

BIỂU HIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG NGUYÊN CỦA PROTEIN TES-30 TÁI TỔ HỢP BẰNG WESTERN BLOT

Đỗ Như Bình

Bệnh viện Quân y 103 - Học viện Quân y

Tóm tắt

Bệnh giun đũa chó mèo là một bệnh có biểu hiện lâm sàng không đặc hiệu, đặc trưng bởi sự di chuyển của ấu trùng đến các cơ quan nội tạng của người và một số động vật. Do biểu hiện triệu chứng nhiễm ký sinh trùng trên lâm sàng rất nghèo nàn, chính vì vậy phương pháp miễn dịch ELISA được sử dụng để phát hiện kháng thể IgG trong huyết thanh người bệnh kháng lại kháng nguyên tiết của *Toxocara spp.* (TES - *Toxocara spp.* excretory-secretory antigens). Quy trình thu nhận kháng nguyên TES tự nhiên bằng phương pháp nuôi cấy ấu trùng giun đũa chó mèo, đòi hỏi kỹ thuật đặc thù, hiệu suất thu nhận kháng nguyên TES thấp và tốn thời gian. Đây chính là các hạn chế chủ yếu của quy trình chế tạo kháng nguyên TES thông thường, ngoài ra kháng nguyên có khả năng phản ứng chéo với kháng thể kháng các loại giun khác, gây hiện tượng dương tính giả. Trong nghiên cứu này, một trình tự cDNA tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp hóa học mã hóa kháng nguyên TES-30 được đưa vào vectơ pET-52b (+) và được biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3) ở dạng dung hợp đuôi ái lực (His)₁₀. Tiến hành tinh sạch bằng sắc ký ái lực và điện di SDS-PAGE thu được protein tái tổ hợp TES-30 có kích thước 30 kDa. Kết quả Western blot xác nhận protein TES-30 tái tổ hợp có hoạt tính kháng nguyên kháng lại kháng thể IgG lưu hành trong máu người nhiễm ấu trùng *Toxocara spp.* Biểu hiện thành công protein tái tổ hợp TES-30 cung cấp nguồn nguyên liệu cho phát triển các kit xét nghiệm chẩn đoán bệnh giun đũa chó mèo ở Việt Nam.

Từ khóa: kháng nguyên tiết của *Toxocara spp.*; protein tái tổ hợp; biểu hiện

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Toxocariasis là bệnh do nhiễm ấu trùng *Toxocara spp.* (*Toxocara canis* từ chó và *Toxocara cati* từ mèo) ở người, có biểu hiện lâm sàng không đặc hiệu, đặc trưng bởi sự di chuyển của ấu trùng đến các cơ quan nội tạng của người và một số động vật [1], [3]. Đa số người bệnh không có biểu hiện rõ ràng do bệnh chủ yếu ở thể ẩn và cũng ít được các bác sĩ lâm sàng chú ý [5]. Chính vì vậy việc phát hiện bệnh là rất khó khăn, chẩn đoán chủ yếu dựa vào phản ứng ELISA để xác định sự lưu hành của kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên tiết TES (*Toxocara* Excretory/Secretory antigens). Về mặt bản chất, các kháng nguyên TES là một nhóm các glycoprotein được các ấu trùng giun đũa chó mèo tiết ra trong quá trình sinh trưởng và phát triển. Chúng bao gồm các protein có kích thước dao động từ 30 đến khoảng 400kDa với một hàm lượng lớn các gốc đường trong phân tử [6]. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các kháng nguyên TES này, đặc biệt TES-30, gây đáp ứng miễn dịch rất mạnh ở người do vậy được coi là chỉ thị thích hợp cho chẩn đoán bệnh giun đũa chó mèo [2], [4]. Tuy nhiên, vai trò chính xác của các kháng nguyên này trong quá trình gây bệnh vẫn chưa được xác định một cách rõ ràng. Thông thường, một kết quả ELISA dương tính sẽ cần khẳng định lại bằng một kỹ thuật khác thường là Western blot [2]. Quy trình thu nhận kháng nguyên TES tự nhiên bằng phương pháp nuôi cấy ấu trùng giun đũa chó mèo, đòi hỏi kỹ thuật đặc thù, hiệu suất thu nhận kháng nguyên TES thấp và cần tối thiểu 60 ngày [7]. Đây chính là các hạn chế chủ yếu của quy trình chế tạo kháng nguyên TES thông thường, ngoài ra kháng nguyên có khả năng phản ứng chéo với kháng thể kháng các loại giun khác, gây hiện tượng dương tính giả. Các hạn chế trên của việc sử dụng các kháng nguyên TES tự nhiên nói trên có thể được giải quyết bằng cách sản xuất kháng nguyên TES ở dạng tái tổ hợp trong *E. coli*. Quy trình thu nhận kháng nguyên TES tái tổ hợp (rTES) kéo dài trong vòng 5 ngày [5]. cho phép thu nhận một

lượng lớn kháng nguyên TES với độ tinh sạch cao. Quan trọng hơn cả là nếu được thiết kế một cách chính xác rTES sẽ cho phép giảm thiểu được hiện tượng dương tính giả do với phản ứng chéo với các kháng thể kháng các loại giun khác [7],[8]. Trong nghiên cứu trước đây chúng tôi đã tổng hợp nhân tạo được cDNA mã hóa kháng nguyên TES-30, trong nghiên cứu này chúng tôi tối ưu hóa quá trình dòng hóa gen này vào vector pET-52b(+) và biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) để biểu hiện protein TES -30 tái tổ hợp. Tinh sạch, đánh giá hoạt tính kháng nguyên TES-30 tái tổ hợp bằng kỹ thuật western blot.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu: Gen mã hóa kháng nguyên nhân tạo TES-30

- Chủng *E. coli* Top10; *E. coli* Rosseta; Chủng *E. coli* BL21 (DE3); Vector pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific), pET52b(+) (Merck);

- Huyết thanh của bệnh nhân: dương tính với *Toxocara*, và dương tính với loại giun sán khác như giun lươn, amip ly, ấu trùng sán lợn và sán lá gan lớn được kháng định bằng Western blot.

- **Thiết bị:** Máy soi chụp ảnh gel; Bộ điện di ADN Horizontal mini; Máy lắc ổn nhiệt; Máy vortex; Micropipette các loại Gilson và Biohit. Bộ điện di đứng Protein Mini.

- **Hóa chất:** Hóa chất điện di protein SDS-PAGE: SDS, Acrylamide; N,N' Methylene-bis-acrylamide; Ammonium persulphate; TEMED; Tris; Glycerol; 2-Mercapthoethanol; Bromophenol xanh có nguồn gốc từ Sigma. Cột sắc ký ái lực Hispur Cobalt Superflow Agarose. Hóa chất cảm ứng IPTG. Hóa chất Western blot: Đệm chuyển màng, đệm rửa màng, đệm blocking, cơ chất TMB...

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu mô tả thực nghiệm

2.2. Phương pháp nghiên cứu và kỹ thuật sử dụng

- **Xây dựng hệ vector biểu hiện gen TES-30:** Cắt plasmid pJET1.2-TES-30 và pET52b(+) bằng 2 enzyme giới hạn *NcoI* và *SacI*. Tinh sạch trên gel đoạn gen TES-30 và pET52b(+) đã cắt mở vòng. Nối đoạn gen TES-30 vào trong pET52b(+) bằng enzyme nối T4 DNA ligase. Biến nạp sản phẩm nối vào trong tế bào khả biến *E. coli* Rosetta. Sàng lọc các dòng khuẩn lạc đã được biến nạp gen TES-30 bằng PCR, điện di sản phẩm trên gel agarose 1,5% để kiểm tra kết quả. Kích thước sản phẩm PCR theo tính toán lý thuyết khoảng 850bp. Tách chiết plasmid từ các dòng đã sàng lọc và gửi giải trình tự. Sau khi xác định được plasmid mang gen chính xác như thiết kế, tiến hành biểu hiện dòng tế bào *E. coli* để thu được protein tái tổ hợp.

- Biểu hiện protein TES-30 tái tổ hợp

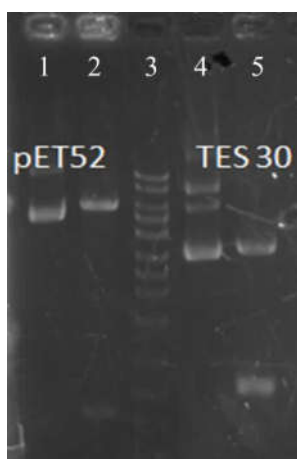
Vector biểu hiện mang gen TES-30 được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E. coli* BL21 (DE3) để kiểm tra khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp. Sau khi nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB lỏng có chứa ampicilin 100 µg/ml (LBA), dòng tế bào mang gen được chuyển sang môi trường LBA lỏng mới với tỉ lệ 1/100. Nuôi cấy tế bào biểu hiện ở nhiệt độ 37 oC cho đến khi OD 600 của môi trường nuôi cấy đạt giá trị 0,6 - 0,8. Ngay sau đó, chất cảm ứng IPTG được thêm vào tới nồng độ cuối là 0,5 mM trong 3 giờ. Tiếp đó, dịch protein tổng số thu được trong điều kiện biến tính (đệm Gu-HCl) được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Hispur Cobalt Superflow Agarose. Phổ protein của các mẫu trước, sau cảm ứng, sau tinh sạch được kiểm tra trên gel polyacryamide 12%. Xác định sự biểu hiện protein dựa vào kích thước của protein TES-30 theo lý thuyết khoảng 30kDa.

- Đánh giá hoạt tính kháng nguyên protein TES-30 tái tổ hợp bằng western blot

TES-30 tái tổ hợp sau khi được tinh sạch trong điều kiện biến tính, tiếp tục được điện di SDS-PAGE trên gel 10% acrylamide, sử dụng 20 μ g cho 1 giếng điện di. Protein được chuyển lên màng nitrocellulose bằng hệ thống chuyển màng semi-dry Trans-BlotH electroblotting system (Bio-Rad, Hercules, CA) với điều kiện chạy là 12V trong 30 phút. Màng tiếp tục được cắt thành từng mảnh và được blocking trong đệm chứa sữa Non-fat-powder-milk trong 1 giờ. Kết thúc quá trình, màng được ủ với huyết thanh người đã được chẩn đoán nhiễm bệnh Toxocariasis và một số bệnh giun sán khác như sán lá gan, ấu trùng sán lợn, giun lươn nhằm đánh giá phản ứng chéo của kháng nguyên rTES-30. Các mẫu huyết thanh được pha loãng 100 lần. Kháng thể dê cộng hợp enzyme kháng IgG người được thêm vào với độ pha loãng 2000 lần. Sau khi rửa trong đệm TBS-T, màng được hiện màu với cơ chất TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng vector biểu hiện pET52b(+) mang gen mã hóa TES-30



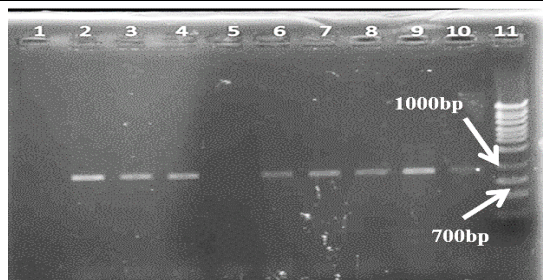
Hình 1. Kết quả cắt vector pET52b(+) và vector pJET1.2 chứa gen mã hóa TES-30 bằng 2 enzyme giới hạn *Nco*I và *Sac*I.

Giếng 1: vector pET52b(+) trước khi cắt. Giếng 2: vector pET52b(+) sau khi cắt.

Giếng 3: HighRanger 1kb DNA Ladder (Norgen). Giếng 4: vector pJET1.2 chứa gen TES-30 trước khi cắt. Giếng 5: vector pJET1.2 chứa gen TES-30 sau khi cắt.

Kết quả điện di cho thấy vector pET52b(+) đã được cắt thành 2 phần, phần có kích thước lớn là vector đã được cắt mở vòng (5kb), phần có kích thước nhỏ là đoạn gen nằm trên vector từ vị trí *Nco*I đến *Sac*I. Tương tự, vector pJET1.2 mang gen TES-30 cũng được cắt thành hai mảnh bao gồm vector pJET1.2 mở vòng (3kb) và đoạn gen TES-30 (700 bp). Như vậy, cả vector pET52b(+) và đoạn gen mã hóa TES-30 tái tổ hợp đã được cắt thành công.

Hai thành phần trên sau khi được tinh sạch trên gel agarose tiếp tục được nối với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase. Sau đó, sản phẩm nối của vector pET52b(+) và đoạn gen mã hóa TES-30 tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* Rosetta bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C ở 15 giây. Tế bào *E. coli* sau biến nạp được cấy trên đĩa môi trường LB có kháng sinh chọn lọc là chloramphenicol và ampicillin để nuôi qua đêm ở 37°C. Để sàng lọc các dòng khuẩn lạc mang gen mã hóa TES-30, DNA từ các dòng khuẩn lạc được tách chiết bằng sốc nhiệt và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Kết quả sàng lọc các dòng tế bào *E.coli* Rosetta được biến nạp bằng vector pET52b mang gen mã hóa TES-30.

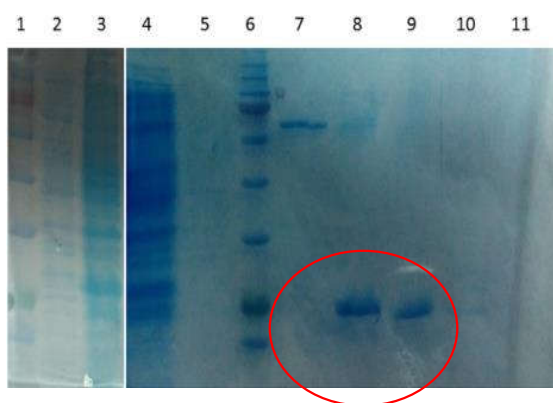
Giếng 1: âm tính PCR. Giếng 2-10: sản phẩm PCR sàng lọc các dòng khuẩn lạc sau biến nạp. Giếng 11: HighRanger 1kb DNA Ladder (Norgen).

Theo kết quả điện di, nhận thấy trong số 9 mẫu sản phẩm PCR sàng lọc có tới 8 mẫu cho kết quả dương tính với một band có kích thước khoảng 850bp. Chọn ngẫu nhiên 3/8 dòng tế bào tiếp tục nuôi trong môi trường LB có kháng sinh chọn lọc là chloraphenicol và ampicillin ở 37°C để tiếp tục tách chiết lấy plasmid và giải trình tự tại công ty 1stBase (Malaysia) với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator. Kết quả giải trình tự 2 chiều của dòng plasmid mang gen chính xác như thiết kế chứng tỏ đã được xây dựng thành công vector biểu hiện pET52b(+) mang gen mã hóa kháng nguyên TES-30.

3.2. Biểu hiện và tinh sạch protein TES-30 trong vector pET52b(+)

Kết quả điện di SDS-PAGE (hình 3) cho thấy sau tinh sạch, trong dịch rửa giải phân đoạn 2 và 3 (giếng 8 và 9) có xuất hiện một băng duy nhất kích thước khoảng 30kDa hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết của protein tái tổ hợp TES-30. Điều này có thể khẳng định, protein TES-30 đã được biểu hiện thành công trong hệ vector pET52b(+).

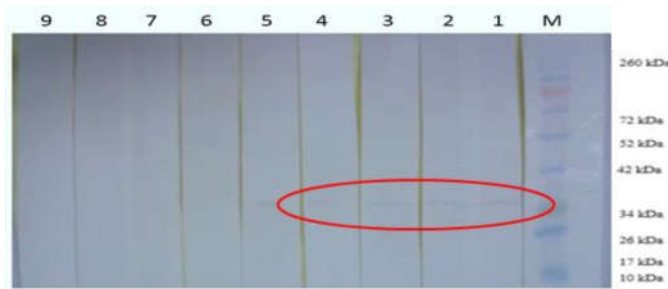
Nồng độ protein thu được sau tinh sạch 1,3mg/ml với thể tích 80ul. Đổi đệm bằng cột 10kDa thu được: 0,5mg/ml với thể tích 100ul.



Hình 3. Kết quả điện di SDS-PAGE kiểm tra sự biểu hiện của TES-30 tái tổ hợp trong tế bào *E.coli* Rosetta mang vector tái tổ hợp pET52b(+)-TES-30 và độ tinh sạch của TES-30 sau khi sử dụng sắc ký ái lực Hispur Cobalt Superflow Agarose.

Giếng 1: GangNam-STAIN Prestained Protein Ladder(JH science); Giếng 2: Protein tổng số trước cảm ứng; Giếng 3: Dịch siêu âm tế bào trong đệm cân bằng; Giếng 4: Dịch siêu âm sau khi qua cột; Giếng 5: Dịch rửa phân đoạn 2; Giếng 6: GangNam-STAIN Prestained Protein Ladder(JH science); Giếng 7: Dịch rửa giải phân đoạn 1; Giếng 8: Dịch rửa giải phân đoạn 2; Giếng 9: Dịch rửa giải phân đoạn 3; Giếng 10: Dịch rửa giải phân đoạn 4; Giếng 11: Dịch rửa giải phân đoạn 5

3. Đánh giá hoạt tính kháng nguyên protein TES-30 tái tổ hợp



Hình 4. Kết quả Western blot thử nghiệm hoạt tính kháng nguyên của TES-30 tái tổ hợp với các mẫu huyết thanh người bệnh.

Màng 1-5: các mẫu huyết thanh dương tính với giun đũa chó mèo

Màng 6: mẫu huyết thanh dương tính với ấu trùng sán lợn

Màng 7: mẫu huyết thanh dương tính với sán lá gan lớn

Màng 8: mẫu huyết thanh dương tính với giun lươn

Màng 9: mẫu huyết thanh dương tính với amip

M: GangNam-STAIN Prestained Protein Ladder(JH science)

Kết quả Western blot (Hình 4) cho thấy 5 mẫu huyết thanh dương tính với bệnh giun đũa chó mèo đều cho một vạch tín hiệu duy nhất tại vị trí có kích thước khoảng 30kDa; trong khi đó 4 huyết thanh còn lại, tuy dương tính với các loại ký sinh trùng khác, nhưng kết quả Western blot âm tính.

4.KẾT LUẬN

Đã biểu hiện và tinh sạch được protein tái tổ hợp TES-30 ở vi khuẩn *E. Coli* BL21 (DE3). Kết quả Western blot cho thấy protein có phản ứng kháng nguyên - kháng thể đối với huyết thanh người nhiễm ấu trùng *Toxocara* spp và không có phản ứng chéo với loài giun sán khác. Kết quả này mở ra triển vọng trong việc sử dụng nguồn kháng nguyên tái tổ hợp để chế tạo các kit chẩn đoán nhanh bệnh Toxocariasis ở người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Fillaux, J. and Magnaval, J.F, (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Vet. Parasitol*, pp. 193, 327–336.
2. Norhaida, A. et al, (2008). rTES-30USM: cloning via assembly PCR, expression, and evaluation of usefulness in the detection of toxocariasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, pp. 102, 151–160.
3. Moreira GMSG, Telmo P de L, Mendonça M, Moreira Ângela Nunes, McBride AJA, Scaini CJ, et al (2014). Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol.*;30(9):456–64
4. Olave AM. et al, 2016. Production and evaluation of the recombinant antigen TES-30 of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of toxocariasis.. *Biomedica*.
5. Sudhakar, N.R. et al, 2014. Characterization of excretory-secretory antigens of adult *Toxocara canis* by western blotting. *J. Parasit. Dis*, pp. 38, 166–169.
6. Stephen H., Gillespie., Richard D., Pearson. (2001), Principles and Practice of Clinical Parasitology, *John Wiley & Sons*, LTD.

7. Savigny, D.H, 1975. In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *J. Parasitol*, pp. 61, 781–782.

8. Yamasaki, H. et al, (1998). Molecular characterization of a cADN encoding an excretory-secretory antigen from *Toxocara canis* second stage larvae and its application to the immunodiagnosis of human toxocariasis. *Parasitol. Int*, pp. 47, 171–181.

9. Yamasaki, H. et al, (2000). Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J. Clin. Microbiol*, pp. 38, 1409–1413.

Abstract

EXPRESSION AND ASSESSMENT OF ANTIGENIC ACTIVITY OF RECOMBINANT TES-30 PROTEIN

Do Nhu Binh

Military Hospital 103-Vietnam Military Medical University

*Toxocariasis is a disease whose clinical manifestations are unspecific, characterized by larval migration to the inner organs of humans and some animals. In the absence of parasitological evidence of infection, immunological methods are required for its diagnosis. Currently, an ELISA technique is being used to detect IgG antibodies against an excretory/secretory antigen of *Toxocara* spp. (TES) which circulate in the blood of infected patients with a high sensitivity however low specificity due to cross-reaction with other helminths. In this study, an artificial ADN encoding TES-30 sequence was then introduced into the pET-52b(+) vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) in the form of (His)₁₀ affinity tag fusion. As the result of SDS-PAGE, the recombinant protein TES-30 of 30 kDa was highly expressed in *E. coli* and was purified by His-tag affinity chromatography. The recombinant TES-30 protein had a specific antigenic activity that was confirmed by Western blot. This recombinant protein holds great potential in epidemiological studies and as a candidate for the development of diagnostic tests for toxocariasis in Vietnam.*

Keywords: excretory/secretory antigen of *Toxocara* spp.; recombinant protein; expression

Cán bộ phản biện

PGS.TS. Nguyễn Thị Hương Bình

Ngày nhận bài: 18/02/2021

Ngày gửi phản biện: 22/02/2021

Ngày đăng bài: 05/03/2021