

TÁCH DÒNG VÀ THIẾT KẾ VECTOR TRUNG GIAN MANG GEN *IL-6* CỦA GÀ VIỆT NAM

Vũ Thị Thu Huyền*, Nguyễn Thị Kim Cúc,
Lê Thị Hồng Minh, Trần Thị Kim Dung, Phạm Việt Cường

Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *huyenvuibt@gmail.com

TÓM TẮT: Cytokines là một họ đa protein có vai trò quyết định trong kiểm soát hệ miễn dịch. Chúng xác định cả kiểu và qui mô của đáp ứng miễn dịch sau khi bị nhiễm nguồn bệnh hoặc chủng ngừa. Trong khuôn khổ bài báo này, gen *IL-6* của gà đã được tách dòng và gắn vào một vector con thoi, là trung gian để làm cơ sở cho việc thiết kế adenovirus vector, đưa gen cytokines vào gia cầm để tăng cường đáp ứng miễn dịch của chúng tới nguồn bệnh. Bằng phương pháp PCR, với cặp mồi đặc hiệu cho gen *IL-6* của gà với các trình tự nhận biết của enzymes giới hạn *Kpn I*, *Not I* và trình tự Kozak, đã tách dòng gen *IL-6* của gà (*ChIL-6*) vào vector pCR2.1. Trình tự gen *ChIL-6* trong vector tách dòng pCR2.1 đã được giải, có 726 nucleotides và sau khi BLASTn thấy trình tự này tương đồng 99% so với một số trình tự khác trong Ngân hàng gen quốc tế. Để thiết kế vector trung gian pShuttle mang gen *IL-6* của gà, plasmid tách dòng pCR2.1/*ChIL-6* và plasmid trung gian pShuttle được xử lý bằng *Kpn I* và *Not I*, sau đó, tiến hành phản ứng nối ghép gen *IL-6* vào pShuttle đã được mở vòng với sự giúp đỡ của T4 ligase và chọn các dòng *E.coli* DH5a biến nạp trên môi trường có ampicilin. Kiểm tra sự có mặt của gen *ChIL-6* trong pShuttle bằng enzymes giới hạn *Kpn I* và *Not I* cũng như phương pháp PCR. Kết quả nhận được cho thấy gen *ChIL-6* đã được gắn vào plasmid trung gian pShuttle và tạo vector tái tổ hợp pShuttle/*ChIL-6*.

Từ khóa: Cytokine, gà Việt Nam, interleukin-6, tách dòng, vector con thoi.

MỞ ĐẦU

Cytokines là một họ đa protein có vai trò quyết định trong kiểm soát hệ miễn dịch. Chúng xác định cả kiểu và qui mô của đáp ứng miễn dịch sau khi bị nhiễm nguồn bệnh hoặc chủng ngừa. Phụ thuộc vào tổ hợp các cytokines được tạo ra, đáp ứng miễn dịch bảo vệ có thể hoặc là đáp ứng trung gian qua kháng thể (Th2) hoặc đáp ứng trung gian tế bào (Th1). Vì vậy, cytokines là các ứng viên rất tốt cho phép chữa bệnh tự nhiên cũng như tá dược cho vaccine [1, 3, 5].

Interleukin-6 (*IL-6*) là một interleukin hoạt động như một cytokine tiền viêm và kháng viêm. Các tế bào T và macrophages tiết ra *IL-6* để kích thích đáp ứng miễn dịch khi bị chấn thương, đặc biệt khi bị bỏng hoặc các tổn thương mô khác dẫn đến viêm nhiễm. Trong trường hợp đáp ứng miễn dịch của vật chủ với nguồn bệnh lạ, thí dụ ở chuột, *IL-6* cần để kháng lại *Streptococcus pneumoniae*. *IL-6* cũng là một “myokine”, một loại cytokine được tạo ra ở cơ, và hàm lượng tăng khi cơ cơ. Trong quá trình luyện tập, người ta nghĩ rằng *IL-6* hoạt động theo kiểu giống như một hormone, huy động cơ chất và/hoặc tăng cường sự vận chuyển

cơ chất. *IL-6* có thể được macrophages tiết ra để phản ứng lại các phân tử vi sinh vật đặc hiệu, hay còn gọi là PAMPs. *IL-6* có vai trò chính trong điều chỉnh đáp ứng miễn dịch, các phản ứng pha cấp và tạo máu, hoạt hóa lymphocytes B và T. Vai trò quan trọng của *IL-6* như một điều biến miễn dịch là khả năng chuyển sự biệt hóa monocyte từ các tế bào dendric thành macrophages [2, 6].

IL-6 đã được nghiên cứu sử dụng như những chất bổ trợ sinh học cho các loại vaccine gia cầm cũng như trong điều trị khối u. Vì vậy, việc đưa nguồn cytokines này từ ngoài vào nhằm tăng cường chức năng miễn dịch của cơ thể vật chủ là vấn đề thu hút sự chú ý của các nhà khoa học, tiến tới áp dụng trong thực tế không những trên đối tượng động vật mà có thể trên cả người [7].

Trong bài báo này, gen *IL-6* của gà nuôi tại Việt Nam đã được tách dòng và gắn vào vector trung gian, làm cơ sở cho thiết kế vector adenovirus, một công cụ chuyển gen *IL-6* cho gà nhằm tăng cường miễn dịch của vật nuôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Vector tách dòng pCR[®] 2.1 (Invitrogen), pShuttle (Clontech), TA cloning Kit (Invitrogen), kit tinh sạch plasmid, tinh sạch sản phẩm PCR, tạo cDNA, enzyme giới hạn *Kpn* I và *Not* I, *E. coli* Top 10. Gà giống Ri (Viện Chăn nuôi Quốc gia). Các loại hóa chất cần thiết cho các kỹ thuật sinh học phân tử của các hãng Sigma, Merk...

Phương pháp

Tách RNA tổng số từ mô lá lách của gà bằng phương pháp sử dụng Trizol.

Tách dòng gen *IL-6* của gà: tiến hành PCR với cặp môi đặc hiệu gen *IL-6* của gà được thiết kế có các trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *Kpn* I và *Not* I và trình tự Kozak.

ChIL-6KozakF: TATCGCGGCCGC (*Not* I) GATATGGCTAACTTACCGAGGG.

ChIL-6KozakR: TCAGGGTACC (*Kpn* I) GGCCTGAAACTCCTGGTCTTTTC.

Thành phần PCR gồm: 0,5 µl template (cDNA từ RNA tổng số), 18 µl nước, 2 µl buffer 10x, 2 µl dNTPs, 1 µl ChIL-6KozakF, 1 µl ChIL-6KozakR, Taq: 0,5 µl. Chu trình nhiệt của PCR 94°C/2 phút, (94°C/1 phút, 68°C/45 giây, 72°C/1 phút) × 30 chu kỳ, 72°C/8 phút và giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm PCR được gắn vào vector tách dòng pCR2.1 với sự giúp đỡ của enzyme T4 ligase.

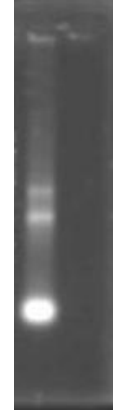
Thiết kế vector trung gian pShuttle mang gen *IL-6* của gà: cả hai plasmid pCR2.1/*ChIL-6* và pShuttle được xử lý riêng bằng *Kpn* I và *Not* I ở 37°C trong 2 giờ. Thành phần phản ứng cắt: 5 µl plasmid pCR2.1/*ChIL-6* hoặc pShuttle; 2 µl mỗi loại enzyme; 2,5 µl buffer; 13,5 µl nước khử ion. Điện di kiểm tra sản phẩm cắt trên gel agarose 1%, tinh sạch pShuttle và gen *ChIL-6* từ agarose gel. Thực hiện phản ứng ligation ở 14°C qua đêm với thành phần gồm 4 µl gen *chIL-6*, 1,5 µl T4-ligase, 1,5 µl buffer T4, 4 µl pShuttle và 4 µl H₂O. Kiểm tra hiệu quả gắn gen bằng enzyme giới hạn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách RNA tổng số từ mô lá lách của gà

Gà 1 tháng tuổi, được uống glutathione 100

mg/ngày, sau 3 ngày, thu mô lá lách của gà theo quy trình thường quy, tách mRNA từ mô lá lách theo phương pháp dùng trizol, ủ sản phẩm mRNA trong DNase trong 1 giờ ở 37°C (hình 1).

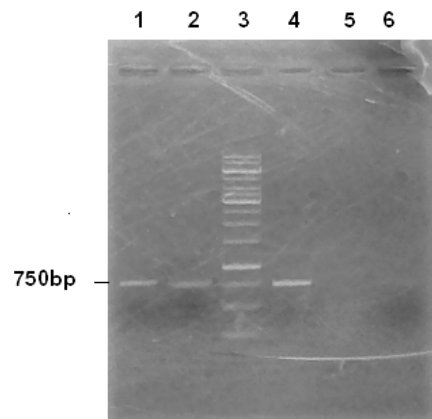


Hình 1. RNA tổng số từ mô lá lách của gà

Bằng phương pháp quang phổ kế, đã xác định nồng độ tương đối và kiểm tra độ tinh sạch của mẫu tách chiết. Kết quả OD₂₆₀/OD₂₈₀ = 1,87 và RNA có nồng độ khoảng 146,4 µg/ml.

Tách dòng gen *IL-6* của gà

Mẫu RNA tổng số được phiên mã ngược tạo cDNA, sử dụng Kit của hãng Fermentas với môi ngẫu nhiên, sau đó, sử dụng cặp môi đặc hiệu cho gen *IL-6* của gà để thu nhận đoạn gen *ChIL-6* bằng PCR (hình 2).



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại gen *IL-6* từ cDNA

1, 2, 4. Sản phẩm PCR;
3. Marker DNA 1kb plus (Fermentas).

Sản phẩm khuếch đại gen được chuyển trực tiếp vào vector nhân dòng pCR2.1 với sự hỗ trợ của enzyme T4 ligase ở 14°C qua đêm. Sau đó, vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến chủng DH5 α . Cây trái tế bào biến nạp lên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh ampicilin 100 μ g/ml và X-gal, nuôi ở 37°C qua đêm. Chọn dòng tế bào tái tổ

hợp dựa trên màu sắc xanh, trắng. Nuôi các dòng riêng rẽ trong môi trường LB có bổ sung ampicilin, tách DNA plasmid và kiểm tra trên gel agarose 1%. Để khẳng định đoạn gen *chIL-6* đã chuyển được vào vector nhân dòng pCR2.1, tiến hành giải trình tự gen trong plasmid từ khuẩn lạc trắng với cặp môi đặc hiệu.

```

1 atgaacttca cggagggctg cgaggcgacg ggacggcggc cggggagcgc cgggagccgc
61 cgccggagag cgccccgtcc cggccccgtc gcgctgctgc cgctgctgct gccgctgctg
121 ctgccgcccg ccgcccgcgt cccgctgccc gccgcccgcg actcgtccgg agagggttggg
181 ctggaggagg aggcgggggc gcggcgggcg ctgctcgact gcgagccgct ggcccgggtg
241 ctgcccgcacc gcgcccgtcca gctgcaggac gagatgtgca agaagttcac cgtgtgctgag
301 aacagcatgg agatgctcgt ccggaacaac ctcaacctgc ccaaggtgac ggaggaggac
361 ggctgcctgc tcgcccggctt cgacgaggag aaatgcctga cgaagctctt cagtggctctg
421 ttcgccccttc agacctacct ggaattcatt caagagactt tcgatagcga aaagcagaac
481 gtcgagtctc tgtgctacag cacaagcac ctggcgccca cgatccggca gatggtgata
541 aatcccgatg aagtggatcat ccagactcg gccgcccaga aatccctcct cgccaatctg
601 aagtcagata aggactggat agagaaaatc accatgcacc tcctcctccg agactttact
661 tcgtttatgg agaagaccgt gagggccgtt cgctatttga aaaagaccag gagtttcagt
721 gcctga

```

Bảng 1. So sánh trình tự *ChIL-6* nhận được từ gà Việt Nam với các trình tự đã đăng ký trong Genbank bằng chương trình BLASTn

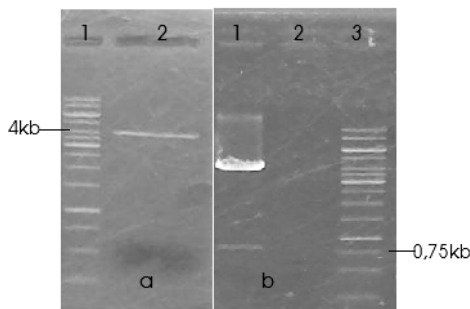
Ký hiệu	Mô tả	Độ phủ	Độ đồng nhất
HM179640.1	<i>Gallus gallus</i> interleukin-6 (IL6) mRNA, complete cds	97%	99%
HM367074.1	<i>Gallus gallus</i> interleukin-6 precursor, mRNA, complete cds	97%	99%
NM204628.1	<i>Gallus gallus</i> interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6), mRNA >emb AJ309540	97%	99%

Đã tiến hành đăng ký trình tự gen Interleukin-6 dài 726 bp của gà Việt Nam trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số JQ897539.

Li et al. (2010) [4] đã tách RNA tổng số từ lymphocytes lá lách gà 1 tháng tuổi sau khi được kích thích bằng ConA trong 20 giờ. Sử dụng Kit sao chép ngược Quantscript (Trung Quốc) để tạo cDNA và bằng PCR, gen *IL-6* của gà đã được tách dòng vào pMD18-T vector và xác định được ORF 726 bp. Kết quả phân tích bằng phần mềm Bioedit cho thấy, trình tự này giống 99% so với trình tự gà của Việt Nam.

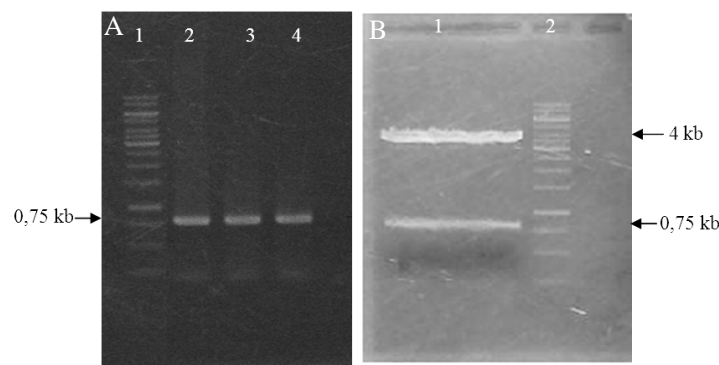
Thiết kế vector trung gian mang gen *IL-6* của gà

Để gắn gen *ChIL-6* vào vector trung gian, cả hai plasmid pCR2.1/*ChIL-6* và pShuttle đều được cắt bằng các enzyme giới hạn *Kpn I* và *Not I* theo phương pháp mô tả và sản phẩm cắt được kiểm tra trên gel agarose 1% (hình 3). Hai enzyme mở vòng plasmid pShuttle và cho một băng trên điện di độ khoảng 4 kb, tương ứng với kích thước của pShuttle, trong khi đó, plasmid pCR2.1/*ChIL-6* bị cắt thành hai băng, băng lớn hơn kích thước khoảng 4 kb, tương ứng với kích thước của pCR2.1 và băng dưới có kích thước tương đương với sản phẩm PCR của gen *ChIL-6*, khoảng 750 bp. Các băng của pShuttle và gen *ChIL-6* được làm sạch bằng GeneJET Gel Extraction kit (Fermentas) từ agarose gel cho phản ứng gắn tiếp theo.



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm cắt của pShuttle (3a) và pCR2.1/*ChIL-6* (3b). Marker DNA 1kb plus (Fermentas) (2).

Gen *ChIL-6* được gắn vào vector pShuttle trong phản ứng tổng thể tích 15 μ l với sự trợ giúp của enzyme T4 ligase ở 14°C qua đêm. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α khả biến, nuôi qua đêm ở 37°C trên môi trường LB bổ sung Ampicilin 100 μ g/ml để chọn lọc dòng biến nạp. Khuếch đại lượng plasmid của một vài khuẩn lạc bất kỳ trong môi trường LB lỏng có kháng sinh qua đêm. Tách plasmid từ các dòng *E. coli* chọn lọc và kiểm tra kết quả gắn gen bằng enzyme giới hạn *Kpn* I, *Not* I và PCR, điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kết quả gắn gen (hình 4).



Hình 4. Kiểm tra sự có mặt của gen *ChIL-6* trong plasmid pShuttle tái tổ hợp
A. Sản phẩm PCR với template là pShuttle/*ChIL-6* và cặp mồi đặc hiệu cho gen *ChIL-6*;
B. Sản phẩm cắt của pShuttle/*ChIL-6*.

Plasmid từ dòng *E. coli* biến nạp khi được cắt bằng hai enzyme giới hạn *Kpn* I và *Not* I cho 2 băng trên điện di đồ (hình 4B, giếng 1). Băng trên có kích thước tương ứng với kích thước của pShuttle (4 kb) và băng nhỏ bên dưới có kích thước tương đương gen *IL-6* của gà. Kết quả nhận được cho thấy, gen *ChIL-6* đã gắn thành công vào vector pShuttle, tạo vector tái tổ hợp pShuttle/*ChIL-6*. Điều này được khẳng định bằng kết quả PCR, khi sử dụng pShuttle/*ChIL-6* làm khuôn với cặp mồi đặc hiệu cho gen *ChIL-6* (hình 4A). Trình tự đoạn gen *ChIL-6* gắn vào vector pShuttle đã được giải và phân tích bằng chương trình Bioedit. Kết quả cho thấy, trình tự nucleotide của đoạn gen không thay đổi so với trình tự nhận được trong pCR2.1/*ChIL-6*.

Kết quả nghiên cứu này là cơ sở để thiết kế plasmid mang gen *ChIL-6* hoặc các gen cytokine khác dựa trên adenovirus vector bằng

phương pháp dòng nhiễm, từ đó có thể đưa cytokine từ ngoài vào gia cầm nhằm tăng khả năng miễn dịch của đàn, tăng sức chịu đựng của gia cầm với các điều kiện ngoại cảnh bất lợi cũng như các nguồn bệnh.

KẾT LUẬN

Đoạn gen hoạt tính *Interleukin-6* của gà Việt Nam đã được tách dòng và trình tự có 726 bp. Đã tiến hành đăng kí trình tự đoạn gen *chIL-6* dài 726 bp của gà Việt Nam trên Ngân hàng gen Quốc tế với mã số JQ897539.

Trình tự đoạn gen *ChIL-6* với các điểm nhận biết của các enzyme giới hạn *Kpn* I và *Not* I cũng như trình tự Kozak đã được gắn vào vector trung gian pShuttle, tạo vector tái tổ hợp pShuttle/*ChIL-6*. Trình tự nucleotide trong vector trung gian không thay đổi so với trình tự trong vector tách dòng pCR2.1.

Lời cảm ơn: Đề tài này được hỗ trợ về kinh phí của chương trình Công nghệ sinh học nông nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, mã số 1121/HĐ_BNN_KHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Giansanti F., Giardi M. F., Botti D., 2006. Avian Cytokines - An Overview. Current Pharmaceutical Design, 12(24): 3083-3099.
- Kishimoto T., 2006. Proceedings: Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. Arthritis Research & Therapy, 8(Sup. 2): S2.
- Kogut M. H., 2000. Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: A review Avian Pathology, 29(5): 395-404.
- Li M., Wang Y., Zou N., Cao S., Wen X., Huang Y., 2010. The polyclonal antibody against chicken interleukin-6 prepared by immunization of recombinant eukaryotic plasmid can react efficiently with its prokaryotic expression protein. J. Animal Veterinary Adv., 9(21): 2679-2684.
- Schneider K., Klaas R., Kaspers B., Staeheli P., 2001. Chicken interleukin-6: cDNA structure and biological properties. Eur. J. Biochem., 268: 4200-4206
- Smolen J. S., Maini R. N., 2006. Interleukin-6: a new therapeutic target. Arthritis Res. Ther., 8(Sup. 2): S5.
- Thompson A. L., Herman F. Staats, 2011. Review article Cytokines: The future of intranasal vaccine adjuvants. Clinical & Develop Immunol., Article ID 289597, 17 pages, doi:10.1155/2011/289597.

CLONING AND CONSTRUCTION OF ENTRY VECTOR CARRYING *IL-6* GEN FROM VIETNAMESE CHICKEN

Vu Thi Thu Huyen, Nguyen Thi Kim Cuc,
Le Thi Hong Minh, Tran Thi Kim Dung, Pham Viet Cuong

Institute of Marine Biochemistry, VAST

SUMMARY

Cytokines are a diverse family of proteins that play a crucial role in controlling the immune system. They determine both the type and extent of an immune response that is generated following infection with a pathogen or after vaccination. In this paper, chicken *IL-6* gene (*ChIL-6*) was cloned and ligated in a shuttle vector, as basic to construction adenovirus vector for cytokine gene delivery in chicken for improving of their immune responses to pathogens. By PCR technique, using specific primers for chicken *IL-6* gene (*ChIL-6*) possessing recognition sites of restriction enzymes *Kpn* I and *Not* I and Kozak sequence, the *ChIL-6* was cloned into pCR2.1 vector. The gene in recombinant pCR2.1/*ChIL-6* was sequenced, the obtained sequence had 726 nucleotides and was 99% similarly to the sequences in GenBank after BLASTn. The sequence has been reported to GenBank with Accession no JQ897539. For construction pShuttle/*ChIL-6* vector, the cloning vector pCR2.1/*ChIL-6* and pShuttle were digested by *Kpn* I and *Not* I, then the ligation reaction was performed with T4 ligase and transformed *E. coli* DH5a clones were selected on LB medium supplemented with ampicilin. The presence of *ChIL-6* gen in pShuttle vector was verified by digestion of recombinant plasmid with *Kpn* I and *Not* I, as well as by PCR. Received results demonstrated that *ChIL-6* gen was ligated into pShuttle and gave pShuttle/*ChIL-6* vector.

Keywords: Chicken, cloning, cytokine, interleukin-6, pshutter vector.

Ngày nhận bài: 25-7-2012