

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH PROTEIN NỘI ĐỘC TỔ STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN (SEB) TRONG CÁC CHỦNG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* PHÂN LẬP TỪ CÁC VỤ NGỘ ĐỘC THỰC PHẨM

Nghiêm Ngọc Minh*, Hầu Thị Thu Trang, Nguyễn Thị Hoài Thu

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Độc tố ruột staphylococcal enterotoxin B (SEB) của vi khuẩn *Staphylococcus aureus* là một trong những nguyên nhân chính gây ngộ độc thực phẩm. Trong nghiên cứu này, với mục đích biểu hiện và tinh sạch protein SEB dạng tự nhiên, chúng tôi đã tiến hành phân lập các chủng *S.aureus* từ các vụ ngộ độc thực phẩm, tách dòng gen *SEB* bằng vector tách dòng pJet, thiết kế thành công vector biểu hiện pET21a+ mang gen mã hóa cho kháng nguyên tái tổ hợp SEB dạng tự nhiên có độc tính và biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3). Các điều kiện để làm tăng khả năng biểu hiện gen *SEB* cũng đã được nghiên cứu và tối ưu hóa. Cũng trong nghiên cứu này, protein tái tổ hợp SEB được tinh sạch thành công bằng cột Nikel Resin phục vụ làm nguyên liệu tạo SEB tái tổ hợp ở dạng đột biến không có độc tính, làm nguyên liệu cho việc tạo Kit phát hiện nhanh ngộ độc thực phẩm do độc tố tụ cầu vàng ở giai đoạn sau.

Từ khóa: *Staphylococcus aureus*, *SEB*, protein tái tổ hợp, nội độc tố, ngộ độc thực phẩm.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, tình hình ngộ độc thực phẩm có chiều hướng gia tăng cả ở Việt Nam và trên thế giới với hậu quả ngày càng nghiêm trọng, điều đáng quan tâm là một trong số nguyên nhân gây ngộ độc được xác định do vi sinh vật gây ra. Trong đó *Staphylococcus aureus* là một trong số các vi sinh vật sinh độc tố gây ngộ độc thực phẩm thường xuyên được tìm thấy từ các vụ ngộ độc. Chúng lại có khả năng kháng methiciline, penicillin nên khi gặp điều kiện thuận lợi còn có thể lây lan và gây những căn bệnh nguy hiểm. Điều đáng chú ý ở đây là chúng có khả năng tiết ra một số độc tố bền với nhiệt và khó bị phân hủy ở nhiệt độ cao. Một trong số đó là độc tố ruột staphylococcal enterotoxin B (SEB) là tác nhân chính thường gặp nhất trong các vụ ngộ độc thực phẩm do *S. aureus*.

Thông thường khi bị lây nhiễm vào cơ thể, SEB sẽ tác động chủ yếu lên các hệ thống vận chuyển ion và nước của ruột, do đó được gọi là enterotoxin (độc tố ruột) [1]. Độc tố ruột

SEB được hình thành khi tụ cầu khuẩn *S. aureus* sống trong điều kiện khắc nghiệt như nhiệt độ môi trường gia tăng đột ngột, thiếu oxy, sự mất cân bằng trong áp suất thẩm thấu vv...[5]. Trình tự axit amin của SEB đã được xác định từ năm 1970 [4]. SEB dạng hoạt động trong môi trường ngoài tế bào gồm 239 amino axit trong 1 chuỗi polypeptit đơn, có khối lượng phân tử khoảng 28,336 KDa.

Với tình hình ngộ độc thực phẩm do độc tố được sinh ra từ *S. aureus*, việc phát triển các công trình nghiên cứu về *S. aureus* và các độc tố của chúng được rất được lưu ý. Năm 2009, Bùi Thị Mai Hương và cộng sự đã nghiên cứu về tính đa dạng di truyền và độc tố của *S.aureus* phân lập từ thức ăn chế biến sẵn tại Hà Nội, Việt Nam. Mỗi dạng thực phẩm có chứa các loại độc tố SEs khác nhau, nghiên cứu đã thu thập 212 mẫu thực phẩm, trong đó có 45 mẫu chứa *S. aureus* [2]. 18 trong 45 chủng đó sở hữu SEB được phát hiện bởi phương pháp phân tích RPLA[2]. Năm 2002, Lee và cs đã nghiên cứu tạo vaccine tiềm năng phòng chống SEB dựa trên việc sử dụng hệ vector từ virus mang gen mã hóa SEB đột

* Tel: 0988 886930, Email : nghieminh@ibt.ac.vn

biến [6]. Ngoài ra, Năm 1982, Stelma và Bergdoll đã khá thành công trong nghiên cứu làm giảm độc tính của SEA và SEB bằng cách methyl hóa nhóm carboxyl ở các phân tử histidin trong cấu trúc protein SEB [7]. Công nghệ sinh học hiện đại có khả năng tạo ra các protein tái tổ hợp ứng dụng trong nhiều lĩnh vực trong đó có y sinh học. Biểu hiện gen *SEB* thành protein tái tổ hợp không độc phục vụ nghiên cứu tạo vaccine cũng được quan tâm nghiên cứu từ khá sớm. Theo đó, việc nghiên cứu phân lập các chủng *S. aureus* có khả năng sinh độc tố SEB, biểu hiện và tinh sạch protein SEB dạng tự nhiên có độc tính làm nguyên liệu tạo SEB tái tổ hợp ở dạng đột biến không có độc tính, làm nguyên liệu cho việc tạo Kit phát hiện nhanh ngộ độc thực phẩm do độc tố tụ cầu vàng đang được quan tâm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Mẫu bệnh phẩm, chủng *S. aureus* thu thập từ các vụ ngộ độc thực phẩm do Học viện Quân y, Trung tâm y tế dự phòng Thái Nguyên, Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh cung cấp.

Quá trình tách dòng và biểu hiện gen *SEB* sử dụng Vector tách dòng pJet (Fermentas), vector pET21a+ (Novagen). Tế bào vi khuẩn khả biến *Escherichia coli* chủng DH5α và BL21(DE3).

Môi trường cho vi khuẩn và các loại đệm sử dụng trong nghiên cứu được chuẩn bị theo Sambrook và cs (2001) hoặc theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phương pháp

Phân lập

Vi khuẩn tụ cầu từ các bệnh phẩm được phân lập theo tài liệu hướng dẫn của WHO [8]. Các bệnh phẩm từ các trường hợp ngộ độc thức ăn (chất nôn, thức ăn ô nhiễm) được lấy khoảng 50 – 100g/mẫu. Các mẫu được nghiền đồng nhất trong cối chày sứ vô trùng, sau đó được cấy song song lên hai môi trường: chapman và thạch máu. Các khuẩn lạc có vòng tan máu beta và đổi màu trên môi trường chapman được lựa chọn và định danh trên máy định danh Biolog.

Tách dòng gen *SEB*

Gen *SEB* được nhân lên từ khuôn DNA tổng số tách từ chủng *S. aureus* đã phân lập với cặp mồi đặc hiệu theo chu trình nhiệt: 95°C – 5 phút, 32 chu kỳ (95°C – 1 phút, 56°C – 1 phút, 72°C – 1 phút 45 giây), 72°C – 10 phút và phản ứng kết thúc khi mẫu được làm lạnh đến 10°C. Cặp mồi nhân đoạn gen *SEB* ngoài trình tự đặc hiệu của gen *SEB* có thêm trình tự enzyme cắt hạn chế *E.coRI* (gạch chân) vào mỗi xuôi và *HindIII* (gạch chân) và trình tự mã hóa trình tự poly Histidine (đậm) vào mỗi ngược như sau:

SEB-F: 5'GGGGAATTCATGGAGAGTCAACCA 3'

SEB-R: 5'CCCCAAGCTTCAGTGGTGGTGGTGTGGTGCTTTTTCTTTG 3'

Sản phẩm tổng hợp gen trên được đưa vào vector tách dòng pJET theo kit tách dòng Gene JETTM PCR Cloning, tạo SEB/pJET. Xác định trình tự gen *SEB* bằng máy phân tích trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger với bộ Kit BigDye Terminator v. 3.2 Cycle Sequencing.

Biểu hiện gen *SEB*

Sản phẩm tổng hợp gen từ vector tách dòng trên và vector biểu hiện pET21a+ được tạo đầu so le bằng hai enzyme hạn chế *EcoRI* và *HindIII*, sau đó được ghép nối với nhau bằng enzyme T₄ ligase tạo SEB/pET21a+, sản phẩm được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt của Cohen và đồng tác giả (1972) để nghiên cứu biểu hiện gen.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập chủng *S. aureus*

Từ 10 mẫu thức ăn của các bệnh nhân bị ngộ độc thực phẩm đã phân lập được 04 chủng tụ cầu vàng, ký hiệu là Sa1, Sa2, Sa3, Sa4. Bốn mẫu vi khuẩn được bất hoạt rồi tách DNA tổng số. Kết quả cả 4 mẫu đều thu được lượng DNA đủ lớn cho các nghiên cứu tiếp theo (Bảng 1)

Bảng 1. Kết quả đo OD nồng độ DNA

TT	Tên mẫu	Nồng độ DNA (ng/μl)	Độ tinh sạch (260/280)
1	Sa1	13,9	1,89
2	Sa2	88,1	1,83

3	Sa3	14,1	1,95
4	Sa4	72,9	1,77

Tách dòng gen SEB

Gen *SEB* được nhân lên từ khuôn DNA tổng số tách từ chủng *S. aureus* Sa1 đã phân lập bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu SEB-F và SEB-R. Kết quả điện di cho thấy đoạn gen *SEB* thu được có kích thước khoảng 800 bp phù hợp với tính toán lý thuyết khi thiết kế mồi. Đoạn gen được đưa vào vector tách dòng pJET theo quy trình của kit tách dòng GeneJETTM PCR Cloning, tạo SEB/pJET và nhân dòng trong *E.coli* DH5 α . Kết quả của quá trình biến nạp được kiểm tra bằng phương pháp colony PCR và cắt kiểm tra các plasmid bằng enzyme giới hạn. Gen *SEB* trong plamid SEB/pJET được xác định trình tự nucleotide và so sánh với một số trình tự gen trên NCBI. Kết quả bảng 2 cho thấy trình tự gen *SEB* tách được có số phần trăm tương đồng khá cao với trình tự gen *SEB* của các chủng *S. aureus* trên ngân hàng gen. Điều này cho thấy gen *SEB* từ chủng *S. aureus* tự nhiên đã được tách dòng thành công.

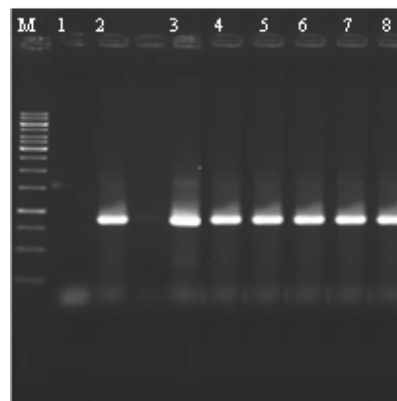
Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự gen *SEB* với một số trình tự gen trên NCBI

TT	Tên trình tự gen tương đồng với gen SEB	Tỉ lệ tương đồng
1	SEB gen, chủng PM36(Mã số: AB479118.1)	95%
2	SEB gen, chủng PM1(Mã số: AB479117.1)	95%
3	SEB gen, chủng OS7(Mã số: AB479116.1)	95%
4	SEB gen, chủng NN43(Mã số: AB462487.1)	95%
5	SEB gen, chủng CMCC 26075(Mã số:AY856382.1)	95%

Thiết kế vector biểu hiện gen

Sản phẩm ghép nối gen SEB trong vector biểu hiện pET21a+ bằng enzyme T₄ ligase được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Kết quả của quá trình biến nạp được kiểm tra bằng phương pháp clony PCR (Hình 1) và cắt kiểm tra các plasmid bằng enzyme cắt giới hạn (Hình 2). Kết quả điện di cho thấy các băng DNA thu được có kích thước khoảng trên 1kb với sản

phẩm clony PCR; 0,8 kb và 5,5 kb, tương ứng kích thước của gen *SEB* và vector pET21a+ với sản phẩm cắt plasmid. Điều này chứng tỏ gen *SEB* đã được gắn thành công vào vector pET21a+.

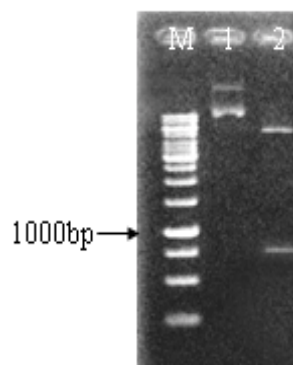


Hình 1. Clony PCR sản phẩm biến nạp.

M: Marker 1kb

1: Đối chứng –

2-8: sản phẩm clony PCR từ các dòng khuẩn lạc



Hình 2. Điện di sản phẩm cắt plasmid SEB/pET21a+

M: Marker 1 kb

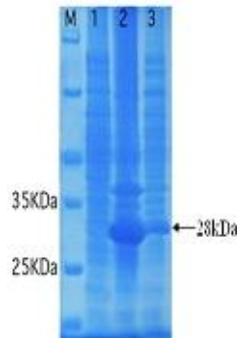
1: SEB/pET21a+

2: Sản phẩm cắt SEB/pET21a+

Biểu hiện gen SEB trong tế bào E. coli BL21 (DE3)

Plasmid tái tổ hợp chọn dòng trong tế bào khả biến *E. coli* DH5 α được biến nạp vào khả biến *E. coli* chủng BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Khả năng biểu hiện của protein SEB tái tổ hợp trong chủng *E. coli* BL21(DE3) được khảo sát ở nồng độ IPTG 0,5mM ở 30°C và thu mẫu sau 5 giờ cảm ứng. Kết quả trên hình 3 cho thấy ở các giếng 2 và 3 vi khuẩn BL21(DE3) mang vector biểu hiện SEB/pET21a+ có cảm ứng IPTG xuất

hiện một băng protein có trọng lượng khoảng 28 kDa tương ứng với trọng lượng protein SEB theo tính toán lý thuyết.



Hình 3. Điện di so sánh protein tổng số của các tế bào *E.coli* BL21(DE3) mang gen SEB tái tổ hợp

M: Marker protein

1: Đối chứng âm

2: Dịch phá tế bào

3: Cặn tế bào sau siêu âm phá tế bào

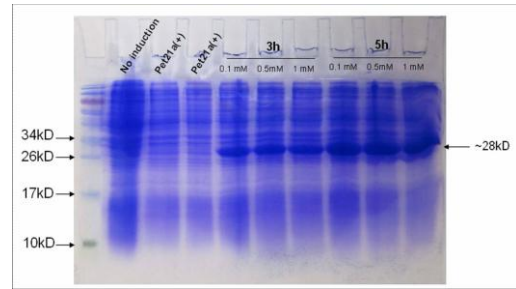
Tối ưu hóa điều kiện biểu hiện gen SEB

Tối ưu nhiệt độ cảm ứng: Chúng tôi đã tiến hành khảo sát khả năng tổng hợp protein SEB tái tổ hợp ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau là 30°C và 37°C với cùng nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,5 mM và thu mẫu sau 5 giờ. Đã tối ưu hóa được nhiệt độ cảm ứng là 30°C.

Tối ưu nồng độ chất cảm ứng IPTG: Protein ngoại lai được điều khiển tổng hợp bởi promoter T7 trên vector pET21a+. Promoter này được cảm ứng bởi sự có mặt của IPTG trong môi trường nuôi cấy [3]. Chúng tôi đã tiến hành khảo sát khả năng biểu hiện protein SEB tái tổ hợp ở các nồng độ chất cảm ứng IPTG khác nhau từ 0,1 - 1 mM (0,1 mM; 0,5 mM và 1 mM) ở 30°C và thu mẫu sau 5 giờ cảm ứng. Kết quả cho thấy nồng độ IPTG tối ưu cho cảm ứng là 0,1mM.

Tối ưu thời gian cảm ứng: Chúng tôi tiến hành khảo sát các thời điểm thu mẫu là 3 giờ, 5 giờ sau khi bổ sung chất cảm ứng IPTG với nồng độ 0,1 mM và nuôi cấy ở 30°C. Kết quả thời gian cảm ứng tối ưu là 5 giờ.

Theo đó, điều kiện tối ưu để cảm ứng biểu hiện protein SEB trong chủng biểu hiện BL21 (DE3) là ở nhiệt độ 30°C, nồng độ chất cảm ứng là 0,1mM sau 5 giờ cảm ứng (Hình 4).



Hình 4. Kết quả tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện gen SEB trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3)

Tinh sạch protein tái tổ hợp SEB

Theo thiết kế vector biểu hiện SEB/pET21a+, khi protein SEB được tổng hợp, nó sẽ nối thêm 6 acid amin Histidin ở phần –COOH. Đây là một đặc điểm thuận lợi cho việc tinh sạch sản phẩm, đồng thời cũng là một tín hiệu để nhận biết sản phẩm được tổng hợp bằng phương pháp Western Blot. Kết quả sản phẩm tinh sạch chỉ có một băng duy nhất với trọng lượng khoảng 28 kDa tương đương trọng lượng của băng biểu hiện trước tinh sạch. Như vậy chúng tôi đã thu được hoàn toàn lượng protein SEB tái tổ hợp tinh sạch.

KẾT LUẬN

Đã phân lập được 04 chủng *S. aureus* từ các vụ ngộ độc và tách dòng thành công gen mã hóa cho nội độc tố SEB trong vector tách dòng SEB/pJET, vector biểu hiện SEB/pET21a+ và biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* BL21(DE3). Điều kiện tối ưu cho biểu hiện gen SEB trong chủng BL21(DE3) là 30°C với nồng độ chất cảm ứng là 0,1mM trong thời gian cảm ứng là 5 giờ. Đã tinh sạch thành công protein tái tổ hợp SEB làm nguyên liệu cho việc tạo Kit phát hiện nhanh ngộ độc thực phẩm do độc tố tụ cầu vàng ở giai đoạn sau.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu tạo kháng nguyên tái tổ hợp *Staphylococcal enterotoxin B (SEB)* phục vụ cho kit phát hiện nhanh ngộ độc thực phẩm do độc tố tụ cầu vàng”, Công trình được thực hiện nhờ trang thiết bị của Phòng Công nghệ sinh học môi trường, Viện Công nghệ Sinh học

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Bruce A. G., Kermit D. H. (2009), CBRNE - Staphylococcal Enterotoxin B,

<http://emedicine.medscape.com/article/830715-overview>.

[2]. Bui Thi Mai Huong, Zahid Hayat Mahmud (2010), Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready – to – eat foods,

www.elsevier.com/locate/foodcont

[3]. Đỗ Thị Huyền, Bùi Hồng Vân, Văn Thị Như Ngọc, Trương Văn Dung, Trương Nam Hải (2009), Biểu hiện gen *ha5* mã hoá kháng nguyên Hemagglutinin (HA) của virus cúm A/H5N1 trong *Escherichia coli*, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 7(2), 185-192.

[4]. Huang L. Y., Bergdoll M. S. (1970), The primer structure of staphylococcal enterotoxin B, *J. Biol. Chem*, 245, 3518-3525.

[5]. Lâm Quốc Hùng (2009), Phòng chống ngộ độc tại Việt Nam năm 2008, dự báo và giải pháp phòng

chống ngộ độc thực phẩm năm 2009, Cục an toàn vệ sinh thực phẩm,

<http://vfa.gov.vn/news.asp?ID=21322.9>

[6]. Lee J. S., Dyas B. K., Nystrom S. S., Lind C. M., Smith J. F., Ulrich R. G. (2002), Immune protection against staphylococcal enterotoxin-induced toxic shock by vaccination with Venezuelan equine encephalitis virus replicon, *J. Infect. Dis*, 185, 1192-1196

[7]. Stelma G. N., Bergdoll M. S. (1982), Inactivation of staphylococcal enterotoxin A by chemical modification, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 105(1), 121-126.

[8]. Valdepitte J. et al (2003), “Basic laboratory procedures in clinical bacteriology”. *WHO. Second edition*

SUMMARY

OPTIMIZATION OF PROTEIN EXPRESSION POSSIBILITY AND PURIFICATION OF ENTEROTOXIN STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B (SEB) IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM FOOD POISONING

Nghiêm Ngọc Minh*, Hậu Thị Thu Trang, Nguyễn Hoài Thu

Institute of Biotechnology

Staphylococcal enterotoxin B of the bacterium *Staphylococcus aureus* is one of the most dangerous causes of food poisoning. In this study, for the purpose of expression and purification of protein SEB natural form, we have carried out the isolation, separation of the SEB gene; designed expression of SEB/pET21a+ which carries the coding gene for antigen recombinant SEB at toxic natural form; and were successful in expression in bacterial cells *E. coli* BL21 (DE3). The conditions for increasing the SEB gene expression has been studied and optimized. Results showed that the recombinant SEB protein was approximately 28 kDa in size and optimal induction conditions is 5 hours at 30°C with 0,1 mM IPTG. Also in this study, the recombinant SEB protein was successfully purified by nickel resin column. The purification product has already served as materials for creating the recombinant SEB protein in non - toxic mutant form, as materials for creating rapid detection of food poisoning by *S. aureus* Kit in other studies.

Key words: *Staphylococcus aureus*, SEB, recombinant protein, enterotoxin, foods poisoning.

* Tel: 0988 886930, Email : nghieminh@ibt.ac.vn