

Tinh sạch và xác định hoạt tính của peptide deformylase từ *Helicobacter pylori* biểu hiện ở *Escherichia coli*

Đỗ Thị Thanh Trung^{1,*}, Lê Hồng Điệp¹, Phạm Bảo Yên²

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Vi khuẩn *Helicobacter pylori* được xác định là nguyên nhân chính gây ra các bệnh đường tiêu hóa với khả năng kháng thuốc điều trị đang ngày càng tăng lên. Đề tài nghiên cứu tinh sạch peptide deformylase, enzyme có vai trò xúc tác cho phản ứng loại bỏ nhóm formyl đầu N của chuỗi peptide mới hình thành trong vi khuẩn như một đích tác dụng mới cho việc sàng lọc, phát triển thuốc diệt *Helicobacter pylori*. Peptide deformylase tái tổ hợp từ *Helicobacter pylori* biểu hiện ở *E. coli* BL21-RIL có kích thước xấp xỉ 24,5 kDa được tách chiết thành công với hiệu suất đạt 37,2% và độ tinh sạch tăng lên 13 lần. Hoạt tính cắt nhóm formyl của HpPDF khá cao với K_m là 137,16 μ M và k_{cat}/K_m là 173,42 $M^{-1}s^{-1}$ và hoạt độ riêng đạt 145,3 U/mg.

Từ khóa: Peptide deformylase, *Helicobacter pylori*, tái tổ hợp, hoạt tính, kháng thuốc.

1. Đặt vấn đề

Helicobacter pylori vi khuẩn gram âm được tìm thấy ở niêm mạc của hơn 90% bệnh nhân mắc bệnh dạ dày với nguy cơ tiến triển thành các thể bệnh nặng bao gồm cả ung thư [1]. Việc sử dụng các loại kháng sinh như amoxicillin, clarithromycin và metronidazole trong điều trị bệnh đường tiêu hóa bao gồm viêm loét dạ dày, u xơ và ung thư dương tính với *H. pylori* ngày càng gặp nhiều khó khăn do tỷ lệ kháng thuốc gia tăng nhanh chóng [2]. Nhiều nghiên cứu tập trung vào tìm kiếm các đích tác dụng phân tử mới thay thế nhằm sàng lọc các hợp chất kháng *H. pylori* mới tiềm năng [3, 4]. Trong đó, peptide deformylase

(EC 3.5.1.88) là enzyme xúc tác cho phản ứng loại bỏ nhóm formyl thuộc methionyl khởi đầu (N-formyl methionyl) của chuỗi peptide mới hình thành ở sinh vật nhân sơ giúp chuỗi được kéo dài và có hoạt tính [3-5]. Nghiên cứu của Miesel và cộng sự đã chỉ ra rằng PDF đối với tế bào nhân thực chỉ có mức biểu hiện rất thấp và không đóng vai trò quan trọng [3]. Peptide deformylase tái tổ hợp được sử dụng làm đích sàng lọc các hợp chất ức chế nhiều vi khuẩn như *Leptospira interrogans* trong nghiên cứu của Li và cộng sự [6], *Plasmodium falciparum* (Kumar và cộng sự) [7] và *Escherichia coli* (Clements và cộng sự) [8]. Do vậy, peptide deformylase (PDF) có thể là đích tiềm năng nhằm sàng lọc thuốc tác dụng đích điều trị hiệu quả cho bệnh nhân nhiễm *H. pylori*.

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-984844115.

Email: trunglb83@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4622>

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Tinh sạch PDF tái tổ hợp từ *H. pylori*

Vector pET22b-*HpPDF94* tái tổ hợp được biểu hiện ở điều kiện nuôi cấy trong môi trường LB lỏng gồm cao nấm men, pepton và NaCl, có bổ sung CoCl_2 100 μM ở 30°C, cảm ứng bằng IPTG nồng độ 1 mM trong 4 giờ với hệ thống biểu hiện tế bào *E. coli* BL21-RIL [9]. Sau khi cảm ứng, sinh khối tế bào được thu lại bằng ly tâm rồi hòa tan trong đệm Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 và ly giải bằng siêu âm để thu được dịch chiết thô, sau đó được ly tâm ở 13000 vòng/phút, 4°C trong vòng 15 phút tách dịch trong và cặn. Dịch trong chứa protein pha tan được cho lên cột gel Ni-NTA đã được cân bằng trước, sau đó được rửa và đẩy với đệm Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 400 mM và imidazole có nồng độ lần lượt là 10 mM, 70 mM và 200 mM. Phân đoạn đẩy sau khi xác định có chứa protein đích và có hoạt tính được thẩm tách bằng đệm chứa Tris-HCl 20 mM pH 8,0 và NaCl 10 mM nhằm loại bỏ imidazole và muối, rồi bảo quản ở -20°C trong dung dịch đệm có chứa 50% glycerol.

2.2. Thử hoạt tính PDF tái tổ hợp

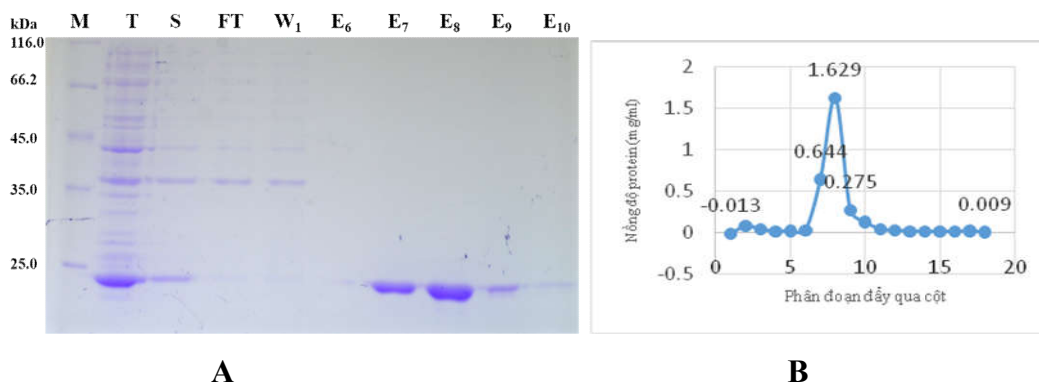
Hoạt tính *HpPDF* được đánh giá sử dụng phản ứng kép với formate dehydrogenase (FDH)

[10]. Formate được tạo ra bởi PDF từ cơ chất N-formyl-Met-Ala-Ser (fMAS) bị oxi hóa bởi FDH, khử NAD^+ thành NADH, hấp thụ bước sóng 340 nm ($\text{eM} \frac{1}{4} 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), được xác định bằng máy đo quang phổ Beckman DU 800. Phản ứng chuẩn diễn ra ở 37°C và đệm chứa HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 10 mM, BSA 0,2 mg/mL (Sigma, USA), NAD^+ 8 mM (Sigma, USA), FDH 0,5 U/mL (Sigma, USA) và cơ chất fMAS (Genscript, USA). Nồng độ cơ chất và nồng độ enzyme được thay đổi cho phù hợp với thiết kế thí nghiệm.

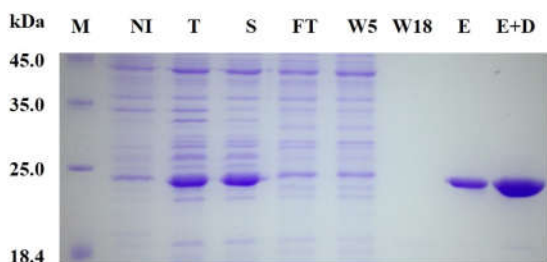
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tinh sạch *HpPDF*

Việc gắn đuôi 6xHis vào protein tái tổ hợp cho phép tinh sạch protein dễ dàng hơn để thu nhận protein tái tổ hợp có độ tinh sạch cao thể hiện qua ảnh điện di Hình 1A và nồng độ các phân đoạn được biểu diễn trên sắc ký đồ Hình 1B. Sắc ký đồ chỉ có một đỉnh duy nhất cho thấy nồng độ imidazole 200 mM là thích hợp để đẩy protein ra tập trung ở phân đoạn 8 và chính là protein đích với kích thước xấp xỉ 24,5 kDa.



Hình 1. Sắc ký đồ tinh sạch PDF qua cột Ni Sepharose High Performance (A) và Ảnh điện di biến tính protein SDS-PAGE (B). M: thang chuẩn protein (New England Biolabs); T: dịch chiết thô; S: dịch trong pha tan; FT: dịch qua cột; W₁: dịch rửa; E₆-10: dịch đẩy.



Hình 2. Ảnh điện di SDS-PAGE. M: Thang chuẩn protein (New England Biolabs); NI: mẫu không cảm ứng; T: dịch chiết thô; S: dịch trong pha tan; FT: dịch qua cột; W5,18: dịch rửa; E: phân đoạn đầy; E+D: dịch sau thẩm tách.

Quá trình tinh sạch đạt hiệu quả cao vì protein bị mất đi trong dịch qua cột (FT) và dịch rửa chỉ

khoảng 5% (Hình 1A và Hình 2). Bên cạnh đó, quá trình thẩm tách có hiệu quả trong việc cô đặc protein làm cho nồng độ PDF tăng lên khoảng 2,5 lần (Hình 2).

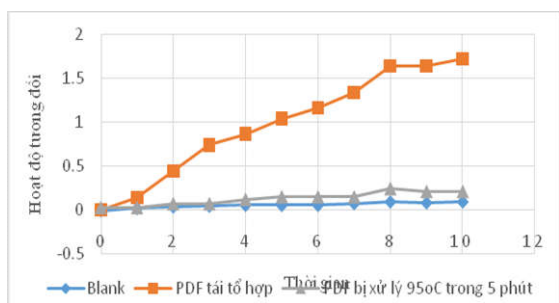
Trong nghiên cứu này, hiệu suất tinh sạch PDF được đánh giá qua từng bước tinh sạch được trình bày trong Bảng 1. Kết quả cho thấy PDF tái tổ hợp đã được tinh sạch có hoạt độ riêng tăng từ 11,4 U/mg protein đến 145,3 U/mg protein, tăng 13 lần so với enzym thô. Trong nghiên cứu của Meinel và cộng sự, PDF tái tổ hợp được tinh sạch với hiệu suất chỉ đạt 26,6 % và mức độ tinh sạch đạt xấp xỉ 6 lần [11]. Hơn nữa, hoạt độ riêng của PDF thu được cũng cao hơn nhiều so với PDF từ *E. coli* trong nghiên cứu đó (31.13 U/mg) [12].

Bảng 1. Hiệu suất tinh sạch HpPDF qua các bước

TT	Các bước tinh sạch	Tổng thể tích (ml)	Protein tổng số (mg)	Hoạt độ tổng số (U)	Hoạt độ riêng (U/mg)	Mức độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)
1	Enzyme thô	7	504	5756	11,4	1	100
2	Tinh sạch qua cột	8	16	2257	141,0	12	39,2
3	Thẩm tách	3	15	2179	145,3	13	37,8

3.2. Nghiên cứu hoạt tính của HpPDF

Hoạt tính cắt nhóm formyl của cơ chất đặc hiệu fMAS của PDF tái tổ hợp được so sánh với enzyme bị bất hoạt khi xử lý ở 95°C trong 5 phút và đối chứng với phản ứng không có mặt của PDF (Hình 3).

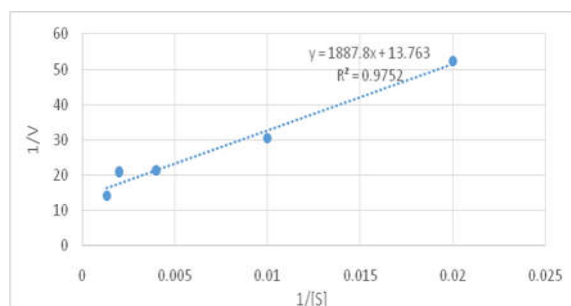


Hình 3. Hoạt tính cắt nhóm formyl trên cơ chất fMAS của PDF tái tổ hợp đã tinh sạch qua cột Ni.

Tiếp theo, kết quả khảo sát các thông số động học hoạt tính của Co-HpPDF tái tổ hợp biểu hiện trong *E. coli* được biểu thị và tính toán qua đồ thị Lineweaver-Burk (Hình 4). Giá trị K_m của PDF trong nghiên cứu này khá nhỏ, đạt 137,16 μM , nhỏ hơn giá trị K_m của PDF của các chủng biểu hiện trong nghiên cứu khác. Theo nghiên cứu của Han và cs [13] giá trị K_m của Co-HpPDF đạt 1700 μM , trong khi, nghiên cứu của Lee chỉ ra K_m của Co-HsPDF cao hơn nhiều, đạt 11.000 μM [14]. Vì K_m thể hiện ái lực của enzym với cơ chất, nên trong nghiên cứu này HpPDF có thể đạt được tốc độ phản ứng tối đa ngay ở nồng độ cơ chất thấp.

Giá trị k_{cat} và k_{cat}/K_m của HpPDF đạt 0,02 s^{-1} và 173,42 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, cao hơn so với các giá trị này trong nghiên cứu của Lee và cộng sự là 0,0081 và 0,74 [9]. Kết quả này cho thấy enzym nghiên cứu

có khả năng xúc tác chuyển hóa cơ chất rất lớn, đạt hiệu quả xúc tác cao.



Hình 4. Đồ thị sự phụ thuộc tốc độ phản ứng vào nồng độ cơ chất theo Lineweaver-Burk.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tinh sạch thành công peptide deformylase tái tổ hợp 24,5 kDa từ *H. pylori* biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21-RIL với hiệu suất tinh sạch cuối cùng đạt 37,2% và độ tinh sạch tăng lên 13 lần. Nghiên cứu đã đánh giá hoạt tính phân cắt nhóm formyl trên cơ chất fMAS của enzyme tái tổ hợp HpPDF cho thấy PDF thu được có hoạt tính cao với k_{cat} và k_{cat}/K_m là $0,02 \text{ s}^{-1}$ và $173,42 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài mã số: 106-NN.02-2013.55.

Tài liệu tham khảo

- [1] Axon A.T.R., Relationship between *Helicobacter pylori* gastritis, gastric cancer and gastric acid secretion, *Advances in Medical Sciences* 52 (2007) 55.
- [2] Seo J.H., Woo H.O., Youn H.S. and Rhee K.H., Antibiotics resistance of *Helicobacter pylori* and treatment modalities in children with *H. pylori* infection, *Korean Journal of Pediatrics* 572 (2014) 67.
- [3] Miesel L., Greene J., Black T.A., Microbial genetics: Genetic strategies for antibacterial drug discovery. *Nature Reviews Genetics* 4 (2003) 442.
- [4] Duckworth M.J., Okoli A.S., Mendz G.L., Novel *Helicobacter pylori* therapeutic targets: the unusual suspects. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 77 (2009) 835.
- [5] Livingston D.M. and Leder P., Deformylation and protein synthesis, *Biochemistry* 8 (1969) 435.
- [6] Yikun Li, Zhifeng Chen, and Weimin Gong, Enzymatic properties of a new peptide deformylase from pathogenic bacterium *Leptospira interrogans*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 295 (2002) 884.
- [7] Kumar A., Nguyen K.T., Srivathsan S., Ornstein B., Turley S., Hirsh I., Pei D., and Hol W.G.J., Crystals of Peptide Deformylase from *Plasmodium falciparum* Reveal Critical Characteristics of the Active Site for Drug Design. *Structure*, 10 (2002) 357.
- [8] Clements J.M., Beckett R.P., Brown A., Catlin G., Lobell M., Palan S., Thomas W., Whittaker M., Wood S., Salama S., Baker P.J., Rodgers H.F., Barynin V., Rice D.W., and Hunter M.G., Antibiotic activity and characterization of BB-3497, a novel peptide deformylase inhibitor, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 452 (2002) 563.
- [9] Đỗ Thị Thanh Trung, Lê Hồng Điệp, Phạm Bảo Yên, Nhân dòng và bước đầu biểu hiện peptide deformylase của chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* phân lập ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 31 4S (2015) 453.
- [10] Lazennec C. and Meinnel T., Formate Dehydrogenase-Coupled Spectrophotometric Assay of Peptide Deformylase, *Analytical Biochemistry* 244 (1997) 180.
- [11] Meinnel T. and Blanquet S., Enzymatic properties of *Escherichia coli* peptide deformylase, *Journal of Bacteriology* 1777 (1995) 1883.
- [12] Rajagopalan P.T., Datta A. and Pei D., Purification, characterization, and inhibition of peptide deformylase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 36 (1997) 13910.
- [13] Han C., Wang Q., Dong L., Sun H., Peng S., Chen J., Yang Y., Yue J., Shen X. and Jiang H., Molecular cloning and characterization of a new peptide deformylase from human pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319 (2004) 1292.
- [14] Lee M.D., Antczak C., Li Y., Sirotnak F.M., Bornmann W.G., Scheinberg D.A., A new human peptide deformylase inhibitable by actinonin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312 (2003) 309.

Purification and Characterization of Peptide Deformylase from *Helicobacter pylori* Expressed in *Escherichia coli*

Do Thi Thanh Trung¹, Le Hong Diep¹, Pham Bao Yen²

¹Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

²The Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology (KLEPT),
VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Abstract: *Helicobacter pylori* is the major reason causing gastrointestinal diseases and is characterized with the rapidly increase of multi drug resistance. In this project, we focused on studying peptide deformylase catalyzing for the crucial N-formyl cleavage from N-formyl methionyl at the beginning of new peptide chains in prokaryotes as an alternative target for screening potential anti-*H. pylori* compounds. The 24.5 kDa recombinant HpPDF expressed in *E. coli* BL21-RIL was successfully purified with a 13-fold increase in purity and 37.2% yield. HpPDF formyl removing specific activity was determined at 145.3 U/mg with K_m of 137.16 μ M and k_{cat}/K_m ratio of 173.42 $M^{-1}s^{-1}$.

Keywords: Peptide deformylase, *Helicobacter pylori*.