

Nghiên cứu 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

Hồ Thị Thương¹, Nguyễn Thu Giang¹, Chu Thị Kim Hoàng², Phạm Thị Vân¹,
Phạm Bích Ngọc¹, Đinh Duy Kháng¹, Chu Hoàng Hà^{1,*}

¹*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam*

²*Đại học Sư phạm Hà Nội 2*

Nhận ngày 07 tháng 01 năm 2015

Chỉnh sửa ngày 14 tháng 01 năm 2015; Chấp nhận đăng ngày 03 tháng 03 năm 2015

Tóm tắt: Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất ở lợn lây lan trên toàn thế giới do virus PRRS (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome*) gây ra. Protein bề mặt GP5 được xem như là mục tiêu hàng đầu dùng để thiết kế vắc xin chống lại sự xâm nhiễm của virus PRRS. Trong nghiên cứu này, đoạn gen mã hóa cho protein GP5 đã được nhân dòng vào vector pRTRA để gắn kết với promoter 35S, ELP, his-tag, cmyc-tag tạo cassette 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP, sau đó cấu trúc được ghép nối vào vector chuyển gen pCB301 và biến nạp vào *A. tumefaciens*. Cấu trúc này sau đó được sử dụng để chuyển vào lá cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp agro-infiltration. Kết quả kiểm tra protein tách chiết từ mẫu lá biểu hiện bằng lai miễn dịch sau 5 ngày biến nạp cho thấy có sự biểu hiện tái tổ hợp của kháng nguyên GP5, tuy nhiên có sự sai khác của kích thước kháng nguyên GP5 so với tính toán lý thuyết do có hiện tượng glycosyl hóa xảy ra trong quá trình cải biến sau dịch mã. Phân tích hàm lượng protein GP5 tái tổ hợp bằng phần mềm ImageJ trên màng lai sau khi tinh sạch protein từ 1 kg lá tươi bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại thu được hàm lượng kháng nguyên GP5 chiếm 3,125 % protein tổng số.

Từ khóa: *Nicotiana benthamiana*, PRRSV, GP5, agro-infiltration, transient expression.

1. Mở đầu

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRS, *Porcine reproductive and respiratory syndrome*), tại Việt Nam còn gọi là bệnh “lợn tai xanh”, được xem là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất ở lợn trên toàn thế giới và được ghi nhận lần đầu tiên tại Bắc Mỹ năm 1987 [1].

Bệnh lây lan vào Việt Nam trên đàn heo giống nhập từ Mỹ về từ năm 1997 sau đó các dịch bệnh nặng được thông báo vào đầu năm 2007, sau đó lây lan khắp 17 tỉnh trên khắp cả nước và gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi trong nước [2], với tổng số hơn 60.000 heo mắc bệnh. Vì sự nguy hiểm và những thiệt hại lớn về kinh tế mà virus PRRS gây ra, việc kiểm soát sự lây lan của dịch bệnh là việc rất cần thiết.

* Tác giả liên hệ. ĐT: 84-912175636.
Email: chuhoangha@ibt.ac.vn

Bệnh do virus PRRSV thuộc loại Arterivirus, họ Arteriviridae và bộ Nodovirales gây ra [3]. Hệ gene của PRRSV có kích thước khoảng 15 kb, với 9 khung đọc mở (ORF): 1a, 1b, 2a, 2b, 3-7. Glycoprotein 5 (GP5) được mã hóa bởi ORF 5, là một trong những thành phần chính của hạt virus với vùng ngoại bào 40 axit amin và vùng nội bào 50 đến 70 axit amin [4]. GP5 có một đoạn tín hiệu peptide định hướng tại đầu cuối N của protein và bị glycosyl hóa sau dịch mã từ 2 đến 4 vị trí đó là N30, N33, N44 hoặc N51 [5]. Vị trí được glycosyl hóa rất quan trọng cho quá trình hình thành cấu trúc và duy trì hoạt tính của protein [6]. GP5 được biết như yếu tố kích thích việc sản sinh kháng thể trung hòa ở lợn và đây là một vấn đề then chốt của miễn dịch dịch thể. Những chủng PRRSV mang đột biến loại vùng glycosyl hóa ở GP5 cho thấy khả năng kích thích sinh kháng thể trung hòa cao hơn chủng đại.

Trong những nghiên cứu phát triển vaccin chống lại PRRSV đã được ghi nhận trong hai thập kỷ qua, việc thiết kế vaccin tiểu đơn vị tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể là đặc biệt quan trọng vì cả hai cơ chế này đều liên quan đến việc bảo vệ chống lại virus. Trong nhiều hướng ứng dụng để phát triển các loại vaccin tiểu đơn vị chống PRRSV, protein GP5 được xem như là mục tiêu hàng đầu dùng để thiết kế loại vaccin này chống lại sự xâm nhiễm của PRRSV [7]. Và hướng tạo vaccin tiểu đơn vị sử dụng hệ thống biểu hiện ở thực vật được xem như là một hướng đầy triển vọng với nhiều ưu điểm vượt trội so với các hệ thống biểu hiện khác như (1) chi phí sản xuất thấp [8]; (2) cho phép thực hiện việc định vị chính xác protein tái tổ hợp trong tế bào, cũng như cho phép protein có những biến đổi sau dịch mã [9]; (3) protein tái tổ hợp được tích lũy trong tế bào thực vật có thể đạt mức cao: lên tới 14,4% lượng protein tổng số trong lá trưởng thành [10]

(4) Protein tái tổ hợp sản xuất từ thực vật sẽ tránh được sự tạp nhiễm của các virus (HIV, HBV, SV40...) và vi khuẩn [11]. Cho đến nay có đến 67 loại kháng nguyên của 24 nguồn bệnh khác nhau đã được biểu hiện thành công trong thực vật [12]. Tuy nhiên protein tái tổ hợp được tích lũy trong cây trồng chuyển gen thường không cao và thiếu một phương thức tinh sạch protein tái tổ hợp hiệu quả. Để khắc phục nhược điểm này, hiện nay agro-infiltration là phương pháp được ứng dụng trong sinh học thực vật nhằm biểu hiện tạm thời gen hoặc sản xuất các protein tái tổ hợp mong muốn. Agro-infiltration được ứng dụng phổ biến nhất trên hai loài *Nicotiana benthamiana* và *Nicotiana tabacum*. Phương pháp này rất hữu ích trong biểu hiện của protein đích thực vật vì phương pháp này nhanh, không bị ảnh hưởng bởi vị trí gắn gen đích trong tế bào thực vật và có thể tiến hành biểu hiện trong các mô đã biệt hóa hoàn toàn như lá [13].

Promoter điều khiển và phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp được xem như là một trong những yếu tố quyết định đến hàm lượng kháng nguyên thu được phục vụ cho việc sản xuất vaccin. Nhiều nghiên cứu về sự biểu hiện và sản xuất thành công kháng nguyên dung hợp với histag với hàm lượng cao dưới sự điều khiển của promoter CaMV (từ *Cauliflower mosaic virus*) và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại đã được chứng minh ví dụ về sự biểu hiện GP5 trong cây thuốc lá chuyển gen với hàm lượng 155 mg/kg lá tươi [14]. Đặc biệt, khi gắn protein tái tổ hợp với Elastin-like polypeptids (ELP), protein tái tổ hợp có thể tích lũy lên tới 25% protein tổng số trong hạt [15].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời kháng nguyên GP5 của PRRSV trong cây thuốc lá (*N. benthamiana*) bằng phương pháp agro-infiltration.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Vật liệu thực vật:

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

Các vector và cặp môi:

Vector pGEM-PRRSV mang gen glycoprotein 5 (GP5) phân lập từ chủng PRRSV VN1421 do phòng Vi sinh vật phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp; vector

pRTRA35S-TBAG-100xELP dưới sự điều khiển của promoter 35S chứa gen kháng kháng sinh ampicilin, trình tự 100xELP và đuôi cmyc-tag, his-tag.

Vector chuyển gen pCB301 có chứa gen kháng kháng sinh kanamycin, được dùng để tạo cấu trúc chuyển gen mã hóa GP5 [16]. 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.

Bảng 1. Danh sách các cặp môi

Tên môi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
GP5-BamHI-F	AGGGATCCGCCAGCAACAACAAC	526
GP5-BamHI-R	AGGGATCCGAGACGACCCCATG	
35S-SQF	CACTGACGTAAGGGATGACGC	Gen +250
35Sterm	CTGGGAAGTACTCACACA	

Chủng vi khuẩn: *E. coli* chủng DH5 α được dùng để chọn dòng và nhân dòng gen. Chủng *A. tumefaciens* C58C1 mang pGV2260 [17].

2.2. Phương pháp

Nhân dòng gen

Đoạn gen GP5 được nhân bản bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn là plasmid pGEM-PRRS (VN1421) với cặp môi đặc hiệu GP5-BamHI-F & R (bảng 1). Phản ứng PCR được tiến hành trong điều kiện: 50 μ l hỗn hợp bao gồm 0,3 μ M primers (Bảng 1), 0,2 μ M dNTPs, 2,5U Pwo SuperYield DNA polymerase, 5 μ l đệm 10X Pwo SuperYield PC và 20 ng khuôn. Quá trình nhân đoạn gồm các bước sau: 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 và điện kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Sản phẩm PCR thu được và plasmid pRTRA 35S-TBAG-100xELP tinh

sạch được phân cắt bằng *BamHI* và loại bỏ gốc phosphate với *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP). Sản phẩm ghép nối đoạn GP5 vào vector pRTRA được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường thạch LB 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 môi đặc hiệu trong bảng 1. Các trình tự nucleotide được phân tích bằng BioEdit 7.0 và Lasergen 7 (DNAstarinc., Madison, WI, USA).

Thiết kế cấu trúc biểu hiện cho chuyển gen thực vật

Vector pRTRA có chứa sự biểu hiện của kháng nguyên GP5 và pCB301 được phân cắt bằng *HindIII* và loại bỏ gốc phosphate với SAP. Sản phẩm ghép nối DNA vào vector pCB301 được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường thạch LB có bổ sung kanamycin 50 mg/l. Plasmid tái tổ hợp

pCB301-GP5/ELP sau khi được chọn dòng bằng PCR và cắt bằng cặp enzyme giới hạn *NcoI* sẽ được biến nạp vào vi khuẩn *A.tumefaciens* C58C1/pGV2260 bằng phương pháp xung điện theo quy trình của [18] để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời với mục đích hỗ trợ sự biểu hiện protein ở thực vật.

Biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá N. benthamiana

Lấy 1 khuẩn lạc chủng *A.tumefaciens* mang vector chứa gen mã hóa cho protein Hc-pro và 1 khuẩn lạc chủng *A.tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301GP5/ELP vào 2 bình 5 ml LB có bổ sung kháng sinh chọn lọc phù hợp. Vi khuẩn được nuôi lắc 120 rpm/phút, 14-16 giờ ở 28°C. Tiếp tục chuyển toàn bộ dịch khuẩn nuôi cấy trên vào bình chứa 50 ml LB và tiếp tục nuôi khoảng 4-6 giờ cho tới khi OD₆₀₀ đạt 0,5-1, khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 5000 rpm/phút trong 10 phút ở 4°C. Cặn khuẩn của hai chủng được trộn với nhau và hòa tan trong đệm MES (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5,6) tới khi OD₆₀₀ đạt 1. Dịch huyền phù vi khuẩn được dùng cho biến nạp vào lá cây *N. benthamiana* bằng hút chân không trong thời gian 2 phút, 27 inches, 0 atm. Các cây thuốc lá sau khi biến nạp được đưa trở lại vào nhà lưới để tiếp tục phát triển. Sau 5 ngày biến nạp, toàn bộ lá được thu và bảo quản ở -80°C.

Kiểm tra sự biểu hiện của GP5 bằng kỹ thuật Western blot

Mẫu lá thuốc lá được nghiền bằng máy Mixer Mill MM 300 (Retsch, Haan, Germany), sau đó hòa tan trong đệm mẫu SDS (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 19,000 rpm, 30 phút, 4°C. 10-30 ug 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. Sau khi được blocking bằng sữa tách béo 5% trong 5 giờ, màng được ủ với kháng thể 1 kháng cmyc qua đêm trước khi ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 2 giờ. Sự có mặt của GP5 gắn cmyc trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất.

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 GP5, làm lạnh trong nitơ lỏng và nghiền 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.

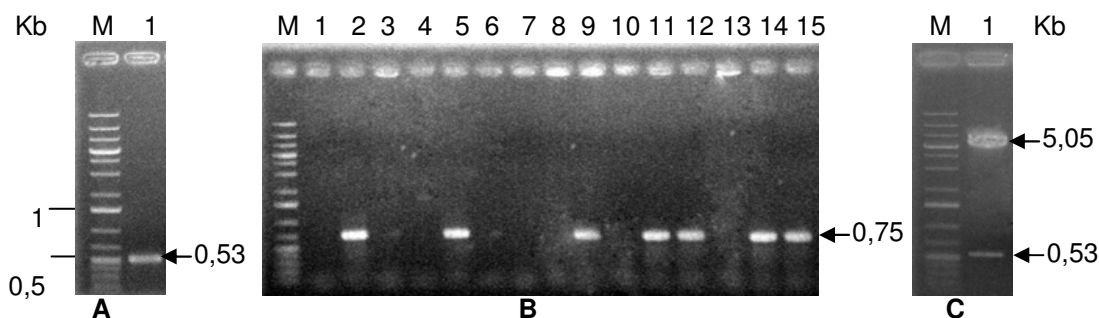
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Thiết kế vector tách dòng pRTRA 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP

Kết quả PCR khuếch đại gene mã hóa protein GP5 PRRSV sử dụng môi GP5-BamHI- F/ GP5-BamHI-R đã thu được phân đoạn DNA có kích thước khoảng 0,5 kb đúng như tính toán lý thuyết (Hình 1A). Đoạn gen này đã được gắn vào vector tách dòng pRTRA và dòng hóa vào trong tế bào *E.coli* DH5α. Sau quá trình chọn dòng bằng colony-PCR (Hình 1B) kiểm tra chiều với môi GP5-BamHI-R/35S-SQF và cắt kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn *BamHI* (Hình 1C), chúng tôi đã thu được dòng

khuẩn lạc mang plasmid mong muốn. Ba dòng khuẩn mang plasmid tái tổ hợp được giải trình tự với môi trường 35S-SQF/35Sterm và kết quả giải trình tự đã cho thấy sự tách dòng và gắn kết

thành công gen mã hóa protein GP5 PRRSV với promoter 35S, Elastin like-polypeptide (ELP), Cmyc và His-tag.



Hình 1. Kết quả thiết kế vector pRTRA tái tổ hợp
(A)-PCR nhân gen mã hóa protein GP5 PRRSV; (B)-Colony-PCR kiểm tra chiều;
(C)-Xử lý vector pRTRA bằng enzyme cắt giới hạn BamHI

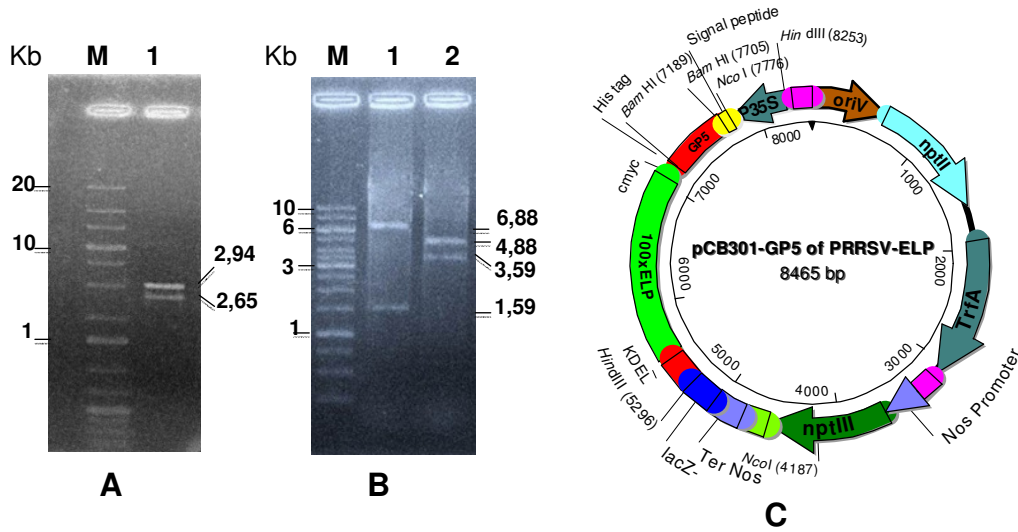
3.2. Thiết kế cấu trúc vector chuyển gen pCB301 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP

Đoạn vector có kích thước khoảng 5,6 kb và cassette 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP có kích thước 2,94 kb được thu nhận từ việc cắt tương ứng từ vector pCB301 và pRTRA 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP bởi enzyme *HindIII* được gắn kết lại với nhau dưới sự xúc tác của enzyme T4 ligase. Plasmid chuyển gen tái tổ hợp pCB301 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP đã được dòng hóa thành công vào tế bào *E.coli* DH5 α . Enzyme *NcoI* đã được sử dụng để kiểm tra chiều của đoạn DNA chuyển vào so với chiều của vector pCB301. Vector tái tổ hợp có chứa đoạn DNA chuyển vào ngược chiều được lựa chọn sau khi cắt kiểm tra với *NcoI* và sau đó đã được biến nạp thành công vào tế bào *A. tumefaciens* C58C1. Các phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn *HindIII* và *NcoI* thu được những phân đoạn như tính toán lý thuyết đã minh chứng cho điều này (Hình 2 A, B, C).

3.3. Đánh giá biểu hiện tạm thời của GP5 ở lá cây thuốc lá bằng Western-blot

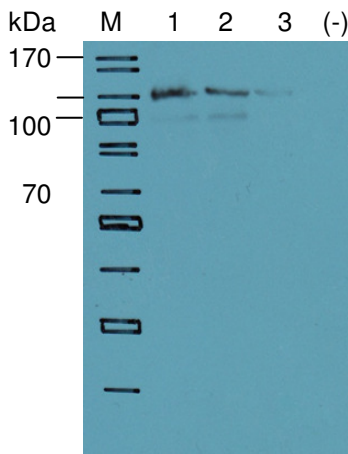
Sự biểu hiện của kháng nguyên GP5 của virus PRRS ở thuốc lá *N. benthamiana* sau khi hút chân không 5 ngày đã được phát hiện bằng kỹ thuật Western-blot. Sự biểu hiện của kháng nguyên GP5 của virus PRRS là khác nhau ở các lá có độ tuổi khác nhau. Lá non, với tốc độ tăng trưởng mạnh, sinh tổng hợp protein mạnh hơn, do đó sự biểu hiện protein đích cũng cao hơn so với lá già (Hình 3).

Tuy nhiên, protein tái tổ hợp thu được cao hơn so với kích thước tính toán lý thuyết của protein kháng nguyên GP5 gắn kết với ELP (65,91 kDa). Điều này liên quan đến quá trình cải biến sau dịch mã, protein GP5 bị glycosyl hóa sau từ 2 đến 4 vị trí đó là N30, N33, N44 hoặc N51 [5]. Thực nghiệm cho thấy rằng sự glycosyl hóa đã làm xuất hiện 2 băng vạch protein cao hơn so với tính toán lý thuyết là 70 kDa và 100 kDa (hình 3), trong khi không có sự tồn tại của các băng vạch này ở cây thuốc lá không chuyển gen. Để có minh chứng rõ ràng về sự biểu hiện của kháng nguyên GP5, chúng tôi tiến hành tinh sạch kháng nguyên GP5 PRRSV bằng phương pháp IMAC.



Hình 2. Thiết kế cấu trúc vector chuyển gen

(A). Cắt Plasmid pRTRA 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP bởi enzyme giới hạn *Hind*III; (B). Cắt plasmid pCB301 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP bởi sản phẩm bởi enzyme *Nco*I: B-1. Sản phẩm cắt xuôi chiều B-2. Sản phẩm cắt ngược chiều, (C). Bản đồ cấu trúc vector chuyển gen pCB301 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP ngược chiều



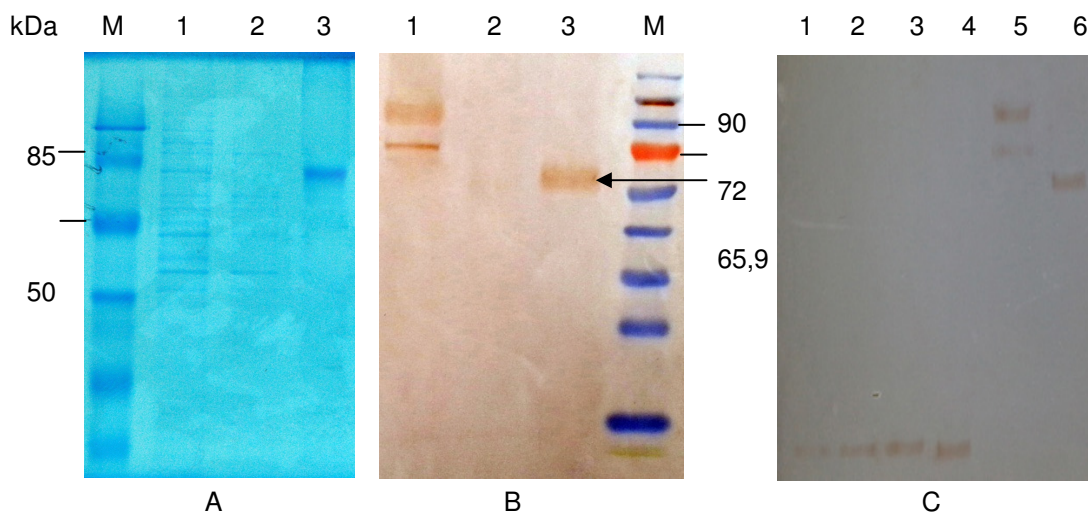
Hình 3. Kết quả Western-blot với dịch chiết thô được phát hiện bằng kháng thể anti-cmyc Lá non; 2. Lá bánh tẻ; 3. Lá già; (-) lá cây thuốc lá không chuyển gen (30 µg/giếng)

3.4. Tinh sạch và định lượng kháng nguyên tái tổ hợp GP5

Để loại bỏ sự ảnh hưởng của các protein không đặc hiệu đến sự biểu hiện của kháng nguyên đích GP5, phương pháp tinh sạch protein bằng sắc ký ion cố định kim loại (niken) đã được sử dụng. Đây là phương pháp hiệu quả

để tinh sạch protein tái tổ hợp liên kết với histag. 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 tương tác của protein liên kết histag với kim loại phụ thuộc vào pH. Protein đích liên kết với cột có thể được hòa tan để tách khỏi cột bằng cách giảm pH hoặc tăng nồng độ của đệm ion hoặc nồng độ của đệm bao gồm EDTA hoặc imidazole.

Sự biểu hiện kháng nguyên GP5 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 GP5 gắn kết với ELP là 65.91 kDa (hình 4 A, B). Như vậy, sau khi tinh sạch bằng phương pháp IMAC, các phân tử glucose đã bị loại bỏ ra khỏi protein đích. Mặc dầu, quá trình glycosyl hóa rất quan trọng cho sự hình thành cấu trúc và duy trì hoạt tính của protein. Tuy nhiên, những chủng PRRSV mang đột biến loại vùng glycosyl hóa ở GP5 đã được chứng minh có khả năng kích thích kháng thể trung hòa cao hơn chủng đại [6].



Hình 4. Đánh giá kết quả tinh sạch và định lượng protein GP5.

(A) Điện di SDS-PAGE: 1A- Dịch chiết thô chứa protein GP5-ELP; 2A- Dịch ra khỏi cột sau khi đưa dịch thô qua cột tinh sạch; 3A: Protein GP5-ELP sau khi tinh sạch; (B) Kết quả Western-blot: 1B- Dịch chiết thô chứa protein GP5-ELP; 2B- Dịch ra khỏi cột sau khi đưa dịch thô qua cột tinh sạch; 3B: Protein GP5-ELP sau khi tinh sạch; (C) Định lượng protein GP5 bằng Western-blot và sử dụng phần mềm ImageJ: 1C, 2C, 3C, 4C: đối chứng dương 50, 100, 150, 200 ng/giếng; 5C: Dịch chiết thô chứa protein GP5-ELP trước xử lý; 6C: GP5-ELP tinh sạch (30 μ g protein tổng số/ giếng).

Từ 1 kg mẫu lá tươi sau khi tinh sạch protein theo phương pháp IMAC và cô lại bằng Concentrator iCON TM, nồng độ protein tổng số được định lượng theo phương pháp Bradford và protein GP5 được định lượng bằng phần mềm ImageJ trên màng lai. Kết quả thu được 250 mg protein GP5 tinh sạch/ 8 gam protein hoàn tan tổng số, với tỷ lệ phần trăm protein GP5/ protein hòa tan tổng số là 3.125 %, tương đương với nồng độ kháng nguyên GP5 là 250 mg/ kg lá tươi. Kết quả thu được cho thấy rằng sự biểu hiện của kháng nguyên GP5 trong cây thuốc lá *N. benthamiana* trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời là tương đối cao, so sánh với sự biểu hiện của kháng nguyên GP5 trong cây thuốc lá chuyển gen của Min và cộng sự (2011) [14] được định lượng bằng phương pháp Elisa với hàm lượng của kháng nguyên GP5 là 155 mg/kg lá tươi.

Kết quả này đã góp phần chứng minh sự thành công trong phương pháp biểu hiện tạm thời và phương pháp tinh sạch kháng nguyên GP5 của virus PRRS từ cây thuốc lá *N. benthamiana* trong một thời gian ngắn. Ngoài phương pháp tinh sạch protein liên kết với his-tag nhờ xu hướng tự nhiên của histidine tạo thành một phức hợp với niken ở pH trung tính thì phương pháp tinh sạch protein qua vào màng mITC dựa vào sự gắn kết Elastin-like polypeptides (ELP) với protein cần biểu hiện được xem như là một phương pháp để nâng cao hiệu quả của quá trình tinh sạch. Scheller và cộng sự (2006) [15] đã tạo protein dung hợp của scFv và trình tự 100xELP trong hạt. Kết quả cho thấy sự tích lũy của protein dịch hợp tăng đáng kể tới hơn 40 lần so với mức bình thường, gần 25% protein tổng số. Floss và cộng sự (2007) [12] đã sử dụng phương pháp tương tự và đề xuất rằng việc sử dụng chiến lược dung

hợp ELP có thể tăng cường sự biểu hiện của kháng thể trung hòa HIV biểu hiện trong hạt. Phan Trọng Hoàng (2013) [16] cũng đã chứng minh rằng sự biểu hiện của HA trong lá và hạt thuốc lá *N. benthamiana* được tăng cường khi dung hợp HA với ELP. Những nghiên cứu này sẽ là tiền đề để chúng tôi tiến hành tinh sạch protein dung hợp với 100xELP dựa vào phương pháp mITC.

4. Kết luận

Đã biểu hiện và tinh sạch thành công kháng nguyên GP5 của virus PRRS từ cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại với hàm lượng cao 250 mg/kg lá tươi. Kết quả này đã góp phần chứng minh sự thành công của thí nghiệm biểu hiện tạm thời của kháng nguyên GP5 PRRSV trong cây thuốc lá *N. benthamiana* và đồng thời cũng tạo tiền đề cho các thí nghiệm biểu hiện tạm thời các protein tái tổ hợp khác trên mô hình cây thuốc lá.

Lời cảm ơn

Công trình này được hoàn thành với kinh phí từ đề tài 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 agro-infiltration’. Đề tài 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] Goyal S.M., Porcine reproductive and respiratory syndrome, J. Vet.Diagn. Invest. 5 (1993) 656–664.
- [2] Đậu Ngọc Hào, Văn Đăng Kỳ, Nguyễn Văn Long, Tiêu Quang An, Một số đặc điểm dịch tễ hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn từ cuối tháng 3 đến đầu tháng 7/2008 tại một số tỉnh trong cả nước. Khoa học kỹ thuật thú y, tập XV, 5 (2008) 14-20.
- [3] Meulenberg J.J., Hulst M.M., de Meijer E.J., Moonen P.L., den Besten, A., de Kluyver, E.P., Wensvoort, G., Moormann, R.J. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV, Virology 192 (1993) 62–72
- [4] Dea S., Gagnon C.A., 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 -688.
- [5] Zhou YJ, Yu H, Tian ZJ, Li GX, Hao XF, Yan LP, Peng JM, An TQ, Xu AT, Wang YX, Wei TC, Zhang SR, Cai XH, Feng L, Li X, Zhang GH, Zhou LJ, Tong GZ , Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008, Virus Res. 144 (2009) 136–144.
- [6] Ansari I.H., Kwon B., Osorio F.A., Pattnaik A.K, Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies, J. Virol. 80 (2006) 3994–4004.
- [7] Xiaodong Zhang G. L., Lei Gao, Lianzhi Mu, Lichun Zhang, Yanlong Cong, Zhuang Ding, Positive inductive effect of IL-18 on virus-specific immune responses induced by PRRSV-GP5 DNA vaccine in swine, Res Vet Sci (94) (2013) 346–353.
- [8] Schillberg S., Fischer R., and Emans N, Molecular farming of recombinant antibodies in plants. Cell.Mol. Life.Sci 60 (2003) 433-445.
- [9] Wagner B., Fuchs H., Adhami F., Ma Y., Scheiner O., and Breiteneder H. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*, Methods 32 (2004) 227-234.
- [10] Verwoerd T.C., Van Paridon P.A., Van Ooyen A.J., Van Lent J.W., Hoekema A., and Pen J., Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves, Plant Physiology 109 (1995) 1199-1205.
- [11] Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K Medical molecular farming: production of antibodies,

- biopharmaceuticals and edible vaccines in plants, Trends Plant Sci 6 (2001) 219-226.
- [12] Floss D.M., Falkenburg D., and Conrad U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview, Transgenic Res 16 (2007) 315-332.
- [13] 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, Eur. J. Biochem 262 (1999) 810-816.
- [14] Min-Yuan Chia, S.-H. H., Hui-Ting Chan, et al., Evaluation of the immunogenicity of a transgenic tobacco plant expressing the recombinant fusion protein of GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin in pigs, Vet Immunol Immunop 140 (2011) 215–225.
- [15] Scheller J., Leps M., and Conrad U., Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides Plant Biotechnol J 4 (2006) 243-249.
- [16] Phan HT, Pohl J, Floss DM, et al., ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice. [Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Plant Biotechnol J 11 (5) (2013) 582-93.
- [17] 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.
- [18] Mersereau M., Pazour G.J., and Das A, Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation, Gene 90 (1990) 149-151.

Study on the Transient Expression of Glycoprotein GP5 of PRRSV in *Nicotiana benthamiana* Using agro-Infiltration

Hồ Thị Thương¹, Nguyễn Thu Giang¹, Chu Thị Kim Hoàng², Phạm Thị Vân¹,
Phạm Bích Ngọc¹, Đinh Duy Kháng¹, Chu Hoàng Hà¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*2nd Hanoi Pedagogical University*

Abstract: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is one of the most dangerous swine disease worldwide. Glycoprotein 5 (GP5) is the leading target for the development of vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. In this study, GP5 coding gene was cloned into pRTRA vector for generating cassette 35S-GP5-Histag-Cmyc-100xELP, then inserted into binary vector pCB301. This construct was transformed into *Nicotiana benthamiana* by using agro-infiltration for transient expression assay. Then this construct was used to confirm expression of GP5 in *N. benthamiana* on 5th day following agro-infiltration. However, it has been also demonstrated that there was a bigger size of GP5 with molecular weight of 100 kDa and 70 kDa because of post translation modification. GP5 was purified from 1 kg fresh tobacco leaf using immobilized metal ion chromatography method and evaluated by Image J software with 3.125 % of total soluble protein.

Keywords: *Nicotiana benthamiana*, PRRSV, GP5, agro-infiltration, transient expression.

