



Original Article

Cloning and Expression of 3 Chymotrypsin-like Protease of SARS-CoV-2 in *E. coli* using pET28a Vector

Vu Thi Duy Ly, Tran Xuan Giang, Ngo Thu Trang, Dinh Nho Thai,
Phan Tuan Nghia, Nguyen Thi Hong Loan*

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

Received 06 October 2022

Revised 04 January 2023; Accepted 10 February 2023

Abstract: The 3 chymotrypsin-like protease (3CLpro) of the severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) is one of the primary targets for the development of antiviral drug therapies as it plays a critical role in viral replication. In this study, the gene encoding for SARS-CoV-2 3CLpro (918 bp) was amplified from the cDNA of the virus by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the pGEM-T vector. 3CLpro was inserted into the expression vector pET28a at the end of the 6 histidine residue encoding sequence to form a fusion protein (6xHis-3CLpro). The 6xHis-3CLpro construct was successfully expressed in *E. coli*. The expression of 3CLpro was highest when *E. coli* BL21(DE3) RIL harboring pET28a-3CLpro vector was cultured in LB medium at 20 °C, induced by 1.0 mM Isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG) when cell density measured by optical density at 600 nm (OD₆₀₀) reached 0.7-0.8 and harvested after 24 hours of induction. The recombinant 3CLpro was purified by Ni-sepharose affinity chromatography under denaturation conditions. The purified 3CLpro had a 41 kDa band on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting using polyclonal anti-3CLpro antibody and hydrolyzed a fluorescent specific substrate of 3CLpro after renaturation.

Keywords: 3 chymotrypsin-like protease, pET28a, recombinant protein expression, SARS-CoV-2.

* Corresponding author.

E-mail address: loannnguyen@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5509>

Nhân dòng và biểu hiện 3 chymotrypsin-like protease của SARS-CoV-2 bằng vector pET28a ở *E. coli*

Vũ Thị Duy Ly, Trần Thị Xuân Giang, Ngô Thu Trang,
Đình Nho Thái, Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Thị Hồng Loan *

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

Nhận ngày 06 tháng 10 năm 2022

Chỉnh sửa ngày 04 tháng 01 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 02 năm 2023

Tóm tắt: 3 chymotrypsin-like protease (3CLpro) của virus Corona gây hội chứng hô hấp cấp tính type 2 (SARS-CoV-2) cần thiết cho quá trình nhân lên và đóng gói của virus và được xem như một trong các đích quan trọng để ức chế hoạt động của virus. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho 3CLpro (918 bp) của SARS-CoV-2 đã được nhân bản thành công từ cDNA của virus bằng PCR và được nhân dòng vào vector pGEM-T. Đoạn gen mã hóa cho 3CLpro sau đó được đưa vào vector biểu hiện pET28a ngay sau trình tự nucleotide của 6 gốc histidine để tạo ra dạng protein dung hợp 6xHis-3CLpro. Cấu trúc gen này đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* tái tổ hợp ở 20 °C, cảm ứng bằng isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG) 1,0 mM tại pha logarit khi mật độ tế bào (OD₆₀₀) khoảng 0,7-0,8 và sinh khối được thu sau 24 giờ cảm ứng. 3CLpro tái tổ hợp đã được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-sepharose trong điều kiện biến tính, có kích thước khoảng 41 kDa trên điện di gel polyacrylamide có chứa sodium dodesyl sulphate natri (SDS-PAGE), phản ứng đặc hiệu với kháng thể đa dòng kháng 3CLpro. 3CLpro tinh sạch sau khi hồi tính có hoạt tính phân cắt cơ chất đặc hiệu của 3CLpro.

Từ khóa: 3 chymotrypsin-like protease, biểu hiện protein tái tổ hợp, pET28a, SARS-CoV-2.

1. Mở đầu

Virus Corona type 2 gây hội chứng hô hấp cấp (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) thuộc họ Coronavirus, nguyên nhân gây ra đại dịch COVID-19 (Coronavirus disease 2019) trên toàn thế giới kể từ cuối năm 2019 cho tới nay [1]. Trong chu trình sống của SARS-CoV-2, 3 chymotrypsin-like protease (3CLpro) là một cysteine protease có vai trò quan trọng. 3CLpro cắt 11 vị trí trên chuỗi polypeptide được mã hóa bởi gen ORF1a/b tạo thành các protein cấu trúc và chức năng cần thiết cho quá trình hình thành thể virus của SARS-CoV-2 [2, 3]. Trình tự nhận biết của 3CLpro là Leu-Gln↓Ser-Ala-Gly (↓ là

chỉ vị trí cắt của enzyme) và không tương đồng với protease ở người nên 3CLpro được xem như là một trong các đích đầu tiên cho phát triển thuốc kháng virus trên cơ sở ức chế protease của nó [4-6]. Để phát triển thuốc kháng virus theo hướng này, cần có chế phẩm 3CLpro tinh sạch và việc sản xuất 3CLpro bằng công nghệ DNA tái tổ hợp là cách hiệu quả nhất [5, 6].

Ngay từ khi SARS-CoV-2 được phát hiện, đã có nhiều công trình nghiên cứu biểu hiện 3CLpro tái tổ hợp. Các nghiên cứu cũng cho thấy enzyme chủ yếu được biểu hiện bằng vật chủ *E. coli* ở dạng dung hợp với 6xHis-tag hoặc glutathione transferase (GST) hoặc maltose-binding protein (MBP) [7-11]. Bên cạnh đó, nhiều đột biến đã xuất hiện trên gen mã hóa 3CLpro của các biến chủng SARS-CoV-2 nên việc thiết lập và cải tiến các quy trình sản xuất 3CLpro vẫn luôn cần thiết

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: loannnguyen@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5509>

[3, 12, 13]. Trong bài báo này chúng tôi báo cáo kết quả nhân dòng, biểu hiện 3CLpro tái tổ hợp trong *E. coli*.

2. Thực nghiệm

2.1. Nguyên liệu

RNA tinh sạch từ virus SARS-CoV-2 được cung cấp bởi Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương. Các chủng vi khuẩn *E. coli* TOP10; *E. coli* BL21(DE3) RIL từ Novagen (Mỹ), vector pET28a đã cải biến có thêm trình tự cắt của TEV protease tại trước vị trí cắt của *Bam*HI và có sẵn đoạn gen ngoại lai kích thước khoảng 1 kb (KAIST, Hàn Quốc); thang chuẩn DNA và nTaq-HOT Polymersase (Enzynomics, Hàn Quốc); One-Step RT-PCR Kit, T4 DNA ligase (NEB, Mỹ); kit pGEM-T vector systems (Promega, Mỹ) nhân dòng trực tiếp sản phẩm PCR, kit tinh sạch plasmid và thô gel (Qiagen, Mỹ); các cặp enzyme cắt giới hạn *Xho*I và *Bam*HI (Thermo Scientific, Mỹ); cơ chất peptide huỳnh quang Generic 3CLpro FRET peptide substrate (Anaspect, Mỹ). Các hóa chất còn lại khác đều được mua từ các hãng uy tín (Merk, Sigma Aldrich, Thermo Scientific) và đạt độ tinh khiết cần thiết cho nghiên cứu sinh học phân tử.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Nhân dòng gen mã hóa 3CLpro của SARS-CoV-2: Đoạn gen mã hóa 3CLpro đã được nhân bản bằng Reverse transcriptase-PCR sử dụng kit One-Step RT-PCR (NEB, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, khuôn là RNA tổng số được phân lập từ chủng SARS-CoV-2 của Vũ Hán (mã số NC_045512). Cặp môi Fw-BamHI: 5': GGATCCAGTGGTTTTAGAAAAATGG CATTTC (phần gạch chân là trình tự cắt của *Bam*HI) và Rv-XhoI: 5': CTCGAGTTATTGGAAAGTAACACCTGAG C (phần gạch chân là trình tự cắt của *Xho*I, bộ ba kết thúc in đậm) được thiết kế dựa trên trình tự 918 bp mã hóa cho 3CLpro, tổng chiều dài đoạn gen và phần môi thiết kế thêm là 933 bp. Sản phẩm PCR sau đó được nhân dòng trực tiếp

vào vector pGEM-T (Promega) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Plasmid pGEM tái tổ hợp mang đoạn gen mã hóa cho 3CLpro (pGEM-3CLpro) được kiểm tra bằng PCR với hai cặp môi Fw-BamHI/Rv-XhoI và M13-Fw/Rv cũng như giải trình tự.

Thiết kế vector biểu hiện 3CLpro trên cơ sở sử dụng vector pET28a: Plasmid tái tổ hợp pGEM-3CLpro và pET28a cải biến được cắt đồng thời với cặp enzyme giới hạn *Bam*HI và *Xho*I; đoạn gen 3CLpro và vector pET28a sau cắt được tinh sạch bằng kit thô gel của Qiagen (Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen 3CLpro được nối vào plasmid pET28a bằng T4 DNA ligase (NEB, Mỹ) và biến nạp sản phẩm gắn vào vi khuẩn *E. coli* TOP10. Vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB agar có bổ sung kanamycin 50 µg/ml. Plasmid pET28a tái tổ hợp mang gen mã hoá cho 3CLpro (pET28a-3CLpro) được kiểm tra bằng PCR với cả hai cặp môi Fw-BamHI/Rv-XhoI và T7 promoter/terminator (T7-Fw/Rv) kết hợp với phân tích trình tự nucleotide. Plasmid pET28a-3CLpro sau đó được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) RIL để biểu hiện 3CLpro. Theo cách thiết kế này, 3CLpro tái tổ hợp được dung hợp với 6xHis tại đầu N qua trình tự cắt của TEV protease và có khối lượng phân tử (KLPT) khoảng 41 kDa.

Thu dịch chiết tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang pET28a-3CLpro và kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp: tế bào *E. coli* BL21(DE3) RIL có chứa vector biểu hiện pET28a-3CLpro được nuôi cấy khởi động trong 5 mL môi trường LB lỏng có kháng sinh kanamycin (kan) 50 µg/mL và chloramphenicol (Cm) 34 µg/mL trong 14-16 giờ, tốc độ lắc 200 vòng/phút (rpm), tại nhiệt độ 37 °C. Môi trường nuôi cấy sau đó được trẻ hóa bằng cách bổ sung thêm 50 mL môi trường LB sao cho mật độ tế bào ban đầu tại bước sóng 600 nm (OD₆₀₀) là 0,05 và tiếp tục nuôi ở nhiệt độ từ 18 - 37 °C cho tới khi OD₆₀₀ đạt 0,4 - 1,0, IPTG được bổ sung tới các nồng độ cuối cùng là 0,1 - 1 mM để cảm ứng sinh tổng hợp protein đích. Sau 3 - 24 giờ nuôi cấy, sinh khối tế

bào được thu hồi bằng cách ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút, 4 °C và tái huyền phù trong 1 mL đệm Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 có NaCl 100 mM, imidazol 5 mM (đệm A). Dịch tế bào được làm lạnh trên đá và xử lý siêu âm để phá vỡ thành tế bào. Dịch siêu âm được ly tâm 12,000 vòng/phút trong 30 phút, 4 °C để thu protein tổng số trong pha tan của tế bào. Phần tủa được bổ sung 1 mL đệm mẫu protein 1X SB có sodium dodecyl sulfate (SDS) 2%, β -mecaptoethanol 2% để hòa tan hoàn toàn các protein không tan.

Dịch chiết tế bào được sắc ký qua cột Nickel-sepharose (1 cm x 1 cm) đã được cân bằng với đệm A. Các phân đoạn protein không gắn cột sau đó được rửa bằng đệm A đến khi $A_{280} < 0,05$, các protein gắn trên cột được đẩy ra khỏi cột bằng đệm A có imidazol 300 mM. Độ tinh sạch của protein được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide có SDS (SDS-PAGE). Sự có mặt của 3CLpro tái tổ hợp được khẳng định bằng thăm tích miễn dịch sử dụng các kháng thể sơ cấp là kháng thể đơn dòng kháng 6xHis-tag (Clontech, Mỹ) và kháng thể đa dòng kháng 3CLpro (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Các kháng thể thứ cấp là kháng thể kháng IgG của chuột có gắn enzyme phosphatase kiềm (AP) tương ứng với kháng thể sơ cấp kháng 6xHis-tag và kháng thể thứ cấp của thỏ có gắn AP tương ứng với kháng thể sơ cấp kháng 3CLpro.

Xác định hoạt tính của 3CLpro: Trong nghiên cứu này hoạt tính của 3CLpro được xác định thông qua khả năng thủy phân cơ chất peptide huỳnh quang dạng FRET. Cơ chất peptide có trình tự Hilyte™ Fluor 488-Glu-Ser-Ala-Thr-Leu-Gln-Ser-Gly-Leu-Arg-Lys-Ala-Lys-QXL®520 (Anaspect, Mỹ) chứa vị trí cắt của 3CLpro với đầu N có gắn chất phát huỳnh quang Hilyte Fluor 488, đầu C là chất thu tín hiệu huỳnh quang QXL 520. Dưới tác dụng thủy phân của 3CLpro, liên kết đặc hiệu bị phân cắt, tín hiệu huỳnh quang phát ra từ Hilyte Fluor 488 được đo ở bước sóng 520 nm. Kết quả là tín hiệu huỳnh quang tăng dần theo thời gian. Các thành phần của phản ứng bao gồm

15 μ L đệm 2X (HEPES 100 mM, pH 7,5, BSA 0,2 mg/mL, Triton X-100 0,02%, DTT 4 mM), 5 μ L cơ chất 44,7 μ M, 9 μ L ddH₂O được trộn đều và ủ ở 28 °C trong thời gian 10 phút; tiếp theo 1 μ L 3CLpro có nồng độ phù hợp được bổ sung. Hoạt tính phân giải cơ chất của 3CLpro được xác định qua sự gia tăng cường độ huỳnh quang theo thời gian, sử dụng máy quang phổ huỳnh Nanodrop ND3000 (Thermo scientific, Mỹ) ở bước sóng Ex/Em (excitation/emmission) = 490 nm/520 nm trong 60 phút.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Nhân bản và nhân dòng gen mã hóa của 3CLpro

Sản phẩm khuếch đại đoạn gen mã hóa 3CLpro bằng RT-PCR được điện di trên gel agarose, kết quả thu được (Hình 1) cho thấy, với khuôn là RNA của virus SARS-CoV-2 đã cho bằng DNA kích thước phù hợp với tính toán lý thuyết là 933 bp (Hình 1 A, giếng 2), trong khi đó, đối chứng âm không có DNA/RNA không có sản phẩm khuếch đại (Hình 1 A, giếng 1). Đoạn gen 933 bp mã hóa 3CLpro sau đó được gắn trực tiếp vào vector pGEM-T. Plasmid tái tổ hợp pGEM-3CLpro được PCR kiểm tra với cặp mồi Fw-BamHI/Rv-XhoI (Hình 1 B, giếng 2) cũng cho sản phẩm khuếch đại cùng kích thước tương tự sản phẩm khuếch đại từ RNA (Hình 1 A, giếng 2). Khi sử dụng cặp mồi M13-Fw/Rv, sản phẩm PCR thu được cho bằng DNA kích thước khoảng 1,2 kb (Hình 1 B, giếng 3) chứng tỏ plasmid có mang đoạn gen của 3CLpro (933 bp của 3CLpro và đoạn DNA 240 bp trên vector pGEM-T). Kết quả giải trình tự vector pGEM-3CLpro (dữ liệu không trình bày) cũng cho thấy gen 3CLpro đã được khuếch đại thành công, có trình tự giống 100% với SARS-CoV-2 có mã số MZ210109 trên Genbank và 99,9% (một thay đổi T thành C tại nucleotide 266 trên gen 3CLpro) với SARS-CoV-2 chủng Vũ Hán (mã số NC_045512) và đã được chèn vào đúng vị trí trong vector pGEM-T. Sự thay đổi T266C dẫn đến thay thế amino acid Leu thành Pro tại vị trí 89 của protein

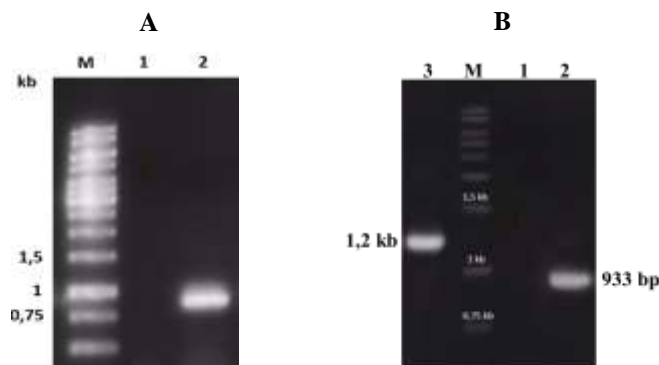
3CLpro, Leu được biết không có vai trò quan trọng trong cấu trúc và hoạt tính của 3CLpro [14]. Phan và cộng sự [15] đã giải trình tự toàn bộ hệ gen của SARS-CoV-2 từ hai bệnh nhân nhiễm SARS-CoV-2 đầu tiên ở Việt Nam, kết quả cho thấy trình tự gen của các chủng này có sự tương đồng tới 99,98% so với trình tự gen của SARS-CoV-2 chủng Vũ Hán (Hình 1).

3.2. Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa 3CLpro bằng pET28a

Hai vector pGEM-3CLpro và pET28a được cắt bằng cặp enzyme giới hạn *XhoI* và *BamHI*, kết quả điện di (Hình 2) cho thấy sản phẩm cắt của pGEM-3CLpro (Hình 2 A, giếng 2) có hai băng DNA (băng 3 kb tương ứng với vector pGEM và băng khoảng 0,9 kb tương ứng với kích thước của 3CLpro); trong khi đó, sản phẩm cắt của pET28a (Hình 2 B, giếng 4) cho 2 băng DNA kích thước tương ứng khoảng 5 kb và 1 kb như tính toán lý thuyết. Băng DNA khoảng

0,9 kb của 3CLpro và 5 kb của plasmid pET28a đã được thu nhận bằng cách thổi gel đã được gắn với nhau bằng T4 DNA ligase.

Sản phẩm của phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng TOP10. Plasmid tái tổ hợp pET28a-3CLpro được PCR kiểm tra với các cặp mồi T7-Fw/Rv và cặp mồi đặc hiệu Fw-BamHI/Rv-*XhoI* cho thấy xuất hiện băng DNA khuếch đại có kích thước khoảng 1,3 kb với cặp mồi T7-Fw/Rv (Hình 2 C, giếng 1), tương ứng với tổng kích thước đoạn gen 3CLpro (933 bp) và một phần vector pET28a (360 bp). Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu Fw-BamHI/Rv-*XhoI* cho băng DNA phù hợp kích thước của gen 3CLpro 933 bp (Hình 2 C, giếng 3). Các kết quả này chứng tỏ đoạn gen 3CLpro đã được gắn vào pET28a. Kết quả giải trình tự nucleotide (dữ liệu không trình bày) cho thấy đoạn gen đã được đưa vào vector pET28a đúng trình tự và khung đọc.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR nhân bản đoạn gen mã hoá 3CLpro (A) và kiểm tra pGEM-3CLpro (B). M: thang chuẩn DNA 1 kb; 1: đối chứng âm (không chứa DNA/RNA); 2: với cặp mồi Fw-BamHI/Rv-*XhoI*; 3: với cặp mồi M13-Fw/Rv.

Tiếp theo, tế bào *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro đã được nuôi cấy, cảm ứng bằng IPTG, thu sinh khối để đánh giá mức độ biểu hiện của 3CLpro tái tổ hợp (ký hiệu 6xHis-3CLpro). Kết quả trình bày ở Hình 3 cho thấy, trên gel polyacrylamide có sự hiện diện của băng protein KLPT khoảng 41 kDa, theo tính toán lý thuyết là của 6xHis-3CLpro, trong dịch chiết tổng số trước và sau cảm ứng IPTG (Hình 3 A, giếng 1-2), trong các

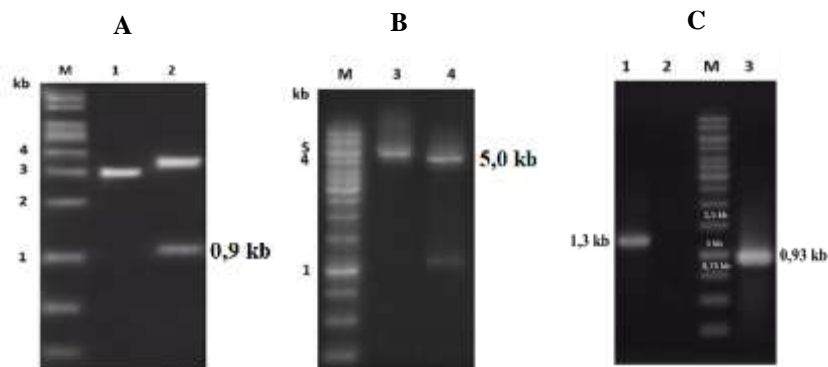
pha hòa tan (Hình 3 A, giếng 3) và không hòa tan (Hình 3 A, giếng 4) của vi khuẩn. Băng 41 kDa cũng được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng kháng His-Tag trong thẩm tích miễn dịch (Hình 3 B) và có hoạt tính cắt cơ chất peptide huỳnh quang đặc hiệu của 3CLpro (Hình 3 C). Như vậy, 6xHis-3CLpro đã được biểu hiện bởi vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang pET28a-3CLpro. Ngoài ra, có thể dễ dàng thấy rằng 6xHis-3CLpro có mặt chủ yếu

trong các pha không hòa tan (Hình 3 A, giống 4).

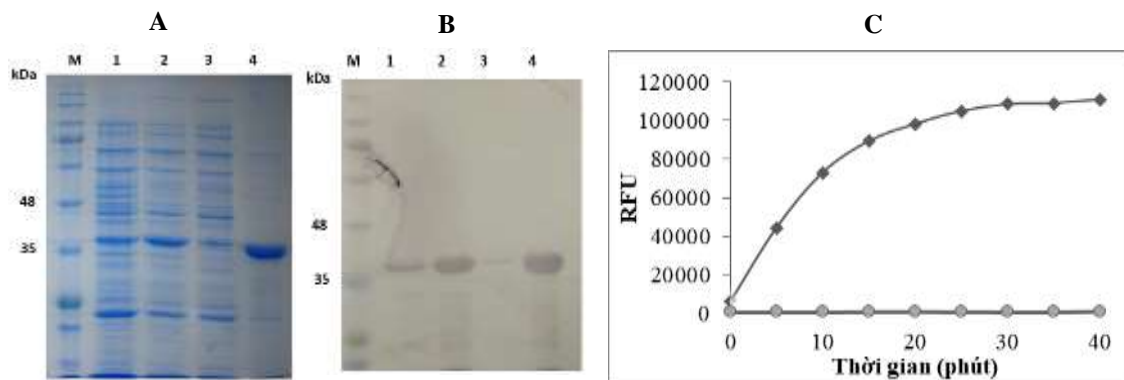
Tương tự nghiên cứu của chúng tôi, một số nghiên cứu trước đó đã biểu hiện 3CLpro dung hợp với 6xHis-tag tại đầu N ở vi khuẩn *E. coli* bằng các vector pET21a [7], vector pET-SUMO [8, 10] hoặc tại đầu C bằng vector pET32b [9, 11]. Trong các nghiên cứu này, 3CLpro tái tổ hợp đều có thể đã được tối ưu hóa codon và biểu hiện ở dạng hòa tan. Mặt khác, bên cạnh dung hợp với 6xHis-tag để thuận lợi cho tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực, protein còn được

dung hợp với các tag khác như GST, SUMO, MBP hoặc Thioredoxin [8-11] giúp tăng mức độ hòa tan và biểu hiện của protein đích. Tuy nhiên, quy trình tinh sạch để thu nhận 3CLpro tái tổ hợp thường gồm một số bước và cần thiết phải loại phân tag dung hợp bằng các protease đặc hiệu [8-11].

Nghiên cứu của chúng tôi là đầu tiên ở Việt Nam về biểu hiện 3CLpro tái tổ hợp, các kết quả thu được là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo về 3CLpro tái tổ hợp.



Hình 2. Điện di gel agarose các sản phẩm tạo vector biểu hiện mang gen 3CLpro. A-B: sản phẩm cắt bởi *XhoI* và *BamHI*. M: thang chuẩn DNA; 1: pGEM-3CLpro trước cắt; 2: pGEM-3CLpro sau cắt; 3: pET28a trước cắt; 4: pET28a sau cắt. C: sản phẩm PCR kiểm tra pET28a-3CLpro. 1: với cặp mồi T7-Fw/Rv; 2: đối chứng âm (không chứa DNA); 3: với cặp mồi Fw-BamHI/Rv-XhoI.



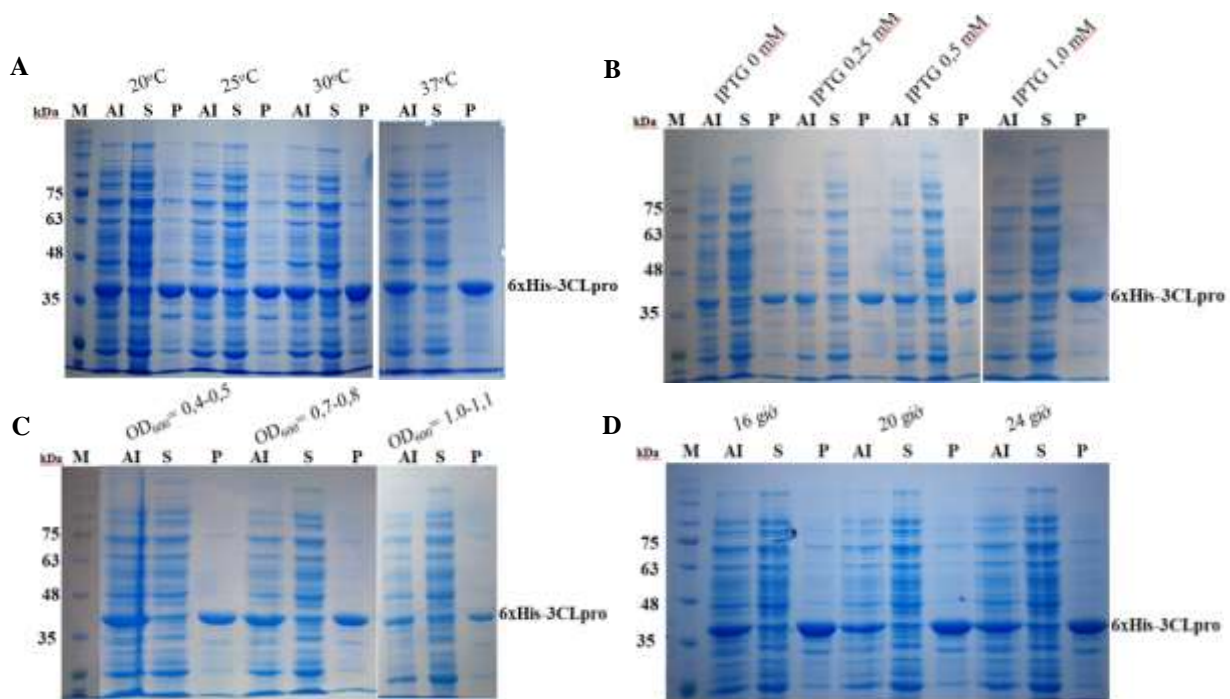
Hình 3. Phân tích các phân đoạn dịch chiết protein từ tế bào *E. coli* mang vector pET28a-3CLpro. A: SDS-PAGE. B: Western blotting sử dụng kháng thể đơn dòng kháng 6xHis-tag. M: thang chuẩn protein; 1: trước cảm ứng IPTG; 2: sau cảm ứng IPTG; 3: protein trong pha tan của tế bào; 4: protein trong phân đoạn hoà tủa của tế bào. C: Hoạt tính cắt cơ chất peptide huỳnh quang của dịch chiết vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang pET28a-3CLpro. (■): dịch chiết protein của tế bào; (●): dịch chiết protein của tế bào được xử lý nhiệt ở 95 °C trong 10 phút.

3.3. Xác định điều kiện thích hợp cho biểu hiện 3CLpro trong vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL

Tế bào *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro đã được nuôi cấy trong các điều kiện khác nhau nhằm cải thiện mức độ biểu hiện của 6xHis-3CLpro. Trong mỗi thí nghiệm, chỉ có một điều kiện (nhiệt độ nuôi cấy, nồng độ IPTG cảm ứng, thời gian cảm ứng

IPTG và thời gian nuôi cấy) là thay đổi trong khi các điều kiện khác được giữ nguyên.

Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của 6xHis-3CLpro bằng SDS-PAGE (Hình 4) cho thấy, 6xHis-3CLpro biểu hiện tốt nhất ở 20 °C với nồng độ chất cảm ứng IPTG 1,0 mM tại pha giữa sinh trưởng của tế bào khi mật độ tế bào OD₆₀₀ khoảng 0,7-0,8 và thu sinh khối sau 24 giờ cảm ứng.



Hình 4. Phân tích SDS-PAGE đánh giá ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy (A), nồng độ IPTG cảm ứng (B), thời điểm cảm ứng IPTG (C) và thời gian nuôi cấy đến mức độ biểu hiện 6xHis-3CLpro (D) của vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro. M: thang chuẩn protein; AI: protein tổng số của tế bào vi khuẩn; S: protein trong pha tan của tế bào; P: protein trong phân đoạn hoà tủa của tế bào.

3.4. Bước đầu tinh sạch 6xHis-3CLpro từ protein tổng số của vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro

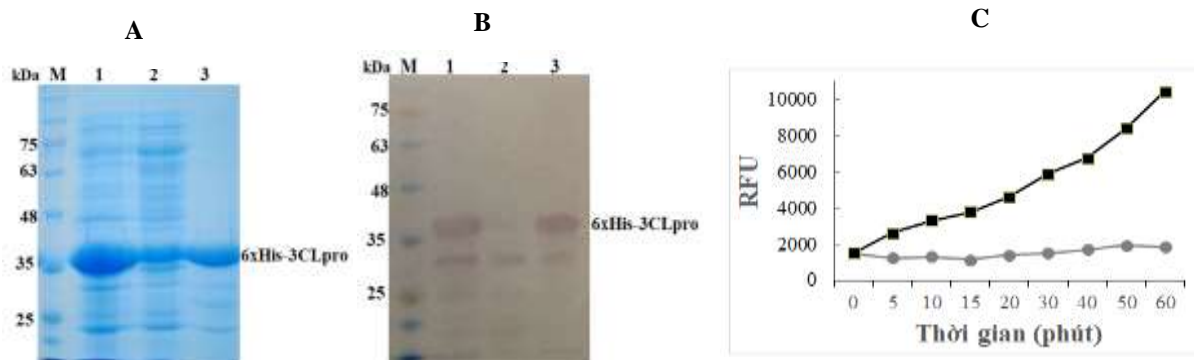
Dịch chiết vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro có hoạt tính phân cắt cơ chất peptide đặc hiệu của 3CLpro đã được cho qua cột sắc ký ái lực Ni-sepharose trong đệm A, tuy nhiên kết quả SDS-PAGE cho thấy 6xHis-3CLpro gần như không gắn với cột Ni-sepharose. Nguyên nhân 6xHis-3CLpro không gắn với Ni-sepharose có thể liên quan

đến sự gấp cuộn của đầu 6xHis vào trong phân tử protein. Hiện tượng này cũng xảy ra với một số protein dung hợp 6xHis tại đầu N. Để khắc phục vấn đề này chúng tôi đã tiến hành thu dịch chiết vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro trong các dung dịch đệm khác nhau, bao gồm: HEPES 20 mM, pH 7,0; phosphate buffered saline (PBS) pH 7,4 và PBS pH 7,4 có urea 1 M (các đệm đều có các thành phần NaCl 100 mM, imidazol 5 mM). Tuy nhiên, kết quả SDS-PAGE đã cho thấy

phân đoạn protein gắn cột chỉ có một lượng nhỏ 6xHis-3CLpro bên cạnh nhiều protein không mong muốn khác.

Trong một hướng tiếp cận khác, chúng tôi đã tiến hành thu nhận 6xHis-3CLpro từ phân đoạn không hòa tan của tế bào *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro bằng cách hòa tan phân đoạn này trong đệm HEPES 20 mM, pH 7,0 có NaCl 100 mM, imidazol 5 mM và urea 8 M (đệm biến tính). Kết quả phân tích SDS-PAGE (Hình 5) cho thấy, trong điều kiện biến tính, protein 6xHis-3CLpro đã gắn cột Ni-sepharose và được rửa chiết bằng imidazol nồng độ 300 mM. Sau tinh sạch, 6xHis-3CLpro cho thấy chủ yếu có một băng protein với KLPT khoảng 41 kDa (Hình 5 A, giếng 3), và có độ tinh sạch khoảng 90% khi phân tích bằng phần mềm Image J. Băng protein này cũng được nhận biết bởi kháng thể đa dòng kháng 3CLpro (Hình 5 B, giếng 3). Phân đoạn 6xHis-3CLpro sau khi qua cột Nickel-sepharose và được hồi tính trong đệm HEPES 20 mM, pH 7,0 có NaCl 100 mM đã thể hiện có khả năng phân cắt đặc hiệu cơ chất peptide huỳnh quang của 3CLpro với tín hiệu

huỳnh quang tăng dần (Hình 5 C). Trong khi đó, đối chứng âm (có 3CLpro bị xử lý nhiệt tại 95 °C trong 10 phút) không có đường tín hiệu huỳnh quang tăng. Như vậy, từ 1 L môi trường nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) RIL mang vector pET28a-3CLpro đã thu nhận được 5,4 mg 3CLpro tái tổ hợp có hoạt tính với độ tinh sạch khoảng 90%. Haniyya và cộng sự [11] đã biểu hiện 3CLpro tái tổ hợp bằng pET32b ở *E. coli* BL21 (DE3) và thu được enzyme với độ tinh sạch hơn 90%. Tương tự như 3CLpro, protease của HIV-1 đã được biểu hiện bằng vector pET28a và pET32a ở vi khuẩn *E. coli*, và enzyme này cũng tập trung chủ yếu ở phân đoạn không tan [16,17]. Tuy nhiên, hiệu suất thu nhận protein sau hồi tính chỉ đạt 4 mg/L môi trường nuôi cấy vi khuẩn [17]. Protein tái tổ hợp biểu hiện chủ yếu ở pha không tan có thể là vấn đề thường gặp khi biểu hiện một gen mã hóa cho protein của virus ở vật chủ là vi khuẩn *E. coli* [17]. Việc nâng cao hiệu suất thu nhận cũng như độ tinh sạch của 3CLpro tái tổ hợp là những vấn đề sẽ được tiếp tục nghiên cứu trong thời gian tới.



Hình 5. Kết quả SDS-PAGE (A), Western blotting (B) và hoạt tính cắt cơ chất peptide huỳnh quang (C) của các phân đoạn tinh sạch 6xHis-3CLpro bằng cột Ni-sepharose. M: thang chuẩn protein; 1: protein tổng số lên cột; 2: phân đoạn không gắn cột; 3: phân đoạn gắn cột được rửa chiết bằng imidazol 300 mM. (■): phân đoạn gắn cột Ni-sepharose sau hồi tính; (●): phân đoạn gắn cột Ni-sepharose sau hồi tính và xử lý nhiệt tại 95 °C, 10 phút.

4. Kết luận

Đã biểu hiện thành công 3CLpro của SARS-CoV-2 bằng vector pET28a trong tế bào *E. coli*. Các điều kiện thích hợp để biểu hiện

3CLpro bao gồm nhiệt độ nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp ở 20 °C, cảm ứng bằng IPTG 1,0 mM tại OD₆₀₀ khoảng 0,7-0,8 và sinh khối được thu sau 24 giờ cảm ứng. 3CLpro tái tổ hợp

được dung hợp với 6xHis tại đầu N có KLPT 41 kDa, độ tinh sạch khoảng 90% trên SDS-PAGE, phản ứng đặc hiệu với kháng thể đa dòng kháng 3CLpro và có hoạt tính phân cắt cơ chất peptide đặc hiệu.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi đề tài KLEPT.20.01 với kinh phí hoạt động thường xuyên của Bộ Khoa học và công nghệ dành cho Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein. Các tác giả cảm ơn GS. TS. Lê Thị Quỳnh Mai, Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương đã cung cấp mẫu RNA của virus SARS-CoV-2.

Tài liệu tham khảo

- [1] Y. C. Wu, C. S. Chen and Y. J. Chan, The Outbreak of COVID-19: An Overview, *Journal of the Chinese Medical Association*, Vol. 3, No. 3, 2020, pp. 217-220, <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000270>.
- [2] N. Chitranshi, V. K. Gupta, R. Rajput, A. Godinez, K. Pushpitha, T. Shen, M. Mirzaei, Y. You, D. Basavarajappa, V. Gupta, S. L. Graham, Evolving Geographic Diversity in SARS-CoV2 and *in silico* Analysis of Replicating Enzyme 3CLpro Targeting Repurposed Drug Candidates, *Journal of Translational Medicine*, Vol. 18, No. 1, 2020, pp. 278, <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02448>.
- [3] S. Ulrich, E. B. Ekanayake, G. Otting, C. Nitsche, Main Protease Mutants of SARS-CoV-2 Variants Remain Susceptible to Nirmatrelvir, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 62, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128629>.
- [4] D. W. Kneller, G. Phillips, H. M. O'Neill, R. Jedrzejczak, L. Stols, P. Langan, A. Joachimiak, L. Coates, A. Kovalevsky, Structural Plasticity of SARS-CoV-2 3CL M^{pro} Active Site Cavity Revealed by Room Temperature X-ray Crystallography, *Nature Communication*, Vol. 11, No. 3202, 2020, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16954-7>.
- [5] A. D. Rathnayake, J. Zheng, Y. Kim, K. D. Perera, S. Mackin, D. K. Meyerholz, M. M. Kashipathy MM et al., 3C-like Protease Inhibitors Block Coronavirus Replication *in vitro* and Improve Survival in MERS-CoV-infected Mice, *Science Translation Medicine*, Vol. 12, No. 557, 2020, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc5332>.
- [6] W. Vuong, C. Fischer M. B. Khan, M. J. Belkum, T. Lamer E. et al., Improved SARS-CoV-2 Mpro Inhibitors Based on Feline Antiviral Drug GC376: Structural Enhancements, Increased Solubility, and Micellar Studies, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 222, No. 2021, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113584>.
- [7] C. Coelho, G. Gallo, C. B. Campos, L. Hardy, M. Würtele, Biochemical Screening for SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors, *PLOS ONE*, Vol. 15, No. 10, 2020, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240079>.
- [8] W. Vuong, M. B. Khan, C. Fischer, E. Arutyunova, T. L. J. Shields, H. A. Saffran, R. T. McKay, M. J. V. Belkum et al., Feline Coronavirus Drug Inhibits the Main Protease of SARS-CoV-2 and Blocks Virus Replication, *Nature Communications*, Vol. 11, No. 4282, 2020, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18096-2>.
- [9] R. Razali, V. K. Subbiah, C. Budiman, Technical Data of Heterologous Expression and Purification of SARS-CoV-2 Proteases Using *Escherichia coli* System, *Data*, Vol. 6, No. 99, 2021, <https://doi.org/10.3390/data6090099>.
- [10] J. C. Milligan, T. U. Zeisner, G. Papageorgiou, D. Joshi, C. Soudy, R. Ulferts, M. Wu, C. T. Lim, K. W. Tan, F. Weissmann, B. Canal, R. Fujisawa, T. Deegan, H. Nagaraj, G. B. Todd, C. Basier, J. F. Curran, M. Howell, R. Beale, K. Labib, N. O'Reilly, J. F.X. Diffley, Identifying SARS-CoV-2 Antiviral Compounds by Screening for Small Molecule Inhibitors of Nsp5 Main protease, *The Biochemical Journal*, Vol. 478, No. 13, 2021, pp. 2499-2515, <https://doi.org/10.1042/BCJ20210197>.
- [11] Haniyya, M. Ulfah, A. Riswoko, L. Mulyawati, T. Ernawati, I. Helianti, Production of Recombinant SARS-CoV-2 3CLprotease: The Key for the Development of Protease Inhibitors Screening Kit in Search of Potential Herb Cure for COVID-19, *Earth and Environmental Science*, Vol. 976, 2022, <https://doi.org/10.1088/1755-1315/976/1/012051>.
- [12] T. J. Cross, G. R. Takahashi, E. M. Diessner, M. G. Crosby, V. Farahmand, S. Zhuang, C. T. Butts, R. W. Martin, Sequence Characterization and Molecular Modeling of Clinically Relevant Variants of the SARS-CoV-2 Main Protease Thomas, *Biochemistry*, Vol. 59, 2020, pp. 3741-3756, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00462>.

- [13] N. Krishnamoorthy, K. Fakhro, Identification of Mutation Resistance Coldspots for Targeting the SARS-CoV2 Main Protease, *IUBMB Life*, Vol. 73, No. 4, 2021, pp. 670-675, <https://doi.org/10.1002/iub.2465>.
- [14] S. G. Elbager et al., High Risk Functional nsSNP in SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Main Peptidase as Potential Targets to Structure-Based Drug Design: A Computational Approach, *International Journal of Virology and Molecular Biology*, Vol. 9, No. 2, 2020, pp. 17-34, <https://doi.org/10.5923/j.ijvmb.20200902.01>.
- [15] L. T. Phan, V. T. Nguyen, K. T. L. Huynh, M. H. Dao et al., Clinical Features, Isolation, and Complete Genome Sequence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from the First Two Patients in Vietnam, *Journal of Medical Virology*, Vol. 92, 2020, pp. 2209-2215, <https://doi.org/10.1002/jmv.26075>.
- [16] H. L. T. Nguyen, X. H. Ho, T. H. T. Ngo, T. V. A. Nguyen, T. N. Phan, Cloning and Expression of Protease Encoding Gene of HIV Type 1 Isolated from Vietnam, *Journal of Biotechnology*, Vol. 8, No. 2, 2010, pp. 227-233.
- [17] H. L. T. Nguyen, T. T. Nguyen, Q. T. Vu, H. T. Le, Y. Pham, P. T. Le, T. P. Bui, T. N. Phan, an Efficient Procedure for the Expression and Purification of HIV-1 Protease from Inclusion Bodies, Vol. 116, 2015, pp. 59-65, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.07.011>.