NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN GP5/M CỦA VIRUS GÂY BỆNH LỢN TAI XANH TRONG HẠT THUỐC LÁ

Đào Thị Sen[1], Lê Thị Thanh[2], Nguyễn Thị Thu Trang[1], Nguyễn Chí Mai [2], Chu Hoàng Hà[2], Nguyễn Tường Vân[2]

[1]*Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

[2] *Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

TÓM TẮT

Bệnh lợn tai xanh là căn bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất hiện đang tàn phá ngành chăn nuôi lợn trên toàn thế giới và gây ra bởi virus PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV). Nghiên cứu phát triển loại vaccine an toàn, hiệu quả chống lại virus PRRS là nhiệm vụ cấp thiết. PRRSVcó dạng hình cầu, chứa sợi RNA đơn dương, thuộc chi *Arterivirus*, họ Arteriviridae và bộ Nidovirales. Hệ gen của nó có kích thước khoảng 15kb gồm 9 khung đọc mở (ORFs) là ORFs 1a, 1b, 2a, 2b, và 3–7. Trong đó, ORF1a và 1b mã hóa cho các prôtêin phi cấu trúc replicase và polymerase, có vai trò trong sự tái bản của virus. ORFs 2-7 mã hóa cho các prôtêin cấu trúc. Để góp phần đa dạng nguồn kháng nguyên cấu trúc quan trọng làm vaccine chống lại bệnh này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu biểu hiện hai kháng nguyên cấu trúc quan trọng GP5 và M của virus PRRS trong thực vật. Gen mã hóa cho kháng nguyên GP5 và M của virus gây bệnh lợn tai xanh phân lập tại Việt Nam năm 2010 được dùng để thiết kế vector biểu hiện đặc hiệu trong hạt thực vật dưới sự điều khiển của promoter đặc hiệu trong hạt phasolin… Đoạn gen đã được chuyển thành công vào cây thuốc lá C9-1 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả khuếch đại PCR cho thấy cấu trúc GP5/M đã được gắn kết ổn định trong DNA genome của lá thuốc lá chuyển gen. Protein tái tổ hợp LTB-GP5/M đã quan sát thấy trong dịch chiết hạt cây thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp Western blot. Đây sẽ là cơ sở để sử dụng cấu trúc này để biểu hiện tổ hợp kháng nguyên GP5/M trong hạt của các thực vật khác nhau.

Từ khóa: kháng nguyên, biểu hiện, PRRSV, GP5, M, LTB, vaccine thực vật

MỞ ĐẦU

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) hay còn gọi là bệnh "lợn tai xanh" là một trong những bệnh virus gây ra thiệt hại nghiêm trọng về kinh tế, đặt ra nhiều thách thức đối với ngành chăn nuôi lợn trên toàn cầu. Ở Việt Nam, virus PRRS được thông báo xuất hiện từ năm 1996 trên đàn lợn nhập khẩu của Mỹ nhưng đến đầu năm 2007 vẫn chưa có báo cáo về bệnh và thiệt hại trực tiếp do virus này gây ra. Nhưng từ cuối tháng 2 năm 2007 đến nay đã bùng phát thành dịch bệnh nặng, lây lan ngày càng rộng và trở nên khó kiểm soát. Theo thống kê, riêng năm 2007 có 324 xã, phường của 65 quận, huyện thuộc 18 tỉnh thành có dịch với 70 577 con lợn bị mắc. Từ đó đến nay, bệnh dịch vẫn tiếp tục và lan rộng đến tất cả các tỉnh thành trong cả nước và diễn biến của bệnh dịch ngày càng phức tạp, khó kiểm soát (Cục Thú y, Bộ Nông nghiệp và PTNT). Dịch lợn tai xanh không chỉ gây ảnh hưởng đến ngành chăn nuôi lợn trong nước mà còn kéo theo nhiều hệ lụy khác như ô nhiễm môi trường, khan hiếm nguồn lợn giống, mất thời gian phục hồi ngành chăn nuôi, giá thịt tăng trong khi nguồn cung không đáp ứng đủ nhu cầu thị trường dẫn đến nhập siêu các sản phẩm thịt...

Tác nhân gây bệnh là virus PRRS thuộc loại *Arterivirus*, họ Arteriviridae và bộ Nidovirales. Virus PRRS chứa hệ gen RNA dương đơn có kích thước khoảng 15kb gồm 9 khung đọc mở mã hóa cho 7 protein cấu trúc. Glycoprotein vỏ GP5 (24 - 26 kDa) và protein mạng lưới M (18 - 19 kDa) được mã hóa bởi ORF5 và ORF 6 là hai protein cấu trúc có khả năng gây đáp ứng miễn dịch. Trong virion, GP5 và M liên kết với nhau thông qua cầu nối disulfide. Các nghiên cứu cho thấy, việc sử dụng GP5 đồng biểu hiện với M sử dụng các vector biểu hiện khác nhau đã tạo ra phản ứng miễn dịch tốt hơn khi chỉ sử dụng GP5 (Jiang *et al*., 2006). Mặc dù, hiện nay có một số vaccine thương mại sẵn có thuộc dạng nhược độc và bất hoạt đang sử dụng nhưng còn tồn tại nhiều nhược điểm như chỉ có hiệu quả một phần trong bảo vệ chống lại virus PRRS, có nguy cơ phát triển độc tính trở lại (Scortti *et al*., 2007). Hơn nữa, loại vaccine này có giá thành tương đối cao, lại đòi hỏi nghiêm ngặt trong khâu bảo quản và vận chuyển. Do đó, yêu cầu đặt ra là tìm kiếm một loại vaccine mới có ý nghĩa kinh tế, an toàn và hiệu quả cao. Đáp ứng yêu cầu đó có nhiều loại vaccine thế hệ mới đã và đang được nghiên cứu sử dụng như vaccine DNA (Zhang *et al*., 2011; Li B *et al*., 2009), vaccine ăn được sử dụng cây trồng biến đổi gene (Chia *et al*., 2011), vector vi khuẩn (Han *et al*., 2011)... Trong đó, vaccine ăn được sản xuất từ thực vật đang là một hướng đi mới, bổ sung cho những vaccine truyền thống. Vaccine thực vật có nhiều ưu điểm như khả năng đáp ứng miễn dịch tốt, dễ dàng sản xuất khối lượng lớn, có độ an toàn cao, dễ bảo quản, sử dụng và kinh tế.

Trong nghiên cứu chuyển gen tạo vaccine thực vật, việc lựa chọn loại thực vật có quy trình chuyển gen hiệu quả là một trong những yếu tố quyết định. Cây thuốc lá là một trong những thực vật đầu tiên chọn để tạo cây chuyển gen nhờ khả năng dễ tái sinh và chấp nhận gen ngoại lai. Đến nay, đã có nhiều protein tái tổ hợp biểu hiện thành công trong thuốc lá như kháng nguyên *cholera* kháng bệnh dịch tả (Daniell *et al*., 2001), gen kháng nguyên phòng bệnh than (Aziz et al., 2002), gen kháng nguyên phòng bệnh viêm gan B (Mason *et al*., 1992)...

Tuy nhiên, protein tái tổ hợp được biểu hiện trong thực vật thường ở mức độ thấp. Sử dụng promoter điều khiển biểu hiện protein ở các cơ quan chuyên biệt, giai đoạn hoặc điều kiện nhất định, hoặc vector virus thực vật là những giải pháp hiệu quả tăng cường biểu hiện gen trong nhiều nghiên cứu gần đây. Nhằm tạo cơ sở cho việc sản xuất kháng nguyên làm nguyên liệu để sản xuất vaccin phòng bệnh lợn tai xanh trong thực vật, chúng tôi đã nghiên cứu biểu hiện đồng thời kháng nguyên GP5 và M kết hợp với LTB dưới sự điều khiển của promoter biểu hiện đặc hiệu ở hạt trong hạt thuốc lá. Khả năng biểu hiện của kháng nguyên trong hạt được đánh giá dựa trên kết quả lai Western. Đây sẽ là cơ sở để tiến hành biểu hiện tổ hợp kháng nguyên này trên các đối tượng thực vật có hạt khác nhau.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Dòng thuốc lá *Nicotiana tabacum* C9-1 *in vitro* do phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

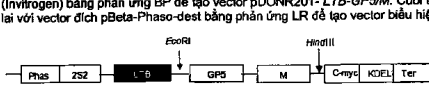
Vector tách dòng pBT (Phan Trọng Hoàng và đồng tác giả, 2005), vector pSHELP chứa gen *LTB* (Labile toxin B subunit, độc tố không chịu nhiệt của *E. coli*) (Lê Văn Sơn và đồng tác giả, 2008), vector pBSK chứa gen *GP5/M* (đã đổi mã phù hợp cho biểu hiện trong thực vật), dòng tế bào *E coli* DH5α, chủng *Agrobacterium tumefaciens* CV58 PGV2260.

Vector pBeta-Phaso-dest mang promoter của protein hạt phasolin được cung cấp bởi trường Đại học Tự do Brussels, Vương Quốc Bỉ.

Phương pháp nghiên cứu

Thiết kế vector chuyển gen

Đoạn gen *GP5/M* và *LTB* từ các vector pBSK-GP5/M, pSHELP-LTB được khuếch đại và ghép nối bằng kỹ thuật Nested-PCR (PCR lồng) để tạo thành đoạn gen *LTB-GP5/M* và được nhân dòng trong vector pBT. Sử dụng cặp mồi đặc hiệu có bổ sung vào đầu 5' của mỗi mồi trình tự *attachment* B1 và B2 cho phản ứng PCR để thu nhận được đoạn gen *LTB-GP5/M* có gắn hai vị trí *attachment*. Sản phẩm PCR tiếp tục được lai với vector pDONR201 nằm trong bộ Kit GateWay (Invitrogen) bằng phản ứng BP để tạo vector pDONR201- *LTB-GP5/M*. Cuối cùng, vector pDONR201- *LTB-GP5/M* được lai với vector đích pBeta-Phaso-dest bằng phản ứng LR để tạo vector biểu hiện pPhaso/*LTB-GP5/M*



Hình 1. Cấu trúc gen chuyển trong vector pPhaso/*LTB-GP5/M*. Phas: phasoline promoter; 2S2: signal peptide; LTB: Labile toxin B subnit; C-myc: peptide phục vụ nhận biết; KDEL: trình tự nhận dạng của mạng lưới nội chất; Ter: terminator; GP5: gen mã glycoprotein 5; M: gen mã hóa protein M

Vector pPhaso/*LTB-GP5/M* được chuyển vào tế bào khả biến *A. tumefaciens* CV58-pGV2260 theo phương pháp xung điện của Hofgen *et al.* (1988) phục vụ cho thí nghiệm chuyển gen.

Biến nạp gen vào cây thuốc lá

Cấu trúc gen *GP5/M* được chuyển vào giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* C9-1 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp của Topping có cải tiến (1998). Các mảnh lá có kích thước khoảng 1 cm^2 của các cây *in vitro* được đặt lên môi trường cảm ứng chồi GM (MS+1mg/l BAP+30g/l sucrose, 7,5 g/l agar, pH 5,8) trong 2 ngày và sau đó được ngâm với dịch huyền phù vi khuẩn (1/2 MS lỏng + 200 µM AS, OD 0,6-0,8) trong vòng 10 phút. Các mảnh lá được thấm khô và đặt lên môi trường đồng nuôi cấy GM trong tối 2 ngày và tiếp theo là môi trường tái sinh có bổ sung cefotaxim 400mg/l nhằm loại bỏ *A. tumefaciens* còn lại, kháng sinh chọn lọc kanamycin 50mg/l và và chất kích thích tạo chồi BAP(6-Benzylaminopurine) 1mg/l. Sau 4-5 tuần các chồi phát triển cao khoảng 2-3cm được cắt khỏi mô lá ban đầu và chuyển sang môi trường ra rễ MS có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycin 50mg/l, và cefotaxim 400mg/l. Cây con ra rễ và phát triển thành cây hoàn chỉnh với 3-4 lá thật sau 2-3 tuần được chuyển ra bầu có trấu trộn cát với tỉ lệ 1:1 và giữ trong nhà cây có nhiệt độ 25±2°C. Cây phát triển với 4-5 lá thật thì chuyển ra trồng trong bầu đất dưới điều kiện nhà kính. Sau 1 tháng, cây được chuyển ra đất trong nhà lưới. Hạt chín được thu về, sấy khô ở 40°C và được bảo quản ở nhiệt độ phòng.

Phương pháp phân tích cây chuyển gen

Tách DNA tổng số

Lá cây thuốc lá sống sót trên môi trường chọn lọc được trồng sau 2-3 tuần trong điều kiện nhà lưới được sử dụng để tách DNA để kiểm tra bằng PCR theo phương pháp Edwards *et al.* (1991) có cải tiến: Lấy 20 mg mẫu vào ống eppendorf 2 ml, nghiền trong nitơ lỏng. Sau đó bổ sung 500 µl dung dịch đệm (200mM Tris-HCl pH7.5, 250mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) vào từng ống, đảo đều. Ngâm trong bể ổn nhiệt 60°C/ 30 phút. Bổ sung 500 µl Chloroform: Isoamyl alcohol (CI) 24:1, đảo đều rồi ly tâm 13000 v/p trong 10 phút. Thu dịch nổi (pha trên) sang ống eppendorf mới rồi bổ sung một thể tích tương đương isopropanol vào từng ống, đảo đều, để lạnh -20 °C/30 phút. Ly tâm 13000 v/p trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi, thu tủa. Làm khô tủa ở nhiệt độ phòng. Hòa tan DNA trong 100µl TE (10mM Tris, 0,1 mM EDTA)

Phương pháp PCR

DNA sau khi tách được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *EcoRI*-GP5/*HindIII*-M theo chu trình nhiệt: 94°C/4 phút, 30 chu kì (94°C/30 giây, 60°C/45 giây, 72°C/1 phút 30 giây), 72°C/10 phút và 4°C/30 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra điện di trên gel agaros 0,8%.

Phân tích biểu hiện của kháng nguyên

Protein tổng số của hạt cây chuyển gen được tách chiết trong đệm chiết gồm 250 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 750 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5 mM PSMF. Sau đó bổ sung đệm tái mẫu 5X (0.0625 M TRIS-HCl, pH 6.8, 5% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 10% glycerol and 0.01% bromophenol blue) Protein tổng số sẽ được chạy điện di trên gel 12% SDS polyacrylamide theo quy trình của Laemmli (1970) và đã được chuyển lên màng lai nitrocellulose (0,4µm, BA85)

Schleicher and Schuell) theo phương pháp của Borijuk et al. (1998). Sau đó, màng được rửa trong TBS và block trong 3% BSA khoảng 1 giờ. Màng được tiếp tục lai với kháng thể C-myc trong 2 giờ. Sau khi rửa sạch 3 lần trong TBS-T, màng lại tiếp tục được lai với kháng thể ALP trong 1 giờ. Các băng có phản ứng lai được phát hiện bằng phản ứng màu với cơ chất có trong thuốc hiện 3,3- diaminobenzidine tablets SIGMA FAST.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biến nạp cấu trúc gen vào cây thuốc lá

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* để chuyển cấu trúc pPhaso-LTB-GP5/M vào giống thuốc lá C9-1 theo phương pháp của Topping có cải tiến (1998). Giống thuốc lá C9-1 được Viện Kinh tế Kỹ thuật thuốc lá lai tạo, có khả năng thích ứng với những vùng khí hậu đặc trưng của Việt Nam lại có phẩm chất, năng suất tốt.

Với mỗi cấu trúc vector chuyển gen, tiến hành cắt khoảng 50 mảnh lá thuốc lá được cắt từ các lá bánh tẻ của cây *in vitro* kích thước khoảng $1cm^2$ được đặt trên môi trường tái sinh GM không bổ sung kháng sinh ở điều kiện ánh sáng 2 ngày trước khi biến nạp. Giai đoạn này nhằm tạo điều kiện cho mô lá thích nghi với môi trường nuôi cấy.

Ngâm khoảng 30 mảnh lá trong đĩa petri chứa 30ml dung dịch huyễn phù vi khuẩn. Các mảnh lá được ngâm và lắc nhẹ với dung dịch trên trong vòng 10 phút. Các mảnh lá được thấm khô và đặt lên môi trường đồng nuôi cấy GM trong tối 2 ngày để đồng nuôi cấy. 20 mảnh lá còn lại không tiến hành nhiễm khuẩn, sử dụng để bố trí 2 công thức đối chứng: WT1 là 10 mảnh lá sau hai ngày cấy trên môi trường cảm ứng GM sẽ chuyển sang môi trường tạo chồi không bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycine (Km); WT2 tương tự WT1 nhưng có bổ sung kháng sinh chọn lọc kanamycine.

Các mảnh lá thuốc lá biến nạp sau hai ngày đồng nuôi cấy được chuyển sang môi trường chọn lọc bổ sung 50 mg/l kanamycine. Do vector pPhaso có mang đoạn gen kháng kanamycine, nên các môi trường sau biến nạp đều được bổ sung 50mg/l kanamycine để chọn lọc các cụm chồi chuyển gen. Cefotacime (400mg/l) cũng được bổ sung vào môi trường nhằm loại bỏ vi khuẩn còn sót lại trên các mảnh lá.

Sau 2 tuần các mảnh lá đối chứng WT 2 bị mất màu xanh và không xuất hiện chồi. Ngược lại, ở công thức WT 1 lá vẫn giữ nguyên màu xanh và xuất hiện nhiều chồi nhỏ khắp các mép lá. Các mảnh lá đã tiến hành biến nạp vẫn còn màu xanh ở một số điểm và tại các điểm đó bắt đầu xuất hiện các cụm mô sẹo và chồi nhỏ. Điều này chứng tỏ trong tế bào của các mảnh lá không chuyển gen không chứa gen kháng kanamycine nên chúng không thể tái sinh trên môi trường có kháng sinh này. Do đó, chúng tôi cho rằng những chồi và cây phát triển trên môi trường chọn lọc 50 mg/l kanamycine là những cá thể giả định chuyển gen.

Những cụm chồi phân hóa mạnh được cắt nhỏ và chuyển sang môi trường tái sinh đa chồi GM Km 50 để tiếp tục chọn lọc. Những chồi mập, xanh xuất hiện sau 4 - 5 tuần chọn lọc đạt kích thước 3 - 4 cm được tách ra và chuyển sang môi trường ra rễ (RM Km 50) để tạo cây hoàn chỉnh. Chồi thuốc lá sau chuyển gen vẫn tiếp tục ra rễ. TI lệ ra rễ đạt gần 100%, rễ dồng đều, xuất hiện nhiều lông hút ở tất cả các cấu trúc chuyển gen. Chồi phát triển và sinh trưởng tốt. Sau 2 tuần trên môi trường ra rễ các chồi con đạt kích thước khoảng 5 - 7 cm, phát triển bình thường

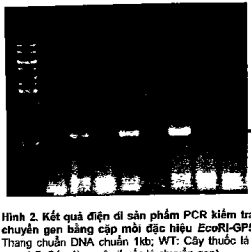
Do thuốc lá là một đối tượng có khả năng đáp ứng khá cao đối với chuyển nạp gen nên sau một số chu kỳ chọn lọc chúng tôi đã thu được khá nhiều dòng cây. Với tổng số 30 mảnh lá sử dụng cho biến nạp. Chúng tôi thu được 54 dòng thuốc lá T_0 sống sót và ra rễ trên môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc (bảng 1). Dựa vào kết quả trên và quan sát về mặt hình thái có thể khẳng định giống thuốc lá C 9-1 có khả năng tiếp nhận cấu trúc gen chuyển tốt, không nhận thấy những biểu hiện bất thường trong quá trình hình thành và phát triển chồi cũng như khả năng ra rễ của chồi. Lựa chọn ngẫu nhiên 20 dòng thuốc lá T_0 để ra bầu. Tỷ lệ sống sót thu được 100%.

Bảng 1. Kết quả biến nạp cấu trúc pPhaso- *LTB-GP5/M* vào cây thuốc lá C 9-1

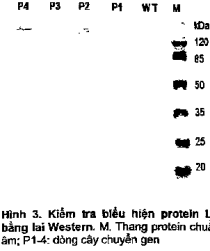
Thí nghiệm	Số mảnh lá thử nghiệm	Số cụm chồi hình thành	Số chồi sống sót/GM+Km50	Số cây ra rễ/RM+Km50
Biến nạp	30	42	54	54
Đối chứng WT1	10	36	81	81
Đối chứng WT2	10	0	-	-

Kiểm tra sự hiện diện của gen mục tiêu *GP5/M* trong cây thuốc lá chuyển gen

Polymerase chain reaction (PCR) là kỹ thuật phổ biến nhất để sàng lọc các dòng cây chuyển gen dương tính. Trong nghiên cứu này, để kiểm tra sự có mặt của các cấu trúc gen chuyển *GP5/M* trong các cây thuốc lá sau biến nạp sinh trưởng được trên môi trường chứa kháng sinh chọn lọc kanamycine, chúng tôi đã tiến hành các phản ứng PCR dựa trên các cặp mồi đặc hiệu *EcoRI-GP5/HindIII-M* và DNA khuôn mẫu được tách từ các cây con đã qua chọn lọc và chuyển ra bầu trong điều kiện nhà lưới. Đối chứng âm là DNA bộ gen tách chiết từ lá của cây không được chuyển gen. Kết quả cho thấy ở các dòng cây giả định chuyển gen có 13/20 dòng có sự hiện diện vạch DNA mong đợi có kích thước khoảng 1,2 kb phù hợp với kích thước đoạn gen *GP5/M* đã được thiết kế trong cấu trúc vector chuyển, băng này không xuất hiện ở trường hợp cây thuốc lá đối chứng. Như vậy, tỷ lệ cây dương tính qua sàng lọc PCR xấp xỉ 65%. Khoảng 35% cây vượt qua chọn lọc nhưng âm tính với kết quả PCR. Điều này có thể giải thích do sự đứt gãy gen trong vector tái tổ hợp do đó các dòng cây chuyển gen này chỉ mang gen kháng kháng sinh hoặc một phần cửa gen đích, dẫn đến cặp mồi nhân gen không bám vào để thực hiện phản ứng PCR. Trong chuyển gen, việc mất gen đích và sắp xếp lại gen trong T-DNA sau khi được chuyển vào tế bào cây chủ có thể xảy ra và đã được tìm thấy trong thực nghiệm (Schwen et al., 2002).



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra cây thuốc lá chuyển gen bằng cặp mồi đặc hiệu *Eco*RI-GP5/*Hind*III-M (M: Thang chuẩn DNA chuẩn 1kb; WT: Cây thuốc lá không chuyển gen; 1-7: Các dòng cây thuốc lá chuyển gen)



Hình 3. Kiểm tra biểu hiện protein LTB-GP5/M trong hạt bằng Iai Western. M. Thang protein chuẩn; WT: cây đối chứng âm; P1-4: dòng cây chuyển gen

Biểu hiện protein tái tổ hợp trong hạt thuốc lá

Để khẳng định các vector thiết kế và cây mang gen chuyển có khả năng biểu hiện protein đích, chúng tôi đã tiến hành lai Western. Trong thí nghiệm này, 4 dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T_0 có kết quả PCR dương tính được lựa chọn để tiến hành phân tích. Cây T_0 sau khi ra hoa và các hạt ở thế hệ T_1 được thu hoạch và kiểm tra khả năng biểu hiện của protein LTB- GP5/M bằng lai Western với kháng thể C-myc. Kết quả lai đã cho chỉ thấy dòng cây chuyển gen (P2, P4) xuất hiện một băng đặc hiệu có kích thước gần bằng 130kDa. Băng protein này không xuất hiện ở hạt cây đối chứng không chuyển gen (WT). Theo tính toán lý thuyết, protein LTB-GP5/M bao gồm LTB, GP5, M, C-myc và KDEL có kích thước khoảng 60 kDa. Thực tế ở các công trình nghiên cứu cho thấy khi protein tổng hợp trong hệ thống thực vật, protein thường sẽ bị quá trình biến đổi sau dịch mã bằng cách gắn thêm các gốc glycoxyl hay gọi là quá trình glycosylation. Ngoài ra, chuỗi protein thường gắn kết với nhau để trở thành dimer (hai chuỗi). Vì vậy, băng protein thu được có kích thước khoảng 130 kDa chính là đoạn protein LTB-GP5/M và có thể khẳng định chúng tôi đã biểu hiện thành công cấu trúc protein LTB-GP5/M

Việc biểu hiện được đồng thời LTB/GP5/M là một kết quả quan trọng. Với mục đích tạo vaccine dùng qua đường miệng, việc tăng cường hiệu quả đáp ứng miễn dịch qua đây là rất cần thiết, quyết định lớn đến sự thành công của vaccine. LTB là một tiểu đơn vị liên kết của độc tố đường ruột không bền nhiệt lấy từ vi khuẩn *E.coli* sống trong đường tiêu hóa. LTB là một chất sinh miễn dịch ở niêm mạc ruột, một số nghiên cứu trên động vật mô hình và một thử nghiệm trên người cho thấy LTB tái tổ hợp có thể kích thích các đáp ứng miễn dịch niêm mạc. Ngoài ra, LTB còn để kháng tốt với sự thủy phân protein ở dạ dày trong điều kiện pH thấp (Kang *et al.*, 2004). Đó là những cơ sở cho việc sử dụng LTB như một giải pháp kỹ thuật nhằm góp phần tăng cường đáp ứng miễn dịch của đoạn gen quan tâm mà nó gắn vào.

Nghiên cứu quá trình đáp ứng miễn dịch ở lợn đã xác định được GP5 và M là hai protein chính liên quan tới đáp ứng miễn dịch. M là protein PRRSV chính được nhận ra bởi các tế bào protein T. Sự hoạt động của tế bào limpho T đặc hiệu kháng nguyên cho phép hoạt hóa hệ thống tế bào miễn dịch để tiêu diệt virus - tế bào bị nhiễm bệnh. GP5 được biết như yếu tố kích thích việc sản sinh kháng thể trung hòa ở lợn. Tuy nhiên, các kháng thể trung hòa còn quá yếu hoặc quá chậm để kích thích miễn dịch của lợn. Nghiên cứu biểu hiện cấu trúc GP5 hoặc M riêng biệt, hoặc GP5/M cho thấy lợn con đồng miễn dịch với cấu trúc GP5/M đã có những đáp ứng miễn dịch dịch thể và tế bào quan trọng sau mười tuần, trong khi đó không phát hiện thấy hoặc biểu hiện ở mức thấp kháng thể trung hòa ở lợn con chỉ sử dụng GP5 hoặc M (Jiang *et al*., 2006). Vì vậy, nghiên cứu chúng tôi sử dụng tổ hợp LTB-GP5/M biểu hiện đồng thời hy vọng tạo ra được đáp ứng miễn dịch cao cho giải pháp sản xuất vaccine ăn được.

KẾT LUẬN

Bằng việc sử dụng nguồn gen *GP5* và *M* của virus PRRS phân lập ở Việt Nam trong cấu trúc vector pPhaso-dest kết hợp *GP5/M* ghép nối với *LTB*, chúng tôi đã chuyển thành công vào cây thuốc lá. Các dòng cây thuốc lá chuyển gen kháng đinh bằng phản ứng PCR. Protein tái tổ hợp LTB-GP5/M đã quan sát thấy trong dịch chiết hạt cây thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp Western blot. Đây sẽ là cơ sở để sử dụng cấu trúc này để biểu hiện tổ hợp kháng nguyên GP5/M trong hạt của các thực vật khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aziz MA, Singh S, Kumar PA and Bhatnagar R (2002). Expression of protective antigen in transgenic plants. a step towards ecible vaccine against anthrax. *Biochem Bioph Res Co* 299: 345-351

Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, Tsai YC, Lin CM, Pang VF, Jeng CR (2011). 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 Immunopathol* 140:215–225

Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6:219-226

Han YW, Kim SB, Rahman M, Uyangaa E, Lee BM, Kim JH, Park KI, Hong JT, Han SB, Eo SK (2011). Systemic and mucosal immunity induced by attenuated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium expressing ORF7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **34**:335–345.

Phan Trọng Hoàng, Nông Văn Hải, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2005). Sử dụng enzime *Xcm*I để thiết kế T-vector pBT phục vụ tách dòng và đọc trình tự gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **3(4)**: 459-463.

Jiang Y, Xiao S, Fang L, Yu X, Song Y, Niu C, Chen H (2006). DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* **24**:2869–2879

Kang TJ, Han SC, Jang MO, Kang KH, Jang YS, Yang S (2004). Enhanced expression of B subunit of *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin in tobacco by optimazation of coding sequence. *Appl Biochem Biotechnol* **117**: 175-187.

Li B, Xiao S, Wang Y, Xu S, Jiang Y, Chen H, Fang L (2009). Immunogenicity of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 protein encoded by a synthetic ORF5 gene. *Vaccine* **27**:1957–1963.

Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *PNAS USA* **89**: 11745-11749.

Scorti M, Prieto C, Alvarez E, Simarro I, Castro JM (2007). Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet Rec* **161**:809–813.

Lê Văn Sơn, Trần Thanh Thu, Chu Hoàng Hà, Geert Angenon, Lê Trần Bình (2008). Biểu hiện kháng nguyên M1 của virus H5N1 trong hạt *Arabidopsis*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* **6**(4A). 563-568

Zhang D, Xia Q, Wu J, Liu D, Wang X, Niu Z (2011) Construction and immunogenicity of DNA vaccines encoding fusion protein of murine complement C3d-p28 and GP5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **29**:629–635.

EXPRESSION OF ANTIGEN GP5/M OF PRRS VIRUS IN TOBACO SEEDS

Dao Thi Sen[1], Le Thi Thanh[2], Nguyen Thi Thu Trang[1], Nguyen Chi Mai[2], Chu Hoang Ha [2], Nguyen Tuong Van[2]

[1] *Hanoi National University of Education*

[2] *Institute of Biotechnology, VAST*

SUMMARY

PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) is the most significant infectious disease currently devastating the swine industry. Thus, developing a safer and effective against PRRS virus (PRRSV) infection is an essential task. PRRSV is a spherical enveloped virus containing a genome of single-stranded positive-sense RNA and belonging to the genus *Arterivirus*, family Arteriviridae, order Nidovirales. The PRRSV genome is approximately 15 kb in size and consists of nine open reading frames (ORFs), designated as ORFs 1a, 1b, 2a, 2b, and 3–7. Both ORF1a and ORF1b encode the non-structural proteins, replicase and polymerase, that are believed to be involved in viral replication. The ORFs 2–7 are postulated to encode for structural proteins. In order to diversify antigen sources for vaccine production to against PRRSV, two most important structure proteins GP5 and M of PRRSV were expressed in tobacco seeds. Genes code for *GP5* and *M* proteins of PRRSV isolated from pigs infected PRRSV in Vietnam in 2010 was constructed in plant expression vector under the control of seed specific phaseolin promoter. The genes were then transferred into the C9-1 tobacco using *Agrobacterium*. The stable insertion of *GP5-M* genes in genome of transgenic tobacco was confirmed by PCR. Western hybridization indicated that fused protein GP5/M was successful expressed in tobacco seeds. This preliminary result is a foundation for expression of GP5/M in seeds of other plants in the future.

Keywords: Antigen, expression, LTB, GP5, M, PRRSV, plant vaccine