

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Đỗ Thị Thanh Trung

**NHÂN DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH TÍNH CHẤT
CỦA PEPTIDE DEFORMYLASE
TỪ VI KHUẨN *HELICOBACTER PYLORI***

Chuyên ngành: Hóa sinh học

Mã số: 9420101.16

(DỰ THẢO) TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội - 2020

**Công trình được hoàn thành tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên,
Đại học Quốc gia Hà Nội**

Người hướng dẫn khoa học:

1. TS. Phạm Bảo Yên

2. TS. Lê Hồng Điệp

Phản biện 1

Phản biện 2

Phản biện 3

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp Đại học Quốc gia chấm luận
án tiến sĩ họp tại

Vào hồi giờ ngày tháng năm 20...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam;

- Trung tâm Thông tin - Thư viện, Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Ngày nay, các bệnh về dạ dày, đặc biệt là ung thư dạ dày ngày càng phổ biến trên thế giới và Việt Nam. Một trong các nguyên nhân chính gây nên bệnh dạ dày đã được xác định là vi khuẩn *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Trước đây, phương pháp điều trị bệnh dạ dày do *H. pylori* sử dụng một số loại kháng sinh mang lại hiệu quả cao. Tuy nhiên, các nghiên cứu mới đây cho thấy có nhiều chủng vi khuẩn *H. pylori* đã thể hiện tính đề kháng với những loại kháng sinh thường dùng, cho nên, việc nghiên cứu thuốc mới là một nhu cầu cấp thiết.

Nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *H. pylori* liên quan chặt chẽ đến hoạt động của rất nhiều protein, trong đó có enzyme peptide deformylase có vai trò xúc tác cho phản ứng loại bỏ nhóm formyl ở đầu N-formylmethionyl của chuỗi peptide mới hình thành ở sinh vật nhân sơ. Do vậy, enzyme peptide deformylase là một protein đích cho quá trình điều trị bệnh liên quan đến vi khuẩn *H. pylori*.

Từ các dược liệu đó, một số hợp chất tự nhiên đã được tìm ra có tác động ức chế đối với vi khuẩn *H. pylori*, tuy nhiên, cơ chế phân tử của tác động này vẫn chưa được rõ ràng. Việc xác định các hợp chất đóng vai trò trong tác động ức chế là điều cần thiết nhằm phát triển một thuốc điều trị mới có hiệu quả.

Vì vậy, tôi lựa chọn lĩnh vực nghiên cứu liên quan đến bệnh dạ dày và vi khuẩn *H. pylori* nhằm giải quyết một số vấn đề trên, cụ thể là nghiên cứu ở cấp độ phân tử như gen, enzyme và cơ chế tác động ức chế của các dược liệu lên vi khuẩn *H. pylori*. Mục tiêu của đề tài là điều tra trình tự của gen mã hóa peptide deformylase nhằm lựa chọn một trình tự để nhân dòng tạo ra enzyme peptide deformylase tái tổ hợp, sau đó biểu hiện và tinh sạch enzyme tái tổ hợp đó, từ đó sử dụng để nghiên cứu ảnh hưởng của các mẫu thảo dược đến tính chất của enzyme.

Mục tiêu

Tạo ra được enzyme peptide deformylase tái tổ hợp có khả năng ứng dụng trong việc sàng lọc chất ức chế tự nhiên có khả năng kháng *Helicobacter pylori*.

Nội dung nghiên cứu

1. Nhân dòng gen mã hóa cho peptide deformylase vào vector phù hợp.
2. Biểu hiện peptide deformylase tái tổ hợp với lượng lớn và trong pha tan.

3. Tinh sạch peptide deformylase tái tổ hợp có hoạt tính và độ tinh sạch cao.
4. Nghiên cứu tính chất của peptide deformylase tái tổ hợp.

Những đóng góp mới của luận án

1. Đã tạo được dòng và xác định được trình tự gen mã hoá cho peptide deformylase với kích thước 525 bp có trình tự amino acid tương đồng 100% với trình tự nucleotide vùng peptide trưởng thành của peptide deformylase từ *Helicobacter pylori*.
2. Đã thiết kế vector biểu hiện chứa đoạn gen *def* mã hóa PDF, biểu hiện được PDF tái tổ hợp chứa His-tag ở *E. Coli* và tối ưu được các điều kiện biểu hiện PDF tái tổ hợp tại 28°C, IPTG 1 mM, đã tinh sạch được PDF tái tổ hợp với hiệu suất 60 mg/L, hiệu suất thu hồi từ dịch chiết tế bào đạt 12% và độ sạch là 96,6%.
3. Đã xác định được hoạt tính của PDF xúc tác trên cơ chất formyl-methionin-alanin-serin (fMAS) với giá trị k_{cat} và k_{cat}/K_m của HpPDF đạt 0,02 và 173,42 và đánh giá được ảnh hưởng của một số hợp chất từ thảo dược có khả năng ức chế hoạt động PDF.

Cấu trúc của luận án

Luận án gồm 98 trang được chia thành các phần: Mở đầu 2 trang; Chương 1: Tổng quan tài liệu 35 trang; Chương 2: Vật liệu và phương pháp 8 trang; Chương 3: Kết quả và thảo luận 37 trang; Kết luận và kiến nghị: 1 trang; Các công trình công bố của tác giả 2 trang; Tài liệu tham khảo 17 trang; Tóm tắt luận án bằng tiếng anh 6 trang; Phụ lục 3 trang. Luận án có 5 bảng số liệu, 29 hình và 46 tài liệu tham khảo bằng tiếng Việt và tiếng Anh.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Các bệnh dạ dày - tá tràng

Trên thế giới, mỗi năm có khoảng hơn 1 triệu trường hợp được chẩn đoán là ung thư dạ dày, ước tính đây là bệnh ung thư phổ biến thứ tư trên thế giới (Wroblewski, et al. 2010). Ở Việt Nam, viêm dạ dày mãn tính là bệnh khá phổ biến, chiếm khoảng 31 – 72% các trường hợp nội soi đường tiêu hóa trên. Bệnh thường gặp ở cả nam và nữ, lứa tuổi mắc bệnh đa phần là từ 40-49 tuổi (Phan, et al. 2015).

1.2. Vi khuẩn *Helicobacter pylori*

1.2.1. Cấu tạo và hình thái của *H. pylori*

H. pylori được phân lập thấy lần đầu tiên năm 1982 bởi Robin Warren và Barry Marshall, là vi khuẩn Gram âm, sống trong lớp nhày của niêm mạc dạ dày (Warren and Marshall 1983). *H. pylori* thuộc giới vi khuẩn, ngành Proteobacteria, lớp Epsilonproteobacteria, họ Campylobacterales, bộ Helicobacteraceae, chi Helicobacter.

1.2.2. Tình hình nhiễm *Helicobacter pylori* và mối liên hệ với bệnh dạ dày - tá tràng

H. pylori ngày nay được tìm thấy trên 50% dân số trên thế giới (Azevedo, et al. 2007), trực tiếp gây ra hàng loạt bệnh đường tiêu hóa và ung thư dạ dày. Thống kê cho thấy hơn một nửa dân số thế giới bị nhiễm vi khuẩn *H. pylori*, tùy vào từng vùng tỷ lệ có thể dao động trong khoảng 50-90%, trong khi ở Việt Nam tỷ lệ này thay đổi từ 63-94,8% các ca mắc bệnh về dạ dày (Axon 2007), (Nhà xuất bản y học 2013). Nguyên nhân chính gây nên bệnh dạ dày đã được xác định là vi khuẩn *H. pylori*.

1.2.3. Tình trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *H. pylori*

Khi điều trị theo các phác đồ kháng sinh dẫn đến một số tác dụng phụ không mong muốn như loạn khuẩn đường ruột, nhiễm khuẩn các cơ quan, đặc biệt là hiện tượng kháng kháng sinh của các chủng *H. pylori* ngày càng tăng (Phan, et al. 2015). Theo những nghiên cứu gần đây ở Việt Nam, tỷ lệ kháng hai loại kháng sinh phổ biến nhất rất cao, trong đó, clarithromycin tăng từ 1% năm 2001 lên 33% năm 2013 và metronidazole khoảng 70% (Binh, et al. 2013).

1.2.4. Các hợp chất tự nhiên có hoạt tính kháng *H. pylori*

Ngày càng có nhiều sự chú ý trong lĩnh vực khám phá thuốc đã được chú trọng về các hợp chất tự nhiên từ dược liệu truyền thống. Sản phẩm tự nhiên và các dẫn xuất của chúng đại diện cho hơn 50% tất cả các loại thuốc điều trị hiện tại. Các hợp chất thuộc về các chất chuyển hóa thứ cấp có khả năng kháng khuẩn chống lại *H. pylori* như flavonoid, saponin, alkaloid. Saponin là glucosides với các đặc tính tạo bọt bao gồm pollycyclic aglycones gắn liền với một hoặc nhiều chuỗi bên đường.

1.3. Peptide deformylase

1.3.1. Cấu trúc và cơ chế của peptide deformylase (PDF)

Peptide deformylase (PDF, EC 3.5.1.88) là enzyme xúc tác cho phản ứng loại bỏ nhóm N-formyl của chuỗi polypeptide mới hình thành cho phản ứng cắt methionine tiếp sau trong quá trình hoàn thiện chức năng cho protein ở cơ thể nhân sơ (Miesel, et al. 2003). Mặc dù nó được tìm thấy ở bào quan của tế bào nhân thực, như lục lạp và ti thể nhưng hoạt động ở mức rất thấp. Như vậy, PDF rất cần thiết cho vi khuẩn sinh trưởng và tồn tại mà không có nhiều tác dụng đối với con người, cho nên, đây là một đích tác dụng tiềm năng cho việc phát triển thuốc kháng sinh.

Việc nhân dòng gen mã hóa peptide deformylase, *def*, vào năm 1993 bởi Meinnel et al. tạo điều kiện thuận lợi cho những nghiên cứu về cơ chế của PDF (Meinnel and Blanquet 1993). PDF lần đầu tiên được biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* và được tinh sạch nhưng hoạt tính thu hồi cực kỳ thấp (k_{cat}/K_m là $80 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ với cơ chất formyl-Met-Ala-Ser) và chứa một ion kẽm trên mỗi polypeptide {Meinnel, 1995}. Tuy nhiên năm 1997, Rajagopalan báo cáo việc tinh sạch một phân đoạn PDF hoạt tính cao trong điều kiện không có oxy, với k_{cat}/K_m là $2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ với cơ chất formyl-Met-Ala-Ser, và chứa một ion sắt trên mỗi polypeptide (Rajagopalan, 2000).

1.3.2. Peptide deformylase là đích phân tử tiềm năng

Vì PDF là cần thiết cho sự sống còn của vi khuẩn nhưng dường như không cần thiết trong động vật tế bào, nó cung cấp một mục tiêu hấp dẫn cho một chiến lược kháng khuẩn mới. Hơn thế nữa, deformylation là một tính năng bảo tồn trong các loài vi khuẩn. Với nhiều cấu trúc ba chiều của các PDF vi khuẩn được tìm ra, cả hai có và không có phức hợp ức chế enzyme, nó cho thấy rằng vị trí hoạt động của PDF được bảo tồn, gồm các vị trí bảo thủ, motif 1 [G ϕ G ϕ AAXQ], motif 2 [EGCLS], và motif 3 [HE ϕ DH] (trong đó ϕ là một

amino acid kỵ nước và X là axit amin bất kỳ). Do đó, PDF dường như là một đích tiềm năng cho kháng sinh phổ rộng mới.

1.4. Ứng dụng công nghệ ADN tái tổ hợp

Những năm gần đây, công nghệ ADN tái tổ hợp ngày càng phổ biến do tính ứng dụng rộng rãi của những kết quả quan trọng. Một số lĩnh vực ứng dụng quan trọng nhất của công nghệ ADN tái tổ hợp là chẩn đoán bệnh di truyền, lấy dấu ADN, trị liệu gen.

1.5. PDF bị ức chế bởi một số hợp chất tự nhiên

Các sản phẩm tự nhiên đã đóng vai trò then chốt trong sự phát triển của kháng sinh kể từ những năm đầu của thế kỷ XX. Tuy nhiên, sự kháng thuốc kháng sinh mới của vi sinh vật tăng nhanh đòi hỏi cung cấp liên tục các tác nhân mới để điều trị hiệu quả các bệnh truyền nhiễm. Nhiều hợp chất kháng khuẩn có nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên đang được điều tra như NVP LBM 415 kháng peptide deformylase, Rifalazil thuộc nhóm ansamycin, MEI036 nhóm β -lactam-cephalosporin v.v... [Butler and Buss 2006]. Mặc dù có nhiều nỗ lực để xác định các hợp chất mới từ các mục tiêu phân tử, chỉ các chất ức chế peptide deformylase (PDIs) hiện đang được thử nghiệm lâm sàng.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và hóa chất

2.1.1. Chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh: Chủng *E. coli* DH5 α

DNA từ chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori*

2.1.2. Các hóa chất và bộ kit

Các hóa chất và bộ kit được đặt mua từ các hãng hóa chất uy tín dành cho nghiên cứu sinh học phân tử.

Các hóa chất và thiết bị máy móc: Invitrogen, Novagen, Merck, New England Biolab, Qiagen, Sigma.

Hóa chất dùng cho phản ứng PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Hóa chất dùng cho điện di trên gel agarose

Hóa chất dùng trong cảm ứng biểu hiện gen

Hóa chất dùng cho tách chiết plasmid từ vi khuẩn

2.1.3. Máy móc và thiết bị

Máy móc thiết bị phục vụ cho các thí nghiệm thuộc phòng Enzyme học và phân tích hoạt tính sinh học; phòng Protein tái tổ hợp, thuộc Phòng thí nghiệm Trọng điểm, trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng ba nhóm phương pháp nghiên cứu chính.

2.2.1. Nhóm phương pháp tạo dòng, biểu hiện, tinh sạch và xác định vector tái tổ hợp

2.2.1.1. Khuếch đại đoạn gen chứa trình tự mã hóa peptide deformylase (def) 777 bp từ chủng vi khuẩn *H. pylori* 94

2.2.1.2 Nhân dòng đoạn gen *def* 525 bp vào vector biểu hiện pET22b

2.2.1.3. Biểu hiện PDF và phân tích bằng điện di SDS-PAGE

2.2.1.4. Western blot

2.2.1.5. Điện di polyacrylamide có SDS (SDS-PAGE)

2.2.1.6. Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng phương pháp sắc kí ái lực

2.2.1.7. Phương pháp thẩm tách loại muối.

2.2.2. Phương pháp xác định hoạt tính PDF sử dụng cơ chất f-MAS

2.2.3. Phân tích kết quả biểu hiện bằng các phần mềm tin sinh học ImageJ và Design expert

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. TẠO DÒNG GEN MÃ HÓA PDF

3.1.1. Khuếch đoạn gen *def* mã hóa PDF bằng kỹ thuật PCR

So sánh trình tự nucleotide của gen *def* ở chủng thu nhập tại Việt Nam với chủng tham chiếu SS1 cho thấy có 6 khác biệt đơn nucleotide, thuộc 4 thay thế amino acid (Bảng 3.1, Hình 3.3).

Protein có sự biến đổi amino acid trong cùng nhóm (kị nước hoặc ưa nước) có thể có đặc tính tương tự protein tham chiếu, trong khi thay đổi khác nhau có thể ảnh hưởng đến hoạt tính của enzyme. Đáng chú ý là ba trình tự bảo thủ (GLAAIQ, EGCLS, and HEIDH) đều không thay đổi ở tất cả các chủng.

Như vậy, chủng *H. pylori* 94 sai khác so với chủng tham chiếu *H. Pylori* là 1,1% về nucleotide và 5,7% về amino acid. Với mức tương đồng cao với chủng trên thế giới, gen *def* của chủng *H. pylori* 94 được sử dụng để nghiên cứu tái tổ hợp trong đề tài này.

3.1.2. Tách dòng gen mã hóa PDF

Sau khi khuếch đại đoạn gen 777 bp chứa gen *def* bằng PCR và kiểm tra trên gel agarose 2%, chúng tôi đã tiến hành gắn đoạn gen này vào vector pGEMT và biến nạp vào tế bào khả biến DH5 α . Kiểm tra các khuẩn lạc trắng cho thấy, khuẩn lạc giếng số 3,4 không chứa đoạn chèn vì có kích thước nhỏ hơn 400 bp, chỉ có khuẩn lạc giếng số 5 có kích thước lớn hơn 500 bp có khả năng chứa đoạn chèn (Hình 3.4).

Khuẩn lạc trắng giếng 5 được nuôi tăng sinh và tách plasmid, sau đó, kết quả PCR lại plasmid khẳng định một lần nữa đã thu được vector tái tổ hợp có chứa đoạn chèn *def* kích thước 777bp.

3.1.3. Kết quả xác định trình tự gen mã hóa PDF trong vector tái tổ hợp

Kết quả đọc trình tự gen *def* tái tổ hợp cho thấy trình tự gen này trùng khớp 100% so với trình tự gen *def* đã xác định từ trước. Như vậy, đoạn gen *def* đã được tách dòng thành công vào vector tái tổ hợp pGEMT.

3.2. BIỂU HIỆN PDF TÁI TỔ HỢP

3.2.1. Thiết kế vector biểu hiện PDFpET22b(+)

Vector pGEMT sau khi đã xác định chứa đoạn gen *def* được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR nhằm nhân lên đúng đoạn 525 bp bằng cặp mồi có chứa trình tự cắt của enzyme giới hạn *NdeI* và *XhoI*. Kết quả điện di trên gel agarose 2% (Hình 3.6A) cho thấy có một băng đặc hiệu duy nhất với kích thước nằm trong khoảng dự kiến (500-600 bp).

Sản phẩm PCR từ vector tách dòng pGEMT và vector pET22b(+) cùng đồng thời được xử lý với hai enzyme giới hạn là *NdeI* và *XhoI* để tạo đầu dính tương hợp giữa đoạn gen cần chèn và vector. Trên hình 3.6B, vector sau khi cắt bằng enzyme *NdeI* và *XhoI* đã có sự thay đổi kích thước rõ rệt (Giếng 1,3), trong khi mẫu PCR thì không nhận rõ (Giếng 2,4). Tuy nhiên, dựa vào kết quả điện di, có thể xác định được nồng độ đoạn chèn và vector để tính toán lượng cho vào phản ứng nối vòng cho phù hợp.

Cấu trúc gen tái tổ hợp được thiết kế để tạo ra một protein 24,5 kDa dưới sự kiểm soát của promoter T7 trong vector pET22b (+) với đoạn 6xHis tại đầu cuối C để sử dụng cho mục đích tinh sạch (Hình 3.7A). Trình tự gen *def* kết quả và trình tự axit amin suy luận (Hình 3.7B) chỉ ra rằng cấu trúc HpPDF94 đã được chèn thành công vào pET22b (+) giữa hai vị trí enzyme giới hạn của *NdeI* và *XhoI*.

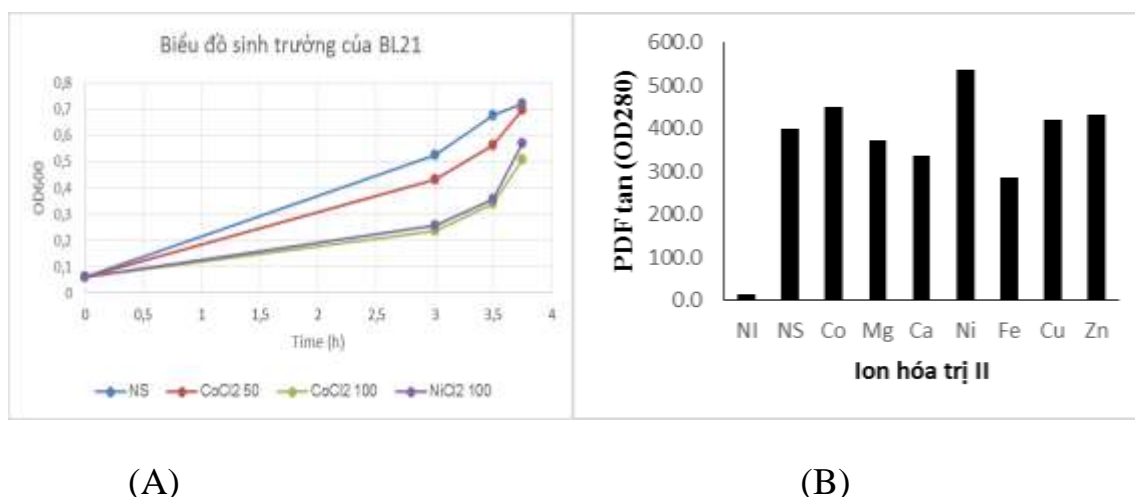
3.2.2. Biểu hiện PDF tái tổ hợp

Qua kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 3.8A) cho thấy phân đoạn protein thu được (giếng pET22b-HpPDF94/T) có chứa băng protein kích thước khoảng xấp xỉ tính toán lý thuyết, băng này không xuất hiện ở mẫu đối chứng chứa vector không có đoạn chèn và mẫu đối chứng không cảm ứng IPTG (giếng pET22b/NI/T, pET22b-HpPDF94/NI). Theo tính toán bằng phần mềm ImageJ, lượng protein đích biểu hiện chiếm khoảng 55,7 % protein tổng số (Hình 3.8B). Như vậy, peptide deformylase đã được biểu hiện thành công với hệ thống biểu hiện gồm vector pET22b và tế bào *E. coli* BL21-RIL.

Kết quả Western blot cho thấy, ở trong các pha tổng số, pha tan và pha cặn từ dịch nuôi tế bào có cảm ứng IPTG thì thu được băng đậm, gắn với kháng thể anti-His, hiện màu với thuốc nhuộm AP rất rõ nét (Hình 3.9). Điều này chứng tỏ việc biểu hiện thành công PDF tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*.

3.2.3. Khảo sát các điều kiện biểu hiện PDF tái tổ hợp ở *E. coli*

Kết quả biểu hiện ban đầu thu được PDF tái tổ hợp tan 55,7%, còn lại 44,3% vẫn nằm trong pha không tan. Theo nhiều nghiên cứu về tính tan của protein tái tổ hợp, có một số yếu tố có khả năng làm tăng tính tan như thay đổi nhiệt độ, pH, co-factor và bổ sung một số chất đặc biệt. Vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát sự ảnh hưởng của các điều kiện biểu hiện đến độ tan và hàm lượng PDF tái tổ hợp thu được.



(A)

(B)

Hình 3.14: (A) Biểu đồ sinh trưởng của tế bào BL21 chứa vector tái tổ hợp khi có mặt của kim loại hóa trị II. (B) Ảnh hưởng của các ion khác nhau đến năng suất hòa tan PDF tái tổ hợp. NI: không cảm ứng; NS: không bổ sung; Co, Mg, Ca, Ni, Fe, Cu, Zn: bổ sung ion khác nhau.

Sau khi khảo sát, điều kiện biểu hiện tế bào *E. coli* thu được nhiều PDF tái tổ hợp ở pha tan nhất là nhiệt độ 28°C, pH môi trường xấp xỉ 7, cảm ứng bằng IPTG 1mM, bổ sung ion kim loại hóa trị II Co^{2+} với nồng độ 100 μM .

3.2.4. Tinh sạch PDF tái tổ hợp

3.2.4.1. Ly giải tế bào và thu phân đoạn

Nhằm thu được một lượng PDF tái tổ hợp lớn, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu lên men thu protein này ở quy mô 0,25lít/mẻ sử dụng bình tam giác 1 lít tại điều kiện tối ưu đã xác định. Sau khi thu tế bào, quá trình ly giải tế bào ảnh hưởng rất nhiều đến khi sử dụng máy siêu âm với chu kỳ và tốc độ khác nhau.

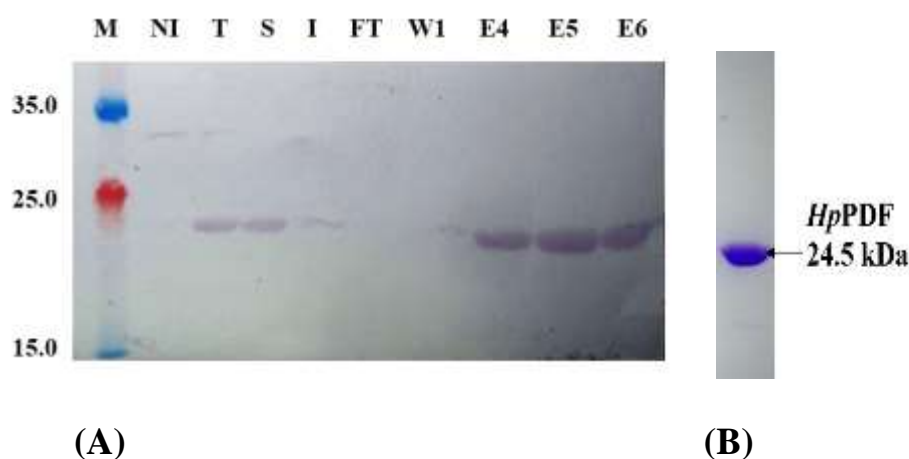
Chế độ siêu âm với chu kỳ 0,6 và công suất 60% đựng trong ống thủy tinh sẽ được lựa chọn cho các lần ly giải tế bào tiếp theo.

3.2.4.2. Tinh sạch protein tái tổ hợp PDF bằng sắc ký ái lực Ni-NTA

Kết quả điện di trên bản gel trùng khớp với kết quả đo nano-drop, PDF thu được hầu hết ở các phân đoạn đáy số 7,8,9, phân đoạn đáy số 8 là phân đoạn thu được PDF với lượng lớn nhất (Hình 3.16). Băng PDF thu được có kích thước xấp xỉ 25 kDa, giống với tính toán lý thuyết là 24,5 kDa. Bằng phần mềm ImageJ, độ tinh sạch của PDF tính toán được là 96,6%.

Quá trình tinh sạch đạt hiệu quả cao vì protein bị mất đi trong dịch qua cột (FT) và dịch rửa chỉ khoảng 5% (Hình 3.16B). Bên cạnh đó, quá trình thẩm tách có hiệu quả trong việc cô đặc protein làm cho nồng độ PDF tăng lên khoảng 2,5 lần (Hình 3.17).

SDS-PAGE và western blot (Hình 3.18) đều cho thấy các băng *HpPDF94* tái tổ hợp duy nhất, sắc nét ở vị trí như tính toán lý thuyết. Điều này cho thấy protein đích được tinh sạch hiệu quả với độ tinh sạch xấp xỉ 96,6%. Hiệu suất của PDF tái tổ hợp từ 1 lít môi trường nuôi cấy là khoảng 31,25 mg, tương đương với các nghiên cứu trước đây (Che et al., 2011).



Hình 3.18. (A) Ảnh nhuộm western blot của *HpPDF94* tái tổ hợp tinh sạch bằng sắc ký cột niken. M: marker protein; NI: không gây ra; T: tổng protein (dịch ly giải tế bào thô); S: phân đoạn hòa tan; I: phân đoạn không tan; FT: phân đoạn qua cột; W1: phân đoạn rửa; E4-E6: phân đoạn đáy. (B) Ảnh điện di *HpPDF* sau khi tinh sạch bằng SDS-PAGE

Trong nghiên cứu này, hiệu suất tinh sạch PDF được đánh giá qua từng bước tinh sạch được trình bày trong Bảng 3.2. Kết quả cho thấy PDF tái tổ hợp đã được tinh sạch có hoạt độ riêng tăng từ 11,4 U/mg protein đến 145,3 U/mg protein, tăng 13 lần so với enzym

thô. Trong nghiên cứu của Meinnel và cộng sự, PDF tái tổ hợp được tinh sạch với hiệu suất chỉ đạt 26,6 % và mức độ tinh sạch đạt xấp xỉ 6 lần [11]. Hơn nữa, hoạt độ riêng của PDF thu được cũng cao hơn nhiều so với PDF từ *E. coli* trong nghiên cứu đó (31,13 U/mg) [12].

3.3. Nghiên cứu hoạt tính của PDF tái tổ hợp

3.3.1. Điều kiện hoạt động tối thích của PDF tái tổ hợp

3.3.1.1. Ảnh hưởng của các yếu tố đến phản ứng

Tốc độ của phản ứng enzyme-cơ chất phụ thuộc vào cả nồng độ enzyme và nồng độ cơ chất. Chính vì thế, việc tối ưu dãy nồng độ enzyme là bước đầu cho quy trình thử hoạt tính. Sau khi sử dụng PDF ở các nồng độ 0,5 μ M, 0,05 μ M, và 0,005 μ M với phản ứng không có cơ chất, kết quả thu được như đồ thị dưới đây:

Sau khi đã lựa chọn 0,05 μ M là nồng độ PDF sử dụng cho phản ứng, thí nghiệm thử hoạt tính được tiến hành với nồng độ cơ chất f-MAS 1mM. Nhìn trên đồ thị (Hình 3.20) có thể nhận thấy khi không có PDF, số đọc vẫn ổn định ở khoảng 0,2, trùng khớp với giá trị ở thí nghiệm trên. Còn khi có mặt PDF, số đọc tăng lên gấp 5 lần, từ đó có thể khẳng định PDF tái tổ hợp thu được là có hoạt tính. Điều này có ý nghĩa quan trọng đối với một enzyme tái tổ hợp. Việc PDF có hoạt tính bước đầu mang lại kết quả nhất định cho quá trình thí nghiệm, tạo tiền đề cho nghiên cứu tiếp theo về động lực của enzyme, về ảnh hưởng của các yếu tố pH, nhiệt độ, sự tương tác của enzyme với các ion kim loại.

3.3.1.2. Nhiệt độ và pH tối thích cho phản ứng của PDF

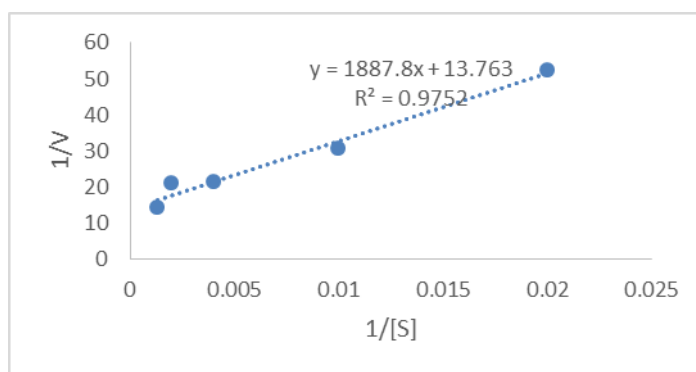
Các thí nghiệm enzym cho thấy, với sự hiện diện của *Hp*PDF94 tinh khiết, lượng sản phẩm NADH được tạo ra bởi phản ứng ghép nối tăng theo thời gian, cho thấy hoạt tính loại bỏ N-formyl của protein tái tổ hợp. Khi khảo sát ảnh hưởng của pH đệm khác nhau, kết quả cho thấy *Hp*PDF chứa Co^{2+} (Co-*Hp*PDF) hoạt động thấp ở pH axit, cao hơn đáng kể trong khoảng 7,0-8,5 với pH tối ưu 7,5 (Hình 3.21A), và sau đó giảm xuống. Một thí nghiệm tương tự kiểm tra điều kiện pH đệm báo cáo một phạm vi pH hơi tối ưu giữa 8,0 và 9,0 (Han và cộng sự, 2004).

Về nhiệt độ xét nghiệm, Co-*Hp*PDF hoạt động ở mức rộng (37-60°C) (Hình 3.21B), tuy nhiên, theo nghiên cứu của Han và cộng sự, 2004, nhiệt độ cao hơn sẽ không phù hợp cho xét nghiệm này do formyl- MAS không ổn định.

3.3.2. Xác định hằng số động học và độ bền của PDF tái tổ hợp

3.3.2.1. Hằng số động học

Các đặc tính xúc tác của Co-HpPDF được đặc trưng hơn ở pH và nhiệt độ tối ưu thông qua việc xác định các tham số động học K_m và V_{max} trong phương trình Lineweaver – Burk (Hình 3.22).



Hình 3.22. Lineweaver–Burk plot of Co-HpPDF at 37°C and pH 7.5

Hoạt tính cắt nhóm formyl của cơ chất đặc hiệu fMAS của PDF tái tổ hợp được so sánh với enzyme bị bất hoạt khi xử lý ở 95°C trong 5 phút và đối chứng với phản ứng không có mặt của PDF (Hình 3.23).

Tiếp theo, kết quả khảo sát các thông số động học hoạt tính của Co-HpPDF tái tổ hợp biểu hiện trong *E. coli* được biểu thị và tính toán qua đồ thị Lineweaver-Burk (Hình 4). Giá trị K_m của PDF trong nghiên cứu này khá nhỏ, đạt 137,16 μM , nhỏ hơn giá trị K_m của PDF của các chủng biểu hiện trong nghiên cứu khác. Theo nghiên cứu của Han và cs [13] giá trị K_m của Co-HpPDF đạt 1700 μM , trong khi, nghiên cứu của Lee chỉ ra K_m của Co-HsPDF cao hơn nhiều, đạt 11.000 μM [14]. Vì K_m thể hiện ái lực của enzym với cơ chất, cho nên trong nghiên cứu này HpPDF có thể đạt được tốc độ phản ứng tối đa ngay ở nồng độ cơ chất thấp.

Giá trị k_{cat} và k_{cat}/K_m của HpPDF đạt 0,02 và 173,42, cao hơn nhiều so với giá trị đó trong nghiên cứu của Lee và cộng sự (0,0081 và 0,74) [9]. So với PDF tinh sạch từ các loài khác, hiệu quả xúc tác của Co-HpPDF tái tổ hợp trong nghiên cứu này thấp hơn so với Ni-EcPDF và cao hơn đáng kể so với Co-HpPDF từ nghiên cứu của Han, có thời gian đạt tốc độ mong muốn nhanh hơn nhưng đường nền lại thấp hơn (Han et al. 2004). Kết quả này cho thấy enzym nghiên cứu có khả năng xúc tác chuyển hóa lượng cơ chất lớn, đạt hiệu quả xúc tác cao.

3.3.2.2. Độ bền nhiệt của PDF

Để đánh giá độ bền của PDF theo nhiệt độ, chúng tôi ủ PDF ở các nhiệt độ khác nhau trong vòng 30 phút, sau đó tiến hành đo hoạt tính của PDF, so sánh với hoạt tính của PDF được bảo quản ở -60°C . Mỗi thí nghiệm được lấy ra đo hoạt tính sau thời gian ủ mẫu. Đáng chú ý, hoạt tính của enzyme bị giảm gần 80% sau khi ủ ở 30°C trong vòng 30 phút (Hình 3.24). Ở các nhiệt độ cao hơn, tuy hoạt tính bị giảm ít hơn nhưng đều bị giảm trên 50% sau khi ủ 30 phút. Điều này cho thấy, hoạt tính của PDF tương đối bền ở các nhiệt độ cao.

Để xác định điều kiện bảo quản của PDF, hoạt tính của PDF được theo dõi trong các khoảng thời gian khác nhau ở các nhiệt độ khác nhau. Đầu tiên, enzyme được ủ ở 25°C và lấy ra đo hoạt tính ở các thời gian khác nhau. Kết quả cho thấy, hoạt tính enzyme giảm nhanh sau 1h giảm còn 60%, sau 3h giảm còn 40% và sau 24h hoạt tính enzyme bị giảm gần 20% (Hình 3.25B). Như vậy, nhiệt độ 25°C không thích hợp để bảo quản enzyme dù trong thời gian ngắn.

Khi bảo quản ở 4°C , hoạt tính enzyme giảm chậm hơn rất nhiều so với nhiệt độ phòng, hầu như không giảm trong vòng 3 giờ, còn 98% sau 1 tuần. Sau 4 tuần ở 4°C , hoạt tính enzyme vẫn còn lại 88% (Hình 3.25B). Như vậy, nhiệt độ 4°C có thể bảo quản được enzyme trong một thời gian ngắn (ít hơn một tuần). Tiếp tục khảo sát từ 1 tuần đến 12 tuần, hoạt tính của enzyme giảm nhanh còn lại 20% khi bảo quản ở 4°C . Trong khi đó, bảo quản ở -80°C hoạt tính enzyme vẫn giữ được trên 99% sau 12 tuần. Tiếp tục khảo sát đến thời điểm 48 tuần (12 tháng) tại điều kiện bảo quản -80°C , hoạt tính của PDF còn lại 92%. Như vậy, nhiệt độ 80°C hoàn toàn thích hợp để bảo quản enzyme PDF tinh sạch lâu dài.

3.3.3. Ảnh hưởng của một số dịch chiết thực vật và một số hợp chất đến hoạt tính của PDF

Để đánh giá ảnh hưởng của các dịch chiết thực vật lên hoạt tính của PDF, tôi đã đánh giá ảnh hưởng của dung môi dimethyl sulfoxide (DMSO) lên hoạt tính của PDF vì DMSO là dung môi hòa tan các dịch chiết thực vật được sử dụng.

Nồng độ DMSO được đánh giá ở 10%, 1% và 0,1%. Kết quả cho thấy, ở nồng độ DMSO 10% ức chế trên 70% hoạt tính của PDF, trong khi ở nồng độ 0,1% thì DMSO ảnh hưởng ít đến hoạt tính của PDF (giữ lại trên 90% hoạt tính PDF) (Hình 3.26). Như vậy, với nồng độ DMSO 0,1% trong dịch chiết thực vật có thể đánh giá được hoạt tính của PDF và ảnh hưởng của dịch chiết thực vật đến hoạt tính của PDF.

Một số dịch chiết tổng số từ các loài thực vật Việt Nam đã được đánh giá mức độ ảnh hưởng đến hoạt tính của PDF tái tổ hợp. Trong đó, có 9/22 dịch chiết có khả năng ức chế từ 50% hoạt tính của PDF ở nồng độ nghiên cứu (2 μ g/100 μ l phản ứng).

Dịch chiết ethy acetate của cây nghệ đen có tác dụng ức chế PDF mạnh nhất ở nồng độ 2 μ g/100 μ l, ức chế 73,49% hoạt động của PDF, trong khi có một số dịch chiết gần như không ức chế như dịch chiết từ cây đỗ rùng (1,07 và 1,55%), dịch chiết ethyl acetate của cây tràu không (1,72%).

Khi so sánh với kết quả xác định khả năng kháng *H. Pylori*, dịch chiết ethyl acetate từ cây chè dây và kim ngân hoa có tác dụng kháng *H. pylori* mạnh và khả năng ức chế PDF mạnh. Bên cạnh đó, một số loại dịch chiết có vòng kháng khuẩn lớn nhưng lại không thể hiện khả năng ức chế PDF như mẫu tràu không chiết trong ethyl acetate, đỗ rùng – ethyl acetate, sa nhân – methanol.

Dịch chiết cây nghệ đen có tác dụng ức chế hoạt động của PDF mạnh nên chúng tôi tiến hành xác định nồng độ ức chế 50% hoạt tính (IC₅₀). Từ kết quả nghiên cứu IC₅₀ trên cho thấy, hoạt tính PDF bị ức chế 50% ở 0,74 μ g (Hình 3.27). Nồng độ này thấp hơn so với nhiều chất ức chế PDF đã nghiên cứu trước đây.

Bên cạnh đó, khi so sánh với kết quả thử khả năng kháng khuẩn *H. pylori*, dịch chiết từ cây tràu không lại có khả năng ức chế mạnh nhất trong các cây. Điều này có thể do khả năng xâm nhập của các chất trong dịch chiết cây tràu không rất lớn, cũng có thể do nhiều cơ chế tác dụng khác lên vi khuẩn. Để tìm hiểu vấn đề này, tôi tiếp tục tiến hành thử nghiệm khả năng ức chế hoạt động của PDF của các phân đoạn từ cây tràu không, đã được làm giàu lên một số thành phần, đủ để cho các chất có tác dụng. Kết quả thể hiện trong bảng 3.4.

Kết quả cho thấy, các phân đoạn tràu không có khả năng ức chế PDF với một số mức độ khác nhau, đạt từ 4,9 đến 51,32%. Điều này cho thấy, khi làm giàu một số nhóm chất trong dịch chiết cây tràu không lên thì một số nhóm chất lại có tác dụng ức chế mạnh, cụ thể là phân đoạn PB23-2, PB23-9 với tỷ lệ ức chế là 51,32% và 49,25%.

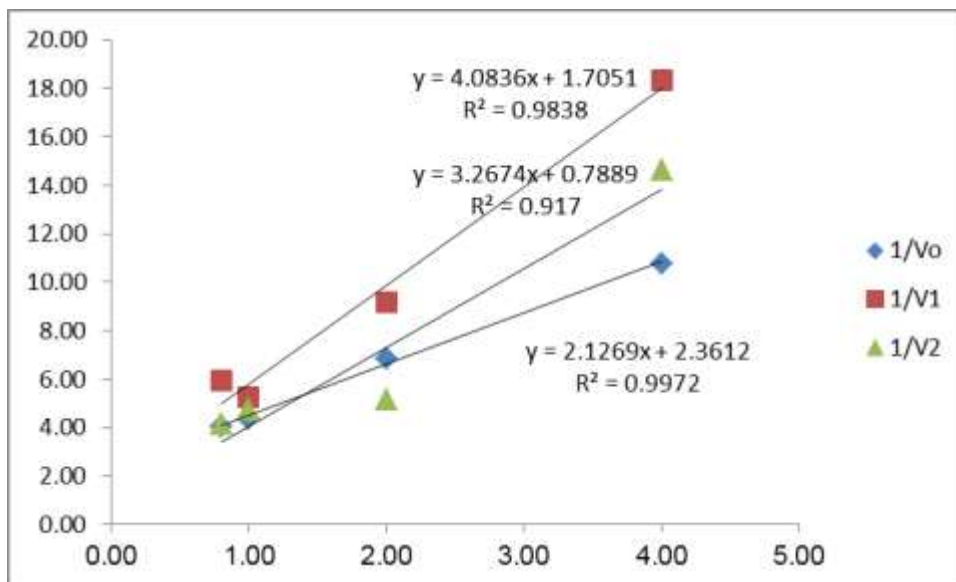
Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế enzyme PDF của 28 chất tinh sạch

28 hợp chất từ thực vật đã được sàng lọc bằng cách sử dụng phép thử hoạt tính để xác định các hợp chất hoạt động ức chế HpPDF (Hình 3.28). Actinonin, một PDI tự nhiên, có giá trị IC₅₀ thấp 0,17 μ M. Chúng tôi đã sử dụng Actinonin như là một đối chứng dương

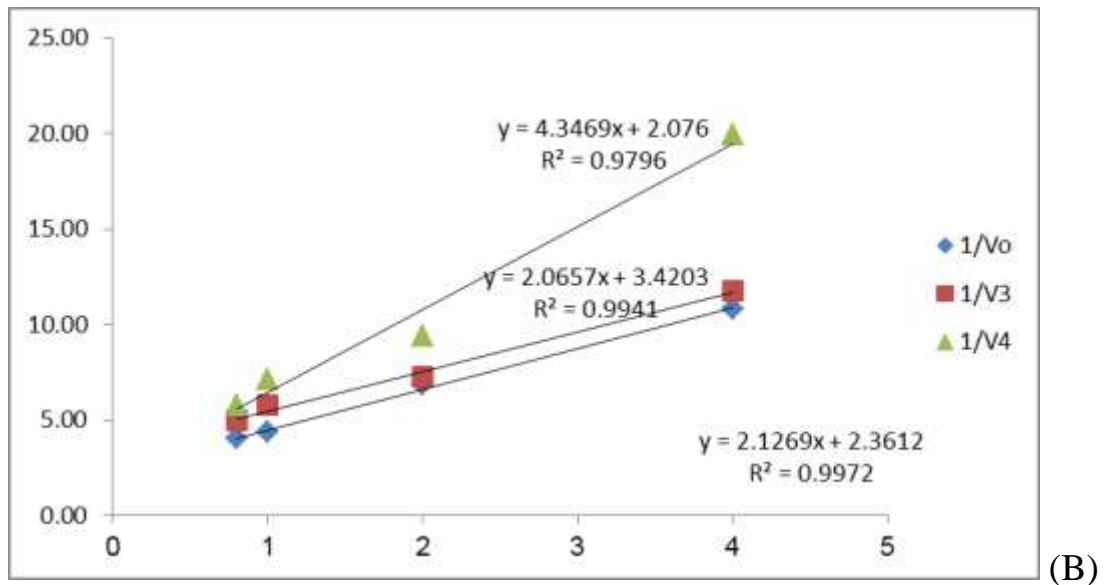
để đánh giá các chất ức chế hệ thống sàng lọc. Theo hình 3.28, có 11/28 mẫu ức chế hoạt tính PDF với giá trị IC_{50} nhỏ hơn 20 nM. Các chất ức chế PDF được chọn lọc cho enzyme vi khuẩn, ví dụ như, BB-81384 ức chế PDF (chứa Ni) của *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae*, *E. coli* và *Staphylococcus aureus* với giá trị IC_{50} là 9, 11, 60, và 300 nM (Gross et al 2004). 18/20 (90%) thể hiện các giá trị IC_{50} từ 75 nM trở xuống đối với PDF của *S. pneumoniae* (Hackbarth, 2002). Như vậy cho thấy, các chất tìm được có tiềm năng cao trong việc sử dụng để ức chế hoạt động của PDF vi khuẩn.

Kết quả cho thấy có 8/25 mẫu có khả năng ức chế mạnh chủng *H. pylori* và PDF tái tổ hợp. 6/25 mẫu có khả năng ức chế PDF mạnh nhưng không ức chế được chủng *H. pylori* ở nồng độ nghiên cứu. Một số chất ức chế PDF ít có tác dụng hơn trong việc ức chế vi khuẩn sống, có khả năng do tác động của hàng rào thành tế bào và màng ngoài, cũng như dòng chảy hoạt động theo cơ chế bơm (Apfel, 2000).

Trong số các chất có khả năng ức chế mạnh PDF, chúng tôi xác định kiểu ức chế enzyme đối với 2 chất là chất số 5 và số 21 (Hình 3.29). Kết quả cho thấy chất số 5 ức chế hoạt động của PDF không theo kiểu ức chế nào, trong khi chất số 21 ức chế PDF theo kiểu không cạnh tranh (uncompetitive).



(A)



Hình 3.29. Hoạt tính của PDF khi có mặt chất số 5 (A) và chất số 21 (B)

Kết quả docking

Các hợp chất có liên kết tiềm năng với PDF đã được sàng lọc sử dụng phương pháp docking. Kết quả cho thấy một số chất có khả năng liên kết tương đương với chất đối chứng actinonin như chất số 4, 20, usnic acid, trong khi đó, có 2 chất có khả năng liên kết với PDF vượt trội là chất số 26 và 28 (Bảng 3.5).

Kết quả về mô hình liên kết cũng cho thấy, chất số 26 và 28 liên kết với PDF tại các vị trí amino acid như sau: Gly46, Gln51, Leu97 với độ dài liên kết thể hiện như tương đối lớn (Phụ lục). Kết quả này khẳng định lại kết quả thực nghiệm và docking có thể sử dụng để sàng lọc trước khi thử nghiệm thực tế trên PDF.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Trên cơ sở các kết quả đã nhận được, chúng tôi rút ra 3 kết luận sau:

1. Đã tạo được dòng và xác định được trình tự gen mã hoá cho peptide deformylase với kích thước 575 bp tương đồng 100% với trình tự amino acid vùng peptide trưởng thành của gen *def* mã hóa peptide deformylase từ chủng *Helicobacter pylori* Việt Nam.
2. Đã thiết kế vector tái tổ hợp chứa đoạn gen *def* và biểu hiện được PDF dưới dạng dung hợp với Histag trên vector pET22b(+) ở tế bào BL21 *E. Coli*. Đã tối ưu được các điều kiện biểu hiện PDF tái tổ hợp tại 28°C, pH 7,0, IPTG 1 mM; đã tinh sạch được PDF tái tổ

hợp dạng PDF-Histag với hiệu suất 60 mg/L, hiệu suất thu hồi từ dịch chiết tế bào đạt 12% và độ sạch là 96,6%; đã xác định được peptide PDF có khối lượng phân tử là 24,5 kDa.

3. Đã nghiên cứu hoạt tính của PDF với giá trị k_{cat} và k_{cat}/K_m của HpPDF đạt 0,02 và 173,42 và đánh giá ảnh hưởng của một số hợp chất từ cây thảo dược có khả năng ức chế hoạt động của PDF.

KIẾN NGHỊ

Với những kết quả đã đạt được, chúng tôi mong muốn được tiếp tục nghiên cứu của mình để sàng lọc ra các hợp chất tiềm năng có tác dụng ức chế PDF và có khả năng kháng *H. pylori*.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Đỗ Thị Thanh Trung**, Lê Hồng Điệp, Phạm Bảo Yên (2015), “Nhân dòng và bước đầu biểu hiện peptide deformylase của chủng vi khuẩn *Helicobacter pylori* phân lập ở Việt Nam”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 31(4S), 453-460.
2. Nguyen Thi Huyen, Trinh Le Phuong, **Do Thi Thanh Trung**, Le Hong Diep, Pham Bao Yen (2016), “Evaluation of recent methods to improve recombinant *Helicobacter pylori* protein yield and solubility in Escherichia coli expression system”, *VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology* 32(1S), 286-292.
3. **Đỗ Thị Thanh Trung**, Lê Hồng Điệp, Phạm Bảo Yên (2017), “Tinh sạch và xác định hoạt tính của peptide deformylase từ *Helicobacter pylori* biểu hiện ở *Escherichia coli*”, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 33(1S), 262-266.
4. **Đỗ Thị Thanh Trung**, Phạm Thị Vui, Nguyễn Huyền Trang, Phạm Vinh Hoa, Nguyễn Thị Thanh Thi, Phạm Thị Lương Hằng, Phạm Bảo Yên (2018), “Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *Helicobacter pylori* của một số dịch chiết thảo dược Việt Nam”, *Tạp chí khoa học và công nghệ Việt Nam* 60(7), 23-27.
5. **Trung Do**, Trang Nguyen Huyen, Thai Ngan Ha, Nguyen Thi Huynh Nhu, Nguyen Van Lam, Nguyen Thi Thu Tram and Pham Bao Yen (2019), “Identification of Potential Anti-*Helicobacter pylori* Compounds from *Usnea undulata* Extracts”, *Natural Product Communications* 14 (7).
6. Nguyen Huyen Trang*, **Do Thi Thanh Trung***, Nguyen Thi Thanh Thi, Pham Thi Luong Hang, Pham Thi Vinh Hoa, Pham Bao Yen (2019), “Inhibitory effects of *Piper betle* extracts and potential compounds on *Helicobacter pylori*”, *Academia journal of biology* 41(4), 69–74 (*Co-first authors).
7. **Đỗ Thị Thanh Trung**, Phạm Bảo Yên (2016), “Screening of *Helicobacter pylori* peptide deformylase inhibiting compounds from Vietnamese medicinal plants to develop effective drugs for gastrointestinal diseases (poster)”, *Keystone Symposia Conference, D4: Gut Microbiota, Metabolic Disorders and Beyond*.