

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.091

TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH TIỂU PHẦN THỤ THỂ TÁI TỔ HỢP SCARB2 CỦA ENTEROVIRUS A71 DUNG HỢP FOLDON PEPTIDE

Từ Quảng Long, Võ Nguyễn Hải Vy, Nguyễn Thanh Tấn và Trần Văn Hiếu*

Phòng thí nghiệm Cảm biến Sinh học, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Văn Hiếu (email: tvhieus@hcmus.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 09/06/2022

Ngày duyệt đăng: 20/06/2022

Title:

Cloning, expression, and purification of recombinant SCARB2 subunit receptor of enterovirus A71 fused with foldon peptide

Từ khóa:

Bẫy virus, Enterovirus A71, foldon peptide, SCARB2

Keywords:

Enterovirus A71, foldon peptide, SCARB2, virus trap

ABSTRACT

Enterovirus A71 (EV-A71) is one of the most popular causative agents of Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD), also the main factor causing several severe symptoms, which can lead to children's death. Up to now, vaccines and antiviral compounds still have disadvantages and are not widely used. Therefore, finding other alternatives and supplemental solutions is necessary, and virus-trap turns out to be a valuable candidate. The main function of the trap is to capture viruses, thereby preventing the infection. To do this, the trap needs to be constructed by one of the EV-A71's binding receptors on human cells, and SCARB2 is the potential one. In this study, we cloned, expressed, and purified the recombinant SCARB2, which was fused with foldon peptide to structure the trimeric form with a highly viral-catching ability for virus trap. For the mentioned purposes, vector pET22b-scrb2-IIIx3 was constructed, and transformed into *E. coli* DH5 α . Protein SCRB2-IIIx3 was expressed in *E. coli* BL21(DE3), but in monomeric form, and mostly in inclusion bodies. After that, it was refolded and purified to soluble form which has biological activity. Those results supportably provide insightful information, which creates a premise for further research.

TÓM TẮT

Enterovirus A71 (EV-A71) là tác nhân chính gây nên biến chứng nguy hiểm của bệnh Tay Chân Miệng, có thể dẫn đến thương tật, và tử vong ở trẻ nhỏ. Hiện nay, vaccine và hợp chất điều trị EV-A71 còn nhiều hạn chế, chưa được áp dụng rộng rãi. Vì thế, nhiều nghiên cứu tìm giải pháp thay thế hoặc bổ trợ đang được tiến hành, trong đó có bẫy virus. Với chức năng chính là bắt, cố định virus, ngăn sự xâm nhiễm, thể bám của bẫy cấu trúc từ thụ thể liên kết EV-A71, cụ thể là SCARB2. Trong nghiên cứu này, tiểu phần thụ thể tái tổ hợp SCARB2 dung hợp foldon peptide được dòng hóa, biểu hiện, và tinh sạch nhằm tạo thể bám ở dạng trimer hóa có ái lực cao với virus. Vector pET22b-scrb2-IIIx3 được cấu trúc trong *E. coli* DH5 α , protein được biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3), và chỉ thu được cấu hình monomer, phân lớn ở dạng thể vùi. Việc tái gấp cuộn và tinh sạch protein được tiến hành nhằm đưa protein trở về dạng tan có hoạt tính sinh học. Những kết quả trên cung cấp thêm nhiều thông tin cần thiết, tạo tiền đề cho việc cấu trúc bẫy virus sau này.

1. GIỚI THIỆU

Tay Chân Miệng (TCM) là bệnh truyền nhiễm ở người, gây ra chủ yếu bởi các virus thuộc họ Picornavirus, thường là bởi loài Enterovirus A ở người, phổ biến nhất là Enterovirus A71 (EV-A71), và Coxsackievirus A16 (CV-A16) (Ventarola et al., 2015). Đối tượng chính của bệnh là trẻ em, đặc biệt là trẻ sơ sinh và trẻ dưới năm tuổi. Bệnh TCM gây ra các triệu chứng bao gồm sốt, đau họng, nổi mụn nước quanh các khu vực như lòng bàn tay, lòng bàn chân, niêm mạc miệng, đầu gối hoặc mông. Một số ghi nhận dịch tễ ở những nơi bùng phát dịch cho thấy tỉ lệ bệnh gây ra bởi CV-A16 phổ biến nhất trong tất cả các chủng, và tỉ lệ bệnh gây ra bởi EV-A71 ở mức khá cao. Tuy nhiên, CV-A16 và các chủng virus khác EV-A71 thường gây ra triệu chứng nhẹ, ít biến chứng nghiêm trọng. Trong khi đó, EV-A71 được xác định là tác nhân gây ra một loạt các tác động từ nhiễm trùng không có triệu chứng, bệnh TCM nhẹ đến rất nặng và tử vong ở trẻ nhỏ (Suzuki et al., 2010; Mao et al., 2014)

Đã có nhiều đợt bùng phát dịch TCM lớn, ảnh hưởng đến hàng triệu trẻ em, đặc biệt ở khu vực Châu Á-Thái Bình Dương. Tại Việt Nam đã có hai đợt bùng phát dịch TCM, một đợt dịch lớn vào năm 2011 với hơn 200.000 ca nhập viện khiến 169 trẻ em tử vong, và gần đây hơn vào năm 2018 với hơn 130.000 ca bệnh và 17 trẻ em tử vong (Nhan et al., 2018). Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra, TCM là bệnh không có thuốc đặc trị hiệu quả được chứng minh lâm sàng, việc phát triển vaccine vẫn đang được tiến hành và còn nhiều mặt hạn chế (Shang et al., 2013; Reed & Cardoso, 2016), và chưa có công bố nào mới ở thời điểm hiện tại. Do đó, việc nghiên cứu các biện pháp mới ngăn chặn sự xâm nhiễm của EV-A71 là một phương án có triển vọng cao, nhằm phòng ngừa các biến chứng nguy hiểm của bệnh TCM, góp phần làm giảm tính nghiêm trọng của tình hình dịch bệnh trên thế giới.

EV-A71 thuộc họ Picornavirus, chi Enterovirus, loài Enterovirus A, thuộc nhóm virus trần, không có màng bao bọc. Vỏ virus cấu tạo từ bốn loại protein chính là VP1-VP4. Trên tiểu phần VP1 có một rãnh lõm gọi là “canyon”, đây là nơi chứa các vị trí liên kết của virus với thụ thể ở người để bắt đầu quá trình xâm nhiễm (Yip et al., 2013; Huang et al., 2019). Đã có nhiều nghiên cứu xoay quanh EV-A71 và con đường xâm nhiễm của nó, từ đó cung cấp một lượng lớn thông tin đáng giá nhằm phát triển các biện pháp phòng ngừa hữu hiệu. Trong số đó, chiến lược sử dụng bẫy virus ở dạng uống là một hướng tiếp cận ít phổ biến đang được nghiên cứu để trở thành giải

pháp hỗ trợ hoặc thay thế hữu hiệu. Cơ chế phổ biến của bẫy là giúp bắt giữ và ngăn cản quá trình xâm nhiễm, sinh sản, và phát triển của virus trước khi nó xâm nhập vào tế bào người. Để thực hiện chức năng đó, thể bám là cấu trúc cần thiết, được cấu tạo từ các loại thụ thể tái tổ hợp của chính virus, có khả năng bắt và cố định virus trên bề mặt bẫy. Các thụ thể điển hình cho EV-A71 rất đa dạng, trong đó bao gồm SCARB2, PSGL-1, annexin A2 (Anx2), heparan sulfate, sialylated glycan, nucleolin, ... (Kobayashi & Koike, 2020). Trong số đó, SCARB2 được lựa chọn làm thụ thể mục tiêu tiềm năng để cấu trúc bẫy trong nghiên cứu này. Đây là thụ thể nội bào hóa chính có ý nghĩa sinh học quan trọng đối với EV-A71, và khác với các thụ thể còn lại, tương tác giữa nó với EV-A71 đã được tìm hiểu rõ ràng. Nó còn là thụ thể chung cho tất cả các chủng EV-A71 đã được phân lập, và kể cả CV-A16 (Lin et al., 2012; Yamayoshi et al., 2012; Dang et al., 2014). Tuy nhiên, SCARB2 vẫn mang một số hạn chế là chỉ có vùng tiểu phần domain III của thụ thể là vùng liên kết với virus, mà ái lực của nó lại không quá cao (Yamayoshi et al., 2013). Điều này dẫn đến hiệu quả bắt virus của bẫy bị giảm khi chọn cấu trúc thể bám bằng toàn bộ thụ thể, và virus vẫn có thể xâm nhiễm vào tế bào qua các thụ thể khác có ái lực cao hơn (PSGL-1).

Để khắc phục tình trạng trên, việc tạo ra các thể trimer domain III của thụ thể SCARB2 được mong đợi có thể giải quyết vấn đề. Việc sử dụng một tiểu phần bám virus của thụ thể được đánh giá là có khả năng giảm kích thước của thể bám, giảm sự công kênh, và tăng số lượng vùng bắt virus. Không chỉ vậy, việc tạo ra các tiểu phần trimer còn được dự đoán là có thể gia tăng hoạt tính sinh học của bẫy nhờ tập trung ái lực của nhiều vùng liên kết tại một vị trí (Tai et al., 2016). Trong đó, foldon peptide là một trong những phương pháp tạo thể trimer tiềm năng được ứng dụng trong nghiên cứu này. Foldon là một đoạn trimer nhỏ bao gồm 27 tiểu đơn vị β sắp xếp như hình cánh quạt, bao gồm các đoạn kẹp tóc đơn β được xác định ở đầu C của fibritin bacteriophage T4. Với các đặc tính nhỏ gọn, dễ dàng thiết kế, tái cấu trúc bằng cách dung hợp gene, vùng này có thể được cấu trúc nhân tạo với các protein đích để tạo ra thể trimer protein (Meier et al., 2004). Thể trimer protein S (Kháng nguyên của SAR-CoV-2) đã được tạo thành công, và khả năng gia tăng đáp ứng miễn dịch của nó trong vaccine cũng đã được đánh giá, là một dẫn chứng thuyết phục về tiềm năng ứng dụng của phương pháp này (Li et al., 2013). Trong nghiên cứu này, tiểu phần domain III của thụ

thể SCARB2 được tổng dung hợp với foldon peptide để cấu trúc nên thể trimer domain III.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Chủng vi khuẩn, plasmid, và điều kiện nuôi cấy

Đoạn gene *scrb2-IIIx3* có kích thước 334 bp được khuếch đại từ khuôn G-block, và cắt nối chung với plasmid pET22b để tạo nên vector tái tổ hợp. *E. coli* DH5 α và *E. coli* BL21(DE3) lần lượt được sử dụng làm chủng chủ để tạo dòng và biểu hiện protein. Môi trường nuôi cấy sử dụng cho cả hai chủng đều là Luria – Bertani (LB) chứa 100 μ g/mL ampicillin ở 37°C. Sự biểu hiện protein được kiểm soát bởi T7 promoter trên pET22b thông qua việc bổ sung chất cảm ứng IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside) (Biobasic).

2.2. Cấu trúc vector pET22b-*scrb2-IIIx3*

Gene *scrb2-IIIx3* được khuếch đại từ khuôn G-block bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu. Sau khi thu nhận, gene mục tiêu được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%, và xử lý chung với plasmid pET22b bằng cặp enzyme cắt giới hạn là *NdeI* và *XhoI* để tạo đầu dính, theo quy trình công bố của nhóm nghiên cứu (Mai et al., 2022). Gene và plasmid sau khi cắt được nối lại với nhau nhờ T4 ligase và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Thể biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường LB-amp, các khuẩn lạc mọc được rĩa ra đĩa LB-amp mới và ủ ở 37°C trong 16 giờ. Thu sinh khối mọc từ từng khuẩn lạc đơn vào ống PCR 0,2 ml, tiến hành sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi T7 ter/T7pro. Sản phẩm PCR cho vạch khoảng 500 bp, từ đó có thể khẳng định vector pET22b-*scrb2-IIIx3* đã được cấu trúc và tạo dòng thành công.

2.3. Biểu hiện protein SCRB2-IIIx3

Vector pET22b-*scrb2-IIIx3* sau khi cấu trúc thành công được thu nhận và biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện theo quy trình của Seidmoradei với một số điều chỉnh (Vo-Nguyen et al., 2021). Các khuẩn lạc *E. coli* BL21(DE3) sau khi được xác nhận mang vector, được hoạt hóa trong môi trường LB-amp lỏng và nuôi cấy lắc ở 37°C trong 16 giờ. Các mẫu sau đó được cấy chuyển với tỉ lệ 1:10 (v/v) và lắc ở 37°C cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,8–1,0. Tại thời điểm này, cảm ứng IPTG được bổ sung ở nồng độ cuối là 0,5 mM, protein được biểu hiện trong 4 tiếng ở điều kiện lắc 37°C. Tế bào được phá ở điều kiện lạnh bằng sóng siêu âm trong dung

dịch đệm PBS 1X để thu được protein ở pha tổng, pha tan, và pha tủa. Sự biểu hiện của protein tái tổ hợp được kiểm tra bằng điện di Tricine SDS-PAGE và nhuộm Coomassie Brilliant Blue, sau đó protein mục tiêu được xác nhận bằng Western blot với kháng thể kháng đuôi polyHis và hiện màu bằng cơ chất 3,3',5,5'-tetra methyl benzidine (TMB).

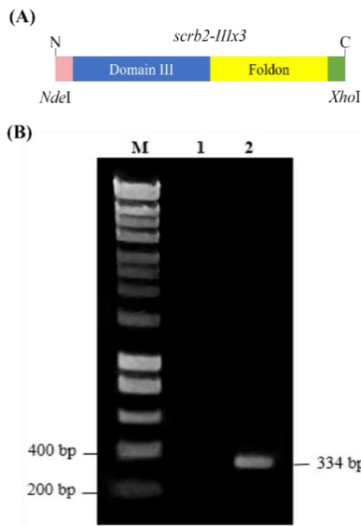
2.4. Tái gấp cuộn và tinh sạch protein SCRB2-IIIx3

Việc tái gấp cuộn protein SCRB2-IIIx3 được thực hiện như mô tả với một số điều chỉnh (Vo-Nguyen et al., 2021). Dịch môi trường nuôi vi khuẩn *E. coli* BL21(DE3) mang vector pET22b-*scrb2-IIIx3* sau khi được cảm ứng biểu hiện, tiến hành phá bằng sóng siêu âm ở điều kiện lạnh trong dung dịch đệm ly giải (20 mM Tris – HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 5 mM EDTA) với tỉ lệ sinh khối thu từ 50 ml dịch canh khuẩn hòa với 20 ml dịch ly giải. Thể vùi tươi được thu bằng cách ly tâm dịch phá tế bào ở tốc độ 13.000 rpm trong 20 phút, sau đó huyền phù phần tủa với 20 ml dịch rửa Triton X-100 (20 mM Tris – HCl pH 8,0, 1% Triton X-100), tiếp tục ly tâm thu cạn và rửa lại 5 lần, sau đó rửa lại trong 20 ml dịch rửa không Triton (20 mM Tris – HCl pH 8,0). Phần cạn thu được sau khi ly tâm dịch sau rửa được huyền phù trong 5 ml dịch hòa tan (20 mM Tris – HCl pH 8,0, 4 M Gu-HCl), được khuấy kỹ bằng máy khuấy từ trong một giờ ở 4°C. Dịch đã khuấy được thu nhận, ly tâm 13.000 rpm trong 10 phút, loại bỏ dịch nổi, thu lấy phần tủa. Hòa phần tủa thu được trong 5 ml dung dịch tái gấp cuộn (20 mM Tris – HCl pH 8,0, 2 M Urea, 10% Sucrose, 0,1% Tween 80), khuấy kỹ hỗn hợp ở 4°C trong 14 giờ. Sau đó, dịch nổi được thu bao gồm thể vùi được hòa tan bằng ly tâm ở tốc độ 13000 rpm trong 10 phút, loại bỏ cạn không hòa tan. Protein SCARB2-IIIx3 ở dạng mạch thẳng trong dịch hòa tan được tái gấp cuộn nhờ thẩm tách chậm trong PBS 1X ở 4°C trong 16 giờ. Phương pháp điện di Tricine SDS-PAGE và nhuộm bac được sử dụng để kiểm tra kết quả tái gấp cuộn.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cấu trúc và tạo dòng vector tái tổ hợp pET22b-*scrb2-IIIx3*

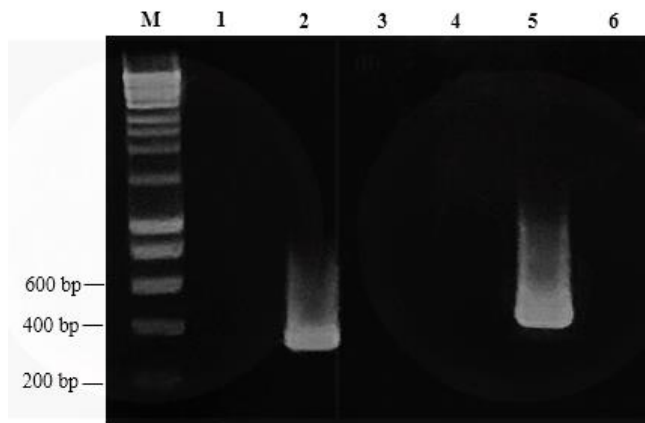
Gene *scrb2-IIIx3* được khuếch đại từ khuôn G-Block bằng cách sử dụng cặp mồi đặc hiệu (725F, 726R). Chiều dài của sản phẩm khuếch đại có kích thước khoảng 334 bp, trong đó bao gồm vùng trình tự mã hóa cho domain III của thụ thể SCARB2 dung hợp với foldon peptide ở đầu C (Hình 1).



Hình 1. Cấu trúc gene *scrb2-IIIx3* (A), kết quả PCR thu nhận gene *scrb2-IIIx3* và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% (B)

M, thang 1 kb; 1, chứng âm; 2, gene *scrb2-IIIx3*

Dưới điều kiện PCR được thực hiện trong nghiên cứu, gene *scarb2-IIIx3* đã được thu nhận thành công (Hình 5B), sau đó gene mục tiêu được tinh sạch bằng phương pháp tủa cồn, xử lý với cặp enzyme *NdeI* và *XhoI*, tiếp theo nối vào pET22b và dòng hóa trong *E. coli* DH5 α . Các khuẩn lạc *E. coli* mọc trên môi trường LB-amp sẽ có cấu hình tròn, lồi, bóng, màu trắng ngà, và được PCR để xác nhận mang vector pET22b-*scarb2-IIIx3* với cặp mồi chéo đặc hiệu trên gene (726R) và mồi trên plasmid (T7-pro). Kết quả điện di cho thấy thu nhận được vạch sản phẩm có kích thước khoảng 424 bp phù hợp với kích thước thiết kế, từ đó có thể kết luận gene *scarb2-IIIx3* đã được tạo dòng thành công và đúng chiều mã hóa vào plasmid pET22b (Hình 2, giếng 5). Chứng âm là tế bào *E. coli* DH5 α biến nạp pET22b được thực hiện đồng thời, không xuất hiện vạch sáng, chứng tỏ kết quả không phải dương tính giả và plasmid pET22b ban đầu không mang gene mục tiêu (Hình 2, giếng 1). Chứng dương là plasmid pET22b được PCR với cặp mồi T7-pro/T7-ter, cho vạch sáng khoảng 300bp. Cho thấy phản ứng PCR diễn ra bình thường (Hình 2, giếng 2).



Hình 2. Kết quả PCR sàng lọc thể biến nạp *E. coli* DH5 α /pET22b-*scrb2-IIIx3* và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%

M, thang 1 kb; 1, chứng âm; 2, pET22b/T7pro-T7ter; 3-6, các khuẩn lạc dự tuyển/T7pro-726R

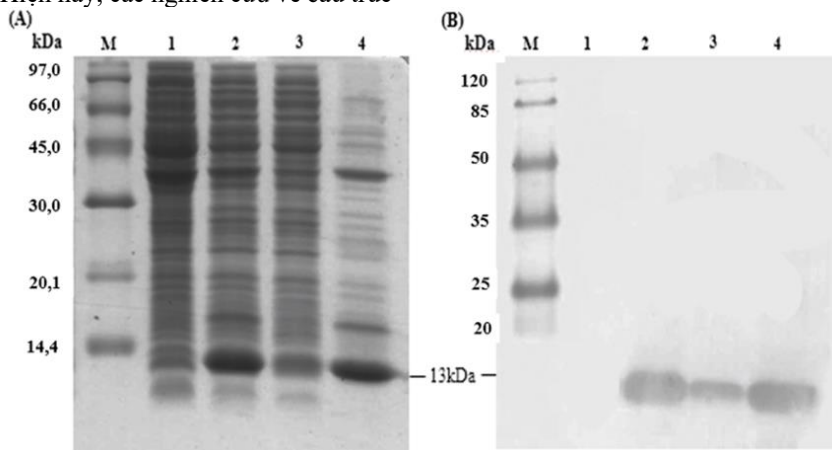
3.2. Biểu hiện protein tái tổ hợp SCARB2-IIIx3

Vector pET22b-*scrb2-IIIx3* được thu nhận và biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3). Các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp được xác nhận bằng PCR, sau đó được hoạt hóa và cảm ứng với IPTG để biểu hiện protein tái tổ hợp. Tế bào *E. coli* sau cảm ứng được ly giải, thu nhận protein, kiểm tra biểu hiện bằng điện di Tricine SDS-PAGE và nhuộm với Coomassie Blue. Từ kết quả phân tách trên gel cho thấy, có sự biểu hiện vượt mức của một dải protein

ở vị trí khoảng 13 kDa, đúng với kích thước được dự đoán của protein SCARB2-IIIx3 ở dạng monomer. Ở giếng chứng âm là *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*scrb2-IIIx3* không cảm ứng với IPTG, không xuất hiện vạch biểu hiện vượt mức, chứng tỏ không có sự rò rỉ biểu hiện (Hình 3A). SCARB2-IIIx3 được dung hợp với đuôi polyHis trên vector pET22b, nhờ đó có thể được phát hiện bằng kháng thể kháng đuôi polyHis, và dễ dàng được xác định so với protein của *E. coli*. Kết quả Western Blot thu nhận được khi hiện hình bằng cơ chất tạo màu 3,3',5,5'-tetra methyl benzidine

(TMB), có sự xuất hiện các vạch protein ở các vị trí tương ứng với kết quả Tricine SDS-PAGE (Hình 3B). Từ đó, có thể kết luận protein SCARB2-IIIx3 ở dạng monomer đã được biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*scrb2-IIIx3*. Mặc khác, việc dung hợp với đuôi foldon peptide làm cho protein SCARB2-IIIx3 có thể liên kết với nhau bằng các cụm cầu nối hydro, và tồn tại ở hai dạng cấu hình là monomer (13 kDa) và trimer (39 kDa). Kết quả điện di cho thấy, protein mục tiêu chỉ biểu hiện ở dạng monomer. Điều này có thể được lý giải bằng một số nguyên nhân: do các foldon peptide liên kết với nhau bằng liên kết hydro nên rất dễ bị đứt gãy ở các điều kiện biến tính mạnh như SDS, DTT, và gia nhiệt ở 100°C. Hiện nay, các nghiên cứu về cấu trúc

trimer hóa protein bằng foldon chủ yếu được thực hiện trên các dòng tế bào động vật, với bước gấp cuộn protein có độ chính xác cao. Trong khi đó, mặc dù vẫn có nghiên cứu về trimer hóa bằng foldon với bộ máy của *E. coli* BL21(DE3) và pET22b, tuy nhiên lại không có sự dung hợp với đuôi polyHis ở đầu C. Chính vì vậy, việc dung hợp đuôi polyHis ngay sau foldon peptide (Hình 3) được nghi vấn có khả năng ảnh hưởng đến cấu trúc gấp cuộn và liên kết giữa các phiến β trong cấu trúc không gian của foldon, khi được biểu hiện bởi bộ máy *E. coli*, và những dự đoán này cần được khảo sát ở các thí nghiệm sau.



Hình 3. Kết quả kiểm tra biểu hiện protein SCARB2-IIIx3 bằng điện di Tricine SDS-PAGE (A) và khẳng định bằng Western blot với kháng thể kháng đuôi polyHis (B)

M, thang protein; 1, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*scrb2-IIIx3* (-IPTG); 2-4, *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*scrb2-IIIx3* (+IPTG); 2, pha tổng; 3, pha tan; 4, pha tủa

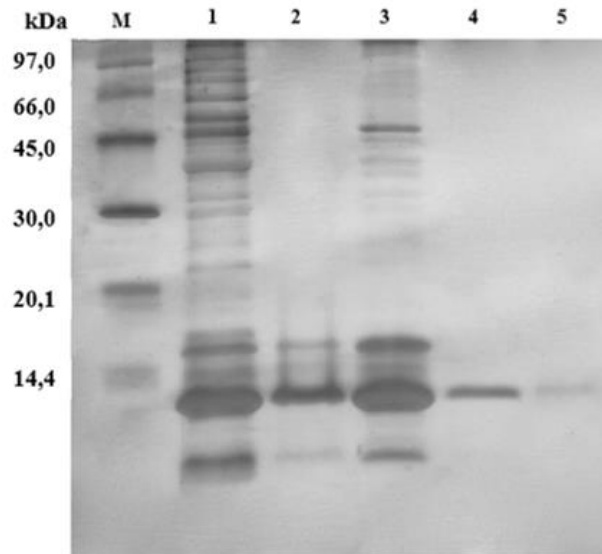
3.3. Tái gấp cuộn protein SCARB2-IIIx3

Tái gấp cuộn protein SCARB2-IIIx3 với kết quả biểu hiện trên, có thể nhận thấy protein SCARB2-IIIx3 ở dạng monomer biểu hiện mạnh ở pha tủa và ít ở pha tan (Hình 3A, giếng 3,4). Trong khi đó, SCARB2-IIIx3 được thiết kế với trình tự mã hóa cho tiểu phần domain III được dự đoán là không mang gốc đường, và không có cầu nối disulfide. Hơn thế nữa, ở điều kiện lắc 16°C, protein mục tiêu biểu hiện chủ yếu ở pha tan nhưng hiệu suất biểu hiện rất thấp, mặc dù vẫn có tủa nhưng lượng tủa khó phát hiện được. Có thể việc biểu hiện protein quá nhanh ở *E. coli* đã dẫn đến tình trạng gấp cuộn sai của protein mục tiêu và protein biểu hiện dưới dạng thể vùi không điển hình. Do đó, việc tái gấp cuộn, đưa protein tái tổ hợp về cấu hình tự nhiên, đúng cấu trúc liên kết, và có hoạt tính sinh học là điều cần phải thực hiện.

Kết quả kiểm tra tái gấp cuộn bằng điện di Tricine SDS-PAGE và nhuộm bạc cho thấy, sau bước hòa tan, đã thu được dịch protein ở dạng tan (Hình 4, giếng 2), trong đó có một vạch protein ngang với kích thước protein mục tiêu ở cấu hình monomer ở giếng thể vùi tươi (13 kDa), không xuất hiện cấu hình trimer (39 kDa). Tuy nhiên, lượng protein bị tủa lại khá nhiều (Hình 4, giếng 3), do đó, cần tiến hành khảo sát thêm các chất biến tính và nồng độ để giúp hỗ trợ hòa tan tủa tốt hơn. Thành phần Triton X100 trong quá trình rửa tủa đã giúp loại bỏ protein tạp từ *E. coli*, đồng thời protein mục tiêu được giữ ổn định nhờ sự có mặt của glycerol. Bên cạnh đó, sau bước tái gấp cuộn, ở phân đoạn dịch tan (Hình 4, giếng 4) chỉ có một vạch protein với kích thước 13 kDa, tương ứng với kích thước vạch mục tiêu, đồng thời không thấy xuất hiện vạch protein tạp, chứng tỏ protein SCARB2-IIIx3 sau quá trình tái gấp cuộn đã biểu hiện tan. Tuy nhiên, quá

trình tái gấp cuộn đã diễn ra không hoàn toàn do vẫn còn một lượng ít protein bị tủa lại (Hình 4, giếng 5). Quá trình tái gấp cuộn được tiến hành khi thâm tách chậm dịch hòa tan trong dung dịch muối PBS 1X, các chất biến tính protein được thay thế dần bởi muối đệm phosphate, nhờ đó các protein mục tiêu được gấp cuộn đúng và các protein tạp được loại bỏ. Từ đó, thu nhận được protein mục tiêu đã tinh sạch và không lẫn tạp. Tuy nhiên, phần lớn protein vẫn còn nằm trong phân đoạn tủa sau khi hòa tan và lượng protein mục tiêu hòa tan được còn ít cho thấy hiệu suất của quá trình tái gấp cuộn chưa được tối ưu. Mặc dù vậy, thể vùi protein SCARB2-IIIx3 đã được tái gấp cuộn thành công và thu nhận ở dạng tan, đồng thời protein thu nhận được tinh sạch, không lẫn các protein tạp khác. Tuy nhiên, cần phải thực hiện thêm một số đánh giá để kiểm tra, như

Western Blot để xác nhận lại protein mục tiêu, và những kỹ thuật nhằm đánh giá cấu trúc gấp cuộn đúng. Một đề xuất là sử dụng kỹ thuật quang phổ lưỡng sắc tròn (Circular Dichroism) để so sánh với mẫu chuẩn là SCARB2-IIIx3 ở pha tan, thu nhận từ mẫu biểu hiện ở 16°C do protein mục tiêu là thể vùi không điển hình (Clarke, 2011). Kết quả trên cũng cho thấy, trạng thái tan hoặc tủa của SCARB2-IIIx3 không ảnh hưởng đến việc kiểm tra cấu hình protein bằng điện di Tricine SDS PAGE, chính vì vậy có thể thêm các khảo sát về điện di không biến tính (Native PAGE) để chứng minh dạng trimer, mục tiêu của nghiên cứu. Dịch tan chứa protein SCARB2-IIIx3 sau đó được cô lại bằng amicon 10 kDa (Sigma) để làm nguồn nguyên liệu sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát sau này.



Hình 4. Kết quả tái gấp cuộn protein SCARB2-IIIx3 và phân tích bằng điện di Tricine SDS-PAGE

M, thang protein; 1, thể vùi tươi; 2, dịch sau hòa tan; 3, tủa sau hòa tan; 4, dịch tan sau gấp cuộn; 5, tủa sau tái gấp cuộn

4. KẾT LUẬN

Trong quá trình xâm nhiễm, tương tác giữa virus và các thụ thể của tế bào chủ giữ vai trò quan trọng, nên việc ngăn chặn hoặc can thiệp vào các tương tác có thể mang lại những ứng dụng tiềm năng. Do đó, các chiến lược sử dụng bẫy virus được dự đoán có khả năng ứng dụng với độ an toàn và hiệu quả cao. Trong nghiên cứu này, vector tái tổ hợp (pET22b-scrb2-IIIx3) mang gene mã hóa cho tiểu phần

domain III của thụ thể SCARB2 dung hợp với foldon peptide đã được cấu trúc thành công. Protein SCRB2-IIIx3 được biểu hiện trong bộ máy *E. coli* BL21(DE3) ở cấu hình monomer và dưới dạng thể vùi. Việc tái gấp cuộn đã được tiến hành nhằm đưa protein SCRB2-IIIx3 về trạng thái tan, đồng thời loại bỏ các protein tạp. Những kết quả trên hỗ trợ cung cấp nguồn thông tin quan trọng cho các nghiên cứu khảo sát dạng trimer hóa và đánh giá hoạt tính sinh học sau này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Clarke, D. T. (2011). Circular dichroism and its use in protein-folding studies. *Methods Mol Biol*, 752, 59-72. doi:10.1007/978-1-60327-223-0_5
- Dang, M., Wang, X., Wang, Q., Wang, Y., Lin, J., Sun, Y., Li, X., Zhang, L., Lou, Z., Wang, J., & Rao, Z. (2014). Molecular mechanism of SCARB2-mediated attachment and uncoating of EV71. *Protein Cell*, 5(9), 692-703. doi:10.1007/s13238-014-0087-3
- Huang, S. W., Cheng, D., & Wang, J. R. (2019). Enterovirus A71: virulence, antigenicity, and genetic evolution over the years. *J Biomed Sci*, 26(1), 81. doi:10.1186/s12929-019-0574-1
- Kobayashi, K., & Koike, S. (2020). Cellular receptors for enterovirus A71. *J Biomed Sci*, 27(1), 23. doi:10.1186/s12929-020-0615-9
- Li, J., Ulitzky, L., Silberstein, E., Taylor, D. R., & Viscidi, R. (2013). Immunogenicity and protection efficacy of monomeric and trimeric recombinant SARS coronavirus spike protein subunit vaccine candidates. *Viral Immunol*, 26(2), 126-132. doi:10.1089/vim.2012.0076
- Lin, Y. W., Lin, H. Y., Tsou, Y. L., Chitra, E., Hsiao, K. N., Shao, H. Y., Liu, C. C., Sia, C., Chong, P., & Chow, Y. H. (2012). Human SCARB2-mediated entry and endocytosis of EV71. *PLoS One*, 7(1), e30507. doi:10.1371/journal.pone.0030507
- Mai, Q.-G., Vo-Nguyen, H.-V., Tran, T. L., & Tran-Van, H. J. J. o. A. B. R. (2022). All-in-One Molecular Cloning as a New Gene Manipulation Method. 9(1), 511-515.
- Mao, Q., Wang, Y., Yao, X., Bian, L., Wu, X., Xu, M., & Liang, Z. (2014). Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine. *Hum Vaccin Immunother*, 10(2), 360-367. doi:10.4161/hv.27087
- Meier, S., Guthe, S., Kiefhaber, T., & Grzesiek, S. (2004). Foldon, the natural trimerization domain of T4 fibritin, dissociates into a monomeric A-state form containing a stable beta-hairpin: atomic details of trimer dissociation and local beta-hairpin stability from residual dipolar couplings. *J Mol Biol*, 344(4), 1051-1069. doi:10.1016/j.jmb.2004.09.079
- Nhan, L. N. T., Hong, N. T. T., Nhu, L. N. T., Nguyet, L. A., Ny, N. T. H., Thanh, T. T., Han, D. D. K., Van, H. M. T., Thwaites, C. L., Hien, T. T., Qui, P. T., Quang, P. V., Minh, N. N. Q., van Doorn, H. R., Khanh, T. H., Chau, N. V. V., Thwaites, G., Hung, N. T., & Tan, L. V. (2018). Severe enterovirus A71 associated hand, foot and mouth disease, Vietnam, 2018: preliminary report of an impending outbreak. *Euro Surveill*, 23(46). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.46.1800590
- Reed, Z., & Cardosa, M. J. (2016). Status of research and development of vaccines for enterovirus 71. *Vaccine*, 34(26), 2967-2970. doi:10.1016/j.vaccine.2016.02.077
- Shang, L., Xu, M., & Yin, Z. (2013). Antiviral drug discovery for the treatment of enterovirus 71 infections. *Antiviral Res*, 97(2), 183-194. doi:10.1016/j.antiviral.2012.12.005
- Suzuki, Y., Taya, K., Nakashima, K., Ohyama, T., Kobayashi, J. M., Ohkusa, Y., & Okabe, N. (2010). Risk factors for severe hand foot and mouth disease. *Pediatr Int*, 52(2), 203-207. doi:10.1111/j.1442-200X.2009.02937.x
- Tai, W., Zhao, G., Sun, S., Guo, Y., Wang, Y., Tao, X., Tseng, C. K., Li, F., Jiang, S., Du, L., & Zhou, Y. (2016). A recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV in trimeric form protects human dipeptidyl peptidase 4 (hDPP4) transgenic mice from MERS-CoV infection. *Virology*, 499, 375-382. doi:10.1016/j.virol.2016.10.005
- Ventarola, D., Bordone, L., & Silverberg, N. (2015). Update on hand-foot-and-mouth disease. *Clin Dermatol*, 33(3), 340-346. doi:10.1016/j.clindermatol.2014.12.011
- Vo-Nguyen, H. V., Nguyen, T. T., Vu, H. T., Nguyen, T. T., Hoang, Q. C., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). Recombinant Human SCARB2 Expressed in Escherichia coli and its Potential in Enterovirus 71 Blockage. *Iran J Sci Technol Trans A Sci*, 1-7. doi:10.1007/s40995-020-01025-9
- Yamayoshi, S., Fujii, K., & Koike, S. (2012). Scavenger receptor b2 as a receptor for hand, foot, and mouth disease and severe neurological diseases. *Front Microbiol*, 3, 32. doi:10.3389/fmicb.2012.00032
- Yamayoshi, S., Ohka, S., Fujii, K., & Koike, S. (2013). Functional comparison of SCARB2 and PSGL1 as receptors for enterovirus 71. *J Virol*, 87(6), 3335-3347. doi:10.1128/JVI.02070-12
- Yip, C. C., Lau, S. K., Lo, J. Y., Chan, K. H., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2013). Genetic characterization of EV71 isolates from 2004 to 2010 reveals predominance and persistent circulation of the newly proposed genotype D and recent emergence of a distinct lineage of subgenotype C2 in Hong Kong. *Virol J*, 10, 222. doi:10.1186/1743-422X-10-222