



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.139

## TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TÁI GẤP CUỘN PRION PROTEIN (PrP<sup>C</sup>) CHUỘT DUNG HỢP VỚI GST

Trương Hà Minh Nhật, Huỳnh Kiến Quang và Trần Văn Hiếu\*

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: tvhieu@hcmus.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/04/2019

Ngày nhận bài sửa: 01/06/2019

Ngày duyệt đăng: 31/10/2019

### Title:

Cloning, expression, and refolding prion protein (PrP<sup>C</sup>) from murine fused with GST-tag

### Từ khóa:

Tế bào M, thụ thể PrP<sup>C</sup>, vaccine uống

### Keywords:

M cell, oral vaccine, PrP<sup>C</sup> receptor

### ABSTRACT

Oral vaccine is one of the most potential strategies for gastrointestinal infection due to significant advantages over parenteral vaccines. In order to overcome existing hurdles in oral vaccine, namely oral tolerance and antigen dispersion, gut-associated M cell is a target for vaccine delivery. Cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>), an M cell receptor, was experimentally proven to interact with heat shock protein Hsp60. In the previous *in silico* studies, two Hsp60-deprived peptides have been predicted to be key-players in this interaction. Therefore, providing PrP<sup>C</sup> for *in vitro* binding assay with Hsp60 is desired to confirm the binding activity of the two predicted peptides. In this study, murine PrP<sup>C</sup>-encoding gene (mPrP<sup>C</sup>) was cloned into pET-gst to generate recombinant vector namedly pET-gst-mPrP<sup>C</sup>. Next, the vector was transformed into expression host *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) for protein expression. SDS-PAGE and Western blot probed with anti-GST antibodies showed the protein expressed in inclusion bodies and hence was subsequently solubilized and refolded. After refolding, GST-mPrP<sup>C</sup> protein was harvested in soluble form with the refolding efficiency reached 88.33%.

### TÓM TẮT

Vaccine đường uống là chiến lược tiềm năng hiện nay trong việc điều trị các bệnh nhiễm khuẩn đường tiêu hóa với nhiều ưu điểm nổi bật hơn hẳn so với vaccine truyền thống dạng tiêm. Nhằm giải quyết tình trạng dung nạp miễn dịch và sự phân tán kháng nguyên ở ruột, tế bào M hiện diện trong đường ruột là mục tiêu cần nhắm trúng đích cho việc vận chuyển kháng nguyên uống hiệu quả. Thụ thể PrP<sup>C</sup> của tế bào M được chứng minh là có tương tác với heat shock protein (Hsp60). Trong nghiên cứu *in silico* trước, nhóm nghiên cứu đã dự đoán được hai pep-tit đóng vai trò chính trong tương tác của Hsp60 với thụ thể PrP<sup>C</sup>. Để khẳng định tính bám của các trình tự dự đoán, PrP<sup>C</sup> tái tổ hợp cần được tạo ra để phục vụ cho nghiên cứu tương tác. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho PrP<sup>C</sup> chuột (mPrP<sup>C</sup>) sẽ được dòng hóa vào vector pET-gst để tạo vector tái tổ hợp pET-gst-mPrP<sup>C</sup>. Tiếp đó, vector được chuyển vào chủng *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) để cảm ứng biểu hiện protein. Kết quả phân tích SDS-PAGE và Western blot với kháng thể kháng GST cho thấy protein tái tổ hợp GST-mPrP<sup>C</sup> biểu hiện ở dạng thể vùi nên được tiến hành hòa tan và tái gấp cuộn. Sau quá trình tái gấp cuộn, protein GST-mPrP<sup>C</sup> được thu nhận ở dạng tan với hiệu suất tái gấp cuộn 88,33%.

Trích dẫn: Trương Hà Minh Nhật, Huỳnh Kiến Quang và Trần Văn Hiếu, 2019. Tạo dòng, biểu hiện và tái gấp cuộn prion protein (PrP<sup>C</sup>) chuột dung hợp với GST. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(5B): 16-22.

## 1 GIỚI THIỆU

Bệnh đường ruột đang là gánh nặng lớn đối với những nước đang phát triển do vấn đề vệ sinh thực phẩm chưa được đảm bảo (UNICEF/WHO, 2009). Trong các biến chứng gây ra bởi bệnh đường ruột, tiêu chảy là dấu hiệu nhận biết điển hình cho xâm nhiễm đường ruột. Tiêu chảy do nhiễm trùng đường ruột gây ra 1,4 triệu ca tử vong vào năm 2017, là nguyên nhân phổ biến thứ hai dẫn đến tử vong ở trẻ dưới năm tuổi trên thế giới. Ở Việt Nam, bệnh liên quan đến tiêu chảy đứng thứ sáu trong các nguyên nhân gây tử vong, và mặc dù tỉ lệ tử vong và nhiễm bệnh đường ruột có xu hướng giảm dần, từ 1.055.969 ca mắc bệnh tiêu chảy vào năm 2002 xuống còn 753.714 ca năm 2011, tuy nhiên, số ca tử vong vẫn còn tồn tại ở mức cao, và nguy cơ của bệnh tiêu chảy vẫn còn đáng quan ngại (Nguyễn Thanh Thảo và *ctv.*, 2014; Fuhrimann *et al.*, 2017).

Trong các phương pháp điều trị xâm nhiễm đường ruột hiện nay, việc sử dụng kháng sinh không thường được khuyến khích sử dụng với hầu hết các ca nhiễm, vì có thể gây các hậu quả nghiêm trọng như gây ảnh hưởng đến vi sinh vật ruột, đồng thời gây hiện tượng kháng kháng sinh nếu lạm dụng (Diniz-Santos *et al.*, 2006; Zollner-Schwetz and Krause, 2015; WHO, 2018). Vì vậy, để ngăn chặn các bệnh đường ruột, phương pháp phòng ngừa sử dụng vaccine được ưu tiên trong các chiến lược ngăn ngừa các dòng vi sinh vật gây bệnh đường ruột phổ biến như ETEC, *Vibrio*, *Shigella* và Rotavirus. Trong việc phát triển các chiến lược cho vaccine đường ruột, vấn đề quan trọng là kích hoạt được hệ miễn dịch màng nhầy nhằm ngăn chặn kịp thời sự xâm nhiễm của vi sinh vật. Tuy vậy, vaccine tiêm lại chỉ kích hoạt miễn dịch hệ thống, tạo ra kháng thể IgG mà không có tác động đến việc tiết kháng thể sIgA ở màng nhầy (Azegami *et al.*, 2014; Czerkinsky and Holmgren, 2015). Do vậy, hầu hết các chiến lược phát triển vaccine hiện nay phòng vi sinh vật đường ruột là vaccine niêm mạc.

Vaccine niêm mạc (uống, qua mũi) có thể kích hoạt cả miễn dịch thể dịch lẫn miễn dịch màng nhầy (Lycke, 2012), đồng thời có ưu điểm là dễ hấp thu. Tuy nhiên, nhìn chung vaccine uống vẫn còn nhiều vấn đề phải được giải quyết như khả năng vượt qua môi trường pH acid và chứa nhiều protease của đường ruột (Turner, 2009). Ngoài ra, bề mặt niêm mạc ruột với diện tích tiếp xúc rộng hơn 300 m<sup>2</sup> khiến thuốc dễ bị phân tán, đồng thời đặc điểm dung nạp miễn dịch nơi đường ruột khiến vaccine chỉ gây được đáp ứng yếu hoặc hoàn toàn không đáp ứng ở đây (Pabst and Mowat, 2012). Một vấn đề khác cũng cần được cân nhắc là dạng vaccine sử dụng. Mặc dù hầu hết vaccine niêm mạc được cấp phép hiện nay ở

dạng bất hoạt/nhuộc độc hoặc dạng chết, vì có thể kích thích cả tín hiệu thứ cấp mà không cần tá dược, nhưng nhóm vaccine này có thể gây nguy hiểm cho người dùng nếu việc bất hoạt hoặc gây chết không hiệu quả.

Vì những lý do trên, một số thể hệ vaccine mới đã và đang được phát triển. Vaccine uống dạng protein tái tổ hợp, mặc dù vẫn chưa được thương mại hóa, nhưng lại mang nhiều ưu điểm như an toàn, có thể sản xuất quy mô lớn với chi phí vừa phải nhờ vào công nghệ protein tái tổ hợp. Để vaccine có thể vượt qua môi trường ruột và tới đúng vị trí hạch lympho để phóng thích, nhiều hệ thống vận chuyển vaccine uống được đề xuất, đặc biệt là cho vaccine uống dạng tiểu phần hay protein như hệ thống vận chuyển dạng lipid (liposome, emulsion hay ISCOM), dạng polymer (polymeric NP, inorganic NP) và dạng vector như virus-like particle (Jasani *et al.*, 2009; Marasini *et al.*, 2014). Ngoài ra, các nghiên cứu đã phát hiện ra tế bào Microfold (tế bào M), với tỉ lệ phân bố là 5-10% trên lớp biểu mô bao phủ đám Peyer-hạch lympho của ruột (Follicle-associated epithelium-FAE), đóng vai trò là “cổng” thu nhận kháng nguyên. Các kháng nguyên này sau đó sẽ được tế bào tua (Dendritic cell-DC) dưới lớp FAE xử lý và trình diện cho các tế bào T CD4<sup>+</sup> và CD8<sup>+</sup> thành các tế bào T hiệu ứng (effector T cell) hay tế bào T nhớ (memory T cell), từ đó hỗ trợ tế bào B biệt hóa thành tương bào tiết IgA (Berlin *et al.*, 1995; Kraehenbuhl and Neutra, 2000; Svensson *et al.*, 2002; Lorenz and Newberry, 2004). Từ cơ sở trên, vaccine uống có thể khắc phục được các hạn chế đã đề cập nếu được thiết kế để nhắm trúng đích tế bào M. Hiện nay, một chiến lược mới nhắm vào tế bào M một cách trực tiếp chính là thông qua tương tác của thụ thể trên bề mặt tế bào M với các phối tử tương ứng có mang kháng nguyên, nhờ đó kháng nguyên được vận chuyển chính xác đến tế bào M (Kunisawa *et al.*, 2012).

Nghiên cứu gần đây cho thấy Hsp60 (heat shock protein 60), một protein biểu hiện trên bề mặt của vi khuẩn *Brucella abortus*, chỉ tương tác với thụ thể prion protein (PrP<sup>C</sup>) của tế bào M thông qua một vài vị trí nhất định trên toàn bộ cấu trúc của Hsp60 (Edenhofer *et al.*, 1996). Với các cơ sở lý thuyết đó, thông qua các công cụ tin sinh học, các vị trí tương tác giữa Hsp60 và thụ thể PrP<sup>C</sup> đã được dự đoán là hai trình tự pep1 và pep2, và đã tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch thành công hai đoạn pep-tít này (kết quả trong nghiên cứu trước đó và chưa công bố). Nghiên cứu này sẽ tập trung vào việc tạo PrP<sup>C</sup> chuột (mPrP<sup>C</sup>) tái tổ hợp phục vụ cho các nghiên cứu tương tác PrP<sup>C</sup> với hai đoạn pep-tít pep1 và pep2 *in vitro* và *in vivo*. Protein mPrP<sup>C</sup> sử dụng trong đề tài sẽ không bao gồm phần đuôi đường hóa

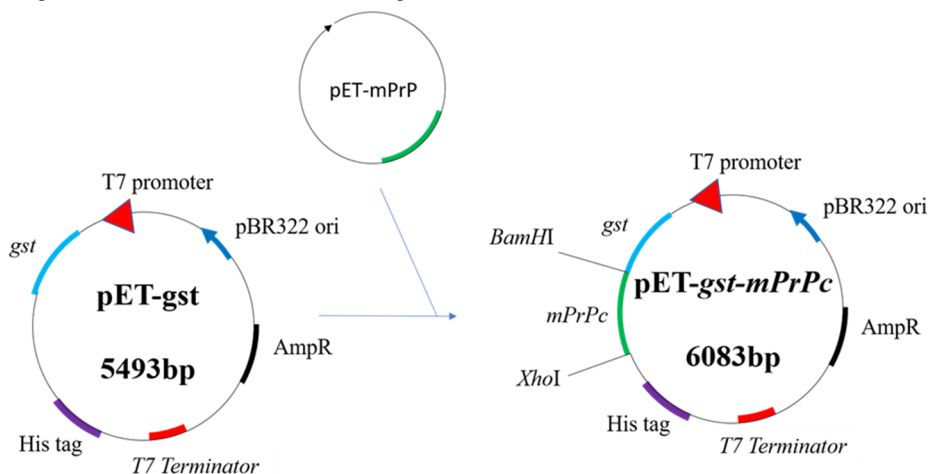
glycosylphosphatidylinositol (GPI), và có kích thước 23 kDa (đoạn 23-231) và được dung hợp với đuôi ái lực glutathione S-transferase (GST) nhằm hỗ trợ việc thử nghiệm tương tác *in vitro* thông qua chip bán dẫn sử dụng tương tác GSH-GST.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Chủng chủ và plasmid

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

chủng biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pET-*mPrPc* chứa gen mã hóa mPrP<sup>C</sup> được sử dụng làm khuôn để thu nhận gen mục tiêu. Plasmid pET-*gst* có mang gen *gst* được sử dụng để dòng hóa cũng như biểu hiện gen *mPrPc* nhờ vào promoter T7 nằm trên plasmid giúp kiểm soát sự biểu hiện gen thông qua chất cảm ứng IPTG (Hình 1). 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, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh



Hình 1: Bản đồ các plasmid cùng chiến lược tạo dòng pET-*gst-mPrPc*

### 2.2 Cấu trúc vector tái tổ hợp pET-*gst-mPrPc*

Gen *mPrPc* được thu nhận từ plasmid khuôn pET-*mPrPc* (được cung cấp bởi TS. Trần Thanh Hòa, SISSA, Trieste, Ý) bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu F-BamHI: 5'-GATCCcctaaagcgccaaagcctgg và R-XhoI: 5'-CTCGAGcttagatcttccctgcgtaataag. Sau khi đã thu nhận thành công, cả gen *mPrPc* và plasmid pET-*gst* được xử lý tạo đầu dính với hai enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Xho*I và nối lại với nhau nhờ enzyme T4 ligase. Sản phẩm nối được hóa biến nạp vào chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  và được nuôi cấy trên môi trường LB có chứa kháng sinh ampicillin nồng độ 100  $\mu$ g/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-*gst*). Kết quả tạo dòng được khẳng định bằng phương pháp giải trình tự.

### 2.3 Dòng hóa chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*gst-mPrPc*

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 100  $\mu$ g/ml. Các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-*gst-mPrPc* được sàng lọc thông qua kỹ thuật PCR khuẩn

lạc với cặp mồi trên plasmid T7pro và T7ter và so sánh với chứng âm là plasmid pET-*gst* không chèn gen.

### 2.4 Cảm ứng biểu hiện GST-*mPrPc* tái tổ hợp

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*gst-mPrPc* được nuôi cấy lắc trong điều kiện môi trường LB chứa kháng sinh ampicillin nồng độ 100  $\mu$ g/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 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 37°C. Sau 8 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 GST. Thực hiện đồng thời với các mẫu đối chứng là mẫu dịch pha tổng của *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*gst* cảm ứng IPTG và *E. coli* BL21 (DE3) không mang plasmid được cảm ứng IPTG.

### 2.5 Hòa tan và tái gập cuộn GST-*mPrPc*

Sinh khối *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*gst-mPrPc* sau khi được cảm ứng biểu hiện sẽ được thu nhận và

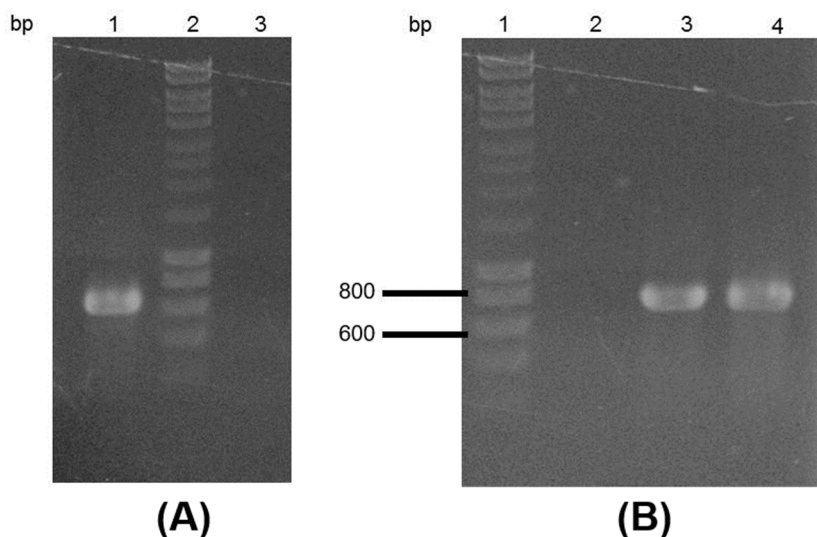
ly giải trong dịch ly giải (Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) bằng sóng siêu âm và tiến hành thu nhận thể vùi tươi. Thể vùi này sau đó sẽ được rửa bằng cách huyền phù trong dịch rửa thể vùi có Triton X-100 (Tris-HCl 20 mM, Triton X-100 2%, pH 8,0) năm lần và rửa lại một lần với dịch rửa thể vùi không bổ sung Triton X-100. Thể vùi sau khi rửa được hòa tan trong dịch hòa tan (Tris-HCl 20 mM, Gu-HCl 4 M, pH 8,0) và ủ lắ ở 4°C. Dịch hòa tan sau đó được ly tâm để thu pha nổi và pha tủa cho phân tích. Pha nổi sẽ được tiếp tục tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng nhanh ở 4°C trong dung dịch tái gấp cuộn (Tris-HCl 20 mM, Urea 2 M, Sucrose 10%, Tween-80 0,1%, pH 8,0).

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Dòng hóa *E. coli* DH5α mang vector tái tổ hợp pET-gst-mPrPc

Gen *mPrPc* có kích thước 624 bp được thu nhận từ plasmid pET-*mPrPc* bằng phương pháp PCR với

cặp mồi đặc hiệu có vùng trình tự cắt giới hạn cho *Bam*HI và *Xho*I. Kết quả điện di trên gel agarose cho thấy, gen mã hóa cho mPrPc có kích thước tương ứng trong khoảng từ 600 bp đến 800 bp. Gen *mPrPc* và plasmid pET-*gst* sau đó sẽ được xử lý giới hạn ở hai đầu bằng *Bam*HI và *Xho*I, nối với nhau bằng T4 ligase và biến nạp vào chủng *E. coli* DH5α. Vì plasmid gốc pET-*gst* có mang gen kháng ampicillin, sản phẩm biến nạp sẽ được trải trên môi trường LB có ampicillin nhằm sàng lọc bước đầu. Sau đó, hai khuẩn lạc đại diện phát triển được trên đĩa LB có kháng sinh sẽ được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với một mồi xuôi đặc hiệu cho gen (F *Bam*HI) và một mồi ngược bắt cặp đặc hiệu trên plasmid (T7Ter) với đối chứng là plasmid pET-*gst*. Kết quả cho thấy có hai khuẩn lạc cho kết quả dương tính. Trong khi đó, kết quả là âm tính khi khuếch đại với khuôn là pET-*gst*, đồng thời kích thước vạch khuếch đại đúng với dự đoán (Hình 2). Từ quan sát này, có thể kết luận đã dòng hóa thành công vector pET-*gst-mPrPc*.



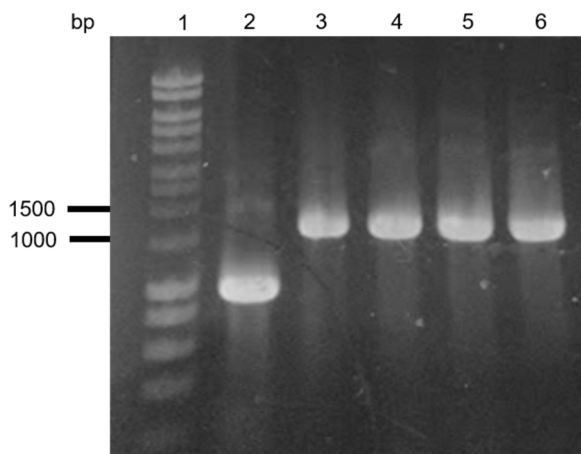
**Hình 2:** Thu nhận gen *mPrPc* (A). 1, gen *mPrPc*; 2, thang DNA 1kb; 3, chứng âm. Sàng lọc thể biến nạp DH5α bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với một mồi trên gen và một mồi trên plasmid (B). 1, thang DNA 1 kb; 2, đối chứng âm; 3-4, các khuẩn lạc dự tuyển

#### 3.2 Dòng hóa *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-gst-mPrPc

Plasmid pET-*gst-mPrPc* dòng hóa thành công được hóa biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* BL21

(DE3) và trải lên đĩa LB chứa ampicillin. Sau đó, các khuẩn lạc được kiểm tra sự hiện diện của plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7pro và T7ter (Hình 3).





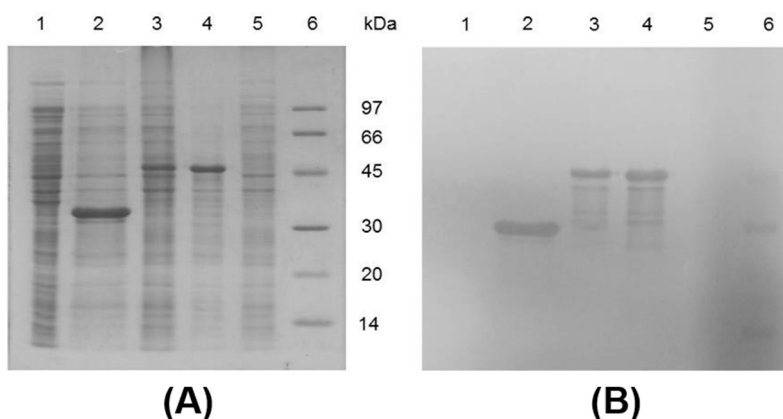
**Hình 3: Sàng lọc thể biến nạp *E. coli* BL21 (DE3) bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi trên plasmid 1, thang DNA 1 kb; 2, plasmid pET-gst; 3-6, các khuẩn lạc dự tuyển.**

Kết quả điện di cho thấy, vạch điện di xuất hiện ở các khuẩn lạc dự tuyển với kích thước nằm trong khoảng 1000-1500 bp, đúng với kích thước của sản phẩm PCR đoạn gen *gst-mPrPc* với cặp mồi trên plasmid. Trong khi đó, ở giếng chứa sản phẩm PCR với khuôn pET-gst có sự chênh lệch kích thước, và sự chênh lệch này đúng bằng với kích thước của gen *mPrPc*. Điều này chứng tỏ, plasmid tái tổ hợp pET-gst-mPrPc đã được biến nạp thành công vào *E. coli* BL21 (DE3).

### 3.3 Kiểm tra biểu hiện GST-mPrP<sup>C</sup>

Chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-gst-mPrPc được tiến hành biểu hiện theo quy trình được đề cập ở phần phương pháp. Protein thu được ở ba phân đoạn tổng, tủa và tan được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE và Western Blot. Đối chứng âm sử dụng là tế bào *E. coli* BL21 (DE3) không mang plasmid và *E. coli* BL21 (DE3)/pET-gst được cảm ứng biểu hiện tương tự.

Kết quả ở giếng 3 và 4 (Hình 4A) cho thấy có sự biểu hiện protein vượt mức có kích thước khoảng 53 kDa, trong khi giếng chứng âm chứa *E. coli* BL21 (DE3) thì lại không có vạch tương tự, chứng tỏ protein này có thể là GST-mPrP<sup>C</sup>. Khi so sánh với protein GST biểu hiện với kích thước khoảng 30 kDa trên vector pET-gst ở giếng 2, ta thấy có sự chênh lệch kích thước, và sự chênh lệch này đúng bằng kích thước theo thiết kế ban đầu của mPrP<sup>C</sup> là 23 kDa. Như vậy, bước đầu đã dự đoán được vạch protein biểu hiện vượt mức có thể là protein GST-mPrP<sup>C</sup>. Bên cạnh đó, có thể nhận thấy rằng, protein dung hợp GST-mPrP<sup>C</sup> được biểu hiện ở pha tủa, không đúng cấu hình tự nhiên. Vì vậy, để thực hiện các thử nghiệm về tính bám dính của thụ thể tế bào M và phối tử tương ứng, GST-mPrP<sup>C</sup> cần phải được hòa tan và tái gấp cuộn, để protein trở về đúng cấu hình tự nhiên ban đầu và có hoạt tính sinh học.



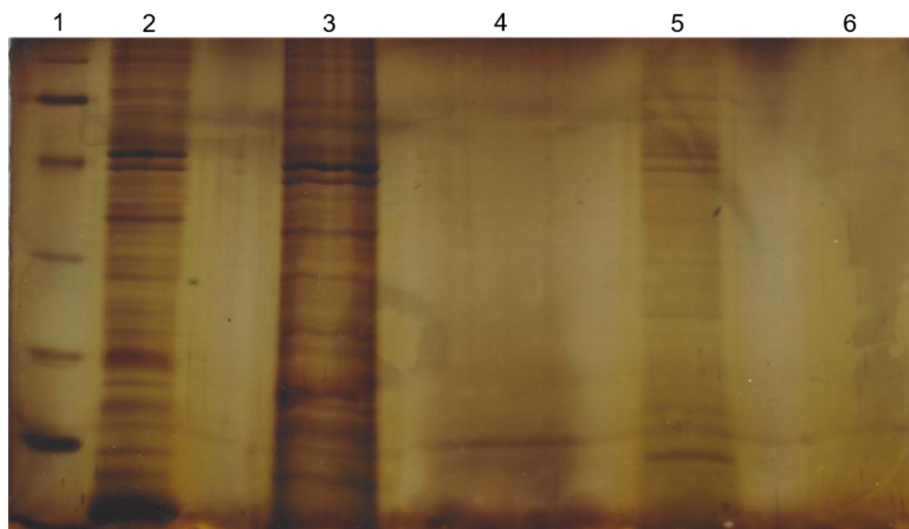
**Hình 4: Kiểm tra và xác nhận sự biểu hiện protein GST-mPrPc bằng phương pháp SDS-PAGE nhuộm Coomassie (A) và lai Western với kháng thể kháng GST (B). 1, *E. coli* BL21 (DE3); 2, *E. coli* BL21 (DE3)/pET-gst; 3, pha tổng; 4, pha tủa; 5, pha tan; 6, thang protein. (Kết quả nhuộm Coomassie được hiển thị ở dạng Grayscale nhằm hỗ trợ việc hiển thị)**

Do protein mPrP<sup>C</sup> được dung hợp với GST, nên để xác nhận sự biểu hiện của protein GST-mPrP<sup>C</sup>, phương pháp lai Western Blot được tiến hành với kháng thể đặc hiệu kháng GST. Kết quả lai Western (Hình 4B) cho thấy, có sự xuất hiện của các vạch protein GST (Hình 4B, giếng 2) và GST-mPrP<sup>C</sup> (Hình 4B, giếng 3-4) tương ứng với kích thước vạch protein biểu hiện vượt mức khi phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE, trong khi chứng âm lại không xuất hiện vạch. Như vậy, protein được biểu

hiện vượt mức ở chủng *E. coli* BL21 (DE3)/pET-*gst-mPrPc* có thể là GST dung hợp với mPrP<sup>C</sup>.

### 3.4 Hòa tan và tái gấp cuộn GST-mPrP<sup>C</sup>

Sau khi biểu hiện ở dạng thể vùi, protein GST-mPrP<sup>C</sup> được thu nhận và tiến hành hòa tan và tái gấp cuộn theo quy trình được trình bày ở phần phương pháp. Các phân đoạn thể vùi tươi, dịch hòa tan, cặn sau hòa tan, dịch nổi sau tái gấp cuộn và cặn sau tái gấp cuộn được phân tích bằng phương pháp SDS-PAGE nhuộm bạc (Hình 5).



**Hình 5:** Phân tích kết quả hòa tan và tái gấp cuộn bằng phương pháp SDS-PAGE và nhuộm bạc. 1, thang protein 14,4-97 kDa; 2, thể vùi trước khi hòa tan; 3, dịch protein hòa tan; 4, cặn sau khi hòa tan; 5, dịch protein sau tái gấp cuộn; 6, cặn sau tái gấp cuộn

Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy, ở mẫu dịch protein hòa tan có xuất hiện vạch protein đậm kích thước 53 kDa (Hình 5, giếng 3), trong khi mẫu tủa sau khi hòa tan lại không xuất hiện vạch (Hình 5, giếng 4), chứng tỏ protein GST-mPrP<sup>C</sup> đã được hòa tan hoàn toàn. Sau khi hòa tan, protein GST-mPrP<sup>C</sup> được tiến hành tái gấp cuộn bằng phương pháp pha loãng nhanh. Kết quả cho thấy, ở mẫu dịch protein sau tái gấp cuộn có xuất hiện vạch protein kích thước 53 kDa (Hình 5, giếng 5). Điều này chứng tỏ protein GST-mPrP<sup>C</sup> đã tái gấp cuộn được hoàn toàn.

Như vậy, sau quá trình tái gấp cuộn, protein GST-mPrP<sup>C</sup> từ thể vùi tươi đã được thu nhận ở dạng tan bằng phương pháp hòa tan trong Gu-HCl 4M và pha loãng nhanh trong dung dịch tái gấp cuộn.

Để xác định được hiệu suất của quá trình tái gấp cuộn, lượng protein GST-mPrP<sup>C</sup> ở phân đoạn thể vùi tươi và ở phân đoạn dịch protein sau tái gấp cuộn được xác định. Kết quả được trình bày trong Bảng 1.

**Bảng 1:** Hiệu suất thu hồi protein của quá trình tái gấp cuộn

	Lượng protein tổng (mg)	Tỉ lệ protein <i>gst-mprp<sup>c</sup></i> (%)	Lượng protein <i>gst-mprp<sup>c</sup></i> (MG)	Hiệu suất
Phân đoạn thể vùi tươi ban đầu	8,84	6,88	0,6	88,33%
Phân đoạn thể vùi sau tái gấp cuộn	3,70	14,29	0,53	

Trong đó, lượng protein GST-mPrP<sup>C</sup> trong phân đoạn thể vùi tươi ban đầu đạt 0,6 mg. Sau quá trình tái gấp cuộn, lượng protein GST-mPrP<sup>C</sup> còn lại thu được 0,53 mg. Như vậy, sau quá trình tái gấp cuộn tuy một lượng protein đã mất đi ở các bước (0,07 mg) nhưng hiệu suất thu hồi đạt 88,33%.

Tóm lại, với các kết quả đạt được, protein GST-mPrP<sup>C</sup> đã được tái gấp cuộn thành công, tồn tại ở dạng tan và có thể tiếp tục quy trình tinh sạch và thử nghiệm khả năng tương tác với các phối tử đã được dự đoán. Tuy nhiên, đề tài này mới chỉ là bước đầu thử nghiệm nên hiệu suất thu hồi vẫn chưa cao, cần

thêm nhiều bước khảo sát để quy trình tái gấp cuộn được hiệu quả hơn.

#### 4 KẾT LUẬN

Cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) là một protein màng biểu hiện mạnh trên tế bào M và đóng vai trò trong việc nhận diện kháng nguyên cần thực bào bằng tế bào M, và protein này đã được phát hiện có thể tương tác với protein bề mặt Hsp60 của *Brucella abortus*. Với mục tiêu thu nhận mPrP<sup>C</sup> dung hợp với GST tái hợp phục vụ cho nghiên cứu tương tác giữa PrP<sup>C</sup> protein và các trình tự dự đoán từ Hsp60 *in vitro* và *in vivo*, đề tài này đã đồng hóa thành công vector pET-gst-mPrPc, biểu hiện protein GST-mPrP<sup>C</sup> ở dạng thể vùi trong chủng chủ *E. coli* BL21 (DE3) cảm ứng với nồng độ IPTG 0,5 mM trong 8 giờ ở nhiệt độ 37°C; và bước đầu tái gấp cuộn thành công protein này với hiệu suất quá trình tái gấp cuộn là 88,33%. Với kết quả thu nhận được, nhóm nghiên cứu sẽ tiếp tục tiến hành tinh sạch protein GST-mPrP<sup>C</sup> và tiến hành thử nghiệm tương tác GST-mPrP<sup>C</sup> với phối tử tương ứng trên tế bào M *in vitro* và *in vivo*, nhằm phục vụ cho việc phát triển vaccine đường uống.

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn TS. Trần Thanh Hòa, SISSA, Trieste, Ý đã cung cấp plasmid pET-mPrPc.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Berlin, C., Bargatze, R.F. and Campbell J.J., *et al.*, 1995. Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*. 80(3): 413-22.

Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S. and Winnacker, E.L., 1996. Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *Journal of Virology*. 70(7): 4724-8.

Kraehenbuhl, J-P. and Neutra, M.R., 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 16(1): 301-32.

Svensson, M., Marsal, J., Ericsson, A., *et al.*, 2002. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha-beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *The Journal of Clinical Investigation*. 110(8): 1113-21.

Lorenz, R.G. and Newberry, R.D., 2004. Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1029(1): 44-57.

Diniz-Santos, D.R., Silva, L.R. and Silva, N., 2006. Antibiotics for the empirical treatment of acute

infectious diarrhea in children. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 10(3):217-27.

Klewpatinond, M., Davies, P., Bowen, S., Brown, D.R. and Viles, J. H., 2008. Deconvoluting the Cu<sup>2+</sup> Binding Modes of Full-length Prion Protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 283(4): 1870–1881.

Jasani, B., Navabi, H. and Adams, M., 2009. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine*. 27(25-26): 3401-4.

Turner, J.R., 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 9(11): 799-809.

Wardlaw, T., Salama, P., Brocklehurst, C., Chopra, M. and Mason, E., 2010. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. *The Lancet*. 375(9718): 870–872.

Kunisawa, J., Kurashima, Y. and Kiyono, H., 2012. Gut-associated lymphoid tissues for the development of oral vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64(6): 523-30.

Lycke, N., 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature Reviews Immunology*. 12(8): 592.

Pabst, O. and Mowat, A., 2012. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunology*. 5(3): 232.

Azegami, T., Yuki, Y. and Kiyono, H., 2014. Challenges in mucosal vaccines for the control of infectious diseases. *International Immunology*. 26(9): 517-28.

Marasini, N., Skwarczynski, M., Toth, I., 2014. Oral delivery of nanoparticle-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 13(11): 1361-76.

Nguyễn Thanh Thảo, Lê Thị Tài, Nguyễn Văn Hiến và *ctv.*, 2014. Tình hình bệnh tiêu chảy tại Việt Nam giai đoạn 2002-2011. *Tạp chí Y học dự phòng*. XXIV: 92-6.

Czerkinsky, C. and Holmgren, J., 2015. Vaccines against enteric infections for the developing world. *Phil Trans R Soc B*. 370(1671): 20150142.

Zollner-Schwetz, I. and Krause, R., 2015. Therapy of acute gastroenteritis: role of antibiotics. *Clinical Microbiology and Infection*. 21(8): 744-9.

Fuhrmann, S., Nauta, M., Pham-Duc, P., *et al.*, 2017. Disease burden due to gastrointestinal infections among people living along the major wastewater system in Hanoi, Vietnam. *Advances in Water Resources*. 108: 439-49.

WHO, 2018. Immunization coverage, access on 3<sup>rd</sup> May 2018. Available from <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/immunization-coverage>.