

# Tinh chế biến thể alpha-toxin bất hoạt Hla<sub>H35LH48L</sub> biểu hiện ở *Escherichia coli* và tạo kháng huyết thanh trên chuột

Lê Dương Vương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Kim Liên<sup>1</sup>, Phan Thị Phương Trang<sup>1,2</sup>, Nguyễn Đức Hoàng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Phòng Thí nghiệm Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/10/2024; ngày chuyển phân biện 30/10/2024; ngày nhận phân biện 11/12/2024; ngày chấp nhận đăng 18/12/2024

## Tóm tắt:

Alpha-toxin (Hla) là yếu tố độc lực gây ly giải tế bào được tạo ra từ vi khuẩn *Staphylococcus aureus*, có vai trò quan trọng trong việc phát sinh các bệnh nhiễm trùng khác nhau và được xem là một nhân tố tiềm năng để phát triển vắc-xin. Nghiên cứu nhằm biểu hiện tái tổ hợp Hla<sub>H35LH48L</sub> được dung hợp với His-tag ở *Escherichia coli* BL21(DE3), tinh sạch protein biến thể bất hoạt này và tạo kháng huyết thanh (serum) ở chuột. Kết quả khảo sát cho thấy, điều kiện phù hợp để biểu hiện protein Hla<sub>H35LH48L</sub> là ở 30°C, nồng độ IPTG 0,05 mM và thu nhận ở 8 giờ sau cảm ứng. Dựa trên phương pháp sắc ký ái lực giữa đuôi 6xHis và Ni-NTA, protein Hla<sub>H35LH48L</sub> thu được với nồng độ 1,17 mg/ml và độ tinh sạch đạt 96%. Kết quả thử nghiệm hoạt tính đối với protein được tinh sạch cho thấy, biến thể Hla<sub>H35LH48L</sub> bị mất khả năng gây ly giải tế bào hồng cầu thỏ. Sau bốn lần tiêm chuột với liều 0,05 mg protein Hla<sub>H35LH48L</sub> mỗi con, huyết thanh thu nhận có khả năng nhận diện kháng nguyên ở độ pha loãng 1/320.000. Kết quả của nghiên cứu này là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo, nhằm trung hòa Hla *in vivo* và phát triển vắc-xin phòng *S. aureus*.

**Từ khóa:** alpha-toxin, *Escherichia coli*, Hla<sub>H35LH48L</sub>, *Staphylococcus aureus*, vắc-xin.

**Chỉ số phân loại:** 2.6, 2.8, 3.3

## Purification of an inactive variant alpha-toxin Hla<sub>H35LH48L</sub> expressed in *Escherichia coli* and generation of antiserum in mice

Duong Vuong Le<sup>1</sup>, Thi Kim Lien Nguyen<sup>1</sup>, Thi Phuong Trang Phan<sup>1,2</sup>, Duc Hoang Nguyen<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Center for Bioscience and Biotechnology, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

<sup>2</sup>Molecular Biotechnology Laboratory, University of Science, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 26 October 2024; revised 11 December 2024; accepted 18 December 2024

## Abstract:

Alpha-toxin (Hla) is a major cytotoxic agent produced by *Staphylococcus aureus*, which plays a significant role in the pathogenesis of various infections and is regarded as a promising antigen for vaccine development. This study aims to express Hla<sub>H35LH48L</sub> fused with His-tag in *Escherichia coli* BL21(DE3), purification of the inactive form, and generation of antiserum in mice. The survey results indicated that the appropriate conditions for expressing the Hla<sub>H35LH48L</sub> protein were at 30°C with an IPTG concentration of 0.05 mM, and harvesting 8 hours post-induction. Based on affinity chromatography between the 6xHis tag and Ni-NTA, the Hla<sub>H35LH48L</sub> protein was purified, obtaining a concentration of 1.17 mg/ml with a purity of 96%. Activity assays for the purified protein revealed that the Hla<sub>H35LH48L</sub> variant lost its ability to lyse rabbit red blood cells. After four injections in mice with a dose of 0.05 mg of Hla<sub>H35LH48L</sub> protein per mouse, the resulting antiserum was able to recognise the antigen with an antibody titer of 1:320,000. The results of this study serve as an important premise for further studies to neutralise Hla *in vivo* and develop a vaccine against *S. aureus*.

**Keywords:** alpha-toxin, *Escherichia coli*, Hla<sub>H35LH48L</sub>, *Staphylococcus aureus*, vaccine.

**Classification numbers:** 2.6, 2.8, 3.3

\* Tác giả liên hệ: Email: ndhoang@hcmus.edu.vn

## 1. Đặt vấn đề

*Staphylococcus aureus*, vi khuẩn tụ cầu vàng, là vi khuẩn Gram dương mang nhiều yếu tố độc lực, đã và đang trở thành một trong những tác nhân gây bệnh phổ biến và nguy hiểm ở người. *S. aureus* là nguyên nhân hàng đầu gây ra các bệnh như nhiễm trùng huyết, viêm nội tâm mạc nhiễm khuẩn, viêm màng phổi và các bệnh liên quan đến xương khớp, da, mô mềm [1]. Theo nghiên cứu thống kê năm 2015, ước tính có 30% dân số toàn cầu nhiễm *S. aureus* [2]. Trong đó, hầu hết các quốc gia có tỷ lệ nhiễm *S. aureus* đã vượt qua con số 25% và một số ít nước lên tới 50%. Tại Việt Nam, tỷ lệ nhiễm *S. aureus* chiếm khoảng 33,8% dân số, cao hơn so với các nước Malaysia (28,7%), Hoa Kỳ (28,6%), Moldova (25,1%) và Algeria (25,8%) [3]. Điều đáng lo ngại là tỷ lệ tử vong của những bệnh nhân nhiễm *S. aureus* là khoảng 10-30%, cao hơn nhiều so với tỷ lệ tử vong do các bệnh AIDS, lao hay viêm gan do virus [4].

Để chống lại *S. aureus*, việc điều trị lâm sàng được thực hiện chủ yếu dựa trên các thể hệ kháng sinh như penicillin, amoxicillin, oxacillin, methicillin, vancomycin... Tuy nhiên, do việc lạm dụng kháng sinh quá mức đã dẫn đến tình trạng các chủng *S. aureus* kháng kháng sinh (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) lan rộng trên toàn thế giới, trong đó tỷ lệ nhiễm MRSA trên tổng số bệnh nhân nhiễm *S. aureus* ở châu Âu là 24% [5], ở Hoa Kỳ là 53% [6]. Tại Việt Nam, công trình nghiên cứu của N.T. Sơn và cs (2019) [7] cho thấy, tỷ lệ nhiễm MRSA của trẻ em trong bệnh viện ở Miền Bắc Việt Nam là 73% và Miền Nam là 39%.

Chính vì vậy, bên cạnh việc tìm kiếm thể hệ kháng sinh điều trị tiếp theo, các nghiên cứu phát triển vắc-xin kháng *S. aureus* đã và đang được quan tâm như một chiến lược lâu dài để phòng chống vi khuẩn này [8]. Trong các nghiên cứu trước đây, alpha-toxin (Hla) đã là một trong những yếu tố độc lực chính giúp *S. aureus* xâm nhiễm vào tế bào chủ và được biểu hiện ở hầu hết các chủng *S. aureus*. Đây còn là yếu tố hỗ trợ sự hình thành màng biofilm giúp *S. aureus* cư trú thành công trong tế bào chủ [9]. Bên cạnh đó, bằng việc đột biến protein Hla thay thế Histidine bằng Leucine tại vị trí His<sup>35</sup> và His<sup>48</sup>, alpha-toxin bị mất hoạt tính tạo lỗ màng tại vị trí thụ thể ADAM-10 và không thể ly giải tế bào [10]. Do đó, việc nghiên cứu biểu hiện, tinh sạch và đánh giá các đặc tính của protein là cần thiết. Nghiên cứu này nhằm tinh chế biến thể alpha-toxin bất hoạt Hla<sub>H35LH48L</sub> được biểu hiện trong vi khuẩn *Escherichia coli* và tạo kháng thể trên chuột làm tiền đề cho việc nghiên cứu phát triển vắc-xin phòng bệnh do *S. aureus*.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Chủng chủ và plasmid

Chủng chủ *E. coli* OmniMAX (Invitrogen™) được sử dụng để dòng hóa tạo plasmid. Chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) (Thermo Scientific™) được dùng để biểu hiện các dạng alpha-toxin dưới sự điều hòa của T7 promoter. Plasmid khuôn pET28a(+) (Novagen) chứa trình tự T7 promoter và trình tự gen mã hóa đuôi 6xHis. Plasmid pHT2328 mang gen Hla<sub>H35LH48L</sub> được tổng hợp.

### 2.2. Tạo dòng plasmid mang gen Hla<sub>H35LH48L</sub>

Gen Hla<sub>H35LH48L</sub> được thu nhận từ plasmid pHT2328 (được lưu trữ ở phòng thí nghiệm thông qua tổng hợp) bằng phản ứng PCR thu gen với cặp mồi đặc hiệu ON2367

(3'-TCTGACATCAACATCAAAAC-5') và ON2368 (3'-GGTGGTGGTCTCGAGTTAGACGTCGTTTGTCACTTCTTC-5'). Sản phẩm PCR thu được và plasmid khung pET28a+ lần lượt được xử lý với hai enzyme cắt giới hạn *Xho*I và *Nde*I. Gen Hla<sub>H35LH48L</sub> đã được nối với plasmid khung sườn pET28a+ bằng enzyme T4 DNA ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng *E. coli* OmniMAX, sàng lọc trên môi trường LB-Agar có bổ sung Kanamycin (50 µg/ml). Các khuẩn lạc tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu ON1461 (5'-GGTGATGTCGGCGATATAGGC-3') và ON2368. Khuẩn lạc có sản phẩm PCR tương ứng với kích thước lý thuyết (1175 bp) được nuôi cấy, tách plasmid bằng bộ kit QIAprep Miniprep và giải trình tự theo phương pháp Sanger bởi Công ty Macrogen Inc. (Hàn Quốc) với mồi đặc hiệu ON1462 (5'-CCGTTTAGAGGCCCAAGG-3') và ON1659 (3'-CCC GCGAAATTAATACGACTCACTATAGG-5'). Kết quả giải trình tự được so sánh, đối chiếu với trình tự đã được thiết kế.

### 2.3. Biểu hiện protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> trong *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361

Plasmid pHT2361 mang gen Hla<sub>H35LH48L</sub> được biến nạp vào chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt và sàng lọc trên môi trường LB-Agar có bổ sung Kanamycin (50 µg/ml). Các khuẩn lạc tiếp tục được sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi ON1461/ ON2368. Khuẩn lạc có kết quả PCR tương ứng với kích thước lý thuyết (1175 bp) đã được sử dụng để khảo sát sự biểu hiện protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> trong *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361 ở các điều kiện nhiệt độ (23°C, 30°C, 37°C), nồng độ IPTG cảm ứng (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 mM) và thời gian thu mẫu sau cảm ứng (từ 0 h đến 12 h). Các mẫu khảo sát được thu nhận với cùng lượng tế bào tương ứng với 1 ml dịch nuôi cấy có OD<sub>600 nm</sub> = 6 bằng phương pháp ly tâm (với tốc độ 6000×g trong 5 phút, loại bỏ dịch nổi). Các mẫu khảo sát nhiệt độ được bổ sung 500 µl lysis buffer (Tris-HCl pH 7,2; 15% sucrose), được tiến hành phá tế bào bằng sóng siêu âm (Q700, Qsonica) trong điều kiện ủ lạnh và thu nhận 100 µl mẫu tổng. Mẫu tủa và mẫu tan được phân tách bằng phương pháp ly tâm 100 µl dịch phá tế bào, với tốc độ 13000×g trong 10 phút. Phần tủa được bổ sung 100 µl lysis buffer và cả 3 mẫu tổng, tủa, tan được bổ sung 25 µl Sample 5X (250 mM Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 10% (v/v) Glycerol; 10 mM DTT; 0,05% (w/v) Bromophenol Blue) và ủ biến tính ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút trước khi tiến hành chạy SDS-PAGE. Sự biểu hiện của protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> được định lượng tương đối bằng độ đậm nhạt, kích thước của vạch protein trên gel SDS-PAGE và phân tích bằng phần mềm AlphaEase FC.

### 2.4. Tinh sạch protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> bằng sắc ký ái lực (IMAC)

Sinh khối của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361 thu nhận sau nuôi cấy cảm ứng bằng IPTG được huyền phù trong Binding buffer (30 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 5% glycerol) có bổ sung 20 µg/ml DNase I, 1 mM PMSF và phá tế bào bằng sóng siêu âm trong điều kiện lạnh. Dịch phá tế bào được ly tâm 19.000×g trong 20 phút ở 4°C và lọc qua màng lọc 0,22 µm. Dịch protein (mẫu trước cột) được đi qua cột HisTrap™ HP. Các protein có đuôi 6xHis sẽ bám lên cột và dung ly ra khỏi cột bằng imidazole với nồng độ tăng dần từ 10 đến 500 mM. Các phân đoạn dung ly protein được kiểm tra bằng phương pháp SDS - PAGE. Nồng độ protein tinh sạch được xác định bằng phương pháp đo độ hấp thụ của mẫu protein tại bước sóng 280 nm dựa trên hệ số Extinction coefficient của protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>.

### 2.5. Kiểm tra hoạt tính ly giải tế bào hồng cầu thử của protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>

Protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> được kiểm tra hoạt tính tán huyết bằng cách ủ 100 µl nồng độ 1 mg/ml trong lồng trên đĩa thạch máu ở điều kiện 4°C, qua đêm. Thí nghiệm được thực hiện đồng thời trên các lồng thạch khác trên cùng một đĩa thạch, với đối chứng là protein 6xHis-Hla wt và chứng âm là Binding buffer.

### 2.6. Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột và thu nhận kháng huyết thanh

Protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tinh sạch được pha loãng về nồng độ 1 mg/ml và trộn với tá chất Freund theo tỷ lệ về trọng lượng 1:1. Quy trình gây đáp ứng miễn dịch bằng phương pháp tiêm dưới da của chuột Swiss tám tuần tuổi gồm: hai lần tiêm mẫu protein với tá chất FCA (Freund's Complete adjuvant) và hai lần tiêm mẫu protein với tá chất FIA (Freund's Incomplete adjuvant); thể tích tiêm là 100 µl và các lần tiêm cách nhau hai tuần. Lô thí nghiệm thực hiện trên bốn con chuột, trong đó có một con chuột được sử dụng làm đối chứng chỉ tiêm tá chất và ba con tiêm với protein kháng nguyên Hla<sub>H35LH48L</sub>. Mẫu máu được thu trước khi tiêm gây đáp ứng miễn dịch và sau khi tiêm nhắc lần cuối. Các mẫu máu này được ly tâm lạnh 6000×g trong 10 phút để tách lấy huyết thanh.

### 2.7. Western Blot để kiểm tra khả năng nhận diện kháng nguyên của huyết thanh

Huyết thanh chuột được gây đáp ứng miễn dịch chủ động bằng protein Hla<sub>H35LH48L</sub> được kiểm tra khả năng đáp ứng miễn dịch với hai kháng nguyên là hai protein dung hợp 6xHis-Hla wt (wild type- dạng nguyên bản, không bị đột biến) và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> bằng phương pháp Western blot. Các mẫu kháng nguyên được chạy SDS-PAGE và chuyển qua màng lai nitrocellulose. Màng lai lần lượt được ủ với kháng thể sơ cấp là huyết thanh từ chuột, kháng thể thứ cấp là Anti-mouse IgG peroxidase (pha loãng trong PBS-T chứa 5% sữa gầy) và sử dụng cơ chất TMB để phản ứng tạo màu.

### 2.8. ELISA

Các protein kháng nguyên 6xHis-Hla wt và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> được pha loãng về các nồng độ 20 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml và cố định trong các giếng ELISA trên đĩa Nunc. Các giếng ELISA được ủ qua đêm với 100 µl huyết thanh được gây đáp ứng miễn dịch chủ động bằng protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> (tỷ lệ pha loãng 1/5.000; 1/10.000; 1/20.000; 1/40.000; 1/80.000; 1/160.000 và 1/320.000). Sau khi rửa sạch bằng PBS-T, các giếng ELISA tiếp tục được ủ với 100 µl kháng thể thứ cấp Anti-mouse IgG peroxidase (nồng độ pha loãng 1/10.000) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cơ chất TMB được sử dụng để phản ứng màu và độ hấp thụ màu (ở bước sóng 450 nm) của từng mẫu ELISA được xác định bằng máy đọc đĩa CLARIOstar (BMG Labtech). Giá trị ngưỡng dương tính (cut-off) được xác định bằng công thức (1) theo nghiên cứu của F. Lardeux và cs (2016) [11]:

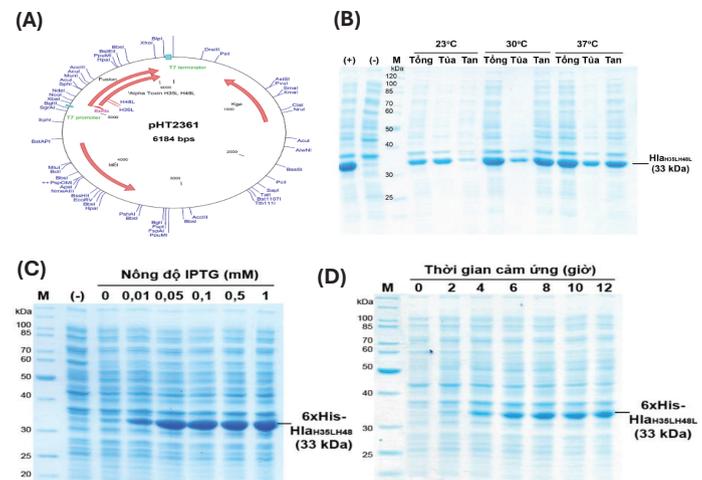
$$\text{Cut-off} = X + 3 \cdot \text{SD} \quad (1)$$

trong đó: X là giá trị trung bình của mẫu đối chứng âm, SD là độ lệch chuẩn của giá trị chứng âm ở các lần lặp lại.

## 3. Kết quả

### 3.1. Tạo plasmid pHT2361 và khảo sát sự biểu hiện protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>

Việc tạo dòng plasmid pHT2361 được thực hiện dựa trên plasmid khung là pET28a+ và gen mã hóa protein Hla<sub>H35LH48L</sub> từ plasmid khuôn pHT2328. Kết quả giải trình tự DNA với khuôn lạc có kết quả PCR dương tính có độ tương đồng với trình tự thiết kế *in silico* là 100%. Điều này chứng tỏ đề tài đã thu nhận được plasmid pHT2361 mang gen mã hóa protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>. Thông tin của plasmid pHT2361 được thể hiện ở hình 1A.



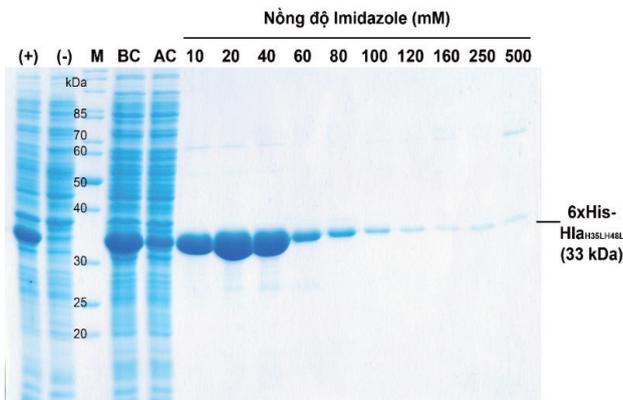
**Hình 1. Kết quả khảo sát biểu hiện protein Hla<sub>H35LH48L</sub> trong E. coli BL21(DE3)/pHT2361:** (A) Sơ đồ plasmid pHT2361; (B) Kết quả khảo sát nhiệt độ biểu hiện; (C) Kết quả khảo sát nồng độ IPTG cảm ứng; (D) Kết quả khảo sát thời gian thu mẫu sau cảm ứng. M: thang protein; (-) E. coli BL21(DE3)/pET28a+.

Plasmid pHT2361 được biến nạp vào chủng E. coli BL21(DE3) để tạo chủng E. coli BL21(DE3)/pHT2361 có khả năng biểu hiện protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> dưới sự kiểm soát của T7 promoter. Khả năng biểu hiện protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> của chủng chủ này được khảo sát với các điều kiện nhiệt độ (23°C, 30°C, 37°C), nồng độ IPTG cảm ứng (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 mM) và thời gian thu mẫu sau cảm ứng (từ 0 đến 12 giờ). Kết quả khảo sát điều kiện nhiệt độ (hình 1B) cho thấy, so với chứng âm, cả ba điều kiện nhiệt độ đều xuất hiện thêm vạch protein khoảng 33 kDa tương ứng với kích thước lý thuyết của protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>. Tuy nhiên, ở 23°C, hơn 70% protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tồn tại ở pha tan. Ở hai điều kiện nhiệt độ còn lại, phần lớn protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tồn tại ở pha tan, trong đó điều kiện 30°C có sự biểu hiện protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tan nhiều hơn. Do đó, 30°C được xác định là điều kiện phù hợp để thu nhận protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tan. Đối với các kết quả khảo sát nồng độ chất cảm ứng IPTG (hình 1C) và thời gian thu sau cảm ứng (hình 1D), các mẫu tương ứng với điều kiện 0,05 mM IPTG và thời điểm 8 giờ sau cảm ứng có giá trị Area (giá trị định lượng protein tương đối dựa trên độ đậm nhạt, kích thước vạch bằng phần mềm AlphaEaseFC) cao nhất. Kết quả phân tích trên gel cho thấy đối với mẫu thu nhận ở điều kiện nhiệt độ 30°C, nồng độ 0,05 mM IPTG và 8 giờ sau cảm ứng, protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> chiếm khoảng 25% tổng số protein nội bào. Do đó, các điều kiện này được sử dụng để

thu nhận nhiều sinh khối chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361 nhằm thu nhận lượng lớn protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>.

### 3.2. Thu nhận protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>

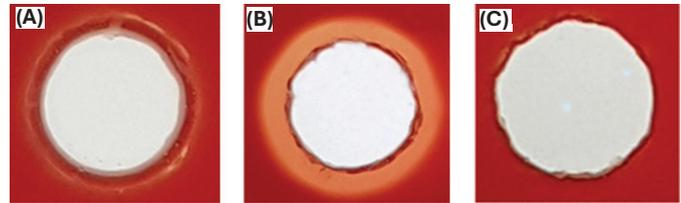
Khối lượng sinh khối thu được sau nuôi chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361 là 26,29 g từ 4,5 l môi trường LB-Kan. Sinh khối được huyền phù trong đệm (buffer) và phá tế bào bằng sóng siêu âm. Protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> được tinh sạch bằng cột HisTrap™ HP dựa trên ái lực của đuôi 6xHis và hạt Ni-NTA trong cột. Kết quả điện di SDS-PAGE (hình 2) cho thấy, trong quá trình dung ly từng bước một với các nồng độ Imidazole tăng dần, các phân đoạn có nồng độ Imidazole từ 10 mM đến 80 mM xuất hiện các vạch đậm có kích thước khoảng 33 kDa, tương ứng với kích thước của protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>. Đồng thời, các phân đoạn này cũng tồn tại rất ít các vạch protein có kích thước khác. Điều này chứng minh rằng, protein dung hợp 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> thu được có độ tinh sạch cao và đạt độ tinh sạch trên 95% với nồng độ 1,17 mg/ml. Độ tinh sạch này phù hợp để sử dụng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. Ngoài ra, sản lượng thu nhận protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tinh sạch từ chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361 đạt mức 19,5 mg/l môi trường LB-Kan hay 2,85 mg/g sinh khối ướt.



**Hình 2. Kết quả tinh chế thu nhận protein Hla<sub>H35LH48L</sub> bằng cột HisTrap™ HP.** M: thang protein; (-) *E. coli* BL21(DE3)/ pET28a+; (+) *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361; BC (before column): dịch phá tế bào của *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361 đã được cảm ứng trước khi qua cột HisTrap™ HP; AC (after column): dịch protein thu nhận sau khi đi qua cột HisTrap™ HP.

### 3.3. Kết quả thử nghiệm hoạt tính tính ly giải tế bào hồng cầu

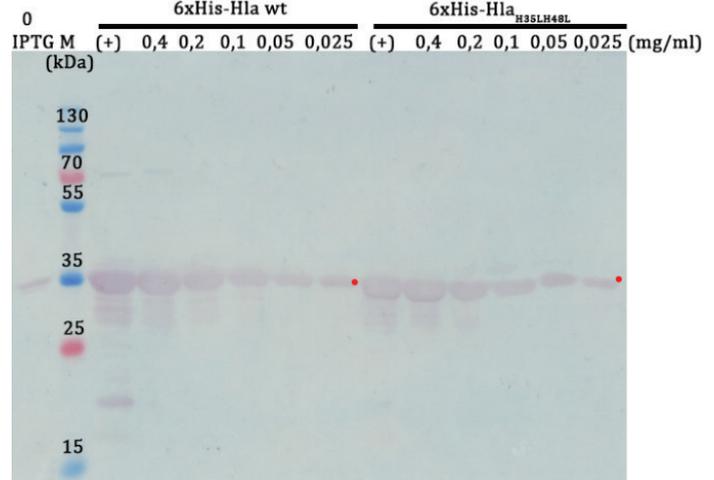
Protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tinh sạch được kiểm tra hoạt tính ly giải tế bào hồng cầu thỏ trên đĩa thạch máu. Kết quả kiểm tra hoạt tính cho thấy: khác với phản ứng ủ với 6xHis-Hla wt (hình 3B) có vòng tròn tán huyết rõ rệt, phản ứng ủ với protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> (hình 3C) hầu như không có sự hiện diện của vòng tròn tán huyết. Kết quả này tương tự với mẫu chứng âm khi ủ với Binding Buffer (hình 3A). Điều này chứng tỏ hai đột biến H35L và H48L đã làm mất gần như hoàn toàn khả năng ly giải tế bào hồng cầu thỏ của alpha-toxin. Đồng thời, kết quả này cũng cho thấy protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> có tính an toàn, phù hợp để ứng dụng nghiên cứu vắc-xin hơn dạng alpha-toxin nguyên bản.



**Hình 3. Hoạt tính ly giải hồng cầu thỏ của các dạng alpha-toxin trên đĩa thạch máu khi ủ với Binding Buffer (A), 6xHis-Hla wt (B), 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> (C).**

### 3.4. Khả năng nhận diện của huyết thanh chuột thu nhận từ kháng nguyên 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> với 6xHis-Hla wt và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>

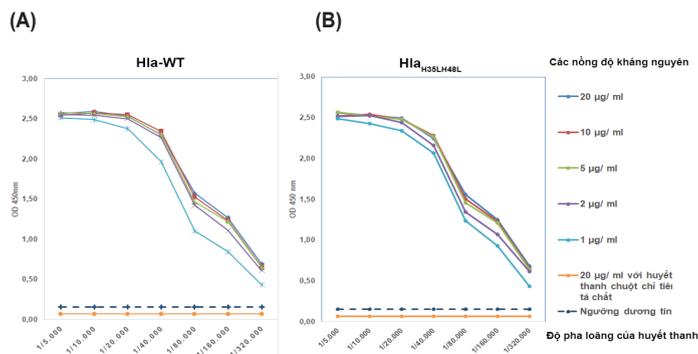
Huyết thanh của ba con chuột thu nhận được sau quá trình gây đáp ứng miễn dịch được trộn lại với nhau thành một mẫu đồng nhất, sau đó kiểm tra khả năng đáp miễn dịch với hai kháng nguyên 6xHis-Hla wt và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> bằng phương pháp Western blot. Kết quả Western blot (hình 4) cho thấy, xuất hiện tín hiệu màu ở các vạch có kích thước khoảng 33 kDa tương ứng với kích thước lý thuyết của protein dung hợp 6xHis-Hla và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>. Các vạch này nhỏ dần khi nồng độ kháng nguyên giảm dần. Điều này chứng tỏ, huyết thanh chuột thu nhận từ kháng nguyên 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> có khả năng tương tác với kháng nguyên đột biến và cả dạng kháng nguyên nguyên bản (wt).



**Hình 4. Kết quả Western blot của hai kháng nguyên Hla wt và Hla<sub>H35LH48L</sub> với kháng huyết thanh thu được từ chuột được tiêm Hla<sub>H35LH48L</sub>.** M: thang protein; (-): mẫu biểu hiện không cảm ứng IPTG; (+): mẫu biểu hiện có cảm ứng IPTG.

Để phân tích kỹ hơn, đề tài tiến hành nghiên cứu sự tương tác của của huyết thanh chuột thu nhận từ kháng nguyên 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> với hai kháng nguyên 6xHis-Hla wt và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> ở dạng tự nhiên (chưa bị biến tính như phương pháp Western Blot) bằng phương pháp ELISA với các nồng độ kháng nguyên và kháng thể khác nhau. Kết quả ELISA (hình 5A và 5B) cho thấy, ở độ pha loãng cao nhất 1/320.000, huyết thanh được thu nhận từ chuột gây đáp ứng miễn dịch bằng kháng nguyên 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> đều có khả năng tương tác với hai kháng nguyên 6xHis-Hla wt và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> (giá trị OD<sub>450 nm</sub> lớn hơn ngưỡng dương tính) ngay cả khi nồng độ của hai kháng nguyên chỉ là 1 µg/ml. Hai đột biến H35L và H48L hầu như không ảnh hưởng đến sự tương tác của huyết thanh với Apha-toxin. Do trong thực tế, *S. aureus* chỉ biểu hiện dạng nguyên bản nên

kết quả này còn cho thấy tiềm năng ứng dụng protein Hla<sub>H35LH48L</sub> để phát triển vắc-xin kháng *S. aureus* là rất lớn.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn khả năng phân ứng của kháng huyết thanh chuột được tiêm Hla<sub>H35LH48L</sub> với kháng nguyên Hla wt (A) và Hla<sub>H35LH48L</sub> (B) bằng phương pháp ELISA.

#### 4. Bàn luận

Các kết quả thu nhận được từ nghiên cứu này chứng tỏ tiềm năng ứng dụng protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> tái tổ hợp ở *E. coli* để phát triển vắc-xin kháng *S. aureus*. Tuy nhiên, do đây mới chỉ là nghiên cứu sơ bộ nên vẫn còn những vấn đề có thể tối ưu. Thứ nhất, nếu so sánh với những sản lượng thu nhận protein tái tổ hợp ở *E. coli* trong những nghiên cứu khác trên thế giới (cao nhất đạt mức 946 mg protein/l môi trường) [12], sản lượng thu nhận protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> trong nghiên cứu này chỉ bằng 1/48. Vấn đề này hoàn toàn có thể khắc phục bằng việc tiến hành tối ưu các điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, pH, thời gian, nồng độ oxy hòa tan, nồng độ các nguyên tố đa lượng, vi lượng...) bằng các phương pháp thống kê như Plackett-Burman, RSM (response surface methodology) [13], cũng như việc lên men theo mẻ có bổ sung dinh dưỡng (fed-batch fermentation) [14]. Thứ hai, đối với kết quả Western Blot (hình 3), các mẫu tế bào *E. coli* biểu hiện 6xHis-Hla wt và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> xuất hiện một số vạch khác với kích thước lý thuyết. Điều này có thể giải thích là do độ tinh sạch của protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> chỉ đạt mức trên 95% nên các protein tạp còn sót lại trong mẫu tinh chế vẫn gây ra đáp ứng miễn dịch và tạo kháng thể trên chuột. Dù vậy, để có thể ứng dụng làm vắc-xin cho người, các protein tạp này phải được loại bỏ gần như hoàn toàn (>99%) để ngăn ngừa xảy ra hiện tượng đáp ứng miễn dịch quá mức như cơn bão cytokine. Độ tinh sạch của protein mục tiêu hoàn toàn có thể gia tăng bằng các phương pháp tinh chế khác như sắc ký ion, sắc ký lọc gel. Cuối cùng, do hầu hết các nghiên cứu vắc-xin kháng *S. aureus* gần đây đều được định hướng phát triển đa kháng nguyên (tức là một loại vắc-xin mang nhiều yếu tố độc lực khác nhau) để đáp ứng sự thay đổi và đa dạng các yếu tố độc lực của *S. aureus* [15]. Trong các nghiên cứu tiếp theo, protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> cần được phối trộn với các nhân tố độc lực khác của *S. aureus* để tiếp tục nghiên cứu phát triển vắc-xin phòng các bệnh do vi khuẩn này gây ra.

#### 5. Kết luận

Protein 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub> đã được biểu hiện và thu nhận với độ tinh sạch cao ở dạng bất hoạt từ chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2361. Đồng thời, huyết thanh của chuột được gây đáp ứng miễn dịch 6xHis-

Hla<sub>H35LH48L</sub> có khả năng tương tác với cả hai dạng kháng nguyên là 6xHis-Hla wt và 6xHis-Hla<sub>H35LH48L</sub>. Kết quả sẽ là cơ sở quan trọng cho các nghiên cứu về trung hòa alpha-toxin *in vivo* và nghiên cứu phát triển vắc-xin phòng *S. aureus* trong các nghiên cứu tiếp theo.

#### LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.06-2019.11. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G.Y.C. Cheung, J.S. Bae, M. Otto (2021), "Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*", *Virulence*, **12**, pp.547-569, DOI: 10.1080/21505594.2021.1878688.
- [2] A. Gnanamani, P. Hariharan, M.P. Satyaseela (2017), "*Staphylococcus aureus*: Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach", *Frontiers in Staphylococcus aureus*, **25pp**, DOI: 10.5772/67338.
- [3] R. Ruimy, L.A. Lefevre, F. Barbier, et al. (2009), "Comparisons between geographically diverse samples of carried *Staphylococcus aureus*", *Journal of Bacteriology*, **191(18)**, pp.5577-5583, DOI: 10.1128/JB.00493-09.
- [4] S.J.V. Hal, S.O. Jensen, V.L. Vaska, et al. (2012), "Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia", *Clinical Microbiology Reviews*, **25(2)**, pp.362-386. DOI: 10.1128/CMR.05022-11.
- [5] E.Y. Garoy, Y.B. Gebreab, O.O. Achila, et al. (2019), "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Prevalence and antimicrobial sensitivity pattern among patients-a multicenter study in Asmara, Eritrea", *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, **2019**, 9pp, DOI: 10.1155/2019/8321834.
- [6] A.S. Lee, H.D. Lencastre, J. Garau, et al. (2018), "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*", *Nature Reviews Disease Primers*, **4**, DOI: 10.1038/nrdp.2018.33.
- [7] N.T. Son, V.T.T. Huong, V.T.K. Lien, et al. (2019), "First report on multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in children admitted to tertiary hospitals in Vietnam", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **29(9)**, pp.1460-1469, DOI: 10.4014/jmb.1904.04052.
- [8] S.A. Fritz, J.B. Wardenburg (2024), "A path forward for *Staphylococcus aureus* vaccine development", *Journal of Experimental Medicine*, **221(10)**, 3pp, DOI: 10.1084/jem.20240002.
- [9] M.J. Anderson, Y.C. Lin, A.N. Gillman, et al. (2012), "Alpha-toxin promotes *Staphylococcus aureus* mucosal biofilm formation", *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, **64(2)**, 10pp, DOI: 10.3389/fcimb.2012.00064.
- [10] L.Z. Song, M.R. Hobaugh, C. Shustak, et al. (1996), "Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore", *Science*, **274**, pp.1859-1866, DOI: 10.1126/science.274.5294.1859.
- [11] F. Lardeux, G. Torrico, C. Aliaga (2016), "Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls", *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **111(8)**, pp.501-504, DOI: 10.1590/0074-02760160119.
- [12] L.G. Morão, L.R. Manzine, L.O.D. Clementino, et al. (2022), "A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression", *PLOS ONE*, **17(7)**, 10pp, DOI: 10.1371/journal.pone.0271403.
- [13] D. Pal, G. Patel, S.H. Nile, et al. (2021), "Optimization of medium composition to increase the expression of recombinant human interferon-β using the Plackett-Burman and central composite design in *E. coli* SE1", *3 Biotech*, **11(5)**, 10pp, DOI: 10.1007/s13205-021-02772-1.
- [14] V. Babacipour, M.R. Mofid, S. Khanchezar, et al. (2017), "Bench-scale overproduction and purification of recombinant GCSF in *Escherichia coli* fed-batch process", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **7**, pp.149-155, DOI: 10.7324/JAPS.2017.70821.
- [15] N. Mohamed, M.Y. Wang, J.C.L. Huec, et al. (2017), "Vaccine development to prevent *Staphylococcus aureus* surgical-site infections", *The British Journal of Surgery*, **104(2)**, pp.e41-e54, DOI: 10.1002/bjs.10454.