

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA LYSIN TÁI TỔ HỢP TỪ PHAGE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Bùi Thị Thùy Dương¹, Nguyễn Đình Duy¹, Đinh Duy Kháng¹, Nguyễn Huy Thuận², Nguyễn Minh Hoàng¹, Đồng Văn Quyên^{1,✉}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Duy Tân

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: dvquyen@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 10.7.2017

Ngày nhận đăng: 02.4.2018

TÓM TẮT

Việc phát minh ra kháng sinh được xem là bước tiến vượt bậc của nền y học thế giới vào đầu thế kỷ 20. Trong sáu thập kỷ qua, 'thần dược' này đã đóng một vai trò quan trọng trong việc giảm gánh nặng toàn cầu về các bệnh truyền nhiễm. Tuy nhiên, trải qua thời gian, cùng với việc lạm dụng kháng sinh đã làm xuất hiện nhiều vi khuẩn kháng kháng sinh. Trước thực trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn ngày càng gia tăng, việc sử dụng lysin bên cạnh liệu pháp thực khuẩn thể (phage therapy) để phòng và điều trị bệnh do vi khuẩn gây ra đang thu hút được sự quan tâm của các nhà khoa học trên toàn thế giới. Lysin hay còn được gọi là endolysin là enzyme thủy phân thuộc họ mureolytic enzyme có trong phage, có tác dụng ly giải thành tế bào vi khuẩn, giải phóng các phage con bằng phân cắt lớp peptidoglycan và cuối cùng giết chết vi khuẩn. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tách dòng và biểu hiện lysin K (LysK) được phân lập từ phage vi khuẩn tụ cầu vàng (*Staphylococcus aureus*) trong vi khuẩn *E. coli* đồng thời đánh giá hoạt tính diệt *S. aureus* của lysin tái tổ hợp trên chủng vi khuẩn chỉ thị *S. aureus* 816. LysK được thiết kế trong vector biểu hiện pET32a(+) và cảm ứng biểu hiện ở nồng độ 0,5 mM IPTG, nhiệt độ 25°C, thu mẫu sau 6 giờ cảm ứng. LysK tái tổ hợp tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực ProBond Nickel-Chelating Resin theo phương pháp tự nhiên. Kết quả thử nghiệm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho thấy LysK tái tổ hợp có hoạt tính diệt *S. aureus* cao. Nghiên cứu này mở ra triển vọng sử dụng LysK tái tổ hợp nhằm thay thế hoặc bổ trợ kháng sinh trong điều trị *S. aureus* ở Việt Nam.

Từ khóa: Lysin tái tổ hợp, lysK, *S. aureus*, kháng kháng sinh, liệu pháp phage

ĐẶT VẤN ĐỀ

Staphylococcus aureus (tụ cầu vàng) là vi khuẩn Gram dương có khả năng gây viêm, ngộ độc thực phẩm và hội chứng sốc độc với tỷ lệ tử vong cao trên cả người và động vật. Nhiễm khuẩn tụ cầu có thể được chữa trị bằng kháng sinh bình thường, nhưng nhiều trường hợp vi khuẩn trở nên kháng thuốc, nhiễm vào các cơ quan nội tạng gây tử vong và những di chứng nặng nề khác. Đặc biệt tình trạng kháng methicillin và vancomycin của *S. aureus* đang trở thành mối quan tâm lớn trên toàn thế giới. Khả năng kháng kháng sinh của chủng vi khuẩn này có thể tăng lên 1000 lần. Thực khuẩn thể được phát hiện lần đầu tiên năm 1915 bởi William Twort và năm 1917 Felix d'Herelle phát hiện ra khả năng giết vi khuẩn của chúng. Qua hàng nghìn năm tiến hóa, thực khuẩn thể tồn tại và tiến hóa song song với vi khuẩn, phân bố

rộng rãi bất cứ nơi đâu tìm thấy vi khuẩn; ước tính có tới 10^{30} phage gấp 10 lần vi khuẩn và có khả năng xâm nhiễm 10^8 loài vi khuẩn (Dabrowska *et al.*, 2005). Phage là một loại virus của vi khuẩn và có khả năng giết tới 50% vi khuẩn được sản sinh mỗi ngày. Chúng sống kí sinh trong tế bào vi khuẩn và chỉ tác động chọn lọc lên một loài vi khuẩn đặc trưng. Trong chu trình sống của mình để giải phóng phage trưởng thành, phage có hệ thống enzyme phân giải thành tế bào vi khuẩn một cách nhanh, đặc hiệu mà không làm ảnh hưởng tới các loài sinh vật khác gọi là lysin. Trái ngược với kháng sinh có thể điều trị nhiều loại bệnh gây nên bởi nhiều loài vi khuẩn, lysin có phổ vật chủ hẹp, đặc hiệu loài do đó chỉ đặc hiệu với một loại bệnh gây bởi một loại vi khuẩn, vì vậy không tác động đến những vi sinh vật có lợi khác. Lysin được tách ra từ phage của vi khuẩn chủ sẽ có hoạt tính kháng lại chính vi khuẩn đó (Loeffler *et al.*, 2001; Daniel *et al.*,

2010). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng lysin có khả năng bám và cắt thành tế bào ngay khi tiếp xúc vì vậy chỉ cần 1 lượng nanogram có thể giết chết 10^7 vi khuẩn *Streptococcus pyogenes* chỉ sau vài phút bổ sung (Nelson *et al.*, 2001). Chính vì vậy lysin có tiềm năng lớn trong việc điều trị những trường hợp nhạy cảm kháng sinh hoặc điều trị các loại vi khuẩn Gram dương có khả năng kháng kháng sinh mạnh như *Bacillus anthracis* và *B. cereus* (Schuch *et al.*, 2002), *Clostridium difficile* (Mayer *et al.*, 2008), *C. perfringens* (Schmitz *et al.*, 2011), *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* (Loeffler *et al.*, 2001).

Lysin thường không có chuỗi peptid tín hiệu nên phải phụ thuộc vào một loại enzym thứ hai để tiếp cận với lớp peptidoglycan. Ở cuối chu kỳ nhân bản, phage tạo ra hai loại enzyme là holin và lysin; holin hình thành trong tế bào chất đục lỗ trên màng tế bào chất tạo điều kiện cho lysin tiếp cận với lớp peptidoglycan cắt cấu nối peptidoglycan và phá vỡ cấu trúc thành tế bào vi khuẩn, giải phóng phage (Wang *et al.*, 2000). Cả 2 enzyme này đều cần thiết cho quá trình phát triển của phage trong tế bào chủ, nhưng khi sử dụng lysin tái tổ hợp thì lysin có thể trực tiếp tác động từ bên ngoài với các vi khuẩn Gram dương không có lớp màng bao quanh mà không cần tới sự trợ giúp của holin. O'Flaherty S *et al.*, (2005) đã biểu hiện thành công LysK có phổ hoạt động rộng, có khả năng tiêu diệt hoàn toàn một số chủng *S. aureus* một cách nhanh chóng, bao gồm cả chủng *S. aureus* kháng methicillin (MRSA). Trong nghiên cứu này chúng tôi nhân dòng gen *lysK* phage xâm nhiễm vi khuẩn *S. aureus*, biểu hiện *lysK* trong *E. coli* BL21 star (DE3) và bước đầu đánh giá hoạt tính ly giải *S. aureus* của lysin tái tổ hợp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng *S. aureus*, kháng thể đa dòng kháng Trx do Phòng Vi sinh vật học phân tử - Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 Star™ (DE3) từ hãng Themor Fisher Scientific, vector pET32a(+) từ hãng Novagen dùng để biểu hiện LysK tái tổ hợp. Các enzym cắt giới hạn từ hãng New England Biolab. Cột sắc ký ái lực ProBond Nickel-Chelating Resin do Invitrogen cung cấp.

Phương pháp

Tách dòng và biểu hiện lysin tái tổ hợp trong *E. coli*

Gen mã hóa LysK được khuếch đại từ phage *S.*

aureus bằng phương pháp PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu LysK-F, LysK-R. Sản phẩm PCR gen *lysK* sau đó được xử lý bằng 2 enzym *Bam*HI và *Xho*I rồi gắn vào vector pET32a(+) đã được xử lý bằng 2 enzym trên nhờ T4-ligase tạo vector tái tổ hợp pETLysK. Để biểu hiện LysK tái tổ hợp, pETLysK được biến nạp vào chủng BL21 Star (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt, chọn một khuẩn lạc riêng rẽ nuôi qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin ở 37°C. Sau đó chuyển 1% dịch nuôi cấy qua đêm vào môi trường LB mới có bổ sung ampicillin, nuôi lắc ở 37°C đến khi OD_{600nm} đạt 0,6-0,8 thì cảm ứng với 0.5 mM IPTG và nuôi cấy ở 25°C trong 6h sau cảm ứng. Thu tế bào và kiểm tra sự biểu hiện của LysK tái tổ hợp trên gel polyacrylamide 12.5%.

Xác định trạng thái

Sau khi biểu hiện 1 ml dịch tế bào pETLysK được hòa trong 500 µl đệm phá (150mM NaCl, 20mM TrisHCl pH 8, 1mM PMSF), phá tế bào bằng phương pháp siêu âm. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút thu dịch nổi. Cặn tế bào hòa lại trong 500 µl đệm phá. Điện di kiểm tra protein tổng số ở pha dịch và pha cặn trên gel polyacrylamide 12,5%.

Tinh sạch Lysin tái tổ hợp

Theo thiết kế protein tái tổ hợp có gắn thêm 6 histidine (6-His) nên được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực ProBond Nickel-Chelating Resin bằng phương pháp không biến tính như mô tả của nhà sản xuất. Tế bào sau cảm ứng được hòa trong đệm phá (20mM Tris HCl, 500 mM NaCl, 1mM PMSF pH 8) và phá bằng siêu âm, ly tâm thu dịch nổi sau đó đưa lên cột sắc ký đã được cân bằng với đệm bám cột (500 mM NaPi, pH 8). Các protein bám cột không đặc hiệu được rửa bằng 5 lần thể tích cột đệm rửa (500 mM NaPi, 30 mM Imidazole). LysK tái tổ hợp được đẩy ra khỏi cột bằng 3 lần thể tích cột đệm đẩy (500 mM NaPi, 300 mM Imidazol). Mẫu được thẩm tích trong đệm (20 mM Tris HCl, 150mM NaCl, pH 8), chia nhỏ cất vào -80°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Điện di trên gel polyacrylamide

Mẫu được biến tính bằng đệm SDS 5X (60 mM Tris HCl pH 6,8, 25% Glycerol, 2% SDS, 14,4 mM 2-Mercaptoetanol, 0,1% Bromophenol Blue, 0,9 ml H₂O) ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút. 15 µl dịch nổi được kiểm tra bằng điện di trên 12,5% SDS-PAGE theo (Laemmli, 1970) dưới cường độ dòng điện 40mA trong 1h, sau đó bản gel được nhuộm bằng Comassiblue trong 30 phút, tẩy bản gel và quan sát kết quả.

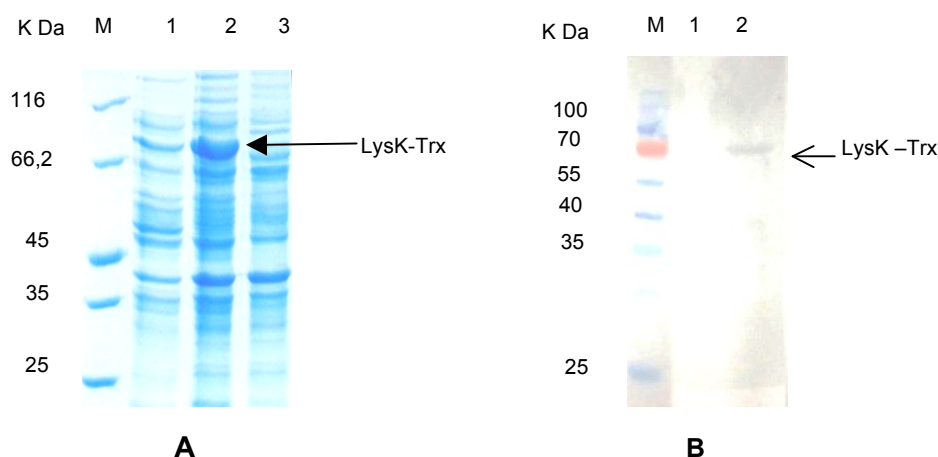
Thử hoạt tính ly giải *S. aureus* của LysK

Hoạt tính kháng khuẩn của LysK tái tổ hợp được đánh giá với vi khuẩn đang trong giai đoạn sinh trưởng bằng cách nhỏ 15 μ l lysin tái tổ hợp tinh sạch lên trên đĩa thạch cấy vi khuẩn chỉ thị *S. aureus*. Đối chứng dương sử dụng phage của *S. aureus*. Đối chứng âm là dịch phá tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 Star™ (DE3) không mang LysK và dung dịch phá tế bào vi khuẩn mang gen *lysK* nhưng không được cảm ứng IPTG. Song song với thí nghiệm trên, chúng tôi thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn của LysK đối với vi khuẩn ngừng phân chia. Các bước được thực hiện như sau: Vi khuẩn chỉ thị *S. aureus* được nuôi trong môi trường LB tới khi OD_{600nm} đạt 0,5- 0,6 thì ly tâm thu tế bào ở 4000 vòng/phút trong 5 phút. Hòa tế bào trong cùng thể tích đệm PBS pH7,4. Bổ sung 100 μ l lysin tinh sạch vào 1 ml dịch vi khuẩn. Mẫu đối chứng âm bổ sung lần lượt 100 μ l mẫu dịch phá tế bào *E. coli* BL21 Star™ (DE3) mang gen lysin nhưng không được cảm ứng biểu hiện bởi IPTG, 100 μ l PBS và 100 μ l đệm bảo quản LysK. Mẫu đối chứng dương bổ sung 100 μ l phage. Giữ mẫu ở 37°C qua đêm để kiểm tra OD_{600nm} và quan sát kết quả.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biểu hiện LysK tái tổ hợp

Gen mã hóa LysK được tách dòng và thiết kế vào vector pET32a(+) như mô tả ở trên. Sau khi biểu hiện, sự có mặt của LysK tái tổ hợp được xác định bằng điện di trên gel polyacrylamide biến tính. Theo thiết kế, LysK tái tổ hợp được biểu hiện ở dạng dung hợp với Trx với kích thước ~ 70 kDa. Kết quả điện di cho thấy, sau cảm ứng bởi 0,5 mM IPTG xuất hiện một băng protein đậm có kích thước ~70 kDa tương đương kích thước của protein tái tổ hợp LysK-Trx, trong khi đó ở mẫu không cảm ứng thì băng protein rất ít (Hình 1A). Do chưa có kháng thể đặc hiệu kháng LysK nên chúng tôi sử dụng kháng thể kháng Trx trong phản ứng Western blot để khẳng định protein hợp là LysK-Trx. Kết quả Western blot (Hình 1B, đường chạy số 2) cho thấy, protein tái tổ hợp phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng Trx, thể hiện bởi 1 băng đặc hiệu với kích thước ~70 kDa, trong khi ở các mẫu đối chứng không quan sát thấy băng này. Như vậy, có thể khẳng định rằng protein tái tổ hợp LysK-Trx đã biểu hiện thành công.



Hình 1. Kiểm tra sự biểu hiện LysK tái tổ hợp. (A) Kết quả SDS-PAGE. M: thang protein chuẩn (Fermentas), 1: Mẫu không cảm ứng, 2: mẫu cảm ứng bằng 0.5 mM IPTG, 3: BL21 mang pET32 không gắn gen LysK cảm ứng bởi IPTG; (B) Kết quả Western Blot sử dụng kháng thể kháng Trx. M: Thang protein chuẩn (Fermentas), 1: Mẫu không cảm ứng IPTG. 2: Mẫu cảm ứng với 0.5mM IPTG Protein LysK-Trx tái tổ hợp có kích thước ~ 70 kDa, phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng Trx.

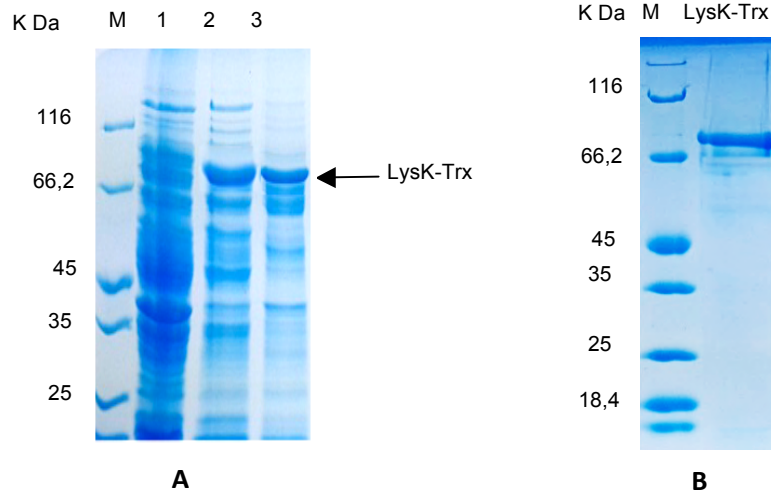
Tinh sạch LysK tái tổ hợp

Trước khi lựa chọn phương pháp tinh sạch LysK phù hợp, chúng tôi xác định trạng thái biểu hiện của protein tái tổ hợp như mô tả ở phần phương pháp.

Kết quả cho thấy LysK-Trx biểu hiện lượng lớn ở dạng hòa tan (Hình 2A), vì vậy chúng tôi lựa chọn phương pháp tinh sạch không biến tính sử dụng cột sắc ký ái lực ProBond Nickel-Chelating Resin. Các bước tinh sạch được thực hiện như mô tả ở trên.

Protein tái tổ hợp sau khi tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide và xác định nồng độ bằng máy Nanodrop. Kết quả (Hình 2B) cho thấy, protein tái tổ hợp thu được có độ tinh sạch cao, ít các protein tạp nhiễm với nồng độ ~300ng/μl tương ứng với 0,9 mg/100 ml dịch nuôi vi khuẩn. Do có gắn thêm Trx nên trước khi đánh giá hoạt

tính của LysK chúng tôi đã loại bỏ Trx bằng cách cắt protein tái tổ hợp với thrombin, sau đó dịch cắt được đưa lên cột ProBond Nickel-Chelating Resin. Trx có gắn 6 histidin do đó sẽ được giữ lại trên cột. Thu dịch chảy qua cột, đây chính là phân đoạn có chứa LysK, bảo quản ở -80°C cho các nghiên cứu tiếp theo.



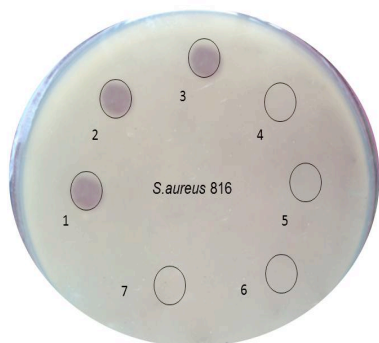
Hình 2. Kiểm tra trạng thái biểu hiện của LysK-Trx (A): 1: Mẫu không cảm ứng IPTG, 2: Dịch nổi, 3: Pha cặn (B). Kết quả tinh sạch Lysin tái tổ hợp bằng cột ProBond Nickel-Chelating Resin (B). M: thang protein chuẩn (Fermentas), LysK-Trx tái tổ hợp sau tinh sạch. LysK-Trx biểu hiện ở dạng hòa tan và có độ tinh sạch cao sau khi tinh sạch bằng cột ProBond Nickel-Chelating Resin.

Đánh giá hoạt tính của lysK

Một số lysin của *S. aureus* đã được tách chiết và nghiên cứu bao gồm LysK, ClyS, MV-L, LysWMY và ΦH5 tuy nhiên mới chỉ có 2 loại lysin được thử nghiệm *in vivo* bao gồm ClyS (Rashel *et al.*, 2007) MV-L (Daniel *et al.*, 2010). Hầu hết phage phân lập được thuộc họ *Siphoviridae* hoặc *Podoviridae*, riêng với họ *Myoviridae* có phage K và phage Twort được phân lập và giải trình tự và gần đây nhất là phage GH15 (Gu *et al.*, 2011). Lysin có thể hoạt động trong dải pH từ 5,0 tới 8,0 và tối ưu ở pH 6,0. Nhiệt độ thích hợp cho lysin hoạt động từ 25°C tới 40°C, nhưng hiệu quả tốt nhất ở 35°C và bị bất hoạt ở 45°C chỉ sau 30 phút. Nghiên cứu trước đó cũng chỉ ra rằng nồng độ muối không ảnh hưởng tới khả năng hoạt động của lysin. Kết quả phân tích cấu trúc cho thấy, lysin bao gồm 3 vùng cấu trúc, phía đầu N là vùng CHAP (cysteinehistidine dependent amidohydrolase/peptidase) có chức năng thủy phân liên kết

giữa D-alanine và Glycine đầu tiên trong chuỗi peptidoglycan; đầu C nhận diện cơ chất và vùng trung tâm amidase phân cắt N-acetylmuramic acid và L-alanine. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện, tinh sạch và đánh giá hoạt tính của LysK được phân lập từ phage *S. aureus* ở điều kiện pH và nhiệt độ tối ưu đã xác định từ các nghiên cứu trên.

LysK được thử hoạt tính bằng cách nhỏ giọt trên đĩa thạch chứa lớp vi khuẩn chỉ thị *S. aureus*. Kết quả trên đĩa thạch (Hình 3) cho thấy LysK tái tổ hợp ly giải và giết chết vi khuẩn chỉ thị, thể hiện bởi vòng kháng khuẩn, ngay cả với mẫu chưa loại bỏ Trx cũng có hoạt tính kháng khuẩn tương tự như mẫu đối chứng dương sử dụng phage. Kết quả này có thể là do Trx nằm phía đầu N của lysin nên không ảnh hưởng tới hoạt tính của LysK. Điều này phù hợp với nghiên cứu của Horgan và đồng tác giả (2009), LysK đầy đủ sau khi loại bỏ vùng CHAP vẫn có thể tiêu diệt được vi khuẩn *S. aureus*.



Hình 3. Thử hoạt tính kháng khuẩn của lysin tái tổ hợp bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. 1: lysin tái tổ hợp đã loại bỏ Trx, 2: lysin tái tổ hợp dung hợp với Trx, 3: đối chứng dương dịch chiết từ phage, 4: đối chứng âm dịch phá của mẫu không cảm ứng IPTG, 5: dịch phá của tế bào BL21 không mang gen mã hóa LysK, 6: đệm phá tế bào, 7: dung dịch dùng để đẩy protein tái tổ hợp ra khỏi cột.

Do đặc tính của Lysin là đặc hiệu cơ chất (peptidoglycan) nên có thể giết chết và ly giải tế bào đang sinh trưởng cũng tế bào ở trạng thái ngừng sinh trưởng, vì vậy chúng tôi tiến hành thí nghiệm với vi khuẩn bị đã ngừng sinh trưởng bằng cách ly tâm thu tế bào vi khuẩn chỉ thị và hòa lại trong đệm PBS (pH 7,4). Quá trình thử hoạt tính được trình bày trong phần phương pháp. Kết quả thử nghiệm cho thấy LysK tái tổ hợp ly giải hầu hết vi khuẩn chỉ thị, dịch chứa vi khuẩn (giá trị $OD_{600nm} = 0,6$) trở nên trong suốt (giá trị $OD_{600nm} = 0,12$) sau khi ủ ở $37^{\circ}C$ qua đêm. Ở mẫu đối chứng dương sử dụng dịch nuôi cấy phage *S.aureus*, giá trị OD giảm từ 0,66 xuống 0,09. Ngược lại mẫu đối chứng âm giá trị OD không thay đổi đáng kể (Bảng 1). Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy LysK tái tổ hợp có hoạt tính ly giải vi khuẩn *S. aureus*.

Bảng 1. Giá trị OD_{600nm} của vi khuẩn *S. aureus* trước và sau khi bổ sung LysK tái tổ hợp.

Mẫu	PBS	Dịch phá BL21	Dịch phá mẫu không cảm ứng	Đệm cắt	Phage	LysK
Trước khi ủ	0,678	0,69	0,68	0,68	0,66	0,642
Sau khi ủ	0,742	0,67	0,64	0,67	0,09	0,182

Các nghiên cứu trước đã cho thấy Lysin có tính đặc hiệu loài cao, do đó sẽ không ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi khác trong quá trình điều trị. Thử nghiệm *in vivo* trên chuột thực nghiệm cho thấy, chỉ sau 20 phút tiêm, Lysin phân bố khắp cơ thể chuột và chỉ cần 5 phút sau khi tiếp xúc với vi khuẩn chủ enzyme này đã giết chết vi khuẩn ở nồng độ 100 Unit/ 10^7 CFU (Loessner *et al.*, 2002). Đặc điểm này cho phép Lysin nhận diện và tiêu diệt vi khuẩn chủ nhanh chóng trước khi hệ miễn dịch của cơ thể kịp trung hòa chúng. Trong một nghiên cứu khác khi thử nghiệm hoạt tính của 2 Lysin khác là Cpl-1 và Pal trên chuột, Jado *et al.*, (Jado *et al.*, 2003) nhận thấy hoạt tính của 2 enzyme này không suy giảm trong những lần điều trị sau đó, đồng thời cũng không quan sát được các dấu hiệu sốc phản vệ hay tác dụng phụ của Lysin. Kết quả nghiên cứu này đã mở ra triển vọng của việc ứng dụng Lysin nói chung và LysK tái tổ hợp nói riêng trong điều trị *S. aureus*, đặc biệt trong hiện nay khi tình trạng vi khuẩn kháng kháng sinh ngày càng gia tăng.

KẾT LUẬN

LysK đã được biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* BL21 star (DE3) và tinh sạch thành công bằng cột sắc ký ái lực ProBond Nickel-Chelating Resin. LysK

sau tinh sạch có hoạt tính tiêu diệt vi khuẩn *S. aureus* gần tương đương hoạt tính của dịch phage *S. aureus*. Các nghiên cứu sẽ được tiếp tục thực hiện để đánh giá sâu hơn về hoạt động, đặc tính của LysK tái tổ hợp tiến đến phát triển được chế phẩm LysK nhằm thay thế hoặc kết hợp với kháng sinh trong điều trị *S. aureus*.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Viện Công nghệ sinh học do PGS. TS. Đồng Văn Quyền làm chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brussow H, Hendrix RW (2002) Phage genomics: small is beautiful. *Cell* 108: 13–16.

Dabowska K, Swiatała-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A (2005) Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* 98: 7–13.

Daniel A, Euler C, Collin M, Chahales P, Gorelick KJ, Fischetti VA (2010) Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1603–1612.

Fischetti VA (2010) Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J*

Med Microbiol 300(6): 357-62.

Gu J, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, Du C, Zuo J, Li Y, Du T, Li L, Han W (2011) LysGH15, a Novel Bacteriophage Lysin, Protects a Murine Bacteremia Model Efficiently against Lethal Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection, *J Clin Microbiol* 49(1):111-117.

Hashimoto H (1994) Drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Japan until 1993. *Jpn J Antibiot* 47:575-84.

Hashimoto H (1994). Drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Japan until 1993. *Jpn J Antibiot* 47:575-84.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I (1997) Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 350:1670-3

Horgan M, O'Flynn G, Garry J, Cooney J, Coffey A, Fitzgerald GF, Ross RP, McAuliffe O (2009). Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 75(3): 872-4.

Jado I, López R, García E, Fenoll A, Casal J, García P, Spanish Pneumococcal Infection Study Network (2003) Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* 52: 967-973.

Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell

wall hydrolase. *Science* 294: 2170-2172.

Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, Scherer S (2002) C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and highaffinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol* 44(2): 335-49.

Nelson D, Loomis L, Fischetti VA (2001) Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4107-4112.

Mayer MJ, Narbad A, Gasson MJ (2008) Molecular characterization of a *Clostridium difficile* bacteriophage and its cloned biologically active endolysin. *J Bacteriol* 190(20):6734-40.

Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly FE, Heath AC, Rohwer F, Gordon JI (2010) Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466(7304): 334-8.

Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, Uehara Y, Kuramoto S, Sugihara S, Yagyu K, Muraoka A, Sugai M, Hiramatsu K, Honke K, Matsuzaki S (2007) Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis* 196(8): 1237-47.

Schuch R, Nelson D, Fischetti VA (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 418 (6900):884-9.

Wang IN, Deaton J, Young R (2000). Holins: the protein clocks of bacterial infection. *Annu Rev Microbiol.* 54:799-825.

CLONING, EXPRESSION AND LYTIC EFFICACY ASSESSMENT OF THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PHAGE LYSIN GENE

Bui Thi Thuy Duong¹, Nguyen Dinh Duy¹, Dinh Duy Khang¹, Nguyen Huy Thuan², Nguyen Thi Minh Huong¹, Dong Van Quyen¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*Duy Tan University*

SUMMARY

The discovery of antibiotics is considered to be one of the greatest medical achievements in the early part of 20th. Over the past six decades, these 'wonder drugs' have played a critical role in reducing the global burden of communicable diseases. As a country in the tropical zone, Vietnam faces numerous infectious disease outbreaks every year. In addition, the overuse of antibiotics in healthcare and the misuse of antibiotics as growth promoter in agriculture these past decades have led to serious antibiotic-resistance in bacterial pathogens of human, crops and livestock in Vietnam. This poses an urgent need for alternative strategies to fight against these pathogens. Lysins are phage-encoded peptidoglycan hydrolases which were recently demonstrated the strong potential in human and veterinary medicine to control and treat pathogens on mucosal surfaces and in systemic infections. These enzymes when applied exogenously to Gram-positive bacteria, bring about rapid lysis and death of the bacterial cell and therefore promise an effective alternative therapy against

antibiotic-resistant bacterial pathogens. In this study, we applied the DNA technology to produce a recombinant *S. aureus* lysin (LysK). LysK was PCR amplified from phage *S. aureus* and cloned into a pET32a(+) expression vector. The recombinant fusion protein (LysK-Trx) was successfully expressed in *E. coli*, purified through nickel column chromatography, and further digested with Thrombin protease. The cleaved protein (intact LysK) was purified by nickel column again. The recombinant LysK was tested for its ability to kill *S. aureus* by a spot inoculation assay. The results showed that recombinant LysK induced the lysis of host bacteria, indicating that the protein was expressed and functionally active. Data from the current study can be used to develop therapeutic tools for treating diseases caused by drug-resistant *S. aureus* strains in Vietnam.

Keywords: *Antibiotic resistance, lysin recombinant, lysK, S. aureus , phage therapy*