

Tạo dòng, biểu hiện, tinh sạch và đánh giá khả năng tương tác của 30 amino acid vùng đầu C của độc tố vi khuẩn *Clostridium perfringens* với thụ thể Claudin-4

Huỳnh Kiến Quang, Nguyễn Hoàng An, Phạm Thị Mộng Quỳnh,
Nguyễn Phước Khải Hoàn, Trần Văn Hiếu

Tóm tắt—Vaccine đường uống là chiến lược đang được quan tâm nhất hiện nay trong việc điều trị các bệnh về đường tiêu hóa do nhiễm khuẩn với nhiều ưu điểm nổi bật hơn hẳn so với vaccine truyền thống ở dạng tiêm. Nhằm giải quyết tình trạng dung nạp miễn dịch và sự phân tán kháng nguyên ở ruột, cũng như có thể kích thích đáp ứng miễn dịch hiệu quả, tế bào M hiện diện trong đường ruột là mục tiêu cần nhắm trúng đích cho việc vận chuyển kháng nguyên. Nhiều nghiên cứu cho thấy, 30 amino acid của vùng đầu C độc tố loài *Clostridium perfringens* (CPE30) có khả năng bám với thụ thể Claudin-4 trên bề mặt tế bào M. Để tạo nguồn nguyên liệu cho việc đánh giá khả năng bám dính của CPE30, gene *cpe30* được dòng hóa vào vector pET-*gfp* bởi hai enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Nde*I trên chủng *E. coli* DH5 α . Kết quả biểu hiện và xác nhận sự biểu hiện của protein dung hợp CPE30-GFP được cảm ứng bằng IPTG trong tế bào chủ *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp SDS PAGE và lai Western với kháng thể kháng 6xHis Tag, cho thấy khả năng biểu hiện vượt mức protein CPE30-GFP trong tế bào chất và chủ yếu ở dạng tan. Đồng thời, CPE30-GFP đã bước đầu được tinh sạch với độ tinh sạch khoảng 92,3%. Thử nghiệm tương tác *in vitro* trên chip bán dẫn silicon đo điện trường (SiNW FETs) cho thấy CPE30 GFP tương tác tốt với thụ thể Claudin-4 (R4). Kết quả này tạo tiền đề cho việc nghiên cứu tiếp theo sự tương tác CPE30 với tế bào M *in vivo*.

Từ khóa—vaccine uống, tế bào M, vùng đầu C độc tố loài *Clostridium perfringens*

Ngày nhận bản thảo: 11-4-2018; Ngày chấp nhận đăng: 11-10-2018; Ngày đăng: 15-10-2018.

Tác giả Trần Văn Hiếu*, Huỳnh Kiến Quang, Nguyễn Hoàng An, Phạm Thị Mộng Quỳnh, Nguyễn Phước Khải Hoàn - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
(e-mail: tvhieu@hcmus.edu.vn)

1 GIỚI THIỆU

Các bệnh nhiễm khuẩn về đường tiêu hóa đã và đang trở thành mối lo ngại cho nhiều quốc gia trên thế giới, đặc biệt là các nước đang phát triển, nơi không đảm bảo vấn đề vệ sinh an toàn thực phẩm. Tại Việt Nam, theo thống kê của Bộ Y tế, số người bị ngộ độc thực phẩm là 5302 người/năm, số người chết là 298 người (49,7 người/năm) trong đó nguyên nhân gây bệnh do vi sinh vật chiếm đến 29,6% [1]. Hiện nay, phương pháp điều trị chính cho các trường hợp này chủ yếu dựa vào kháng sinh. Tuy nhiên phương thức này lại tiềm ẩn nhiều nguy cơ có hại cho sức khỏe bệnh nhân như các vi khuẩn có lợi trong hệ đường ruột sẽ bị tiêu diệt đồng thời hay gây ra tình trạng lạm dụng dẫn đến hiện tượng kháng kháng sinh [2]. Để hạn chế tình trạng này, FDA đã khuyến khích phát triển nhiều biện pháp mới trong việc điều trị và phòng ngừa, đặc biệt phải kể đến là việc sử dụng vaccine uống. Với nhiều ưu điểm nổi bật, khắc phục được những tồn tại của vaccine tiêm như không những có thể kích thích đáp ứng miễn dịch hệ thống mà còn có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch niêm mạc cục bộ, kịp thời ngăn chặn sự phát triển của vi sinh vật gây hại tại vị trí nhiễm [3], không gây đau, dễ dàng sử dụng và có thể tránh lây nhiễm chéo, một tình trạng rất thường xảy ra khi sử dụng kim tiêm.

Tuy nhiên, việc phát triển vaccine đường uống là một câu chuyện không đơn giản, bằng chứng là số lượng vaccine uống hiện nay vẫn còn bị giới hạn [4]. Chúng ta cần phải cân nhắc đến nhiều yếu

tổ có thể ảnh hưởng khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch của loại vaccine này. Trong đó có thể kể đến như điều kiện khắc nghiệt ở dạ dày và ruột, sự phân tán kháng nguyên hay hiện tượng dung nạp miễn dịch. Chính vì thế, các nghiên cứu hiện nay đang tập trung phát triển các giá thể, các hệ thống mang vaccine nhằm đảm bảo quá trình bảo vệ và vận chuyển vaccine đến đúng vị trí mong muốn trong đường ruột.

Nhiều nghiên cứu cho thấy, tế bào M (Microfold cells) được mệnh danh là “cửa ngõ” của hệ miễn dịch đường ruột. Đây là loại tế bào được tìm thấy ở bề mặt mô lympho trong ruột non, có vai trò quan trọng trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch nhờ khả năng vận chuyển kháng nguyên đến các mô lympho bên dưới thông qua hệ thống các thụ thể trên bề mặt tế bào tương tác với các phối tử tương ứng [4]. Hiện nay, các nhóm nghiên cứu đang cố gắng tìm kiếm và lựa chọn các phối tử phù hợp với chiến lược phát triển vaccine của mình, trong đó nổi bật nhất là các phối tử có bản chất là peptide và protein. Các phối tử có bản chất là protein và peptide gồm có FimH [5], Hsp60 [6], Co1 [7] hay vùng độc tố đầu C của *Clostridium perfringens* (CPE) đều là những phối tử đang được quan tâm hiện nay. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, 30 amino acid ở vùng đầu C trên độc tố của loài *Clostridium perfringens* (CPE30) có khả năng bám ái lực cao với thụ thể Claudin-4 hiện diện trên bề mặt tế bào M và hoàn toàn không gây độc cho cơ thể [8-10]. Điều này cho thấy tiềm năng to lớn trong việc ứng dụng tạo vaccine uống nhắm trúng đích tế bào M của loại phối tử này. Chính vì thế, với mong muốn phát triển loại vaccine thế hệ mới này, chúng tôi tiến hành tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein CPE30 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. Bên cạnh đó, GFP lại có nhiều phẩm chất như tính tan tốt, không gây độc cho tế bào... chính vì đặc điểm đó, protein GFP dung hợp với CPE30 trong nghiên cứu này đóng vai trò như một chất đánh dấu, theo dõi sự vận chuyển và tương tác của phối tử với bề mặt tế bào M.

Hiện nay có nhiều phương pháp để đánh giá tương tác protein-protein *in vitro*. Chip bán dẫn silicon đo điện trường (silicon nanowire field-

effect transistors (SiNW FETs)) nhận được sự quan tâm đặc biệt do độ chọn lọc cao, cực kỳ nhạy, kết quả đo lường nhanh, và có thể tích hợp lên hệ thống chip điện tử phân tích hiệu năng cao [11-15] cũng như có nhiều cải tiến giúp tăng cường khả năng đánh giá tương tác protein-protein đã được thực hiện [11-15]. Lợi dụng khả năng bám với ái lực cao của glutathione S-transferase (GST) với glutathione (GSH), GSH được cố định lên chip để đo lường tương tác của protein dung hợp với GST [11]. Theo đó, thụ thể Claudin-4 của CPE30 được dung hợp với GST để có thể cố định lên chip SiNW FET có GSH. Thông qua việc đo lường sự thay đổi điện trường trước và sau khi bổ sung mẫu thử có thể đánh giá được tương tác của CPE30 và thụ thể Claudin-4.

Kết quả của nghiên cứu này nhằm chủ động tạo nguồn nguyên liệu cho các thử nghiệm về tính bám dính của CPE30 *in vivo* trong tương lai.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng chủ và plasmid

Chủng *E. coli* DH5 α 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 *pcep193-319his* (được cung cấp bởi GS. Yasuhiko Horiguchi, Đại học Osaka, Nhật Bản) chứa gene mã hóa CPE30 được sử dụng làm khuôn để thu nhận gene mục tiêu. Plasmid pET-*gfp* có mang gene *gfp* được sử dụng để dòng hóa cũng như biểu hiện gene *cpe30* nhờ vào promoter T7 nằm trên plasmid giúp kiểm soát sự biểu hiện gene thông qua chất cảm ứng IPTG. 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 pET-*cpe30-gfp*

Gene *cpe30* được thu nhận từ plasmid khuôn *pcep193-319his* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 5'-*cpe30-BamHI* và 3'-*cpe30-NdeI*. Sau khi đã thu nhận thành công, cả gene *cpe30* và plasmid pET-*gfp* được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt hạn chế *BamHI* và *NdeI* và nối lại với nhau nhờ enzyme T4 ligase. Sản phẩm nối được được hóa biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 α và

được nuôi cấy trên môi trường LB có chứa kháng sinh ampicillin nồng độ cuối 100 µg/mL. Các thể biến nạp sau đó được tiếp tục sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi T7pro và T7ter (mồi trên plasmid pET-*gfp*). Kết quả tạo dòng được xác định bằng phương pháp giải trình tự.

Tạo dòng chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp*

Vector tái tổ hợp có kết quả giải trình tự đúng được tiến hành hóa biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 (DE3) và nuôi cấy trên môi trường LB-Agar có kháng sinh ampicillin nồng độ cuối 100 µg/mL. Các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp* được sàng lọc thông qua kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu 5'-*cpe30-BamHI* và 3'-*cpe30-NdeI*.

Cảm ứng biểu hiện CPE30-GFP tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp* được nuôi cấy lắc trong điều kiện môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin nồng độ cuối 100 µg/mL, 37 °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 °C cho đến khi OD₆₀₀ đạt giá trị 0,6 – 0,8. Ngay sau đó, chất cảm ứng IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) được bổ sung vào môi trường nuôi cấy sao cho nồng độ cuối đạt 0,5 mM và tiếp tục nuôi cấy lắc ở 16 °C. Sau 16 – 20 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 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)/pET-*gfp* có cảm ứng IPTG và *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp* không cảm ứng IPTG.

Tinh sạch CPE30-GFP bằng phương pháp sắc ký ái lực

Dịch vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp* ở pha tổng 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 CPE30-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 tổng số. 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 CPE30-GFP được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE và nhuộm bạc.

Đo lường tương tác protein-protein sử dụng linh kiện bán dẫn silicon đo điện trường (SiNW-FET)

Kỹ thuật đo lường tương tác protein-protein được thực hiện theo công bố của Lin và cộng sự [11]. Cụ thể, chip SiNW-FET có GSH được bổ sung 1 mM GST hoặc GST-R4 (thụ thể Claudin-4 dung hợp với GST, bài báo đang chuẩn bị công bố). CPE30-GFP ở nồng độ 1 mM trong PBS pH 7,4 được bổ sung lên chip có GST hoặc GST-R4. Do pI theo tính toán của các protein này dưới 6,5 nên ở pH 7,4 các protein này đều tích điện âm. Điện trường được đo lường thông qua hệ thống phân tích chip bán dẫn (HP 4145B, Hewlett-Packard) sử dụng chương trình LabVIEW. Mỗi tương quan giữa cường độ (ID) (A) và hiệu điện thế (VG) (V) trước và sau khi nạp CPE30-GFP được thể hiện nhằm đánh giá khả năng tương tác. Protein GST ở dạng không dung hợp với thụ thể được sử dụng làm đối chứng âm. Nếu protein không có tương tác hoặc tương tác yếu với thụ thể sẽ được đẩy ra ngoài càng nhiều làm giảm nhanh cường độ (ID) (A). Sự chênh lệch (ID) giữa CPE30-GFP với GST-R4 và CPE30-GFP với GST cho phép đánh giá liệu CPE30-GFP có thể tương tác với GST-R4 hay không.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng chủng *E. coli* DH5α mang vector tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp*

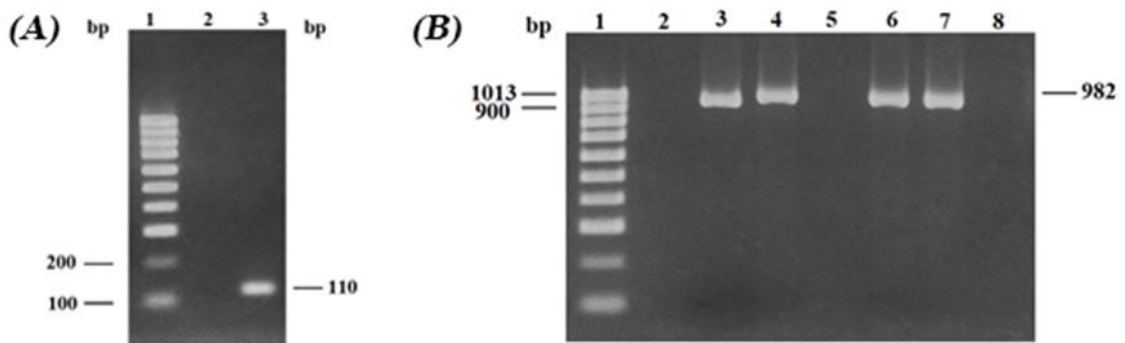
Để đồng hóa vector pET-*cpe30-gfp*, gene *cpe30* được tiến hành thu nhận từ khuôn *pcpe193-319his* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu 5'-*cpe30-BamHI* và 3'-*cpe30-NdeI*. Sản phẩm PCR được kiểm tra kích thước bằng phương pháp điện di trên

gel agarose 1%. Kết quả điện di cho thấy đã thu nhận được duy nhất một đoạn gene có kích thước 110 bp, đúng với kích thước gene *cpe30* (giếng 3, hình 1A). Bên cạnh đó, chứng âm của phản ứng PCR được thiết kế với đầy đủ tất cả các thành phần như phản ứng thu gene ngoại trừ khuôn *pcpe193-319his* không được bổ sung nhằm kiểm tra sự ngoại nhiễm. Kết quả cho thấy, không có sự hiện diện của bất kỳ vạch DNA nào trên bản gel điện di và điều này chứng tỏ phản ứng PCR thu nhận gene *cpe30* hoàn toàn không có tác nhân ngoại nhiễm (giếng 2, Hình 1A).

Sau khi được xử lý tạo các đầu dính bằng hai enzyme cắt hạn chế là *BamHI* và *NdeI*, gene *cpe30* và plamid pET-*gfp* được nối lại với nhau thông qua T4 ligase và tiến hành biến nạp sản phẩm nối vào chủng *E. coli* DH5 α . Trên plamid pET-*gfp* 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 T7pro và T7ter bắt đặc hiệu với vùng T7 promoter và T7 terminator của plamid pET-*gfp*.

Vector pET-*cpe30-gfp* được xây dựng bằng cách chèn gene *cpe30* vào giữa vùng T7 promoter và T7 terminator của plamid pET-*gfp*. Do đó, sản phẩm khuếch đại của khuẩn lạc có mang vector pET-*cpe30-gfp* có kích thước 982 bp. Kết quả điện di cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển dương tính có sự xuất hiện vạch DNA kích thước vào khoảng giữa vạch 900 bp và 1013 bp của thang, phù hợp với kích thước dự đoán ban đầu (giếng 3, 4, 6, 7, Hình 1B). Hơn nữa chứng âm không xuất hiện vạch, chứng tỏ không có sự ngoại nhiễm xảy ra trong quá trình PCR (giếng 2, Hình 1B). Như vậy, bước đầu dự đoán gene *cpe30* đã chèn vào đúng vị trí mong muốn theo đúng với thiết kế ban đầu. Các khuẩn lạc dương tính này sẽ tiếp tục được nuôi cấy, tách chiết plamid và tiến hành giải trình tự.

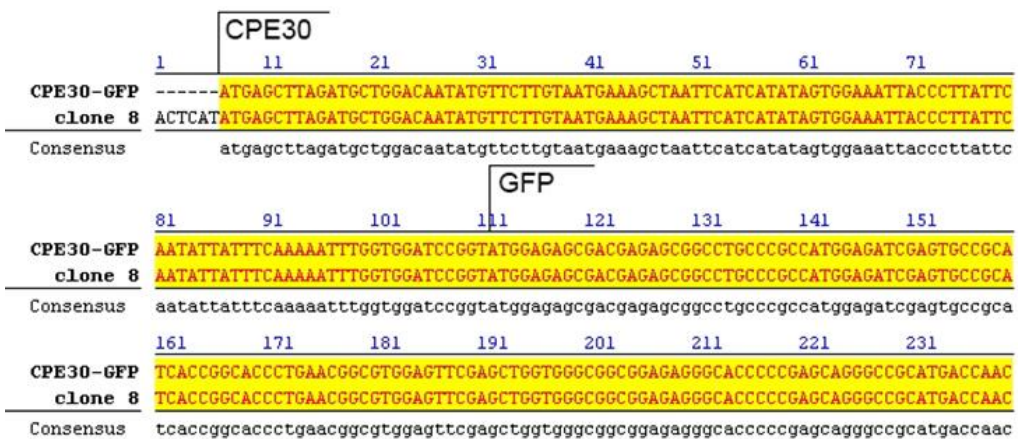


Hình 1. Thu nhận gene *cpe30*

(A). 1: Thang chuẩn DNA 100bp; 2: Chứng âm; 3: Sản phẩm PCR thu gene *cpe30* và Sàng lọc thể biến nạp *E. coli* DH5 α (DE3) bằng cặp mồi T7pro và T7ter; (B). 1: Thang chuẩn 100bp; 2: Chứng âm; 3 – 8: Các khuẩn lạc dự tuyển.

Kết quả giải trình tự đoạn gene *cpe30* trên plamid tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp* (hình 2) cho thấy đoạn gene này có độ tương đồng 100% so với thiết kế gene ban đầu và đồng khung dịch mã. Như

vậy, gene *cpe30* đã được chèn thành công vào vector pET-*gfp* vào đúng vị trí nhận biết của hai enzyme *BamHI* và *NdeI*.

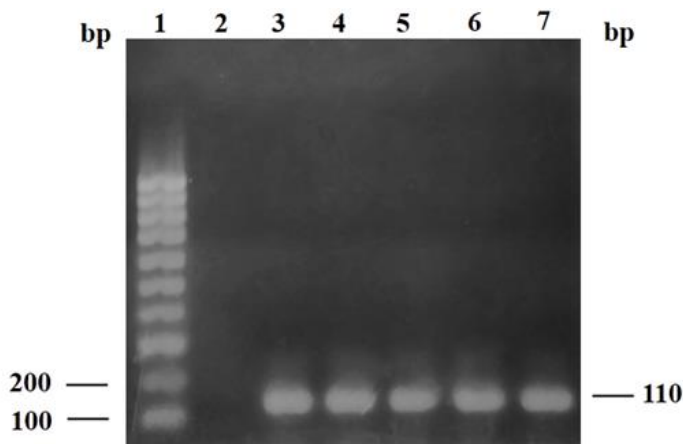


Hình 2. Một phần kết quả giống cột đầu 5' trình tự gene *cpe30-gfp* dòng hóa được (clone 8) và gene *cpe30-gfp* lý thuyết (CPE30-GFP) được trình bày

Tạo dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp*

Sau khi đã cấu trúc thành công, vector tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp* được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) và nuôi cấy trên môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin. Các khuẩn lạc mọc được trên môi trường sàng lọc được lựa chọn ngẫu

nhiên và được kiểm tra sự hiện diện của vector tái tổ hợp thông qua kỹ thuật PCR bằng cặp mồi đặc hiệu 5'-*cpe30-BamHI* và 3'-*cpe30-NdeI*. Kết quả cho thấy ở các giếng 4 – 7 (hình 3) đều xuất hiện một vạch DNA có kích thước 110 bp tương ứng với kích thước gen *cpe30* ở giếng 3 (hình 3). Như vậy, chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp* đã được dòng hóa thành công.



Hình 3. Sàng lọc thể biến nạp *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp* với cặp mồi đặc hiệu.

1: Thang chuẩn 100 bp; 2: Chứng âm; 3: gene *cpe30*; 4 – 7: Sản phẩm PCR khuẩn lạc dự tuyển *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp*

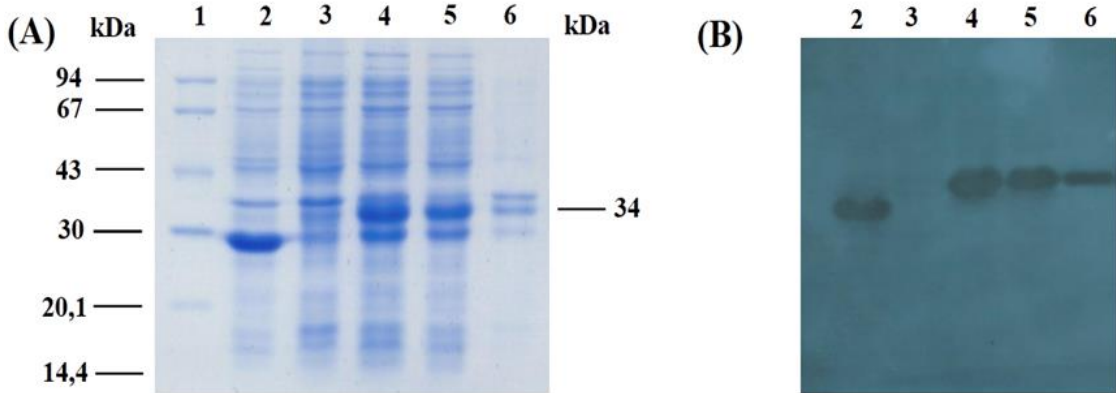
Kiểm tra sự biểu hiện của protein CPE30-GFP

Protein CPE30-GFP tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện từ chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp* theo quy trình được mô tả trong phần phương pháp. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy có sự biểu hiện vượt mức của

protein có kích thước khoảng 34 kDa ở giếng 4 (hình 4A), đúng bằng kích thước dự đoán của CPE30-GFP và có sự chênh lệch kích thước với protein GFP (30 kDa) ở giếng 2 (hình 4A). Hơn nữa, không có sự xuất hiện vạch protein mục tiêu ở đối chứng âm là chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp* không cảm ứng IPTG. Bên

cạnh đó, protein CPE30-GFP được thiết kế dưới dạng dung hợp với đuôi 6xHis được mã hóa bởi một đoạn DNA nằm ở hạ lưu vùng gene *gfp* nên sự có mặt của CPE30-GFP tái tổ hợp được khẳng định gián tiếp thông qua sự hiện diện của đuôi 6xHis này. Kết quả xác nhận sự có mặt của CPE30-GFP được thực hiện thông qua kỹ thuật Western blot với kháng thể kháng đuôi 6xHis cho

thấy protein biểu hiện vượt mức thể hiện trong bản gel SDS-PAGE chính là protein GFP ở giếng 2 (hình 4B) và CPE30-GFP ở giếng 4 – 6 (hình 4B) và protein này biểu hiện chủ yếu ở pha tan. Như vậy, CPE30-GFP tái tổ hợp, dung hợp với đuôi 6xHis đã được biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*cpe30-gfp*.



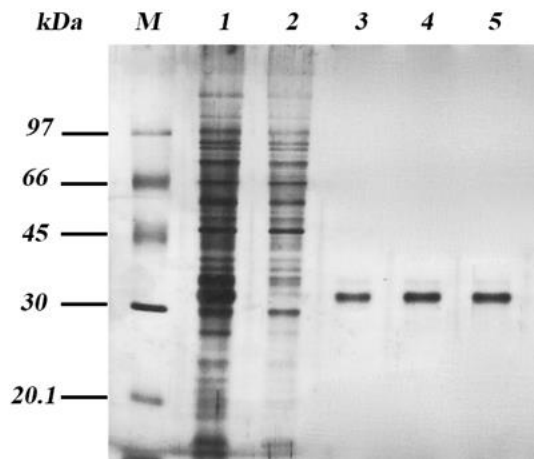
Hình 4. Kiểm tra sự biểu hiện protein CPE30-GFP bằng điện di SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng 6xHis (B).

1: Thang phân tử lượng protein; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*gfp*, IPTG (+); 3: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*cpe30-gfp*, IPTG (-); 4 – 6: *E. coli* BL21(DE3)/pET-*cpe30-gfp*, IPTG (+); 4: pha tổng; 5: pha tan; 6: pha tủa

Tinh sạch protein CPE30-GFP tái tổ hợp

Với sự dung hợp với đuôi 6xHis, protein CPE30-GFP được tinh sạch thông qua phương pháp tinh chế sắc kí ái lực với cột Ni^{2+} . 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^{2+} có trong cột. Sau đó, protein mục tiêu sẽ được dung ly ra khỏi cột bởi chất cạnh tranh là imidazole và phân tích độ tinh sạch bằng phương pháp SDS-PAGE cùng phần mềm Gel Analyzer.

Kết quả điện di SDS-PAGE cùng việc đánh giá độ tinh sạch bằng phần mềm Gel Analyzer cho thấy các phân đoạn dung ly ở giếng 4 và giếng 5 (Hình 5) cho một vạch protein có kích thước đúng bằng với kích thước của CPE30-GFP với độ tinh sạch khoảng 92,3%.



Hình 5. Tinh sạch protein CPE30-GFP tái tổ hợp. 1: Thang protein phân tử lượng thấp; 2: Dịch protein trước khi nạp cột; 3: Dịch protein qua cột; 4, Dịch rửa cột; 5 – 6: Phân đoạn dung ly protein mục tiêu

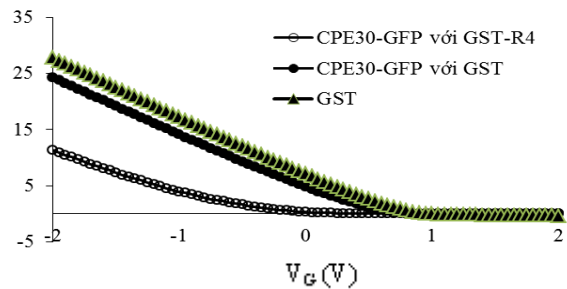
Khi so sánh với các nghiên cứu trên thế giới, CPE30 chủ yếu được tổng hợp hóa học và tinh sạch bằng phương pháp HPLC pha đảo với độ tinh sạch ước tính >98% [9, 16]. Bên cạnh đó, peptide CPE30 cũng có thể được tổng hợp bằng kỹ thuật protein tái tổ hợp, và thường được gắn trực tiếp với đuôi 6xHis, hoặc dung hợp với các protein khác như hemagglutinin như trong nghiên cứu của Thejani E. Rajapaksa và cộng sự, trong trường hợp này, protein được tinh sạch bằng phương pháp tủa với ammonium sulphate, sau đó sử dụng cột ion Co^{2+} để thu được phân đoạn protein tinh sạch cuối cùng [17]. Như vậy, chưa từng có công bố nào sử dụng đối tượng nghiên cứu là CPE30 được dung hợp với GFP và trải qua quá trình tinh sạch trực tiếp với độ tinh sạch khoảng 92,3% như trong nghiên cứu này. Hơn nữa, với độ tinh sạch khoảng 90 – 95% (tương đương với tiêu chuẩn của các sản phẩm protein tái tổ hợp thương mại), protein này có thể tiếp tục được sử dụng để tiến hành các thử nghiệm ở *in vitro* và *in vivo*.

Đo lường tương tác CPE-GFP

Chip GSH-SiNW FET được sử dụng để đo lường tương tác giữa CPE30-GFP với GST-R4 và CPE30-GFP với GST thông qua giá trị I_D-V_G . Đồ thị trong Hình 6 cho thấy có sự chênh lệch lớn giữa tương tác CPE30-GFP với GST-R4 (vòng tròn trắng; 11,31 A) và tương tác CPE30-GFP với GST (vòng tròn tô đen; 24,27 A) (bảng 1). Tương tác giữa CPE30-GFP và GST yếu xấp xỉ mẫu GST không dung hợp R4 (tam giác tô đen; 28,14 A). Kết quả này xác định CPE30-GFP tương tác tốt GST-R4 và không tương tác hoặc tương tác rất yếu với GST. Như vậy, có thể kết luận rằng CPE30 có tương tác với thụ thể tự nhiên Claudin-4 (R4).

Bảng 1. Chênh lệch cường độ (I_D) (A) các mẫu trước và sau khi nạp CPE30-GFP

Tương tác thử nghiệm	CPE30-GFP với GST-R4	CPE30-GFP với GST	GST
(I_D) (A)	11,31	24,27	28,14



Hình 6. Đánh giá tương tác giữa CPE30-GFP với GST-R4. Cường độ (I_D) (A) và hiệu điện thế (V_G) (V) trước và sau khi nạp CPE30-GFP. Kết quả đại diện cho 3 lần lặp lại độc lập.

4 KẾT LUẬN

Vector tái tổ hợp mang gene *cpe30-gfp* (pET-*cpe30-gfp*) mã hóa cho protein CPE30-GFP đã được cấu trúc thành công, trong đó peptide CPE30 có nguồn gốc từ protein Hsp60 của vi khuẩn *Clostridium perfringens*; dòng hóa thành công dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET-*cpe30-gfp*; biểu hiện thành công protein CPE30-GFP tái tổ hợp ở pha tan và bước đầu tinh sạch và thu nhận được protein này với độ tinh sạch 92,3%. Protein này cho thấy vẫn giữ được khả năng tương tác với thụ thể tự nhiên của nó là Claudin-4 (R4) *in vitro*. Nghiên cứu này làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc phát triển các vaccine uống nhắm trúng đích tế bào M bao gồm thử nghiệm tính bám dính trên bề mặt tế bào M mức độ *ex vivo* và *in vivo*, đánh giá khả năng vận chuyển kháng nguyên qua tế bào M, nghiên cứu đáp ứng miễn dịch đường ruột sử dụng kháng nguyên mô hình là GFP.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn GS. Yasuhiko Horiguchi, Đại học Osaka, Nhật Bản đã cung cấp plasmid *ppe193-319his*. 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 đạc chip GSH-SiNW FET cho Nguyễn Hoàng An thông qua chương trình hợp tác giữa Trường 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]. Vệ sinh an toàn thực phẩm, vấn đề xã hội bức xúc cần giải quyết, 2011.
- [2]. A.C.O.S. AFFAIRS, Combating antibiotic resistance, *The Journal of the American Dental Association*, vol. 135, 4, 484-487, 2004.
- [3]. A. Azizi, A. Kumar, F. Diaz-Mitoma, J. Mestecky, Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal M cells, *PLoS pathogens*, 6, 11, e1001147, 2010.
- [4]. S.H. Kim, Y.S. Jang, Antigen targeting to M cells for enhancing the efficacy of mucosal vaccines, *Experimental & Molecular Medicine*, 46, 3, e85, 2014.
- [5]. N.T.T. Hoa, D.T. Truong, H.T. Van, Cloning and expression of GFP-fused m cell targeting protein (FimH), *International Symposium on Green Technology (ISGT)*, 1009–1017, 2016.
- [6]. G. Nakato *et al.*, Cutting Edge: Brucella abortus exploits a cellular prion protein on intestinal M cells as an invasive receptor, *J. Immunol.*, 189, 4, 1540–4, 15 2012.
- [7]. N.H. An, D.T. Truong, T.V. Hieu, Cloning, expression and purification of M-cell specific binding peptide (Co1) fused with GFP, *Journal of Biotechnology*, 14, 4, 599–604, 2016.
- [8]. D.D. Lo, J. Ling, A.H. Eckelhoefer, M cell targeting by a Claudin 4 targeting peptide can enhance mucosal IgA responses, *BMC Biotechnol*, 12, 7, 13, 2012.
- [9]. T. Ye, Y. Yue, X. Fan, C. Dong, W. Xu, S. Xiong, M cell-targeting strategy facilitates mucosal immune response and enhances protection against CVB3-induced viral myocarditis elicited by chitosan-DNA vaccine, *Vaccine*, 32, 35, 4457–65, 2014.
- [10]. Z. Gao, B.A. McClane, Use of Clostridium perfringens enterotoxin and the enterotoxin receptor-binding domain (C-CPE) for cancer treatment: opportunities and challenges, *Journal of Toxicology*, 2012.
- [11]. S.P. Lin *et al.*, A reversible surface functionalized nanowire transistor to study protein–protein interactions, *Nano Today*, 4, 3, 235–243, 2009.
- [12]. T.W. Lin *et al.*, Label-free detection of protein-protein interactions using a calmodulin-modified nanowire transistor, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 3, 1047–1052, 2010.
- [13]. K.I. Chen, B.R. Li, Y.T. Chen, Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation, *Nano Today*, 6, 2, 131–154, 2011.
- [14]. X. Duan, Y. Li, N. K. Rajan, D.A. Routenberg, Y. Modis, M. A. Reed, Quantification of the affinities and kinetics of protein interactions using silicon nanowire biosensors, *Nature Nanotechnology*, 7, 6, 401, 2012.
- [15]. S.P. Lin, T.Y. Chi, T.Y. Lai, M.C. Liu, Investigation into the effect of varied functional biointerfaces on silicon nanowire MOSFETs, *Sensors*, 12, 12, 16867–16878, 2012.
- [16]. J. Ling, H. Liao, R. Clark, M.S.M. Wong, D.D. Lo, Structural constraints for the binding of short peptides to claudin-4 revealed by surface plasmon resonance, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 45, 30585–30595, 2008.
- [17]. T.E. Rajapaksa, M.S. Hamer, X. Fernandez, H.A. Eckelhoefer, D.D. Lo, Claudin 4-targeted protein incorporated into PLGA nanoparticles can mediate M cell targeted delivery, *Journal of Controlled Release*, 142, 2, 196–205, 2010.

Cloning, expression, purification and interaction evaluation of 30 amino acids in C terminus of *Clostridium perfringens* toxin with its receptor Claudin-4

Huynh Kien Quang, Nguyen Hoang An, Pham Thi Mong Quynh,
Nguyen Phuoc Khai Hoan, Tran Van Hieu*

University of Science, VNUHCM
*Corresponding author: tvhieu@hcmus.edu.vn

Received: 11-4-2018, Accepted: 11-10-2018, Published: 15-10-2018

Abstract—Oral vaccine is a strategy being the most interested about treatments of gastrointestinal infections because of many great benefits outweigh conventional injection vaccines. In order to resolve the dispersion of antigens in gastrointestinal surfaces, the immunological tolerance and also be capable to stimulate immune responses effectively, M cells are targeted for antigens delivery. A number of researches reported that 30 amino acids in C terminus of *Clostridium perfringens* toxin (CPE30) have a high affinity to Claudin-4 receptor presenting on M cells. It is highly indispensable to produce a resource for assessing of CPE30 binding ability so *cpe30* gene was cloned into the pET-*gfp* plasmid by

two restriction enzymes *Bam*HI and *Nde*I on the *E. coli* DH5a strain. The expression and confirmation of the fusion protein CPE30-GFP which was induced by IPTG in *E. coli* BL21 (DE3) strain and assessed by SDS-PAGE and Western blot with 6xHis Taq antibody demonstrated that there was the over expression of CPE30 GFP fusion protein in the cytoplasm, mainly in the soluble form. Finally, CPE30-GFP was purified which the purity was approximately 92.3%. *In vitro* protein interaction measurement using silicon nanowire field-effect transistors (SiNW FETs) showed that CPE30-GFP had a good binding affinity with its receptor Claudin-4 (R4). This result laid the groundwork for the CPE30 interaction study with the M cell *in vivo*.

Index Terms—oral vaccine, M cell, C terminus of *Clostridium perfringens* toxin.