

Tinh chế enzyme AaCas12b và ứng dụng phát hiện *Neisseria meningitidis* bằng kỹ thuật LAMP kết hợp CRISPR-Cas một ống

Purify enzyme recombinant AaCas12b for *Neisseria meningitidis* detection using LAMP combined CRISPR-Cas one-pot technique

Đào Thị Huyền, Lê Hữu Phúc Sơn, Đào Thanh Quyên,
Ngô Tất Trung và Lê Hữu Song

Bệnh viện Trung ương Quân đội 108

Tóm tắt

Mục tiêu: Tinh chế và ứng dụng enzyme AaCas12b trong kết hợp LAMP-CRISPR giúp chẩn đoán nhanh bệnh viêm màng não do *Neisseria meningitidis*. **Đối tượng và phương pháp:** Plasmid BPK2014-AaCas12b (#121949, Addgene) mang trình tự gen mã hóa cho protein AaCas12b được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21(λDE3). Sau đó, tinh chế enzyme này bằng cột sắc ký ái lực Niken. Enzyme AaCas12b sau tinh chế được ứng dụng trong phương pháp CRISPR/Cas kết hợp phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt LAMP giúp phát hiện nhanh *Neisseria meningitidis*. **Kết quả:** Biểu hiện và tinh sạch thành công enzyme AaCas12b có kích thước khoảng 130kD, có hoạt tính sinh học. Phản ứng kết hợp giữa LAMP và CRISPR/AaCas12b trong một ống phản ứng phát hiện *Neisseria meningitidis* với độ nhạy 102 bản sao/phản ứng trong tổng thời gian 60 phút. **Kết luận:** Enzyme AaCas12b tự tổng hợp có hoạt tính và có tính ứng dụng cao trong hệ thống cắt đặc hiệu CRISPR/Cas.

Từ khóa: *Neisseria meningitidis*, AaCas12b, CRISPR.

Summary

Objective: Expression and purification of AaCas12b and its application to combine LAMP and CRISPR in one-pot to detect *Neisseria meningitidis*. **Subject and method:** *E. coli* BL21(λDE3) cells were transformed with plasmid BPK2014-AaCas12b encoding for AaCas12b protein. After that, Niken affinity chromatography method was used for enzyme purification. Enzyme AaCas12b applied to CRISPR/Cas combined isothermal amplify reaction LAMP for *Neisseria meningitidis* detecting. **Result:** Expression and purification of AaCas12b enzyme have 130kD and has biological activity. LAMP combined CRISPR/AaCas12b in one-pot assay could detect *Neisseria meningitidis* with sensitivity of 102 copies/reaction on 60 minutes. **Conclusion:** Enzyme AaCas12b in-house have activity and applicability in endonuclease systems CRISPR/Cas.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, AaCas12b, CRISPR.

Ngày nhận bài: 25/10/2023, ngày chấp nhận đăng: 01/11/2023

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

1. Đặt vấn đề

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) là một họ các trình tự DNA có nguồn gốc từ bộ gen của các sinh vật nhân sơ-vi khuẩn và vi khuẩn cổ [1]. Những trình tự này hình thành từ các đoạn DNA của những thực khuẩn thể từng tấn công vào sinh vật nhân sơ đó. Chúng được dùng để phát hiện và phá hủy DNA của những loại thể thực khuẩn tương tự trong các lần tấn công về sau. Do đó, chúng đóng vai trò quan trọng trong hệ thống phòng thủ virus (phage) của sinh vật nhân sơ [1]. Dựa trên hệ thống phòng thủ đó, các nhà khoa học phát triển ra đa dạng các enzyme cas phục vụ cho nhu cầu chỉnh sửa gen và gần đây còn ứng dụng trong chẩn đoán, chẳng hạn như CRISPR-Cas9 và CRISPR-Cas12a/Cpf1, CRISPR-Cas12b/C2c1. Hầu hết các protein cas được cấu tạo bởi hai mô-đun chức năng chính: “adaptation module” (cung cấp vật liệu di truyền vào hệ thống CRISPR tạo ra crRNA) và “effector module” (được hướng dẫn bởi crRNA, nhằm mục tiêu và phân cắt axit nucleic đích) [2].

Ứng dụng của hệ thống CRISPR-Cas trong chẩn đoán sinh học phân tử mới được khám phá và nghiên cứu gần đây. Hệ thống này có khả năng nhận diện một cách đặc hiệu DNA trình tự đích và cắt chính xác chúng. Trong đó, crRNA có chức năng dẫn hướng cho enzyme Cas tìm đến kết hợp với đoạn DNA đích có chứa trình tự PAM phù hợp và trình tự liên kết bổ sung với vị trí protospacer trên crRNA [3]. Sau khi nhận diện thành công, enzyme này sẽ thể hiện hoạt tính cắt phân tử DNA đích một cách đặc hiệu, bên cạnh đó, tính chất exonuclease (collateral activity hay còn được gọi là hoạt tính trans-cleavage) được đồng thời hoạt hoá, enzyme lộ ra một đầu cắt mạnh mẽ các phân tử DNA mạch đơn (ssDNA) có trong hỗn hợp phản ứng [4]. Nghiên cứu của Wang và cộng sự đã ứng dụng hoạt tính này nhằm phân rã các đầu dò huỳnh quang sợi đơn (Fluorescent-quencher- probe) nhằm ghi nhận được tín hiệu [5].

Hiện nay, trong chẩn đoán nhanh vi khuẩn *Neisseria meningitidis*, nghiên cứu của DoKyung Lee và cộng sự cũng như nghiên cứu của Seki M và cộng sự đã sử dụng công nghệ khuếch đại đẳng nhiệt LAMP với ưu điểm là phản ứng đẳng nhiệt, thời gian

khuếch đại ngắn và độ nhạy cao [6, 7]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cung cấp thêm một công cụ CRISPR-Cas giúp tăng tính đặc hiệu của phản ứng LAMP. Để giảm thiểu sự nhiễm chéo trong quá trình thao tác, nghiên cứu hướng tới sự kết hợp LAMP cùng CRISPR trong cùng một ống phản ứng. Tuy nhiên, điều này gặp hạn chế lớn bởi các biến thể enzyme Bst DNA polymerase cho phản ứng LAMP tối ưu ở nhiệt độ từ 60-65°C. Trong khi đó, các biến thể enzyme Cas có nhiệt độ hoạt động từ 37-42°C. Sự không bền nhiệt của enzyme Cas khiến chúng trở nên khó kết hợp. Mới đây, trong nghiên cứu của Teng và cộng sự đã xác định hệ thống CRISPR-Cas12b/C2c1 từ vi khuẩn *Alicyclobacillus acidiphilus* (AaCas12b), duy trì hoạt động nuclease tối ưu trong phạm vi nhiệt độ rộng (từ 31°-59°C) [8].

Mặt khác enzyme AaCas12b chưa được thương mại hóa, do đó việc chủ động tạo ra protein này là điều rất cần thiết cho việc tiến đến ứng dụng trong các phương pháp mới. Ở đây, nhóm nghiên cứu ứng dụng đặc tính cắt DNA mạch đơn và nhiệt độ hoạt động cao của enzyme này nhằm mục tiêu: *Để ứng dụng kết hợp với phương pháp khuếch đại đẳng nhiệt LAMP giúp thực hiện phát hiện Neisseria meningitidis trong một ống phản ứng mà không phải hai ống như các công bố trước.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Vật liệu

Plasmid BPK2014-AaCas12b (#121949, Addgene), chứa trình tự mã hoá cho enzyme AaCas12b, tế bào khả biến *E. coli* BL21(λDE3) ΔserC ΔycdX; Gel sắc ký HisPur™ Ni-NTA Resin (#88221, ThermoFisher). Hoá chất Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), enzyme thương mại EnGen® Lba Cas12a (Cpf1) (#M0653T, NEB, Ipswich, MA, USA), bộ mồi, đoạn đầu dò dùng trong phản ứng LAMP và CRISPR được tổng hợp bởi Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA, USA).

2.2. Biểu hiện và tinh sạch enzyme AaCas12b tái tổ hợp

Plasmid BPK2014-AaCas12b (#121949, Addgene), mang trình tự gen mã hóa protein AaCas12b được

biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21(λDE3). 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 34mg/mL kháng sinh chloramphenicol 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 chloramphenicol, nuôi ở 37°C, lắc 160 vòng/phút cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4-0,6. Tế bào được cảm ứng biểu hiện enzyme AaCas12b bằng 0,5mM IPTG ở 16°C trong 16 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 (NPI-10: 50mM đệm phosphate, 300mM NaCl, 10mM imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 10% glycerol, pH 8,0), đảo trộn đều, phá tế bào bằng siêu âm theo chương trình 4ON-4OFF, Amplitude 40% trong 10 phút, ở 4°C. Thu hồi protein tại pha lỏng bằng cách 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 đệm Phosphate, 300mM NaCl, 10mM imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 10% Glycerol, pH 8,0), 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 đệm Phosphate, 300mM NaCl, 40mM Imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 10% Glycerol, pH 8,0). Rửa giải protein với tỷ lệ 1:1 v/v đệm rửa giải - Elution buffer (50mM đệm Phosphate, 300mM NaCl, 500mM imidazole, 0,5% TritonX, 1mM DTT, 20% glycerol, pH 8,0). Protein thu hồi được bảo quản trong đệm bảo quản - storage buffer (50 mM Tris-HCl, 200mM KCl, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 40% glycerol, pH 8,0) 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) [9] để kiểm tra và đo nồng độ bằng phương pháp Bradford (tham khảo quy trình từ Bio-protocol) [10]. Đồng thời, chúng cũng được đánh giá

hoạt tính dựa trên mô hình cắt đặc hiệu gen CtrA *Neisseria meningitidis* bằng hệ thống CRISPR có so sánh với enzyme thương mại EnGen® Lba Cas12a (Cpf1) (#M0653T, NEB, Ipswich, MA, USA).

2.3. Khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp - LAMP

Phương pháp ứng dụng kết quả của nghiên cứu trước [11], theo đó, enzyme BstLF được tinh chế thành công và ứng dụng trong mô hình khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp LAMP phát hiện *Neisseria meningitidis*. Phản ứng sử dụng 3 cặp mỗi khuếch đại vùng gen CtrA đặc hiệu cho chủng vi khuẩn (các trình tự cụ thể của các mối sẽ được cung cấp nếu độc giả quan tâm và liên hệ với nhóm tác giả). Thành phần phản ứng bao gồm đệm Isothermal buffer 1X (20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 50mM KCl, 2mM MgSO₄, 0,1% Tween 20, pH 8,0-8,8 @25°C), 0,4M Betaine, 0,25mM mỗi dNTP, 1,6μM mỗi FIP - BIP primer, 0,4μM mỗi F3-B3 primer, 0,8μM mỗi LF-LB primer, enzyme BstLF. Phản ứng tối ưu ở nhiệt độ 63°C, trong thời gian 40 phút. Kiểm tra sản phẩm khuếch đại của phản ứng LAMP trên gel agarose 1,2% hoặc cắt đặc hiệu bằng CRISPR.

2.4. Cắt đặc hiệu mạch đôi DNA bằng hệ thống CRISPR-Cas

Để kiểm tra hoạt tính của enzyme cắt giới hạn AaCas12b, phản ứng cắt đặc hiệu CRISPR được tiến hành với thành phần đệm 1X NEBuffer r2,1 (50mM NaCl; 10mM Tris-HCl; 10mM MgCl₂; 100μg/ml BSA; pH 8,0 @25°C), 750nM đoạn đầu dò ssDNA FAM-Quencher (trình tự/56-FAM/TTATTATT/BHQ-1/), 75nM gRNA, 25nM AaCas12b (New England Biolabs, Ipswich, MA). Tất cả các thành phần này được trộn đều trong tổng thể tích 20μL và thêm trực tiếp vào ống sản phẩm LAMP. Sau đó, phản ứng được ủ ở 39°C trong 30 phút, theo dõi tín hiệu huỳnh quang bằng máy đọc huỳnh quang.

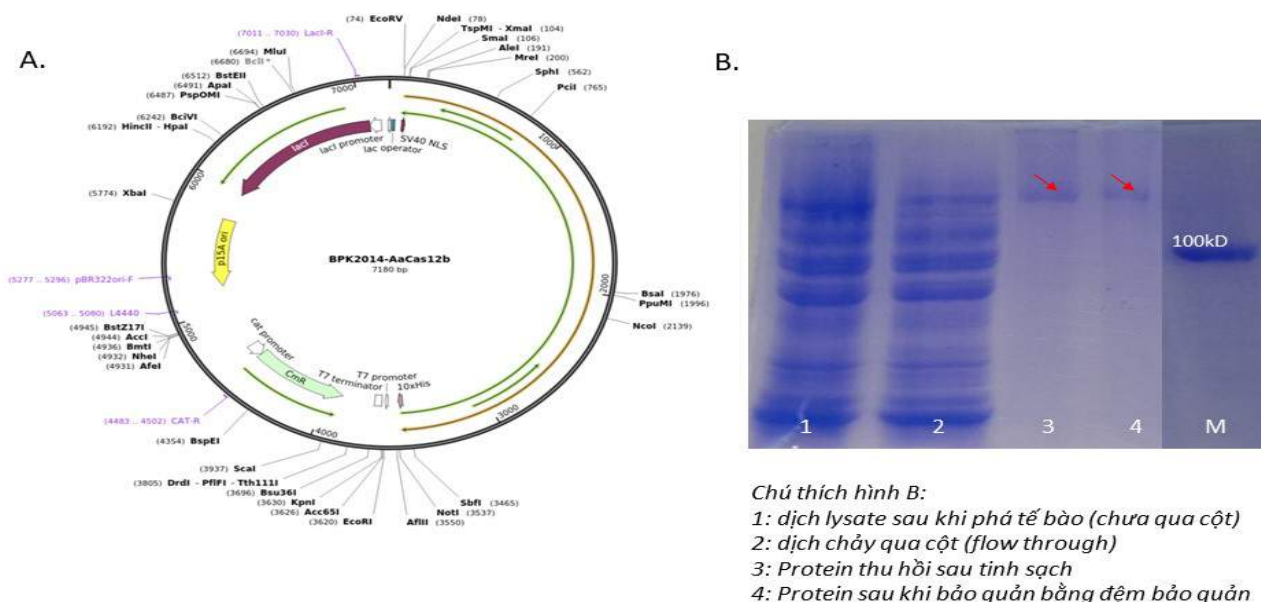
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Biểu hiện và tinh sạch enzyme AaCas12b tái tổ hợp

Nghiên cứu biểu hiện protein AaCas12b từ plasmid BPK2014-AaCas12b (#121949, Addgene)

(Hình 1A). Việc tổng hợp các biến thể protein tái tổ hợp mang các đặc tính chọn lọc có vai trò rất quan trọng trong nhiều lĩnh vực đặc biệt là sinh phân tử. Biến thể AaCas12b từ *Alicyclobacillus acidiphilus* được tổng hợp trong nghiên cứu của Fei Teng và cộng sự với ưu điểm có thể duy trì hoạt động nuclease tối ưu trong phạm vi nhiệt độ rộng từ 31°C đến 59°C [8]. Plasmid BPK2014-AaCas12b mang trình tự gene mã hóa cho protein AaCas12b gắn với đuôi 10xHis tag giúp tăng ái lực và độ tinh sạch đối với cột sắc ký ái lực. Quy trình biểu hiện được thực hiện dựa theo công bố của Fei Teng và cộng sự [8].

Protein AaCas12b có kích thước lớn khoảng 130kD. Việc lựa chọn chủng chủ hết sức quan trọng bởi protein đích mang kích thước lớn, khó cuộn gấp. Nhóm nghiên cứu đã tìm ra chủng chủ phù hợp là *E. coli* BL21(λDE3) ΔserC ΔycdX - một chủng được thiết kế để kết hợp đồng dịch mã hiệu quả của phosphothreonine (pThr) vào protein tái tổ hợp bởi *Escherichia coli*. Ở chủng này, việc xóa gen serC chịu trách nhiệm về mức độ phosphoserine nội bào bằng cách xóa phosphatase giả định, ycdX cho phép kết hợp pThr đồng nhất ở các vị trí khác nhau trong các protein khác nhau [12].



Hình 1. (A) Sơ đồ cấu trúc plasmid BPK2014-AaCas12b (plasmid #121949, Addgene), mang trình tự gen mã hóa protein AaCas12b (nguồn: Addgene). (B) Hình ảnh điện di SDS-PAGE sau tinh sạch protein AaCas12b bằng HisPur™ Ni-NTA Resin. Trong đó, M là marker băng đánh dấu kích thước 100kD. Các mũi tên đỏ chỉ băng protein AaCas12b thu hồi được sau tinh sạch hoàn nguyên bằng elution buffer (3) và bảo quản bằng storage buffer (4).

Sau khi phá tế bào bằng siêu âm, protein được gắn lên cột sắc ký ái lực Niken bởi đuôi 10x-His Tag, các protein không có đuôi này lập tức bị rửa trôi khỏi cột. Tỷ lệ các thành phần đậm trong quá trình tinh sạch cũng góp phần ảnh hưởng đến sự tinh sạch của enzyme sau thu hồi, trong đó, nồng độ imidazole đặc biệt quan trọng, nồng độ imidazole cần tăng dần để rửa hết các tạp protein không cần thiết. Trong pha thu hồi, enzyme AaCas12b được thu hồi trong đệm chứa imidazole nồng độ cao

500mM imidazole (elution buffer) sẽ đẩy protein đích ra khỏi cột giúp thu hồi được lượng tối đa. Enzyme sau thu hồi được điện di SDS-PAGE thể hiện trên (Hình 1). Protein tinh chế ở giếng 3 và giếng 4 thể hiện độ tinh sạch cao, chỉ có duy nhất 1 băng đích với kích thước khoảng 130kD, phù hợp với kích thước dự kiến.

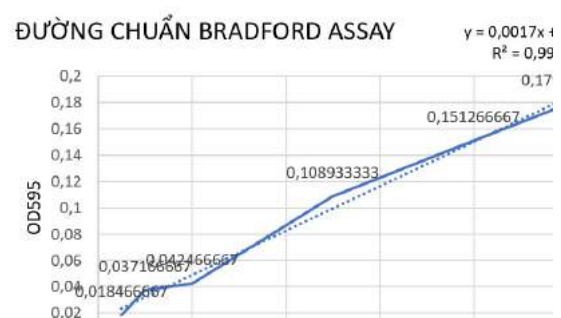
Sự tinh sạch protein ảnh hưởng rất nhiều các phản ứng sinh học phân tử. Một protein được tinh chế bị nhiễm bẩn các tạp chất có thể gây ra ức chế

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 AaCas12b có ứng dụng trong hệ thống cắt đặc hiệu CRISPR/Cas phục vụ mục đích chẩn đoán. 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 protein AaCas12b theo Bradford assay

Nồng độ protein trong dung dịch thu hồi được đánh giá bằng phương pháp Bradford có phạm vi độ nhạy từ 5ng/μL đến 100ng/μL protein [13]. 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 acid của Coomassie Brilliant Blue G-250 thay đổi từ 465nm sang 595nm khi xảy ra liên kết với protein.

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



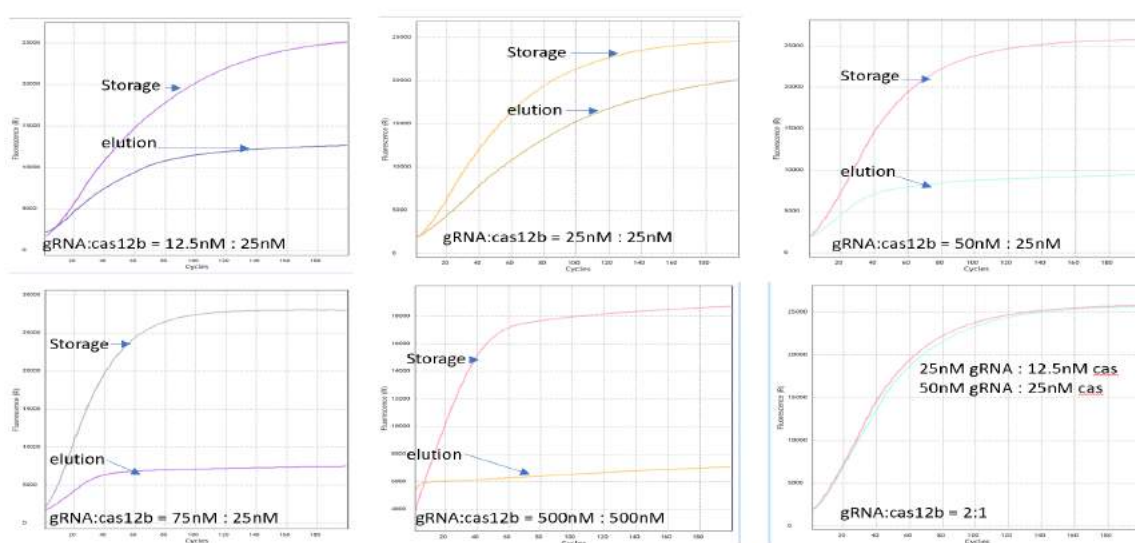
Hình 2. Xây dựng biểu đồ đường chuẩn Bradford.

Đường chuẩn được xây dựng bởi 6 nồng độ BSA bao gồm (5ng/μL, 10ng/μL, 20ng/μL, 50ng/μL, 80ng/μL, 100ng/μL) tuyến tính với giá trị OD595 theo hàm số $y = 0,0017x + 0,015$ với x là nồng độ protein (ng/μL) 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/μL - 100ng/μL (Hình 2). Tiếp theo, pha loãng protein AaCas12b theo hệ số 2, lần lượt là 2-4-8 lần. Mỗi nồng độ được đo lặp lại 3 lần, sau đó lấy giá trị trung bình. Theo đó, nồng độ protein AaCas12b thu hồi được trong dung dịch rửa giải (AaCas12b elution) là 64,2361ng/μL và dung dịch bảo quản (AaCas12b storage) là 33,6805ng/μL, tương đương với khoảng 0,5μM AaCas12b elution và 0,25μM AaCas12b storage. 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 AaCas12b bằng phản ứng cắt đặc hiệu CRISPR

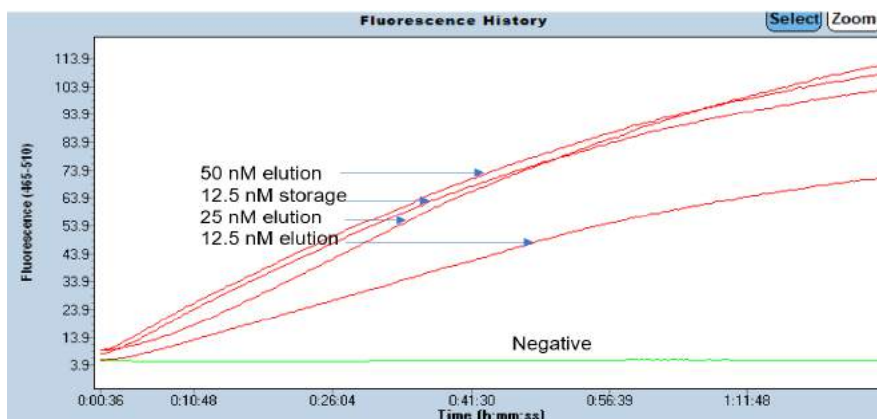
Bước đầu, nghiên cứu khảo sát hoạt tính của enzyme AaCas12b bằng phản ứng cắt đặc hiệu *Neisseria meningitidis*. Hai hỗn hợp enzyme AaCas12b elution (được hoàn nguyên bằng elution buffer sau tinh sạch) và AaCas12b storage (được bảo quản bằng storage buffer). Tín hiệu hoạt tính cis tỷ lệ thuận với tín hiệu huỳnh quang thu được trong phản ứng CRISPR. Kết quả khảo sát hoạt tính của AaCas12a trong phản ứng CRISPR (Hình 3) cho thấy ở nhiệt độ tối ưu 39°C enzyme AaCas12b tinh sạch được có hoạt tính sinh học, chúng cắt đặc hiệu gen *ctrA* của *Neisseria meningitidis*. Đồng thời, khảo sát tỷ lệ gRNA:enzyme Cas lần lượt là 1:2; 1:1; 2:1; 3:1 thấy rằng ở tỷ lệ gRNA:enzyme Cas = 3:1 phản ứng có hiệu suất cao hơn cả (Hình 3).



Hình 3. Khảo sát hoạt tính của enzyme AaCas12b trong phản ứng CRISPR cắt đặc hiệu não mô cầu. Phản ứng được khảo sát tại các nồng độ gRNA:enzyme Cas = 1:1; 2:1; 3:1.

Khảo sát hoạt tính của AaCas12b ở nhiệt độ cao 60°C, thấy rằng với nồng độ 50nM elution và 25nM elution cho hoạt tính tốt. Hơn thế, khi bảo quản trong storage, cho thấy hoạt tính của enzyme ổn định hơn so với elution. Với nồng độ 12,5nM storage

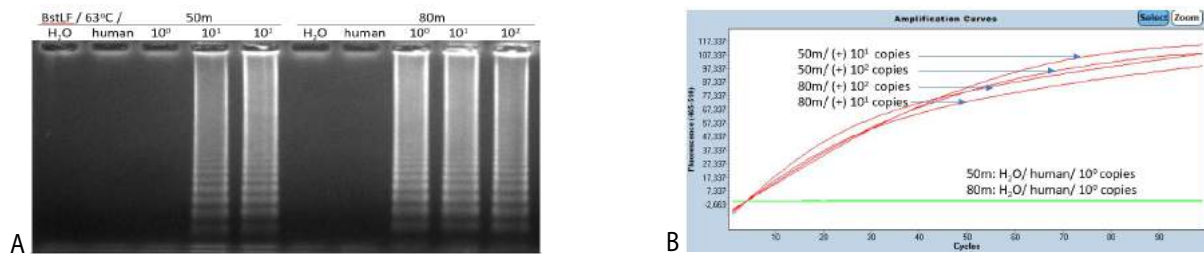
ghi nhận được tín hiệu mạnh hơn so với 12,5nM elution và tương đương với các nồng độ 25nM và 50nM elution (Hình 4). Điều này cho thấy enzyme AaCas12b tinh sạch được có hoạt tính và có thể hoạt động ở nhiệt độ cao.



Hình 4. Kết quả ghi nhận tín hiệu huỳnh quang khảo sát hoạt tính của enzyme AaCas12b elution và AaCas12b storage tại các nồng độ khác nhau.

Khảo sát hoạt tính enzyme AaCas12b elution và AaCas12b storage tại các nồng độ khác nhau bao gồm 12,5nM-25nM-50nM ứng dụng trong phản ứng cắt đặc hiệu CRISPR/Cas nhắm gen đích *Neisseria meningitidis*. Nhiệt độ phản ứng là 60°C trong 120 phút. Phản ứng được thực hiện ở máy đọc huỳnh quang Light Cycle 480, chế độ đọc liên tục tại bước sóng 465-510nm, phân tích kết quả bằng tín hiệu huỳnh quang thực theo thời gian.

Thực tế, trước khi tham gia cắt đặc hiệu CRISPR/Cas, gen đích *Neisseria meningitidis* cần được khuếch đại đặc hiệu bằng phản ứng khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian vòng lặp LAMP. Sau đó, coi sản phẩm khuếch đại là cơ chất cho phản ứng CRISPR/Cas tiếp theo.

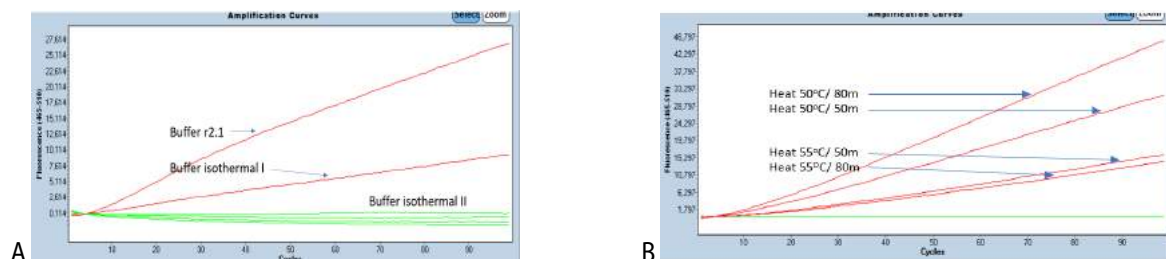


Hình 5. Hình ảnh kết quả đánh giá hoạt tính enzyme AaCas12b. (A) hình ảnh điện di khuếch đại bằng phản ứng LAMP; (B) hình ảnh đo tín hiệu huỳnh quang phản ứng cắt đặc hiệu CRISPR-Cas sử dụng AaCas12b.

Kết quả khuếch đại LAMP cho thấy dãy băng với nhiều kích thước khác nhau (ladder) trên gel điện di agarose. Khi tăng thời gian khuếch đại LAMP lên 80 phút thấy độ nhạy tăng từ 10^1 xuống 10^0 bản sao (Hình 5A). Tuy nhiên kết quả thí nghiệm ở nồng độ 10^0 bản sao khi thực hiện 80 phút có tỷ lệ lặp lại không cao, đồng thời đôi khi xuất hiện cả hiện tượng dương tính giả tại các mẫu chứng âm. Sau đó sản phẩm khuếch đại được đưa vào phản ứng cắt đặc hiệu CRISPR-Cas. Kết quả cho thấy có tín hiệu cắt ở những mẫu 10^1 và 10^2 bản sao, mà không thu được ở 10^0 bản sao (Hình 5B). Do đó, có thể phỏng đoán rằng, khi tăng thời gian lên 80 phút, thực tế không có sự khuếch đại gen đích ở nồng độ quá thấp là 1 bản sao mà tín hiệu dương tính của LAMP ở nồng độ 1 bản sao là tín hiệu giả, do các mẫu bắt cặp không đặc hiệu khi được ủ với nhau quá lâu. Điều này chứng tỏ, enzyme AaCas12b tinh sạch được có hoạt tính, và độ tinh khiết có thể ứng dụng được trong các phản ứng cắt đặc hiệu CRISPR-Cas. Khi kết hợp LAMP và CRISPR/Cas hai bước có thể phát hiện *N. meningitidis* có nồng độ 10^1 bản sao.

3.4. Kết quả phát hiện *Neisseria meningitidis* bằng phương pháp LAMP kết hợp CRISPR-Cas12b trong cùng một bước phản ứng

Sự kết hợp LAMP và CRISPR trong cùng một ống phản ứng là một thách thức lớn đối với không chỉ các nhóm nghiên cứu ở Việt Nam mà còn trên thế giới. Đã có một số công bố cũng từng kết hợp hai phản ứng này trong cùng một ống phản ứng phát hiện SARS-CoV2 [14] hay *Klebsiella pneumoniae* [15]. Chưa một công bố nào có thể kết hợp hai phản ứng này trong cùng một điều kiện để phát hiện *Neisseria meningitidis*. Sự khó khăn cốt lõi khi kết hợp hai giai đoạn phản ứng này là sự chênh lệch nhiệt độ tối ưu cho phản ứng LAMP và CRISPR. Trong đó, nhiệt độ tối ưu của phản ứng LAMP là 60-65°C và nhiệt độ tối ưu của phản ứng CRISPR là 37-42°C. Sự khám phá ra enzyme Cas chịu nhiệt có dải nhiệt độ hoạt động cao giúp cho kéo gần khoảng cách giữa LAMP và CRISPR. Tuy nhiên, sự kết hợp vẫn rất khó khăn khi khoảng cách vẫn là rất lớn. Nhóm nghiên cứu đã tối ưu các điều kiện dung dịch đệm phản ứng phù hợp giúp phản ứng LAMP có thể diễn ra ở nhiệt độ thấp hơn từ 50-60°C và phản ứng CRISPR có thể diễn ra ở điều kiện nhiệt độ cao hơn từ 50-60°C.

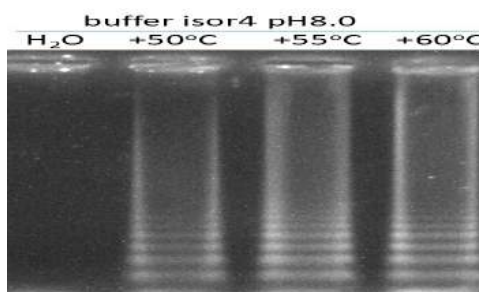


Hình 6. Hình ảnh Kết quả khảo sát hoạt tính enzyme AaCas12b trong điều kiện đệm phản ứng và nhiệt độ phản ứng khác nhau; (A) Hình ảnh huỳnh quang thu được từ phản ứng CRISPR ở 63°C khi sử dụng các đệm khác nhau bao gồm r2.1 (NEB, Ipswich, MA, USA) hoặc buffer isothermal I (NEB, Ipswich, MA, USA) hoặc buffer isothermal II (NEB, Ipswich, MA, USA); (B) Hình ảnh huỳnh quang thu được khi thực hiện phản ứng CRISPR sau khi ủ enzyme AaCas12b tại nhiệt độ 50°C trong 50-80 phút và tại 55°C trong 50-80 phút.

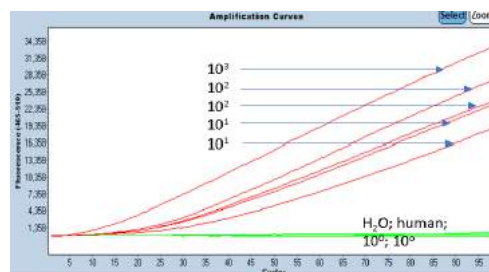
Kết quả Hình 6A cho thấy enzyme AaCas12b không phù hợp với dung dịch đệm phản ứng đẳng nhiệt của LAMP. Cụ thể khi thực hiện khảo sát hoạt tính enzyme này ở nhiệt độ cao với các đệm phản ứng khác nhau thì thấy rằng chỉ có đệm r2.1 cho tín hiệu cao; đệm isothermal I cho tín hiệu giảm đáng kể; đệm isothermal II cho tín hiệu âm tính. Sự khác biệt này, phỏng đoán do sự khác biệt về độ pH của đệm phản ứng, trong đó, đệm phản ứng LAMP có pH 8,8, đệm phản ứng r2,1 của phản ứng CRISPR là pH 8,0. Đặc biệt, sau khi xử lý gia nhiệt enzyme ở (50°C-55°C) trong (50-80 phút) thấy rằng hoạt tính

của enzyme giảm khi tăng nhiệt độ và thời gian ủ. Điều này đòi hỏi phản ứng LAMP cần được tối ưu cả về mặt nhiệt độ và thời gian ủ.

Nhóm nghiên cứu đã khảo sát các loại đệm khác nhau nhằm tối ưu cho kết hợp hai phản ứng LAMP và CRISPR trong một ống. Thấy rằng, đệm dung dịch isor4 bao gồm 20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 50mM KCl, 4mM MgSO₄, 0,1% Tween 20, pH 8,0 @25°C. Theo đó, phản ứng LAMP có thể khuếch đại được mẫu chứng dương ở các nhiệt độ thấp 50°C; 55°C; 60°C (Hình 7A).



A.



B.

Hình 7. Hình ảnh kết quả tối ưu phản ứng LAMP và CRISPR trong cùng một ống phản ứng phát hiện *Neisseria meningitidis*.

Bên cạnh đó, để tăng hoạt tính của enzyme AaCas12b có thể hoạt động ổn định ở nhiệt độ cao 50°C, nhóm nghiên cứu tối ưu và bổ sung 100mM glycine. Từ đó, khi thực hiện tất cả thành phần phản ứng LAMP và CRISPR trong cùng một ống mà chỉ thay đổi nồng độ Mg²⁺; pH dung dịch đệm và bổ sung glycine, phản ứng khuếch đại LAMP và phản ứng cắt CRISPR diễn ra và có thể thu được tín hiệu huỳnh quang rõ ràng. Hình 7B là hình ảnh tín hiệu huỳnh quang thu được khi thực hiện đồng thời LAMP và CRISPR-Cas trong cùng một ống phản ứng. Điều kiện phản ứng diễn ra ở 50°C trong 100 phút. Trong đó đọc tín hiệu ở 50 phút sau của phản ứng. Tín hiệu dương tính ở các nồng độ 10¹ bản sao, 10² bản sao và 10³ bản sao; âm tính ở các nồng độ 10⁰ bản sao và chứng âm H₂O và DNA người khỏe mạnh.

4. Kết luận

Protein AaCas12b được biểu hiện thành công có hoạt tính enzyme cắt đặc hiệu trong hệ thống CRISPR/Cas nhằm phát hiện *N. meningitidis* sau

khuếch đại đẳng nhiệt (LAMP) với độ nhạy là 10² bản sao/phản ứng.

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

1. Barrangou R (2015) *The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond*. Curr Opin Immunol 32: 36-41. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.008.
2. Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV (2015) *Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems*. Mol Cell 60(3): 385-397.
3. Xu Y, Li Z (2020) *CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy*. Comput Struct

- Biotechnol J 18: 2401-2415. doi: 10.1016/j.csbj.2020.08.031.18: 2401-2415.
4. Strecker J, Jones S, Koopal B et al (2019) *Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing*. Nat Commun 10(1): 212.
 5. Li L, Li S, and Wang J (2018) *CRISPR-Cas12b-assisted nucleic acid detection platform*. bioRxiv preprint.
 6. Lee D, Kim EJ, Kilgore PE, Kim SA, Takahashi H, Ohnishi M, Anh DD, Dong BQ, Kim JS, Tomono J, Miyamoto S, Notomi T, Kim DW, Seki M (2015) *Clinical evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of Neisseria meningitidis in cerebrospinal fluid*. PLoS One 10(4): 0122922.
 7. Seki M, Kilgore PE, Kim EJ, Ohnishi M, Hayakawa S, Kim DW (2018) *Loop-mediated isothermal amplification methods for diagnosis of bacterial meningitis*. Front Pediatr 6:57. doi: 10.3389/fped.2018.00057.
 8. Teng F, Cui T, Feng G et al (2018) *Repurposing CRISPR-Cas12b for mammalian genome engineering*. Cell Discov 4(1): 63.
 9. Simpson RJ (2006) *SDS-PAGE of proteins*. CSH Protoc 2006(1):pdb.prot4313. doi: 10.1101/pdb.prot4313.
 10. He F (2011) *Bradford Protein Assay*. Bio-101: e45. DOI: 10.21769/BioProtoc.45.
 11. Đào Thị Huyền, Đào Thanh Quyên, Trần Thị Thanh, 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*. Journal of 108-clinical medicine and pharmacy 18(5).
 12. Zhang MS, Brunner SF, Huguenin-Dezot N, Liang AD, Schmied WH, Rogerson DT, Chin JW (2017) *Biosynthesis and genetic encoding of phosphothreonine through parallel selection and deep sequencing*. Nat Methods 14(7): 729-736. doi: 10.1038/nmeth.4302.
 13. 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(1-2): 248-254.
 14. Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang MW, Kim NG, Yu X, Li J, Walker BD, Greninger AL, Jerome KR, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F (2020) *Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics*. medRxiv [Preprint]:2020.05.04.20091231. doi: 10.1101/2020.05.04.20091231.
 15. Qiu X, Liu X, Ma X, Wang R, Chen S, Li F, Li Z (2022) *One-pot isothermal LAMP-CRISPR-based assay for Klebsiella pneumoniae detection*. Microbiol Spectr 10(4):e0154522. doi: 10.1128/spectrum.01545-22.