

TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN ENZYME ENDOLYSIN TÁI TỔ HỢP TRONG *Escherichia coli* TỪ STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGES NA6

Nguyễn Thị Hồng Hải¹, Khuất Hữu Trung¹, Trần Đăng Khánh¹,
Lê Thị Hằng¹, Phạm Thị Lý Thu¹, Đặng Tất Thành²

TÓM TẮT

Endolysins (tên gọi khác là lysins) là các enzyme thủy phân có nguồn gốc từ thực khuẩn thể (bacteriophage) có tác dụng phá hủy peptidoglycan của thành tế bào vi khuẩn trong giai đoạn cuối chu trình sinh sản của thực khuẩn thể. Dòng thực khuẩn thể vi khuẩn *Staphylococcus* NA6 được phân lập từ mẫu sữa tươi nguyên liệu cho thấy khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *Staphylococcus aureus* cao. Gen (*LysSA*) mã hóa enzyme endolysin của thực khuẩn thể NA6 được tạo dòng và tối ưu hóa mã bộ ba biểu hiện enzyme endolysin trong vi khuẩn *E. coli*. Sau đó toàn bộ đoạn DNA được chuyển vào vector biểu hiện pET21b(+) trong vi khuẩn *E. coli* BL21. Gen *LysSA* mã hóa protein endolysin (*LysSA*) có khối lượng phân tử được tính toán khoảng 50 kDa. Endolysin tái tổ hợp tách chiết được có hoạt tính kháng cao với vi khuẩn gây bệnh *S. aureus*.

Từ khóa: *Escherichia coli*, Endolysin, *Staphylococcus aureus*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Staphylococcus aureus là tụ cầu khuẩn có khả năng sản sinh ra các độc tố gây nên sự ngộ độc thực phẩm, một trong những nguyên nhân phổ biến nhất gây ra bệnh viêm dạ dày, ruột trên toàn thế giới. *Staphylococcus aureus* cũng là tác nhân thường xuyên gây nhiễm trùng cận lâm sàng ở bò sữa và đặc biệt là bệnh viêm vú - bệnh gây tử vong và phổ biến nhất ở bò sữa. Vì vậy, sự có mặt của *S. aureus* là mối nguy cơ lớn cho sự an toàn và chất lượng của các loại sữa, phomai truyền thống.

Endolysin có nguồn gốc từ thực khuẩn thể có tác dụng phá hủy peptidoglycan của thành tế bào vi khuẩn trong giai đoạn cuối chu trình sinh sản của thực khuẩn thể. Các enzyme này làm giảm độ mạnh của thành tế bào dẫn đến dung giải tế bào và

giải phóng ra các thực khuẩn thể thế hệ tiếp theo. Vì vậy, khi có mặt endolysin chúng có thể phân hủy lớp peptidoglycan của thành tế bào của mọi vi sinh vật khi tiếp xúc, dẫn đến các vi sinh vật sẽ bị chết. Bên cạnh sự phân giải từ bên trong, các endolysin từ thực khuẩn thể của các vật chủ Gram dương vẫn có thể phân giải nhanh chóng vi khuẩn khi chúng ở ngoại bào (Loessner, 2005). Giống như chất kháng vi khuẩn tiềm năng, endolysin có phương thức hoạt động riêng biệt, có tính chuyên biệt cao, hoạt động chống lại các vi khuẩn kể cả các loại nhạy cảm với thuốc kháng sinh (Borysowski *et al.*, 2006). Ngoài ra, các endolysin tái tổ hợp được báo cáo là ức chế nhiều loại vi khuẩn gây bệnh và được khẳng định như một nguồn kháng vi sinh vật thay thế để điều trị các bệnh nhiễm khuẩn do vi khuẩn Gram dương gây ra (Loessner, 2005). Nhờ đó mà endolysin được

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp; ² Vụ Khoa học và Công nghệ, Bộ Công thương

xem như một chất kháng sinh thực phẩm lý tưởng có tính tác động chọn lọc. Trong công nghiệp lên men, endolysin như Ply511 có thể được sử dụng để kiểm soát vi khuẩn *Listeria monocytogenes* làm hỏng sữa (Gaeng *et al.*, 2000) hoặc sử dụng lysine CTP1 để kiểm soát vi khuẩn *clostridium* trong quá trình chế biến phomat (Mayer *et al.*, 2010). Trong chế biến sữa, endolysin LysH5 từ thực khuẩn thể của vi khuẩn *Staphylococcus* LysH5 có thể tiêu diệt vi khuẩn *S. aureus* trong sữa tươi nguyên liệu sau 4 giờ ở 37°C (Obeso *et al.*, 2008). Ngoài ra, endolysin có thể kiểm soát vi khuẩn gây bệnh viêm vú ở tuyến vú của gia súc lấy sữa, phòng trừ nhiễm chéo thực phẩm trong quá trình lấy sữa và giết mổ gia súc như endolysin Ply700 và LysH5 kiểm soát vi khuẩn gây bệnh *Streptococcus uberis* và *S. aureus* (Celia *et al.*, 2008; Obeso *et al.*, 2008).

Được phân lập từ mẫu sữa tươi nguyên liệu thu thập từ Nghệ An, dòng thực khuẩn thể vi khuẩn *Staphylococcus* NA6 có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *S. aureus* cao nhất. Sau khi giải trình tự gen, đã tiến hành nối và kiểm tra biểu hiện đa hình gen endolysin LysSA của thực khuẩn thể vi khuẩn *Staphylococcus* NA6 vào *Escherichia coli*. Đồng thời, nghiên cứu biểu hiện protein endolysin tái tổ hợp và đánh giá hoạt tính kháng với *S. aureus*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gen mã hóa endolysin của thực khuẩn thể *S. aureus* LysSA được tách dòng trong vector tách dòng pCR™4–TOPO (Invitrogen). Plasmid pET21b(+) của hãng Novogen được dùng làm vector biểu hiện gen mã hóa endolysin. Tế bào *E. coli* DH5α được dùng cho mục đích tách dòng gen. Tế bào *E. coli* BL21 dùng để biểu hiện protein.

Enzyme cắt giới hạn NdeI, XhoI được dùng để xử lý vector tách dòng và vector biểu hiện. Cặp môi T7 Terminator (GCTAGTTATTGCTCAGCGG) và T7 Promoter (TAATACGACTCACTATAGGG) được dùng trong PCR kiểm tra các sản phẩm ghép nối và vi khuẩn mang gen tái tổ hợp sau biến nạp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế vector biểu hiện pET21b – LysSA

Trình tự gen LysSA mã hóa enzyme Endolysin (được phân lập từ thực khuẩn thể NA6) được tách dòng trong vector pCR™4–TOPO (Invitrogen) và được gửi sang Canada để tối ưu hóa mã bộ ba biểu hiện protein Endolysin trong vi khuẩn *E. coli*. Sau đó, vector tái tổ hợp và vector biểu hiện pET21b(+)

được xử lý đồng thời bằng 2 enzyme cắt giới hạn là *NdeI* và *XhoI* và được nối lại với nhau bằng enzyme T4 DNA ligase (Sigma) để tạo thành tổ hợp pLysSA. Sản phẩm ghép nối được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 và nuôi trên môi trường LB agar bổ sung kháng sinh ampicillin ở nồng độ 100 µg/ml.

2.2.2. Biểu hiện protein tái tổ hợp

Tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET21b(+) – LysSA được nuôi lắc trên môi trường Luria Broth có bổ sung ampicillin nồng độ 100 µg/ml, lắc 200 vòng/phút qua đêm ở 37°C. Sau đó 0,5 ml dịch nuôi cấy được chuyển qua 50 ml môi trường LB chứa ampicillin 100 µg/ml và được nuôi lắc ở 37°C đến khi mật độ quang (OD_{600nm}) đạt 0,6 - 0,8. Chất cảm ứng IPTG được thêm vào đến nồng độ cuối cùng đạt 1 mM, dịch nuôi cấy được tiếp tục nuôi lắc trong 4 h. Tế bào vi khuẩn được thu bằng ly tâm 6.000 vòng /phút trong 6 phút tại 4°C và rửa trong Lysis buffer (Tris 50 mM pH = 7,5; NaCl 100 mM; MgSO₄ 8 mM) sau đó được phá vỡ bằng sóng siêu âm. Protein được thu bằng ly tâm 13.000 vòng/phút trong 30 phút tại 4°C và loại bỏ cặn tế bào (dịch enzyme endolysin). Sau đó protein được biến tính và phân tích bằng SDS-PAGE 12%.

2.2.3. Hoạt tính của enzyme endolysin

Vi khuẩn chỉ thị *S. aureus* được nuôi cấy trên môi trường LB lỏng ở 37°C cho đến khi OD_{600nm} = 0,05 - 0,1 (10³ - 10⁶ cfu/ml). Chuẩn bị môi trường LB bán lỏng có chứa vi khuẩn với nồng độ 10³ cfu/ml. Đục thạch thành các lỗ nhỏ, đều nhau. Nhỏ 100 µl dịch có chứa enzyme endolysin đã được pha loãng theo cấp số 2 vào mỗi giếng. Để đĩa trong tủ lạnh trong 1 giờ, sau đó chuyển sang tủ ấm 30°C nuôi qua đêm và quan sát vòng vô khuẩn. Hoạt tính của endolysin được biểu thị bằng đơn vị units trên 1 ml (U/ml) và được tính theo công thức: (1000 □ 25⁻¹) □ (D⁻¹). Trong đó: D là độ pha loãng cao nhất mà ở đó không có sự phát triển của chủng chỉ thị *S. aureus*.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ năm 2016 - 2018 tại Viện Di truyền Nông nghiệp và Tập đoàn SyntBioLab, Canada.

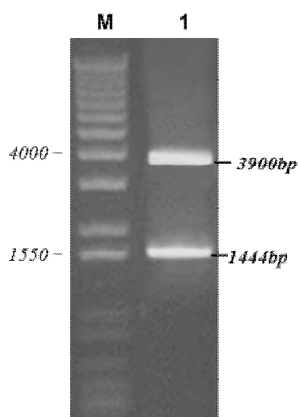
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế vector biểu hiện pET21b – LysSA

Gen mã hóa endolysin LysSa có kích thước 1443 bp. Để thuận lợi cho việc đưa trình tự gen vào vector biểu hiện, trình tự nhận biết của 2 enzyme *XhoI* và *NdeI* được thêm vào 2 đầu đoạn gen đích, kích thước gen tăng lên là 1452 bp. Vector tách dòng

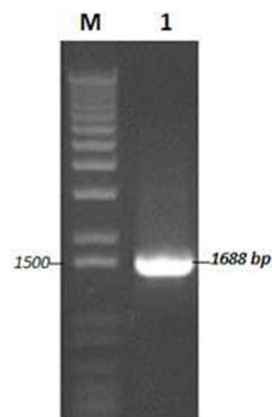
pCR-LysSa và vector pET21b (+) sau khi xử lý bằng *XhoI* và *NdeI* được phân tách trên gel agarose 1%. Kích thước sản phẩm cắt giới hạn lần lượt là 1444 bp (gen LysSa), khoảng 3,9 kb (vector tách dòng) và 5366 bp (vector pET21 (+)). Sản phẩm cắt của gen LysSa và pET21b(+) được tinh sạch bằng bộ kit Gel

Extraction Kit (Fermentas) và được nối với nhau bằng enzyme T4 ligase để tạo thành vector tái tổ hợp pLysSa. Sản phẩm nối được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi T7 promoter/T7 terminator. Kết quả thu được vạch băng mong muốn với kích thước 1668 bp (Hình 2).



Hình 1. Kết quả cắt vector tách dòng pCR-LysSA bằng enzyme cắt giới hạn *XhoI* và *NdeI*

Ghi chú: M: Marker 1 kb DNA plus (Invitrogen); 1: Sản phẩm cắt của vector tách dòng pCR-LysSA bằng enzyme cắt giới hạn *XhoI* và *NdeI*.

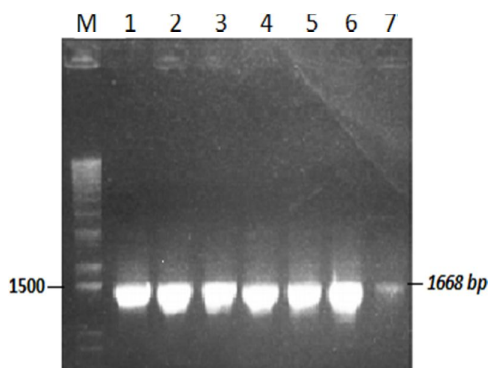


Hình 2. Kết quả kiểm tra sản phẩm nối vector pET21b(+) và gen LysSA bằng cặp mồi T7prom/T7 term

Ghi chú: M: Marker 1 kb DNA plus (Invitrogen); 1: pET21b(+)/LysSA.

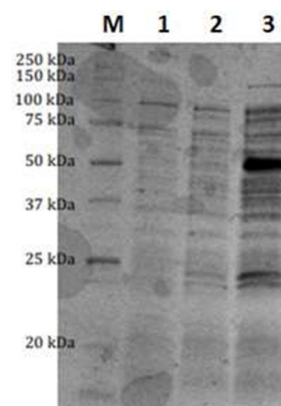
Để tìm được dòng vi khuẩn *E. coli* biểu hiện Endolysin hiệu quả, plasmid tái tổ hợp pLysSA được biến nạp vào 3 dòng *E. coli* khác nhau là Tuner, Rosetta (Novagen) và BL21-DE3 bằng kỹ thuật xung điện. Các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB agar/ampicillin được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra sự có mặt của vector tái tổ hợp bằng PCR với cặp mồi T7 promoter/T7 terminator (Hình 3).

Kết quả cho thấy tất cả các giếng đều xuất hiện vạch băng tương ứng với kích thước của vector pLysSA là 1688 bp. Như vậy, nghiên cứu này đã biến nạp thành công vector pLysSA vào cả ba dòng vi khuẩn nhận. Sau đó, chúng tôi dùng dòng *E. coli* BL21 DE3 để tiến hành biểu hiện protein Endolysin.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc của 3 dòng *E. coli* sau khi được biến nạp vector pLysSA, bằng cặp mồi T7 prom/term

Ghi chú: M: marker 1kb plus DNA (Invitrogen); 1, 2 - Tuner + pLysSa; 3, 4 - Rosetta + pLysSa; 5, 6 - BL21DE3 + pLysSa; 7 - vector pLysSa (đối chứng).



Hình 4. Kiểm tra sự biểu hiện protein Endolysin từ dòng *E. coli* BL21 mang plasmide tái tổ hợp pLysSA bằng điện di SDS-PAGE (12%)

Ghi chú: M: thang protein chuẩn (Biorad); 1: chủng đối chứng *E. coli* BL21/không cảm ứng; 2: *E. coli* BL21/pLysSA/không cảm ứng; 3: *E. coli* BL21/pLysSA/cảm ứng IPTG.

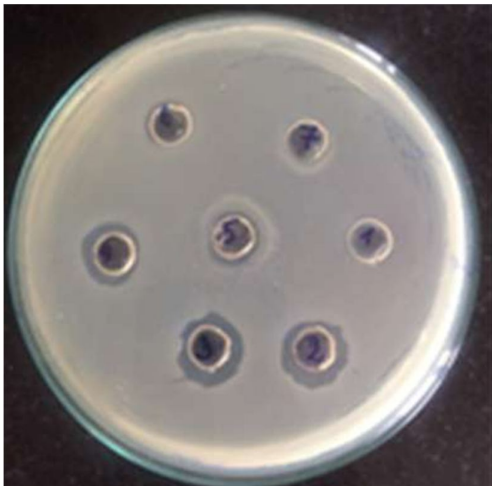
3.2. Biểu hiện protein tái tổ hợp

Tế bào *E. coli* BL21 mang vector tái tổ hợp pLysSA được nuôi cấy trong môi trường LB broth có bổ sung kháng sinh Ampicillin ở 37°C và cảm ứng bằng IPTG 1mM (khi OD_{600 nm} đạt 0,6, sinh khối được thu sau 4 h. Protein được tách ra khỏi tế bào *E. coli* bằng sóng siêu âm và được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12% (Hình 4). Kết quả điện di cho thấy *E. coli* BL21 mang vector tái tổ hợp khi cảm ứng bằng IPTG, protein tái tổ hợp được thấy rõ và có kích thước khoảng hơn 50 kDa (giếng 3) trong khi trường hợp không bổ sung chất cảm ứng thì không xuất hiện protein tái tổ hợp (giếng 1,2).

3.3. Kiểm tra khả năng kháng vi khuẩn *S. aureus* của endolysin tái tổ hợp

Sau khi thu được enzyme endolysin như mô tả ở mục 2.2.2, tiến hành đánh giá hoạt tính kháng với vi khuẩn *S. aureus* bằng phương pháp đục lỗ thạch. Hoạt tính của endolysin được đánh giá thông qua chỉ số U/ml (unit per milliliter) bằng nghịch đảo của độ pha loãng lớn nhất mà tại đó, 100 µl dịch endolysin vẫn thể hiện khả năng ức chế vi sinh vật chỉ thị.

Theo kết quả trên hình 5, endolysin có khả năng kháng vi khuẩn *S. aureus* và độ hòa loãng cao nhất mà tại đó còn xuất hiện vòng kháng khuẩn là 1:16, khi đó hoạt độ của endolysin tái tổ hợp ước tính khoảng 15 U/ml.



Hình 5. Kiểm tra hoạt tính của endolysin tái tổ hợp thu được sau biểu hiện

Ghi chú: 1: 50 µl dung dịch TFA 0,1% (Đối chứng); 2 - 7: 50 µl dịch endolysin sau khi tinh sạch một phần tại các độ pha loãng 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã thiết kế thành công vector tái tổ hợp mang gen LysSA mã hóa enzyme Endolysin được phân lập từ thực khuẩn thể NA6 (pLysSA) và được biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21. Kết quả này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm sản xuất enzyme endolysin tái tổ hợp ứng dụng thực tế trong bảo quản sữa.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu các điều kiện nhân nuôi chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21 mang gen LysSA, tách chiết và tinh sạch enzyme endolysin để ứng dụng trong bảo quản sữa tươi nguyên liệu và sữa tươi thanh trùng.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Đề án phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực công nghệ chế biến đến năm 2020 theo Hợp đồng số 06/HĐ-ĐT.06.16/CNSHCB.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Borysowski J., Weber-Dabrowska, B., Gorski, A.,** 2006. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Experimental Biology and Medicine*, 231, 366-377.
- Celia, L. K., Nelson, D., & Kerr, D. E.,** 2008. Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Veterinary Microbiology*, 130, 107-117.
- Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H., & Loessner, M. J.,** 2000. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2951-2958.
- Loessner, M.J.,** 2005. Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 480-487.
- Mayer, M. J., Payne, J., Gasson, M. J., & Narbad, A.,** 2010. Genomic sequence and characterization of the virulent bacteriophage phiCTP1 from *Clostridium tyrobutyricum* and heterologous expression of its endolysin. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5415-5422.
- Obeso, J.M., Martinez, B., Rodriguez, A., & Garcia, P.,** 2008. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 212-218.

Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant endolysin from Staphylococcal bacteriophages NA6

Nguyen Thị Hong Hai, Khuat Huu Trung, Tran Dang Khanh,
Le Thi Hang, Pham Thi Ly Thu and Dang Tat Thanh

Abstract

Endolysins (or lysins) are bacteriophage-encoded lytic enzymes that break down the peptidoglycan of the bacterial cell wall during the terminal stage of the bacteriophage reproduction cycle. Bacteriophage NA6 was isolated from raw milk showed good capacity against bacteria *Staphylococcus aureus*. The endolysin gene (*LysSA*) from genome of *Staphylococcus aureus* NA6 was cloned, codon-usage optimized for expression in *E.coli* and characterized. Then optimized sequence *LysSA* was moved on vector pET21b (+) in order to get enzyme expression induction in *E.coli* BL21 with protein molecular mass of 50 kDa. Testing enzyme lytic activity showed that recombinant endolysin had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: *Escherichia coli*, Endolysin, *Staphylococcus aureus*

Ngày nhận bài: 22/9/2018
Ngày phản biện: 27/9/2018

Người phản biện: TS. Huỳnh Ngọc Thanh Tâm
Ngày duyệt đăng: 15/10/2018