

Tinh chế tiểu phần LukF-PV của độc tố Panton-Valentine leukocidin từ *Staphylococcus aureus* biểu hiện trong *Escherichia coli* và tạo kháng huyết thanh ở chuột

Lê Dương Vương¹, Phan Diễm My¹, Phan Thị Phương Trang², Nguyễn Hữu Ngọc Tuấn³, Đặng Thùy Tiên⁴, Nguyễn Đức Hoàng^{1*}

¹Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm Công nghệ Sinh học Phân tử, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 227 Nguyễn Văn Cừ, phường Chợ Quán, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

³Trung tâm Nghiên cứu Y sinh và Bộ môn Sinh hóa và Sinh học phân tử, Trường Đại học Y khoa Phạm Ngọc Thạch, 2 Dương Quang Trung, phường Hòa Hưng, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

⁴Viện Khoa học Vật liệu Ứng dụng, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, phường An Phú Đông, TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 16/1/2025; ngày chuyển phản biện 21/1/2025; ngày nhận phản biện 12/2/2025; ngày chấp nhận đăng 13/2/2025

Tóm tắt:

LukF-PV là một trong hai tiểu phần của yếu tố độc lực Panton-Valentine leukocidin (PVL) của *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Tiểu phần LukF-PV có khả năng liên kết với tiểu phần LukS-PV theo tỷ lệ 4:4 để hình thành cấu trúc octameric, tạo lỗ trên màng và phá hủy tế bào bạch cầu vật chủ. Nghiên cứu này nhằm thu nhận protein LukF-PV được dung hợp với đuôi 6xHis (6xHis-LukF-PV) và tạo kháng huyết thanh trên chuột. Khi sử dụng các điều kiện nuôi cấy với nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng và thời gian sau cảm ứng phù hợp, sự biểu hiện 6xHis-LukF-PV trên chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) đạt mức khoảng 30% tổng số protein nội bào. Dựa vào sắc ký ái lực, protein 6xHis-LukF-PV đã được thu nhận với nồng độ 2,45 mg/ml, độ tinh sạch 95% và hiệu suất thu nhận 6,75 mg/l môi trường LB. Kháng huyết thanh được tạo ra từ chuột thu được có hiệu giá kháng thể 1/160.000. Các kết quả nghiên cứu có thể giúp cung cấp thông tin và nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo trong phòng ngừa và điều trị bệnh do *S. aureus* gây ra.

Từ khóa: *Escherichia coli*, LukF-PV, Panton-Valentine leukocidin, *Staphylococcus aureus*, tinh chế protein tái tổ hợp, vắc-xin.

Chỉ số phân loại: 1.6, 2.8, 3.1

Purification of the LukF-PV subunit of *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin expressed in *Escherichia coli* and generation of antiserum in mice

Duong Vuong Le¹, Diem My Phan¹, Thi Phuong Trang Phan², Huu Ngoc Tuan Nguyen³, Thuy Tien Dang⁴, Duc Hoang Nguyen^{1*}

¹Center for Bioscience and Biotechnology, Vietnam National University Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Molecular Biotechnology Laboratory, Vietnam National University Ho Chi Minh City, 227 Nguyen Van Cu Street, Cho Quan Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Biomedical Research Center and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Pham Ngoc Thach University of Medicine, 2 Duong Quang Trung Street, Hoa Hung Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

⁴Institute of Applied Materials Science, Vietnam Academy of Science and Technology, An Phu Dong Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 16 January 2025; revised 12 February 2025; accepted 13 February 2025

Abstract:

LukF-PV is one of the two subunits of the virulence factor Panton-Valentine leukocidin (PVL) produced by *Staphylococcus aureus*. The LukF-PV subunit can bind with the LukS-PV subunit in a 4:4 ratio to construct an octameric structure that creates pores in the leukocyte cell membrane, leading to leukocyte destruction. This study focused on purifying the LukF-PV protein fused with a 6xHis-Tag (6xHis-LukF-PV) and raising antiserum in mice. The expression of 6xHis-LukF-PV in *Escherichia coli* BL21(DE3) was achieved under culture conditions with appropriate temperature, inducer and time after induction, resulting in an expression level of approximately 30% of total intracellular protein. Using affinity chromatography, 6xHis-LukF-PV was purified to 95% purity, achieving a concentration of 2.45 mg/ml and a yield of 6.75 mg/l in LB medium. Antisera were generated in mice, having antiserum with a titer of 1/160,000. The results provide information and primary materials for future preventative or treatment studies against *S. aureus*.

Keywords: *Escherichia coli*, LukF-PV, Panton-Valentine leukocidin, recombinant protein purification, *Staphylococcus aureus*, vaccine.

Classification numbers: 1.6, 2.8, 3.1

*Tác giả liên hệ: Email: ndhoang@hcmus.edu.vn

1. Đặt vấn đề

Staphylococcus aureus là một vi khuẩn gây bệnh cơ hội, liên quan đến nhiều loại nhiễm trùng từ nhẹ đến nghiêm trọng, bao gồm nhiễm trùng da, mô mềm, nhiễm trùng máu, viêm phổi, và viêm nội tâm mạc. Đặc biệt, các chủng *S. aureus* kháng methicillin (MRSA) đã trở thành mối đe dọa y tế toàn cầu, làm gia tăng tỷ lệ tử vong và chi phí điều trị [1]. Hiện nay, các phương pháp phòng ngừa và điều trị bao gồm sử dụng kháng sinh và kiểm soát nhiễm khuẩn, nhưng sự gia tăng của các chủng kháng thuốc đã đặt ra thách thức lớn, thúc đẩy nhu cầu tìm kiếm các liệu pháp thay thế như kháng huyết thanh hoặc vắc-xin [2].

Một trong những yếu tố độc lực quan trọng của *S. aureus* là PVL. Độc tố này chịu trách nhiệm phá hủy các tế bào bạch cầu, gây hoại tử, apoptosis [3]. PVL được phát hiện diện với một tỷ lệ nhỏ (khoảng 5%) trong các chủng *S. aureus* lâm sàng, nhưng nó liên quan chặt chẽ với các chủng CA-MRSA (khoảng 85%), đặc biệt là các chủng gây bệnh viêm phổi, nhiễm trùng da và mô mềm [4]. Trong báo cáo lâm sàng của M.J. Alawad và cs (2023) [5], bệnh viêm phổi hoạt tử PVL-MRSA đã gây ra những biến chứng nặng có khả năng đe dọa tính mạng con người như suy hô hấp và tiêu cơ vân. Do đó, việc phát triển vắc-xin chống lại các chủng *S. aureus* có khả năng sinh PVL là thực sự cần thiết.

PVL được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1932. Giống như cấu trúc của các leukocidin khác được tìm thấy ở *S. aureus*, PVL là một độc tố hai thành phần bao gồm LukF-PV, với khối lượng phân tử 34 kDa và LukS-PV, với khối lượng phân tử 32 kDa. Hai protein oligome hóa với nhau để hình thành lỗ xuyên màng, dẫn đến sự ly giải của bạch cầu đa nhân và đại thực bào [6]. Trong quá trình oligome hóa, một lỗ rỗng hình vòng được hình thành cho phép vùng thân được đưa vào màng tế bào đích, dẫn đến sự hình thành lỗ có đường kính 1-2 nm cấu tạo bởi bốn tiểu phần S và bốn tiểu phần F [7]. Đặc

biệt, tiểu phần LukF-PV còn được cho là có khả năng tương tác đặc hiệu với các thụ thể trên bề mặt bạch cầu như C5aR và C5L2, góp phần vào cơ chế né tránh miễn dịch của vi khuẩn [8]. Mặc dù các nghiên cứu trước đây đã phân tích tổng thể vai trò của PVL trong cơ chế bệnh sinh, việc tập trung vào tiểu phần LukF-PV như một mục tiêu tiềm năng để phát triển liệu pháp điều trị vẫn còn hạn chế.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện tiểu phần LukF-PV tái tổ hợp trong hệ thống chủng chủ *E. coli*. Sau quá trình tinh sạch, protein 6xHis-LukF-PV tái tổ hợp này được sử dụng để gây miễn dịch trên chuột, tạo ra kháng huyết thanh đặc hiệu với LukF-PV. Đây là cơ sở quan trọng cho việc phát triển các liệu pháp miễn dịch chống lại *S. aureus*, như kháng huyết thanh hoặc vắc-xin. Nghiên cứu này càng trở nên quan trọng trong bối cảnh các giải pháp hiện tại như kháng sinh đang dần mất hiệu quả trước sự gia tăng của các chủng *S. aureus* kháng thuốc [9].

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Trong nghiên cứu này, chủng *E. coli* OmniMAX (Invitrogen) được sử dụng để tạo dòng plasmid gen LukF-PV. Chủng *E. coli* BL21(DE3) (Thermo Scientific) được lựa chọn để biểu hiện protein LukF-PV. Plasmid khung sườn pET28a(+) (Novagen) có promoter T7 và vùng trình tự mã hóa đuôi 6xHis. Plasmid pHT2332 [10] mang gen LukF-PV tổng hợp được sử dụng làm khuôn cho PCR.

2.2. Tạo dòng plasmid biểu hiện mang gen LukF-PV

Plasmid biểu hiện pHT2352 được tạo ra như sau. Gen LukF-PV được thu nhận từ vector pHT2332 bằng phương pháp PCR sử dụng hai cặp mồi đặc hiệu ON2369 (5'- GCCGCGGGCAGCCATATGGATGCTGCTCAACATATT

ACACCG -3') để thêm vị trí nhận biết cắt của enzyme *NdeI* và ON2370 (5'- GGTGGTGGTGCTCGAGTTTAGACG TCAGACATAGGGTTCTTTTC-3') để thêm vị trí nhận biết cắt của enzyme *XhoI*. Gen LukF-PV được nhân bản bằng enzyme *Pfu* DNA polymerase. Sản phẩm PCR thu gen (953 bp) và plasmid khung pET28a+ lần lượt được xử lý với cặp enzyme cắt giới hạn *NdeI/XhoI* rồi nối lại với nhau bằng T4 DNA ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào chủng tạo dòng là *E. coli* OmniMAX [11] và sàng lọc trên môi trường LB-Kan-Agar. PCR khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu ON1461 (5'-GGTGATGTCGGCGATATAGGA-3' gắn với vùng trình tự trên plasmid khuôn) và ON2370(5'-GGTGGTGGTGC TCGAGTTAGACGTCAGACATAGGGTTCTTTTC-3' gắn với vùng trình tự trên gen LukF-PV). Khuẩn lạc cho sản phẩm PCR tương ứng kích thước thiết kế (953 bp) được nuôi cấy, tách plasmid và giải trình tự (thực hiện bởi Macrogen Inc., Hàn Quốc) bằng cặp mồi ON1659(5'-CCC GCGAAATTAATACGACTCACTATA GG-3')/ON1462(5'CCGTTTAGAGGCCCAAGG-3').

2.3. Biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV trong *E. coli*

Plasmid pHT2352 được biến nạp vào chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV. Các điều kiện biểu hiện protein được khảo sát là: nhiệt độ (23, 30, 37°C), nồng độ IPTG cảm ứng (0-1 mM) và thời điểm thu mẫu sau cảm ứng (0-12 giờ). Các mẫu khảo sát được thu nhận với cùng lượng tế bào (tương ứng với 1 ml dịch nuôi có OD_{600 nm}=6) và được phá tế bào bằng sóng siêu âm. Sau khi ly tâm 100 µl mẫu với lực ly tâm 13.000 ×g trong 5 phút để phân tách, các phân đoạn protein tủa (P-pellet), tan (S-Soluble) tiếp tục được biến tính bằng cách bổ sung 25 µl Sample 5X (250 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% SDS, 10% Glycerol, 10 mM DTT, 0,05% Bromophenol Blue) và ủ ở 95°C trong 5 phút. Mức độ biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV ở các điều kiện được kiểm tra bằng phương pháp SDS-PAGE và phân tích bằng phần mềm AlphaEase FC.

2.4. Thu nhận protein 6xHis-LukF-PV bằng sắc ký ái lực (IMAC)

Protein 6xHis-LukF-PV được tinh sạch thông qua sắc ký ái lực kim loại (IMAC) trên cột HisTrap™ HP. Mẫu sinh khối *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 được hòa tan trong dung dịch đệm Tris (Tris-HCl 30 mM pH 8,0; NaCl 500 mM, 5% Glycerol) phá tế bào bằng sóng siêu âm và ly tâm 3 lần với lực ly tâm 19.000 ×g trong 15 phút. Phần dịch nổi chứa các protein trong phân đoạn tan được lọc bằng màng nitrocellulose (kích thước lỗ 0,22 µm) và bơm qua cột sắc ký HisTrap™ HP để tiến hành tinh chế. Quá trình ly giải để thu nhận protein 6xHis-LukF-PV được thực hiện bằng dung dịch đệm Tris được bổ sung chất ly giải là Imidazole (với nồng độ tăng dần theo gradient 10-500 mM). Các phân đoạn protein ly giải được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Nồng độ protein tinh sạch được xác định dựa trên phương pháp đo sự hấp thụ quang phổ UV-Vis (UV-Vis spectroscopy) và hệ số Molar extinction coefficient của protein 6xHis-LukF-PV [12].

2.5. Sắc ký lỏng ghép khối phổ hai lần (LC-MS/MS)

Quá trình phân cắt protein được thực hiện thông qua việc sử dụng enzyme trypsin (Merck, Đức). Để thực hiện quá trình phân cắt, 0,25 mg protein tinh sạch được hòa tan bằng 200 µl dung dịch đệm NH₄HCO₃ (pH 7,5) và thêm 5 µl trypsin. Quá trình phân cắt bằng enzyme được thực hiện bằng cách ủ mẫu ở nhiệt độ 37°C trong 16 giờ.

Giải trình tự bằng cách sử dụng dữ liệu MS/MS kết hợp cơ sở dữ liệu Cyclotide được thực hiện như sau. Mẫu protein 6xHis-LukF-PV tinh sạch được phân tích trình tự peptide bằng phương pháp Liquid chromatography - Tandem mass spectrometry/ Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Mẫu sau khi được phân cắt bằng enzyme trypsin cắt tại các vị trí đặc hiệu, tạo ra các đoạn peptide ngắn. Các peptide thu được sau quá trình thủy phân được đưa vào hệ thống LC-MS/MS. Phân tích được tiến hành ở tốc độ dòng

chảy 0,3 ml/phút. Pha động bao gồm hai dung môi, cụ thể là A và B. Dung môi A được chuẩn bị bằng cách kết hợp 0,1% FA (Fisher Scientific, Hoa Kỳ) với miliQ-H₂O... Dung môi B được chuẩn bị bằng cách thêm acetonitrile (Fisher Scientific, Hoa Kỳ) với 0,1% FA... Độ dốc rửa giải được lập trình để tăng nồng độ dung môi B từ 10 lên 90% trong khoảng thời gian 37 phút. Quá trình phân tích sử dụng cột XBridge C18 3,5 μ m, 2,1x150 mm trên máy quang phổ khối TripleTOF 6600+ (AB SCIEX), được trang bị Phân tích TF 1.8. Trong đó, giai đoạn LC tách các peptide dựa trên đặc tính hóa lý, và MS/MS thực hiện phân tích khối phổ. Phổ MS/MS được phân tích bằng phương pháp tìm kiếm ProteinPilot. Giải trình tự thủ công được thực hiện và các đoạn được căn chỉnh bằng Biokit trên PeakView@2.2 để đảm bảo độ chính xác của các đoạn được giải trình tự.

2.6. Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột bằng protein 6xHis-LukF-PV

Protein 6xHis-LukF-PV sau khi tinh sạch được pha loãng đến nồng độ 1 mg/ml và trộn với tá chất Freund theo tỷ lệ khối lượng 1:1 để tạo thành hỗn hợp tiêm. Quy trình gây đáp ứng miễn dịch trên chuột Swiss (8 tuần tuổi) bằng phương pháp tiêm dưới da được thực hiện theo thứ tự lần lượt là: hai lần tiêm hỗn hợp protein với tá chất FCA để kích hoạt hệ miễn dịch của chuột và hai lần tiêm nhắc hỗn hợp protein với tá chất Freund's incomplete adjuvant (FIA). Thể tích mỗi lần tiêm là 100 μ l và các lần tiêm cách nhau hai tuần. Thí nghiệm được thực hiện trên bốn con chuột, trong đó một con làm đối chứng chỉ tiêm tá chất, ba con còn lại tiêm hỗn hợp protein kháng nguyên 6xHis-LukF-PV. Các mẫu máu được thu trước lần tiêm đầu tiên và sau lần tiêm nhắc cuối cùng. Huyết thanh được thu nhận bằng cách ly tâm lạnh 6.000 $\times$ g ở 4°C trong 10 phút.

Thí nghiệm này được thực hiện với sự chấp thuận (cho phép) về các khía cạnh y đức trong nghiên cứu của Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu tại Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng TP Hồ Chí Minh (ngày 01/03/2020).

2.7. Xác định hiệu giá kháng thể bằng phương pháp ELISA

Protein 6xHis-LukF-PV được pha loãng về các nồng độ 20, 10, 5, 2 và 1 μ g/ml, cố định trong các giếng

ELISA trên đĩa Nunc. Các giếng ELISA được bổ sung 100 μ l huyết thanh được gây đáp ứng miễn dịch chủ động bằng protein 6xHis-LukF-PV (tỷ lệ pha loãng 1/5.000; 1/10.000; 1/20.000; 1/40.000; 1/80.000; 1/160.000 và 1/320.000) và tiến hành ủ qua đêm. Sau khi rửa sạch 5 lần bằng PBS-T, các mẫu ELISA tiếp tục được ủ với 100 μ l kháng thể thứ cấp Anti-mouse IgG peroxidase (nồng độ pha loãng là 1/10.000) ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Cơ chất TMB được sử dụng để phản ứng tạo màu với enzyme peroxidase. Độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm của từng mẫu ELISA được xác định bằng máy đọc đĩa CLARIOStar (BMG Labtech, Đức). Giá trị ngưỡng dương tính (Cut-off value) được xác định bằng " $X + 3 \times SD$ " với X: là giá trị trung bình của mẫu đối chứng âm, SD: là độ lệch chuẩn của giá trị chứng âm ở các lần lặp lại [13].

3. Kết quả

3.1. Tạo dòng plasmid pHT2352 mang gen mã hóa protein 6xHis-LukF-PV

Plasmid pHT2352 được tạo ra dựa trên plasmid khung sườn pET28a+ và gen LukF-PV được thu nhận từ plasmid pHT2332. Kết quả giải trình tự DNA từ khuẩn lạc có PCR khuẩn lạc dương tính cho thấy, trình tự thu được hoàn toàn trùng khớp (100%) với trình tự thiết kế *in silico* (dữ liệu không được trình bày). Điều này xác nhận rằng plasmid pHT2352 mang gen mã hóa protein 6xHis-LukF-PV đã được tạo dòng thành công. Sơ đồ chi tiết về plasmid pHT2352 được trình bày trong hình 1A.

3.2. Biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV trong *E. coli*

Plasmid pHT2352 đã được biến nạp vào chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) để tạo ra chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 có khả năng biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV dưới sự điều khiển của promoter T7. Khả năng biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV của chủng chủ này đã được khảo sát dưới các điều kiện khác nhau về nhiệt độ (23, 30, 37°C), nồng độ IPTG cảm ứng (0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 mM), và thời gian thu mẫu sau khi cảm ứng (từ 0 đến 12 giờ). Kết quả khảo sát cho thấy, so với mẫu chứng âm *E. coli* BL21(DE3)/pET28a+ (không mang gen LukF-PV nên không có vạch protein mục tiêu), tất cả mẫu khảo sát có cảm ứng đều có thêm sự xuất hiện của vạch protein

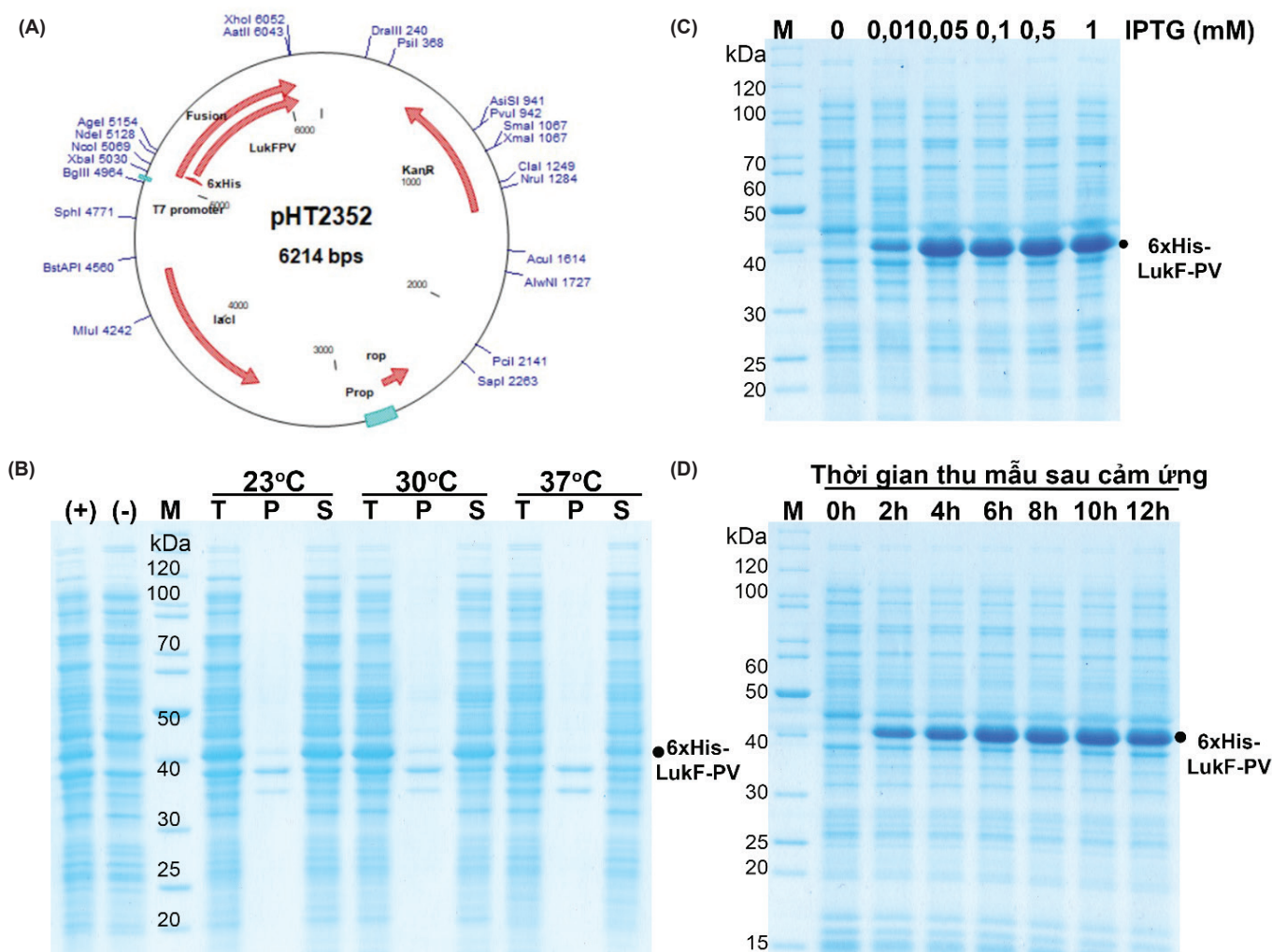
6xHis-LukF-PV khoảng 40 kDa (hình 1B). Tuy nhiên, kích thước của các vạch protein lại lệch so với kích thước theo thiết kế *in silico* của 6xHis-LukF-PV (35 kDa). Dù vậy, sự biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV sẽ được xác minh lại trong các bước nghiên cứu tiếp theo.

Kết quả khảo sát nhiệt độ cho thấy, hai điều kiện 23 và 30°C có sự biểu hiện vượt trội so với 37°C. Khi xét về pha tan, vạch protein 6xHis-LukF-PV ở mẫu 23°C có chỉ số định lượng tương đối Area (phân tích bằng phần mềm AlphaEaseFC) cao hơn 8% vạch protein của mẫu 30°C. Do đó, nhiệt độ 23°C được xác định là điều kiện phù hợp để chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV ở pha tan. Đối với khảo sát nồng độ IPTG

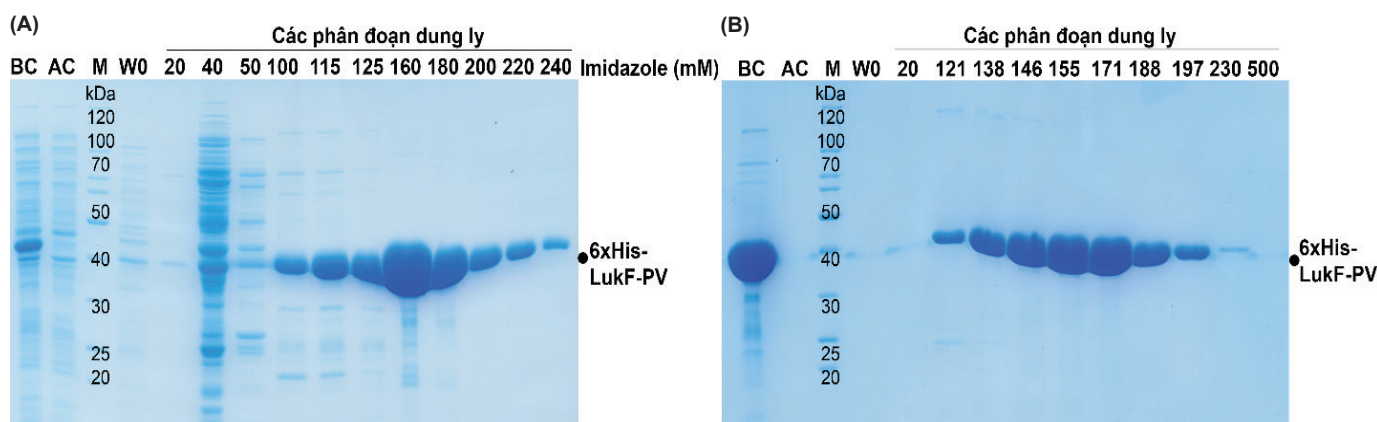
(hình 1C) và thời gian thu mẫu (hình 1D), điều kiện 0,05 mM IPTG và thu mẫu sau 10 giờ cảm ứng được xác định là điều kiện phù hợp. Kết quả phân tích bằng phần mềm AlphaEase FC cho thấy, với điều kiện ở nhiệt độ 23°C, 0,05 mM IPTG và thời điểm thu mẫu 10 giờ sau cảm ứng, protein 6xHis-LukF-PV chiếm khoảng 30% tổng số protein nội bào.

3.3. Tinh sạch protein 6xHis-LukF-PV

Khi tiến hành nuôi cấy với các điều kiện đã khảo sát: nhiệt độ 23°C, 0,05 mM IPTG và thời điểm thu mẫu 10 giờ sau cảm ứng, khối lượng sinh khối của chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 đạt được sau khi nuôi cấy là 22,81 g từ 4,5 l môi trường LB-Kan. Sau quá trình phá tế bào



Hình 1. Sự biểu hiện protein 6xHis-LukF-PV trong *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352: (A) plasmid pHT2352; (B) khảo sát nhiệt độ biểu hiện 6xHis-LukF-PV: mẫu tổng (T), mẫu tủa (P), mẫu tan (S); (C) khảo sát các nồng độ IPTG cảm ứng; (D) khảo sát thời gian thu mẫu sau cảm ứng. M: thang protein; (+) *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 đã được cảm ứng; (-) *E. coli* BL21(DE3)/pET28a+.



Hình 2. Kết quả tinh chế thu nhận protein 6xHis-LukF-PV bằng cột HisTrap™ HP. (A) lần tinh chế 1; (B) lần tinh chế 2. M: thang protein; BC (before column): dịch phá tế bào của *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 đã được cảm ứng trước khi qua cột HisTrap™ HP; AC (after column): dịch protein thu nhận sau khi đi qua cột HisTrap™ HP; W0 (wash fraction): phân đoạn rửa cột với Buffer 0 mM Imidazole.

bằng sóng siêu âm và ly tâm để thu nhận pha tan, protein dung hợp 6xHis-LukF-PV được tinh sạch thông qua cột sắc ký ái lực HisTrap™ HP, nhờ sự tương tác giữa đuôi 6xHis của protein và các hạt Ni-NTA. Kết quả SDS-PAGE (hình 2A) cho thấy, các phân đoạn được rửa giải với nồng độ Imidazole từ 100 mM đến 240 mM xuất hiện vạch protein đậm với kích thước khoảng 40 kDa, giống với kích thước ở phần khảo sát. Điều này chứng tỏ vạch protein mà đề tài quan tâm có đuôi dung hợp 6xHis và có thể đúng là protein mục tiêu 6xHis-LukF-PV.

Ngoài ra, do các phân đoạn ly giải có sự tồn tại của các vạch protein tạp nên các phân đoạn có protein 6xHis-LukF-PV được gộp lại, thẩm tách loại Imidazole bằng dung dịch đệm Tris và tiếp tục được tinh sạch bằng cột HisTrap™ HP lần 2. Kết quả tinh chế lần 2 (hình 2B) cho thấy, hầu hết các vạch protein tạp đã được loại bỏ. Protein 6xHis-LukF-PV đã được thu nhận với nồng độ 2,45 mg/ml và độ tinh khiết trên 95% (đủ điều kiện để thực hiện thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch trên chuột). Sản lượng thu nhận protein 6xHis-LukF-PV từ chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 là 6,75 mg/l môi trường LB-Kan hay 1,33 mg/g sinh khối ướt.

3.4. Xác nhận 6xHis-LukF-PV bằng khối phổ LC-MS/MS

Trước khi tiến hành phản ứng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột, đề tài tiến hành xác nhận phân đoạn protein tinh sạch bằng phương pháp LC-MS/MS. Protein tinh

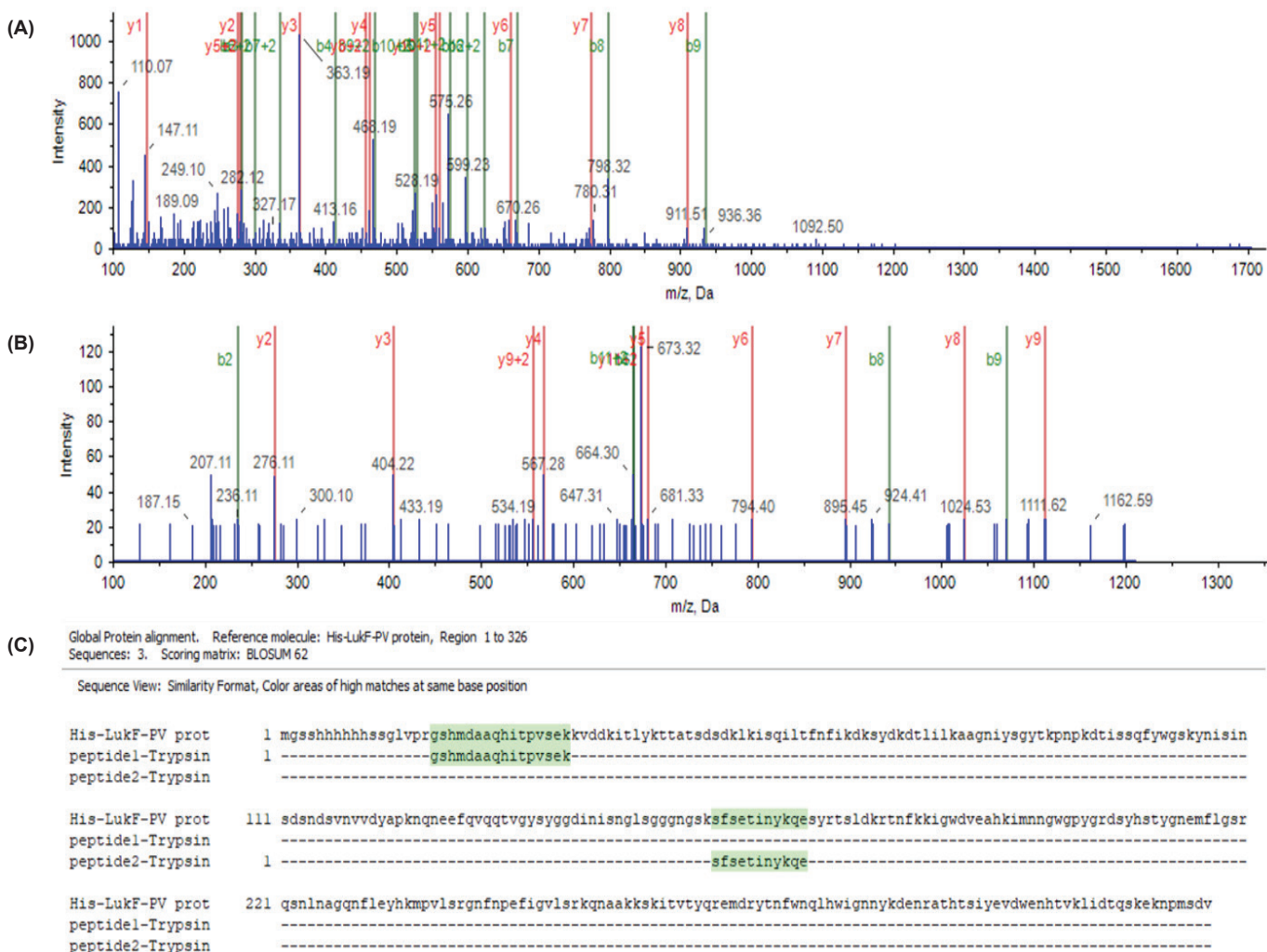
sạch được thủy phân bằng enzyme Trypsin tạo ra nhiều đoạn peptide ngắn. Các ion y và b (tương ứng với peptide) có cường độ cao nhất được phân lập, phân mảnh và được phổ MS/MS ghi lại. Hình 3 mô tả một số mảnh đã phân cắt, cụ thể là các mảnh được tạo ra thông qua quá trình phân hủy enzyme trypsin và hỗn hợp trypsin và endo GluC. Trong đó, hai phân đoạn peptide GSHMDAAQHITPVSEK (hình 3A) và SFSETINYKQE (hình 3B) được chọn để minh họa cho dữ liệu khối phổ MS/MS. Hình 3A, 3B nổi bật với độ lặp lại, tin cậy cao; tương ứng với các trình tự ở vùng đầu N và vùng giữa của protein LukF-PV.

Sau đó, các mảnh peptide được phân tích để giải trình tự peptide bằng cách tìm kiếm cơ sở dữ liệu protein của các mảnh kết quả. Việc xác định protein chưa biết được thực hiện bằng cách khớp các khối lượng peptide nhiều kết quả với công cụ tìm kiếm. Công cụ tìm kiếm ProteinPilot được sử dụng để phân tích phổ MS/MS. Hơn nữa, một phương pháp giải trình tự thủ công được sử dụng trong đó các đoạn được liên kết bằng Bio Tool Kit trên PeakView@ 2.2 để xác nhận độ chính xác của các đoạn được giải trình tự. Hai trình tự của hai đoạn peptide được so sánh với trình tự của protein His-LukF-PV. Kết quả hình 3C cho thấy, có sự trùng khớp với trình tự protein. Vì vậy, chúng tôi protein tinh sạch mà nhóm nghiên cứu thu nhận được đúng là protein 6xHis-LukF-PV.

3.5. Tạo kháng huyết thanh kháng 6xHis-LukF-PV ở chuột

Sau quá trình gây đáp ứng miễn dịch, huyết thanh của 3 con chuột được trộn lại với nhau thành một mẫu gộp đồng nhất để kiểm tra sự tương tác của kháng huyết thanh chuột thu nhận với kháng nguyên 6xHis-LukF-PV bằng phương pháp ELISA với các nồng độ kháng nguyên và kháng thể khác nhau. Sự tương tác của kháng nguyên 6xHis-LukF-PV và kháng thể trong huyết thanh thu nhận từ chuột được gây đáp ứng miễn dịch được xác định dựa trên phản ứng tạo màu giữa cơ chất TMB và enzyme peroxidase (được gắn trên kháng thể thứ cấp). Độ hấp

thu của mẫu ELISA tại bước sóng 450 nm ($OD_{450\text{ nm}}$) càng cao chứng tỏ sự tương tác kháng nguyên - kháng thể càng mạnh hay lượng kháng thể kháng 6xHis-LukF-PV trong huyết thanh chuột được gây đáp ứng miễn dịch càng nhiều. Nếu giá trị $OD_{450\text{ nm}}$ thấp hơn ngưỡng dương tính thì sự tương tác kháng nguyên-kháng thể được xem là không đáng kể (hay âm tính). Kết quả ELISA (hình 4 và bảng 1) cho thấy, kháng nguyên 6xHis-LukF-PV với nồng độ thấp nhất 1 $\mu\text{g/ml}$ có khả năng tương tác kháng huyết thanh được thu nhận từ chuột (giá trị $OD_{450\text{ nm}}$ lớn hơn ngưỡng dương tính) với độ pha loãng của kháng huyết thanh (hiệu giá kháng thể) là 1/160.000.

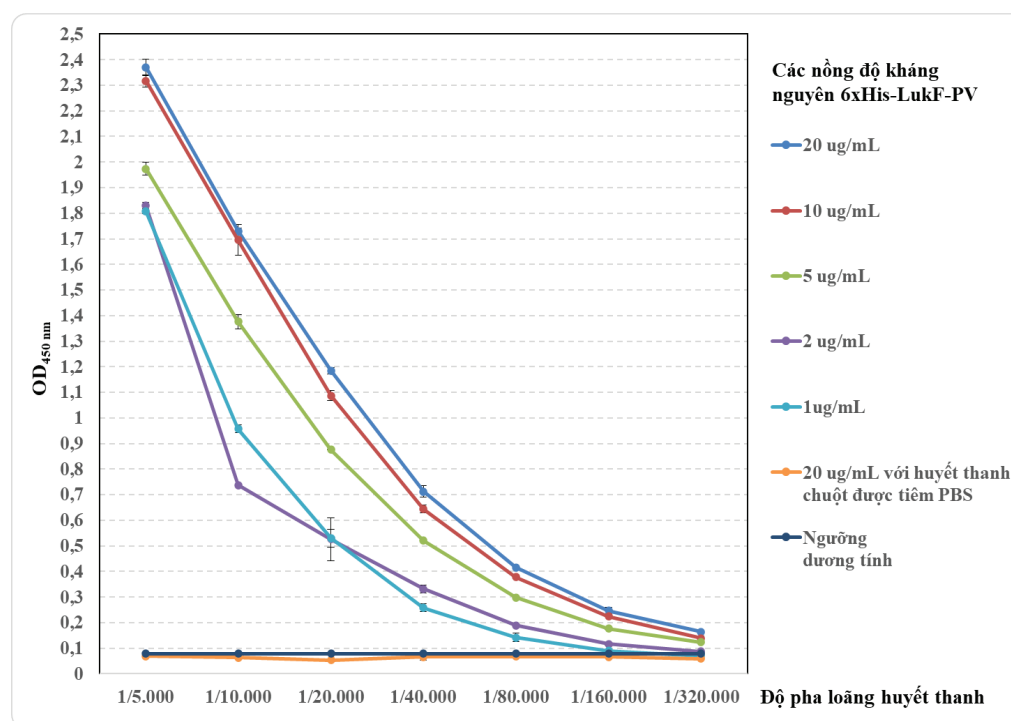


Hình 3. Kết quả xác nhận protein 6xHis-LukF-PV bằng phương pháp LC-MS/MS. (A) Khối phổ LC-MS/MS của đoạn peptide GSHMDAAQHITPVSEK; **(B)** Khối phổ LC-MS/MS của đoạn peptide SFSETINYKQE; **(C)** Kết quả so sánh giữa trình tự 2 đoạn peptide và trình tự của protein 6xHis-LukF-PV có sự trùng khớp.

Bảng 1. Số liệu các phản ứng ELISA của kháng huyết thanh chuột với kháng nguyên 6xHis-LukF-PV

Độ pha loãng huyết thanh	Các nồng độ kháng nguyên 6xHis-LukF-PV					Đối chứng (20 µg/ml 6xHis-LukF-PV với huyết thanh chuột tiêm PBS)
	20 µg/ml	10 µg/ml	5 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	
1/5.000	2,37±0,031	2,317±0,023	1,974±0,026	1,83±0,013	1,808±0,011	0,069±0,001
1/10.000	1,731 ±0,013	1,695±0,06	1,376±0,027	0,737±0,005	0,957±0,016	0,064±0,002
1/20.000	1,185±0,013	1,088±0,021	0,876±0,002	0,527±0,084	0,53± 0,036	0,054±0,004
1/40.000	0,713±0,023	0,644±0,016	0,521±0,007	0,332±0,016	0,259±0,015	0,067±0,013
1/80.000	0,417±0,003	0,379±0,003	0,298±0,003	0,19±0,001	0,143±0,016	0,068±0,002
1/160.000	0,247±0,012	0,225±0,002	0,177±0,004	0,117±0,004	0,09±0,001	0,067±0,002
1/320.000	0,164±0,007	0,139±0,009	0,123±0,001	0,088±0,001	0,071±0,001	0,059±0,003

Ngưỡng dương tính (Cut-off value) = 0,079.



Hình 4. Đồ thị biểu diễn sự tương tác của kháng huyết thanh chuột với kháng nguyên 6xHis-LukF-PV bằng phương pháp ELISA. OD_{450 nm}: độ hấp thụ ánh sáng của mẫu ELISA tại bước sóng 450 nm, phản ánh sự tương tác kháng nguyên - kháng thể.

4. Bàn luận

Các kết quả được trình bày trong nghiên cứu này đã cho thấy tiềm năng sản xuất và ứng dụng protein 6xHis-LukF-PV biểu hiện bởi chủng *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352 trong nghiên cứu phát triển vắc-xin kháng

S. aureus. Tuy nhiên, một số vấn đề cần được bàn luận. Thứ nhất, khi xét về sản lượng thu nhận trên *E. coli*, cao nhất đạt mức 946 mg protein/l môi trường [14], sản lượng 6,75 mg 6xHis-LukF-PV/l môi trường LB chỉ thuộc mức thấp. Dù vậy, kết quả này vẫn đáp ứng được mục tiêu chính của nghiên cứu này là thu nhận lượng protein 6xHis-LukF-PV có độ tinh sạch cao và số lượng đủ để tiến hành khảo sát tính sinh miễn dịch. Việc gia tăng sản lượng thu nhận hoàn toàn có thể thực hiện trong những nghiên cứu

tiếp theo khi tiến hành tối ưu các điều kiện nuôi cấy (nhiệt độ, nồng độ IPTG, thời gian thu mẫu, nồng độ Oxy trong môi trường...) hay các thành phần đa và vi lượng bằng các phương pháp thống kê. Vấn đề thứ hai là, sự

khác biệt về kích thước của protein mục tiêu 6xHis-LukF-PV theo dự đoán lý thuyết dựa trên trình tự amino acid là 35 kDa với kích thước vạch protein tinh chế trên gel SDS-PAGE khoảng 40 kDa. Theo những nghiên cứu khác trên thế giới, sự khác biệt này có thể là do như sự gắn SDS không đồng đều do tính acid/base, tính kỵ nước hay các cấu trúc đặc biệt của protein [16, 17]. Thực tế, protein này khá đặc biệt có pI là 9,14 và có lẽ vì điều này dẫn đến sự khác biệt kích thước thể hiện trên SDS-PAGE. Thứ ba là về đuôi dung hợp 6xHis. Câu hỏi đặt ra là liệu đuôi dung hợp này có ảnh hưởng đến sự tạo kháng thể kháng LukF-PV hay không. Một ví dụ điển hình là nghiên cứu của T.W. Lin và cs (2022), sự dung hợp đuôi 6xHis đã làm giảm đáng kể tính sinh miễn dịch của SARS-CoV-2 RBD protein [18]. Do đó, trong nghiên cứu tiếp theo, đuôi 6xHis sẽ được thiết kế để loại bỏ sau quá trình tinh chế theo mô hình tinh chế hai bước dựa trên TEV protease [19] hoặc HRV3C protease [20]. Cuối cùng là về hiệu giá kháng thể, một chỉ số quan trọng trong việc đánh giá hiệu quả của một loại vắc-xin hoặc liệu pháp miễn dịch. Hiệu giá kháng thể 1/160.000 chứng tỏ huyết thanh từ chuột được gây đáp ứng miễn dịch bằng protein tái tổ hợp 6xHis-LukF-PV tồn tại lượng lớn kháng thể kháng lại kháng nguyên này. Đồng thời, giá trị này cho thấy sự tương tác mạnh của kháng huyết thanh với kháng nguyên 6xHis-LukF-PV, cho thấy tiềm năng trung hòa độc tố PVL của kháng huyết thanh (đề tài thu nhận) như các kháng thể kháng LukF-PV trong các nghiên cứu trước như của B.J. Laventie và cs (2011) [21] hay H. Karauzum và cs (2013) [22]. Trong tương lai, chúng tôi sẽ tiếp tục tiến hành khảo sát sự phối trộn protein LukF-PV với LukS-PV (hoặc các yếu tố độc lực khác của *S. aureus* như LukA, Hla, MntC...) nhằm tạo ra kháng huyết thanh có tỷ lệ bảo hộ cao, có khả năng trung hòa độc tố PVL cũng như vắc-xin đa dòng kháng *S. aureus*.

5. Kết luận

Trong nghiên cứu này, protein 6xHis-LukF-PV biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3)/pHT2352) đã được thu nhận với độ tinh sạch cao. Protein được xác nhận bằng khối phổ. Kháng huyết thanh từ chuột có hiệu giá kháng thể đạt 1/160.000. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở và nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo trong phòng ngừa, điều trị bệnh gây ra bởi *S. aureus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F.D. Lowy (1998), "Staphylococcus aureus infections", *New England Journal of Medicine*, **339**, pp.520-532, DOI: 10.1056/NEJM199808203390806.
- [2] V.G. Fowler, J.M. Miro, B. Hoen, et al. (2005), "Staphylococcus aureus endocarditis: A consequence of medical progress", *JAMA*, **293**, pp.3012-3021, DOI: 10.1001/jama.293.24.3012.
- [3] D.R. Bhatta, L.M. Cavaco, G. Nath, et al. (2016), "Association of panton valentine leukocidin (PVL) genes with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Western Nepal: A matter of concern for community infections (a hospital based prospective study)", *BMC Infectious Diseases*, **16**, DOI: 10.1186/s12879-016-1531-1.
- [4] D. Oliveira, A. Borges, M. Simões (2018), "Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases", *Toxins*, **10**, DOI: 10.3390/toxins10060252.
- [5] M.J. Alawad, S. Zara, A. Elgohari, et al. (2023), "Catastrophic complications of PVL-MRSA necrotizing pneumonia presenting as respiratory failure and rhabdomyolysis, case report and review of the literature", *Clinical Case Reports*, **11**, DOI: 10.1002/ccr3.6809.
- [6] M.J. Aman, H. Karauzum, M.G. Bowden, et al. (2010), "Structural model of the pre-pore ring-like structure of panton-valentine leukocidin: Providing dimensionality to biophysical and mutational data", *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **28**, pp.1-12, DOI: 10.1080/073911010010524952.
- [7] A.N. Spaan, J.A.G.V. Strijp, V.J. Torres (2017), "Leukocidins: Staphylococcal bi-component pore-forming toxins find their receptors", *Nature Reviews Microbiology*, **15**, pp.435-447, DOI: 10.1038/nrmicro.2017.27.
- [8] M.J. Aman, R.P. Adhikari (2014), "Staphylococcal bicomponent pore-forming toxins: Targets for prophylaxis and immunotherapy", *Toxins*, **6**, pp.950-972, DOI: 10.3390/toxins6030950.

- [9] B. Maddiboyina, H. Roy, M. Ramaiah, et al. (2023), "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Novel treatment approach breakthroughs", *Bulletin of The National Research Centre*, **47**, p.95, DOI: 10.1186/s42269-023-01072-3.
- [10] N.N. Nguyen, L. Duong, M.B. Doan, et al. (2025), "Surface display of LukF-PV on *Bacillus subtilis* spore for oral administration", *Future Microbiology*, **20**, pp.469-477, DOI: 10.1080/17460913.2025.2480933.
- [11] A. Froger, J.E. Hall (2007), "Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method", *Journal of Visualized Experiments*, DOI: 10.3791/253.
- [12] B.J.S.C. Olson (2016), "Assays for determination of protein concentration", *Current Protocols in Pharmacology*, **73**, pp.A.3A.1-A.3A.32, DOI: 10.1002/cpph.3.
- [13] F. Lardeux, G. Torrico, C. Aliaga (2016), "Calculation of the ELISA's cut-off based on the change-point analysis method for detection of *Trypanosoma cruzi* infection in Bolivian dogs in the absence of controls", *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **111**, pp.501-504, DOI: 10.1590/0074-02760160119.
- [14] L.G. Morão, L.R. Manzone, L.O.D. Clementino, et al. (2022), "A scalable screening of *E. coli* strains for recombinant protein expression", *PLOS ONE*, **17**, DOI: 10.1371/journal.pone.0271403.
- [15] D. Pal, G. Patel, P. Dobariya, et al. (2021), "Optimisation of medium composition to increase the expression of recombinant human interferon- β using the Plackett-Burman and central composite design in *E. coli* SE1", *3 Biotech*, **11**, DOI: 10.1007/s13205-021-02772-1.
- [16] A. Rath, M. Glibowicka, V.G. Nadeau, et al. (2009), "Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins", *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, pp.1760-1765, DOI: 10.1073/pnas.0813167106.
- [17] P. Tiwari, P. Kaila, P. Guptasarma (2019), "Understanding anomalous mobility of proteins on SDS-PAGE with special reference to the highly acidic extracellular domains of human E- and N-cadherins", *Electrophoresis*, **40**, pp.1273-1281, DOI: 10.1002/elps.201800219.
- [18] T.W. Lin, P.H. Huang, B.H. Liao, et al. (2022), "Tag-free SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD), but not C-terminal tagged SARS-CoV-2 RBD, induces a rapid and potent neutralizing antibody response", *Vaccines*, **10**, DOI: 10.3390/vaccines10111839.
- [19] D.V. Le, T. Phan, H. Nguyen (2024), "Production of tobacco etch virus protease (TEV) expressed in the endotoxin-free *Bacillus subtilis* and its application", *Current Microbiology*, **81**, p.376, DOI: 10.1007/s00284-024-03907-2.
- [20] V.D. Le, T.T.P. Phan, T.M. Nguyen, et al. (2019), "Using the IPTG-inducible Pgrac212 promoter for overexpression of human rhinovirus 3C protease fusions in the cytoplasm of *Bacillus subtilis* cells", *Current Microbiology*, **76**, pp.1477-1486, DOI: 10.1007/s00284-019-01783-9.
- [21] B.J. Laventie, H.J. Rademaker, M. Saleh, et al. (2011), "Heavy chain-only antibodies and tetravalent bispecific antibody neutralizing *Staphylococcus aureus* leukotoxins", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, **108**, pp.16404-16409, DOI: 10.1073/pnas.1102265108.
- [22] H. Karauzum, R.P. Adhikari, J. Sarwar, et al. (2013), "Structurally designed attenuated subunit vaccines for *S. aureus* LukS-PV and LukF-PV confer protection in a mouse bacteremia model", *PLOS ONE*, **8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0065384.