

KHẢO SÁT ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN VÀ TINH CHẾ INTERLEUKIN-33 NGƯỜI DUNG HỢP VỚI SUMO TRÊN ESCHERICHIA COLI

Nguyễn Quốc Thái¹, Nguyễn Kim Hưng¹,
Tôn Thảo Vy¹, Vũ Thanh Thảo¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Interleukin (IL)-33 là một thành viên mới trong họ IL-1, đóng vai trò quan trọng trong các phản ứng miễn dịch ở người thông qua tương tác với thụ thể ST2. Do đó, IL-33 là một đích tác động tiềm năng để phát triển các thuốc điều trị các bệnh lý liên quan IL-33. Nhóm nghiên cứu đã thành công tạo dòng Escherichia coli mang plasmid biểu hiện IL-33 người tái tổ hợp dạng dung hợp với tag SUMO. **Mục đích:** khảo sát các điều kiện nuôi cấy và tinh chế IL-33 người tái tổ hợp. **Phương pháp:** Khảo sát các điều kiện nuôi cấy để thu protein dạng tan: môi trường (LB, TB, ZYP-5052); nhiệt độ (25°C và 37°C). Tinh chế IL-33 dạng dung hợp bằng sắc ký ái lực cố định ion kim loại (IMAC) **Kết quả:** Chúng E. coli BL21(DE3) tái tổ hợp có khả năng tạo SUMO-IL-33 dạng tan với hiệu suất cao trong môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 ở 25°C. Từ 50mL dịch nuôi cấy tinh chế qua cột Ni Sepharose thu được khoảng 20 mg protein. **Kết luận:** Nghiên cứu đã khảo sát được các điều kiện nuôi cấy và tinh chế thích hợp để thu IL-33 tan ở dạng dung hợp với tag SUMO với hiệu suất cao.

Từ khóa: interleukin-33 người tái tổ hợp, IMAC, pET-SUMO, E. coli

SUMMARY

EXPRESSION AND PURIFICATION OF HUMAN INTERLEUKIN-33 FUSED WITH SUMO IN ESCHERICHIA COLI

Background: Interleukin (IL)-33 is a new member of the IL-1 superfamily that plays crucial roles in human immune responses via interaction with its ST2 receptor. IL-33 thus appears an attractive target for the drug development against IL-33 related disorders. Our research group has successfully transformed Escherichia coli with plasmid bearing human il33 gene fused with SUMO tag. **Objectives:** This study aims to examine the culture conditions and the purification process to obtain the recombinant IL-33. **Methods:** Expression conditions for optimal soluble recombinant IL-33 were examined, including culture medium (LB, TB, ZYP-5052); temperature (25°C and 37°C). The recombinant IL-33 fused with SUMO tag was purified by immobilized metal affinity chromatography method (IMAC). **Results:** The transformed E. coli BL21(DE3) can express soluble SUMO-IL-33 with high yield in autoinduction medium ZYP-5052 at 25°C. From 50 mL of bacterial culture, we

obtained approximately 20 mg of purified protein by Ni Sepharose column. **Conclusion:** In this study, we have examined the culture and the purification conditions suitable to obtain soluble SUMO-IL-33 with high yield. **Keywords:** recombinant human interleukin-33, IMAC, pET-SUMO, E. coli

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

IL-33 là một thành viên mới trong họ IL-1, đóng vai trò quan trọng trong các quá trình viêm, nhiễm khuẩn và phản ứng tự miễn thông qua tương tác với thụ thể ST2. Những nghiên cứu trên động vật thử nghiệm và mô bệnh cho thấy IL-33 là một đích tác động đầy hứa hẹn để điều trị các rối loạn miễn dịch liên quan đến sự điều hòa tín hiệu của cytokin như hen suyễn, dị ứng, viêm khớp dạng thấp, xơ vữa động mạch [1].

Việc nghiên cứu sản xuất và phát triển thuốc mới dựa trên ức chế tương tác giữa IL-33 và thụ thể ST2 đòi hỏi sự chủ động trong nguồn cung IL-33. Hiện nay vẫn chưa có nhà cung cấp IL-33 trong nước trong khi nguồn nhập khẩu có giá thành khá cao. Bước đầu tiên nhóm nghiên cứu đã tạo thành công chủng Escherichia coli mang gen mã hoá cho il33 người được tối ưu hoá cho biểu hiện trên E. coli. Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành khảo sát các điều kiện nuôi cấy để thu lượng protein dạng tan và tinh chế IL-33 người tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực cố định ion kim loại (IMAC).

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Khảo sát biểu hiện protein tái tổ hợp. E. coli BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp pET-SUMO-il33 được cấy hoạt hóa trong môi trường LB (bổ sung kanamycin 50 µg/mL, glucose 1%), lắc ở 37 °C qua đêm. Sau đó vi khuẩn tái tổ hợp được cấy chuyển sang các môi trường khảo sát (mục 2.2) bổ sung kanamycin 50µg/mL, glucose 1%, lắc ở 37°C, 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào đạt OD₆₀₀ = 0,6–0,8, cảm ứng bằng isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) 0,1 mM đối với môi trường LB và TB. Tiếp tục nuôi cấy qua đêm trong điều kiện nhiệt độ khảo sát. Ly tâm thu sinh khối tế bào ở tốc độ 6000 × g trong 10 phút. Phân tán sinh khối trong dung dịch đệm A chứa natri phosphat 50 mM pH 7,8; NaCl 400 mM; KCl 100 mM; glycerol 10%. Tán siêu âm phá tế bào, ly tâm ở 13000 × g, 30 phút ở 10°C.

¹Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Quốc Thái

Email: ngthai@ump.edu.vn

Ngày nhận bài: 9.2.2024

Ngày phản biện khoa học: 25.3.2024

Ngày duyệt bài: 26.4.2024

Phân tích sự biểu hiện protein bằng SDS-PAGE.

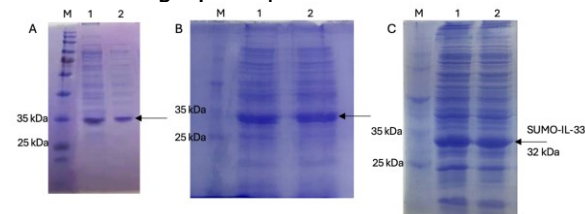
2.2. Khảo sát điều kiện nuôi cấy. Tiến hành khảo sát các điều kiện sau đây: Môi trường nuôi cấy: LB, TB (0,1 mM IPTG), môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 [2] ở nhiệt độ 37°C như mục 2.1; Nhiệt độ nuôi cấy sau khi cảm ứng với IPTG trong môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 ở nhiệt độ 25 °C và 37 °C. Sau khi nuôi cấy, theo dõi và thu sinh khối tế bào và phân tích biểu hiện protein bằng SDS-PAGE theo mục 2.1.

2.3. Tinh chế IL-33 tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực trên cột Ni Sepharose. Dịch tế bào thu được sau khi phá tế bào và ly tâm (mục 2.1) trong đệm A được bổ sung imidazol 10 mM trước khi nạp lên cột Ni Sepharose 1,0 mL (đã được cân bằng trước với cùng loại đệm). Sau khi thu mẫu protein không bám cột, rửa cột bằng đệm A bổ sung imidazol với nồng độ tăng dần: 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM. Các phân đoạn rửa giải được phân tích bằng SDS-PAGE và nồng độ protein được định lượng bằng phương pháp Bradford [3].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Khảo sát điều kiện nuôi cấy thích hợp để thu protein tan

Môi trường nuôi cấy. Nuôi cấy chủng vi khuẩn E. coli BL21(DE3) chứa vector pET-SUMO-il33 tái tổ hợp ở nhiệt độ 37 °C trong 03 môi trường: LB + IPTG 0,1 mM; TB + IPTG 0,1 mM và môi trường ZYP-5052, thu được lượng sinh khối lần lượt là 0,62 g; 0,81 g và 0,85 g từ 50 mL dịch nuôi cấy. Kết quả điện di SDS-PAGE (Ảnh 1) cho thấy SUMO-IL-33 biểu hiện thành công dưới dạng protein tan trên cả ba môi trường. Trong đó, môi trường ZYP-5052 và môi trường TB cho sinh khối cao hơn môi trường LB. Môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 cho hiệu quả kinh tế cao hơn so với sử dụng chất cảm ứng IPTG có giá thành khá cao. Do đó, trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn môi trường ZYP-5052 cho các thí nghiệm tiếp theo.

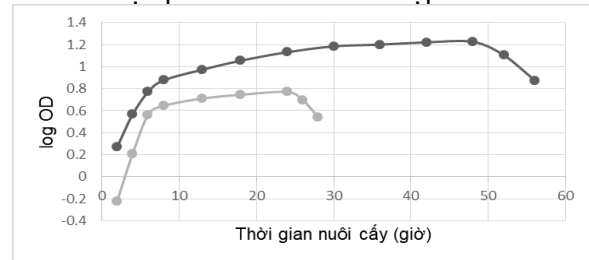


Ảnh 1: Biểu hiện protein khi nuôi cấy trong môi trường LB (A), TB (B) và ZYP-5052 (C)

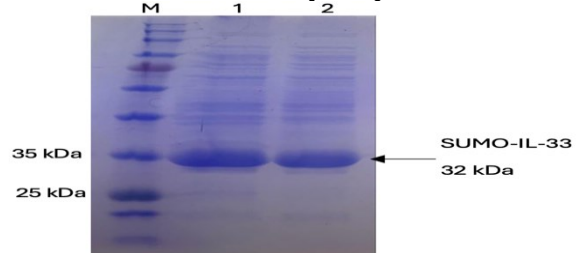
M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng; 2: protein tan

Nhiệt độ nuôi cấy. Chủng E. coli BL21

(DE3) mang vector tái tổ hợp pET-SUMO-il33 được nuôi cấy trong 50 mL môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 ở nhiệt độ 25 °C. Theo dõi độ hấp thụ OD ở bước sóng 600 nm và thu hoạch sinh khối tế bào sau 48 giờ. Thời gian nuôi cấy vi khuẩn E. coli BL21(DE3) chứa vector pET-SUMO-il33 trong môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 ở nhiệt độ 25 °C (48 giờ) dài hơn so với khi nuôi cấy ở 37 °C (24 giờ). Dựa vào OD₆₀₀ thu được trong suốt quá trình tăng trưởng cho thấy mật độ tế bào khi nuôi cấy ở 25 °C cao gấp 2-3 lần so với khi nuôi cấy ở 37 °C. Như vậy, ở 25 °C E. coli tăng trưởng chậm hơn, mật độ tế bào tăng đáng kể so với khi nuôi cấy ở 37 °C (Ảnh 2). Tổng sinh khối thu được từ 50 mL dịch nuôi cấy đạt 1,13 g. Kết quả SDS-PAGE (Ảnh 3) cho thấy ở nhiệt độ 25 °C SUMO-IL-33 đã được cảm ứng biểu hiện thành công và tồn tại dưới dạng hòa tan. Năng suất biểu hiện protein khá cao, xấp xỉ 60% tổng lượng protein toàn phần ước lượng trên SDS-PAGE. Do đó, chúng tôi lựa chọn môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 ở nhiệt độ 25 °C để biểu hiện protein IL-33 tái tổ hợp.



Ảnh 2: Đường cong sinh trưởng của vi khuẩn tái tổ hợp ở 25°C (đen) và 37°C (xám)



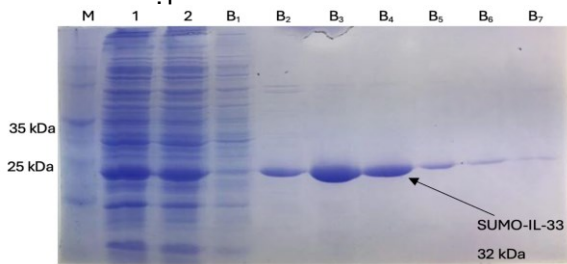
Ảnh 3: Biểu hiện protein khi nuôi cấy trong môi trường ZYP-5052 ở 25 °C

M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng; 2: protein tan

3.2. Tinh chế SUMO-IL-33 bằng sắc ký ái lực trên cột Ni Sepharose

E. coli BL21(DE3) mang plasmid biểu hiện SUMO-IL-33 được nuôi cấy trong môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 ở 25 °C và được tinh chế theo phương pháp sắc ký ái lực với cột Ni Sepharose (mục 2.3). Kết quả phân tích protein

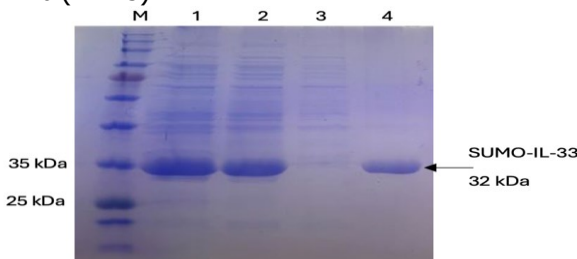
từ các phân đoạn dịch rửa giải chứa nồng độ nồng độ imidazol tăng dần từ 10–500 mM được trình bày trong ảnh 4. Khi cho dịch đồng thể qua cột, phần lớn SUMO-IL-33 bám cột và xuất hiện rất ít ở dịch rửa giải với nồng độ 10 mM imidazol. Khi rửa giải với nồng độ imidazol tăng dần, SUMO-IL-33 bắt đầu xuất hiện ở phân đoạn chứa 50 mM imidazol; phân đoạn chứa 100 mM và 150 mM imidazol rửa giải được phần lớn lượng SUMO-IL-33 có trong cột. Lượng SUMO-IL-33 còn lại không đáng kể ở phân đoạn rửa giải với nồng độ imidazol từ 200 mM trở lên (Ảnh 4). Do đó, chúng tôi chọn dung dịch rửa giải đệm là A có bổ sung imidazol 150 mM để tinh chế protein IL-33 tái tổ hợp.



Ảnh 4: Khảo sát điều kiện tinh chế SUMO-IL-33 từ cột Ni Sepharose

M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng; 2: protein tan; 3: protein không bám cột; B1–B7: Phân đoạn rửa với đệm A chứa imidazol 10, 50, 100, 150, 200, 250, 500 mM.

Lặp lại thí nghiệm và tinh chế SUMO-IL-33 bằng cách rửa giải với đệm chứa imidazol 150 mM, lượng protein thu được là 20,15 mg từ 50 mL dịch nuôi cấy. Hiệu suất tinh chế đạt khoảng 27% (Ảnh 5).



Ảnh 5: Tinh chế SUMO-IL-33 từ 50 mL dịch nuôi cấy

M: Thang chuẩn protein; 1: protein tổng cộng; 2: protein tan; 3: protein không bám cột; 4: SUMO-IL-33 rửa giải với đệm A chứa imidazol 150 mM.

IV. BÀN LUẬN

Môi trường LB có hàm lượng dinh dưỡng phong phú và tính thẩm thấu của nó phù hợp cho pha tăng trưởng của tế bào. Tuy nhiên, thực

tế nó không phải là lựa chọn tốt nhất để đạt được mật độ tế bào nuôi cấy cao. Môi trường TB đã được chứng minh tạo được mật độ tế bào cao hơn môi trường LB [4]. Khi nuôi cấy trong môi trường LB và TB, cần phải bổ sung chất cảm ứng IPTG khi OD₆₀₀ đạt 0,4-0,6. Bên cạnh đó, môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 được coi là môi trường tối ưu để nuôi cấy tế bào. Môi trường này sử dụng glucose, lactose và glycerol để tối ưu hóa điều kiện cảm ứng. Glucose là nguồn carbon tối ưu cho pha tăng trưởng của tế bào, khi nguồn glucose cạn kiệt, tế bào sử dụng nguồn carbon từ lactose-chất cảm ứng của operon lac [4]. Trong nghiên cứu này chúng tôi lựa chọn môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 với ưu thế về giá thành so với sử dụng IPTG.

Phản ứng kết tập nói chung của protein thường xảy ra ở nhiệt độ cao. Giảm nhiệt độ nuôi cấy giúp loại bỏ một phần các protease sốc nhiệt được tạo ra trong điều kiện biểu hiện quá mức và giảm hoạt động và biểu hiện của các chaperone, do đó làm tăng độ ổn định và tiềm năng cho protein gấp chính xác. Bên cạnh đó, nuôi cấy ở nhiệt độ thấp ức chế sự sao chép, phiên mã và dịch mã, protein được tạo ra chậm hơn và có thời gian để gấp cuộn đúng cách [5]. Kết quả khảo sát cho thấy ở 25 °C, E. coli tăng trưởng chậm hơn, lượng sinh khối thu được và lượng protein tan thu được tăng lên so với khi nuôi cấy ở 37°C.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã khảo sát điều kiện nuôi cấy vi khuẩn E. coli BL21(DE3) để thu IL-33 tái tổ hợp dạng tan trong quy mô phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy môi trường tự cảm ứng ZYP-5052 ở 25°C cho lượng protein tan lớn nhất. SUMO-IL-33 được tinh chế thành công bằng IMAC với cột Ni Sepharose sử dụng đệm rửa giải chứa imidazol nồng độ 150 mM, đạt hiệu suất 20,15 mg từ 50 mL dịch nuôi cấy.

VI. LỜI CẢM ƠN

Nhóm nghiên cứu cảm ơn Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ kinh phí thực hiện đề tài này thông qua hợp đồng nghiên cứu khoa học số 225/2020/HĐ-ĐHYD ngày 15/10/2020.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chen, W. Y., Tsai, T. H., Yanq, J. L., & Li, L. C.** (2018). "Therapeutic strategies for targeting IL-33/ST2 signalling for the treatment of inflammatory diseases". *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(1), pp. 349-358.
2. **Studier, F. W.** (2005) "Protein production by

- auto-induction in high-density shaking cultures", Protein expression and purification, 41(1), pp. 207-234.
- Bradford, M. M.** (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Analytical biochemistry, 72(1-2), pp. 248-254.
 - Rosano G. L., Ceccarelli E. A.** (2014), "Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges", Frontiers in microbiology, 5, 172.
 - Sørensen H. P., Mortensen K. K.** (2005). "Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli", Microb Cell Fact, 4(1), 1.

ĐỘC LẬP CHỨC NĂNG TRONG SINH HOẠT VÀ CÁC YẾU TỐ LIÊN QUAN Ở NGƯỜI BỆNH SAU ĐỘT QUỴ TẠI BỆNH VIỆN PHỤC HỒI CHỨC NĂNG - ĐIỀU TRỊ BỆNH NGHỀ NGHIỆP

Phan Minh Hoàng¹

TÓM TẮT

Mục tiêu: Đánh giá khả năng độc lập chức năng trong hoạt động sinh hoạt hằng ngày và các yếu tố liên quan trên người bệnh đột quỵ não. **Đối tượng và phương pháp:** Nghiên cứu cắt ngang thực hiện trên người bệnh sống sót sau đột quỵ tại Bệnh viện Phục hồi chức năng - Điều trị bệnh nghề nghiệp từ tháng 4 đến 10 năm 2023. **Kết quả:** Nghiên cứu ghi nhận 204 người bệnh, độ tuổi trung bình là 56,6 tuổi, với 73,1% nam giới và 26,9% nữ giới. Thời gian nằm viện trung bình là 23,4 ngày. Tỷ lệ người bệnh hoàn toàn phụ thuộc vào người khác cho các hoạt động hàng ngày là 70,6%. Khi ra viện, tỷ lệ này giảm xuống còn 26,5%. Tình trạng phụ thuộc trầm trọng có sự thay đổi từ 25,0% tăng lên 29,9%. Các nhóm phụ thuộc vừa và phụ thuộc nhẹ cũng thể hiện sự thay đổi đáng kể sau điều trị. Có mối liên quan giữa nhóm tuổi, nơi ở, loại tổn thương não đến với khả năng hoạt động độc lập. **Kết luận:** Tỷ lệ phụ thuộc trong sinh hoạt của người bệnh sau đột quỵ khá cao. Có sự tiến triển đáng kể trong khả năng tự lập của bệnh nhân sau quá trình điều trị. Việc can thiệp sớm và kế hoạch điều trị cá thể hóa có thể đóng vai trò quan trọng quá trình cải thiện chức năng độc lập trong sinh hoạt hằng ngày của người bệnh. **Từ khóa:** độc lập chức năng trong sinh hoạt, phục hồi chức năng, sau đột quỵ

SUMMARY

ASSESSING FUNCTIONAL INDEPENDENCE IN DAILY ACTIVITIES AND RELATED FACTORS IN POST STROKE PATIENTS AT HO CHI MINH CITY HOSPITAL REHABILITATION - PROFESSIONAL DISEASES

Objectives: To evaluate the functional independence in daily activities and the related factors among stroke patients. **Methods:** A cross-sectional study conducted on stroke survivors at the Ho Chi

Minh City Hospital Rehabilitation - Professional Diseases from April to October 2023. **Results:** The study involved 204 patients with an average age of 56.6 years, comprising 73.1% males and 26.9% females. The average length of hospital stay was 23.4 days. Initially, 70.6% of patients were completely dependent on others for daily activities, which decreased to 26.5% upon discharge. There was a change in the severity of dependency, with the percentage increasing from 25.0% to 29.9%. Both moderate and mild dependency groups showed significant changes after treatment. There was a correlation between age group, place of residence, type of brain injury, and the ability to perform activities independently. **Conclusion:** The dependency rate in daily activities of stroke patients is quite high. There has been significant progress in patients' independence after treatment. Early intervention and personalized treatment plans can play a crucial role in improving patients' ability to independently perform daily activities.

Keywords: Functional independence in activities, rehabilitation, post-stroke.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đột quỵ não là vấn đề nghiêm trọng và đáng lo ngại thường gặp ở người cao tuổi, là nguyên nhân tử vong đứng thứ ba sau ung thư và các bệnh tim mạch [1]. Người bệnh đột quỵ não tại Việt Nam ngày càng gia tăng do nhiều yếu tố nguy cơ như tăng huyết áp, xơ vữa động mạch, bệnh lý tim mạch và rối loạn chuyển hóa. Tỷ lệ tử vong trong vòng một năm sau đột quỵ lên tới 40% và hơn 50% người sống sót phải đối mặt với tình trạng tàn tật ở mức độ từ trung bình đến nặng. Hậu quả của đột quỵ não không chỉ là tỷ lệ tử vong cao mà còn gây ra các di chứng lâu dài cho những người sống sót, bao gồm hạn chế vận động, khó khăn trong giao tiếp và tự chăm sóc, đặc biệt là liệt nửa người và khó nói. Phục hồi chức năng sau đột quỵ não là một phần quan trọng trong quá trình điều trị và hồi phục của người bệnh, tuy nhiên thực tế cho thấy sự quan

¹Bệnh viện Phục hồi Chức năng, Điều trị bệnh nghề nghiệp
Chịu trách nhiệm chính: Phan Minh Hoàng
Email: drminhhoang@gmail.com
Ngày nhận bài: 8.2.2024
Ngày phản biện khoa học: 22.3.2024
Ngày duyệt bài: 25.4.2024