

## CẢI THIỆN MỨC ĐỘ BIỂU HIỆN CỦA CHOLERA TOXIN B SUBUNIT TRONG CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN

Nguyễn Hoàng Lộc

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Tae-Jin Kang, Mi-Ok Jang, Moon-Sik Yang

Trường Đại học quốc gia Chonbuk, Hàn Quốc

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Cholera toxin (CT) của vi khuẩn *Vibrio cholerae* là tác nhân gây bệnh tả, làm mất nước và các chất điện giải trong cơ thể. CT bao gồm các tiểu đơn vị (subunit) A và B. Tiểu đơn vị pentamer B (cholera toxin B subunit-CTB) chứa 5 chuỗi polypeptides giống nhau và liên kết với các điểm thụ cảm glycosphingolipid trên bề mặt tế bào eukaryotic. CTB vi khuẩn biểu hiện khoảng 0.3% lượng protein tổng số ở khoai tây [1], 0.095% ở thuốc lá [9], 0.02% và 0.04% tương ứng trong lá và quả cà chua [3]. Nhìn chung, mức độ biểu hiện thấp của các kháng nguyên ngoại lai đã hạn chế sự phát triển hiệu quả các vaccine dựa trên cơ sở thực vật (plant-based vaccine). Vì thế, việc hướng tới các mức độ biểu hiện cao hơn đang được quan tâm nghiên cứu. Sự biểu hiện của các thành phần vaccine trong thực vật được cải thiện bằng cách thay đổi một số yếu tố như các tín hiệu leader và polyadenylation [7], tối ưu bộ ba mã hoá cho biểu hiện ở thực vật [8]. Mức độ tích lũy cao hơn và sự ổn định của protein đã được thực hiện bằng cách bổ sung trình tự SEKDEL ở đầu tận cùng C [2]. Protein KDEL thực hiện các chức năng cần thiết liên quan sự lắp ráp và gấp nếp protein trong mạng lưới nội sinh chất (endoplasmic reticulum-ER) [6].

Trong nghiên cứu này chúng tôi trình bày việc thiết kế và cấu trúc gen *ctb* tổng hợp (synthetic *ctb*), chuỗi mã hoá đã được tối ưu bằng cách kết hợp cả 2 trình tự Kozak và ER-retention. Phân tích biểu hiện của gen *ctb* tổng hợp trong cây thuốc lá, phân tích liên kết GM1 (galactosyl-N-acetylgalactosamyl-sialyl-galactosylglucosyl ceramide) để xác nhận protein CTB tái tổ hợp đã tạo một cấu trúc chức năng pentamer.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Cấu trúc của vector biểu hiện và biến nạp thực vật

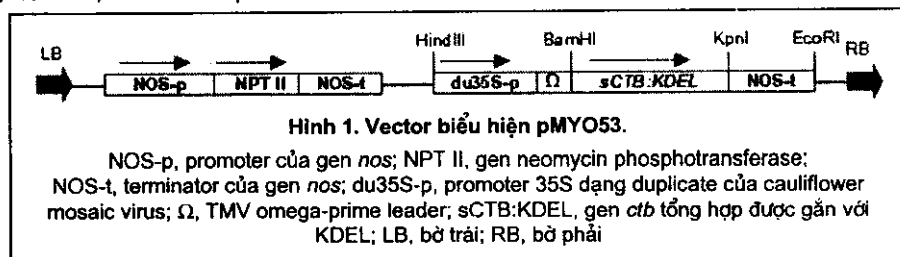
Thiết kế gen *ctb* tổng hợp dựa trên phương pháp PCR mở rộng dẫn bằng các đoạn chồng lên nhau (overlap extension PCR) với 10 primer khác nhau. Plasmid pMYO52 được cắt bằng *Bam*HI và *Kpn*I, và gen *ctb* tổng hợp được gắn vào ở các vị trí tương đồng trong vector biểu hiện thực vật, bằng cách đó tạo ra vector pMYO53 (hình 1). Vector biểu hiện pMYO53 được biến nạp từ *E.coli* (chủng TOP 10) vào *Agrobacterium tumefaciens* (chủng LBA 4404). Dòng *Agrobacterium* mang gen *ctb* tổng hợp được gây nhiễm vào cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L. cv T1560) *in vitro* theo phương thức đồng nuôi cấy (co-culture). Sau đó mẫu vật được chuyển lên môi trường Murashige-Skoog (1962) bổ sung 0.1mg/L NAA, 1mg/L BAP, 300mg/L kanamycin và 500mg/L cefotaxime để tái sinh chồi. Các chồi được chuyển lên môi trường MS không có hormone chứa 300mg/L kanamycin và 500mg/L cefotaxime để tạo rễ.

#### Xác định và phân tích biểu hiện của gen *ctb* tổng hợp trong cây chuyển gen

- Sự hiện diện của gen *ctb* tổng hợp trong cây biến nạp được xác định bằng PCR với các primer đặc trưng của gen này. DNA tổng số (100ng) của cây biến nạp và cây đối chứng, cùng với DNA pMYO53 (20ng), được dùng làm khuôn mẫu để phát hiện gen *ctb* tổng hợp bằng khuếch đại PCR.

- RNA tổng số (20 µg) của lá cây biến nạp được phân đoạn trên gel formaldehyde agarose, sau đó gắn lên màng Hybond-N+. Giai đoạn tiền lai được thực hiện ở 60°C/2h trong Church buffer (pH 7.4), tiếp đó lai với probe (gen *ctb* tổng hợp đánh dấu P<sup>32</sup>) ở 60°C O/N trong cùng đệm. Màng lai được rửa 2 lần/20 phút ở 60°C với 2x SSC + 0,1% SDS, và 2 lần/20 phút ở 60°C với 2x SSC + 1% SDS. Tín hiệu lai được phát hiện bằng phóng xạ tự ghi.

- Protein thực vật (20µg) và CTB tinh sạch (30, 150 và 300ng) được dùng trực tiếp hoặc đun sôi 10 phút trước khi điện di



trên gel SDS-PAGE 15%. Thẩm tích protein lên màng Hybond-C và ủ 2h ở nhiệt độ phòng (RT) trong đệm TBST chứa 2,5% non-fat dry milk và rabbit anti-cholera antiserum (1:5000). Ủ tiếp 2h ở RT trong đệm TBST chứa alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit IgG (1:7000). Nhuộm màu bằng BCIP/NBT trong đệm TMB (100mM Tris (pH 9,5), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM NaCl).

- Protein của cây chuyển gen, đối chứng (NC) và CTB tinh sạch (PC) được dùng để phủ các giếng của đĩa microtiter với 100µl/giếng. Ủ qua đêm ở 4°C, rửa 3 lần bằng đệm PBST (PBS + 0.05% Tween-20), ngăn các phản ứng không đặc hiệu bằng 1% BSA trong PBS trong 2h ở 37°C, rửa 3 lần bằng đệm PBST. Ủ với rabbit anti-cholera serum (1:8000) trong 0.01M PBS chứa 0.5% BSA trong 2h ở 37°C, rửa 3 lần bằng đệm PBST. Sau đó ủ tiếp với horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:10000) trong 0.01M PBS chứa 0.5M BSA trong 2h ở 37°C, rửa 3 lần bằng đệm PBST. Nhuộm màu cách bổ sung 100 µl/giếng TMB (PharMingher 2606 and 2607KC) trong 30 phút ở RT, trong tối. Đọc OD 405nm bằng ELISA reader, tính lượng CTB biểu hiện ở thực vật bằng đường chuẩn CTB tinh sạch.

- Phân tích GM1-ELISA được thực hiện để xác định ái lực của CTB thực vật với GM1-ganglioside. Đĩa microtiter được bọc với monosialoganglioside-GM1 với 100µl/giếng GM1 (3µg/mL) trong đệm PBS ở 4°C qua đêm. Ở đối chứng các giếng được bọc với 100µl/giếng BSA (3µg/mL). Rửa 3 lần bằng đệm PBST, và ngăn phản ứng không đặc hiệu bằng 1% BSA trong 0.01M PBS trong 2h ở 37°C. Rửa 3 lần bằng đệm PBST, đĩa được ủ với dịch chiết protein của cây chuyển gen và cây đối chứng cùng với CTB tinh sạch trong 2h ở 37°C. Các bước tiếp theo của phương thức này tương tự phương pháp định lượng protein CTB bằng ELISA.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Thiết kế gen ctb tổng hợp**

Mức độ biểu hiện tăng lên của protein ở thực vật đã được thông báo sau khi cải tiến các chuỗi mã hoá của gen [10]. Vì thế, chúng tôi thiết kế phiên bản tối ưu bộ ba mã hoá của gen *ctb*, vẫn giữ lại chuỗi mã hoá amino acid của gen tự nhiên ngoại trừ ở vị trí 2, nghĩa là bộ ba ATT của isoleucine được thay thế bởi bộ ba GTG của valine (hình 2). Đặt G ngay sau mã khởi đầu AUG và chuỗi Kozak đã tăng hiệu quả dịch mã lên 10 lần [4]. Sự thay đổi này sẽ không biến đổi trình tự của *ctb* hoàn chỉnh được sản xuất trong tế bào thực vật, do peptide tín hiệu ở đầu tận cùng NH<sub>2</sub> đã được loại bỏ trong suốt quá trình sản xuất và hoàn thiện protein [2]. Các chuỗi DNA có thể làm mất ổn định của RNA trong thực vật, như là chuỗi tín hiệu polyadenylation AATAAA, được loại khỏi gen tổng hợp. Trình tự SEKDEL được gắn vào đầu 3' của khung đọc mã *ctb*. Cuối cùng, các điểm nhận biết cho *Bam*HI và *Kpn*I được đưa vào tương ứng ở đầu 5' và 3' của gen *ctb* để cung cấp các vị trí cắt hạn chế thuận lợi cho việc tạo dòng trong vector biểu hiện thực vật.

**Xác định và phân tích biểu hiện của gen ctb tổng hợp trong cây chuyển gen**

Sản phẩm PCR có kích thước mong đợi (414 bp) thu được từ các mẫu DNA tổng số của tất cả 12 dòng

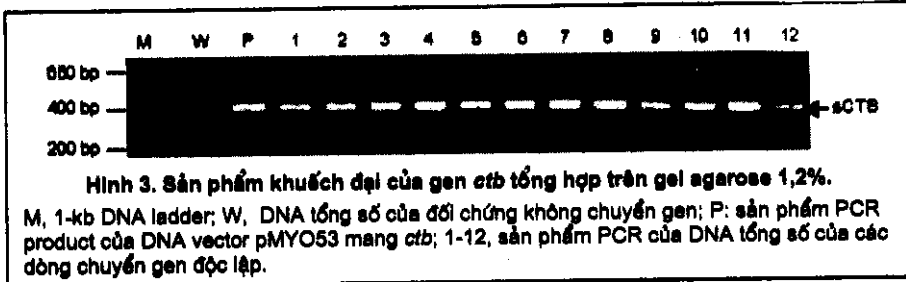
thuốc lá được biến nạp, đã gợi ý rằng gen *ctb* tổng hợp đã hợp nhất trong chromosomal DNA của cây chuyển gen (hình 3). Như mong đợi, DNA hệ gen của cây đối chứng đã không được khuếch đại. Các khuếch đại không đặc hiệu cũng không được quan sát thấy, điều này chỉ ra rằng tính đặc hiệu cao của các primér và điều kiện PCR.

Mức độ biểu hiện của mRNA *ctb* được phân tích

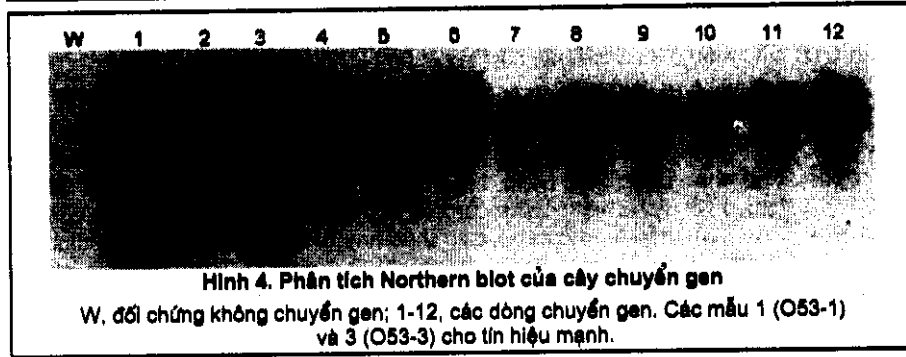
	GGATCC <u>GCCACC</u>	
	BamHI Kozak	
N	ATGATTAAATTAAAATTTGGTGTTTTTTTTACAGTTTACTATCTTCAGCATATG	55
S	ATGGTGAAGCTCAAGTTCGGAGTGTCTTCACAGTCTCCTCTCCTCCGGCTTACG	
N	CACATGGAACACCTCAAATATTACTGATTTGTGTGCAGAATACCACAACACACA	110
S	CTCATGGAACACCACAGAACATTACTGATTTGTGCGCTGAGTACCACAACACACA	
N	AATACATACGCTAAATGATAAGATATTTTCGTATACAGAATCTCTAGCTGGAAAA	165
S	AATTCATACTCTCAACGATAAGATCTTCTCCTACACAGAGTCCCTCGCTGGAAAG	
N	AGAGAGATGGCTATCATTACTTTTAAGAATGGTGCAACTTTTCAAGTAGAAGTAC	220
S	AGGGAGACTGGCTATCATTACTTTTCAAGAAGCGGACTACTTTCCAAGTTGAGGTTC	
N	CAGGTAGTCAACATATAGATTTCACAAAAAAGCGAATTGAAAAGGATGAAGTAC	275
S	CAGGAGCCCAACATATTGATTTCCAGAGAAGGCTATTGAGAGGATGAAGGATAC	
N	CCTGAGGATTGCATATCTTACTGAAGCTAAAGTCGAAAAGTTATGTGTATGGAAT	330
S	CCTCAGGATTGCTTACTCTACTGAGGCTAAGGTGGAGAAGTTGTGCGTTTGGAAC	
N	AATAAAACGCCTCATGCGATTCCCGCAATTAGTATGCGCAAATTA	385
S	KACRAGACTCCCATGCTATTGCTGCTATTAGCATGCTAACTACTCTGAGAAAG	
	S E K	
S	ATGAGCTATGAGGTACC	
	D E L *** KpnI	

Hình 2. So sánh gen *ctb* tự nhiên của vi khuẩn (N) với gen *ctb* tổng hợp (S)  
 Các nucleotide in đậm trong chuỗi "S" đã được thay đổi. Chuỗi tín hiệu polyadenylation giả định (AATAAA) trong gen tự nhiên được gạch dưới.

bằng Northern blot với gen *ctb* tổng hợp được dùng làm probe. Loại mRNA thích hợp hiện diện trong tất cả các cây chuyển gen có lượng *ctb* cao (hình 4). Quá trình lai đã cho thấy *ctb* probe đã lai mạnh với các dòng cây chuyển gen 1 và 3 (tương ứng O53-1 và O53-3), do đó chỉ ra mức độ biểu hiện cao của gen *ctb* tổng hợp. Vì thế 2 dòng này được dùng cho phân tích Western blot, ELISA, và liên kết GM1.

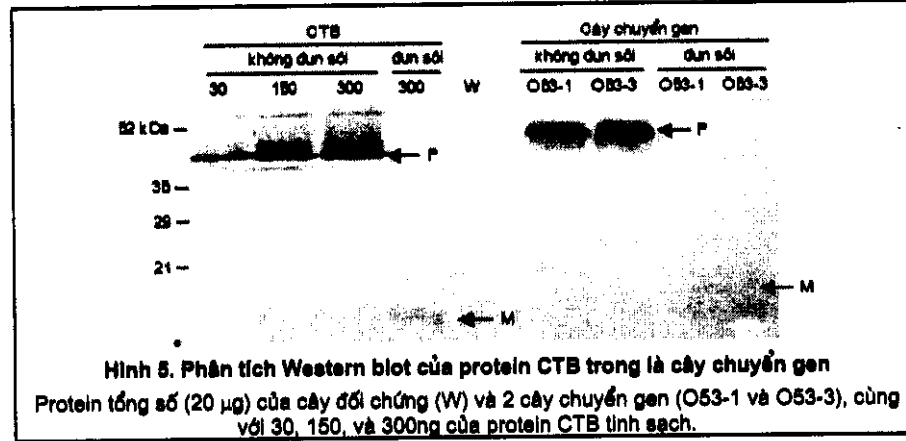


Hình 3. Sản phẩm khuếch đại của gen *ctb* tổng hợp trên gel agarose 1,2%.  
M, 1-kb DNA ladder; W, DNA tổng số của đối chứng không chuyển gen; P: sản phẩm PCR product của DNA vector pMYO53 mang *ctb*; 1-12, sản phẩm PCR của DNA tổng số của các dòng chuyển gen độc lập.

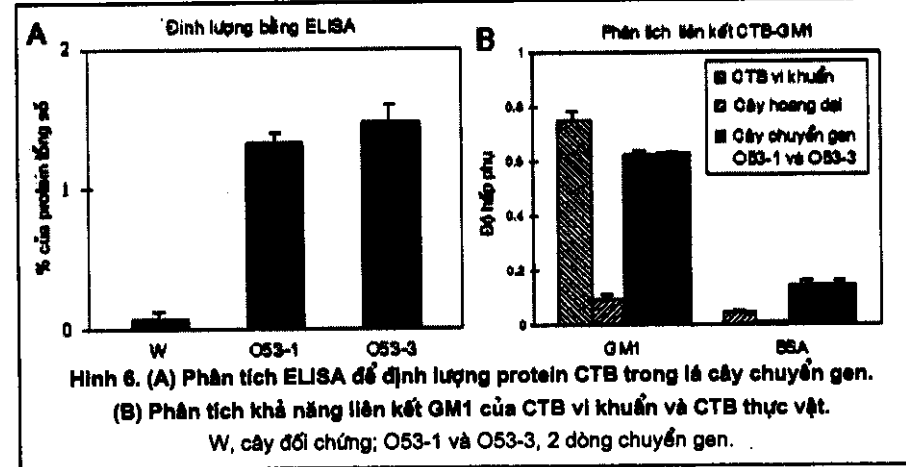


Hình 4. Phân tích Northern blot của cây chuyển gen  
W, đối chứng không chuyển gen; 1-12, các dòng chuyển gen. Các mẫu 1 (O53-1) và 3 (O53-3) cho tín hiệu mạnh.

Phân tích Western blot của cây thuốc lá được biến nạp gen *ctb* tổng hợp đã phát hiện ra protein CTB thuộc loại oligomer có trọng lượng phân tử khoảng 50 kDa (hình 5). Protein này phân tách thành các monomer khoảng 15 kDa khi bị đun sôi khoảng 10 phút. Cả 2 dạng multimer và monomer của CTB có nguồn gốc thực vật có trọng lượng phân tử cao hơn một chút so với CTB của vi khuẩn (tương ứng 50 kDa và 45 kDa đối với pentamer, 15 kDa và 12 kDa đối với monomer). Sự khác nhau này có lẽ do 6 amino acid được bổ sung thêm ở đầu tận cùng C cho ER-retention. Các monomer của cả 2 loại protein CTB có hoạt tính miễn dịch kém hơn các dạng multimer.



Hình 5. Phân tích Western blot của protein CTB trong lá cây chuyển gen  
Protein tổng số (20 µg) của cây đối chứng (W) và 2 cây chuyển gen (O53-1 và O53-3), cùng với 30, 150, và 300ng của protein CTB tinh sạch.



Hình 6. (A) Phân tích ELISA để định lượng protein CTB trong lá cây chuyển gen.  
(B) Phân tích khả năng liên kết GM1 của CTB vi khuẩn và CTB thực vật.  
W, cây đối chứng; O53-1 và O53-3, 2 dòng chuyển gen.

Các monomer của cả 2 loại protein CTB có hoạt tính miễn dịch kém hơn các dạng multimer.

ELISA được dùng để định lượng protein CTB trong lá của các dòng O53-1 và O53-3. Lượng protein CTB được tính bằng phần trăm của protein tổng số của thực vật (hình 6A). Nồng độ tối đa của protein hoà tan được đưa vào trong giếng của đĩa microtiter tương ứng với nồng độ protein CTB protein xấp xỉ 1,5% của protein tổng số trong lá cây O53-3. Trên cơ sở các kết quả của phân tích ELISA và Western thì 1g lá (trọng lượng tươi) của cây thuốc lá chuyển gen chứa 40-45µg protein tái tổ hợp thực vật của gen *ctb* tổng hợp.

Phân tích liên kết GM1-ELISA cho thấy cả 2 protein CTB thực vật và CTB vi khuẩn có ái lực mạnh đối với GM1-ganglioside, nhưng không với BSA (hình 6B). Các ái lực liên kết mạnh này chỉ ra rằng liên kết của tiểu đơn vị CTB có nguồn gốc thực vật với GM1 có tính chất cộng tác [5], và các vị trí cần cho liên kết của CTB pentamer với GM1 được bảo tồn. Liên kết giữa CTB thực vật và GM1 ganglioside tăng cường khả năng các tiểu đơn vị monomer B tích lũy trong khoang ER của tế bào thực vật, tự lắp ráp thành oligomer, và có thể là pentamer, lúc đó các dạng liên kết GM1 của CTB xuất hiện.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arakawa T, Chong DK, Merritt JL and Langridge WH, 1997. *Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants*. *Transgenic Res.* 6: 403-413.
2. Haq TA, Mason HS, Clements JD and Arntzen CJ, 1995. *Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants*. *Science* 268: 714-716.
3. Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK and Tyagi AK, 2002. *Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants*. *Transgenic Res.* 11: 447-454.
4. Kozak M., 1989. *The scanning model for translation: An update*. *J. Cell Biol.* 108: 229-241.
5. Merritt EA, Sarfaty S, van den Akker F, L'Hoir C, Martial JA and Hol WG, 1994. *Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide*. *Protein Sci.* 3: 166-175.
6. Pelham HR, 1988. *Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment*. *EMBO J.* 7: 913-918.
7. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ and Mason HS, 2000. *Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization*. *Nat. Biotechnol.* 18: 1167-1171.
8. Streetfield S.J., Jilka J.M., Hood E.E., Turner D.D., Bailey M.R., Mayor J.M., Woodard S.L., Belfuse K.K., Horn M.E., Delaney D.E., Tizard I.R. and Howard J.A., 2001. *Plant-based vaccines: unique advantages*. *Vaccine* 19: 2742-2748.
9. Wang XG, Zhang GH, Liu CX, Zhang YH, Xiao CZ and Fang RX, 2001. *Purified cholera toxin B subunit from transgenic tobacco plants possesses authentic antigenicity*. *Biotechnol Bioeng.* 72: 490-494.
10. Yang SH, Moran DL, Jia HW, Bicar EH, Lee M. and Scott M.P., 2002. *Expression of a synthetic porcine  $\alpha$ -lactalbumin gene in the kernels of transgenic maize*. *Transgenic Res.* 11: 11-20.

### SUMMARY

#### ENHANCEMENT OF EXPRESSION LEVEL OF CHOLERA TOXIN B SUBUNIT IN TRANSGENIC TOBACCO PLANT

Nguyen Hoang Loc  
University of Sciences, Hue University  
Tae-Jin Kang, Mi-Ok Jang, Moon-Sik Yang  
Chonbuk National University, South Korea

The cholera toxin B subunit (CTB) contains five identical polypeptides and targets glycosphingolipid receptors on eukaryotic cell surfaces. Increased expression of CTB in plants is critical to the development of edible vaccines. In this study, the coding sequence of the *ctb* gene was optimized, based on the modification of codon usage to that of tobacco plant genes and the removal of mRNA-destabilizing sequences. The synthetic *ctb* gene was cloned into a plant expression vector and expressed in tobacco plants under the control of the CaMV 35S promoter. The recombinant CTB protein constituted approximately 1.5% of the total soluble protein in transgenic tobacco leaves. This level of CTB production was approximately 15-fold higher than that in tobacco plants that were transformed with the bacterial *ctb* gene. The recombinant CTB produced by tobacco plants demonstrated strong affinity for GM1-ganglioside, which indicates that the sites required for binding and proper folding of the pentameric CTB structure were conserved.