

KẾT QUẢ BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT INTERFERON ALPHA GÀ TRONG *E. COLI*

Nguyễn Thu Hà¹, Đồng Văn Quyên²

¹ Trường Đại học Thành Đông

Email: nth292001@gmail.com

² Học viện Công nghệ sinh học, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÓM TẮT

Dịch bệnh do virus là mối đe dọa thường xuyên và gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi gà ở Việt Nam. Vì vậy, việc tạo ra các chế phẩm sinh học có hoạt tính tăng cường khả năng chống nhiễm virus cho gà có thể mang lại giá trị kinh tế lớn cho ngành chăn nuôi. Nghiên cứu này tập trung vào việc tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện gene mã hóa Interferon-alpha của gà (ChIFN- α) - một họ cytokine quan trọng trong phản ứng miễn dịch kháng virus - trên hệ thống *E. coli* Rosetta và tinh sạch sản phẩm protein tái tổ hợp. Kết quả cho thấy ChIFN- α được biểu hiện chủ yếu dưới dạng thể vùi và có thể được tinh sạch với độ tinh khiết cao. Những kết quả thu được cho thấy, việc sản xuất ChIFN- α tái tổ hợp quy mô lớn trên *E. coli* có tiềm năng ứng dụng lớn cho ngành chăn nuôi gà ở nước ta.

Từ khóa: interferon-alpha gà, *E. coli*, cúm gia cầm, biểu hiện gene.

ABSTRACT

Viral diseases are a frequent threat and cause severe damage to the poultry industry in Vietnam. Therefore, the creation of biological products that enhance the ability to resist viral infections in chickens can bring significant economic value to the poultry industry. This study focuses on optimizing the conditions for expressing the gene encoding chicken Interferon- α (ChIFN- α) - an important cytokine family in the antiviral immune response - on the *E. coli* Rosetta system and purifying the recombinant protein product. The results show that ChIFN- α is mainly expressed in the form of inclusion bodies and can be purified with high purity. The obtained results indicate that the production of large-scale recombinant ChIFN- α on *E. coli* has great potential for application in our country's poultry industry.

Keywords: Chicken interferon-alpha; *E. coli*; avian influenza, gene expression.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các dịch bệnh do virus như cúm, Gumboro và Newcastle đang là mối đe dọa lớn đối với ngành chăn nuôi gia cầm tại Việt Nam. Tính đến tháng 11 năm 2021, dịch cúm gia cầm đã ảnh hưởng đến 31 tỉnh thành và đã dẫn đến việc tiêu hủy hơn 400 nghìn con gà. Không có thuốc hiệu quả để điều trị nhiễm virus và việc sử dụng thuốc kháng sinh không phải là một giải pháp. Tiêm

phòng vaccine là cách tốt nhất để ngăn ngừa và kiểm soát dịch bệnh. Tuy nhiên, virus có khả năng biến đổi và làm giảm hiệu quả của vaccine. Một ví dụ là vaccine Marek chỉ có thể ngăn chặn triệu chứng mà không ngăn chặn sự lây lan của virus.

Interferon là một nhóm các protein tự nhiên được sản xuất bởi các tế bào của hệ miễn dịch ở hầu hết các động vật, nhằm chống lại các tác

nhân ngoại lai như virus, vi khuẩn, ký sinh trùng và tế bào ung thư. Nó chỉ được tổng hợp khi có mặt các chất sinh interferon (còn gọi là interferonogene). Interferon thuộc một lớp lớn của glycoprotein được biết đến dưới cái tên cytokine (chất hoạt hoá tế bào). Interferon đóng vai trò quan trọng trong cửa ngõ miễn dịch, nó là hàng rào bảo vệ đầu tiên của cơ thể chống lại virus và sự phát triển bất thường của tế bào.

Trên động vật có các nhóm interferon chính:

Interferon type I gồm chủ yếu là: alpha ($IFN\alpha$), beta ($IFN\beta$)...

Interferon type II gồm: gamma ($IFN\gamma$).

Đặc tính sinh học: Chúng bền vững trước nhiều loại enzyme như : ribonuclease, deoxyribonuclease...

nhưng bị phân giải bởi protease và bị phá hủy bởi nhiệt độ. Đặc tính sinh học quan trọng của interferon là không có tác dụng đặc hiệu đối với virus (interferon được sinh ra do một loại virus có thể kìm hãm sự nhân lên của những virus khác).

Sau khi nhiễm virus, tế bào bị cảm ứng và sản sinh ra interferon, interferon không có tác dụng bảo vệ tế bào mẹ mà chỉ bảo vệ các tế bào bên cạnh, ở các tế bào này virus vẫn hấp phụ lên vách tế bào và xâm nhập vào bên trong tế bào, nhưng đến giai đoạn sao chép thông tin của virus thì interferon có tác dụng ức chế, kìm hãm sự tổng hợp mRNA của virus, mRNA của virus không được tổng hợp thì sự chuyển hóa acid nucleic và protein của virus cũng không tiến hành được, do đó không có hạt virus mới được giải phóng ra.

Hoạt động của $IFN\alpha$ không có tính đặc hiệu đối với loài.

Nghiên cứu này tập trung vào việc biểu hiện và tinh chế interferon-alpha gà ($ChIFN-\alpha$) trong hệ thống vi khuẩn *E. coli* để tạo ra một lượng lớn $ChIFN-\alpha$ giúp tăng cường sức đề kháng của gia cầm đối với nhiều mầm bệnh, với giá thành hợp lý, sử dụng trong ngành chăn nuôi. Để kiểm tra sự biểu hiện của protein, trình tự gene $IFN-\alpha$ đã được tối ưu hóa và chèn vào vector pET32a(+), sau đó biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* (Rosetta). Một nỗ lực nhanh chóng để tinh chế protein cũng đã được thực hiện. Những kết quả này đóng vai trò là bước cơ bản hướng tới sản xuất hàng loạt $ChIFN\alpha$ tái tổ hợp cho ngành chăn nuôi gia cầm.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gene $ChIFN\alpha$ được đặt hàng từ GeneScript và pET32a (+) và được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Vi sinh vật phân tử, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các chủng *E. coli* DH5 α và *E. coli* Rosseta được lưu giữ trong phòng thí nghiệm và được sử dụng để nhân bản vector pET32a/ $ChIFN-\alpha$ hoặc làm vật chủ biểu hiện.

Cột sắc ký ái lực The ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Thermo Science, Hoa Kỳ) được sử dụng để tinh sạch protein tái tổ hợp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Xây dựng vector biểu hiện protein

Gene $ChIFN\alpha$ (chiều dài 585 bp) (Genebank AM049251) đã được tối ưu hóa để sử dụng codon trong hệ thống

biểu hiện *E. coli* và sau đó chèn vào vector pET32a (+) thông qua các vị trí nhận biết enzyme EcoRI và HindIII. T4 ligase đã được sử dụng để thất cuộc thí nghiệm. Vector đã tạo được đặt tên là pET32a/ChIFN- α .

2.2.2. Chuẩn bị các tế bào thẩm quyền và nhân bản pET32a/ChIFN- α

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α được sử dụng để nhân bản pET32a/ChIFN- α . Để chuẩn bị các tế bào có thẩm quyền, các tế bào DH5 α bảo quản trong tủ lạnh -80°C được lấy ra và cấy rìa trên đĩa thạch Luria-Bertani (LB). Một khuẩn lạc được chọn và nuôi cấy trong 2 mL môi trường LB (10g/L tryptone, 10 g/L chiết xuất nấm men, 8 g/L NaCl, pH=7,4) ở 37°C và lắc 150 vòng/phút trong 16 giờ. Huyền phù vi khuẩn sau đó được nuôi cấy trong 15-20 mL môi trường LB cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,5 - 0,6. Huyền phù tế bào được chia thành các ống Eppendorf 1,5 mL và đặt trên đá trong khoảng 30 phút đến 1 giờ trước khi ly tâm ở tốc độ 4.000 vòng/phút trong 4°C 10 phút. Phần nổi phía trên được loại bỏ trong khi các viên tế bào được thu thập và rửa bằng 500 μ L 100mM CaCl₂. Sau khi ủ trên đá trong 30 phút, các tế bào được tái huyền phù trong 100 μ L CaCl₂ 100mM cộng với glycerol. Các tế bào có khả năng được giữ trên băng trong 1 giờ trước khi chuyển đổi hoặc được lưu trữ ở -80°C để sử dụng lâu dài.

Để biến nạp, 1 μ L plasmid tái tổ hợp pET32a/ChIFN- α đã được bổ sung vào 100 μ L tế bào đủ năng lực DH5 α . Hỗn hợp này sau đó được giữ trên đá trong

30 phút rồi sốc nhiệt ở 42°C trong 1 phút 30 giây. Sau đó, lọ tế bào được bổ sung 500 μ L môi trường LB và nuôi cấy ở 37°C, lắc 150 vòng/phút trong 1 giờ trước khi cấy vi khuẩn trên môi trường thạch LB chứa ampicillin (nồng độ cuối cùng 100 μ g/mL) qua đêm để chọn lọc. Các khuẩn lạc thể biến đổi ngẫu nhiên mọc trên đĩa LB + ampicillin được chọn để tách plasmid. Để kiểm tra xem các khuẩn lạc thể biến nạp có chứa vector pET32a/ChIFN- α tái tổ hợp hay không, việc cắt bỏ bằng enzyme giới hạn EcoRI và HindIII được thực hiện song song với giải trình tự bằng cách sử dụng đoạn mồi khởi động và đoạn kết thúc T7.

2.2.3. Biểu hiện gene trong tế bào *E. coli* Rosetta

Chủng *E. coli* Rosetta được sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp. Việc chuyển đổi đã được thực hiện như mô tả ở trên. Một khuẩn lạc chứa plasmid pET32a/ChIFN- α được nuôi cấy trong 3mL LB + ampicillin ở 37°C, lắc 150 vòng/phút trong 16 giờ. Tiếp theo, huyền dịch vi khuẩn được cấy truyền 1% vào 2 lọ penicillin, mỗi lọ chứa 3 mL môi trường LB + ampicillin, sau đó ủ ấm đến khi OD₆₀₀ đạt 0,5 – 0,6. Sau khi đạt được OD yêu cầu, mỗi chai penicillin được dán nhãn, một chai không bổ sung IPTG làm đối chứng và chai còn lại được tạo cảm ứng bằng IPTG để biểu hiện protein ở các nhiệt độ, nồng độ IPTG và thời gian lấy mẫu khác nhau. Các thí nghiệm này nhằm mục đích tìm ra các điều kiện biểu hiện có thể mang lại năng suất protein cao nhất và độ hòa tan tốt nhất. Các điều

kiện của mỗi thí nghiệm được tóm tắt trong bảng dưới đây.

Bảng 1. Thí nghiệm xác định điều kiện tối ưu cho protein

	Nhiệt độ (°C)	Nồng độ IPTG (mM)	Thời gian (giờ)
Thí nghiệm 1	15	1	16
Thí nghiệm 2	25	1	10
Thí nghiệm 3	30	1	10
Thí nghiệm 4	37	1	4
Thí nghiệm 5	15	0.5	24
Thí nghiệm 6	15	0.5	48
Thí nghiệm 7	15	0.5	72
Thí nghiệm 8	37	0.2	4
Thí nghiệm 9	37	0.5	4

Tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 5-10 phút ở 4°C, rửa một lần với 300 µl Tris-HCl 20 mM, pH 8 sau đó được tạo huyền phù lại trong 300 µL Tris-HCl 20 mM, pH 8 trước khi bảo quản ở -20 °C. Để nghiên cứu khả năng hòa tan của protein được biểu thị, các mẫu được xử lý bằng sóng siêu âm (xung 10 giây – 10 giây nghỉ, biên độ 35%), sau đó ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Phần nổi phía trên hòa tan được thu thập vào một ống Eppendorf mới. Phần

cặn không tan được rửa một lần bằng Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, sau đó được hòa tan lại trong 300µl Tris-HCl 20mM, pH 8,0.

2.2.4. Phân tích SDS-PAGE của protein biểu hiện

Sau khi biểu hiện, sự hiện diện của protein và các mẫu biểu hiện của nó (hòa tan hoặc không hòa tan) được phân tích bằng điện di gel natri dodecyl-sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) trên gel polyacrylamide 12,6% (Bảng 2). Tóm lại, các mẫu protein được trộn với dung dịch đệm mẫu PAGE phân giải urê 2X (1,25 mL Tris 0,5M pH 6,8, 2 mL SDS 10%, 3,6 g urê, 699,1 µL mercaptoethanol 1M, 3 mL glycerol, 0,5 mL 1% bromophenol blue) và biến tính ở 100°C trong 8 phút và ly tâm ở 10.000 vòng / phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó nạp vào gel. Gel được chạy ở 35 A trong khoảng 1,5 giờ trong dung dịch đệm chạy SDS 1X (3,03 g trisbase, 14,44 g glycine, 1 g SDS trong 1000 mL nước khử ion) cho đến khi bromophenol chạm đến mép dưới của gel. Gel được nhuộm bằng dung dịch nhuộm màu (25 mg coomassie màu xanh, 100 ml dung dịch (50% methanol, 10%CH₃COOH, 40% nước khử ion) và được loại bỏ bằng dung dịch nhuộm màu (125 mL methanol, 50 mL CH₃COOH, 325 mL nước khử ion) cho đến khi gel nền trong suốt

Bảng 2. Thành phần của polyacrylamide gel

Thành phần	Gel biến tính	
	Gel tách (µl)	Gel cô (µl)
H ₂ O	1,230	693.75
Tris- HCl	626	

Thành phần	Gel biến tính	
3M, pH= 8.8		
Tris- HCl 0.5M, pH= 6.8		312.5
Acrylamide	2,100	212.5
Glycerol	1,000	
SDS 10%	25	6.25
APS 10%	25	12.5
Temed	4	1
Tổng	5,010	1,238.5

2.5. Tinh sạch protein tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp được đánh dấu 6xHis được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực ProBond™ Nickel Chelating Resin trong điều kiện biến tính theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đầu tiên, 2 mL nhựa đã được thêm vào cột và làm lắng bằng trọng lực. Sau khi hút dịch nổi, cột được rửa một lần với 6 ml dung dịch đệm liên kết biến tính (urê 8 M, natri photphat 20 mM pH 7,8, 500 mM NaCl). Sau đó, phần không hòa tan của protein biểu hiện được lắng với 8 ml đệm liên kết biến tính, được thêm vào cột trong 1 giờ nhẹ nhàng. Lysate chảy qua đã được thu thập, dán nhãn và lưu trữ ở 4°C để phân tích SDS-PAGE. Tiếp theo, cột là rửa một lần với 4 ml đệm liên kết biến tính. Bốn lần rửa tiếp theo đã được thực hiện, hai lần đầu tiên sử dụng 4 ml dung dịch đệm rửa biến tính (8 M urê 20 mM, natri photphat pH 6,0, 500 mM NaCl) cho mỗi lần rửa; tiếp theo là hai lần rửa khác sử dụng 4 mL dung dịch đệm rửa 2 (50mM NaH₂PO₄, 500mM NaCl, 40mM imidazole, pH 8) cho mỗi lần rửa. Kế tiếp, protein được rửa giải bằng 8 mL dung dịch đệm rửa giải (8 M urê, 20 mM NaH₂PO₄ pH 4,8, 500 mM NaCl, 400 mM imidazole) và được đánh dấu là

F1-8. Các mẫu trong tất cả các bước thanh lọc đã được thu thập, dán nhãn và lưu trữ ở 4°C để phân tích SDS-PAGE.

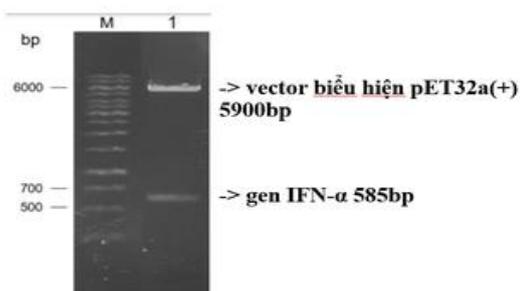
3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Nhân bản và giải trình tự vector biểu hiện pET32a/ChIFN- α

Để biểu hiện protein ChIFN- α , điều đầu tiên là sao chép trình tự gene liên tiếp. Trình tự mã hóa gene cho ChIFN- α đã được tối ưu hóa để biểu hiện quá mức trong *E. coli*, sử dụng công cụ do genescript cung cấp (<https://www.genescript.com/genesmartfree-gene-codon-timization.html>) rồi tổng hợp. Trình tự ChIFN- α được tổng hợp có chiều dài 585 bp và chứa các vị trí nhận biết enzyme EcoRI và HindIII ở 5' và đầu 3' tương ứng. Vector pET32a(+) và ChIFN- α được tổng hợp đều được xử lý bằng EcoRI và HindIII. ChIFN- α đã tiêu hóa được ghép vào vector pET32a(+) được cắt bằng các enzyme cắt giới hạn giống nhau, bằng cách sử dụng T4 DNA ligase để xây dựng một vector biểu hiện tái tổ hợp (pET32a/ChIFN- α). Vector tái tổ hợp pET32a/ChIFN- α được chuyển nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α và nuôi cấy trên môi trường thạch LB chứa ampicillin (nồng độ cuối cùng 100 μ g/mL). Các plasmid từ các khuẩn lạc đã trưởng thành được chọn ngẫu nhiên để tách và cắt plasmid với enzyme hạn chế EcoRI và HindIII để chọn plasmid tái tổ hợp chứa genee quan tâm. Song song, để xác nhận genee nhân bản đã được giải trình tự nucleotide ChIFN- α bằng cách sử dụng trình khởi động T7 và mỗi kết thúc đã được thực hiện.

Sau khi xử lý bằng enzyme cắt giới hạn, kết quả trên gel agarose 1% cho thấy các đoạn DNA có kích thước xấp xỉ 585 và 5.900 bp, tương ứng với kích

thước lý thuyết của gene ChIFN- α và vector còn lại (Hình 1). Ngoài ra, kết quả giải trình tự đã tiết lộ danh tính trình tự 100% giữa gene ChIFN- α được tối ưu hóa trong vector nhân bản và được tổng hợp bởi GeneScript. Những kết quả này chỉ ra rằng ChIFN- α đã được chèn thành công vào pET32a(+) và nhân bản vào chủng DH5 α .



Hình 1. Vector pET32a/ChIFN- α được cắt bằng enzyme cắt giới hạn EcoRI

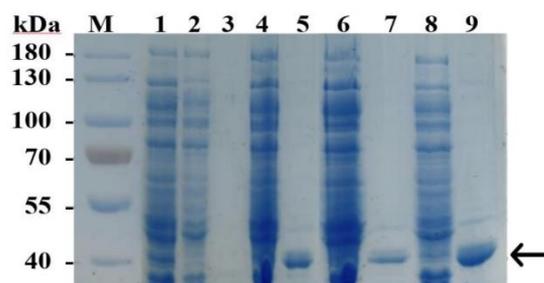
Và HindIII. M: Điểm đánh dấu; **Làn 1:** Sản phẩm PCR kích thước gene ChIFN- α

3.2. Biểu hiện ChIFN- α tái tổ hợp ở *E. coli*

Nghiên cứu này đã chọn *E. coli* Rosetta làm vật chủ biểu hiện gene ChIFN- α . Plasmid tái tổ hợp pET32a/ChIFN- α được chuyển vào *E. coli* Rosetta bằng phương pháp sốc nhiệt. Các khuẩn lạc biến nạp được nuôi cấy trong môi trường LB có chứa ampicillin cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,5-0,6. Vi khuẩn *E. coli* phát triển nhanh chóng trong khoảng nhiệt độ từ 5-37°C. Nhiệt độ ảnh hưởng đáng kể đến trạng thái biểu hiện và số lượng của protein tái tổ hợp. Về mặt lý thuyết, trọng lượng phân tử của protein tái tổ hợp là 40 kDa, bao gồm 21,9 kDa của ChIFN- α , 11,5 kDa Trx-tag và 6,6 kDa His-tag. Để tìm ra các điều kiện tối ưu cho sự biểu hiện quá mức của ChIFN- α , một số yếu tố ảnh hưởng đến sự biểu hiện của protein tái tổ hợp đã được thử nghiệm. Đầu tiên, nồng độ IPTG cao nhất là 1mM được sử dụng

để tối ưu hóa nhiệt độ biểu hiện nằm trong khoảng từ 15, 25, 30 và 37°C.

Kết quả protein biểu hiện được quan sát thấy trên gel polyacrylamide 12,6% (Hình 2). Ở 1mM IPTG, sau 16 giờ cảm ứng ở 15°C, protein tái tổ hợp ChIFN- α không xuất hiện ở cả phần hòa tan và không hòa tan. Ở 25°C, 30°C sau 10 giờ và 37°C sau 4 giờ cảm ứng IPTG, dải ChIFN- α với kích thước 40 kDa chỉ xuất hiện trong phần protein không hòa tan



Hình 2. Biểu hiện của protein ChIFN- α tái tổ hợp ở vi khuẩn *E. coli* Rosetta được tạo ra bằng 1mM IPTG ở các nhiệt độ khác nhau.

M: Điểm đánh dấu; **Làn 1:** tổng protein không gây cảm ứng IPTG; **Làn 2-9:** protein hòa tan và không hòa tan sau thời gian và nhiệt độ cảm ứng IPTG khác nhau tương ứng; **Làn 2-3:** ở 15°C trong 16 giờ cảm ứng; **Làn 4-5:** ở 25°C trong 10 giờ cảm ứng; **Làn 6-7:** ở 30°C trong 10 giờ cảm ứng; **Làn 8-9:** ở 37°C sau 4 giờ cảm ứng.

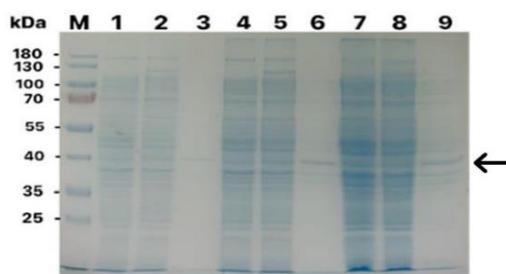
Nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng ở nồng độ cảm ứng IPTG thấp và nhiệt độ nuôi cấy thấp, khả năng hòa tan của protein tái tổ hợp trong *E. coli* có thể cải thiện (Sørensen & Mortensen, 2005). Nồng độ IPTG và thời gian cảm ứng là những yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng và trạng thái biểu hiện của protein tái tổ hợp.

Do đó, mức biểu hiện của ChIFN- α tái tổ hợp ở 15°C với nồng độ IPTG 0,5

mM được đánh giá thêm trong tối đa 72 giờ sau khi cảm ứng (Hình 3). Kết quả điện di trên gel polyacrylamide 12,6% cho thấy rằng ngay cả sau 72 giờ sau cảm ứng, dải protein ở 40 kDa không thể được quan sát rõ ràng ở phần hòa tan hoặc không hòa tan, cho thấy rằng protein ChIFN- α tái tổ hợp này biểu hiện yếu ở 15° C với 0,5 mM IPTG.

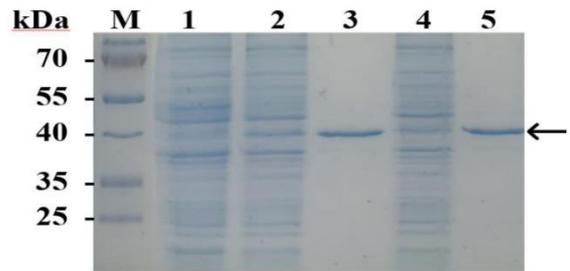
Các thử nghiệm tiếp theo đã được kiểm tra với nồng độ IPTG thấp hơn - 0,2 mM và 0,5 mM - ở 37°C trong 4 giờ cảm ứng (Hình 4). Ở hai nồng độ IPTG thấp hơn, biểu hiện protein được quan sát thấy ở cả dạng hòa tan và không hòa tan; tuy nhiên, hầu hết protein tái tổ hợp được biểu hiện ở dạng không hòa tan (dải 40 kDa). Trong cùng điều kiện biểu hiện của quá trình nuôi cấy trong 4 giờ ở 37°C, protein tái tổ hợp được biểu hiện ở nồng độ 1 mM IPTG nhiều hơn so với ở nồng độ 0,2 mM IPTG và 0,5 mM IPTG.

Dựa trên kết quả khảo sát, ChIFN- α được biểu hiện hiệu quả ở điều kiện tối ưu 37°C, sau 4 giờ cảm ứng với nồng độ 1 mM IPTG



Hình 3. Biểu hiện của protein ChIFN- α tái tổ hợp ở *E. coli* Rosetta ở 15°C sau khi tạo ra 0,5mM IPTG tại các thời điểm khác nhau. M: điểm đánh dấu; Làn 1-9: tổng số protein không cảm ứng IPTG, protein hòa tan và protein không hòa tan tương ứng; Làn 1-2-3: sau 24 giờ cảm ứng; Làn 4-5-6:

sau 48 giờ cảm ứng; Làn 7-8-9: sau 72 giờ cảm ứng.



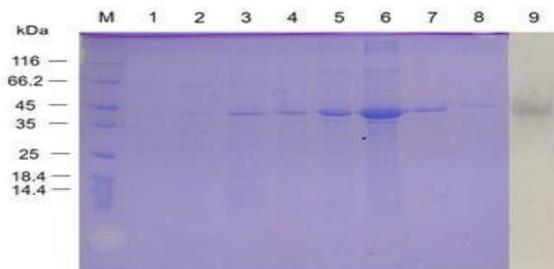
Hình 4. Biểu hiện của protein ChIFN- α tái tổ hợp ở *E. coli* Rosetta ở 37°C sau 4 giờ cảm ứng với các nồng độ IPTG khác nhau. M: điểm đánh dấu; Làn 1: tổng số protein không cảm ứng IPTG; Làn 2-3: protein hòa tan, không hòa tan được cảm ứng với 0,2 mM IPTG; Làn 4-5: các protein hòa tan, không hòa tan được cảm ứng với 0,5 mM IPTG.

3.3. Tinh sạch protein ChIFN- α tái tổ hợp

Tinh chế protein là một loạt các quy trình nhằm phân lập một hoặc một số protein từ một hỗn hợp phức tạp, thường là tế bào, mô hoặc toàn bộ sinh vật. Phương pháp tinh chế thường được xác định bởi kích thước protein, đặc điểm sinh lý hoặc tương tác ái lực protein. Hexahistidine (được gắn thẻ 6xHis) được gắn vào đầu C của ChIFN- α tái tổ hợp để giúp tinh chế enzyme dễ dàng hơn bằng sắc ký ái lực thẻ His. Thẻ His trong ChIFN- α sẽ liên kết chặt chẽ với các ion Ni²⁺ khi mẫu được đưa vào sắc ký ái lực chelate Ni²⁺, ChIFN- α được giữ lại trong cột trong khi các protein khác chảy ra ngoài. Protein tái tổ hợp được tinh chế trong Điều kiện biến tính bằng cách sử dụng ProBond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogene).

ChIFN- α tái tổ hợp được thu thập từ cột sắc ký ái lực với dung dịch đệm chứa 400 mM Imidazole. Cuối cùng, tám

phần, mỗi phần gồm 1 mL, được thu thập và kiểm tra trên SDS-PAGE 12,6%. Kết quả cho thấy protein tái tổ hợp tinh sạch bắt đầu xuất hiện từ phân số 3 đến 8; ở phân số 5 và 6, ChIFN- α được quan sát thấy ở các dải quan trọng nhất. Để xác nhận protein tinh khiết là ChIFN- α tái tổ hợp, phân tích Western blot được sử dụng để xác định các sản phẩm protein tinh khiết (Hình 5)



Hình 5. Protein ChIFN- α tái tổ hợp tinh sạch.

M: điểm đánh dấu; Làn 1-8: phân tích SDS-PAGE về các phân số của ChIFN- α tái tổ hợp được rửa giải bằng 400 mM Imidazole; Làn 9: Phân tích Western blot về khả năng phản ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp đối với kháng thể đơn cụ thể

4. BÀN LUẬN

Để sản xuất thành công số lượng lớn ChIFN- α tái tổ hợp cho ứng dụng quy mô lớn, tồn tại một số thách thức đáng kể bao gồm biểu hiện hiệu quả, độ hòa tan và độ tinh khiết. Trong hai nghiên cứu trước đây ở Việt Nam, ChIFN- α được biểu hiện trong hệ thống khác nhau: *Pichia pastoris* (tế bào nấm men) (Giang et al., 2020) và *Bacillus subtilis* (vi khuẩn) (Thu, 2012) nhưng hiệu quả phòng bệnh của sản phẩm thể hiện đối với mầm bệnh trên gà không cao và không ổn định. Sự lựa chọn của một máy chủ biểu hiện thích hợp ảnh hưởng mạnh mẽ đến sự biểu hiện của

một protein mục tiêu. Trong nghiên cứu của chúng tôi, hệ thống biểu hiện *E. coli* được lựa chọn nhờ các ưu điểm: sinh trưởng nhanh, dễ nuôi cấy, giá thành thấp và sự sẵn có của một số vectơ biểu hiện sinh vật nhân sơ (chẳng hạn như vectơ chuỗi pET) để sản xuất protein ngoại sinh, nhân dòng và biểu hiện protein tái tổ hợp. Ngoài ra, các thể dung hợp có thể được hợp nhất với gene mục tiêu trong các vectơ biểu hiện và tác động đáng kể đến quá trình phiên mã, sản lượng protein, độ hòa tan và tinh chế. Trong hệ thống pET, gene mục tiêu được tạo dòng sau promoter T7 của phage và sự biểu hiện được thực hiện bởi T7 RNA polymerase trong vật chủ. Trx là protein ổn định nhiệt nội bào 12 kDa của *E. coli* có thể được sử dụng để đồng sản xuất với protein mục tiêu, cải thiện khả năng hòa tan và ổn định của nó. Đối tác dung hợp Trx có thể được gắn ở đầu N hoặc đầu C của protein đích nhưng hiệu quả hơn ở đầu N của protein đích. Trong nghiên cứu này, vectơ pET32a(+) chứa đồng yếu tố hòa tan Trx đã được thiết kế thành công và sau đó được hợp nhất với gene ChIFN- α tái tổ hợp và được biểu hiện trong hệ thống *E. coli* Rosetta. Các chủng vật chủ Rosetta có nguồn gốc từ BL21 đã được xử lý công nghệ để tăng sự biểu hiện của các protein của sinh vật nhân chuẩn. Khi được sử dụng trong *E. coli*, các chủng này đã cung cấp tRNA cho các codon hiếm AGG, AGA, AUA, CUA, CCC và GGA có thể có lợi cho sự biểu hiện protein của sinh vật nhân chuẩn nguồn gốc (Galluccio và cộng sự, 2022). Trong một số nghiên cứu trước đây, ChIFN- α tái tổ hợp cũng được thể hiện thành công trong các hệ thống *E. coli* khác nhau. Nghiên cứu của Jun Zhao và cộng sự, cũng đã thiết kế một vectơ biểu hiện pET32a/ChIFN- α , và biểu hiện

thành công protein ở dạng hòa tan và không hòa tan sau 5 giờ và 10 giờ cảm ứng 1 mM IPTG ở 32°C trong vi khuẩn *E. coli* Rosetta (DE3) (Zhao et al., 2019). Trong khi đó, trong nghiên cứu của chúng tôi, với cùng nồng độ 1 mM IPTG và thời gian cảm ứng: 25°C, 30°C sau 10 giờ và 37°C sau 4 giờ cảm ứng IPTG, protein của chúng ta chỉ được biểu hiện dưới dạng thể vùi.

Nghiên cứu của chúng tôi và nghiên cứu của Zhao et al. khác nhau trong việc lựa chọn máy chủ biểu thức. Trong khi Zhao et al. đã chọn các chủng Rosetta (DE3) làm tế bào chủ, chúng tôi sử dụng các chủng Rosetta (Nova 1) và không rõ liệu đây có phải là nguyên nhân cơ bản dẫn đến khả năng hòa tan khác nhau của các protein được biểu thị hay không. Thẻ Trx được hợp nhất với gene ChIFN- α tái tổ hợp để cải thiện khả năng hòa tan, tuy nhiên, nó không hoàn thành mục đích của nó với bất kỳ protein tái tổ hợp nào. Thẻ Trx được sử dụng trong nghiên cứu của Kong & Guo đã cải thiện khả năng hòa tan của protein yếu tố tăng trưởng nguyên bào sợi 19 (FGF19) thể hiện trong chủng Rosetta-gami, nhưng không làm tăng khả năng hòa tan của FGF19 trong BL21 (DE3) Strain và FGF15 ở cả BL21 (DE3) Strain và Rosetta-gami (Kong & Guo, 2014). Vì vậy, có thể thấy rằng các yếu tố khác có thể cần

thiết cho biểu hiện hòa tan của nó. Mặc dù các protein tái tổ hợp của chúng tôi chỉ được thể hiện ở dạng không hòa tan, nhưng nó dễ dàng được tinh chế bằng sắc ký cột ái lực. Quá trình tinh chế chỉ được thực hiện một lần, nhưng protein vẫn còn khoảng 90% tinh khiết cho đến phần cuối cùng. Nhiều biến số có thể ảnh hưởng đến hiệu quả, năng suất và tính ổn định của hoạt động trong quá trình tinh chế như đặc tính của protein, thành phần đệm, muối và tiền xử lý mẫu ảnh hưởng đến hiệu quả tinh chế. Ngoài ra, phân tích Western blot cho thấy khả năng miễn dịch với các kháng thể cụ thể, gợi ý rằng protein này có khả năng giữ lại hoạt tính sinh học ban đầu.

5. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, gene ChIFN- α được sao chép vào vector biểu hiện pET32a (+) và vector biểu hiện tái tổ hợp được chuyển nạp vào vi khuẩn chủ *E. coli* Rosetta, để sản xuất ChIFN- α tái tổ hợp *E. Coli*. Nghiên cứu đã xác định các điều kiện tối ưu hóa biểu hiện gene mã hóa Interferon- α của gà (ChIFN- α). *Những kết quả thu được cho thấy, việc sản xuất ChIFN- α tái tổ hợp quy mô lớn trên E. coli có tiềm năng ứng dụng lớn cho ngành chăn nuôi gà ở nước ta, giúp ngăn chặn các dịch bệnh do virus như cúm, Gumboro và Newcastle đang là mối đe dọa lớn đối với ngành chăn nuôi gia cầm tại Việt Nam.*

TÀI LIỆU TRÍCH DẪN

- [1]. Galluccio, M., Console, L., Pochini, L., Scalise, M., Giangregorio, N., & Indiveri, C. (2022), "Strategies for Successful Over-Expression of Human Membrane Transport Systems Using Bacterial Hosts: Future Perspectives", *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms23073823>

- [2]. Giang N. T. T., Đồ H. Q., & Quân N. Đ. (2020), “Khả năng ức chế virus gây bệnh Gumboro trên gà 3 tuần tuổi của Interferon Alpha gà”, *Tạp chí Khoa học - kỹ thuật và công nghệ, Đại học Mở thành phố Hồ Chí Minh* 15(1), 5–15. <https://doi.org/10.46223/HCMCOUJS.tech.vi.15.1.1017.2020>
- [3]. Kong, B., & Guo, G. L. (2014), “Soluble Expression of Disulfide Bond Containing Proteins FGF15 and FGF19 in the Cytoplasm of Escherichia coli”, *PLOS ONE*, 9(1), e85890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085890>
- [4]. Thu H. T. V. (2012), “Hiệu quả của bào tử Bacillus Subtilis biểu hiện interferon alpha gà trong phòng bệnh Gumboro trên gà”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, Số 22c, 30-39
- [5]. Zhao, J., Yu, H.-Y., Zhao, Y., Li, F.-H., Zhou, W., Xia, B.-B., He, Z.-Y., Chen, J., Jiang, G.-T., & Wang, M.-L. (2019), “Soluble expression, rapid purification, biological identification of chicken interferon-alpha using a thioredoxin fusion system in *E. coli* and its antiviral effects to H9N2 avian influenza virus. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(2), 192–201. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1566150>