

# Cải biến vector hệ Virut Semliki Forest (SFV) nhằm biểu hiện thụ thể GPCR của người Việt Nam

Phạm Thị Hồng Nhung<sup>1,2</sup>, Hoàng Thị Mỹ Nhung<sup>1</sup>, Đinh Đoàn Long<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Enzym-Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, 334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 2 tháng 12 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 16 tháng 12 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 30 tháng 12 năm 2014

**Tóm tắt.** Các thụ thể xuyên màng kết cặp G-protein (GPCR) của người có vai trò quan trọng trong các nghiên cứu sàng lọc và phát hiện dược phẩm. Vì vậy, việc biểu hiện thành công các thụ thể này bằng công nghệ ADN tái tổ hợp có ý nghĩa quan trọng. Trong các hệ vector biểu hiện, hệ vector có nguồn gốc từ Virut Semliki Forest (SFV) có nhiều ưu điểm nổi bật trong biểu hiện các thụ thể màng tế bào nhờ khả năng lây nhiễm rộng các tế bào động vật có vú giúp sự cải biến protein sau dịch mã hiệu quả. Mục đích của nghiên cứu này là cải biến hệ vector SFV cơ bản (pSFV) để tạo vector biểu hiện có vị trí đa nhân dòng (MCS) và các mã kết thúc dịch mã (stop codons) mở rộng để nâng cao hiệu quả sử dụng hệ vector. Phiên bản vector sau khi được cải biến đã được áp dụng thành công để biểu hiện thụ thể neurokinine-1 (NK1R), một thụ thể GPCR điển hình, có chức năng sinh học đầy đủ được kiểm chứng qua phương pháp lai miễn dịch (Western Blot) và phép đo chức năng thụ thể (Fura-2). Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể sử dụng hệ vector pSFV cải biến cho biểu hiện và sản xuất các thụ thể GPCR tái tổ hợp của người Việt Nam phục vụ cho các nghiên cứu về sinh học thụ thể hoặc trong các nghiên cứu sàng lọc và phát triển thuốc.

**Từ khóa.** Vector biểu hiện Semliki Forest Virus, Thụ thể neurokinin-1 (NK-1R), ADN tái tổ hợp.

## 1. Tổng quan

Các thụ thể kết cặp G-protein (viết tắt là GPCR) là nhóm thụ thể xuyên màng sinh chất phổ biến và đa dạng nhất ở người [1-3]. Các GPCR liên quan đến nhiều bệnh lý, bao gồm cả các bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn, tới các bệnh về tim mạch, thần kinh, tiêu hóa, tiết niệu, v.v... Hiện nay, GPCR được coi là đích phân tử

(molecular target) của trên 60% các loại dược phẩm đang được sử dụng trong điều trị [1] và là mục tiêu phân tử được sử dụng rộng rãi nhất trong các chương trình sàng lọc thuốc hướng đích [4]. Vì lý do đó, các hệ vector biểu hiện thụ thể GPCR được quan tâm nghiên cứu phát triển trong hơn 20 năm qua. Trong số đó, hệ thống biểu hiện có nguồn gốc Virut Semliki Forest (pSFV) có một số ưu điểm vượt trội: i) phổ tế bào vật chủ lây nhiễm rộng, ii) hệ virut bị suy giảm khả năng tự tái bản (chỉ được tái bản khi

\* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-912150799  
E-mail: longdd.smp@vnu.edu.vn

có vector hỗ trợ) nên tính an toàn sinh học được nâng cao, iii) làm giảm mức dịch mã protein tế bào chủ dẫn đến biểu hiện vượt trội các protein GPCR tái tổ hợp.

Tuy vậy, hệ vector cơ bản (pSFVgen2 và pSFV-Helper2) có nhược điểm là trình tự giới hạn tại vị trí nhân dòng đa điểm (MCS) hạn chế và chỉ có một bộ ba mã kết thúc dịch mã (stop codon), dẫn đến giới hạn khả năng sử dụng hệ vector này cho các GPCR khác nhau, đồng thời đòi hỏi việc cài gen phải đúng khung đọc duy nhất vốn đòi hỏi kỹ thuật phức tạp. Nghiên cứu này của chúng tôi được thực hiện nhằm 2 mục tiêu: 1) Cải biến vector biểu hiện cơ bản (pSFVgen2) bằng cách bổ sung trình tự giới hạn vào vị trí nhân dòng đa điểm và bổ sung catxet 3 mã kết thúc dịch mã (stop codons) lệch nhau lần lượt 1 nucleotit sau vị trí MCS để đảm bảo sự kết thúc dịch mã không phụ thuộc vào vị trí cài của gen tại MCS; 2) Thử nghiệm hệ vector cải biến để biểu hiện thụ thể NK1R phân lập từ người Việt Nam để kiểm chứng khả năng hoạt động của hệ vector sau cải biến trong tế bào bùồng trùng chuột Hamster (CHO).

## 2. Vật liệu và phương pháp

### Vật liệu

Dòng cADN mã thụ thể NK1R của người Việt Nam được phân lập và cài vào vector nhân dòng pJET1.2 (pJET1.2-NK1R) đã được chúng tôi mô tả trước đây [5]. Hệ vector pSFV cơ bản (pSFVgen2 và pSFV-Helper2) là quà tặng từ TS. Ghérici Hassain, Trường Đại học Công nghệ Liên Bang Laussane, Thụy Sĩ.

### Cải biến hệ vector cơ bản

Đoạn oligonucleotit mang các trình tự giới hạn mở rộng và catxet 3 stop codons được chúng tôi tự thiết kế (Hình 1) và được đặt tổng hợp bởi hãng IDT (Mỹ).

Các cặp môi PCR đặc hiệu vector pSFV và cADN mã NK1R có trình tự như sau:

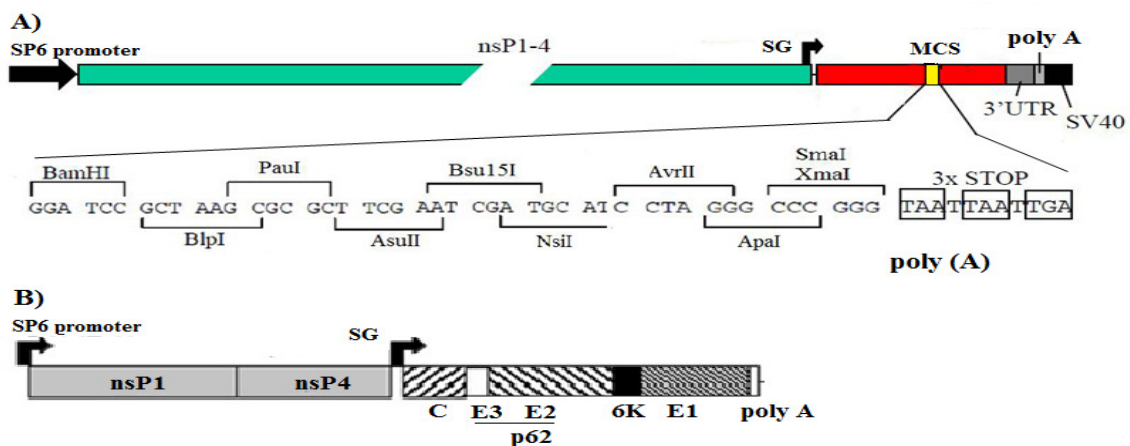
NK1-F: 5'-ATTTGGATCCGATATGGATAACGTCCTC-3'

NK1-R: 5'-TAAATCGATCTAGGAGAGCACATTG-3'

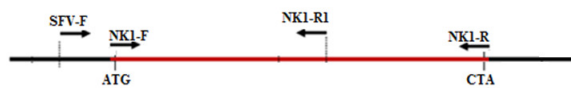
NK1-R1: 5'-GCCAGCAGATGGCGAAGG-3'

SFV-F: 5'-GCCCATCTATGACAACAAG-3'

Vị trí bắt cặp của các cặp môi được mô tả ở Hình 2.



Hình 1. Cấu trúc hệ vector pSFV. A) Cấu trúc vector biểu hiện pSFVgen 2 (trình tự bên dưới là đoạn được bổ sung vào vector cải biến pSFV-Klept1.2; B) Cấu trúc vector hỗ trợ pSFV-Helper2.



Hình 2. Vị trí bắt cặp các mồi PCR trên vector pSFV-Klept1.2 (kí hiệu SFV-F) và trong đoạn cài cADN mã NK1R (kí hiệu bắt đầu bằng NK1; F, mồi xuôi; R, mồi ngược), để kiểm chứng đoạn cài gắn vào vector pSFV.

### PCR khuếch đại đoạn gen mã thụ thể NK1R

cADN mã cho NK1R được nhân dòng từ vector pJET1.2-NK1R bằng phản ứng PCR dùng *Pfu* ADN polymerase (Thermo Scientific, Mỹ) và cặp mồi NK1-F/NK1-R có chứa vị trí giới hạn *Bam*HI và *Bsu*15I. Chu trình nhiệt được sử dụng: thời gian biến tính đầu tiên: 95°C - 3 phút; lặp lại 4 chu kì: 95°C - 30 giây, 50°C - 30 giây, 72°C - 90 giây; lặp lại 35 chu kì: 95°C - 30 giây, 58°C - 30 giây, 72°C - 90 giây; thời gian tổng hợp sau cùng: 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc).

### Chuyển cADN mã NK1R từ vector nhân dòng pJET1.2 sang vector biểu hiện pSFV-Klept1.2

Vector pSFV-Klept1.2 và sản phẩm PCR của cADN mã NK1R được cắt đồng thời bởi 2 enzyme giới hạn *Bam*HI và *Bsu*15I (Thermo Scientific, Mỹ) để đảm bảo đoạn cài được lắp đúng chiều. Vector pSFV-Klept1.2 sau khi mở vòng được ngăn đóng vòng bằng Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific, Mỹ) rồi được tinh sạch bằng phenol/chloroform. cADN mã NK1R được nối vào vector nhờ T4 ADN ligase (Thermo Scientific, Mỹ).

### Sàng lọc khuẩn lạc *E.coli* DH5α mang vector pSFV-NK1R

Hỗn hợp ADN tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E.coli* khả biến DH5α theo quy trình truyền thống [6] rồi cấy trên môi trường có bổ sung ampicillin để phát hiện khuẩn lạc mang plasmid. Các khuẩn lạc tiếp tục được sàng lọc nhanh bằng kĩ thuật colony PCR dùng cặp mồi SFV-F/NK1-R1 để tìm khuẩn lạc mang vector pSFV-NK1R.

### Biểu hiện NK1R trên tế bào CHO sử dụng hạt virus SFV mang gen mã NK1R

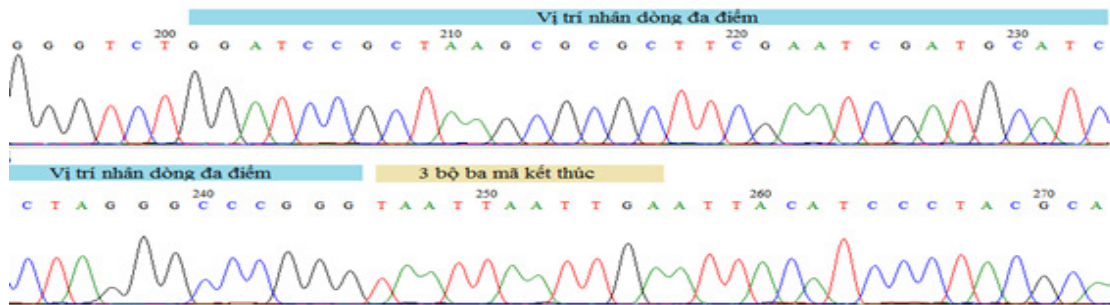
pSFV-NK1R và pSFV-Helper2 được phiên mã invitro và ARN của chúng được đồng biến nạp bằng xung điện vào tế bào BHK-21 để sản xuất hạt virus SFV mang cADN mã NK1R. Để có khả năng lây nhiễm, hạt virus được hoạt hóa bằng  $\alpha$ -chymotrypsin ở nồng độ 500 $\mu$ g/ml trong 20 phút.

Tế bào CHO nuôi cấy đạt khoảng 70 – 80% đồng dòng được ủ với virut đã hoạt hóa qua đêm ở 37°C trong tủ 5% CO<sub>2</sub>. Ngày hôm sau tế bào được thu để kiểm tra sự biểu hiện của NK1R bằng kỹ thuật Western Blot và phép thử Fura-2AM (Invitrogen, Life Technologies).

## 3. Kết quả

### 3.1. Cải biến vector pSFV cơ bản

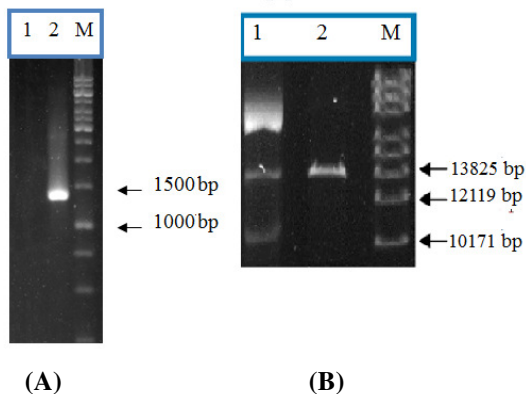
Trình tự nucleotit ở Hình 3 cho thấy đoạn oligonucleotit mang các trình tự giới hạn mở rộng (cho các enzym giới hạn *Bam*HI, *Bsp*I, *Pau*I, *Asu*II, *Bsu*15I, *Avr*II, *Apa*I, *Sma*I) và catxet 3 bộ ba kết thúc dịch mã (stops codons) đã được cài thành công vào vector cơ bản pSFVgen2 để tạo vector pSFV-Klept1.2.



Hình 3. Kết quả giải trình tự đầu 3' của vector pSFV-Klept1.2 cho thấy đoạn oligonucleotit cải biến đã được cài thành công vào vector biểu hiện cơ bản pSFVgen2.

### 3.2. Chuyển cADN mã NK1R từ vector nhân dòng pJET1.2 sang vector biểu hiện pSFV

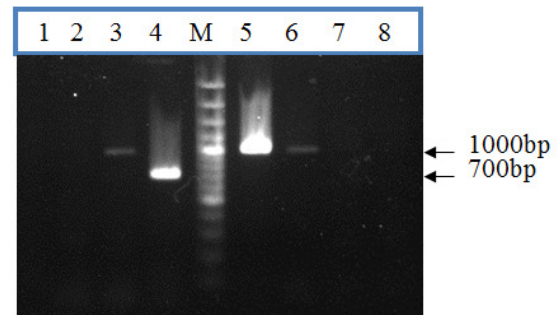
Ảnh điện di ở Hình 4A cho thấy đoạn chèn cADN mã NK1R đã được nhân dòng thành công và được cắt tạo đầu dính cho sản phẩm có kích thước 1214 bp đúng như tính toán lý thuyết. Bảng điện di rõ và đặc hiệu đủ điều kiện sử dụng cho các phản ứng tiếp theo. Sản phẩm điện di ở Hình 4B cho thấy vector pSFV-Klept1.2 mở vòng hoàn toàn với băng ADN đủ chất lượng để sử dụng cho phản ứng nối ADN.



Hình 4. Ảnh điện di trên gel agarose 1%. A) Sản phẩm PCR của cADN mã NK1R. 1, đối chứng âm; 2, sản phẩm PCR của cADN mã NK1R; M, thang ADN 100 bp. B) Plasmid pSFV-Klept1.2. 1, plasmid sau mở vòng; 2, pSFV – Klept1.2 xử lý đồng thời *Bam*HI/*Bsu*15I Alkaline Phosphatase; M, Thang ADN kích thước lớn (Thermo Scientific).

### 3.3. Sàng lọc khuẩn lạc *E.coli* DH5α mang vector tái tổ hợp pSFV-NK1R

Để tăng cường hiệu quả của phản ứng colony PCR, hỗn hợp chứa khuẩn lạc được ủ ở 95°C trong 15 phút trước khi đưa vào sàng lọc. Tại nhiệt độ gắn mỗi là 60°C và sử dụng cặp mồi SFV-F/NK1-R1, chúng tôi đã thu được một số khuẩn lạc tạo ra sản phẩm PCR có kích thước 915 bp là những khuẩn lạc mang đoạn chèn NK1R đúng chiều như minh họa ở Hình 5.

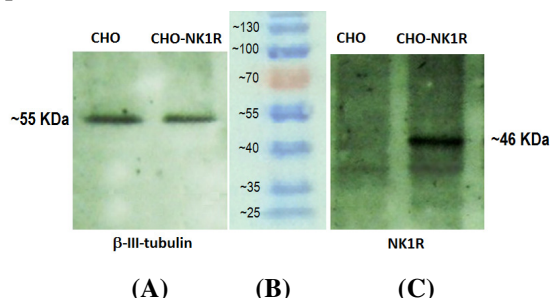


Hình 5. Ảnh điện di sàng lọc khuẩn lạc mang pSFV-NK1R bằng colony PCR. 1, Đối chứng âm; 2 đến 8, sản phẩm PCR của các mẫu khuẩn lạc thu được; M: Thang ADN 100 bp (Thermo Scientific).

### 3.4. Biểu hiện NK1R trên tế bào CHO

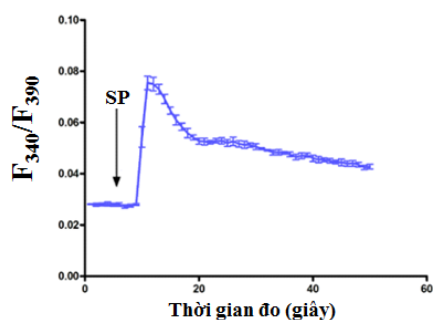
Thí nghiệm Western blot được tiến hành với cùng một lượng protein tổng số thu từ dòng CHO tự nhiên và CHO được ủ với hạt virus SFV-NK1R (viết tắt là CHO-NK1R) sử dụng kháng thể Tubulin (480011, Invitrogen) và

kháng thể NK1R (SAB4502913, Sigma). Kết quả Western blot được thể hiện ở Hình 6.



Hình 6. Ảnh Western blot tế bào CHO tự nhiên và tế bào CHO biểu hiện NK1R. Các tế bào CHO được phân tích 24 giờ sau lây nhiễm với hạt virus SFV-NK1R. A) Western blot với kháng thể tubulin (Invitrogen). B) Thang chuẩn protein. C) Western blot với kháng thể NK1R (Sigma).

Kết quả phân tích hoạt tính của NK1R biểu hiện trên dòng tế bào CHO-NK1R thông qua khả năng giải phóng  $Ca^{2+}$  nội bào khi thêm Substance P ở nồng độ  $10^{-7}$  M. Chỉ số  $Ca^{2+}$  nội bào được đánh giá thông qua kit Fura-2AM (Life Technologies Inc., Singapore) thông qua giá trị huỳnh quang đo tại bước sóng 340 nm (F340) và 390nm (F390) dùng máy Plate CHAMELEON<sup>TM</sup> V (Hidex, Phần Lan) được trình bày ở Hình 7.



Hình 7. Fura-2 của tế bào CHO biểu hiện NK1R. Các tế bào CHO-NK1R được xử lý với phối tử đặc hiệu (Substance P) tại vị trí mũi tên và đo động học liên tục trong 60 giây. Lượng  $Ca^{2+}$  được giải phóng được tính từ tỉ số F340/F390 tăng do Substance P kích thích cho thấy tế bào CHO-NK1R đã biểu hiện thụ thể có chức năng truyền tín hiệu (dẫn đến tăng chất truyền tin thứ 2) như tế bào tự nhiên.

## 5. Thảo luận

Kết quả phân tích Western blot cho thấy, dòng tế bào CHO-NK1R đã biểu hiện thụ thể NK1R và thụ thể này hoàn toàn không biểu hiện trên dòng tế bào CHO tự nhiên mặc dù lượng protein cơ định (sản phẩm gen giữ nhà) đưa vào là như nhau thể hiện thông qua đối chứng nhuộm với kháng thể  $\beta$ -III-tubulin.

Khi thêm chất chủ vận điển hình của NK1R là Substance P vào môi trường, tế bào CHO-NK1R xảy ra đáp ứng tế bào như ở dạng tự nhiên. Như vậy, mô hình tế bào CHO-NK1R được tạo ra có thể sử dụng cho nghiên cứu sàng lọc các hợp chất thu từ nguồn dược liệu Việt Nam với đích tác dụng là thụ thể NK1R.

Với dải vật chủ lây nhiễm rộng, tính an toàn do virus mới tạo ra vẫn ở dạng bất hoạt nếu không qua xử lý  $\alpha$ -chymotrypsin, khả năng lây nhiễm nhanh và hiệu quả, quy trình nghiên cứu này có thể được áp dụng để biểu hiện các GPCR tái tổ hợp khác của người phục vụ cho các nghiên cứu sinh học thụ thể và dược lý học phân tử.

## 6. Kết luận

Chúng tôi đã cải biến được vector cơ bản hệ pSFVgen2 (tạo vector biểu hiện pSFV -Klept 1.2) và dùng để biểu hiện thành công thụ thể NK1R hoàn chỉnh từ người Việt Nam qua việc tế bào tái tổ hợp CHO-NK1R biểu hiện đầy đủ chức năng sinh học của thụ thể.

## Lời cảm ơn

Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam cho đề tài ĐT-PTNTĐ.2011-G/04 để thực hiện nghiên cứu này.

**Tài liệu tham khảo**

- [1] Eglén RM, Reisine T (2008). *GPCR proteins: important new tools in drug discovery*. *Assay Drug Dev Technol.* 6(5): 659-71.
- [2] Thompson MD, Siminovich KA, Cole DE (2008). *G protein-coupled receptor pharmacogenetics*. *Methods Mol Biol.*; 448: 139-85.
- [3] Lundström K (2009). *An overview on GPCRs and drug discovery: structure-based drug design and structural biology on GPCRs*. *Methods Mol Biol*, 552: 66-51
- [4] Lundström K (2006). *Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors*. *Curr Protein Pept Sci*, 7(5): 465 - 70.
- [5] Võ Thương Lan, Phan Hà My, Đinh Đoàn Long (2013). Tách dòng cDNA mã hóa cho thụ thể neurokinin-1 từ mô não người Việt Nam. *Tạp chí Khoa học (VNU)*, 29 (4): 24 - 28.
- [6] Sambrook J., Russell D.W. (2011) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 5th edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

## Development of Semliki Forest Virus Expression Vector for Production of Human GPCR Receptors Clonally Isolated from Vietnamese Patients

Phạm Thị Hồng Nhung<sup>1,2</sup>, Hoàng Thị Mỹ Nhung<sup>1</sup>, Đinh Đoàn Long<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Lab for Enzyme-Protein Technology, VNU University of Science,  
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hanoi, Vietnam

**Abstracts:** Semliki Forest Virus (SFV) expression system permits a rapid and efficient production of large quantities of receptor proteins for pharmacological studies. The system is based on replicon vector (pSFV2gen) and helper vector (pSFV-Helper2). The purpose of this study is to develop and use the improved SFV vectors to express human G-protein coupled receptors isolated from Vietnamese patients in mammalian cell lines. A new replicon vector (pSFV - Klept1.2) was constructed from pSFV2gen by joining a new DNA sequence which has additional multiple cloning sites and a cassette of 3 stop codons. cDNA of Neurokinin-1 receptor (NK1R) was introduced into the pSFV-Klept1.2 and in vitro transcribed RNA was electroporated into BHK-21 cells with pSFV-Helper2 RNA for producing virus. Results of Western Blot and Fura - 2AM assay show that pSFV-Klept1.2 expressed NK1R into CHO cells with full activity. With these vectors, we have established successfully a cellular model facilitating the production of recombinant GPCRs for molecular pharmacological studies and drug screening.

**Keywords:** Neurokinin-1 receptor, Semliki Forest Virus vector, recombinant DNA.