



Original Article

## Expression of the Recombinant Protein Substrate for Detection of the Endopeptidase Activity of Botulinum Neurotoxin Serotype B

Le Phan Anh, Vu Thi Phuong, Pham Bao Yen, Le Thi Hong Nhung, Phan Tuan Nghia, Nguyen Thi Hong Loan\*

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

Received 05<sup>th</sup> June 2024

Revised 17<sup>th</sup> December 2024; Accepted 26<sup>th</sup> December 2024

**Abstract:** Botulinum neurotoxins (BoNTs) produced by *Clostridium botulinum* are metalloproteases. Based on structural differences and substrate specificity, BoNTs are classified into 8 serotypes from A to H. Identification of the endopeptidase activity of BoNTs is the basis for BoNT detection. In this study, a recombinant gene encoding for the substrate of the BoNT serotype (BoNT/B) was successfully cloned and expressed in *E. coli* BL21(DE3) using a pET28CYL1 vector. At the N-terminus of the designed recombinant protein, there was 6<sup>x</sup>His tag along with an enhanced cyan fluorescent protein. The C-terminus held an enhanced yellow fluorescent protein, while a peptide with amino acid sequences spanning from 60 to 94 residues of VAMP2 (a natural substrate of BoNT/B) was positioned in the midsection. The whole construct was called 6<sup>x</sup>His-CFP-VAMP2(60-94)-YFP, with a molecular weight of approximately 60.1 kDa. The substrate protein exhibited a high level of expression in the soluble fraction of *E. coli* BL21(DE3), which was purified via Ni-affinity chromatography to electrophoretic homogeneity. The extracellular fluid of *C. botulinum* serotype B (crude BoNT/B) cleaved the recombinant protein to generate two smaller protein fragments that are consistent with theoretical calculations. Crude BoNT/B required the presence of dithiothreitol (DTT) for substrate proteolytic cleavage, but it was inhibited by ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA).

**Keywords:** BoNT, *Clostridium botulinum*, ECFP-EYFP, pET28CLY1, VAMP2

\* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5752>

# Biểu hiện cơ chất protein tái tổ hợp cho phát hiện hoạt tính endopeptidase của độc tố thần kinh botulinum serotype B

Lê Phan Anh, Vũ Thị Phụng, Phạm Bảo Yên, Lê Thị Hồng Nhung,  
Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Thị Hồng Loan\*

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

Nhận ngày 05 tháng 6 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 17 tháng 12 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày tháng 12 năm 2024

**Tóm tắt:** Độc tố thần kinh botulinum (BoNT), do vi khuẩn *Clostridium botulinum* sinh ra, là một metalloprotease. Dựa trên những khác biệt trong cấu trúc và tính đặc hiệu cơ chất, BoNT được phân thành 8 serotype, ký hiệu A-H. Xác định hoạt tính endopeptidase của BoNT là cơ sở chính để phát hiện độc tố thần kinh. Nghiên cứu này đã nhân dòng và biểu hiện thành công đoạn gen mã hóa cho peptide mang trình tự cắt của BoNT serotype B trong *E. coli* BL21(DE3) sử dụng vector pET28CYL1. Theo thiết kế, protein cơ chất có 6<sup>x</sup>His và ECFP ở đầu N, đoạn peptide từ axit amin 60 đến 94 của protein VAMP2 (cơ chất tự nhiên của BoNT/B) và EYFP ở đầu C (6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP) và có KLPT 60,1 kDa. Protein cơ chất có mức độ biểu hiện cao trong pha tan của vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3), được tinh sạch đến mức đồng thể về điện di bằng cột sắc ký ái lực Ni-sepharose. Protein tái tổ hợp bị phân cắt bởi dịch ngoại bào của *C. botulinum* serotype B (BoNT/B thô) tạo ra 2 protein có KLPT phù hợp với tính toán lý thuyết. Phản ứng phân cắt protein cơ chất bởi BoNT/B thô cần sự có mặt của dithiothreitol (DTT) và bị ức chế bởi ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA).

**Từ khóa:** BoNT, *Clostridium botulinum*, ECFP-EYFP, pET28CLY1, VAMP2.

## 1. Mở đầu

*Clostridium botulinum* (*C. botulinum*) là vi khuẩn gram dương, kỵ khí và có khả năng tạo độc tố thần kinh botulinum (BoNT), nguyên nhân gây bệnh ngộ độc botulinum (botulism). Dựa trên cơ sở huyết thanh học, BoNT được phân thành 8 loại (serotype), ký hiệu từ A đến H. Trong đó A và B là 2 serotype thường gặp nhất trong các vụ ngộ độc botulinum ở người [1, 2].

Về cấu trúc, BoNT là một metalloprotease (holotoxin) có khối lượng phân tử (KLPT) 150 kDa gồm 2 chuỗi polypeptide: chuỗi nhẹ (light chain - LC; 50 kDa) có hoạt tính endopeptidase với Zn<sup>2+</sup> là cofactor; và chuỗi

nặng (heavy chain - HC; 100 kDa) có chức năng liên kết với thụ thể, giúp chuyển LC vào trong tế bào thần kinh. LC và HC được liên kết cộng hóa trị với nhau qua cầu nối disulfide [3]. BoNT được xếp vào danh mục chất độc bảng A và phân cắt phức hệ các loại protein tham gia dẫn truyền thần kinh (specific N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor - SNARE), ngăn chặn giải phóng acetylcholine, dẫn đến tê liệt mềm và gây tử vong ở người, chỉ với 0,1-1 ng/kg qua đường tiêm [3, 4].

Các kiểu huyết thanh BoNT khác nhau phân cắt chọn lọc protein SNARE tại các vị trí đặc hiệu khác nhau. Cụ thể, BoNT/B cắt tại vị trí liên kết giữa Gln76-Phe77 trên protein VAMP2 (Vesicle-associated membrane protein) của SNARE [3]. Do đó, các cơ chất peptide của BoNT/B thường được tổng hợp dựa trên trình

\* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: loannnguyen@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5752>

tự axit amin của VAMP2 [5-7]. Tuy nhiên, protein VAMP2 có trình tự trên 100 axit amin [8] và bao gồm cả vị trí phân cắt của các loại BoNT khác nên không thể phát hiện được chính xác serotype của BoNT và có thể gây dương tính giả. Các nghiên cứu đã xác định số lượng axit amin phù hợp trên trình tự VAMP2 để đảm bảo hiệu quả phát hiện BoNT/B, tránh dương tính giả và giảm chi phí sản xuất [5-7]. Theo đó, các chuỗi peptide với chiều dài khoảng 7, 10 hoặc 20 axit amin xung quanh vị trí Gln76 - Phe77, không bị cắt bởi BoNT/B. Cơ chất peptide với chiều dài 28 axit amin từ Leu60 - Lys87 (VAMP2 (60 - 87) đã cho hoạt tính cắt bởi BoNT/B. Tuy nhiên, nhược điểm của cơ chất này là không thể phát hiện được một số subtype gồm B2, B4 và B6 của BoNT/B [7]. Cơ chất peptide gồm 35 axit amin từ Leu60 tới Lys94 trên VAMP2 hiện đang được sử dụng phổ biến trong một số nghiên cứu với khả năng có thể phát hiện được toàn bộ các subtype của BoNT/B [5-7].

Do BoNT thể hiện độc tính ở nồng độ rất thấp, đa dạng về các serotype *C. botulinum* và ở các nền mẫu thực phẩm phức tạp nên xác định chính xác ngộ độc botulinum luôn có nhiều khó khăn [3]. Hiện nay, phát hiện ngộ độc do BoNT dựa trên khả năng gây chết trên chuột (Mouse bioassay, MBA) đang được coi là tiêu chuẩn vàng. Bên cạnh đó, một số phương pháp sử dụng cơ chất SNARE để phát hiện hoạt tính endopeptidase của BoNT như Endopeptidase - Mass Spectrometry (Endopep-MS), truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (Fluorescent resonance energy transfer - FRET) đang được nghiên cứu với mục tiêu thay thế, cải tiến và giảm việc sử dụng động vật [3, 9]. Các phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tuy nhiên cần phương tiện và máy móc hiện đại, đắt tiền.

Tại Việt Nam, các chủng phân lập trong các đợt dịch gần đây đã được công bố là mang gen mã hóa BoNT/A và BoNT/B. Tuy nhiên, phân loại serotype của độc tố vẫn chưa được xác định [10]. Bên cạnh đó, các nghiên cứu về độc tố BoNT chủ yếu tập trung phát hiện sự có mặt của vi khuẩn *C. botulinum* dựa trên gen bằng

PCR/real-time PCR. Gần đây, Nguyen và cộng sự [11] đã thiết lập phương pháp xác định hoạt tính endopeptidase BoNT/A và BoNT/B bằng phương pháp Dotblot. Tuy nhiên, phương pháp vẫn cần đặt hàng cơ chất peptide với giá thành cao từ nước ngoài.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi thực hiện nghiên cứu tạo một cơ chất dạng protein tái tổ hợp gắn chất phát huỳnh quang chứa trình tự axit amin 60-94 của VAMP2 để có thể dùng cho việc phát hiện hoạt tính của BoNT/B bằng điện di trên gel SDS-PAGE, hay bằng thẩm tách miễn dịch hoặc bằng quang phổ huỳnh quang [12, 13].

## 2. Thực nghiệm

### 2.1. Nguyên liệu

Đoạn gen kích thước khoảng 120 bp mã hoá các axit amin từ vị trí 60 đến 94 trên protein VAMP2 mang trình tự cắt của BoNT/B, đã được tối ưu hóa codon cho biểu hiện ở *E. coli* [14] và được tổng hợp trong vector pUC19 bởi Công ty Cổ phần Phù Sa Genomics (Việt Nam), ký hiệu pUC19-VAMP2(60-94). Vector pET28CLY1 biểu hiện ECFP-EYFP được đặt từ Addgene (Mỹ). Dịch protein ngoại bào của vi khuẩn *C. botulinum* serotype B được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia [11]. Các chủng vi khuẩn *E. coli* TOP10, *E. coli* BL21(DE3) từ Novagen (Mỹ); kháng thể đơn dòng kháng 6<sup>x</sup>His-tag từ Clontech (Mỹ); gel Ni-Sepharose từ GE (Mỹ); thang chuẩn protein Pierce™ Unstained Protein MW marker (ThermoFisher scientific, Mỹ) và GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder (Intron, Hàn Quốc). Các hóa chất khác đều được mua từ các hãng uy tín và đạt độ tinh khiết cần thiết cho nghiên cứu sinh học phân tử.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

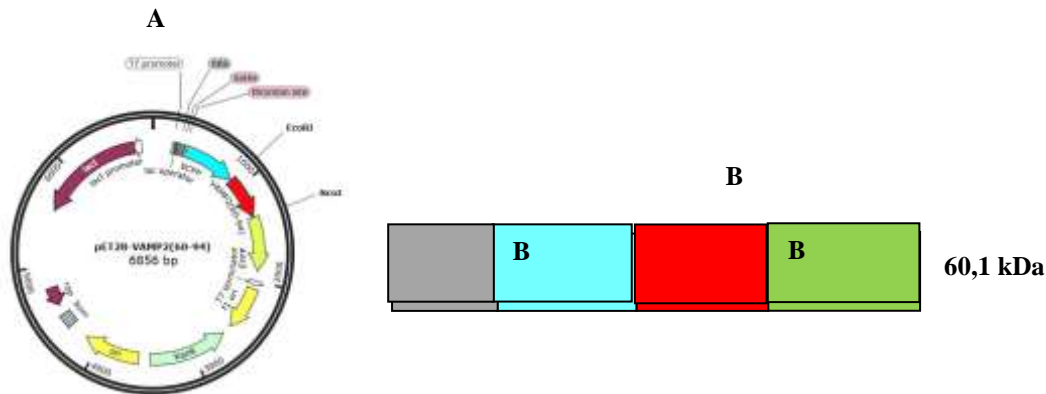
*Thiết kế vector biểu hiện cơ chất protein của BoNT/B trên cơ sở sử dụng vector pET28CLY1: Plasmid pUC19-VAMP2(60-94) và pET28CLY1 được cắt đồng thời với cặp enzyme giới hạn NcoI và EcoRI. Thành phần*

phản ứng bao gồm: 1,5 µg plasmid; 5 µL buffer 10<sup>x</sup>; 1 µL *Nco*I và 1 µL *Eco*RI; bổ sung ddH<sub>2</sub>O đến tổng thể tích là 50 µL. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều và ủ ở 37 °C trong 1 giờ, bất hoạt phản ứng tại 65 °C trong 10 phút. Đoạn gene *VAMP2(60-94)* và vector pET28CLY1 sau cắt được tinh sạch bằng kit thôi gel của Qiagen (Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen *VAMP2(60-94)* được nối vào plasmid pET28CLY1 bằng T4 DNA ligase 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 pET28CLY1 tái tổ hợp mang gen mã hoá cho *VAMP2(60-94)* (pET28-*VAMP2(60-94)*) (Hình 1A) được kiểm

tra bằng phản ứng cắt bởi cặp enzyme giới hạn *Nco*I và *Eco*RI kết hợp với phân tích trình tự nucleotide sử dụng cặp mồi T7Fw/Rv. Plasmid pET28-*VAMP2(60-94)* sau đó được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện peptide *VAMP2(60-94)*.

Theo cách thiết kế này, peptide *VAMP2(60-94)* được dung hợp với 6 gốc histidine và protein phát huỳnh quang màu xanh dương (enhanced cyan fluorescent protein-6<sup>x</sup>His-ECFP) tại đầu N và protein phát huỳnh quang màu vàng (enhanced yellow fluorescent protein-EYFP) tại đầu C (Hình 1B). Cấu trúc của protein này được ký hiệu là 6<sup>x</sup>His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP với KLPT 60,1 kDa.



Hình 1. Sơ đồ vector pET28-*VAMP2(60-94)* (A) và cấu trúc protein 6<sup>x</sup>His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP (B).

*Thu dịch chiết tế bào vi khuẩn E. coli BL21(DE3) mang pET28-VAMP2(60-94) và kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp:* Tế bào *E. coli* BL21(DE3) có chứa vector biểu hiện pET28a-*VAMP2(60-94)* được nuôi cấy khởi động trong 5 mL môi trường LB lỏng có kháng sinh kanamycin (kan) 50 µg/mL trong 14-16 giờ, tốc độ lắc 200 rpm, ở 37 °C.

Môi trường nuôi cấy sau đó được trẻ hóa bằng cách bổ sung thêm 100 mL môi trường LB sao cho mật độ tế bào được đo bằng mật độ quang tại bước sóng 600 nm ( $OD_{600}$ ) = 0,05 và tiếp tục được nuôi cấy ở 25 °C tới khi mật độ tế bào  $OD_{600}$  đạt 0,6-0,8, isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG) được bổ sung (đạt các nồng độ cuối cùng 0,1 mM) để cảm

ứng sinh tổng hợp protein đích. Sau khoảng 20 giờ nuôi cấy, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm ở 6,000 vòng/phút trong 10 phút, 4 °C và sinh khối tế bào được hòa lại trong 1 mL đệm NaHepes 50 mM, pH 7,4 có 500 mM NaCl, 10 mM imidazole (đệm A). Dịch tế bào được làm lạnh trên đá, và được 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 dịch trên tủa chứa protein tổng số trong pha tan của tế bào (dịch chiết tế bào). Phần tủa tế bào sau đó được hòa tan bằng 1 mL đệm mẫu protein 1<sup>x</sup> SB có natri dodecyl sulfate (SDS) 2%, β-mecaptoethanol 2% để hòa tan hoàn toàn các protein có trong tủa.

Dịch chiết tế bào được tinh sạch qua cột sắc ký Nickel–sepharose (1 cm × 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 rửa chiết bằng đệm A có imidazol 250 mM.

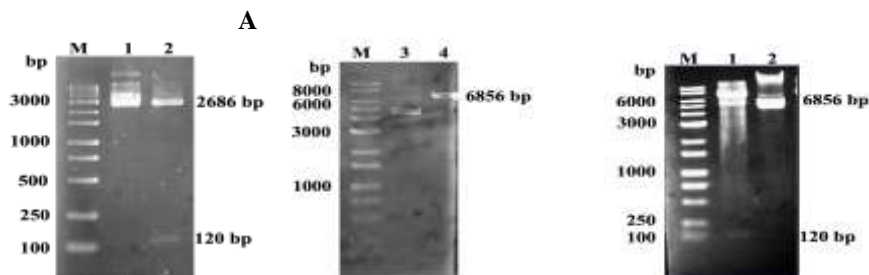
Độ tinh sạch của protein được đánh giá bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 12,5% có SDS (SDS-PAGE) theo Laemmli [15]. KLPT tương đối của các protein được tính dựa trên xác định độ di động điện di  $R_f$  của các protein (đã biết KLPT) trong thang chuẩn và mẫu trên bản gel SDS-PAGE. Sự có mặt của protein tái tổ hợp được khẳng định bằng thẩm tách miễn dịch với kháng thể đơn dòng kháng 6<sup>x</sup>His-tag và kháng thể thứ cấp kháng IgG của chuột có gắn enzyme phosphatase kiềm (AP). Các phân đoạn có 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP được tập hợp lại và thẩm tách qua đêm trong đệm NaHepes 50 mM, pH 7,1 có 50 mM NaCl, glycerol 10%.

Phát hiện hoạt tính endopeptidase trong dịch ngoại bào của *C. botulinum* serotype B (BoNT/B thô) với cơ chất protein 6<sup>x</sup>His-ECFP–

VAMP2(60-94)-EYFP: Khi có hoạt tính của BoNT/B, cơ chất protein 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP (60,1 kDa) sẽ bị phân cắt tạo ra 2 protein: 6<sup>x</sup>His-ECFP (30,8 kDa) và EYFP (29,3 kDa), có thể phát hiện bằng điện di SDS-PAGE, riêng protein 6<sup>x</sup>His-ECFP có thể phát hiện được bằng thẩm tách miễn dịch sử dụng kháng thể kháng 6<sup>x</sup>His. Các thành phần phản ứng bao gồm: đệm 5<sup>x</sup> NaHepes 250 mM pH 7,4, DTT 125 mM, ZnCl<sub>2</sub> 50 μM, 1,5 μg protein cơ chất, 0,1 - 1 μL dịch ngoại bào *C. botulinum*, bổ sung ddH<sub>2</sub>O đến 25 μL và được trộn đều, ủ tại 37 °C trong thời gian 30 phút - qua đêm. Sau đó, phản ứng được dừng bằng cách bổ sung đệm mẫu 1<sup>x</sup> SB và xử lý nhiệt tại 95 °C, 10 phút. Sản phẩm cắt được xác định bằng điện di trên gel SDS-PAGE 12% và thẩm tách miễn dịch sử dụng kháng thể kháng 6<sup>x</sup>His.

### 3. Kết quả và thảo luận

#### 3.1. Nhân dòng gen mã hóa VAMP2(60-94) bằng vector pET28CLY1



Hình 2. Điện di các sản phẩm plasmid trước và sau khi được cắt bởi enzyme giới hạn *EcoRI* và *NcoI*. A) M: thang chuẩn DNA; 1: plasmid pUC19-VAMP2(60-94); 2: sản phẩm cắt pUC19-VAMP2(60-94) bởi *EcoRI* và *NcoI*; 3: plasmid pET28CLY1; 4: sản phẩm cắt pET28CLY1 bởi *EcoRI* và *NcoI*. B) M: thang chuẩn DNA; 1: sản phẩm cắt pET28-VAMP2(60-94) bởi *EcoRI* và *NcoI*; 2: plasmid pET28-VAMP2(60-94).

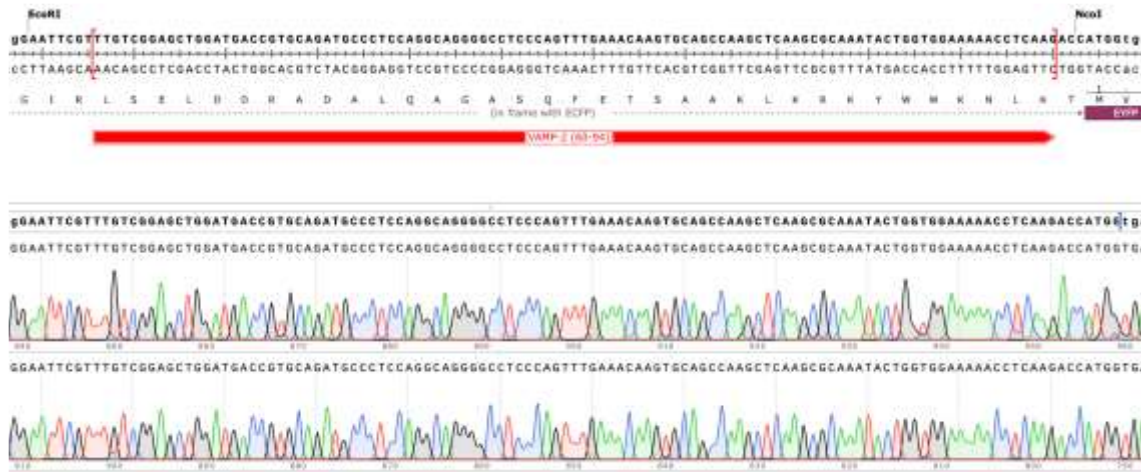
Vector pUC19-VAMP2(60-94) khi được cắt bằng *EcoRI* và *NcoI* đã cho một băng DNA với kích thước 2686 bp tương ứng với kích thước của vector pUC19 nguyên bản và một băng

khoảng 120 bp, tương ứng với kích thước của VAMP2(60-94) (Hình 2A, giếng 2). Tương tự, sản phẩm cắt của pET28CLY1 với cặp enzyme giới hạn tương ứng cũng cho băng plasmid mở

vòng kích thước tương đương khoảng 6856 bp (Hình 2A, giếng 4).

Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp (gắn đoạn *VAMP2(60-94)* với vector pET28CLY1) bằng *NcoI/EcoRI* cho thấy có hai băng DNA, kích thước khoảng 6856 bp và 120 bp tương ứng với vector pET28CLY1 và băng DNA của *VAMP2(60-94)* (Hình 2B, giếng 1). Các kết quả

này bước đầu khẳng định plasmid pET28CLY1 tái tổ hợp mang đoạn gen mã hóa *VAMP2(60-94)* (pET28-*VAMP2(60-94)*). Kết quả giải trình tự vector pET28-*VAMP2(60-94)* cho thấy đoạn gen mã hóa *VAMP2(60-94)* đã được chèn vào pET28CLY1 đúng khung đọc và trình tự (Hình 3).



Hình 3. Trình tự gen *VAMP2(60-94)* trong plasmid pET28-*VAMP2(60-94)*.

### 3.2. Đánh giá mức độ biểu hiện và tinh sạch $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP ở vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) mang vector pET28-*VAMP2(60-94)*

Vector pET28-*VAMP2(60-94)* được biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) cho nuôi cấy và biểu hiện cơ chất protein tái tổ hợp.

Kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện của cấu trúc  $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP trong *E. coli* BL21(DE3) bằng điện di SDS-PAGE cho thấy, có sự xuất hiện của băng protein KLPT khoảng 60,1 kDa, theo tính toán lý thuyết là của  $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP trong tế bào tổng số trước và sau cảm ứng IPTG (Hình 4A, giếng 1-2), trong pha tủa (Hình 4A, giếng 3) và đặc biệt băng protein này to và đậm nét trong mẫu của pha tan (Hình 4A, giếng 4). Như vậy, protein ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP đã được biểu hiện tốt và chủ yếu ở pha tan của *E. coli* BL21(DE3). Kết quả điện di kiểm tra độ tinh sạch của  $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-

EYFP qua cột sắc ký Ni-sepharose cho thấy, các phân đoạn không gắn cột (Hình 4B, giếng 2-4) có sự xuất hiện nhiều băng protein KLPT khác nhau. Trong khi đó, ở các phân đoạn gắn cột (Hình 4B, giếng 5-9), xuất hiện một băng protein KLPT khoảng 60,1 kDa đậm nét, theo lý thuyết là  $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP. Như vậy, protein tái tổ hợp đã được tinh sạch từ protein tổng số (pha tan) của vi khuẩn mang vector pET28CLY1 tái tổ hợp.

### 3.3. Phân cắt cơ chất protein tái tổ hợp $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP bởi BoNT/B thô

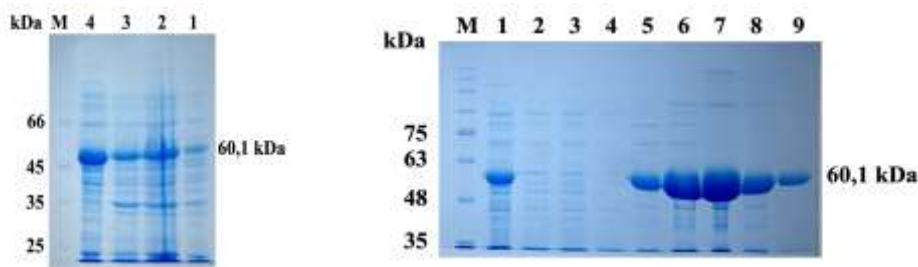
Sử dụng BoNT/B thô để phân cắt cơ chất  $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP, kết quả điện di sản phẩm cắt cho thấy cơ chất khi bị cắt tạo thành 2 băng protein có KLPT khoảng 29 kDa và 31 kDa (Hình 5A, giếng 4-5). Trong đó, một băng protein được nhận ra bởi kháng thể đơn dòng kháng  $6^{\times}$ His-tag (Hình 5B, giếng 4-5). Trong khi đó, cơ chất protein  $6^{\times}$ His-ECFP-*VAMP2(60-94)*-EYFP đã không bị cắt bởi BoNT/B thô đã được xử



lý nhiệt, vẫn giữ nguyên một băng 60,1 kDa (Hình 5, giống 3). Như vậy, có thể thấy rằng BoNT/B thô đã phân cắt đặc hiệu protein tái tổ hợp 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP.

Thực tế, cũng đã có các công bố về thiết kế các cơ chất dạng gắn trình tự axit amin 33-116 [12] hay 33-94 [13] của VAMP2 với CFP và

YFP để phát hiện hoạt tính BoNT/B, /D, /F, và /G bằng phương pháp huỳnh quang FRET. Sự lựa chọn các trình tự khác nhau có thể giúp cải thiện hiệu quả phân cắt cơ chất. Tuy vậy, chúng tôi chưa có điều kiện để so sánh hiệu quả phân cắt của các cơ chất này bởi BoNT/B.



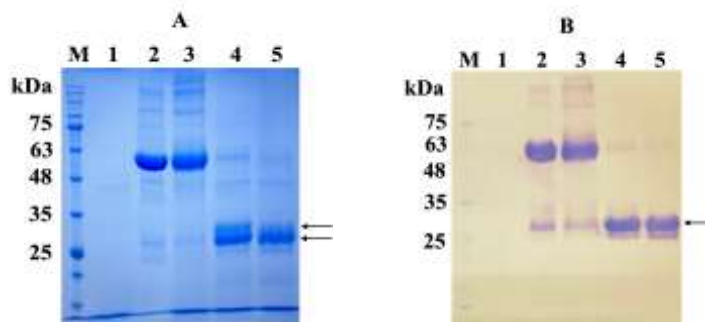
Hình 4. Điện di SDS-PAGE đánh giá mức độ biểu hiện (A); và các phân đoạn tinh sạch 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP ở vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) bằng cột sắc ký ái lực Ni-sepharose (B).

A) M: thang chuẩn protein Pierce<sup>TM</sup> Unstained Protein MW marker;

1: tế bào tổng số trước cảm ứng IPTG; 2: tế bào tổng số sau cảm ứng IPTG;

3: protein trong phân đoạn hòa tủa của tế bào; 4: protein trong phân đoạn tan của tế bào.

B) M: thang chuẩn protein GangNam-STAIN<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder; 1: Protein tổng số; 2-4: các phân đoạn không gắn cột Ni-sepharose. 5-9: các phân đoạn gắn cột Ni-sepharose.

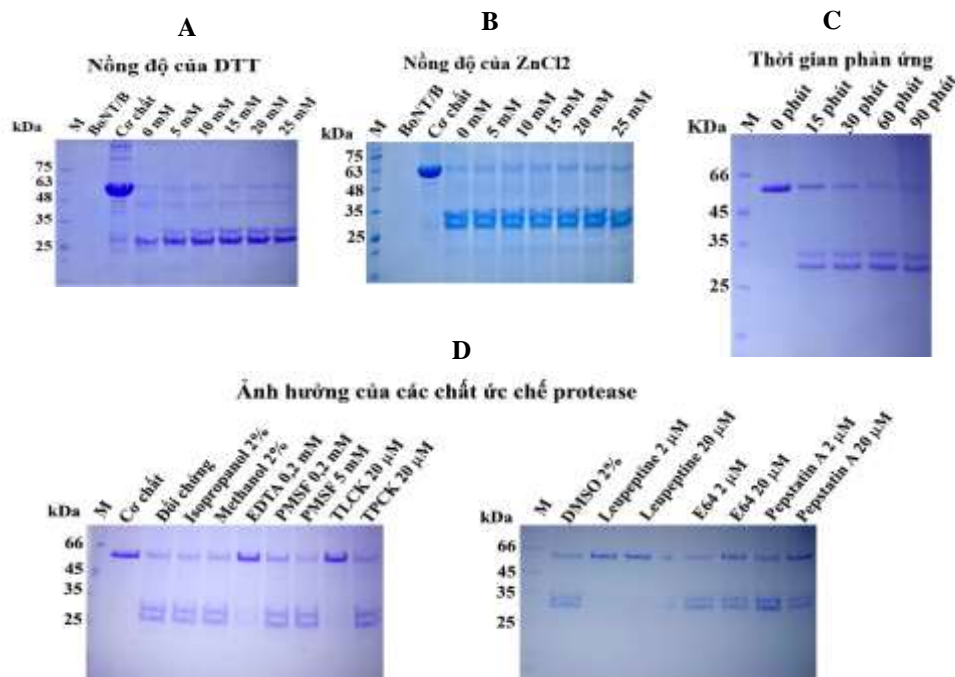


Hình 5. Điện di SDS-PAGE (A) và thử tách miễn dịch (B) của sản phẩm phản ứng phân cắt cơ chất 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP bằng BoNT/B thô. M. thang chuẩn protein GangNam-STAIN<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder; 1: BoNT/B thô; 2: 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP; 3: sản phẩm phản ứng phân cắt cơ chất 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP bằng BoNT/B thô đã được xử lý nhiệt ở 95 °C trong 10 phút; 4-5: sản phẩm phản ứng phân cắt cơ chất 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP bằng BoNT/B thô trong 30 phút và 60 phút.

### 3.4. Ảnh hưởng của các điều kiện phản ứng lên sự phân cắt 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP bởi BoNT/B thô

Ảnh hưởng của các điều kiện phản ứng khác nhau lên sự phân cắt cơ chất bởi BoNT/B thô cũng đã được khảo sát. Kết quả nghiên cứu (Hình 6A) cho thấy khi không có DTT, sản phẩm phản ứng chỉ có một băng protein duy nhất với KLPT khoảng 29 kDa, đây có thể chủ yếu là sản phẩm cắt không đặc hiệu bởi các protease khác trong dịch chiết ngoại bào của *C. botulinum* (BoNT/B thô). Khi có mặt của DTT với các nồng độ 5 - 25 mM, có sự xuất hiện của 2 băng protein có KLPT khoảng 29 và 31 kDa trong sản phẩm cắt; băng protein 31 kDa đậm dần lên theo sự tăng nồng độ DTT.

DTT được biết đến có vai trò cắt cầu disulfide giữa LC và HC của BoNT, cần thiết cho hoạt tính endopeptidase của BoNT [16]. Kết quả nghiên cứu một lần nữa cho thấy nồng độ DTT 20 mM là thích hợp cho phản ứng cắt cơ chất 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP bởi BoNT/B thô. BoNT/B là một metalloprotease có Zn<sup>2+</sup> là cofactor [11, 16]. Kết quả phân tích ảnh hưởng của ZnCl<sub>2</sub> (Hình 6B) cho thấy, không có sự khác biệt nhiều giữa đối chứng không bổ sung ZnCl<sub>2</sub> và các phản ứng có ZnCl<sub>2</sub>. Có thể lý giải rằng, Zn<sup>2+</sup> đã có sẵn trong BoNT/B thô [17]. BoNT/B thô thể hiện hoạt tính rõ nhất (sự giảm cường độ của băng 60,1 kDa và tăng cường độ của các băng 31 và 29 kDa khi được ủ với cơ chất trong 60 phút (Hình 6C).



Hình 6. Điện di SDS-PAGE đánh giá sự ảnh hưởng của một số điều kiện phản ứng lên khả năng phân cắt cơ chất protein 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP bởi BoNT/B thô.

A) Ảnh hưởng của DTT; B) Ảnh hưởng của ZnCl<sub>2</sub>; C) Ảnh hưởng của thời gian phản ứng; D) Ảnh hưởng của các chất ức chế protease.

Các chất ức chế đặc hiệu của các protease, bao gồm: EDTA (chất ức chế metalloprotease), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, chất ức

chế serine protease), Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TLCK, chất ức chế chymotrypsin-like protease), Tosyl phenylalanyl



chloromethyl ketone (TPCK, chất ức chế trypsin-like protease), leupeptin (ức chế serine và cysteine protease), E64 (chất ức chế cysteine protease) và pepstatin A (chất ức chế aspartyl protease) đã được ủ với BoNT/B thô ở 4 °C trong 15 phút trước khi được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng. Kết quả phân tích (Hình 6D) cho thấy, khi không có mặt của các chất ức chế (đối chứng) cũng như có isopropanol 2% (dung môi pha PMSF), methanol 2% (dung môi pha TPCK và E64) và DMSO 2% (dung môi pha pepstatin A), cơ chất đã bị phân cắt bởi BoNT/B thô. Tương tự, PMSF, TPCK, E64 và pepstatin A đều không ảnh hưởng đến hoạt tính cắt cơ chất của BoNT/B thô. Ngược lại, EDTA 0,2 mM, TLCK 20 μM và leupeptin từ 2 μM đã ức chế khả năng cắt cơ chất bởi BoNT/B thô. Đáng chú ý, EDTA được biết đến là chất ức chế đặc hiệu của metalloprotease cũng như BoNT [17].

Tổng hợp cùng với các kết quả ảnh hưởng của DTT, sự ức chế của EDTA và thời gian phản ứng có thể khẳng định, BoNT/B có trong dịch ngoại bào của vi khuẩn *C. botulinum* serotype B và đã cắt cơ chất 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP. Bên cạnh đó, trong dịch ngoại bào cũng có mặt của các protease khác nên có thể đã xảy ra hiện tượng cắt không đặc hiệu. Các nghiên cứu tiếp theo là cần thiết để khẳng định khả năng cắt đặc hiệu của BoNT/B cũng như hạn chế sự hoạt động của các protease khác (nếu có) trong dịch ngoại bào. Tuy nhiên, sử dụng dịch ngoại bào của vi khuẩn cho nghiên cứu sẽ gần với tình huống thực tế phát hiện độc tố trong các mẫu thực phẩm. Sự thay thế chuỗi nhẹ tái tổ hợp, tinh sạch của BoNT/B bởi dịch chiết ngoại bào của *C. botulinum* có thể hạn chế sự cắt không đặc hiệu này. Rasooly và cộng sự [18] khi xác định hoạt tính của mẫu BoNT/A trong thực phẩm cũng cho thấy phản ứng cắt không đặc hiệu của thực phẩm không nhiễm BoNT/A với cơ chất peptide huỳnh quang đặc hiệu của BoNT/A. Tuy nhiên, khi có BoNT/A tín hiệu huỳnh quang gần như tăng gấp đôi.

#### 4. Kết luận

Đã nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch thành công cơ chất protein tái tổ hợp 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP của BoNT/B ở *E. coli* BL21(DE3) sử dụng vector pET28CLY1. Protein tái tổ hợp 6<sup>x</sup>His-ECFP-VAMP2(60-94)-EYFP tinh sạch chỉ có một băng trên SDS-PAGE và có KLPT phù hợp với thiết kế là 60,1 kDa. Protein tái tổ hợp đã được phân cắt bởi BoNT/B thô (dịch ngoại bào của *C. botulinum* serotype B) tạo ra 2 protein nhỏ hơn, có KLPT phù hợp với tính toán lý thuyết. Phản ứng phân cắt bởi BoNT/B thô được hoạt hóa bởi DTT, bị ức chế đặc hiệu bởi EDTA, TLCK và leupeptin; nhưng không bị ảnh hưởng bởi PMSF, TPCK, E64 hay pepstatin A.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Dự án VINIF mã số VINIF.2022.DA0016.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] M. W. Peck, Bacteria: *Clostridium botulinum*, Encyclopedia of Food Safety, Vol. 1, 2014, pp. 381-394, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00091-3>.
- [2] S. Zhang, G. Masuyer, J. Zhang, Y. Shen, D. Lundin, L. Henriksson, S. I. Miyashita, M. M. Carranza, M. Dong, P. Stenmark, Identification and Characterization of a Novel Botulinum Neurotoxin, Nat. Commun., Vol. 8, No. 14130, 2017 pp. 1-10, <https://doi.org/10.1038/ncomms14130>.
- [3] L. Berg, D. Stern, D. Pauly, S. Mahrhold, J. Wesemann et al., Functional Detection of Botulinum Neurotoxin Serotypes A to F by Monoclonal Neoepitope-Specific Antibodies and Suspension Array Technology, Sci. Rep., Vol. 9, No. 5531, 2019, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41722-z>.
- [4] S. Simon, U. Fiebig, Y. Liu, R. Tierney, J. Dano, S. Worbs, T. Enderman, M. C. Nevers, H. Volland, D. Sesardic, M. B. Dorner, Recommended Immunological Strategies to Screen for Botulinum Neurotoxin-Contacting Samples, Toxins, Vol. 7, No. 12, 2015, pp. 5011-5034, <https://doi.org/10.3390/toxins7124860>.

- [5] Z. G. Wang, Dong, S. Singh, H. Steen and J. Li, A Simple and Effective Method for Detecting Phosphopeptides for Phosphoproteomic Analysis, *J. Proteomics*, Vol. 72, No. 5, 2009, pp. 831-835, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.03.006>.
- [6] O. Rosen, L. Feldberg, S. Gura, R. Zichel, A New Peptide Substrate for Enhanced Botulinum Neurotoxin Type B Detection by Endopeptidase-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry/Multiple Reaction Monitoring Assays, *Anal. Biochem.*, Vol. 473, 2015, pp. 7-10, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.09.016>.
- [7] S. R. Kalb, J. Baudys, K. Kiernan, D. Wang, F. Becher, J. R. Barr, Proposed BoNT/A and /B Peptide Substrates Cannot Detect Multiple Subtypes in the Endopep-MS Assay, *J. Anal. Toxicol.*, Vol. 44, No. 2020, pp. 173-179, <https://doi.org/10.1093/jat/bkz044>.
- [8] C. C. Shone, C. P. Quinn, R. Wait, B. Hallis, S. G. Fooks, P. Hambleton, Proteolytic Cleavage of Synthetic Fragments of Vesicle-Associated Membrane Protein, Isoform-2 by Botulinum Serotype B Neurotoxin, *Eur. J. Biochem.*, Vol. 217, No. 3, 1993, pp. 965-971, <https://doi.org/10.1111/j.14321033.1993.tb18327.x>.
- [9] R. J. Hobbs, C. A. Thomas, J. Halliwell and C. D. Gwenin, Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins - A Review, *Toxins*, Vol. 11, No. 418, 2019, <https://doi.org/10.3390/toxins11070418>.
- [10] T. T. H. La, T. L. Nguyen, T. T. Nguyen, Y. Pham, Investigation of Botulinum Neurotoxin Types from *Clostridium botulinum* Causing a Recent Outbreak in Vietnam, *VNU J. Sci.: Nat. Sci. Technol.*, Vol. 37, No. 4, 2021, pp. 64-68, <https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.5332>.
- [11] H. L. T. Nguyen, H. L. Nguyen, P. A. Le, T. T. Nguyen, M. Q. Luu, Y. Pham, A Versatile Immunoassay Based on Functionalized Nanoparticles for Botulinum Neurotoxin Detection and Sensor Development, *Discover Appl. Sci.*, Vol. 6 No. 243, 2024, <https://doi.org/10.1007/s42452-024-05900-7>.
- [12] M. Dong, W. H. Tepp, E. A. Johnson, E. R. Chapman, Using Fluorescent Sensors to Detect Botulinum Neurotoxin Activity in Vitro and in Living Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 101, No. 41, 2004, pp. 14701-14706, <https://doi.org/10.1073/pnas.0404107101>.
- [13] D. R. Ruge, F. M. Dunning, T. M. Piazza T, B. E. Molles, M. Adler, F. N. Zeytin, W. C. Tucker, Detection of Six Serotypes of Botulinum Neurotoxin using Fluorogenic Reporters, *Anal. Biochem.*, Vol. 411, No. 2, 2011, pp. 200-209, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.002>.
- [14] H. Yu, L. Crisman, M. H. B. Stowell, J. Shen, Functional Reconstitution of Intracellular Vesicle Fusion using Purified SNAREs and Sec1/Munc18 (SM) Proteins, *Methods Mol. Biol.*, Vol. 1860, 2019, pp. 237-249, [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8760-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8760-3_15).
- [15] U. K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, Vol. 227, No. 5259, 1970, pp. 680-685, <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [16] S. Cai, H. K. Sarkar, B. R. Singh, Enhancement of the Endopeptidase Activity of Botulinum Neurotoxin by its Associated Proteins and Dithiothreitol, *Biochemistry*, Vol. 38, No. 21, 1999, pp. 6903-6910, <https://doi.org/10.1021/bi990086c>.
- [17] L. L. Simpson, A. B. Maksymowych, S. Hao, The Role of Zinc Binding in the Biological Activity of Botulinum Toxin, *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, No. 29, 2001, pp. 27034-27041, <https://doi.org/10.1074/jbc.M102172200>.
- [18] R. Rasooly, P. M. Do, Development of an in Vitro Activity Assay as an Alternative to the Mouse Bioassay for *Clostridium botulinum* Neurotoxin Type A, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 74, No. 14, 2008, pp. 4309-4313, <https://doi.org/10.1128/AEM.00617-08>.