

Biểu hiện và tính chế đoạn rút gọn peptide ngoại bào của enzyme chuyển đổi angiotensin 2 (trhACE2) có khả năng gắn với protein gai của SARS-CoV-2

Nguyễn Thị Lệ Thủy^{1*}, Nguyễn Minh Tuấn^{1,2}, Phạm Thị Kim Trâm¹, Nguyễn Đăng Quân¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, 2374 quốc lộ 1A, khu phố 2, phường Trung Mỹ Tây, quận 12, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Bách khoa, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 5/5/2023; ngày chuyển phản biện 8/5/2023; ngày nhận phản biện 30/5/2023; ngày chấp nhận đăng 2/6/2023

Tóm tắt:

SARS-CoV-2 xâm nhiễm vào tế bào thông qua tương tác giữa protein gai (spike protein) của virus với thụ thể ACE2 (Angiotensin converting enzyme 2) trên bề mặt tế bào. Do đó, ACE2 được xem là mấu chốt trong các nghiên cứu thuốc cho phòng và điều trị COVID-19. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo, thu nhận và đánh giá hoạt tính dạng rút gọn trình tự vùng peptidase của ACE2 (truncated recombinant human ACE2 - trhACE2) biểu hiện từ tế bào vi khuẩn *Escherichia coli* lên khả năng gắn protein gai của SARS-CoV-2. Vùng trình tự của ACE2 (18-119 axit amin (aa) được tạo dòng vào plasmid pET28a(+) và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5a để nhân dòng plasmid và tiếp tục được chuyển sang tế bào *E. coli* BL21 (DE3) để biểu hiện protein mục tiêu. trhACE2 được tinh sạch bằng sắc ký ái lực sử dụng cột HisTrap HP với độ tinh sạch đạt trên 95%. Năng suất thu nhận trhACE2 đạt 75 mg/l. Protein sau tinh sạch được loại urea tái gấp cuộn bằng quá trình thẩm tích. trhACE2 được đánh giá khả năng gắn với protein gai của virus bằng phương pháp sandwich ELISA và phân tích tương tác cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR). Các kết quả cho thấy, trhACE2 có khả năng gắn protein gai của SARS-CoV-2 với ái lực tương tác $K_d=15,7$ nM. Với quy trình biểu hiện và thu nhận khá đơn giản, ít tốn kém trên hệ thống tế bào *E. coli* cho thấy tiềm năng phát triển trhACE2 cho các liệu pháp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị COVID-19.

Từ khóa: *E. coli*, protein gai, SARS-CoV-2, trhACE2.

Chỉ số phân loại: 3.1

1. Đặt vấn đề

Hội chứng suy hô hấp cấp (Severe acute respiratory syndrome - SARS) hay còn gọi là bệnh COVID-19 gây ra do chủng mới của virus corona là SARS-CoV-2 xuất hiện lần đầu tiên tại Vũ Hán (Trung Quốc) vào cuối năm 2019. Bệnh nhanh chóng lây lan ra các quốc gia và vùng lãnh thổ trên toàn thế giới. Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) tính tới ngày 26/4/2023, thế giới có hơn 764 triệu người nhiễm, trong đó có gần 7 triệu ca tử vong do virus này [1]. Tại Việt Nam, tính từ đầu đợt bùng phát dịch đến ngày 30/4/2023, số ca nhiễm COVID-19 là hơn 11,5 triệu người [2]. Vắc-xin phòng bệnh đã được các quốc gia nhanh chóng phát triển và đưa vào tiêm chủng, góp phần phòng chống dịch hiệu quả. Tuy nhiên, sự xuất hiện các biến chủng mới của virus có khả năng siêu lây nhiễm và giảm hiệu quả bảo vệ của vắc-xin vẫn là những thách thức trong quá trình ứng phó với dịch COVID-19 trên toàn cầu. Trước tình hình diễn biến phức tạp của dịch COVID-19 trên thế giới và ở Việt Nam, nhiều chuyên gia trong và ngoài nước đã dự đoán dịch bệnh sẽ còn tiếp tục kéo dài. Vì vậy, mở rộng nghiên cứu các biện pháp để ngăn chặn sự lây lan và xâm nhiễm của SARS-CoV-2 bên cạnh vắc-xin và các liệu pháp trị liệu đã có là rất cần thiết trong tình hình hiện nay.

ACE2 là một protein trên màng của nhiều loại tế bào khác nhau như tế bào biểu mô phế nang phổi, tim, thận, ruột, túi mật, tinh hoàn... [3, 4]. SARS-CoV-2 xâm nhiễm vào tế bào thông qua tương tác giữa protein gai (spike protein hay còn gọi là protein S) của virus với thụ thể ACE2 trên bề mặt tế bào [5, 6]. ACE2 không chỉ trung hoà SARS-CoV-2 thông qua khả năng gắn với protein S mà còn giúp giảm thiểu các tổn thương cho nhiều cơ quan bao gồm phổi, thận và tim, do sự tăng hoạt động hệ thống renin-angiotensin [7-10]. Việc bổ sung ACE2 tự do sẽ cạnh tranh liên kết của protein S với ACE2 trên màng tế bào, từ đó làm giảm khả năng xâm nhập vào tế bào của SARS-CoV-2 [11]. Như vậy việc tăng hàm lượng ACE2 tự do ngoại bào có thể là một phương thức giảm thiểu sự xâm nhiễm của SARS-CoV-2 vào tế bào.

Protein ACE2 dạng tự nhiên có kích thước đầy đủ là 805 aa, bao gồm vùng peptide tín hiệu (1-17 aa), vùng ngoại bào (18-740 aa), vùng xuyên màng (741-761 aa) và vùng nội bào (762-805 aa), trong đó vùng ngoại bào là vùng cấu trúc chính thực hiện hoạt động của enzyme. Vùng ngoại bào bao gồm vùng peptidase đầu N (peptidase domain - PD, 18-605 aa) và vùng giống collectrin ở đầu C (collectrin-like domain CLD, 606-740 aa). Nghiên cứu trước đây cho thấy, SARS-CoV hay SARS-CoV-2 liên kết với vùng peptidase

*Tác giả liên hệ: Email: lenacns2005@gmail.com

Expression and purification of truncated recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 (trhACE2) capable of binding spike protein of SARS-CoV-2

Thi Le Thuy Nguyen^{1*}, Minh Tuan Nguyen^{1,2},
Thi Kim Tram Pham¹, Dang Quan Nguyen¹

¹Ho Chi Minh City Biotechnology Center,

2374 National Highway 1A, Quarter 2, Trung My Tay Ward, District 12, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam National University - Ho Chi Minh City,

268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 5 May 2023; revised 30 May 2023; accepted 2 June 2023

Abstract:

SARS-CoV-2 infects the host through the interaction between spike protein and the ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2) receptor on the host cell surface. Therefore, ACE2 is considered as a key target in drug development against COVID-19. In this study, we generated the truncated recombinant human ACE2 (trhACE2) expressed on *Escherichia coli* and evaluated its binding activity to spike protein of SARS-CoV-2. The sequence of ACE2 (18-119 aa) was cloned into pET28a(+) plasmid and transformed into *E. coli* DH5 α strain and finally was transferred to *E. coli* BL21 (DE3) cells for protein expression. Protein trhACE2 was purified by affinity chromatography using a HisTrap HP column. Protein purity was above 95% and production yield was 75 mg/l. The purified protein was refolded by dialysis method. trhACE2 was evaluated for its ability to bind the spike protein by sandwich ELISA assay and surface plasmon resonance (SPR). The results showed that trhACE2 has the ability to bind spike protein of SARS-CoV-2 with the equilibrium dissociation constant $K_d=15.7$ nM. With a relatively simple and inexpensive expression and purification process on *E. coli* system, there is the potential to develop trhACE2 for preventive and supportive therapies against COVID-19.

Keywords: *E. coli*, SARS-CoV-2, spike protein, trhACE2.

Classification number: 3.1

của ACE2 thông qua vùng liên kết thụ thể (receptor binding domain - RBD) trên protein S và tham gia vào quá trình xâm nhiễm của virus [12]. Nghiên cứu của A. Basit và cs (2021) [13] khi thực hiện đánh giá tương tác *in silico* bằng phương pháp docking và dự đoán sử dụng phần mềm máy tính cho thấy, trình tự rút gọn của vùng peptidase của ACE2 (21-119 aa) có ái lực tương tác với RBD mạnh hơn so với trình tự ACE2 dạng tự nhiên. Ngoài ra, trình tự ngắn gọn có thể giúp protein biểu hiện ở dạng tan, thuận lợi cho quá trình thu nhận. Do vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi tạo, thu nhận và đánh giá hoạt tính dạng rút gọn trình tự vùng trhACE2 lên khả năng gắn với protein gai của SARS-CoV-2 từ tế bào vi khuẩn *E. coli*.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Chủng vi khuẩn *E. coli* dùng cho tạo dòng và biểu hiện trhACE2

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α mang plasmid pDONR221 mang gen mã hóa vùng ngoại bào của ACE2 (GenBank: BC048094) dùng cho khuếch đại trình tự gen mục tiêu được mua từ Ngân hàng plasmid DNASU (Viện Thiết kế Sinh học ASU, Hoa Kỳ, code: HsCD00829706).

Chủng *E. coli* DH5 α và *E. coli* BL21 (DE3) dùng cho tạo dòng và biểu hiện trhACE2 được tiếp nhận từ Phòng Công nghệ Sinh học y dược, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh.

2.2. Tạo dòng *E. coli* mang vùng trình tự gen mã hoá trhACE2

Trình tự gen mã hoá cho trhACE2 được khuếch đại từ trình tự của ACE2 đầy đủ trên plasmid pDONR221 (DNASU) bằng phản ứng PCR với cặp mồi thiết kế (bảng 1), sử dụng enzyme Phusion high fidelity DNA polymerase (Thermo). Trình tự khuếch đại được gắn thêm trình tự của các enzyme cắt *NcoI* và *XhoI* để chèn vào plasmid pET-28a(+) (GenScript) sử dụng enzyme T4 DNA ligase (Thermo). Plasmid tái tổ hợp pET-28a(+)-trhACE2 sau đó được chuyển vào tế bào *E. coli* DH5 α và *E. coli* BL21 (DE3) để nhân dòng và biểu hiện bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào *E. coli* mang plasmid pET28a(+)-trhACE2 được chọn lọc trên môi trường thạch LB (Luria-Bertani) bổ sung kháng sinh kanamycin 50 μ g/ml (Km50) và kiểm tra sự hiện diện của đoạn trình tự trhACE2 trên plasmid bằng PCR khuẩn lạc và giải trình tự DNA trên hệ thống máy giải trình tự 3500 Genetic Analyzer (Thermo). Dòng *E. coli* mang trình tự mục tiêu chính xác với trình tự gốc được chọn lọc và sử dụng cho đánh giá khả năng biểu hiện của protein mục tiêu.

Bảng 1. Trình tự mỗi sử dụng trong nghiên cứu.

Mỗi	Trình tự (5' - 3')
trhACE2-F	GCTCCATGGCTCAGTCTACCATCGAAGAA
trhACE2-R	TCAGCTCGAGGATGGTGTTCAGACGTTTGA

Gạch dưới: vị trí enzyme cắt giới hạn.

2.3. Biểu hiện và tinh sạch trhACE2 từ *E. coli* bằng sắc ký ái lực

Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET28a(+)-trhACE2 được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung Km50 qua đêm và được tăng sinh thứ cấp trong môi trường LB + Km50 đến OD₆₀₀ đạt giá trị trong khoảng 0,6-0,8. Tế bào vi khuẩn được thu nhận sau ly tâm và chuyển sang môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh Km50 và Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) để cảm ứng biểu hiện protein mục tiêu. Điều kiện cảm ứng được khảo sát bao gồm các nồng độ IPTG 0, 0,1, 0,5, 1,0 mM ở các nhiệt độ 16°C (trong 16 giờ) và 37°C (trong 5 giờ). Sau thời gian cảm ứng, dịch tế bào được ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Phần cặn tế bào được hòa tan lại trong đệm ly giải (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, 1 mM PMSF); phá màng tế bào bằng sóng siêu âm với 50% biên độ, tổng thời gian là 3 phút. Dịch ly giải tế bào được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu nhận riêng dịch nổi và cặn tế bào để kiểm tra sự biểu hiện của protein mục tiêu bằng điện di SDS-PAGE.

Để thu nhận trhACE2, tiến hành cảm ứng biểu hiện protein ở quy mô 500 ml môi trường LB có bổ sung kháng sinh Km50 và chất cảm ứng IPTG nồng độ 0,1 mM ở 37°C, trong 5 giờ. Cặn tế bào *E. coli* được thu nhận, phá tế bào bằng sóng siêu âm, thu và rửa cặn trong đệm PBST (PBS có bổ sung Triton X-100 0,1%). Cặn tế bào sau đó được hoà trong NTA bind buffer (Ni-NTA buffer kit, Merck) có bổ sung urea 8M, lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi thực hiện quá trình tinh sạch bằng sắc ký ái lực trên hệ thống máy tinh sạch AKTA pure (GE Healthcare) với cột HisTrap HP 5ml (GE Healthcare) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Protein sau tinh sạch được loại urea tái gấp cuộn bằng quá trình thẩm tích (dialysis) qua đêm lần lượt trong các đệm PBS bổ sung urea với nồng độ giảm dần. Protein trhACE2 thu nhận sau tinh sạch được đánh giá bằng SDS-PAGE, phân tích độ tinh sạch của protein trên gel SDS-PAGE bằng phần mềm ImageJ. Sự hiện diện của protein mục tiêu được xác định bằng phương pháp Western blot với kháng thể sơ cấp kháng His (6*His, His-tag antibody, Hãng Proteintech) và kháng thể kháng ACE2 của người (ACE2 antibody, Hãng Proteintech); kháng thể thứ cấp là anti-mouse/rabbit IgG

(H+L) (Proteintech) tương ứng. Protein được định lượng bằng phương pháp Bradford sử dụng bộ kit Pierce™ Coomassie Protein Assay Kit (Thermo).

2.4. Phương pháp sandwich ELISA đánh giá khả năng gắn của trhACE2 với protein S

Sandwich ELISA được thực hiện lặp lại 3 lần trên đĩa ELISA 96 giếng. Đĩa ELISA được phủ với 100 µl protein S của SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 Spike S1+S2 protein, chủng delta B.1.617.2, Hãng Sino Biological) nồng độ 2 µg/ml pha trong PBS, được thêm vào từng giếng và ủ qua đêm ở 4°C, giếng đối chứng được ủ với 100 µl PBS. Các giếng sau khi ủ được rửa 3 lần bằng PBS-T (PBS có bổ sung 0,05% Tween-20) và được khoá (block) bằng 150 µl PBS bổ sung 5% huyết thanh bò (Bovine serum albumin - BSA) trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng. Các giếng sau đó được rửa 2 lần với PBS-T. trhACE2 được pha loãng trong PBS ở các nồng độ khác nhau được cho vào mỗi giếng (100 µl/giếng) và ủ ở 4°C qua đêm. Các giếng được rửa lại 4 lần với PBS-T trước khi bổ sung 100 µl kháng thể sơ cấp kháng ACE2 của người (ACE2 antibody, Hãng Proteintech) được pha loãng trong PBS-T (tỷ lệ 1:1000) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau 4 lần rửa với PBS-T, phức hợp protein S-trhACE2-kháng thể sơ cấp được phát hiện bằng thêm vào mỗi giếng 100 µl kháng thể thứ cấp anti-rabbit IgG (H+L) được pha loãng trong PBS-T (tỷ lệ 1:5000) và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các giếng được rửa bốn lần bằng PBS-T, sau đó bổ sung 50 µl tetramethyl benzidine (TMB; ThermoFisher) và ủ tối trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Các phản ứng được kết thúc bằng cách thêm 50 µl HCl 3M và đo độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm.

2.5. Đánh giá ái lực tương tác của trhACE2 với protein S bằng phân tích tương tác cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR)

Thí nghiệm SPR được thực hiện trên hệ thống Biacore X100 (Cytiva). Chip CM5 (Cytiva) được rửa bằng cách tiêm 3 lần (30 giây/lần) với buffer chứa NaCl 1M và NaOH 50 mM ở tốc độ 10 µl/phút trước khi cố định với protein S của SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2 Spike S1+S2 protein, chủng delta B.1.617.2, Hãng Sino Biological). Tương tác của trhACE2 với protein S được phân tích ở 25°C bằng cách tiêm nhiều chu kỳ của trhACE2 ở các nồng độ khác nhau ở tốc độ 30 µl/phút với các thông số: thời gian gắn tiếp xúc 180 giây, tiếp theo là thời gian phân ly 480 giây, bề mặt được tái tạo sau mỗi lần tiêm bằng buffer chứa NaCl 2 M và NaOH 0,1 M với tốc độ 30 µl/phút trong thời gian 30 giây, sau đó là thời gian ổn định 120 giây. Dữ liệu đo được tính toán theo mô hình động học 1:1 bằng phần mềm đánh giá của hệ thống Biacore X100.

3. Kết quả và bàn luận

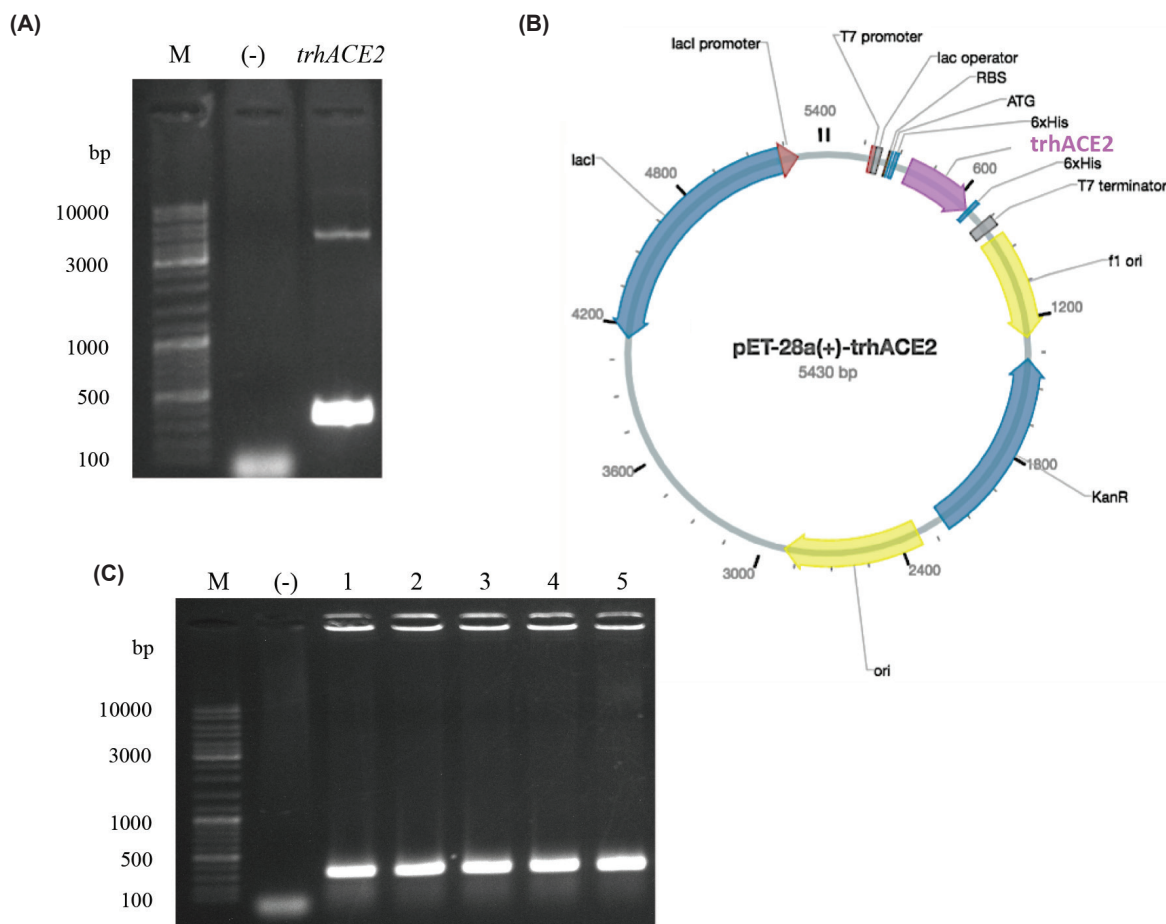
3.1. Tạo dòng *E. coli* mang vùng trình tự gen mã hoá *trhACE2*

Trình tự rút gọn của vùng ngoại bào của ACE2 người (18-119 aa) được khuếch đại từ trình tự của ACE2 đầy đủ trên plasmid pDONR221 (DNASU) bằng phản ứng PCR với cặp mồi thiết kế (bảng 1). Trình tự khuếch đại được gắn thêm trình tự của các enzyme cắt để chèn vào plasmid pET-28a(+) cho bước tạo dòng tiếp theo. Kết quả điện di sản phẩm PCR có kích thước khoảng 320 bp (hình 1A). Trình tự *trhACE2* sau khuếch đại được tinh sạch qua cột bằng bộ kit tinh sạch sản phẩm PCR (GeneJET PCR purification kit, Thermo) và cắt xử lý với enzyme *NcoI*, *XhoI* rồi chèn vào plasmid pET28a(+) đã được xử lý cắt với cùng 2 enzyme này sử dụng enzyme T4 DNA ligase. Plasmid tái tổ hợp sau khi ghép nối được đặt tên là pET28a(+)-*trhACE2* (hình 1B). Plasmid được chuyển vào tế bào *E. coli* DH5 α và BL21 (DE3) để nhân dòng và biểu hiện. Tế bào *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp phát triển trên môi trường thạch LB có bổ

sung kháng sinh Km50 được kiểm tra sự hiện diện của đoạn trình tự *trhACE2* bằng PCR khuẩn lạc (hình 1C). Kết quả giải trình tự plasmid thu nhận từ tế bào vi khuẩn kháng định plasmid tái tổ hợp mang trình tự đúng trình tự của *trhACE2*. Như vậy, chúng tôi đã tạo được dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang plasmid tái tổ hợp pET28a(+)-*trhACE2* để biểu hiện *trhACE2*.

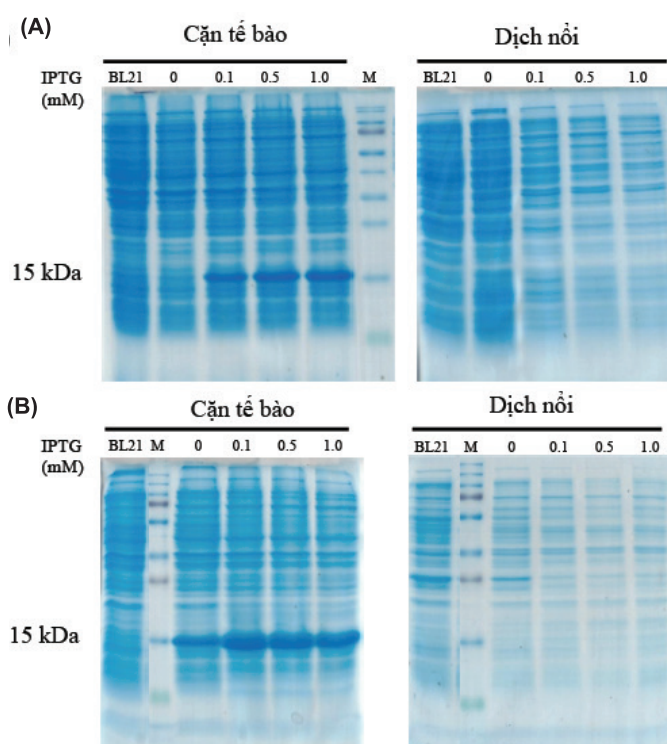
3.2. Biểu hiện và tinh sạch *trhACE2*

Plasmid pET28a(+) được sử dụng phổ biến để biểu hiện nhiều loại protein tái tổ hợp trên tế bào vi khuẩn *E. coli*. Gen mã hoá cho protein mục tiêu được kiểm soát mức độ biểu hiện bởi promoter T7 mạnh hiện diện trên plasmid, cho phép sự biểu hiện của protein mục tiêu nhiều chỉ trong thời gian ngắn. Bên cạnh đó, plasmid này còn mang thêm đuôi Histidine (His tag) ở đầu N và đầu C của protein mục tiêu, hỗ trợ cho quá trình tinh sạch thu nhận protein mục tiêu bằng sắc ký ái lực với nickel. Do vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng plasmid pET28a(+) để biểu hiện *trhACE2* trong tế bào *E. coli*. Sự biểu hiện của *trhACE2* được kiểm



Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại đoạn trình tự *trhACE2* từ plasmid pDONR221 (A); cấu trúc plasmid tái tổ hợp pET28a(+)-*trhACE2* (B); kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc kiểm tra sự hiện diện của đoạn *trhACE2* trên 5 khuẩn lạc *E. coli* BL21 (DE3) ngẫu nhiên mọc trên đĩa thạch LB bổ sung kháng sinh Km50 (C). M: thang DNA, (-): chứng âm.

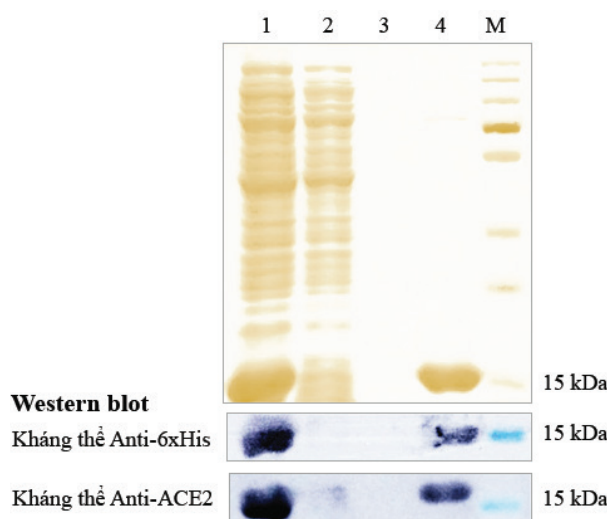
soát bởi promoter T7 hiện diện trên plasmid khi được cảm ứng bởi chất cảm ứng IPTG. Mức độ biểu hiện của trhACE2 được khảo sát ở các nồng độ IPTG khác nhau (0, 0,1, 0,5 và 1,0 mM) ở 2 điều kiện nhiệt độ cảm ứng là 16 và 37°C. Mặc dù điều kiện nhiệt độ thấp được cho là giúp cải thiện tính tan của protein mục tiêu, kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy, trhACE2 (kích thước ~15 kDa) biểu hiện chủ yếu ở trong thể vùi (cặn tế bào) so với ở dạng tan (dịch nổi) ở cả 2 điều kiện nhiệt độ cảm ứng. Ở 37°C, mức độ biểu hiện của protein mục tiêu cao hơn so với mức độ biểu hiện ở 16°C. Không có sự khác biệt mức độ biểu hiện của trhACE2 với các nồng độ IPTG khảo sát ở điều kiện cảm ứng 37°C (hình 2). Do đó, điều kiện cảm ứng ở 37°C với nồng độ IPTG là 0,1 mM được áp dụng để biểu hiện và thu nhận trhACE2 ở quy mô lớn.



Hình 2. SDS-PAGE đánh giá sự biểu hiện của trhACE2 từ tế bào *E. coli* BL21 (DE3) được cảm ứng với IPTG ở 16°C trong 16 giờ (A) và 37°C trong 5 giờ (B). M: thang protein; BL21: *E. coli* BL21 (DE3) không mang plasmid tái tổ hợp.

Protein trhACE2 tiếp tục được cảm ứng biểu hiện ở quy mô lớn và được thu nhận để tinh sạch bằng sắc ký ái lực trên cột HisTrap HP. Cột HisTrap HP mang hạt nickel sepharose có khả năng bắt giữ mạnh nhóm histidine (His), ứng dụng cho tinh sạch protein mục tiêu mang nhóm His. Kết quả điện di SDS-PAGE nhuộm bạc và Western blot kiểm tra sự hiện diện của protein trhACE2 ở các phân đoạn thu nhận trong quá trình tinh sạch được trình bày trong hình 3. Kết

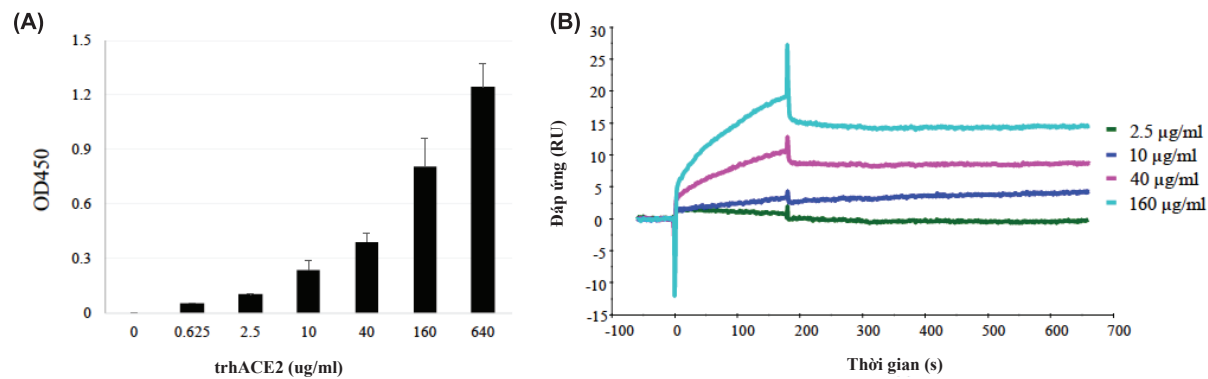
quả cho thấy, phần lớn protein mục tiêu được thu nhận trong phân đoạn thôi giải, với độ tinh sạch đạt >95% (phân tích bằng phần mềm ImageJ). Western blot với kháng thể kháng His và kháng thể đặc hiệu kháng ACE của người cho thấy tín hiệu lai đặc hiệu với protein trhACE2. Protein sau tinh sạch được loại urea tái gấp cuộn bằng quá trình thẩm tích. Hiệu suất thu nhận trhACE2 của toàn bộ quy trình đạt 75 mg/l, tương đương hiệu suất thu nhận các dạng khác nhau của ACE2 được biểu hiện từ *E. coli* đã công bố trong các nghiên cứu trước [14, 15].



Hình 3. Kết quả điện di SDS-PAGE nhuộm bạc và Western blot các phân đoạn thu nhận trong quá trình tinh sạch qua cột HisTrap HP của trhACE2. 1: mẫu trước khi qua cột; 2: phân đoạn qua cột; 3: phân đoạn rửa cột; 4: phân đoạn thôi giải; M: thang protein.

3.3. Khả năng gắn với protein gai của SARS-CoV-2 của trhACE2

Phương pháp sandwich ELISA được thực hiện để đánh giá khả năng gắn của trhACE2 với protein S của SARS-CoV-2. Đã ELISA được phủ với protein S (SARS-CoV-2 Spike S1+S2 protein, chủng delta B.1.617.2, Hãng Sino Biological). Tiếp theo đó, trhACE2 ở các nồng độ khác nhau được cho vào mỗi giếng đã phủ với protein S. Phức hợp protein S-trhACE2 được phát hiện và định lượng bằng kháng thể sơ cấp và kháng thể thứ cấp đặc hiệu với trhACE2. Kết quả cho thấy, khả năng gắn với protein S tương quan tỷ lệ với nồng độ tăng dần của protein trhACE2 (hình 4A). Ái lực tương tác của trhACE2 với protein S được xác định bằng tác động cộng hưởng plasmon bề mặt cho thấy, ái lực tương tác $K_d=15,7$ nM. Kết quả cho thấy, trhACE2 có ái lực với S protein mạnh hơn so với ACE2 dạng tự nhiên ($K_d=27,5$ nM) [16].



Hình 4. Đánh giá khả năng gắn của trhACE2 với protein S của SARS-CoV-2. (A) Sandwich ELISA đánh giá khả năng gắn trhACE2 với protein S, mức độ gắn tỷ lệ thuận với nồng độ của trhACE2, giá trị thể hiện là giá trị đo trung bình của 3 lần lặp lại $\pm$ độ lệch chuẩn (SD); **(B)** Biểu đồ tương tác (sensorgrams) của trhACE2 ở các nồng độ khác nhau với protein S được phân tích trên hệ thống Biacore X100.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã tạo được protein tái tổ hợp cho vùng trhACE2 của người trên hệ thống tế bào *E. coli* khá đơn giản, nhanh chóng với hiệu suất thu nhận protein mục tiêu cao. Các kết quả thử nghiệm cho thấy, khả năng gắn với protein S của SARS-CoV-2 của trhACE2 được tạo ra. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở cho các đánh giá tiếp theo về khả năng trung hoà và ức chế SARS-CoV-2 của trhACE2 trên mô hình tế bào cũng như đánh giá tiền lâm sàng, hứa hẹn nhiều tiềm năng phát triển các liệu pháp phòng ngừa và hỗ trợ điều trị COVID-19.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ kinh phí bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP Hồ Chí Minh. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] World Health Organization (2023), *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*, <https://COVID19.who.int/>, accessed 20 March 2023.

[2] Vietnam Ministry of Health (2023), "COVID-19 epidemic situation: Latest update from the Ministry of Health", *Vietnam Journal of Health and Life*, <https://suckhoedoisong.vn/tinh-hinh-dich-COVID-19-cap-nhat-moi-nhat-tu-bo-y-te-16921081215062562.htm>, accessed 20 March 2023 (in Vietnamese).

[3] M. Donoghue, F. Hsieh, E. Baronas, et al. (2000), "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin", *Circ. Res.*, **87**(5), pp.E1-E9, DOI: 10.1161/01.res.87.5.e1.

[4] F. Hikmet, L. Méar, Å. Edvinsson, et al. (2020), "The protein expression profile of ACE2 in human tissues", *Mol. Syst. Biol.*, **16**(7), pp.1-16, DOI: 10.15252/msb.20209610.

[5] I. Hamming, W. Timens, M.L.C. Bulthuis, et al. (2004), "Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis", *J. Pathol.*, **203**(2), pp.631-637, DOI: 10.1002/path.1570.

[6] R. Yan, Y. Zhang, Y. Li, et al. (2020), "Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2", *Science*, **367**(6485), pp.1444-1448, DOI: 10.1126/science.abb2762.

[7] A. Zoufaly, M. Poglitsch, J.H. Aberle, et al. (2020), "Human recombinant soluble ACE2 in severe COVID-19", *Lancet Respir. Med.*, **8**(11), pp.1154-1158, DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30418-5.

[8] K. Kuba, Y. Imai, S. Rao, et al. (2005), "A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury", *Nat. Med.*, **11**(8), pp.875-879, DOI: 10.1038/nm1267.

[9] D.W. Wong, G.Y. Oudit, H. Reich, et al. (2007), "Loss of angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2) accelerates diabetic kidney injury", *Am. J. Pathol.*, **171**(2), pp.438-451, DOI: 10.2353/ajpath.2007.060977.

[10] L. Samavati, B.D. Uhal (2020), "ACE2, much more than trust a receptor for SARS-COV-2", *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**(317), pp.1-9, DOI: 10.3389/fcimb.2020.00317.

[11] P. Rizzo, F.V.D. Sega, F. Fortini, et al. (2020), "COVID-19 in the heart and the lungs: Could we "Notch" the inflammatory storm?", *Basic Res. Cardiol.*, **115**(3), DOI: 10.1007/s00395-020-0791-5.

[12] J. Damas, G.M. Hughes, K.C. Keough, et al. (2020), "Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**(36), pp.22311-22322, DOI: 10.1073/pnas.2010146117.

[13] A. Basit, T. Ali, S.U. Rehman (2021), "Truncated human angiotensin converting enzyme 2; a potential inhibitor of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and potent COVID-19 therapeutic agent", *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **39**(10), pp.3605-3614, DOI: 10.1080/07391102.2020.1768150.

[14] X. Gao, K. Liang, S. Mei, et al. (2021), "An efficient system to generate truncated human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2) capable of binding RBD and spike protein of SARS-CoV2", *Protein Expr. Purif.*, **184**, DOI: 10.1016/j.pep.2021.105889.

[15] S.Y. Xu, A. Fomenkov, T.H. Chen, et al. (2021), "Expression of human ACE2 N-terminal domain, part of the receptor for SARS-CoV-2, in fusion with maltose-binding protein, *E. coli* ribonuclease I and human RNase A", *Front. Microbiol.*, **12**, DOI: 10.3389/fmicb.2021.660149.

[16] S. Kim, Y. Liu, Z. Lei, et al. (2021), "Differential interactions between human ACE2 and spike RBD of SARS-CoV-2 variants of concern", *J. Chem. Theory Comput.*, **17**(12), pp.7972-7979, DOI: 10.1021/acs.jctc.1c00965.