

Đánh giá hiệu quả sử dụng dịch ly giải tế bào *Escherichia coli* biểu hiện enzyme *Bst* DNA polymerase dùng cho phản ứng LAMP

Trần Thị Hậu*, Trần Hồng Diễm, Phùng Thị Thu Hương

Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

*tthau@ntt.edu.vn

Tóm tắt

Bst DNA polymerase Large Fragment (*Bst*LF) là enzyme giữ vai trò tổng hợp mạch mới trong các phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng lặp (LAMP). Hiện nay, *Bst*LF thương mại sử dụng cho LAMP có giá thành cao, trong khi *Bst*LF tự sản xuất cần quy trình tinh sạch phức tạp và khó giữ được hoạt tính lâu dài. Do đó, nghiên cứu này phát triển phương pháp nhằm đơn giản hóa quy trình bằng cách biểu hiện *Bst*LF trong *Escherichia coli* BL21(DE3) và sử dụng trực tiếp dịch ly giải tế bào thay vì tinh sạch enzyme. *E. coli* BL21(DE3) được cảm ứng biểu hiện *Bst*LF bằng IPTG 0,05 mM ở 37 °C trong 4 giờ, sau đó thu tế bào và ly giải ở 65 °C trong vòng 30 phút. Dịch ly giải từ 6×10^{11} tế bào được bổ sung trực tiếp vào phản ứng LAMP và có thể phát hiện tối thiểu 10^3 fg DNA hệ gen của các vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* và *Salmonella enterica*. Nghiên cứu đã chứng minh việc sử dụng dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF hoàn toàn có thể thay thế cho *Bst*LF tinh sạch trong phản ứng LAMP, cung cấp nguồn sinh phẩm giá rẻ phù hợp cho các ứng dụng nghiên cứu và đào tạo.

Nhận 19/03/2025

Được duyệt 23/05/2025

Công bố 28/06/2025

Từ khóa

E. coli BL21(DE3), *Bst*LF, LAMP, dịch ly giải tế bào

© 2025 Journal of Science and Technology - NTTU

1 Đặt vấn đề

Phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt trung gian vòng lặp (Loop Mediated Isothermal Amplification – LAMP) là một kỹ thuật sinh học phân tử được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu và xây dựng các bộ sinh phẩm chẩn đoán nhanh và chính xác các tác nhân gây bệnh như vi rút, vi khuẩn, và ký sinh trùng. LAMP sở hữu những ưu điểm nổi bật về quy trình thực hiện đơn giản, không yêu cầu thiết bị luân nhiệt, giá thành rẻ và khả năng khuếch đại trình tự mục tiêu nhanh với độ nhạy cao. LAMP có thể nhân bản chính xác trình tự axit nucleic mục tiêu trong điều kiện đẳng nhiệt từ (60-65) °C chỉ trong vòng (15-60) phút nhờ sự hoạt động cùng lúc của từ (4-6) môi được thiết kế chuyên biệt và một enzyme *Bst* DNA polymerase có khả năng vừa tách mạch vừa tổng hợp mạch mới [1].

Trong phản ứng LAMP, enzyme *Bst* DNA polymerase giữ vai trò quyết định hoạt động khuếch đại trình tự axit nucleic. *Bst* DNA polymerase là một enzyme bền nhiệt, có nguồn gốc từ vi khuẩn *Geobacillus stearothermophilus*. *Bst*LF là một phần của protein *Bst* DNA polymerase có chiều dài khoảng 592 axit amin và khối lượng phân tử khoảng 67,9 kDa [2]. *Bst*LF có hoạt tính polymerase 5'-3' nhưng thiếu hoạt tính exonuclease 3'-5'. Do đó, trong phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt, *Bst*LF tập trung vào hoạt tính dịch chuyển sợi và tổng hợp mạch mới dựa trên mạch đơn tách ra từ sự phân tách liên kết hydro từ mạch kép [3]. Ứng dụng của enzyme *Bst*LF bị hạn chế do chi phí thương mại cao, thời gian vận chuyển kéo dài và yêu cầu bảo quản nghiêm ngặt, dẫn đến làm giảm khả năng tiếp cận và

ảnh hưởng đến tính sẵn có của enzyme trong nghiên cứu và phát hiện mầm bệnh [4, 5].

Để khắc phục những hạn chế trên, một số nghiên cứu đã tập trung cải tiến quy trình biểu hiện và tinh sạch *Bst*LF tái tổ hợp, hướng đến việc tạo ra enzyme có hoạt tính cao, ổn định và thuận tiện hơn cho ứng dụng thực tế [6, 7]. *Bst*LF tái tổ hợp đã được biểu hiện và tinh sạch thành công từ vi khuẩn *Escherichia coli* BL21(DE3)*pLysS* và ứng dụng trong phát hiện chính xác *Neisseria meningitidis* [7]. Tại Việt Nam, enzyme Br512, một biến thể của *Bst*LF có hoạt tính mạnh trong tổng hợp DNA và hoạt tính phiên mã ngược tương tự *Bst*3.0, cũng đã được biểu hiện thành công bằng BL21(DE3) và được tinh sạch để sử dụng trong phản ứng LAMP phát hiện vi rút HPV18 và SARS-CoV-2 [8, 9]. Tuy nhiên, các nghiên cứu trước đều cần thực hiện quá trình tinh sạch *Bst*LF với nhiều bước phức tạp, tốn thời gian và phải đảm bảo điều kiện tinh chế, bảo quản để enzyme duy trì được hoạt tính. Để đơn giản hóa quy trình, tiết kiệm thời gian và chi phí, nghiên cứu này đã loại bỏ bước tinh chế protein, sử dụng trực tiếp dịch ly giải tế bào chứa *Bst*LF trong phản ứng LAMP nhằm phát hiện axit nucleic của vi khuẩn gây bệnh. Đối với lĩnh vực nghiên cứu trong nước, đây là tiếp cận đầu tiên sử dụng trực tiếp dịch ly giải tế bào biểu hiện enzyme *Bst*LF cho phản ứng LAMP. Kết quả nghiên cứu không chỉ đáp ứng mục tiêu cung cấp nguồn sinh phẩm tiện ích, giá rẻ phục vụ nhu cầu sử dụng tại phòng thí nghiệm mà còn góp phần tạo tiền đề để nghiên cứu các sinh phẩm tế bào có giá trị ứng dụng trong chẩn đoán nhanh mầm bệnh tại hiện trường.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Chủng *E. coli* BL21(DE3) (NEB) được dùng để biểu hiện protein *Bst*LF. Plasmid pET21a(+)-*Bst*LF-6xHis (mã số Addgene: 159148), chứa trình tự mã hóa cho enzyme *Bst*LF, trọng lượng phân tử ước tính khoảng 67,9 kDa, được sử dụng làm vector tái tổ hợp biểu hiện *Bst*LF. Môi trường Luria-Bertani (LB) (1 % Peptone, 1 % NaCl, 0,5 % Cao nấm men) được sử dụng làm môi trường nuôi cấy và biểu hiện của BL21(DE3)/*Bst*LF.

DNA hệ gen của *P. aeruginosa* (Phòng thí nghiệm Vi sinh – Viện Kỹ thuật Công nghệ cao NTT), *S. aureus*

ATCC6538, *S. enterica* ATCC14028 được tách chiết bằng bộ sinh phẩm tách chiết Monarch Genomic DNA Purification Kit (NEB) và sử dụng làm trình tự gen mục tiêu cho phản ứng LAMP. Chất lượng và nồng độ DNA hệ gen vi khuẩn sau khi tách chiết được xác định bằng máy Nanodrop One^c (Thermo Scientific). Các bộ mẫu dùng trong phản ứng LAMP được thiết kế dựa trên vùng gen đặc hiệu của các chủng vi khuẩn mục tiêu bằng phần mềm Primer Explorer v.5 và được đặt tổng hợp từ Công ty Phù Sa Genomics, Cần Thơ (Bảng 1P).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Biến nạp plasmid pET21a(+)-*Bst*LF-6xHis vào tế bào *E. coli* BL21(DE3)

Khoảng 5 ng plasmid pET21a(+)-*Bst* LF-6xHis được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42 °C trong 45 giây. Sau biến nạp, các khuẩn lạc thuần được chọn lọc trên đĩa thạch LB bổ sung ampicillin 100 µg/mL (LB-Amp100). Sự có mặt của gen mục tiêu trong các khuẩn lạc được xác định bằng PCR khuẩn lạc, sử dụng bộ sinh phẩm MyTaqTM HS DNA Polymerase (Bioline, England). Chu trình nhiệt phản ứng PCR được thiết lập theo hướng dẫn của nhà sản xuất và sử dụng cặp mồi T7pro đặc hiệu với vùng promoter T7 trên plasmid pET21a(+) (Bảng 1P) để khuếch đại trình tự chứa gen mục tiêu *Bst*LF. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di gel agarose 1 % với kích thước sản phẩm dự kiến là 1952 cặp base (bp).

2.2.2 Kiểm tra biểu hiện *Bst*LF tái tổ hợp bằng SDS-PAGE và lai Western Blot

Chủng *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF được hoạt hóa trong 10 mL LB-Amp100 ở 37 °C trong vòng (16-18) giờ. Sau đó, dịch vi khuẩn được cấy chuyển sang 10 mL môi trường LB-Amp100 với tỉ lệ 1/10 (v/v) và nuôi lắc 150 vòng/phút ở 37 °C đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8. Biểu hiện *Bst*LF được cảm ứng bằng IPTG 1 mM tại 37 °C trong 4 giờ. Sau cảm ứng, sinh khối tế bào được thu bằng ly tâm. Tế bào được xử lý với PBS 1X, SDS 10 % và Protein Loading Dye 4X (tỉ lệ 2:1:1) trong 10 phút ở 100 °C để có được mẫu protein tổng số. 10 µL mẫu protein tổng số được nạp vào mỗi giếng trên gel SDS-PAGE 12,5 % và tiến hành điện di ở 150 V trong 90 phút. Gel được nhuộm với chất nhuộm Coomassie Brilliant Blue trong 2 giờ, sau đó giải nhuộm đến khi nền gel trong suốt để quan sát kết quả.

Sự hiện diện của *Bst*LF được xác nhận lại bằng phương pháp lai Western Blot. Theo đó, 2 μ L mẫu protein tổng số được nạp trên gel SDS-PAGE để sử dụng cho Western Blot. Protein được chuyển lên màng nitrocellulose và lai với kháng thể đơn dòng Anti-6*His được đánh dấu HRP (Proteintech, Singapore) (1:10000) bắt đặc hiệu với đuôi 6*His-tag gắn trên protein *Bst*LF. *Bst*LF được phát hiện bằng bộ kit ECL (Amersham Bioscience, England).

2.2.3 Khảo sát điều kiện tối ưu cho biểu hiện *Bst*LF

Biểu hiện của *Bst*LF được đánh giá ở các điều kiện khác nhau bao gồm nồng độ IPTG (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; và 1) mM, nhiệt độ cảm ứng (18; 25; 30; và 37) °C và thời gian cảm ứng từ (0; 2; 4; và 6) giờ. Sau cảm ứng, tế bào được ly tâm thu cặn và điện di SDS-PAGE để đánh giá mức độ biểu hiện *Bst*LF. Sự khác biệt về hiệu quả biểu hiện *Bst*LF giữa các điều kiện khác nhau được đánh giá bằng dữ liệu phân tích từ phần mềm phân tích Gel Analyzer 23.1. Sau khi chọn vùng và các band cần phân tích, phần mềm hiển thị giá trị Raw volume, đây là thông số thể hiện mật độ điểm ảnh của các band protein. Tỷ lệ giá trị Raw volume của protein mục tiêu và protein tổng số cung cấp một giá trị tương đối về mức độ khác biệt biểu hiện protein tái tổ hợp giữa các điều kiện khác nhau.

Sau khi xác định các điều kiện tối ưu cho biểu hiện của *Bst*LF, nghiên cứu biểu hiện *Bst*LF ở thể tích 100 mL môi trường LB, trải đĩa để định lượng tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF. Dịch nuôi cấy vi khuẩn còn lại được ly tâm để thu sinh khối và giữ ở -80 °C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.4 Đánh giá hoạt tính của dịch ly giải *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF trong phản ứng LAMP

Tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF được ly giải trong nước Mili-Q ở 65 °C trong vòng 30 phút, vortex sau mỗi 10 phút ủ, sau đó ly tâm 6 000 rpm trong 3 phút bằng máy ly tâm Spindown (Clever Scientific, England) để làm lắng cặn tế bào. Trong nghiên cứu trước đó, phản ứng LAMP có thể hoạt động khi bổ sung (2×10^7) tế bào *E. coli* biểu hiện *Bst*, do đó, nghiên cứu này sử dụng dịch ly giải trong khoảng từ (10^7 - 10^{12}) tế bào để bổ sung trực tiếp vào phản ứng LAMP và đánh giá lượng dịch ly giải tế bào phù hợp để mang lại hiệu quả khuếch đại của phản

ứng [4]. Phản ứng LAMP được thiết lập với thể tích 20 μ L bao gồm 1X Isothermal Amplification Buffer II (1X) (NEB), 6 mM $MgSO_4$, 1,4 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), 1,6 μ M mỗi mỗi FIP, BIP, 0,4 μ M mỗi mỗi F3/B3, 6X SYBR Green I, enzyme *Bst*LF thương mại được thay thế bằng các thể tích từ 1 μ L đến 10 μ L dịch chiết của *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF từ các ống tế bào với mật độ tương ứng 10^7 đến 10^{11} tế bào/ μ L, bổ sung nước Mili-Q để phản ứng đủ 20 μ L. Một ng DNA hệ gen của *S. aureus* được sử dụng cho phản ứng ban đầu đánh giá hoạt tính của dịch ly giải *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF. Phản ứng được ủ 65 °C bằng máy Realtime PCR Prime Pro 48 (Techne, England) trong 90 phút tương ứng với 90 chu kỳ, tín hiệu huỳnh quang được thu nhận sau mỗi chu kỳ. Sử dụng máy Realtime PCR để ủ phản ứng cho phép xác định thời điểm phản ứng LAMP dương tính là số chu kỳ mà tại đó cường độ tín hiệu huỳnh quang của SYBR Green tăng thể hiện qua đường cong tín hiệu qLAMP trên phần mềm Techne ProStudy. Kết quả phản ứng LAMP được kiểm tra lại bằng điện di gel agarose 1,5 %, 50 V trong 40 phút.

2.2.5 Định lượng tương đối hàm lượng protein *Bst*LF trong dịch ly giải *E. coli* BL21(DE3) tham gia vào phản ứng LAMP

Sau khi xác định lượng dịch chiết tế bào *E. coli* BL21(DE3) được sử dụng để phản ứng LAMP hoạt động hiệu quả, nghiên cứu đã định lượng hàm lượng protein *Bst*LF tham gia phản ứng dựa trên đường chuẩn tín hiệu xây dựng từ dữ liệu phân tích kết quả SDS-PAGE bằng phần mềm Gel Analyzer 23.1. Protein BSA chuẩn (Bio Basic) với các nồng độ từ 100 đến 400 μ g/mL và dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF dùng cho phản ứng LAMP được điện di SDS-PAGE trên cùng một bảng gel để đảm bảo các yếu tố thí nghiệm được đồng nhất. 16 μ L mẫu protein được nạp vào mỗi giếng. Chỉ số Raw volume thu được từ phần mềm Gel Analyzer 23.1 được sử dụng để dựng đường chuẩn BSA và tính toán nồng độ protein *Bst*LF có trong dịch ly giải tế bào tham gia vào phản ứng LAMP.

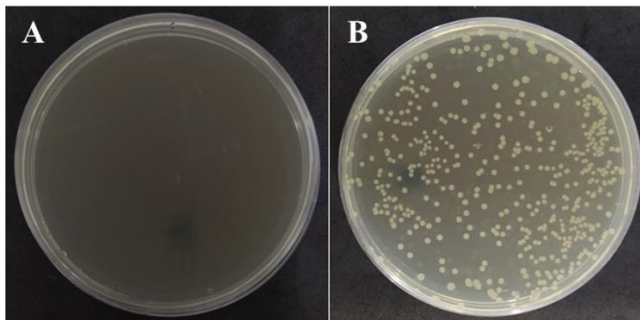
2.2.6 Ngưỡng phát hiện DNA vi khuẩn của phản ứng LAMP sử dụng dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF

DNA hệ gen của các chủng vi khuẩn *P. aeruginosa*, *S. aureus* ATCC6538 và *S. enterica* ATCC14028 được pha loãng theo dãy thập phân từ 1 fg đến 10⁶ fg và được sử dụng cho thí nghiệm xác định ngưỡng phát hiện DNA mục tiêu của *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF-LAMP. Phản ứng LAMP được thực hiện sử dụng lượng dịch ly giải tế bào tối ưu đã được xác định ở Mục 2.2.4. Giới hạn phát hiện DNA mục tiêu của phản ứng *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF-LAMP cũng được so sánh với enzyme *Bst*3.0 thương mại (NEB) để đánh giá khả năng ứng dụng của dịch ly giải *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Biến nạp và kiểm tra dòng tế bào BL21(DE3) mang vector tái tổ hợp

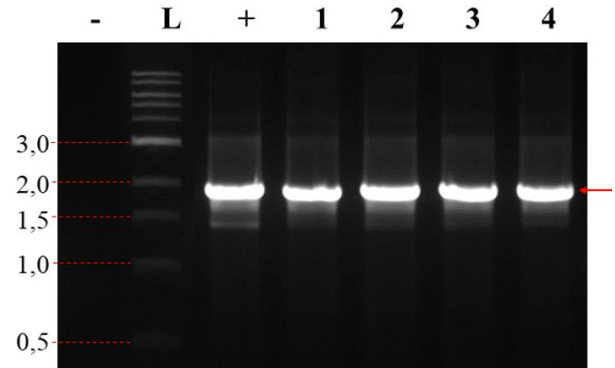
Sau khi biến nạp, dòng tế bào mang vector tái tổ hợp pET21a(+)-*Bst* LF-6xHis có khả năng biểu hiện gen kháng kháng sinh ampicillin và phát triển trên đĩa thạch LB-Amp100. Kết quả cho thấy mẫu đối chứng âm là *E. coli* BL21(DE3) không được biến nạp vector tái tổ hợp không có sự xuất hiện của khuẩn lạc trên môi trường kháng sinh chọn lọc (Hình 1A). Trong khi đó, trên đĩa LB-Amp100 có sự xuất hiện của các khuẩn lạc đơn (Hình 1B), cho thấy những khuẩn lạc này có khả năng là dòng tế bào đã mang vector tái tổ hợp.



Hình 1 Kết quả biến nạp vector pET21a(+)-*Bst*LF-6xHis vào BL21(DE3). (A) BL21(DE3); (B) BL21(DE3) được biến nạp vector pET21a(+)-*Bst*LF-6xHis

Để xác định kết quả dòng hóa, khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch LB-Amp100 tiếp tục được sàng lọc bằng phương pháp PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi T7pro, đặc hiệu cho vùng promoter T7 trên vector pET21a(+). Kết quả cho thấy các vạch sản phẩm PCR khuẩn lạc tương đồng với sản phẩm từ đối chứng dương là vector pET21a(+)-

Bst LF-6xHis, phù hợp với kích thước đoạn gen mục tiêu dự kiến khoảng 1 952 bp (Hình 2). Như vậy, vector pET21a(+)-*Bst*LF-6xHis đã được biến nạp thành công vào chủng BL21(DE3), được gọi tắt là dòng *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF và được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

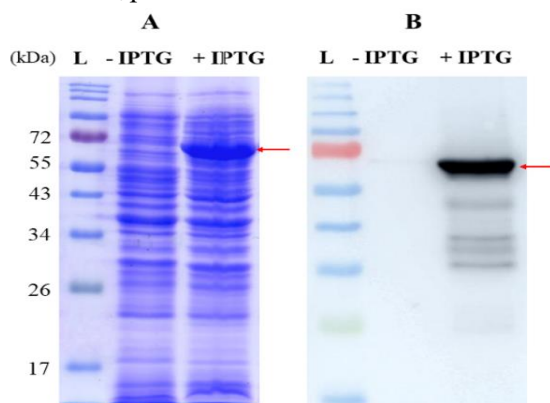


Hình 2 Kết quả PCR khuẩn lạc từ đĩa LB-Amp100 sau biến nạp. (-) Đối chứng âm: phản ứng không chứa plasmid pET21a(+)-*Bst*LF-6xHis; (+) Đối chứng dương: phản ứng bổ sung plasmid pET21a(+)-*Bst*LF-6xHis; 1, 2, 3 và 4: khuẩn lạc; L: thang DNA 1 kb (NEB)

3.2 Kiểm tra biểu hiện *Bst*LF tái tổ hợp bằng *E. coli* BL21(DE3)

*Bst*LF được cảm ứng biểu hiện bằng IPTG 1 mM trong 4 giờ ở 37 °C. Kết quả kiểm tra biểu hiện bằng điện di SDS-PAGE protein tổng số cho thấy khi cảm ứng bằng IPTG, hình ảnh điện di xuất hiện vạch protein biểu hiện vượt mức giữa hai vạch 55 kDa và 72 kDa của thang protein và có kích thước tương ứng với kích thước lý thuyết của *Bst*LF là 67,9 kDa và không thấy có sự xuất hiện của vạch này ở đối chứng âm là chủng không cảm ứng IPTG (Hình 3A). Ngoài ra, do *Bst*LF tái tổ hợp được biểu hiện dưới dạng dung hợp với đuôi 6*His, sự biểu hiện của *Bst*LF có thể được xác nhận thông qua đuôi 6*His này bằng phương pháp lai Western Blot sử dụng kháng thể Anti-6*His. Kết quả cho thấy vạch tín hiệu Western Blot đậm chính là vạch protein biểu hiện vượt mức ở bản điện di SDS-PAGE (Hình 3B, cột +IPTG). Bên cạnh đó, vạch tín hiệu này hầu như không quan sát được ở đối chứng âm là chủng không cảm ứng IPTG (Hình 3B, cột -IPTG). Như vậy, *E. coli*

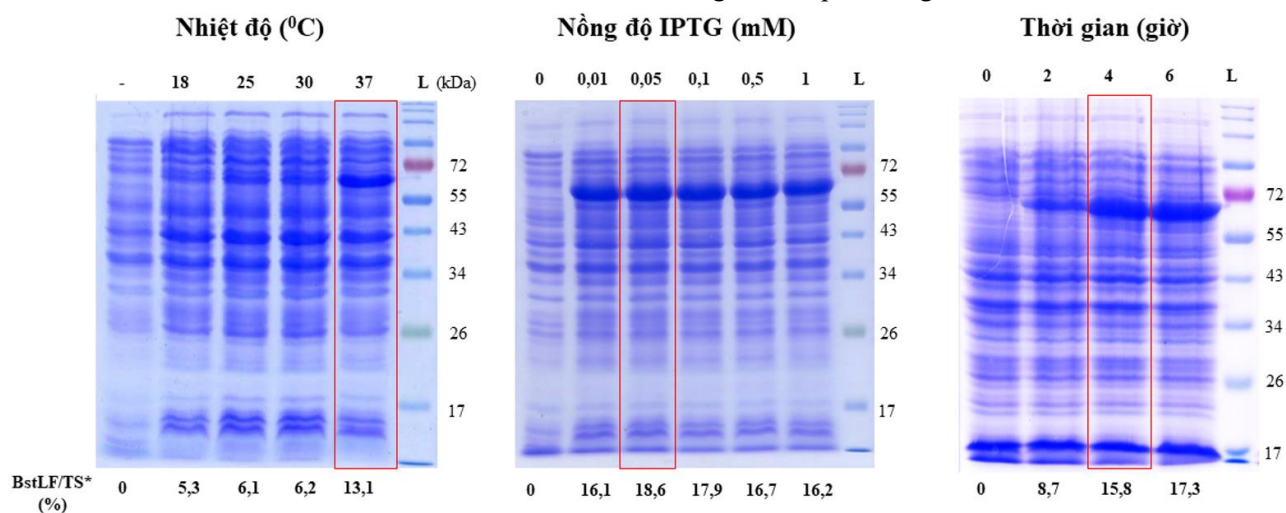
BL21(DE3)/*Bst*LF đã biểu hiện thành công enzyme *Bst*LF tái tổ hợp.



Hình 3 SDS-PAGE (A) và Western Blot với kháng thể Anti-6*His (B) kiểm tra biểu hiện *Bst*LF trong *E. coli*

BL21(DE3) trong điều kiện có và không có cảm ứng IPTG 1 mM (4 giờ, 37 °C). L: thang protein (NEB)

3.3 Khảo sát điều kiện tối ưu cho biểu hiện của *Bst*LF
Kết quả khảo sát các yếu tố nồng độ chất cảm ứng IPTG, nhiệt độ và thời gian cảm ứng tối ưu cho biểu hiện của *Bst*LF tái tổ hợp cho thấy BL21(DE3) được cảm ứng ở 37 °C trong 4 giờ với 0,05 mM IPTG đạt hiệu quả biểu hiện tốt nhất (Hình 4). Điều kiện này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đây [10]. Tuy nhiên, nồng độ IPTG tối ưu cho biểu hiện của *Bst*LF trong nghiên cứu này là 0,05 mM và thấp hơn so với các nghiên cứu trước đó 10 lần đến 20 lần [7, 10]. Việc giảm nồng độ IPTG không ảnh hưởng đến hiệu suất biểu hiện *Bst*LF đồng thời giúp tránh độc tính lên tế bào và giảm chi phí thí nghiệm.



Hình 4 Kết quả khảo sát điều kiện nhiệt độ cảm ứng biểu hiện *Bst*LF ở (18; 25; 30; và 37) °C, nồng độ IPTG (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; và 1) mM, và thời gian cảm ứng từ (0; 2; 4; và 6) giờ. L: thang protein (NEB)

Thông thường, ở 37 °C, sự sinh trưởng và phân chia của *E. coli* diễn ra nhanh chóng, nhưng thời gian cảm ứng dài có thể dẫn đến protein mục tiêu gấp cuộn sai và hình thành thể vùi [11]. Do đó, khoảng thời gian ngắn từ 4 giờ đến 6 giờ được cho là khoảng thời gian phù hợp cho biểu hiện protein tái tổ hợp. Trong giai đoạn từ 2 giờ đến 4 giờ cảm ứng, hàm lượng protein *Bst*LF tăng 7,1 %, tuy nhiên, từ giai đoạn sau 4 giờ đến 6 giờ cảm ứng, hàm lượng *Bst*LF chỉ tăng 1,5 % (Hình 4). Khi tế bào bước vào pha cân bằng và pha suy vong, chất dinh dưỡng và chất cảm ứng trong môi trường cạn kiệt, đồng thời, độc tố và lượng tế bào chết từ quá trình tăng sinh cũng tăng lên, làm sinh trưởng của vi khuẩn chậm lại

và quá trình dịch mã protein mục tiêu cũng giảm [12]. Như vậy, nếu kéo dài thời gian cảm ứng thì hiệu quả biểu hiện protein tái tổ hợp tăng không đáng kể. Do đó, 4 giờ được chọn là khoảng thời gian cảm ứng phù hợp cho biểu hiện *Bst*LF.

3.4 Khảo sát hoạt tính của dịch ly giải tế bào *E. coli*

BL21(DE3)/*Bst*LF trong phản ứng LAMP

Các kết quả ở Mục 3.2 và Mục 3.3 cho thấy enzyme *Bst*LF được biểu hiện vượt mức trong tế bào *E. coli* BL21(DE3). Ngoài ra, enzyme *Bst*LF tái tổ hợp được thiết kế nhằm mục tiêu được biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3) ở dạng protein tan trong tế bào chất nên dễ dàng hơn cho quá trình thu nhận protein. Do đó, trong

thí nghiệm này, tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF được ly giải ở 65 °C để giải phóng protein ra khỏi tế bào và lượng protein *Bst*LF có trong dịch chiết tế bào được tin là có khả năng đủ để khuếch đại trình tự gen mục tiêu trong phản ứng LAMP mà không cần thực hiện bước

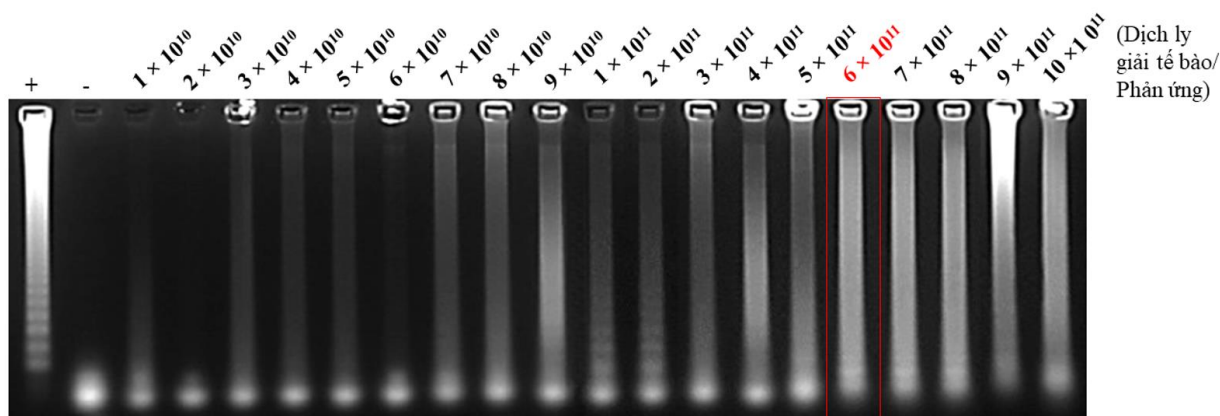
tinh sạch enzyme. Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy việc sử dụng trực tiếp dịch chiết tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF có khả năng khuếch đại DNA mục tiêu trong phản ứng LAMP (Bảng 1).

Bảng 1 Kết quả tín hiệu qLAMP sử dụng dịch ly giải tế bào BL21(DE3)/*Bst*LF

Số thứ tự	Tên mẫu (Dịch ly giải tế bào/phản ứng)	Thời gian (phút)	Số thứ tự	Tên mẫu (Dịch ly giải tế bào/phản ứng)	Thời gian (phút)
1	-	-	25	5×10^9	-
2	+	20	26	6×10^9	-
3	1×10^7	-	27	7×10^9	-
4	2×10^7	-	28	8×10^9	-
5	3×10^7	-	29	9×10^9	-
6	4×10^7	-	30	1×10^{10}	-
7	5×10^7	-	31	2×10^{10}	-
8	6×10^7	-	32	3×10^{10}	-
9	7×10^7	-	33	4×10^{10}	-
10	8×10^7	-	34	5×10^{10}	-
11	9×10^7	-	35	6×10^{10}	-
12	1×10^8	-	36	7×10^{10}	-
13	2×10^8	-	37	8×10^{10}	-
14	3×10^8	-	38	9×10^{10}	82
15	4×10^8	-	39	1×10^{11}	65
16	5×10^8	-	40	2×10^{11}	84
17	6×10^8	-	41	3×10^{11}	74
18	7×10^8	-	42	4×10^{11}	66
19	8×10^8	-	43	5×10^{11}	60
20	9×10^8	-	44	6×10^{11}	35
21	1×10^9	-	45	7×10^{11}	35
22	2×10^9	-	46	8×10^{11}	34
23	3×10^9	-	47	9×10^{11}	50
24	4×10^9	-	48	10^{12}	74

Kết quả qLAMP cho thấy mẫu đối chứng âm (dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21(DE3) không mang vector tái tổ hợp) không có sự khuếch đại tín hiệu huỳnh quang (Bảng 1) và hình ảnh điện di không xuất hiện sản phẩm LAMP (Hình 5). Phản ứng LAMP dương tính sau 20 phút ủ khi sử dụng enzyme thương mại *Bst*3.0

(Bảng 1). Với lượng protein ly giải từ (10^7 đến 8×10^{10}) tế bào/phản ứng, hình ảnh điện di không xuất hiện sản phẩm LAMP hoặc chỉ xuất hiện các vệt sáng mờ trên gel điện di (Hình 5, Hình 1P). Điều này cho thấy lượng *Bst*LF trong dịch ly giải chưa đủ để khuếch đại trình tự DNA mục tiêu.



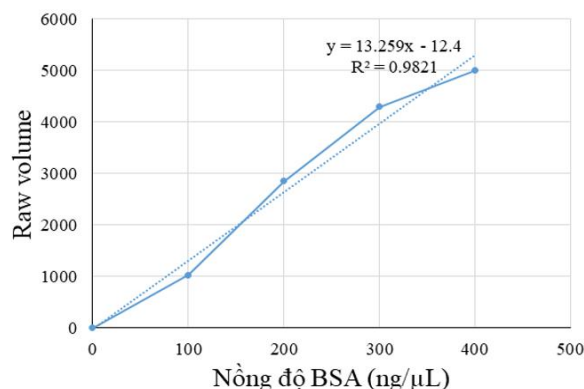
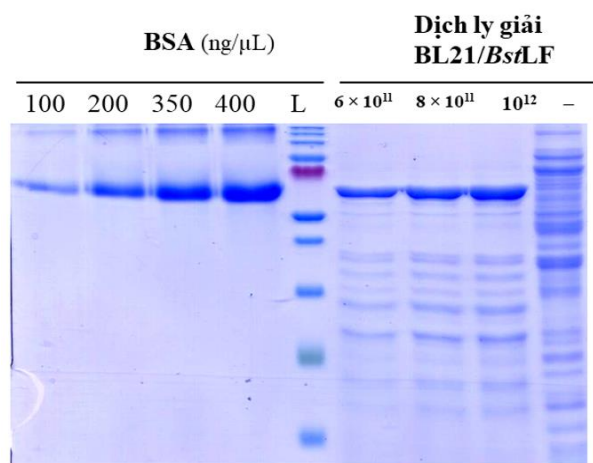
Hình 5 Kết quả khảo sát hoạt tính của dịch protein ly giải từ 10^{10} đến 10^{12} tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF/phản ứng được thêm vào phản ứng LAMP. (-): Dịch ly giải tế bào BL21(DE3) không mang plasmid biểu hiện *Bst*LF; (+): Phản ứng LAMP sử dụng enzyme *Bst*3.0.

Với các phản ứng bổ sung dịch ly giải từ $(9 \times 10^{10}$ đến $10^{12})$ tế bào/phản ứng, kết quả qLAMP cho thấy các phản ứng LAMP có sự khuếch đại gen của *S. aureus* (Bảng 1, Hình 5, Hình 2P). Tuy nhiên, chỉ các mẫu với dịch ly giải từ $(1 \times 10^{11}$ đến $8 \times 10^{11})$ tế bào/phản ứng, sản phẩm điện di xuất hiện các vạch DNA có kích thước khác nhau đặc trưng của sản phẩm LAMP (Hình 5). Các mẫu còn lại (dịch ly giải từ $(9 \times 10^{10}$, 9×10^{11} và 10^{12}) tế bào/phản ứng) cho sản phẩm điện di mờ và không rõ vạch. Vạch sản phẩm LAMP rõ nhất ở phản ứng bổ sung dịch ly giải của $(10^{11}$ và $2 \times 10^{11})$ tế bào/phản ứng, tuy nhiên, phản ứng mất hơn 65 phút để cho kết quả dương tính (Bảng 1, Hình 5). Trong khi đó, các phản ứng được bổ sung dịch

ly giải từ $(6 \times 10^{11}$, 7×10^{11} và $8 \times 10^{11})$ tế bào/phản ứng có thể khuếch đại trình tự DNA mục tiêu và cho kết quả dương tính trong vòng 35 phút (Bảng 1). Như vậy, dịch ly giải từ 6×10^{11} tế bào/phản ứng được chọn là lượng tối ưu được bổ sung vào phản ứng LAMP để phát hiện được DNA vi khuẩn *S. aureus* và rút ngắn thời gian phát hiện DNA mục tiêu sau khoảng 35 phút.

3.5 Kết quả định lượng *Bst*LF được biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3) tham gia vào phản ứng LAMP

Kết quả xây dựng đường chuẩn BSA sử dụng dữ liệu Raw Volume từ phân tích hình ảnh điện di SDS-PAGE bằng phần mềm Gel Analyzer thu được đường chuẩn tín hiệu $y = 13,259x - 12,4$ ($R^2 = 0,9821$) (Hình 6, Bảng 2).



Hình 6 Kết quả điện di protein BSA ở các nồng độ từ 100 ng/μL đến 400 ng/μL và các mẫu protein dịch ly giải từ $(6 \times 10^{11}$, 8×10^{11} , và $10 \times 10^{11})$ tế bào/phản ứng trên cùng một bảng gel SDS-PAGE và dựng đường chuẩn BSA bằng chỉ số Raw Volume từ dữ liệu phân tích Gel Analyzer.

Bảng 2 Kết quả định lượng tương đối nồng độ protein *Bst*LF trong dịch ly giải tế bào tham gia phản ứng LAMP 20 μ L dựa trên đường chuẩn BSA

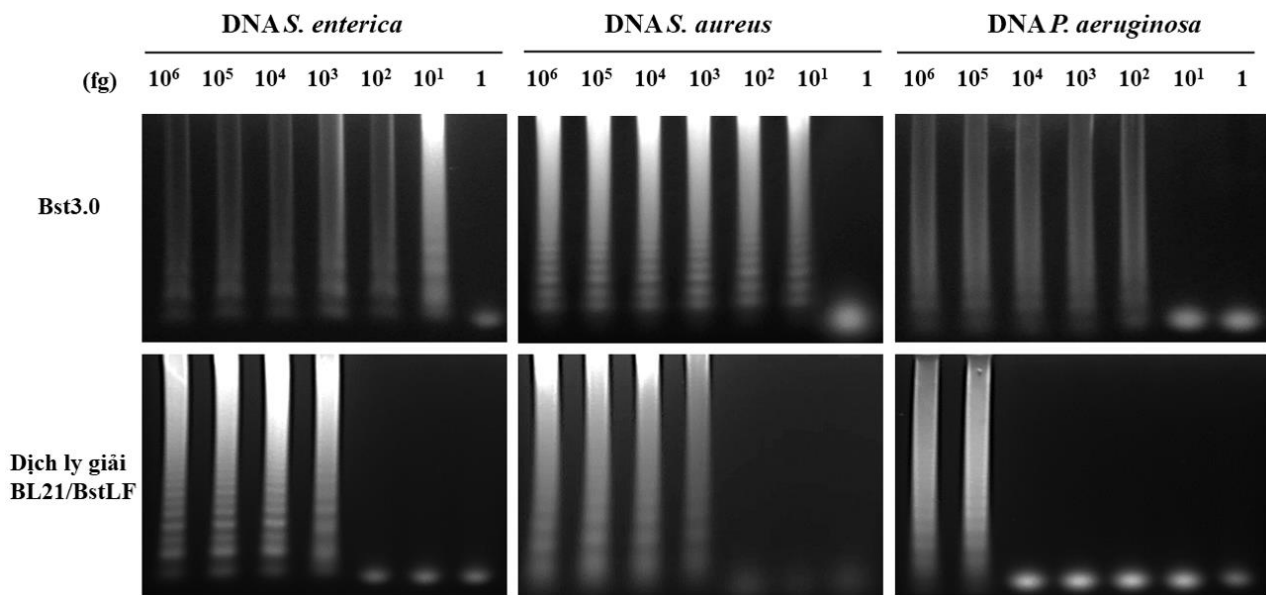
Dịch ly giải protein từ BL21(DE3)/ <i>Bst</i> LF ($\times 10^{11}$)	Giá trị Raw Volume	Nồng độ <i>Bst</i> LF trong 16 μ L nạp mẫu (ng/ μ L)	Nồng độ <i>Bst</i> LF trong LAMP (μ M)
6	1938	147	1,7
8	2574	195	2,3
10	3160	239	2,8

Sử dụng đường chuẩn BSA, nghiên cứu tính toán được nồng độ enzyme *Bst*LF trong dịch ly giải từ 6×10^{11} tế bào để phản ứng LAMP hoạt động hiệu quả với nồng độ cuối khoảng 1,7 μ M trong một phản ứng 20 μ L (Bảng 2). Đây là nồng độ enzyme *Bst*LF phù hợp cho phản ứng LAMP vì nồng độ enzyme *Bst* được tối ưu trong các kit thương mại thường nằm trong khoảng (0,4-2) μ M.

3.6 Ngưỡng phát hiện DNA vi khuẩn của phản ứng LAMP sử dụng dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF

Nghiên cứu thực hiện thí nghiệm đánh giá hoạt tính của dịch protein ly giải từ tế bào BL21(DE3)/*Bst*LF so với

enzyme *Bst*3.0 thương mại (NEB) trong phản ứng LAMP phát hiện DNA vi khuẩn. Kết quả cho thấy dịch protein ly giải từ *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF cũng thể hiện hoạt tính tạo mạch của enzyme *Bst*LF khi có thể phát hiện được 10^3 fg/phản ứng (*S. aureus* hay *S. enterica*) đến 10^5 fg/phản ứng (*P. aeruginosa*) DNA hệ gen vi khuẩn (Hình 7, Hình 3P và Hình 4P). Trong khi đó phản ứng LAMP sử dụng enzyme *Bst*3.0 có thể phát hiện được tối thiểu 10^2 fg/phản ứng DNA của *P. Aeruginosa* và 10 fg/phản ứng DNA của *S. aureus* hay *S. enterica* (Hình 7, Hình 3P và Hình 4P).



Hình 7 Kết quả LAMP so sánh giới hạn phát hiện DNA hệ gen của *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. enterica* trong khoảng từ 1 fg đến 10^6 fg/phản ứng sử dụng enzyme *Bst*3.0 thương mại và dịch protein ly giải từ 6×10^{11} tế bào BL21(DE3)/*Bst*LF

Sự khác biệt về giới hạn phát hiện DNA mục tiêu giữa dịch ly giải tế bào có chứa *Bst*LF và enzyme *Bst*3.0 một phần là trong dịch ly giải có chứa cặn tế bào, DNA và

các protein nội sinh của *E. coli* có thể gây nhiễu phản ứng LAMP và làm giảm độ nhạy so với enzyme tinh sạch. Ngoài ra, *Bst*3.0 đã được tối ưu hóa và tinh sạch

để hoạt động trong điều kiện lý tưởng, trong khi dịch ly giải có thể chứa tạp chất từ vi khuẩn và các thành phần đệm phản ứng vẫn chưa được tối ưu, do đó ảnh hưởng đến hiệu suất khuếch đại. Bên cạnh đó, phiên bản *Bst*LF đã được chứng minh trước đó là có hiệu suất khuếch đại kém hơn so với *Bst*3.0, do phiên bản *Bst*LF chưa được cải thiện về cấu trúc và chức năng. Ở một số nghiên cứu tinh sạch enzyme *Bst*LF hoặc Br512 (biến thể của *Bst*LF) và ứng dụng trong phản ứng LAMP, khi so sánh với enzyme *Bst*3.0 đều cho thấy các phiên bản *Bst*LF cho ngưỡng phát hiện axit nucleic mục tiêu cao hơn với thời gian lâu hơn so với *Bst*3.0 [7, 9]. Cụ thể, phản ứng RT-LAMP sử dụng enzyme Br512 tái tổ hợp tự sản xuất có thể phát hiện gen N của SARS-CoV-2 với ngưỡng phát hiện là 10^2 bản sao/ μ L trong 70 phút, trong khi *Bst*3.0 phát hiện được 10 bản sao/ μ L trong 60 phút [9]. Ngoài ra, tất cả các nghiên cứu này đều tiếp cận hướng sử dụng enzyme tự sản xuất với quá trình tinh chế phức tạp. Trong khi đó, mặc dù có giới hạn phát hiện cao hơn, kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã đáp ứng được mục tiêu ban đầu là tạo ra dịch ly giải *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF khuếch đại DNA hiệu quả và loại bỏ bước tinh sạch protein ra khỏi quy trình thực hiện so với các nghiên cứu trước đó, đây là điểm mạnh của phương pháp, giúp tiết

kiệm chi phí, rút ngắn thời gian thực hiện, phù hợp cho nghiên cứu và đào tạo tại phòng thí nghiệm. Ngoài ra, nghiên cứu cũng tạo tiền đề cho các nghiên cứu sau sử dụng phiên bản enzyme *Bst* tốt hơn, đồng thời kết hợp với tối ưu quy trình biểu hiện, ly giải enzyme và tối ưu điều kiện phản ứng LAMP.

4 Kết luận

Nghiên cứu đã biểu hiện thành công enzyme *Bst*LF trong *E. coli* BL21(DE3) và sử dụng dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF trực tiếp trong phản ứng LAMP mà không cần tinh sạch enzyme. Phương pháp này giúp giảm chi phí và đơn giản hóa quy trình, đồng thời cung cấp nguồn sinh phẩm giá rẻ cho nghiên cứu và đào tạo. Mặc dù phương pháp đã đạt hiệu quả khuếch đại DNA, độ nhạy phản ứng vẫn cần được cải thiện. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo nên tập trung vào nâng cao hiệu suất ly giải enzyme và tối ưu hóa điều kiện phản ứng LAMP, mở rộng tiềm năng ứng dụng trong chẩn đoán nhanh và phát hiện mầm bệnh.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ – Đại học Nguyễn Tất Thành, mã đề tài 2024.01.25/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

1. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
2. Ocorbin, I. P., Boyarskikh, U. A., & Filipenko, M. L. (2015). Large Fragment of DNA Polymerase I from *Geobacillus* sp. 777: Cloning and Comparison with DNA Polymerases I in Practical Applications. *Molecular Biotechnology*, 57(10), 947-959. <https://doi.org/10.1007/s12033-015-9886-x>.
3. Aviel-Ronen, S., Qi Zhu, C., Coe, B. P., Liu, N., Watson, S. K., Lam, W. L., & Tsao, M. S. (2006). Large fragment *Bst* DNA polymerase for whole genome amplification of DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Genomics*, 7, 312. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-312>
4. Bhadra, S., Nguyen, V., Torres, J. A., Kar, S., Fadanka, S., Gandini, C., Akligoh, H., Paik, I., Maranhao, A. C., Molloy, J., & Ellington, A. D. (2021). Producing molecular biology reagents without purification. *PloS One*, 16(6), e0252507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252507>
5. Pedro, M. V. S., Canas, V. A., Garcia, J. R., Lopez, C., Zulueta, M., & Macauyag, E. A. (2025). A low-cost production method for *Bst* DNA polymerase (large fragment). *SciEnggJ*, 18(1), 20-27. <https://doi.org/10.54645/2025181HVR-89>
6. Huang, W. H., Zhai, F., & Hong, G. F. (1999). Cloning, Expression, Characterization and Application of *Bst* DNA Polymerase Large Fragment. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 31(4), 379-384.



7. Đào Thị Huyền, Đào Thanh Quyên, Trần Thị Thanh Huyền, Trần Thị Thu Huyền, Ngô Tất Trung, Lê Hữu Song. (2023). Biểu hiện enzyme Bst Large Fragment tái tổ hợp và ứng dụng trong khuếch đại đẳng nhiệt phát hiện *Neisseria Meningitidis*. *Tạp chí Y dược Lâm sàng* 108, 18(5). <https://doi.org/10.52389/ylds.v18i5.1882>
8. Đinh Thị Thảo, Nguyễn Cẩm Thạch, Nguyễn Phú Thành, Ngô Tất Trung, Lê Hữu Song. (2023). Xây dựng quy trình biểu hiện enzyme tái tổ hợp Br512, ứng dụng phát hiện Human papillomavirus type 18 bằng phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 528. <https://doi.org/10.51298/vmj.v528i2.6133>
9. Nguyễn Phú Thành, Đinh Thị Thảo, Nguyễn Cẩm Thạch, Bạch Thùy Dương, Ngô Tất Trung, Lê Hữu Song. (2023). Nghiên cứu sản xuất enzyme Br512 tái tổ hợp và ứng dụng sàng lọc Sars-Cov-2 bằng kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt. *Tạp chí Y học Quân sự*, 363. <https://doi.org/10.59459/1859-1655/JMM.47>
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 Research International*, 2016, 2906484. <https://doi.org/10.1155/2016/2906484>
11. Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14, 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
12. Jaishankar, J., & Srivastava, P. (2017). Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2000. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02000>

Evaluation of directly using *Escherichia coli* cell lysate expressing *Bst* DNA polymerase enzyme for Loop-mediated isothermal amplification reaction (LAMP)

Hau Thi Tran*, Diem Hong Tran, Huong Thi Thu Phung
 NTT Hi-Tech Institute, Nguyen Tat Thanh University, HCMC, Viet Nam
 *tthau@ntt.edu.vn

Abstract *Bst* DNA polymerase Large Fragment (*Bst*LF) is a crucial enzyme responsible for synthesizing new DNA strands in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reactions. At present, commercially available *Bst*LF for LAMP is costly, whereas self-synthesized *Bst*LF requires a complex purification process and poses challenges in maintaining long-term enzymatic activity. This study aims to simplify the production process, reduce time and costs by expressing *Bst*LF in *Escherichia coli* BL21(DE3) and directly utilizing the cell lysate in LAMP reactions. BL21(DE3) cells were induced to express *Bst*LF using 0.05 mM IPTG at 37 °C for 4 hours. *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF cells were resuspended in Mili-Q water, subjected to heat treatment at 65 °C for 30 minutes, followed by centrifugation to pellet the cells. The cell lysate was directly incorporated into the LAMP reaction. The amplification capability of *Bst*LF was evidenced when lysate from 6×10^{11} cells was included in the reaction, enabling the detection of a minimum of 10^3 fg/reaction of genomic DNA from common bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella enterica*. This study demonstrates that *E. coli* BL21(DE3)/*Bst*LF cell lysate can serve as an effective alternative to purified *Bst*LF in LAMP reactions, thereby providing a cost-effective and practical resource for research and educational purposes.

Keywords *E. coli* BL21(DE3), *Bst*LF, LAMP, cell lysate