

# Tách dòng và đồng biểu hiện gen mã hóa hai loại kháng nguyên vỏ GP5ecto (vùng ngoại bào) và M của virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn

Nguyễn Thị Minh Hằng<sup>1,2,\*</sup>, Hồ Thị Thương<sup>1</sup>, Nguyễn Thu Giang<sup>1</sup>,  
Phạm Bích Ngọc<sup>1</sup>, Nguyễn Trung Nam<sup>1</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam,  
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

<sup>2</sup>*Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp,  
Thị trấn Xuân Mai, Chương Mỹ, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 09 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

**Tóm tắt:** Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) là một loại bệnh truyền nhiễm phổ biến trong chăn nuôi lợn, do virus PRRS (PRSSV) gây ra. Protein GP5 (ORF5) là glycoprotein vỏ ngoài, bao gồm vùng ngoại bào (ectodomain) và vùng nội bào (endodomain). Protein M (ORF6) là protein cấu trúc bảo thủ nhất của virus và không bị glycosyl hóa. Protein GP5 và M liên kết chặt chẽ với nhau bằng cầu disulfit giúp cho việc lắp ráp và lây nhiễm của virus. Sự biểu hiện đồng thời của protein GP5 và M có thể phát triển phản ứng miễn dịch mạnh hơn. Trong nghiên cứu này, hai đoạn gen mã hóa cho protein GP5ecto (vùng ngoại bào) và M của chủng virus PRRS (VN07196) được khuếch đại riêng lẻ. Hai đoạn gen này sau đó được ghép nối với nhau bằng kỹ thuật PCR lồng sử dụng các cặp mồi đặc hiệu; được gắn kết với promoter 35S, Histag và Cmyc, ELP; nhân dòng trong vector pRTRA và thiết kế vào cấu trúc vector chuyên gen thực vật pCB301. Protein tái tổ hợp GP5ecto-M gắn kết ELP được biểu hiện thành công trong lá cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện gen tạm thời, tối ưu và tinh sạch protein GP5ecto-M bằng phương pháp mITC cho thấy đã tinh sạch thành công loại protein này. Đây là cơ sở khoa học quan trọng để tiến hành biểu hiện tạm thời và tinh sạch kháng nguyên GP5ecto-M ở quy mô lớn nhằm mục đích nghiên cứu tính sinh miễn dịch trên động vật và sản xuất vaccine tiểu đơn vị phòng chống PRRSV.

**Từ khóa:** Biểu hiện tạm thời, đồng biểu hiện, protein GP5ectodomain-M, PRRSV, tinh sạch protein.

## 1. Mở đầu

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) còn gọi là bệnh “lợn tai xanh” là một loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm và phổ biến

trong ngành chăn nuôi ở nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam, do virus PRRS (PRSSV) gây ra. PRRSV thuộc loại Arterivirus, họ Arteriviridae và bộ Nodovirales. Genome PRSSV là sợi sRNA đơn, dương, dài 15 000 bp [1] với 9 khung đọc mở (ORFs): 1a, 1b, 2a, 2b, 3-7. ORF1a, ORF1b mã hoá RNA polymerase. Trong đó, GP2-3-4 mã hoá protein chức năng. GP5 (ORF5) mã hoá glycoprotein vỏ ngoài, bao

\*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-983797705.

Email: ntminhhang@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4588>

gồm vùng ngoại bào (ectodomain) và vùng nội bào (endodomain). M (ORF6) mã hoá protein màng, N (ORF7) mã hoá protein cấu trúc nucleocapsid. Protein GP5 và M là hai protein liên kết màng chính của PRRSV, liên kết chặt chẽ với nhau bằng cầu disulfit giúp cho việc lắp ráp và lây nhiễm của virus và trong tế bào vật chủ [2, 3]. Protein M là protein cấu trúc bảo thủ nhất của virus và không bị glycosyl hóa. GP5 và M được dùng để thiết kế vaccine tiểu đơn vị chống lại sự xâm nhiễm của PRRSV.

Một số nghiên cứu gần đây tại Việt Nam đã thành công trong việc biểu hiện đơn lẻ hai loại protein này bằng công nghệ biểu hiện gen tạm thời như biểu hiện GP5 [4], biểu hiện thành công protein M bằng phương pháp biểu hiện tạm thời trong thực vật [5]. Một số hướng nghiên cứu phát triển các loại vaccine chống PRRSV khác nhau cũng đã được triển khai như tạo vaccine DNA đồng biểu hiện GP5 và M vaccine DNA [6, 7]. Sự biểu hiện đồng thời của protein GP5 và M có thể phát triển phản ứng miễn dịch mạnh hơn, đặc biệt là kháng thể trung hòa PRRSV của các heterodimer GP5/M trong bảo vệ miễn dịch chống lại nhiễm PRRSV [7] và virus truyền bệnh giả dại (pseudorabies) biểu hiện GP5 [8], adenovirus biểu hiện GP5/M [9], pseudotype baculovirus biểu hiện GP5/M [10], virus đậu mùa biểu hiện GP5/M [11] và cây thuốc lá biểu hiện GP5 [12].

Để tiếp cận những khả năng này, chúng tôi đã nghiên cứu thiết kế vector chuyển gen tái tổ hợp mang hai gen mã hoá protein GP5ecto (vùng ngoại bào) và M của chủng virus PRRS (VN07196) để biểu hiện đồng thời hai gen này

trong thực vật bằng công nghệ biểu hiện gen tạm thời, tinh sạch protein tái tổ hợp làm cơ sở cho việc nghiên cứu sản xuất vaccine tiểu đơn vị phòng ngừa PRRSV.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng

**Chủng vi khuẩn:** Chủng *E. coli* DH5 $\alpha$  được sử dụng để nhân và chọn dòng gen. Chủng *A. tumefaciens* C58C1 mang yếu tố phiên mã FUS3 được sử dụng để đồng biểu hiện tạm thời với vector đích mang gen biểu hiện protein tái tổ hợp dưới sự kiểm soát của promoter 35S, do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

#### Các vector plasmid và vật liệu thực vật:

Trình tự 100xELP trong vector pRTRA được tổng hợp và mô tả bởi Scheller và đồng tác giả (2006) [13]. Vector pRTRA-35S-H5-100xELP [14] (Hoang P.T., 2012) được thiết kế từ vector gốc pRTRA 35S-TBAG-100xELP của Floss và đồng tác giả (2010a) [15].

Vector chuyển gen pCB301-Kan (dựa vào pCB301 của Xiang và đồng tác giả, 1999) [16]; Plasmid mang gen GP5ectoM của virus PRRS chủng Việt Nam (VN07196) và cây thuốc lá *N. benthamiana* do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu được nêu ở Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên môi	Trình tự (5'-3')
I.	Môi dùng trong khuếch đại gen GP5ecto có gắn thêm các vị trí cắt của enzyme giới hạn NcoI và pspOMI.	
1	GP5ecto- NcoI-F	AGCCATGGCTTTGGGGAAGTGCTTGACCGCGTGCC
2	GP5ecto- pspOMI-R	CCGGGCCCCACTGCCAGTCAAATTTTGTGCC
II.	Môi dùng trong khuếch đại gen M có gắn thêm các vị trí cắt của enzyme giới hạn pspOM và BamHI	
1	M- pspOMI-F	TGGGGCCCGGGTCGTCTCTAGACGACTTCTGCA
2	M-BamHI-R	AGGGATCCTTTGGCATATTTAACAAGGTTTAC

III.	Môi dùng trong khuếch đại gen GP5ecto-M có gắn thêm các vị trí cắt của enzyme giới hạn NcoI và BamHI	
1	GP5ecto-NcoI-F	AGCCATGGCTTTGGGGAAGTGCTTGACCGCGTGC
2	M-BamHI-R	AGGGATCCTTTGGCATATTTAACAAGGTTTAC
IV.	Môi dùng trong giải trình tự gen GP5ecto-M trên vector pRTRA	
1	35S-SQF	CACTGACGTAAGGGATGACGC
2	35STerm	CTGGGAAGTACTCACACA

## 2.2. Phương pháp

### Nhân dòng gen mã hoá protein GP5ecto, M, GP5ecto-M của virus PRRS

Đoạn gen GP5ecto và đoạn gen M được khuếch đại bằng PCR sử dụng khuôn là plasmid pGEM-PRRS (VN07196) với hai cặp môi tương ứng (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR: 50 µl hỗn hợp, gồm 0,3 µM primers, 0,2 µM dNTPs, 2,5U Pwo SuperYield DNA polymerase, 5 µl đệm 10X Pwo SuperYield PC và 20 ng khuôn. Chu trình PCR: 94°C/3 phút; 32 chu kỳ lặp lại các bước 94°C/30 giây, 55°C/50 giây, 72°C/1 phút; 72°C/10 phút, sản phẩm được giữ ở 4°C, điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

Sản phẩm PCR nhân gen GP5ecto và gen M thu được được xử lý để ghép nối với nhau bằng kỹ thuật PCR lồng sử dụng cặp môi tương ứng (bảng 1), nhằm thu được phân đoạn DNA tái tổ hợp GP5ecto-M. Đoạn gen mã hoá protein GP5ecto-M thu được và plasmid pRTRA 35S-TBAG-100xELP tinh sạch được phân cắt bằng NcoI và BamHI. Sau đó, phân đoạn GP5ecto-M được ghép nối vào vector pRTRA tạo plasmid tái tổ hợp, được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α, chọn dòng khuẩn lạc trên môi trường có bổ sung kháng sinh. Plasmid được tách chiết và giải trình tự sử dụng cặp môi đặc hiệu trong bảng 1. Các trình tự nucleotide được phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.0 và Lasergen 7 (DNASTAR, Inc, Madison, WI, USA).

### Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen GP5ecto-M của PRRSV phục vụ chuyển gen

Vector pRTRA tái tổ hợp mang gen mã hoá kháng nguyên GP5ecto-M và vector pCB301 được phân cắt bằng HindIII, sản phẩm cắt (GP5ecto-M/ELP) được ghép nối vào khung vector pCB301 và được biến nạp vào tế bào

*E. coli* DH5α. Tiến hành chọn dòng khuẩn lạc trên môi trường thạch LB có 50 mg/l kanamycin bằng colony-PCR. Plasmid tái tổ hợp pCB301-GP5ecto-M/ELP được cắt kiểm tra bằng enzyme NcoI và BamHI, sau đó được biến nạp vào *A. tumefaciens* C58C1 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời protein ở thực vật.

### Biểu hiện tạm thời protein tái tổ hợp trong mô lá thuốc lá *N. benthamiana*

Khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301-GP5ecto-M/ELP và chủng mang vector chứa gen mã hóa cho protein Hc-pro hỗ trợ biểu hiện gen ở thực vật được nuôi trong môi trường YEB có bổ sung kháng sinh chọn lọc (50 µg/ml Cabernicilon 50 µg/ml, Rifamicin và 100 µg/ml Kanamicin). Vi khuẩn được nuôi lắc 200 rpm/phút, 16-18 giờ ở 28°C. Tiếp tục nuôi tăng sinh khối vi khuẩn đến thể tích cần thiết và có OD<sub>600</sub> đạt 0,5-1. Khuẩn được thu nhận bằng ly tâm 5000 rpm/phút, 15 phút ở 4°C. Cặn khuẩn của 2 chủng hòa tan trong đệm MES (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, pH 5,6) có giá trị OD<sub>600</sub> đạt 0,8-1 và được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1. Dịch huyền phù vi khuẩn được dùng cho biến nạp vào lá cây thuốc lá bằng phương pháp hút chân không trong thời gian 1,5 phút, 27 inches, 0 atm. Các cây thuốc lá sau khi biến nạp được tiếp tục nuôi và chăm sóc trong buồng sinh trưởng có điều kiện ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm phù hợp. Lá cây thuốc lá được thu hoạch sau 6 ngày biến nạp và bảo quản ở -80 °C để tách chiết protein [5].

### Kiểm tra sự biểu hiện của protein GP5ecto-M bằng phản ứng Western blot

Mẫu lá thuốc lá được nghiền thành bột mịn, hoà tan trong đệm mẫu SDS (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0,1% (w/v) Bromophenolblue, 10% (v/v) Glycerol, pH 6,8), biến tính mẫu ở 95°C

trong 10 phút, điện di ở 100V, 20mA trong 3 giờ; 10-30  $\mu$ g protein sau khi được phân tách bằng điện di SDS-PAGE (10% polyacrylamide), sau đó chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter (Thermoscientific) ở 25V, 1.3A trong 20 phút. Blocking màng bằng sữa tách béo 5% trong 5 giờ, màng tiếp tục được ủ với kháng thể qua đêm, ủ màng với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 2 giờ. Phát hiện sự có mặt của protein GP5ecto-M trong dung dịch hiện màu có chứa cơ chất DAB (Diaminobenzidine) trong 15 phút.

#### Tinh sạch protein GP5ecto-M

**Tối ưu nồng độ PEG trong quá trình tinh sạch:** PEG (polyethylene glycol) được sử dụng nhằm kết tủa những protein tạp à không làm mất protein mục tiêu. Nghiền 10g lá trong nitor lỏng, bổ sung 60ml Tris-HCl 50 mM (pH8.0) lạnh, ly tâm ở 13.000 rpm, 30 phút, ở 4°C. Bổ sung PEG ở dải nồng độ (2% - 12%) vào 2ml dịch chiết lá thực vật. Ly tâm 13.000 v/p, 30 phút, 4°C. Dung dịch được biến tính và kiểm tra bằng Westen blot.

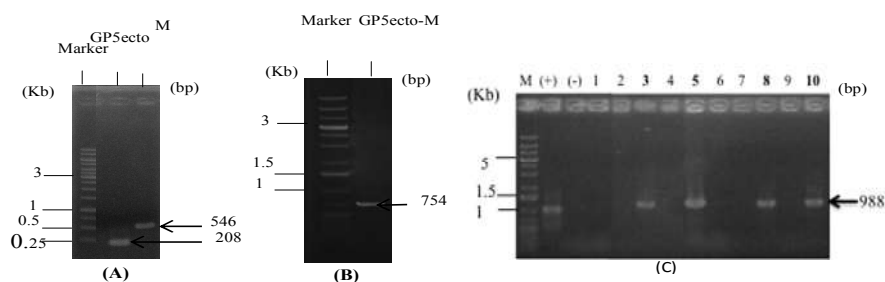
**Tinh sạch protein GP5ecto-M tái tổ hợp có gắn ELP bằng phương pháp mITC (Membrane-based inverse transition cycling):** Nghiền nhỏ 100g lá tươi trong nitor lỏng, bổ sung 200 ml Tris-HCl 50 mM (pH8.0) lạnh, ly tâm 25000 v/p trong 30 phút ở 4°C, bổ sung NaCl đến nồng độ 2M. Ly tâm 25.000 v/p trong 30 phút, ở 4°C. Dung dịch được đưa qua màng

polyethersulfone (PES) 0,22  $\mu$ m ở 4°C, thu dịch chiết trước xử lý. Dịch chiết được làm ấm đến nhiệt độ phòng và lọc qua màng cellulose acetate 0,2  $\mu$ m, màng được rửa 2 lần bằng NaCl 2M để loại protein lẫn. Nước Milipore-Q lạnh được chuyển qua màng lọc để thu hồi protein mục tiêu gắn ELP.

### 3. Kết quả và thảo luận

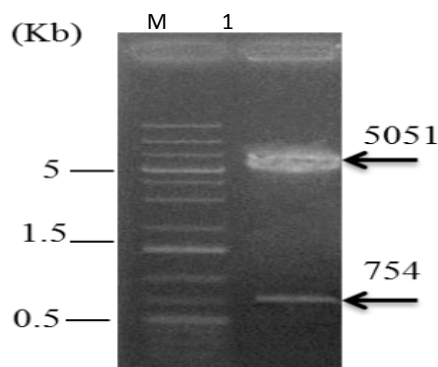
#### 3.1. Thiết kế vector tách dòng pRTRA tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên GP5ecto-M gắn kết Elastin like-polypeptide (GP5ecto-M-ELP)

Đoạn gen mã hóa GP5 vùng ectodomain và gen mã hóa protein M được khuếch đại riêng bằng các phản ứng PCR với các cặp mồi đặc hiệu tương ứng. Sau đó ghép nối tạo thành đoạn gen GP5ecto-M bằng phản ứng PCR lồng sử dụng cặp mồi GP5ecto-*NcoI*- F và M-*BamHI*-R (bảng 1). Kết quả điện di kiểm tra các sản phẩm của phản ứng PCR cho thấy đã thu được phân đoạn DNA theo đúng tính toán lý thuyết của GP5 vùng ngoại bào là 208 bp, của M là 546 bp và GP5ecto-M là 754 (Hình 1: A, B). Chọn dòng tế bào E. coli bằng colony-PCR (Hình 1: C) thu được các đoạn DNA có kích thước khoảng gần 1000 bp (988 bp). Kết quả này phù hợp với tính bao gồm gen mã hóa protein GP5ecto - M (754 bp) và m một đoạn promoter (234 bp).

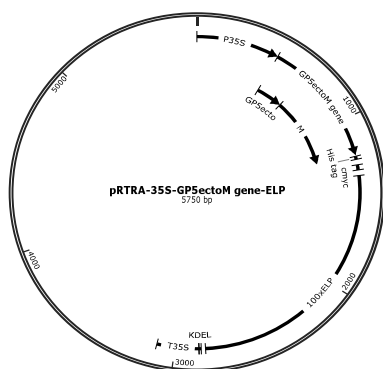


Hình 1. PCR nhân gen mã hóa protein GP5ecto, M và GP5ecto-M, (A): PCR nhân hai gen mã hóa protein GP5ecto và M của PRRSV; (B): PCR nhân gen mã hóa protein GP5ecto-M; (C): Colony-PCR chọn dòng tế bào E.coli mang plasmid chứa GP5ecto-M bằng cặp mồi 35S-F và M-BamHI-R; M: marker 1 kb; (+): Đối chứng dương; (-): Đối chứng âm; 1-10: Sản phẩm PCR chứa gen mã hóa protein GP5ecto-M.

Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn *NcoII* và *pspOMI* (Hình 2: A) thu được các phân đoạn DNA có kích thước khoảng 5051 bp và 754 bp. Kích thước của các phân đoạn này trùng với kích thước tính toán lý thuyết của vector pRTRA 35S-100xELP là 5109 bp và của gen GP5ecto-M là 754 bp. Như vậy, có thể khẳng định đã nhân dòng GP5ecto-M trong vector pRTRA35S-100xELP thành công.



(A)



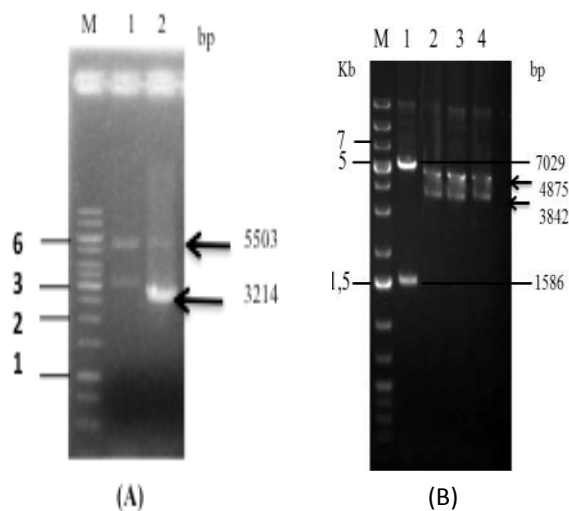
(B)

Hình 2. Sản phẩm cắt pTRA 35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP bằng *NcoI* và *pspOMI* (A) và sơ đồ cấu trúc vector tách dòng mang gen mã hoá protein GP5ecto-M gắn kết ELP (B).

Plasmid pRTRA-35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP được giải trình tự với môi 35S-SQF/35Sterm cho thấy đã tách dòng và gắn kết thành công gen mã hóa protein GP5ecto-M của PRRSV với promoter 35S, Elastin like-polypeptide (ELP), Cmyc và His-tag (Hình 2: B).

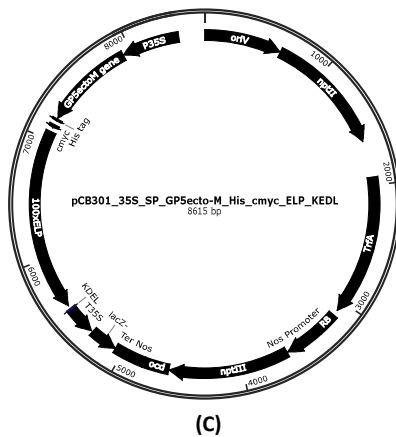
### 3.2. Thiết kế vector chuyển gen mang gen mã hóa kháng nguyên GP5ecto-M gắn kết ELP

Plasmid pRTRA-35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP và vector pCB301 được xử lý bằng enzyme *HindIII*. Kết quả điện di sản phẩm cắt plasmid thu được các phân đoạn DNA gồm cassette 35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP có kích thước khoảng 3,2 kb, khung vector pCB301 mở vòng có kích thước khoảng 5,5 kb. Khung vector pCB301 được ghép nối với cassette 35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP tạo vector chuyển gen pCB301-35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP. Kiểm tra vector chuyển gen mang cassette biểu hiện bằng enzyme giới hạn *HindIII* (Hình 3:A) đã thu được hai phân đoạn DNA theo đúng tính toán lý thuyết của vector pCB301 mở vòng (5508 bp) và cassette biểu hiện (3214 bp). Để chọn lọc dòng khuẩn mang vector chuyển gen có cassette đảo chiều (chiều biểu hiện của gen GP5ecto-M ngược chiều với chiều biểu hiện của gen kháng kháng sinh), các plasmid cho kết quả dương tính (đúng kích thước theo tính toán lý thuyết) sau khi cắt với enzyme *HindIII* được xử lý với *NcoI*. Kết quả xử lý các plasmid tái tổ hợp với *NcoI* (Hình 3:B) cho thấy thu được hai phân đoạn DNA theo đúng kích thước tính toán lý thuyết tương ứng là 4876 bp và 3589 bp (cassette đảo chiều) và 7029 bp và 1586 bp (cassette xuôi chiều).



(A)

(B)



Hình 3. Kết quả thiết kế vector chuyển gen mang gene mã hóa kháng nguyên GP5ecto-M gắn kết ELP; (A): Điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pCB301 tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn *HindIII*; M: Marker 1 kb; 1,2: Sản phẩm cắt plasmid pCB301-35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP; (B): Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pCB301 tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn *NcoI*; (C): Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pCB301-35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP.

Dòng khuẩn mang vector chuyển gen có cassette đảo chiều được dùng để biến nạp vào *A. tumefaciens* phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời. Như vậy, vector chuyển gen pCB301-GP5ecto-M-100xELP đã được thiết kế thành công, có sơ đồ thiết kế như hình 3: C.

Vector chuyển gen pCB301 mang cassette biểu hiện 35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP đảo chiều được thiết kế thành công. Vector tái tổ hợp này được sử dụng để biến nạp vào các chủng *A. tumefaciens*.

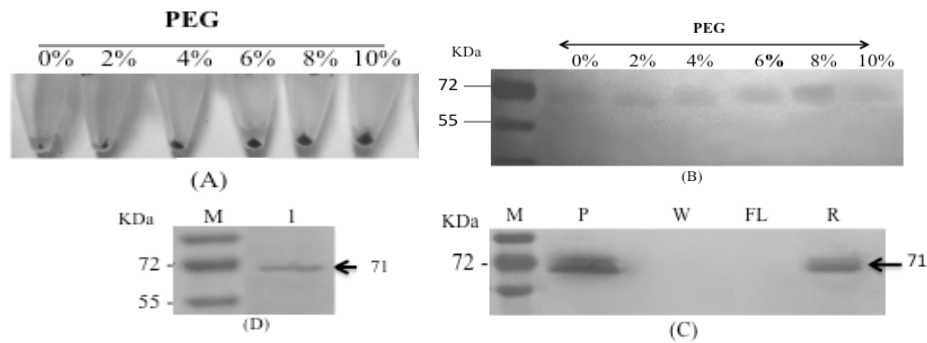
### 3.3. Biểu hiện tạm thời và tinh sạch protein GP5ecto-M của PRRSV ở lá cây thuốc lá *N. benthamiana*

Sử dụng chủng *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301 mang cassette 35S-GP5ecto-M-Histag-Cmyc-100xELP để biểu hiện protein GP5ecto-M trong mô lá thuốc lá bằng phương pháp biểu hiện tạm thời (được mô tả ở Mục 2.2. Phương pháp).

Tinh sạch protein GP5ecto-M bằng phương pháp mITC

Trong quá trình tinh sạch protein, PEG được sử dụng để loại bỏ một số protein thực vật. Tuy nhiên, nồng độ PEG cần phải được tối ưu nhằm loại bỏ các protein tạp trong dịch chiết thực vật mà không làm mất protein mục tiêu. Ở các nồng độ được nghiên cứu cho thấy sự kết tủa của protein tạp trong dịch chiết lá thuốc lá tăng lên rõ rệt khi tăng nồng độ PEG từ 0 - 10% (Hình 4: A). Ở nồng độ PEG 10% kết tủa protein lắng cặn là nhiều nhất. Phát hiện protein đích bằng lại miễn dịch (Hình 4: B), cho thấy ở tất cả các nồng độ đều thu được protein mục tiêu GP5ecto-M. Tuy nhiên, ở công thức không bổ sung PEG vào nồng độ PEG 2% xuất hiện băng mục tiêu nhưng rất mờ, cho thấy ở nồng độ này vẫn tinh sạch được protein GP5ecto-M nhưng do lẫn nhiều protein tạp dẫn đến hạn chế việc phát hiện protein mục tiêu. Ở nồng độ 8%, thu được băng vạch đậm nét nhất, chứng tỏ tại nồng độ này protein tinh sạch thu được nhiều nhất. Khi tăng nồng độ PEG từ 8% đến 10% băng vạch nhạt dần, có thể do protein mục tiêu bị mất dần. Như vậy, nồng độ PEG càng cao, protein mục tiêu có thể bị kết tủa cùng các protein tạp. Do đó, rất có thể nếu nồng độ PEG tiếp tục tăng đến một giới hạn nào đó sẽ làm mất protein mục tiêu. Vì vậy, PEG 8% được lựa chọn và sử dụng bổ sung vào dịch chiết thực vật trong quá trình tinh sạch protein GP5ecto-M bằng phương pháp mITC.

Dịch chiết thực vật được bổ sung PEG 8%, được tinh sạch theo phương pháp mITC, kiểm tra protein GP5ecto-M bằng Western blot (Hình 4: C) gồm các mẫu: dịch chiết thô trước xử lý, dịch chảy qua màng sau khi cho qua màng dịch chiết thô, dung dịch sau khi rửa và protein sau khi tinh sạch được tách rửa khỏi màng, cho thấy ở giếng chứa dịch thô và giếng protein sau khi tinh sạch xuất hiện băng màu nâu duy nhất có kích thước khoảng 71 kDa và không xuất hiện ở giếng chứa dịch chảy qua màng và các dịch rửa màng. Điều này chứng tỏ protein đích có gắn ELP có trong dịch thô đã được giữ lại trên màng. Kiểm tra độ tinh sạch của protein GP5ecto-M khi sử dụng PEG 8% trên SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (Hình 4: C) thu được băng vạch protein đậm nét, không lẫn protein tạp.



Hình 4. Kết quả biểu hiện và tinh sạch protein GP5ecto-M, tối ưu PEG cho quá trình tinh sạch (A): Dịch chiết thực vật (2ml) có bổ sung PEG ở các nồng độ (0 -10%) sau ly tâm; (B): Kết quả Western blot phát hiện protein GP5ecto-M sau khi sử dụng PEG ở các nồng độ 0-10%; (C): Tinh sạch protein đích bằng lai miễn dịch: M:marker protein; R: dịch chiết thô trước xử lý; FL: dịch chảy qua màng sau khi đưa dịch thô qua màng; W: Dung dịch sau khi rửa; P: Protein đích; (D): Kiểm tra sự tinh sạch của protein ở nồng độ PEG 8% trên SDS-PAGE, M: Marker protein; 1: protein tinh sạch

Từ các kết quả thu được cho thấy đã biểu hiện và tinh sạch thành công protein GP5ecto-M. Như vậy, nồng độ PEG phù hợp nhất cho tinh sạch protein GP5ecto-5 bằng phương pháp mITC là 8%.

#### 4. Kết luận

Vector chuyển gen tái tổ hợp mang gen mã hoá kháng nguyên GP5ecto-M của chủng PRRSV gây bệnh lợn tai xanh của Việt Nam (VN07196) đã được thiết kế. Đã biểu hiện và tinh sạch thành công protein GP5ecto-M trong lá thuốc lá bằng công nghệ biểu hiện gen tạm thời nhằm phục vụ sản xuất vaccine tiểu đơn vị chống lại PRRSV.

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện với kinh phí từ đề tài thuộc nhiệm vụ nghiên cứu thường xuyên của phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ Sinh học: “Nghiên cứu sản xuất kháng nguyên của virus gây bệnh lợn tai xanh trong cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp agroinfiltration”. Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng các trang thiết bị của phòng công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] Meulenber JM, Peter Sen-Den Besten A, Kluyver EP, Moormann RJM, Schaaper WMM, Wensvoort G, Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206(2000) 155.
- [2] Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B, Rogan D, Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 145 (2000) 659.
- [3] Mardassi H, Massie B, Dea S. Intracellular synthesis, processing, and transport of proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 221 (1996) 98.
- [4] Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Chu Thị Kim Hoàng, Phạm Thị Vân, Phạm Bích Ngọc, Đinh Duy Kháng, Chu Hoàng Hà, Nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên GP5 của virus gây bệnh lợn tai xanh trong cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*) bằng phương pháp agro-infiltration. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 31, (1) (2015) 5.
- [5] Nguyễn Thị Minh Hằng, Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Biểu hiện và tinh sạch protein M của virus prrs gây bệnh lợn tai xanh bằng công nghệ biểu hiện tạm thời trong lá thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. *Công nghệ sinh học* 15 (3), Chấp nhận đăng (2017).

- [6] Hou YH, Chen J, Tong G Z, Tian Z J, Zhou YJ, Li GX, Li X, Peng J M, An T Q, Yang H, A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets. *Vaccine* 26 (2008) 143.
- [7] Jiang Y, Xiao S, Fang L, Yu X, Song Y, Niu C, Chen H, DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* 24 (2006b) 2869.
- [8] Qiu HJ, Tian ZJ, Tong GZ, Zhou YJ, Ni JQ, Luo YZ, Cai XH, Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol* 106 (2005) 309.
- [9] Jiang W, Jiang P, Li Y, Tang J, Wang X, Ma S, Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 113 (2006a) 169.
- [10] Wang S, Fang L, Fan H, Jiang Y, Pan Y, Luo R, Zhao Q, Chen H, Xiao S, Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 25 (2007) 8220.
- [11] Zheng Q, Chen D, Li P, Bi Z, Cao R, Zhou B, Chen P, Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* 35 (2007) 585.
- [12] Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, Tsai YC, Lin CM, Pang VF, Jeng CR, Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant. *Vet Immunol Immunopathol*. 135 (2010) 234.
- [13] Scheller J, Leps M, and Conrad U, Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides. *Plant Biotechnology Journal* 4 (2006) 243.
- [14] Phan HT, ELPylated avian flu vaccines from plants: Improvement of expression and development of a new purification strategy. Dissertation, IPK, Gatersleben, Germany (2012).
- [15] Floss D M, Mockey M, Zanello G, Brosson D, Diogon M, Frutos R, Bruel T, Rodrigues V, Garzon E, Chevaleyre C, Berri M, Salmon H, Conrad U, Dedieu L, Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *J. Biomed. Biotechnol.* (2010a) 1.
- [16] Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, and Oliver D, A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 40 (1999) 711.

## Cloning and Co-expression of Genes Encoding two Types of GP5ecto envelope (Ectodomain) and M Antigens of Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Nguyen Thi Minh Hang<sup>1,2</sup>, Ho Thi Thuong<sup>1</sup>, Nguyen Thu Giang<sup>1</sup>,  
Pham Bich Ngoc<sup>1</sup>, Nguyen Trung Nam<sup>2</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology,  
18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam*

<sup>2</sup>*College of Forestry Biotechnology, VNUF, Xuan Mai, Chuong My, Hanoi, Vietnam*

**Abstract:** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is a common infectious disease in the pig farming, caused by the PRRS virus. GP5 protein (ORF5) encodes the outer skin



glycoprotein, including the extracellular (ectodomain) and endothelium(endodomain). GP5 and M proteins are tightly bound together by disulfide bridges to assemble and infect the virus. Co-expression of GP5 and M proteins can develop a stronger immune response. In this study, the two genes encoding for the GP5ecto (ectodomain) and M proteins of the PRRSV strain (VN07196) were amplified individually, which were then nested together using PCR technique. Using specific 35S, Histag and Cmyc promoters, ELPs, clones in the pRTRA vector and designed into the pCB301 plant transformation vector. The ELP-binding GP5ecto-M binding protein was successfully expressed in the tobacco leaves of *N. benthamiana* by transient expression, optimal and purified gene expression technology of GP5ecto-M by the mITC method. Succeeded this protein. This is an important scientific basis for the large-scale transient expression and purification of GP5ecto-M antigens for the purpose of studying the immunogenicity in animals and the production of PRRSV subunit vaccine.

*Keywords:* Transient expression, co-expression, protein GP5ectodomain-M, PRRSV, protein purification.