

LỰA CHỌN MÔI TRƯỜNG NUÔI CÂY NHÂM TĂNG SẢN LƯỢNG FLAGELLIN FLIC TẠI TỔ HỢP CỦA *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM TỪ *ESCHERICHIA COLI*

Đỗ Thị Huyền¹, Lê Quỳnh Giang¹, Sven-Olof Enfors², Trương Nam Hải¹

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

²Viện Công nghệ Hoàng gia Thụy Điển

TÓM TẮT

Flagellin FlhC của *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) là protein có khả năng sinh miễn dịch phòng hộ, kích hoạt cả miễn dịch bẩm sinh lẫn miễn dịch thích ứng giúp cơ thể động vật kháng lại vi khuẩn. Không những thế, kháng thể kháng flagellin còn được truyền từ gà mẹ sang trứng và bảo hộ gà con khỏi sự xâm nhiễm của *Salmonella*. Vì vậy, gen *flhC* mã hóa cho kháng nguyên đã được biểu hiện trong tế bào *E. coli* nhằm đánh giá khả năng sử dụng chúng để điều chế vaccine phòng *S. Typhimurium*. FlhC được đề cập trong bài báo này đã được biểu hiện dưới dạng dung hợp với thioredoxin (Trx) nên được gọi là TrxFlhC. Trong quá trình lên men sản xuất TrxFlhC, môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng lớn đến sinh khối *E. coli* BL21 tái tổ hợp cũng như sản lượng protein ngoại lai TrxFlhC thu được. Khi chủng này được nuôi trong các môi trường M9, M9Y, MYL và LB, lượng TrxFlhC được biểu hiện trong môi trường LB cao hơn so với các môi trường còn lại. Nếu thêm muối M9 và glucose vào môi trường LB, sinh khối tế bào đạt gần gấp đôi và lượng protein TrxFlhC được tổng hợp nhiều hơn hẳn. Ngoài ra, nguồn carbon có ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng của chủng cũng như lượng protein tái tổ hợp TrxFlhC. Glucose rất thích hợp cho chủng sinh trưởng nhưng không phù hợp để biểu hiện lượng lớn protein ngoại lai. Khi thay thế nguồn carbon glucose bằng glycerol trong môi trường LB có thêm muối M9, mức độ tốc độ sinh trưởng của chủng chậm hơn (sau 8 h sinh khối tế bào mới đạt bằng sinh khối tế bào của chủng sinh trưởng trong môi trường có glucose lúc 6 h) nhưng protein TrxFlhC thu được với lượng cao hơn hẳn.

Từ khóa: *E. coli* BL21, *flhC*, *S. Typhimurium*, TrxFlhC, vaccine

MỞ ĐẦU

Flagellin của *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) nói chung và của vi khuẩn nói riêng là kháng nguyên tương đối ổn định, ít bị đột biến và là nhân tố gây bệnh quan trọng của vi khuẩn trên động vật. Đây là tiểu phần đơn duy nhất cấu thành nên kháng nguyên roi. Ngoài việc tham gia vào quá trình vận động, bám dính của vi khuẩn lên tế bào đích, kháng nguyên roi còn tham gia đặc lực giúp vi khuẩn xâm nhiễm đại thực bào, tế bào biểu mô ruột, đồng thời giúp vi khuẩn thoát khỏi đại thực bào để phát tán ra cơ quan nội tạng của động vật bị nhiễm (Sano *et al.*, 2007). Nhiều công trình khoa học đã chứng minh flagellin có khả năng kích thích sinh miễn dịch bảo hộ theo cả hai nhánh: miễn dịch bẩm sinh và miễn dịch tiếp thu (qua miễn dịch dịch thể và miễn dịch trung gian tế bào) giúp cơ thể động vật kháng lại vi khuẩn (Cuadros *et al.*, 2004, Ramos *et al.*, 2004, McSorley *et al.*, 2000). Đặc biệt, khi gây miễn dịch chủ động cho gia cầm với vaccine vô hoạt, hầu hết kháng thể được truyền sang trứng và

bảo vệ gà mới nở kháng lại *Salmonella* chính là kháng thể kháng flagellin (Chanter *et al.*, 2006). Nhiều nhóm nghiên cứu đã nhận định rằng, kháng nguyên roi của *Salmonella* rất có tiềm năng để bào chế vaccine phòng *Salmonella* cho động vật (Cuadros *et al.*, 2004, Ramos *et al.*, 2004, McSorley *et al.*, 2000). Gần đây nhóm nghiên cứu ở Nhật Bản đã chứng minh vaccine dưới đơn vị tái tổ hợp có thành phần kháng nguyên là flagellin FlhC của *S. Enteritidis* có hiệu lực cao hơn cả vaccine vô hoạt đang được bán trên thị trường, bảo hộ gà chống lại *S. Enteritidis* (Toyota-Hanatani *et al.*, 2009).

S. Typhimurium có hai kháng nguyên roi H:1 và H:1,2 cấu thành từ hai loại flagellin FlhC và FlhB tương ứng. Trong đó, kháng nguyên H:1 là kháng nguyên trội được biểu hiện thường xuyên để tham gia vào các hoạt động sống của tế bào. Protein FlhC đã được biểu hiện dưới dạng dung hợp với thioredoxin (Trx) trước vùng đa nối nên khi được biểu hiện thành protein, FlhC sẽ ở dạng dung hợp với Trx và được gọi là protein TrxFlhC. Theo như Epstein và đồng tác giả (2002), protein Trx được mã

hoà từ gen *trx* sẽ giúp cho protein tái tổ hợp biểu hiện ổn định hơn, hạn chế hình thành cấu trúc sai lệch. Để sản xuất được lượng lớn TrxFliC dùng cho thử nghiệm làm vaccine phòng *S. Typhimurium* cho gia cầm, trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả về việc lựa chọn môi trường lên men để làm tăng sản lượng TrxFliC từ chủng *E. coli* tái tổ hợp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi sinh vật

Chủng *E. coli* BL21 [*F' omp hsd SB(trbM)gal dem (DE3) phxS(CamI)*] tái tổ hợp mang gen mã hóa flagellin FliC của *S. Typhimurium*.

Thiết bị lên men:

Hệ thống lên men đa bình Greta (Belanch Biotechnik, Thụy Điển).

Môi trường

M9: 1 lít môi trường chứa 6,645 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 0,5 g NaCl; 1 g NH_4Cl ; 10 g glucose; 0,24 g MgSO_4 ; 0,024 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MgSO_4 và CaCl_2 được chuẩn bị và khử trùng riêng, để nguội và bổ sung vào môi trường).

M9Y: môi trường M9 có bổ sung thêm 0,5% yeast extract.

MYL: môi trường M9Y trong đó glucose được thay bằng 2% lactose.

LB: 0,5% cao nấm men, 1% bacto tryptone; 1% NaCl.

LBGlu: Thành phần như môi trường LB nhưng thêm 10 g/l glucose.

MYTGlut: môi trường M9 có thêm 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract.

MYTGly: thành phần giống môi trường MYTGlut nhưng thay glucose bằng 10 g/l glycerol.

MYTLac: thành phần giống môi trường MYTGlut nhưng thay glucose bằng 10 g/l lactose.

Dung dịch vi lượng

Một lít dung dịch vi lượng bao gồm: 0,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 16,7 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,18 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,16 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,11 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,18 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 20,1 g Na-EDTA.

Phương pháp

Lên men sản xuất protein tái tổ hợp

Quy trình lên men chủng *E. coli* tái tổ hợp được tối ưu từng bước trong hệ thống lên men Greta. Môi trường sử dụng để tối ưu là các môi trường trên. Trước khi nuôi cấy, bổ sung 3 ml dung dịch vi lượng vào 1 lít môi trường trong bình lên men. Các điều kiện nuôi cấy chủng tái tổ hợp: nhiệt độ nuôi ban đầu 37°C, nhiệt độ cam ứng 28 – 30°C, pH 6, tốc độ dòng khí 0,5-1 vvm; áp suất 0,1 bar; tốc độ khuấy 500-1500 v/p để kiểm soát giá trị DOT trong khoảng 20-30%. Nồng độ IPTG cảm ứng là 0,05 mM. Cứ sau 1 h, tiến hành thu mẫu một lần để phân tích tốc độ sinh trưởng thông qua giá trị OD_{600} và sự tổng hợp protein tái tổ hợp pha tan, pha không tan trên gel SDS-PAGE.

Định lượng protein tái tổ hợp

Hàm lượng protein được xác định sơ bộ bằng máy VersaDoc Imaging system Model 4000 (Bio-Rad, USA) dựa trên hàm lượng protein chuẩn và được phân tích bằng phần mềm Quantity One, Version 4.6.1 (Bio-Rad, USA). Hàm lượng chính xác được xác định bằng bộ kit S. Tag Rapid Assay Kit (Novagen, USA) (Đỗ Thị Huyền *et al.*, 2008).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Việc tìm môi trường thích hợp cho chủng tái tổ hợp khi nuôi cấy trong nồi lên men là rất cần thiết. Mục đích của công việc này nhằm thu được lượng lớn protein có hoạt tính sinh học cao, ổn định, năng cao sản lượng protein ngoại lai và tiết kiệm được chi phí.

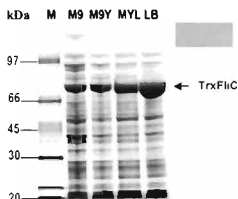
Môi trường lên men

Kết quả cho thấy, khi nuôi cấy trong môi trường M9, chủng tái tổ hợp sinh trưởng rất chậm nhưng nếu sử dụng môi trường M9 có thêm cao nấm men (M9Y) hoặc M9 thêm cao nấm men và đường lactose (MYL) thì chủng phát triển rất nhanh. Chủng tảo nguồn nitrogen là muối vô cơ không thích hợp hoặc không đủ để chủng sinh trưởng. Ngược lại, để chủng sinh trưởng tốt, nguồn nitrogen là cao nấm men có vẻ thích hợp hơn muối vô cơ. Tuy nhiên, sau 5 h nuôi cấy, chủng trong các môi trường M9Y và MYL không còn sinh trưởng dẫn đến OD_{600} giảm (Bảng 1). Trong khi đó, nếu nuôi chủng trong môi trường LB, mặc dù chủng sinh trưởng không mạnh, sinh khối chỉ bằng một nửa sinh khối thu được từ môi trường MYL và M9Y nhưng protein tái tổ hợp

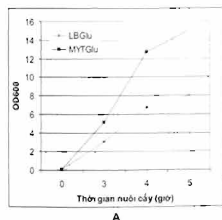
TrxFliC được sinh ra lai nhiều hơn cả (Hình 1). Điều đó chứng tỏ chủng *E. coli* tái tổ hợp cần nguồn carbon và nitrogen hữu cơ để sinh tổng hợp protein tái tổ hợp.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng của chủng tái tổ hợp trong các môi trường khác nhau (OD₆₀₀).

Thời gian sau cảm ứng (h)	M9	M9Y	MYL	LB
0	0,6	0,6	0,8	0,6
1	0,8	1,4	1,3	1,2
2	1	3,2	1,9	1,6
3	1,3	4,4	2,7	2,1
4	1,7	8,6	6,7	2,5
5	1,9	7,1	5,9	2,9
6	2,1	3,9	5,7	3,2

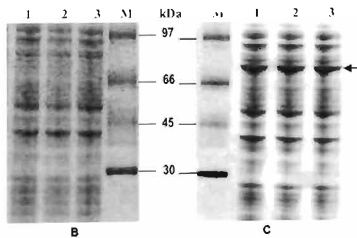


Hình 1. TrxFliC được tổng hợp ở các môi trường nuôi cấy khác nhau sau 5 giờ cảm ứng.



A

Hình 2. Ảnh hưởng của muối trong môi trường M9 lên khả năng sinh trưởng và tổng hợp TrxFliC. **A** Sự sinh trưởng của chủng trong môi trường LBGlucose, MYTGlucose. **B** Protein pha tan của chủng sinh TrxFliC được nuôi cấy trong môi trường LBGlucose. **C** Protein pha tan của chủng sinh TrxFliC được nuôi cấy trong môi trường MYTGlucose. M: Thang protein chuẩn 1-3. Mẫu được thu ở thời điểm 3, 4, 5 giờ sau khi cảm ứng. Mũi tên chỉ vị trí của TrxFliC.



B

C

Vi IPTG là một hóa chất đắt tiền nên trong công trình này nguồn carbon là lactose đã được thử sử dụng thay thế cho chất cảm ứng (Donovan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007). Tuy nhiên, kết quả hình 1 cho thấy, khi thay lactose làm chất cảm ứng biểu hiện, TrxFliC được sinh ra ít hơn nhiều so với việc sử dụng IPTG làm chất cảm ứng trong môi trường LB. Mặt khác, vì lượng IPTG cần để cảm ứng trong chủng tái tổ hợp ở nồng độ rất thấp (0,05 mM) nên việc sử dụng IPTG vẫn có thể chấp nhận được.

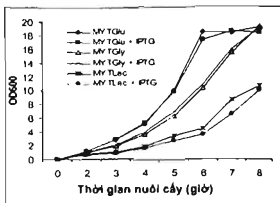
Muối vô cơ trong môi trường M9

Muối trong môi trường M9 có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh tổng hợp TrxFliC. Điều này đã được chứng minh khi nuôi cấy chủng tái tổ hợp trong hai môi trường LBGlucose và MYTGlucose có bổ sung chất cảm ứng IPTG. Chủng sinh trưởng rất mạnh trong môi trường MYTGlucose có chứa muối của môi trường M9 và nguồn cao nấm men, peptone tương tự như môi trường LB. Trong môi trường này sinh khối tế bào đạt gần gấp đôi so với môi trường LBGlucose (Hình 2A) và lượng protein TrxFliC được tổng hợp nhiều hơn hẳn (tính trên cùng một lượng tế bào). Chứng tỏ, muối trong môi trường M9 rất cần thiết cho sự sinh trưởng của chủng và tổng hợp protein ngoại lai. Ở những khảo sát trước đây, gần như 100% protein TrxFliC được biểu hiện dưới dạng tan khi nuôi cấy sinh tổng hợp protein tái tổ hợp ở 28°C (Đỗ Thị Huyền *et al.*, 2008). Vì thế, trong nghiên cứu này, lượng TrxFliC pha tan có thể đại diện được cho lượng TrxFliC được tổng hợp ra trong quá trình nuôi cấy. Kết quả trong nghiên cứu này cũng đã chứng minh glucose không phải là nguồn carbon thích hợp cho chủng mang gen *fliC* sinh tổng hợp TrxFliC (Hình 2B, C).

Lựa chọn nguồn carbon, chất cảm ứng lên sản lượng TrxFliC

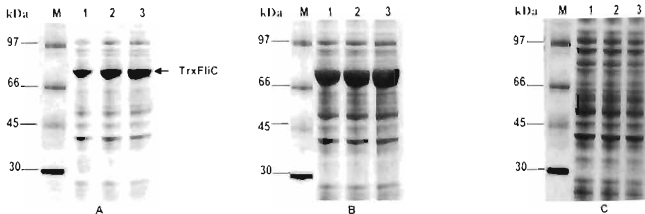
Để lựa chọn được nguồn carbon thích hợp cho sinh tổng hợp TrxFliC, chúng tôi tổ hợp đã được nuôi trong các môi trường MYTGlu, MYTGly và môi trường MYTLac. Song song với thí nghiệm trên, sự ảnh hưởng của chất cảm ứng IPTG lên khả năng sinh trưởng của chúng cũng đã được kiểm tra vì trong quy mô bình tam giác, IPTG có ảnh hưởng rất mạnh, làm giảm khả năng sinh trưởng của chúng (Đỗ Thị Huyền *et al.*, 2008).

Kết quả thu được trên hình 3 chỉ ra rằng, nguồn carbon có ảnh hưởng rất lớn đến sự sinh trưởng của chúng. So sánh mật độ tế bào đạt được ở các môi trường, tốc độ sinh trưởng của tế bào cao nhất và đạt tới pha cân bằng sớm nhất ở môi trường MYTGlu (sau khoảng 6 h nuôi cấy) tiếp theo là ở môi trường MYTGly và MYTLac. Tuy nhiên sinh khối cao nhất thu được từ môi trường MYTGlu và MYTGly là như nhau. Trong môi trường MYTLac, mật độ tế bào chỉ đạt bằng một nửa mật độ tế bào được nuôi cấy trong nguồn carbon là glucose hoặc glycerol.



Hình 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon, chất cảm ứng lên khả năng sinh trưởng của chủng sinh TrxFliC

Tuy nhiên, lượng protein tái tổ hợp TrxFliC được sinh ra khi lên men chúng trong môi trường MYTGlu chỉ bằng 1/3 so với khi lên men ở môi trường MYTGly (Hình 4A, B) mặc dù ở môi trường MYTGly, tốc độ sinh trưởng của chúng thấp hơn (sau 8 h sinh khối tế bào mới đạt bằng sinh khối tế bào của chúng sinh trưởng trong glucose lúc 6 h).



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên khả năng sinh tổng hợp TrxFliC. A: Protein pha tan được tạo ra ở môi trường MYTGlu. B: Protein pha tan được tạo ra ở môi trường MYTGly. C: Protein pha tan được tạo ra ở môi trường MYTLac. M: Thang protein chuẩn. 1-3: Mẫu được thu ở thời điểm 3, 4, 5 h sau khi cảm ứng.

Thông thường, glucose là nguồn carbon rất được ưa chuộng để sinh tổng hợp protein ngoại lai khi lên men chúng *E. coli* tái tổ hợp (Zhou *et al.*, 1999). Tuy nhiên, cũng có công trình nghiên cứu đã thành công trong việc tổng hợp lượng lớn protein tái tổ hợp từ chủng *E. coli* sử dụng glycerol làm nguồn carbon. Việc sử dụng glycerol có thể giảm lượng sản phẩm phụ sinh ra trong quá trình lên men. Đồng thời, glycerol còn làm tăng sinh mạnh AMP vòng. Nhờ

đó, promoter lac được cảm ứng tốt hơn nhiều để sinh tổng hợp protein ngoại lai (Kim *et al.*, 2007). Sau khi nuôi cấy chúng tái tổ hợp trong điều kiện tối ưu, lượng TrxFliC thu được đạt khoảng 1,3 mg/lít môi trường nuôi cấy.

Trong thí nghiệm này, chất cảm ứng IPTG dường như không còn ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chúng. Điều này có thể lý giải là do sinh khối tế bào đã đủ lớn tại thời điểm cảm ứng.

KẾT LUẬN

Trồng bình lên men 1 lit, chủng *E. coli* tái tổ hợp sinh tổng hợp TrxFliC với hàm lượng cao nhất đạt 1,3 g/lit môi trường khi được nuôi cấy cầm ứng ở 28-30°C trong môi trường LB có thêm muối của môi trường M9 và nguồn carbon glycerol, pH 6.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện bằng kinh phí dự án hợp tác giữa Việt Nam-Thụy Điển "Nghiên cứu sản xuất các protein tái tổ hợp sử dụng trong Nông nghiệp và Y dược".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chanter N, Jackson K, Pugh C, Sheehan B (2006) Vaccination of laying chickens with an inactivated *Salmonella* vaccine reduces *Salmonella* growth in eggs. Poster. 135 International Symposium *Salmonella* and *Salmonellosis*, 10-12 May 2006, St Malo, France

Cuadros C, Lopez-Hernandez FJ, Dominguez AL, McClelland M, Lustgarten J (2004) Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infect Immun* 72(5): 2810-6.

Đỗ Thị Huyền, Lê Quỳnh Giang, Văn Thị Như Ngọc, Tô Long Thành, Trương Nam Hải (2008) Flagellin FliC của *Salmonella* Enterica serovar Typhimurium được biểu hiện tốt trong *Escherichia coli* BL21 dưới dạng dung hợp với thioredoxin. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 46(2): 49-57.

Donovan RS, Robinson CW, Glick BR (2000) Optimizing the expression of a monoclonal antibody fragment under

the transcriptional control of the *Escherichia coli* lac promoter. *Can J Microbiol* 46: 532-41

Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, Renshaw M, Sambhara S, Katz JM (2002) DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis* 8: 796-801.

Kim M, Elvin C, Brownlee A, Lyons R (2007) High yield expression of recombinant pro-resilin: lactose-induced fermentation in *E. coli* and facile purification. *Protein Expr Purif* 52(1):230-36.

McSorley SJ, Cookson BT, Jenkins MK (2000) Characterization of CD4⁺ T cell responses during natural infection with *Salmonella typhimurium*. *J Immunol* 164: 986-93.

Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 12: 509-17

Sano G, Takada Y, Goto S, Maruyama K, Shindo Y, Oka K, Matsui H, Matsuo K (2007) Flagella facilitate escape of *Salmonella* from oncotic macrophages. *J Bacteriol* 189: 8224-32.

Toyota-Hanatan Y, Kyoumoto Y, Baba E, Ekawa T, Ohta H, Tani H, Sasai K (2009) Importance of subunit vaccine antigen of major FliC antigenic site of *Salmonella* Enteritidis J1: A challenge trial. *Vaccine* 27:1680-84.

Zhou D, Hardt WD, Galan JE (1999) *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* 67: 1974-81.

SELECTION OF MEDIA FOR INCREASING THE YIELD OF RECOMBINANT *SALMONELLA* TYPHIMURIUM FLIC FLAGELLIN IN *ESCHERICHIA COLI* STRAIN

Do Thi Huyen¹, Le Quynh Giang¹, Sven-Olof Enfors², Trương Nam Hải^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Royal Institute of Technology, Sweden

SUMMARY

Flagellin FliC of *Salmonella* Typhimurium is an important antigen which is able to stimulate immune response in both innate and adaptive immunes to help animals against the bacterium. Moreover, the anti-flagellin antibody in vaccinated chickens was identified to be transmitted into eggs for protecting the newly hatched chickens from *Salmonella*. Thus, the gene coding for *S. Typhimurium* FliC was expressed in *E. coli* in previous study to investigate feasibility of the recombinant protein for *Salmonella* vaccine development. Protein FliC in this study was produced in fusion form with Thioredoxin thus it was designated TrxFliC. In TrxFliC production process, culture media took important role in cell-biomass of the recombinant *E. coli* BL21 as well as TrxFliC productivity. Among the investigated media: M9, M9Y, MYL and LB, the yield of TrxFliC in LB medium was much higher than in the others. Supplement of salts in M9 and glucose into LB medium

* Author for correspondence: Tel: +84-4-37560339; E-mail: tnhai@ibt.ac.vn

resulted in nearly double of cell-biomass and significantly higher TrxFliC productivity than in LB medium. Further more, carbon sources also profoundly influenced on the growth and production of TrxFliC of the recombinant strain. Although glucose was identified as the most suitable carbon source for the *E. coli* strain growth, but was not good for resulting in high yield of TrxFliC. Using glycerol instead of glucose in LB medium supplemented with the salts of M9 resulted in lower specific growth rate of the recombinant strain (after 8 hours of cultivation, cell-biomass reached by the cell-biomass of the strain grown in medium containing glucose as carbon source at 6 hours) but TrxFliC productivity was much higher, approximately 3 folds. In the selected medium, 1.3 g TrxFliC from 1 l culture was harvested.

Keywords: *E. coli* BL21, fliC, *S. Typhimurium*, TrxFliC, vaccine