

Biểu hiện Protein HA/H7N9 Polymer dung hợp IgMFC trong cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*) bằng phương pháp Agroinfiltration

Lê Thị Thủy, Lê Thu Ngọc, Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang,
Phạm Bích Ngọc*, Chu Hoàng Hà

*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam,
18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 16 tháng 12 năm 2016

Chỉnh sửa ngày 18 tháng 01 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 24 tháng 03 năm 2017

Tóm tắt: Virus cúm A/H7N9 gây bệnh trên người xuất hiện đầu tiên tại Trung Quốc năm 2013 và tiếp tục lây nhiễm đến nay với tỷ lệ tử vong 40%. Hemagglutinin (HA) là protein chính của virus cúm, chứa các epitope trung hòa virus, được xem như là mục tiêu hàng đầu dùng để thiết kế loại vắc xin tái tổ hợp chống lại sự xâm nhiễm của virus cúm A. Trong nghiên cứu này, kháng nguyên HA của virus cúm H7N9 dung hợp với đoạn Fc của IgM được biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *nicotiana. sp* bằng phương pháp Agro-infiltration. Sự biểu hiện của protein được kiểm tra bằng lai miễn dịch. Kết quả cho thấy, chúng tôi đã biểu hiện thành công protein (H7pII-IgMFC)₃ trong cây thuốc lá *N. benthamiana*. Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại (Immobilized metal ion chromatography- IMAC) và đánh giá hoạt tính sinh học bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu. Kết quả kiểm tra hoạt tính cho thấy (H7pII-IgMFC)₃ gây ngưng kết hồng cầu với hiệu giá ngưng kết 32 HAU tương ứng với 0,31 µg protein tinh sạch. Kết quả này mở ra một hướng mới cho việc phát triển vắc xin chống virus cúm A/H7N9 trong tương lai.

Từ khóa: Virus cúm A/H7N9, Hemagglutinin (HA), polymer dung hợp IgMFC, biểu hiện tạm thời, protein tái tổ hợp.

1. Mở đầu

Virus H7N9 thuộc virus cúm A họ Orthomyxoviridae [1]. Chúng virus cúm H7N9 trước đây đã từng xuất hiện nhưng chỉ gây ra dịch bệnh trên chim tại Hà Lan, Nhật Bản và Hoa Kỳ. Ba trường hợp nhiễm virus cúm gia cầm A/H7N9 đầu tiên trên người được phát

hiện và công bố tại Thượng Hải và An Huy, Trung Quốc vào ngày 31/03/2013 (WHO, 2013). Thống kê đến nay của WHO (báo cáo ngày 14/12/2016), thế giới ghi nhận tổng số 807 trường hợp nhiễm cúm A(H7N9) trên người, trong đó có 322 trường hợp tử vong (tỷ lệ 40%) [2]. Hiện nay, một số vắc xin đã được thử nghiệm và phát triển như vắc xin nhược độc [3, 4], vắc xin cúm bất hoạt [5], vắc xin mảnh [6] và vắc xin vector virus [7, 8]. Tuy nhiên, các vắc xin này hiệu quả chưa cao hoặc có nguy

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-912247887.
Email: pbnogoc@ibt.ac.vn

ơ gây thay đổi đặc tính miễn dịch của virus [9]. Vì vậy, yêu cầu nghiên cứu và sản xuất ra vắc xin phòng virus cúm H7N9 hiệu quả là một vấn đề cấp bách.

Công nghệ vắc xin tiểu đơn vị là một cách tiếp cận đầy hứa hẹn trong sản xuất vắc-xin cúm với lợi thế về an toàn và sản xuất, và chúng đã được chứng minh là có hiệu quả chống lại bệnh cúm [10, 11]. Hemagglutinin (HA) là protein chính của vỏ virus cúm, chứa các epitope trung hòa virus, được bao gồm trong tất cả các loại vắc-xin cúm hiện nay, cũng như trong phần lớn các vắc xin thử nghiệm và được xem như là mục tiêu hàng đầu dùng để thiết kế loại vắc xin tái tổ hợp chống lại sự xâm nhiễm của virus cúm A [12-14]. IgM là kháng thể đầu tiên được sản xuất trong quá trình đáp ứng miễn dịch [15]. Phần đoạn Fc của IgM được quan tâm đặc biệt vì cấu trúc của nó, khả năng hình thành oligomer và khả năng liên kết với protein effector khác nhau giữa các vùng Fc của các IgM khác nhau. Việc dung hợp Fc với protein tái tổ hợp đã được chứng minh là có hiệu quả trong nhiều nghiên cứu phát triển vắc xin trên thế giới. Trong các nghiên cứu phát triển vắc xin tiểu đơn vị, việc dung hợp protein với đoạn Fc của IgM đã được chứng minh là có nhiều ưu điểm nổi bật, bao gồm mức độ biểu hiện protein cao, năng suất tốt hơn, tinh sạch dễ dàng và tăng cường sự ổn định của protein [16].

Agroinfiltration là một phương pháp biểu hiện tạm thời protein ở thực vật sử dụng khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Phương pháp này có những ưu điểm như thu protein nhanh, không bị ảnh hưởng bởi vị trí gắn gen đích trong tế bào thực vật, có thể tiến hành biểu hiện trong các mô đã biệt hóa hoàn toàn như lá, protein biểu hiện ở mức độ cao và không gặp phải vấn đề an toàn sinh học hay rủi ro đến môi trường [17]. Nhiều nghiên cứu biểu hiện và sản xuất thành công kháng nguyên tái tổ hợp với hàm lượng cao như kháng nguyên HA virus cúm gia cầm H5N1 200 mg HA/kg lá tươi [18]; 675 mg HA/kg [19]; 400 mg NA/kg [20].

Trong nghiên cứu này, kháng nguyên HA của

virus cúm H7N9 dung hợp với đoạn Fc của IgM được biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp agroinfiltration. Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại (Immobilized metal ion chromatography-IMAC) và đánh giá hoạt tính sinh học bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Thực vật: Cây thuốc lá *N. benthamiana* do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp

Các vector: Vector pUCHA mang gen mã hóa cho kháng nguyên H7 được tổng hợp bởi công ty SGIDNA của Thụy Điển; Vector pRTRA_35S_SP_His_H5_pII_IgMFc_cmyc_KDEL do Viện di truyền thực vật và nghiên cứu cây trồng (IPK) Đức cung cấp (Phan Trong Hoang et al., unpublished data). Vector chuyển gen pCB301 có chứa gen kháng kháng sinh kanamycin [21] được dùng để tạo vector chuyển gen mã hóa protein (H7pII- IgMFc)₃; Vector pMON65305/Hc-Pro chứa gen mã hóa cho protein Hc-Pro và gen kháng kháng sinh spectinomycin và rifamycin được dùng để đồng biểu hiện trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời với vector đích tái tổ hợp.

Chủng vi khuẩn: *Escherichia coli* chủng DH5α được sử dụng như tế bào chủ cho bước nhân dòng gen.

Agrobacterium tumefaciens C58C1 [22] được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen thông qua *Agrobacterium* và biểu hiện tạm thời.

Agrobacterium tumefaciens C58C1 mang vector yếu tố phiên mã FUS3 được sử dụng để đồng biểu hiện tạm thời với vector đích chứa trong vi khuẩn *Agrobacterium* cho sự biểu hiện của protein tái tổ hợp dưới sự kiểm soát của promoter CaMV 35 **Bảng 1.** Danh sách các cặp môi.

Bảng 1. Danh sách các cặp mồi

Tên mồi	Trình tự mồi 5'-3'
H7-BamHI-F	<u>GGATCC</u> GGTCATCACGCAGTCTCCAA
H7- <i>pspOMI</i> -R	<u>GGGCC</u> CGGTAACGGTGTTCATTCCGGGT
H7_F	GGTCATCACGCAGTCTCCAA
H7_R	GGTAACGGTGTTCATTCCGGGT
35S Pro-F	CACTGACGTAAGGGATGACGC
35S Ter-R	CTGGGA ACTACT CACACA

2.2. Phương pháp

Thiết kế vector mang gen mã hóa protein (H7pII-IgMFC)₃

Tạo vector tách dòng mang gen mã hóa protein (H7-pII-IgMFC)₃.

Đoạn gen mã hóa protein H7 được nhân lên bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu H7-BamHIF/*pspOMIR*. Phản ứng PCR được tiến hành trong điều kiện: 50 µl hỗn hợp bao gồm 0,3 µM mồi, 0,2 µM dNTPs, 2,5U Pwo SuperYield DNA polymerase, 5 µl đệm 10X Pwo SuperYield PC và 20 ng khuôn. Quá trình nhân đoạn gồm các bước sau: 94°C/3 phút; 30 chu kỳ lặp lại các bước 94°C/30 giây, 56°C/50 giây, 72°C/30 giây; 72°C/4 phút, sản phẩm được giữ ở 4°C và điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Sản phẩm PCR thu được và plasmid pRTRA_35S_SP_His_H5_pII_IgMFC_cmyc_KDEL được phân cắt bằng *BamHI* và *pspOMI*, sau đó loại bỏ gốc phosphate với *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP). Sản phẩm ghép nối đoạn H7 vào vector pRTRA được biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5α. Chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường LB đặc bổ sung carbenicilin 50 mg/l. Plasmid sau đó được tách chiết và được giải trình tự tự động theo phương pháp Sanger và cộng sự sử dụng cặp mồi 35S-Pro-F và HA-*pspOMI*-R trong bảng 1. Các trình tự nucleotide được phân tích bằng BioEdit 7.0 và Lasergen 7 (DNASTar, Madison, WI, USA).

Thiết kế cấu trúc vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa protein (H7pII-IgMFC)₃. Vector pRTRA có chứa gen mã hóa cho kháng nguyên (H7pII-ELP)₃ và pCB301

được phân cắt bằng *HindIII* nhằm thu được đoạn gen mục tiêu bao gồm 35S_SP_His_pII_IgMFC_cmyc_KDEL và –khung vector pCB301 mở vòng. Các phân đoạn này được tinh sạch để phục vụ cho phản ứng nối ghép tạo vector chuyển gen pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL. Sản phẩm của phản ứng được biến nạp vào tế bào *E.coli* DH5α và chọn lọc trên môi trường LB có bổ sung kanamycin 50 mg/l. Plasmid tái tổ hợp pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL sau khi được chọn dòng bằng PCR và cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *HindIII* sẽ được biến nạp vào vi khuẩn *A.tumefaciens* C58C1/pGV2260 bằng phương pháp xung điện [11] để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời.

Phương pháp biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá *N. benthamiana*. *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 mang vector đích chứa đoạn gen mã hóa kháng nguyên H dưới dạng oligomer và chủng *A.tumefaciens* C58C1 chứa gen mã hóa HcPro được nuôi riêng biệt trong 40 ml môi trường LB có bổ sung 50 µg/ml Kan và 50 µg/ml Rif qua đêm. Sau đó toàn bộ dung dịch chứa từng chủng chuẩn được sang môi trường mới chứa 300 ml LB bổ sung 50 µg/L Kan, 50 µg/mL Rif, 50 µg/mL Carbe qua đêm. Khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 4000 v/p trong 30 phút ở 4°C. Dịch khuẩn *A.tumefaciens* chứa gen đích và gen mã hóa cho protein hỗ trợ HcPro được trộn đều và pha loãng đến nồng độ OD₆₀₀ 0.8-1 bằng dung dịch đệm (10mM MES và 10 mM MgCl₂). Mười cây *N. benthamiana* từ 6-8 tuần tuổi được dùng để biến nạp cho mỗi cấu trúc. Trước khi biến nạp,

cây được bọc giấy quanh bầu đất sau đó toàn bộ cây được úp ngược ngập trong ca 2 lít đựng dung dịch *A.tumefaciens*. Toàn bộ lá cây bị nhả chìm trong bình chứa vi khuẩn bên trong bình hút chân không. Hút chân không ở 25 inches Hg, 2 phút. Xả không khí ra từ từ, mở nắp. Các cây này sau đó được đặt trong tủ sinh trưởng ở 21-25°C, 16 giờ chiếu sáng, độ ẩm 75%. Lá thuốc lá *N.benthamiana* sau 8 ngày biến nạp được thu và bảo quản ở -80°C.

Kiểm tra sự biểu hiện (H7pII- IgMFC)₃ bằng kỹ thuật Western blot

SDS-PAGE

Mẫu lá thuốc lá được nghiền bằng máy Mixer Mill MM 300 (Retsch, Haan, Germany), sau đó hòa tan trong đệm mẫu SDS 1X (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 0,1% (w/v), Bromophenolblue, 10% (v/v) Glycerol), biến tính mẫu ở 95°C, 10 phút và ly tâm 13000 v/p trong 30 phút tại 4°C. 10-30 µg protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE (10% polyacrylamide), sau đó chuyển lên màng nitrocellulose qua đêm.

Western blot

Sau khi màng được phủ bằng sữa tách béo 5% được pha trong TBS 1X (20 mM Tris-HCl, 180 mM NaCl pH 7.8) trong 2 giờ, màng được ủ tiếp với kháng thể kháng cmyc trong 2 giờ trước khi ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 2 giờ. Giữa các bước ủ kháng thể, màng được rửa bằng sữa tách béo 0.5% được pha trong TBS 1X ba lần mỗi lần cách nhau 5 phút. Riêng lần gần cuối và lần cuối thì màng tương ứng được rửa với TBS 1X và PBS 1X ((PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄ pH 7.4). Sự có mặt của kháng nguyên HA gắn cmyc trong mẫu được nhận diện sử dụng phương pháp hiện màu dựa vào phản ứng của enzyme HRP trong sự hiện diện của cơ chất DAB dưới sự xúc tác của H₂O₂.

Tinh sạch protein dựa vào sắc ký ion cố định kim loại (Immobilized metal ion chromatography- IMAC).

Thu 1 kg lá thuốc lá biểu hiện H7pII-IgMFC và pII-IgMFC, làm lạnh trong nitơ lỏng và

nghiên thành dạng đồng nhất trong máy xay sinh tố. Protein tổng số được tách chiết trong đệm 50 mM Tris (pH 8,0). Dịch chiết được phân tách bằng ly tâm (18,000 rpm, 30 phút, 4°C), lọc qua màng lọc và được trộn với agarose gắn Ni-NTA. Hỗn hợp được trộn đều trong 30 phút, 4°C và được đưa vào cột sắc ký. Rửa cột chứa hỗn hợp trên với 2 lít đệm rửa (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazole, pH 8,0). Protein tái tổ hợp sau đó được hòa tan từ cột bằng đệm hòa tan (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 125 mM Imidazole, pH 8,0) và được cô lại bằng Concentrator iCON TM và bảo quản ở -20°C.

Phản ứng ngưng kết hồng cầu với protein (H7pII-IgMFC)₃

Chuẩn bị tế bào hồng cầu: Thu 8 ml mẫu máu từ tĩnh mạch ở cánh gà khỏe mạnh, chưa từng tiêm chủng với loại vắc xin nào và được hòa trong dung dịch Alserver với tỷ lệ 1: 1. Dung dịch sau đó được đi ly tâm với thể tích tương đương của PBS với tốc độ 2000 vòng/10 phút để hồng cầu lắng xuống đáy. Quá trình được lặp lại nhiều lần với PBS. Sau đó hút 2 ml hồng cầu cho vào 198 ml PBS để thu được tế bào hồng cầu gà 1% và được bảo quản ở từ 4°C

Phản ứng ngưng kết hồng cầu: Phản ứng ngưng kết hồng cầu được thực hiện theo OIC [23]. Bổ sung thêm 50 ml kháng nguyên vào giếng đầu tiên của một tấm nhựa vi chuẩn độ có đáy hình chữ V chứa 50 ml PBS. Pha loãng 2 lần trên toàn bộ hàng, sau đó bổ sung thêm 50 ml 1% tế bào hồng cầu vào mỗi giếng. Kết quả đã được đọc sau khi ủ đĩa ở 25°C trong 30 phút. Nồng độ pha loãng đến điểm cuối cùng cho phản ứng ngưng kết hồng cầu được xác định là một đơn vị ngưng kết (HAU) [24].

3. Kết quả và thảo luận

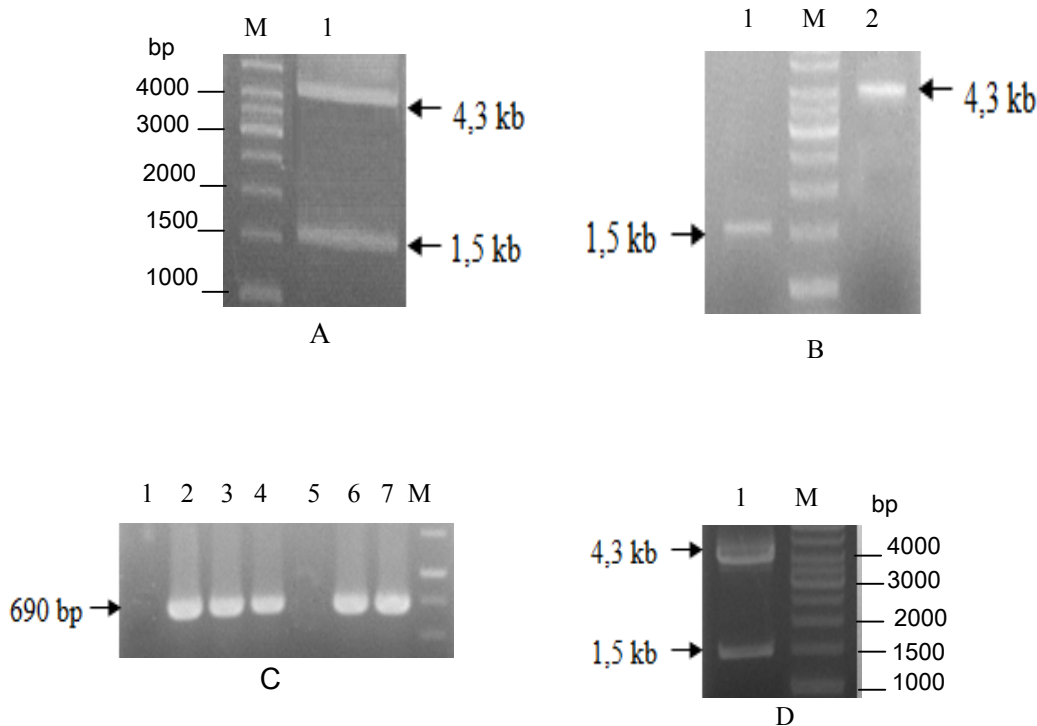
Thiết kế vector gen mã hóa protein (H7pII-IgMFC)₃.

Thiết kế vector tách dòng pRTRA_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL

Xử lý đồng thời đoạn gen H7 đã khuếch đại và vector pRTRA_35S_SP_His_H5_pII_IgMFC

_cmyc_KDEL bằng cặp enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. Gen H7 đã xử lý enzyme và đoạn khung vector sau khi loại bỏ gen mã hóa kháng nguyên H5 (khoảng 1,5 kb) còn lại có chiều dài gần 4,3 kb được thu nhận và tinh sạch (Hình 1A, B) phục vụ cho phản ứng nối ghép bằng T4-DNA ligase để tạo vector tái tổ hợp pRTRA_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL. Sản phẩm nối ghép được nhân dòng trong *E.coli* DH5 α . Để sàng lọc các dòng khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp mong muốn, chúng tôi

tiến hành kiểm tra bằng phương pháp colony-PCR sử dụng cặp mồi H7_F và H7_R, sau đó khuếch đại một phân đoạn gen H7 có kích thước 690 bp (Hình 1C); đồng thời cắt kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI. Kết quả điện di sản phẩm cắt cho 2 băng vạch khoảng 1,5 kb và 4,3 kb theo đúng tính toán lý thuyết (Hình 1D). Như vậy đã thiết kế thành công vector pRTRA_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL.



Hình 1. Kết quả thiết kế vector pRTRA_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL.

(A): xử lý vector bằng *Bam*HI và *Psp*OMI; (B): sản phẩm tinh sạch đoạn gen H7 (1) và khung vector (2) sau khi đã xử lý bằng *Bam*HI và *Psp*OMI; (C): colony-PCR chọn lọc các khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp; (D): cắt kiểm tra vector tái tổ hợp bằng *Bam*HI và *Psp*OMI.

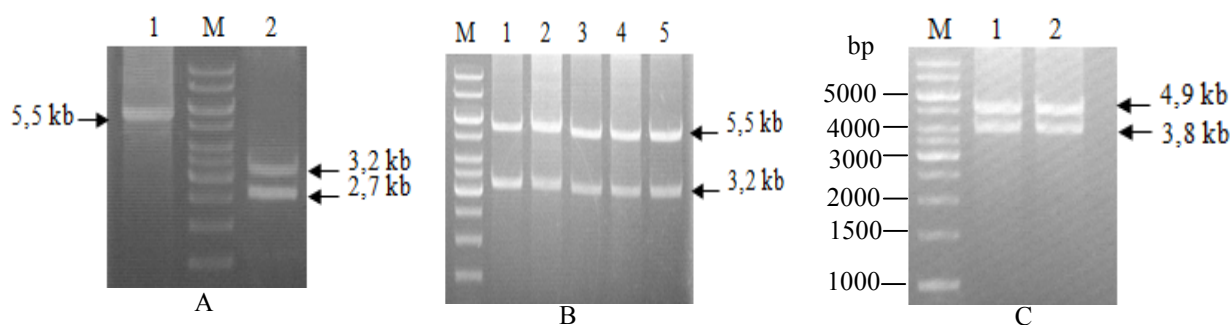
Thiết kế vector chuyển gen pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL

Plasmid pRTRA_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL và pCB301- Kan cùng được xử lý bằng enzyme *Hind*III nhằm thu được đoạn gen mục tiêu bao gồm 35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL và khung vector pCB301 mở vòng. Kết quả điện di cho thấy, sản phẩm

cắt vector pCB301 cho 1 băng có kích thước khoảng 5,5 kb theo đúng tính toán lý thuyết (hình 2A,1); trong khi đó sản phẩm cắt vector pRTRA_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL cho 2 vạch băng: 1 vạch có kích thước gần 3,2 kb tương ứng với cassette 35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL, vạch băng còn lại có kích thước gần 2,7 kb là đoạn khung

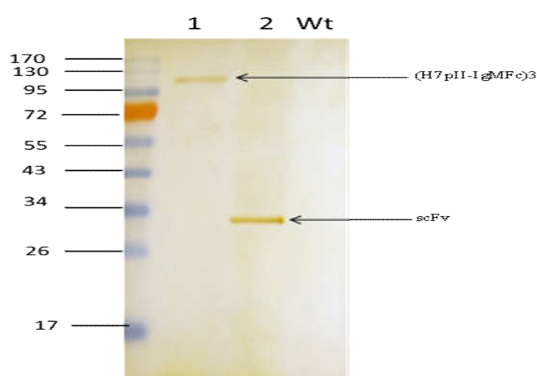
vector còn lại (hình 2A,2). Các phân đoạn DNA có kích thước 5,5 kb và 3,2 kb sau đó được thu nhận và tinh sạch để phục vụ cho phản ứng nối ghép tạo vector chuyển gen pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL. Vector tái tổ hợp này được kiểm chứng bằng xử lý enzyme giới hạn *HindIII* (Hình 2B).

Đồng thời để chọn được vector chứa gen mã hóa protein H7-pII-IgMFC có chiều biểu hiện ngược chiều gen kháng kháng sinh, chúng tôi đã cắt kiểm tra bằng enzyme *NcoI* (Hình 2C). Các kết quả trên đã chứng minh vector pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL đã được thiết kế thành công.



Hình 2. Kết quả thiết kế vector pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL. (A): xử lý vector pCB301-Kan (1) và PRTRA_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL (2) bằng *HindIII*; (B): Cắt kiểm tra vector pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL bằng *HindIII*; (C): Cắt kiểm tra vector pCB301_35S_SP_His_H7_pII_IgMFC_cmyc_KDEL bằng *NcoI*

Đánh giá sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên HA dung hợp IgM-Fc bằng Western blot.



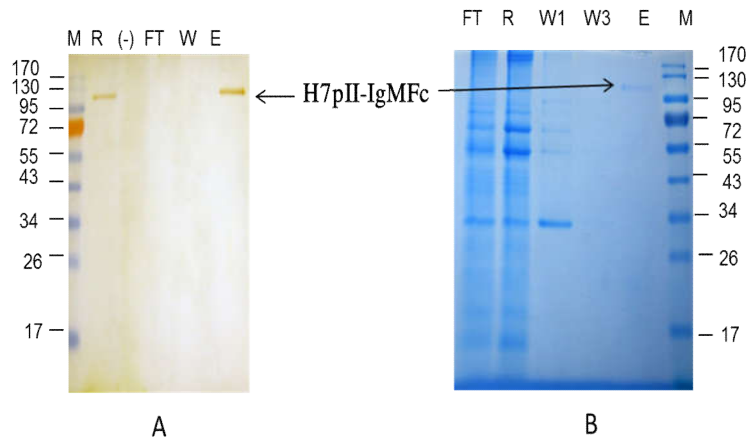
Hình 3. Kết quả western blot chứng tỏ sự biểu hiện của kháng nguyên HA dung hợp IgM-Fc và motif trimer dung hợp IgM-Fc sử dụng kháng thể kháng c-myc. M: Marker protein 10-170 kDa; 1: Dịch chiết protein chứa kháng nguyên HA dung hợp IgM-Fc; 2: Đối chứng dương protein scFv mang đuôi c-myc.

Sau 8 ngày biến nạp, sự biểu hiện thành công của protein (H7pII-IgMFC)₃ trong lá thuốc lá *N. benthamiana* đã được xác nhận bằng phản ứng western-blot sử dụng kháng thể kháng cmyc (Hình 3). Protein (H7pII-IgMFC)₃ có kích thước khoảng 100 kDa (Hình 3). Việc gắn đuôi cmyc giúp cho việc nhận biết protein tái tổ hợp dựa vào phản ứng lai đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể. Protein H7pII-IgMFC dạng trimer ở dạng nguyên thể có cấu trúc dạng 3 phân tử H7pII- IgMFC, tuy nhiên khi được phân tách bằng SDS-PAGE bổ sung β-mercaptoethanol, cấu trúc không gian nguyên thể của protein này đã bị phá vỡ một phần hoặc hoàn toàn. Kết quả xác định bằng western blot cho thấy rằng vạch băng có kích thước khoảng 100 kDa tương ứng với kích thước của protein (H7pII-IgMFC)₃. Như vậy, protein (H7pII-IgMFC)₃ đã được biểu hiện thành công ở lá cây thuốc lá bằng phương pháp Agro-infiltration.

Tinh sạch kháng nguyên HA dung hợp IgM-Fc dựa vào sắc ký ái lực

Để loại bỏ sự ảnh hưởng của các protein không đặc hiệu đến sự biểu hiện của kháng nguyên đích HA, phương pháp tinh sạch protein bằng sắc ký ái lực đã được sử dụng. Đây là phương pháp hiệu quả để tinh sạch protein tái tổ hợp liên kết với his-tag. Phương pháp này dựa trên xu hướng tự nhiên của histidine tạo thành

một phức hợp với các kim loại hóa trị II (ví dụ như niken) ở pH trung tính. Sự biểu hiện kháng nguyên HA dung hợp IgM-Fc sau khi tinh sạch đã được phát hiện thành công bằng điện di SDS-page và phương pháp Western-blot với chỉ một vạch băng theo đúng kích thước với lý thuyết của kháng nguyên HA gắn kết với IgM-Fc là khoảng 100 kDa (hình 4 A, B).



Hình 4. Tinh sạch protein $(H7pII-IgMFC)_3$ bằng sắc ký ái lực (IMAC). 30 μ g protein tổng số của dịch chiết thô-raw extract (RE), dịch chảy qua-flow through (FT) và dịch rửa-wash fraction (W) được phân tách bởi 10% SDS-PAGE. (A) Phát hiện $(H7pII-IgMFC)_3$ bằng Western blot. $(H7pII-IgMFC)_3$ được phát hiện bởi kháng thể đơn dòng anti-c-myc và theo sau bởi kháng thể 2 là horseradish peroxidase linked sheep anti-mouse IgG. (B) Phát hiện $(H7pII-IgMFC)_3$ bằng nhuộm Coomassie. 1 μ g của protein tinh sạch $(H7pII-IgMFC)_3$ (E) được phân tách bởi 10% SDS-PAGE. M: protein marker.

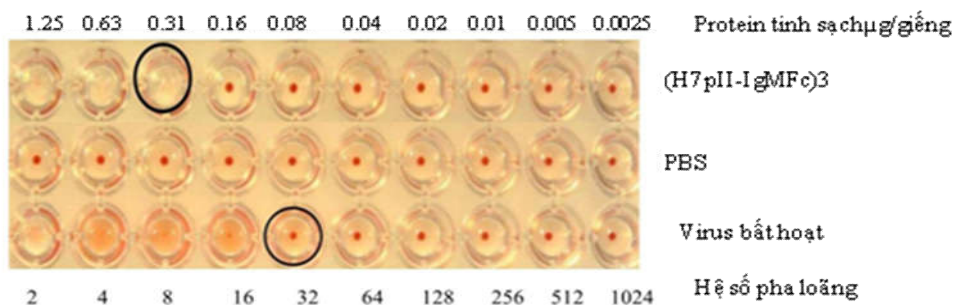
Như vậy, từ kết quả của Western blot và nhuộm Coomassie blue cho thấy rằng, đã tinh sạch thành công protein $(H7pII-IgMFC)_3$. Hai protein tinh sạch này sẽ được sử dụng để kiểm tra hoạt tính sinh học bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu.

Đánh giá hoạt tính sinh học của protein tinh sạch $(H7pII-IgMFC)_3$ bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu

Hoạt tính sinh học của kháng nguyên tinh sạch $(H7pII-IgMFC)_3$ được xác định bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu. Phản ứng này dựa trên sự tương tác của protein HA với các thụ thể có mặt trên tế bào hồng cầu. Quá trình tương tác tạo thành một mạng lưới, gây ngưng kết hồng

cầu. Nếu không có quá trình tương tác giữa protein với thụ thể, hồng cầu sẽ không bị ngưng kết, các tế bào hồng cầu sẽ bị kéo xuống và hình thành giọt máu ở đáy giếng chữ V.

Kết quả của phản ứng ngưng kết hồng cầu (hình 5) cho thấy rằng, protein $(H7pII-IgMFC)_3$ sau khi tinh sạch vẫn giữ được hoạt tính sinh học. Protein tinh sạch $(H7pII-IgMFC)_3$ gây ngưng kết hồng cầu tại nồng độ protein tinh sạch là 0.31 μ g/giếng. Nồng độ protein mà tại đó gây ngưng kết hồng cầu càng thấp thì hoạt tính sinh học của protein đó càng cao. Như vậy, qua phản ứng ngưng kết hồng cầu cho thấy rằng, hoạt tính sinh học của protein tinh sạch $(H7pII-IgMFC)_3$ là khá cao.



Hình 5. Kết quả phản ứng gây ngưng kết hồng cầu của (H7pII-IgMFC)₃. PBS được sử dụng làm đối chứng âm. Virus bất hoạt chủng H5N1/Vietnam/2004 được sử dụng làm đối chứng dương.

Theo Phan Trọng Hoàng và cộng sự (2014), protein H5-pII chỉ có khả năng gây ngưng kết hồng cầu ở nồng độ protein cao hơn 2.5 μg/giếng [24]. Như vậy, kết quả này chứng tỏ rằng việc gắn kết IgMFC vào protein HA là có tác dụng tăng cường hoạt tính sinh học. Điều này có thể được giải thích là khi gắn kết IgMFC vào protein HA, các cầu nối disulfide trong IgM-Fc đã gắn kết các phân tử protein HA dạng trimer lại với nhau để tạo thành dạng oligomer. Cấu trúc oligomer làm tăng số quyết định kháng nguyên của protein (HApII-IgMFC)₃ so với phân tử protein HA hay HApII, từ đó làm tăng hoạt tính ngưng cầu. Đồng thời việc hình cấu trúc oligomer cũng có thể góp phần làm tăng khả năng gây đáp ứng miễn dịch của HA.

Việc dung hợp Fc với protein tái tổ hợp đã được chứng minh là có hiệu quả trong nhiều nghiên cứu phát triển vắc xin trên thể giới. Trong các nghiên cứu phát triển vắc xin tiểu đơn vị, việc dung hợp protein với đoạn Fc của IgM đã được chứng minh là có nhiều ưu điểm nổi bật, bao gồm mức độ biểu hiện protein cao, năng suất tốt hơn, tinh sạch dễ dàng thông qua cột protein A dưới điều kiện không quá nghiêm ngặt và tăng cường sự ổn định của protein [16]. Krishnamurthy và cộng sự (2011) [25] đã báo cáo kết quả phát triển vắc xin chống lại virus Ebola với protein dung hợp Fc- EBOVGP có sự cải thiện đáng kể đáp ứng miễn dịch và đề nghị rằng vắc xin dựa vào protein dung hợp Fc-Filovirus GP có thể phát triển để bảo vệ chống

lại virus. David và cộng sự (2011) [26] cũng đã chứng minh rằng việc dung hợp protein với Fc có hiệu quả trong phát triển vắc xin vì sự tương tác của Fc với các protein effector đặc hiệu như các thụ thể FcRn làm tăng cường thời gian bán rã ‘half-life’ và kéo dài hoạt động điều trị. Keith và cộng sự (2011) [27] đã chứng minh sự biểu hiện của protein CMG2 dung hợp với Fc với mức độ cao 730 mg/kg trọng lượng lá tươi trong *Nicotiana benthamiana* và 65 mg/kg trong *N. tabacum*. CMG2-Fc được tinh sạch từ lá thuốc lá bảo vệ thô chống lại *B. anthracisspores* với liều lượng 2 mg/kg khối lượng cơ thể đưa vào trong thời gian thử thách. Loureiro và cộng sự (2011) [28] đã nghiên cứu biểu hiện của Hemagglutinin (HAs) của virus cúm HA1 và HA3 của người và virus cúm gia cầm H5 được sản xuất dưới dạng protein tái tổ hợp dung hợp với tiểu phần Fc của Ig người. Protein tái tổ hợp HA dung hợp Fc người (HA-HuFc) được tiết ra từ các thể bào côn trùng lây nhiễm baculovirus như là dạng HA oligomer bị glycosyl hóa có khối lượng như mong đợi, ngưng kết tế bào hồng cầu, được tinh sạch dựa vào protein A và đã được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch ở chuột trong sự vắng mặt của chất bổ trợ. Sự miễn dịch được xác minh cho tất cả các chủng, với mẫu huyết thanh chứng minh cho sự lây nhiễm đặc hiệu hemagglutinin các chủng, sự đặc hiệu epitope giống với sự lây nhiễm virus và phản ứng trung hòa. Như vậy HA gắn với HuFc là ứng viên tiềm năng cho

chiến lược phát triển vắc xin chống lại virus cúm A.

Tóm lại, so với dạng trimer HA, khả năng hình thành mạng lưới với các tế bào hồng cầu của dạng HA oligomer là tốt hơn nên cho kết quả ngưng kết hồng cầu tốt hơn. Đây là cơ sở để tiến hành nhiều thí nghiệm nghiên cứu tiếp theo trên cơ sở sử dụng protein HA dạng oligomer.

4. Kết luận

Đề tài đã thực hiện thành công các nội dung cơ bản sau;

- Đã thiết kế thành công vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa các protein (H7pII-IgMFC)₃ và tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* mang các vector chuyển gen tương ứng.

- Đã đánh giá sự biểu hiện thành công của các protein (H7pII-IgMFC)₃ ở cây thuốc lá *N.benthamiana* bằng kỹ thuật Western blot. Đã tinh sạch thành công các protein (H7pII-IgMFC)₃ bằng phương pháp sắc ký lọc gel (IMAC)

- Hoạt tính sinh học của các protein tinh sạch (H7pII-IgMFC)₃ đã được kiểm tra bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu: protein tinh sạch (H7pII-IgMFC)₃ có khả năng gây ngưng kết hồng cầu ở nồng độ protein là 0.31 µg.

- Đề tài này mở ra một hướng mới cho việc phát triển vắc xin chống virus cúm A/H7N9 trong tương lai

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp Viện Công nghệ sinh học “Nghiên cứu biểu hiện của protein HA (H7N9) polymer dung hợp IgMFC trong cây thuốc lá (*Nicotiana* sp.) bằng phương pháp Agroinfiltration’ và một phần kinh phí đề tài VAST02.03/14-15 cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Tài liệu tham khảo

- [1] Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus, *N Engl J Med* 368 (2013) 1888–1897. [PubMed: 23577628].
- [2] www.who.int
- [3] Babu TM, Levine M, Fitzgerald T, Luke C, Sangster MY, Jin H, et al, Live attenuated H7N7 influenza vaccine primes for a vigorous antibody response to inactivated H7N7 influenza vaccine, *Vaccine* 32(50) (2014) 6798–804. [PubMed: 25446831].
- [4] Min JY, Vogel L, Matsuoka Y, Lu B, Swayne D, Jin H, et al, A live attenuated H7N7 candidate vaccine virus induces neutralizing antibody that confers protection from challenge in mice, ferrets, and monkeys, *J Virol* 84(22) (1010)11950–60. [PubMed: 20810733].
- [5] Couch RB, Patel SM, Wade-Bowers CL, Nino D, A randomized clinical trial of an inactivated avian influenza A (H7N7) vaccine, *PLoS ONE* 7(12) (2012) e49704. [PubMed: 23239968].
- [6] Cox RJ, Major D, Hauge S, Madhun AS, Brokstad KA, Kuhne M, A cell-based H7N1 split influenza virion vaccine confers protection in mouse and ferret challenge models, *Influenza Other Respir Viruses* 3(3) (2009) 107–17. [PubMed: 19453487].
- [7] Goff PH, Krammer F, Hai R, Seibert CW, Margine I, Garcia-Sastre A, Induction of cross-reactive antibodies to novel H7N9 influenza virus by recombinant Newcastle disease virus expressing a North American lineage H7 subtype hemagglutinin, *J Virol* 87(14) (2013) 8235–40. [PubMed: 23698299].
- [8] Kreijtz JH, Wiersma LC, De Gruyter HL, Vogelzang-van Trierum SE, van Amerongen G, Stittelaar KJ, A single immunization with modified vaccinia virus ankara-based influenza virus H7 vaccine affords protection in the influenza A(H7N9) pneumonia ferret model, *J Infect Dis.* (2014).
- [9] Gaspar LP, Mendes YS, Yamamura AMY, Almeida LFC, Caride E, Goncalves RB, Pressure-inactivated yellow fever 17DD virus: Implications for vaccine development, *J Virol Methods* 150 (2008) 57–62. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.03.002 PMID: 18420285.
- [10] Galarza JM, Latham T, Cupo A, Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus

- challenge, *Viral Immunol* 18(1) (2005) 244–51. [PubMed: 15802970].
- [11] Krammer F, Albrecht RA, Tan GS, Margine I, Hai R, Schmolke M, Divergent H7 immunogens offer protection from H7N9 virus challenge, *J Virol* 88(8) (2014) 3976–85. [PubMed: 24453375].
- [12] Kang SM, Pushko P, Bright RA, Smith G, Compans RW, Influenza virus-like particles as pandemic vaccines, *Curr Top Microbiol Immunol* 333 (2009) 269–89. [PubMed: 19768411].
- [13] Pushko P, Pujanauski L.M, Sun X, Pearce M, Hidajat R, Kort T, Schwartzman L.M, Tretyakova I, Chunqing L, Taubenberger J.K, Tumpey T.M, Recombinant H7 hemagglutinin forms subviral particles that protect mice and ferrets from challenge with H7N9 influenza virus, *Vaccine* 33(38) (2015) 4975–4982. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.026.
- [14] Pushko P, Pumpens P, Grens E, Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures, *Intervirology* 56(3) (2013) 141–65. [PubMed: 23594863].
- [15] Boes M, Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses, *Mol Immunol* 37(18) (2000), 1141–1149.
- [16] Andrianov V., R. Brodzik, S. Spitsin, Production of recombinant anthrax toxin receptor (ATR/CMG2) fused with human Fc in planta, *Protein Expression and Purification*, 70 (2) (2010) 158–162.
- [17] Fischer, R., Schumann, D., Zimmermann, S., Drossard, J., Sack, M., and Schillberg, S., Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants, *European Journal of Biochemistry* 262(1999) 810-816.
- [18] Shoji, Y.; Bi, H.; Musiyuchuk, K.; Rhee, A.; Horsey, A.; Roy, G.; Green, B.; Shamloul, M.; Farrance, C.E.; Taggart, B., Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza, *Vaccine* (27) (2009) 1087–1092.
- [19] Mortimer E, Maclean J.M, Mbewana S, Buys A, Williamson A.L, Hitzero I.I, Rybicki E.P, Setting up a platform for plant-based influenza virus vaccine production in South Africa, *BMC Biotechnology* 12 (2012) 14. DOI: 10.1186/1472-6750-12-14.
- [20] Mett, V., Musiyuchuk, K., Bi, H., Farrance, C.E., Horsey, A., Ugulava, N., Shoji, Y., de la Rosa, P., Palmer, G.A., Rabindran, S., Streatfield, S.J., Boyers, A., Russell, M., Mann, A., Lambkin, R., Oxford, J.S., Schild, G.C., and Yusibov, V., A plant-produced influenza subunit vaccine protects ferrets against virus challenge, *Influenza Other Respi Viruses* 2 (2008), 33–40.
- [21] Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ, A mini binary vector series for plant transformation, *Plant Mol Biol* 40 (1999), 711–717.
- [22] Deblaere R., Bytebier B., De Greve, H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., and Leemans J., Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 4777–4788.
- [23] <http://www.oic.gov.ie/en/Publications/Annual-Reports/2014-Annual-Report>.
- [24] Phan, H.T., Hause, B., Hause, G., Arcalis, E., Stoger, E., Maresch, D., Altmann, F., Joensuu, J., Conrad, U., Influence of Elastin-Like Polypeptide and hydrophobin on recombinant Hemagglutinin accumulations in transgenic tobacco plants, *PLoS ONE* 9(6) (2014) e99347.
- [25] Krishnamurthy Konduru, Steven B. Bradfute, Jerome Jacques, Mohanraj Manangeeswaran, Ebola virus glycoprotein Fc fusion protein confers protection against lethal challenge in vaccinated mice, *Vaccine* 29(16) (2011) 2968–2977.
- [26] David N. A. Mekhaieel, Daniel M. Czajkowsky, Jan Terje Andersen, Jianguo Shi, Marwa El-Faham, Polymeric human Fc-fusion proteins with modified effector functions, *SCIENTIFIC REPO RTS*(2011) 1: 124. DOI: 10.1038/srep00124.
- [27] Keith L. Wycoff, Archana Belle, Dorothe'e Deppe, Leah Schaefer, James M. Maclean, Recombinant Anthrax Toxin Receptor-Fc Fusion Proteins Produced in Plants Protect Rabbits against Inhalational Anthrax, *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 55(2011) 132–139.
- [28] Loureiro Silvia, Junyuan Ren, Pongsathon Phapugrangkul, Camilo A. Colaco, Christopher R., Adjuvant-Free Immunization with Hemagglutinin-Fc Fusion Proteins as an Approach to Influenza Vaccines, *JOURNAL OF VIROLOGY* (2011) 3010–3014.

Study on the Expression of HA/H7N9 Polymer Fusing IgMFC in *Nicotiana benthamiana* using Agroinfiltration

Le Thi Thuy, Le Thu Ngoc, Ho Thị Thuong, Nguyen Thu Giang,
Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha

*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,
18 Hoang Quoc Viet, Hanoi, Vietnam*

Abstract: The first cases of human infection caused by an avian-origin influenza A H7N9 virus emerged in eastern China in 2013 and have continued cause sporadic human infections with mortality rates approaching 40%. Hemagglutinin HA, the major protein of influenza virus envelope, contains virus-neutralizing epitopes and has been considered as a major candidate for the development of recombinant influenza vaccines influenza A virus infection. In this study, HA (H7N9) polymer antigen fusing IgMFC was expressed transiently in *nicotiana. sp* using Agro-infiltration method. Western blot was used to confirm expression of recombinant protein. The results have been demonstrated that (H7pII-IgMFC)₃ was expressed successfully in *N. benthamiana*. Recombinant protein were purified using Immobilized metal ion chromatography- IMAC method before assessed biological activity using hemagglutination assay. The testing results show that (H7pII-IgMFC)₃ causes hemagglutination with 32 HAU corresponding to 0.31 g of protein purification. This study opens up a new direction for the development of vaccines against influenza A /H7N9 in the future.

Keywords: Influenza virus A/H7N9, Hemagglutinin (HA), polymer fusing IgMFC, transient expression, recombinant protein.