

# NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN PROTEIN PANTON VALENTINE LEUKOCIDIN CỦA VI KHUẨN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ÂN KHẮC HUY, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG LAN,  
DIỆP THẾ TÀI, Viện Pasteur Tp. Hồ Chí Minh

## TÓM TẮT:

**Đặt vấn đề:** Panton Valentine leukocidin (PVL) là một trong những độc tố liên quan đến hoại tử mô, làm tăng độc lực, đóng vai trò quan trọng trong khả năng xâm nhiễm của các chủng vi khuẩn *S. aureus*. Nghiên cứu biểu hiện protein PVL là bước đầu trong việc nghiên cứu vai trò gây bệnh cũng như tầm soát phân bố PVL trong cộng đồng và nhiễm trùng bệnh viện hiện nay. **Phương pháp:** PCR được dùng trong thu nhận gen mục tiêu *lukS-PV* mã hóa PVL-S. Kỹ thuật tạo dòng được sử dụng để tạo ra vector tái tổ hợp pET22b-PVL-S. Biểu hiện PVL-S được cảm ứng bằng IPTG, được khẳng định bằng điện di SDS-PAGE và lai Western blot với kháng thể kháng His. **Kết quả:** Gen *lukS-PV* thu được đúng kích thước dự kiến là 375 bp. Vector tái tổ hợp sau khi kiểm tra bằng PCR, enzyme cắt hạn chế và giải trình tự cho kết quả gen *lukS-PV* chèn đúng chiều và đồng khung trong vector pET22b. Protein PVL-S đã được biểu hiện thành công với kích thước 18 kDa khi chuyển vector pET22b-PVL-S vào tế bào BL21(DE3). **Kết luận:** Protein PVL được biểu hiện thành công, đây là cơ sở cho những nghiên cứu tiếp theo về protein PVL-S trong việc tạo kháng thể và nghiên cứu quy trình thu sinh khối lớn protein này đang được tiếp tục triển khai.

**Từ khóa:** *S. aureus*, Panton Valentine leukocidin gene, protein.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) là một trong những tác nhân hàng đầu gây nhiễm trùng bệnh viện và cộng đồng. Thêm vào đó là khả năng kháng các loại kháng sinh đang gia tăng gây khó khăn trong công tác điều trị, nhất là các chủng *S. aureus* kháng methicillin (MRSA). Nguy hiểm hơn là những chủng *S. aureus* mang gen *lukS-PV* mã hóa protein PVL [1]. Sự biểu hiện PVL là nguyên nhân của những tổn thương liên quan đến hoại tử mô, tăng độc lực cho *S. aureus* và gây giảm số lượng bạch cầu trong tế bào chủ.

PVL được cấu tạo từ 2 thành phần là PVL-S và PVL-F được gắn xen kẽ nhau tạo nên cấu trúc dạng vòng có hoạt tính [2]. Khi xâm nhập vào vật chủ, *S. aureus* sẽ tổng hợp hai thành phần PVL-S và PVL-F dưới dạng monomer hòa tan trong nước. Đầu tiên PVL-S gắn lên màng bạch cầu, sau đó sẽ dimerizes với PVL-F, tiếp tục gắn xen kẽ để hình thành một cấu trúc dạng vòng [3], trải qua những thay đổi về hình dạng dẫn đến sự hình thành một lỗ xuyên qua màng bạch cầu dẫn đến việc ly giải làm giảm số lượng bạch cầu. Sau khi ly giải, những hạt trong bạch cầu sẽ được giải phóng, cụ thể là histamine từ basophil. Những hạt này sẽ kích thích các bạch cầu trung tính sản xuất enzyme ( $\beta$ -glucuronidase và lysozyme), các

thành phần chemotactic (leukotrimen-B4 và IL-8) dẫn đến một loạt các viêm nhiễm trung gian [4,5,6]. Những phản ứng trên sẽ làm hoại tử vùng mô xung quanh vị trí nhiễm. Khả năng tăng độc lực của những chủng *S. aureus* có biểu hiện PVL cho tới nay vẫn chưa được làm rõ.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tạo dòng và biểu hiện protein PVL-S trong hệ thống *E. coli* với mục tiêu phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo về PVL trong việc tìm hiểu cơ chế gây bệnh cũng như vai trò của protein này trên các chủng MRSA.

## PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Chủng vi sinh vật và plasmid

Chủng chuẩn *S. aureus* ATCC 25923 được sử dụng để thu nhận gen *lukS-PV*. Chủng chuẩn *E. coli* DH5 $\alpha$  (F – *endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi  $\lambda$  – recA1 gyrA96  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15)) (Promega) dùng làm chủng chủ để tạo dòng và lưu trữ plasmid tái tổ hợp. Chủng *E. coli* BL21(DE3) (F – *dcm ompT hsdSB (rB – mB-) gal met*)*

(Promega) dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Plasmid pET22b do hãng Novagen cung cấp, chịu sự kiểm soát của promoter T7 được dùng làm vector biểu hiện PVL.

### Thu nhận gen đích bằng phản ứng PCR

Phản ứng PCR thu nhận gen *lukS-PV* được tiến hành với cặp mồi đặc hiệu cho gen *lukS-PV*, do chúng tôi tự thiết kế có mang trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *EcoRI* ở đầu 5' và *NotI* ở đầu 3' nhằm khuếch đại đoạn gen mục tiêu dài 375 bp:

5'-CGAATTCATCATTAGGTTAAATGTCTGGACATGATCC-3'  
và 5'-CGCGCCCGCATTATGTCCITTCACITTTTTTC-3'.

Chương trình phản ứng PCR bao gồm 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 1 bước biến tính ở 94°C trong 1 phút, 1 bước bắt cặp ở 55°C trong 1 phút và một bước kéo dài ở 72°C trong 1 phút; cuối phản ứng là một bước kéo dài trong 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sau đó được bảo quản ở 4°C và được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%.

### Thiết lập vector tái tổ hợp pET22b-PVL-S có mang gen *lukS-PV*

Sản phẩm PCR được cắt bằng enzyme cắt hạn chế *EcoRI* và *NotI*. Sản phẩm cắt được nối vào vector biểu hiện pET22b bằng enzyme T4 DNA ligase. Vector tái tổ hợp tạo thành được đặt tên là pET22b-PVL-S và được biến nạp vào *E. coli* DH5 $\alpha$  bằng phương pháp hóa biến nạp.

### Sàng lọc thể biến nạp và giải trình tự DNA

PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu và sử dụng enzyme cắt hạn chế *BsaI* và *XbaI* để sàng lọc thể biến nạp. Bên cạnh đó, giải trình tự cũng được dùng

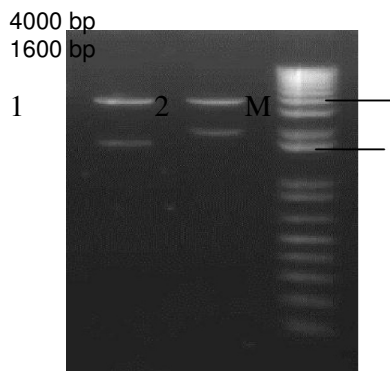
trong việc khẳng định sự đồng khung của gen mục tiêu vào plasmid. Quy trình giải trình tự được thực hiện tại Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh. Trình tự thu nhận được so sánh với trình tự lý thuyết bằng phần mềm ClustalX 2.0.12.

### Biểu hiện protein PVL-S

Tiến hành biến nạp plasmid pET22b-PVL-S vào dòng tế bào *E. coli* BL21(DE3) và sàng lọc bằng kháng sinh ampicillin và PCR khuẩn lạc. Chọn khuẩn lạc dương tính với phản ứng PCR để tiến hành biểu hiện protein dưới sự cảm ứng của IPTG.

Hình 1: Kết quả điện di gen *lukS-PV*

- (A): M. Thang 100bp; 1. Chứng âm; 2. Sản phẩm PCR thu nhận gen *lukS-PV*.  
(B): M. Thang 100bp; 1. Chứng dương; 2. Chứng âm; 3 và 4. Sản phẩm PCR khuẩn lạc xác định gen *lukS-PV*  
(C): M. Thang 100bp; 1. Chứng dương; 2. Sản phẩm PCR gen *lukS-PV* từ plasmid



Hình 2: Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp bằng enzyme cắt hạn chế  
M. Thang 1kb plus; 1. Plasmid pET22b (chứng dương); 2. Plasmid tái tổ hợp

### **Phân tích protein PVL-S bằng SDS-PAGE và lai Western blot**

Các mẫu protein thu được sau khi phá tế bào sẽ được xử lý với dung dịch nạp mẫu 2X (SDS 4%, Tris-HCl (pH=6,8) 0,125M, Sucrose 10%, Bromphenol blue 0,04%, Beta-mercapto 10%). Tiến hành điện di SDS-PAGE với nồng độ gel polyacrylamide là 16%. Protein sau khi điện di được chuyển lên màng lai và thực hiện lai Western blot với kháng thể đơn dòng kháng đuôi 6xHis và phát hiện nhờ kháng thể kháng IgG của chuột cộng hợp với HRPO.

### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **Thu nhận gen *lukS-PV***

Gen *lukS-PV* được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, cho sản phẩm có một vạch có kích thước 375 bp (hình 1A) tương ứng với kích thước gen *lukS-PV* như đã thiết kế theo lý thuyết. Như vậy, cặp mồi đặc hiệu do chúng tôi thiết kế có thể dùng để thu nhận trình tự gen mục tiêu đúng như trình tự lý thuyết.

### **Tạo vector tái tổ hợp pET22b-PVL-S mang gen *lukS-PV***

Sàng lọc khuẩn lạc và tách chiết plasmid tái tổ hợp sử dụng cho PCR plasmid với cặp mồi đặc hiệu cho gen *lukS-PV*, cho kết quả tương ứng với kích thước của gen *lukS-PV* (hình 1C). Sản phẩm cắt mở vòng của plasmid tái tổ hợp bằng cặp enzyme *Bsal* và *XbaI* (hình 2) cho một vạch có kích thước khoảng 2000 bp tương ứng với gen *lukS-PV* chèn vào giữa vị trí của 2 enzyme trên. Plasmid pET22b được cắt với cặp enzyme *Bsal* và *XbaI* thì đoạn ngắn chỉ dài khoảng 1650 bp do không có gen *lukS-PV* chèn vào (hình 2, giống 1). Như vậy, plasmid thu nhận được là plasmid pET22b có gắn gen *lukS-PV*.

Vector tái tổ hợp pET22b-PVL-S được kiểm tra thêm một lần nữa bằng phương pháp giải trình tự DNA. So sánh kết quả giải trình tự với trình tự gen *lukS-PV* theo thiết kế cho thấy có sự tương đồng 100% (hình 3). Gen *lukS-PV* được gắn chèn vào vị trí của enzyme *EcoRI* và *NotI* có sự đồng khung dịch mã.