

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÙNG GIEN *preM-env* CỦA VIRÚT DENGUE TYP 2 TRONG NẤM MEN *PICHIA PASTORIS*

PHÙNG THU NGUYỆT, NGUYỄN HỒNG THANH,
ĐINH DUY KHÁNG, TRƯƠNG NAM HẢI

Viện Công nghệ sinh học

Bệnh sốt Dengue là một trong những dịch bệnh nguy hiểm nhất, chỉ sau dịch bệnh sốt rét hiện đang phổ biến ở các nước nhiệt đới và á nhiệt đới. Ước tính trên thế giới có khoảng 100 triệu người bị sốt Dengue hàng năm. Mức độ biểu hiện nghiêm trọng nhất của bệnh là hiện tượng sốt xuất huyết và sốc Dengue có thể dẫn đến tử vong, nhất là đối với trẻ em. Virút Dengue thuộc họ *Flaviviridae* và gồm có 4 typ kháng nguyên khác nhau (từ DEN1 đến DEN4). Dịch sốt Dengue thường bùng phát vào mùa hè bởi các vectơ trung gian truyền virút Dengue là muỗi *Aedes aegypti*.

Hệ gen của virút Dengue chứa một khung đọc mở đơn dài khoảng 11 kb, mã hóa cho 3 protein cấu trúc và 7 protein khác. Protein vỏ (E) là một protein cấu trúc chính bọc lộ trên bề mặt của virút Dengue trưởng thành, chứa khoảng 495 axit amin với trọng lượng phân tử khoảng 60 kDa [1]. Protein E có thể liên kết với các thụ thể và cảm ứng sự dung hợp màng virút với màng tế bào chủ, do đó gây nên hiện tượng nhiễm virút Dengue. Ngoài ra, protein E còn chứa các epitop kháng nguyên không trung hòa, gây nên hiện tượng sốt xuất huyết Dengue và sốc Dengue hay còn gọi là quá trình tăng cường phụ thuộc kháng thể. Protein E đã được biểu hiện ở một số hệ biểu hiện khác nhau như *Escherichia coli*, nấm men [2], côn trùng [3, 4] và trên tế bào động vật [5, 6]. Tuy nhiên, protein E biểu hiện trong tế bào vi khuẩn không cuộn đúng cấu trúc không gian để giữ được toàn bộ các epitop trung hòa của nó [7]. Trong khi đó, các protein tái tổ hợp E được tổng hợp nhờ hệ thống nuôi cấy mô tế bào động vật rất tốn kém và phức tạp. Gen mã hóa cho protein E

(*env*) liên kết với gen mã hóa cho protein PrM (*preM*-precursor membrane) tạo nếp gấp đúng và tăng tính bền vững cho protein E trong quá trình hình thành cấu trúc không gian của virút. Do đó, toàn bộ vùng gen *preM-env* là một kháng nguyên quan trọng cho nghiên cứu vaccin chống lại virút Dengue và nó cũng được sử dụng trong chẩn đoán nhanh các typ kháng nguyên của virút này.

Trong những năm gần đây, hệ nấm men *P. pastoris* đã được sử dụng như một hệ biểu hiện mạnh và không tốn kém để tổng hợp một lượng lớn các protein tái tổ hợp có hoạt tính. Theo kết quả của một nhóm nghiên cứu Trung Quốc, vùng gen mã hóa cho protein E của virút Dengue typ 2 đã được biểu hiện thành công trong *P. pastoris* với trọng lượng phân tử khoảng 60 kDa [1]. Điều này chứng tỏ *P. pastoris* đã được chọn như là một vật chủ thích hợp để biểu hiện gen của virút Dengue. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng nấm men *P. pastoris* để biểu hiện vùng gen *preM-env* của virút Dengue typ 2 phân lập tại Việt Nam với mục đích nhằm thu được một lượng kháng nguyên tái tổ hợp. Lượng kháng nguyên này, sau khi tinh sạch, được sử dụng để tạo Kit chẩn đoán nhanh bằng phương pháp Western blot và phương pháp ELISA. Đây là báo cáo đầu tiên nghiên cứu sự biểu hiện của vùng gen *preM-env* của virút Dengue typ 2 trong nấm men *P. pastoris*.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thiết kế plasmid chứa vùng gen *preM-env*

Công trình được tài trợ về kinh phí của đề tài khoa học KC-04.18.

Trình tự vùng gen *preM-env* của virút Dengue typ 2 phân lập tại Việt Nam đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với số đăng ký là AJ574886. Vùng gen này được tách làm hai dòng trên plasmid pCR2.1, một dòng đầu 5' chứa đoạn gen dài 1387 bp (pCRD2-5') và một dòng đầu 3' chứa đoạn gen dài 1480 bp (pCRD2-3'). Plasmid pCRD2-3' được cắt bằng enzym *HindIII* (Biolabs) để thu đoạn gen đầu 3' và được ghép nối với pCRD2-5' cũng được xử lý bằng enzym này để tạo nên vectơ tái tổ hợp chứa toàn bộ vùng gen *preM-env* (ký hiệu là pCRD2).

2. Tổng hợp vùng gen *preM-env*

Plasmid pCRD2 được sử dụng làm khuôn để tổng hợp nên vùng gen *preM-env* bằng kỹ thuật PCR với hai đoạn môi thiết kế thêm điểm cắt của các enzym hạn chế *SnaBI* và *NotI*

5'PrM-E-*SnaBI*: 5'-agt tac gta ttc cat tta acc aca cgt aac-3'

3'PrM-E-*NotI*: 5'-a ggc ggc cgc tca atg atg atg atg atg ggc ctg cac cat aac tcc caa- 3'

Chương trình PCR được bắt đầu bằng phản ứng biến tính ADN sợi khuôn xảy ra ở nhiệt độ 94°C trong 2 phút, tiếp theo là 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước. Bước 1: biến tính ADN sợi khuôn ở 94°C trong 1 phút; bước 2: đoạn môi kết cặp bổ sung với trình tự sợi khuôn ở 57°C trong 1 phút; bước 3: tổng hợp kéo dài chuỗi ở 72°C trong 2 phút. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 2 phút và giữ mẫu trong 4°C.

3. Thiết kế và biến nạp vectơ biểu hiện pPICD2 vào nấm men *P. pastoris*

Sản phẩm PCR được cắt bằng các enzym hạn chế *SnaBI* và *NotI* (Biolabs) và ghép nối vào vectơ pPIC9 cũng được xử lý bằng hai enzym này. Plasmid tái tổ hợp này được cắt kiểm tra bằng các enzym hạn chế *SnaBI+NotI* và *BamHI*.

Plasmid pPICD2 được mở vòng bằng enzym hạn chế *StuI* (Biolabs) và được biến nạp vào tế bào *P. pastoris* GS115 theo phương pháp xung điện (GenePulser, Bio-Rad). Các thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường MD khuyết histidin (YNB 0,34%, glucoza 2%, biotin 0,0004%).

4. Biểu hiện protein tái tổ hợp

Một số thể biến nạp phát triển mạnh trên môi trường chọn lọc được cấy chuyển sang môi trường lỏng PEG (1% yeast extract, 2% pepton, 1% glyxêrol). Tế bào được nuôi cấy lắc ở 30°C với tốc độ 230 vòng/phút; sau khoảng 20 giờ, ly tâm dịch nuôi cấy ở 3000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và hòa lại tế bào trong môi trường PEM (1% yeast extract, 2% pepton, 1% metanol) để đạt được OD = 1, sau đó tiếp tục nuôi cấy lắc 230 v/p ở 28°C. Tế bào được cảm ứng sau 24 giờ bằng metanol với nồng độ cuối cùng 1%. Dịch nuôi cấy sau 3 ngày cảm ứng được thu lại và tiến hành xác định protein bằng điện di trên gel polyacrylamit 12,5%.

5. Kiểm tra khả năng liên kết giữa protein tái tổ hợp PrM-E với kháng thể đặc hiệu kháng virút Dengue typ 2 bằng phương pháp Western blot

Protein tái tổ hợp được điện di trên gel SDS-PAGE 12.5%. Sau đó, protein được chuyển sang màng PVDF trong dung dịch đệm có metanol (glyxin: 14,41g; tris: 3g; 20% metanol). Điện di chuyển màng được thực hiện ở hiệu điện thế 100V trong khoảng 2 giờ ở điều kiện lạnh. Phân chưa gắn protein trên màng được phủ bằng dung dịch TBS 1X có chứa 5% sữa tách bơ ở 4°C qua đêm. Rửa màng vài lần bằng dung dịch TTBS (TBS 1X: 250 ml; tween 20: 250µl; bổ sung nước đến 500 ml) trong khoảng 5 phút. Màng được ủ trong dung dịch chứa kháng thể kháng virút Dengue typ 2 trong huyết thanh thỏ với nồng độ pha loãng thích hợp trong 2 giờ. Màng được rửa vài lần bằng dung dịch TTBS và được ủ trong dung dịch kháng thể kháng IgG của thỏ có gắn enzym peroxidaza. Tiếp tục rửa màng bằng đệm TTBS và TBS. Chuyển màng sang 30 ml dung dịch chất hiện màu cho tới khi xuất hiện băng. Phản ứng được dừng lại bằng cách rửa màng nhiều lần bằng nước cất.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

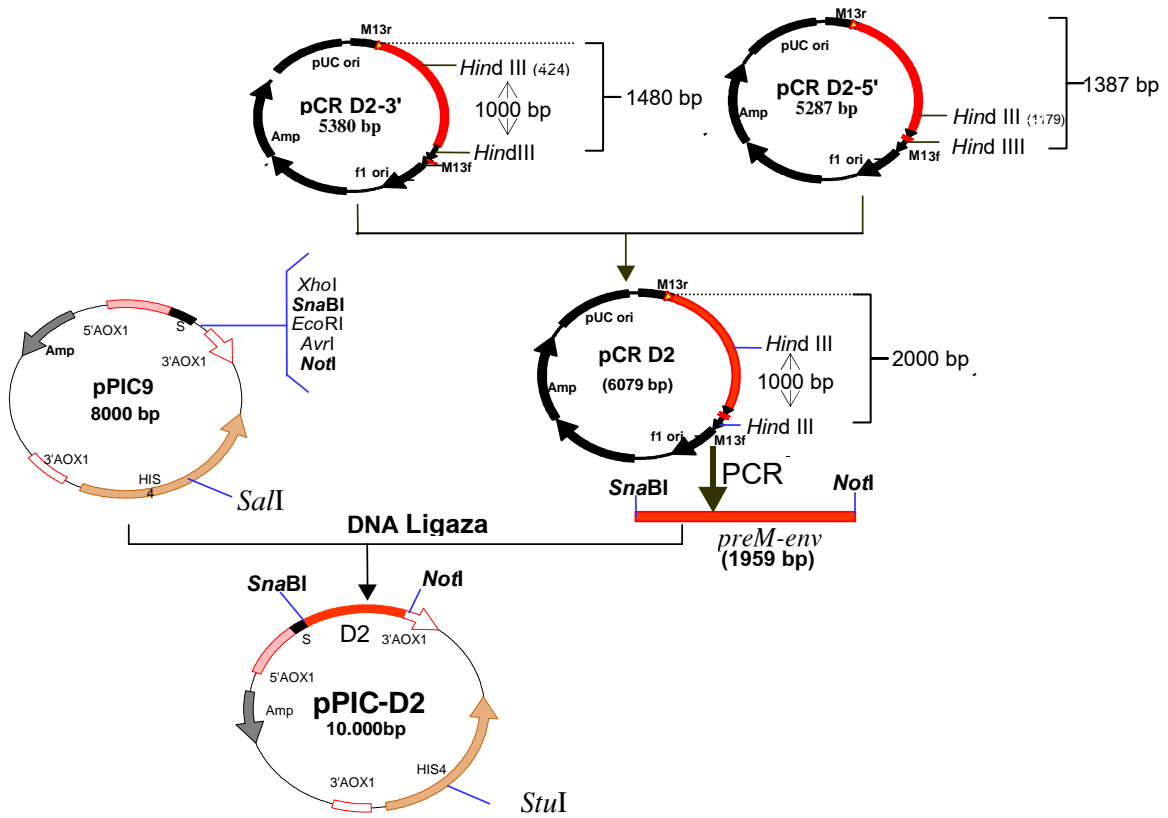
1. Thiết kế vectơ biểu hiện vùng gen *preM-env*

Toàn bộ vùng gen *preM-env* của virút Dengue typ 2 được ghép nối và đưa vào vectơ biểu hiện trong nấm men pPIC9 theo hình 1.

Vùng gen *preM-env* của virút Dengue typ 2 có kích thước khoảng 2000 bp. Để đơn giản hóa

việc tách dòng, vùng gen này được tách làm hai dòng đầu 3' (pCRD2-3') và đầu 5' (pCRD2-5') (theo như mô tả ở phần vật liệu và phương pháp). Nhìn từ hình 1, ta thấy có các điểm cắt của enzym hạn chế *Hind*III nằm trong gen và trên vùng đa nối của vectơ. Vị trí của điểm cắt *Hind*III nằm trong gen đầu 3' là 424 và trong

gen đầu 5' là 1179. Điểm *Hind*III nằm trong vùng nối lên nhau giữa đầu 5' và đầu 3' của vùng gen *preM-env*, do đó enzym này được sử dụng để cắt đoạn gen khoảng 1000 bp từ plasmit pCRD2-3' và ghép nối với plasmit pCRD2-5' (5079 bp) đã được xử lý bằng *Hind*III.

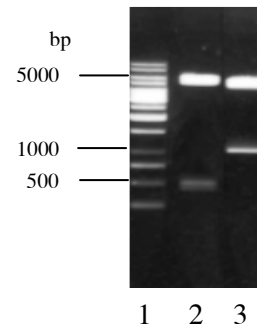


Hình 1. Sơ đồ thiết kế vectơ biểu hiện vùng gen *preM-env* của virút Dengue typ 2

Hai đoạn gen này được ghép nối với nhau nhờ enzym nối ADN ligaza, tạo plasmit tái tổ hợp có chứa đoạn gen hoàn chỉnh *preM-env* (ký hiệu pCRD2). Sản phẩm nối sau khi biến nạp vào trong tế bào *E. coli* DH5 α được cắt kiểm tra bằng các enzym hạn chế *Bam*HI và *Hind*III (hình 2).

Theo tính toán, ở plasmit pCRD2 khi cắt bằng *Bam*HI sẽ xuất hiện 3 băng có kích thước khoảng 400, 500 và 5179 bp; còn khi xử lý pCRD2 bằng *Hind*III sẽ xuất hiện các băng có kích thước khoảng 1060 và 5019bp. Kết quả trên hình 2 cho thấy các dòng đều xuất hiện băng có kích thước như trong tính toán. Như

vậy, chúng tôi đã thu được plasmit tái tổ hợp pCRD2 có chứa toàn bộ vùng gen *preM-env*.

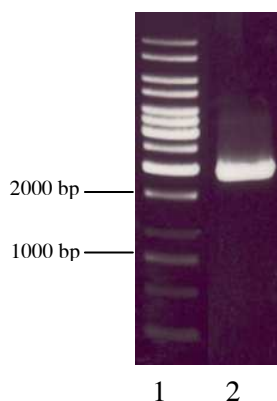


Hình 2. Điện di sản phẩm cắt plasmit pCRD2 trên gel agarosa 0,8%

Đường chạy 1: thang ADN chuẩn; đường chạy 2: sản phẩm cắt plasmid pCRD2 bằng *Bam*HI; đường chạy 3: sản phẩm cắt plasmid pCRD2 bằng *Hind*III

2. Tổng hợp vùng gen *preM-env*

Để đưa toàn bộ vùng gen *preM-env* hoàn chỉnh vào vectơ biểu hiện pPIC9, hai đoạn mỗi để nhân vùng gen *preM-env* được thiết kế có chứa điểm cắt của các enzym hạn chế *Sna*BI và *Not*I. Bên cạnh đó, để thuận lợi cho việc tinh sạch protein sau này, đoạn mỗi đầu 3' còn được thiết kế thêm vùng mã hóa cho 6 histidin nằm trước bộ ba kết thúc. Plasmid pCRD2 được sử dụng làm khuôn cho kỹ thuật PCR. Kết quả PCR được kiểm tra trên gel agarosa 0,8% (hình 3).



Hình 3. Điện di sản phẩm PCR của vùng gen *preM-env* trên gel agarosa 0,8%
Đường chạy 1: thang ADN; đường chạy 2: sản phẩm PCR

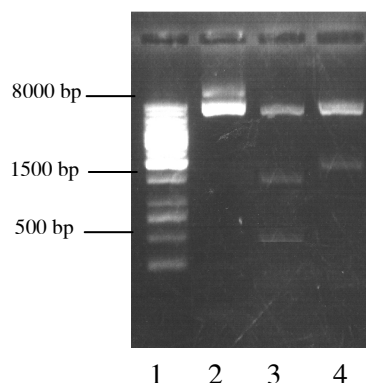
Kết quả trên hình 3 cho thấy vùng gen *preM-env* có kích thước khoảng 2000 bp đã được nhân lên thành công và có kích thước đúng với tính toán.

3. Thiết kế plasmid biểu hiện pPICD2

Sản phẩm PCR được cắt bằng hai enzym hạn chế *Sna*BI+*Not*I và được ghép nối vào vectơ pPIC9 cũng được xử lý bằng hai enzym này. Các plasmid pPIC9 chứa toàn bộ vùng gen *preM-env* của virút Dengue typ 2 (được ký hiệu là pPICD2). pPICD2 được cắt kiểm tra bằng các enzym hạn chế *Bam*HI, *Sna*BI+*Not*I. Kết quả cắt kiểm tra pPICD2 được trình bày trên hình 4.

Kết quả trên hình 4 cho thấy ở pPICD2 khi cắt bằng *Bam*HI xuất hiện ba băng có kích thước khoảng 507, 1402 và 8000bp; còn khi xử

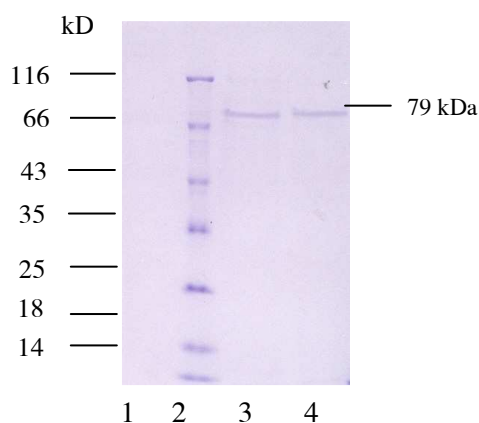
lý vectơ này bằng *Sna*BI+*Not*I, xuất hiện 2 băng có kích thước đúng với kích thước của gen khoảng 2000 bp. Các băng điện di trên hình 4 cho thấy các sản phẩm cắt kiểm tra cho các băng ADN có kích thước đúng như tính toán. Như vậy, chúng tôi đã thiết kế thành công vectơ pPICD2 biểu hiện vùng gen *preM-env* để đưa vào nấm men *P. pastoris*.



Hình 4. Sản phẩm cắt kiểm tra plasmid pPICD2 trên gel agarosa 0,8%

Đường chạy 1: thang ADN chuẩn; đường chạy 2: dòng đối chứng pPICD2; đường chạy 3: plasmid pPICD2/ *Bam*HI; đường chạy 4: plasmid pPICD2/ *Sna*BI+*Not*I

4. Biểu hiện protein tái tổ hợp PrM-E



Hình 5. Điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamit 12,5% để kiểm tra khả năng biểu hiện của vùng gen *preM-env* trong *P. pastoris* sau 3 ngày cảm ứng.

Đường chạy 1: protein của dòng đối chứng; đường chạy 2: thang protein chuẩn; đường chạy 3, 4: protein của các dòng chứa vùng gen *preM-env*

Plasmid pPICD2 được mở vòng bằng *Stu*I để giúp định hướng cho quá trình tích hợp vùng

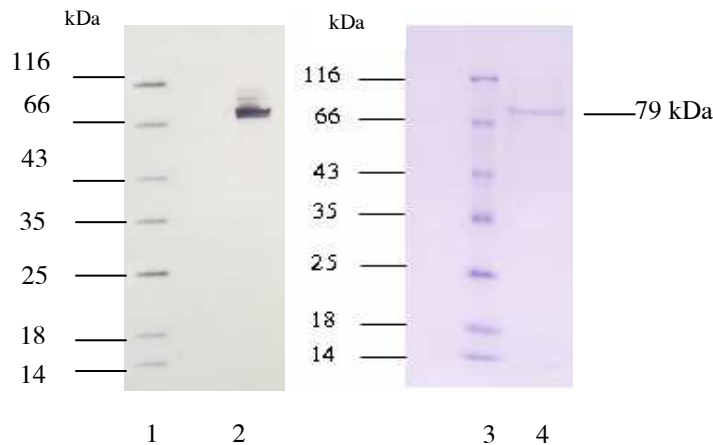
gien *preM-env* vào vùng đột biến của gien mã hóa histidin trong genom của nấm men được dễ dàng. Sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường MD khuyết histidin, đã xuất hiện nhiều khuẩn lạc, chứng tỏ chủng nấm men tái tổ hợp có khả năng tổng hợp histidin và plasmid đã được tích hợp vào genom của nấm men. Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp PrM-E được thể hiện trên hình 5.

Kết quả trên hình 5 cho thấy protein tái tổ hợp PrM-E có kích thước khoảng 79 kDa đã được biểu hiện trong tế bào nấm men *P. pastoris* sau khi được cảm ứng bằng metanol 1%, trong khi dòng đối chứng chỉ chứa vectơ pPIC9 thì không thấy xuất hiện băng protein tương ứng. Trong tế bào nấm men, thường xảy ra quá trình glycozyl hóa các protein sau khi dịch mã, do đó protein ngoại lai được biểu hiện thường được gắn thêm các gốc đường. Kích thước của protein tái tổ hợp PrM-E cao hơn so với kích thước của protein PrM-E theo tính toán là 7 kDa, có thể được giải thích là do quá trình glycozyl hóa trong

tế bào nấm men *P. pastoris*. Lượng protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện, được xác định bằng phương pháp so sánh với protein chuẩn khoảng 0,1-0,2 mg/ml. Phản ứng Western blot có thể kiểm tra khả năng liên kết miễn dịch kháng nguyên-kháng thể với lượng protein tinh sạch khoảng 0,001 mg/ml. Vì vậy, lượng protein tái tổ hợp PrM-E được tổng hợp trong *P. pastoris* có thể sử dụng được trong phản ứng Western blot. Từ kết quả trên, chúng tôi kết luận đã biểu hiện thành công toàn bộ vùng gien *preM-env* của virút Dengue typ 2 trong nấm men *P. pastoris*.

5. Kết quả kiểm tra protein tái tổ hợp bằng Western blot

Protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện trong nấm men *P. pastoris* được kiểm tra khả năng liên kết miễn dịch với kháng thể đặc hiệu kháng virút Dengue typ 2 trong huyết thanh thử bằng Western blot.



Hình 6. Sự liên kết của kháng nguyên tái tổ hợp PrM-E với kháng thể kháng virút Dengue typ 2 trong huyết thanh thử được kiểm tra bằng Western blot

Đường chạy 1,3: thang protein chuẩn; đường chạy 2: kết quả lai kháng nguyên PrM-E2 với kháng thể kháng virút Dengue typ 2; đường chạy 4: protein tái tổ hợp PrM-E của virút Dengue typ 2 biểu hiện trong *P. pastoris*

Kết quả biểu hiện vùng gien *preM-env* trên hình 6 (đường chạy 4) cho thấy protein tái tổ hợp có kích thước khoảng 79 kDa. Các protein kháng nguyên PrM-E này được chuyển sang màng PVDF và được phủ với kháng thể kháng virút Dengue 2. Kết quả lai Western blot trên hình 6 (đường chạy 2) cho thấy sự xuất hiện một băng protein duy nhất,

đúng với kích thước của protein biểu hiện. Điều này chứng tỏ protein tái tổ hợp PrM-E có khả năng liên kết với kháng thể đặc hiệu kháng virút Dengue typ 2. Kết quả này mở ra triển vọng ứng dụng protein tái tổ hợp PrM-E2 cho mục đích tạo bộ sinh phẩm trong chẩn đoán bệnh sốt Dengue và sốt xuất huyết Dengue.

III. KẾT LUẬN

Hai đoạn gen tách dòng riêng biệt đầu 3' (pCRD2-3') và đầu 5' (pCRD2-5') đã được ghép nối thành công để tạo thành vùng gen hoàn chỉnh pCRD2 bằng enzym hạn chế *HindIII*. Vùng gen pCRD2 có kích thước khoảng 2000 bp đã được đưa vào trong vectơ pPIC9 và biểu hiện thành công trong nấm men *P. pastoris* mà vẫn giữ được tính kháng nguyên của protein. Protein tái tổ hợp có kích thước khoảng 79 kDa được tổng hợp với hàm lượng khoảng 0,1-0,2mg/ml và có khả năng đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng thể kháng virút Dengue typ 2 trong phản ứng Western blot.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hui-yong W. et al.**, 2003: J. Virol. Methods, 109: 17-23.
2. **Sugrue R. J. et al.**, 1997: J. Virol. Methods, 69: 159-169.
3. **Staropoli I. et al.**, 1997: Vaccine, 15: 1946-1954.
4. **Kelly E. P. et al.**, 2000: Vaccine, 18: 2549-2559.
5. **Men R. et al.**, 1991: J. Virol., 65: 1400-1407.
6. **Men R. et al.**, 2000: Vaccine, 18: 3113-3122.
7. **Himani B. et al.**, 2001: Protein Expression and Purification, 23: 84-96.

EXPRESSION OF THE GENE REGION *preM-env* OF DENGUE VIRUS TYPE 2 IN *PICHA PASTORIS*

PHUNG THU NGUYET, NGUYEN HONG THANH,
DINH DUY KHANG, TRUONG NAM HAI

SUMMARY

The Dengue fever is one of the most serious illnesses in many tropical and subtropical countries. Laboratory tests are essential for diagnosis of the Dengue infection. The gene region *preM-env* of Dengue virus type 2 containing about 2000 bp was amplified by using the RT-PCR method from the infected cell and cloned in the pCR2.1 vector. This gene region was inserted in the pPIC9 vector for expression in the yeast cells. The electroporation was used to transfer the recombinant plasmid (pPIC-D2) into *P. pastoris* cells. The expressed full-length PrM-E gene in *P. pastoris* was identified by SDS-PAGE and Western-blot. It was shown that the recombinant protein with molecular weight of approximately 79 kDa excreted into the supernatant of culture when induced with 1% methanol after 3 days. The protein concentration expressed in *P. pastoris* was estimated of 0.1-0.2 mg/ml by the comparison with the molecular weight of the protein marker. The result of Western blot indicated that the recombinant protein PrM-E was able to bind with rabbit monoclonal antibody specific to Dengue virus type 2. The purified recombinant PrM-E protein will be applied for producing the diagnosis Kit of Dengue virus.

Ngày nhận bài: 31-8-2004