Melanin, vật liệu giá thể mới tiềm năng cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp gắn His-tag

Nguyễn Thị Loan[1], Nguyễn Thị Hồng Loan[1,2], Nguyễn Đình Thắng[1,2], Lê Thị Hồng Nhung[1,2*]

[1]Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Việt Nam

[2]Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội, Việt Nam

Ngày đến tòa soạn: 21/06/2021; Ngày chấp nhận đăng: 20/07/2021

Tóm tắt

Niken-Sepharose là một trong những giá thể thông dụng nhất trong việc tinh sạch protein tái tổ hợp mang His-tag (His-tag protein) dựa vào liên kết ái lực giữa trình tự polyhistidine và ion Ni^{2+}. Tuy nhiên, giá thành của Sepharose được cho là khá cao, đặc biệt là cho các nghiên cứu về protein ở Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lần đầu tiên chỉ ra rằng melanin, được tách chiết từ túi mực là phế phẩm trong ngành thực phẩm, có thể được sử dụng làm giá thể tiềm năng để tinh sạch các His-tag protein. Melanin và melanin sau khi hấp phụ ion kim loại đã được thử nghiệm để làm chất nền cho quá trình tinh sạch His-tag protein. Kết quả cho thấy protein tái tổ hợp mang His-tag VP28 trong dịch chiết protein tổng số đều được bắt giữ bởi các giá thể melanin hấp phụ ion kim loại Ni^{2+}, Fe^{3+} và Zn^{2+} cũng như là giá thể melanin dạng đơn. Các thử nghiệm giải phóng His-tag VP28 ra khỏi giá thể được thực hiện trên chất nền melanin và melanin hấp phụ Ni^{2+} (Ni-melanin). Kết quả cho thấy protein này được giải phóng ra tương đối chọn lọc khi sử dụng đệm đẩy imidazole 250 mM ủ qua đêm. So sánh một cách tương đối với Ni-Sepharose thì melanin và Ni-melanin cho hiệu quả tinh sạch lần lượt là 38 % và 18 %. Hiệu quả tinh sạch này là chưa cao, tuy nhiên các nghiên cứu tối ưu quy trình có thể sẽ giúp tăng hiệu suất và tăng độ tinh sạch của His-tag protein.

Từ khóa: *Melanin, ion kim loại, giá thể sắc ký ái lực, Sepharose, His-tag protein.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong công nghệ DNA tái tổ hợp, protein đích thường được dung hợp với một trình tự của polyhistidine-tag (hay còn gọi là His-tag) bao gồm từ 3 đến 8 acid amin histidine (phổ biến là 6) nhằm tạo thuận lợi cho quá trình tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực cũng như nhận biết các protein đích bằng kháng thể kháng histidine [1]. Cụ thể, các His-tag có khả năng tạo liên kết phối trí với các ion kim loại (Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ca^{2+}, Co^{2+} hoặc Fe^{3+}), trên cơ sở đó, các giá thể dẫn xuất của polysaccharide (sepharose, sephadex, cellulose,…) đã được hoạt hóa để có khả năng hấp phụ các ion kim loại trên bề mặt tạo thành gel sắc ký ái lực và tinh sạch đặc hiệu các His-tag protein. Sepharose dùng cho mục đích này có thể được hoạt hóa bằng cách gắn cố định với một phối tử acid iminodiacetic [1] và thường được cung cấp bởi nhiều hãng uy tín như GE healthcare, Sigma-Aldrich. Tuy nhiên, giá thành của Ni-Sepharose tương đối cao (chẳng hạn 3,2 - 3,8 triệu đồng cho 10 mL gel của hãng Cytiva hoặc Thermo) đặc biệt là cho các nghiên cứu về protein ở Việt Nam. Vì thế phát triển một vật liệu mới thay thế cho Sepharose giúp giảm giá thành trong việc tinh sạch protein sẽ tạo điều kiện cho các nghiên cứu về protein ở trong nước.

* *Điện thoại: 0866155264 Email: nhungle@hus.edu.vn*

Melanin là sắc tố sinh học có nhiều trong tự nhiên, được tổng hợp ở hầu hết các loài như người, động vật, vi khuẩn và nấm. Melanin được hình thành bằng việc oxi hoá và polyme hoá tyrosine ở động vật và các hợp chất phenol ở các sinh vật thấp hơn [2]. Melanin có nhiều chức năng sinh học khác nhau trong sinh vật sống; trong đó phổ biến nhất là tạo sắc tố, có khả năng hấp thụ tia UV bảo vệ da và tóc ở động vật [2-3]. Ngoài ra, melanin còn được biết đến là các chất vận chuyển điện tích, điều hoà ion và nhận phóng xạ tự do [4]. Với các tính chất này, melanin đã được nghiên cứu ứng dụng trong nhiều lĩnh vực khác nhau. Trong y học, melanin có thể dùng để chống oxi hoá, kháng khuẩn, virus và chống ung thư [5-8]. Trong lĩnh vực môi trường, melanin được nghiên cứu để loại bỏ ion kim loại nặng trong nước bị ô nhiễm [9-10]. Tuy nhiên, nghiên cứu ứng dụng của melanin trong việc tinh sạch protein thì vẫn là hướng ứng dụng mới chưa được biết đến. Trong nghiên cứu này, melanin được lựa chọn cho mục đích làm vật liệu giá thể cho sắc ký ái lực vì nó có nhiều đặc tính phù hợp. Melanin có tính bền nhiệt, không tan trong nước, trong acid, tan ít trong kiềm, không phải là nguồn thức ăn của vi sinh vật [11]. Quan trọng hơn là melanin mang nhiều nhóm chức quan trọng, bao gồm hydroxyl (-OH), acid carboxylic (-COOH), và amin (-NH-), cho phép melanin có thể tạo liên kết để bắt giữ các ion kim loại như Ni^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+} [12-13].

Melanin từ túi mực cũng đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu khác nhau [9, 12-13]. Trong ngành thuỷ sản, mực được chế biến để phục vụ nhu cầu thực phẩm trong nước và xuất khẩu với một lượng lớn, mang lại giá trị cao về mặt kinh tế. Tuy nhiên, túi mực của mực và bạch tuộc thì được coi là phế phẩm, gần như không được sử dụng đến. Trong khi hàm lượng melanin chiếm 16 - 18 % trong trọng lượng túi mực [16]. Vì thế, nếu có thể khai thác sử dụng được nguồn nguyên liệu này sẽ rất có ý nghĩa vì giá thành vật liệu không đáng kể và có thể mang lại nhiều ứng dụng trong thực tiễn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) RIL mang vector pET28a tái tổ hợp biểu hiện protein VP28 dung hợp 6xHis-tag tại đầu C (His-tag VP28); His-tag VP28 có khối lượng phân tử khoảng 28 kDa [17].

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hoá chất được dùng trong nghiên cứu bao gồm các muối ($NiSO_4$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, $ZnSO_4.H_2O$) của hãng Sigma, kháng thể anti-histidine từ chuột của Clontech, Ni-Sepharose của GE Healthcare, thang chuẩn protein của hãng iNtRON BIOTECH. Các hóa chất còn lại đều được mua từ các hãng có uy tín và đạt độ tinh khiết cần thiết cho nghiên cứu.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tinh sạch melanin từ túi mực của con mực

Túi mực của con mực thu được từ công ty hải sản đã được phá vỡ và thu lấy chất lỏng theo tỷ lệ 50 g chất lỏng mực được hòa tan vào 200 mL HCl 0,5 M. Hỗn hợp sau đó được siêu âm 15 phút trong bể siêu âm và khuấy từ trong 30 phút. Sau khi rửa với nước, mẫu được bổ sung thêm aceton 100 % và ủ tại 4ºC trong 48 giờ, ly tâm 10.000 vòng tại 5ºC trong 15 phút và thu cặn (melanin). Lặp lại bước rửa với aceton 02 lần và rửa với nước 03 lần. Tiếp theo, cặn thu nhận được sấy khô ở 60ºC, nghiền nhỏ về đến kích thước khoảng 150 µm và bảo quản ở nhiệt độ phòng [16].

2.3.2. Biểu hiện His-tag VP28 ở chủng vi khuẩn E. coli BL21 (DE3) RIL và chuẩn bị dịch chiết protein

Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) RIL biểu hiện His-tag VP28 được nuôi cấy khởi động trong 50 mL môi trường LB lỏng có kháng sinh kanamycin 50 µg/mL trong 14 - 16 giờ, tốc độ lắc 200 rpm, tại nhiệt độ 37ºC. Dịch nuôi cấy được bổ sung vào 1 L LB lỏng sao cho mật độ tế bào tại OD_{600} = 0,05 và tiếp tục được nuôi cấy tại 37ºC tới khi mật độ tế bào OD_{600} đạt 0,8, bổ sung IPTG 0,5 mM để cảm ứng sinh tổng hợp protein đích. Sau 3 giờ, tế bào được thu lại bằng cách ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút, 4ºC. Sinh khối tế bào được hòa lại trong đệm A (Tris - HCl 20 mM pH 7,9, NaCl 100 mM, PMSF 1 mM, Imidazole 5 mM) theo tỉ lệ: 1 môi trường: 10 mL đệm, làm lạnh trên đá, tiến hành siêu âm 13 lần, mỗi lần 30 giây để phá vỡ thành tế bào. Dịch siêu âm được ly tâm 12.000 vòng/phút trong 30 phút, 4°C để thu protein tổng số trong pha tan của tế bào.

2.3.3. Hấp phụ ion kim loại lên bề mặt của melanin

1 g melanin ủ trong 5 mL đệm P (PBS 1 × pH 7,4, NaCl 100 mM, imidazole 10 mM). Bổ sung 1 mL mỗi ion kim loại: Ni^{2+}, Zn^{2+} và Fe^{3+} với nồng độ 100 mM, đảo trộn trong 60 phút, sau đó ly tâm mẫu ở 6.000 rpm trong 10 phút, thu cặn là melanin ở trạng thái tự do hoặc đã được gắn với kim loại (ký hiệu lần lượt là Ni-, Zn- và Fe-melanin). Phần dịch nổi cũng được thu lại để xác định lượng ion kim loại tự do (kim loại không liên kết với melanin) bằng phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử.

2.3.4. Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS)

Phương pháp quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS) được dùng để định lượng nồng độ ion kim loại trong mẫu thử. Kim loại trong mẫu được chuyển thành hơi nguyên tử tự do, có khả năng hấp thụ ánh sáng có bước sóng phù hợp được phát ra từ nguồn sáng của thiết bị. Cường độ hấp thụ ánh sáng tỷ lệ với nồng độ ion kim loại trong mẫu.

Công thức tính % ion kim loại đã hấp phụ và lượng ion kim loại đã hấp phụ bởi melanin được tính như sau:

% ion kim loại được hấp phụ = % ((100 mM ban đầu - nồng độ dư thừa mM) / 100 mM ban đầu)
*Lượng ion kim loại hấp phụ (mg) = 100 mM ban đầu*khối lượng phân tử M - nồng độ dư thừa (mg/L)*

2.3.5. Chuẩn bị các giá thể melanin

Để chuẩn bị giá thể cho tinh sạch protein, 0,2 g melanin ủ trong 1 mL đệm P (PBS 1 × pH 7,4, NaCl 100 mM, imidazole 10 mM). Bổ sung 0,2 mL mỗi ion kim loại: Ni^{2+}, Zn^{2+} và Fe^{3+} với nồng độ 100 mM, đảo trộn trong 60 phút, sau đó ly tâm mẫu ở 6.000 rpm, 10 phút, thu cặn là melanin ở trạng thái tự do hoặc đã được gắn với kim loại (ký hiệu lần lượt là Ni, Zn và Fe-melanin).

Cơ sở cho việc lựa chọn lượng Sepharose và melanin này là do thể tích của chúng trong ống nghiệm là tương đối giống nhau.

2.3.6. Tinh sạch His-tag VP28 bằng các giá thể melanin gel Ni-Sepharose trong ống nghiệm

300 mL gel Ni-Sepharose dùng làm đối chứng dương hoặc các giá thể melanin chuẩn bị ở mục phương pháp 2.3.5 được cân bằng trong đệm P tại 4°C, 60 phút. Sau đó, tiến hành ly tâm loại bỏ dịch nổi. 1 mL của dịch chiết *E. coli* BL21 (DE3) RIL biểu hiện His-tag VP28 (nồng độ 15 mg/mL) được bổ sung và tiếp tục ủ trong 3 giờ ở 4°C. Tiến hành ly tâm, loại bỏ dịch nổi thu các phân đoạn protein không gắn gel/melanin (ký hiệu Ft). Các phân đoạn protein gắn yếu hoặc gắn không đặc hiệu với gel/melanin tiếp tục được rửa bằng đệm P có imidazole 30 mM đến khi

A280 < 0,05. Các protein gắn gel/melanin được rửa chiết bằng cách bổ sung đệm đẩy (elution) là đệm P có nồng độ imidazol khác nhau và pH khác nhau (được trình bày ở phần kết quả), ly tâm, thu dịch nổi (ký hiệu E). Sau rửa chiết, các protein tiếp tục được rửa bằng đệm P có imidazole 30 mM đến khi A280 < 0,05. Các protein gắn gel/melanin được rửa chiết bằng cách bổ sung đệm đẩy (elution) là đệm P có nồng độ imidazol khác nhau và pH khác nhau (được trình bày ở phần kết quả), ly tâm, thu dịch nổi (ký hiệu E). Sau rửa chiết, các protein vẫn còn gắn với gel/giá thể melanin (ký hiệu AE) sẽ được thu nhận bằng cách ủ gel/giá thể melanin trong đệm mẫu (có thành phần SDS) của điện di SDS-PAGE. Các phân đoạn protein được thu lại và kiểm tra độ tinh sạch bằng điện di trên gel SDS-PAGE hoặc/và thẩm tách miễn dịch Western-Blotting.

2.3.7. Điện di trên protein trên gel polyacrylamid có SDS

SDS-PAGE gồm 2 lớp: lớp gel tách 12 % và lớp gel cô 4 %. Mẫu protein sau khi trộn với đệm mẫu (nồng độ 5x) theo tỷ lệ thể tích 4 : 1 được xử lý nhiệt ở 95°C trong 5 phút và làm lạnh ngay trên đá và dùng để tra giếng chạy điện di. Điện di trong đệm Tris-glycine pH 8,8 chứa SDS 1 %, quá trình điện di với hiệu điện thế ổn định 150V trong 1 giờ. Bản gel điện di được nhuộm với dung dịch Comassie brilliant blue R-250 (CBB) 0,5 % pha trong hỗn hợp methanol: acetic: nước với tỉ lệ thể tích là 3 : 6 : 1 khoảng 30 phút, màu thuốc nhuộm được tẩy bằng hỗn hợp đã dùng để pha CBB cho tới khi bản gel có nền sáng.

2.3.8. Thẩm tách miễn dịch (Western-Blotting) sử dụng kháng thể kháng His-tag

Các dịch chứa protein cần kiểm tra sau khi điện di trên gel SDS-PAGE được chuyển lên màng PVDF (Polyvinylidene fluoride) bằng phương pháp điện chuyển trong đệm Tris-Glycine có methanol 10 %. Màng được cố định bằng dung dịch BSA 3 % trong đệm PBS (pH 7,4) 1 giờ ở nhiệt độ phòng. BSA được loại bỏ và màng được rửa 3 lần bằng đệm rửa PBST (PBS 1x, pH 7,4 có bổ sung Tween-80 0,1 %). Màng sau đó được ủ với kháng thể đơn dòng sơ cấp kháng histidine (Clontech, Mỹ), trong 1 giờ, ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Màng được rửa 3 lần bằng đệm PBST. Sau đó, màng tiếp tục được ủ với kháng thể thứ cấp kháng IgG của chuột (anti-mouse) có gắn enzym phosphatase kiềm (AP). Các băng protein được hiện màu bằng cách ủ màng trong dung dịch cơ chất NBT (p- nitro blue tetrazolium chloride) và BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) pha trong đệm Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5 có $MgCl_2$ 5 mM và NaCl 0,1 M. Phản ứng được dừng trong đệm PBS 1x, pH 7,4 có chứa EDTA 20 mM khi các băng protein hiện rõ.

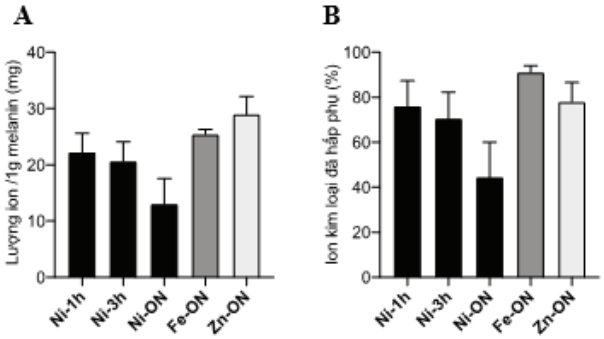
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khả năng hấp phụ các ion kim loại của melanin

Để lựa chọn ion kim loại phù hợp gắn với melanin nhằm tạo giá thể kim loại-melanin để tinh sạch His-tag protein, nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát khả năng hấp phụ các ion kim loại khác nhau (Ni^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}) của melanin trong các thời gian khác nhau 1 giờ, 3 giờ và qua đêm (ON) đối với Ni^{2+}.

Kết quả phân tích nồng độ ion kim loại bằng phương pháp quang phổ hấp phụ nguyên tử cho thấy 1 g melanin sau khi ủ qua đêm có khả năng hấp phụ các ion kim loại Ni^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+} với lượng lần lượt là 13,1; 25,5 và 28,9 mg (Hình 1A) hay 44,5; 91,2 và 86,5 mM (Hình 1B). Tính trên cùng một nồng độ ion kim loại thì melanin có khả năng hấp phụ nhiều nhất là Fe^{3+}, rồi đến Zn^{2+}, Ni^{2+} (Hình 1B). Melanin đã được hấp phụ kim loại Fe^{3+}, Zn^{2+} và Ni^{2+} được ký hiệu lần lượt là Fe-mel, Zn-mel và Ni-mel. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Hong và cộng

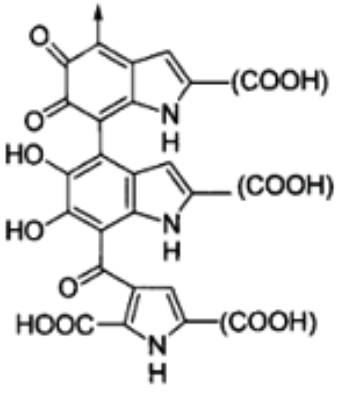
sự (2004) đã chỉ ra rằng melanin có khả năng hấp phụ các ion kim loại với ái lực với Cu^{2+}, Fe^{3+} và Mn^{2+} lớn hơn Zn^{2+} [12].



Hình 1. *Khả năng hấp phụ kim loại của melanin*

A) Lượng ion kim loại (mg) mà 1 g melanin hấp phụ. B) Mức độ hấp phụ (%) của melanin đối với các ion kim loại. Kết quả này cũng tương đương với lượng ion kim loại (mM) mà 1 g melanin hấp phụ. Mức độ hấp phụ được tính dựa trên nồng độ ban đầu và nồng độ dư thừa. Biểu đồ được tính toán theo kết quả của 03 thí nghiệm lặp lại độc lập.

Thời gian ủ khác nhau (Hình 1A-B) cho thấy, melanin có khả năng hấp phụ Ni^{2+} tốt hơn khi được ủ với Ni^{2+} trong thời gian 1 giờ hoặc 3 giờ so với ủ qua đêm (ON). Nồng độ hấp phụ ở thời gian ngắn 1 giờ hay 3 giờ cao hơn qua đêm (ON) đối với Ni^{2+}. Điều này có thể do melanin có thể hấp phụ Ni^{2+} bằng cả cơ chế vật lý và hoá học. Về cơ chế liên kết hoá học thì ion Zn^{2+} được biết là liên kết với nhóm acid carboxylic, còn Fe^{3+} có thể liên kết với cả nhóm OH và amin của melanin (Hình 2). Trong khi đó, Ni^{2+} có thể liên kết với cả 02 nhóm carboxylic acid và amin, trong đó chủ yếu là với amin ở pH 7 - 8 [12-13, 17]. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng ngoài liên kết ion của các ion kim loại như Ni^{2+} với melanin (liên kết hoá học) thì còn có các liên kết yếu dẫn đến sự tương tác vật lý như Van der Waals, tương tác tĩnh điện [18], cũng như là các tương tác kỵ nước có thể xảy ra [19]. Chính vì thế chúng tôi đã giả thuyết rằng sự phản hấp phụ do phá vỡ các liên kết yếu này do một yếu tố nào đó (chẳng hạn pH) trong quá trình ủ dài có thể xảy ra. Hoặc do nồng độ ion ban đầu cao, nên thời gian ủ dài sẽ đưa các trạng thái liên kết về cân bằng, dẫn đến sụt giảm nồng độ ion được hấp phụ.



Hình 2*. Cấu trúc được dự đoán của eumelanin [12]*

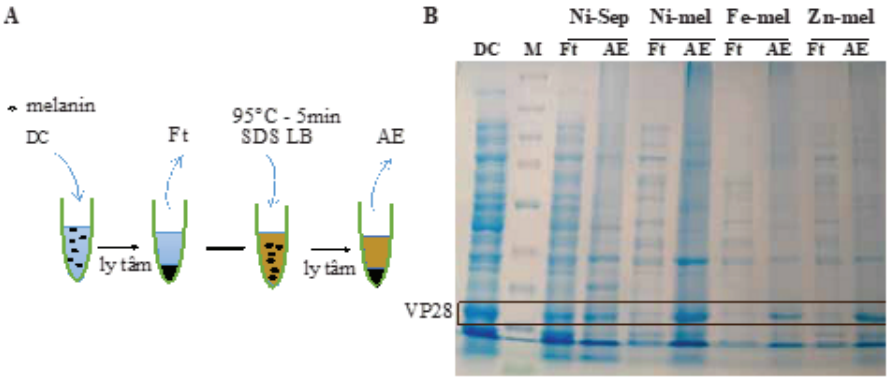
Các vị trí COOH có thể là H hoặc COOH, tùy thuộc vào dạng monomer

3.2. Khả năng liên kết của các giá thể melanin với His-tag VP28

Trong nghiên cứu này, các giá thể melanin đã hấp phụ ion kim loại qua đêm (Fe-mel, Zn-mel và Ni-mel) và Ni-Sepharose (đối chứng dương) đã được ủ với dịch chiết protein tổng số của vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) RIL có biểu hiện His-tag VP28 để khảo sát khả năng gắn của His-tag VP28 với các giá thể.

Lượng 0,3 mL Sepharose và 0,2 gram melanin (trước khi cho dung dịch) được sử dụng để so sánh với nhau trong nghiên cứu này là do thể tích của chúng trong ống nghiệm là tương đối giống nhau. Các phân đoạn protein trong Ft và AE được thu nhận lại để kiểm tra sự có mặt của His-tag VP28 bằng điện di SDS-PAGE (Hình 3A).

Kết quả trên SDS-PAGE (Hình 3B) cho thấy đã thu nhận được băng protein có kích thước 28 kDa tương đương với His-tag VP28 trong dịch AE của tất cả các giếng. Băng 28 kDa này cũng thể hiện rõ nét ở mẫu Ni-mel, và tương đương với băng từ Ni-Sepharose. Điều này cho thấy giá thể kim loại-melanin đều có khả năng liên kết với His-tag VP28 và thậm chí có thể so sánh được với Ni-Sepharose. Thí nghiệm này cho thấy khả năng liên kết của các giá thể melanin gắn ion kim loại với His-tag VP28, là tiền đề cho việc tiến hành thử nghiệm tinh sạch His-tag protein sử dụng các giá thể melanin có gắn ion kim loại tiếp theo. Thí nghiệm cần được lặp lại nhiều lần để có những nhận định về sự giảm nồng độ protein trong các phân đoạn Ft, AE của Fe-melanin và Zn-melanin so với Ni-melanin. Ngoài ra, thử nghiệm melanin dạng đơn với dịch chiết protein tổng số sẽ là một kết quả thú vị để so sánh với các giá thể melanin khác về khả năng liên kết với His-tag protein.



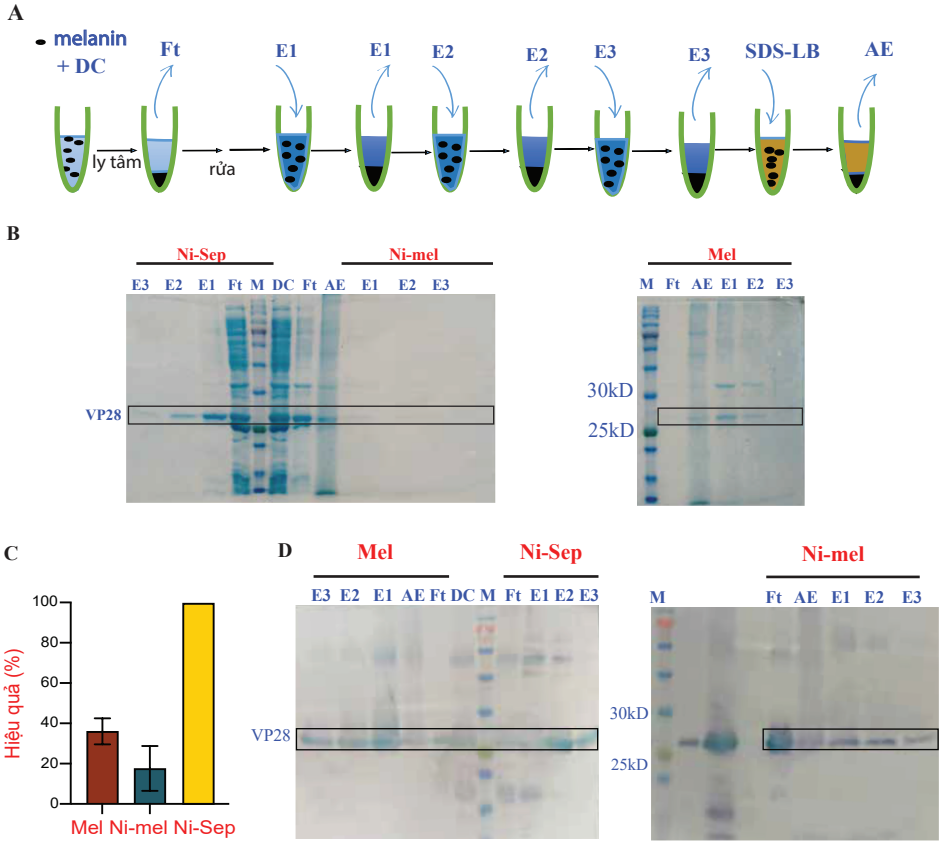
***Hình 3**. Khả năng liên kết của các giá thể melanin với His-tag VP28*

A) Sơ đồ thí nghiệm; B) SDS-PAGE các phân đoạn protein tinh sạch bằng giá thể kim loại - melanin. M: thang chuẩn protein, DC: dịch chiết, Ft: phân đoạn không gắn giá thể, AE: phân đoạn protein sau rửa chiết, mel: melanin, Sep: Sepharose

3.3. Tinh sạch His-tag VP28 bằng giá thể Ni-melanin

Trong nghiên cứu này, giá thể Ni-melanin đã được thử nghiệm để tinh sạch His-tag VP28 trong dịch chiết tế bào vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) RIL với một số điều kiện khác nhau và so sánh với hiệu quả tinh sạch His-tag VP28 của đối chứng dương Ni-sepharose. Ngoài ra, melanin dạng đơn cũng được dùng làm giá thể đối chứng. Gel/giá thể sau khi được ủ với dịch chiết protein thô, thu Ft, các protein gắn không đặc hiệu, các phân đoạn protein gắn đã được rửa giải với đệm P nồng độ imidazol khác nhau 250, 500 mM pH 7,4 (ký hiệu lần lượt là E1, E2) hoặc đệm P nồng độ imidazol 250 mM pH 2,0 (ký hiệu E3) (sơ đồ thí nghiệm Hình 4A).

Kết quả trên gel SDS-PAGE và thẩm tách miễn dịch (Hình 4B) cho thấy đệm chiết E1 sau 14 giờ ủ đều cho phép giải phóng protein His-tag VP28 khỏi các giá thể. Độ sáng (intensity) của băng His-tag VP28 trên gel SDS-PAGE giảm dần theo thứ tự: giá thể Ni-Sepharose > melanin > Ni-melanin (Hình 4B). Các thử nghiệm với thời gian ủ ngắn hơn (30 phút, 60 phút) của đệm E1 đều chưa thấy khả năng rửa giải protein mong muốn (kết quả không được trình bày). Các đệm E2, E3 là các đệm chiết có mức độ khắc nghiệt tăng dần so với E1 được bổ sung lần lượt sau đó (ủ 1 giờ mỗi đệm) nhằm thu được hết các phân đoạn gắn cột (Hình 4A). Tuy nhiên E2, E3 dường như không có hiệu quả hơn E1 trong việc rửa giải protein vì His-tag VP28 vẫn không được giải phóng ra khỏi giá thể Ni-melanin (Hình 4B). Kết quả trên gel thẩm tách miễn dịch (Hình 4D) xác nhận sự có mặt của His-tag VP28 ở vị trí băng quan tâm. Kết quả này của 1 lần thí nghiệm, cần được lặp lại để xác nhận tính định lượng của VP28 ở các dịch chiết thu được.



Hình 4. *Các giá thể melanin cho phép tinh sạch VP28*

A) Sơ đồ thí nghiệm. B) Hình ảnh gel đại diện cho thấy các giá thể melanin cho phép tinh sạch VP28. Các mẫu protein được điện di trên gel polyacrylamide 12 %, nhuộm Comassie blue. Khung màu nâu được đánh dấu trên gel chỉ ra vị trí tương đương với VP28. C) Hiệu quả tinh sạch VP28 của các giá thể melanin so với Sepharose-Ni. Giếng E1 trong hình B được phân tích bằng phần mềm imageJ. Thí nghiệm lặp lại 3 lần độc lập. D) Kết quả thẩm tách miễn dịch (kết quả 1 lần thí nghiệm). Kháng thể sơ cấp anti-histidine từ chuột và kháng thể thứ cấp kháng IgG của chuột đã được sử dụng. M: thang chuẩn protein, DC: dịch chiết, Ft: phân đoạn không gắn giá thể, AE: phân đoạn protein sau rửa chiết, mel: melanin, Sepharose.

Để có một ước lượng cho khả năng tinh sạch His-tag VP28 của các giá thể melanin, độ sáng của băng His-tag VP28 ở giếng E1 của melanin và Ni-melanin đã được so sánh với đối chứng dương Ni-Sepharose. Kết quả cho thấy hiệu quả này tương ứng là 38 % và 18 % khi sử dụng giá thể melanin và Ni-melanin (Hình 4C). Sự so sánh này mang tính tương đối vì được dựa trên mức độ tương đồng về thể tích của gel Ni-Sepharose và melanin/Ni-melanin trong ống nghiệm. Để có một kết quả so sánh tối ưu hơn về hiệu quả tinh sạch cũng như là bài toán kinh tế giữa melanin và Sepharose thì cần triển khai thêm các thí nghiệm khác. Chẳng hạn như dùng một lượng cố định His-tagged VP28 đã tinh sạch cho lên giá thể Ni-sepharose và melanin để tính toán được lượng gel Ni-Sepharose (mL) và lượng melanin (gram) cần dùng để thu lại hết được lượng His-tag VP28 đó.

Ngoài ra, kết quả trên cho thấy một điều thú vị là melanin không hấp phụ các ion kim loại (được dùng làm đối chứng) lại cho hiệu quả tinh sạch cao hơn Ni-melanin khoảng 2 lần (38 % và 18 %). Dịch không gắn cột (Ft) của Ni-melanin cho nhiều băng protein hơn so với của melanin, gợi ý rằng cơ chế liên kết của Ni-melanin và melanin với VP28 là khác nhau. Các cơ chế liên kết của các giá thể melanin với His-tag protein hiện chưa được hiểu rõ. Giả thiết của chúng tôi là các gốc COOH, -NH- của melanin dạng đơn có thể tạo ra các liên kết với các protein trong dịch chiết protein tổng số, có thể không chọn lọc với His-tag protein. Nhưng khi dùng chất cạnh tranh imidazole thì có thể đẩy His-tag protein ra khỏi chất nền. Trong khi đó với giá thể Ni-melanin, Ni^{2+}có khả năng đã chiếm các gốc chức năng của melanin và tạo ra các cánh tay liên kết ngắn không ổn định với His-tag, dẫn đến việc mất His-tag trong quá trình tinh sạch. Ngoài ra, một giả thiết khác là melanin sau quá trình tinh sạch vẫn bắt giữ bền chặt các ion khác (không phải là sodium) trong nước biển, ảnh hưởng đến khả năng tinh sạch protein với hiệu suất cao.

Hiện tại nghiên cứu của chúng tôi chưa cho thấy hiệu quả tinh sạch cao nhưng cũng đã chỉ ra được tiềm năng ứng dụng melanin, một phế phẩm trong ngành thực phẩm, trong công nghệ sinh học như là một vật liệu giá thể mới cho sắc kí ái lực. Ngoài ra đây là một hướng ứng dụng mới của melanin, lần đầu tiên được nghiên cứu ở trong/ngoài nước. Để mang lại hiệu quả mong muốn và khả năng tinh sạch cao thì việc quá trình tối ưu và biến đổi vật liệu cần phải được nghiên cứu thêm. Biến đổi cấu trúc melanin chẳng hạn như gắn thêm các cánh tay đòn (spacer aim) giúp liên kết với phối tử hiệu quả hơn, làm tăng và ổn định quá trình tinh sạch protein đích.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả trên có thể kết luận, khả năng hấp phụ các ion Ni^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}của melanin lần lượt vào khoảng 13,1; 25,5 và 28,9 mg/g melanin hay 44,5; 91,2 và 86,5 mM/g với thời gian qua đêm. Khả năng hấp phụ của melanin với ion Ni^{2+}giảm dần theo thời gian 1 giờ > 3 giờ > qua đêm. Các chất nền melanin ở dạng đơn và dạng hấp phụ ion kim loại Ni^{2+}đã cho phép tinh sạch protein mang His-tag VP28 khi dùng đệm rửa chiết có imidazole 250 mM sau 14 giờ ủ. So sánh một cách tương đối, cùng một thể tích với Ni-Sepharose, melanin và Ni-melanin cho hiệu suất tương ứng là 38 % và 18 %.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội với mã số đề tài TN.20.07. Để hoàn thành được nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu xin chân thành cảm ơn GS.TS. Phan Tuấn Nghĩa đã tư vấn trong quá trình thực hiện đề tài cũng như hỗ trợ một số hoá chất và chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3) RIL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. GE healthcare, "*Affinity Chromatography*," *GE Healthcare. Handbook*., 2007.

[2]. M. d'Ischia, K. Wakamatsu, F. Cicoira , E. Di Mauro, J. C. Garcia-Borron, S. Commo, I. Galván, G. Ghanem, K. Kenzo , P. Meredith, A. Pezzella , C. Santato, T. Sarna, J. D. Simon, L. Zecca, F. A Zucca, A. Napolitano, and S. Ito, "Melanins and melanogenesis: From pigment cells to human health and technological applications," *Pigment Cell and Melanoma Research*, vol. 28, no. 5. 2015.

[3]. K. H. Kaidbey, P. P. Agin, R. M. Sayre, and A. M. Kligman, "Photoprotection by melanin-a comparison of black and Caucasian skin," *Journal of the American Acedemy of Dermatology*, vol. 1, no. 3, 1979.

[4]. M. Chu, W. Hai, Z. Zhang, F. Wo , Q. Wu, Z. Zhang, Y. Shao, D. Zhang, L. Jin, and D. Shi, "Melanin nanoparticles derived from a homology of medicine and food for sentinel lymph node mapping and photothermal in vivo cancer therapy," *Biomaterials*, vol. 91, 2016.

[5]. R. C. R. De Goncalves and S. R. Pombeiro-Sponchiado, "Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from Aspergillus nidulans," *Biological & Pharnaceutical. Bulletin,* vol. 28, no. 6, 2005.

[6]. A. El-Obeid, S. Al-Harbi, N. Al-Jomah, and A. Hassib, "Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF-α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production," *Phytomedicine,* vol. 13, no. 5, 2006.

[7]. D. C. Montefiori and J. Zhou, "Selective antiviral activity of synthetic soluble l-tyrosine and l-dopa melanins against human immunodeficiency virus in vitro," *Antiviral Research*, vol. 15, no. 1, 1991.

[8]. P. T. Ha, N. H. Nam, D. D. Hai, P. Q. Thong, T. T. M. Nguyet, N. X. Phuc, H. T. M. Nhung, L. M. Huong, N. T. Linh, and B. Q. Thuc, "Targeted drug delivery nanosystems based on copolymer poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate for cancer treatment," *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 7, no. 1, 2016.

[9]. A. M. Cuong, N. T. L. Na, P. N. Thang, T. N. Diep, L. B. Thuy, N. L. Thanh, and Nguyen Dinh Thang, "Melanin-embedded materials effectively remove hexavalent chromium (CrVI) from aqueous solution," *Environmental Health and Preventive Medicine*, vol. 23, no. 1, pp. 1-11, 2018.

[10]. X. Yu, Z. Gu, R. Shao, H. Chen, X. Wu, and W. Xu, "Study on adsorbing chromium (VI) ions in wastewater by aureobacidium pullulans secretion of melanin," *Advanced Materials Research*., vol. 156-157, pp. 1378-1384, 2011.

[11]. J. D. Nosanchuk and A. Casadevall, "Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* vol. 50, no. 11. 2006.

[12]. L. Hong, Y. Liu, and J. D. Simon, "Binding of Metal Ions to Melanin and Their Effects on the Aerobic Reactivity," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 80, no. 3, p. 477, 2004.

[13]. L. Hong and J. D. Simon, "Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in Melanin," *Society,* vol. 111, no. 28, pp. 7938-7947, 2007.

[14]. Y. Liu and J. D. Simon, "The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of Sepia officinalis," *Pigment Cell Research*, vol. 16, no. 1, 2003.

[15]. N. T. L. Na, S. D. Loc, N. L. M. Tri, N. T. B. Loan, H. A. Son, N. L. Toan, H. P. Thu, H. T. M. Nhung, N. L. Thanh, N. T. V. Anh, and N. D. Thang, "Nanomelanin potentially protects the spleen from radiotherapy-associated damage and enhances immunoactivity in tumor-bearing mice," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 10, 2019.

[16]. M. Magarelli, P. Passamonti, and C. Renieri, "Purification, characterization and analysis of sepia melanin from commercial sepia ink (Sepia Officinalis)," *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, vol. 5, no. 2, 2010.

[17]. T. Kiss and A. Gergely, "Copper(II) and nickel(II) ternary complexes of l-dopa and related compounds," *Journal of Inorgani Biochemistry,* vol. 25, no. 4, pp. 247-259, 1985.

[18]. B. Larsson and H. Tjälve, "Studies on the mechanism of drug-binding to melanin," *Biochemistry Pharmacology,* vol. 28, no. 7, pp. 1181-1187, 1979.

[19]. K. B. Stępień and T. Wilczok, "Studies of the mechanism of chloroquine binding to synthetic dopa-melanin," *Biochemical Pharmacology,* vol. 31, no. 21, pp. 3359-3365, 1982.

Melanin, a potential new matrix material for recombinant His-tag protein purification

Nguyen Thi Loan[1], Nguyen Thi Hong Loan[1,2], Nguyen Dinh Thang[1,2], Le Thi Hong Nhung[1,2]

[1]Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

[2]The Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

Abstract

Nickel-Sepharose (Ni-Sepharose) has been being applied as the most common matrix in purifying His-tag proteins based on the affinity interaction between histidine residues and Ni^{2+} ion. However, Sepharose still comes at high cost for this purification purpose, especially in developing countries as Vietnam. Here, we show for the first time that melanin from ink sacs of squids which is considered as biowaste in the food industry, can be used as a new potential matrix material instead of Sepharose. We utilized either melanin or melanin charged with metal ions as the stationary phase of affinity purification of His-tag proteins. The results showed that a recombinant His-tag protein VP28 in a protein pool was captured by melanin and Ni^{2+}/Fe^{3+}/Zn^{2+} chelated melanin. Experiments for releasing VP28 were performed only on the melanin and Ni^{2+} -melanin matrices. The result showed that VP28 was quite selectively eluted when applying elution buffer of 250 mM imidazole overnight. The relative efficiency in releasing VP28 of melanin and Ni-melanin matrices roughly compared to Ni-Sepharose were about 38 % and 18 % respectively. Further optimization of this process may allow higher efficiency in the purification of His-tag proteins.

Keywords: *Melanin, metal ions, matrix of affinity chromatography, Sepharose, His-tag proteins.*