TAP CHI SINH HOC 2017, 39(2): 219-225
DOI: 10.15625/0866-7160/v39n2.9000

BIỂU HIỆN TẠM THỜI PROTEIN INTERLEUKIN-7 TÁI TỔ HỢP TRONG CÂY THUỐC LÁ (*Nicotiana benthamiana* Domin) BẰNG PHƯƠNG PHÁP AGRO-INFILTRATION

Nguyễn Huy Hoàng[1,2], Phạm Bích Ngọc[1], Lê Văn Sơn[1], Chu Hoàng Hà[1]*

[1]Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam
[2]Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên, Đại học Thái Nguyên

TÓM TẮT: *Interleukin-7* là một cytokine có vai trò quan trọng trong việc thúc đẩy sự sinh trưởng và phát triển của các tế bào miễn dịch CD4 và CD8 trong hệ miễn dịch của người, đây cũng là đích tấn công của mầm bệnh khi xâm nhập cơ thể. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chuyển đoạn gen mã hóa cho protein interleukin-7 (IL-7) đã được nhân dòng vào vector pRTRA để tạo cassette 35S-IL7-cMyc-histag-100xELP; sau đó ghép nối vào vector chuyển gen pCB301 và biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Cấu trúc này được biến nạp vào lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp agro-infiltration. Kết quả kiểm tra protein tách chiết từ mẫu lá bằng lai miễn dịch sau 5 ngày biến nạp cho thấy đã biểu hiện thành công protein IL-7 tái tổ hợp ở lá thuốc lá. Tuy nhiên, có sự sai khác về khối lượng phân tử protein IL-7 so với tính toán lý thuyết do có hiện tượng glycosyl hóa trong quá trình biến đổi sau dịch mã. Phân tích hàm lượng protein IL-7 tái tổ hợp bằng phần mềm ImageJ trên màng lai sau khi tinh sạch protein từ 1 kg lá tươi bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại thu được hàm lượng protein IL-7 chiếm 3,15% protein tổng số. Kết quả này tạo tiền đề cho các nghiên cứu thu nhận protein IL-7 tái tổ hợp an toàn ở thực vật, ứng dụng trong việc chữa bệnh cho con người.

Từ khóa: Nicotiana benthamiana, biểu hiện tạm thời, CD4, CD8, interleukin-7, miễn dịch.

MỞ ĐẦU

Hiện nay, trong y học, các protein có hoạt tính sinh học được sử dụng rộng rãi để làm thuốc điều trị như các loại hormone, enzyme tái tổ hợp. *Interleukin-7* là một cytokine, có vai trò chính trong sự tăng trưởng của các dòng tế bào B và T trong hệ miễn dịch ở người.

Việc biểu hiện protein tái tổ hợp ở thực vật hiện đang được quan tâm nghiên cứu do chi phí sản xuất thấp (Schillberg et al., 2003), có thể định vị chính xác protein tái tổ hợp trong tế bào, cũng như cho phép protein có những biến đổi sau dịch mã (Wagner et al., 2004), protein tái tổ hợp tích lũy trong tế bào thực vật thu được đạt mức cao, lên tới 14,4% lượng protein tổng số trong lá trưởng thành (Verwoerd et al., 1995); tránh được sự lây nhiễm của các virus (HIV, HBV) và các loài vi khuẩn (Daniell et al., 2001). Floss et al. (2007) đã thống kê trên thực vật, có 67 loại protein kháng nguyên của 24 nguồn bệnh khác nhau.

Tuy nhiên, protein tái tổ hợp tích lũy trong cây trồng chuyển gen thường không cao và chưa có một phương pháp tinh sạch hiệu quả. Để khắc phục nhược điểm này, hiện nay đang có hướng nghiên cứu sử dụng phương pháp agro-infiltration, đây là phương pháp nhằm biểu hiện tạm thời gen hoặc sản xuất các protein tái tổ hợp mong muốn. Trong đó, hai loài thuốc lá *Nicotiana benthamiana* và *Nicotinana tabacum* được sử dụng phổ biến trong phương pháp biểu hiện này. Ưu điểm của phương pháp này là khả năng biểu hiện nhanh, không bị ảnh hưởng bởi vị trí gắn gen đích trong tế bào thực vật và có thể tiến hành biểu hiện trong các mô đã biệt hóa hoàn toàn như lá (Fischer et al., 1999).

Trong bài này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của protein interleukin-7 tái tổ hợp trong cây thuốc lá *(N. benthamiana)* bằng phương pháp agro-infiltration.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* do phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.

Vector pBSK-IL7 mang gen *IL-7* tổng hợp nhân tạo tại hãng Epoch Life Science (Ho a

Kỳ); vector pRTRA 35S-TBAG-100xELP điều khiển bởi promoter 35S chứa gen kháng kháng sinh *ampicilin*, trình tự 100xELP và đuôi cMyc, his-tag; vector chuyển gen pCB301 chứa gen kháng kháng sinh *kanamycin*, được sử dụng để tạo cấu trúc chuyển gen mã hóa IL-7. Vector pMON6530/Hc-Pro chứa gen mã hóa cho protein Hc-Pro và gen kháng kháng sinh *spectinomycin* và *rifamycin* được sử dụng để đồng biểu hiện trong nghiên cứu biểu hiện tạm thời, có vai trò là protein hỗ trợ cho vector đích tái tổ hợp biểu hiện.

Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α sử dụng để chọn dòng và nhân dòng gen; chủng vi khuẩn *A. tumefaciens C58C1* mang pGV2260 (Deblaere et al., 1985).

Nhân dòng gen

Đoạn gen *IL-7* được nhân lên bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn là plasmid pBSK/IL7 với cặp mồi đặc hiệu IL7_BamHI_F và IL7_BamHI_R. Phản ứng PCR được tiến hành trong điều kiện: 50 µl hỗn hợp phản ứng gồm 0,3 µM mồi (bảng 1), 0,2 µM dNTPs, 5 µl đệm 10X Pwo SuperYield PC, 2,5 U Pwo SuperYield DNA polymerase, 20 ng khuôn. Chu trình nhiệt: 94^{o}C/5 phút, 30 chu kỳ lặp lại các bước 94^{o}C/30 giây, 50^{o}C/30 giây, 72^{o}C/1 phút 30 giây. Sau đó giữ 72^{o}C/10 phút và sản phẩm được giữ bảo quản ở 15^{o}C. Kết quả PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Sản phẩm PCR và plasmid pRTRA 35S-TBAG-100xELP tinh sạch được cắt đồng thời bằng enzyme *Bam*HI và loại bỏ gốc phosphate bằng enzyme *SAP*. Sản phẩm ghép nối gen *IL-7* vào vector pRTRA được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α. Sau đó tiến hành chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường LB đặc có bổ sung *carbenicilin* 50 mg/L. Tiến hành tách chiết plasmid và giải trình tự tự động theo phương pháp của Sanger và cộng sự sử dụng cặp mồi đặc hiệu trong Bảng 1. Các trình tự nucleotide thu được được phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.0 và Lasergen 7.

Bảng 1. Trình tự nucleotide các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên cặp mồi	Trình tự nucleotide (chiều 5' - -> 3')	Kích thước (bp)
IL7_BamHI_F	GAAAACCTGTATTTTCAGGGAGGATCC	564
IL7_BamHI_R	CCGGATCCTCCCTGAAAATACAGGTTTTCGTGGTGGTGG	
35S-SQF	CACTGACGTAAGGGATGACGC	Gen + 250
35Sterm	CTGGGAACTACTCACACA	

Thiết kế cấu trúc tối ưu biểu hiện chuyển gen thực vật

Thực hiện phản ứng cắt vector pRTRA mang gen *IL-7* và vector pCB301 bằng enzyme *Hind*III và loại bỏ gốc phosphate bằng enzyme *SAP*. Sản phẩm ghép nối DNA vào vector pCB301 được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α và chọn lọc trên môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh *kanamycin* 50 mg/L. Plasmid tái tổ hợp pCB301-IL7/ELP sau khi được chọn dòng bằng PCR và cắt bằng enzyme *Nco*I sẽ được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumafaciens* C58C1/pGV2260 bằng xung điện để phục vụ cho nghiên cứu biểu hiện tạm thời với mục đích hỗ trợ sự biểu hiện protein ở thực vật.

Biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá N. benthamiana

Lấy 1 khuẩn lạc *A. tumefaciens* mang vector chứa gen mã hóa cho protein Hc-Pro và 1 khuẩn lạc *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301_IL7/ELP nuôi trong 2 bình tam giác chứa 5 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh chọn lọc, nuôi lắc 120 vòng/phút ở 28^{o}C trong 16 giờ. Sau đó, chuyển toàn bộ dịch khuẩn nuôi trên vào bình chứa 50ml LB và tiếp tục nuôi khoảng 4-6 giờ tới khi OD_{600} đạt 0,5 - 1; thu nhận khuẩn bằng ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút ở 4^{o}C. Trộn lẫn cặn khuẩn của hai chủng với nhau vào trong đệm MES (10 mM $MgCl_2$, 10 mM MES, pH 5,6) tới khi OD_{600} đạt 1. Dịch huyền phù vi khuẩn sẽ được biến nạp vào lá cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng hút chân không trong điều kiện 2 phút, 27 inches, 0 atm. Sau khi biến nạp, các cây thuốc lá được đưa trở lại nhà lưới. Sau 5 ngày biến nạp, tiến hành thu hoạch toàn bộ lá và bảo quản ở -80^{o}C.

Kiểm tra sự biểu hiện của protein IL-7 tái tổ hợp bằng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot

Mẫu thuốc lá được xử lý qua nito lỏng và nghiền bằng máy Mixer Mill MM 300 (Đức), sau đó hòa tan trong đệm SDS (50mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 0,1% (w/v) bromophenolblue, 10% (v/v) glycerol), biến tính ở 95^{o}C trong 10 phút. Sau đó ly tâm 15000 vòng/phút trong 30 phút ở 4^{o}C. Sử dụng 10-30 µg protein để chạy điện di SDS-PAGE, sau đó chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter của hãng Scientific Pierce ở 25V, 1,3A trong 20 phút. Sau đó tiến hành blocking bằng sữa tách béo 5% trong 5 giờ, màng được ủ với kháng thể 1 kháng c-Myc qua đêm, sau đó ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 2 giờ. Sự có mặt của protein IL-7 tái tổ hợp gắn c-Myc trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất.

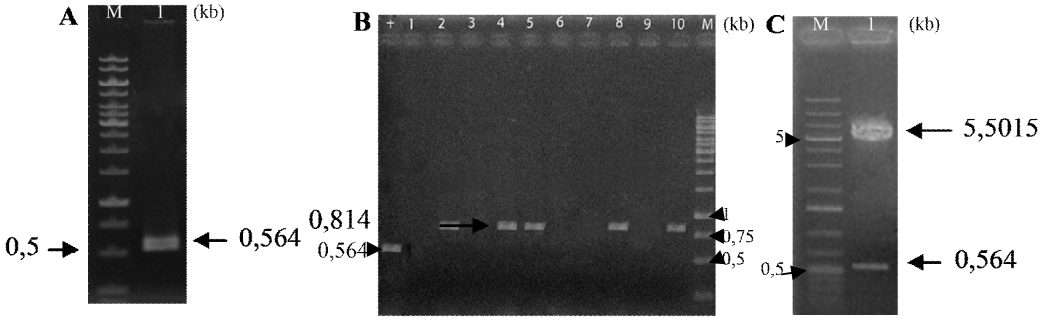
Tinh sạch protein IL-7 tái tổ hợp bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại (IMAC)

Tiến hành thu 1kg lá thuốc lá biểu hiện IL-7, làm lạnh trong nitơ lỏng và nghiền thành bột mịn. Protein tổng số được tách chiết trong 50 mM dung dịch đệm Tris (pH 8,0), sau đó đem ly tâm 18.000 vòng/phút trong 30 phút ở 4^{o}C, lọc qua màng lọc và trộn với agarose gắn Ni-NTA. Trộn đều trong 30 phút ở 4^{o}C rồi đưa vào cột sắc ký. Sử dụng 2 lít đệm rửa (gồm 50 mM NaH_2PO_4, 30 mM Imidazole, 300 mM NaCl, pH 8) để rửa cột chứa hỗn hợp. Protein IL-7 tái tổ hợp được hòa tan từ cột bằng đệm hòa tan (gồm 50mM NaH_2PO_4, 125 mM Imidazole, 300 mM NaCl, pH 8,0) và cô đặc lại bằng Concentrator iCO^{TM}, bảo quản ở -20^{o}C.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector tách dòng pRTRA 35S-IL7-Histag-cMyc-100xELP

Sử dụng cặp mồi IL7_BamHI_F và IL7_BamHI_R nhân đoạn gen mã hóa protein IL-7 trong vector mang pBSK-IL7 bằng PCR, thu được phân đoạn DNA có kích thước khoảng 564 bp đúng như tính toán lý thuyết (hình 1A). Đoạn gen này được ghép nối vào vector tách dòng pRTRA và dòng hóa trong vi khuẩn *E. coli* DH5α. Sau đó chọn dòng bằng colony-PCR và kiểm tra chiều với cặp mồi IL7_BamHI_R và 35S_SQF (hình 1B) và cắt kiểm tra bằng enzyme *Bam*HI (hình 1C) cho thấy, chúng tôi đã thu được dòng khuẩn lạc mang plasmid mong muốn. Giải trình tự 5 dòng khuẩn lạc với cặp mồi 35S_SQF và 35Sterm cho thấy chúng tôi đã tách dòng và ghép nối thành công gen mã hóa protein IL-7 với promoter 35S, ELP, c-Myc và His-tag.



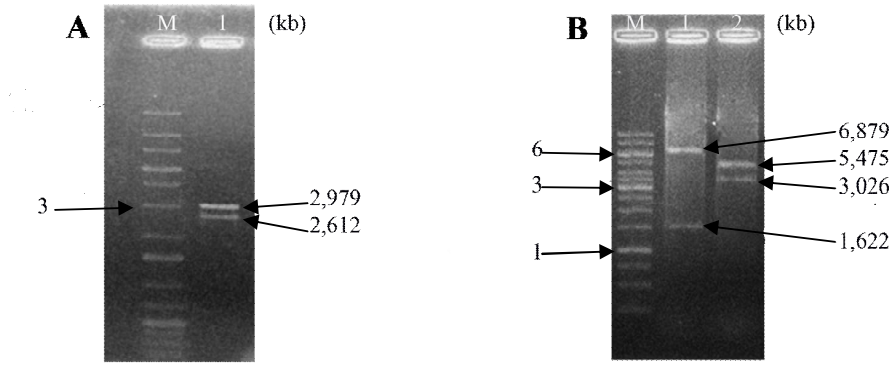
Hình 1. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA tái tổ hợp

A. PCR nhân gen mã hóa protein IL-7; B. Kiểm tra chiều bằng colony-PCR: B(+). đối chứng dương, B(1-10). các dòng khuẩn lạc chuyển gen; C. Sản phẩm cắt vector pRTRA bằng enzyme *Bam*HI; M (A;B). Marker DNA1kb (Fermentas); M (C). Marker DNA 1kb plus (Fermentas).

Thiết kế cấu trúc vector chuyển gen pCB301 35S-IL7-cMyc-histag-100xELP

Sử dụng enzyme *Hind*III cắt đồng thời vector pCB301 và pRTRA 35S-IL7-cMyc-histag-100xELP thu được đoạn vector có kích thước khoảng 5,6kb và cassette 35S-IL7-cMyc-histag-100xELP có kích thước 2,979 kb. Thực hiện phản ứng ghép nối hai sản phẩm trên dưới

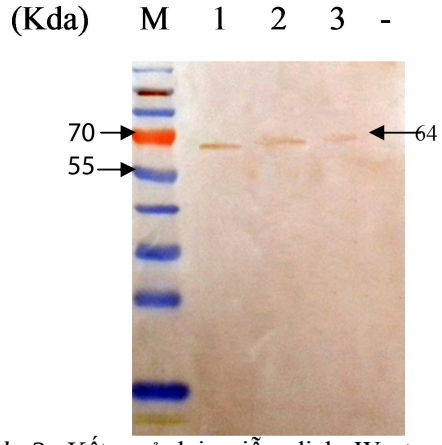
sự xúc tác của enzyme T4 ligase, biến nạp thành công vào vi khuẩn *E. coli DH5α*. Sử dụng enzyme *Nco*I để kiểm tra chiều của đoạn gen chuyển vào so với chiều của vector pCB301. Những dòng có vector tái tổ hợp chứa đoạn DNA ngược chiều được lựa chọn, sau đó biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58C1.



Hình 2. Kết quả thiết kế vector chuyển gen pCB301 tái tổ hợp

A. Sản phẩm cắt plasmid pRTRA 35S-IL7-cMyc-histag-100xELP bằng enzyme *Hind*III; B. Sản phẩm cắt plasmid pCB301 35S-IL7-cMyc-histag-100xELP bằng enzyme *Nco*I: B-1. Sản phẩm cắt xuôi chiều, B-2: Sản phẩm cắt ngược chiều; M (A). Marker DNA 1kb plus (Fermentas), M (B). Marker DNA 1kb (Fermentas).

Đánh giá biểu hiện tạm thời protein IL-7 tái tổ hợp ở cây thuốc lá bằng Western blot



Hình 3. Kết quả lai miễn dịch Western blot kiểm tra sự biểu hiện protein IL-7 tái tổ hợp trong lá thuốc lá

M. Marker protein (4-20% Tris-glycine SDS-PAGE) (Thermo Fisher Scientific); 1. Lá non; 2. Lá bánh tẻ; 3. Lá già; (-). Đối chứng âm: cây thuốc lá không chuyển gen.

Để kiểm tra sự biểu hiện của protein IL-7 tái tổ hợp ở thuốc lá *N. benthamiana*, chúng tôi sử dụng kỹ thuật lai miễn dịch Western blot. Qua thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy khả năng biểu hiện của protein IL-7 khác nhau ở các lá có độ tuổi khác nhau, biểu hiện mạnh nhất ở lá non, điều này có thể giải thích do ở lá non có tốc độ sinh trưởng mạnh, sinh tổng hợp protein mạnh hơn so với lá bánh tẻ và lá già.

Kết quả thể hiện trên hình 3 cho thấy, ở các đường chạy 1, 2, 3 xuất hiện băng có kích thước khoảng 64 kDa, tương ứng với kích thước protein IL-7 tái tổ hợp theo tính toán lý thuyết, trong khi ở đường chạy đối chứng âm, cây thuốc lá không chuyển gen không có xuất hiện các băng này. Để kiểm tra chắc chắn về sự biểu hiện của protein IL-7 tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành tinh sạch protein bằng phương pháp IMAC.

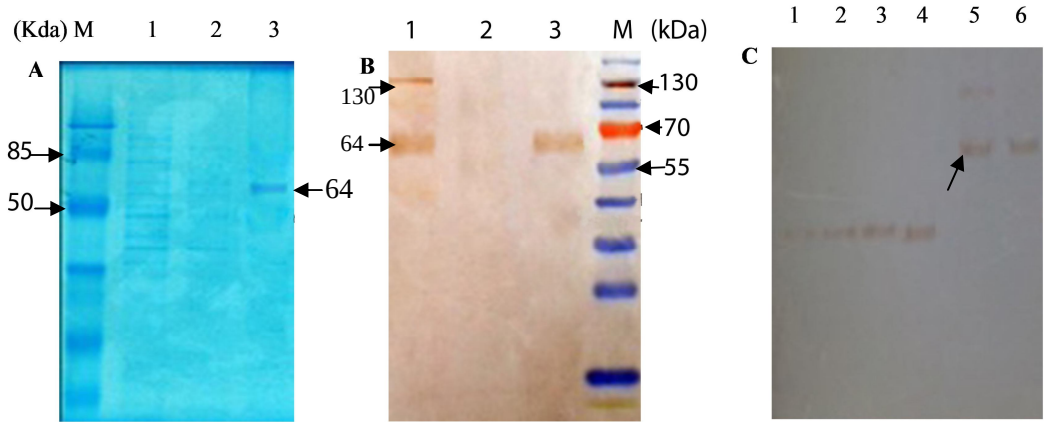
Tinh sạch và định lượng protein tái tổ hợp IL-7

Chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại (niken) để tinh sạch và định lượng protein tái tổ hợp IL-7. Đây là phương pháp hiệu quả để tinh sạch protein tái tổ hợp liên kết với his-tag. Phương pháp này dựa trên nguyên lý histidine tạo phức hợp với các kim loại hóa trị II (niken) ở nồng độ pH trung tính. Sự tương tác của protein liên kết his-tag với kim

loại phụ thuộc vào nồng độ pH. Protein đích sau khi liên kết với cột, có thể được hòa tan để thu nhận bằng cách giảm pH dung dịch hoặc tăng nồng độ của đệm ion hoặc nồng độ của đệm EDTA hoặc imidazole.

Sau khi tinh sạch, chúng tôi kiểm tra sự biểu hiện của protein IL-7 tái tổ hợp bằng điện di SDS-PAGE và phương pháp lai miễn dịch Western blot. Kết quả cho thấy băng vạch protein có kích thước 64 kDa, đúng theo tính toán lý thuyết.

Từ 1kg mẫu lá tươi, sau khi tinh sạch theo phương pháp IMAC và thu nhận lại protein tái tổ hợp bằng Concentrator iCON^{TM}, nồng độ protein tổng số được chúng tôi định lượng theo phương pháp của Bradford và protein IL-7 được định lượng bằng phần mềm ImageJ trên màng lai. Kết quả thu được 252 mg protein IL-7 tinh sạch/8 gam protein hòa tan tổng số, đạt tỷ lệ 3,15%, tương đương nồng độ protein IL-7 là 252 mg/kg lá tươi. So sánh với kết quả biểu hiện kháng nguyên GP5 trong cây thuốc lá chuyển gen của Min-Yuan et al. (2011) định lượng bằng ELISA là 155 mg/kg lá tươi sự biểu hiện của protein IL-7 trong cây thuốc lá *N. benthamiana* trong nghiên cứu biểu hiện tạm thời của chúng tôi tương đối cao.



Hình 4. Kết quả tinh sạch và định lượng protein IL-7 tái tổ hợp

A. Điện di SDS-PAGE: 1A- Dịch chiết thô chứa protein IL7-ELP; 2A- Dịch chiết thu nhận sau khi đi qua cột tinh sạch; 3A: Protein IL7-ELP sau tinh sạch;B. Kết quả Western-blot: 1B- Dịch chiết thô chứa protein IL7-ELP; 2B- Dịch chiết thu nhận sau khi đi qua cột tinh sạch; 3B- Protein IL7-ELP sau khi tinh sạch;C. Định lượng protein GP5 bằng Western-blot và sử dụng phần mềm ImageJ: 1C, 2C, 3C, 4C- đối chứng dương có nồng độ 50, 100, 150, 200 ng/giếng; 5C- Dịch chiết thô chứa protein IL7-ELP trước xử lý; 6C- IL7-ELP sau tinh sạch (30µg protein tổng số/ giếng).

Kết quả này chứng minh hiệu quả của phương pháp biểu hiện tạm thời và tinh sạch protein IL-7 từ cây thuốc lá *N. benthamiana* trong thời gian ngắn. Ngoài ra, chúng tôi cũng tiếp tục tiến hành nghiên cứu tinh sạch protein qua màng mITC dựa vào sự gắn kết của ELP với protein đích IL-7, đây được xem là phương pháp giúp nâng cao hơn nữa hiệu quả của quá trình tinh sạch. Phan Trọng Hoàng (2013) đã chứng minh sự biểu hiện của kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 trong lá và hạt thuốc lá *N. benthamiana* được tăng cường khi dung hợp kháng nguyên HA với ELP. Scheller (2006) đã tạo được protein dung hợp của scFv và trình tự 100xELP trong hạt, làm tăng khả năng tích lũy của protein mong muốn tới hơn 40 lần so với mức bình thường. Những nghiên cứu này sẽ là tiền đề để chúng tôi tiến hành tinh sạch protein IL-7 dung hợp với 100xELP dựa trên phương pháp mITC.

KẾT LUẬN

Đã biểu hiện và tinh sạch thành công protein IL-7 từ cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại

với hàm lượng sau tinh sạch đạt 252 mg/kg lá tươi. Điều này góp phần chứng minh sự thành công của nghiên cứu biểu hiện tạm thời protein IL-7 trong cây thuốc lá *N. benthamiana* và tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

Lời cảm ơn: Thực nghiệm của nghiên cứu được tiến hành tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K., 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends Plant Sci., 6(5): 219-226.

Deblaere R., Bytebier B., De Greve, H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J., 1985. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. Nucleic Acids Res., 13(13): 4777-4788.

Fischer R., Schumann D., Zimmermann S., Drossard J., Sack M., Schillberg S, 1999. Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. Eur. J. Biochem., 262(3): 810-816.

Floss D.M., Falkenburg D., Conrad U., 2007. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. Transgenic Res., 16(3): 315-332.

Min-Yuan Chia, 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 coliheat-labile enterotoxin in pigs. Vet Immunol Immunop, 140(3-4): 215-225.

Phan H. T., Pohl J., Floss D. M., Rabenstein F., Veits J., Le B. T., Chu H. H., Hause G., Mettenleiter T., Conrad U., 2013. ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice. Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Plant Biotechnol. J., 11(5): 582-593.

Scheller J., Leps M., Conrad U., 2006. Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptids. Plant Biotechnol. J., 4(2): 243-249.

Schillberg S., Fischer R., Emans N., 2003. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. Cell.Mol. Life.Sci., 60(3): 433-445.

Verwoerd T. C., Van Paridon P. A., Van Ooyen A. J., Van Lent J. W., Hoekema A., Pen J., 1995. Stable accumulation of Aspergillus niger phytase in transgenic tobacco leaves. Plant Physiology, 109(4): 1199-1205.

Wagner B., Fuchs H., Adhami F., Ma Y., Scheiner O., Breiteneder H., 2004. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in Nicotiana benthamiana. Methods, 32(3): 227-234.

TRANSIENT EXPRESSION OF A TASTE-MODIFYING PROTEIN, INTERLEUKIN-7, IN NICOTIANA BENTHAMIANA USING AGRO-INFILTRATION

Nguyen Huy Hoang[1,2], Pham Bich Ngoc[1], Le Van Son[1], Chu Hoang Ha[1]*

[1]Institute of Biotechnology, VAST, *chuhoangha@ibt.ac.vn
[2]Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy, Thai Nguyen University

SUMMARY

Interleukin-7 (IL-7) is a cytokine that plays an important role in promoting growth and development of CD4 and CD8 immune cells in humans. IL-7 is also a target of the attack of some invasive pathogens. In this study, IL-7- coding gene was cloned into pRTRA vector to generate a cassette 35S-IL7-cmyc-histag-100xELP, and then this cassette was inserted into a binary vector pCB301. This construct was transformed into *Nicotiana benthamiana* using agro-infiltration for transient expression assay. Western blot was used to confirm expression of IL-7 in *N. benthamiana* on the 5th day of post-agro-infiltration. The results show that there were two bigger size of IL-7 with molecular weights of 64 and 130 KDa resulted from post translational modification. IL-7 was purificated from 1 kg of fresh tobacco leaves with the quantity of 3.15% of total soluble protein using immobilized metal ion chromatography method and evaluated by the Image J software. These results set forward the stage of studies on the safety and therapeutic applications of plant-derived recombinant IL-7 protein to humans.

Keywords: Nicotiana benthamiana, agro-infiltration, CD4, CD8, immune, IL-7, transient expression.

Citation: Nguyen Huy Hoang, Pham Bich Ngoc, Le Van Son, Chu Hoang Ha, 2017. Transient expression of a taste-modifying protein, Interleukin-7, in nicotiana benthamiana using agro-infiltration. Tap chi Sinh hoc, 39(2): 219-225. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n2.9000.

**Corresponding author:* chuhoangha@ibt.ac.vn

Received 13 December 2016, accepted 20 May 2017