

BIỂU HIỆN GEN *fliC* CẢI BIẾN CỦA *Salmonella* Dublin VÀ TINH SẠCH FLAGELLIN TÁI TỔ HỢP

VÕ VIỆT CƯỜNG ⁽¹⁾, TRỊNH VĂN TOÀN ⁽¹⁾, LÊ THỊ LAN ANH ⁽¹⁾, ĐẶNG THỊ VIỆT HƯƠNG ⁽¹⁾,
HỒ THỊ HỒNG NHUNG ⁽³⁾, NGUYỄN THỊ NHUNG ⁽²⁾, ĐỖ THỊ HUYỀN ⁽⁴⁾, TRỊNH KHẮC SÁU ⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Flagellin là protein cấu tạo nên sợi roi tế bào vi khuẩn gram âm, tham gia vào quá trình vận động, bám dính và xâm nhiễm vào tế bào đích. Flagellin của vi khuẩn *Salmonella* có kích thước khoảng 50 kDa được cấu tạo gồm 4 vùng D0, D1, D2 và D3. Vùng D0 và D1 có trình tự bảo thủ ít thay đổi giữa các loài, vùng D2 và D3 có trình tự axit amin thay đổi [1, 2]. Flagellin có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua khả năng hoạt hoá miễn dịch bẩm sinh, bám vào thụ thể TLR-5 có mặt trên các tế bào miễn dịch, tế bào biểu mô đường hô hấp và phổi [3, 4]. Thông qua TLR-5, flagellin cảm ứng các yếu tố bảo vệ tế bào như ức chế quá trình chết theo chương trình; thúc đẩy sự tái tạo mô mới [5]. Flagellin tăng cường sự biểu hiện các gen của hệ thống miễn dịch bẩm sinh các tế bào biểu mô của người; hoạt hoá tế bào mono sản xuất ra các cytokin tiền viêm và gây ra đáp ứng miễn dịch thích ứng [6]. Flagellin có tiềm năng sử dụng làm tá chất để phát triển vắc xin do có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào [4, 7].

Đã có những công bố về khả năng hỗ trợ miễn dịch, bảo vệ phóng xạ của flagellin. Flagellin ức chế tạo thành khối u qua đó giúp tế bào đề kháng với nhiễm phóng xạ. Nghiên cứu của Vijay-Kumar và cộng sự cho thấy chuột được tiêm với 1 µg flagellin trước khi chiếu toàn thân 2 giờ bằng tia γ, với tổng liều 8 Gy có khả năng sống sót 75%, sau 40 ngày chuột vẫn sống khỏe mạnh, không có các dấu hiệu tổn thương tế bào biểu mô ruột [8]. Nghiên cứu khả năng bảo vệ phóng xạ của chế phẩm Entolimod/CBLB502 thành phần chính là flagellin của *Salmonella* trên khi, với liều chiếu toàn thân 6,50 - 6,75 Gy cho thấy Entolimod giảm nguy cơ tử vong 2-3 lần, khả năng sống sót được cải thiện đáng kể ở nhóm sử dụng chế phẩm Entolimod [9]. Các nghiên cứu biểu hiện flagellin tái tổ hợp tạo vắc xin phòng *Salmonella* cho gia cầm và phục vụ phát triển vắc xin tái tổ hợp ở trong nước đã được một số tác giả công bố [10, 11]. Tuy nhiên, đến nay chưa có các nghiên cứu ứng dụng flagellin tái tổ hợp hỗ trợ điều trị nhiễm xạ cấp. Để tạo chế phẩm hỗ trợ điều trị nhiễm xạ cấp, chúng tôi tiến hành tạo dòng, biểu hiện đoạn gen *fliC* cải biến mã hóa protein flagellin của vi khuẩn *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Dublin trong *Escherichia coli* dưới dạng dung hợp với protein SUMO.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

- Gen *fliC* cải biến được tổng hợp bởi hãng Gene Script (Mỹ) và tách dòng trong vector pUC57. Plasmid pSUMO3 (LifeSensors) có kích thước 5743 bp được dùng làm vector biểu hiện. Chủng *Escherichia coli* DH5α được sử dụng để nhân dòng. Chủng *E. coli* Rosetta 1 (Novagen) được dùng làm chủng biểu hiện.

- Enzyme hạn chế *Bsa*I, *Sal*I, T4 DNA ligase; PCR master mix 2x (Invitrogen).
- Cặp mồi nhân gen *fliC*: F_Flic/*Bsa*I: 5'TATATGGTCTCTAGGTATGGCACAAGTCATTAAT 3' và R_Flic/*Sal*I: 5'CCGGCGCGGTCTGACTTAACGCAGTAAAGAGAG 3' (Trình tự gạch chân là vị trí nhận biết của enzym hạn chế tương ứng); mồi T7 promotor: 5' TAATACGACTCACTATAGGG. Môi trường nuôi cấy LB: pepton 15 g/L, cao nấm men 5g/L, NaCl 0,5%, pH7, kháng sinh ampicilin 100 µg/mL (Invitrogen).
- Marker DNA, marker protein (Invitrogen), cột sắc ký ái lực Hitrap HP chelating 5 mL (GE Healthcare).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết kế plasmid mang gen mã hóa flagellin

Đoạn gen *fliC* mã hóa flagellin *S. Dublin* được khai thác từ GenBank có mã số AAA27081. Trình tự mã hóa 176 axit amin đầu và trình tự mã hóa axit amin 402 đến 505 được giữ nguyên, đoạn gen *fliC* được thiết kế không chứa trình tự mã hóa vùng D2 và D3 từ vị trí axit amin 177 đến 401 mà được thay bằng đoạn trình tự 48 bp mã hóa 16 axit amin (linker domain). Đoạn gen *fliC* cải biến có kích thước 891 bp, mã hóa 296 axit amin được tổng hợp bởi hãng Gene Script và gắn vào tách dòng pUC57 tạo thành vector pUC57-*fliC*.

Gen *fliC* cải biến được khuếch đại từ plasmid pUC57-*fliC* bằng cặp mồi đặc hiệu F_Flic/*Bsa*I và R_Flic/*Sal*I. Sản phẩm PCR được tinh sạch và xử lý bằng enzym hạn chế *Bsa*I và *Sal*I. Đồng thời, vector pSUMO3 cũng được xử lý bằng hai enzym trên. Đoạn gen *fliC* và vector pSUMO3 được nối với nhau bằng T4 ligase để tạo thành plasmid tái tổ hợp pSUMO_ *fliC*. Sản phẩm ghép nối được biến nạp và nhân dòng trong tế bào *E. coli* DH5α. Tinh sạch plasmid tái tổ hợp và kiểm tra sự có mặt của gen *fliC* bằng PCR và giải trình tự gen sử dụng cặp mồi T7 promoter và T7 terminator. Plasmid tái tổ hợp pSUMO_ *fliC* tiếp tục được biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* Rosetta 1.

2.2. Biểu hiện gen *fliC* cải biến

Lấy 1 khuẩn lạc *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid pSUMO_ *fliC* nuôi cấy trong 10 mL môi trường LB chứa ampicillin 100 µg/mL (môi trường LBamp) ở nhiệt độ 37°C, 250 vòng/phút trong 16 giờ. Dịch tế bào được chuyển sang 10 mL môi trường LBamp với mật độ tế bào ban đầu OD₆₀₀ = 0,1. Tiếp tục nuôi cấy cho đến khi mật độ tế bào đạt giá trị OD₆₀₀ = 0,4 - 0,6 tiến hành cảm ứng với IPTG tới nồng độ cuối cùng là 0,5 mM. Sau 4 giờ nuôi cấy, tế bào được thu lại bằng ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Tế bào được hoà lại trong đệm 10 mM PBS, pH = 7,4 để đạt OD₆₀₀ = 10. Protein tổng số được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 12,6%. Mẫu tế bào được bảo quản ở -80°C.

2.3. Thu nhận và tinh sạch flagellin tái tổ hợp

Tế bào chủng *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pSUMO_ *fliC* sau nuôi cấy cảm ứng 4 giờ được thu nhận bằng ly tâm 8000 vòng/phút trong 5 phút, sau đó tế bào được hoà lại trong đệm 10 mM PBS, pH = 7,4 để đạt OD₆₀₀ = 10. Tiến hành siêu âm phá tế bào vi khuẩn 30 phút ở điều kiện lạnh. Ly tâm 8000 vòng/phút trong

10 phút, thu lấy dịch nổi - pha tan S1 và phần tủa - pha không tan P1. Điện di kiểm tra protein trên gel polyacrylamide 12,6%. Phần tủa được hòa tan trong đệm A (10 mM PBS, pH 7,4; 0,5 mM EDTA; 1% Triton X-100; 2 M urea). Ly tâm 8000 vòng/phút trong 10 phút thu lấy dịch nổi. Protein trong các pha tan và không tan được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6%.

Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni^{2+} Hitrap HP chelating 5 mL (GE). Quy trình tinh sạch được thực hiện theo các bước như sau: (1) Rửa cột bằng 25 mL nước cất 2 lần; (2) Rửa cột trong 25 mL dung dịch đệm B (10 mM PBS, pH 8,0; 1% Triton X-100; 2 M urea, 10 mM imidazole); (3): bơm 20 mL dung dịch protein tái tổ hợp trong đệm B lên cột, protein tái tổ hợp có gắn đuôi histidine có ái lực mạnh với niken được giữ lại trên cột, lặp lại bước 2 để loại bỏ các protein bám không đặc hiệu trên cột; (4): Protein tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột bằng 10 mL dung dịch đệm C (10 mM PBS, pH 8,0; 1% Triton X-100; 2 M urea, 100 mM imidazole). Các phân đoạn protein được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6%.

Phương pháp đọc trình tự axit amin bằng LC/MS

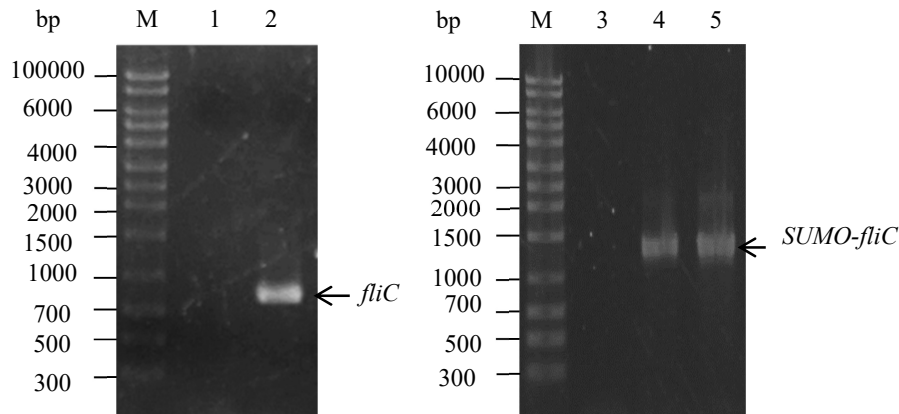
Phương pháp đọc trình tự protein được thực hiện theo mô tả của Hãng Proteomics International. Các mẫu protein tinh sạch sẽ được phân mảnh bằng sử dụng trypsin tạo thành các đoạn peptit đạt các tiêu chuẩn phân tích (thường dưới 20 axit amin). Sau đó, các đoạn peptide được phân tích bằng phân tích LC-MS, sử dụng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 Infinity HPLC, các acid amin có thể được phân tách. Các peptit có cùng kích thước sẽ lần lượt đi vào thiết bị phun Agilent 1260 Chipcube Nanospray trên máy quang phổ khối Agilent 6540. Các peptid sẽ được phun tới thành các giọt nhỏ đa điện tích ra khỏi đầu kim phun tích điện và bay vào bộ phận phân tích khối của máy khối phổ MS. Các peptide được tải lên cột ProtID-Chip-150 C18 sử dụng pha động là 1 gradien gồm nước/ acetonitrile/axit formic 0,1% (v/v) đóng vai trò trong sự phân tách peptit và tối ưu cường độ tín hiệu. Các tín hiệu quang phổ được phân tích để xác định các protein quan tâm bằng phần mềm Mascot sequence matching với cơ sở dữ liệu MSPnr100database.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Thiết kế vector biểu hiện gen *fliC*

Đoạn gen *fliC* được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ khuôn plasmid pUC_ *fliC* bằng cặp mồi F_ *Flic/BsaI* và R_ *Flic/SalI*. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit GenJet PCR và kiểm tra kích thước bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả phân tích bằng điện di trên gel agarose 1% cho thấy đường chạy 2 xuất hiện một băng DNA có kích thước xấp xỉ 900 bp tương ứng với kích thước của gen *fliC* (hình 1). Gen *fliC* sau đó được ghép nối vào vector biểu hiện pSUMO3. Sản phẩm ghép nối được biến nạp và nhân dòng trong tế bào *E. coli* DH5 α . Plasmid tái tổ hợp tách chiết từ dòng biến nạp được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi T7 promoter và R_ *Flic/SalI*. Theo lý thuyết từ vị trí T7 promotor đến vị trí đa điểm tách dòng trên vector pSUMO3 khoảng 400 bp, sau khi gen *fliC* ghép nối vào vector pSUMO3, sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi T7 promoter và R_ *Flic/SalI* với khuôn

plasmid pSUMO_fliC tái tổ hợp có kích thước khoảng 1300 bp. Kết quả phân tích bằng điện di trên gel agarose 1% cho thấy đường chạy 4, 5 (hình 1) chỉ xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 1300 bp tương ứng với kích thước của gen *SUMO-fliC*.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen *fliC* trên gel agarose 1%

M: marker 1kb; đường chạy 1, 3: đối chứng âm; đường chạy 2: sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi *F_Flic/BsaI* và *R_Flic/SalI*; đường chạy 4,5: sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi *T7 promoter* và *R_FliC/SalI*

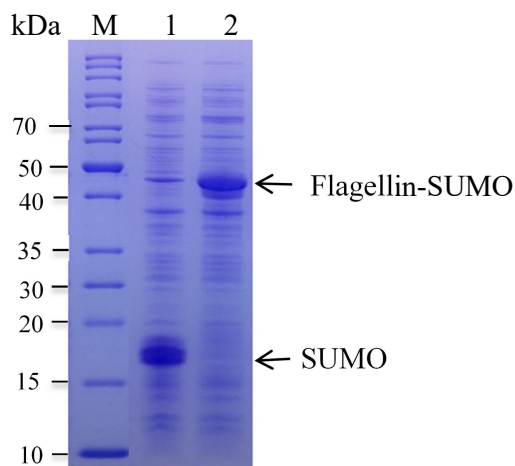
Để kết luận chắc chắn gen *fliC* được ghép nối vào vector pSUMO3, đã tiến hành giải trình tự gen plasmid pSUMO_fliC với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator (hình 2). Kết quả xác định và so sánh trình tự nucleotide cho thấy trình tự gen *fliC* trong vector biểu hiện tương đồng gen thiết kế 100%. Như vậy gen *fliC* cải biến đã ghép nối thành công vào vector biểu hiện pSUMO3.

ATGCGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAG
CAAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCCAATGGCACAAGTCAT
TAATACAAACAGCCTGTCGCTGTTGACCCAGAATAACCTGAACAAATCTCAGTCCTC
ACTGAGTTCGCTATTGAGCGTCTGTCCTCTGGTCTGCGTATCAACAGCGCGAAAGA
CGATGCGGCAGGCCAGGCGATTGCTAACCCTTCACTTCTAATATCAAAGGTCTGAC
TCAGGCTTCCCGTAACGCTAACGACGGCATTCTATTGCGCAGACCACTGAAGGTGC
GCTGAATGAAATCAACAACAACCTGCAGCGTGTGCGTGAGTTGTCTGTTCAGGCCA
CTAACGGGACTAACTCTGATTCCGATCTGAAATCTATCCAGGATGAAATTCAGCAAC
GTCTGGAAGAAATCGATCGCGTTTCTAATCAGACTCAATTTAACGGTGTTAAAGTCC
TGTCTCAGGACAACCAGATGAAAATCCAGGTTGGTGCTAACGATGGTGAAACCATT
ACCATCGATCTGCAAAAAATTGATGTGAAAAGCCTTGGCCTTGATGGGTTCATGTT
AATTCCCCGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGAATTCTAGACTCCATGGGTACATTA
ATCAATGAAGACGCTGCCGACGCAAGAAAAGTACCGCTAACCCACTGGCTTCAAT
TGATTCTGCATTGTCAAAAGTGGACGCAGTTCGTTCTTCTCTGGGGGCAATTCAAAA
CCGTTTTGATTACGCCATTACCAACCTTGGCAATACGGTAACCAATCTGAACCTCCGC
GCGTAGCCGTATCGAAGATGCTGACTATGCAACGGAAGTTTCTAATATGTCTAAAG
CGCAGATTCTGCAGCAGGCTGGTACTCCGTTCTGGCGCAGGCTAACCAAGGTTCCGC
AAAACGTCCTCTCTTTACTGCGTTAA

Hình 2. Trình tự nucleotide gen *fliC* sau khi cải biến

3.2. Biểu hiện gen *fliC* trong *E. coli*

Plasmid pSUMO_fliC được biến nạp vào tế bào *E. coli* Rosetta 1 bằng phương pháp sốc nhiệt. Chủng *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pSUMO_fliC được nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung ampicillin đến giá trị OD khoảng 0,4 - 0,6 thì tiến hành cảm ứng biểu hiện với 0,5 mM IPTG. Protein tái tổ hợp sau cảm ứng được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6%. Trong quá trình thiết kế vector biểu hiện pSUMO_fliC, gen *fliC* (hình 3) được biểu hiện ở dạng dung hợp với một đoạn protein SUMO nhằm tăng hiệu suất biểu hiện cũng như tính tan của protein tái tổ hợp.



Hình 3. Biểu hiện gen *fliC* dung hợp với SUMO trong *E. coli* Rosetta 1

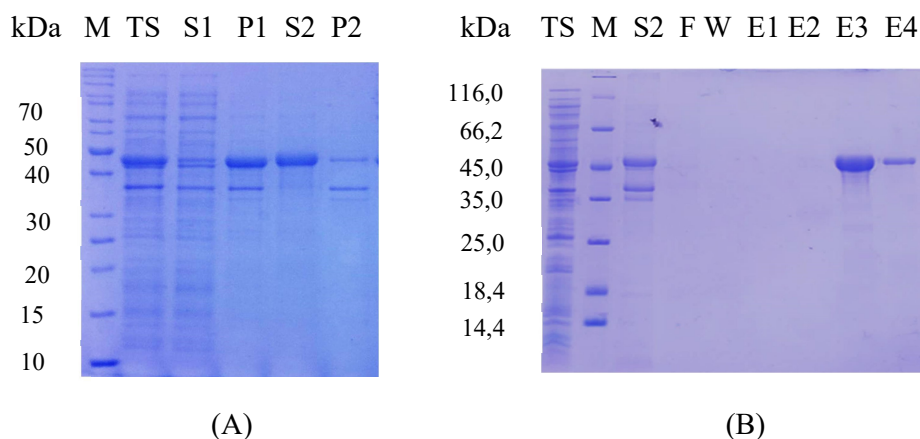
M: marker; đường chạy 1: protein tổng số chủng *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid pSUMOpro3 (đối chứng âm); đường chạy 2: protein tổng số chủng *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pSUMO_fliC

Theo tính toán lý thuyết, flagellin tái tổ hợp có trọng lượng khoảng 31 kDa, SUMO có trọng lượng khoảng 17 kDa. Khi biểu hiện ở dạng dung hợp SUMO-flagellin có trọng lượng 48 kDa (hình 3). Kết quả điện di protein tổng số chủng *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pSUMO_fliC xuất hiện băng protein đậm kích thước khoảng 48 kDa. Mẫu protein tổng số chủng *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid pSUMO3 xuất hiện băng protein khoảng 17 kDa, tương ứng với trọng lượng của protein SUMO.

3.2. Tinh sạch protein SUMO-Flagellin

Kết quả khảo sát tính tan đường chạy S1, P1 (hình 4A) cho thấy protein SUMO flagellin tái tổ hợp được biểu hiện chủ yếu ở dạng không tan. Protein tái tổ hợp được tách ra khỏi pha tủa bằng cách hòa tan trong đệm A (10 mM PBS, pH 7,4; 0,5 mM EDTA; 1% Triton X-100, 2 M ure). Trên vector biểu hiện gen dung hợp SUMO-fliC được thiết kế trình tự mã hóa cho 6 axit amin histidine đầu 5' vì vậy protein tái tổ hợp có thể được tinh chế hiệu quả bằng sắc ký ái lực cột Ni²⁺. Protein SUMO-flagellin tái tổ hợp được đưa lên cột sắc ký ái lực Hitrap HP Chelating 5 mL,

phân đoạn chứa protein sau tinh sạch được thu ở dung dịch đệm C (10 mM PBS, pH 8,0; 1% Triton X-100; 2 M ure, 100 mM imidazole). Tiến hành điện di kiểm tra phân đoạn protein qua cột trên gel polyacrylamide 12,6%. Kết quả cho thấy, SUMO-flagellin tái tổ hợp thu được chủ yếu ở phân đoạn E3. Độ sạch protein tái tổ hợp được phân tích bằng phần mềm Image-Lab (Bio-Rad) cho kết quả 95%. Hàm lượng protein sinh tổng hợp đạt 0,6 g/L môi trường.



Hình 4. Thu nhận và tinh sạch SUMO - flagellin tái tổ hợp

A: Kết quả kiểm tra tính tan của SUMO - flagellin tái tổ hợp; B: kết quả tinh sạch SUMO - flagellin bằng sắc ký ái lực. TS: protein tổng số; M: marker; S1: protein pha tan sau siêu âm; P1: protein pha tủa sau siêu âm; S2: protein pha tan của P1 trong đệm A bổ sung ure đến nồng độ 2 M; P2: pha tủa P1 trong đệm A bổ sung ure đến nồng độ 2 M; F: dung dịch qua cột; W: dung dịch rửa cột, E1-E4: các phân đoạn protein thu được ở nồng độ 100 mM imidazole.

Để đảm bảo trình tự axit amin SUMO-flagellin được tổng hợp theo đúng khung đọc mở, trình tự đoạn ngắn (10 - 15 axit amin) được xác định bằng phương pháp LC/MS, thực hiện theo mô tả của Proteomics International. Phiên giải kết quả giải trình tự đã thu nhận được các đoạn ngắn 10 - 15 axit amin giống với trình tự axit amin của flagellin thiết kế hình 5. Như vậy gen *fliC* cải biến mã hóa protein flagellin đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rosetta 1.

WP_000079822.1 Mass: 50907 Score: 351 Matches: 34(30) Sequences: 7(3) emPAI: 0.46
ref[WP_000079822.1] flagellin n=2 Tax_Id=562 [Escherichia coli]

☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
9	366.7041	731.3937	731.3926	0.0011	0	29	3.3	1	K.GLTQASR.N
30	551.2686	1100.5226	1100.5210	0.0015	0	59	0.0024	1	K.DDAAGQAIANR.F
42	382.5606	1144.6600	1144.6564	0.0036	1	17	37	1	R.LSSGLRINSAK.D
46	582.7975	1163.5804	1163.5782	0.0022	0	(50)	0.018	1	K.SQSSLSSAIER.L

Hình 5. Phiên giải kết quả giải trình tự axit amin của SUMO-flagellin bằng phương pháp LC/MS

Flagellin của *Salmonella* spp. được xem là một tá dược tiềm năng nhờ khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch thể và miễn dịch qua trung gian tế bào thông qua khả năng hoạt hoá miễn dịch bẩm sinh, bám vào thụ thể TLR-5. Gần đây một số công bố cho thấy chế phẩm sinh học với thành phần chính là flagellin có khả năng bảo vệ động vật thí nghiệm khi chiếu xạ toàn thân [8, 9]. Các nghiên cứu chỉ ra việc cắt bỏ vùng biến đổi D2, D3 làm giảm tính kháng nguyên và tăng khả năng bảo vệ phóng xạ của flagellin. Trình tự bảo thủ D0, D1 của flagellin là yếu tố quan trọng gây đáp ứng miễn dịch thông qua TLR5 [1, 12].

Gen *fliC* đã được thiết kế ở dạng đơn lẻ trong vector pET-28a hoặc dung hợp với thioredoxin trong vector pET-22b(+) và biểu hiện trong tế bào trong *E. coli* BL21 [10, 11]. Ở quy mô bình tam giác hiệu suất sinh tổng hợp flagellin đạt 0,6 g/L môi trường, khi tối ưu các điều kiện biểu hiện và biểu hiện trong hệ thống lên men hàm lượng protein tái tổ hợp đạt 1,3 g/L [13]. Trong nghiên cứu này trình tự gen *fliC* có nguồn gốc từ vi khuẩn *S. Dublin* được cải biến, loại bỏ trình tự mã hóa vùng D2, D3 kích thước 891 bp biểu hiện dưới dạng dung hợp với protein SUMO trong tế bào *E. coli* Rosetta 1. Protein SUMO được biết đến với vai trò điều hòa cấu trúc và chức năng protein đích của tế bào Eukaryote; hoạt động giống chaperon ngăn chặn sự kết tụ của protein trung gian, giúp hình thành cấu hình chính xác, nhờ đó cải thiện tính tan của protein [14]. SUMO đã được chứng minh có khả năng biểu hiện hiệu quả những protein thuộc nhóm khó biểu hiện ở dạng đơn như matrix metalloproteinase 13, protein vỏ VP1 và VP3 của vi rút gây bệnh chân tay miệng [15, 16]. Hàm lượng protein tái tổ hợp thu được ở quy mô bình tam giác đạt 0,6 g/L. Mặc dù phần lớn flagellin được biểu hiện ở pha không tan tuy nhiên việc thiết lập, tối ưu các điều kiện biểu hiện sẽ giúp tăng hiệu suất sinh tổng hợp và cải thiện tính tan protein tái tổ hợp. Sau khi biểu hiện thành công, flagellin sẽ được cắt khỏi SUMO và được sử dụng làm dược chất để bào chế chế phẩm hỗ trợ điều trị nhiễm xạ cấp.

4. KẾT LUẬN

Đã biểu hiện thành công gen *fliC* cải biến dưới dạng dung hợp với protein SUMO trong tế bào *E. coli* Rosetta 1. Protein SUMO-flagellin tái tổ hợp có trọng lượng khoảng 48 kDa và được biểu hiện với hàm lượng 0,6 g/L, chủ yếu ở dạng thể vùi. Protein SUMO-flagellin thu nhận từ pha không tan bằng dung dịch đệm chứa ure 2 M, sau đó được tinh sạch bằng sắc ký ái lực, độ tinh sạch đạt 95%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Forstnerič V., Ivičak-Kocjan K., Plaper T., Jerala R., Benčina M., *The role of the C-terminal DO domain of flagellin in activation of Toll like receptor 5*, PLoS Pathog., 2017, **13**(8):e1006574.
2. Song W., Jeon Y., Namgung B. et al., *A conserved TLR5 binding and activation hot spot on flagellin*, Sci. Rep., 2017, **7**:40878.
3. Simon R., Samuel C. E., *Activation of NF-B-dependent gene expression by Salmonella flagellins FliC and FljB*, Biochem Biophys. Res. Commun., 2007, **355**(1):280-285.

4. Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*, Nature, 2001, **410**(6832):1099-1103.
5. Jones R. M., Sloane V. M., Wu H., Luo L., Kumar A., Kumar M. V., Gewirtz A. T., Neish A. S., *Flagellin administration protects gut mucosal tissue from irradiation-induced apoptosis via MKP-7 activity*, Gut., 2011, **60**(5):648-657.
6. Thomas Tallant, Amitabha Deb, Niladri Kar, Joseph Lupica, Michael J de Veer and Joseph A DiDonato, *Flagellin acting via TLR5 is the major activator of key signaling pathways leading to NF- κ B and proinflammatory gene program activation in intestinal epithelial cells*, BMC Microbiology, 2004, p.4-33.
7. Skountzou I., Martin M. D., Wang B. Z., Ye L., Koutsouanos D., Weldon W., *Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine*, Vaccine, 2010, **28**(24):4103-4112.
8. Vijay-Kumar M., Aitken J. D., Sanders C. J., Frias A., Sloane V. M., Xu J., Neish A. S., Rojas M., Gewirtz A. T., *Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation*, J. Immunol., 2008, **180**(12):8280-8285.
9. Krivokrysenko V. I., Toshkov I. A., Gleiberman A. S., Krasnov P., Shyshynova I., Beshpalov I., Maitra R. K., Narizhneva N. V., Singh V. K., Whitnall M. H., Purmal A. A., Shakhov A. N., Gudkov A. V., Feinstein E., *The Toll-like receptor 5 agonist entolimod mitigates lethal acute radiation syndrome in non-human primates*, PLoS One, 2015, **10**(9):e0135388.
10. Đỗ Thị Huyền, Lê Quỳnh Giang, Sven-Olof Eiifors, Trương Nam Hải, *Lựa chọn môi trường nuôi cấy nhằm tăng sản lượng flagellin fliC tái tổ hợp của Salmonella enterica serovar Typhimurium từ Escherichia coli*, Tạp chí Công nghệ sinh học, 2012, **10**(1):93-98.
11. Trần Thị Bảo Châu, Nguyễn Việt Anh, Trần Văn Hiếu, *Tạo dòng, biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp FliC của Salmonella enteritidis*, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, 2016, **19**(6):62-68.
12. Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*, Nature, 2001, **410**(6832):1099-1103.
13. Trương Nam Hải, *Salmonella: Kit chẩn đoán và vacxin trên cơ sở protein tái tổ hợp*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội, 2011, tr.113-137.
14. Bis R. L., Stauffer T. M., Singh S. M., Lavoie T. B., Mallela K. M., *High yield soluble bacterial expression and streamlined purification of recombinant human interferon α -2a*, Protein Expr. Purif., 2014, **99**:138-46.

15. Malakhov M. P., Mattern M. R., Malakhova O. A., Drinker M., Weeks S. D., Butt T. R., *SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins*, J. Struct. Funct. Genomics, 2004, **5**(1-2):75-86.
16. Lee C. D., Yan Y. P., Liang, S. M., *Production of FMDV virus-like particles by a SUMO fusion protein approach in Escherichia coli*. J. J Biomed Sci. 2009, **16**(1):69.

SUMMARY

EXPRESSION OF MODIFIED *fliC* GENE FROM *Salmonella* Dublin AND PURIFICATION OF RECOMBINANT FLAGELLIN

Flagellin is a potent trigger of innate immune responses that enhance adaptive immune responses. Flagellin has intrinsic adjuvant activity mediated through toll-like receptor (TLR 5) and is an attractive candidate for highly effective vaccine adjuvant. The N-terminal D0-D1 domain of flagellin is required for TLR5 recognition. In the present study, *fliC* gene from *S. Dublin* expressed in *E. coli* BL21 in the fusion form with SUMO protein. The 48 kDa fusion protein of SUMO-flagellin was synthesised in insoluble inclusion body. The overall yield of expressed SUMO - flagellin was 0.6 g/L. The recombinant protein solubilized in 2 M urea then was purified by using Ni-NTA column chromatography with purity about 95.4%. Flagellin will be cleaved from fusion protein and used to develop as a radiation countermeasure.

Keywords: *E. coli* Rosetta 1, flagellin, radiation countermeasure, fusion protein; *E. coli* Rosetta 1, flagellin, điều trị nhiễm xạ cấp, protein dung hợp.

Nhận bài ngày 04 tháng 11 năm 2021

Phản biện xong ngày 15 tháng 11 năm 2021

Hoàn thiện ngày 18 tháng 11 năm 2021

⁽¹⁾ Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga

⁽²⁾ Trường Đại học khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

⁽³⁾ Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁽⁴⁾ Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Liên hệ: **Võ Việt Cường**

Viện Y sinh Nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga
Số 63 Nguyễn Văn Huyền, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội
Điện thoại: 0982201991; Email: cuongvrtc@gmail.com