

THIẾT KẾ VECTOR MANG CẤU TRÚC GEN INTERLEUKIN-7 PHỤC VỤ CHUYỂN GEN TRONG HỆ THỐNG THỰC VẬT

Nguyễn Huy Hoàng^{1*}, Chu Hoàng Hà², Phạm Bích Ngọc², Lê Văn Sơn²

¹Trường Đại học Y Dược - ĐHTH Thái Nguyên

²Viện Công nghệ Sinh học - VAST

TÓM TẮT

Interleukin là một nhóm các cytokine được tìm thấy đầu tiên trong các tế bào bạch cầu. Chức năng của hệ thống miễn dịch phụ thuộc chủ yếu vào interleukins. Trong đó, nhóm interleukin 7 (IL-7) là một cytokine có vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng của các dòng tế bào B và T. Đây là những tế bào có chức năng quan trọng trong hệ miễn dịch của con người, và là mục tiêu tấn công của nhiều loại virus khi xâm nhập vào cơ thể. Nhằm mục đích nâng cao chất lượng điều trị bệnh theo hướng sử dụng liệu pháp sinh học và góp phần hoàn thiện các phương pháp nghiên cứu sản xuất các cytokines nói chung và interleukin 7 nói riêng một cách tối ưu. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector mang cấu trúc gen Interleukin 7 phục vụ chuyển gen trong hệ thống thực vật.

Từ khóa: biểu hiện gen, interleukin 7, cytokines, lympho B, lympho T

MỞ ĐẦU

Ngày nay con người đang phải đối mặt với rất nhiều căn bệnh nguy hiểm, đe dọa nghiêm trọng tới sức khỏe như: AIDS, viêm gan B, C. Trong đó, chủ yếu việc điều trị là sử dụng thuốc chống virus theo từng giai đoạn của diễn biến bệnh nên tính hiệu quả không cao và chỉ mang tính tạm thời. Vì vậy, đang có hướng nghiên cứu mới là sử dụng các liệu pháp miễn dịch hay liệu pháp sinh học.

Một trong các sinh phẩm được dùng trong liệu pháp sinh học là các chất cytokines được tạo ra trong các tế bào bạch cầu và là thành phần quan trọng trong việc điều khiển hệ thống miễn dịch và viêm của cơ thể.

Interleukin là một nhóm các cytokine được tìm thấy đầu tiên trong các tế bào bạch cầu. Chức năng của hệ thống miễn dịch phụ thuộc chủ yếu vào interleukins. Trong đó, nhóm interleukin 7 (IL-7) là một cytokine có vai trò quan trọng trong sự tăng trưởng của các dòng tế bào B và T. Đây là những tế bào có chức năng quan trọng trong hệ miễn dịch của con người, và cũng là mục tiêu tấn công của virus khi xâm nhập vào cơ thể người. Chuyển gen mã hóa protein vào cây lương thực là nguồn

thức ăn chính cho con người đang là một trong những hướng nghiên cứu phục vụ sản xuất protein tái tổ hợp hiện nay. Do tế bào thực vật có ưu điểm nuôi cấy dễ dàng, môi trường nuôi cấy đơn giản, rẻ tiền, dễ dàng sản xuất một lượng sinh khối lớn trong khoảng thời gian ngắn và quan trọng hơn cả là tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* không mang các mầm bệnh cho người.

Với mục đích tạo cơ sở cho việc sản xuất protein IL-7 tái tổ hợp phục vụ trong điều trị bệnh, chúng tôi đã tiến hành thiết kế vector mang gen IL - 7, là nguồn nguyên liệu để chuyển gen vào cây trồng để thu sinh khối protein tái tổ hợp.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *E.Coli* DH 5α. Chủng *Agrobacterium rhizogenes* TR105 (Viện Sinh học phân tử và Dược học, trường đại học Heidelberg, CHLB Đức).

Gen interleukin 7 của người, mã số J04156.1 trên ngân hàng Gel bank được tối ưu mã để biểu hiện ở thực vật và được tổng hợp nhân tạo bởi công ty Geneart, Germany và được ghép nối vào vector pBS-IL7. Vector chuyển gen pK7WG2D. Vector pENTR221/cal nhận

* Tel 0975 421186, Email huyhoangntn@gmail.com

từ Viện Sinh học phân tử và Dược học, trường đại học Heidelberg, CHLB Đức

Phương pháp

Thiết kế vector chuyển gen thực vật

Gen IL7 được nhân lên bằng PCR với cặp mỗi đặc hiệu IL7_F và IL7_R theo chu trình: 94°C / 4 phút, 30 chu kì (94°C / 30 giây, 53°C / 30 giây, 72°C / 1 phút 30 giây), 72°C / 10 phút và 15°C / 20 giờ.

Các phương pháp ghép nối vào vector theo Sambrook và Russell (2002) và theo quy trình Gateway kit của Invitrogen. DNA plasmid được biến nạp vào *E.Coli* theo phương pháp sốc nhiệt của Cohen và đồng tác giả (1972) và biến nạp vào *Agrobacterium rhizogenes* bằng phương pháp xung điện. DNA plasmid được tách chiết và làm sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (2002). DNA tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp clony PCR với cặp mỗi đặc hiệu IL7_F và IL7_R và xác định trình tự bằng máy phân tích trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector tái tổ hợp chứa cấu trúc gen IL7

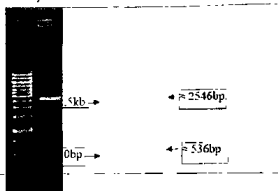
Dựa trên trình tự gen IL7, cặp mỗi đặc hiệu IL7_F và IL7_R được thiết kế có trình tự như sau:

IL7_F TCGAGCTCGATTGTGATATT

IL7_R AGGAAGCTCAAGTCATTACG

Các nucleotide in đậm là trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *SacI* và *HindIII*, các nucleotide in thường là trình tự tương đồng với gen IL7. Gen IL7 được nhân bằng cặp mỗi đặc hiệu IL7_F và IL7_R, sản phẩm PCR điện di có kích thước khoảng 536bp. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và xử lý cắt đồng thời bởi 2 enzyme *SacI/HindIII* và được nối vào vector pENTR221/cal. Vector tái tổ hợp pENTR221/cal/IL7 được kiểm tra bằng

PCR và bằng phản ứng cắt bởi *SacI/HindIII* (Hình 1).

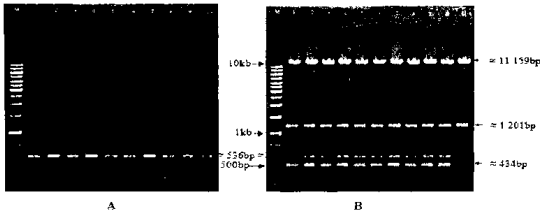


Hình 1. Cắt pENTR221/cal/IL7 bằng *SacI/HindIII*

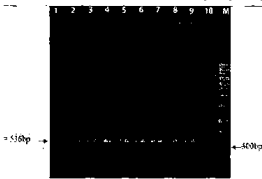
Điện di sản phẩm cắt cho thấy 2 phân đoạn gen có kích thước khoảng 536bp và 2544bp, tương ứng với kích thước của gen IL7 và vector pENTR221/cal. Cấu trúc gen IL7 và các gen mã hóa các peptide chức năng được chuyển vào vector pK7WG2D bằng phản ứng LR Gateway. Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp bằng PCR và cắt enzyme hạn chế *SacI/HindIII* cho thấy sản phẩm PCR với cặp mỗi đặc hiệu IL7_F và IL7_R có kích thước khoảng 536bp, sản phẩm cắt vector pK7WG2D/cal/IL7 bằng *SacI/HindIII* thu được 4 đoạn gen có kích thước khoảng 434bp, 536bp, 1201bp và 11159bp, kích thước này phù hợp với tính toán theo lý thuyết (Hình 2). Như vậy, cấu trúc gen IL7 đã được thiết kế thành công vào vector biểu hiện thực vật pK7WG2D. Dòng plasmid 1 được lựa chọn cho biến nạp vào *Agrobacterium* để phục vụ chuyển gen ở thực vật.

Biến nạp cấu trúc gen vào vi khuẩn *A.tumefaciens*

Chúng tôi sử dụng 50-100 ng plasmid pK7WG2D/cal/IL7 để biến nạp vào tế bào khả biến *A. tumefaciens* C58 bằng sốc nhiệt. Sản phẩm của quá trình biến nạp được nuôi trên môi trường YMB chọn lọc có bổ sung 100mg/L Spectinomycin, ủ đĩa ở 28°C. Sau 2 ngày, kết quả thu được một lượng lớn khuẩn lạc trên đĩa thạch. Để chọn ra những dòng khuẩn lạc như mong muốn (mang vector chuyển gen), chúng tôi tiến hành kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR



Hình 2. Điện di kiểm tra vector tái tổ hợp pK7WG2D/cal/IL7 bằng PCR (A) và cắt bởi enzyme hạn chế *SacI/HindIII* (B) M: Thang chuẩn 1Kb, Giếng 1 – 10: mẫu vector tái tổ hợp tách từ các dòng khuẩn lạc, giếng 11: plasmid pK7WG2D/cal



Hình 3. Kết quả colony-PCR bằng cặp mồi IL7_F và IL7_R; M: Thang marker DNA 1kb Giếng 1 - 10: Các dòng khuẩn lạc

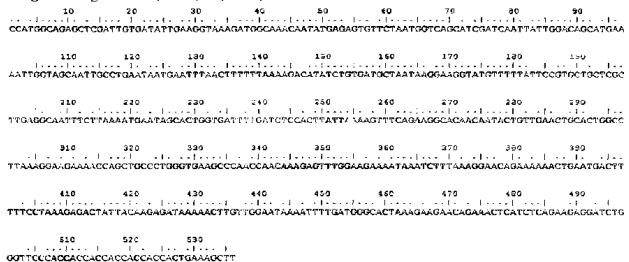
Chọn 10 dòng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch để tiến hành phản ứng colony-PCR bằng cặp mồi đặc hiệu trên gen: IL7_F và IL7_R. Sản phẩm phản ứng được điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả thể hiện ở hình 3 cho thấy có 8 trong 10 dòng khuẩn lạc được lựa chọn cho

kết quả dương tính với phản ứng PCR với một băng duy nhất có kích thước 536bp (trừ dòng số 1 và dòng số 10 cho kết quả âm tính). Với tỷ lệ như vậy, cho thấy đã biến nạp thành công vector pK7WG2D vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58.

Như vậy, chúng tôi đã tạo được chủng *A. tumefaciens* mang plasmid tái tổ hợp pK7WG2D/cal/IL7. Đây chính là nguồn nguyên liệu phục vụ cho mục đích biểu hiện protein ở thực vật phục vụ sản xuất protein tái tổ hợp sử dụng trong y học.

KẾT LUẬN

Bằng việc sử dụng nguồn gen IL7 ở người, chúng tôi đã thiết kế thành công vector mang cấu trúc gen IL7 phù hợp biểu hiện protein tái tổ hợp ở thực vật.



Hình 4. Trình tự gen Interleukin - 1

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bouaziz, J.D., Yanaba, K., Venturi, G.M., Wang, Y., Tisch, R.M., Poe, J.C. and Tedder, T.F, *Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autor-eactive CD4+ T cell activation in mice*, 2007. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 20878–20883.

2. Britton, M.T., M.A. Escobar, and A.M. Dandekar, *The oncogenes of Agrobacterium tumefaciens and Agrobacterium rhizogenes in Agrobacterium*, From Biology to Biotechnology, T. Tzfira and V. Citovsky, 2008, Editors

Springer: New York, p. 524-65.

3. Chilton, M.D., *Agrobacterium rhizogenes inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells*, 1982, Nature, p.432-34

4. Goodwin, R.G., S Lupton, A. Schmierer, *Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 302-306

5. Henney, *Interleukin 7: effects on early events in lymphopoiesis*, 1989, Today 10 (5): 170–173.

SUMMARY

VECTOR CONSTRUCTION CONTAINED
STRUCTURE INTERLEUKIN-7 IN PLANT

Nguyen Huy Hoang^{1*}, Chu Hoang Ha², Pham Bich Ngoc², Le Van Son²

¹College of Medical and Pharmacy - TNU, ²IBT - VAST

Interleukin is a group of the first cytokines found in the white blood cells. The function of the immune system depends mainly on interleukins. In particular, the interleukin 7 (IL - 7) is a cytokine which has an important role in the growth of B and T cell. These cells have important functions in the human immune system and is targeted by viruses when it is entering the body. The purpose to improve the quality of treatment towards using biological therapy and contribute to the improvement of research methods cytokines production in general and interleukin- 7 in particular in an optimal way. In this study, we presented the results of design vector carrying the structural interleukin 7 gene to serve gene transfer in the plant systems

Keywords: gene expression, interleukin - 7, cytokines, lympho B, lympho T

Ngày nhận bài: 30/11/2014. Ngày phản biện: 10/12/2014; Ngày duyệt đăng: 08/5/2015

Phản biện khoa học: TS. Nguyễn Thu Hiền – Trường Đại học Y Dược - ĐHTN

* Tel 0975 421186, Email huyhoangyt@gmail.com