

# Tạo dòng, biểu hiện, tinh sạch peptide CPE16 gắn định hướng tế bào M có nguồn gốc từ vùng đầu C độc tố *Clostridium perfringens* (CPE) và thử tương tác với Claudin-R4

Huỳnh Kiến Quang<sup>1</sup>, Mai Quốc Gia<sup>1</sup>, Nguyễn Hoàng An<sup>1</sup>, Võ Thị Thanh Hà<sup>2</sup>, Trần Văn Hiếu<sup>1,\*</sup>

## TÓM TẮT

Phát triển vaccine đường uống thông qua việc tạo đáp ứng miễn dịch niêm mạc nhằm phòng ngừa các bệnh đường ruột đang là hướng nghiên cứu được quan tâm hiện nay. Việc nhắm trúng đích tế bào M – tế bào thu nhận kháng nguyên là hướng giải pháp hiệu quả giải quyết tình trạng phân tán kháng nguyên. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy vùng đầu C của độc tố *Clostridium perfringens* có khả năng tương tác với thụ thể Claudin-4 trên bề mặt tế bào M. Bằng các phương pháp tin sinh học, peptide CPE16 (16 amino acid đầu C của độc tố *Clostridium perfringens*) được dự đoán có khả năng tương tác với thụ thể Claudin-4. Trong nghiên cứu này, CPE16-GFP được thu nhận để làm nguyên liệu nhằm thử nghiệm khả năng bám dính với tế bào M. Plasmid tái tổ hợp pET22b-*cpe16-gfp* được tạo ra thông qua việc nối gene *cpe16-gfp* vào plasmid pET22b đã xử lý với cặp enzyme cắt hạn chế NdeI và XhoI. Plasmid tái tổ hợp được hóa biến nạp vào *E. coli* BL21 (DE3) và cảm ứng biểu hiện với 0,5 mM IPTG. Protein CPE16-GFP được kiểm tra và xác định bằng phương pháp SDS-PAGE và Western blot với kháng thể kháng 6xHis. Kết quả cho thấy protein CPE16-GFP được biểu hiện ở pha tan. Protein CPE16-GFP được tinh sạch bằng sắc ký ái lực ion kim loại với độ tinh sạch đạt 94,14%. Cuối cùng, CPE16 được thử nghiệm khả năng tương tác với GST-claudin-R4 bằng phương pháp sử dụng sợi nano silicon (SiNW-FET). Kết quả cho thấy CPE16 có tương tác với GST-claudin-R4 được thể hiện qua sự thay đổi về giá trị cường độ dòng điện trên sợi nano so với đối chứng GST.

**Từ khoá:** CPE16, tế bào M, vaccine đường uống, vùng đầu C độc tố *Clostridium perfringens*

<sup>1</sup>Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

<sup>2</sup>Sở Khoa học Công nghệ tỉnh Bến Tre

## Liên hệ

**Trần Văn Hiếu**, Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

## Lịch sử

- Ngày nhận: 21-11-2018
- Ngày chấp nhận: 01-02-2019
- Ngày đăng: 31-03-2019

DOI: 10.32508/stdjns.v3i1.723



## Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



## GIỚI THIỆU

Các bệnh lây nhiễm qua đường tiêu hóa là nguyên nhân chính gây tử vong trên toàn thế giới<sup>1</sup>, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe, kinh tế của nhiều quốc gia, đặc biệt là những nước đang phát triển. Tại Việt Nam, theo thống kê của Bộ Y tế, mỗi năm có từ 250 đến 500 vụ ngộ độc thực phẩm với 7.000–10.000 ca nhiễm, dẫn đến 100–200 trường hợp tử vong<sup>2</sup>. Phương pháp điều trị được áp dụng nhiều nhất hiện nay là sử dụng các loại kháng sinh. Tuy nhiên phương pháp này vẫn tồn tại nhiều nhược điểm như chi phí cao, ảnh hưởng đến hệ vi sinh đường ruột, có thể dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh nếu lạm dụng. Các nhược điểm trên đòi hỏi cần phát triển những liệu pháp điều trị, phòng ngừa hiệu quả hơn. Gần đây, vaccine đường uống xuất hiện như một phương pháp phòng ngừa hoàn hảo, với nhiều ưu điểm nổi bật, khắc phục được những tồn tại của vaccine tiêm như tạo ra đáp ứng miễn dịch niêm mạc cục bộ, không gây đau, dễ dàng vận chuyển, sử dụng và có thể tránh lây nhiễm chéo<sup>3</sup>.

Tuy nhiên, việc phát triển vaccine đường uống gặp phải rất nhiều rào cản. Do đó số lượng vaccine uống được cấp phép hiện nay chỉ dừng lại ở con số bốn<sup>4</sup>. Các rào cản có thể kể đến như các lớp biểu mô ruột và khe hẹp tế bào được liên kết chặt giữa chúng (Tight Junction), điều kiện khắc nghiệt ở ruột, sự phân tán vaccine, thành phần vaccine không an toàn hay hiện tượng dung nạp miễn dịch<sup>5</sup>. Vì vậy, các nhà khoa học đang tập trung nghiên cứu, phát triển các hệ thống mang, thành phần cũng như định hướng vaccine nhằm đảm bảo vaccine còn nguyên vẹn và đến đúng vị trí mong muốn.

Các công bố cho thấy tế bào M (Microfold cells) là tế bào cấu thành các vị trí thu nhận kháng nguyên của hệ thống miễn dịch niêm mạc ruột<sup>6</sup>. Tế bào được tìm thấy trên bề mặt các mô lympho trong ruột, chúng có vai trò quan trọng trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch nhờ khả năng thu nhận kháng nguyên thông qua các thụ thể trên bề mặt tế bào và vận chuyển kháng nguyên đến các mô lympho bên dưới<sup>7,8</sup>. Hiện nay, có nhiều cặp phối tử - thụ thể được biết đến<sup>9</sup>. Với

**Trích dẫn bài báo này:** Kiến Quang H, Quốc Gia M, Hoàng An N, Thanh Hà V T, Hiếu T V. **Tạo dòng, biểu hiện, tinh sạch peptide CPE16 gắn định hướng tế bào M có nguồn gốc từ vùng đầu C độc tố *Clostridium perfringens* (CPE) và thử tương tác với Claudin-R4**. *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(1):38-45.

những ưu điểm sẵn có, protein và peptide là những loại phối tử nhận được nhiều sự quan tâm. Các phối tử có bản chất là protein và peptide gồm có FimH, Hsp60, Co1 hay vùng đầu C của độc tố *Clostridium perfringens* (CPE). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, 30 amino acid ở vùng đầu C của độc tố *Clostridium perfringens* (CPE30) có khả năng tương tác mạnh với thụ thể Claudin 4 trên bề mặt tế bào M và không gây độc cho cơ thể<sup>10-14</sup>. Với tiêu chí tối ưu về kích thước và cấu hình, nhóm nghiên cứu chúng tôi đã ứng dụng công cụ tin sinh học dự đoán được trong đoạn CPE30 có chứa 16 amino acid liên tục (CPE16) cũng có khả năng tương tác với thụ thể Claudin-4 (kết quả chưa công bố). Do đó, nhằm mục tiêu thử nghiệm phát triển vaccine uống, chúng tôi tiến hành tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein CPE16 dung hợp với Green Fluorescent Protein (GFP). GFP là một protein có khả năng phát huỳnh quang khi được kích thích với ánh sáng có bước sóng phù hợp. GFP dung hợp với CPE16 trong nghiên cứu này nhằm hỗ trợ cho việc theo dõi sự vận chuyển và tương tác của phối tử với bề mặt tế bào M về sau. Kết quả của nghiên cứu này nhằm tạo nguồn nguyên liệu ban đầu cho các thử nghiệm về khả năng tương tác của CPE16 với Claudin-4 nhằm phát triển vaccine uống.

Chip bán dẫn hiệu ứng trường dùng sợi nano silicon (SiNW-FET) có khả năng ứng dụng cao trong lĩnh vực cảm biến sinh học nhờ vào độ nhạy rất cao (nồng độ thấp đến picomol), độ chọn lọc cao, theo dõi theo thời gian thực và không cần sử dụng các chỉ dấu phân tử<sup>15</sup>. Khi xử lý bề mặt của sợi nano silicon với vật liệu tương tác với các phân tử mong muốn, các phân tử mục tiêu tương tác với các phân tử trên sợi nano silicon sẽ làm thay đổi điện trở giữa hai điện cực nguồn và đường thoát của FET. Bằng cách cung cấp một hiệu điện thế xác định ở điện cực cổng ( $V_G$ ) và điện cực đường thoát ( $V_D$ ) rồi đo cường độ dòng điện đi ra điện cực đường thoát ( $I_D$ ), có thể xác định được có tương tác của các phân tử với nhau hay không. Trong nghiên cứu này, một đế mang SiNW-FET đã xử lý với glutathione (GSH)<sup>16</sup> để cố định các phân tử glutathione S transferase (GST), được sử dụng để xác định sự tương tác của GST-claudin-R4 với CPE16-GFP. Các giá trị  $I_D$  (cường độ dòng điện đo được ở điện cực đường thoát) đo được của GST/CPE16-GFP và GST-claudin-R4/CPE16-GFP được so sánh với nhau để rút ra kết luận về tương tác của CPE16-GFP và claudin-R4.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Chủng chủ và plasmid

Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng làm chủng để nhân bản vector tái tổ hợp. Chủng *E. coli* BL21 (DE3)

được sử dụng làm chủng biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pET22b-*cpe30-gfp* chứa gene mã hóa CPE16 được sử dụng làm khuôn để thu nhận gene mục tiêu. Plasmid pET22b được sử dụng để dòng hóa gene *cpe16-gfp*, và giúp kiểm soát sự biểu hiện gene nhờ vào promoter T7 trên plasmid thông qua chất cảm ứng IPTG (Biobasic). Tất cả các chủng vi sinh vật và plasmid được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-TPHCM.

### Cấu trúc vector tái tổ hợp pET22b-*cpe16-gfp*

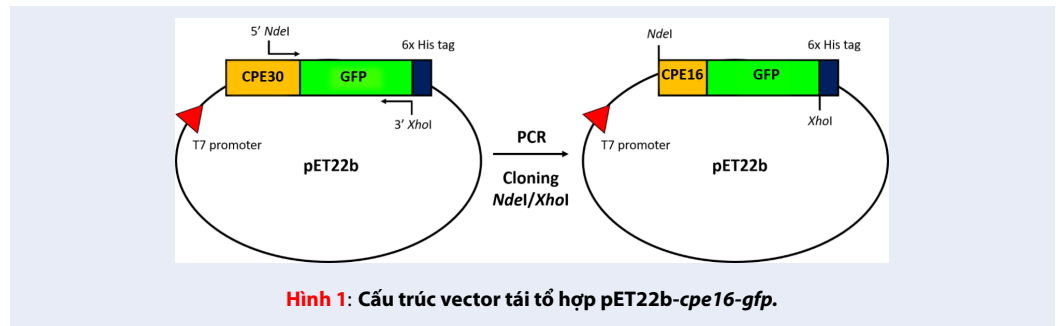
Gene *cpe16-gfp* được thu nhận từ plasmid khuôn pET22b-*cpe30-gfp* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 160FNde (catatgTCATCATATAGTG-GAAATTACC) và 39RXho (ctcgagTTCCTCACCG-GCATCTGCATCCG). Sau khi đã thu nhận thành công, gene *cpe16-gfp* và plasmid pET22b được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt hạn chế *XhoI* và *NdeI* (Thermo Scientific) và nối lại với nhau nhờ enzyme T4 ligase (Thermo Scientific) (Hình 1). Sản phẩm nối được hóa biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  và được nuôi cấy trên môi trường LB (Peptone: 10 g/L, cao nấm men: 5 g/L, NaCl: 10 g/L, pH 7,0) có chứa kháng sinh ampicillin (Biobasic) nồng độ cuối 100  $\mu$ g/mL. Các thể biến nạp sau đó được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 160FNde và T7ter (mồi trên plasmid pET22b).

### Tạo dòng chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET22b-*cpe16-gfp*

Vector tái tổ hợp có kết quả PCR khuẩn lạc dương tính được tiến hành hóa biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) sau đó nuôi trên môi trường LB có kháng sinh ampicillin nồng độ cuối 100  $\mu$ g/mL. Các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET22b-*cpe16-gfp* được sàng lọc lại bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi 160FNde và T7ter.

### Cảm ứng biểu hiện CPE16-GFP tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*cpe16-gfp* được nuôi cấy lắc trong điều kiện môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin nồng độ cuối 100  $\mu$ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 16 giờ. Sau đó, vi khuẩn được cấy chuyển với tỉ lệ 1:20 (v/v) và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 37 $^{\circ}$ C cho đến khi OD<sub>600</sub> đạt giá trị 0,6–0,8. Ngay sau đó, chất cảm ứng IPTG được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ cuối đạt 0,5 mM và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 25 $^{\circ}$ C. Sau 5 giờ cảm ứng, sinh khối vi khuẩn được thu nhận và ly giải bằng sóng siêu âm để thu protein ở các pha tổng, tan và tủa. Sự biểu hiện protein



**Hình 1: Cấu trúc vector tái tổ hợp pET22b-cpe16-gfp.**

tái tổ hợp được xác nhận bằng phương pháp SDS-PAGE với nhuộm Coomassive Blue và Western blot với kháng thể kháng 6xHis. Thực hiện đồng thời với các mẫu đối chứng là mẫu dịch pha tổng của *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b có cảm ứng IPTG và *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-gfp có cảm ứng IPTG.

### Tinh sạch CPE16-GFP bằng phương pháp sắc ký ái lực

Dịch vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-cpe16-gfp ở pha tan sau khi được cảm ứng biểu hiện, thu nhận và ly giải bằng sóng siêu âm được sử dụng làm nguồn nguyên liệu để tinh sạch protein CPE16-GFP bằng phương pháp tinh sạch sắc ký ái lực với cột Hitrap HP (GE Healthcare). Cột sau khi được cân bằng với dung dịch A (20 mM phosphate, pH 7,4), được nạp dịch protein pha tan. Sau đó, cột được tái cân bằng với dung dịch A và rửa với dung dịch B (20 mM phosphate, 90 mM imidazole, pH 7,4). Cuối cùng, protein mục tiêu được dung ly với dung dịch C (20 mM phosphate, 99 mM imidazole, pH 7,4). Kết quả tinh sạch CPE16-GFP được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE, nhuộm bạc và phân tích bằng phần mềm Gel Analyzer.

### Đo lường tương tác giữa CPE16-GFP với claudin-R4

Kỹ thuật nhằm đo lường tương tác CPE16-GFP với Claudin-R4 được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Lin và cộng sự<sup>16</sup>. Cụ thể, chip bán dẫn FET mang sợi nano silicon (SiNW - FET) đính glutathione (GSH) được bổ sung 1 mM GST hoặc GST-Claudin-R4. Sau đó bổ sung PBS pH 7,4 hoặc CPE16-GFP ở nồng độ 1 mM trong PBS pH 7,4 lên chip có GST hoặc GST-Claudin-R4. Tùy thuộc vào điện tích của các phân tử trong dung dịch sẽ tác động đến cường độ dòng điện chạy qua điện cực đường thoát ( $I_D$ ) của FET. Bằng việc đo thông số cường độ dòng điện này có thể xác định được sự tương tác của các phân tử với nhau. Các thông số được ghi nhận thông qua hệ

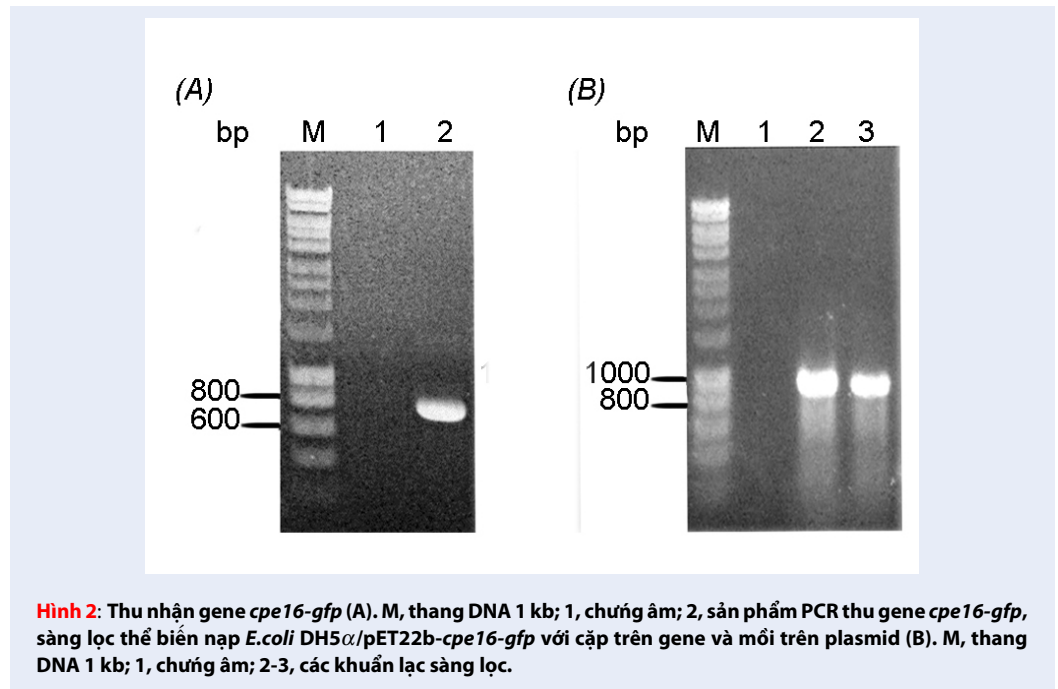
thống phân tích chip bán dẫn (HP 4145B, Hewlett-Packard) sử dụng chương trình LabVIEW. Protein GST ở dạng không dung hợp với thụ thể được sử dụng làm đối chứng âm. Nếu không có tương tác của protein với thụ thể sẽ không làm thay đổi cường độ dòng điện. Sự chênh lệch giá trị  $I_D$  giữa CPE16-GFP với GST-claudin-R4 và CPE16-GFP với GST sẽ cho biết liệu CPE16-GFP có tương tác với GST-claudin-R4 hay không.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tạo dòng chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ mang vector tái tổ hợp pET22b-cpe16-gfp

Để dòng hóa vector pET22b-cpe16-gfp, gene cpe16-gfp được tiến hành thu nhận từ khuôn pET22b-cpe30-gfp bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 160FNde và 39RXho. Sản phẩm PCR được kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di cho thấy đã thu nhận được duy nhất một đoạn gene có kích thước 766 bp, đúng với kích thước gene cpe16-gfp (giếng 2, Hình 2A). Bên cạnh đó, chứng âm của phản ứng PCR với đầy đủ tất cả các thành phần như phản ứng thu gene ngoại trừ khuôn pET22b-cpe30-gfp thì không có sự hiện diện của bất kì vạch DNA nào trên bản gel điện di, điều này chứng tỏ phản ứng PCR thu nhận gene cpe16-gfp hoàn toàn không có tác nhân ngoại nhiễm (giếng 1, Hình 2A). Sau khi được xử lý tạo các đầu dính bằng hai enzyme cắt hạn chế là XhoI và NdeI, gene cpe16-gfp và plasmid pET22b được nối lại với nhau thông qua T4 ligase và tiến hành biến nạp sản phẩm nối vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$ . Trên plasmid pET22b có mang gene kháng kháng sinh ampicillin nên các thể biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường nuôi cấy có chứa kháng sinh ampicillin. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 160FNde và T7ter.

Vector pET22b-cpe16-gfp được tạo ra bằng cách chèn gene cpe16-gfp vào giữa vùng T7 promoter và T7 terminator của plasmid pET22b. Do đó, sản phẩm



khuyến đại của khuẩn lạc có mang vector pET22b-*cpe16-gfp* có kích thước 896 bp. Kết quả điện di cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển dương tính có sự xuất hiện vạch DNA kích thước nằm giữa vạch 800 bp và 1000 bp của thang, phù hợp với kích thước dự đoán ban đầu (giếng 2, 3, **Hình 2B**). Hơn nữa chứng âm không xuất hiện vạch, chứng tỏ không có sự ngoại nhiễm xảy ra trong quá trình PCR (giếng 1, **Hình 2B**). Các khuẩn lạc dương tính này được tiếp tục nuôi cấy và tách chiết plasmid. Vector tái tổ hợp pET22b-*cpe16-gfp* này được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) và nuôi cấy trên môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin để chuẩn bị cho bước kiểm tra biểu hiện.

### Kiểm tra sự biểu hiện của protein CPE16-GFP

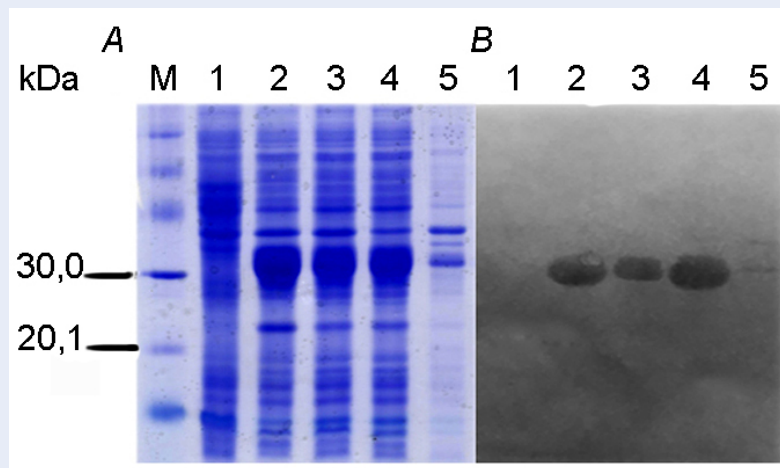
Protein CPE16-GFP tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện từ chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*cpe16-gfp*. Kết quả cho thấy có xuất hiện màu xanh đặc trưng của GFP ở ống nghiệm biểu hiện chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*cpe16-gfp*, và màu xanh này giống với màu xanh ở ống nghiệm biểu hiện chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*gfp* (kết quả không trình bày). Điều này cho thấy GFP vẫn giữ được đặc tính phát quang đặc trưng khi dung hợp với CPE16, tạo thuận lợi cho các thử nghiệm sau này. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy có sự biểu hiện vượt mức của protein có kích thước lớn hơn 30 kDa ở giếng 3 (**Hình 3A**), đúng bằng

kích thước dự đoán của CPE16-GFP và có sự chênh lệch khá nhỏ kích thước với GFP (30 kDa) ở giếng 2 (**Hình 3A**). Không có sự xuất hiện vạch protein vượt mức ở chứng âm là chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b không chèn gene. Bên cạnh đó, protein CPE16-GFP được thiết kế dung hợp với đuôi 6xHis ở vùng đầu C, do đó sự có mặt của CPE16-GFP tái tổ hợp được xác định thông qua sự hiện diện của đuôi 6xHis này. Sự có mặt của CPE16-GFP được kiểm tra thông qua kỹ thuật Western blot với kháng thể kháng 6xHis, kết quả cho thấy protein biểu hiện vượt mức thể hiện trong bản gel SDS-PAGE chính là protein GFP ở giếng 2 (**Hình 3B**) và CPE16-GFP ở giếng 3-5 (**Hình 3B**) và protein này biểu hiện chủ yếu ở pha tan. Như vậy, CPE16-GFP tái tổ hợp, dung hợp với đuôi 6xHis đã được biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET22b-*cpe16-gfp*.

### Tinh sạch protein CPE16-GFP tái tổ hợp

Với sự dung hợp với đuôi 6xHis, protein CPE16-GFP được tinh sạch thông qua phương pháp tinh chế sắc kí ái lực với cột Ni<sup>2+</sup>. Khi dịch protein tổng số đi qua cột sắc kí, những protein nào có mang đoạn polyhistidine được giữ lại thông qua lực tương tác giữa polyhistidine và ion Ni<sup>2+</sup> có trong cột. Sau đó, protein mục tiêu được dung ly ra khỏi cột bởi chất cạnh tranh là imidazole.

Kết quả điện di SDS-PAGE cùng việc đánh giá độ tinh sạch bằng phần mềm Gel Analyzer cho thấy



**Hình 3:** Kiểm tra sự biểu hiện protein CPE16-GFP bằng điện di SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng 6xHis (B). M, thang phân tử lượng protein; 1, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b (+IPTG); 2, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-gfp (+IPTG); 3-5 *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-cpe16-gfp (+IPTG); 3, pha tổng; 4, pha tan; 5, pha tủa.

các phân đoạn dung ly ở giếng 4, giếng 5 và giếng 6 (Hình 4 A) cho một vạch protein có kích thước bằng với kích thước của CPE16-GFP với độ tinh sạch khoảng 94,14% (Hình 4 B).

Như vậy, CPE16-GFP đã được tinh sạch thông qua một bước với độ tinh sạch 94,14%. Với độ tinh sạch này, protein mục tiêu đủ điều kiện (độ tinh sạch  $\geq 90\%$ ) để tiếp tục tiến hành các thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* về sau.

### Đo lường tương tác giữa CPE16-GFP với Claudin-R4

GSH/SiNW-FET cố định với GST hoặc GST-Claudin-R4 rồi cho bám với CPE16-GFP. Sau đó ghi nhận giá trị cường độ dòng điện ở đường thoát ( $I_D$ ) của FET. Như đã nêu, vì  $V_G$  và  $V_D$  là cố định do đó  $I_D$  phụ thuộc vào điện tích của các phân tử bám lên dây nano silicon. Kết quả thể hiện trong Hình 5, ở  $V_G = -1V$ , giá trị  $I_D$  của GST-Claudin-R4/CPE16-GFP giảm nhiều hơn khi tăng dần  $V_G$  so với giá trị  $I_D$  của GST/CPE16-GFP (chứng âm) minh chứng cho khả năng tương tác giữa CPE16-GFP và Claudin-R4.

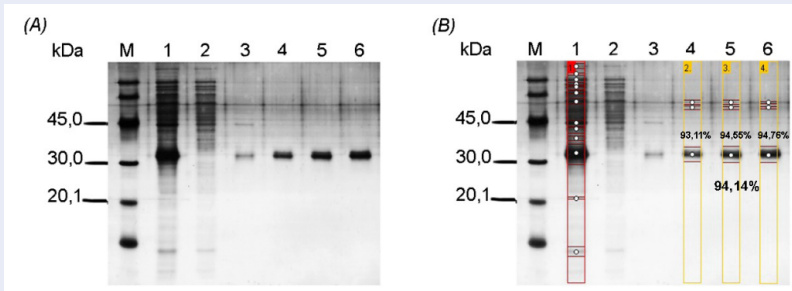
Tóm lại, việc tối ưu hóa kích thước peptide nhắm định hướng tế bào M là điều vô cùng cần thiết, giúp việc mang kháng nguyên dễ dàng hơn nhờ kích thước gọn nhẹ, ít ảnh hưởng đến cấu trúc cũng như chức năng của kháng nguyên đi kèm. CPE16 được dự đoán từ CPE30 là một trong những peptide tiềm năng giải quyết được vấn đề đặt ra. CPE16 đã được thu nhận và bước đầu cho thấy khả năng tương tác với Claudin-4. Các thử nghiệm tiếp theo cần được tiếp tục tiến hành để xác nhận khả năng gắn kết với thụ thể tế bào M *in vivo* hỗ trợ nghiên cứu phát triển vaccine uống.

## KẾT LUẬN

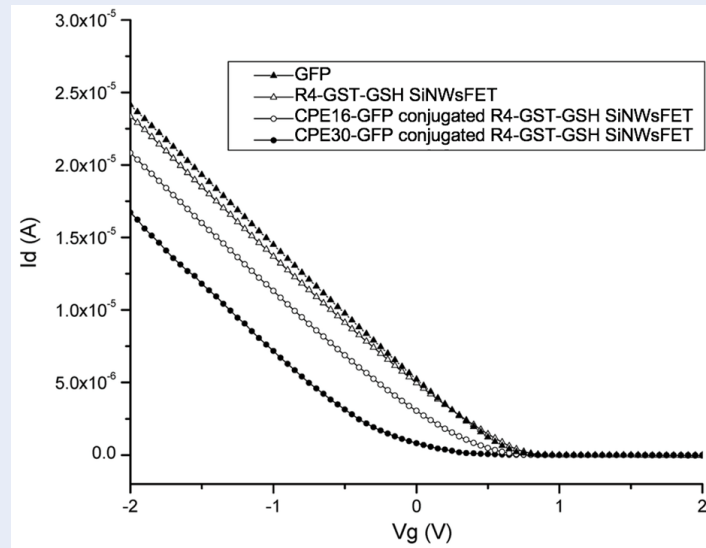
Vector tái tổ hợp mang gene *cpe16-gfp* (pET22b-*cpe16-gfp*) mã hóa cho protein CPE16-GFP đã được cấu trúc thành công, trong đó peptide CPE16 có nguồn gốc từ *Clostridium perfringens*; dòng hóa thành công *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET22b-*cpe16-gfp*; biểu hiện thành công protein CPE16-GFP tái tổ hợp ở pha tan và tinh sạch được protein này với độ tinh sạch 94,14%; protein CPE16-GFP cho thấy có sự tương tác với thụ thể claudin-R4 trên chip. Khi so sánh với các nghiên cứu trên thế giới, hiện nay chưa thấy có nghiên cứu nào sử dụng CPE16 như một phối tử định hướng tế bào M. Như đã đề cập, CPE16 được dự đoán từ đoạn peptide CPE30. Đoạn peptide CPE30 này thường được tổng hợp hóa học và tinh sạch bằng phương pháp HPLC pha đảo với độ tinh sạch lên đến 98%<sup>17</sup>, hoặc được tinh sạch bằng phương pháp tủa muối ammonium sulphate, sau đó sử dụng cột  $Co^{2+}$  để thu được phân đoạn tinh sạch cuối cùng<sup>18</sup>.

## DANH MỤC VIẾT TẮT

- bp:** Base pair
- CPE:** *Clostridium perfringens* enterotoxin
- E. coli*:** *Escherichia coli*
- GFP:** Green fluorescent protein
- GSH:** Glutathione
- GST:** Glutathione S transferase
- His:** Histidine
- IPTG:** Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
- kDa:** kilo Dalton
- LB:** Luria Broth



**Hình 4:** Đánh giá độ tinh sạch protein CPE16-GFP tái tổ hợp bằng SDS-PAGE kết hợp nhuộm bạc (A) và phân tích bằng phần mềm Gel Analyzer (B). M, thang protein phân tử lượng thấp; 1, dịch protein nạp cột; 2, dịch protein qua cột; 3, dịch rửa cột; 4, 5, 6, các phân đoạn dung lyprotein mục tiêu.



**Hình 5:** Tương quan  $I_D$  với  $V_G$  của GST/CPE16-GFP và GST-claudin-R4/CPE16-GFP.

OD: Optical Density  
 PAGE: Polyacrylamide Gel Electrophoresis  
 PBS: Phosphate buffered saline  
 PCR: Polymerase chain reaction  
 SDS: Sodium Dodecyl Sulfate  
 SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

### XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả tuyên bố rằng họ không có xung đột lợi ích.

### TUYÊN BỐ ĐÓNG GÓP CỦA TÁC GIẢ

Huỳnh Kiến Quang, Mai Quốc Gia, Trần Văn Hiếu tiến hành thiết kế thí nghiệm, thu thập số liệu, xử lý kết quả, tham gia viết bài. Nguyễn Hoàng An, Võ Thị

Thanh Hà tiến hành thu thập số liệu, xử lý kết quả.

### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn GS. Yasuhiko Horiguchi, Đại học Osaka, Nhật Bản đã cung cấp plasmid pcp193-319his. Nhóm cũng xin chân thành cảm ơn PGS. Shu-Ping Lin, Viện nghiên cứu Kỹ thuật Y sinh, và Phòng thí nghiệm Thiết bị Nano Quốc gia, Đại học Quốc gia Chung Hsing, Đài Loan đã hỗ trợ các thiết bị đo đặc chip GSH-SiNW FET cho Nguyễn Hoàng An thông qua chương trình hợp tác giữa Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM và Đại học Quốc gia Chung Hsing, Đài Loan. Nghiên cứu được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh (ĐHQG-HCM) trong khuôn khổ Đề tài mã số C2018-18-06.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Culligan EP, Hill C, Sleator RD. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut Pathog.* 2009;1:19. Available from: [10.1186/1757-4749-1-19](https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-19).
2. Hoai X. Mỗi năm Việt Nam có khoảng 250-500 vụ ngộ độc thực phẩm; 2019. Available from: [http://congan.com.vn/doi-song/viet-nam-co-10-ngan-nguoi-ngo-doc-thuc-pham-moi-nam\\_31089.htm](http://congan.com.vn/doi-song/viet-nam-co-10-ngan-nguoi-ngo-doc-thuc-pham-moi-nam_31089.htm).
3. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:592–605. Available from: [10.1038/nri3251](https://doi.org/10.1038/nri3251).
4. Kim SH, Jung DI, Yang IY, Kim J, Lee KY, Nochi T, et al. M cells expressing the complement C5a receptor are efficient targets for mucosal vaccine delivery. *Eur J Immunol.* 2011;41:3219–29. Available from: [10.1002/eji.201141592](https://doi.org/10.1002/eji.201141592).
5. Davitt CJ, Lavelle EC. Delivery strategies to enhance oral vaccination against enteric infections. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;91:52–69. Available from: [10.1016/j.addr.2015.03.007](https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.007).
6. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:301–32. Available from: [10.1146/annurev.cellbio.16.1.301](https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.301).
7. Corr SC, Gahan CC, Hill C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;52:2–12. Available from: [10.1111/j.1574-695X.2007.00359.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00359.x).
8. Kim SH, Seo KW, Kim J, Lee KY, Jang YS. The M cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination. *J Immunol.* 2010;185:5787–95. Available from: [10.4049/jimmunol.0903184](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903184).
9. Kim SH, Jang YS. Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines. *Exp Mol Med.* 2014;46:e85. Available from: [10.1038/emm.2013.165](https://doi.org/10.1038/emm.2013.165).
10. Hanna PC, Mietzner TA, Schoolnik GK, McClane BA. Localization of the receptor-binding region of Clostridium perfringens enterotoxin utilizing cloned toxin fragments and synthetic peptides. The 30 C-terminal amino acids define a functional binding region. *J Biochem.* 1991;266:11037–43.
11. Shrestha A, Uzal FA, McClane BA. The interaction of Clostridium perfringens enterotoxin with receptor claudins. *Anaerobe.* 2016;41:18–26. Available from: [10.1016/j.anaerobe.2016.04.011](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.011).
12. Veshnyakova A, Protze J, Rossa J, Blasig IE, Krause G, Piontek J. On the interaction of Clostridium perfringens enterotoxin with claudins. *Toxins (Basel).* 2010;2:1336–56. Available from: [10.3390/toxins2061336](https://doi.org/10.3390/toxins2061336).
13. Takahashi A, Komiya E, Kakutani H, Yoshida T, Fujii M, Horiguchi Y, et al. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin, by site-directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:1639–48. Available from: [10.1016/j.bcp.2007.12.016](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.12.016).
14. Takahashi A, Kondoh M, Masuyama A, Fujii M, Mizuguchi H, Horiguchi Y, et al. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4. *J Control Release.* 2005;108:56–62. Available from: [10.1016/j.jconrel.2005.07.008](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.07.008).
15. Cui Y, Wei Q, Park H, Lieber CM. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science.* 2001;293:1289–92. Available from: [10.1126/science.1062711](https://doi.org/10.1126/science.1062711).
16. Lin TW, Hsieh PJ, Lin CL, Fang YY, Yang JX, Tsai CC, et al. Label-free detection of protein-protein interactions using a calmodulin-modified nanowire transistor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1047–52. Available from: [10.1073/pnas.0910243107](https://doi.org/10.1073/pnas.0910243107).
17. Ling J, Liao H, Clark R, Wong MS, Lo DD. Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance. *J Biol Chem.* 2008;283:30585–95. Available from: [10.1074/jbc.M803548200](https://doi.org/10.1074/jbc.M803548200).
18. Rajapaksa TE, Stover-Hamer M, Fernandez X, Eckelhoefer HA, Lo DD. Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery. *J Control Release.* 2010;142:196–205. Available from: [10.1016/j.jconrel.2009.10.033](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.033).

# Cloning, expression, and purification of the M cell targeting peptide CPE16 derived from C-terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin and the binding evaluation with Claudin-r4

Huynh Kien Quang<sup>1</sup>, Mai Quoc Gia<sup>1</sup>, Nguyen Hoang An<sup>1</sup>, Vo Thi Thanh Ha<sup>2</sup>, Tran Van Hieu<sup>1,\*</sup>

## ABSTRACT

Developing the oral vaccine that stimulates the mucosal immune system in order to prevent the gastro-intestinal infection is an indispensable demand nowadays. Targeting the M cells, which is a sampling antigen cell, is a highly efficient solution to prevent the dispersion of antigens. Many researches demonstrate that C-terminus *Clostridium perfringens* enterotoxin binds to the Claudin-4 receptor on the M cell surface. By using bioinformatics methods, the peptide CPE16 (16 amino acid of C-terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin) was predicted to have a high affinity to Claudin-4 receptor on M cells. In this present study, CPE16-GFP was produced as a resource to assess the binding ability to M cells. Recombinant plasmid pET22b-*cpe16-gfp* was constructed through cloning *cpe16-gfp* gene into pET22b by two restriction enzymes, NdeI and XhoI, respectively. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strain. The expression of protein CPE16-GFP was induced by 0.5 mM IPTG and confirmed by SDS-PAGE analysis and Western blot probed with anti-6xHis antibody. CPE16-GFP protein was expressed in soluble form. CPE16-GFP was purified by using immobilized-metal affinity chromatography with the purity up to 94.14 percent. Finally, CPE16 was tested for the binding ability to recombinant GST-claudin-R4 with the use of silicon nanowire (SiNW-FET). The result showed that CPE16 interacted with GST-claudin-R4 presented by the change of the current through nanowire, compared to its counterpart control GST.

**Key words:** C-terminus *Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE16, M cell, oral vaccine

<sup>1</sup>Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM

<sup>2</sup>Ben Tre Province's Department of Science and Technology

## Correspondence

**Tran Van Hieu**, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, VNU-HCM

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

## History

- Received: 21-11-2018
- Accepted: 01-02-2019
- Published: 31-03-2019

DOI : 10.32508/stdjns.v3i1.723



## Copyright

© VNU-HCM Press. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



**Cite this article :** Quang H K, Gia M Q, An N H, Ha V T T, Hieu T V. Cloning, expression, and purification of the M cell targeting peptide CPE16 derived from C-terminus of *Clostridium perfringens* enterotoxin and the binding evaluation with Claudin-r4 . *Sci. Tech. Dev. J. - Nat. Sci.*; 3(1):38-45.