

## THIẾT KẾ VECTOR TĂNG CƯỜNG BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN GP5 CỦA VIRUS PRRS TRONG TẾ BÀO THỰC VẬT

Đào Thị Sen<sup>1,2</sup>, Nguyễn Chi Mai<sup>3</sup>, Lê Quỳnh Liên<sup>3</sup>, Trần Mỹ Linh<sup>3</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Tường Vân<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

<sup>3</sup>Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 23.6.2016

Ngày nhận đăng: 22.8.2016

### TÓM TẮT

Phát triển vaccine thực vật hiện đang được coi là một giải pháp trợ giúp hiệu quả, an toàn và kịp thời để chống lại các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm ở người và động vật. Tuy nhiên, sản xuất các kháng nguyên hay vaccine tiêu đơn vị trong thực vật vẫn còn hạn chế vì mức độ biểu hiện thấp. Việc sử dụng vector dựa trên virus thực vật dưới sự điều khiển của promoter đặc hiệu là một trong những giải pháp giúp tăng cường biểu hiện. Áp dụng giải pháp này, cấu trúc vector biểu hiện GP5 của virus PRRS dựa trên virus khảm thuốc lá TMV và promoter cảm ứng nhiệt Hsp 18.2. (pHsp-TMV-GP5) đã được thiết kế. Kết quả đánh giá bước đầu khả năng phát triển của các dòng tế bào thuốc lá BY-2 được chuyển cấu trúc vector trên cho thấy không có ảnh hưởng tiêu cực nào. Khi biến nạp vector pHsp-TMV-GP5 vào tế bào thuốc lá BY-2, biểu hiện GP5 không những được tăng cường mà còn được điều khiển chặt chẽ bởi promoter cảm ứng nhiệt Hsp 18.2. Tế bào chuyển gen có thể phát triển bình thường sau 01 tuần nuôi cấy. Trong khi đó, tế bào BY-2 mang cấu trúc TMV-GP5 dưới sự điều khiển của promoter cơ định 35S (pCB-35S-TMV-GP5) có tốc độ phát triển chậm hơn. Những kết quả này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm đánh giá khả năng biểu hiện của GP5, khả năng đáp ứng miễn dịch và hiệu quả kinh tế của việc sử dụng vector này.

**Từ khóa:** GP5 của PRRSV, promoter cảm ứng, tế bào BY-2, vaccine thực vật, TMV.

### MỞ ĐẦU

Sử dụng các cấu trúc vector biểu hiện dựa trên virus thực vật đang được đánh giá là một giải pháp tiềm năng nhờ khả năng tự tái bản hệ gen của chúng. Chỉ cần được sao chép trong tế bào thực vật, genome của virus tái tổ hợp mang gen quan tâm sẽ có khả năng tự nhân lên với số lượng lớn, độc lập với hệ gen cây chủ và protein tái tổ hợp có thể biểu hiện với mức độ cao. Tuy nhiên, loại vector này chỉ thường được sử dụng để biểu hiện tạm thời ở cây nguyên vẹn do mức biểu hiện cao thường xuyên của gen chuyển thường có ảnh hưởng tiêu cực đến khả năng tồn tại của tế bào cây chuyển gen ổn định. Nhược điểm này có thể được khắc phục bằng việc sử dụng promoter cảm ứng đặc hiệu để kiểm soát biểu hiện ở tế bào hay cây nguyên vẹn chuyển gen ổn định.

Bệnh lợn tai xanh hay hội chứng rối loạn hô hấp và sinh sản ở lợn - PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm gây tử vong cao ở lợn. Nguyên nhân gây bệnh được xác định là do virus PRRS mang RNA sợi đơn, dương, thuộc chi *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*.

Virus PRRS được đánh giá là một trong những virus RNA có tốc độ tiến hóa nhanh lại có đặc tính sinh miễn dịch khác lạ so với các loại virus gây bệnh toàn thân khác. Để phòng chống bệnh này, hiện có nhiều loại vaccine thương mại được sử dụng bao gồm vaccine vô hoạt và nhược độc. Tuy nhiên, cho tới nay vẫn chưa có một vaccine nào thỏa mãn được các yêu cầu về hiệu lực và an toàn như mong đợi. Việc nghiên cứu phát triển các vaccine mới là hết sức cần thiết. Phát triển vaccine tiêu đơn vị trong thực vật được đánh giá là một hướng đi mới, bổ sung hiệu quả cho những vaccine truyền thống. Vaccine thực vật có nhiều ưu điểm như có thể sử dụng đơn giản qua đường miệng, khả năng đáp ứng miễn dịch tốt, có độ an toàn cao và dễ bảo quản.

Hệ gen của virus PRRS có kích thước khoảng 15kb gồm 9 khung đọc mở, mã hóa cho 7 protein cấu trúc bao gồm E, GP3, GP4, GP5, M và N (Fang, Snijder, 2010). Trong số đó, glycoprotein GP5 được dùng như mục tiêu hàng đầu để thiết kế vaccine tiêu đơn vị chống lại sự xâm nhiễm của virus PRRS (Li *et al.*, 2009). Glycoprotein GP5 có trọng lượng phân tử từ 24-25 kDa, là protein liên kết vỏ bọc kết

hợp glycogen. Các kháng thể trung hòa chủ yếu liên kết trực tiếp với các epitope có trên bề mặt của protein GP5, do vậy virus có thể bị trung hòa. Có ba vị trí epitope kích thích tế bào lympho B đã được xác định, một epitope trung hòa chính nằm ở giữa của ectodomain GP5 (aa 36-52), một epitope không trung hòa (epitope A) và một epitope trung hòa (epitope B) trong ectodomain của GP5 (Ostrowski *et al.*, 2002). GP5 có khả năng kích thích việc sản sinh kháng thể trung hòa ở lợn và đây là một vấn đề then chốt của miễn dịch dịch thể. Các nghiên cứu biểu hiện GP5 trong thực vật đã được một số nghiên cứu tiến hành song lượng kháng thể trung hòa trong huyết thanh đạt được còn thấp. Nguyên nhân chính được cho là bởi mức độ biểu hiện của GP5 tái tổ hợp yếu. Do đó, cần có các giải pháp để tăng cường mức độ biểu hiện kháng nguyên này. Sử dụng promoter điều khiển biểu hiện protein mạnh, hoặc vector dựa trên virus thực vật là những giải pháp hiệu quả tăng cường biểu hiện gen trong nhiều nghiên cứu gần đây.

Nghiên cứu của chúng tôi hướng tới cung cấp cơ sở khoa học của việc tăng cường biểu hiện kháng nguyên GP5 của virus PRRS biểu hiện ở thực vật bằng cách phát triển cấu trúc vector dựa trên virus thực vật. Cấu trúc vector được thiết kế mang genome của virus TMV (Tobacco Mosaic Virus) tái tổ hợp với GP5 dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng nhiệt Hsp18.2, phân lập từ *Arabidopsis thaliana* hoặc promoter cơ định 35S. Hiệu quả của các vector biểu hiện sẽ được đánh giá phân tích trong các dòng tế bào thuốc lá BY-2.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Vector 30B- TMV-GFP chứa cDNA của virus

TMV (TS. W.O Dawson, Viện Thực phẩm và Nông nghiệp, Trường Đại học Florida, Mỹ cung cấp); Vector pSHELP chứa gen *LTB* (Labile toxin B subunit - độc tố không chịu nhiệt của *E. coli*), vector pBSK chứa gen *GP5* (đã đổi mã phù hợp cho biểu hiện trong thực vật), vector pBT, vector pCB-GW-35S và pCB-GW-Hsp (Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp); Tế bào thuốc lá BY-2 (Phòng Hóa sinh thực vật, Trường Đại học Anwept, Vương quốc Bỉ cung cấp).

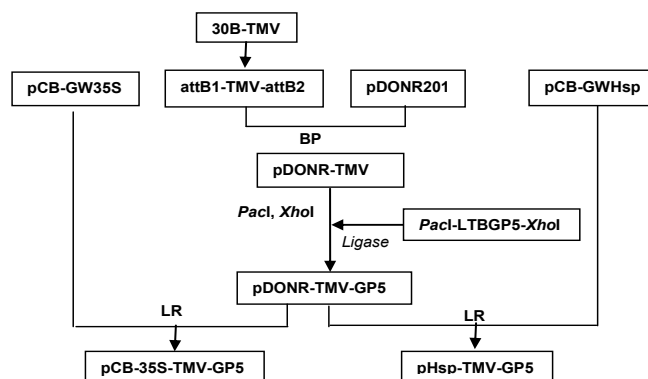
### Thiết kế các cặp môi đặc hiệu

Từ vector 30B-TMV-GFP, bộ ba môi attB1-TMV, TMVrevRib và attB2-TMV được thiết kế để thực hiện phản ứng PCR nhân đoạn genome TMV đồng thời loại bỏ gen CP, sử dụng phần mềm BioEdit.

Để tăng khả năng hấp thu protein GP5 qua đường miệng, chúng tôi thiết kế môi để nối gen *LTB* với gen *GP5* bằng kỹ thuật PCR. Môi xuôi nhân gen *LTB* có trình tự điểm cắt của enzyme *PacI* ở đầu 5' (*LTB-PacI*). Môi ngược để nhân đoạn gen *LTB* có đuôi bổ sung với 10 bp trên môi xuôi để nhân gen *GP5* (*LTB-rev*). Tương tự, môi xuôi để nhân gen *GP5* có thêm 10 bp bổ sung với môi ngược để nhân gen *LTB* (*GP5-for*). Môi ngược nhân đoạn *GP5* có trình tự điểm cắt của enzyme *XhoI* ở đầu 5' (*GP5-XhoI*).

### Thiết kế vector chuyển gen

Các vector chuyển gen được thiết kế theo sơ đồ thể hiện trong Hình 1. Các phương pháp ghép nối vào vector được thực hiện theo Sambrook và Russell (2001) và theo hướng dẫn sử dụng kỹ thuật Gateway (Invitrogen).



Hình 1. Sơ đồ phương pháp thiết kế vector pCB-35S-TMV-GP5 và pHsp-TMV-GP5.

Kỹ thuật Gateway, một kỹ thuật dòng hóa dựa vào điểm đặc hiệu trong hệ thống tái tổ hợp của phage, cho phép tách dòng có định hướng của các sản phẩm PCR, bao gồm phản ứng LR và BP và sử dụng các cặp môi với đầu gắn attB1 và attB2. Phản ứng BP được thực hiện giữa sản phẩm PCR trên và vector pDONR201 dưới sự xúc tác bởi hỗn hợp enzyme BP Clonase. Vector chuyển gen cuối cùng thu được thông qua phản ứng LR giữa pDONR201 mang sản phẩm PCR và vector chuyển gen gốc. DNA plasmid được biến nạp vào *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt của Cohen *et al.* (1972). Vector tái tổ hợp pCB-35S-TMV-GP5 và pHsp-TMV-GP5 được chuyển vào tế bào khả biến *Agrobacterium tumefaciens* CV58-pGV2260 theo phương pháp

xung điện của Hofgen *et al.* (1988) phục vụ cho thí nghiệm chuyển gen vào tế bào BY-2.

### Biến nạp gen vào tế bào thuốc lá BY-2

Cấu trúc gen 35S-TMV-GP5 và Hsp-TMV-GP5 được chuyển vào tế bào thuốc lá BY-2 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp của Nguyễn Thanh Vân và đồng tác giả (2010).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Thiết kế môi

Theo phương pháp như đã mô tả trên, chúng tôi đã thiết kế được các cặp môi như thể hiện trong Bảng 1.

**Bảng 1.** Trình tự các cặp môi thiết kế và sử dụng

TT	Tên môi	Trình tự môi	Mục đích
1	attB1-TMV	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TGTATTTTACAACAATTACC	Môi xuôi nhân đoạn TMV
2	TMVrevRib	CGGACTCATCAGACCGGAAAGCACATCCGG TGACAGGGCTCcgaaaccctcgctttattacgtg	Môi ngược nhân đoạn TMV, trình tự in thường là đoạn 3'UTR, trình tự in hoa là đoạn đầu 5' của đoạn ribozyme
3	attB2-TMV	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtGGACAGTCCT GTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACCGGAA AGC	Môi ngược nhân đoạn TMV, trình tự in thường là trình tự attB2, trình tự in hoa là đoạn đầu 3' của đoạn ribozyme, có 22 nucleotide lặp lại trong trình tự môi TMVrevRib
4	<i>LTB-Pacl</i>	<b>GCTTAATTAA</b> ATG GCTCCACAATCCATCACTG	Môi xuôi nhân đoạn <i>LTB</i>
5	<i>LTB-rev</i>	TCCCAAGCATCCCAGGGTTCTCCATGCTGA	Môi ngược nhân đoạn <i>LTB</i>
6	<i>GP5-for</i>	CATGGAGAACCCCGGGATGCTTGGGAAATG	Môi xuôi nhân đoạn <i>GP5</i>
7	<i>GP5-XhoI</i>	<b>GCCTCGAGT</b> CAATTAAGTCTTCTTCAG	Môi ngược nhân đoạn <i>GP5</i>
8	5'Athsp	<b>GGTACCCCGT</b> CATTTCTTCTG	Môi xuôi nhân đoạn promoter Hsp18.2
9	P39	TCGACTAGAATAGTAAATTGTAATG	Môi ngược nhân đoạn promoter 35S
10	P70	GGAGAAGATCTTACCGTC	Môi xuôi trên hệ gen của TMV ở vị trí nucleotide 4962
11	P71	GGCACACCGTTTTTCG	Môi ngược trên hệ gen của TMV ở vị trí nucleotide 1498

### Nhân dòng hệ gen của TMV

TMV có kích thước khoảng 7 kb, TMV được gắn vào vector pDONR201 bằng kỹ thuật Gateway. Sử dụng bộ ba môi attB1-TMV, TMVrevRib và attB2-TMV, nhân được đoạn genome của TMV kích thước gần 7kb từ vector 30B-TMV bằng phản ứng LT-PCR (Expand Long Template PCR) hai lần liên tiếp.

Đoạn TMV được thiết kế có 2 vị trí attB1 và attB2 ở hai đầu 5' và 3' được lai vào vector pDONR201 bằng phản ứng BP. Vector tái tổ hợp pDONR-TMV được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5- $\alpha$ . Vector pDONR201 có mang gen ccdB là gen mã hóa cho protein độc đối với *E. coli* DH5- $\alpha$ . Do đó, sau biến nạp chỉ các dòng khuẩn mang vector pDONR201 chứa đoạn TMV mới phát triển tiếp trên môi trường chọn lọc. Thực hiện phản ứng cắt với enzyme *PacI* và *XhoI*, plasmid pDONR-TMV-1 tạo

ra 3 băng có kích thước khoảng 9000 bp, 400 bp và 300bp, tương ứng với thiết kế. Kết quả giải trình tự khẳng định sự chính xác về trình tự của TMV, đảm bảo thu được genome TMV hoạt động tốt ở các thí nghiệm tiếp theo.

### Thiết kế vector pDONR-TMV-GP5

Để tiến hành phản ứng nối, đoạn gen mã hóa GP5 (642 bp) được nhân lên bằng cặp mồi GP5-for và GP5-XhoI và đoạn LTB (309 bp) được nhân lên bằng cặp mồi LTB-PacI và LTB-rev, được ghép nối với nhau bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi LTB-PacI và GP5-XhoI. Năm chu kỳ đầu tiên không bổ sung mồi để tạo điều kiện cho sự bắt cặp của hai gen LTB và GP5. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy đoạn nối LTB-GP5 có kích thước xấp xỉ 1kb, tương ứng kích thước tính toán lý thuyết. Sản phẩm nối được tinh sạch, sau đó gắn vào vector tách dòng pBT và biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* DH5- $\alpha$ . Tiến hành tách và đọc trình tự plasmid để kiểm tra độ chính xác của phản ứng nối.

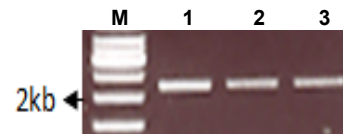
Hai vector pBT-LTB-GP5 và pDONR-TMV đã được cùng cắt bởi 2 enzyme XhoI và PacI. Trong đó, vector pBT-LTB-GP5 tạo ra sản phẩm gồm hai băng, kích thước khoảng 2,7 kb và 1 kb. Bộ khung vector pDONR-TMV có kích thước 9 kb và đoạn gen LTB-GP5 kích thước 1 kb sau khi được tinh sạch từ gel agarose được gắn lại với nhau bằng enzyme T4 ligase. Vector tái tổ hợp được nhân lên trong tế bào *E.coli* DH5- $\alpha$ .

Để chọn được các khuẩn lạc thật sự mang đúng vector tái tổ hợp, các khuẩn lạc phát triển trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng phản ứng PCR sử dụng trực tiếp khuẩn lạc và mồi p70 nằm trong trình tự hệ gen TMV và mồi GP5-XhoI nhằm kiểm tra sự có mặt của đoạn GP5 trong vector tái tổ hợp. Ngoài ra, vector tái tổ hợp còn được cắt bằng enzyme PacI/XhoI. Kết quả cho thấy, vector đều được cắt thành hai băng kích thước khoảng 9 kb và 1 kb, chứng tỏ đoạn gen LTB-GP5 đã được gắn thành công vào vector pDONR-TMV.

### Phát triển vector pHsp-TMV-GP5 và pCB-35S-TMV-GP5

Vector đích để chuyển gen GP5 vào trong thực vật pHsp-TMV-GP5 được tạo thành thông qua phản ứng LR giữa vector pDONR-TMV-GP5 và pCB-GWhsp. Trước khi thực hiện lai, vector pDONR-TMV đã được cắt mở vòng bằng PstI, là vị trí cắt duy nhất sau gần trình tự attL2, nhằm tạo đoạn thẳng

trước để giúp phản ứng LR lai đoạn TMV vào pCB-GWhsp được thực hiện một cách hiệu quả. Tiến hành phản ứng PCR kiểm tra 3 plasmid được tách từ 3 khuẩn lạc *E. coli* sau phản ứng LR sử dụng mồi ngược p71 (ở vị trí khoảng 1500 trên TMV) và mồi xuôi 5'AtHsp (trên vector pCB-GWhsp). Kết quả cho thấy ở cả ba khuẩn lạc, vector đều cho băng kích thước khoảng hơn 2 kb tương ứng kích thước tính



**Hình 2.** Điện di sản phẩm PCR kiểm tra vector pHsp-TMV-GP5 bằng mồi 5'AtHsp và p71. Giếng 1-3: Plasmid pHsp-TMV-GP5 số 1-3

toán lý thuyết (Hình 2).

Tương tự như thiết kế vector pHsp-TMV-GP5, vector pCB-35S-TMV-GP5 được tạo thành thông qua phản ứng lai LR giữa vector pDONR-TMVGP5 và pCB-GW35S. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$ . Các khuẩn lạc phát triển trên môi trường LB có kháng sinh chọn lọc kanamycin (50 mg/l) đã được chọn để tiến hành kiểm tra. Thực hiện phản ứng PCR trực tiếp khuẩn lạc sử dụng cặp mồi đặc hiệu LTB-PacI và Cmyc-rev đã khẳng định được sự có mặt của gen LTB-GP5 trên vector pCB-35S-TMV-GP5. Các khuẩn lạc chọn lọc đều mang vector tái tổ pCB-35S-TMV-GP5.

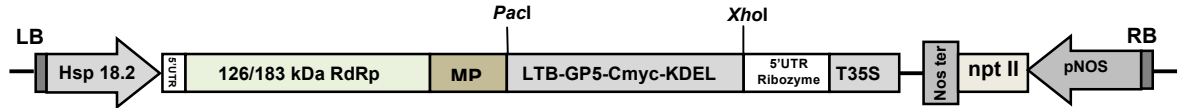
### Biến nạp cấu trúc gen chuyển vào tế bào thuốc lá BY-2

Hai cấu trúc vector chuyển gen pCB-35S-TMV-GP5 (I) và pHsp-TMV-GP5 (II) (Hình 3) được tiến hành biến nạp vào tế bào thuốc lá BY-2 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Quan sát sự phát triển của tế bào BY-2 sau biến nạp 2 tuần trên môi trường chọn lọc chứa 50 mg/L kanamycin cho thấy có sự khác biệt rõ rệt về khả năng sinh trưởng và phát triển của các dòng tế bào BY-2 chuyển gen mang hai cấu trúc khác nhau. Các dòng tế bào BY-2 mang cấu trúc (I) phát triển thành cụm tế bào, có kích thước nhỏ hơn hẳn so với các dòng tế bào BY-2 mang cấu trúc (II) (khoảng 5 - 10 dòng tế bào/1 đĩa với cấu trúc I, khoảng 15 - 25 cụm/1 đĩa với cấu trúc II) (Hình 4). Sau 3 tuần chuyển sang môi trường mới, 85% dòng tế bào tiếp tục phát triển tốt trong thí nghiệm chuyển cấu trúc II nhưng chỉ có 33% dòng tế bào tiếp tục phát triển ở cấu trúc I.

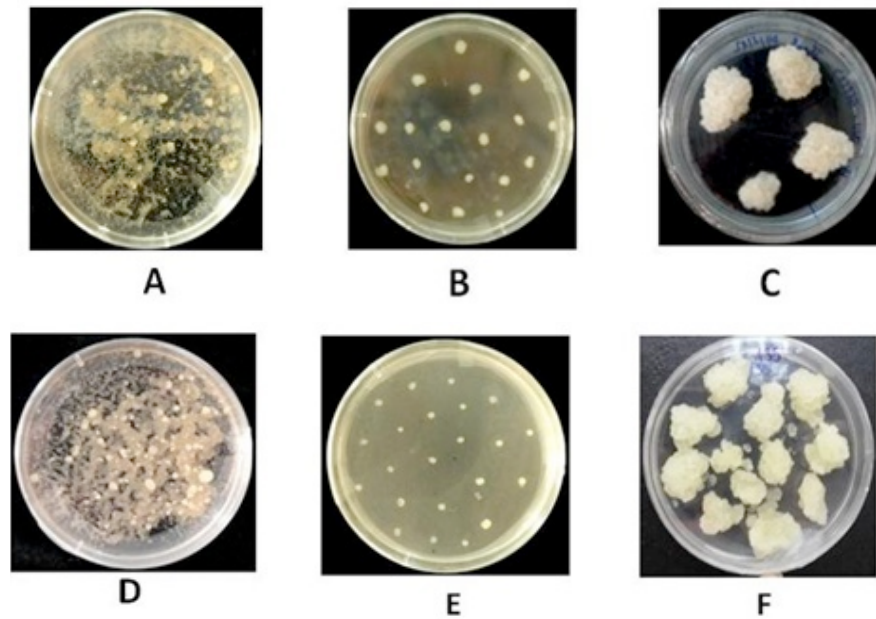
**pCB-35S-TMV-GP5**



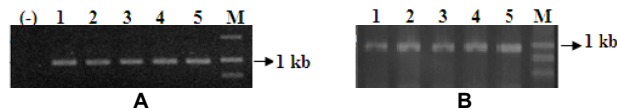
**pHsp-TMV-GP5**



**Hình 3.** Sơ đồ vector pCB-35S-TMV-GP5 và pHsp-TMV-GP5. Ghi chú: Nos ter: nopaline synthase terminator; Nos pro: nopaline synthase promoter; nptII: neomycin phosphotransferase II; T35S: terminator của CaMV 35S; 35S pro: The constitutive 35S promoter của Cauliflower Mosaic Virus (CaMV); RdRp: RNA-dependent RNA polymerase của TMV; MP: Membrane Protein; 3'UTR: untranslated region ở đầu 3'; 5'UTR: untranslated region ở đầu 5'; AtHsp18.2 promoter: heat shock promoter 18.2 của *Arabidopsis thaliana*



**Hình 4.** Kết quả bước đầu quá trình chuyển gen GP5 vào tế bào BY-2. Ghi chú: A,B,C: Tế bào BY-2 chuyển gen pCB-35S-TMV-GP5; D,E,F: Tế bào BY-2 chuyển gen pHsp-TMV-GP5, A,D: Tế bào sau 2 tuần rửa khuẩn; B,E: Các cụm tế bào 2 tuần tuổi phát triển trên môi trường chọn lọc được cấy chuyển sang môi trường mới; C,F: Cụm tế bào 5 tuần tuổi



**Hình 5.** Sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen GP5 A: cấu trúc pHsp-TMV-GP5; B: cấu trúc pCB-35S-TMV-GP5. Ghi chú: (-): đối chứng âm; M: Thang chuẩn DNA 1kb; 1-5: Dòng tế bào BY-2 chuyển gen 1-5.

Tiến hành các phản ứng PCR dựa trên cặp mồi đặc hiệu LTB-*PacI*/GP5-*XhoI* với DNA khuôn mẫu được tách ra từ các dòng tế bào BY-2 phát triển tốt trên môi trường chọn lọc cho thấy chúng tôi thu được các dòng tế bào BY-2 chuyển gen (Hình 5). Tỷ lệ sống sót của các dòng tế bào sau 4 lần cấy chuyển trên môi trường chọn lọc trung bình với cấu trúc II là 15%, cấu trúc I là 5,6 %. Tỷ lệ các dòng tế bào có phản ứng PCR dương tính trong số các dòng tế bào tiếp tục phát triển sau 4 lần cấy chuyển khá cao (89% ở cấu trúc I và 87% ở cấu trúc II).

Sự khác biệt về khả năng sinh trưởng, phát triển của các dòng tế bào BY-2 trong hai cấu trúc chuyển có thể do gen chuyển được điều khiển bởi các promoter khác nhau. Promoter 35S là promoter cơ định, hoạt động liên tục. Cùng với đó, hoạt động của gen GP5 còn được thực hiện thông qua virus TMV. Khi bộ gen của TMV được chuyển vào tế bào BY-2, dưới sự điều khiển của promoter 35S, cơ chế hoạt động của TMV được thực hiện song song với sự phát triển của tế bào BY-2. Sự nhân nhanh của TMV trong khoảng thời gian dài, kèm theo việc biểu hiện liên tục của GP5 có thể đã làm ức chế sự phát triển của tế bào BY-2, dẫn đến hiện tượng tế bào mang gen chuyển bị chết. Chính vì vậy, cấu trúc dạng này trước đây thường chỉ được sử dụng trong phương thức chuyển gen biểu hiện tạm thời. Tuy nhiên, với cấu trúc Hsp-TMV-GP5, gen chuyển được điều khiển bởi promoter cảm ứng nhiệt Hsp18.2. Gen đích là TMV và GP5 chỉ được biểu hiện khi kích hoạt promoter Hsp18.2 ở nhiệt độ 37°C trong 2h. Ở nhiệt độ nuôi cấy tế bào 25°C, promoter Hsp18.2 không được kích hoạt, TMV chưa hoạt động và GP5 chưa được biểu hiện, nên không gây ảnh hưởng đến sự phát triển của tế bào BY-2. Vì thế, đây có thể là một cấu trúc thích hợp sử dụng cho chuyển gen ổn định ở tế bào thực vật. Kết quả thu được trong nghiên cứu này tương tự khi tiến hành so sánh hai cấu trúc biểu hiện GFP tương tự trên dòng tế bào BY-2 (Nguyen Tuong Van *et al.*, 2016).

## KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã cho thấy cấu trúc vector dựa trên virus TMV đã thúc đẩy biểu hiện kháng nguyên GP5 của virus PRRS dưới sự điều khiển của promoter cảm ứng nhiệt Hsp 18.2 trong dòng tế bào thuốc lá BY-2. Cấu trúc này đã bước đầu thể hiện khả năng vượt trội so với vector biểu hiện GP5 dưới sự điều khiển của promoter cơ định. Kết quả trong nghiên cứu này cùng với những phân tích kháng định mức độ biểu hiện cao và khả năng đáp ứng miễn

dịch của kháng nguyên GP5 trên động vật thí nghiệm trong thời gian tới sẽ là cơ sở cho việc ứng dụng dạng vector này để biểu hiện các protein khác nhau trong tế bào thực vật.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành trong chương trình đào tạo tiến sỹ của nghiên cứu sinh Đào Thị Sen và trong nhiệm vụ hợp tác quốc tế về Khoa học và Công nghệ theo Nghị định thư giữa Việt Nam và Vương quốc Bỉ: “Nghiên cứu biểu hiện gen Glycoprotein 5 (GP5) của virus gây bệnh lợn tai xanh ở thuốc lá và đậu tương”.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Fang Y, Snijder EJ (2010) The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res* 154:61-76.
- Cohen A, Chang A, Hsu L (1972) Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc Natl Acad Sci* 69(8): 2110-2114.
- Höfgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res* 16(20):9877.
- 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.
- Nguyen Thanh Van, Nguyen Tuong Van, Le Quynh Lien (2010) Optimising in vitro culture and *Agrobacterium*-mediated transformation protocols of tobacco BY-2 cells. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8(3B): 1205-1210.
- Nguyen Tuong Van, Nguyen Chi Mai, Le Thi Thanh, Le Quynh Lien, Tran My Linh, Dao Thi Sen, Tran Thanh Thu, Geert Angenon, Chu Hoang Ha (2016) A new expression vector for production of recombinant proteins in plant cells. *Research Journal of Biotechnology* 11(2): 63-69.
- Ostrowski M, Galeota J, Jar A, Platt K, Osorio F, Lopez O (2002) Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 76: 4241-4250.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scotti M, Prieto C, Alvarez E, Simarro I, Castro J (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.

## **VECTOR CONSTRUCTION TO ENHANCE GP5 ANTIGEN EXPRESSION OF VIRUS PRRS IN PLANT CELLS**

**Dao Thi Sen<sup>1,2</sup>, Nguyen Chi Mai<sup>3</sup>, Le Quynh Lien<sup>3</sup>, Tran My Linh<sup>3</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1</sup>, Nguyen Tuong Van<sup>1,✉</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Hanoi National University of Education*

<sup>3</sup>*Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology*

### **SUMMARY**

Plant vaccine is a new tool to enrich available vaccine resources for protection of human and animal health. Plant vaccine offers several advantages over current conventional vaccines, including that storage and transportation are convenient after lyophilization, production costs are low, and the contamination of mammalian pathogens is avoided. However, the low expression of foreign genes in plant still exists that limits the application of this kind of vaccine. Presently, plant virus-based expression vectors represent a technology that enables high levels of recombinant proteins to be produced efficiently in plant cells. In this study, a modified TMV-based vector to elevate glycoprotein GP5 of PRRSV in plant cells without negative effects in the development of plant cells was developed. Gene encoded GP5 was replaced CP of TMV and the whole was regulated by the heat shock protein Hsp 18.2 promoter. Transgenic BY-2 cells carrying pHsp-TMV-GP5 showed the normal development compared to the ones harbouring pCB-35S-TMV-GP5. The results showed that the Hsp-TMV-GP5 construct do not have a negative effect on viability of transgenic plant cells. A further study will be carried out to investigate the expression of GP5 in stable transgenic plant cells to confirm the benefit of the modified expression vector in development of rapid and cost-effective antigens in plant cell suspension culture.

**Keywords:** *BY-2, Hsp 18.2 promoter, GP5 of PRRSV, plant vaccine, TMV.*

---

✉ *Author for correspondence: E-mail: vanngtg@gmail.com*