

TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA POLYMERASE CỦA VIRUS VIÊM GAN B TRÊN BỀ MẶT TẾ BÀO *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Nguyễn Thị Phương Trang¹, Kim Young-Ho², Đinh Duy Kháng³, Đồng Văn Quyền³

¹*Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Việt Nam*

²*Trường Đại học Suwon, Hàn Quốc*

³*Viện Công nghệ sinh học, Việt Nam*

TÓM TẮT

Mặc dù là virus DNA nhưng sự sao chép của virus viêm gan B (HBV) vẫn phải cần đến hoạt tính phiên mã ngược của polymerase. Polymerase được mã hóa bởi gen *pol*. Đã có nhiều nỗ lực nhằm biểu hiện gen *pol*, nhưng đến nay các đặc tính sinh hóa của protein mã hóa bởi gen này vẫn chưa được làm sáng tỏ do không thể thu nhận đủ lượng protein hòa tan có hoạt tính sinh học để phục vụ cho mục đích nghiên cứu. Trong công trình này chúng tôi nghiên cứu biểu hiện polymerase của HBV trên bề mặt nấm men *Saccharomyces cerevisiae*. Toàn bộ gen *pol* có chiều dài 2496 bp được khuếch đại bằng PCR, tách dòng vào vector pGEM-Teasy và được giải trình tự. Gen *pol* sau đó được đưa vào vector biểu hiện pYDI và biến nạp vào *S. cerevisiae* bằng xung điện. Để biểu hiện gen *pol*, các tế bào nấm men mang plasmid tái tổ hợp chứa gen này được nuôi cấy ở 30°C trên môi trường YNB-CAA có bổ sung 2% glucose và được cảm ứng bằng 2% galactose ở 20°C, tiếp tục lắc trong thời gian 12 - 72 h. Kết quả phân tích bằng SDS-PAGE cho thấy polymerase tái tổ hợp có kích thước khoảng 107 kDa, được tiết ra trên bề mặt của tế bào nấm men và liên kết với tế bào bằng 2 cầu nối disulfide ở vị trí aga2p và aga1p. Mức độ biểu hiện của polymerase (Pol) tăng dần theo thời gian nuôi cấy và mạnh nhất ở thời điểm 60 h sau cảm ứng. Kết quả này được khẳng định lại bằng Western blot sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng V5-epitope. Thành công của nghiên cứu này là một bước quan trọng trong việc nghiên cứu cấu trúc và chức năng của HBV Pol, tiền đề phát triển loại thuốc điều trị HBV mới dựa trên việc bất hoạt polymerase của virus.

Từ khóa: Biểu hiện gen, polymerase, *S. cerevisiae*, virus viêm gan B

MỞ ĐẦU

Viêm gan do virus viêm gan B (Hepatitis B virus - HBV) là một trong những bệnh truyền nhiễm phổ biến nhất trên thế giới. Người bị nhiễm HBV có nguy cơ cao chuyển thành mạn tính và có thể phát triển thành xơ gan và ung thư gan (Almeida *et al.*, 1971; Beasley, 1988; Cha, Dematteo, 2005). Các số liệu nghiên cứu gần đây cho thấy, ước tính có khoảng hai tỷ người đã nhiễm HBV, trong đó khoảng 350 đến 400 triệu người đang mang HBV mạn tính trên thế giới (Edlich *et al.*, 2000; Ganem, Prince, 2004). Tỷ lệ người mang HBV mạn tính thay đổi theo khu vực địa lý, tập trung chủ yếu ở châu Phi, châu Á và Đông Nam Á trong đó khu vực Châu Á và Tây Thái Bình Dương chiếm 75% (Lok, 2004). Khoảng 15 - 40% trường hợp viêm gan B mạn tính phát triển thành xơ gan, suy gan hoặc ung thư gan. Việt Nam là nước có tỷ lệ người nhiễm HBV cao nhất thế giới, tỷ lệ HBsAg (+) ở người lớn khỏe mạnh từ 10 - 20%, có nơi lên tới 26%. Ước tính Việt Nam hiện có hơn 10 triệu người đang mang HBV

mạn tính và nguy cơ phát sinh ung thư gan ở những người này là rất lớn.

Các nghiên cứu di truyền phân tử cho thấy bộ máy di truyền của HBV gồm 4 khung đọc mở chồng nhau mã hóa cho PreS/S, PreC/C, Pol, và X protein (HBX). Trong đó, polymerase (Pol) là một protein đa chức năng có hoạt tính enzyme với kích thước khoảng 94 kDa, đóng vai trò quan trọng trong vòng đời của virus này. Pol hoạt động như một primer trong quá trình tổng hợp sợi DNA dương của virus viêm gan B từ sợi DNA âm hoặc từ sợi RNA; tiêu giảm sợi RNA trong phức hợp RNA-DNA và đóng gói pre-RNA nhân bảo vào hạt nucleocapside (Mason *et al.*, 1993). Vai trò sinh học và các đặc tính hóa sinh của Pol trong các đối tượng như vi khuẩn, động vật, thực vật và đặc biệt là ở retrovirus được nghiên cứu khá chi tiết (Levin, 1997). Tuy nhiên, sự hiểu biết về Pol ở HBV vẫn chưa được làm sáng tỏ do sự khó khăn trong việc biểu hiện và thu nhận protein này. Việc nghiên cứu ở mức độ phân tử về Pol sẽ giúp tìm ra các thuốc điều trị HBV mới; nếu

ức chế được hoạt động của protein này cũng đồng nghĩa với việc ức chế được sự nhân lên của virus trong tế bào vật chủ. Ở Việt Nam, bệnh viêm gan B do virus viêm gan B cũng được nhiều phòng thí nghiệm quan tâm nghiên cứu.

Nhằm mục đích phát triển các bộ kit chẩn đoán sớm lây nhiễm HBV và tiến tới sản xuất được vaccine viêm gan B tái tổ hợp, trước đây chúng tôi đã tách dòng và biểu hiện một số kháng nguyên quan trọng của HBV như kháng nguyên HBsAg, preS, HBcAg (Đồng Văn Quyền *et al.*, 1999; 2003; 2005; Đặng Trường Minh *et al.*, 2003). Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu tách dòng và biểu hiện gen mã hóa protein Pol trên bề mặt tế bào *S. cerevisiae* với mục đích thu nhận đủ lượng protein tái tổ hợp ở dạng hòa tan và có hoạt tính. Protein này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu sinh hóa cũng như cấu trúc để tìm ra vai trò và cấu trúc của chúng trong vòng đời của HBV, đây là những cơ sở quan trọng để phát triển các thuốc điều trị bệnh viêm gan do virus viêm gan B mới.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Plasmid p4691 chứa hệ gen của virus viêm gan B do trường Đại học Suwon, Korea cung cấp được sử dụng làm khuôn để tách dòng gen mã hóa protein Pol. Các enzyme hạn chế do New England Biolab cung cấp; Taq DNA polymerase nhận của Perkin Elmer; các hóa chất thông dụng mua của Merck. Vector pGEM-Teasy (Promega) và pYD1 cùng với chủng *Saccharomyces cerevisiae* (Invitrogen) được sử dụng để tách dòng và biểu hiện gen.

Phương pháp

Tách dòng gen mã hóa polymerase

Đoạn gen mã hóa cho protein Pol dài 2496 bp được khuếch đại từ plasmid p4691 bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu có gắn vị trí nhận biết của enzyme *KpnI* ở mỗi xuôi (F-pol) và vị trí cắt của enzyme *NotI* ở mỗi ngược (R-pol). Trình tự cặp mồi được thể hiện ở dưới đây, vị trí nhận biết của enzyme được gạch chân và in đậm.

F-pol: 5'- **AGGTACCAATGCCCCTATCCTATC** AACAC -3';

R-pol: 5'- **TGCGGCCGCATTAACGGTGGTCTC** CATGCGAC -3'.

Phản ứng PCR được chạy trong tổng thể tích 50 ml gồm 32 ml H₂O, 5 ml đệm, 5 ml dNTP, 3 ml mỗi F (30 pM), 3 ml mỗi R (30 pM), 1 ml vector p4691, 1 ml enzyme *Pfu*-Topo. Chương trình chạy PCR được tiến hành theo chu kỳ nhiệt: 3 phút ở 95°C, 30 chu kỳ (50 giây 95°C, 1 phút 55°C, 3 phút 72°C) và sau đó là 1 chu kỳ ở 72°C trong 8 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR purification kit (QIAGEN) và gắn vào vector tách dòng pGEM-Teasy (Promega) sau đó biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH-5α. Các plasmid pGEM-Teasy tái tổ hợp mang sản phẩm PCR được sàng lọc bằng cắt kiểm tra với 2 enzyme hạn chế *NotI* và *KpnI* và xác định trình tự.

Xác định trình tự gen pol

Trình tự gen mã hóa cho polymerase và vị trí gắn của nó với vector pGEM-Teasy được xác định theo phương pháp tổng hợp của Sanger và đồng tác giả (1977) với bộ kit xác định trình tự BigDye terminator v3.1 và máy đọc trình tự ABI 3100 Avant Genetic analyzer (Applied Biosystems).

Thiết kế vector biểu hiện gen pol trong *S. cerevisiae*

Gen mã hóa cho Pol sau khi được khuếch đại và xác định đúng trình tự được cắt khỏi vector tách dòng pGEM-Teasy bằng 2 enzyme hạn chế *NotI* và *KpnI* và đưa vào vector biểu hiện pYD1 sau khi đã được mở vòng bằng cùng 2 enzyme này. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α, các vector biểu hiện mang gen *pol* được chọn lọc và kiểm tra khung đọc mở bằng cắt kiểm tra với 2 enzyme trên.

Biểu hiện gen mã hóa Pol

Vector biểu hiện mang gen *pol* được biến nạp vào *S. cerevisiae* bằng xung điện (Lan *et al.*, 2001; Mewes *et al.*, 2002). Quá trình chọn lọc các tế bào nấm men có mang vector tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường thạch dextro không chứa tryptophan (0,67% YNB, 0,01% leucine, 2% glucose, 1,5% agar). Đây là môi trường khuyết dưỡng, chỉ có tế bào mang plasmid tái tổ hợp mới mọc được trên môi trường này. Các tế bào nấm men mang vector tái tổ hợp được nuôi lắc ở 30°C trên môi trường YNB-CAA (0,67% YNB, 0,5% casamino acid) có bổ sung 2% glucose cho đến khi OD₆₀₀ = 2. Ly tâm tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 5 phút ở nhiệt độ 4°C, thu tế bào. Hòa tế bào lại trong môi trường YNB-CAA chứa glucose 2% ở OD₆₀₀ = 0,5, cảm ứng bằng galactose 2% được thực hiện ở 20°C trong thời gian từ 12 - 72 h. Sau cảm ứng, protein tái tổ hợp

được thu nhận bằng cách xử lý các tế bào nấm men với DTT ở nồng độ 10 mM trong 2 h để cắt đứt các cầu nối disulfide giải phóng protein tái tổ hợp ra khỏi bề mặt tế bào nấm men. Kết quả biểu hiện được kiểm tra bằng điện di trên gel 12% polyacrylamide (Laemmli, 1970) và khẳng định bằng phương pháp Western blot (Towbin *et al.*, 1979) với kháng thể đặc hiệu kháng V5-epitope.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng và xác định trình tự gen mã hóa polymerase

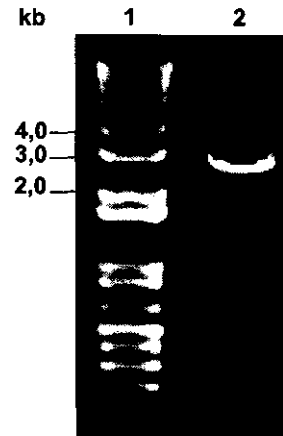
Gen mã hóa protein polymerase của virus viêm gan B có chiều dài lý thuyết 2496 bp được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu (pol-F và pol-R) từ plasmid p4691 có chứa bộ gen hoàn chỉnh của virus viêm gan B bằng PCR. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel 1% agarose.

Gen *pol* đã được khuếch đại đặc hiệu, một băng DNA có kích thước khoảng 2,5 kb đúng với kích thước theo lý thuyết của gen *pol*. Sản phẩm PCR được gắn vào vector tách dòng pGEM-Teasy và biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng DH5 α . Các plasmid tái tổ hợp được chọn lọc và cắt kiểm tra bằng 2 enzyme hạn chế *NotI* và *KpnI*. Kết quả điện di kiểm tra trên gel 1% agarose cho thấy plasmid được cắt kiểm tra có các băng với kích thước đúng như dự tính. Plasmid này được tinh sạch và xác định trình tự DNA đọc từ cả 2 đầu bằng cặp mồi T7-promoter và T7-terminator. Sau khi giải trình tự, phân tích bằng Chromas và so sánh với trình tự gen *Pol* đã công bố trên GenBank (mã số DQ464168) và nhận được độ tương đồng 98%, chúng tôi khẳng định việc tách dòng gen *pol* vào vector pGEM-Teasy đã thành công, kết quả phân tích trình tự DNA cũng cho thấy vị trí gắn của gen *pol* vào vector pGEM-Teasy nằm đúng trong vùng cắt nối đa vị với 2 đầu là vị trí cắt của enzyme hạn chế *NotI* và *KpnI*. Trình tự gen *pol* được dịch mã ra trình tự amino acid bằng chương trình expasy (www.expasy.ch), kết quả cho thấy gen được dịch mã thông suốt không có mã kết thúc trong phân tử protein được dịch mã (kết quả trình tự gen và trình tự protein không nêu ở đây).

Thiết kế vector pYD1 tái tổ hợp mang gen mã hóa protein Pol

Gen mã hóa polymerase trong vector tách dòng pGEM-Teasy và vector biểu hiện pYD1 được xử lý đồng thời bằng 2 enzyme *NotI* và *KpnI*, sau đó được

nối lại với nhau. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và chọn lọc trên môi trường thạch có chứa ampicillin nồng độ 100 μ g/ml. Plasmid tái tổ hợp mang gen *pol* (pYD1-pol) sau đó được phân tích với 2 enzyme hạn chế *NotI* và *KpnI* và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose. Kết quả điện di ở hình 1 cho thấy, đoạn gen tách ra từ plasmid pYD1-pol sau khi xử lý với 2 enzyme trên có kích thước đúng bằng chiều dài của gen *pol* (~2,5 kb) như dự kiến. Như vậy gen *pol* đã được gắn thành công vào vector biểu hiện pYD1. Việc kiểm tra bằng 2 enzyme này cũng khẳng định là gen *pol* đã được gắn vào vector biểu hiện.



Hình 1. DNA marker (1); Điện di đồ vector pYD1-pol cắt bằng *NotI* và *KpnI* (2).

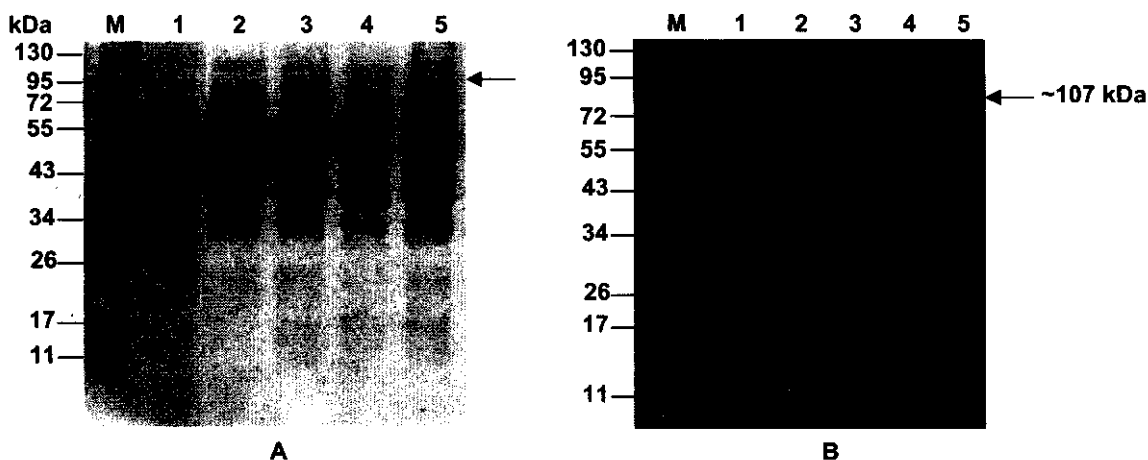
Biểu hiện protein trong *S. cerevisiae*

Vector tái tổ hợp pYD1-pol mang gen *pol* lắp ráp đúng chiều được biến nạp vào *S. cerevisiae* bằng phương pháp xung điện. Quá trình biểu hiện được tiến hành như đã mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu. Sau cảm ứng dịch nuôi cấy được thu sau mỗi 12 h, tế bào sau đó được xử lý với 10 mM DTT trong thời gian 2 h để giải phóng protein tái tổ hợp ra khỏi bề mặt tế bào và kiểm tra mức độ biểu hiện của protein pol bằng điện di trên gel 12% polyacrylamide.

Kết quả điện di (Hình 2A) cho thấy, sau cảm ứng xuất hiện một băng protein mới có kích thước khoảng 107 kDa tương ứng với kích thước theo tính toán lý thuyết của protein dung hợp (107,58 kDa), băng protein này đậm dần theo thời gian cảm ứng và đậm nhất ở thời điểm 60 h sau cảm ứng (Hình 2A, giếng số 4). Để khẳng định băng protein này chính là protein Pol tái tổ hợp ở dạng liên kết,

protein này sau đó được phân tích bằng kỹ thuật Western blot sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng V5-epitope. Như đã mô tả ở trên, Pol tái tổ hợp sẽ gắn thêm V5-epitope ở đầu C, vì vậy nếu gen *pol* được biểu hiện thì protein dung hợp cũng sẽ phản ứng với kháng thể kháng V5-epitope (Hình 2B). Đây là mục đích của nhà thiết kế và sản xuất vector nhằm giúp người nghiên cứu có thể dễ dàng nhận biết sự biểu hiện của gen đích. Kết quả kiểm tra bằng Western blot cho thấy protein tái tổ hợp phản ứng

đặc hiệu với kháng thể kháng V5-epitope, thể hiện bởi một băng có kích thước lý thuyết khoảng 107 kDa trên màng (Hình 2B). Kết quả Western blot cũng cho thấy protein Pol biểu hiện mạnh nhất ở 60 h sau cảm ứng (Hình 2B, giếng số 4), phù hợp với lượng protein nhiều nhất ở thời điểm này khi kiểm tra bằng điện di trên gel SDS-PAGE (Hình 2A, giếng số 4). Như vậy, có thể khẳng định là gen mã hoá protein Pol của virus HBV đã được biểu hiện thành công trên tế bào nấm men *S. cerevisiae*.



Hình 2. Kiểm tra sự biểu hiện của Pol tái tổ hợp bằng điện di trên gel polyacrylamide 12,5% (A) và Western blot (B). M: protein marker; 2A1: Pol tái tổ hợp 12 h sau cảm ứng; 2A2 - 4A5: Pol tái tổ hợp ở 24, 48, 60 và 72 h sau cảm ứng. 2B1 - 2B5: kiểm tra biểu hiện của Pol bằng kháng thể kháng V5-epitope ở 12, 24, 48, 60 và 72 h sau cảm ứng. Mũi tên chỉ vị trí băng protein tái tổ hợp.

KẾT LUẬN

Protein Pol của HBV thu hút được nhiều sự quan tâm chú ý của các nhà khoa học do vai trò quan trọng của chúng trong vòng đời của virus viêm gan B. Hoạt tính phiên mã ngược của Pol đã được nghiên cứu và hiểu biết chi tiết ở nhiều đối tượng như vi khuẩn, động vật, thực vật và đặc biệt là ở retrovirus (Levin, 1997), tuy nhiên đặc tính sinh hóa của protein này ở HBV vẫn chưa được sáng tỏ do sự khó khăn trong việc biểu hiện và thu nhận đủ lượng protein Pol có hoạt tính phục vụ cho các mục đích nghiên cứu. Một số nghiên cứu trước cũng sử dụng nhiều hệ vector và vật chủ khác nhau như vi khuẩn, côn trùng, nấm men... để biểu hiện Pol, tuy nhiên mức độ biểu hiện rất thấp (Qudri, Siddiqui, 1999; Choi *et al.*, 2002; Lanford *et al.*, 1995). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng vector pYD1 và biểu hiện thành công gen mã hóa Pol của HBV trong nấm men chủng *S. cerevisiae*. Kết quả nghiên cứu

cho thấy protein tái tổ hợp biểu hiện ở dạng hòa tan, được tiết ra trên bề mặt của tế bào nấm men *S. cerevisiae*. Pol tái tổ hợp biểu hiện tốt nhất ở thời gian 60 h sau cảm ứng. Kết quả biểu hiện được khẳng định bằng Western blot sử dụng kháng thể kháng V5-epitope.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ về kinh phí của quỹ nghiên cứu khoa học - Chính phủ Hàn Quốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Almeida JD, Ruben Stein D, Stott EJ (1971) New antigen- antibody system is Australia antigen positive hepatitis. *Lancet* 2: 1224- 1227.

Đặng Trường Minh, Lê Thị Tâm, Bạch Như Quỳnh, Đồng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng (2003) Tạo dòng và thiết kế vector biểu hiện gen kháng nguyên lõi của

virus viêm gan B (HBcAg) phân lập từ khối u của bệnh nhân ung thư gan. *Tap chí Di truyền học và Ứng dụng* 1: 1-6.

Đồng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng, Yu Yeon Gyu (2003) Tách dòng và xác định trình tự vùng pres gen kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B. *Tap chí Sinh học* 25(4): 32-36.

Đồng Văn Quyền, Bạch Như Quỳnh, Đài Duy Ban, Đinh Duy Kháng (1999) Nghiên cứu biểu hiện gen kháng nguyên bề mặt của virus viêm gan B (HBsAg) ở trực khuẩn *Escherichia coli*. *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*: 239-244.

Đồng Văn Quyền, Yu Yeon Gyu, Đinh Duy Kháng (2005) Biểu hiện và tinh sạch vùng preS của vi rút viêm gan B phân lập từ sinh thiết khối u của bệnh nhân ung thư gan. *Tap chí Khoa học và Công nghệ* 43(2): 31-37.

Shlomai A, Shaul Y (2003) Inhibition of Hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *J Hepatol* 37(4): 764-770.

Bartenschlager R, Junker-Neipmann M, Schaller H, (1990) The P gene product of hepatitis B virus is required as a structural component for genomic RNA encapsidation. *J Virol* 64: 5324-5332.

Beasley RP (1988) Hepatitis B virus: the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61: 1942-1956.

Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R, Tanner W, (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: Cell wall attachment and active sites of α - and α -Agglutinin. *EMBO J* 13: 4737-4744.

Cappellaro C, Hauser K, Mrsa V, Watzele M, Watzele G, Gruber C, Tanner W (1991) *Saccharomyces cerevisiae* α - and α -Agglutinin: Characterization of their molecular interaction. *EMBO J* 10: 4081-4088.

Cha C, Dematteo RP (2005) Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19: 25-37.

Choi J, Kim EE, Park YI, Han YS (2002) Expression of the active human and duck hepatitis B virus polymerases in heterologous system of *Pichia methanolica*. *Antivir Res* 55(2): 279-290.

Seeger C, Mason W S (2000) Hepatitis B virus biology *Microbio Mol Biol Rev* 64(1): 51-68.

Chiesa R, Donato F, Tagger A, Favret M, Ribero M L, Nardi G, Gelatti U, Bucella E, Tomasi E, Portolani N, Bonetti M, Bettini L, Pelizzari G, Salmi A, Savio A, Garatti M, Callea F (2000) Etiology of Hepatocellular Carcinoma in Italian Patients with and without

Cirrhosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 213-216.

Mizukoshi E, Sidney J, Livingston B, Ghany M, Hoofnagle J H, Sette A, Rehmann B (2004) Cellular Immune Responses to the Hepatitis B Virus Polymerase. *J Immun* 173: 5863-5871.

Ganem D, Prince AM (2004). Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350: 1118-1129.

Ganem D, Varnus HE (1987) The molecular biology of the hepatitis B virus. *Ann Rev Biochem* 56: 651-693.

Cho G, Na S, Suh SW, Jung G (2000) Expression of recombinant HBV pol proteins in HepG2 cells. *J Biochem Mol Biol* 33(6): 440-447.

Qadri I, Siddiqui A (1999) Expression of hepatitis B virus Polymerase in Ty1-his3A1 retroelement of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 274(44): 31359-31365.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lanford RE, Notvall L, Beames B (1995) Nucleotide priming and reverse transcriptase activity of hepatitis B virus polymerase expressed in insect cells. *J Virol* 69(7): 4431-4439.

Levin HL (1997) It's prime time for reverse transcriptase. *Cell* 88: 5-8.

Lok AS (2004) Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: 303-309.

Mason WS (1993) The problem of antiviral therapy for chronic hepadnavirus infection. *J Hepatol* 17(3): 137-142.

Roy A, Lu CF, Marykwas DL, Lipke PN, Kurjan J (1991) The Ag1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein α - agglutinin. *Mol Cell Biol* 11: 4196-4206.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning I, II, III*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.

Lu X, Block T (2004) Study of the early steps of the hepatitis B virus life cycle. *Int J Med Sci* 1(1): 21-33.

CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING HEPATITIS B VIRUS POLYMERASE ON THE SURFACE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Nguyen Thi Phuong Trang¹, Kim Young-Ho², Dinh Duy Khang³, Dong Van Quyen³ *

¹*Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam*

²*University of Suwon, Korea*

³*Institute of Biotechnology, Vietnam*

SUMMARY

Although hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus but their replication is dependent upon reverse transcriptase encoded by the HBV polymerase gene (*pol* gene). Molecular genetic studies have suggested that the HBV polymerase (Pol), a multifunctional enzyme of about 94 KDa, plays critical roles during the viral life cycle. These functions include priming activity, polymerase activity and nuclease activity. Despite much effort have been made toward expressing the *pol* gene, the biochemical dissection of the corresponding protein has lagged behind because of the inability to obtain sufficient amounts of soluble enzyme required for such an analysis. Here we reported our study on the expression of Pol on the surface of *S. cerevisiae*. The *pol* gene with 2496 bp in length was amplified by PCR, cloned into pGEM-Teasy vector and sequenced. The *pol* gene was then cut out from pGEM-Teasy and inserted into pYD1 vector at *NotI* and *KpnI* sites to generate pYD1-pol expression vector. The recombinant pYD1-pol was transformed into yeast *S. cerevisiae* by electroporation. To express Pol, the yeast cells carrying pYD1-pol were grown in liquid medium YNB-CNN supplemented with 2% of glucose and were induced by adding 2% of galactose at 20°C with shaking at 220 rpm for 12 - 72 hrs. The expression of Pol was analysed by SDS-PAGE and found to be growth-time dependent with the highest protein accumulation at 60 hrs after induction. This result was confirmed by Western blot using the anti V5-epitope antibodies. The recombinant HBV polymerase greatly facilitate future analyses on pol-protein structure and function and allow the investigation for new anti-HBV drugs specifically blocking HBV polymerase.

Keywords: Gene expression, hepatitis B virus, polymerase, *S. cerevisiae*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7563386; Fax: 84-4-7914815; E-mail: dvquyen@gmail.com

CLONING AND EXPRESSION OF THE GENE ENCODING HEPATITIS B VIRUS POLYMERASE ON THE SURFACE OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Nguyen Thi Phuong Trang¹, Kim Young-Ho², Dinh Duy Khang³, Dong Van Quyen³ *

¹*Institute of Ecology and Biological Resources, Vietnam*

²*University of Suwon, Korea*

³*Institute of Biotechnology, Vietnam*

SUMMARY

Although hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus but their replication is dependent upon reverse transcriptase encoded by the HBV polymerase gene (*pol* gene). Molecular genetic studies have suggested that the HBV polymerase (Pol), a multifunctional enzyme of about 94 KDa, plays critical roles during the viral life cycle. These functions include priming activity, polymerase activity and nuclease activity. Despite much effort have been made toward expressing the *pol* gene, the biochemical dissection of the corresponding protein has lagged behind because of the inability to obtain sufficient amounts of soluble enzyme required for such an analysis. Here we reported our study on the expression of Pol on the surface of *S. cerevisiae*. The *pol* gene with 2496 bp in length was amplified by PCR, cloned into pGEM-Teasy vector and sequenced. The *pol* gene was then cut out from pGEM-Teasy and inserted into pYD1 vector at *NotI* and *KpnI* sites to generate pYD1-pol expression vector. The recombinant pYD1-pol was transformed into yeast *S. cerevisiae* by electroporation. To express Pol, the yeast cells carrying pYD1-pol were grown in liquid medium YNB-CNN supplemented with 2% of glucose and were induced by adding 2% of galactose at 20°C with shaking at 220 rpm for 12 - 72 hrs. The expression of Pol was analysed by SDS-PAGE and found to be growth-time dependent with the highest protein accumulation at 60 hrs after induction. This result was confirmed by Western blot using the anti V5-epitope antibodies. The recombinant HBV polymerase greatly facilitate future analyses on pol-protein structure and function and allow the investigation for new anti-HBV drugs specifically blocking HBV polymerase.

Keywords: *Gene expression, hepatitis B virus, polymerase, S. cerevisiae*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7563386; Fax: 84-4-7914815; E-mail: dvquyen@gmail.com