

Biểu hiện enzyme *Bst* Large Fragment tái tổ hợp và ứng dụng trong khuếch đại đẳng nhiệt phát hiện *Neisseria meningitidis*

Expression of recombinant *Bst* Large Fragment polymerase and its application in isothermal amplification for detecting *Neisseria meningitidis*

Đào Thị Huyền, Đào Thanh Quyên,
Trần Thị Thanh Huyền, Trần Thị Thu Hiền,
Ngô Tất Trung và Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Biểu hiện enzyme *Bst* Large Fragment (*Bst*LF) và ứng dụng trong phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt phát hiện *N. meningitidis*. **Đối tượng và phương pháp:** Plasmid *pET15b_BstLF_6XHis* mã hoá enzyme *Bst* Large Fragment được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Enzyme *Bst* Large Fragment được biểu hiện bằng chất cảm ứng đặc hiệu (IPTG) và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực. Đánh giá hoạt tính của enzyme *Bst* Large Fragment tự sản xuất và so sánh với enzyme thương mại trên mô hình vi khuẩn *N. meningitidis*. **Kết quả:** Điều kiện biểu hiện cho hiệu suất tốt nhất ở 37°C trong 4 giờ với 1mM chất cảm ứng IPTG. *Bst* Large Fragment thu được có độ tinh sạch cao, có hoạt tính tốt. Ứng dụng enzyme *Bst*LF tự sản xuất trong phản ứng LAMP phát hiện *N. meningitidis* được thiết lập trong vòng 50 phút với độ nhạy 10^2 bản sao/phản ứng, độ tin cậy 95%. **Kết luận:** Biểu hiện thành công enzyme *Bst*LF và ứng dụng trong xét nghiệm LAMP phát hiện *N. meningitidis* với ngưỡng phát hiện là 10^2 bản sao/phản ứng tương đương với enzyme thương mại *Bst* 3.0 DNA Polymerase.

Từ khóa: *N. meningitidis*, khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp, *Bst* Large Fragment.

Summary

Objective: Expression of *Bst* Large Fragment enzyme (*Bst*LF) and its application in isothermal amplification for detecting *N. meningitidis*. **Subject and method:** *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells were transformed with *pET15b_BstLF_6XHis* encoding plasmid was then induced with the specific inducer (IPTG); Using the affinity chromatography method. Its function was evaluated and compared with the commercial enzyme in the LAMP reaction for identifying *N. meningitidis*. **Result:** The best condition for expression of high-quality recombinant *Bst* Large Fragment enzyme in 37°C, 1mM IPTG in four hours. The reaction using an in-house enzyme for detecting *N. meningitidis* was established in 50 minutes. The sensitivity achieved was 10^2 copies/reaction (confidence is 95%). **Conclusion:** Expression of *Bst*LF enzyme and its application in LAMP assay for detecting *N. meningitidis* with a detection limit of 10^2 copies/reaction, equivalent to commercial *Bst* 3.0 DNA Polymerase enzyme.

Keywords: *N. meningitidis*, Loop-mediated isothermal amplification, *Bst* Large Fragment.

Ngày nhận bài: 31/5/2023, ngày chấp nhận đăng: 1/7/2023

Người phản hồi: Ngô Tất Trung, Email: tatrungngo@gmail.com - Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

1. Đặt vấn đề

Các kỹ thuật sinh học phân tử đóng vai trò quan trọng trong y học. Hiện nay, phản ứng chuỗi polymerase (PCR) là phương pháp được sử dụng rộng rãi nhất để khuếch đại DNA nhằm phát hiện và xác định các bệnh truyền nhiễm, rối loạn di truyền và các mục đích nghiên cứu khác. Tuy nhiên, nó đòi hỏi một máy điều nhiệt đắt tiền để tách hai chuỗi DNA và sau đó khuếch đại đoạn gen đích. Trong những năm gần đây, nghiên cứu mới trong sinh học phân tử về tổng hợp DNA in vivo chứng minh khả năng khuếch đại DNA trong điều kiện đẳng nhiệt mà không cần thiết bị luân nhiệt, giá thành rẻ, có thể khuếch đại và kéo dài chuỗi với độ nhạy cao. Có nhiều phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt đã được phát triển, tuy nhiên, theo xếp loại ấn phẩm nghiên cứu đã công bố, khuếch đại đẳng nhiệt DNA qua trung gian vòng (loop-mediated isothermal amplification of DNA - LAMP) là phổ biến nhất, đã được phát triển thương mại và có nhiều nghiên cứu công bố trong cộng đồng khoa học [1]. LAMP sử dụng từ 4 đến 6 đoạn mỗi được thiết kế bắt đặc hiệu với đoạn DNA đích bao gồm: F3, B3, FIP, BIP (có thể có thêm LF, LB). Các đoạn mỗi này được thiết kế sao cho chúng liên tục gắn vào mạch khuôn thúc đẩy quá trình khuếch đại và dịch chuyển sợi của enzyme tổng hợp mạch [2]. Do đó, sản phẩm tạo thành sau phản ứng LAMP là các đoạn DNA với một số vòng hình quả tạ tạo thành nhiều hình dạng và kích thước khác nhau, tạo hình ảnh nhiều dải băng trên gel điện di agarose.

Trong phản ứng LAMP, enzyme Bst DNA Polymerase đóng vai trò rất quan trọng. Bst DNA Polymerase được phân lập lần đầu tiên từ chủng *Bacillus stearothermophilus*. Loại enzyme này có đặc tính chịu nhiệt, hoạt động DNA polymerase loại dịch chuyển sợi, chúng tổng hợp một sợi DNA mới trong khi tự phân tách liên kết hydro của DNA mẫu sợi kép. Do đó, DNA có thể được tổng hợp ở nhiệt độ không đổi và quá trình tổng hợp không bị ức chế bởi cấu trúc thứ cấp của DNA [3]. Biến thể đầu tiên của enzyme này là Bst Polymerase Large Fragment, là một phần của protein *Bacillus stearothermophilus* DNA Polymerase, chúng thiếu miền 5' → 3' exonuclease, giúp tập trung cao độ hoạt tính dịch

chuyển sợi 5' → 3' polymerase của enzyme [4]. Sau này có thêm nhiều nghiên cứu tạo ra một số biến chủng mới giúp cải thiện chức năng, mới đây nhất là biến thể enzyme Bst 3.0 có thêm hoạt tính phiên mã ngược, đang được thương mại hoá [5, 6].

Việc chủ động tạo ra enzyme khuếch đại đẳng nhiệt là cần thiết chủ động nguồn sinh phẩm cho các nghiên cứu, đào tạo. Trong nghiên cứu này, hoạt tính 5' → 3' polymerase của enzyme khuếch đại đẳng nhiệt được quan tâm hơn cả trên đối tượng đích là DNA. Đây là lý do enzyme Bst Large Fragment tái tổ hợp được lựa chọn nghiên cứu sản xuất. Enzyme tự sản xuất được ứng dụng trong phản ứng LAMP trên mô hình vi khuẩn *N. meningitidis* gây bệnh viêm màng não. Chúng tôi mong rằng, việc chủ động nguồn nguyên vật liệu giúp các nghiên cứu tại Việt Nam tiếp cận dễ dàng hơn với các công nghệ mới, tiến tới tạo điều kiện thuận lợi nếu triển khai xét nghiệm nhanh và ứng dụng chẩn đoán tại hiện trường.

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Plasmid *pET15b_BstLF_6XHis*, chứa trình tự mã hoá cho enzyme Bst Large Fragment, được gửi tặng từ nhóm nghiên cứu thuộc Đại học Stanford, California. Tế bào khả biến *BL21 Star™ (DE3)pLysS One Shot™ Chemically Competent E. coli* (#C602003, Invitrogen); Gel sắc ký HisPur™ Ni-NTA Resin (#88221, ThermoFisher). Hoá chất Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), enzyme thương mại Bst Large Fragment (NEB, Ipswich, MA, USA), enzyme thương mại Bst3.0 (NEB, Ipswich, MA, USA), và bộ môi dùng trong phản ứng LAMP được đặt hàng từ Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA).

2.2. Biểu hiện và tinh chế enzyme Bst Large Fragment tái tổ hợp

Plasmid *pET15b_BstLF_6XHis* (Stanford, California), mang trình tự gen mã hóa protein Bst Large Fragment được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Khuẩn lạc thuần sau biến nạp được tăng sinh trong 5mL môi trường LB (1% peptone, 1% NaCl, 0,5% cao nấm men, pH 7,0-7,5) có bổ sung 100mg/mL kháng sinh ampicillin ở 37°C trong 8-12

giờ, lắc 160 vòng/phút. Sau đó, tiếp tục tăng sinh trong 500mL môi trường LB có bổ sung ampicillin, nuôi ở 37°C, lắc 160 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8. Tế bào được cảm ứng biểu hiện enzyme *Bst*LF bằng 0,5-1,5mM IPTG ở 37°C trong 3-7 giờ, lắc 160 vòng/phút. Sau đó, ly tâm 4000xg trong 10 phút ở 4°C thu sinh khối. Cặn tế bào được ly giải bởi dịch ly giải + Lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 5mM Imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 10% Glycerol), đảo trộn đều, phá tế bào bằng siêu âm theo chương trình 4ON-4OFF, Amplitude 40% trong 10 phút ở trên đá lạnh. Thu hồi protein tại pha lỏng bằng ly tâm với tốc độ tối đa (15.000xg) trong 45 phút tại 4°C (dịch thu hồi lysate).

Protein thu được trong dịch ly giải được tinh sạch theo phương pháp ái lực ion bằng Ni-NTA Resin (Thermo Scientific, USA). Hạt Ni-NTA Resin được chuyển vào ống eppendorf, sau đó ly tâm 500xg trong 2 phút, loại bỏ cặn. Hạt Ni-NTA được cân bằng bởi đệm cân bằng (50mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 5mM Imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 10% Glycerol), lắc đảo 5 phút sau đó loại dịch. Mẫu lysate được thêm vào ống chứa hạt Ni-NTA Resin, ủ lắc trên đá trong 5 phút. Tiếp tục ly tâm 500xg trong 2 phút và loại dịch. Hạt nhựa sau đó được rửa 2 lần với tỷ lệ 1:2 v/v đệm rửa - Wash buffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 40mM Imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 10% Glycerol). Rửa giải protein với tỷ lệ 1:1 v/v đệm rửa giải - Elution buffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 250mM Imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 20% Glycerol). Protein thu hồi được bảo quản trong đệm bảo quản - storage buffer (50mM Tris-HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 50% Glycerol) và bảo quản ở -20°C.

Protein sau tinh sạch được điện di trên gel SDS-PAGE (tham khảo quy trình từ Cold Spring Harbor Protocols [7]) để kiểm tra và đo nồng độ bằng phương pháp Bradford (tham khảo quy trình từ Bio-protocol [8]). Đồng thời, chúng cũng được đánh giá hoạt tính dựa trên mô hình khuếch đại gen *CtrA* phát hiện *N. meningitidis* bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp - LAMP có so sánh đối chiếu với hiệu suất của enzyme thương mại.

2.3. Tối ưu phản ứng sử dụng *Bst* Large Fragment cho khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp phát hiện *N. meningitidis*

Nghiên cứu sử dụng enzyme *Bst* LF đã tinh chế (in-house) trong tối ưu phản ứng LAMP phát hiện *N. meningitidis*. Phản ứng sử dụng 3 cặp môi khuếch đại vùng gen *CtrA* đặc hiệu cho chủng vi khuẩn (các trình tự cụ thể của các môi sẽ được cung cấp nếu độc giả quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả). Thành phần phản ứng bao gồm đệm Isothermal Amplification Buffer 1X (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 50-150mM KCl, 2-8mM MgSO₄, 0,1% Tween 20, pH 8,0-8,8 @25°C), 0-0,4M Betaine, 0,25mM dNTPs, 1,6μM mỗi FIP - BIP primer, 0,4μM mỗi F3 - B3 primer, 0,8μM mỗi LF - LB primer, enzyme *Bst*LF. Phản ứng được khảo sát ở khoảng nhiệt độ 60-65°C, trong thời gian từ 30-70 phút. Ngoài ra, hoạt tính khuếch đại của enzyme *Bst*LF in-house sẽ được so sánh với enzyme thương mại *Bst* large fragment (Neb) hoặc *Bst* 3.0 (Neb). Kiểm tra sản phẩm khuếch đại của phản ứng LAMP trên gel agarose 1,2%.

2.4. Xác định ngưỡng phát hiện *N. meningitidis* của phản ứng LAMP sử dụng *Bst*LF in-house trên mẫu chứng âm và panel chứng dương

Mẫu chứng âm là DNA được tách chiết từ dịch não tủy người nhiễm khuẩn khác mà không phải não mô cầu (DNA chứng âm). Panel chứng dương là chủng chuẩn *N. meningitidis* được tách chiết và pha loãng thành panel với độ pha loãng 10 lần, bao gồm các nồng độ: 10⁰ bản sao; 10¹ bản sao; 10² bản sao; 10³ bản sao. Mỗi mẫu lặp lại 20 lần. Ngưỡng phát hiện là nồng độ bản sao thấp nhất có thể phát hiện với độ tin cậy 95% (tức 19/20 lần phát hiện).

2.5. So sánh hoạt tính *Bst*LF tự sản xuất (*Bst*LF in-house) với *Bst* large fragment (NEB) và *Bst*3.0 (NEB) trong phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt LAMP phát hiện *N. meningitidis*

Phản ứng LAMP phát hiện *N. meningitidis* được thực hiện trong điều kiện phản ứng tối ưu của mỗi enzyme *Bst*LF in-house; *Bst* large fragment (NEB) và *Bst*3.0 (NEB) và sử dụng chung cùng bộ môi khuếch đại vùng gen *CtrA* đặc hiệu cho chủng vi khuẩn *N.*

meningitidis đã thiết kế. Thành phần phản ứng bao gồm đệm Isothermal Amplification Buffer 1X (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 50mM KCl, 2mM MgSO₄, 0,1% Tween 20, pH 8,0-8,8 @25°C) đối với enzyme *BstLF in-house* hoặc 1X ThermoPol Reaction Buffer - NEB (đối với enzyme *Bst large fragment*) hoặc 1X Isothermal Amplification Buffer II - NEB (đối với *Bst3.0*), 0,4 M Betaine, 0,25mM dNTPs, 1,6µM mỗi FIP - BIP primer, 0,4 µM mỗi F3 - B3 primer, 0,8 µM mỗi LF - LB primer, enzyme *Bst* và enzyme T4gp32. Phản ứng được khảo sát ở khoảng nhiệt độ 63°C, trong thời gian 40 phút (đối với enzyme *BstLF in-house* và *Bst large fragment*) hoặc 20 phút đối với enzyme *Bst3.0*. Kiểm tra sản phẩm sau khuếch đại của phản ứng LAMP trên gel agarose 1,2%.

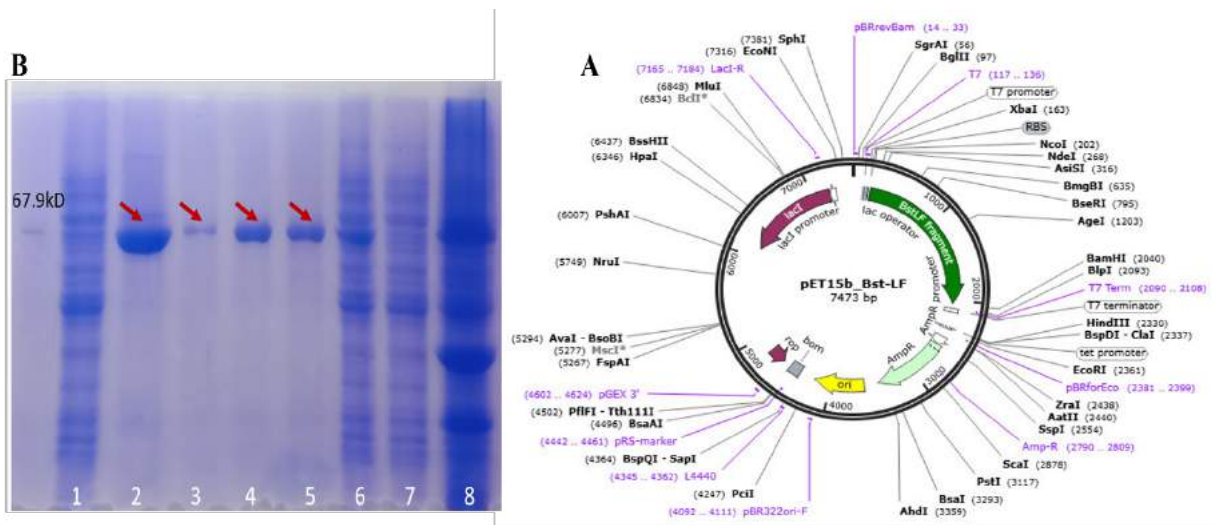
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Biểu hiện và tinh sạch enzyme *BstLF* tái tổ hợp

Hiện nay có nhiều biến thể của enzyme *Bst* DNA polymerase ứng dụng trong kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt bao gồm wild-type *Bst* polymerase, *Bst*

large fragment, *Bsm*, *Bst Br512*, *Bst v5.9*,... Đồng thời đã có nhiều biến thể cài gen trên các vector khác nhau. Tuy nhiên, chúng tôi lựa chọn *pET15b_Bst-LF* (Hình 1A) bởi đặc tính mạnh mẽ, chúng giữ lại cấu trúc gần như phần lớn cấu trúc của enzyme wild-type, nhưng thiếu miền 5' → 3' exonuclease và gen mã hóa cho protein liên kết đường maltose (Maltose Binding Protein) giúp *BstLF* có hoạt tính chuyển dịch sợi mạnh mẽ hơn. Hơn nữa, hệ biểu hiện T7 promoter cho hiệu suất biểu hiện cao và dễ dàng thao tác [9].

Nhóm nghiên cứu tiến hành tối ưu quy trình biểu hiện enzyme *BstLF* trên ba yếu tố là nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng và thời gian cảm ứng. Khoảng nhiệt độ khảo sát từ 16-37°C, nồng độ IPTG được khảo sát lần lượt ở nồng độ 0,5 – 1 - 2mM, và thời gian cảm ứng từ 3-7 giờ. Trong các điều kiện được thử nghiệm, nhận thấy rằng điều kiện biểu hiện ở 37°C trong 4 giờ với 1mM chất cảm ứng IPTG cho hiệu suất tốt nhất.



Chú thích hình B

- 1: Dịch chảy qua cột (wash buffer chứa 10mM Imidazole).
- 2: Protein thu hồi được sau rửa giải lần 1 (wash buffer chứa 10mM Imidazole).
- 3: Protein thu hồi sau rửa giải lần 2 (wash buffer chứa 10mM Imidazole).
- 4: Protein thu hồi được sau rửa giải lần 1 (wash buffer chứa 40mM Imidazole và rửa 2 lần).
- 5: Protein thu hồi được sau rửa giải lần 1 (wash buffer chứa 40mM và rửa 3 lần).
- 6: Dịch chảy qua cột (wash buffer chứa 40mM Imidazole và rửa 2 lần).
- 7: Dịch chảy qua cột (wash buffer chứa 40mM và rửa 3 lần).
- 8: Dịch lysate sau khi phá tế bào (chứa qua cột).

Hình 1. (A) Sơ đồ cấu trúc plasmid pET15b_Bst-LF chứa trình tự mã hoá protein *Bst* Large Fragment (nguồn: Addgene). (B) Hình ảnh điện di SDS-PAGE sau tinh sạch protein bằng HisPur™ Ni-NTA Resin bằng các đệm rửa khác nhau. Cột đầu tiên là băng đánh dấu có kích thước 67,9kD bằng với kích thước của protein *BstLF*. Các mũi tên đỏ chỉ băng protein *BstLF* thu hồi được sau tinh sạch.

Sau khi phá tế bào, protein được gắn lên cột bởi đuôi *6X-HisTag*, các protein không có đuôi này lập tức bị rửa trôi khỏi cột. Tỷ lệ các thành phẩm đậm trong quá trình tinh sạch cũng góp phần ảnh hưởng đến sự tinh sạch của enzyme sau thu hồi. Kết quả khảo sát thấy rằng ở nồng độ 40mM imidazole trong đệm rửa (wash buffer) được cho là tốt nhất để loại bỏ các protein tạp gắn không đặc hiệu trên cột và 250mM–500mM imidazole trong đệm rửa giải (elution buffer) thu hồi được lượng enzyme đích tối đa. Tuy nhiên vì điều kiện hạn chế, chúng tôi không có bước loại muối ra khỏi dung dịch đệm, trong khi đó imidazole nồng độ cao có thể gây ức chế các phản ứng sinh học phân tử sau này. Chính vì thế nhóm nghiên cứu quyết định chọn nồng độ 250mM imidazole cho elution buffer. Enzyme sau thu hồi được điện di SDS-PAGE thể hiện trên Hình 1.

Kết quả phân tích protein *BstLF* trên gel SDS-PAGE (Hình 1B) cho thấy dịch lysate có chứa nhiều băng trong đó có một băng đậm có kích thước tương đồng với băng 67,9kD (giếng 8). Sau tinh sạch chỉ còn một băng protein duy nhất ở giếng rửa giải, có kích thước 67,9kD, cho thấy protein sau tinh sạch không bị nhiễm bẩn bởi các protein tạp chất hoặc nội tại của chủng chủ *E. coli*. Rõ ràng khi tăng nồng độ imidazole trong dịch rửa giải từ 10mM lên 40mM thì các protein tạp chất không đặc hiệu trên cột đã bị loại bỏ hoàn toàn. Việc lặp lại bước rửa 2-3 lần cho kết quả độ sạch không khác biệt. Tuy nhiên, sản lượng thu hồi sẽ càng bị hao hụt nếu rửa quá nhiều lần. Các giếng protein thu hồi sau rửa giải lần 1 (giếng 2, 4, 5) đều cho hình ảnh bắt màu đậm, chứng tỏ hiệu suất thu hồi cao.

Sự tinh sạch protein ảnh hưởng rất nhiều các phản ứng sinh học phân tử. Một protein được tinh chế bị nhiễm bẩn các tạp chất có thể gây ra ức chế phản ứng diễn ra hoặc gây ra hiện tượng dương tính giả. Việc tạo ra một quy trình biểu hiện và tinh sạch đơn giản, đủ độ sạch phục vụ ứng dụng trong kỹ thuật sinh học phân tử là điều cần thiết. Nghiên cứu này đã tạo ra protein *BstLF* có ứng dụng trong phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt phát hiện não mô cầu.

Tuy nhiên, nhóm nghiên cứu không khuyến cáo sử dụng protein này để phát hiện vi khuẩn *E. coli* vì nó vật chủ trong quá trình biểu hiện, việc còn tồn dư DNA của chủng chủ trong dịch thu hồi protein là điều khó tránh khỏi.

3.2. Kết quả đo nồng độ enzyme *BstLF* theo Bradford assay

Nồng độ protein trong dung dịch thu hồi được đánh giá bằng phương pháp Bradford. Thuốc thử phản ứng chủ yếu với dư lượng arginine và phản ứng ít hơn với dư lượng histidine, lysine, tyrosine, tryptophan và phenylalanine. Thử nghiệm dựa trên quan sát rằng độ hấp thụ tối đa đối với dung dịch axit của Coomassie Brilliant Blue G-250 thay đổi từ 465nm sang 595nm khi xảy ra liên kết với protein. Phương pháp đo có phạm vi độ nhạy gần với 5 đến 100µg/mL protein [10].

Nồng độ BSA chuẩn	OD595
5	0,018466667
10	0,037166667
20	0,042466667
50	0,108933333
80	0,151266667
100	0,179266667

Hình 2. Xây dựng biểu đồ đường chuẩn Bradford. Đường chuẩn được xây dựng bởi 6 nồng độ BSA bao gồm (5ng/uL, 10ng/uL, 20ng/uL, 50ng/uL, 80ng/uL, 100ng/uL) tuyến tính với giá trị OD₅₉₅ theo hàm số $y = 0,0017x + 0,015$ với x là nồng độ protein (ng/uL) và y là giá trị OD₅₉₅ của phức hợp thuốc thử-protein.

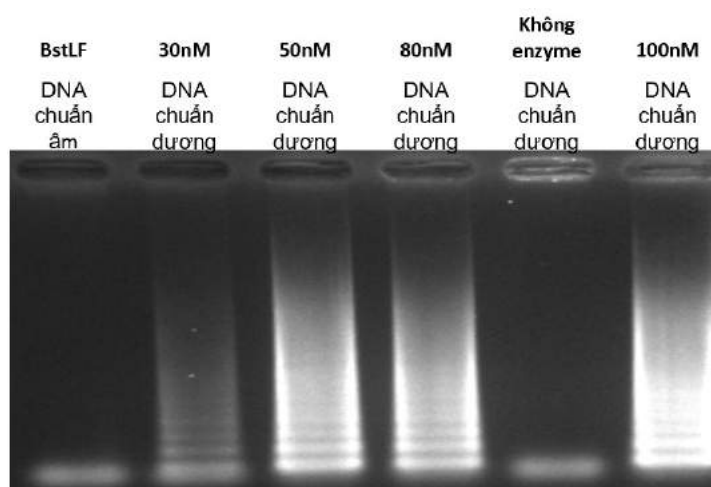
Trong phép đo này, đường chuẩn được xây dựng từ BSA tuyến tính trong khoảng từ 5ng/uL-100ng/uL. Tiếp theo, pha loãng protein *BstLF* theo các hệ số lần lượt là 2 - 4 - 10 lần. Mỗi nồng độ được đo lặp lại 3 lần, sau đó lấy giá trị trung bình. Nồng độ protein được tính theo công thức trong Bảng 1.

Bảng 1. Bảng kết quả đo nồng độ protein BstLF theo phương pháp Bradford

BstLF (A)	OD595 (B)	Hệ số pha loãng (C)	Nồng độ protein (ng/uL) ($D=C*(B-0,015)/0,0017$)	Nồng độ protetin trung bình (ng/uL) ($E=\sum D/3$)	Nồng độ protein trung bình (uM)
Rửa 2 lần Wash buffer (40mM imidazole)	0,142633	2	150,1569	141,5556	2,1
	0,074167	4	139,2157		
	0,038	10	135,2941		
Rửa 3 lần Wash buffer (40mM imidazole)	0,1021	2	102,4706	108,7712	1,61
	0,060967	4	108,1569		
	0,034667	10	115,6863		

Từ kết quả trên cho thấy, nồng độ protein bị giảm đi khi tăng bước rửa từ 2 lần lên 3 lần. Do đó, quy trình thực hiện 2 bước rửa là phù hợp và không nên rửa quá nhiều ở nồng độ cao imidazole. Tuy nhiên Bradford có một nhược điểm là chỉ đo được nồng độ protein tổng số. Điều này có nghĩa không phải tất cả protein đo được đều là protein đích và đều có hoạt tính. Chính vì vậy, protein sau tinh chế cần được trải qua thí nghiệm khảo sát hoạt tính.

3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme BstLF trong phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt LAMP

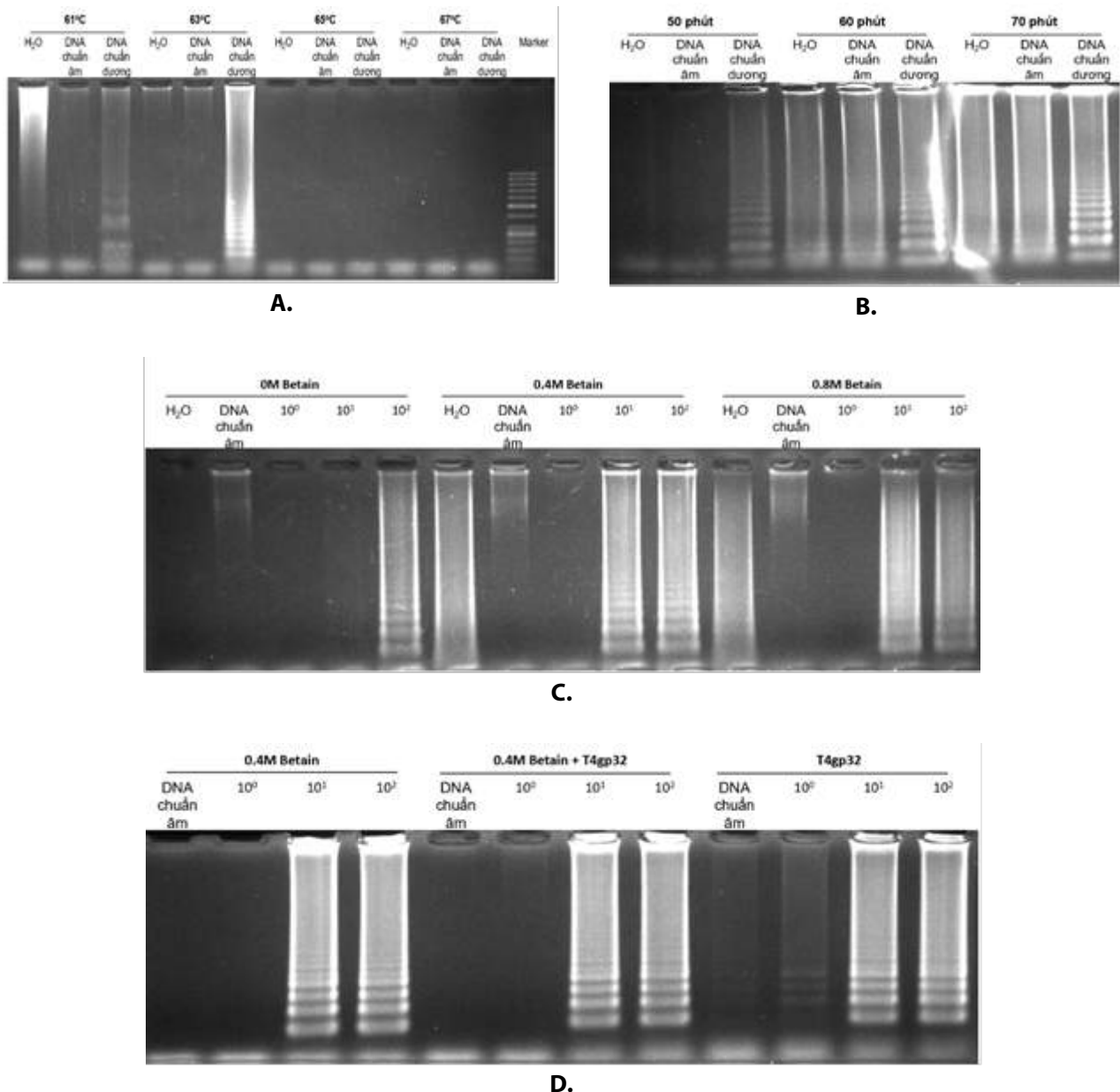


Hình 3. Hình ảnh điện di kết quả khảo sát hoạt tính enzyme BstLF tinh sạch được bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP.

Kết quả khuếch đại LAMP cho thấy dãy băng với nhiều kích thước khác nhau (ladder) trên gel điện di agarose. Kết quả khuếch đại cũng khác nhau khi nồng độ enzyme thay đổi. Ở phản ứng không chứa enzyme BstLF, không thu được tín hiệu. Với lượng khảo sát từ 30nM-100nM, thấy rằng từ 50nM đến 100nM cho hình ảnh rõ nét trên gel điện di, không có hiện tượng dương tính giả ở các mẫu DNA chứng âm hoặc mẫu không bổ sung enzyme. Điều này chứng tỏ, enzyme BstLF tinh sạch được có hoạt tính, và độ tinh khiết có thể ứng dụng trong phản ứng kéo dài chuỗi.

3.4. Kết quả tối ưu phản ứng sử dụng Bst Large Fragment cho khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp phát hiện *N. meningitidis*

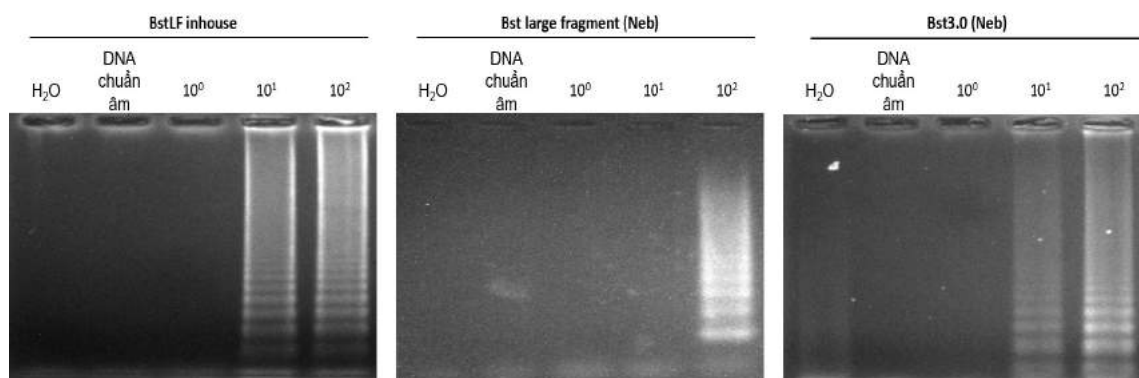
Nhằm cải thiện kết quả phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp phát hiện *N. meningitidis*, nhóm nghiên cứu thực hiện tối ưu dựa trên các yếu tố bao gồm nồng độ enzyme, nhiệt độ, thời gian phản ứng, nồng độ $MgSO_4$, KCl...



Hình 4. Hình ảnh điện di kết quả tối ưu phản ứng LAMP phát hiện *N. meningitidis* sử dụng enzyme BstLF. Tối ưu nhiệt độ phản ứng; (B) Tối ưu thời gian phản ứng; (C) Tối ưu nồng độ Betain trong đệm phản ứng; (D) T4gp32 góp phần ổn định phản ứng.

Hiệu suất khuếch đại LAMP tốt nhất ở nhiệt độ là 63°C (Hình A), thời gian phản ứng tối ưu là 50 phút (Hình B). Kết quả nghiên cứu chỉ ra xu hướng bắt cặp mỗi không đặc hiệu ở nhiệt độ thấp và bắt cặp khó khăn ở nhiệt độ cao; thời gian phản ứng quá lâu gây ra hiện tượng dương tính giả ở các mẫu âm tính. Xu hướng này cũng được chỉ ra bởi các nghiên cứu trước đây bởi Luo Z và cộng sự [11] và nghiên cứu của

Hardinge P và Murray JAH [12]. Nhằm tối ưu thành phần đệm phản ứng, một dải nồng độ từ 2 mM đến 8mM MgSO₄ và từ 50mM đến 150mM KCl được khảo sát. Kết quả cho thấy điều kiện phản ứng tối ưu khi sử dụng đệm chứa 2mM MgSO₄ và 50mM KCl. Ngoài ra, nghiên cứu cũng khảo sát đối chất hỗ trợ phản ứng như betain giúp giảm hoặc thậm chí loại bỏ sự phụ thuộc vào thành phần cặp bazơ của quá trình chuyển đổi nóng chảy nhiệt DNA, làm ổn định DNA, từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho việc tách mạch DNA [13, 14]. Đồng thời việc bổ sung thêm protein bám mạch đơn (single strand binding) T4gp32 giúp cho phản ứng ổn định và chính xác hơn. Rõ ràng, kết quả thí nghiệm trong nghiên cứu này đã chỉ ra, việc bổ sung Betain và T4gp32 hoàn toàn có lợi cho phản ứng và tăng độ nhạy gấp 10 lần từ 100 còn 10 bản sao/phản ứng so với phản ứng không có hai chất trên.



Hình 5. Hình ảnh so sánh kết quả phát hiện *N. meningitidis* bằng phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt LAMP sử dụng BstLF tự sản xuất (BstLF in-house) với Bst large fragment (NEB) và Bst3.0 (NEB).

Nhóm nghiên cứu thực hiện thí nghiệm song song, đánh giá hoạt tính của BstLF tự sản xuất so với enzyme Bst large fragment thương mại (NEB) và enzyme Bst3.0 thương mại (NEB) trong phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt phát hiện *N. meningitidis*. Kết quả cho thấy enzyme BstLF in-house có thể phát hiện được các mẫu từ 10 bản sao/phản ứng. Không xuất hiện hiện tượng dương tính giả ở các mẫu chứng âm. So với enzyme Bst large fragment thương mại (NEB) chỉ khuếch đại được mẫu ở nồng độ 100 bản sao/phản ứng, mặc dù nó có chung quy trình tối ưu so với BstLF in-house (63°C trong 50 phút). Tuy nhiên, BstLF in-house có hoạt tính dịch chuyển sợi tương đương với enzyme Bst 3.0 (NEB), cùng phát hiện được nồng độ 10 bản sao nhưng thời gian phản ứng 50 phút và lâu hơn khi sử dụng enzyme Bst3.0 cho kết quả sau phản ứng 20 phút. Đây có lẽ là nhược điểm của thể hệ enzyme BstLF so với enzyme Bst3.0. Ngoài ra, enzyme Bst3.0 còn thể hiện hoạt tính phiên mã ngược, nhưng enzyme BstLF thì không [15].

3.5. Kết quả ngưỡng phát hiện của phản ứng LAMP sử dụng BstLF in-house phát hiện *N. meningitidis* trên mẫu chứng âm và panel chứng dương.

Panel chứng dương là chủng chuẩn *N. meningitidis* được tách chiết và pha loãng thành panel với độ pha loãng 10 lần theo dải nồng độ: 10⁰; 10¹; 10²; 10³ bản sao. Mỗi mẫu lặp lại 20 lần. Kết quả được liệt kê trong Bảng 2 dưới đây:

Bảng 2. Kết quả phát hiện dương tính *N. meningitidis* bằng phản ứng LAMP sử dụng BstLF in-house sau 20 lần lặp lại tại mỗi nồng độ

Mẫu chuẩn	Dương tính
H ₂ O	0/20
DNA chuẩn âm	2/20
10 ⁰ bản sao/ phản ứng	4/20
10 ¹ bản sao/ phản ứng	3/20
10 ² bản sao/ phản ứng	19/20
10 ³ bản sao/ phản ứng	20/20

Như vậy, nghiên cứu đã biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme *Bst*LF ứng dụng phát hiện *N. meningitidis* dựa trên công nghệ khuếch đại đẳng nhiệt LAMP, là phương pháp đơn giản, nhanh chóng, chính xác. Kết quả lặp lại, nghiên cứu này xác nhận độ nhạy phát hiện là 10^2 bản sao/phản ứng (độ tin cậy 95% với 19/20 lần lặp lại), đôi khi phát hiện được từ 1-10 bản sao/phản ứng.

4. Kết luận

Biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme *Bst*LF và ứng dụng trong xét nghiệm LAMP phát hiện *N. meningitidis* với ngưỡng phát hiện là 10^2 bản sao/phản ứng, độ tin cậy 95%.

Lời cảm ơn: Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn Bộ Quốc Phòng đã tài trợ cho nghiên cứu này (mã số đề tài: 20208940).

Tài liệu tham khảo

- Oliveira BB, Veigas B and Baptista PV (2021) *Isothermal amplification of nucleic acids: The race for the next "gold standard"*. *Front. Sens.* 2:752600. doi: 10.3389/fsens.2021.752600.
- Mori Y, Notomi T (2009) *Chemotherapy, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases*. *J Infect Chemother* 15(2): 62-69.
- Alhassan A, Li Z, Poole CB, Carlow CK (2015) *Expanding the MDx toolbox for filarial diagnosis and surveillance*. *Trends Parasitol* 31(8): 391-400.
- Aviel-Ronen S, Qi Zhu C, Coe BP, Liu N, Watson SK, Lam WL, Tsao MS (2006) *Large fragment Bst DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues*. *BMC Genomics* 7: 1-10.
- Ma Y, Zhang B, Wang M, Ou Y, Wang J, Li S (2016) *Enhancement of polymerase activity of the large fragment in DNA polymerase I from Geobacillus stearothermophilus by site-directed mutagenesis at the active site*. *Biomed Res Int* 2016:2906484. doi: 10.1155/2016/2906484.
- Wang G, Ding X, Hu J et al (2017) *Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities*. *Sci Rep* 7, 13928. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13324-0>.
- Simpson RJ (2006) *SDS-PAGE of proteins*. *CSH Protoc* 2006(1):pdb.prot4313. doi: 10.1101/pdb.prot4313.
- He F (2011) *Bradford protein assay*. *Bio-101*: e45. DOI: 10.21769/BioProtoc.45.
- Du F, Liu YQ, Xu YS, Li ZJ, Wang YZ, Zhang ZX, Sun XM (2021) *Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production*. *Microb Cell Fact* 20(1):189. doi: 10.1186/s12934-021-01680-6..
- Bradford MM (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem* 72: 248-254. doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Luo Z, Ye C, Xiao H, Yin J, Liang Y, Ruan Z, Luo D, Gao D, Tan Q, Li Y, Zhang Q, Liu W, Wu J (2022) *Optimization of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for robust visualization in SARS-CoV-2 and emerging variants diagnosis*. *Chem Eng Sci* 251:117430. doi: 10.1016/j.ces.2022.117430.
- Hardinge P, Murray JAH (2019) *Murray, Reduced false positives and improved reporting of loop-mediated isothermal amplification using quenched fluorescent primers*. *Sci Rep* 9, 7400 . <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43817-z>.
- Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A, Weissman SM (1996) *Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content*. *Genome Res* 6(7): 633-638. doi: 10.1101/gr.6.7.633.
- Zou Y, Mason MG, Botella JR (2020) *Botella, Evaluation and improvement of isothermal amplification methods for point-of-need plant disease diagnostics*. *PLoS One* 15(6):e0235216. doi: 10.1371/journal.pone.0235216.
- da Silva SJR, Pardee K, Balasuriya UBR, Pena L (2021) *Development and validation of a one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for rapid detection of ZIKV in patient samples from Brazil*. *Sci Rep* 11(1): 4111. doi: 10.1038/s41598-021-83371-1.