

Nghiên cứu biểu hiện kháng nguyên vỏ miền III tái tổ hợp của virus sốt xuất huyết type 1, 2, 3, 4 trên *Escherichia coli*

Trần Thanh Loan¹, Đặng Ngọc Phước², Nguyễn Ngọc Lương³, Phan Thị Minh Phương¹, Alberto Alberti⁴

(1) Bộ môn Miễn dịch – Sinh lý bệnh, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(2) Bộ môn Sinh hóa, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(3) Bộ môn Công nghệ sinh học – Khoa Sinh học - Trường Đại học Khoa học Huế

(4). Bộ môn Vi sinh và Miễn dịch học - Thú y – Đại học Sassari - Ý

Tóm tắt

Mục tiêu: Biểu hiện protein EDIII tái tổ hợp của 4 típ huyết thanh của virus Dengue (DENV) trên *Escherichia coli* (E.coli). **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng nghiên cứu là các plasmid tái tổ hợp pGEX-2T mang gene EDIII của mỗi típ huyết thanh của DENV. Sau khi tạo dòng thành công, chúng tôi tiến hành cho plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp biến nạp vào chủng *Escherichia coli* BL21(DE3)RIPL để biểu hiện protein EDIII tái tổ hợp trong những điều kiện nhiệt độ và nồng độ IPTG khác nhau. Kỹ thuật Western blot được sử dụng để kiểm tra sự biểu hiện chính xác cũng như tính kháng nguyên của protein EDIII của DENV típ 2. **Kết quả:** Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy protein EDIII tái tổ hợp của 4 típ huyết thanh của DENV đều đã được tạo dòng và biểu hiện thành công trên *Escherichia coli*. Nhiều điều kiện biểu hiện khác nhau đã được kiểm tra nhưng không tạo được protein EDIII tái tổ hợp ở dạng hòa tan. Kết quả phân tích Western blot cho thấy protein EDIII của DENV-2 đã được biểu hiện chính xác và xác nhận tính kháng nguyên của nó. **Kết luận:** Protein EDIII tái tổ hợp của 4 típ huyết thanh của virus Dengue (DENV) đã được biểu hiện thành công trên *Escherichia coli* (E.coli). Tinh sạch protein EDIII không hòa tan bằng quá trình biến tính rồi hồi tính có thể mang lại kết quả trong những nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: virus Dengue (DENV), protein EDIII

Abstract

Expression of recombinant envelope protein domain III of Dengue virus type 1, 2, 3, 4 in *Escherichia coli*

Tran Thanh Loan¹, Dang Ngoc Phuoc², Nguyen Ngoc Luong³, Phan Thi Minh Phuong¹, Alberto Alberti⁴

(1) Department of Immunology and Pathophysiology, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Department of Biochemistry, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(3) Department of Biotechnology, Hue University of Sciences, Hue University

(4) Department of Veterinary Medicine, University of Sassari, Italy

Objectives: To express recombinant EDIII protein of all 4 serotypes of Dengue virus in *Escherichia coli*. **Subjects and methods:** After cloning gene EDIII of each type of DENV-1, 2, 3, 4 into plasmid pGEX-2T, the recombinant pGEX-2T-EDIII plasmids were transformed into *Escherichia coli* BL21 strain to express the recombinant EDIII protein in different conditions of temperature and IPTG concentration. Western blot technique was used to confirmed the correct expression of EDIII protein of DEN-2 as well as its antigenic property. **Results:** SDS-PAGE analysis showed that the recombinant EDIII proteins of all 4 serotypes of DENV were successfully cloned and expressed in *Escherichia coli*. Different conditions of expression have been examined but incapably produce recombinant EDIII protein in soluble form for properly folding. Western blotting analysis revealed the correct expression and confirmed the antigenic property of EDIII protein of DENV-2. **Conclusions:** Recombinant EDIII proteins of 4 serotypes of Dengue virus were successfully cloned and expressed in *Escherichia coli*. Purification of recombinant EDIII protein by denaturation and followed by renaturation strategies could have potential results in further studies

Keyword: Dengue virus, EDIII protein

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trên thế giới, sốt xuất huyết là một trong những căn bệnh lây truyền qua đường muỗi đốt quan trọng nhất hiện nay. Ước tính khoảng 2.5 tỷ người thuộc hơn 100 quốc gia đang sống trong vùng dịch tễ sốt xuất huyết[1]. Theo Cục Y tế dự phòng, trong 7 tháng đầu năm 2017 đã ghi nhận 80555 trường hợp

nhễm sốt xuất huyết, trong đó 69085 ca nhập viện và 02 ca tử vong.

Virus Dengue (DENV) được truyền sang người chủ yếu qua muỗi *Aedes aegypti*. Cả bốn típ huyết thanh khác nhau của DENV, được đặt tên là DENV -1, 2, 3, 4, thuộc họ *Flaviviridae*, đều có khả năng gây bệnh. Việc chẩn đoán sớm có vai trò quan trọng

trong điều trị, dự đoán nguy cơ bùng phát dịch cũng như kiểm soát vector truyền bệnh một cách hiệu quả[2]. Bên cạnh đó, việc phát triển vắc-xin phòng bệnh sốt xuất huyết là vô cùng cấp thiết.

Vỏ của DENV bao gồm hai loại protein: protein E và protein M, trong đó protein E là một glycoprotein có 3 miền (I, II và III) với miền III chịu trách nhiệm cho sự gắn của virus lên tế bào đích. Protein vỏ miền III (EDIII) mang nhiều epitope phụ thuộc cấu trúc đặc hiệu cho từng típ huyết thanh[3]. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng protein EDIII có thể được sử dụng không chỉ như một kháng nguyên trong các chẩn đoán huyết thanh học mà còn là một ứng cử viên sáng giá cho các nghiên cứu phát triển vắc-xin dự phòng nhiễm DENV. Hiện nay, hầu hết các nghiên cứu sản xuất vắc-xin Dengue tái tổ hợp đều tập trung vào ứng dụng của protein EDIII[4].

Nhiều nghiên cứu đã biểu hiện được protein EDIII trên *Escherichia coli* (*E.coli*) cho các mục đích khác nhau như thử nghiệm vắc-xin hay sản xuất kháng thể đơn dòng[5]. *E.coli* là một trong những vật chủ được sử dụng phổ biến nhất để sản xuất protein tái tổ hợp. Những nghiên cứu trước đây cho thấy protein EDIII biểu hiện trên *E.coli* có xu hướng hình thành thể không hòa tan trong tế bào chất của nó, nghĩa là protein không gấp cuộn đúng. Sau khi tạo dòng vào vector biểu hiện pGEX-2T, protein EDIII hợp nhất với protein Glutathione-S-Transferase (GST) khi biểu hiện. Điều này có thể làm tăng khả năng hòa tan của protein EDIII tái tổ hợp, qua đó làm tăng hoạt tính sinh học của nó.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo dòng và biểu hiện protein EDIII tái tổ hợp của virus Dengue típ 1, 2, 3, 4 trên *E.coli* trong các điều kiện biểu hiện khác nhau và xác nhận tính kháng nguyên của protein EDIII tái tổ hợp.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Plasmid tái tổ hợp pGEX-2T mang gene EDIII của mỗi típ huyết thanh của DENV, được cung cấp từ nghiên cứu "Tạo dòng gene mã hóa cho protein EDIII của DENV típ 1, 2, 3, 4 vào plasmid biểu hiện pGEX-2T".

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Biến nạp plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp vào tế bào biểu hiện *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3) RIPL

Chủng *E.coli* BL21 CodonPlus (DE3) RIPL được nuôi cấy trên môi trường gel LB (Luria Bertani) chứa Chloramphenicol (CAF) nồng độ 35µg/ml. Quá trình biến nạp thực hiện theo protocol của TransformAid Bacterial Transformation Kit (K2710, ThermoScientific™. Ban đầu, tạo tế bào *E.coli* BL21

khả nạp bằng cách: lấy khuẩn lạc tế bào *E.coli* BL21 mới nuôi cấy cho vào ống nghiệm chứa 1,5ml dung dịch C-medium, nuôi cấy lắc ở 37°C trong 2 giờ, sau đó li tâm 1 phút để thu tế bào. Tế bào được tái huyền phù với 300µl dung dịch T-solution, ủ trong đá 5 phút. Tiếp tục li tâm 1 phút, loại bỏ dịch nổi, tái huyền phù tế bào trong 120µl dung dịch T-solution, ủ trong đá 5 phút. Lúc này tế bào *E.coli* BL21 ở trạng thái khả nạp. Lấy 50µl dung dịch tế bào khả nạp cho vào 5µl dung dịch chứa plasmid (khoảng 50ng vector pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp), trộn đều và ủ 5 phút trong đá. Sau đó cấy trải ngay lên đĩa LB chứa 2 loại kháng sinh là Chloramphenicol (CAF) nồng độ 35µg/ml và Ampicillin (AM) nồng độ 100µg/ml, ủ qua đêm ở 37°C.

2.2.2. Biểu hiện protein EDIII tái tổ hợp trên *Escherichia coli* trong các điều kiện nhiệt độ và nồng độ IPTG khác nhau.

Lấy 1 khuẩn lạc vi khuẩn *E.coli* BL21 tái tổ hợp cấy vào 3ml môi trường LB lỏng chứa CAF nồng độ 35µg/ml và AM nồng độ 100µg/ml, nuôi cấy lắc qua đêm ở 37°C, 220 vòng/phút. Ngày tiếp theo, cho 1ml dung dịch vừa nuôi cấy vào 10ml môi trường LB lỏng chứa CAF và AM, nuôi cấy lắc trong 3h ở 37°C, 220 vòng/phút. Sau đó tách ra 1ml dung dịch này trước khi dịch nuôi cấy được cảm ứng bằng IPTG. Có thể xem đây là mẫu chứng âm.

Mẫu này được li tâm để loại bỏ phần dịch nổi, phần tế bào được lưu giữ ở -20°C. Đây là mẫu Tzero (T0). Sau đó, cho IPTG vào dung dịch nuôi cấy đạt nồng độ 0,1mM và tiếp tục quá trình nuôi cấy lắc tế bào. Sau mỗi 1 giờ, tách ra 1ml dịch nuôi cấy, li tâm thu tế bào và lưu giữ ở -20°C, lần lượt cho đến 7 giờ. Các mẫu thu nhận sau khi cảm ứng bằng IPTG là T1, T2, ..., T7. Thực hiện tương tự đối với các điều kiện nhiệt độ và IPTG khác bao gồm:

Điện di trên gel polyacrylamide với Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE) được thực hiện bằng cách: mỗi mẫu được xử lý bởi 100µl dung dịch đệm Laemmli 1X, làm nóng đến 95°C trong 5 phút, sau đó li tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi được sử dụng làm mẫu chạy trên gel Polyacrylamide 10% ở điện thế 80V trong 15 phút, 200V trong 30 phút. Sau đó, gel được nhuộm bởi dung dịch Coomassie Brilliant Blue và phân tích kết quả.

2.2.3. Thực hiện kỹ thuật Western blot.

Các mẫu được điện di trên gel Polyacrylamide 10%. Sau đó gel được chuyển lên một màng Nitrocellulose (Hybond-C Extra, Amersham, GE) với dòng điện 250mA trong 1 giờ. Màng này tiếp tục được khóa bởi dung dịch PBS-T (0,05% Tween-20, 20mM Tris-HCl và 150mM NaCl) chứa 5% skim milk.

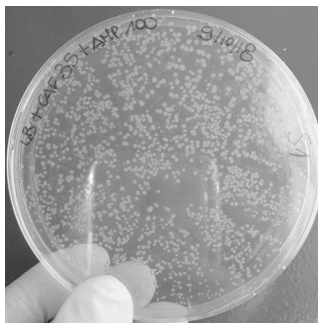
Một hỗn hợp huyết thanh được tạo thành gồm 50 mẫu huyết thanh của bệnh nhân đã xác định nhiễm DENV bằng xét nghiệm ELISA trước đó. Hỗn hợp huyết thanh và kháng thể kháng IgG từ Dê – HRP (Southern Biotech, Alabams, USA) sau khi hòa

loãng với với dung dịch PBS-T chứa 2,5% skim milk lần lượt được cho vào với vai trò là kháng thể thứ nhất và kháng thể thứ hai. Cuối cùng, dung dịch Pierce CN/DAB (Thermo Scientific) được sử dụng để đọc kết quả.

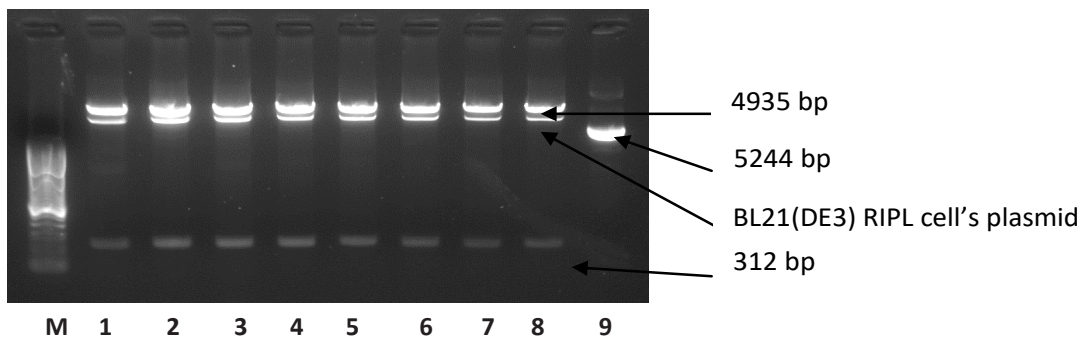
3. KẾT QUẢ

3.1. Biểu hiện protein EDIII tái tổ hợp

3.1.1. Biến nạp plasmid tái tổ hợp pGEX-2T-EDIII vào tế bào BL21 (DE3) RIPL



Hình 1. Khuẩn lạc *E.coli* BL21 (DE3) RIPL tái tổ hợp mang gene EDIII của DENVтип I trên đĩa LB chứa AM và CAF. Plasmid tái tổ hợp pGEX-2T-EDIII của mỗiтип huyết thanh của DENV đã được biến nạp thành công vào tế bào *E.coli* BL21(DE3) RIPL. Khuẩn lạc mọc trên môi trường thạch LB chứa 2 loại kháng sinh CAF và AM chứng tỏ rằng vi khuẩn đã nhận được plasmid tái tổ hợp (Hình 3.1). Không có khuẩn lạc mọc trên đĩa chứng âm.



Hình 2. Plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp tách từ tế bào *E.coli* BL21 (DE3) RIPL được cắt bởi 2 enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI.

M: 100bp DNA ladder (Invitrogen™).

Cột 1, 2: plasmid pGEX-2T-EDIII gene -тип 1 được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 3, 4: plasmid pGEX-2T-EDIII gene -тип 2 được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 5, 6: plasmid pGEX-2T-EDIII gene -тип 3 được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 7, 8: plasmid pGEX-2T-EDIII gene -тип 4 được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 9: plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp.

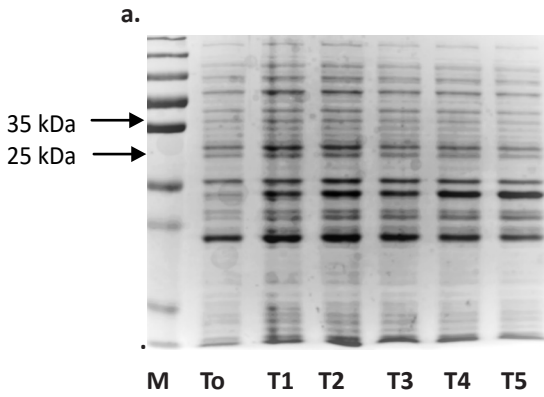
Plasmid tách từ các tế bào này được cắt bằng 2 enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI để xác nhận sự có mặt của plasmid tái tổ hợp trong tế bào. Kết quả điện di cho thấy xuất hiện sản phẩm với kích thước khoảng 312bp từ plasmid đã cắt. Các plasmid đã cắt có dạng chuỗi nên di chuyển chậm hơn so với plasmid không cắt (dạng vòng) trên gel agarose. Sản phẩm cắt ra có kích thước tương đồng với kích thước của gene EDIII chứng minh rằng tế bào BL21 đã mang vector biểu hiện chính xác. Ngoài ra, tế bào BL21 còn chứa plasmid riêng của nó (Hình 3.2).

3.1.2. Biểu hiện protein EDIII tái tổ hợp của DENVтип 2

Gene EDIII có kích thước 312bp và mã hóa cho protein EDIII khoảng 104 acid amin, có kích thước dự đoán

khoảng 18 kDa. Trong tế bào biểu hiện BL21, protein EDIII hợp nhất với protein GST, đã được mã hóa trong vector pGEX-2T, có kích thước khoảng 26 kDa. Protein GST-EDIII hợp nhất có kích thước khoảng 34 kDa. Trong kết quả phân tích SDS-PAGE, có một dải protein với kích thước khoảng 34 kDa, tương đương với kích thước của protein GST- EDIII hợp nhất, xuất hiện với lượng tăng dần sau khi cảm ứng bằng IPTG (Hình 3.3). Điều đó chứng tỏ rằng protein GST-EDIII đã được biểu hiện trong tế bào *E.coli* BL21 (DE3) RIPL.

Trong điều kiện biểu hiện này - nhiệt độ 30°C, nồng độ IPTG 0.1mM, dải protein GST-EDIII xuất hiện khá yếu kể cả sau 5 giờ cảm ứng với IPTG. Vì vậy, những điều kiện biểu hiện khác được đánh giá để có điều kiện biểu hiện tối ưu.



Hình 3. Kết quả phân tích SDS-PAGE protein tách từ tế bào BL21 tái tổ hợp biểu hiện protein EDIII – tập 2

a. Điều kiện: Nhiệt độ: 30°C-[IPTG]: 0.1mM
M: PageRuler™ Prestained Ladder plus (10-250 kDa) (Thermo Fisher Scientific Inc.)

T₀: trước khi cảm ứng bằng IPTG.

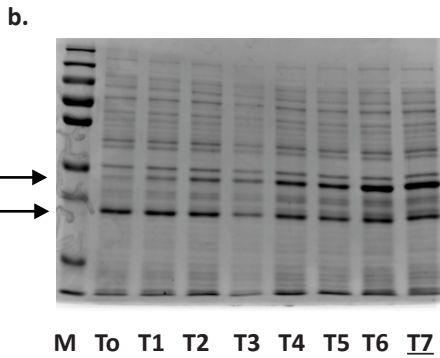
T1: 1 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG

T2: 2 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG

T3: 3 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG

T4: 4 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG

T5: 5 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG

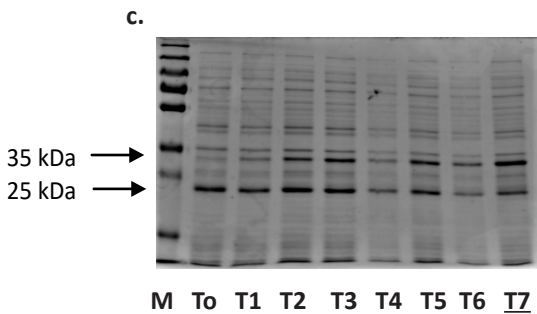


b. Điều kiện: Nhiệt độ: 37°C [IPTG]: 0.1mM

M: Protein Marker

T₀: trước khi cảm ứng bằng IPTG.

T1-T7: 1-7 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG.

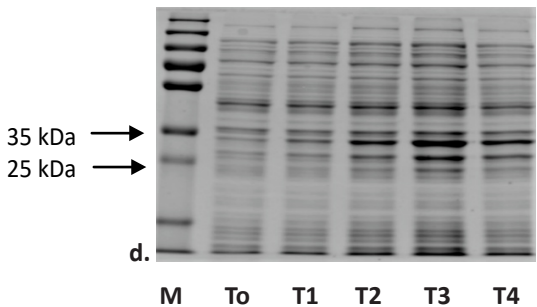


c. Điều kiện: Nhiệt độ: 37°C [IPTG]: 1mM

M: Protein Marker

T₀: trước khi cảm ứng bằng IPTG.

T1-T7: 1-7 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG.



d. Điều kiện: Nhiệt độ: 20°C – [IPTG]: 0.8mM

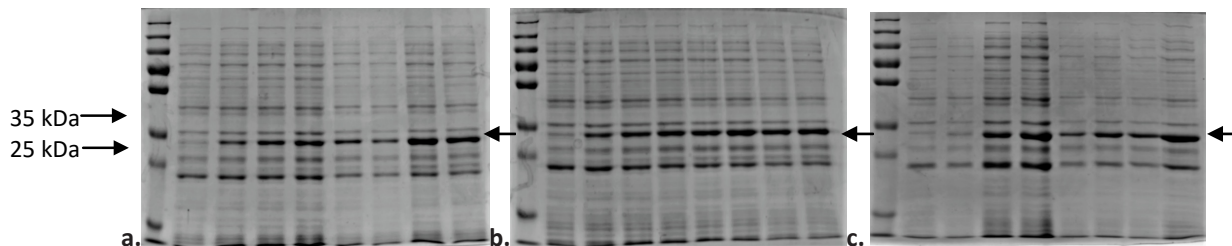
M: Protein Marker

T₀: trước khi cảm ứng bằng IPTG.

T1-T7: 1-7 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG.

Sau khi đánh giá ở nhiều điều kiện biểu hiện khác nhau, chúng tôi thấy rằng tại điều kiện nhiệt độ 37°C và nồng độ IPTG 0.1mM, lượng protein GST-EDIII tip 2 tái tổ hợp được sản xuất với lượng lớn nhất sau 7 giờ cảm ứng. Chúng tôi chọn điều kiện này để biểu hiện protein tái tổ hợp với các tip còn lại.

3.1.3. Biểu hiện protein EDIII tái tổ hợp của DENV tip 1, 3 và 4.



Hình 4. Phân tích SDS-PAGE protein tách từ tế bào BL21 tái tổ hợp biểu hiện protein EDIII – tip 1 (hình a), tip 3 (hình b), tip 4 (hình c).

Điều kiện: Nhiệt độ: 37°C – [IPTG]: 0.1mM

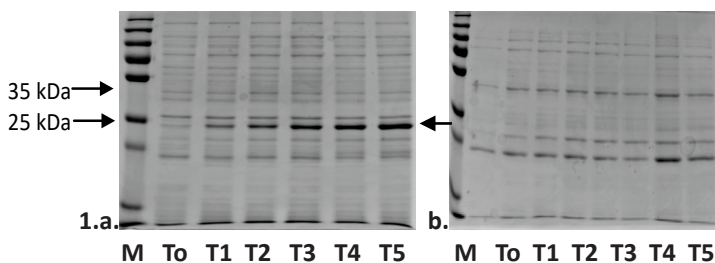
M: Protein Marker; *T₀*: trước khi cảm ứng bằng IPTG; *T1-T7:* 1-7 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG.

Protein EDIII tái tổ hợp được tổng hợp nhiều nhất sau 6 giờ cảm ứng IPTG đối với tip 1, sau 5 giờ cảm ứng IPTG đối với tip 3 và sau 7 giờ cảm ứng IPTG đối với tip 4.

3.2. Kiểm tra tính hòa tan của protein EDIII tái tổ hợp

Để đánh giá sự gập cuộn đúng của protein tái tổ hợp cũng như đưa ra phương pháp tinh sạch phù hợp, chúng tôi ly giải tế bào bằng phương pháp đóng băng/tan băng để khảo sát sự phân bố của protein EDIII tái tổ hợp dạng hòa tan và dạng không hòa tan trong tế bào biểu hiện. Để thực hiện, các mẫu đã thu thập sau mỗi 1 giờ cảm ứng sẽ được ly giải bằng cách làm lạnh nhanh mẫu với dung dịch ni-tơ lỏng rồi ủ 10 phút trong nước ấm (37°C), thực hiện 3 lần. Sau khi ly tâm, mẫu dịch nổi (supernatant) và cặn lắng (pellet) được tách riêng để phân tích SDS-PAGE.

3.2.1. Kiểm tra tính hòa tan của protein EDIII tái tổ hợp tip 2

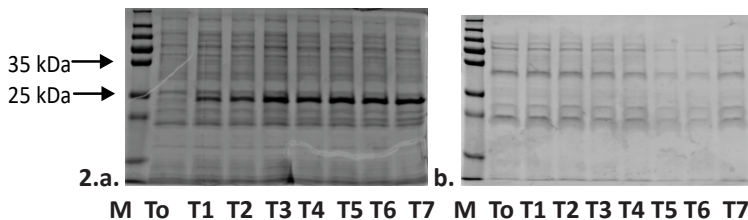


Hình 5. Kết quả SDS-PAGE kiểm tra tính hòa tan của protein EDIII tip 2 tái tổ hợp 1. Điều kiện: Nhiệt độ: 30°C–[IPTG]: 0.1Mm (a. Pellet - b. Supernatant).

M: Protein Marker, *T₀*: trước khi cảm ứng IPTG, *T1 – T5:* 1-5 giờ sau cảm ứng IPTG.

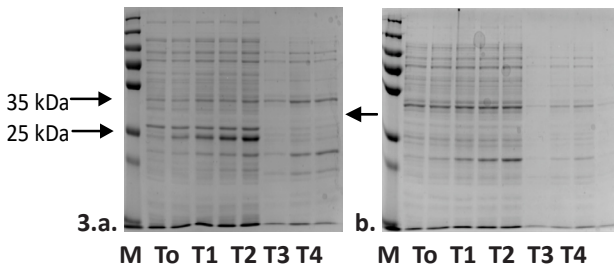
Kết quả phân tích SDS-PAGE cho thấy protein EDIII tái tổ hợp của DENV-2 chỉ có mặt trong phần pellet mà không có trong phần dịch nổi sau khi ly giải tế bào biểu hiện. Kết quả này chỉ ra rằng protein GST-EDIII đã hình thành ở dạng không hòa tan, cũng có nghĩa là protein EDIII đã gập cuộn không chính xác.

Tất cả các mẫu còn lại được thu thập sau các điều kiện biểu hiện khác nhau của tip 2, cũng như của các tip 1, 3 và 4 đều cho kết quả tương tự, rằng protein EDIII tái tổ hợp chỉ xuất hiện trong phần pellet của tế bào tái tổ hợp sau ly giải, thể hiện trong các hình ảnh dưới đây.



2. Điều kiện: Nhiệt độ: 37°C–[IPTG]: 0.1mM (a. Pellet - b. Supernatant).

M: Protein Marker, *T₀*: trước khi cảm ứng IPTG, *T1 – T7:* 1-7 giờ sau cảm ứng IPTG.



3. Điều kiện: Nhiệt độ: 20°C-[IPTG]: 0.8mM

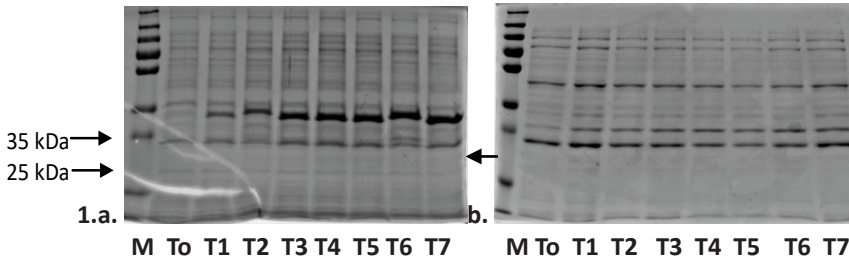
(a. Pellet - b. Supernatant).

M: Protein Marker, T₀: trước khi cảm ứng IPTG, T1 – T4: 1-4 giờ sau cảm ứng IPTG.

Như vậy, sự biểu hiện EDIII tái tổ hợp tip 2 ở những điều kiện trên đều không tạo được protein EDIII dạng hòa tan.

3.2.2. Kiểm tra tính hòa tan của protein EDIII tái tổ hợp tip 1, 3, 4.

Các protein EDIII tái tổ hợp tip 1, 3 và 4 đều được biểu hiện ở điều kiện: nhiệt độ 37°C, nồng độ IPTG 0.1mM.

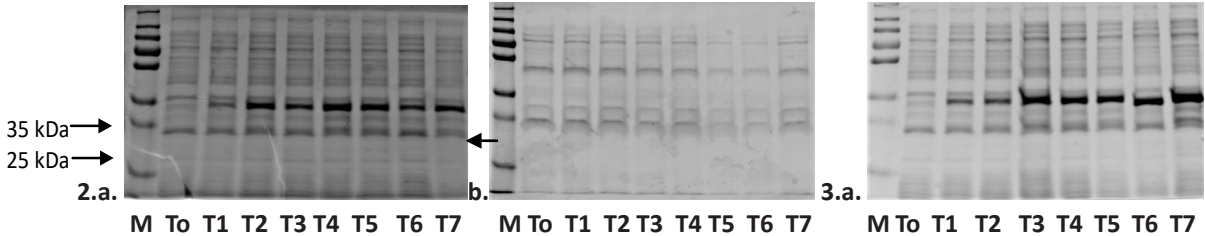


Hình 6. Kết quả SDS-PAGE

kiểm tra tính hòa tan của protein EDIII tip 1 (hình 1), tip 3 (hình 2), tip 4 (hình 3).

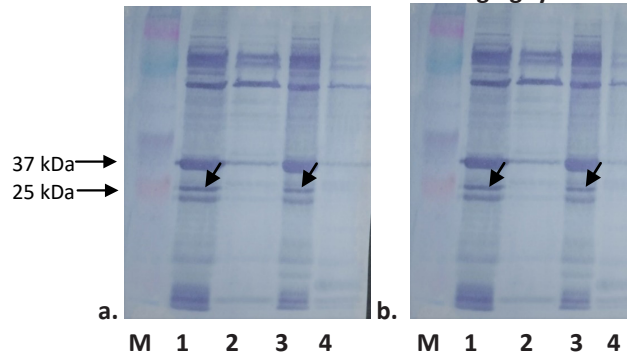
(a. Pellet - b. Supernatant).

M: Protein Marker, T₀: trước khi cảm ứng IPTG, T1 – T7: 1-7 giờ sau cảm ứng IPTG.



Mỗi kết quả phân tích SDS-PAGE trên đều cho thấy có một dải protein rất mờ có cùng kích thước với protein GST-EDIII tái tổ hợp nhưng xuất hiện ở mẫu T₀ (trước khi cảm ứng bằng IPTG). Protein này xuất hiện cả trong mẫu pellet và supernatant của tế bào sau ly giải, với nồng độ gần như nhau, cho thấy rằng đây có lẽ là protein của bản thân vi khuẩn *E.coli* BL21.

3.3. Western blot kiểm tra tính kháng nguyên của protein EDIII tái tổ hợp tip 2



Hình 7. Western blotting analysis of

recombinant EDIII protein of DENV-2

M: Protein Marker

Cột 1, 2 : pellet và supernatant của tế bào BL21 tái tổ hợp biểu hiện protein EDIII trong điều kiện nhiệt độ 20°C, [IPTG] 0.8mM.

Cột 3, 4: pellet và supernatant của tế bào BL21 tái tổ hợp biểu hiện protein EDIII trong điều kiện nhiệt độ 37°C, [IPTG] 0.1mM.

a. Mẫu huyết thanh làm 1st Ab hòa loãng 1/100.

b. Mẫu huyết thanh làm 1st Ab hòa loãng 1/500.

Dung dịch CN/DAB chứa chromogenic peroxidase tạo ra băng màu đen tại vị trí có mặt kháng thể của dê - HRP, kháng thể được sử dụng là “kháng thể thứ 2”. Dải băng đậm màu đen xuất hiện ở cột 1 và 3 (pellet) với kích thước khoảng 34kb chứng minh cho sự hiện diện của “kháng thể thứ nhất” từ huyết thanh của bệnh nhân sau khi chúng gắn

vào protein EDIII. Kết quả dương tính này cho thấy protein đã được dịch mã chính xác theo khung, biểu hiện đúng protein EDIII tái tổ hợp. Bên cạnh đó, một loại epitope dạng chuỗi của protein này đã gắn vào kháng thể đặc hiệu có trong huyết thanh của bệnh nhân nhiễm DENV.

Ngoài ra, trên kết quả phân tích còn có nhiều dải

bằng màu đen khác ở cả phần pellet và supernatant của tế bào ly giải. Chúng là các loại protein của tế bào biểu hiện *E. coli* BL21. Phản ứng xảy ra có thể giải thích là do sự tiếp xúc tự nhiên giữa người với *E. coli*, một loại vi khuẩn rất phổ biến, đã kích thích cơ thể tạo ra đáp ứng miễn dịch và dẫn đến sự có mặt của các kháng thể kháng *E. coli* trong huyết thanh.

4. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công protein EDIII của cả bốn týp huyết thanh DENV trên *Escherichia coli*. Mặc dù được kiểm tra trong các điều kiện biểu hiện khác nhau, protein EDIII do tế bào *E. coli* biểu hiện có xu hướng hình thành thể vùi không hòa tan trong tế bào chất, cho thấy nó đã gấp cuộn không chính xác và không đạt được cấu trúc tự nhiên của nó. Kết quả Western blot cho thấy kháng thể từ các mẫu huyết thanh của bệnh nhân nhiễm DENV đã phát hiện được protein EDIII tái tổ hợp của DENV-2. Điều này chứng minh rằng protein EDIII tái tổ hợp của DENV-2 được biểu hiện chính xác và một epitope dạng chuỗi của nó đã liên kết với các kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh của bệnh nhân nhiễm DENV, xác nhận tính kháng nguyên của nó.

Escherichia coli cho đến nay vẫn là vật chủ biểu hiện phổ biến nhất đối với các nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện protein. Tuy nhiên, hệ thống biểu hiện *E. coli* thiếu quá trình chỉnh sửa hậu dịch mã. Trong khi đó, protein EDIII cần hình thành một liên kết di-sulfide quan trọng giữa hai axit amin Cystein 302 và Cystein 333, đóng vai trò thiết yếu đối với cấu trúc kháng nguyên của nó [4]. Theo nghiên cứu của Tripathi và cộng sự, protein EDIII tái tổ hợp có xu hướng hình thành các thể vùi không hòa tan trong tế bào chất của *E. coli* [6]. Trong nghiên cứu của mình, họ đã biểu hiện protein EDIII của DENV-4 gắn đuôi 6x-His-tag bằng cách sử dụng vectơ biểu hiện pET30a+ biến nạp vào chủng *E. coli* BLR (DE3) [7]. Kết quả protein EDIII đã được biểu hiện quá mức ở dạng thể vùi không hòa tan. Do đó, các tác giả đã sử dụng chiến lược biến tính protein để tinh sạch rồi sau đó hồi tính để thu được sản phẩm protein EDIII tái tổ hợp. Trước đó, nghiên cứu của Jaiswal và cộng sự năm 2004 đã sử dụng chủng *E. coli* BL21 (DE3) và vector biểu hiện pET28a cho kết quả tương tự [8]. Sau đó, Fahimi và cộng sự đã đề xuất thay đổi chủng *E. coli* biểu hiện thành chủng *E. coli Origami* và hạ thấp nhiệt độ biểu hiện. Kết quả đã sản xuất được protein EDIII dạng hòa tan [9]. Điều này được cho là nhờ đột biến kép của hai gene mã hóa thioredoxin reductase (trxB) và glutathione reductase (gor) trong bộ gene của chủng *E. coli Origami*, cho phép hình

thành liên kết di-sulfide trong tế bào chất của *E. coli*.

Chúng tôi đã sử dụng protein Glutathione-S-Tranferase (GST) để liên kết với protein EDIII tái tổ hợp để tăng khả năng tạo protein tái tổ hợp hòa tan. Do protein EDIII có kích thước nhỏ (khoảng 104 axit amin), nên khi kết hợp với protein GST (229 axit amin), protein mới sẽ đạt được kích thước vừa phải, làm chậm tốc độ dịch mã trong *E. coli*, qua đó hỗ trợ cho việc gấp cuộn protein đúng cách [10]. Mặc dù vậy, việc biểu hiện thành công protein hòa tan phụ thuộc rất nhiều vào bản chất của protein EDIII. Chúng tôi đã biểu hiện protein ở các điều kiện khác nhau: thử với nồng độ IPTG thấp hơn (1mM, 0,8mM và 0,1mM) và nhiệt độ thấp hơn (37°C, 30°C và 20°C) nhưng protein EDIII trong nghiên cứu của chúng tôi đều có xu hướng hình thành thể vùi không hòa tan. Vectơ biểu hiện pGEX-2T và chủng RIPL BL21 (DE3) được sử dụng để biểu hiện có thể không phù hợp trong việc tạo ra protein EDIII tái tổ hợp dạng hòa tan.

Tuy nhiên, hiện nay hệ thống biểu hiện hợp nhất với protein GST được cho là là hiệu quả nhất để sản xuất protein hòa tan. Trong nghiên cứu của chúng tôi, protein hợp nhất GST-EDIII có thể đã được biểu hiện ở dạng hòa tan nhưng ở mức rất thấp. Phương pháp ly giải đóng băng/tan băng mà chúng tôi đã sử dụng trong việc kiểm tra tính hòa tan của protein EDIII tái tổ hợp có thể đã không trích xuất được tất cả các protein trong tế bào chất của *E. coli*. Các phương pháp khác như ly giải tế bào bằng sóng siêu âm hoặc bằng lysozyme nên được thực hiện thay thế để xác nhận rõ ràng hơn sự hiện diện hoặc vắng mặt của protein hợp nhất GST-EDIII dạng hòa tan trong tế bào chất. Trong nghiên cứu này, protein tái tổ hợp được phát hiện trong phân tích SDS-PAGE dựa trên kích thước và sự dày lên của dải protein theo thời gian sau khi cảm ứng bởi IPTG. Kết quả dương tính của xét nghiệm Western blot với huyết thanh bệnh nhân nhiễm DENV đã góp phần xác nhận protein EDIII tái tổ hợp được biểu hiện chính xác. Tuy nhiên, nếu thực hiện kỹ thuật Western blot với kháng thể kháng GST (anti-GST) làm kháng thể thứ hai thì sẽ cung cấp bằng chứng vững chắc hơn cho sự chính xác trong việc biểu hiện protein hợp nhất GST-EDIII. Bằng cách phát hiện sự hiện diện của GST sẽ chứng minh được rằng gene trong vector biểu hiện đã được phiên mã và dịch mã đúng khung, dẫn đến biểu hiện chính xác protein.

Việc protein được gấp cuộn chính xác là cần thiết để đạt được cấu trúc tự nhiên của nó. Tuy nhiên, nếu phục vụ cho mục đích chẩn đoán, điều này có thể không cần thiết - theo Tripathi và cộng sự [7]. Trong nghiên cứu của họ vào năm 2008, protein

EDIII tái tổ hợp của DENV-4, sản xuất bởi hệ thống biểu hiện *E.coli*, đã được sử dụng làm kháng nguyên để tạo kit chẩn đoán ELISA inhouse dipstick. Kết quả thử nghiệm với 72 mẫu huyết thanh bệnh nhân cho thấy kết quả tương đồng đến 90% so với các xét nghiệm trước đó. Protein EDIII tái tổ hợp trong nghiên cứu này đã được biểu hiện ở dạng không hòa tan, sau đó được biến tính để tinh chế rồi hồi tính để đạt cấu trúc tự nhiên. Nghiên cứu của Jaiswal và cộng sự chứng minh rằng EDIII tái tổ hợp biểu hiện bởi *E.coli* vẫn đạt được hoạt tính sinh học nếu quá trình biến tính, tinh sạch và hồi tính được tối ưu hóa [8]. Những kết quả này gợi ý rằng protein EDIII tái tổ hợp sau khi hồi tính có thể được sử dụng trong chẩn đoán sốt xuất huyết với độ nhạy và độ đặc hiệu cao.

Một vấn đề quan trọng khác trong sản xuất protein EDIII là sản lượng. *E.coli* hiện nay vẫn là hệ thống biểu hiện hiệu quả nhất. Do protein EDIII thường hình thành thể vùi trong tế bào chất của *E.coli*, một số nghiên cứu đã liên kết protein EDIII với các protein khác như Maltose (MBP) [11], Glutathione-S-Transferase (GST) [10] hoặc thioredoxin ... Thay đổi vật chủ biểu hiện cũng là một chiến lược khác trong nỗ lực để sản xuất được protein hòa tan [9]. Tuy nhiên, sản lượng EDIII tái tổ hợp hòa tan trong các nghiên cứu này chỉ đạt mức từ thấp đến trung bình. Theo Jaiswal và cộng sự [8], việc sản xuất protein EDIII tái tổ hợp mang hoạt tính sinh học sẽ đạt năng suất cao nếu thu nhận protein

dạng không hòa tan trong tế bào chất của *E.coli*, sau đó áp dụng các phương pháp biến tính, tinh sạch và hồi tính thích hợp. Protein EDIII tái tổ hợp của chúng tôi có thể là một ứng viên cho xét nghiệm huyết thanh học chẩn đoán sốt xuất huyết sau một quá trình biến tính, tinh sạch và hồi tính thích hợp.

4. KẾT LUẬN

Protein EDIII của DENV đóng vai trò rất quan trọng trong các nghiên cứu phát triển vắc-xin và kit chẩn đoán huyết thanh học bệnh sốt xuất huyết vì những protein này mang nhiều epitope có khả năng gây đáp ứng miễn dịch. Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công protein EDIII tái tổ hợp của cả bốn típ huyết thanh của virus sốt xuất huyết. Phân tích Western blot cho thấy protein EDIII tái tổ hợp của DENV-2 đã được phát hiện bằng kháng thể từ huyết thanh của bệnh nhân bị nhiễm DENV, chứng minh rằng protein này đã được biểu hiện chính xác và xác nhận tính kháng nguyên của protein EDIII. Protein EDIII tái tổ hợp có xu hướng hình thành thể vùi không hòa tan trong tế bào chất của *E.coli*.

Protein EDIII tái tổ hợp dạng thể vùi không hòa tan có thể thu nhận được bằng quy trình biến tính, tinh chế rồi hồi tính thích hợp. Thử nghiệm ELISA sử dụng kháng nguyên là protein EDIII tái tổ hợp sau hồi tính với huyết thanh bệnh nhân cần được thực hiện trong các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. S. Hasan, S. Jamdar, M. Alalowi, and S. Al Ageel Al Beajji, "Dengue virus: A global human threat: Review of literature," *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, vol. 6, no. 1, p. 1, 2016.
2. S. Kalayanarooj, "Clinical Manifestations and Management of Dengue/DHF/DSS," *Trop. Med. Health*, vol. 39, no. 4SUPPLEMENT, pp. S83–S87, 2011.
3. P. Thullier *et al.*, "Mapping of a dengue virus neutralizing epitope critical for the infectivity of all serotypes: Insight into the neutralization mechanism," *J. Gen. Virol.*, vol. 82, no. 8, pp. 1885–1892, 2001.
4. M. Combe, X. Lacoux, J. Martinez, O. Méjan, F. Luciani, and S. Daniel, "Expression, refolding and bio-structural analysis of a tetravalent recombinant dengue envelope domain III protein for serological diagnosis," *Protein Expr. Purif.*, vol. 133, pp. 57–65, 2017.
5. N. L. Nguyen *et al.*, "Expression and purification of an immunogenic dengue virus epitope using a synthetic consensus sequence of envelope domain III and *Saccharomyces cerevisiae*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 88, no. 2, pp. 235–242, 2013.
6. N. K. Tripathi, "Recombinant dengue virus type 3 envelope domain III protein from *Escherichia coli*," *Biotechnol. J.*, vol. 6, no. 5, Sp. Iss. SI, pp. 604–608, 2011.
7. N. K. Tripathi, J. P. Babu, A. Shrivastva, M. Parida, A. M. Jana, and P. V. L. Rao, "Production and characterization of recombinant dengue virus type 4 envelope domain III protein," *J. Biotechnol.*, vol. 134, no. 3–4, pp. 278–286, 2008.
8. S. Jaiswal, N. Khanna, and S. Swaminathan, "High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 33, no. 1, pp. 80–91, 2004.
9. H. Fahimi, H. Allahyari, Z. M. Hassan, and M.

Sadeghizadeh, "Dengue virus type-3 envelope protein domain iii; expression and immunogenicity," *Iran. J. Basic Med. Sci.*, vol. 17, no. 11, pp. 836–843, 2014.

10. G. H. Ji *et al.*, "Characterization of a novel dengue serotype 4 virus-specific neutralizing epitope on the envelope protein domain III," *PLoS One*, vol. 10, no. 10,

pp. 1–18, 2015.

11. W. M. P. B. Wahala, C. Huang, S. Butrapet, L. J. White, and A. M. De Silva, "Recombinant Dengue Type 2 Viruses with Altered E Protein Domain III Epitopes Are Efficiently Neutralized by Human Immune Sera," pp. 4019–4023, 2012.