

TÁCH DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH KHÁNG NGUYÊN LIGB CỦA XOẮN KHUẨN *LEPTOSPIRA* TRONG TẾ BÀO *ESCHERICHIA COLI*

Lê Thị Lan Anh^{1,✉}, Minh Thị Hằng², Nguyễn Thị Thu Hiền⁵, Phạm Thị Hà Giang¹, Triệu Phi Long³, Lê Thị Vân Anh^{6,7}, Đào Thị Hà Thanh⁴, Cấn Thị Thu Thủy⁵, Nguyễn Hữu Đức²

¹Trung tâm Nhiệt đới Việt – Nga, Bộ Quốc Phòng

²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Viện Y học dự phòng quân đội

⁴Viện Thú y Quốc gia

⁵Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

⁶Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

⁷Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: leanhb10@gmail.com

Ngày nhận bài: 26.8.2019

Ngày nhận đăng: 30.10.2019

TÓM TẮT

Xoắn khuẩn *Leptospira* là một trong những bệnh truyền từ động vật sang người phổ biến ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Con người nhiễm bệnh do tiếp xúc với nguồn nước hay nguồn thực phẩm có chứa mầm bệnh *Leptospira*. Bệnh bùng phát mạnh sau những đợt lũ lụt và gây những hậu quả nặng nề về kinh tế và sức khỏe con người. Bệnh nếu không được phát hiện và điều trị kịp thời sẽ gây những bệnh lý nghiêm trọng như viêm gan-thận cấp, viêm màng não, chảy máu, biến chứng cơ tim và thần kinh; bệnh nặng có thể dẫn đến tử vong. Vì vậy, phát hiện nhanh và chính xác tác nhân gây bệnh *Leptospira* đóng vai trò quan trọng trong điều trị bệnh. Trong các kháng nguyên của *Leptospira*, vùng bảo thủ của kháng nguyên LigB (Leptospiral immunoglobulin-like protein) là vùng có mặt ở tất cả các loài *Leptospira* gây bệnh mà không có ở các *Leptospira* không gây bệnh, vì vậy, vùng gen này đã và đang được nghiên cứu làm nguyên liệu chế tạo bộ kit phát hiện *Leptospira* cũng như làm nguyên liệu chế tạo vaccine phòng *Leptospira*. Với mục đích chế tạo bộ kit phát hiện kháng thể kháng *Leptospira* trong các mẫu máu và huyết thanh bệnh, sử dụng vùng bảo thủ của kháng nguyên LigB của *Leptospira* gây bệnh làm nguyên liệu chế tạo bộ kit. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả tách dòng, biểu hiện và tinh sạch vùng bảo thủ kháng nguyên LigB trong tế bào *E. coli*. Kết quả cho thấy, LigB đã được biểu hiện và tinh sạch thành công bằng sắc ký ái lực. Hàm lượng protein sau tinh sạch đạt 60 mg/L môi trường với độ sạch đạt trên 98%.

Từ khóa: Biểu hiện, *E. coli*, *Leptospira*, LigB, tinh sạch, xoắn khuẩn.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Leptospirosis là bệnh nhiễm khuẩn cấp tính xuất hiện chủ yếu ở vùng khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới với tác nhân gây bệnh là xoắn khuẩn *Leptospira* spp. *Leptospira* sống trong ống thận của động vật gặm nhấm và được đào thải ra môi trường qua nước tiểu. Tác nhân *Leptospirosis* có thể tồn tại ngoài môi trường trong vài tuần đến vài tháng. Con người nhiễm bệnh do tiếp xúc trực tiếp với vi khuẩn gây bệnh qua các vết thương hở trên da hoặc tiếp xúc với môi trường nước, đất, thức ăn mang mầm bệnh (Barnett *et al.*, 1999). Bệnh có triệu chứng giống với

các bệnh sốt khác như sốt rét, sốt xuất huyết, sốt do *Rickettsia* gây khó khăn cho quá trình chẩn đoán và điều trị. Bệnh không được điều trị sẽ dẫn đến thoái hóa thể nặng kèm các tổn thương thận và/hoặc gan cũng như xuất huyết phổi nghiêm trọng (Goarant, 2016). Nghiên cứu tình hình nhiễm *Leptospira* trên người và động vật gặm nhấm ở miền nam Việt Nam giai đoạn 2004-2013 cho thấy tỷ lệ nhiễm *Leptospira* ở miền Bắc cao hơn ở miền Nam và các ca nhiễm trên động vật cao hơn ở người. Tỷ lệ người nhiễm *Leptospira* thấp chỉ khoảng 4,4% trong đó tỷ lệ nhiễm *Leptospira* trên động vật gặm nhấm như chuột chiếm 7,7% (Hoàng Kim Loan *et al.*, 2013) và tăng

lên trên 20% vào năm 2016 (Nguyễn Thị Bé Mươi *et al.*, 2016). Các nghiên cứu gần đây cho thấy, tỷ lệ vật nuôi và động vật gần người nhiễm *Leptospira* khá cao, trong đó chó, lợn, bò là những vật nuôi có tỷ lệ nhiễm *Leptospira* cao nhất từ 22% - 40% (Lê Huỳnh Thanh Hương, 2001; Lý Thị Liên Khai, 2012; Nguyễn Thị Bé Mươi *et al.*, 2016, Nguyễn Thị Ngân, 2000).

Theo báo cáo của Trường Trung cấp 24 Biên phòng, từ năm 2010 đến nay trên đàn chó nghiệp vụ của Nhà Trường thường xuyên xuất hiện dịch bệnh có biểu hiện vàng da, xuất huyết, triệu chứng điển hình của *Leptospira*, số chó chết do nhiễm bệnh này là 81 con. Kết quả xét nghiệm cho thấy đã có sự lưu hành *Leptospira* tại khu vực khảo sát. Điều này đã gây những thiệt hại nặng nề cho công tác huấn luyện. Hiện nay, việc chẩn đoán *Leptospira* tại Việt Nam chủ yếu là phương pháp vi ngưng kết MAT truyền thống. Phương pháp này có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, tuy nhiên quy trình phức tạp, đòi hỏi cán bộ có chuyên môn cao, trang thiết bị chuyên dụng khó áp dụng rộng rãi. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu chế tạo bộ kit Lepto-LAT (*Leptospira* latex agglutination test) phát hiện nhiễm xoắn khuẩn *Leptospira*. Đây là phương pháp đã được ứng dụng thành công trên cả người và động vật với độ nhạy dao động từ 75 đến 90% và độ đặc hiệu dao động từ 90 đến 99%. Một trong những ưu điểm vượt trội của phương pháp LAT là thời gian phát hiện *Leptospira* tương đối ngắn chỉ từ 5 phút đến 15 phút (Shekatkaret *et al.*, 2010; Smits *et al.*, 2000; Tangkanakul *et al.*, 2000; Victoriano *et al.*, 2009) với thao tác thực hiện đơn giản và đọc kết quả dễ dàng.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày nội dung tách dòng, biểu hiện và tinh sạch vùng bảo thủ kháng nguyên đặc hiệu LigB của *Leptospira* dùng làm nguyên liệu chế tạo bộ kit. LigB protein (*Leptospira* immunoglobulin-like protein B) là protein ngoài màng của *Leptospira* có khối lượng phân tử khoảng 212 kDa, gen mã hóa cho LigB protein có kích thước khoảng 5,7 kb. Các nghiên cứu cho thấy, vùng bảo thủ của LigB protein có mặt ở tất cả các *Leptospira* gây bệnh mà không có mặt ở các *Leptospira* không gây bệnh. Vùng bảo thủ của LigB có kích thước khoảng 1 kb đã được tách dòng, biểu hiện và tinh sạch trong dòng tế bào *E. coli* bằng công nghệ DNA tái tổ hợp làm kháng nguyên dùng trong phát hiện nhiễm *Leptospira* trên bò, trâu, cừu và dê bằng phương pháp ngưng kết hạt nhựa latex LAT (Nagalingam *et al.*, 2015) cũng như phương pháp ELISA (Deneke *et al.*, 2014).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, plasmid, kháng thể và hoá chất dùng trong nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169 (ϕ 80 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 hóa kháng nguyên LigB.

Vector tách dòng và biểu hiện pLATE51 (Thermo).

Kháng thể 6x-His Tag Polyclonal (Invitrogen) được sử dụng làm kháng thể 1 và kháng thể Goat anti-Rabbit IgG (H+L) cộng hợp HRP (Invitrogen) được sử dụng làm kháng thể 2 trong phản ứng 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 (Sigma). TBS (0,5 M Tris HCl, pH 7,5; 2,5 M NaCl), TTBS (TBS, bổ sung 0,05% Tween-20).

Môi trường sử dụng trong nghiên cứu: LB (0.5% cao nấm men, 1% tryptone, 0.5% NaCl), SB (1% cao nấm men, 6% tryptone, 0.5% NaCl). LBA (LB bổ sung 100 μ g/ml ampicillin).

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế plasmid tái tổ hợp pLATE51 mang đoạn gen *ligB*

Đoạn gen mã hóa vùng bảo thủ kháng nguyên LigB được tổng hợp dựa vào trình tự gen *ligB* của chủng *Leptospira interrogans* strain Kito serogroup *Canicola* (EU700268.1) bằng phương pháp tổng hợp gen (IDT). Đoạn gen *ligB* được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi (mồi xuôi F-*ligB*/pLATE51: 5'GGTGATGATGATGAC AAG ATGGCTTCTAGCGAGAAT3' và mồi ngược R-*ligB*/pLATE51: 5'GGAGATGGGAAGTCATTA TGTGTTTGTAAATACCTTT 3'). Chu trình nhiệt PCR được tiến hành gồm 94°C: 5 phút; (94°C: 15 giây, 46°C: 15 giây, 72°C: 1,5 phút) x 25 chu kỳ, 72°C: 7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch bằng bộ kit PCR purification (Intron), tiến hành ghép nối vào vector pLATE51 sử dụng bộ kit aLICator LIC Cloning &

Expression System (Thermo) và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Sản phẩm biến nạp được kiểm tra trên môi trường LBA11 khuẩn lạc sống trên môi trường LBA được tiến hành nuôi cấy trong môi trường lỏng LBA, lắc 250 rpm ở 37°C, qua đêm để tiến hành tách chiết DNA plasmid (Intron). Plasmid được sử dụng làm DNA khuôn cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen *ligB* sử dụng cặp mồi LIC Forward: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3' và LIC Reverse: 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'. Chương trình PCR được tiến hành gồm 95°C: 5 phút; (95°C: 30 giây, 58°C: 30 giây, 72°C: 1,5 phút) x 25 chu kỳ, 72°C: 7 phút.

Biểu hiện đoạn gen mã hóa kháng nguyên *ligB* trong tế bào *E. coli* Rosetta 1

Tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid tái tổ hợp pLATE_{ligB} được nuôi trong 5 ml môi trường SBA(SBamp), ở 37°C, trong 16 -18 giờ. Chuyển 1% dịch nuôi cấy trên vào môi trường SBA, nuôi cấy ở cùng điều kiện đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4 - 0,6 tiến hành cảm ứng với 0,1 mM IPTG. 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 kháng thể His-tag

Protein tổng số sau điện di trên gel polyacrylamide 12,6% được chuyển lên màng PVDF trong 1 giờ. Màng sau đó được ủ trong dung dịch sữa skim milk 5% pha trong dung dịch TBS 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiến hành rửa màng bằng dung dịch TTBS và TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút. Màng sau đó được ủ với kháng thể 1 là kháng thể 6x-His Tag Polyclonal pha loãng 500 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 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) 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 (Sigma).

Xử lý và tinh sạch *LigB* protein bằng sắc ký ái lực

Lấy 20ml dịch lên men sinh tổng hợp *LigB* ở OD 10 trong đệm PBS 20mM được rửa đông ở 55°C, trong 10 phút. Tiến hành siêu âm với công suất 30%,

xung 20 giây nghỉ 10 giây trong 20 phút, trên đá. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi. Hòa tan cặn trong 20 ml đệm PBS 50 mM, ure 2M. Lắc 10 phút ở nhiệt độ phòng, tốc độ 110 vòng/phút. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi. Hòa tan cặn trong 20 ml đệm PBS 20 mM, ure 6M. Lắc 110 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Ly tâm 13000 vòng/phút trong 10 phút. Dịch nổi được bổ sung 500 mM NaCl và 10mM Imidazol để tiến hành quá trình tinh sạch. Protein được gắn lên cột tinh sạch Hitrap chealting 5 ml (GE) có gắn Ni²⁺ trong đệm PBS 50mM, pH 7.4, NaCl 500mM, 6M ure, 10 mM Imidazole, protein được rửa giải trong đệm tinh sạch chứa 100 mM Imidazole. Các phân đoạn được thu lại và kiểm tra bằng điện di trên gel SDS-PAGE 12,6%. Hàm lượng protein được định lượng bằng phương pháp Bradford (Bradford, 1976).

KẾT QUẢ

Thiết kế vector biểu hiện mang đoạn gen mã hóa vùng bảo thủ kháng nguyên *LigB* (gọi tắt là gen *ligB*)

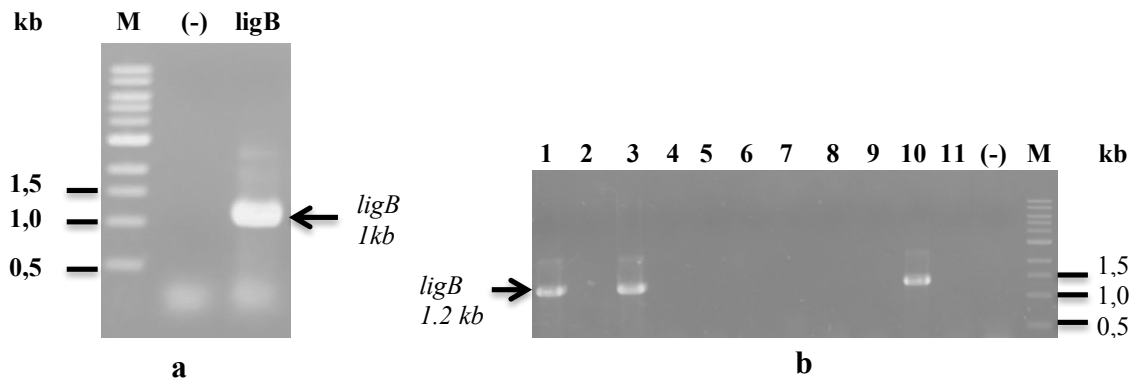
Để tạo vector tái tổ hợp mang đoạn gen *ligB*, đoạn gen *ligB* được khuếch đại bằng PCR sử dụng plasmid pUC_{ligB} làm DNA khuôn. Kết quả nhân gen PCR cho thấy, sản phẩm PCR là đoạn gen có kích thước khoảng 1kb theo đúng như thiết kế (Hình 1a). Như vậy, đoạn gen *ligB* đã được khuếch đại thành công. Sản phẩm PCR được tinh sạch và ghép nối vào vector pLATE51. Plasmid tái tổ hợp được kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *ligB* bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi LIC Forward và LIC Reverse. Theo thông tin trên plasmid pLATE51, vị trí mồi xuôi và mồi ngược đặt cách vị trí gắn gen *ligB* là 100 bp, vì vậy, sản phẩm PCR chứa đoạn gen *ligB* sẽ có kích thước khoảng 1,2 kb. Kết quả PCR plasmid sau biến nạp cho thấy, trong 11 plasmid, plasmid số 1, 3 và 10 tạo sản phẩm PCR có kích thước khoảng 1,2 kb theo đúng như tính toán lý thuyết (hình 1b, đường chạy 1, 3 và 10). Như vậy, đoạn gen *ligB* đã được ghép nối thành công vào vector biểu hiện pLATE51. Trình tự đoạn gen *ligB* trong plasmid tái tổ hợp pLATE51_{ligB} được kiểm tra bằng phân tích trình tự và cho kết quả đúng như lý thuyết.

Biểu hiện đoạn gen *ligB* trong tế bào *E. coli* Rosetta1

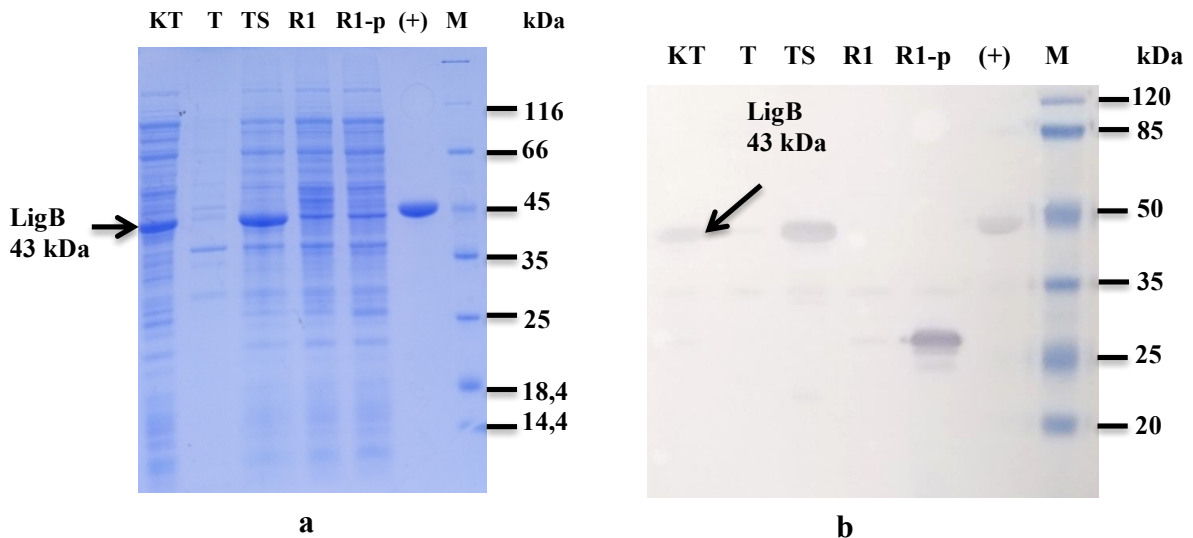
Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của đoạn gen *ligB* trong tế bào *E. coli* Rosetta 1 cho thấy, protein *LigB*

đã được biểu hiện với kích thước khoảng 43 kDa theo đúng như tính toán lý thuyết (Hình 2, đường chạy TS). Khảo sát tính tan và không tan cho thấy protein LigB được biểu hiện ở dạng không tan (hình 2, đường chạy KT). Kết quả kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu với kháng thể bằng western blot đã quan sát thấy vạch băng đậm với kích thước tương ứng với kích thước của protein LigB ở phần protein

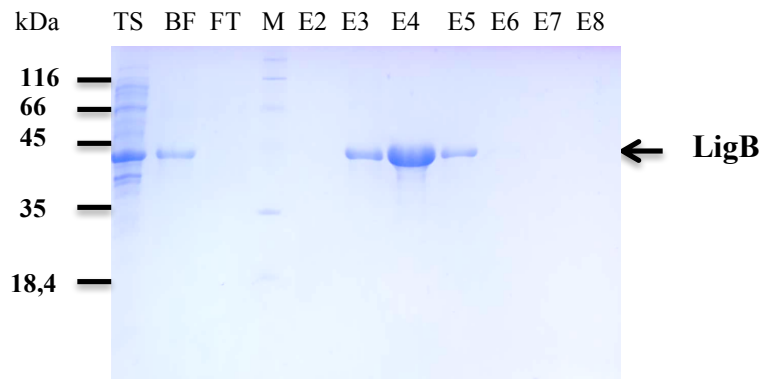
tổng số và phần protein không tan. Ở phần protein pha tan chỉ quan sát thấy vạch băng rất mờ, do phần lớn protein LigB biểu hiện ở dạng không tan. Vạch băng này không được quan sát thấy trên mẫu đối chứng âm là tế bào *E. coli* Rosetta 1 và *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid pLATE51 (hình 2b, đường chạy R1 và R1-p). Như vậy, protein LigB đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rosetta 1.



Hình 1. Điện di plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen *ligB*. a. Nhân đoạn gen *ligB* bằng PCR; b. Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng PCR. M. Thang chuẩn DNA 1kb (Thermo); (-). đối chứng âm, nước được thay cho DNA khuôn; *ligB*: nhân đoạn gen *ligB* từ plasmid pUC_igB; 1-11: 11 plasmid tái tổ hợp sau biến nạp.



Hình 2. Biểu hiện protein LigB trong tế bào *E. coli* Rosetta 1. a. Điện di protein trên gel SDS-PAGE 12,6%; b. Western blot kiểm tra sự biểu hiện của LigB. T. protein pha tan; KT. protein pha không tan; TS. Protein tổng số; R1. Tế bào *E. coli* Rosetta 1; R1-p. Tế bào *E. coli* Rosetta 1 mang plasmid pLATE51; (+): đối chứng dương protein 56kDa của *Orientia tsutsugamushi* có gắn 6 histidine ở đầu N; M. Thang chuẩn protein (Thermo).



Hình 3. Tinh sạch protein LigB bằng sắc ký ái lực với Ni²⁺. TS: protein tổng số; BF: Dịch protein trong 6M urea trước khi qua cột; FT: Dịch protein rửa qua cột; M: Thang chuẩn protein (Thermo); E2- E8: các phân đoạn protein sau khi được đẩy ra bằng đệm chứa 100mM Imidazole.

Sau khi biểu hiện thành công LigB trong tế bào *E. coli* Rosetta 1, chúng tôi tiến hành các nghiên cứu lựa chọn điều kiện biểu hiện phù hợp cho sinh tổng hợp LigB. Kết quả khảo sát các điều kiện nuôi cấy gồm môi trường, nồng độ IPTG, nhiệt độ cảm ứng và thời gian thu mẫu sau cảm ứng, điều kiện phù hợp cho sinh tổng hợp LigB protein trong tế bào *E. coli* Rosetta 1 là môi trường SB, cảm ứng ở thời điểm OD_{600nm} đạt 0,4-0,6 với 0,1 mM IPTG, ở nhiệt độ 37°C, thu mẫu 4 giờ sau cảm ứng. Kết quả định lượng protein bằng phương pháp Bradford cho thấy trước khi khảo sát điều kiện nuôi cấy, nồng độ protein tổng số (chủ yếu là LigB) là 239 mg/L, sau khi khảo sát lựa chọn được điều kiện nuôi cấy thích hợp nồng độ protein tổng số (chủ yếu là LigB) đạt 571,5 mg/L môi trường, tăng 58% so với trước khi khảo sát.

Tinh sạch vùng bảo thủ kháng nguyên LigB bằng sắc ký ái lực

Kết quả trên hình 3 cho thấy, sau khi làm tan trong 6M ure, phần protein tan trước khi qua cột tương đối sạch (đường chạy BF, hình 3), sau khi qua cột cho thấy không có mặt vạch băng protein LigB ở đường chạy FT (dịch qua cột), chúng tôi protein đã được bám tốt trên cột. Sự có mặt của 100mM Imidazole đã đẩy protein LigB ra và tập trung ở 3 phân đoạn E3, E4 và E5, chủ yếu ở phân đoạn E4. Kết quả điện di protein cho thấy, ở cả 3 phân đoạn, protein LigB được thổi ra là một vạch băng duy nhất, không lẫn tạp. Như vậy, protein LigB đã được tinh sạch thành công bằng sắc ký ái lực. Kết quả định

lượng protein bằng Bradford cho thấy phân đoạn E4, nồng độ protein LigB sau tinh sạch đạt 1 mg/mL, có độ sạch >98%. Sau quá trình làm tan trong 6M ure và tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực, kết quả, trong 1L môi trường nuôi cấy thu được 60 mg protein LigB có độ sạch trên 98% sử dụng phần mềm gel analyzer.

THẢO LUẬN

Sử dụng các kháng nguyên của *Leptospira* trong chế tạo bộ kit phát hiện *Leptospira* đã được nghiên cứu trước đó, tuy nhiên, việc sử dụng các kháng nguyên sống từ các chủng *Leptospira* đã tạo ra những nguy cơ cao trong nghiên cứu do phải tiếp xúc và thao tác trực tiếp với các tác nhân này dẫn đến tăng nguy cơ lây nhiễm cho người nghiên cứu. Sản xuất LigB tái tổ hợp đã được nghiên cứu sử dụng làm nguyên liệu chế tạo các bộ kit ngưng kết hạt latex hay kit ELISA phát hiện *Leptospira* có độ nhạy và độ đặc hiệu cao (Deneke *et al.*, 2014, Senthilkumar *et al.*, 2010). Hiệu quả phát hiện *Leptospira* dựa trên LigB tái tổ hợp cho độ nhạy và độ đặc hiệu cao hơn so với sử dụng nguyên liệu là các kháng nguyên sống từ *Leptospira* (Nagalingam *et al.*, 2015). Phát hiện *Leptospira* dựa trên các chẩn đoán huyết thanh học đang ngày càng được áp dụng rộng rãi, đặc biệt là phương pháp MAT và ELISA được xem như tiêu chuẩn vàng trong xét nghiệm phát hiện kháng thể kháng *Leptospira*. Tuy nhiên, một trong những hạn chế của các phương pháp huyết thanh học hiện nay là khó phân biệt được đối với mẫu động vật nhiễm *Leptospira* hay tiêm vaccine

phòng *Leptospira*. Nghiên cứu của tác giả Palaniappan và cộng sự, 2004 đã chỉ ra rằng, trong động vật tiêm vaccine thiếu các kháng thể với vùng bảo thủ của kháng nguyên LigB. Do vậy, vùng bảo thủ của kháng nguyên LigB là nguyên liệu thích hợp cho các phương pháp chẩn đoán huyết thanh đối với *Leptospira* giúp phân biệt được giữa mẫu nhiễm *Leptospira* và mẫu được tiêm phòng *Leptospira* (Palaniappan *et al.*, 2004).

Trong nghiên cứu này, vùng bảo thủ của kháng nguyên LigB đã được tách dòng và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rosetta 1 ở dạng không tan. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Conrad và cộng sự, 2017. Protein LigB được làm tan trong 6M ure và tinh sạch thành công bằng sắc ký ái lực với hàm lượng protein sau tinh sạch đạt 60 mg/1 lít môi trường nuôi cấy, có độ sạch trên 98%. Hàm lượng protein LigB trong nghiên cứu này cao gấp 3 lần so với nghiên cứu của tác giả Deneke và cộng sự, 2014 (Deneke *et al.*, 2014). Sau tinh sạch, protein LigB sẽ được tiến hành thẩm tích loại ure và sử dụng làm nguyên liệu chế tạo bộ kit chẩn đoán huyết thanh học phát hiện kháng thể kháng *Leptospira* trong các mẫu nghiên cứu.

KẾT LUẬN

Đoạn gen mã hóa vùng bảo thủ của kháng nguyên LigB đã được thiết kế và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* Rosetta 1 với hàm lượng đạt 571,5 mg/L môi trường. Protein LigB biểu hiện chủ yếu ở dạng không tan và tan tốt trong 6M ure. Đã tinh sạch thành công protein LigB bằng sắc ký ái lực với độ sạch trên 98%. Kết quả tinh hiệu xuất tinh sạch cho thấy trong 1L môi trường thu được 60 mg protein LigB có độ sạch trên 98%.

Lời cảm ơn: Nội dung nghiên cứu này được thực hiện từ đề tài cấp Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga “Nghiên cứu quy trình tạo bộ sinh phẩm Lepto-LAT phát hiện nhiễm xoắn khuẩn *Leptospira*”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Goarant C (2016) *Leptospirosis*: risk factors and management challenges in developing countries. *Res Rep Trop Med* 7: 49–62.

Hoàng Kim Loan, Đậu Thị Việt Liên, Vũ Thị Quế Hương, Lạc Ngọc Thêm, Phan Ngọc Thảo, Lê Nhi, Bùi Chí Tâm, Phan Công Trung, Lê Thanh Tùng, Bùi Xuân Bằng, Vũ Đình Luân, Nguyễn Việt Chánh, Lê Thị Thanh Hà và Cao

Thị Bảo Vân (2013) *Leptospira*: 10 năm (2004- 2013) khảo sát tình hình nhiễm trên người và động vật gặm nhấm ở miền nam Việt Nam, *Tạp chí Y học dự phòng*, tập 23, số 10(146) Số đặc biệt.

Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, Summers TA, Wagar EA, Cheville NF, Hartskeerl RA, Haake DA (1999) Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters, *Infect Immun* 67(2): 853–861.

Lê Huỳnh Thanh Hương, luận án tiến sĩ khoa học nông nghiệp (2001) Tình hình nhiễm *Leptospira* ở chó tại một số địa phương phía Bắc Việt Nam và biện pháp phòng trị bệnh.

Lý Thị Liên Khai (2012) Điều tra tình hình nhiễm vi khuẩn *Leptospira* trên đàn bò sữa, chó và chuột tại công ty cổ phần thủy sản sông hậu, *Tạp chí Khoa học* 2012:21b 87-96.

Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal Biochem* 72: 248-254.

Nagalingam M, Thirumalesh SR, Kallishamurthy T, Niharika N, Balamurugan V, Shome R, Sengupta PP, Shome BR, Prabhudas K, Rahman H., Comparative evaluation of recombinant LigB protein and heat-killed antigen-based latex agglutination test with microscopic agglutination test for diagnosis of bovine leptospirosis, *Trop Anim Health Prod* (2015) 47:1329–1335, DOI 10.1007/s11250-015-0867-7.

Neida LC, Flávia WC, Je´ssica DS, Marcelle MS, Samuel F, Karla SM, Cleiton SS, Daniel AA, Marco AM, Mitermayer GR, Odir AD, Alan JAM (2017) LigB subunit vaccine confers sterile immunity against challenge in the hamster model of leptospirosis, *PLOS Negl Trop Dis* | <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005441> March 16, 2017.

Nguyễn Thị Bé MườI, Hồ Thị Việt Thu (2016) Khảo sát tỷ lệ nhiễm *Leptospira* trên chuột (*Rattus norvegicus* và *Rattus rattus*) tại tỉnh Kiên Giang, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Số chuyên đề Nông nghiệp* 2: 95-98.

Nguyễn Thị Bé MườI, Hồ Thị Việt Thu và Nguyễn Châu Nguyệt Anh (2016) Sự lưu hành của *Leptospira* trên chó tại tỉnh An Giang, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Số chuyên đề Nông nghiệp* 2: 91-94.

Nguyễn Thị Ngân (2000) Tình hình nhiễm *Leptospira* của dê và những động vật có liên quan tại một số tỉnh Miền Bắc Việt Nam và biện pháp phòng trị, Luận án tiến sĩ. Hà Nội.

Palaniappan RU, Chang YF, Hassan F, McDonough SP, Pough M, Barr SC, Simpson KW, Mohammed HO, Shin S, McDonough P, Zuerner RL, Qu J, Roe B (2004) Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by

Leptospira interrogans and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA, *J Med Microbiol* 53: 975–984.

Shekatkar S, Acharya NS, Harish BN, Parija SC. (2010) Comparison of an in-house latex agglutination test with IgM ELISA and MAT in the diagnosis of *leptospirosis*, *Ind J Med Microbiol* 28(3): 238.

Smits HL, van der Hoorn MA, Goris MG, Gussenhoven GC, Yersin C, Sasaki DM, Terpstra WJ, Hartskeerl RA. (2000) Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human *leptospirosis*, *J Clin Microbiol*, 38(3): 1272–1275.

Senthilkumar TMA, M Subathra, P Ramadass, V Ramaswamy (2010) Serodiagnosis of bovine *leptospirosis* by IgG-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Latex

Agglutination Test, *Trop Anim Health Prod* 42:217–222.

Tangkanakul W, Tharmaphornpil P, Plikaytis BD, Bragg S, Poonsuksombat D, Choomkasien P, Kingnate D, Ashford DA (2000) Risk factors associated with leptospirosis in Northeastern Thailand, 1998, *Am J Trop Med Hyg* 63(3–4): 204–208.

Veronica B, Nathan N, Paul K, Talima P (2017) Meta-analysis to estimate the load of *Leptospira* excreted in urine: Beyond rats as important sources of transmission in low-income rural communities, *BMC Res Notes* 10(1).

Deneke Y, Sabarinath T, Gogia N, Lalsiamthara J, Viswas KN, Chaudhuri P (2014) Evaluation of recombinant LigB antigen-based indirect ELISA and latex agglutination test for the serodiagnosis of bovine *leptospirosis* in India, *Mol Cell Probes* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2014.01.001>.

CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF *LEPTOSPIRA* LIGB ANTIGEN IN *ESCHERICHIA COLI*

Le Thi Lan Anh¹, Minh Thi Hang², Nguyen Thi Thu Hien⁵, Pham Thi Ha Giang¹, Trieu Phi Long³, Le Thi Van Anh^{6,7}, Dao Thi Ha Thanh⁴, Can Thi Thu Thuy⁵, Nguyen Huu Duc²

¹Vietnam Russia Tropical Center, Ministry of Defense

²Vietnam National University of Agriculture

³Institute of Army Preventive Medicine

⁴National Institute of Veterinary Research

⁵University of Science, Vietnam National University, Hanoi

⁶Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

⁷Publishing House for Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Leptospira is one of the most common zoonotic diseases in the tropics and subtropics. Humans are infected by exposure to *Leptospira* contained water or food sources. Leptospirosis usually breaks out after the flood and causes several consequences for people and economy. *Leptospirosis* disease, if not rapidly detected and treated promptly, it causes serious consequences such as acute hepatitis-kidneys, meningitis and bleeding, heart and nerve complications, and severe illness can lead to death. Therefore, quick and accurate detection of *Leptospira* pathogen plays a very important role in *Leptospirosis* disease treatment. Among antigens of *Leptospira*, a conserved domain of LigB antigen (Leptospiral immunoglobulin-like protein) was reported that is present in the most of pathogenic serovars of *Leptospira*, but not in the non-pathogenic *Leptospira biflexa*, thus this conserved domain was used for production of *Leptospirosis* detection kits as well as vaccine for *Leptospirosis*. In order to create a kit for *Leptospirosis* diagnostic, especially detect anti-*Leptospira* antibodies in *Leptospira* infected serum and plasma samples, about 1kb gene fragment encoding for conserved domain of LigB (about 36 kb in molecular weight) was used as the material for producing of LigB protein by DNA recombinant technology. In this study, we present the results for cloning, expressing a conserved domain of LigB antigen in *E. coli* cells and purifying protein by affinity chromatography column. The result indicates that recombinant LigB protein was successfully expressed in *E. coli* Rosetta 1 and purified by Hitrap chealating column. The LigB protein concentration after purification reached 60 mg/L medium with 98% purity. This purified protein will be used as the materials for creating *Leptospirosis* kit.

Keywords: Expression, *E. coli*, *Leptospira*, LigB, purification, spirochete.