trực tiếp từ Phòng thí nghiệm miễn dịch, Khoa thú y, Trường Đại học Gent, Vương quốc Bỉ. Chúng tôi đã tiến hành chiết tách được 4 lô kháng nguyên F4 và F18.

Nồng độ kháng nguyên F4/F18 chiết tách trong các lô thí nghiệm được xác định bằng phản ứng BCA trên đĩa vi chuẩn độ 96 lỗ đáy bằng với protein chuẩn là BSA. Trong dung dịch phản ứng, protein (BSA, kháng nguyên F4 hoặc F18), Cu^{1+} và acid bicinchoninic sẽ kết hợp với nhau và tạo thành phức hợp có màu tím (hình 1). Dựa vào khả năng hấp phụ ở bước sóng 595nm (giá trị OD) của dung dịch phản ứng chứa BSA ở các nồng độ tương ứng, chúng tôi xây dựng được đồ thị và phương trình đường chuẩn (minh họa ở đồ thị 1). Căn cứ vào phương trình đường chuẩn và giá trị OD của dung dịch phản ứng chứa mẫu kháng nguyên F4/F18, nồng độ các lô kháng nguyên đã được xác định (bảng 1).



Hình 1. Phản ứng BCA xác định nồng độ kháng nguyên F4/F18

Đồ thị 1. Phương trình đường chuẩn xác định nồng độ kháng nguyên F4/F18



Bảng 1. Nồng độ các lô kháng nguyên F4 và F18 được xác định bằng phương pháp BCA

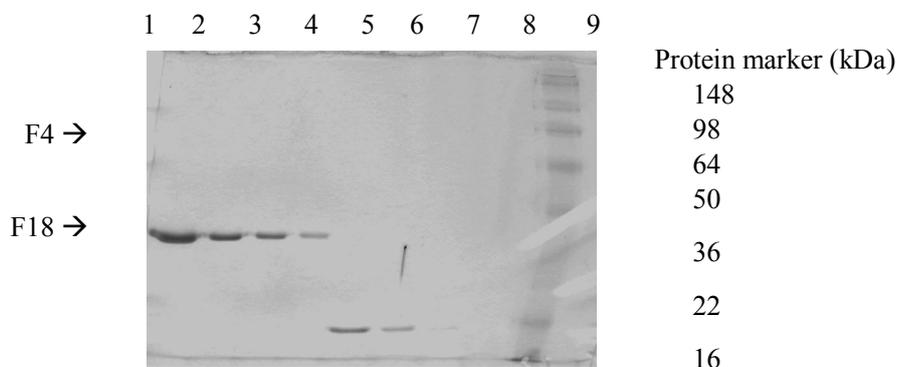
Lô kháng nguyên	Nồng độ (mg/ml)	
	F4	F18
1	1,1	0,27
2	0,488	0,88
3	0,48	0,36
4	0,65	0,42
Trung bình	0,68	0,46

Kết quả bảng 1 cho thấy nồng độ trung bình của các lô kháng nguyên F4 và F18 chiết tách được lần lượt là 0,68mg/ml và 0,46mg/ml (tương đương với $0,57\text{mg}/10^{12}$ cfu và $0,38\text{mg}/10^{12}$ cfu vi khuẩn *E.coli* khi đưa vào chiết tách). Khi chiết tách kháng nguyên F4, Van den Broeck và cs (1999) cũng thu được kháng nguyên với nồng độ là $1,7\text{mg}/10^{12}$ cfu. Như vậy, nồng độ kháng nguyên chiết tách của chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Van den Broeck và cs (1999). Trong phản ứng ELISA phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên F4/F18, nồng độ

kháng nguyên cần thiết là $5\mu\text{g}/\text{ml}$. Vì thế, lượng kháng nguyên thu được vẫn đảm bảo để thực hiện phản ứng.

Kháng nguyên sau khi chiết tách được điện di trên thạch SDS-polyacrylamide 12% để xác định trọng lượng phân tử và độ tinh sạch của kháng nguyên. Kết quả điện di cho thấy chỉ xuất hiện 1 vạch với trọng lượng phân tử khoảng 26kDa đối với kháng nguyên F4 và 15kDa đối với kháng nguyên F18 (hình 2). Hơn nữa, trên mặt thạch không xuất hiện bất kỳ vạch không mong muốn nào, chứng tỏ kháng nguyên F4 và F18 chiết tách có độ tinh khiết cao.

Năm 1999, khi điện di kháng nguyên F4 chiết tách trên thạch SDS-polyacrylamide, Van den Broeck và cs (1999) cũng thu được 1 vạch với trọng lượng phân tử vào khoảng 26kDa. Bằng kỹ thuật Western blot với kháng thể đơn dòng kháng tiểu phân tử FaeG, tác giả cho biết vạch protein này chính là tiểu phân tử FaeG - thành phần chính của kháng nguyên bám dính F4.



Hình 2. Kết quả điện di kháng nguyên F4 và F18 chiết tách trên thạch SDS-polyacrylamide

Giếng 1- 4: kháng nguyên F4, giếng 5-8: kháng nguyên F18, giếng 9: protein marker
 (SeeBlue Plus2 Pre-stained standard, Invitrogen)

Theo Smeds và cs (2001), thành phần cấu tạo và quyết định tính kháng nguyên chính của kháng nguyên F18 là tiểu phân tử FedA với trọng lượng phân tử khoảng 15,1kDa. Điều này cũng được Tiels và cs (2007) khẳng định khi điện di kháng nguyên F8 chiết tách trên thạch SDS-polyacrylamide và xác nhận lại bằng phương pháp Western blot. Vạch protein với trọng lượng phân tử khoảng 15kDa xuất hiện trên thạch sau khi nhuộm chính là tiểu phân tử FedA.

Như vậy, kháng nguyên F4 và F18 sau chiết tách đạt độ tinh khiết cao, không lẫn các protein lạ. Thành phần chủ yếu trong kháng nguyên được xác định là tiểu phân tử FaeG (kháng nguyên F4) và FedA (kháng nguyên F18). Đây chính là thành phần chính quyết định tính kháng nguyên và khả năng bám dính của kháng nguyên F4, F18. Vì vậy, có thể sử dụng những kháng nguyên này làm kháng nguyên chuẩn trong phản ứng ELISA phát hiện kháng thể hay sử dụng làm nguồn kháng nguyên để gây miễn dịch chủ động trên gia súc.

IV. KẾT LUẬN

Đã chiết tách thành công kháng nguyên bám dính F4 và F18 từ chủng vi khuẩn *E.coli*. Nồng độ kháng nguyên sau chiết tách đạt 0,68mg/ml (kháng nguyên F4) và 0,46mg/ml (kháng nguyên F18). Những kháng nguyên này có thể sử dụng làm kháng nguyên chuẩn trong phản ứng ELISA phát hiện kháng thể tương ứng trong huyết thanh lợn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Frydendahl, K., 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *E.coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs

and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.*, 85, 169-182.

2. Osek, J., 1999. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Veterinary Microbiology*, 68, 209-217.
3. Smeds, A., Hemmann, K., Jakava-Viljanen, M., Pelkonen, S., Imberechts, H., and Palva, A., 2001. Characterization of the adhesin of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infect Immun.*, 69(12), 7941-7945.
4. Tiels, P., Verdonck, F., Coddens, A., Ameloot, P., Goddeeris, B., and Cox, E., 2007. Monoclonal antibodies reveal a weak interaction between the F18 fimbrial adhesin FedF and the major subunit FedA. *Vet Microbiol.*, 119, 115-120.
5. Tiels, P., Verdonck, F., Coddens, A., Goddeeris, B., Cox, E., 2008. The excretion of F18+ *E.coli* is reduced after oral immunisation of pigs with a FedF and F4 fimbriae conjugate. *Vaccine*, 26(17), 2154-2163.
6. Van der Stede, Y., Cox, E., Verdonck, F., Vancaeneghem, S., and Goddeeris, B.M., 2003. Reduced faecal excretion of F4 super (+) *E.coli* by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 or CpG oligodeoxynucleotides. *Vaccine*, 21, 1023-1032.
7. Verdonck, F., Cox, E., van Gog, K., Van der Stede, Y., Duchateau, L., Deprez, P., Goddeeris, B., 2002. Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Vaccine*, 20, 2995-3004.
8. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D., 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol.*, 123, 145-152.