

BIỂU HIỆN GEN HA5.1 ĐƯỢC CẢI BIẾN MÃ CÓ HOẠT TÍNH SINH HỌC TRONG NẤM MEN *PICHA PASTORIS* X33

Võ Viết Cường¹, Lê Thị Huệ², Đỗ Thị Huyền^{2*}, Lê Quỳnh Giang²,
Nguyễn Thị Quý², Trương Nam Hải²

¹Trung tâm nhiệt đới Việt-Nga

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *dohuyen@ibt.ac.vn

TÓM TẮT: Bên cạnh ảnh hưởng của điều kiện lên men và promotor thì mức độ biểu hiện protein ngoại lai trong *Pichia pastoris* còn phụ thuộc các yếu tố liên quan đến quá trình phiên mã và dịch mã như: chỉ số phù hợp gen ngoại lai với chủng biểu hiện; sự ưu tiên sử dụng các mã bộ ba của *P. pastoris*; hàm lượng GC và sự phân bố GC dọc theo gen. Để thu được tiểu phần HA1 (HA5.1) của kháng nguyên hemagglutinin H5 có hoạt tính sinh học làm cơ sở cho việc tạo vaccine phòng cúm A/H5N1 cho gia cầm, chúng tôi tiến hành tối ưu mã bộ ba gen *ha5.1* có kích thước 1 kb của virus cúm A/H5N1 phù hợp với hệ biểu hiện nấm men *P. pastoris* X33. Gen sau khi được cải biến (*mha5.1*) có CAI đạt 0,98, hàm lượng trung bình GC từ 41,93 giảm xuống 36,64%. Tần suất sử dụng các mã bộ ba ở mức phù hợp 91-100% tăng mạnh từ 44% trước cải biến lên 94% và không còn các mã bộ ba hiếm. Sau khi tối ưu mã bộ ba, gen *mha5.1* được ghép nối vector pPICZamha 5.1 và nhân dòng trong *E. coli* DH10b. Vector pPICZamha5.1 sau đó được biến nạp vào nấm men *P. pastoris* X33. Protein tái tổ hợp MHA5.1 được tổng hợp dưới sự điều khiển của promotor *AOX1* có kích thước 50-70 kDa và tiết ra ngoài môi trường sau 72 giờ nuôi cấy, nhiệt độ 30°C, pH môi trường cảm ứng 6,7 đến 7,2, với chất cảm ứng 1% methanol. HA5.1 tái tổ hợp liên kết đặc hiệu với kháng thể thô kháng virus cúm A/H5N1 và có hoạt tính ngưng kết hồng cầu gà ở độ pha loãng mẫu 2⁶.

Từ khóa: Chỉ số phù hợp mã bộ ba, cúm gia cầm A/H5N1, *P. pastoris* X33, pPICZamha5.1 protein HA5.1 tái tổ hợp.

MỞ ĐẦU

P. pastoris là một trong những hệ biểu hiện eukaryote được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu biểu hiện các protein ngoại lai, đặc biệt là các gen mã hóa protein có bản chất glycoprotein do có quá trình cải biến sau dịch mã như phosphoryl hóa, acetyl hóa, glycosyl hóa khá hoàn thiện. Protein biểu hiện được tiết ra môi trường với hàm lượng lớn, có tính ổn định cao và giữ nguyên hoạt tính sinh học [2, 10]. Một trong những vấn đề cần xem xét trước khi biểu hiện gen ngoại lai không chỉ đối với *P. pastoris* mà với mọi hệ biểu hiện là cân bằng tỷ lệ sử dụng mã bộ ba gen ngoại lai với chủng biểu hiện; điều chỉnh hàm lượng GC, sự phân bố GC dọc theo chiều dài của gen; sự phân bố tỷ lệ mã bộ ba [5, 7].

Trong quá trình tiến hóa, các loài khác nhau có tính thiên vị với một loại mã bộ ba nhất định trong số các mã bộ ba đồng nghĩa cùng mã hóa cho một axit amin. Do đó có thể mã bộ ba được ưu tiên sử dụng ở loài này nhưng lại trở thành

mã bộ ba hiếm ở loài khác. Tần suất sử dụng bộ ba AGG, AGA mã hoá cho Arg ở người là 11,2%, trong khi đó, giá trị này ở *E. coli* là 2,1% và 2,4%. Ngược lại *E. coli* chủ yếu sử dụng bộ ba CGT để mã hoá cho Arg với tần suất 16,4% [5]. Hàm lượng GC cao và phân bố không đều dễ tạo cấu trúc thứ cấp, như cấu trúc kẹp tóc. Cấu trúc thứ cấp được hình thành hay mất đi gần vùng mRNA không dịch mã và gần mã bộ ba khởi đầu có ảnh hưởng đến tốc độ suy thoái mRNA và ảnh hưởng tới khởi đầu dịch mã [1, 4].

Hemagglutinin (HA) của virus cúm A là một kháng nguyên bề mặt quan trọng, có bản chất là glycoprotein. HA đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm vào tế bào chủ của virus. Kháng nguyên HA được xem là thành phần quyết định để tạo vaccine. Kết quả các nghiên cứu cho thấy, phần lớn sự bảo hộ chống lại virus cúm A là kết quả của đáp ứng miễn dịch kháng lại kháng nguyên HA, đặc biệt là tiểu phần HA1. Sealens et al. (1999) [11] đã biểu hiện gen HA từ chủng virus cúm A/H3N2

trong nấm men *P. pastoris*, HA tái tổ hợp được tiết ra môi trường nuôi cấy và có khả năng bảo vệ chuột khi công độc với liều 10 x LD50 chủng cúm A/H3N2. Có nhiều công trình nghiên cứu tối ưu mã bộ ba biểu hiện gen HA làm vaccine phòng cúm. Kết quả nghiên cứu của Chen et al. (2008) [3] cho thấy HA type đại không biểu hiện protein tốt trong tế bào 293 T của chuột, lượng mRNA thấp trong tế bào chất và dịch mã không hiệu quả do các sai khác trong sử dụng mã bộ ba. Sau cải biến các mã bộ ba làm tăng hàm lượng GC từ 42% lên 58% để phù hợp với hệ biểu hiện tế bào động vật có vú, mRNA tổng hợp có tính ổn định cao, được chế biến và xuất từ nhân ra tế bào chất tốt hơn, vaccine cung cấp miễn dịch bảo hộ hiệu quả ở chuột với chủng virus H5N1. Trong nghiên cứu này, với mục đích thu được HA5.1 tái tổ hợp có hoạt tính HA cao dùng để chế vaccine phòng cúm A/H5N1 cho gia cầm chúng tôi tiến hành tối ưu mã bộ ba và biểu hiện gen mã hoá cho kháng nguyên HA5.1 của virus cúm A/H5N1 trong *P. pastoris* X33.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Vi khuẩn *E. coli* DH10b [F-*gyrA462 endA1* Δ (*sr1-recA*) *mcrB mrr hsdS20*(rB-, mB) *supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Smr) *xyl5 Δ leu mtl1*] (Invitrogen) được sử dụng để tách dòng gen. Chủng nấm men *P. pastoris* X33 (Invitrogen) được sử dụng làm chủng biểu hiện. Gen *mha5.1* được tổng hợp từ hãng (Genscript). Plasmid pPICZ α A (Invitrogen) được sử dụng làm vector tách dòng và biểu hiện.

Kháng thể thô kháng virus cúm A/H5N1 do phòng Vi sinh phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp. Hồng cầu gà do Trung tâm Giống gia cầm Thụy Phương cung cấp.

Cải biến gen HA5.1

Sử dụng công cụ phân tích mã bộ ba hiếm (Rare Codon Analysis Tool) của hãng Genscript để kiểm tra sự phù hợp của trình tự gen *ha5.1* với hệ biểu hiện *P. pastoris*. Sự phân tích dựa trên các tiêu chí sau: CAI (Codon Adaption Index - Chỉ số phù hợp mã bộ ba); hàm lượng G+C và sự phân bố của GC dọc theo chiều dài của gen; sự phân bố tỷ lệ phần trăm các mã bộ ba.

Thiết kế vector biểu hiện pPICZ α mha5.1

Gen *ha5.1* có kích thước 1 kb sau khi tối ưu mã bộ ba được tổng hợp và được đưa vào vector pPICZ α mha5.1. Vector pPICZ α mha5.1 sau đó biến nạp vào tế bào *E. coli* DH10b và chọn lọc trên đĩa LB chứa 100 μ g/ml zeocin. Plasmid tách từ thể biến nạp được kiểm tra bằng các enzyme hạn chế. Plasmid tái tổ hợp được cắt mở vòng bằng *Bst*XI và được biến nạp bằng xung điện vào tế bào nấm men *P. pastoris* X33. Sự có mặt của gen *mha5.1* trong hệ gen thể biến nạp được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 5' AOX1 và 3' AOX1 có trình tự như sau: 5' AOX1: 5' gactggtccaattgacaagc 3'; 3' AOX1: 5' gcaaatggcattctgacatcc 3'.

Biểu hiện gen *mha5.1* trong *P. pastoris* X33

Chủng nấm men tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường thạch MD có zeocin chứa YNB 1,34%; glucose 2%; biotin 4.10⁻⁵ % sau 3 ngày ở 30°C. Các khuẩn lạc mọc lên từ đĩa MD được chuyển sang môi trường MD lỏng nuôi cấy qua đêm ở 30°C, lắc 250 vòng/phút đến OD_{600nm} đạt khoảng 6. Chuyển 1% dịch nuôi cấy qua đêm vào môi trường BMGY: yeast extract 1%; peptone 2%; glycerol 1%; potassium phosphate 100 mM, pH 6; YNB 1,34%; biotin 4x10⁻⁵%, tiếp tục nuôi cấy khoảng 16 đến 18 giờ để OD_{600nm} đạt từ 2 đến 6. Sau đó tế bào nấm men được chuyển sang môi trường cảm ứng BMMY: yeast extract 1%; peptone 2%; potassium phosphate 100 mM, pH 6; YNB 1,34%; biotin 4x10⁻⁵%. Chất cảm ứng methanol được bổ sung vào môi trường nuôi cấy đến nồng độ cuối cùng đạt 1%.

Kiểm tra protein ngoại lai tiết ra môi trường nuôi cấy bằng điện di SDS-PAGE và Western blot

Dịch nuôi cấy sau 72 giờ cảm ứng được ly tâm để loại bỏ tế bào. Protein tổng số trong dịch nuôi cấy được phát hiện bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 12,6% sau đó nhuộm bạc. Đối với thí nghiệm Western blot dịch nuôi cấy thu được từ chủng *P. pastoris* X33 tái tổ hợp sau khi điện di được chuyển sang màng PVDF, sử dụng kháng thể 1 là kháng thể thô kháng virus cúm A/H5N1 pha loãng 5.000 lần và kháng thể 2 là kháng thể dê kháng IgG thô cộng hợp enzyme horseradish peroxidase (HRP) pha

loãng 10.000 lần.

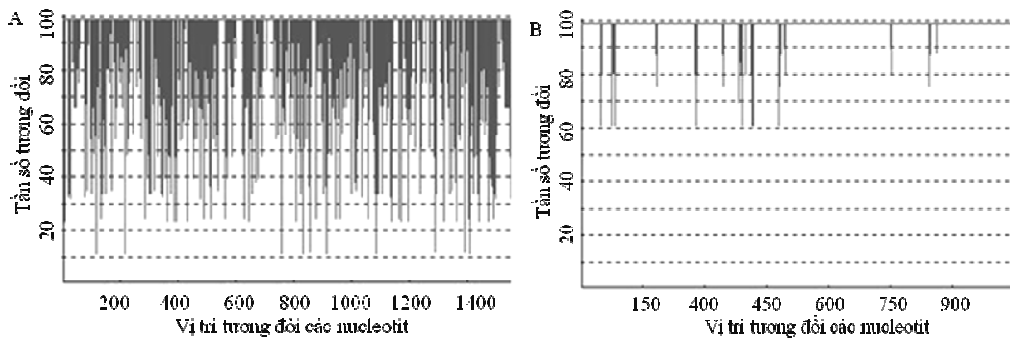
Kiểm tra hoạt tính ngưng kết hồng cầu của protein tái tổ hợp

Kháng nguyên HA của virus cúm có khả năng liên kết với axit sialic của thụ thể trên bề mặt hồng cầu làm cho hồng cầu bị ngưng kết tạo màng trên đĩa microtiter đáy chữ U. Việc đánh giá khả năng gây ngưng kết hồng cầu gà được tiến hành như sau: cho 50 µl NaCl 0,9% vào 12 giếng của đĩa TaKaShi, bổ sung 50 µl

dịch nuôi cấy vào giếng 1, trộn đều và hút 50 µl từ giếng thứ 1 sang giếng thứ 2 để pha loãng mẫu theo cơ số 2, trộn đều và hút 50 µl từ giếng thứ 2 sang giếng thứ 3, làm tương tự với các giếng còn lại. Cuối cùng bổ sung vào các giếng 50 µl hồng cầu gà 1% pha loãng trong NaCl 0,9%, trộn đều để ở nhiệt độ phòng 30 phút.

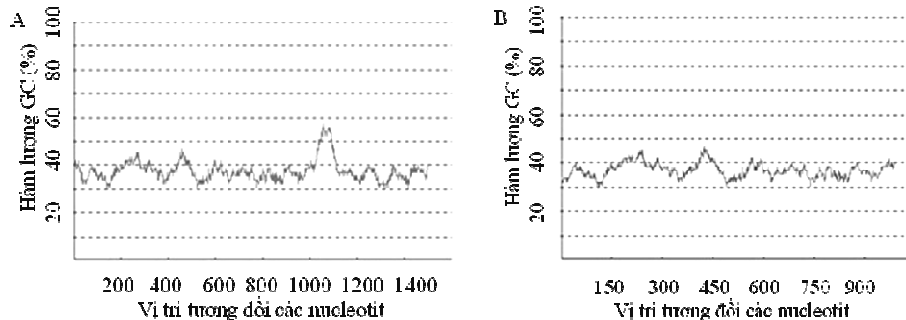
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cải biến gen *ha5.1*



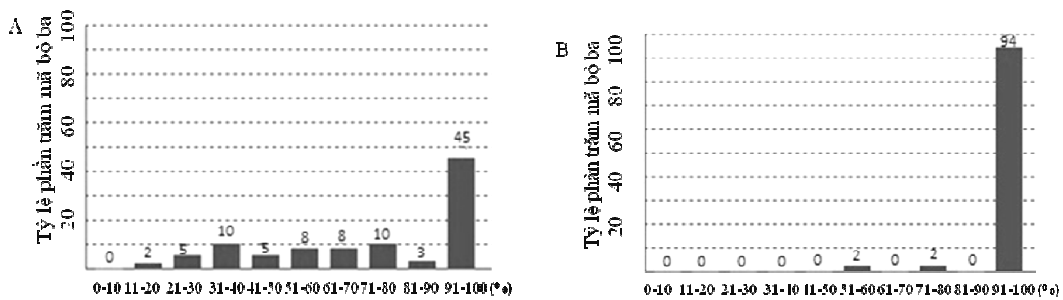
Hình 1. Tần số sử dụng các mã bộ ba dọc theo chiều dài gen trong *P. Pastoris*

A. Gen *ha5.1* trước khi cải biến, chỉ số CAI = 0,69;
 B. Gen *ha5.1* đã được cải biến (*mha5.1*) có chỉ số CAI = 0,98.



Hình 2. Hàm lượng GC phân bố dọc theo chiều dài của gen

A. Gen *ha5.1* trước khi cải biến; B. Gen *ha5.1* đã được cải biến (*mha5.1*).



Hình 3. Sự phân bố tỷ lệ phần trăm các mã bộ ba phù hợp của gen *ha5.1* trong *P. pastoris*.

A. Gen *ha5.1* trước khi cải biến; B. Gen *ha5.1* đã được cải biến (*mha5.1*).

Kết quả phân tích mức độ phù hợp của trình tự gen *ha5.1* (mã số AJ867074) với hệ biểu hiện *P. pastoris* trước cải biến cho thấy: Gen *ha5.1* trước cải biến có chỉ số CAI thấp, CAI = 0,69, các mã bộ ba hiếm có tần số sử dụng dưới 30% chiếm 6%, chỉ có 44% mã bộ ba phân bố ở mức 91 - 100%. Lượng GC phân bố dọc theo chiều dài gen không đều, do đó dễ tạo cấu trúc thứ cấp ở mRNA và kìm hãm sự dịch mã (hình 1A, 2A, 3A).

Sau khi cải biến mã, gen *mha5.1* có chỉ số phù hợp mã CAI để biểu hiện trong *P. pastoris* đạt 0,98. Các mã bộ ba đều có tần số sử dụng ở

mức cao trên 60% và không còn các mã bộ ba hiếm (hình 1B). Hàm lượng GC trung bình giảm xuống còn 36,64%, lượng GC phân bố đều hơn so với trước cải biến (hình 2B). Đặc biệt tần suất sử dụng các mã bộ ba ở mức 91-100% tăng mạnh từ 44% lên 94%, còn lại 2% các mã bộ ba phân bố ở mức 51-60%, 2% phân bố ở mức 71-80% (hình 3B). Trình tự nucleotit gen *ha5.1* và *mha5.1* (hình 4) trước và sau cải biến có độ tương đồng 77%. Trình tự axit amin do hai gen *ha5.1* và *mha5.1* mã hóa có độ tương đồng 100%.

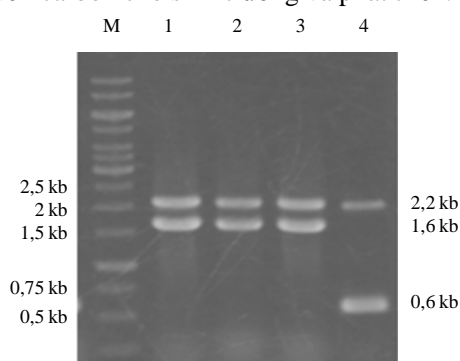
1	CATCATCATCATCATCATATGGAAAGATTGTTTTGTTGTTGGCTATCGTTTTCTTTGGT	59
60	TAAGTCTGATCAAATCTGTATCGTTACCATGCTAACAACCTACTGAACAAGTTGATAC	119
120	TATTATGAAAAAGAACGTTACTGTTACTCATGCTCAAGATATTTTGGAAAAGACTCATAA	179
180	CGGAAAGTTGTGTGCTTTGGATGGTGTAAAGCCATTGATTTTGAGAGATTGTTCTGTTC	239
240	TGGTTGGTTGTTGGGTAACCCAATGTGTGATGAATTCATCAACGTTCCAGAATGGTCTTA	299
300	CATTGTTGAAAAGGCTAACCCAGTTAACGATTTGTGTTACCCAGGAGATTTTAAACGATTA	359
360	CGAAGAATTGAAGCATTGTTGTTCCAGAATCAACCATTTTCGAAAAGATTCAAATCATCCC	419
420	AAAGTCTTCTTGGTCTTCTCATGAAGCTTCTTTGGGTGTTTCTTCTGCTTGTCCATACCA	479
480	GGGAAAGTCTTCTTTCTTTAGAAACGTTGTTTGGTTGATTAAGAAGAAGCTACTTACCC	539
540	AACATATTAAGAGATCTTACAACAACACTAACCAAGAAGATTTGTTGGTTTTGTGGGGTAT	599
600	TCATCATCCAAACGATGCTGCTGAACAAATTAAGTTGTACCAAACCCAACACTACTTACAT	659
660	TTCTGTTGGTACTTCTACTTTGAACCAAAGATTGGTTCCAAGAATTGCTACTAGATCTAA	719
720	GGTTAACGGTCAATCTGGTAGAATGGAATTTTCTGGACTATTTTGAAGCCAAACGATGC	779
780	TATTAACTTTGAATCTAACGGTAACTTTATTGCTCCAGAATACGCTTACAAGTTGGTTAA	839
840	GAAGGAGATTCTACTATTATGAAATCTGAATTTGAATACGGTAACTGTAACACTAAGTG	899
900	TCAAACCTCAATGGGTGCTATTAACCTTCTATGCCATTTTATAACATTCCATTGAC	959
960	TATTGGTGAATGTTCCAAAGTACGTTAAGTCTAACAGATTGGTTTTGGCTACTGGTTTGAG	1019
1020	AAACTCTCCACAAAGAGAAAGA	1041

Hình 4. Trình tự gen *mha5.1*. Các nucleotit trong khung sẫm màu là nucleotit đã được cải biến so với trình tự *ha5.1* (mã số AJ867074).

Thiết kế vector biểu hiện pPICZ*mha5.1*

Gen *ha5.1* có kích thước 1 kb sau khi tối ưu mã bộ ba được tổng hợp nhân tạo và đưa vào vector pPICZ*mha5.1* để tách dòng, nhân dòng vào chuyển vào nấm men *P. pastoris*. Genome nấm men tái tổ hợp đã được tách chiết, dùng làm khuôn để kiểm tra sự có mặt của gen *mha5.1* trong hệ gen bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 5' AOX1 và 3' AOX1 nằm ở hai đầu của gen, cách gen một khoảng cách là 0,6 kb. Sản phẩm PCR từ thể biến nạp với plasmid pPICZ*mha5.1* (Hình 5) gồm 2 đoạn DNA kích thước 1,6 kb và 2,2 kb tương ứng với đoạn DNA mang gen *mha5.1* được chèn vào hệ gen và đoạn DNA mã hóa cho gen aldehyde oxidase 1 trong hệ gen của nấm men đại. Chính enzyme

này đã giúp nấm men sử dụng methanol làm nguồn carbon cho sinh trưởng và phát triển.

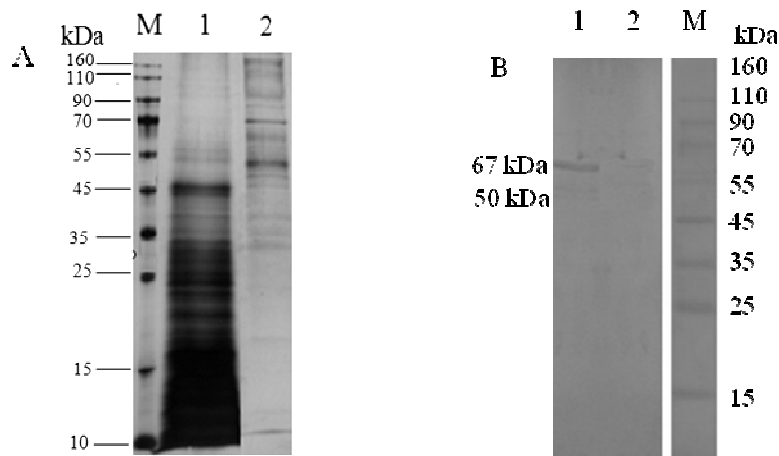


Hình 5. Phân tích sản phẩm PCR khuếch đại đoạn DNA nằm giữa hai trình tự 5'AOX1 và 3'AOX1

M. Marker 1-3: thể biến nạp chứa plasmid pPICZ α Amha5.1; 4. Thể biến nạp chứa plasmid pPICZ α A

Biểu hiện protein HA5.1 trong *P. pastoris* X33

Theo lý thuyết, protein MHA5.1 tái tổ hợp có kích thước 43 kDa. Tuy nhiên, trên cả gel polyacrylamit và trên màng Western blot có sử dụng kháng thể kháng virus cúm A/H5N1, protein ngoại lai MHA5.1 được tổng hợp có kích thước từ 50 kDa đến 57 kDa (hình 6).



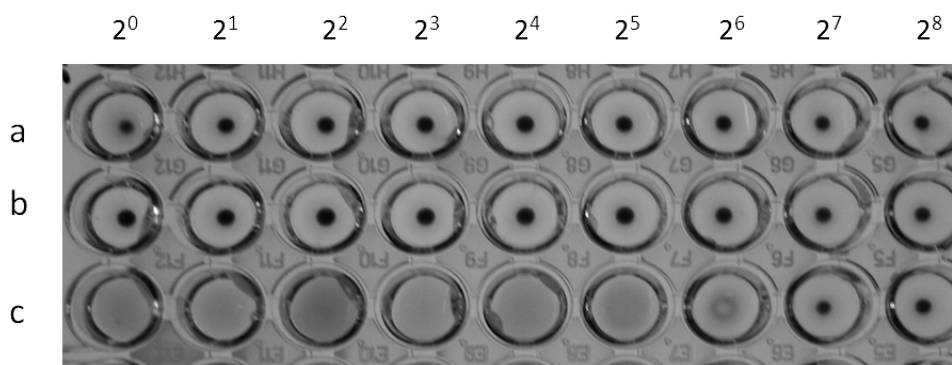
Hình 6. Phân tích protein ngoại bào từ dịch nuôi cấy chủng nấm men tái tổ hợp trên gel polyacrylamide 12,6% (A) và Western blott (B)

M. Thang protein chuẩn; 1. Mẫu protein ngoại bào dịch nuôi cấy chủng *P. pastoris* X33 mang plasmid tái tổ hợp pPICZ α mha5.1; 2. Mẫu protein ngoại bào dịch nuôi cấy chủng *P. pastoris* X33 mang vector pPICZ α A (đối chứng âm).

Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của MHA5.1

Hoạt tính sinh học của kháng nguyên HA là hoạt tính ngưng kết hồng cầu gà. Trong dịch lên men chủng đối chứng âm (hình 7b), protein HA5.1 không được tổng hợp nên tất cả hồng

cầu gà đã bị sa lắng dưới đáy giếng chữ U. Trong khi đó dịch lên men từ chủng mang gen *mha5.1* đã làm cho hồng cầu bị ngưng kết, tạo màng không sa lắng, với độ pha loãng môi trường nuôi cấy từ 2^0 đến 2^6 (hình 7c).



Hình 7. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu gà của MHA5.1 trong dịch lên men

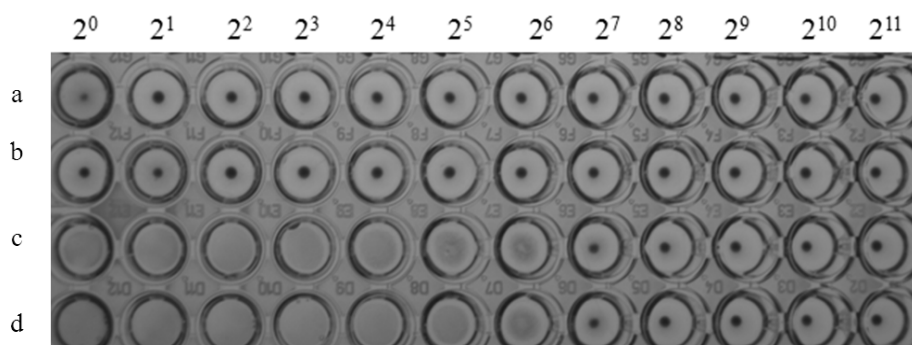
a. Đối chứng âm - không có mẫu; b. Đối chứng âm - dịch nuôi cấy tế bào *P. pastoris* X33 mang vector pPICZ α A; c. dịch nuôi cấy tế bào *P. pastoris* X33 mang plasmid tái tổ hợp pPICZ α mha5.1.

Như vậy, MHA5.1 tái tổ hợp sau khi được tối ưu mã bộ ba giữ nguyên được hoạt tính ngưng kết hồng cầu gà. Đây là một đặc tính quan trọng cho thấy protein MHA5.1 tái tổ hợp được glycosyl và gấp cuộn đúng với cấu trúc tự nhiên, làm tăng tính sinh miễn dịch của kháng nguyên.

Ảnh hưởng pH đến quá trình biểu hiện HA5.1

Theo nghiên cứu của Saelens et al. (1999)

[11] pH của môi trường cảm ứng có ảnh hưởng rõ rệt lên mức độ biểu hiện protein HA tái tổ hợp ở *P. Pastoris*. *P. pastoris* có thể sinh trưởng được ở khoảng pH 3 - 7. Vì vậy chúng tôi lựa chọn 5 pH của môi trường cảm ứng ban đầu khác nhau: pH 4,0; pH 5,0; pH 6; pH 6,7 và pH 7,2 để kiểm tra mức độ ảnh hưởng của pH đến khả năng biểu hiện và hoạt tính của protein tái tổ hợp. Trước khi kiểm tra hoạt tính ngưng kết, pH môi trường được đưa về pH 6.



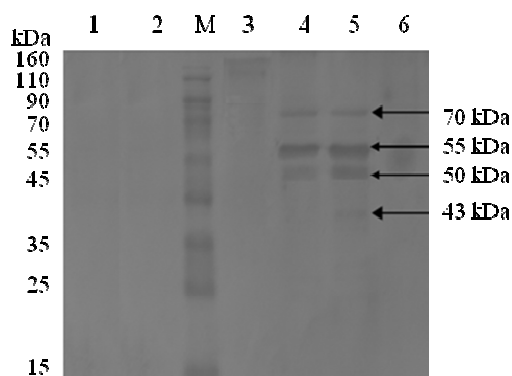
Hình 8. Hoạt tính MHA của mẫu dịch nuôi cấy chủng nấm men tái tổ hợp ở các pH môi trường cảm ứng ban đầu pH 4,0; pH 6,7 và pH 7,2

a. Mẫu dịch nuôi cấy tế bào *P. pastoris* X33 mang vector pPICZ α A (đôi chứng âm); b, c, d. Mẫu dịch nuôi cấy tế bào *P. pastoris* X33 mang plasmid pPICZamha5.1 ở các pH môi trường cảm ứng ban đầu là: pH 4,0; pH 6,7 và pH 7,2.

Khi đưa pH môi trường về pH 6 chỉ có dịch nuôi cấy chủng *P. pastoris* X33 mang plasmid pPICZamha5.1 ở các pH môi trường cảm ứng ban đầu là: pH 6,7; pH 7,2 có hoạt tính ngưng kết hồng cầu tới độ pha loãng mẫu là 2^6 , còn dịch nuôi cấy ở các pH môi trường cảm ứng ban đầu pH 4,0; pH 5,0; pH 6,0 hồng cầu bị sa lắng (Hình 8b, 8c, 8d). Như vậy có thể protein MHA5.1 được tổng hợp ở môi trường cảm ứng pH 6,7 và pH 7,2.

Để khẳng định các nhận định trên chúng tôi tiến hành kiểm tra protein tái tổ hợp MHA5.1 từ môi trường nuôi cấy bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả cho thấy dịch nuôi cấy tế bào *P. pastoris* X33 mang plasmid tái tổ hợp pPICZamha5.1 ở môi trường cảm ứng pH 6,7 và 7,2 có chứa 3 dạng MHA5.1 tái tổ hợp có kích thước 50, 57, 70 kDa. Ngoài ra, ở pH 7,2, một phần nhỏ MHA5.1 có kích thước đúng theo tính toán lý thuyết là 43 kDa (Hình 9). Như vậy

chúng tôi ở pH 6,7 và pH 7,2 MHA5.1 được tổng hợp nhiều hơn nên có hoạt tính sinh học cao hơn.



Hình 9. Phân tích MHA5.1 tái tổ hợp được tiết vào môi trường khi nuôi cấy tế bào nấm men ở pH khác nhau sau 75 giờ cảm ứng
M. Thang protein chuẩn; 1-5. Dịch nuôi cấy tế bào *P. pastoris* X33 mang plasmid

pPICZ α 5.1 ở các pH môi trường cảm ứng ban đầu là: pH 4,0; pH 5,0; pH 6; pH 6,7 và pH 7,2; 6. Mẫu dịch nuôi cấy tế bào *P. pastoris* X33 mang vector pPICZ α A ở pH môi trường cảm ứng ban đầu pH 6.

THẢO LUẬN

Hệ biểu hiện *P. pastoris* được xem là hệ biểu hiện thích hợp nhất để biểu hiện protein HA vì chúng thỏa mãn các điều kiện như: (1) Có quá trình cải biến protein sau dịch mã; (2) Dễ tiến hành các thao tác di truyền; (3) Dễ điều khiển quá trình sinh tổng hợp protein ngoại lai [2,10]. Tuy nhiên, kết quả các nghiên cứu trước đây cho thấy việc biểu hiện gen HA trong *P. pastoris* gặp một số khó khăn do chỉ số phù hợp mã bộ ba giữa gen ngoại lai và vật chủ thấp (CAI = 0,69). CAI là chỉ số sử dụng bộ mã bộ ba chuẩn của gen biểu hiện cao ở một loài để đánh giá sự phù hợp của mỗi mã bộ ba của gen ngoại lai với loài biểu hiện đó. Chỉ số CAI thấp thì mức độ biểu hiện protein ngoại lai kém hoặc protein không đảm bảo chức năng sinh học. Chỉ số CAI bằng 1,0 được xem là lý tưởng nhất để biểu hiện gen ngoại lai [5,7].

Thông thường các gen có CAI trên 0,75 mới có khả năng biểu hiện tốt, bên cạnh đó gen *ha5.1* có chứa nhiều bộ ba không tương thích trong *P. pastoris* do đó việc dịch mã gen *ha5.1* trong nấm men thường cho hiệu quả thấp. Hơn nữa, sự phân bố của G và C trên gen *ha5.1* không đồng đều có thể dẫn tới hình thành cấu trúc thứ cấp ở mRNA, ảnh hưởng bất lợi tới quá trình dịch mã. Trong nghiên cứu này chỉ số CAI gen *ha5.1* tăng từ 0,69 lên 0,98 (42%), hàm lượng GC giảm từ 41% xuống 36,6% (4%). Mặc dù hàm lượng GC có giảm xuống nhưng sự phân bố của G và C dọc theo chiều dài của gen *mha5.1* đều hơn, hạn chế được sự hình thành cấu trúc thứ cấp ở mRNA. Hơn nữa, theo nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen *P. pastoris*, để có thể biểu hiện tốt, phân bố của GC dọc theo gen không nên vượt quá 43%. Gen trước khi cải biến mặc dù tỷ lệ GC đạt 41% nhưng có vùng gen CG đã tăng trên 50%. Vì vậy, trên tổng thể gen sau khi cải biến hàm lượng GC giảm nhưng không có vùng nào GC vượt quá 43%. Đặc biệt, giá trị CAI đạt 0,98 gần đến giá trị lý tưởng. Tùy theo từng chủng chủ biểu hiện mà gen được

cải biến sao cho phù hợp. Ở *E. coli*, phần trăm GC dọc theo hệ gen là 52,35%. Vì vậy, trong quá trình tối ưu mã để biểu hiện gen gen *ha* từ 19 chủng virus cúm A trong hệ biểu hiện *E. coli*, Mani et al. (2011) [9] đã cải biến làm tăng CAI lên 69,7%, hàm lượng GC tăng 16,2% tương đương với %GC trên toàn gen là 49%. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, gen sau khi cải biến có khả năng biểu hiện tốt hơn.

Kết quả một số nghiên cứu cho thấy khả năng biểu hiện HA5 của virus cúm H5N1 trong tế bào động vật đạt 20 mg/l sau khi được tối ưu mã bộ ba, đồng thời protein tái tổ hợp được cuộn gấp giống với cấu trúc tự nhiên của HA5 và đảm bảo hoạt tính sinh học liên kết với axit sialic trên bề mặt tế bào hồng cầu [16]. Vaccine DNA dựa trên gen HA từ type phụ H1 đã tối ưu mã bộ ba khi gây miễn dịch trên thỏ và chuột đều kích thích đáp ứng miễn dịch tạo kháng thể nhanh hơn và hiệu giá kháng thể IgG kháng HA cao gấp 7-10 lần so với vaccine DNA biểu hiện HA chủng hoang dại [14]. Ở đây, chúng tôi cũng đã tối ưu mã và biểu hiện thành công HA5.1 của chủng virus cúm A/H5N1/Hà Tây/2004 trong tế bào nấm men *P. pastoris*. Vì trong nghiên cứu trước, HA5.1 được chúng tôi biểu hiện trong chủng nấm men này bị phân cắt nhiều và glycosyl hóa quá mức nên về hàm lượng, chúng tôi không thể so sánh được mức độ biểu hiện giữa hai chủng [6]. Kết quả nổi bật của nghiên cứu là gen sau cải biến đã được biểu hiện ra protein có hoạt tính HA cao mà chúng tôi không thấy ở dòng gen chưa được cải biến.

Theo tính toán lý thuyết dựa trên gen và protein mã hóa từ gen, MHA5.1 có khối lượng phân tử khoảng 43 kDa. Tuy nhiên, trong tất cả các thí nghiệm, chỉ khi lên men để sinh tổng hợp protein ở pH ban đầu 7,2 protein tái tổ hợp có kích thước 34 kDa mới được phát hiện bằng Western blot nhưng hàm lượng rất thấp. Trong khi đó, ở các pH khác hoặc ở điều kiện nuôi cấy lên men bình thường, chủng tái tổ hợp tổng hợp ra protein ngoại lai có kích thước khoảng 50-70 kDa. Theo nhiều nghiên cứu, HA là protein được glycosyl hóa, chính glycosyl hóa đã làm tăng hoạt tính sinh học cũng như tính kháng nguyên của protein này [15]. Protein HA1 có 6 vị trí gắn kết glycosyl kiểu N. Đây cũng là kiểu glycosyl hóa chính, hay gặp ở *P. pastoris*.

Glycosyl hóa kiểu O xảy ra với tần số thấp hơn. Salen et al. (1999) [11] đã biểu hiện kháng nguyên HA1 của virus cúm A/H3N2 trong *P. pastoris* cũng nhận được kết quả tự, protein tái tổ hợp có mức độ glycosyl hóa cao, làm tăng kích thước của protein tái tổ hợp. Vì vậy, MHA5.1 đã được biểu hiện có kích thước lớn hơn tính toán có thể do quá trình glycosyl hóa xảy ra trong nấm men.

pH môi trường nuôi cấy không chỉ ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng sinh trưởng của nấm men, pH còn gián tiếp hoặc trực tiếp ảnh hưởng tới hiệu quả biểu hiện protein ngoại lai. Để xác định điều kiện biểu hiện protein ngoại lai tốt trong tế bào nấm men *P. pastoris* X33, trước tiên chúng tôi thay đổi pH môi trường cảm ứng BMMY. pH nghiêng dần về phía kiềm thì protein được biểu hiện tốt hơn và mức độ glycosyl hóa cao hơn. Ở pH 7,2 MHA5.1 tái tổ hợp được tổng hợp với lượng khá lớn, đa dạng về khối lượng (43, 50, 57, 70 kDa) (Hình 9). Nhiều nghiên cứu cho thấy pH môi trường cảm ứng có ảnh hưởng đến mức độ glycosyl hóa protein tái tổ hợp. Liu et al. (2005) [8] khi nghiên cứu ảnh hưởng của các điều kiện lên men lên mức độ glycosyl hóa của protein tái tổ hợp rHIFN ω ở *P. pastoris* chỉ ra rằng mức độ glycosyl hóa ở protein này có thể đạt hiệu quả khi duy trì ở khoảng pH 7,0 - 7,5. Yoshimasu et al. (2004) [17] cũng chứng minh pH có ảnh hưởng tới khả năng glycosyl hóa vào đầu N khi biểu hiện protein pepsin ở *P. pastoris*. Một số nghiên cứu khác cũng cho thấy ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng glycosyl hóa protein ở tế bào động vật có vú, ở *Aspergillus niger* [12,13].

KẾT LUẬN

Gen *ha5.1* mã hoá cho kháng nguyên HA5.1 của virus cúm A/H5N1 đã được cải biến để phù hợp với hệ biểu hiện nấm men *P. pastoris* và biểu hiện thành công trong nấm men *P. pastoris* X33. Protein MHA5.1 tái tổ hợp được glycosyl hóa, có hoạt tính sinh học cao, đảm bảo tính kháng nguyên. Từ kết quả nghiên cứu này có thể tiến hành tối ưu các điều kiện môi trường để sản xuất lượng lớn kháng nguyên HA5.1 tái tổ hợp trong *P. pastoris* và kiểm tra tính miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được sự hỗ trợ về kinh phí của đề tài “Nghiên cứu sản xuất vaccine tái tổ hợp phòng bệnh cúm gia cầm bằng kỹ thuật biểu hiện gen mã hoá kháng nguyên HA của chủng virus cúm A/H5N1 Việt Nam trong nấm men *Pichia pastoris*” do Viện Thú y chủ trì. Qua công trình nghiên cứu này, chúng tôi cũng gửi lời cảm ơn phòng Vi sinh phân tử, Viện Công nghệ sinh học đã cung cấp kháng thể thử kháng virus cúm A/H5N1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Angov E., 2011. Codon usage: Nature's roadmap to expression and folding of proteins. *Biotechnol. J.*, 6: 650-659.
2. Balamurugan V., Reddy G. R., Suryanarayana V. S., 2007. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-Vaccines. *Indian J Biotechnol.*, 6: 175-186
3. Chen M. W., Cheng T. J., Huang Y., Jan J. T., Ma S. H., Yu A. L., Wong C. H., Ho D. D., 2008. A consensus-hemagglutinin-based DNA vaccine that protects mice against divergent H5N1 influenza viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 105(36): 13538-43
4. Coghlan A., Wolfe K. H., 2000. Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 16: 1131-1145.
5. Gustafsson C., Govindarajan S., Minshull J., 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.*, 22(7): 346-353.
6. Lê Thị Thu Hồng, Văn Thị Như Ngọc, Lê Quỳnh Giang, Bùi Khánh Chi, Nguyễn Thị Quý, Đỗ Thị Huyền, Sven Olof-Enfors, Trương Văn Dung, Trương Nam Hải, 2009. Nghiên cứu tạo vaccine dưới đơn vị phòng cúm A/H5N1 bằng kỹ thuật biểu hiện protein HA tái tổ hợp trong nấm men *Pichia pastoris*. Báo cáo khoa học, Hội nghị Quốc gia về sinh vật biến đổi gen và quản lý an toàn sinh học, Hà Nội: 39-47.
7. Li F., Yang S., Zhao L., Li Q., Pei J., 2012. Synonymous condon usage bias and

- overexpression of a synthetic *xynB* Gene from *Aspergillus niger* NL1 in *Pichia pastoris*. *BioRes.*, 7(2): 2330-2343.
8. Liu H., Pan H. C., Cai S. X., Chen Z. W., Zheng X. F., Yang H. T., Xiao Z. Y., 2005. The effect of fermentation conditions on glycosylation of recombinant human interferon omega in yeast *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.*, 21(1): 107-112.
 9. Mani I., Singh V., Chaudhary D. K., Somvanshi P., Negi M. P. S., 2011. Codon optimization of the major antigen encoding genes of diverse strains of influenza a virus. *Interdiscip. Sci.*, 3(1): 36-42.
 10. Romanos M., 1995. Advances in the Use of *Pichia pastoris* for High-Level Expression. *Curr. Opin. Biotech.*, 6: 527-533.
 11. Saelens X., Vanlandschoot P., Martinet W., Maras M., Neiryneck S., Contreras R., Fiers W., Jou W. M., 1999. Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. *Eur. J. Biochem.*, 260(1): 166-175.
 12. Sajjan E., Matanguihan R., Heidemann R., Abu-Absi S., Asuncion W., Yamasaki G., Wu X., Chen J., Murphy J. E., Zhang C., 2010. The effect of bioreactor pH and temperature on protein glycosylation in perfusion cultures of mammalian cells. *Cells and Culture*, 4(8): 785-788.
 13. Wallis. G. F., Swift R. J., Atterbury R., Trappe S., Rinas U., Hemming F. W., Wiebe M., Trinci A. J., Peberdy J. F., 2001. The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and chemostat-evolution of *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1527: 112-122.
 14. Wang S., Taaffe J., Parker C., Solórzano A., Cao H., García-Sastre A., Lu S., 2006. Hemagglutinin (HA) proteins from H1 and H3 serotypes of influenza A viruses require different antigen designs for the induction of optimal protective antibody responses as studied by codon-optimized HA DNA vaccines. *J. Virol.*, 80(23): 11628-11637.
 15. Wanga C. C., Chena R. J., Tsenga Y. C., Hsua C. H., Hunga Y. F., Chena S. W., Chenf C. M., Khoof, Chenga T. J., Chenga Y. S., Jana J. T., Wua C. Y., Maa C., Wonga C. H., 2009. Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106 (43): 18137-18142.
 16. Yang J. L., Wang H. L., Wang S. X., Yang P., Liu K., Jiang C., 2010. High-level expression, purification and characterization of codon-optimized recombinant hemagglutinin 5 proteins in mammalian cells. *Chin. Med. J.*, 123(8): 1073-1077.
 17. Yoshimasu M. A., Tanaka T., Ahn J. K., Yada R. Y., 2004. Effect of N-linked glycosylation on the aspartic proteinase porcine pepsin expressed from *Pichia pastoris*. *Glycobiology*. 14(5): 417-429.

EXPRESSION OF CODON OPTIMIZED *HA5.1* GENE WITH BIOFUNCTIONAL ACTIVITY IN *PICHIA PASTORIS* X33

Vo Viet Cuong¹, Le Thi Hue², Do Thi Huyen², Le Quynh Giang²,
Nguyen Thi Quy², Truong Nam Hai²

¹Vietnam - Russian tropical Center

²Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Exotic gene expression in *P. pastoris* is dependent on multistep processes involving regulation at the level of transcription, protein translation, and posttranslational modifications. In order to further improve the

expression level of HA recombinant protein from A/H5N1 avian virus we optimized the HA5.1 protein coding sequence and expressed it in *P. pastoris* X33. After optimization, Codon Adaptation Index (CAI) value was improved from 0.69 to 0.98, without modifying the amino acid sequence of the encoded protein. The synthetic *mha5.1* with a length of 1 kb was inserted in to pPICZamha5.1 and cloned in *E. coli* DH10b then integrated into *P. pastoris* X33. HA5.1 recombinant protein of 50-70 kDa was synthesized at 30°C under induction of 1% methanol during 72 hours. Recombinant protein had biological function to agglutinate chicken's blood cells at maximum 2⁶ dilutions and had antigenicity to bind with antibody against HA5 of virus H5N1. These important results are the basis for using recombinant HA5.1 protein as a subunit vaccine.

Keywords: Codon Adaptation Index; avian influenza virus H5N1, *P. pastoris* X33, HA5.1 recombinant protein.

Ngày nhận bài: 27-9-2012