

VAI TRÒ CỦA YSCW TRONG VIỆC TIẾT ĐỘC TỐ BỞI VI SINH VẬT GÂY BỆNH *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Evaluating the Role of YscW in Secretion of Virulence Factors by
Foodborne Pathogen *Yersinia enterocolitica*

Nguyễn Hương Thủy¹, Zachary W. Bent²

¹Khoa Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học California, Davis, Hoa Kỳ

Địa chỉ email tác giả liên lạc: thuycntp@hua.edu.vn

Ngày gửi đăng: 26.04.2011; Ngày chấp nhận: 15.06.2011

TÓM TẮT

YscW là một lipoprotein nằm ở màng ngoài tế bào của vi khuẩn gây bệnh đường ruột *Yersinia enterocolitica*. Có giả thuyết cho rằng YscW đóng vai trò quan trọng hỗ trợ khả năng tiết độc tố và gây bệnh của *Yersinia enterocolitica*. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích đánh giá vai trò của YscW bằng việc thiết kế một đột biến khuyết đoạn *yscW* và sau đó kiểm tra khả năng tiết độc tố của đột biến này. Kết quả cho thấy đột biến khuyết đoạn *yscW* đã được thiết kế thành công. Những dòng *Y. enterocolitica* chứa đột biến khuyết đoạn *yscW* hầu như không thể hiện khả năng tiết độc tố. Kết quả gợi ý YscW là một protein tiềm năng trong việc hỗ trợ khả năng gây bệnh của *Y. enterocolitica*.

Từ khóa: Độc tố, đột biến khuyết đoạn, *Yersinia enterocolitica*, YscW.

SUMMARY

YscW is a small lipoprotein located in the outer membrane of food-borne pathogen *Yersinia enterocolitica*. It is hypothesized that YscW plays a vital role in the improvement of virulence factors (Yop) secretion by *Y. enterocolitica*. The role of YscW was thus investigated in the present study by construction of a *yscW* deletion mutant and its ability to secrete Yops was subsequently evaluated. In this study, *yscW* deletion gene (Δ *yscW*) was successfully constructed. *Y. enterocolitica* mutants expressed nearly no Yop secretion. These results indicated that YscW might be required for the Yop secretion by *Y. enterocolitica*.

Key words: Deletion mutant, virulence factors, *Yersinia enterocolitica*, YscW.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Yersinia enterocolitica là chủng vi sinh vật gây bệnh đường ruột ở người. Chủng vi sinh vật này thường được phân lập từ lợn và thực phẩm bao gồm hải sản, thịt gà, sữa chưa thanh trùng... Cho đến nay, đã thống kê được nhiều trường hợp nhiễm bệnh do ăn thức ăn nhiễm khuẩn *Y. enterocolitica*. Biểu hiện bệnh phụ thuộc vào lứa tuổi và khả năng miễn dịch của cơ thể (Babic-Erceg và cs., 2003, Ackers và cs., 2000). Ở trẻ em (dưới 5 tuổi), biểu hiện bệnh thường là sốt, đau bụng và đi ngoài ra máu. Ở trẻ em lớn hơn 5 tuổi và người trưởng thành, biểu hiện

chính là đau bụng và sốt (Ehara và cs., 2000). Cơ chế gây bệnh của *Y. enterocolitica* đã và đang là vấn đề nghiên cứu rất được quan tâm trong nhiều năm trở lại đây. Hiện nay, các nghiên cứu đã chỉ ra rằng khả năng gây bệnh của *Y. enterocolitica* là nhờ sự có mặt của plasmid gây bệnh pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) và hệ thống tiết type III (Type III Secretion System-T3SS) (Bleves và Cornelis, 2000). Trong đó, hệ thống tiết Ysc (*Yersinia* secretion) được nghiên cứu sâu nhất. Người ta thấy rằng khi tiếp xúc với tế bào chủ, chủng vi sinh vật này phản ứng với sự thay đổi của môi trường xung quanh rất nhanh nhạy bằng cách kích thích hệ thống

tiết type III. Trong điều kiện *in vitro*, ở 37°C và trong môi trường thiếu Ca²⁺, nhờ hệ thống tiết type III, *Y. enterocolitica* sẽ tiết ra những độc tố có bản chất là những protein (Yops) vào trong tế bào chủ và gây bệnh cho cơ thể chủ (Cornelis, 2002).

Có khoảng 25 protein tham gia vào cấu trúc nên hệ thống tiết Ysc. Tuy nhiên chỉ có một vài protein tham gia trực tiếp vào quá trình tiết độc tố của *Y. enterocolitica*. Trong đó, một lipoprotein có kích thước nhỏ nằm ở màng ngoài tế bào *Y. enterocolitica*, tên là YscW có thể đóng vai trò quan trọng hỗ trợ cho khả năng tiết độc tố (Yops) ra ngoài môi trường của chủng vi khuẩn gây bệnh *Y. enterocolitica* (Allaoui và cs., 1995; Burghout và cs., 2004). Protein này được mã hoá bởi gene tương ứng *yscW* trên plasmid pYV. Vì vậy, nghiên cứu này sẽ tập trung vào việc thiết kế một gene chứa đột biến khuyết *yscW* và xác định khả năng tiết độc tố của gene đột biến này từ đó xác định được rõ hơn vai trò của *yscW*. Việc nghiên cứu cơ chế gây bệnh của *Y. enterocolitica* sẽ tạo tiền đề cho việc điều trị các bệnh liên quan đến nhiễm khuẩn *Yersinia*.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng vi sinh vật, plasmid và điều kiện nuôi cấy

Các chủng vi sinh vật và plasmid sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở bảng 1.

Chủng *Y. enterocolitica* được nuôi cấy ở 26°C và chủng *E. Coli* được nuôi cấy ở 37°C trên môi trường thạch LB hoặc môi trường lỏng LB (Luria-Bertani).

2.2. Phương pháp thiết kế đột biến khuyết đoạn *yscW* (*yscW*)

Đột biến khuyết đoạn *yscW* được thiết kế sử dụng phương pháp PCR của Warren và cs. (1997). Về nguyên tắc, vùng upstream và downstream của gene mục tiêu được nhân lên nhờ việc sử dụng các cặp mồi đặc hiệu và sau đó kết hợp chúng lại để tạo thành đột biến khuyết đoạn. Trong nghiên cứu này, 4 đoạn mồi A, B, C, D được sử dụng. Trình tự nucleotide của các đoạn mồi này được liệt kê ở bảng 2. Trong đó, 2 đoạn mồi A và B được sử dụng để nhân vùng upstream của gene *yscW* (đoạn AB). Hai đoạn mồi C và D được sử dụng để nhân vùng downstream của *yscW* (đoạn CD). Sau đó, đoạn mồi A và D được sử dụng để tạo thành sản phẩm là đột biến khuyết đoạn *yscW* (đoạn AD).

2.3. Chuyển gene vào *E. coli*

Allele đột biến khuyết đoạn, *yscW*, được chuyển vào vector pCR-BluntII-TOPO sử dụng bộ KIT Zero BluntII-TOPO Cloning Kit (Invitrogen). Đoạn gene này sau đó được chuyển vào vector tự phân huỷ pGY765, từ đó tạo nên plasmid pGY1281. Plasmid này được chuyển vào chủng *E. Coli* SM10pir bằng phương pháp xung điện và được đặt tên là chủng GY6632.

Bảng 1. Chủng vi sinh vật và plasmid được sử dụng

Chủng vi sinh vật và plasmid	Đặc điểm	Nguồn gốc
<i>Y. enterocolitica</i>		
JB580v	Serogroup O:8, Nal, Δ yenR (R- M+)	Kinder và cs., 1993
GY6533	JB580v Δ yscW	Đề tài
<i>E. coli</i>		
SM10 λ pir	Thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu Km	Miller và Mekalanos, 1988
GY2683	S17-1 λ pir pTM100 <i>yscW</i> in Tc (subcloned from pGY1001)	Tae Jong Kim, thành viên lab, 2007
GY6632	SM10 λ pir pGY1281	Đề tài
Plasmid		
Ptm 100	Mob ⁺ , derivative of pACYC184, Cm ^r , Tef ^r	Michiels và Cornelis, 1991
pGY765	pMRS101 (NotI removed) Δ ofY, Str ^r suicide vector	Briana Young, thành viên lab, 2005
pGY1004	pTM100:: <i>yscW</i>	Zachary Bent, thành viên lab, 2007
pGY1281	pMRS101 (NotI removed) Δ yscW	Đề tài

Cm^r: Kháng chloramphenicol; Tef^r: Kháng tetracycline; Str^r: Kháng streptomycin

Bảng 2. Các môi được sử dụng

Môi	Trình tự (5'-3')
A	CCGGCTATTGGGAATATG
B	TGCTGTGCGAGATAATGG
C	CCATTATCTCGCACAGCACGATGGTTGTACATCGCA
D	CGAGAGGAATAAAGTCCC

2.4. Tuyển chọn đột biến khuyết đoạn *yscW* ở *Y. enterocolitica*

Allele $\Delta yscW$ được chuyển vào *Y. enterocolitica* bằng phương pháp tiếp hợp giữa chủng *E. coli* GY6632 và chủng wild-type *Y. enterocolitica* JB580v. Hỗn hợp tiếp hợp được nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa đồng thời 2 kháng sinh: streptomycin (Str) và acid nalidixic (Nal), nhằm tuyển chọn những dòng *Y. enterocolitica* (kháng Nal) mang vector tự phân huỷ pGY1281 (kháng Str). Những dòng *Yersinia* đã loại bỏ (đào thải) vector tự phân huỷ được tuyển chọn bằng cách nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường TYE chứa 7,5% sucrose. Gene *sacB* trên vector tự phân huỷ có khả năng dịch mã ra enzyme levansucrase. Enzyme này chuyển sucrose thành chất gây độc đối với *Yersinia*. Do đó, những dòng (clone) đã loại bỏ vector tự phân huỷ trở nên kháng sucrose nhưng lại mẫn cảm với streptomycin. Những khuẩn lạc này sau đó được cấy lại lên môi trường thạch LB và LB chứa streptomycin (Str) và acid nalidixic (Nal). Những dòng nào mọc trên môi trường LB mà không mọc trên môi trường LB chứa streptomycin và acid nalidixic là những dòng mà vector tự phân huỷ đã bị loại. Những dòng này mang allele *yscW* wild-type hoặc allele khuyết gene *yscW*. Sau đó dùng PCR để xác định dòng vi khuẩn mang allele khuyết *yscW*, dòng này được đặt tên là GY6533.

2.5. Điện di trên gel sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE)

Y. enterocolitica được nuôi cấy qua đêm trong môi trường lỏng LB và sau đó nuôi cấy trong môi trường Yop (thiếu ion Ca^{2+} , thêm

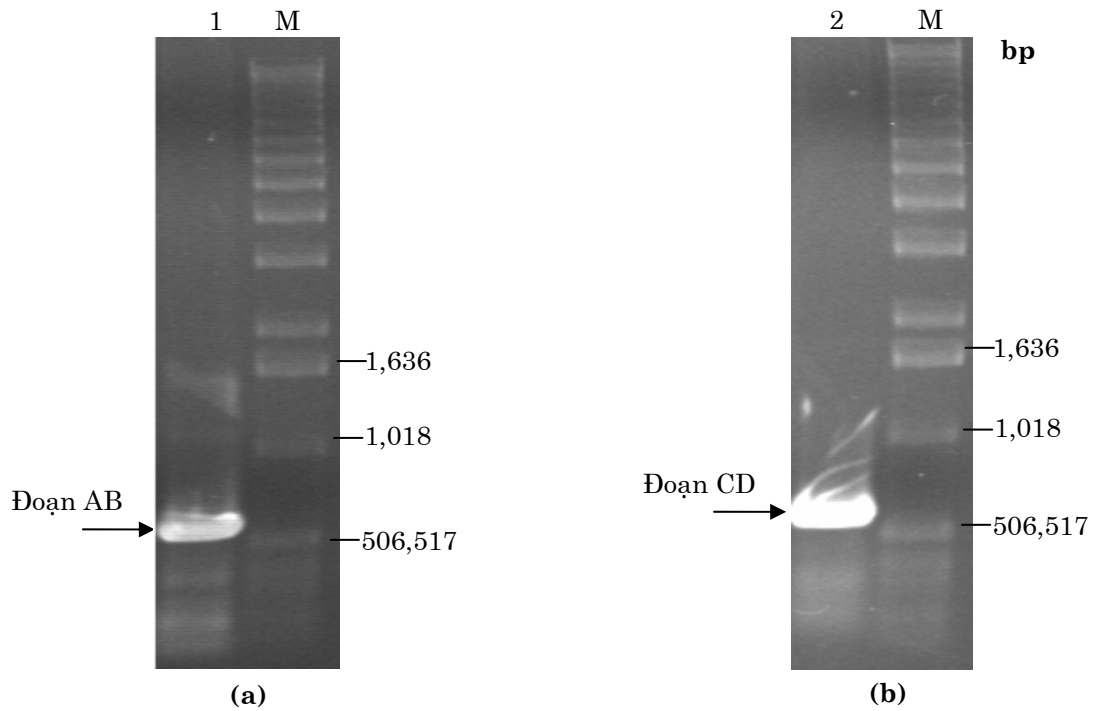
1,5 mg/mL $MgCl_2$ and 2,1 mg/mL $Na_2C_2O_4$) với tỷ lệ 1:30, ở 37°C trong 6 giờ.

Sự tiết protein Yop được xác định bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Mật độ tế bào của dịch nuôi cấy được đo bằng phương pháp so màu ở bước sóng 600 nm và giá trị OD này được dùng để đồng nhất mật độ tế bào. Dịch tế bào được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút để tách tế bào vi khuẩn khỏi dịch nuôi cấy. Protein sau đó được kết tủa bằng dung dịch TCA 10% và để qua đêm ở 4°C. Dung dịch chứa kết tủa được rửa bằng acetone lạnh rồi hoà tan trong dung dịch đệm chứa 2-mercaptoethanol với thể tích tương ứng với giá trị OD_{600} của dịch nuôi cấy. Mẫu sau đó được đun nóng ở 95°C trong 5 phút và khả năng tiết Yop được xác định bằng phương pháp điện di sử dụng 10% gel polyacrylamide. Sau khi điện di dùng thuốc nhuộm CBB (Coomassie Brilliant Blue) để hiển thị protein.

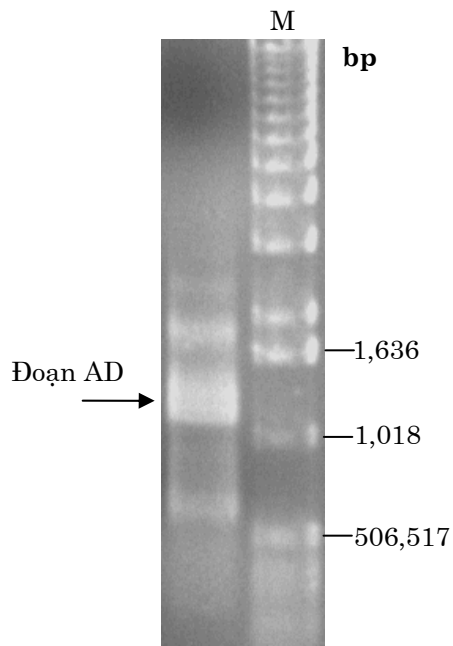
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế đột biến khuyết đoạn *yscW*

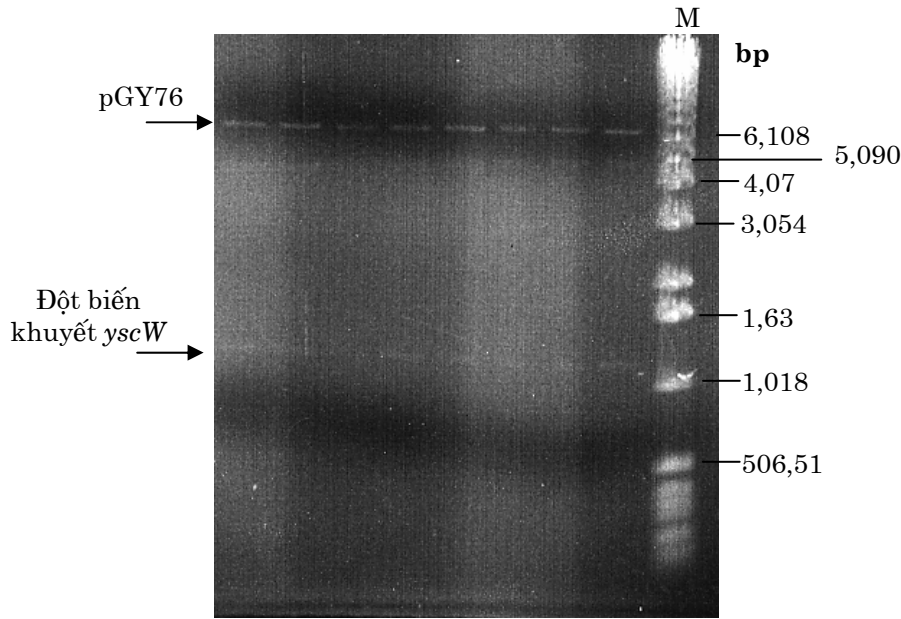
Sau khi tiến hành thiết kế đột biến khuyết đoạn *yscW* bằng phương pháp PCR, đã thu được các đoạn AB, CD và AD (đoạn đột biến khuyết đoạn *yscW*) có kích thước tương đương là 580 bp, 540 bp và 1120 bp (Hình 1, 2). Dựa trên trình tự của bộ gene (đã được giải mã) của chủng wild-type *Y. enterocolitica* JB580v, các đoạn AB, CD và AD cũng có kích thước tương tự như vậy. Điều này cho thấy đoạn đột biến khuyết *yscW* đã được thiết kế thành công. Đoạn gene này sau đó được tinh sạch bằng bộ Kit DNA Extraction Kit (QIAGEN) để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR (a) Đoạn AB (b) Đoạn CD. Mẫu được điện di trên gel agarose 0,8% trong 1 giờ ở 100V, nhuộm bằng ethidium bromide và hiển thị bằng UV. Giếng 1: Đoạn AB; Giếng 2: Đoạn CD; M: Thang chuẩn (1 kb).



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR của đoạn AD. Mẫu được điện di trên gel agarose 0,8% trong 1 giờ ở 100V, nhuộm bằng ethidium bromide và hiển thị bằng UV. M: Thang chuẩn (1 kb)



Hình 3. Điện di plasmid pGY1281 sau khi cắt bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Xba*I endonucleases: pGY765 (~7000 bp) và *yscW* (~1120 bp); M: Thang chuẩn (1 kb)

3.2. Chuyển gene vào *E. coli*

Sau khi tiến hành chuyển vector mang allele khuyết đoạn *yscW* (pGY1281) vào *E. coli*, những dòng mang vector này được tuyển chọn bằng cách nuôi cấy trong môi trường thạch LB có chứa streptomycin. Plasmid của một số dòng phát triển trên môi trường này được tinh sạch, sử dụng bộ Kit Plasmid Miniprep Kit (Qiagen), để kiểm tra xem thực sự chúng có mang đoạn allele đột biến khuyết *yscW*. Đoạn allele khuyết *yscW* được giải phóng ra khỏi plasmid nhờ enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Xba*I. Kết quả điện di trên hình 3 cho thấy, 8 dòng *E. coli* chứa plasmid pGY765 và đoạn allele khuyết *yscW*. Một trong 8 dòng được lựa chọn và đặt tên là GY6632. Dòng này sau đó được sử dụng cho những thí nghiệm tiếp theo.

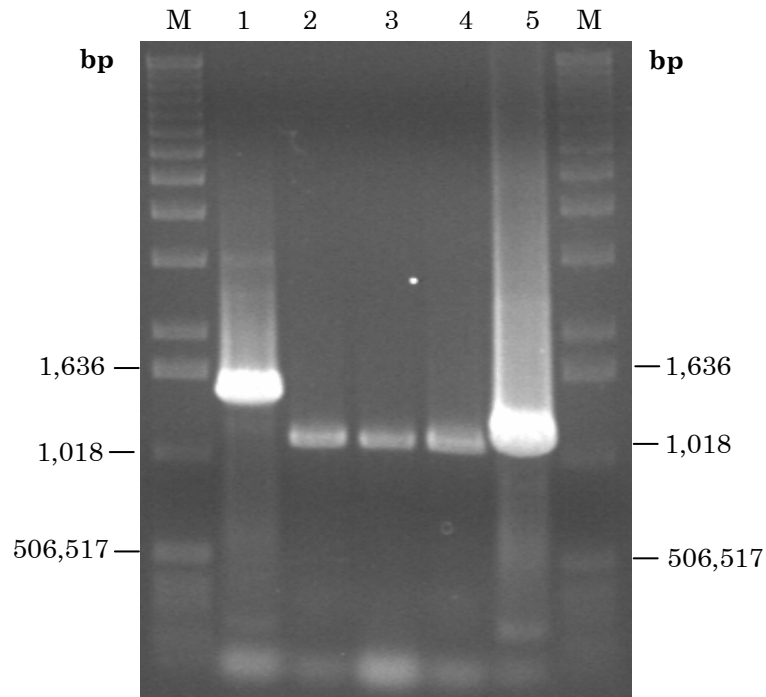
3.3. Tuyển chọn dòng *Y. enterocolitica* chứa đột biến khuyết đoạn *yscW*

Sự có mặt của đoạn allele đột biến khuyết *yscW* trong *Y. enterocolitica* được xác định bằng phương pháp PCR. Trong quá trình tuyển chọn, 58 dòng đã được kiểm tra và trong đó 3 dòng có sản phẩm PCR có kích thước tương ứng với 1120 bp, kích thước của

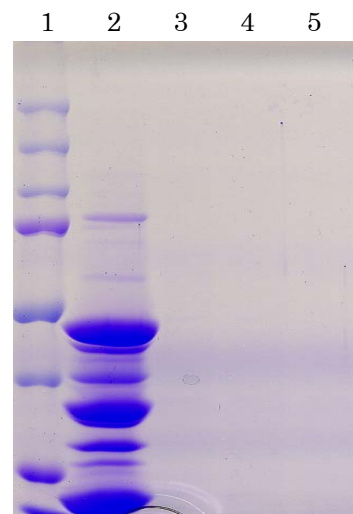
đoạn allele đột biến khuyết *yscW*, cho thấy rằng đoạn gene đột biến khuyết *yscW* có mặt ở *Y. enterocolitica* (Hình 4). Nghiên cứu này chọn 1 trong 3 dòng và đặt tên là GY6533.

3.4. Ảnh hưởng của đột biến khuyết *yscW* đến khả năng tiết độc tố của *Y. enterocolitica*

Nghiên cứu tiến hành kiểm tra khả năng tiết Yops của dòng *Yersinia* chứa đột biến khuyết *yscW* bằng phương pháp SDS-PAGE như đã mô tả. Từ hình 5 có thể thấy các dòng *Y. enterocolitica* chứa đột biến khuyết *yscW* hầu như không còn khả năng tiết Yop so với chủng hoang dại *Y. enterocolitica* JB580v. Điều này có thể được giải thích là do thiếu YscW nên khả năng tiết độc tố Yop của *Y. enterocolitica* bị giảm sút mạnh, chứng tỏ rằng YscW có thể đóng vai trò quan trọng đối với việc tiết độc tố của *Y. enterocolitica*. Burghout và cs. (2004) đã đánh giá vai trò của YscW đối với khả năng tiết độc tố của *Yersinia*. Thông qua việc thiết kế một đột biến khuyết YscW và đánh giá khả năng tiết độc tố của đột biến này, các tác giả thấy rằng khả năng tiết độc tố của đột biến này giảm mạnh so với chủng hoang dại.



Hình 4. Điện di sản phẩm PCR của 3 dòng *Y. enterocolitica* tuyển chọn
Giếng 1: Chủng wild-type *Y. enterocolitica* JB580v;
Giếng 2, 3, 4: Ba dòng *Y. enterocolitica* chứa đoạn đột biến khuyết *yscW*;
Giếng 5: Plasmid pCR-BluntII-TOPO; M: Thang chuẩn (1 kb).



Hình 5. Điện di SDS-PAGE cho thấy khả năng tiết Yop của 3 dòng
***Y. enterocolitica* chứa đột biến khuyết *yscW*.**
Giếng 1: Thang chuẩn;
Giếng 2: Chủng wild-type *Y. enterocolitica* JB580v;
Giếng 3, 4, 5: Ba dòng *Y. enterocolitica* chứa đột biến khuyết *yscW*.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Bằng việc thiết kế đột biến gene khuyết *yscW*, kết quả nghiên cứu bước đầu đã cho thấy YscW có thể đóng vai trò quan trọng đối với khả năng tiết độc tố của *Y. enterocolitica*. Tuy nhiên để có đánh giá chính xác vai trò của YscW, cần phải tiến hành thêm những thí nghiệm như sau:

- Thí nghiệm chuyển lại đoạn gene *yscW* trở lại vào dòng *Y. enterocolitica* chứa đột biến khuyết *yscW* (complementation test) để kiểm tra khả năng tiết Yop của chúng có tương tự chủng wild-type không.

- Kiểm tra sự tiết Yop nội bào của dòng *Y. enterocolitica* chứa đột biến khuyết *yscW*.

- Kiểm tra khả năng của đột biến khuyết *yscW* trong việc hỗ trợ cho việc chuyển Yop ra bên ngoài môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ackers, M. L., S. Schoenfeld, J. Markman, M. G. Smith, M. A. Nicholson, W. DeWitt, D. N. Cameron, P. M. Griffin & L. Slutsker (2000). An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. *J Infect Dis*, 181, 1834-7.
- Allaoui, A., R. Scheen, C. Lambert de Rouvroit & G. R. Cornelis (1995). VirG, a *Yersinia enterocolitica* lipoprotein involved in Ca²⁺ dependency, is related to *exsB* of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 177, 4230-7.
- Babic-Erceg, A., Z. Klismanic, M. Erceg, D. Tandara & M. Smoljanovic (2003). An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:3 infections on an oil tanker. *Eur J Epidemiol*, 18, 1159-61.
- Burghout, P., F. Beckers, E. de Wit, R. van Boxtel, G. R. Cornelis, J. Tommassen & M. Koster (2004). Role of the pilot protein YscW in the biogenesis of the YscC secretin in *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol*, 186, 5366-75.
- Cornelis, G. R. (2002). *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol*, 158, 401-8.
- Ehara, A., K. Egawa, F. Kuroki, O. Itakura & M. Okawa (2000). Age-dependent expression of abdominal symptoms in patients with *Yersinia enterocolitica* infection. *Pediatr Int*, 42, 364-6.
- Matsumoto, H. & G. M. Young (2009). Translocated effectors of *Yersinia*. *Curr Opin Microbiol*, 12, 94-100.
- Kinder, S. A., L. J. Badger, O. G. Bryant, C. J. Pepe and L. V. Miller (1993). Cloning of the YenI restriction endonuclease and methyltransferase from *Yersinia enterocolitica* serotype O:8 and construction of a transformable R-M+ mutant. *Gene*, 136, 271-275.
- Michiels T., & R. G. Cornelis (1991). Secretion of hybrid proteins by the *Yersinia* Yop export system. *Journal of Bacteriology*, 173, 1677-1685.
- Miller, V. L. & J. J. Mekalanos (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: Osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *Journal of Bacteriology*, 170, 2575-2583.
- Warrens, A. N., M. D. Jones & R. I. Lechler (1997). Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene*, 186, 29-35.