



Original Article

Cloning, Expression, Re-folding, and Purification of Protein Flic (*Salmonella* Enteritidis) with Deletion of Amino Acids 220-320

Nguyen Viet Anh^{1,2}, Tran Thi Bao Chau^{1,2},
Nguyen Phuoc Khai Hoan^{1,2}, Tran Van Hieu^{1,2,*}

¹University of Science, 227 Nguyen Van Cu, Dist. 5, Ho Chi Minh, Vietnam

²Vietnam National University Ho Chi Minh City, Vo Truong Toan,
Linh Trung, Thu Duc, Ho Chi Minh, Vietnam

Received 29 October 2019

Revised 01 January 2020; Accepted 29 November 2021

Abstract: In order to develop high-performance subunit vaccines, many studies are currently aiming at the development of immunoadjuvants. Flagellin protein (FliC) contained in the *Salmonella*'s filament is one of the potential candidates for this purpose. However, the high antigenic property of FliC has made it difficult to apply for many vaccines. A variant with the deletion of amino acids from 220 to 320 of flagellin has been proven to have an adjuvant effect with lower immunogenicity. In this present study, we cloned and expressed FliC_{Δ220-320} recombinant in *Escherichia coli* system. The expression of FliC_{Δ220-320} was induced by IPTG and confirmed by SDS-PAGE and Western Blot probed with 6xHis tag antibody. The results showed that the expressed protein existed mainly in inclusion bodies. The targeted protein was then solubilized, re-folded and purified by affinity chromatography method reaching the purity of 80%. In conclusion, we successfully expressed recombinant FliC_{Δ220-320} protein and this is a source for the evaluation and development of immune adjuvants.

Keywords: Adjuvant, flagellin, FliC_{Δ220-320}, inclusion bodies, *S. Enteritidis*, TLR5.

* Corresponding author.

E-mail address: tvhieu@hcmus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4966>

Tạo dòng, biểu hiện, tái gấp cuộn, và tinh sạch protein flic (*Salmonella enteritidis*) loại bỏ vùng trình tự axit amin 220-320 từ thể vùi

Nguyễn Việt Anh^{1,2}, Trần Thị Bảo Châu^{1,2},
Nguyễn Phước Khải Hoàn^{1,2}, Trần Văn Hiếu^{1,2,*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 227 Nguyễn Văn Cừ, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh, Võ Trường Toản, Linh Trung, Thủ Đức, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 29 tháng 10 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 01 tháng 01 năm 2020; Chấp nhận đăng ngày 29 tháng 11 năm 2021

Tóm tắt: Nhằm phát triển các thể hệ vaccine tiểu phần hiệu lực cao, nhiều nghiên cứu hiện nay đang nhắm tới việc phát triển các tá dược miễn dịch bổ sung vào thành phần của vaccine tiểu phần. Protein Flagellin (FliC) có trong thành phần cấu tạo của lông roi vi khuẩn *Salmonella* spp. là một trong những ứng cử viên tiềm năng đang được nghiên cứu cho mục đích này. Tuy nhiên, tính kháng nguyên cao của FliC đã làm cho việc ứng dụng phân tử này trong nhiều vaccine khác nhau gặp nhiều trở ngại. Trong số các nỗ lực tìm kiếm biến thể FliC có tính kháng nguyên thấp mà vẫn giữ được khả năng bổ trợ miễn dịch, biến thể FliC_{Δ220-320} (phân tử FliC loại bỏ vùng trình tự axit amin 220-320) đã được báo cáo là tiềm năng hơn cả. Với mục tiêu tạo nguồn protein FliC_{Δ220-320} tái tổ hợp, chúng tôi đã tiến hành dòng hóa và biểu hiện biến thể này trên hệ thống tế bào vi khuẩn *Escherichia coli*. Các kết quả phân tích SDS-PAGE và Western blot cho thấy chúng tôi đã biểu hiện thành công protein FliC_{Δ220-320} ở dạng thể vùi. Protein mục tiêu sau đó đã được hòa tan, tái gấp cuộn và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực đạt độ tinh sạch 80%. Như vậy, chúng tôi đã tạo thành công nguồn protein FliC_{Δ220-320} tái tổ hợp hướng đến mục đích phục vụ cho các đánh giá miễn dịch và phát triển tá dược về sau.

Từ khóa: Flagellin, FliC_{Δ220-320}, *S. Enteritidis*, tá dược, thể vùi, TLR5.

1. Mở đầu

Vaccine từ lâu đã được biết đến như một biện pháp hiệu quả trong việc chống lại các tác nhân gây bệnh truyền nhiễm. Ba loại vaccine được sử dụng trên người hiện nay là vaccine nhược độc, vaccine bất hoạt và vaccine tiểu phần [1]. Tuy được xem là loại vaccine hiệu quả nhất, vaccine nhược độc tồn tại nhiều nguy cơ tiềm ẩn hơn cả vì các vi khuẩn, virus trong vaccine có thể sẽ tái gây độc trở lại. Mặt khác, một số tác nhân gây bệnh rất khó hoặc không thể nuôi cấy được trong phòng thí nghiệm, làm

cho việc sản xuất các vaccine nhược độc và vaccine bất hoạt trở nên không khả thi. Vaccine tiểu phần ra đời như một giải pháp cho những khó khăn này. Vaccine này thường chứa kháng nguyên là các thành phần của mầm bệnh đã được tinh sạch hoặc được tổng hợp. Tuy nhiên, nếu chỉ chứa duy nhất kháng nguyên tinh sạch thì các vaccine này không đủ khả năng kích thích các đáp ứng miễn dịch mạnh mẽ từ cơ thể vật chủ. Do vậy, việc bổ sung các chất có khả năng bổ trợ miễn dịch (tá dược miễn dịch) vào các vaccine loại này là rất cần thiết [2]. Sự có mặt của các chất bổ trợ trong vaccine giúp tăng cường, thúc đẩy và kéo dài các đáp ứng miễn dịch đặc hiệu hướng tới các kháng nguyên mong muốn. Từ năm 2009, các nhà khoa học

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: tvhieu@hcmus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4966>

trên thế giới đang tập trung vào một loại tá được xuất phát từ các vi sinh vật, đó là kiểu mẫu phân tử liên quan với mầm bệnh (Pathogen associated molecular pattern - PAMP). Các phân tử này được bắt giữ bởi các thụ thể có mặt trên các dòng tế bào miễn dịch như đại thực bào, tế bào tua,... Việc tương tác của các phân tử này với các thụ thể của nó tạo ra các tín hiệu nội bào giúp tăng cường các đáp ứng miễn dịch [3]. Một trong những phân tử PAMP được nghiên cứu rất kỹ về khả năng bị bắt giữ bởi thụ thể trên bề mặt tế bào miễn dịch và hoạt tính tá được miễn dịch đó là protein flagellin [4].

Protein flagellin, một phân tử PAMP, là đơn phân chính cấu thành nên lông roi của các chủng vi khuẩn Gram dương và Gram âm. Trong số các phân tử Flagellin từ các loài vi khuẩn khác nhau đã được nghiên cứu, Flagellin của *Salmonella* spp. được chú ý như một tá được miễn dịch tiềm năng hơn cả bởi các đặc tính hỗ trợ miễn dịch hiệu quả của nó thông qua sự liên kết mạnh mẽ với phân tử thụ thể TLR5 hiện diện trên bề mặt của các tế bào miễn dịch bẩm sinh như tế bào tua, đại thực bào, các tế bào Langerhans biểu bì,... [5]. Tuy nhiên, ở vùng biến động của protein flagellin chứa đựng kháng nguyên pha H đặc hiệu của các typ huyết thanh vi khuẩn gây bệnh có thể làm cho khả năng đáp ứng miễn dịch của cơ thể đối với các kháng nguyên mục tiêu có trong vaccine bị suy giảm [6], dẫn đến việc sử dụng flagellin làm tá được sẽ trở nên vô nghĩa. Bên cạnh đó, tính kháng nguyên cao của FliC cũng tạo nên một rào cản lớn để phân tử FliC có thể được ứng dụng làm tá được cho nhiều vaccine tiểu phần.

Do vậy, nhiều nghiên cứu biến đổi protein Flagellin đã được tiến hành. Năm 2008, Nempont và cs đã công bố rằng việc loại bỏ vùng siêu biến động của Flagellin đã làm mất khả năng kích hoạt sự sản xuất các kháng thể trung hòa Flagellin nhưng không làm thay đổi đáng kể khả năng kích thích các đáp ứng tiền viêm, tức là vẫn giữ được khả năng kích hoạt TLR5 [7]. Ở một nghiên cứu khác trong năm 2010, Liu và cộng sự đã loại bỏ đoạn trình tự axit amin 220 - 320 (FliC_{Δ220-320}), tính kháng nguyên có sự giảm đi đáng kể so với phân tử FliC, đặc

biệt các cytokine tiền viêm lại được tiết ra nhiều hơn [8]. Vì vậy, chúng tôi nhận định rằng protein này có tiềm năng phát triển làm tá được miễn dịch.

Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu về việc ứng dụng protein FliC_{Δ220-320} trong phát triển tá được và nguồn FliC_{Δ220-320} nguyên liệu phục vụ cho các nghiên cứu về sau là vô cùng quan trọng. Do đó, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein flagellin được loại bỏ vùng biến động từ axit amin 220 đến 320 (FliC_{Δ220-320}) nhằm tạo ra nguồn FliC_{Δ220-320} nguyên liệu phục vụ cho các nghiên cứu đánh giá miễn dịch cũng như phát triển tá được trong tương lai.

2. Thực nghiệm

2.1. Chủng vi sinh vật, plasmid và môi trường nuôi cấy

Escherichia coli DH5α [F- endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ-recA1 gyrA96 Δ lacU169 (φ80 lacZ ΔM15)] được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và lưu trữ plasmid tái tổ hợp mục tiêu.

Escherichia coli BL21 (DE3) [F-dcm ompT hsdSB (rB-mB-) gal met] được sử dụng làm chủng chủ để biểu hiện protein mục tiêu dưới sự cảm ứng của IPTG.

Salmonella enterica serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) được sử dụng làm khuôn để thu nhận trình tự gen *fliC*_{Δ220-320}.

Plasmid pET-28a (Novagen) có kích thước 5369 bp, được dùng để thiết kế vector biểu hiện FliC_{Δ220-320} dưới sự kiểm soát của promoter T7 và có mang gen kháng kháng sinh kanamycin dùng để sàng lọc thể biến nạp.

Các chủng vi khuẩn và plasmid được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ sinh học phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Các môi trường được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: LB (Trypton 10 g/L, cao nấm men 5 g/L, NaCl 5 g/L), LB-Kan50 (môi trường LB có bổ sung kháng sinh kanamycin nồng độ cuối 50 μg/mL). LB-Kan50 agar (môi trường LB-Kan50 với agarose 2%).

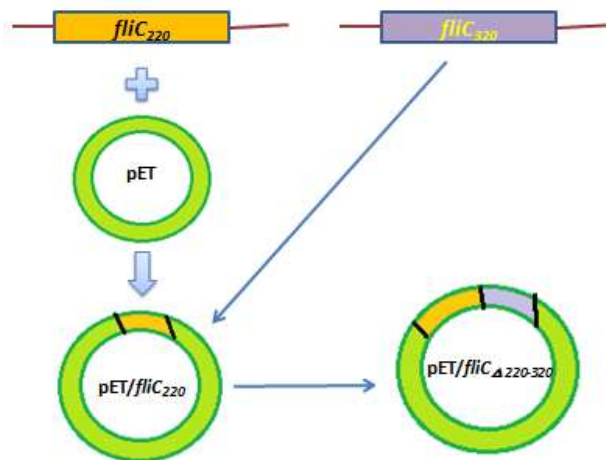
2.2. Thiết kế plasmid pET-*fliC* Δ 220-320

Plasmid pET/*fliC* Δ 220-320 được cấu trúc qua hai bước: bước thứ nhất, cấu trúc plasmid tái tổ hợp trung gian pET/*fliC*₂₂₀. Bước thứ hai, đoạn *fliC*₃₂₀ tiếp tục được nối vào phía sau trình tự *fliC*₂₂₀ trên plasmid pET/*fliC*₂₂₀ để tạo plasmid pET/*fliC* Δ 220-320 (Hình 1).

Các đoạn gen *fliC*₂₂₀ và *fliC*₃₂₀ được thu nhận từ bộ gen của *S. enterica* serovar Enteritidis bằng kỹ thuật phản ứng chuỗi polymerase (PCR) với các cặp mồi 220F/220R

và 320F/320R tương ứng được thiết kế đặc hiệu cho từng đoạn gen.

Phản ứng PCR nhân bản đoạn gen được thực hiện với các thành phần sau: 4 μ l MgCl₂ 25 mM; 5 μ l dNTP 8 mM; 5 μ l buffer Taq 1X; 1 μ l mỗi xuôi 0,5 μ M; 1 μ l mỗi ngược 0,5 μ M; 100 ng khuôn DNA; Taq DNA polymerase 1U; và ddH₂O được bổ sung để đủ 50 μ l. Phản ứng PCR được thực hiện với 30 chu kỳ nhiệt bao gồm ba bước: biến tính 95 °C, 45 giây, gắn mồi ở 57 °C, 30 giây và kéo dài chuỗi ở 72 °C, 45 giây.



Hình 1. Các bước cấu trúc plasmid tái tổ hợp pET/*fliC* Δ 220-320.

Ở bước 1: plasmid pET-28a và đoạn gen *fliC*₂₂₀ (thu nhận bằng mồi xuôi 220F: CATATGgcacaagtcattaata và mồi ngược 220R: GAATTctgcacgtcactac) được cắt bằng cặp enzyme *NdeI/EcoRI*. Sản phẩm cắt được tinh sạch bằng bộ kit EZ-10 Spin Column DNA (Biobasic) và được nối bằng enzyme *Ligase*. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp và trải trên đĩa môi trường LB-Kan 50, ủ ở 37 °C trong 16-18 giờ. Do gen kháng kháng sinh kanamycin được thiết kế trên plasmid pET-28a nên các thể biến nạp mang plasmid tái tổ hợp pET/*fliC*₂₂₀ được sàng lọc bước đầu bằng môi trường nuôi cấy chứa kháng sinh kanamycin (LB-Kan50). Các khuẩn lạc mọc được trên đĩa LB-Kan50 tiếp tục được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi 220F/T7ter. Plasmid pET/*fliC*₂₂₀ được

tách chiết từ các khuẩn lạc dương tính để sử dụng trong bước 2.

Ở bước 2: plasmid pET/*fliC*₂₂₀ và đoạn gen *fliC*₃₂₀ (thu nhận bằng mồi xuôi 320F: GAATTCaatgctgctaccttac và mồi ngược 320R: CTCGAGacgcagtaagagag) được cắt bằng cặp enzyme *EcoRI/XhoI*. Các bước cắt, nối và biến nạp được thực hiện tương tự như bước 1.

Đòng *E. coli* DH5 α mang plasmid mục tiêu pET/*fliC* Δ 220-320 được sàng lọc bằng phương pháp sàng lọc kháng sinh trên đĩa môi trường LB-Kan50 và sàng lọc PCR khuẩn lạc với cặp mồi 220F/320R. Plasmid tách từ các khuẩn lạc dương tính trong sàng lọc PCR khuẩn lạc được kiểm tra cấu trúc bằng phản ứng cắt plasmid với cặp enzyme *NdeI/XhoI*.

Plasmid tách từ các khuẩn lạc dương tính trong các sàng lọc trên được kiểm tra trình tự bởi Công ty Sinh hóa Phù Sa. Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự lý thuyết bằng phần mềm Jellyfish.

2.3. Tạo dòng chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} và cảm ứng biểu hiện *FliC*_{Δ220-320}

Plasmid pET-*fliC*_{Δ220-320} được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3). Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường LB-Kan50 được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi 220F/320R. Các khuẩn lạc dương tính với phản ứng PCR được lựa chọn để cấy hoạt hóa và tăng sinh trong môi trường LB-Kan50 ở 37 °C và tốc độ lắc 250 vòng/phút. Sự biểu hiện của *FliC*_{Δ220-320} được cảm ứng bằng IPTG 0,5 mM tại thời điểm OD₆₀₀ của dịch nuôi cấy đạt 0,8 - 1. Sau 4 giờ cảm ứng, sinh khối vi khuẩn được thu nhận để phân tích.

Mẫu sinh khối vi khuẩn sau cảm ứng biểu hiện được hòa lại trong đệm Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 và xử lý phá tế bào bằng siêu âm với 10 xung 15W, mỗi xung dài 30 giây và ngưng 30 giây giữa các xung. Mẫu sinh khối đã xử lý được cho vào hai ống mới, mỗi ống 100 μl. Một ống gọi là mẫu protein tổng số. Ống còn lại được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dịch nổi được thu nhận và cho vào một ống khác, gọi là mẫu protein pha tan. Phần tủa được hòa lại trong 100 μl nước cất vô trùng, gọi là mẫu protein pha tủa.

Khả năng biểu hiện của protein *FliC*_{Δ220-320} từ chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) trong các mẫu protein pha tổng, tủa và tan được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide có SDS (SDS - PAGE), protein được nhuộm màu với Coomassie Brilliant Blue G-250.

Phương pháp lai miễn dịch - Western blot với kháng thể kháng đuôi dung hợp 6xHis được sử dụng để xác nhận một cách gián tiếp sự biểu hiện của *FliC*_{Δ220-320}. Các mẫu protein được phân tách bằng phương pháp SDS-PAGE, sau đó được chuyển sang màng nitrocellulose. Kháng thể sơ cấp (kháng thể chuột đơn dòng kháng Histidine -

Santa Cruz) và kháng thể thứ cấp (kháng thể thỏ kháng kháng thể chuột cộng hợp enzyme Horseradish peroxidase - Santa Cruz) lần lượt được bổ sung lên màng lai. Kết quả được ghi nhận bằng phương pháp hiện phim bằng cơ chất ECL (GE). Tín hiệu trên bản phim được số hoá bằng máy scan ảnh chuyên dụng với độ phân giải cao (300dpi).

2.4. Hòa tan thể vùi và tái gấp cuộn protein *FliC*_{Δ220-320}

Tế bào *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} được cảm ứng bằng IPTG, thu sinh khối, phá tế bào bằng sóng siêu âm, và ly tâm để thu nhận thể vùi protein *FliC*_{Δ220-320}. Thể vùi sau đó được rửa ba lần với dung dịch Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, Triton X-100 1% để loại bỏ các protein màng của vi khuẩn. Tiếp đến, dung dịch Tris-HCl 20 mM pH 8.0, Guanidine-HCl 2 M, Isopropanol 2% được sử dụng để hòa tan thể vùi *FliC*_{Δ220-320} trong 2 giờ, ở 10°C. Dung dịch thể vùi hòa tan được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 30 phút để kiểm tra sự tan của thể vùi *FliC*_{Δ220-320} trong dịch nổi. Kết quả hòa tan thể vùi được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE.

Thể vùi sau khi hòa tan được tái gấp cuộn bằng phương pháp thẩm tách với dung dịch Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, EDTA 2 mM trong điều kiện 4°C, 24 giờ. Dung dịch protein sau thẩm tách được ly tâm trong 30 phút với tốc độ 13.000 vòng/phút. Phần dịch nổi sau ly tâm được dùng cho bước tinh sạch *FliC*_{Δ220-320}.

2.5. Tinh sạch *FliC*_{Δ220-320}

Protein *FliC*_{Δ220-320} được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực sử dụng cột HisTrap (GE Healthcare): 5 ml dung dịch protein *FliC*_{Δ220-320} cần tinh chế được nạp vào cột HisTrap. Rửa cột bằng 25 ml dung dịch Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, Imidazole 20 mM nhằm loại bỏ những thành phần gắn không chuyên biệt ra khỏi cột. Dung ly protein mục tiêu còn gắn lại trên cột bằng 10 ml dung dịch dung ly (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 100 mM, Imidazole 200 mM). Dịch dung ly

được thu nhận để kiểm tra độ sạch của protein mục tiêu sau tinh chế bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và phần mềm phân tích hình ảnh Image J. Cột HisTrap sử dụng có dung tích 5 ml, tốc độ dòng chảy qua cột khi cân bằng cột và rửa cột là 1,0 ml/phút; khi nạp mẫu và dung ly protein là 0,5 ml/phút.

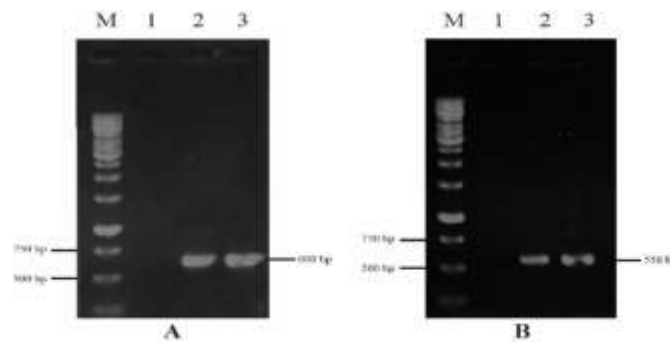
3. Kết quả

3.1. Thu nhận gen *fliC*₂₂₀ và gen *fliC*₃₂₀

Gen *fliC*₂₂₀ được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu. Kết quả điện di sản

phẩm PCR trên gel agarose 1% cho một vạch có kích thước 660 bp (Hình 2 A, giếng 2) tương ứng với kích thước gen *fliC*₂₂₀ theo lý thuyết. Như vậy, cặp mồi đặc hiệu do chúng tôi thiết kế có khả năng thu nhận trình tự gen mục tiêu đúng kích thước lý thuyết. Sản phẩm PCR sau đó được cắt bằng cặp enzyme cắt giới hạn *NdeI* và *EcoRI* (Hình 2 A, giếng 3) để chuẩn bị cho việc dòng hóa vào plasmid pET-28a.

Gen *fliC*₃₂₀ cũng được thu nhận và xử lý tương tự bằng cặp enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *XhoI* (Hình 2 B).



Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose. (A) Thu nhận và xử lý gen *fliC*₂₂₀. M, thang DNA; 1, chứng âm; 2, gen *fliC*₂₂₀; 3, gen *fliC*₂₂₀ được xử lý với *NdeI* và *EcoRI*. (B) Thu nhận và xử lý gen *fliC*₃₂₀. M, thang DNA; 1, chứng âm; 2, gen *fliC*₃₂₀; 3, gen *fliC*₃₂₀ được xử lý với *EcoRI* và *XhoI*.

3.2. Tạo plasmid tái tổ hợp pET-28a mang gen *fliC*_{Δ220-320}

Plasmid pET-28a và đoạn gen *fliC*₂₂₀ sau cắt, được nối lại với nhau và sản phẩm nối được biến nạp vào chủng chủ *E. coli* DH5α. Để sàng lọc các dòng *E. coli* DH5α mang pET/*fliC*₂₂₀, các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-Kan50 được tiến hành PCR. Cặp mồi được sử dụng trong sàng lọc này bao gồm một mồi xuôi 220F bắt cặp đặc hiệu với trình tự *fliC*₂₂₀ và một mồi ngược T7ter bắt cặp đặc hiệu với trình tự T7 terminator trên plasmid pET-28a.

Kết quả sàng lọc được hiển thị trên gel agarose 1% (Hình 3 A, giếng 3, 4, 5) cho thấy có sự xuất hiện của một vạch kích thước khoảng 785 bp lớn hơn kích thước của gen

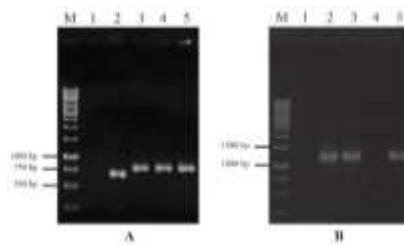
*fliC*₂₂₀ (Hình 3 A, giếng 2). Khoảng cách từ vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *EcoRI* tới T7 terminator là 105 bp, trong khi đó kích thước của gen *fliC*₂₂₀ là 660 bp. Nếu gen *fliC*₂₂₀ chèn đúng trong vùng MCS của plasmid pET-28a như đã thiết kế thì sản phẩm PCR với cặp mồi 79F/T7ter sẽ có kích thước 785 bp. Plasmid từ các khuẩn lạc dương tính với phản ứng PCR được tiến hành tách chiết để phục vụ cho việc nối trình tự gen *fliC*₃₂₀ còn lại.

Trình tự gen *fliC*₃₂₀ được nối vào plasmid pET-*fliC*₂₂₀ bằng cách tiếp cận tương tự. Các dòng *E. coli* DH5α mang pET/*fliC*_{Δ220-320} tiếp tục được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc và giải trình tự DNA. Kết quả PCR khuẩn lạc (Hình 3 B, giếng 2, 3, 5) cho một

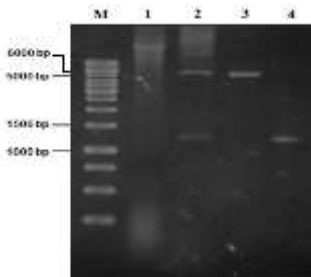
vạch kích thước khoảng 1215 bp trên bản điện di bằng với kích thước của gen *fliC*₂₂₀ và gen *fliC*₃₂₀ cộng lại. Như vậy, các khuẩn lạc cho kết quả sàng lọc dương tính ở giếng 2, 3 và 5 có khả năng mang plasmid pET-28a có gắn gen *fliC*_{Δ220-320}.

Để xác định vị trí nối các đoạn *fliC*₂₂₀ và *fliC*₃₂₀ vào plasmid pET-28a là đúng với thiết kế ban đầu, chúng tôi thực hiện phản ứng cắt kiểm tra plasmid pET/*fliC*_{Δ220-320} đã sàng lọc với hai enzyme *NdeI* và *XhoI*. Kết quả thể hiện ở Giếng

2, Hình 4 chỉ ra rằng sản phẩm cắt plasmid pET/*fliC*_{Δ220-320} chứa hai đoạn DNA, một đoạn (giếng 3) bằng kích thước với sản phẩm cắt plasmid pET-28a bằng *NdeI* và *XhoI* (5289bp), đoạn còn lại (giếng 4) có cùng kích thước với gen *fliC*_{Δ220-320} (1215bp). Như vậy, chúng tôi đã chèn đoạn gen *fliC*_{Δ220-320} vào plasmid pET-28a ở vị trí trình tự nhận biết của enzyme *NdeI* và *XhoI* trên plasmid theo đúng với thiết kế ban đầu.



Hình 3. Kết quả sàng lọc dòng vi khuẩn *E. coli* DH5 α , (A) mang plasmid tái tổ hợp pET/*fliC*₂₂₀. M, thang DNA; 1, chứng âm; 2, gen *fliC*₂₂₀; 3-5, khuẩn lạc sàng lọc, (B) mang plasmid tái tổ hợp pET/*fliC*_{Δ220-320}. M, thang DNA; 1, chứng âm; 2-5 khuẩn lạc sàng lọc.



Hình 4. Kiểm tra cấu trúc plasmid pET/*fliC*_{Δ220-320} bằng phương pháp cắt với cặp enzyme *NdeI* và *XhoI*. M, Thang DNA; 1, plasmid pET/*fliC*_{Δ220-320}; 2, plasmid pET/*fliC*_{Δ220-320} cắt bởi *NdeI* và *XhoI*; 3, plasmid pET28a cắt bởi *NdeI* và *XhoI*; 4, gen *fliC*_{Δ220-320}

Plasmid tái tổ hợp pET-*fliC*_{Δ220-320} được tiến hành kiểm tra sự chính xác của gen được chèn vào bằng cách giải trình tự plasmid tái tổ hợp với cặp môi T7pro/T7ter. Sử dụng phần mềm Jellyfish để sắp giống hàng và phân tích kết quả giải trình tự. Kết quả được thể hiện ở Hình 5 cho thấy gen *fliC*_{Δ220-320} dòng hóa được có sự tương đồng 100% với trình tự lý thuyết. Như

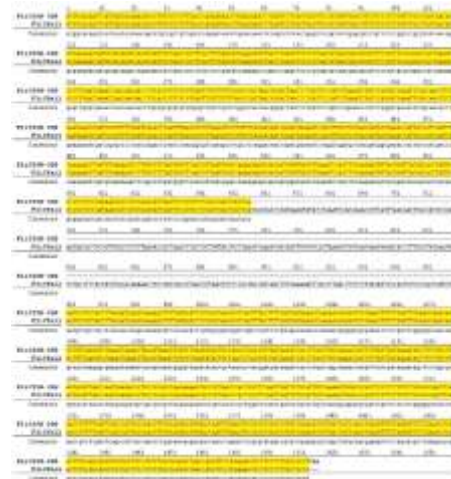
vậy, chúng tôi đã cấu trúc thành plasmid pET-*fliC*_{Δ220-320} đúng với thiết kế ban đầu.

3.3. Biểu hiện protein *FliC*_{Δ220-320} trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3)

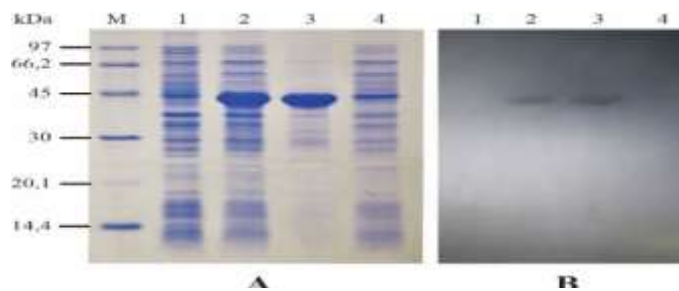
Plasmid pET-*fliC*_{Δ220-320} được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3). Các thể biến nạp được sàng lọc trên môi trường LB-Kan50 và kiểm tra lại bằng PCR khuẩn lạc

với cặp mồi 220F/320R (kết quả không trình bày ở đây). Khuẩn lạc cho kết quả dương tính với phản ứng PCR được chọn để biểu hiện protein FliC_{Δ220-320}. Kết quả phân tích SDS-PAGE (Hình 6 A) cho thấy, ở các giếng 2 và 3 lần lượt là các mẫu protein pha tổng và pha tủa của chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} được cảm ứng biểu hiện có sự xuất hiện của một vạch protein to và đậm có kích thước gần với vạch 45 kDa của thang chuẩn LMW, tương ứng với kích thước dự đoán của protein FliC_{Δ220-320} là 44 kDa. Mặt khác, ở giếng 1 là mẫu tế bào *E. coli* BL21 (DE3) không mang plasmid tái tổ hợp, không có sự xuất hiện của vạch protein này. Như vậy, cả mẫu protein pha tổng và pha tủa của chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} được cảm ứng có xuất hiện vạch protein với kích thước tương ứng với protein FliC_{Δ220-320} và phần lớn nằm trong pha tủa, nên có khả năng chủng *E. coli* BL21

(DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} đã tổng hợp được protein FliC_{Δ220-320} ở dạng thể vùi.



Hình 5. Kết quả giống hàng trình tự gen *fliC*_{Δ220-320} dòng hóa được và gen *fliC* hoàn chỉnh.



Hình 6. Kiểm tra biểu hiện protein *FliC*_{Δ220-320} của chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} bằng điện di SDS-PAGE (A) và lai Western blot (B). M, thang protein LMW; 1, protein tổng số từ *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a cảm ứng bằng IPTG; 2 – 4, protein tương ứng pha tổng, tủa và tan từ *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} cảm ứng bằng IPTG.

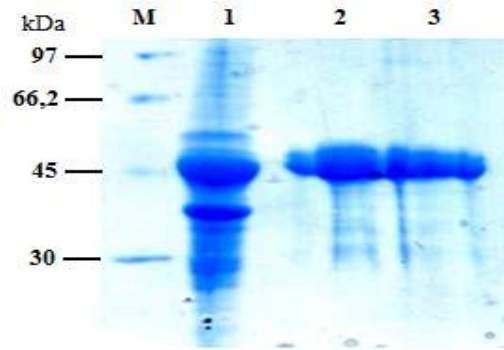
Thêm vào đó, protein FliC_{Δ220-320} tái tổ hợp được biểu hiện dung hợp với đuôi 6xHis được mã hóa bởi sáu codon CAC có trên vector pET-28a nên sự hiện diện của FliC_{Δ220-320} tái tổ hợp có thể được xác nhận gián tiếp thông qua đuôi 6xHis này. Kết quả xác nhận sự hiện diện của FliC_{Δ220-320} bằng phương pháp Western blot với kháng thể kháng đuôi 6xHis cho thấy vạch

protein biểu hiện vượt mức trong bản điện di SDS-PAGE (Hình 6 A, Giếng 2 và 3) chính là protein có chứa đuôi dung hợp 6xHis (Hình 6 B, Giếng 2 và 3) và protein này được biểu hiện hầu hết ở pha tủa (Hình 6 B, Giếng 3). Như vậy, FliC_{Δ220-320} tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên chủng *E. coli*

BL21(DE3)/pET/*fliC*_{Δ220-320} dưới dạng dung hợp với đuôi 6xHis.

3.4. Tinh sạch protein *FliC*_{Δ220-320}

Thông qua việc gắn đuôi dung hợp 6xHis, protein *FliC*_{Δ220-320} cũng dễ dàng được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực với cột HisTrap. Kết quả hòa tan thể vùi và tinh sạch protein mục tiêu được trình bày ở Hình 7.



Hình 7. Kết quả tinh chế protein *FliC*_{Δ220-320} được kiểm tra trên gel polyacrylamide 15% (nhuộm với thuốc nhuộm Coomassie brilliant blue). M, thang protein LMW; 1, protein tổng số từ *E. coli* BL21(DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} cảm ứng bằng IPTG; 2, protein pha tủa sau hòa tan từ *E. Coli* BL21(DE3)/pET-*fliC*_{Δ220-320} cảm ứng IPTG; 3, protein *FliC*_{Δ220-320} sau tái gấp cuộn và tinh sạch.

Bảng điện di Hình 7 thể hiện rằng *FliC*_{Δ220-320} đã được hòa tan tốt sau 2 giờ xử lý trong dung dịch chứa 2M Guanidine-HCl (giếng 2). Bên cạnh đó, kết quả phân tích độ sạch tương đối của *FliC*_{Δ220-320} (giếng 3) bằng phần mềm Image J cho thấy protein *FliC*_{Δ220-320} tái tổ hợp đã được tinh sạch và thu nhận thành công với độ tinh sạch là 80% (kết quả phân tích không được thể hiện ở đây). Hiện nay, chưa có bất kỳ công trình nào về việc tái gấp cuộn và tinh sạch *FliC*_{Δ220-320} được công bố trên thế giới và cả ở Việt Nam. Chúng tôi lần đầu tiên thành công trong việc thu nhận *FliC*_{Δ220-320} dạng tan thông qua tái gấp cuộn.

4. Thảo luận

Protein flagellin có nguồn gốc từ *S. enterica* serovar Enteritidis có 505 axit amin trong trình tự, bao gồm hai vùng bảo thủ ở hai đầu N và C (D0 và D1) và một vùng biến động (D2/D3) nằm ở giữa [9]. Các phân tích về trình tự và cấu

trúc của protein này cho thấy vùng bảo thủ (D0/D1) bao gồm đầu N- chiếm khoảng 170 axit amin và đầu C- chiếm 90 axit amin. Hai vùng này cần thiết cho việc nhận biết cũng như hoạt động của TLR5 thông qua ba cấu trúc xoắn bên [10, 11]. Vùng biến động nằm từ vị trí axit amin 170 tới 400, không cần thiết cho hoạt động của TLR5 nhưng thiết yếu cho kháng nguyên flagellin *FliC* do chúng chứa đựng kháng nguyên pha H đặc hiệu của các typ huyết thanh vi khuẩn gây bệnh [6]. Thật vậy, trong một nghiên cứu về ảnh hưởng của các domain đối với hoạt tính tá được của flagellin, Nempont và cs đã đưa ra hai kết luận quan trọng: i) Sự trung hòa flagellin bởi kháng thể kháng flagellin đã làm mất khả năng kích hoạt TLR5 của protein này; và ii) Có sự tách rời về mặt chức năng giữa các domain mang tính kháng nguyên và các domain hoạt hóa TLR5 của flagellin. Các tác giả cho biết rằng việc loại bỏ vùng biến động của flagellin đã loại bỏ khả

năng kích hoạt sự sản xuất các kháng thể trung hòa flagellin trên chuột nhưng không làm thay đổi đáng kể khả năng kích thích các đáp ứng tiền viêm trong thí nghiệm [1]. Từ đó có thể thấy, việc loại bỏ vùng biến động của flagellin sẽ không ảnh hưởng sự tương tác giữa flagellin và TLR5. Tiếp sau đó, Liu và cộng sự (2010) đã đưa ra những kết quả đáng chú ý. Nhóm tác giả cho thấy rằng việc loại bỏ 100 amino acid trong vùng trình tự biến động D2, D3 của Flagellin (FliC) đã tạo nên biến thể FliC-delta220-320 (FliC Δ 220-320) vẫn giữ được khả năng kích thích tạo các cytokine tiền viêm mà tính kháng nguyên của nó được giảm đi đáng kể [11].

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã cấu trúc thành công plasmid tái tổ hợp pET-*fliC* _{Δ 220-320} và tạo thành công dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid pET-*fliC* _{Δ 220-320} có khả năng biểu hiện vượt mức protein FliC _{Δ 220-320} (44 kDa) ở dạng thể vùi trong tế bào chất. Sự tổng hợp protein đích trong dòng *E. coli* tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE và khẳng định bằng phương pháp Western blot với kháng thể kháng đuôi dung hợp 6xHis. Protein FliC _{Δ 220-320} dạng thể vùi, lần đầu tiên đã được chúng tôi hòa tan, tái gấp cuộn và tinh sạch với độ tinh sạch 80%. Như vậy, chúng tôi đã bước đầu tinh sạch và thu nhận thành công protein FliC _{Δ 220-320} tái tổ hợp để phục vụ cho các đánh giá miễn dịch tiếp theo.

Tài liệu tham khảo

- [1] S. Lee, M. T. Nguyen, Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases, *Immune Network*, Vol. 15, No. 2, 2015, pp. 51-57, <https://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>.
- [2] F. R. Vogel, Improving Vaccine Performance with Adjuvants, *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 30 (Supplement 3), 2000, pp. S266-S270, <https://doi.org/10.1086/313883>.
- [3] T. H. Mogensen, Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 22, No. 2, 2009, pp. 240-273, <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>.
- [4] F. Hayashi, K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, A. Aderem, The Innate Immune Response to Bacterial Flagellin is Mediated by Toll-like Receptor 5, *Nature* Vol. 410, 2001, pp. 1099-1103, <https://doi.org/10.1038/35074106>.
- [5] E. A. Nissen, K. D. Smith, K. L. Strobe, S. L. R. Barret, B. T. Cookson, S. M. Logan, A. Aderem, Evasion of Toll-like Receptor 5 by Flagellated Bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 102, No. 26, 2005, p. 9247-9252, <https://doi.org/10.1073/pnas.0502040102>.
- [6] K. D. Smith, E. A. Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. A. Bergman, S. L. Barrett, et al., Toll-like Receptor 5 Recognizes a Conserved Site on Flagellin Required for Protofilament Formation and Bacterial Motility, *Nature Immunology*, Vol. 4, 2003, pp. 1247-1253, <https://doi.org/10.1038/ni1011>.
- [7] C. Nempont, D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret and Jean-Claude Sirard, Deletion of Flagellin's Hypervariable Region Abrogates Antibody-Mediated Neutralization and Systemic Activation of TLR5-Dependent Immunity, *The Journal of Immunology*, Vol. 181, 2008, pp. 2036-2043, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2036>.
- [8] F. Liu, J. Yang, Y. Zhang, D. Zhou, Y. Chen, W. Gai, et al., Recombinant Flagellins with Partial Deletions of the Hypervariable Domain Lose Antigenicity but not Mucosal Adjuvancy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 392, 2010, pp. 582-587, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.009>.
- [9] T. D. E. Pyles, H. R. Wong, K. Odoms, R. B. Pyles, *Salmonella* Flagellin-dependent Proinflammatory Responses are Localized to the Conserved Amino and Carboxyl Regions of the Protein, *The Journal of Immunology*, Vol. 167, 2001, pp. 7009-7016, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.12.7009>.
- [10] R. R. V. Malapaka, L. O. Adebayo, B. C. Tripp, A Deletion Variant Study of the Functional Role of the Salmonella Flagellin Hypervariable Domain Region in Motility, *Journal of molecular biology*, Vol. 365, 2007, pp. 1102-1116, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.054>.
- [11] S. G. Jacchieri, R. Torquato, R. R. Brentani, Structural Study of Binding of Flagellin by Toll-Like Receptor 5, *Journal of Bacteriology*, Vol. 185, No. 14, 2003, pp. 4243-4247, <https://doi.org/10.1128/JB.185.14.4243-4247.2003>.