

THỬ HOẠT TÍNH KHÁNG THỂ TÁI TỔ HỢP ĐẶC HIỆU VI KHUẨN *Escherichia coli* O157:H7

Hoàng Phú Hiệp¹, Lê Thị Kim Xuân², Nguyễn Minh Lụa², Nguyễn Thị Minh Huyền²,
Trần Mạnh Hà², Đào Minh Đức², Nguyễn Bích Nhi², Lê Quang Huấn²

¹Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *huanlequang@gmail.com

TÓM TẮT: Kháng thể là các phân tử immunoglobulin có bản chất là glycoprotein đóng vai trò nhận biết và vô hiệu hóa các tác nhân lạ như virus hoặc vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, protein kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được tinh sạch bằng phương pháp hybrid. Tiếp theo, Hoạt tính kháng thể được thử bằng các phương pháp như Dot Blot, Western Blot và ELISA. Kết quả cho thấy protein kháng thể bắt cặp đặc hiệu với vi khuẩn *E. coli* O157:H7. Bước đầu xác định tính đặc hiệu kháng thể tái tổ hợp bằng phương pháp gắn hạt nano silica với kháng thể và nhuộm với vi khuẩn *E. coli* O157:H7 và soi dưới kính hiển vi. Từ đó tạo cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu tạo kit chuẩn đoán vi khuẩn này trong mẫu thực phẩm cũng như cung cấp thêm nguồn kháng thể trong phác đồ điều trị ngộ độc do vi khuẩn *E. coli* O157:H7 gây ra.

Từ khóa: *Escherichia coli* O157:H7, pET28a TRX, kháng thể tái tổ hợp, nano silica.

MỞ ĐẦU

Escherichia coli O157:H7 là một trong bốn chủng vi khuẩn gây bệnh tiêu chảy sau các chủng *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. và *Shigella* sp. Các bệnh có liên quan đến vi khuẩn *E. coli* là bệnh tiêu chảy, viêm phổi, viêm đường nước tiểu và một số bệnh khác. Triệu chứng bị nhiễm trùng vi khuẩn thường khác nhau, nhưng nhìn chung, bệnh nhân có các triệu chứng như: nôn, đau bụng, sốt, xuất huyết da, cao huyết áp, tiêu chảy thường có máu [1]. Hàng năm, vi khuẩn *E. coli* O157:H7 gây ra nhiều vụ ngộ độc trên thế giới. Tháng 6 năm 2009 Trung tâm Kiểm soát và phòng chống Bệnh của Hoa Kỳ (CDC) đã thông báo có 69 người ở 29 bang khác nhau đã bị nhiễm khuẩn *E. coli* O15:H7 và đã có 34 người phải nhập viện khi sử dụng bánh ướp lạnh đóng gói của Nestlé Toll House. Báo cáo trên cho thấy, năm 2013, có 33 người thuộc 4 bang nhiễm khuẩn *E. coli* O157:H7. Năm 2014 cho thấy đã có 12 người ở 4 bang nhiễm vi khuẩn *E. coli* O157:H7, nguyên nhân sau đó được xác định do thịt bò bị nhiễm vi khuẩn này [7].

Trong các kỹ thuật sử dụng kháng thể, một nhân tố quan trọng ảnh hưởng tới kết quả thí nghiệm đó là kháng thể. Các kit test chẩn đoán miễn dịch hiện nay dựa vào các kháng thể đơn dòng nên có độ nhạy cảm và tính đặc hiệu cao.

Kỹ thuật biểu lộ trên phage (phage display) do Smith trình bày năm 1985 là kỹ thuật biểu hiện các phân tử peptide hoặc protein, trong đó có cả các phân tử kháng thể được biểu lộ trên bề mặt thực khuẩn thể hình sợi [6]. Đây là kỹ thuật có nhiều ưu điểm trong nghiên cứu tạo kháng thể đơn dòng hiện nay. Vì vậy, việc sử dụng kỹ thuật này tạo kháng thể đơn dòng trong chẩn đoán cũng như điều trị bệnh đang được nghiên cứu. Thí dụ như nghiên cứu ứng dụng kháng thể đơn dòng trong điều trị bệnh như kháng thể đơn dòng kháng CD25 [3], hay kháng thể scFv kháng CYFRA 21-1 trong điều trị ung thư phổi [1]... Sử dụng kỹ thuật phage display, kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu vi khuẩn *E. coli* được tạo dòng và biểu hiện thành công trong vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) [3]. Trong nghiên cứu này, protein kháng tái tổ hợp đặc hiệu vi khuẩn *E. coli* O157:H7 sẽ được kiểm tra độ hoà tan và hoạt tính bằng các phương pháp Dot Blot, Western Blot và ELISA.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vector pET28a TRX mang gen mã hóa kháng thể trong vi khuẩn *E. coli* BL21 sử dụng từ nghiên cứu trước đây của một số tác giả [3].

Hạt nano silica chứa chất màu huỳnh quang FITC (SiO₂-FITC) được cung cấp bởi nhóm Nanobiophotonic, trung tâm Điện tử học lượng

từ, Viện Vật lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

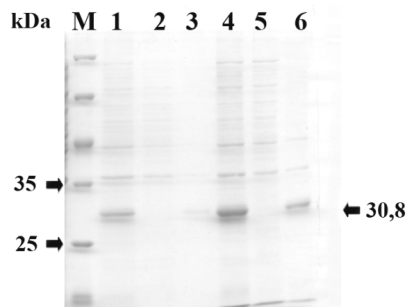
Các hoá chất và bộ kit sử dụng trong thí nghiệm đều được mua của hãng Biolabs (Anh), Invitrogen và Fermentas (Hoa Kỳ).

Kháng thể đơn dòng đặc hiệu vi khuẩn *E. coli* O157:H7 (ab75244) có nguồn gốc từ chuột, cộng hợp anti-6X His-tag (ab18184), kháng thể kháng chuột cộng hợp (ab6789) của Hãng Abcam (Hoa Kỳ).

Để kiểm tra độ hòa tan chủng tế bào BL21(DE3) mang protein tái tổ hợp được nuôi hoạt hóa, sau đó tế bào được thu lại bằng ly tâm và hòa trong đệm phá tế bào. Tế bào được phá bằng siêu âm trong 10 phút. Hút dịch protein tổng số, tiếp theo là ly tâm thu mẫu hòa tan và mẫu cặn tế bào, cặn tế bào được hòa lại trong cùng thể tích đệm phá tế bào ban đầu. Các mẫu được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 10% theo Laemly [5].

Tinh sạch protein bằng cột ái lực ProBond Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) theo phương pháp hybrid và kiểm tra độ tinh sạch bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamide 10%.

Kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp Dot Blots, Western Blot và ELISA với kháng nguyên là tế bào vi khuẩn *E. coli* O157:H7, đối chứng là vi khuẩn ATCC 25922.



Hình 1. Điện di SDS-PAGE kiểm tra độ hòa tan của kháng thể tái tổ hợp

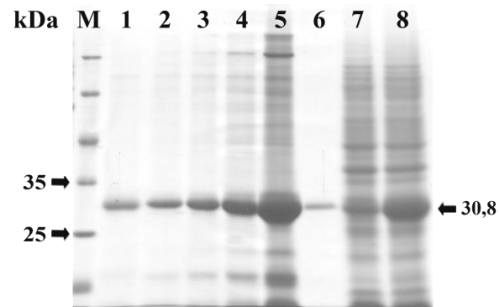
M: marker; 1: Protein tổng số ở 28°C; 2: Protein không tan ở 28°C; 3: Protein tan ở 28°C; 4: Protein tổng số ở 37°C; 5: Protein không tan ở 37°C; 6: Protein tan ở 37°C.

Phương pháp gắn hạt nano silica và soi dưới hệ kính hiển vi: Hạt nano silica chứa chất màu huỳnh quang FITC (SiO₂-FITC) có kích thước 60-80nm, nồng độ hạt là 4.10¹² hạt/ml. Khi gắn kháng thể scFv, theo tính toán có khoảng 20 kháng thể/hạt nano. Hạt nano SiO₂-FITC và kháng thể đều được pha loãng trong đệm PBS 1X, sau đó 2 dung dịch được trộn với nhau và cho phản ứng trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó cho thêm BSA 1%. Dung dịch phức hệ được rửa 2 lần bằng ly tâm 5.000 v/p 5 phút và phân tán lại trong PBS. Sau đó phức hợp silica-kháng thể được nhuộm với vi khuẩn *E. coli* O157:H7 với đối chứng được sử dụng là vi khuẩn ATCC và chụp ảnh dưới kính hiển vi laser ở độ phóng đại 60X.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kiểm tra độ hòa tan và tinh sạch kháng thể tái tổ hợp

Ba mẫu protein tổng số, protein hòa tan và protein cặn tế bào được điện di trên gel polyacrylamide 10% (hình 1). Kết quả điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 10% trên hình 1 cho thấy ở cả 2 nhiệt độ 30°C và 37°C, protein tái tổ hợp ở dạng dung hợp với đoạn fusion đều được tổng hợp dưới dạng hòa tan. Như vậy, hai nhiệt độ này không ảnh hưởng nhiều đến trạng thái biểu hiện protein tái tổ hợp.

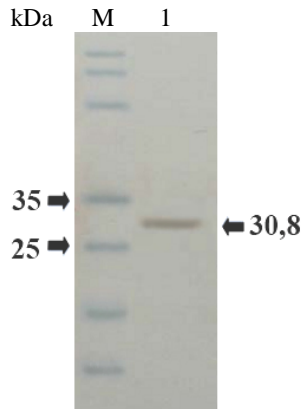


Hình 2. Kết quả điện di SDS-PAGE quá trình tinh sạch protein tái tổ hợp bằng phương pháp Hybrid

M: Marker protein US7; 1: Imidazole 500 mM (phân đoạn 2); 2: Imidazole 500 mM (phân đoạn 1); 3: Imidazole 250 mM (phân đoạn 4); 4: Imidazole 250 mM (phân đoạn 3); 5: Imidazole 250 mM (phân đoạn 2); 6: Imidazole 250 mM (phân đoạn 1); 7: Dịch qua cột; 8: Đệm Lysis đưa lên cột.

Để phục vụ cho mục đích chẩn đoán, kháng thể tái tổ hợp sẽ được tinh sạch. Ở đây chúng tôi sử dụng phương pháp hybrid để đảm bảo thu được toàn bộ hàm lượng protein tái tổ hợp. Kết quả được thể hiện ở hình 2.

Kết quả thu được trên bản điện di SDS-PAGE cho thấy kháng thể tái tổ hợp đã được thu nhận ở dạng tinh sạch, có kích thước khoảng 30 kDa, tương ứng với kích thước đã tính toán theo lý thuyết. Sau khi được tinh sạch, kháng thể tái tổ hợp sẽ được thẩm tích trong đệm PBS ở 4°C qua đêm và được đo OD280nm để xác định nồng độ. Nồng độ protein thu được là 0,5 mg/ml. Hàm lượng protein tái tổ hợp thu được



Hình 3. Kết quả Western blot của kháng thể tái tổ hợp với anti His-tag

M: Marker; 1: protein tái tổ hợp.

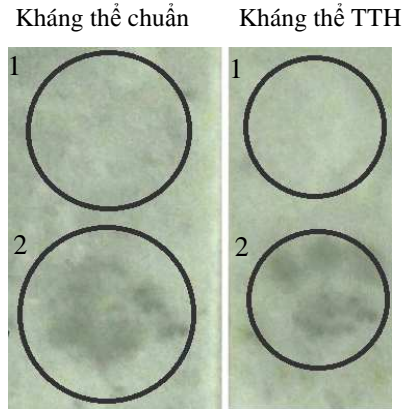
Hiện nay, kháng thể đơn dòng đặc hiệu *E. coli* O157:H7 đã được thương mại hóa sử dụng cho nghiên cứu, do đó rất thuận lợi để so sánh ái lực của các kháng thể tái tổ hợp thu được với ái lực của kháng thể chuẩn có mã số AB75244 (do Hãng Abcam sản xuất). Để kiểm tra tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp, phản ứng Dot blot được thực hiện sử dụng kháng thể tái tổ hợp và kháng thể chuẩn với mẫu kháng nguyên là vi khuẩn *E. coli* O157:H7 và đối chứng là vi khuẩn *E. coli* ATCC (hình 4).

Qua kết quả ở hình 4 cho thấy, cả kháng thể chuẩn lẫn kháng thể tái tổ hợp đều không bắt cặp với kháng nguyên trên vi khuẩn *E. coli* ATCC. Đối với vi khuẩn *E. coli* O157:H7, kháng thể chuẩn bắt đặc hiệu, hiện màu đậm, số

lượng nhiều; với kháng thể tái tổ hợp trên màng xuất hiện ít hơn, màu đậm tương tự do hàm lượng kháng thể sử dụng trong thí nghiệm thấp dẫn tới số lượng kháng thể bắt cặp với vi khuẩn *E. coli* O157:H7 thấp nên số lượng bắt không nhiều như kháng thể chuẩn. Điều này chứng tỏ, kháng thể tạo ra đã bắt đặc hiệu với vi khuẩn *E. coli*, tuy nhiên cần nâng cao hàm lượng kháng thể trong các nghiên cứu tiếp theo.

Xác định tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp bằng các phương pháp lai blot

Để xác định protein thu được là protein dung hợp kháng thể mang trình tự His-tag, chúng tôi đã tiến hành kỹ thuật lai Western blot (hình 3), sử dụng kháng thể kháng His-tag với nồng độ pha loãng 1:2000. Kết quả ở hình 3 cho thấy xuất hiện băng protein có kích thước khoảng 30 kDa, tương ứng với kích thước lý thuyết của kháng thể tái tổ hợp, kết quả này chứng tỏ đã biểu hiện và tinh sạch thành công kháng thể tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực Ni²⁺.



Hình 4. Kết quả Dot blot kháng thể tạo ra với kháng thể chuẩn (Hãng Abcam)

1: Vi khuẩn ATCC; 2: Vi khuẩn *E. coli* O157:H7.

lượng nhiều; với kháng thể tái tổ hợp trên màng xuất hiện ít hơn, màu đậm tương tự do hàm lượng kháng thể sử dụng trong thí nghiệm thấp dẫn tới số lượng kháng thể bắt cặp với vi khuẩn *E. coli* O157:H7 thấp nên số lượng bắt không nhiều như kháng thể chuẩn. Điều này chứng tỏ, kháng thể tạo ra đã bắt đặc hiệu với vi khuẩn *E. coli*, tuy nhiên cần nâng cao hàm lượng kháng thể trong các nghiên cứu tiếp theo.

Kiểm tra hoạt tính kháng thể bằng ELISA

Để đánh giá độ nhạy của kháng thể tái tổ hợp tạo ra với vi khuẩn *E. coli* O157:H7, phản ứng ELISA với kháng nguyên là vi khuẩn *E. coli* O157:H7, đối chứng là vi khuẩn ATCC và PBS được thực hiện. Kết quả ELISA được trình bày ở bảng 1.

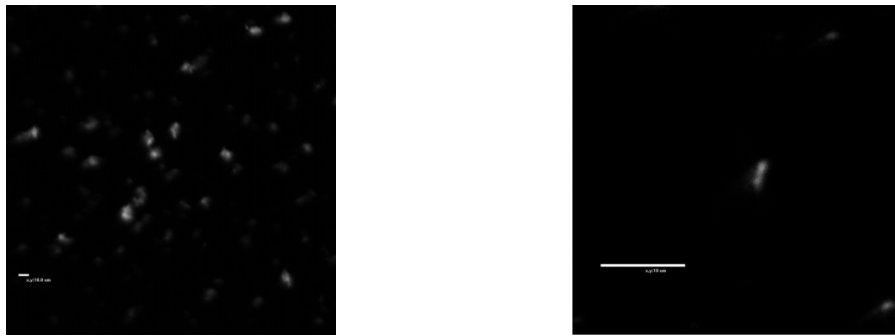
Bảng 1. Kết quả của phản ứng ELISA xác định độ nhạy của kháng thể tái tổ hợp và kháng thể chuẩn

Mẫu	Kháng thể	OD 405nm	
		Kháng thể tái tổ hợp	Kháng thể chuẩn (AB75244)
PBSIX		$0,05 \pm 1 \times 10^{-6}$	$0,048 \pm 3 \times 10^{-6}$
ATCC		$0,067 \pm 2,33 \times 10^{-6}$	$0,061 \pm 0,000013$
O157		$0,59 \pm 0,00026$	$0,78 \pm 0,00079$

Dựa vào kết quả ở bảng 1 có thể thấy, cả kháng thể tái tổ hợp và kháng thể chuẩn đều không bắt cặp với vi khuẩn ATCC nhưng bắt cặp đặc hiệu với vi khuẩn *E. coli* O157:H7, trong đó, giá trị OD 405 nm đo được của kháng thể chuẩn cao hơn so với kháng thể tái tổ hợp. Kết quả này chứng tỏ kháng thể chuẩn có độ đặc hiệu cao hơn kháng thể tái tổ hợp.

Xác định tính đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp bằng gắn hạt nano

Các hạt nano gắn kháng thể có khả năng ứng dụng trong y sinh đặc biệt đối với quá trình điều trị và chẩn đoán. Trong nghiên cứu này, độ đặc hiệu của kháng thể tái tổ hợp đã được kiểm tra bằng phương pháp gắn silica và soi dưới hệ kính hiển vi laser quét đồng tiêu. Kết quả được thể hiện ở hình 5.



Hình 5. Hình ảnh phức kháng thể-silica bắt tế bào *E. coli* O157:H7

Các điểm sáng màu xanh là vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được bắt bởi phức kháng thể-silica khi soi ở độ phóng đại 60X dưới kính hiển vi.

Kết ở hình 5 cho thấy, khi soi phức kháng thể-silica liên kết với vi khuẩn *E. coli* O157:H7 đã có rất nhiều điểm phát quang trên trường kính. Điều đó chứng tỏ đã có nhiều kháng thể đã bám vào vi khuẩn *E. coli* O157:H7. Thí nghiệm cũng được tiến hành song song với đối chứng là vi khuẩn ATCC, tuy nhiên, do kháng thể không bám vào vi khuẩn này, dẫn tới vi khuẩn không phát quang và không quan sát được dưới kính hiển vi. Như vậy, có thể thấy kháng thể tái tổ hợp bắt cặp đặc hiệu với vi khuẩn *E. coli* O157:H7, không bắt cặp với đối chứng là vi khuẩn ATCC.

KẾT LUẬN

Đã xác định tính tan và tinh sạch được

protein kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu vi khuẩn *E. coli* O157:H7.

Kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu vi khuẩn *E. coli* O157:H7 được kiểm tra hoạt tính bằng các phương pháp Western Blot, Dot Blot và ELISA.

Bước đầu sử dụng phức hợp nano-kháng thể trong việc phát hiện vi khuẩn *E. coli* O157:H7 bằng phương pháp soi dưới kính hiển vi laser.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Buchanan R. L., Doyle M. P., 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. Food. Technol., 51(10): 69-76.

2. Lê Đình Chắc, Nguyễn Thị Thu Thủy, Lê Quang Huân, 2010. Tạo kháng thể scFV đặc hiệu kháng nguyên CYFRA 21-1. Tạp chí Y học thực hành, 2: 163-168.
3. Lê Quang Huân, Lã Thị Huyền, 2009. Kháng thể tái tổ hợp và ứng dụng. Nxb. Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.
4. Hoàng Phú Hiệp, Lê Quang Huân, 2014. Tạo dòng và biểu hiện kháng thể tái tổ hợp đặc hiệu vi khuẩn *Escherichia coli* O157:H7. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên, 129(15): 89-94.
5. Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. Nature, 22: 680-685.
6. Smith G. P., 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science, 228(4705): 1315-1317.
7. Trung tâm Kiểm soát và Phòng chống bệnh Hoa Kỳ, 2014 <http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>, ngày 10/12/2014.

ACTIVITY TEST OF ANTIBODY RECOMBINANT SPECIFICITY *Escherichia coli* O157:H7

Hoang Phu Hiep¹, Le Thi Kim Xuan², Nguyen Minh Lua², Nguyen Thi Minh Huyen²,
Tran Manh Ha², Dao Minh Duc², Nguyen Bich Nhi², Le Quang Huan²

¹Thai Nguyen University of Education, TNU

²Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Antibodies are immunoglobulin molecules which originally are glycoprotein that play role to identify and neutralize foreign agents such as viruses or bacteria.

In this study, antibody protein recombine specificity of *E. coli* O157:H7 which was purified using hybrid methods. Next, antibody activity was tested by the methods as Dot Blot, Western Blot & ELISA. The results showed that antibody protein specifically paired with *E. coli* O157:H7. Initially determine the specificity of antibodies by recombinant methods silica nanoparticles attached to antibodies and staining with *E. coli* O157:H7 and examined under a microscope. Thereby creating a scientific basis for the study of microbial diagnostic kit created in food samples as well as providing additional sources of antibody therapy of poisoning caused by bacteria *E. coli* O157:H7.

Keywords: *Escherichia coli* O157:H7, pET28a TRX, recombinant antibodies, nano silica.

Ngày nhận bài: 10-7-2013