

Dòng hóa và biểu hiện protein LTB trong *Escherichia coli* và *Bacillus subtilis*

- Phan Thị Phượng Trang
- Nguyễn Lê Tuấn Anh
- Nguyễn Đức Hoàng

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 9 tháng 8 năm 2013)

TÓM TẮT

Protein LTB là tiểu phần B của độc tố không bền nhiệt (LTs) ở vi khuẩn *Escherichia coli* ETEC, tiểu phần này không gây độc nhưng lại có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao. Vì vậy, LTB được xem là protein kháng nguyên phù hợp để sản xuất vaccine tiểu phần phòng bệnh tiêu chảy do ETEC gây ra. Ngày nay, các protein kháng nguyên được sản xuất chủ yếu bởi công nghệ protein tái tổ hợp với hệ thống biểu hiện thông dụng là *E. coli*. Tuy nhiên, các protein do chủng chủ *E. coli* tạo ra thường lẫn nhiều nội độc tố cần phải được loại bỏ trong các sản phẩm được. Vì vậy, việc biểu hiện và thu nhận protein kháng nguyên từ chủng biểu hiện khác không tạo ra nội độc tố như *Bacillus subtilis* đang được quan tâm nghiên cứu. pHT là hệ thống vector mới cho

phép biểu hiện protein ở cả *E. coli* lẫn *B. subtilis*. Sử dụng hệ thống này, protein LTB được dòng hóa và biểu hiện trên cả hai chủng chủ. Kết quả, plasmid pHT326 cho phép biểu hiện protein LTB ở dạng dung hợp với LysSN-6xHis-TEV trên *B. subtilis* và *E. coli* đã được tạo dòng và kiểm tra khả năng biểu hiện. Sự bám của protein dung hợp lên cột tinh chế có ái lực với His-tag cũng đã được kiểm tra. Kết quả này phục vụ cho việc tinh chế thu nhận protein LTB có tiềm năng ứng dụng để phát triển vaccine tiểu phần phòng bệnh tiêu chảy cũng như phát triển các bộ kit chẩn đoán vi khuẩn ETEC trong các mẫu thực phẩm, bệnh phẩm hoặc các bộ kit phát hiện kháng thể kháng LTB trong máu động vật.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, LTB, LysSN, hệ thống pHT.

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn ETEC (Enterotoxigenic *Escherichia coli*) là một loại vi khuẩn *E. coli* có khả năng gây bệnh. Chúng là nguyên nhân chính gây ra dịch tiêu chảy ở người và động vật do có khả năng tiết ra các loại độc tố gây rối loạn chức năng chuyển hóa nước và muối ở ruột gây ra hiện

tượng không hấp thu được nước [1]. Các loại độc tố này bao gồm: độc tố bền nhiệt (heat stable enterotoxins - STs) và độc tố không bền nhiệt (heat labile enterotoxins - LTs). Trong đó, độc tố không bền nhiệt có vai trò quan trọng trong việc hình thành bệnh [6].

Bệnh tiêu chảy là một trong những mối quan tâm hàng đầu của dịch tễ học và y học do dễ mắc bệnh và lây nhiễm nhanh, có thể gây ra những đại dịch lớn. Do đó, việc phòng bệnh luôn được đặt lên hàng đầu. Một trong những biện pháp phòng bệnh hiệu quả là dùng vaccine. Ngày nay, vaccine đã được phát triển với rất nhiều loại khác nhau, trong đó vaccine tiểu phần là một trong những loại vaccine hiệu quả với ít tác dụng phụ nhất nên luôn được quan tâm phát triển. Thành phần quan trọng nhất của vaccine tiểu phần là các protein kháng nguyên. Các protein này có thể được thu nhận trực tiếp từ vi sinh vật gây bệnh. Tuy nhiên phương pháp này tồn tại những nguy cơ về vấn đề an toàn. Một biện pháp khác nhằm thu nhận protein kháng nguyên hiệu quả hơn, dễ thực hiện và ít tốn kém là dựa vào công nghệ protein tái tổ hợp.

Protein LTB là tiểu phần B của độc tố không bền nhiệt ở vi khuẩn ETEC, 5 tiểu phần này hình thành cấu trúc pentamer vòng bao lấy 1 tiểu phần A để hình thành độc tố LTs. Thành phần chính gây độc là tiểu phần A. Ngược lại, tiểu phần B không gây độc, chức năng chính của chúng là giúp độc tố LTs bám lên bề mặt tế bào niêm mạc ruột [1, 2]. Điều thú vị là tuy không gây độc nhưng tiểu phần B lại gây đáp ứng miễn dịch khá hiệu quả, do đó, chúng được sử dụng làm thành phần chính của các loại vaccine tiểu phần phòng bệnh tiêu chảy do vi khuẩn ETEC gây ra [8].

Hiện nay, protein LTB được sản xuất bằng công nghệ protein tái tổ hợp với hệ thống biểu hiện khá phổ biến là vi khuẩn *E. coli*. Tuy nhiên, việc biểu hiện protein ở *E. coli* tồn tại một bất lợi, đó là sản phẩm thường lẫn nội độc tố và để loại bỏ hoàn toàn những độc tố này cần phải qua nhiều bước tinh chế rất khó khăn và tốn kém. Do đó, cần có những hệ thống biểu hiện khác không tạo ra nội độc tố để biểu hiện và thu nhận protein LTB dễ dàng hơn với chi phí thấp. Vi khuẩn *B. subtilis* là một trong những đối tượng tiềm năng cho mục tiêu trên.

Hệ thống biểu hiện protein ở *B. subtilis* hiện đang được quan tâm nghiên cứu và đã có một số hệ thống vector cho hiệu quả biểu hiện protein cao [3, 5]. Trong đó, hệ thống vector pHT đã được thương mại hóa bởi công ty Mobitec (Đức), cho phép biểu hiện protein hiệu quả ở cả *B. subtilis* lẫn *E. coli*. Do đó, hệ thống vector pHT được sử dụng để tạo dòng và biểu hiện protein LTB, đồng thời kiểm tra khả năng tinh chế protein mục tiêu nhằm làm cơ sở cho việc thu nhận LTB tái tổ hợp phục vụ cho việc phát triển vaccine phòng bệnh tiêu chảy do ETEC gây ra cũng như phát triển các bộ kit chẩn đoán ETEC trong thực phẩm và bệnh phẩm.

Ngoài ra, do tính gây đáp ứng miễn dịch mạnh, protein LTB còn được dùng trong các nghiên cứu có sử dụng chỉ thị miễn dịch [4]. Cụ thể, protein LTB được sử dụng để làm chỉ thị miễn dịch trong dự án nghiên cứu mới của Trung tâm khoa học và Công nghệ sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh nhằm thiết lập những chủng vi khuẩn có khả năng biểu hiện protein ngoại lai ngay trong cơ thể động vật một cách chủ động dưới sự kiểm soát của các chất cảm ứng. Khi vi khuẩn có khả năng biểu hiện protein LTB tái tổ hợp bên trong cơ thể động vật thí nghiệm được cảm ứng biểu hiện, hiện tượng giả tăng kháng thể kháng LTB xảy ra. Vì vậy, việc tạo dòng và biểu hiện LTB ở *B. subtilis* và *E. coli* còn là cơ sở cho việc thu nhận protein LTB tái tổ hợp nhằm phát triển các bộ kit phát hiện kháng thể kháng LTB trong máu động vật thí nghiệm phục vụ cho dự án nghiên cứu trên.

Vì hệ thống vector pHT cho phép biểu hiện protein ở cả *B. subtilis* và *E. coli* nên hiệu quả biểu hiện LysSN-6xHis-TEV-LTB ở *B. subtilis* và *E. coli* đều được khảo sát. Mặc dù protein biểu hiện từ *E. coli* cần phải loại bỏ nội độc tố nên tốn kém nhưng nếu hiệu quả biểu hiện LTB ở *E. coli* đem lại lợi ích to lớn hơn so với chi phí phải bỏ

ra nhằm loại bỏ nội độc tố thì vẫn có thể được xem xét sử dụng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

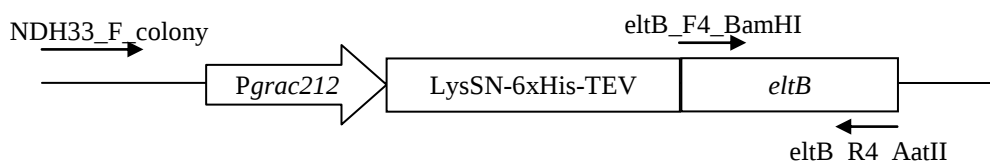
Plasmid: Tất cả các plasmid được cung cấp bởi Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh. Trong đó, plasmid pLDV5 [4] mang gen *eltB* mã hóa protein LTB và plasmid pHT320 là một vector biểu hiện, cho phép biểu hiện protein trong cả hai chủng vi sinh vật là *B. subtilis* và *E. coli*. Plasmid này mang trình tự promoter *Pgrac212*, theo sau đó là trình tự mã hóa cho đuôi dung hợp LysSN-6xHis-TEV nhằm tăng cường khả năng biểu hiện của protein mục tiêu. Đuôi His-TEV giúp dễ dàng tinh chế và loại bỏ đuôi dung hợp khỏi protein mục tiêu. Trình tự MCS nằm ngay sau trình tự mã hóa LysSN-6xHis-TEV.

Chủng vi sinh vật: *E. coli* OmniMAX™ F' {proAB+ lacIq lacZAM15 *Tn10(TetR)*

Δ(ccdAB) mcrA *Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*
Φ80lacZAM15 *Δ(lacZYA-argF)*
U169 endA1recA1 supE44 thi-

1 gyrA96 relA1 tonA panD (Invitrogen); *E. coli* BL21 F- dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal [malB+]K-12(λS) (Novagen); *B. subtilis* 1012 leuA8 metB5 trpC2 hsdRM1 [7].

Môi cho phản ứng PCR: Các môi oligonucleotide được sử dụng trong phản ứng PCR thu gene cũng như phản ứng PCR khuếch đại được tổng hợp bởi công ty Macrogen (Hàn Quốc). Các môi bao gồm: *eltB_F4_BamHI* (ggccGGATCCATG GTCCTCAGTCTATTACAGAACTATG); *eltB_R4_AatII* (ggccGACGTCctaGTTTTCCATACTGATTGC CG); NDH33_F_colony (GTGTTATGGCTTGAACAATCACG). Sơ đồ môi được thể hiện như trong Hình 1.



Hình 1. Sơ đồ vị trí các môi cho phản ứng PCR

Enzyme: Enzyme *Pfu* DNA polymerase và *Taq* DNA polymerase được cung cấp bởi công ty New England Biolabs (Mỹ). Các enzyme cắt giới hạn bao gồm *BamHI*, *AatII*, *Sall*, *BglII* được cung cấp bởi công ty Fermentas (Đức).

Tạo dòng vector pHT326

Gene *eltB* được thu nhận thông qua phản ứng PCR với khuôn DNA là plasmid pLDV5 và cặp môi đặc hiệu *eltB_F4_BamHI* và *eltB_R4_AatII*. Thành phần phản ứng PCR: 1X *Pfu* buffer (có sẵn $MgCl_2$), 200 μ M dNTP, 0,25 pmol môi, 50 ng pLDV5, 2U *Pfu* DNA polymerase. Phản ứng được thực hiện trong 30 chu kỳ gồm các bước 95°C/30s, 55°C/30s, 72°C/30s. Sản phẩm được

tinh sạch thông qua bộ kit PCR purification kit (Qiagen), sau đó được xử lý với hai enzyme cắt giới hạn là *BamHI* và *AatII*.

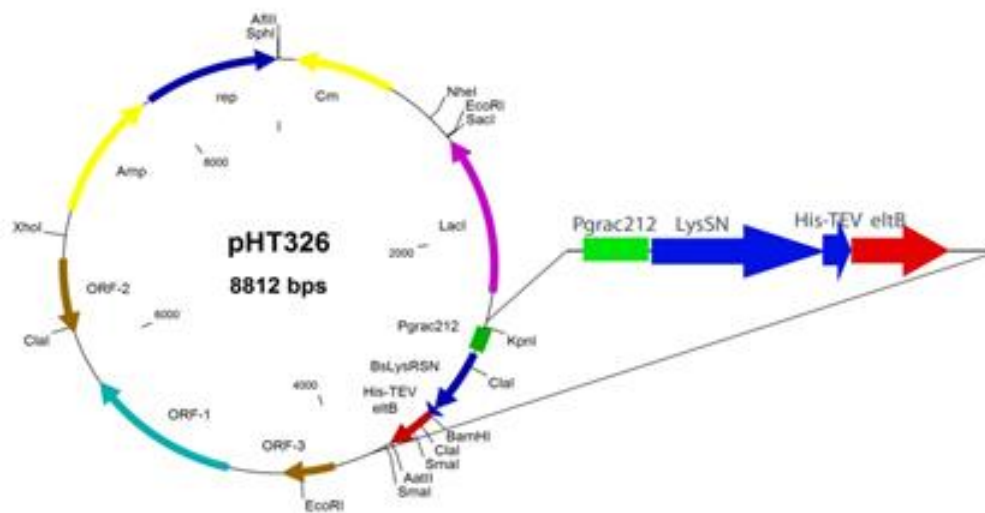
Plasmid pHT320 cũng được xử lý mở vòng bởi hai enzyme *BamHI* và *AatII*, sau đó được nối với gene *eltB* để tạo plasmid pHT326 (Hình 2). Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* OmniMAX khả nạp. Các thể biến nạp được sàng lọc bằng phản ứng PCR khuếch đại với hai cặp môi: (1) *eltB_F4_BamHI* và *eltB_R4_AatII*; (2) NDH33_F_colony và *eltB_R4_AatII*. Sơ đồ môi được thể hiện trong Hình 1. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại gồm: 1X *Taq* buffer (có sẵn $MgCl_2$), 200 μ M dNTP, 0,25 pmol môi, 1U *Taq*

DNA polymerase. Phản ứng được thực hiện trong 30 chu kỳ gồm các bước 95°C/30s, 55°C/30s, 72°C/30s.

Sau khi sàng lọc và chọn được khuẩn lạc mang plasmid pHT326, tiến hành tách chiết plasmid thông qua bộ kit Plasmid purification Mini kit (Qiagen) và kiểm tra lại plasmid đã thu nhận được thông qua phản ứng cắt bởi các

enzyme cắt giới hạn *SalI* và *BglII* và phân tích sản phẩm cắt trên gel điện di agarose.

Plasmid sau khi được kiểm tra bằng enzyme cắt hạn chế được giải trình tự tại công ty MacroGen (Hàn Quốc) với môi trường NDH33_F_colony nhằm xác nhận một cách chính xác vector pHT326.



Hình 2. Sơ đồ plasmid pHT326

Biểu hiện protein LTB trong *B. subtilis* và *E. coli*

Vector tái tổ hợp pHT326 được biến nạp vào tế bào *B. subtilis* 1012 theo phương pháp biến nạp tự nhiên và vào tế bào *E. coli* BL21 theo phương pháp hóa biến nạp với CaCl_2 . Các khuẩn lạc mọc trên môi trường LB-Agar có bổ sung nồng độ kháng sinh thích hợp (10 µg/ml chloramphenicol đối với *B. subtilis* 1012 và 50 µg/ml ampicillin với *E. coli* BL21) được chọn để nuôi cấy lắc trong 100 ml môi trường LB ở 37°C và cảm ứng biểu hiện protein bằng IPTG với nồng độ 0,5 mM, thời điểm cảm ứng lúc OD_{600} đạt 0,8 và thời gian cảm ứng là 2 h. Kiểm tra sự biểu hiện protein thông qua phương pháp SDS-PAGE với mẫu là sinh khối thu được.

Kiểm tra đuôi dung hợp

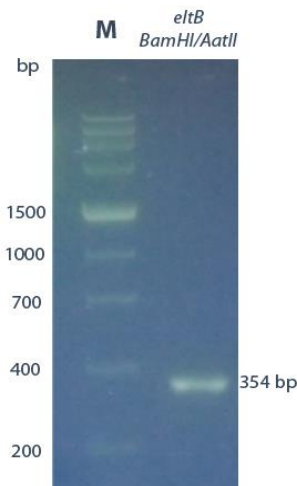
Protein tái tổ hợp LysSN-6xHis-TEV-LTB có khả năng bám đặc hiệu lên cột Ni^{2+} giúp dễ dàng tinh chế theo phương pháp sắc ký ái lực. Tuy nhiên, ở một số trường hợp, do hệ quả của việc gấp cuộn nên đuôi dung hợp có thể bị che lấp và không thực hiện được chức năng. Do đó, để khẳng định đuôi dung hợp 6xHis ở protein LysSN-6xHis-TEV-LTB mục tiêu có khả năng bám được lên cột Ni^{2+} giúp dễ dàng tinh chế, chúng tôi tiến hành phá tế bào trong dung dịch đệm gồm 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; 5% Glycerol; 25 mM Imidazole và kiểm tra mức độ biểu hiện protein ở dạng tan, sau đó dịch protein tổng số được nạp qua cột His Spin Trap (GE Healthcare) và thu nhận dịch protein

sau khi qua cột, rửa cột và dung ly protein bám trên cột bằng dung dịch Imidazole 250 mM pH 8,0. Điện di tất cả các mẫu trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE) để kiểm tra.

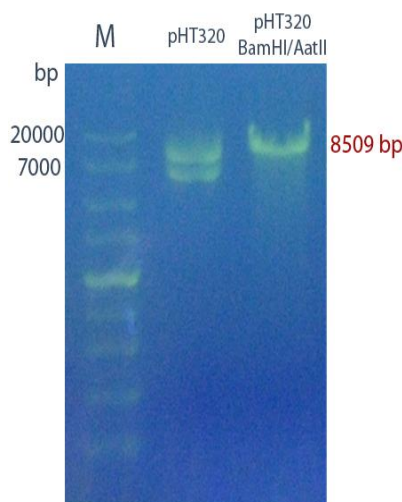
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo dòng vector pHT326

Gene *eltB* được khuếch đại bằng phản ứng PCR, sau đó được xử lý với hai enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Aat*II có kích thước 354 bp. Kiểm tra bằng điện di trên gel agarose, kết quả thu được một vạch sáng rõ có kích thước khoảng 354 bp (Hình 3) phù hợp với kích thước dự đoán trên lý thuyết. Đồng thời, plasmid pHT320 cũng được xử lý với hai enzyme cắt giới hạn tương ứng và kiểm tra trên gel điện di agarose, kết quả cho 1 vạch có kích thước khoảng 8509 bp (Hình 4), phù hợp với cấu hình dạng thẳng trên lý thuyết của plasmid pHT320 đã mở vòng. Như vậy, đoạn gen *eltB* và plasmid pHT320 đã sẵn sàng cho việc dòng hóa.



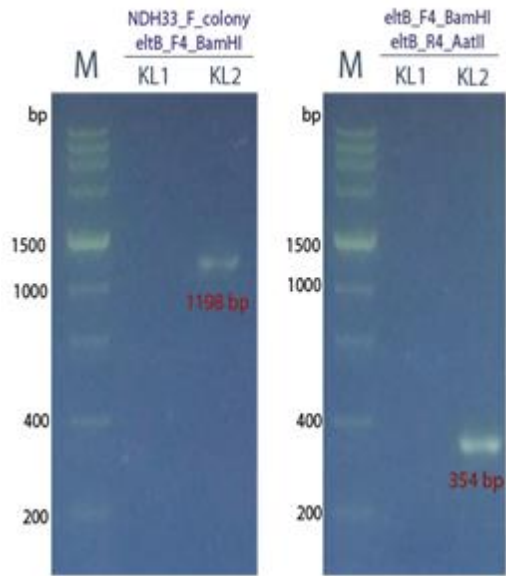
Hình 3. Kết quả thu nhận gene *eltB*. M, thang DNA; *eltB*/*Bam*HI/*Aat*II, sản phẩm PCR thu gene



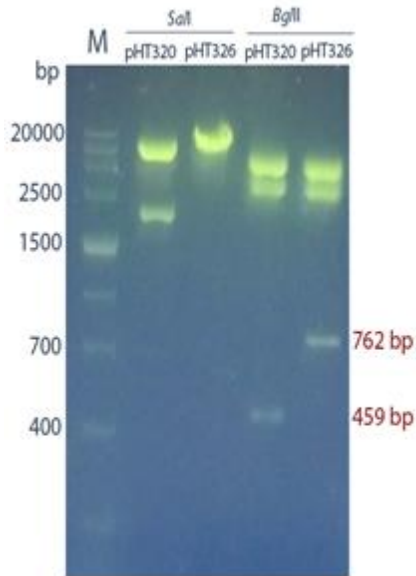
Hình 4. Kết quả cắt mở vòng plasmid pHT320. M, thang DNA; pHT320, plasmid pHT320 mới tách chiết và chưa mở vòng; pHT320/*Bam*HI/*Aat*II, plasmid pHT320 đã mở vòng

Gene *eltB* được gắn chèn vào plasmid pHT320 đã mở vòng bằng phản ứng nối nhờ T4 DNA ligase, sau đó biến nạp sản phẩm nối vào tế bào *E. coli* OmniMAX. Chọn 2 khuẩn lạc để thực hiện sàng lọc bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với hai cặp mồi đặc hiệu: (1) *eltB*_F4_*Bam*HI và *eltB*_R4_*Aat*II; (2) NDH33_F_colony và *eltB*_R4_*Aat*II. Kết quả, thu được khuẩn lạc 2 cho vạch DNA dương tính tương ứng với cả hai cặp mồi. Ngược lại, khuẩn lạc 1 cho kết quả âm tính (Hình 5). Như vậy, khuẩn lạc 2 được dự đoán có mang vector pHT326.

Plasmid từ khuẩn lạc 2 được tách chiết, sau đó tiến hành cắt kiểm tra và giải trình tự. Kết quả cắt kiểm tra vector pHT326 với hai enzyme *Bgl*II và *Sal*I cho các sản phẩm có kích thước tương ứng với dự đoán trên lý thuyết (cắt với *Bgl*II cho 3 vạch kích thước 4969 bp, 3081 bp và 762 bp, cắt với *Sal*I cho 1 vạch kích thước 8812 bp) và khác với đối chứng là các sản phẩm cắt plasmid gốc pHT320 cũng với *Bgl*II và *Sal*I (Hình 6 và Bảng 1).



Hình 5. Kết quả PCR khuẩn lạc. M, thang DNA; KL1, khuẩn lạc 1; KL2, khuẩn lạc 2



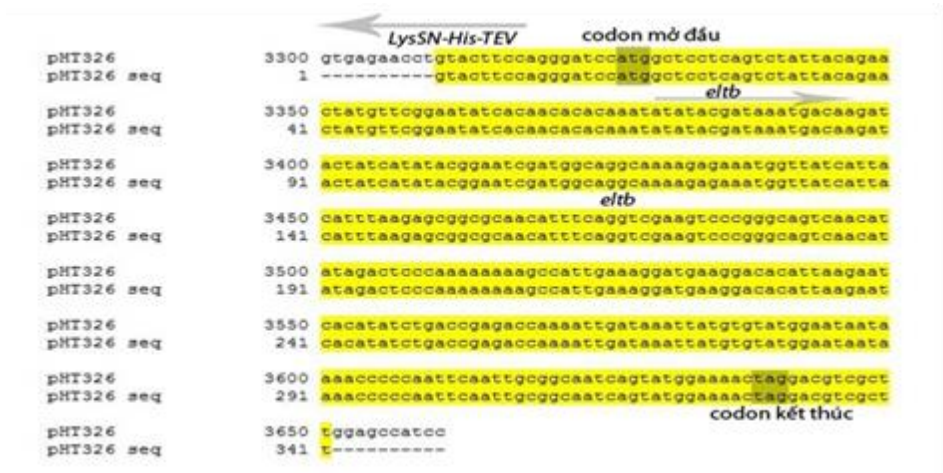
Hình 6. Kết quả cắt kiểm tra plasmid pHT326. M, thang DNA.

Bảng 1. Kích thước các sản phẩm sau khi xử lý cắt plasmid pHT320 và pHT326 bằng *SalI* và *BglII*

Enzyme	<i>SalI</i>		<i>BglII</i>	
Plamids	pHT320	pHT326	pHT320	pHT326
Kích thước các sản phẩm (bp)	6601 1908	8812	4969 3081 459	4969 3081 762

Kết quả giải trình tự bằng cho thấy có sự tương đồng 100% giữa trình tự thực tế của vector

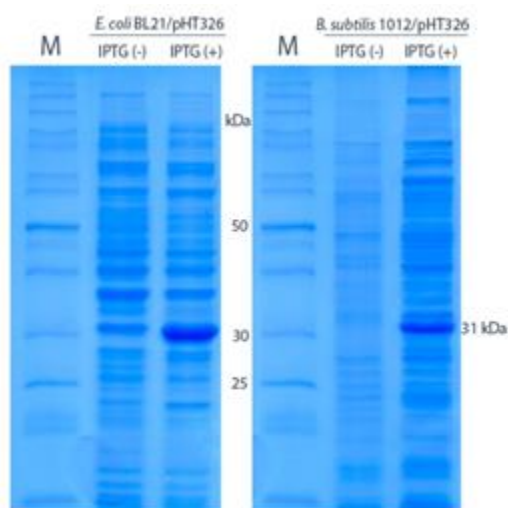
pHT326 và trình tự trên lý thuyết (Hình 7). Như vậy, đã tạo dòng thành công vector pHT326.



Hình 7. Kết quả giải trình tự plasmid pHT326

Kết quả kiểm tra sự biểu hiện protein LysSN-6xHis-TEV-LTB

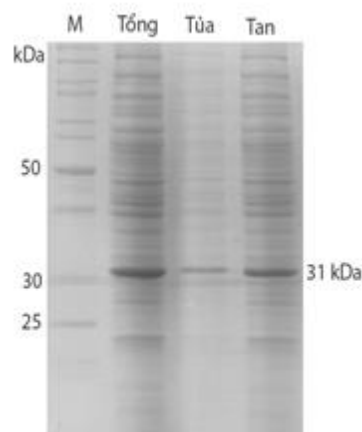
Plasmid pHT326 được biến nạp vào tế bào *B. subtilis* 1012 và *E. coli* BL21, kiểm tra khả năng cảm ứng biểu hiện protein tái tổ hợp bằng phương pháp SDS-PAGE. Kết quả, ở cả hai chủng vi khuẩn đều xuất hiện một vạch protein đậm so với chứng âm ở kích thước khoảng 31 kDa, phù hợp với kích thước của protein mục tiêu LysSN-6xHis-TEV-LTB. Kết quả còn cho thấy vạch protein biểu hiện ở *E. coli* đậm hơn so với ở *B. subtilis* (Hình 8). Như vậy chúng tôi có thể kết luận vector pHT326 cho phép biểu hiện thành công protein mục tiêu ở cả hai chủng vi khuẩn là *B. subtilis* và *E. coli*.



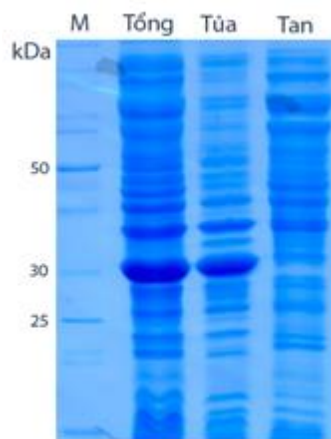
Hình 8. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện protein LysSN-6xHis-TEV-LTB ở *E. coli* BL21 và *B. subtilis* 1012. M, thang protein; IPTG (-), không cảm ứng IPTG; IPTG (+), cảm ứng IPTG nồng độ 0,5 mM ở thời điểm OD₆₀₀ = 0,8 và thu mẫu sau 2h

Tuy nhiên, kết quả khảo sát tính tan của protein mục tiêu (Hình 8) cho thấy protein biểu hiện ở *E. coli* đa phần ở dạng thể vùi không tan, trong khi protein biểu hiện ở *B. subtilis* có ở dạng tan. Vì vậy, chúng tôi ưu tiên sử dụng protein LysSN-6xHis-TEV-LTB được biểu hiện ở *B. subtilis* để kiểm tra khả năng tinh chế, cụ thể là

kiểm tra sự gắn lên cột Ni²⁺. Kết quả kiểm tra cho thấy dịch protein trước khi qua cột có vạch protein mục tiêu kích thước 31 kDa nhưng sau khi qua cột vạch protein này không còn. Ở phân đoạn dung ly thấy sự xuất hiện lại vạch protein tương ứng (Hình 9). Như vậy, chúng tôi kết luận protein LysSN-6xHis-TEV-LTB có khả năng bám tốt lên cột His Spin Trap, do đó dễ dàng tinh chế bằng phương pháp sắc kí ái lực.

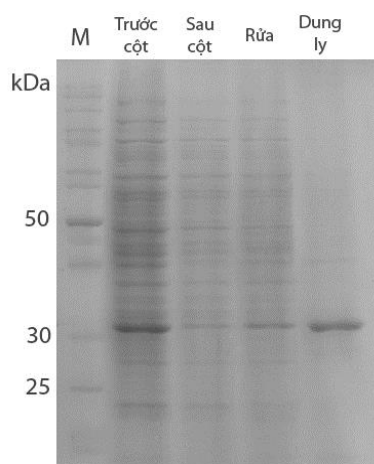


A



B

Hình 8. Kết quả kiểm tra mức độ tan của protein LysSN-6xHis-TEV-LTB. A, ở *B. subtilis*; B, ở *E. coli*



Hình 9. Kết quả kiểm tra sự gắn lên cột Ni^{2+} của protein mục tiêu được biểu hiện bởi chủng chủ *B. subtilis*

KẾT LUẬN

Dựa trên những kết quả đạt được như đã trình bày, chúng tôi đã tạo dòng thành công plasmid pHT326 mang gen *eltB* cho phép biểu hiện protein LTB ở dạng dung hợp với đuôi LysSN-6xHis-TEV trên cả hai chủng vi khuẩn là *B. subtilis* và *E. coli*. Tuy nhiên, chỉ có protein được biểu hiện ở *B. subtilis* mới ở dạng tan và protein này có khả năng bám tốt lên cột Ni^{2+} giúp dễ dàng tinh chế thông qua phương pháp sắc ký ái lực.

Do protein mục tiêu biểu hiện ở *E. coli* ở dạng thể vùi không tan, nên không thể tinh chế thu nhận theo phương pháp thông thường. Do đó,

nếu muốn sử dụng vector pHT326 trong *E. coli* để biểu hiện và tinh chế LTB theo phương pháp thông thường, các điều kiện biểu hiện ở *E. coli* nhằm thu được protein mục tiêu dạng tan nên được khảo sát cụ thể hơn.

Đối với protein mục tiêu được biểu hiện ở *B. subtilis*, có thể tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện để thu được lượng protein mục tiêu cao nhất. Sau đó sẽ tiến hành tinh chế protein nhằm phát triển vaccine tiểu phần phòng bệnh tiêu chảy và thiết lập các quy trình ELISA giúp chẩn đoán vi khuẩn ETEC cũng như phát hiện kháng thể kháng LTB ở động vật để phục vụ cho dự án nghiên cứu mới của Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh về sự biểu hiện protein ở vi khuẩn một cách chủ động ngay trong cơ thể động vật dưới sự kiểm soát của các chất cảm ứng.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn tập thể cán bộ làm việc tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ sinh học, PTN. Công nghệ sinh học phân tử và Bộ môn Sinh hóa – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Tp Hồ Chí Minh đã giúp đỡ chúng tôi hoàn thành tốt đề tài này. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.16-2011.80.

Cloning and expression of LTB in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

- Phan Thi Phuong Trang
- Nguyen Le Tuan Anh
- Nguyen Duc Hoang

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

LTB is the B subunit of heat labile toxins (LT) in *Escherichia coli* ETEC. This subunit is non-toxic but has a high immune response. Therefore, LTB is considered a suitable antigen for partial vaccine against the diarrhea caused by *E. coli* ETEC. The most important component of partial vaccine is antigen protein. Nowadays, with the advancement of recombinant protein technology, these antigens are mainly produced by the common bacterial expression system as *E. coli*. However, the recombinant proteins produced by *E. coli* are often miscellaneous with enterotoxins, which should be removed from pharmaceutical products. Thus, the production of antigen proteins in other expression system without

endotoxins like *Bacillus subtilis* is in attention. We conducted the experiments of cloning and expressing LTB using a novel pHT plasmid that allow the protein to be expressed in both of *E. coli* and *B. subtilis*. We were successful to generate plasmid pHT326 and express the gene encoding for the fusion protein of LTB and LysSN-6xHis-TEV in *B. subtilis* and *E. coli*. The binding of fusion protein on the columns that have affinity with His-tag was confirmed. This result is about to be applied for the development of partial vaccine against the diarrhea as well as the development of some diagnostic kits for ETEC in food or medical waste and kits to detect antibodies against LTB in animals.

Key words: *Bacillus subtilis*, LTB, LysSN, pHT system.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. D.M. Gill, S.H. Richardson, Adenosine diphosphate-ribosylation of adenylate cyclase catalyzed by heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: comparison with cholera toxin, *The Journal of infectious diseases*, 141, 64–70 (1980).
- [2]. J. Holmgren, Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera, *Nature*, 292, 413–417 (1981).
- [3]. H.D. Nguyen, Q.A. Nguyen, R.C. Ferreira, L.C.S. Ferreira, L.T. Tran, W. Schumann, Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability, *Plasmid*, 54, 241–248 (2005).
- [4]. J.D. Paccez, H.D. Nguyen, W.B. Luiz, R.C.C. Ferreira, M.E. Sbrogio-Almeida, W. Schuman, L.C.S. Ferreira, Evaluation of

- different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles, *Vaccine*, 25, 4671–4680 (2007).
- [5]. T.T.P. Phan, H.D. Nguyen, W. Schumann, Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*, *Protein expression and purification*, 46, 189–195 (2006).
- [6]. F. Qadri, A.-M. Svennerholm, A.S.G. Faruque, R.B. Sack, Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention, *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 465–483 (2005).
- [7]. H. Saito, T. Shibata, T. Ando, Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg, *Molecular & general genetics: MGG*, 170, 117–122 (1979).
- [8]. A.-M. Svennerholm, J. Tobias, Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Expert review of vaccines*, 7, 795–804, (2008).