

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH KHÁNG KHUẨN CỦA PEPTIT TÁI TỔ HỢP PEP-H

LÊ QUANG HUẤN

Viện Công nghệ sinh học

Trong những năm gần đây, sự kháng thuốc của vi sinh vật gây bệnh ngày càng gia tăng. Nhiều loại thuốc kháng sinh mới đã nhanh chóng mất hiệu lực, đồng thời xuất hiện các bệnh nhiễm virus mang tính toàn cầu như HIV, viêm gan B, C, viêm màng não... đang là mối quan tâm đặc biệt của các quốc gia cũng như các nhà khoa học trên toàn thế giới. Vì vậy, các nhà khoa học không ngừng tìm kiếm các loại vaccin mới, các loại kháng sinh mới với những cơ chế tác động khác với cơ chế tác động của các loại kháng sinh thông thường, đồng thời có hiệu lực kháng khuẩn mạnh và đặc hiệu. Một trong những hướng nghiên cứu tìm kiếm đó là các loại thuốc kháng sinh có bản chất peptit. Ngoài các peptit tự nhiên được tách chiết từ động thực vật, còn có các peptit tái tổ hợp cũng đang được các nhà nghiên cứu đặc biệt quan tâm.

Để góp phần nghiên cứu các peptit có hoạt tính kháng khuẩn ứng dụng trong y học, trong

thời gian qua, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của peptit tái tổ hợp [2,3,4] dựa trên trình tự nucleotit của peptit kháng khuẩn đã được tìm thấy trong sam biển *Tachypleus tridentatus* mà các tác giả Nhật Bản đã công bố trước đây [5].

Trong bài này, chúng tôi trình bày phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của peptit tái tổ hợp PEP-H.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu

Dựa trên trình tự peptit tachypleusin, một peptit trong máu sam biển (horseshoe crab: *Tachypleus tridentatus*) cũng như tính chất của các amino axit, chúng tôi thiết kế đoạn oligonucleotit có trình tự như sau:

5'-AATTCATGAGAAGTGGTGTATAGAAAGAAACCATATAGAAAATGTAGATGA-3'
3'-GTACTCTTCTACCACAATATCTTTCTTTGGTATATCTTTTACATCTACTTCGA-5'

Trình tự nucleotit của đoạn gen này được hãng GENSET Singapore Biotech. Pte Ltd. tổng hợp dưới dạng các sợi độc lập theo phương pháp hóa học. Chủng vi sinh vật *E. coli* BL₂₁; Vectơ biểu hiện pMAL-C2; Các hóa chất sử dụng trong thí nghiệm: IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranosit) (Sigma), sephadex G-75, sephadex G-25 (Sigma), cột sắc ký ái lực amyloza resin của hãng New England Biolab, maltoza (Sigma), factor Xa và các hóa chất sử dụng khác đều là những hóa chất tinh khiết. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật: môi trường lỏng LB (2% trypton, 1% yeast extract, 1% NaCl); môi trường chọn lọc là môi trường LB bổ sung ampicillin nồng độ 100 µg/ml.

2. Phương pháp

a) Nuôi cấy vi khuẩn

Chủng vi khuẩn biểu hiện peptit tái tổ hợp là *E. coli* BL₂₁ mang gen tái tổ hợp được nuôi trên môi trường LB cho đến khi đạt OD₆₀₀ = 0,5, bổ sung chất cảm ứng IPTG với nồng độ 0,3 mM, và tiếp tục nuôi lắc (200 vòng/phút) ở 37°C, thời gian 180 phút.

b) Tách chiết protein liên kết

Từ 300 ml dịch nuôi cấy tế bào, sau khi cảm ứng 3 giờ, được ly tâm với vận tốc 5000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút, phần tế bào kết lắng được hòa lại trong 15 ml dung dịch đệm (10 mM Tris-HCl, pH = 8,0; 1 mM EDTA). Sau đó, sự thủy giải tế bào được thực hiện bằng siêu

âm hoặc enzym lysozym (100 µg/ml).

Lấy 1 ml dịch thủy giải tế bào đưa lên cột ái lực amyloza resin. Sau khi rửa cột với 15 ml dung dịch đệm (20 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl), protein liên kết được giải hấp với dung dịch đệm trên có bổ sung maltoza (20 mM Tris-HCl, pH = 8,0, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 10 mM maltoza). Thu 10 phân đoạn ngay sau khi cho dung dịch giải hấp, mỗi phân đoạn 1 ml. Xác định các phân đoạn chứa protein liên kết, xử lý với factor Xa để tách protein MalE và peptit tái tổ hợp Protein liên kết được cắt bằng factor Xa trong đệm TE có bổ sung 20 mM CaCl₂ ở nhiệt độ 23°C, trong thời gian 16 giờ. Sau đó dịch protein đã cắt bằng factor Xa được sắc ký ái lực qua cột amyloza resin (cột sắc ký 1 × 1 cm). Thu các phân đoạn (10 phân đoạn, 300 µl/phân đoạn) ngay sau khi cho dung dịch protein. Hoạt tính kháng khuẩn của peptit ở các phân đoạn được kiểm tra theo phương pháp vòng kháng khuẩn.

c) Xác định hoạt tính kháng khuẩn của peptit

Các chủng vi khuẩn sử dụng trong phép thử: *E. coli* DH-5α và *Pseudomonas aeruginosa*

Môi trường và hóa chất:

- Trypticaza soy broth (TBS, Difco, Detroit, MI): hòa 30 g TBS trong 1 lit nước cất khử ion (dH₂O), khử trùng 20 phút ở nhiệt độ 121°C, bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Đệm photphat: dung dịch stock (100 mM), hòa riêng biệt 15,6 g NaH₂PO₄·2.H₂O; 26,8 g Na₂HPO₄·7.H₂O trong 1 lit dH₂O. Pha dung dịch đệm photphat (100 mM) có pH là 7,4 hoặc 6,5 bằng cách trộn hai dung dịch theo tỷ lệ nhất định cho đến khi đạt pH mong muốn. Khử trùng hoặc lọc qua màng lọc (0,45µm), bảo quản ở nhiệt độ phòng.

- Agarosa (sigma): sử dụng agarosa để hạn chế tới mức tối thiểu sự tương tác của các peptit mang điện tích dương với agar là điều cần thiết khi xác định hoạt tính kháng khuẩn của peptit .

- Lớp gel dưới: trộn 50 ml đệm photphat 100 mM với 5 ml TSB, thêm 5 g agarosa, thêm dH₂O đủ 500 ml, chỉnh pH = 7,4 hoặc 6,5 bằng 1N NaOH hoặc HCl. Khử trùng. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Trước khi sử dụng, có thể làm nóng chảy bằng lò vi sóng hoặc trong bể nước nóng 42°C.

- Lớp gel trên: hòa tan 60 g trypticaza soy broth (sigma) và 10 g agarosa trong 1 lit dH₂O. Khử trùng và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Trước khi sử dụng, có thể làm nóng chảy bằng lò vi sóng hoặc trong bể nước nóng 42°C.

- Dung dịch 10 mM photphat, pH = 7,4 được chuẩn bị từ dung dịch 100 mM, khử trùng và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Dung dịch đệm này được làm lạnh trước khi rửa tế bào.

Quy trình thử nghiệm:

1. Cấy chuyển một khuẩn lạc vào 50 ml TSB, nuôi lác (200 vòng/phút), 37°C, 18-24 giờ.
2. Cấy chuyển 50 µl (đối với tế bào là *E. coli*) vào 50 ml môi trường TSB mới và nuôi tiếp 2,30 giờ ở 37°C trong máy lác.
3. Ly tâm thu tế bào: 400 vòng/phút, 10 phút ở 4°C.
4. Rửa tế bào với 10 ml dung dịch đệm photphat (pH = 7,4) đã làm lạnh, ly tâm thu tế bào như bước 3. Sau đó hòa lại tế bào trong 5 ml dung dịch đệm photphat (pH = 7,4) đã làm lạnh.
5. Lấy 1 ml dịch tế bào vừa thu được đo phổ hấp thụ. Kết quả xác định OD₆₂₀ sẽ cho phép tính toán và pha phân dịch tế bào còn lại (4 ml) tới nồng độ 4.10⁶ CFU (công thức tính như sau: **CFU/ml = OD₆₂₀ × 2,5.10⁸**).
6. Lấy 10 ml dung dịch gel dưới cho vào ống ly tâm dung tích 15 ml và bổ sung 4.10⁶ CFU, vortex 15 giây, đổ lên đĩa petri, để gel đông chặt khoảng 2 phút.
7. Đặt đĩa lên trên tờ giấy kẻ ôly và đục giếng theo số lượng: 4 × 4 hoặc 5 × 5.
8. Cho 5 µl các mẫu peptit cần thử nghiệm vào các giếng đã đục (peptit được pha trong 0,01% axit axetic). Đậy đĩa petri và nuôi trong 3 giờ ở 37°C.
9. Bổ sung thêm 10 ml lớp gel trên giàu dinh dưỡng vào các đĩa; sau khi gel đông chặt đậy đĩa petri và nuôi tiếp qua đêm ở 37°C.
10. Sáng hôm sau, bổ sung 10 ml dung dịch tẩy lên bề mặt đĩa (dung dịch tẩy: 5% axit axetic trong 25% metanol); sau 20 phút, xác định bán kính vòng kháng khuẩn.

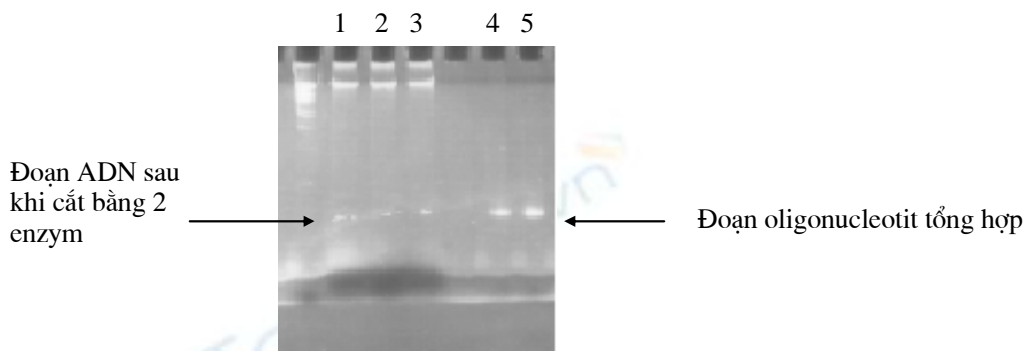
II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Thiết kế vectơ mang gen peptit tái tổ hợp

Gien tổng hợp sau khi được gắn vào vectơ pMAL-C2 nhờ các enzym giới hạn *E.CoR1* và *HindIII*, được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α và chọn lọc trên môi trường LB chứa ampixillin (100 μ g/ml).

Để kiểm tra kết quả biến nạp, chúng tôi đã tiến hành tách chiết ADN của plasmid pMAL-

C2 mang gien peptit tái tổ hợp và cắt ADN plasmid bằng các enzym giới hạn *E.CoR1* và *Hind III*, sau đó kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamit. Kết quả trên điện di đồ thu được 2 băng ADN, một băng tương ứng với ADN có trọng lượng phân tử lớn và một băng có trọng lượng phân tử tương ứng với trọng lượng phân tử của đoạn oligonucleotit tổng hợp (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di ADN plasmid sau khi cắt bằng các enzym *E.CoR I* và *Hind III*
 Các giếng 1, 2, 3: ADN plasmid các khuẩn lạc sau khi xử lý với *E.CoR I* và *Hind III*
 Các giếng 4, 5: Đoạn oligonucleotit tổng hợp

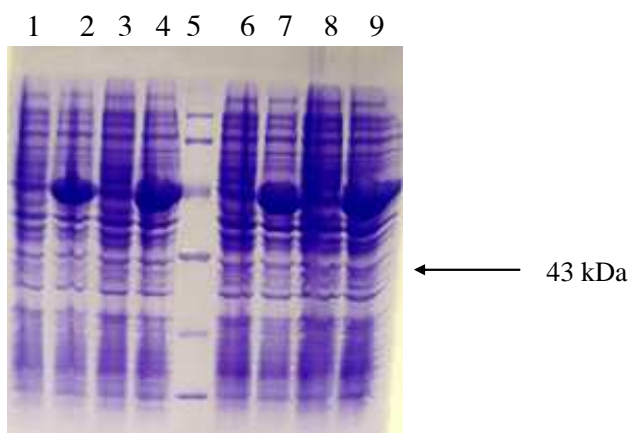
Từ các kết quả trên đây, có thể khẳng định rằng đoạn oligonucleotit do chúng tôi tổng hợp đã được gắn vào vectơ pMAL-C2 và thay thế cho đoạn polylinker của pMAL-C2. Vị trí của đoạn oligonucleotit nằm giữa vị trí nhận biết của các enzym giới hạn *E.CoR1* và *HindIII*.

2. Biểu hiện gien tái tổ hợp

Sau khi biến nạp vectơ pMAL-C2 mang gien peptit tái tổ hợp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL-21, các tế bào vi khuẩn đã biến nạp được nuôi

cấy trên môi trường LB chứa kháng sinh ampixillin (100 μ g/ml) cho tới khi đạt nồng độ OD₆₀₀ = 0,5, bổ sung chất cảm ứng IPTG tới nồng độ cuối cùng là 0,3 mM. Nuôi tiếp trong 3 giờ ở 37°C, sau đó thu nhận tế bào và tách chiết protein vi khuẩn.

Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của gien sau khi cảm ứng bằng IPTG bằng điện di trên gel polyacrylamit SDS-PAGE được trình bày trên hình 2.

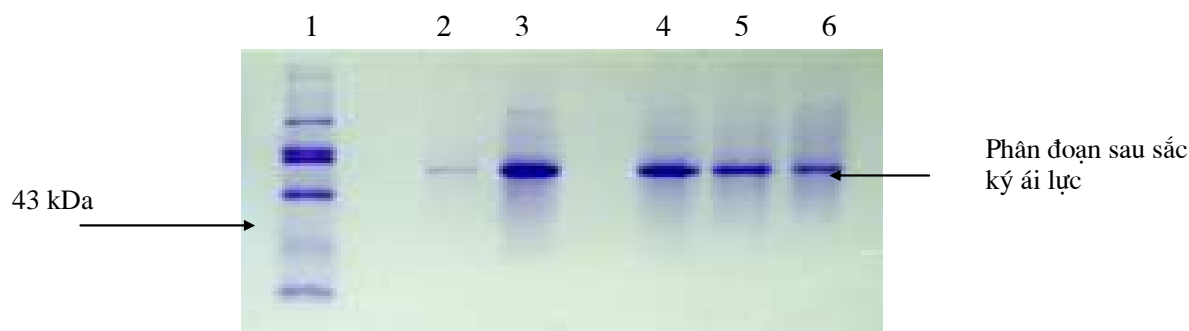


Hình 2. Điện di đồ của protein tế bào vi khuẩn trước và sau khi cảm ứng bằng IPTG
 Giếng 5: Marker protein; Các giếng 1, 3, 6, 8 là protein trước khi cảm ứng bằng IPTG
 Các giếng 2, 4, 7, 9 là protein sau khi cảm ứng bằng IPTG.

Trên hình 2, sau khi cảm ứng bằng IPTG, ta thấy lượng protein có trọng lượng phân tử khoảng 43 kDa xuất hiện rất rõ so với trước khi gây cảm ứng. Điều này có nghĩa là gen tái tổ hợp trong vectơ đã hoạt động mạnh (tổng hợp một lượng lớn protein tái tổ hợp) sau khi bổ sung IPTG vào môi trường nuôi cấy.

3. Tinh chế peptit

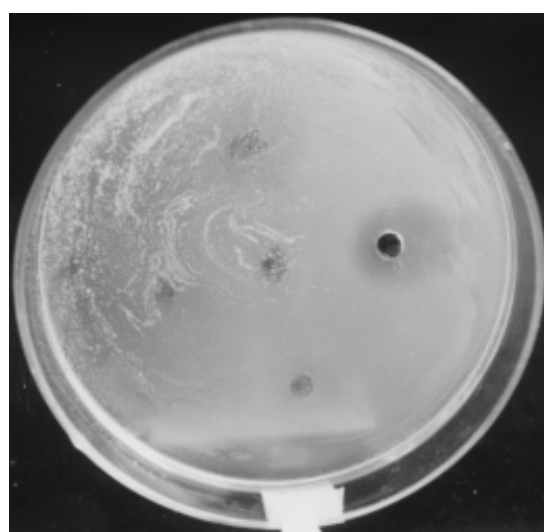
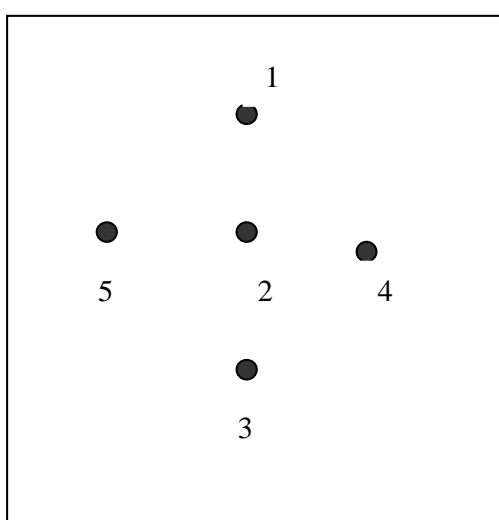
Pha loãng dịch phá tế bào bằng đệm TE (TE: 50mM Tris-HCl, pH = 7,4, 0,1% EDTA và 100 mM NaCl). Sau đó, cho lên cột sắc ký ái lực với chất amyloza resin, giải hấp bằng đệm TE có bổ sung maltoza. Các phân đoạn chứa protein liên kết được kiểm tra bằng điện di trên SDS-PAGE. Kết quả thu được một băng protein có trọng lượng phân tử khoảng 43 kDa (hình 3).



Hình 3. Điện di đồ các phân đoạn thu được bằng sắc ký ái lực trên amyloza resin
Giếng 1: Marker protein
Các giếng 2, 3, 4, 5, 6: Protein của các phân đoạn thu được sau khi bổ sung maltoza.

Protein liên kết, sau khi tinh chế trên cột sắc ký ái lực, được cắt bằng factor Xa trong đệm TE có bổ sung 20 mM CaCl₂ ở nhiệt độ 23°C, thời gian 16 giờ. Sau đó dịch protein đã cắt bằng factor Xa được sắc ký ái lực qua cột amyloza resin (cột sắc ký 1 × 1 cm). Thu các phân đoạn (10 phân đoạn, 300 µl/phân đoạn) ngay sau khi cho dung

dịch protein. Hoạt tính kháng khuẩn của peptit ở các phân đoạn được kiểm tra theo phương pháp vòng kháng khuẩn. Kết quả cho thấy, ở phân đoạn thứ 4, khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn là rất rõ. Kết quả xác định hoạt tính kháng khuẩn của peptit theo phương pháp vòng kháng khuẩn được trình bày trên hình 4.



Hình 4. Khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn gram dương *Bacillus subtilis*
Giếng 4: phân đoạn 3 sau sắc ký ái lực có sự ức chế đối với *Bacillus subtilis*
Các giếng 1, 2, 3, 5: Các phân đoạn 1, 2, 4, 5 sau sắc ký ái lực không có hoạt tính.

III. KẾT LUẬN

1. Đoạn oligonucleotit tổng hợp mã hóa cho một peptit tái tổ hợp đã được gắn vào vectơ pMAL-C2 giữa điểm nhận biết của các enzym giới hạn *EcoR*I và *Hind*III và biểu hiện tốt trong tế bào vi khuẩn *E. coli* BL₂₁.

2. Protein liên kết được tế bào vi khuẩn *E. coli* BL₂₁ tổng hợp với một lượng lớn sau khi cảm ứng bằng IPTG và thu được protein sạch chỉ cần một bước tinh chế trên cột ái lực amyloza resin.

3. Đã xây dựng được phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn thích hợp, có độ nhạy cần thiết để xác định hoạt tính của peptit tái tổ hợp

nói riêng, các peptit nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Beching B., Zasloff M., Opella S.**, 1993: *Protein Sci.*, 2(12): 2077-2084.
2. **Birney M. H. and Penney D. G.**, 1990: *Heart Lung*, 19(2): 174-183.
3. **Blondelle S. E.**, 1995: *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 39-46.
4. **Boma H. G.**, 1995: *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 61-92.
5. **Nakamura T. et al.**, 1998: *J. Biol. Chem.*, 263: 16709-16713.

METHOD FOR DETECTION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE RECOMBINANTIAL PEPTIDE PEP-H

LE QUANG HUAN

SUMMARY

The gene encoding the recombinant peptide has been synthesized by chemical method and it was successfully expressed in *E. coli*. The new method was developed for detection of the antimicrobial activities of the pure recombinant peptide which after has been purified on affinity chromatography and cleaved by the factor Xa.

Ngày nhận bài: 14-1-2002