

BIỂU HIỆN GEN *HA5-1* MÃ HÓA TIỂU PHẦN KHÁNG NGUYÊN HEMAGGLUTININ (HA) CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Văn Thị Như Ngọc¹, Đỗ Thị Huyền¹, Nguyễn Thanh Nhân², Nguyễn Phước Hải³, Trương Văn Dung⁴, Trương Nam Hải¹

¹Viện Công nghệ Sinh học

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Trường Cao đẳng Sư phạm Kiên Giang

⁴Viện Thú y

TÓM TẮT

Bệnh cúm gia cầm thể độc lực cao (HPAI) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm có tốc độ lây lan rất nhanh và tỷ lệ gây chết cao trong đàn gia cầm nhiễm bệnh. Bệnh gây ra bởi virus cúm type A, thuộc họ *Orthomyxoviridae* với nhiều subtype khác nhau. Hiện nay, người ta đã phát hiện được 16 type HA khác nhau, trong đó hầu hết các type đều gây bệnh cho gia cầm và có thể gây bệnh cho người. Chúng tôi đang nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp dựa trên kháng nguyên HA của virus H5N1 được biểu hiện trong nấm men *Pichia pastoris* để bảo vệ gia cầm chống lại virus cúm. Để tạo vaccine, gen *ha5-1* không chứa trình tự mã hóa cho peptide tín hiệu, mã hóa cho tiểu phần HA5-1 của kháng nguyên hemagglutinin ở virus cúm A/H5N1 đã được dung hợp với gen *trx* mã hóa cho thioredoxin của vi khuẩn trong vector biểu hiện pET22 $_{trx}$. Sau đó, vector tái tổ hợp này được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để sơ bộ khảo sát khả năng biểu hiện của gen lai trong tế bào *E. coli*. Đúng như dự kiến, protein dung hợp TrxHa5-1 có kích thước khoảng 57 kDa đã được biểu hiện với hàm lượng lớn trong tế bào *E. coli* dưới sự điều khiển của T7 lac promoter và chất cảm ứng IPTG 0.5 mM. Tuy nhiên, chỉ lượng nhỏ protein tái tổ hợp tồn tại dưới dạng tan (10%). Ở 22, 28, 30, 37°C, lượng protein tái tổ hợp được tạo ra tương ứng đạt 78, 110, 126, 142 mg/l sau 4 h nuôi cấy trong môi trường cảm ứng. Protein tái tổ hợp tan nhiều nhất và có hàm lượng cao chiếm đến 50% protein tổng số khi nuôi cấy chủng tái tổ hợp ở 25°C, còn ở 30°C, lượng protein tái tổ hợp được tổng hợp so với protein tổng số chỉ đạt khoảng 20%. Protein dung hợp này đã được tinh sạch thành công bằng cột sắc ký ái lực với His-tag trong điều kiện biến tính và hồi tính. HA5-1 tái tổ hợp biểu hiện trong vi khuẩn này được nhận biết bởi kháng thể đa dòng kháng lại H5N1 trong huyết thanh gà được tiêm với chủng vaccine virus H5N1. Cấu trúc gen lai này sẽ được đưa vào vector pPIC9 để biểu hiện gen trong nấm men *P. pastoris* nhằm nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp dựa vào chủng nấm men.

Từ khóa: *E. coli* BL21, *ha5-1*, pET22 $_{trx}$, protein tái tổ hợp, vaccine

MỞ ĐẦU

Virus cúm gia cầm typ A thuộc họ *Orthomyxoviridae* có hệ gen gồm 8 phân đoạn RNA mã hoá cho 10 protein. Dựa vào các kháng nguyên bề mặt là hemagglutinin và neuraminidase mà người ta định ra các subtype khác nhau. Hiện nay, các nhà khoa học đã phát hiện được 16 subtype hemagglutinin ký hiệu từ H1 đến H16. Trong số chúng thuộc các subtype này, chủng H5N1 được xem là chủng độc lực cao đã từng gây bệnh và gây tử vong cho người (Fedson, 2005). Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), tính từ tháng 12 năm 2003 đến tháng 11 năm 2006 trên toàn thế giới có 258 người mắc bệnh và trong đó 153 người bị tử vong do cúm gia cầm H5N1. Đồng thời, dịch cúm

gia cầm đã làm thiệt hại to lớn đến nền kinh tế mà con số chính xác không thể thống kê chi tiết. Điều đáng lo ngại là hiện nay, virus này đã có khả năng truyền trực tiếp từ gia cầm sang người mà không cần phải qua vật thể trung gian nào khác (Nwe *et al.*, 2006). Để ngăn chặn sự lây lan virus giữa các đàn gia cầm cũng như ngăn chặn gia cầm truyền bệnh cho người, phương pháp hiệu quả nhất là tiêm chủng cho gia cầm chống lại virus H5N1 (Nwe *et al.*, 2006).

Vaccine phòng cúm H5N1 đã được nghiên cứu bao gồm vaccine dưới đơn vị (Subunit), vaccine nhược độc (Attenuated), vaccine DNA, vaccine vô hoạt (Inactivated)... Hiện nay, vaccine vô hoạt và vaccine tái tổ hợp có vector dẫn truyền (Vector-based) đang được sử dụng rất rộng rãi trên thị

trường. Công nghệ chủ yếu để tạo loại vaccine này là nuôi virus trong phôi gà sau đó vô hoạt virus nhưng giữ lại kháng nguyên HA. Đây là công nghệ đòi hỏi thiết bị, phòng nghiên cứu có độ an toàn cao và đôi khi không nhận được lượng lớn virus từ phôi gà dùng để làm vaccine (Lipatov *et al.*, 2004). Theo tính toán, lượng protein của virus dùng làm vaccine sau khi nuôi cấy 10 ngày trong 200 phôi gà thường chỉ đạt 20 - 40 mg [Nwe *et al.*, 2006]. Vì thế, việc chuẩn bị một lượng lớn vaccine vô hoạt gặp nhiều khó khăn. Mặc dù hiện nay chưa có vaccine dưới đơn vị nano chính thức được sử dụng để phòng H5N1 trên thị trường nhưng nhiều nhà khoa học trên thế giới đã coi đây là một loại vaccine có thể thay thế được cho vaccine vô hoạt đang sử dụng. Kháng nguyên HA của virus cúm đã được chứng minh là có khả năng gây đáp ứng miễn dịch bảo hộ (Chen., 2004; Daly, Mumford., 2001; Justewicz *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 2000; Saelens *et al.*, 1999). Vì thế, các nhà khoa học đã tạo vaccine dưới đơn vị bằng cách đưa gen mã hoá kháng nguyên HA vào biểu hiện trong các chủng vi khuẩn, virus không gây bệnh, nấm men và thậm chí cả cây trồng để thu được lượng lớn kháng nguyên HA dùng làm vaccine. Vaccine này có ưu điểm là an toàn, qui trình sản xuất lượng lớn đơn giản, không đòi hỏi trang thiết bị phức tạp và đắt tiền (Treanor *et al.*, 2001). Điều đáng chú ý là vaccine này chỉ tạo ra kháng thể chống lại kháng nguyên vỏ mà không tạo kháng thể chống các loại protein khác bên trong virus như kháng nguyên M, NS, NP, ... nên có thể sử dụng các kháng nguyên bên trong virus để phân biệt được gia cầm nhiễm virus và gia cầm được tiêm vaccine (Nwe *et al.*, 2006).

Năm 1999, Saelens và đồng tác giả cũng đã đưa toàn bộ gen mã hoá kháng nguyên HA của H3N2 vào biểu hiện trong nấm men *P. pastoris*. Kết quả của nghiên cứu đã chỉ ra rằng, kháng nguyên HA được biểu hiện rất thấp, tuy nhiên kháng nguyên tái tổ hợp này cũng có khả năng bảo hộ cao (100%). Năm 2006, Gao và đồng tác giả một lần nữa đã khẳng định vai trò sinh đáp ứng miễn dịch bảo hộ của HA giúp gà chống lại H5N1. Các tác giả này đã đưa phân đoạn gen mã hoá kháng nguyên HA và tiểu đơn vị của kháng nguyên HA (HA5-1, HA2) của chủng H5N1 vào biểu hiện trong adenovirus. Kháng nguyên HA5-1 và HA tái tổ hợp có mức độ bảo hộ 100% đối với gà thực nghiệm. Tuy nhiên, mức độ an toàn của vaccine sử dụng vector là adenovirus dạng này vẫn chưa được xác định rõ ràng. Vì thế, chúng tôi đã tiến hành tách dòng các gen mã hoá kháng nguyên HA5-1 và đưa vào biểu hiện trong nấm men *P. pastoris*. Để khắc phục việc biểu hiện kém của

HA trong *P. pastoris*, chúng tôi đưa gen vào vector pET22b(+) mang đoạn gen *trx* nằm ngay sau promoter T7 và nghiên cứu khả năng biểu hiện của gen trong *E. coli* BL21. Sau đó, đoạn gen dùng hợp *trx* và gen mã hoá cho kháng nguyên HA5-1, HA2, HA được đưa vào vector biểu hiện pPIC9 để biểu hiện gen lai trong *P. pastoris*. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày việc tách dòng và biểu hiện gen *ha5-1* mã hoá cho kháng nguyên HA5-1 của virus cúm H5N1 trong *E. coli* BL21.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng *E. coli* DH5 α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZM15)*] được sử dụng để chọn dòng và nhân dòng gen.

Chủng *E. coli* BL21 [*F-omp hsd SB (rBmB) gel dem (DE3) physS (CamI)*] được sử dụng làm tế bào chủ cho biểu hiện gen.

Plasmid pCR2.1 do hãng Invitrogen sản xuất được sử dụng làm vector tách dòng trong tế bào *E. coli* DH5 α .

Plasmid pET22trx (pET22b(+)) mang gen mã hoá thioredoxin do Phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ Sinh học thiết kế được sử dụng làm vector biểu hiện gen trong tế bào *E. coli* BL21.

Vector pCRH5 mang gen *ha5* và huyết thanh gà chứa kháng thể kháng virus cúm A/H5N1 do Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Phương pháp

Kỹ thuật PCR và tách dòng gen

Phản ứng làm biến tính DNA khuôn diễn ra ở 94°C trong 4 phút, sau đó được tiếp theo với 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước: Bước 1: Biến tính sợi DNA khuôn ở 94°C trong 1 phút; bước 2: Mở kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 50°C trong 1 phút; bước 3: Tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 8 phút và ủ mẫu ở 4°C. Hai đoạn mỗi dùng để nhân gen do hãng Amersham Pharmacia Biotech tổng hợp. Mỗi xuôi có chứa trình tự của *Nco* I (chữ gạch chân) và mỗi ngược có trình tự của

*Bam*HI (chữ gạch chân). Trình tự hai môi như sau:

Môi *ha5*-1f: ttccatggggtgatcagatttgcattgggtac;

Môi *ha5*-1r: gggatccgatcttctctctttgagggtc.

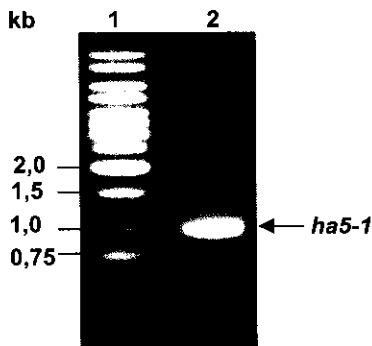
Các phương pháp về sinh học phân tử như cắt, nối các đoạn gen, biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*, điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose, polyacrylamide ... được tiến hành theo phương pháp thường quy (Sambrook, Russell, 2001).

Thiết kế vector biểu hiện

Gen *ha5*-1 được nhân lên từ dòng pCRH5 bằng cặp môi đặc hiệu có chứa hai trình tự của enzyme hạn chế *Nco* I và *Bam*H I. Sản phẩm PCR được nối trực tiếp vào vector tách dòng pCR2.1. Trong vector tách dòng, chúng tôi tiến hành kiểm tra và đọc trình tự gen. Sau đó gen *ha5*-1 được cắt bằng hai enzyme hạn chế trên và đưa vào vector biểu hiện pET22trx để tạo thành vector pET22trxha5-1. Protein thioredoxin mã hoá từ gen *trx* giúp cho protein tái tổ hợp biểu hiện ổn định hơn và cuộn xoắn chính xác hơn, hạn chế lỗi trong quá trình cuộn xoắn. Plasmid pET22trxha5-1 được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để biểu hiện gen.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện gen



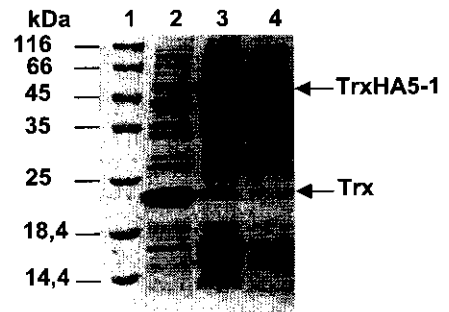
Hình 1. Phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8%. 1: Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas); 2: Sản phẩm PCR nhân gen *ha5*-1.

Bằng phương pháp PCR sử dụng cặp môi đặc hiệu, gen *ha5*-1 mã hóa tiểu phần đầu của kháng nguyên HA5 đã được khuếch đại thành công từ ADN khuôn là gen *ha5* trong vector pCRH5 theo chu trình nhiệt đã mô tả ở phần vật liệu và phương pháp (Hình

1). Sản phẩm PCR trên gel là một băng đặc hiệu, có kích thước khoảng 1 kb đúng như kích thước của gen *ha5*-1 trên Ngân hàng gen. Gen *ha5*-1 sau đó được tách dòng trong vector pCR2.1 và được kiểm tra bằng giải trình tự gen. Trình tự gen *ha5*-1 trong vector tách dòng tương đồng 100% với gen *ha5*-1 đã được đăng ký trên Ngân hàng gen mã số AJ867074. Sau khi đưa vào vector biểu hiện pET22trx, gen *ha5*-1 được kiểm tra bằng một số enzyme hạn chế (kết quả không thông báo). Dòng plasmid pET22trx mang đúng gen *ha5*-1 được đặt tên là pET22trxha5-1. Plasmid tái tổ hợp này được biến nạp vào chủng *E. coli* BL21 để biểu hiện gen.

Biểu hiện gen *ha5*-1

Các dòng *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang plasmid pET22trxha5-1 được nuôi cấy ở 37°C qua đêm trong 2 ml môi trường LBA (môi trường LB có chứa 100 µg/ml Ampicillin). Sau đó, tế bào được pha loãng trong môi trường LBA mới sao cho OD₆₀₀ ≈ 0,1 và được nuôi tiếp ở cùng điều kiện trong khoảng thời gian 1,5 h để OD_{600nm} đạt từ 0,5 đến 0,8. Sau đó, mẫu được cảm ứng bằng cách bổ sung IPTG đến nồng độ cuối cùng là 1 mM và lắc tiếp ở 30°C trong 4 h.



Hình 2. Protein tổng số từ các chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21. 1: Thang protein chuẩn (Fermentas); 2: *E. coli* BL21 mang vector pET22trx; 3-4: *E. coli* BL21 mang vector pET22trxha5-1

Sau khi nuôi cấy cảm ứng, tế bào được thu lại và xử lý để kiểm tra protein tổng số của chúng. Kết quả (Hình 2) cho thấy, HA5-1 được biểu hiện dưới dạng protein lai với Trx có kích thước khoảng 57 kDa như tính toán. Trong điều kiện này, protein tái tổ hợp được biểu hiện với hàm lượng khá lớn.

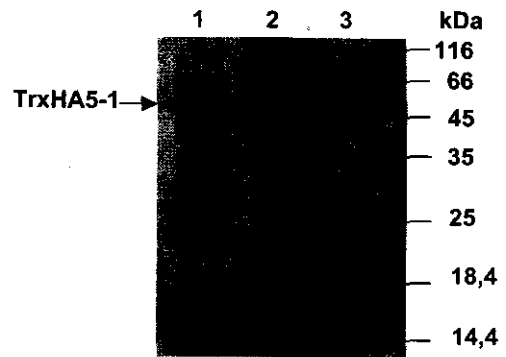
Từ năm 1983, Davis và đồng tác giả đã đưa gen mã hóa kháng nguyên HA1-1, HA1 của chủng virus cúm H1N1 vào tế bào *E. coli* để tạo kháng nguyên HA1-1 và HA1 tái tổ hợp với mục đích để nghiên

cứ khả năng sinh miễn dịch của kháng nguyên này. Khi biểu hiện dưới dạng dung hợp với Trp operon ở đầu N, protein được biểu hiện với lượng lớn (khoảng 10 - 20% protein tổng số). Kháng thể kháng lại kháng nguyên tái tổ hợp được sinh ra từ động vật thực nghiệm có khả năng nhận biết và liên kết tốt với protein HA của virus đã được xử lý bằng chất tẩy (detergent), HA trên lớp vỏ virus và các mảnh protein HA được bọc lộ trên tế bào bị nhiễm virus H1N1. Kết quả này đã chứng tỏ rằng HA biểu hiện dưới dạng dung hợp có khả năng kích hoạt hệ miễn dịch ở động vật sinh ra kháng thể nhận biết được ít nhất một số quyết định kháng nguyên của HA trên hạt virus. Từ những nhận định ban đầu đó, tác giả đã hy vọng có thể nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp dựa vào chủng vi khuẩn *E. coli* (Davis *et al.*, 1983). Tuy nhiên, những nghiên cứu sâu hơn về miễn dịch của HA tái tổ hợp đã cho thấy chỉ kháng thể đa dòng kháng lại HA trên vỏ virus mới liên kết được với kháng nguyên tái tổ hợp, trong khi đó, kháng thể có khả năng trung hoà virus được hệ miễn dịch của động vật sinh ra để kháng lại epitope đặc hiệu trên HA lại không nhận biết được kháng nguyên tái tổ hợp này. Vì vậy HA1-1 và HA1 tái tổ hợp được tạo ra không có khả năng kích thích hệ miễn dịch của động vật sinh kháng thể trung hoà virus cũng như kháng thể ức chế ngưng kết hồng cầu HI. Điều này được giải thích là do cấu trúc bậc ba của kháng nguyên tái tổ hợp không giống với kháng nguyên tự nhiên (Nayak *et al.*, 1985). Thioredoxin là một protein được sử dụng nhiều trong các thí nghiệm biểu hiện gen dạng dung hợp vì protein này có khả năng làm tăng mức độ biểu hiện protein ngoại lai do làm tăng tỷ lệ protein tái tổ hợp có cấu trúc cuộn xoắn đúng, chính xác khi được tổng hợp trong tế bào *E. coli*. Vì vậy, với mục đích tạo được protein HA5-1 có khả năng sinh miễn dịch tốt, chúng tôi đã dung hợp gen *ha5-1* với gen *trx* trong vector pET22trx để biểu hiện gen trong tế bào *E. coli* BL21. Gen *ha5-1* trong vector được biểu hiện dưới sự điều khiển của T7 promoter và được điều hòa chặt chẽ bởi chất cảm ứng IPTG có trong môi trường.

Các protein tái tổ hợp tạo ra dưới dạng không tan thường là không có hoạt tính và có cấu trúc bậc ba không chính xác. Vì vậy, để kiểm tra sơ bộ chất lượng của TrxHa5-1, chúng tôi đã kiểm tra lượng protein tái tổ hợp ở pha tan và pha không tan. Tế bào sau khi nuôi cấy cảm ứng được hòa vào đệm TE có chứa 0.1 mg/ml lysozyme. Sau khi ủ trong vòng 1 giờ ở 37°C, mẫu được lấy ra để siêu âm và ly tâm. Protein tan được thu lại, còn protein không tan được hòa trở lại đệm và dùng để điện di kiểm tra. Gel sau khi điện di

và nhuộm với Commassie blue R250 được đưa vào máy VersaDoc Imaging system, Model 4000 (Bio-Rad, Mỹ) và dùng phần mềm Quantity one 4.6.1 để sơ bộ kiểm tra hàm lượng protein tái tổ hợp ở pha tan và pha không tan. Kết quả cho thấy, protein lai TrxHA5-1 được tổng hợp ra nằm trong pha tan rất ít (khoảng 10%) và còn lại là ở pha không tan (Hình 3).

So với các nghiên cứu trước, khi protein HA5-1 biểu hiện dưới dạng dung hợp với Trp, protein tái tổ hợp được tổng hợp ra nằm hoàn toàn ở pha không tan. Như vậy, chúng tôi có thể hy vọng rằng protein HA5-1 được tạo ra dưới dạng dung hợp với Trx sẽ có khả năng sinh miễn dịch tốt.



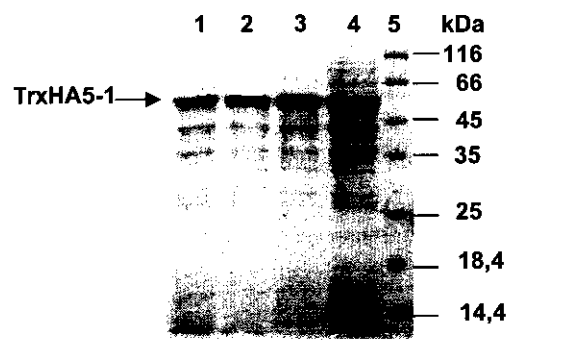
Hình 3. Protein từ chủng *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang gen *trxha5-1*. 1: Protein ở pha tan; 2: Protein ở pha không tan; 3: Thang protein chuẩn (Fermentas).

Tối ưu điều kiện biểu hiện gen

Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng biểu hiện gen ha5-1

Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng lớn đến hàm lượng và chất lượng protein tái tổ hợp được tạo ra. Thông thường, ở 37°C, tế bào *E. coli* sinh trưởng tốt nhất, đồng thời quá trình sinh tổng hợp protein của chúng diễn ra mạnh mẽ, vì vậy, khi biểu hiện một số gen có mã bộ ba tương đồng với mã bộ ba trong *E. coli*, chúng chủ sẽ tổng hợp ở ạt một lượng rất lớn protein ngoại lai. Song song với việc tổng hợp mạnh protein, các protease cũng được tổng hợp với lượng lớn. Vì thế, những protein ngoại lai nhạy cảm với quá trình proteolytic sẽ bị protease thủy phân nhanh chóng. Trong những trường hợp này để thu được lượng lớn protein ngoại lai, chúng cần được nuôi cấy ở nhiệt độ thấp hơn. Khi protein tái tổ hợp được tổng hợp với lượng lớn trong tế bào, các chaperone và protein tham gia trong hình thành

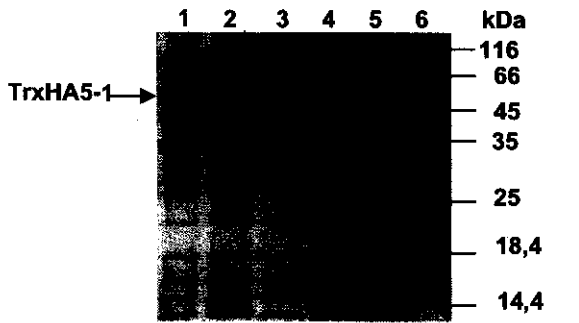
cấu trúc protein không đáp ứng đủ nhu cầu của protein tái tổ hợp được sinh ra nên thường dẫn đến cấu trúc sai lệch và không có chức năng. Trong thí nghiệm biểu hiện gen *ha5-1* trong *E. coli*, chúng tôi đã khảo sát biểu hiện protein ở 22, 28, 30 và 37°C. Nhờ phần mềm Quantity one 4.6.1, chúng tôi tính toán được ở 22, 28, 30 và 37°C, hàm lượng protein HA5-1 tái tổ hợp được tổng hợp tương ứng với 78, 110, 126, 142 mg trong 1 l môi trường nuôi cấy. Như vậy, hàm lượng protein tái tổ hợp biểu hiện ở 30 và 37°C là gần tương đương nhau tuy nhiên ở 37°C, lượng protein tái tổ hợp chỉ đạt 9,3% so với protein tổng số, còn ở 30°C, protein tái tổ hợp đạt 20% protein tổng số và cao nhất ở 25°C, ở nhiệt độ này protein tái tổ hợp đạt 50% so với protein tổng số và protein tái tổ hợp nằm ở pha tan nhiều hơn (kết quả không thông báo). Vì thế, chúng tôi chọn nhiệt độ 25°C để biểu hiện gen trong tế bào *E. coli* BL21.



Hình 4. Protein tổng số từ chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21 mang vector pET22*Trxha1* được cảm ứng bằng 0,5 mM IPTG ở các nhiệt độ khác nhau. 1-4 : Nhiệt độ cảm ứng tương ứng 22, 28, 30 và 37°C; 5: Thang protein chuẩn (Fermentas).

Ảnh hưởng của nồng độ IPTG lên khả năng sinh tổng hợp HA5-1

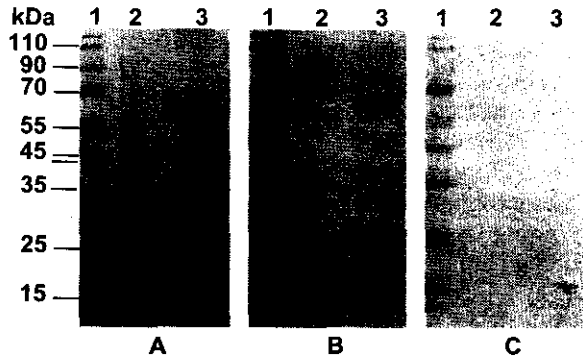
Xác định được nồng độ IPTG vừa đủ để cảm ứng tổng hợp protein tái tổ hợp là một trong những bước quan trọng trong quá trình lên men. Nồng độ IPTG quá lớn có thể sẽ làm giảm lượng protein tái tổ hợp thu được. Vì vậy, trong thí nghiệm này chúng tôi kiểm tra khả năng sinh tổng hợp TrxHa5-1 của chủng tái tổ hợp khi được nuôi cấy cảm ứng với nồng độ 0,1, 0,5, 1, 1,5 và 2 mM. Kết quả cho thấy khi chủng tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường cảm ứng có chứa 0,5 mM IPTG, hàm lượng protein tái tổ hợp được tổng hợp là nhiều nhất (Hình 5).



Hình 5. Protein tổng số từ chủng tái tổ hợp *E. coli* BL21 mang vector pET22*Trxha1* được cảm ứng ở các nồng độ IPTG khác nhau. 1-5 : Nồng độ chất cảm ứng IPTG tương ứng 0,1, 0,5, 1, 1,5 và 2 mM. 6: Thang protein chuẩn (Fermentas).

Tinh chế TrxHa5-1 và nghiên cứu khả năng nhận biết TrxHA5-1 của kháng thể đa dòng kháng H5N1

TrxHA5-1 tái tổ hợp được thiết kế gắn thêm một đoạn trình tự gồm 6 histidine, vì thế protein tái tổ hợp dễ dàng được tinh sạch bằng cột sắt ký ái lực. Dịch tế bào thu được sau khi nuôi cấy cảm ứng bằng IPTG được bổ sung lysozyme 1 mg/ml và ủ ở 37°C trong 1 giờ để phá vỡ thành tế bào. Sau đó, dùng NaOH 1 M để điều chỉnh mẫu tế bào đã ly giải đến pH ~10 nhằm tạo môi trường tối ưu cho quá trình siêu âm. Do 90% TrxHA5-1 được tổng hợp trong *E. coli* ở dạng không tan (inclusion body), nên để protein có thể tồn tại trong dung dịch, mẫu sau khi ly giải được bổ sung thêm 5 M urea để làm biến tính protein. Sau đó, tiến hành siêu âm mẫu trên đá đến khi thu được dịch trong suốt. Protein nằm trong pha tan được thu lại bằng ly tâm 10000 vòng/ phút trong 10 phút và được điều chỉnh đến pH~7 để tiến hành đưa mẫu lên cột sắc ký ái lực. Sau khi rửa để loại bỏ các protein không có ái lực hoặc ái lực yếu với cột, protein tái tổ hợp được thu theo phân đoạn bằng đệm thu mẫu không chứa urea để làm hồi tính protein. Protein trên mỗi phân đoạn được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacryamide 12,6% trong điều kiện biến tính có SDS. Kết quả, protein TrxHa5-1 đã được tinh chế thành công. Chúng tôi tiến hành kiểm tra sơ bộ chất lượng của kháng nguyên tái tổ hợp thông qua khả năng liên kết kháng nguyên tái tổ hợp với kháng thể đa dòng ở gà kháng lại chủng virus làm vaccine H5N1 bằng phản ứng Western Blot (Hình 6).



Hình 6. Phân tích khả năng liên kết giữa kháng nguyên tái tổ hợp với kháng thể kháng viurs H5N1. A: Protein trên gel polyacrylamide được nhuộm commassie blue R250; B: Màng được phủ với kháng thể trong huyết thanh gà kháng chủng virus H5N1; C: Màng được phủ với kháng thể trong huyết thanh gà sạch; 1: Thang protein chuẩn (Fermentas); 2: Protein từ chủng *E. coli* BL21 mang pET22trx; 3: Protein TrxHa1 tinh sạch.

Quan sát trên màng PVDF (Hình 6), trên đường chạy protein đối chứng tách chiết từ chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 tái tổ hợp không mang gen *ha5-1* chúng tôi thấy không xuất hiện băng có kích thước tương ứng với gen TrxHa5-1. Trong khi đó, trên đường chạy protein TrxHa5-1 tinh chế thấy xuất hiện băng rất rõ nét khi màng được phủ với kháng thể từ huyết thanh gà kháng H5N1 và màng phủ với kháng thể từ huyết thanh gà sạch không thấy xuất hiện băng protein này. Điều đó chứng tỏ kháng nguyên tái tổ hợp TrxHA5-1 được tổng hợp trong *E. coli* chứa quyết định kháng nguyên nằm trên tiểu phần HA5-1.

KẾT LUẬN

Gen *ha5-1* mã hoá tiểu phần đầu của kháng nguyên Hemagglutinine của virus cúm A/H5N1 phân lập từ mẫu bệnh phẩm Việt Nam đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 dưới dạng dung hợp với protein Thioredoxin với vector pET22b(+). Protein tái tổ hợp sau khi được tinh chế thành công bằng sắc ký ái lực có khả năng bắt cặp đặc hiệu với kháng thể tự nhiên kháng virus H5N1. Nghiên cứu này đã mở ra cơ hội cho những nghiên cứu tiếp theo về khả năng sinh miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp này và là cơ sở để đưa cấu trúc gen lại vào biểu hiện trong nấm men *P. pastoris*.

Lời cảm ơn: Bài báo được thực hiện bằng kinh phí đề tài: “Nghiên cứu sản xuất vaccine phòng bệnh cúm gia cầm bằng chủng H5N1 Việt Nam” do Viện Thú y chủ trì và Dự án thuộc Quỹ nghiên cứu Việt Nam - Thụy Điển cấp cho PGS. TS. Trương Nam

Hải. Công trình được thực hiện nhờ trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen Z (2004) Medical progress. Influenza DNA vaccine: an update. *Chin Med J* 117(1): 125-132.
- Daly JM, Mumford JA (2001) *Influenza infection*. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York, USA.
- Davis AR, Nayak DP, Ueda M, Hiti AL, Dowbenko D, Kleid DG (1981) Expression of antigenic determinants of the hemagglutinin gene of a human influenza virus in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(9): 5376-5380.
- Deltito BJ, Ward JM, Hodgson J, Gershater CJL, Edwards H, Wysocki LA, Watson FA, Sanesh S, Kan JF (1995) Effect of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177(24): 7086-7091.
- Davis AR, Bos T, Ueda M, Nayak DP, Dowbenko D, Compans RW (1983) Immune response to human influenza virus hemagglutinin expressed in *Escherichia coli*. *Gene* 21(3): 273-284.
- Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, Renshaw M, Sambhara S, Katz JM (2002) DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis* 8(8): 796-801.
- Fedson DS (2005) Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development. *J Public Health Policy* 26: 4-29.

Gao W, Soloff AD, Lu X, Montecalvo A, Nguyen DC, Matsuoka Y, Robbin PD, Swayne DE, Donis RO, Katz JM, Barratt-Boyes SM, Gambotto A (2006) Protection of mice and poultry from lethal H5N1 avian influenza virus through adenovirus-based immunization. *J Virol* 80(4): 1959-1964.

Justewicz DM, Morin MJ, Robinson HL, Webster RG (1995) Antibody-forming cell response to virus challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 69(12): 7712-7717.

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

Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. (2004) Influenza: emergence and control. *J Virol* 78: 8951-8959.

Matsuoka Y, Chen H, Cox N, Subbarao K, Beck J, Swayne D (2003) Safety evaluation in chickens of candidate human vaccines against potential pandemic strains of influenza. *Avian Dis* 47: 926-930.

Nayak DP, Davis AR, McQueen NL, Bos TJ, Jabbar MA, Sivasubramanian N, Lionelli G (1985) Biological and immunological properties of haemagglutinin and neuraminidase expressed from cloned cDNAs in

prokaryotic and eukaryotic cells. *Vaccine* 3(3 Suppl): 165-171.

Nwe N, He Q, Damrongwatanapokin S, Du Q, Manopo I, Limlamthong Y, Fenner BJ, Spencer L, Kwang J (2006) Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiol* 24: 6-16.

Ross TM, Xu Y, Bright RA, Robinson HL (2000) C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat Immun* 1(2): 127-131.

Saelens X, Vanlandschoot P, Martinet W, Maras M, Neirynck S, Contreras R, Fiers W, Jou WM (1999) Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. *Eur J Biochem* 260: 166-175.

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Treanor JJ, Wilkinson BE, Masseoud F, Hu-Primmer J, Battaglia R, O'Brien D, Wolff M, Rabinovich G, Blackwelder W, Katz JM (2001) Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin vaccine for H5 influenza in humans. *Vaccine* 19: 1732-1737.

EXPRESSION OF *HA5-1* GENE CODING FOR SUBUNIT OF HEMAGGLUTININ (HA) ANTIGEN OF INFLUENZA VIRUS A/H5N1 IN *ESCHERICHIA COLI*

Van Thi Nhu Ngoc¹, Do Thi Huyen¹, Nguyen Thanh Nhan², Nguyen Phuoc Hai³, Truong Van Dung⁴, Truong Nam Hai^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²Hanoi University of Science, VNU

³Kien Giang Teachers' Training College

⁴Institute of Veterinary Research

SUMMARY

Highly pathogenic avian influenza is a transmission disease which spreads rapidly and results in highly lethal proportion of infected avian. This disease is caused by influenza A virus that belongs to the family *Orthomyxoviridae* with several different subtypes. Nowadays, 16 subtypes have been identified; most of them cause infection in birds and possibly in human. Our aim is to construct an influenza vaccine for poultry based on recombinant HA derived from influenza virus H5N1. In order to do so, cloned *ha5-1* gene coding for a subunit of the strain A/H5N1 influenza virus hemagglutinin (HA), lacking a native signal peptide was fused to a bacterial gene *trx* coding for thioredoxin in the expression vector pET22_{trx}. The novel vector was transformed into *E. coli* BL21 for surveying the expression level of the gene in *E. coli*. As expected, recombinant fusion protein TrxHA5-1 of 57 kDa was expressed at high level in *E. coli*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562790; Fax: 84-4-7562790; E-mail: tnhai@hn.vnn.vn

BL21 under the regulation of T7 lac promoter with inducer IPTG 0.5 mM. However, only small amount of recombinant proteins was soluble (10%). At 22, 28, 30, 37°C, amounts of the HA5-1 synthesized by recombinant strains reached to 78, 110, 126, 142 mg/l after 4 hours of cultivation in induction medium. However, protein produced at 25°C had the highest solubility and occupied about 50% of total proteins and at 30°C, expression level of the recombinant proteins was reduced (about 20% of total protein). The chimeric protein was successfully purified by his-tag affinity column under denaturizing and re-denaturation conditions. The TrxHa5-1 expressed in the bacteria was recognized by polyclonal HA antibodies against H5N1 vaccine strain in the chicken sera.

Keywords: *E. coli BL21, ha5-1, pET22-trx, recombinant protein, sub-unit vaccine*