

BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN GLYCOPROTEIN GP5 CỦA VIRUS PRRS GÂY BỆNH LỢN TAI XANH TRÊN CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN

Đào Thị Sen^{1,2}, Chu Hoàng Hà¹, Nguyễn Tường Vân^{1*}

¹Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, Việt Nam

TÓM TẮT: Bệnh lợn tai xanh là căn bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất cho ngành chăn nuôi lợn trên toàn thế giới do virus PRRS gây ra. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu biểu hiện kháng nguyên GP5 của virus PRRS phân lập được ở Việt Nam kết hợp với LTB ở thực vật dưới sự điều khiển của promoter phasoline biểu hiện đặc hiệu ở hạt và promoter 35S. Kết quả khuếch đại PCR và RT-PCR cho thấy đoạn gen đã được chuyển thành công vào cây thuốc lá C9-1 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Protein tái tổ hợp LTB-GP5 đã quan sát thấy trong dịch chiết hạt cây thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp lai Western. Phân tích ELISA cho thấy các dòng thuốc lá chuyển gen được điều khiển bởi promoter phasoline có mức độ biểu hiện GP5 được cải thiện đáng kể so với cấu trúc 35S với hàm lượng protein GP5 được đạt khoảng 2,2% TSP. Đây sẽ là cơ sở để sử dụng cấu trúc đặc hiệu này để biểu hiện protein tái tổ hợp LTB-GP5 trong hạt của các thực vật khác.

Từ khóa: *Agrobacterium*, kháng nguyên, GP5, LTB, PRRSV, vaccine thực vật.

MỞ ĐẦU

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 là virus PRRS được xác định lần đầu tiên ở Bắc Mỹ năm 1991 và là một trong những virus tiến hóa nhanh, vì thế gây hạn chế cho việc ứng dụng các vaccine truyền thống phát triển từ chủng gốc để phòng chống các chủng mới phát sinh. Ngoài ra, các vaccine truyền thống như vaccine nhược độc hoặc bất hoạt còn tồn tại các nhược điểm như có nguy cơ phát triển độc tính trở lại, giá thành tương đối cao, lại đòi hỏi nghiêm ngặt trong khâu bảo quản và vận chuyển (Scortti, 2007). Phát triển vaccine tiểu 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 PRRSV có kích thước khoảng 15kb gồm 9 khung đọc mở, mã hóa cho 7 protein cấu trúc bao gồm GP3, E, GP3, GP4, GP5, M và N (Fang, 2010). Trong số đó,

glycoprotein GP5 được coi như mục tiêu hàng đầu để thiết kế vaccine tiểu đơn vị chống lại sự xâm nhiễm của virus PRRS (Li, 2009). Glycoprotein GP5 có trọng lượng phân tử 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 trên bề mặt của protein GP5, vì 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, 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 mà phần lớn được cho bởi mức độ biểu hiện thấp của GP5. Do đó, cần có các giải pháp 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.

Sử dụng promoter điều khiển biểu hiện protein ở các cơ quan chuyên biệt, giai đoạn hoặc điều kiện nhất định là một trong những giải pháp hiệu quả tăng cường biểu hiện gen trong những nghiên cứu gần đây. Với mục đích 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 kháng nguyên GP5 kết hợp với LTB dưới sự điều khiển của promoter phasoline biểu hiện đặc hiệu ở hạt và promoter 35S ở cây thuốc lá. Khả năng biểu hiện của kháng nguyên trong hạt được đánh giá dựa trên kết quả lai Western và ELISA. Đây sẽ là cơ sở để tiến hành biểu hiện kháng nguyên này trên các đối tượng thực vật khác nhau.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* C9-1 *in vitro* được nuôi giữ trong phòng thí nghiệm Công nghệ Tế bào Thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

Vector tách dòng pBT, vector pBSK chứa gen GP5/M (được đặt nhân tạo), Vector pSHELP chứa gen LTB (Labile toxin B subunit, độc tố không chịu nhiệt lấy từ *E. coli*), vector pCB301-GW-35S, bộ Kit GateWay (Invitrogen), dòng tế bào *E. coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* CV58 pGV2260 do Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Thiết kế vector chuyển gen

Để tăng khả năng hấp thu protein GP5 qua đường miệng, chúng tôi thiết kế nối gen LTB (labile toxin B subunit, độc tố không chịu nhiệt lấy từ vi khuẩn *E. coli*) với gen GP5 bằng kỹ thuật PCR. Mỗi xuôi nhân gen LTB có trình tự điểm cắt của enzyme *PacI* ở đầu 5' (LTB-*PacI*). Mỗi ngược để nhân đoạn gen LTB có đuôi bổ sung với 10 bp trên mỗi xuôi để nhân gen GP5 (LTB-rev). Tương tự, mỗi xuôi để nhân gen GP5 có thêm 10 bp bổ sung với mỗi ngược để nhân gen LTB (GP5-for). Mỗi ngược nhân đoạn GP5 có trình tự điểm cắt của enzyme *XhoI* ở đầu 5' (GP5-*XhoI*).

Các phương pháp ghép nối vào vector được thực hiện theo Sambrook & Russell (2001) và theo hướng dẫn sử dụng kỹ thuật Gateway (Invitrogen). Phản ứng BP được thực hiện giữa sản phẩm PCR trên và vector pDONR201 dưới

sự xúc tác bởi hỗn hợp enzym BP Clonase tạo vector pDONR201-LTB-GP5. Vector pDONR201-LTB-GP5 được lai với vector đích pBeta-Phaso-dest bằng phản ứng LR để tạo vector biểu hiện pPhaso/LTB-GP5. Tương tự, tiến hành lai LR giữa vector pDONR201-LTB-GP5 với vector pCB-GW-35S được vector biểu hiện pCB-GW-35S-LTB-GP5. Các vector biểu hiện trên 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 thực vật.

Biến nạp gen vào cây thuốc lá

Cấu trúc gen *LTB-GP5* được chuyển vào giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* C9-1 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* theo phương pháp của Topping có cải tiến (Topping 1998). Các mảnh lá có kích thước khoảng 1 cm² của những 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 μ M 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 400 mg/l nhằm loại bỏ *Agrobacterium* còn lại, kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l và chất kích thích tạo chồi BAP (6-Benzylaminopurine) 1 mg/l. Sau 4–5 tuần các chồi phát triển cao khoảng 2–3 cm được cắt khỏi mô lá ban đầu và chuyển sang môi trường ra rễ MS có bổ sung kanamycin 50 mg/l, và cefotaxim 400 mg/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 \pm 2°C. Cây phát triển với 4–5 lá thật thì chuyển ra trồng trong bầu đất dưới điều kiện nhà kính.

Phương pháp PCR: Lá cây thuốc lá sống sót trên môi trường chọn lọc được trồng sau 3 tuần trong điều kiện nhà lưới được sử dụng kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng PCR theo phương pháp của Kasajima et al., (2004) với cặp mồi LTB-*PacI*-For và GP5-rev. Chu trình nhiệt như sau: 94°C: 3'; 25 chu kỳ bao gồm

(94°C: 30 giây, 53°C: 30 giây, 72°C: 1 phút); 72°C: 10 phút; giữ ở 4°C.

Tách RNA và phản ứng phiên mã ngược (RT-PCR): RNA tổng số từ mẫu cây thuốc lá được tách chiết theo hướng dẫn sử dụng hóa chất Trizol Reagents (Invitrogen, USA). cDNA được tạo ra theo bộ kit First stand cDNA synthesis (Fermentas).

Tách chiết protein: Mẫu lá và hạt của các dòng thuốc chuyển gen được nghiền mịn bằng nitor lỏng, bổ sung đệm chiết PBS 1X (theo tỉ lệ 100 µg mẫu: 100 µl dịch chiết). Li tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút rồi thu dịch nổi sang ống mới, xác định hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp Bradford (1976).

Lai miễn dịch Western blot: Thí nghiệm Western blot được tiến hành theo Van Breedam (2011) và theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Protein tổng số sau tách chiết được bổ sung đệm tải mẫu 5X (0,0625 M TRIS-HCl, pH 6,8, 5% SDS, 1% β-mercaptoethanol, 10% glycerol và 0,01% bromophenol blue), sau đó ủ mẫu ở 95°C trong vòng 5 phút và đặt trong đá 10 phút. Protein tổng số được điện di trên gel SDS-polyacrylamide 12% rồi được chuyển sang màng nitrocellulose (0,4µm, BA85). Sau đó, rửa màng bằng TBS và ủ trong 3% BSA khoảng 1 giờ. Màng được rửa sạch trong dung dịch TBS Tween 0,1% rồi tiếp tục ủ với dung dịch kháng thể kháng c-myc nồng độ 1:700 trong 2h ở nhiệt độ phòng. Ủ với kháng thể 2 là kháng thể kháng dê IgG cộng hợp HRP (Thermo scientific Pierce) pha loãng 1:10.000 trong 1 giờ. Các băng có phản ứng lai được phát hiện bằng phản ứng màu với cơ chất hiện màu là 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB).

Phân tích mức độ biểu hiện GP5 bằng kỹ thuật ELISA

Thí nghiệm ELISA (Enzym-linked immunosorbent assay) gián tiếp định lượng glycoprotein GP5 thông qua định lượng protein c-myc: Dịch chiết protein tổng số của các mẫu

cây chuyển gen được pha loãng bằng dung dịch coating (3,03 g/l Na₂CO₃, 6,0 g/l NaHCO₃) đến nồng độ 200 µg/ml, 100 µl mẫu được tra vào các đĩa trên đĩa microplate, mỗi mẫu lặp lại 3 lần; Ủ qua đêm ở 4°C; Rửa đĩa 2 lần bằng PBS-T (Tween 0,05%); Blocking bằng sữa tách béo 5% pha trong PBS trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng; Rửa đĩa 2 lần; Ủ với kháng thể 1-anti c-myc (260µg/ml) pha loãng 1:700 trong 2 giờ; Rửa đĩa 3 lần; Ủ với kháng thể 2 là kháng thể kháng dê IgG cộng hợp HRP (Thermo scientific Pierce) pha loãng 1:10.000 trong 1 giờ và cơ chất hiện màu là TMB; Dùng HCl 1N để dừng phản ứng màu; Đo màu ở bước sóng 450 nm. Hàm lượng glycoprotein GP5 được xác định dựa vào đường chuẩn được xây dựng dựa trên protein tinh sạch ScFv gắn đuôi c-myc (Kirsch, 2008).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Biến nạp cấu trúc gen vào cây thuốc lá

Trong nghiên cứu này, vi khuẩn *A. tumefaciens* được sử dụng để chuyển cấu trúc 35S-LTB-GP5 và pPhaso-LTB-GP5 vào giống thuốc lá C9-1 nhằm tạo cây thuốc lá chuyển gen mang hai cấu trúc biểu hiện đặc hiệu ở hạt (pPhaso-LTB-GP5) và biểu hiện không đặc hiệu (35S-LTB-GP5). Các mảnh lá biến nạp được chọn lọc trên môi trường bổ sung 50 mg/l kanamycin. Những chồi mập, xanh xuất hiện sau 45 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. Tỉ lệ ra rễ đạt 100%, rễ đồng 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. Lựa chọn ngẫu nhiên 20 dòng thuốc lá T₀ ở mỗi công thức để ra bầu. Tỉ lệ sống sót thu được 100%. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả biến nạp ở cây thuốc lá C 9-1

Công thức	Số mảnh lá thử nghiệm	Số cụm chồi/mảnh lá	Số chồi sống sót/mảnh lá	Tỷ lệ ra rễ (%)
35S-LTB-GP5	30	1,35 ± 0,61	1,74 ± 0,73	100
pPhaso-LTB-GP5	30	1,45 ± 0,68	1,94 ± 0,77	100
ĐC WT1	10	3,4 ± 0,84	7,8 ± 1,55	100

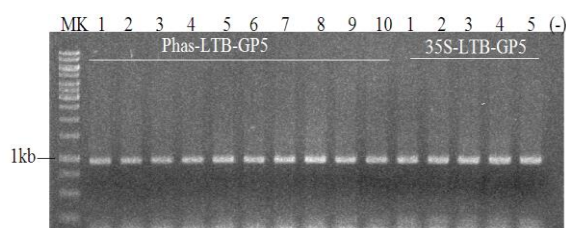
ĐC WT2	10	0		
--------	----	---	--	--

ĐC WT1: Mẫu không biến nạp, không chọn lọc bằng Km; ĐC WT1: Mẫu không biến nạp, chọn lọc bằng Km

Kết quả cho thấy, ở cả hai cấu trúc biến nạp số cụm chồi hình thành/mảnh lá và số chồi sống sót/mảnh lá không có sự sai khác có ý nghĩa. Điều này có thể lý giải bởi hai cấu trúc sử dụng biến nạp sử dụng chỉ khác nhau về promoter, độ dài cấu trúc tương đương nhau nên không khác biệt lớn về khả năng tiếp nhận gen ở cây thí nghiệm. Số chồi thu được sau chọn lọc cao bởi khả năng dễ tái sinh cây và chấp nhận gen ngoại lai của cây thuốc lá (Cramer, 1996).

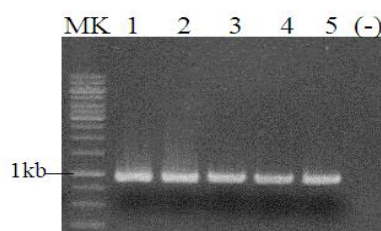
Kiểm tra sự hiện diện của gen mục tiêu GP5 trong cây thuốc lá chuyển gen

Các cây phát triển ổn định và ra lá mới sau 3 tuần ra cây *in vivo* được tiến hành thu lá, thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *LTB-PacI-for/GP5-rev*. Đối chứng âm là DNA bộ gen tách chiết từ nhiễm sắc thể của cây không được chuyển gen. Kết quả cho thấy ở các dòng cây giả định chuyển gen có sự hiện diện vạch DNA mong đợi có kích thước gần 1 kb phù hợp với kích thước đoạn gen LTB-GP5 đã được thiết kế trong cấu trúc vector chuyển, băng này không xuất hiện ở trường hợp cây thuốc lá đối chứng (hình 1).



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra cây thuốc lá chuyển gen bằng cặp mồi đặc *LTB-PacI-for/GP5-rev*; MK: Thang chuẩn DNA chuẩn 1 kb; (-): Cây thuốc lá không chuyển gen; 1–10: Các dòng cây thuốc lá chuyển gen

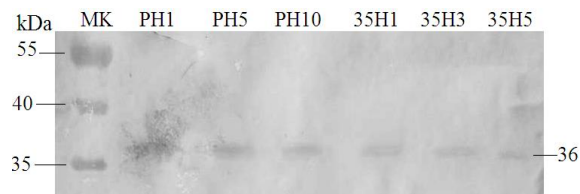
Quá trình biểu hiện gen được thể hiện qua hai giai đoạn: (1) Phiên mã từ DNA sang RNA và (2) Dịch mã từ RNA tổng hợp các phân tử protein thông qua bộ máy ribosome. Trong thí nghiệm này, các dòng cây mang cấu trúc 35S-LTB-GP5 do gen chuyển được điều khiển bởi promoter 35S có khả năng hoạt hóa liên tục nên chúng tôi đã sử dụng RT-PCR để kiểm tra sự biểu hiện gen thông qua RNA ở lá các dòng cây dương tính với phản ứng PCR (hình 2). Kết quả cho thấy 100% dòng thuốc lá mang gen chuyển đều được phiên mã ra RNA.



Hình 2. Kết quả RT-PCR bằng cặp mồi *LTB-PacI-for/GP5-rev* các dòng cây thuốc lá chuyển cấu trúc 35S-LTB-GP5; MK: Thang protein chuẩn; 1–5: các dòng thuốc lá chuyển gen, (-): cây thuốc lá không chuyển gen

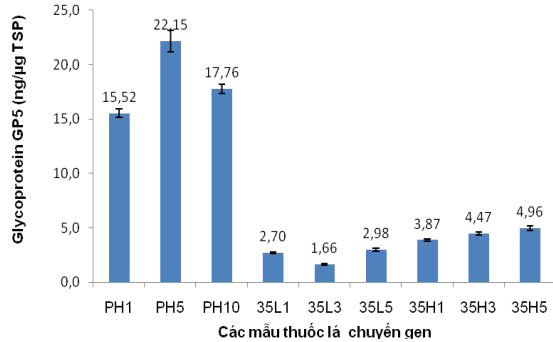
Phân tích sự biểu hiện của protein GP5 tái tổ hợp trong các dòng thuốc lá chuyển gen

Việc chuyển gen vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens* không chỉ được thực hiện khá dễ dàng với hiệu suất cao, cây thuốc lá cũng đã được chứng minh là có khả năng biểu hiện chính xác nhiều protein phức tạp. Đồng thời đây là một cây trồng cho năng suất sinh khối rất lớn, lá có thể cắt nhiều lần trong năm. Một cây thuốc lá chuyển gen duy nhất có thể sản xuất lên đến một triệu hạt (Cramer, 1996). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục phân tích sự biểu hiện của protein GP5 tái tổ hợp trong các dòng thuốc lá chuyển gen để khẳng định về hoạt động của các vector thiết kế, đồng thời so sánh mức độ biểu hiện GP5 dưới sự điều khiển của hai loại promoter bằng lai Western và ELISA. Với cấu trúc 35S-LTB-GP5, 3 dòng thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T₀ có kết quả RT-PCR dương tính (dòng số 1,3,5) được lựa chọn để tiến hành phân tích. Lá của cây T₀ được thu hoạch và lưu giữ ở -80°C (kí hiệu 35L1, 35L3, 35L5). Hạt của các cây này được thu hoạch lưu giữ ở 4°C (35H1, 35H3, 35H5). Với cấu trúc Phas-LTB/GP5, hạt T₁ của 3 dòng thuốc lá chuyển gen (dòng số 1,5,10) cũng được phân tích sự biểu hiện của LTB-GP5 (PH1, PH5, PH10). Kết quả phân tích sự biểu hiện protein ở lá và hạt của các dòng thuốc lá chuyển gen bằng lai Western được thể hiện trên hình 3.



Hình 3. Biểu hiện protein LTB-GP5 trong hạt bằng lai Western; MK: Thang protein chuẩn, PH1, PH5, PH10: hạt các dòng chuyển gen phas-LTB-GP5; 35H1, 35H3, 35H5: hạt các dòng chuyển gen 35S-LTB-GP5

Đồng thời, tiến hành xác định hàm lượng LTB-GP5 tái tổ hợp gián tiếp bằng kỹ thuật ELISA. Kết quả được chỉ ra ở hình 4.



Hình 4. Hàm lượng LTB-GP5 trong một số dòng thuốc lá chuyển gen

Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện có sự khác nhau rõ rệt giữa các dòng thuốc lá chuyển gen được điều khiển bởi các promoter khác nhau. Hàm lượng glycoprotein GP5 tái tổ hợp ở các dòng dao động 1,66–22,15 ng/μg protein tan tổng số (TSP). Mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp GP5 trong hạt thuốc lá dưới sự điều khiển của promoter phasolin có sự cải thiện rõ rệt khi so sánh với mẫu lá và hạt của các dòng được điều khiển bởi promoter 35S. Trong đó, dòng PH5 có sự biểu hiện GP5 tái tổ hợp là cao nhất đạt 22,15 ng/μg protein tan tổng số (chiếm 2,21% TSP), cao hơn khoảng 10 lần so với hàm lượng GP5 trong lá và khoảng 6 lần trong hạt của các dòng chuyển gen được điều khiển bởi promoter 35S.

Mức độ biểu hiện GP5 dưới sự điều khiển của promoter 35S trong lá thuốc lá ở nghiên cứu này cũng ở mức thấp tương đương với các nghiên cứu trước đó khi sử dụng constitutive promoter để điều khiển biểu hiện (sử dụng promoter UBQ1, hàm lượng GP5 đạt khoảng 0,0155% TSP, với promoter 35S đạt khoảng 0,0108% TSP trong lá thuốc lá) (Chia et al., 2011). Sử dụng các cây trồng khác cũng không có cải thiện đáng kể về mức độ biểu hiện GP5. GP5 biểu hiện ở khoai tây chuyển gen dao động từ 2,5–4,7 μg/g ở lá và 0,8–1,2 μg/g củ. Kết quả của một nghiên cứu gần đây đã tạo được chuỗi biểu hiện GP5, đạt mức độ biểu hiện ở lá vào khoảng 0,021–0,037% TSP (Chan et al., 2013). Sử dụng các promoter cơ định (constitutive-promoter) do promoter được hoạt hóa liên tục, protein được biểu hiện ở toàn bộ mô/cơ quan thực vật nên thường protein tái tổ hợp chỉ đạt

được ở mức thấp, không tạo ra những thay đổi lớn ở cây chủ. Ngược lại, các promoter biểu hiện đặc hiệu sẽ chỉ được biểu hiện trong phần mong muốn mà không làm thay đổi các bộ phận khác của cây như các promoter đặc hiệu ở quả, ở hạt, ở phôi. Trong đó, biểu hiện đặc hiệu ở hạt và sử dụng các promoter biểu hiện đặc hiệu ở hạt có nhiều lợi thế vượt trội. Phaseolin, một promoter được nghiên cứu đầu tiên và đến nay vẫn là một trong những promoter biểu hiện mạnh nhất. Promoter beta-phaseolin được phân lập từ các cây họ đậu, điều khiển sự tổng hợp phaseolin, một trong những protein chiếm thành phần lớn trong hạt đậu. Nghiên cứu của De Jaeger et al. (2002) cho thấy mức biểu hiện của scFv dưới sự điều khiển của beta-phaseolin trong hạt đậu *Phaseolus vulgaris* có thể lên tới 36,5% TSP. Sử dụng cấu trúc tương tự, khi biểu hiện scFv-Fc ở hạt *Arabidopsis thaliana* đạt mức 10% TSP (Van Droogenbroeck, 2007). Trong nghiên cứu này, sử dụng promoter beta-phaseolin cũng đã giúp cải thiện đáng kể mức độ biểu hiện của GP5 là 2,2% TSP. Rõ ràng, đây sẽ là một giải pháp hiệu quả giúp nâng cao mức độ biểu hiện của GP5.

KẾT LUẬN

Bằng việc sử dụng nguồn gen GP5 của virus PRRS phân lập ở Việt Nam ghép nối với LTB trong cấu trúc vector pPhaso-dest và pCB-35S, chúng tôi đã chuyển thành công cấu trúc gen LTB-GP5 vào cây thuốc lá. Kết quả cho thấy sử dụng promoter đặc hiệu ở hạt pPhaso cho mức biểu hiện protein cao hơn hẳn so với promoter cơ định 35S (gấp 6–10 lần). Đây sẽ là cơ sở để sử dụng cấu trúc đặc hiệu này như một giải pháp tăng cường biểu hiện kháng nguyên GP5 trong hạt của các thực vật sử dụng như một vaccine thực vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bradford M. M., 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Chan H. T., Chia M., Pang V., Jeng C., Do Y., Huang P., 2013. Oral immunogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen expressed in transgenic banana. *Plant Biotechnol*, J.11: 315–324.

- Chia M. Y., Hsiao S. H., Chan H. T., Do Y. Y., Huang P. L., Chang H. W., Tsai Y. C., Lin C. M., Pang V. F., Jeng C. R., 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(3-4): 215–225.
- Cramer C. L., Weissenborn D. L., Oishi K. K., Grabau E. A., Bennett S., Ponce E., Grabowski G. A., Radin D. N., 1996. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 792: 62–71.
- De Jaeger G., Scheffer S., Jacobs A., Zambre M., Zobell O., Goossens A., Depicker A., Angenon G., 2002. Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat. Biotechnol.*, 20: 1265–1268.
- Fang Y., Snijder E. J., 2010. The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res.* 154(1-2): 61–76.
- Höfgen R., Willmitzer L., 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.*, 16(20): 9877.
- Kasajima I., Ide Y., Ohkama-Ohstsu N., Hayashi H., Yoneyama T., Fujiwara T., 2004. A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 22: 49–52.
- Kirsch M. I., Hülseweh B., Nacke C., Rülker T., Schirrmann T., Marschall H. J., Hust M., Dübel S., 2008. Development of human antibody fragments using antibody phage display for the detection and diagnosis of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). *BMC Biotechnol.* 8: 66. Doi: 10.1186/1472-6750-8-66.
- 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(13): 1957–1961.
- 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(9): 4241–4250.
- Sambrook J., Russell D. W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd 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(24): 809–813.
- Topping J. F., 1998. Tobacco transformation, In Foster GD, Taylor SC, *Plant virology protocol*, 81: 365–485.
- Van Breedam W., Costers S., Vanhee M., Gagnon C. A., Rodríguez-Gómez I. M., Geldhof M., Verbeeck M., Van Doorselaere J., Karniyuchuk U., Nauwynck H. J., 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific mAbs: supporting diagnostics and providing new insights into the antigenic properties of the virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141(3-4): 246–257.
- Van Droogenbroeck B., Cao J., Stadlmann J., Altmann F., Colanesi S., Hillmer S., Robinson D. G., Van Lerberge E., Terryn N., Van Montagu M., Liang M., Depicker A., De Jaeger G., 2007. Aberrant localization and underglycosylation of highly accumulating single-chain Fv-Fc antibodies in transgenic *Arabidopsis* seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 1430–1435.

EXPRESSION OF ANTIGEN GP5 OF PRRS VIRUS IN TOBACO

Dao Thi Sen^{1,2}, Chu Hoang Ha¹, Nguyen Tuong Van¹

¹The Institute of Biotechnology (IBT), VAST

²Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

SUMMARY

PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) is the most significant infectious disease currently devastating the swine industry. In order to diversify antigen sources for vaccine production to against PRRSV, co-expressing LTB and PRRSV GP5- an important structure protein GP5 of PRRSV were expressed in tobacco. Genes encoded for GP5 of PRRSV isolated from pigs infected PRRSV in Vietnam in 2010 and was constructed in plant expression vector under the control of seed specific phaseolin promoter and constitutive promoter 35S. The genes were then transferred into the C9-1 tobacco using *Agrobacterium*. The stable insertion of LTB-GP5 genes in genome of transgenic tobacco was confirmed by PCR and RT-PCR. Western hybridization indicated that fused protein LTB-GP5 was successful expressed in tobacco seeds. Analysis of transgenic tobacco seeds revealed that under regulation of promoter beta-phaseolin, the level expression of GP5 was significant improved as quantified by ELISA (2.2 % of total soluble protein). This preliminary result is a foundation for expression of GP5 in seeds of other plants in the future.

Keywords: Antigen, GP5, LTB, plant vaccine, PRRSV.

Citation: Dao Thi Sen, Chu Hoang Ha, Nguyen Tuong Van, 2018. Expression of antigen GP5 of PRRS virus in tobacco. *Tap chi Sinh hoc*, 40(2): 177–183. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.12246>.

*Corresponding author email: vanngtg@gmail.com

Received 28 March 2018, accepted 30 June 2018