

BIỂU HIỆN VÀ TÍNH SẠCH CÁC KHÁNG NGUYÊN 56 KDa CÁC CHỦNG VI KHUẨN *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* GÂY BỆNH SỐT MÒ TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Lê Thị Lan Anh^{1,✉}, Trịnh Văn Toàn², Phạm Thị Hà Giang¹, Bùi Thị Thanh Nga¹, Võ Viêt Cường¹, Hồ Thị Hồng Nhung³, Nguyễn Lê Huyền Trang⁴, Đinh Duy Kháng⁵

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga

²Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Học viện Nông nghiệp Việt Nam

⁴Viện Kiểm định quốc gia Vắc xin và sinh phẩm y tế

⁵Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: leanhbio@gmail.com

Ngày nhận bài: 04.8.2018

Ngày nhận đăng: 25.9.2018

TÓM TẮT

Bệnh sốt mò (scrub typhus) là bệnh truyền nhiễm cấp tính thuộc nhóm bệnh lây truyền từ động vật sang người, tác nhân gây bệnh là vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* Gram âm, truyền bệnh cho người qua vết đốt của ấu trùng mò. Hiện nay, việc chẩn đoán bệnh sốt mò chủ yếu dựa trên triệu chứng lâm sàng của bệnh và thường khó phân biệt với các bệnh khác như sốt dengue, sốt rét hay sốt do *Leptospira*. Vì vậy, một phương pháp có độ nhạy, độ chính xác cao cho chẩn đoán sốt mò đóng vai trò rất quan trọng. Với mục đích chế tạo bộ kit ELISA cho phát hiện kháng thể kháng vi khuẩn *O. tsutsugamushi* dùng trong chẩn đoán bệnh sốt mò tại Việt Nam, 4 đoạn gen mã hóa cho vùng quyết định kháng nguyên 56 kDa của các kiểu gen *O. tsutsugamushi* lưu hành phổ biến tại Việt Nam gồm Karp (HT-09), Gilliam (HT-11), TA763 (HT-49) và Kato (YB-50) đã được tách dòng và biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli* Rosetta 1. Cả 4 kháng nguyên tái tổ hợp đều được biểu hiện tốt ở dạng không tan (inclusion body). Các protein không tan này đã được làm tan trong nồng độ 6 M urea và tinh sạch thành công bằng sắc ký ái lực với Ni²⁺. Bốn protein tái tổ hợp HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 sau tinh sạch có độ tinh sạch trên 95% với hàm lượng protein lần lượt là 12,57 mg/ml; 11,6 mg/ml; 8,98 mg/ml và 8,02 mg/ml.

Từ khóa: Biểu hiện, kháng nguyên 56 kDa, không tan, *Orientia tsutsugamushi*, sốt mò, tinh sạch, urea

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sốt mò hay sốt bụi rậm (scrub typhus) là bệnh truyền nhiễm cấp tính, lây truyền từ động vật như loài gặm nhấm (chủ yếu là chuột), thỏ, lợn, các loài chim, hoặc gia súc (chó, lợn)... sang người thông qua vector truyền bệnh là ấu trùng mò. Tác nhân gây bệnh sốt mò là vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* Gram âm, ký sinh nội bào bắt buộc. Bệnh lưu hành chủ yếu ở Châu Á và Tây Thái Bình Dương (Kelly *et al.*, 2009). Ở Đông Nam Á, theo thống kê có tới 1 triệu trường hợp xảy ra mỗi năm (Nhiem *et al.*, 2017). *O. tsutsugamushi* có cấu trúc kháng nguyên đa dạng, tùy thuộc vào loài mò, động vật gặm nhấm và các động vật khác cũng như phân bố ở các vùng địa lý. Bằng phản ứng Western blot, các nhà khoa

học đã phát hiện ra 4 kháng nguyên của vi khuẩn có kích thước 22 kDa, 47 kDa, 56 kDa và 110 kDa. Trong đó, kháng nguyên 56 kDa chiếm 10-15% protein tổng số tế bào, mang tính đặc hiệu cao và không biểu hiện ở các *Rickettsia* khác. Hiện nay, có nhiều biến thể của kháng nguyên 56 kDa chủ yếu gồm Gilliam, Kato, Karp, TA763, Kawasaki, Kuroki và khoảng hơn 30 chủng huyết thanh khác đã được xác định trên toàn cầu.

Hiện nay có rất nhiều các phương pháp được sử dụng trong nghiên cứu chẩn đoán sốt mò như nested PCR (Nguyễn Văn Minh *et al.*, 2017), realtime PCR (Ngô Thi Quyết *et al.*, 2017), duplex PCR (Nguyễn *et al.*, 2017) cho phép chẩn đoán nhiễm *O. tsutsugamushi* ở giai đoạn sớm hay phương pháp miễn dịch huỳnh quang gián tiếp IFA (indirect

immunofluorescence), ELISA cho phép phát hiện kháng thể kháng *O. tsutsugamushi*. Trong các phương pháp trên thì IFA được đánh giá là “tiêu chuẩn vàng” trong chẩn đoán sốt mò. Bên cạnh phương pháp chuẩn IFA này, ELISA được đánh giá là phương pháp phát hiện sốt mò có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, đủ tiêu chuẩn để chẩn đoán sốt mò (Kim *et al.*, 1993).

Huyết thanh bệnh nhân sốt mò mang kháng thể kháng kháng nguyên 56 kDa với hiệu giá cao, do đó xét nghiệm chẩn đoán huyết thanh dựa trên kháng nguyên 56 kDa được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán bệnh sốt mò. Tuy nhiên, trình tự nucleotide trên vùng gen mã hoá cho kháng nguyên đặc hiệu 56 kDa khác nhau giữa các vùng địa lý dẫn đến sự thay đổi về kiểu gen 56 kDa của các chủng *O. tsutsugamushi* (Nguyễn Bảo Triệu *et al.*, 2017). Vì vậy, các nghiên cứu về sự lưu hành các kiểu gen 56 kDa của các chủng *O. tsutsugamushi* đóng vai trò quan trọng và quyết định trong việc lựa chọn kháng nguyên 56 kDa làm nguyên liệu chế tạo bộ kit chẩn đoán sốt mò. Theo nghiên cứu về kiểu gen của *O. tsutsugamushi* tại khu vực miền Bắc Việt Nam của nhóm tác giả Nguyễn và cộng sự, 2017 cho thấy các kiểu gen của *O. tsutsugamushi* rất đa dạng, phổ biến nhất là kiểu gen Karp (65%), TA763 (17%), Gilliam (12%) và các kiểu gen khác (17%) (Nguyễn *et al.*, 2017). Số liệu nghiên cứu kiểu gen của 40 chủng *O. tsutsugamushi* tại tỉnh Khánh Hoà thu thập năm 2013-2014 đã chỉ ra rằng 95% chủng *O. tsutsugamushi* có kiểu gen Karp, trong khi kiểu gen Gilliam và TA716 như nhau chỉ chiếm 2,5% (Nguyễn Bảo Triệu *et al.*, 2017). Nghiên cứu sự lưu hành các kiểu gen của *O. tsutsugamushi* tại một số khu vực miền Bắc của chúng tôi trong báo cáo gần đây nhất cho thấy 4 kiểu gen lưu hành chủ yếu là Karp (63,6%), Kato (12,1%), TA763 (9,1%), Gilliam (6,1%) (Nguyễn Văn Minh *et al.*, 2017). Trước đây, các phương pháp ELISA nghiên cứu trong chẩn đoán sốt mò chỉ dựa vào kiểu gen Karp mã hoá cho kháng nguyên 56 kDa, đây là kiểu gen lưu hành phổ biến nhất trong các kiểu gen của *O. tsutsugamushi* (Kelly *et al.*, 2009, Blacksell *et al.*, 2008). Tuy nhiên, để tăng độ nhạy cũng như độ đặc hiệu của phương pháp ELISA, hỗn hợp 3 hoặc 4 kháng nguyên 56 kDa của các kiểu gen lưu hành phổ biến nhất đã được tuyển chọn làm nguyên liệu chế tạo bộ kit ELISA và khuyến cáo được sử dụng trong chẩn đoán sốt mò tại các khu vực có sự lưu hành của kiểu gen trên (Kim *et al.*, 2013). Để tạo bộ kit ELISA có độ nhạy và độ đặc hiệu cao dùng trong chẩn đoán bệnh sốt mò tại Việt Nam, bốn vùng quyết định kháng nguyên 56 kDa các

kiểu gen lưu hành chủ yếu ở Việt Nam gồm Karp (HT-09), Gilliam (HT-11), Kato (HT-49) và TA763 (YB-50) đã được lựa chọn. Trong bài báo trước, đoạn gen mã hoá cho *ht-09* được đưa vào vector pET22b(+) và biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21. Tuy nhiên, sau khi so sánh khả năng biểu hiện protein HT-09 sử dụng hệ vector pLATE51 và dòng tế bào biểu hiện *E. coli* Rosetta 1, kết quả cho thấy, protein HT-09 tách dòng trong vector pLATE51 và biểu hiện tốt hơn trong tế bào *E. coli* Rosetta 1 (Lê Thị Lan Anh *et al.*, 2017). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả tách dòng và biểu hiện 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 trong vector pLATE51 và tế bào *E. coli* Rosetta 1. Các protein tái tổ hợp sau biểu hiện được tinh sạch bằng sắc ký ái lực Ni²⁺.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, plasmid và huyết thanh

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1Δ lac U169 (φ80 lacZM15)*], *E. coli* Rosetta 1 [*lacI lacUV5-pLysSRARE[T7p20 ileX argUthrU tyrU glyT thrT argW metT leuW proL ori_{p15A}](Cm^R)* (Novagen) được sử dụng để nhân dòng và biểu hiện đoạn gen mã hoá kháng nguyên 56 kDa.

Vector tách dòng và biểu hiện pLATE51 (Invitrogen).

Huyết thanh bệnh nhân sốt mò dương tính với kháng thể kháng kháng nguyên 56 kDa của *O. tsutsugamushi* (xác định bằng test nhanh SD-Bioline, Hàn Quốc và nested PCR) được sử dụng để lai Western blot.

Hóa chất dùng trong điện di protein và Western blot: Tris base (Biorad), APS (Merk), Temed (Sigma), Bisacrylamide, Acrylamide (Merk), Glycerol (Merk), SDS (Biorad), đệm xử lý protein 5x (Thermo scientific), Skim milk (Merk), TMB (Thermo scientific), PBST (500 mL): 1,16 g Na₂HPO₄, 0,1 g KCl, 0,1 g K₃PO₄, 4,0 g NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,4 (Merk).

Phương pháp nghiên cứu

Biểu hiện đoạn gen *ht-09*, *ht-11*, *ht-49*, *yb-50* trong tế bào *E. coli* Rosetta 1

Tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pLATE_{ht-09} hoặc pLATE_{ht-11}, hoặc pLATE_{ht-49}, hoặc pLATE_{yb-50} được nuôi trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin

(LBamp), ở 37°C, qua đêm. Chuyển 1% dịch nuôi cấy trên vào môi trường LBamp, nuôi cấy ở cùng điều kiện đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4 - 0,6 tiến hành cảm ứng với 0,1 mM IPTG (HT-09 và HT-11) hoặc 0,5 mM IPTG (HT-49 và YB50). Tế bào tiếp tục được nuôi cấy ở cùng điều kiện trong 4 giờ. Thu mẫu bằng li tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Protein tổng số được phân tích bằng điện di SDS-PAGE và Western blot. Sinh khối tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp được hòa tan trong đệm 20mM Tris-HCl pH 8 đạt OD₆₀₀=10, mẫu được bảo quản ở -80°C.

Kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu của protein tái tổ hợp với huyết thanh kháng *O. tsutsugamushi*

Protein tổng số sau điện di trên gel polyacrylamide 12,6% được chuyển lên màng PVDF sử dụng thiết bị chuyển màng (Cleaver Scientific) trong 1 giờ. Màng sau đó được ủ trong dung dịch sữa skim milk 5% pha trong dung dịch TBS (0,5 M Tris HCl, pH 7,5; 2,5 M NaCl) 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiến hành rửa màng bằng dung dịch TTBS (TBS bổ sung 0,05% Tween-20) và TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút. Màng sau đó được ủ với huyết thanh bệnh nhân dương tính với *O. tsutsugamushi* pha loãng 2000-5000 lần trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa màng lần lượt bằng dung dịch TTBS và TBS, tiếp theo màng được ủ với kháng thể 2 là kháng thể kháng IgM người cộng hợp HRP pha loãng 10000 lần trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Màng sau đó được rửa bằng dung dịch TBS và TTBS. Cuối cùng màng được hiện màu bằng dung dịch hiện màu TMB (Thermo Scientific).

Xử lý sơ bộ protein tái tổ hợp HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50

Siêu âm phá tế bào trên đá trong 30 phút. Li tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi (dung dịch S1). Tủa được hòa lại trong đệm A (20 mM Tris-HCl, pH 8; 0,5 mM EDTA; 1% Triton-X100) (dung dịch P1). Dung dịch P1 được bổ sung urea đến nồng độ cuối cùng là 2 M, lắc đều 10 phút ở nhiệt độ phòng. Li tâm 15 phút ở 8000 vòng/phút, dịch nổi (dung dịch S2). Tủa được hòa lại trong đệm A (20 mM Tris-HCl, pH8; 0,5 mM EDTA; 1% Triton-X100) (dung dịch P2). Dung dịch P2 được bổ sung urea đến nồng độ cuối cùng là 4 M, lắc đều ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Tiếp tục li tâm 15 phút ở 8000 vòng/phút, dịch nổi (dung dịch S3). Tủa được hòa lại bằng đệm A (20 mM Tris-HCl, pH 8; 0,5 mM EDTA; 1% Triton-X100) (dung dịch P3). Dung dịch P3 được bổ sung urea đến nồng độ cuối cùng là 6 M, lắc đều 10 phút ở nhiệt độ phòng. Li tâm 8000 vòng/phút trong 15 phút, dịch nổi (dung dịch S4).

Tủa được hòa lại trong đệm A (dung dịch P4). Các dung dịch được giữ lại và kiểm tra khả năng hòa tan của protein trong urea bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6%.

Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực

Bốn protein tái tổ hợp 56 kDa được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni²⁺ Hitrap HP chelating 5 ml (GE). Quy trình tinh sạch được thực hiện theo các bước sau: Bước 1: Rửa cột bằng 25 ml nước cất 2 lần, bước 2: Rửa cột trong 25 ml dung dịch đệm A (20 mM Tris-HCl, pH 8; 1% Triton-X100; 6 M urea, 10 mM Imidazole), bước 3: 20 ml dung dịch protein trong đệm A chứa 6 M urea được đưa lên cột. Protein tái tổ hợp có gắn đuôi histidine có ái lực mạnh với Nickel trên cột sẽ được giữ lại trên cột, những protein không có histidine và các thành phần khác sẽ đi ra khỏi cột. Bước 4: Protein tái tổ hợp 56 kDa được đẩy ra khỏi cột bằng 10 ml dung dịch đệm B chứa 20mM Tris-HCl, pH8; 1% Triton-X100; 6 M urea, 100 mM Imidazole, bước 5: Làm sạch cột bằng 25 ml dung dịch đệm A chứa 250 mM Imidazole, bước 6: Rửa cột bằng 25 ml nước cất 2 lần. Cột được giữ trong 20% ethanol và bảo quản ở 4°C. Các phân đoạn protein trước và sau tinh sạch được giữ lại và kiểm tra độ sạch bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,6%.

Thẩm tích loại ure trong sản phẩm tinh sạch

Phân đoạn protein sau tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực trong 6M urea được thẩm tích lần lượt trong dung dịch đệm chứa 4 M và 2 M urea. Các bước được thực hiện như sau: Dịch protein sau tinh sạch chứa 6M urea được đặt trong túi thẩm tích (SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 10K MWCO, Thermo Scientific) và được thẩm tích 2 lần trong dung dịch đệm (20 mM Tris-HCl, pH 8 chứa 4 M urea), mỗi lần trong 1 giờ ở 4°C. Sau đó, túi thẩm tích chứa dung dịch protein được thẩm tích 2 lần trong dung dịch đệm (20 mM Tris-HCl, pH 8 chứa 2 M urea), mỗi lần trong 1 giờ ở 4°C. Cuối cùng, túi thẩm tích chứa protein được thẩm tích 2 lần trong dung dịch đệm 20 mM Tris-HCl, pH 8, không chứa urea, mỗi lần trong 1 giờ ở 4°C. Hàm lượng protein sau thẩm tích được định lượng bằng máy nanodrop. Dịch protein sau thẩm tích được bảo quản ở -80°C.

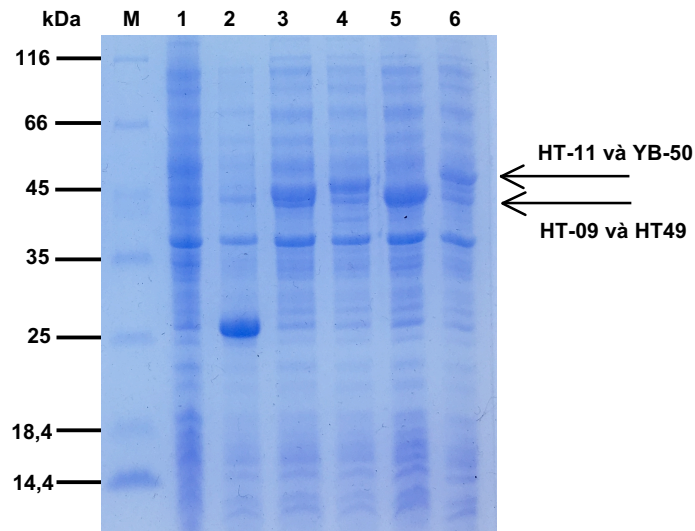
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

Biểu hiện 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 trong dòng tế bào *E. coli* Rosetta 1

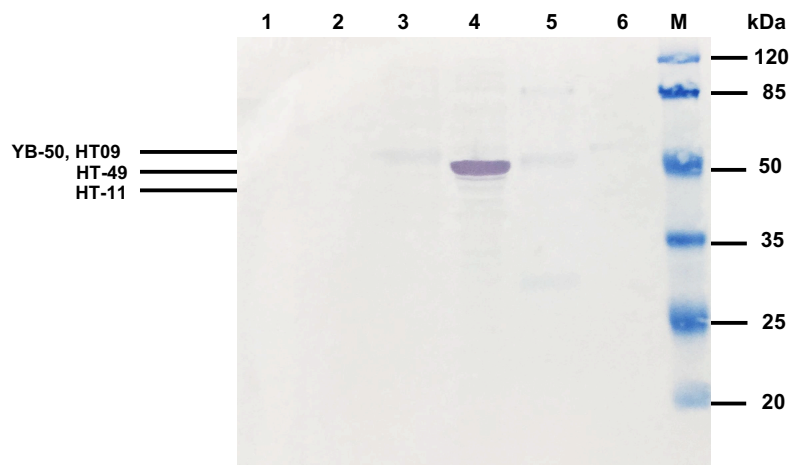
Trong quá trình thiết kế, cả 4 gen *ht-09*, *ht-11*,

ht-49 và *yb-50* được thiết kế gắn thêm 6 bộ ba mã hóa cho histidine ở đầu C vì vậy protein được biểu hiện sẽ gắn thêm 6 gốc histidine thuận lợi cho quá trình tinh sạch bằng sắc ký ái lực sau này. Theo tính toán, đoạn gen mã hóa vùng quyết định kháng nguyên cho *ht-09*, *ht-11*, *ht-49* và *yb-50* có kích thước lần lượt khoảng 1149 bp, 1113 bp, 1146 bp và 1200 bp. Protein HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 sau tổng hợp có trọng lượng phân tử lần lượt là 46 kDa, 44 kDa, 46 kDa và 48 kDa.

Kết quả trên hình 1 cho thấy, sau khi cảm ứng với IPTG, cả 4 dòng tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp đều xuất hiện một vạch băng đậm có kích thước theo đúng như tính toán. Các vạch băng này không được quan sát ở tế bào *E. coli* Rosetta 1 và tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang vector pLATE51. Như vậy, cả 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rosetta 1.



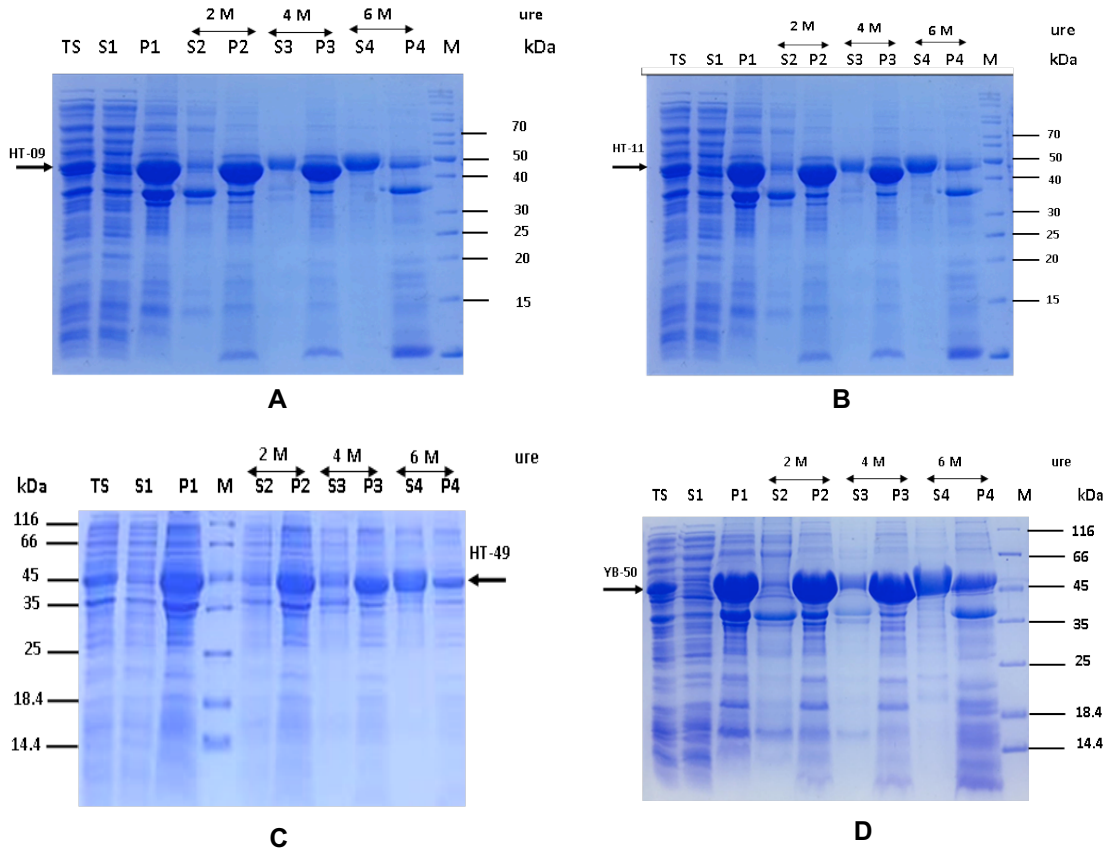
Hình 1. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 trong tế bào *E. coli* Rosetta 1. Đường chạy 1. Tế bào *E. coli* Rosetta 1, đường chạy 2. Tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang vector pLATE51, đường chạy 3-6. Tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pLATE_HT09, pLATE_HT11, pLATE_HT49 và pLATE_YB50 cảm ứng với 0,5 mM IPTG ở 37°C trong 4 giờ, M. Thang chuẩn protein (Thermo Scientific).



Hình 2. Kiểm tra sự bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên và kháng thể bằng western blotting của protein tái tổ hợp HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 trong tế bào *E. coli* Rosetta 1 của protein tái tổ hợp bằng Western blot. Đường chạy 1. Tế bào *E. coli* Rosetta 1, đường chạy 2. Tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang vector pLATE51, đường chạy 3-6. Tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pLATE_HT09, pLATE_HT11, pLATE_HT49 và pLATE_YB50 cảm ứng với 0,5 mM IPTG ở 37°C trong 4 giờ, M. Thang chuẩn protein (Thermo Scientific).

Để kiểm tra chính xác sự biểu hiện của protein tái tổ hợp, cả 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 đã được tiến hành phản ứng lai miễn dịch bằng Western blot sử dụng huyết thanh của bệnh nhân chẩn đoán sốt mò dương tính với *O. tsutsugamushi* chủng Karp, Gilliam, TA763 và Kato

làm kháng thể 1 (kháng thể pha loãng 5000 lần). Kết quả trên hình 2 cho thấy, cả 4 kháng nguyên bắt cặp đặc hiệu với kháng thể tương ứng. Như vậy, cả 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rosetta 1.



Hình 3. Kết quả xử lý tiền tinh chế 4 kháng nguyên tái tổ hợp HT-09 (A) , HT-11 (B), HT-49 (C) và YB-50 (D) trong ure. TS. Protein tổng số, S1. Protein pha tan, P1. Protein pha không tan, S2. Protein tan trong 2 M ure, P2. Protein không tan trong 2 M ure, S3. Protein tan trong 4 M ure, P3. Protein không tan trong 4 M ure, S4. Protein tan trong 6 M ure, P4. Protein không tan trong 6 M ure.

Xử lý sơ bộ 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50

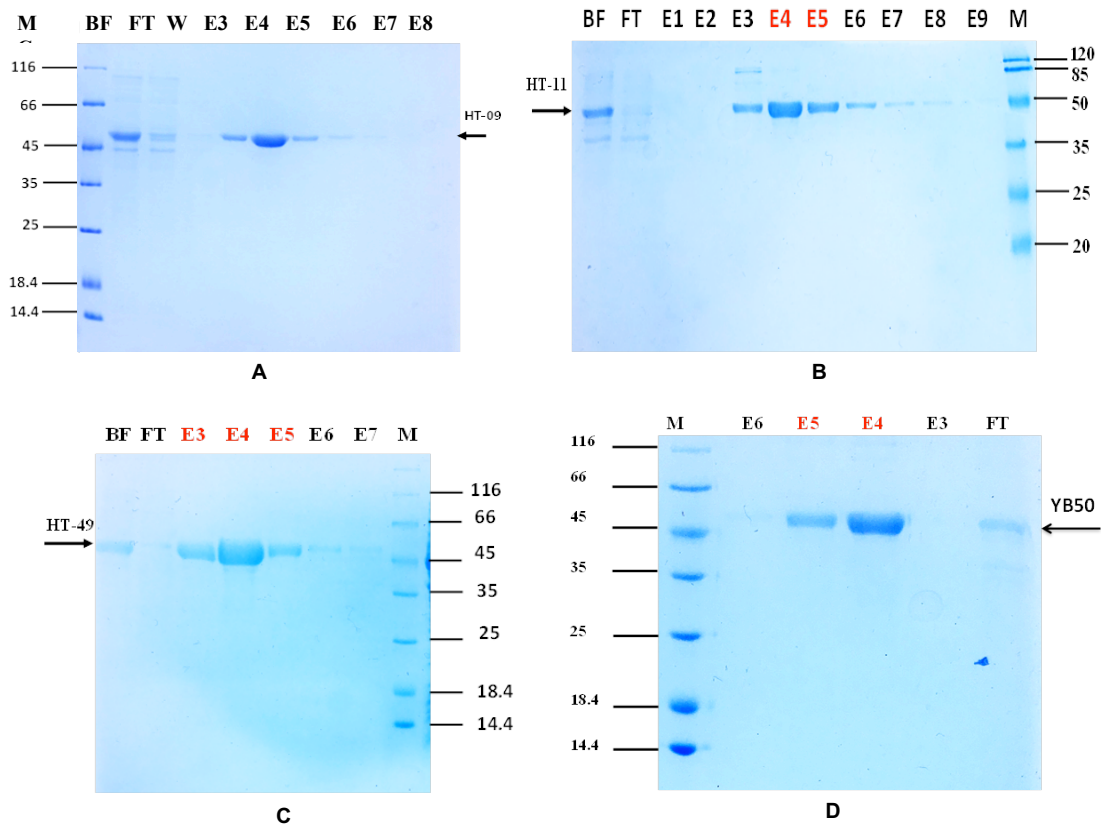
Tính tan của protein đóng vai trò quan trọng quyết định đến hoạt tính sinh học của protein. Vì vậy, sau khi kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp dạng tan (soluble form) và không tan (insoluble form) của protein đã được kiểm tra. Sử dụng phương pháp siêu âm phá tế bào, dưới tác dụng mạnh của sóng siêu âm kết hợp với sốc nhiệt đã phá vỡ thành tế bào vi khuẩn và giải phóng protein. Sau khi li tâm, phần protein tan tồn tại ở dạng dịch nổi (pha tan), các thành phần của tế bào và protein không tan được

lắng xuống ở dạng tủa (pha không tan). Pha tan và không tan được thu lại và kiểm tra bằng điện di protein trên gel polyacrylamide 12,6%. Kết quả trên hình 3 cho thấy, cả 4 kháng nguyên đều biểu hiện ở dạng không tan (đường chạy P1). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu trước đó (Ching *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 2003). Để thuận lợi cho quá trình tinh chế, mẫu protein dạng không tan đã được làm tan trong các nồng độ urea khác nhau từ 0, 2, 4, 6 và 8 M. Kết quả cho thấy kháng nguyên HT-11 và YB-50 tan tốt ở nồng độ 6 M urea (Hình 3B, D, đường chạy S4) và kém tan ở nồng độ 8 M urea, trong khi HT-09 và HT-49 tan

trung đối tốt ở nồng độ 6 M urea (Hình 3 A, C, đường chạy S4) và tan gần như hoàn toàn ở nồng độ 8 M urea (dữ liệu không trình bày). Sau quá trình xử lý protein trong các nồng độ urea từ thấp đến cao, kết quả cho thấy protein đích tan chủ yếu trong nồng độ 6 M – 8 M urea (Hình 3), các protein tạp đã được loại bỏ hiệu quả qua các bước làm tan và rửa, kết quả này phù hợp với các công bố trước đây. Các nghiên cứu của Cao và cộng sự năm 2007, Ching và cộng sự năm 1998 cho thấy kháng nguyên 56 kDa tái tổ hợp tan tốt ở nồng độ 6 M urea (Cao *et al.*, 2007, Ching *et al.*, 1998), tuy nhiên một số nghiên cứu khác đã chỉ ra rằng nồng độ 8 M urea là nồng độ phù hợp để làm tan protein tái tổ hợp 56 kDa (Yang *et al.*, 2003). Căn cứ vào kết quả trên hình 3 và để giảm chi phí cho quá trình xử lý tiền tinh chế và thuận lợi cho quá trình loại urea sau tinh sạch, nồng độ 6 M urea đã được lựa chọn để hòa tan 4 kháng nguyên tái tổ hợp HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50. Dịch protein hòa tan trong 6 M urea được thu lại và đưa lên cột sắc ký ái lực Hitrap HP chelating 5 ml để tiến hành tinh sạch protein.

Kết quả tinh sạch 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50

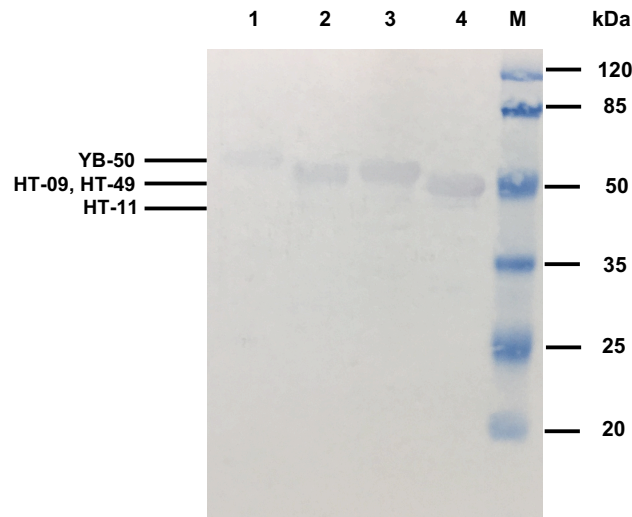
Dung dịch protein tan trong 6 M urea được đưa lên cột sắc ký ái lực Hitrap HP Chelating 5 ml. Protein được đưa lên cột ở dung dịch đệm chứa 10 mM Imidazole, các phân đoạn chứa protein sau tinh sạch được thu ở dung dịch đệm chứa 100 mM Imidazole. Các phân đoạn chứa protein tái tổ hợp được tiến hành điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 12,6%. Kết quả cho thấy, cả 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 đều tập trung chủ yếu ở 3 phân đoạn E3, E4 và E5 (Hình 4). Hàm lượng protein sau tinh sạch của 4 kháng nguyên HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 ở phân đoạn E4 có giá trị lần lượt là 12,57 mg/ml; 11,6 mg/ml; 8,98 mg/ml và 8,02 mg/ml. Sử dụng phần mềm phân tích độ sạch của protein Gel Analyzer để kiểm tra độ sạch của protein sau tinh sạch. Kết quả chỉ ra rằng cả 4 kháng nguyên sau tinh sạch có độ sạch trên 95%.



Hình 4. Kết quả tinh sạch 4 kháng nguyên tái tổ hợp HT-09 (A), HT-11 (B), HT-49 (C) và YB-50 (D). BF. Dung dịch protein trước khi qua cột, FT. Dung dịch qua cột, W. Dung dịch rửa cột, E3-E9. Các phân đoạn protein thu được ở nồng độ 100 mM Imidazole, M. Thang chuẩn protein (Thermo Scientific).

Kiểm tra tính bắt cặp đặc hiệu với kháng thể bằng phương pháp Western blot cho thấy cả 4 protein tái tổ hợp sau tinh sạch bắt cặp đặc hiệu với kháng thể kháng *O. tsutsugamushi* với 4 băng protein đậm xuất hiện trên màng lai với kích thước đúng như tính toán HT-09 (46 kDa), HT-11 (44

kDa), HT-49 (46 kDa) và YB-50 (58 kDa) (Hình 5). Phân đoạn E4 và E5 của mỗi protein được hoà với nhau để tiến hành thẩm tích loại urea. Dung dịch protein sau thẩm tích được sử dụng làm nguyên liệu chế tạo bộ kit ELISA phát hiện nhiễm *O. tsutsugamushi*.



Hình 5. Kiểm tra sự bắt cặp đặc hiệu kháng nguyên và kháng thể bằng phương pháp Western blot của protein tái tổ hợp HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 sau tinh sạch trong 6 M ure. Đường chạy 1. YB-50, đường chạy 2. HT-09, đường chạy 3. HT-49, đường chạy 4. HT-11, M. Thang chuẩn protein (Thermo Scientific).

KẾT LUẬN

Bốn đoạn gen *ht-09*; *ht-11*; *ht-49* và *yb-50* mã hóa vùng quyết định kháng nguyên 56 kDa của *O. tsutsugamushi* đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rosetta 1. Bốn kháng nguyên 56 kDa biểu hiện tốt ở dạng không tan và bắt cặp đặc hiệu với kháng thể kháng *O. tsutsugamushi* kiểm tra bằng phương pháp Western blot. Kết quả xử lý sơ bộ và tinh sạch bằng sắc ký ái lực với Ni^{2+} cho thấy cả 4 protein tái tổ hợp HT-09, HT-11, HT-49 và YB-50 có độ sạch trên 95% và hàm lượng lần lượt là 12,57 mg/ml; 11,6 mg/ml; 8,98 mg/ml và 8,02 mg/ml.

Lời cảm ơn: Nội dung nghiên cứu này được thực hiện từ đề tài cấp Bộ Quốc phòng “Nghiên cứu chế tạo bộ kit ELISA phát hiện nhiễm *O. tsutsugamushi*”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Blacksell SD, Luksameetanasan R, Kalambaheti T,

Aukkanit N, Paris DH, McGready R, Nosten F, Peacock SJ, Day NP (2008) Genetic typing of the 56-kDa type-specific antigen gene of contemporary *Orientia tsutsugamushi* isolates causing human scrub typhus at two sites in north-eastern and western Thailand. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52(3): 335–342.

Kelly DJ, Fuerst PA, Ching WM, Richards AL (2009) Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Infect Dis* 48(3): S203–230.

Kim IS, Seong SY, Woo SG, Choi MS, Chang WH (1993) High-level expression of a 56-kilodalton protein gene (*bor56*) of *Rickettsia tsutsugamushi* Boryong and its application to enzyme-linked immunosorbent assays. *J Clin Microbiol* 31(3): 598–605.

Kim YJ, Yeo SJ, Park SJ, Woo YJ, Kim MW, Kim SH, Chang IA, Jeon SH, Park BJ, Song GJ, Lee MG, Kim IS, Kim YW (2013) Improvement of the diagnostic sensitivity of scrub typhus using a mixture of recombinant antigens derived from *Orientia tsutsugamushi* serotypes. *J Korean Med Sci* 28(5): 672–679.

Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Văn Minh, Trịnh Văn Toàn, Bùi Thị Thanh Nga, Võ Việt Cường (2017) Tách dòng và biểu hiện đoạn gen mã hóa vùng quyết định kháng nguyên 56 kDa của vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* trong *E. coli*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nhiệt đới* 13: 67–74.

Cao M, Guo H, Tang T, Wang C, Li X, Pan X, Jin Z, Tang J (2007) Preparation of recombinant antigen of *O. tsutsugamushi* Ptan strain and development of rapid diagnostic reagent for scrub typhus. *Am J Trop Med Hyg* 76(3): 553–558.

Ngô Thị Quyết, Nguyễn Bảo Triệu, Trịnh Hoàng Long, Nguyễn Đức Duy, Ngô Đăng Nghĩa, Viên Quang Mai (2017) Điều tra tình hình bệnh sốt mò do *Orientia tsutsugamushi* tại tỉnh Khánh Hòa, Việt Nam. *Tạp chí Y học Dự phòng* 27(8): 579.

Nguyễn Bảo Triệu, Ngô Thị Quyết, Huỳnh Kim Mai, Trịnh Thị Xuân Mai, Trịnh Hoàng Long, Nguyễn Đức Duy, Viên Quang Mai (2017) Xác định kiểu gen của *Orientia tsutsugamushi* gây bệnh sốt mò lưu hành tại tỉnh Khánh Hòa giai đoạn 2013-2014. *Tạp chí Y học dự phòng* 27(8): 485.

Nguyen HLK, Pham HTT, Nguyen TV, Hoang PV, Le MTQ, Takemura T, Hasebe F, Hayasaka D, Yamada A, Hotta K. (2017) The genotypes of *Orientia tsutsugamushi*, identified in scrub typhus patients in northern Vietnam. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 111(3): 137–139.

Nguyễn Văn Minh, Nguyễn Văn Tình, Phạm Thị Hà Giang, Trịnh Văn Toàn, Dương Tuấn Linh, Võ Việt Cường (2017) Đặc điểm di truyền phân tử của vi khuẩn

Orientia tsutsugamushi gây bệnh sốt mò ở một số tỉnh phía Bắc. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ nhiệt đới* 13: 59–66.

Nhiem LV, Maureen L, Hoa LTP, Nho LV, Oleg M, Didier R, Philippe P (2017) Use of eschar swabbing for the molecular diagnosis and genotyping of *Orientia tsutsugamushi* causing scrub typhus in Quang Nam province, Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis* 11(2): e0005397.

Ching WM, Wang H, Eamsila C, Kelly DJ, Dasch GA (1998) Expression and Refolding of Truncated Recombinant Major Outer Membrane Protein Antigen (r56) of *Orientia tsutsugamushi* and Its Use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Clin Diagn Lab Immunol* 5(4): 519–526.

Chen WJ, Niu DS, Zhang XY, Chen ML, Cui H, Wei WJ, Wen BH, Chen XR (2003) Recombinant 56-Kilodalton Major Outer Membrane Protein Antigen of *Orientia tsutsugamushi* Shanxi and Its Antigenicity. *Infect Immun* 71(8): 4772–4779.

Lee YM, Kim DM, Lee SH, Jang MS, Neupane GP (2011) Phylogenetic Analysis of the 56 kDa Protein Genes of *Orientia tsutsugamushi* in Southwest Area of Korea. *Am J Trop Med Hyg* 84(2): 250–254.

Qing Yang Wei-Mei Ching J.U. Jiang Leslie Lousteau Allen L. Richards (2003) An Improved Method for the Purification and Refolding of r56-kDa Proteins from Gilliam and Kato strains of *Orientia tsutsugamushi*. *Ann N Y Acad Sci* 990: 375–85.

EXPRESSION AND PURIFICATION OF FOUR TRUNCATED 56 KDA ANTIGENS FROM *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* IN *ESCHERICHIA COLI*

Le Thi Lan Anh¹, Trinh Van Toan², Pham Thi Ha Giang¹, Bui Thi Thanh Nga¹, Vo Viet Cuong¹, Ho Thi Hong Nhung³, Nguyen Le Huyen Trang⁴, Dinh Duy Khang⁵

¹Institute of Bio-Medicine, Vietnam Russia Tropical Center

²VNU University of Science

³Vietnam National University of Agriculture

⁴National Institute for Control of Vaccine and Biologicals

⁵Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Scrub typhus is an acute febrile illness caused by *Orientia tsutsugamushi*, transmitted to humans by the bite of the larva of trombiculid mites. Diagnosis of scrub typhus is normally based on the clinical presentations. However, it is difficult to differentiate scrub typhus from other acute febrile illnesses, such as dengue fever, malaria and leptospirosis due to similar symptoms. For differential diagnosis of scrub typhus from other acute febrile diseases, a rapid and reliable serological diagnosis is important. In order to produce an ELISA kit for detection of antibodies against *O. tsutsugamushi* in Vietnam, four truncated 56 kDa antigenic genes of *O. tsutsugamushi* including Karp (HT-09), Gilliam (HT-11), TA763 (HT-49), and Kato (YB-50) isolated from the most prevalent cases in Vietnam were cloned and expressed in *E. coli* Rosetta 1 cells. The recombinant proteins formed inclusion bodies when expressed in *E. coli*. The recombinant 56 kDa proteins in insoluble form were solubilized in 6M urea and were successfully purified by Ni²⁺ affinity column. The purity of four

Tạp chí Công nghệ Sinh học **16**(3): 533–541, 2018

recombinant proteins, HT-09, HT-11, HT-49 and YB-50, reached more than 95% and their concentrations are 12,57 mg/ml; 11,6 mg/ml; 8,98 mg/ml và 8,02 mg/ml, respectively.

Keywords: *56 kDa antigen, expression, inclusion body, Orientia tsutsugamushi, purification, scrub typhus, urea*