

NGHIÊN CỨU SỰ BIỂU HIỆN TẠM THỜI CỦA KHÁNG NGUYÊN H7 CỦA VIRUS CÚM A/H7N9 TRONG CÂY THUỐC LÁ (*NICOTIANA BENTHAMIANA*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP AGRO-INFILTRATION

Lê Thị Thủy, Lê Thu Ngọc, Hồ Thị Thương, Phạm Bích Ngọc[✉], Lâm Đại Nhân, Chu Hoàng Hà

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: pbngoc@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 30.9.2015

Ngày nhận đăng: 29.11.2016

TÓM TẮT

Cúm A/H7N9 là chủng virus cúm gia cầm mới, có khả năng lây bệnh trên người được phát hiện tại Trung Quốc vào năm 2013. Protein bề mặt Hemagglutinin của virus cúm được xem như là mục tiêu hàng đầu dùng để thiết kế vaccin chống lại sự xâm nhiễm của virus cúm A/H7N9. Trong nghiên cứu này, đoạn gen mã hóa cho protein H7 của virus cúm A/H7N9 đã được nhân dòng vào 2 vector pRTRA dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S để gắn kết ELP, tạo thành 35S-H7-histag-cmyc-ELP-KDEL và 35S-H7pII-histag-cmyc-ELP-KDEL tương ứng khi không có mặt và có mặt trimer motif GCN4. Các cassette này sau đó đã được ghép nối vào vector chuyển gen pCB301 và biến nạp vào *A. tumefaciens* để chuyển vào lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp Agro-infiltration. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện protein H7 từ mẫu lá sau 5 ngày biến nạp bằng lai miễn dịch cho thấy có sự biểu hiện thành công của các protein tái tổ hợp H7-ELP và (H7pII-ELP)₃. Điều này cho thấy rằng gen mã hóa protein H7 của virus cúm A/H7N9 đã được gắn thành công vào 2 vector chuyển gen và được biểu hiện dưới dạng đơn H7-ELP và dạng ba (H7pII-ELP)₃ trong cây thuốc lá *N. benthamiana*. Dịch chiết protein từ lá thuốc lá mang các loại kháng nguyên này được sử dụng để đánh giá hoạt tính sinh học bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu. Kết quả cho thấy rằng, dịch chiết protein kháng nguyên (H7pII-ELP)₃ là có khả năng gây ngưng kết hồng cầu ở nồng độ protein 94 µg/ml, trong khi đó dịch chiết protein H7-ELP lại không có khả năng gây ngưng kết hồng cầu tại nồng độ protein đó.

Từ khóa: biểu hiện tạm thời, Hemagglutinin (HA), *Nicotiana benthamiana*, protein tái tổ hợp, virus cúm A/H7N9.

MỞ ĐẦU

Cúm A/H7N9 là chủng virus cúm gia cầm mới được phát hiện tại Trung Quốc với độc lực cao. Thông thường, virus cúm A phân nhóm H7 thường gây bệnh trên gia cầm, tuy nhiên một số biến thể có thể gây bệnh sang người khi tiếp xúc trực tiếp với gia cầm nhiễm bệnh, ví dụ như subtype H7N2, H7N3 và H7N5 đã gây tử vong cho con người (Campbell *et al.*, 1970; Tweed *et al.*, 2004). Chủng virus H7N9 trước đây đã từng xuất hiện nhưng chỉ gây ra dịch bệnh trên chim tại Hà Lan, Nhật Bản và Hoa Kỳ. Ba trường hợp nhiễm virus cúm gia cầm A/H7N9 đầu tiên trên người được phát hiện và công bố tại Thượng Hải và An Huy, Trung Quốc vào ngày 31/3/2013 (WHO, 2013).

Nhóm virus cúm A đều có hệ gen là (-ss) RNA. Kích thước hệ gen cúm A/H7N9 là 13.090

nucleotide và có cấu trúc phân thành 8 phân đoạn mã hóa cho 11 protein, mỗi phân đoạn mã hoá cho một chuỗi polypeptide, từ đó tổng hợp nên các protein chức năng của virus. Phân đoạn 1 đến 3 mã hóa cho protein PB2, PB1 và PA, là các protein có chức năng là enzyme polymerase. Phân đoạn 4 mã hóa cho protein HA. HA của virus cúm A là một loại protein gây ngưng kết hồng cầu, được acylat hoá ở vùng giáp ranh với vỏ virus và có đầu N liên kết glycan ở một số vị trí nhất định (Swayne, 2008).

Những nghiên cứu về vaccin chống lại virus cúm A bắt đầu từ thập niên 90 và cho đến nay có rất nhiều nghiên cứu về kháng nguyên HA đã được biểu hiện thành công trên thực vật. Trong nhiều hướng ứng dụng để phát triển các loại vaccin tiêu đơn vị chống virus cúm A, protein HA được xem như là mục tiêu hàng đầu dùng để thiết kế loại vaccin này chống lại sự xâm nhiễm của virus cúm A. Hướng tạo

vacxin tiêu đơn vị sử dụng hệ thống biểu hiện ở thực vật được xem như là một hướng đầy triển vọng với nhiều ưu điểm vượt trội so với các hệ thống biểu hiện khác như (1) chi phí sản xuất thấp; (2) cho phép thực hiện việc định vị chính xác protein tái tổ hợp trong tế bào, cũng như cho phép protein có những biến đổi sau dịch mã. Tuy nhiên, protein tái tổ hợp được tích lũy trong cây trồng chuyển gen thường không cao và thiếu một phương thức tinh sạch protein tái tổ hợp hiệu quả. Để khắc phục nhược điểm này, hiện nay agro-infiltration là phương pháp được ứng dụng trong sinh học thực vật nhằm biểu hiện tạm thời gen hoặc sản xuất các protein tái tổ hợp mong muốn. Agro-infiltration được ứng dụng phổ biến nhất trên hai loài thuốc lá *Nicotiana benthamiana* và *Nicotiana tabacum*. Phương pháp này rất hữu ích trong biểu hiện của protein đích thực vật vì phương pháp này 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).

Promoter điều khiển và phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp được xem như là một trong những yếu tố quyết định đến hàm lượng kháng nguyên thu được phục vụ cho việc thử khả năng đáp ứng miễn dịch. Nhiều nghiên cứu về sự biểu hiện và sản xuất thành công kháng nguyên dung hợp His-tag với hàm lượng cao dưới sự điều khiển của promoter CaMV (từ *Cauliflower Mosaic Virus*) và tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ion cố định kim loại đã được chứng minh ví dụ về sự biểu hiện HA trong cây thuốc lá chuyển gen với hàm lượng 155 mg/kg lá tươi (Chia *et al.*, 2011). Đặc biệt, khi gắn protein tái tổ hợp với Elastin-Like Polypeptide (ELP), protein tái tổ hợp có thể tích lũy lên tới 25% protein tổng số trong hạt (Phan *et al.*, 2013).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời kháng nguyên H7-ELP và (H7pII-ELP)₃ của virus cúm A/H7N9 trên cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp Agro-infiltration.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thực vật

Cây thuốc lá *in vitro* giống K326 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật cung cấp.

Các vector

Vector pUCHA mang gen mã hóa cho kháng

nguyên H7 được tổng hợp bởi công ty SGIDNA của Thụy Điển; vector pRTRA35S-HA-histag-cmyc-100xELP-KDEL và vector pRTRA-35S-H5pII-histag-cmyc-ELP-KDEL có chứa 100xELP đã được thiết kế (Phan *et al.*, 2013); vector chuyển gen pCB301 có chứa gen kháng kháng sinh kanamycin dựa trên pCB301 của (Xiang *et al.*, 1999) được dùng để tạo vector chuyển gen mã hóa protein H7-ELP và (H7pII-ELP)₃; Vector pMON65305/Hc-Pro chứa gen mã hóa cho protein Hc-Pro và gen kháng kháng sinh spectinomycin và rifamycin được dùng để đồng biểu hiện trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời với vector đích tái tổ hợp (Hồ Thị Thương *et al.*, 2014).

Chủng vi khuẩn

E. coli chủng DH5α được dùng để chọn dòng và nhân dòng gen. Chủng *A. tumefaciens* C58C1 mang pGV2260 được dùng để chuyển gen mã hóa protein H7 vào thực vật.

Thông tin các cặp mồi

Bảng 1. Danh sách các cặp mồi.

Tên mồi	Trình tự (5'-3')
H7-BamHI-F	<u>GGATCC</u> GGTCATCACGCAGTCTCCAA
H7-BamHI-R	<u>GGATCC</u> GGTAACGGTGTTCATTCCGGT
H7-PspOMI-R	<u>GGGCC</u> CGGTAACGGTGTTCATTCCGGT
35S-SQF	CACTGACGTAAGGGATGACGC
35S-term	CTGGGAAGTACTCACACA

Phương pháp

Tạo vector tách dòng mang gen mã hóa protein H7-ELP và (H7pII-ELP)₃

Đoạn gen mã hóa protein H7 được nhân bản bằng phản ứng PCR sử dụng với các cặp mồi đặc hiệu H7-*BamHI-F* & R và HA-*BamHI-F*/*pspOMI-R* (Bảng 1). Phản ứng PCR được tiến hành trong điều kiện: 50 µl hỗn hợp bao gồm 0,3 µM mồi, 0,2 µM dNTPs, 2,5U Pwo SuperYield DNA polymerase, 5 µl đệm 10X Pwo SuperYield PC và 20 ng khuôn. Quá trình nhân đoạn gồm các bước sau: 94°C/3 phút; 30 chu kỳ lặp lại các bước 94°C/30 giây, 56°C/50 giây, 72°C/30 giây; 72°C/4 phút, sản phẩm được giữ ở 4°C và điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Sản phẩm PCR thu được và các plasmid pRTRA 35S-H7-histag-cmyc-ELP-KDEL, pRTRA-35S-H7pII-histag-cmyc-ELP-KDEL tinh sạch được phân cắt bằng *BamHI* hoặc *BamHI* và *pspOMI*, sau đó loại bỏ gốc phosphate với *Shrimp alkaline phosphatase* (SAP). Sản phẩm ghép nối đoạn H7 vào vector pRTRA được biến nạp vào tế

bào *E.coli* DH5 α . Chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường thạch LB đặc bổ sung carbenicilin 50 mg/l. Plasmid sau đó được tách chiết và được giải trình tự tự động theo phương pháp Sanger và cộng sự sử dụng cặp mồi đặc hiệu trong bảng 1. Các trình tự nucleotide được phân tích bằng BioEdit 7.0 và LaserGen 7 (DNASTar, Madison, WI, USA).

Thiết kế cấu trúc vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa protein H7-ELP và (H7pII-ELP)₃

Vector pRTRA có chứa gen mã hóa cho kháng nguyên H7-ELP, (H7pII-ELP)₃ và pCB301 được phân cắt bằng *Hind*III. Sản phẩm được ghép nối vào vector pCB301 và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường thạch LB có bổ sung kanamycin 50 mg/l. Plasmid tái tổ hợp pCB30135S-H7-histag-cmyc-ELP-KDEL và pCB30135S-H7pII-histag-cmyc-ELP-KDEL sau khi được chọn dòng bằng PCR và cắt bằng cặp enzyme giới hạn sẽ được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* C58C1/pGV2260 bằng phương pháp xung điện theo quy trình của (Mersereau *et al.*, 1990), để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời với mục đích hỗ trợ sự biểu hiện protein ở thực vật.

Biểu hiện tạm thời protein H7 trong cây thuốc lá *N. benthamiana*

Chọn 1 khuẩn lạc chủng *A.tumefaciens* mang vector chứa gen mã hóa cho protein Hc-pro và 1 khuẩn lạc chủng *A.tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301-H7-histag-cmyc-ELP-KDEL và pCB301-H7pII-histag-cmyc-ELP- KDEL nuôi trong bình 5 ml LB có bổ sung kháng sinh chọn lọc phù hợp. Vi khuẩn được nuôi lắc 120 rpm, 14 -16 h ở 28 °C. Toàn bộ dịch khuẩn nuôi cấy trên được chuyển vào bình chứa 50 ml LB và tiếp tục nuôi khoảng 4 - 6 h cho tới khi OD₆₀₀ đạt 0,4-0,8, khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 5000 rpm trong 15 phút ở 4 °C. Cặn khuẩn của hai chủng được trộn với nhau và hòa tan trong đệm MES (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5,6) tới khi OD₆₀₀ đạt 0,8. Dịch huyền phù vi khuẩn được dùng cho biến nạp vào lá cây thuốc lá bằng hút chân không trong thời gian 2 phút, 27 inches, 0 atm. Các cây thuốc lá sau khi biến nạp được đưa trở lại vào nhà lưới để tiếp tục phát triển. Sau 5 ngày biến nạp, toàn bộ lá được thu và bảo quản ở -80 °C.

Kiểm tra sự biểu hiện của H7-ELP và (H7pII-ELP)₃ bằng kỹ thuật Western blot

Mẫu lá thuốc lá được nghiền bằng máy Mixer

Mill MM 300 (Retsch, Haan, Germany), sau đó hòa tan trong đệm mẫu SDS (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 0,1% (w/v), Bromophenolblue, 10% (v/v) Glycerol), biến tính mẫu ở 95 °C, 10 phút và ly tâm 13.000 vòng 30 phút, 4 °C. 10-30 μ g protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE (10% polyacrylamide), sau đó chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter (Thermo Scientific Inc.) ở 25 V, 1,3 A trong 20 phút. Sau khi được phủ màng bằng sữa tách béo 5% trong 5 h, màng được ủ với kháng thể 1 kháng cmyc trong 2 h trước khi ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 2 h. Giữa các bước ủ kháng thể, màng được rửa bằng PBS ba lần mỗi lần cách nhau 5 phút. Sự có mặt của protein H7 và (H7pII-ELP)₃ gắn cmyc trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất.

Phương pháp tách chiết protein tổng số phục vụ cho phản ứng ngưng kết hồng cầu

Mẫu lá thuốc lá được nghiền bằng máy Mixer Mill MM 300 (Retsch, Haan, Germany), sau đó được hòa tan trong đệm PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂PO₄; 1,8 mM KH₂PO₄). Dịch chiết protein được thu lại sau khi ly tâm 13.000 vòng 30 phút, 4 °C. Nồng độ protein tổng số được đo ở bước sóng 595 nm theo phương pháp của Bradford (1976) với đường chuẩn được dựng bằng BSA (Bovine Serum Albumin).

Phản ứng ngưng kết hồng cầu với dịch chiết mang protein H7 và (H7pII-ELP)₃

Chuẩn bị tế bào hồng cầu

Thu 8 ml mẫu máu từ tĩnh mạch ở cánh gà khỏe mạnh, chưa từng tiêm chủng với loại vaccin nào và được hòa trong dung dịch Alserver với tỷ lệ 1:1. Dung dịch sau đó được đi ly tâm với thể tích tương đương của PBS với tốc độ 5000 vòng/30 phút để hồng cầu lắng xuống đáy. Quá trình được lặp lại hai lần với PBS. Sau đó hút 2 ml hồng cầu cho vào 198 ml PBS để thu được tế bào hồng cầu gà 1% và được bảo quản ở từ 4 °C.

Phản ứng ngưng kết hồng cầu

Phản ứng ngưng kết hồng cầu được thực hiện theo OIC (OIC, 2014). Bổ sung 50 ml kháng nguyên vào giếng đầu tiên của một tấm nhựa vi chuẩn độ có đáy hình chữ V đã chứa 50 ml PBS. Pha loãng 2 lần trên toàn bộ hàng, sau đó bổ sung thêm 50 ml 1% tế bào hồng cầu vào mỗi giếng. Kết quả đã được đọc sau khi ủ đĩa ở 25 °C trong 30 phút. Nồng độ pha

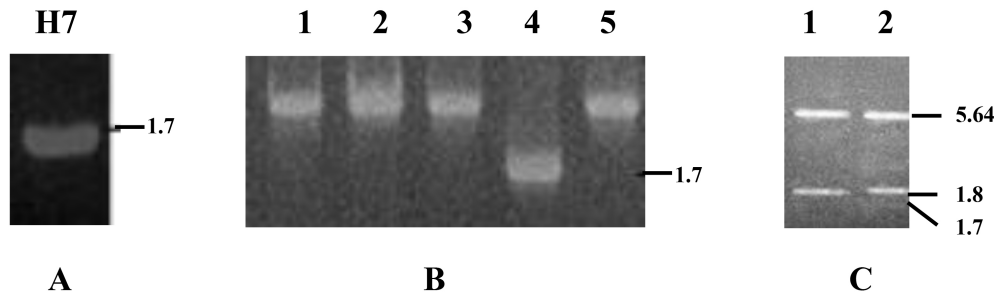
loãng đến điểm cuối cùng cho phản ứng ngưng kết hồng cầu được xác định là một đơn vị ngưng kết (HAU) (Phan *et al.*, 2014).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

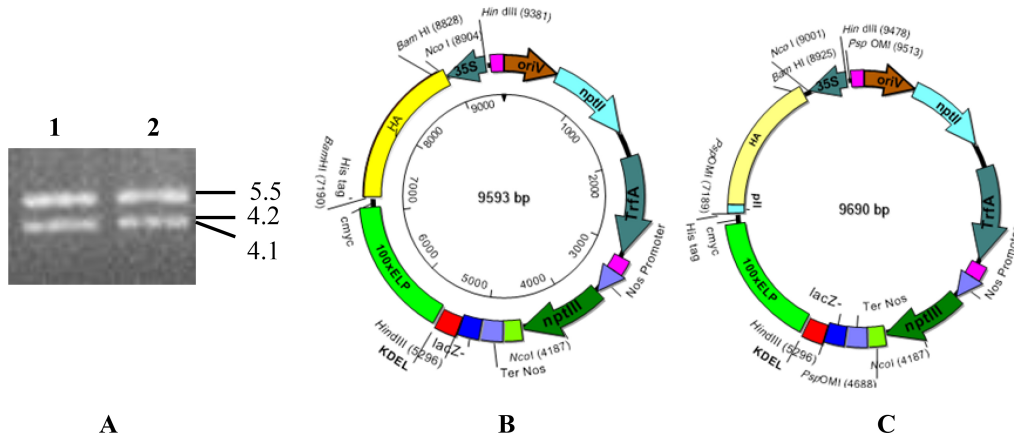
Tạo vector tách dòng mang gen mã hóa protein H7 và H7pII gắn kết 100x ELP

Kết quả PCR khuếch đại gene mã hóa protein H7-ELP và H7pII-ELP từ vector pUCHA sử dụng cặp mồi được liệt kê ở bảng 1 đã thu được phân đoạn DNA có kích thước khoảng 1,7 kb đúng như tính toán lý thuyết (Hình 1A). Đoạn gen mã hóa

protein H7-ELP, (H7pII-ELP)₃ và vector tách dòng pRTRA 35S-H7-histag-cmyc-ELP-KEDL và pTRA 35S-H7pII-histag-cmyc-ELP-KDEL sau khi được xử lý với *Bam*HI hoặc *Bam*HI/*Psp*OMI được gắn với nhau và dòng hóa vào trong tế bào *E. coli* DH5α. Chọn dòng tế bào *E. coli* tái tổ hợp bằng colony-PCR (Hình 1B) và bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI hoặc *Bam*HI/*Psp*OMI. (Hình 1C), chúng tôi đã thu được các dòng khuẩn lạc mang plasmid mong muốn. Ba dòng khuẩn lạc mang plasmid tái tổ hợp được giải trình tự với mồi 35S-SQF/35S-term. Kết quả giải trình tự đã cho thấy sự tách dòng và gắn kết thành công gen mã hóa protein H7-ELP và (H7pII-ELP)₃ vào vector tách dòng.



Hình 1. Kết quả thiết kế vector pRTRA tái tổ hợp. (A) Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen mã hóa protein H7. 1: gen H7; M: Marker DNA 1-10 kb; (B) Kết quả điện di sản phẩm PCR trực tiếp khuẩn lạc. 1-5: dòng khuẩn lạc 1-5; (C) Kết quả điện di sản phẩm xử lý vector pRTRA/H7 bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Bam*HI/*Psp*OMI. 1: vector pRTRA/H7pIIELP; 2: vector pRTRA/H7ELP.



Hình 2. Kết quả thiết kế cấu trúc vector chuyển gen. (A). Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pCB301 mang gen mã hóa protein H7 với *Hind*III. M: Marker DNA 1-10 kb. 1: Vector pCB301 35S H7-his tag-cmyc-ELP-KDEL; 2: Vector pCB301 35S-H7pII-his tag-cmyc-ELP-KDEL. (B). Sơ đồ vector pCB301-35S-H7-histag-cmyc-ELP-KDEL. (C). Sơ đồ vector pCB301-35S-H7pII-histag-cmyc-ELP-KDEL.

Thiết kế cấu trúc vector chuyển gen thực vật

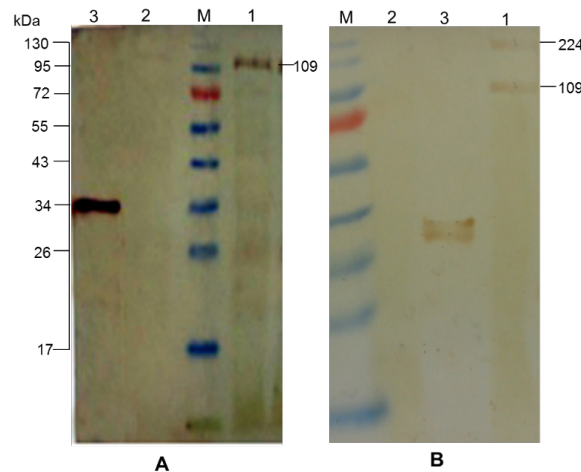
Đoạn vector pCB301 có kích thước khoảng 5,6 kb, cassette 35S-H7-histag-cmyc-ELP-KEDL và cassette 35S-H7pII-histag-cmyc-ELP-KDEL có kích thước khoảng 2,9 kb được thu nhận từ việc cắt vector pCB301 và vector pRTRA tương ứng bởi enzyme *Hind*III được gắn kết lại với nhau dưới sự xúc tác của enzyme T4 ligase và biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5 α . Plasmid tái tổ hợp được xác định thành công bằng phản ứng cắt bởi enzyme cắt giới hạn *Hind*III (Hình 2A). Vector tái tổ hợp có chứa đoạn DNA chuyển vào ngược chiều với chiều biểu hiện của gen kháng kháng sinh được lựa chọn để được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* C58C1. Các sơ đồ vector chuyển gen thực vật được thể hiện ở (Hình 2B,C).

Đánh giá biểu hiện tạm thời của protein H7-ELP và (H7pII-ELP)₃ ở lá cây thuốc lá bằng Western-blot

Chủng *A. tumefaciens* mang vector chứa gen mã hóa cho protein HcPro được dùng để đồng biến nạp với chủng *A. tumefaciens* mang vector chứa gen mã hóa

kháng nguyên đích vào cây thuốc lá. Protein HcPro đã được chứng minh có vai trò trong việc làm tăng sự biểu hiện của các kháng nguyên đích trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời (Hồ Thị Thương *et al.*, 2015).

Sau 4 ngày biến nạp, sự biểu hiện thành công của protein H7-ELP và (H7pII-ELP)₃ trong lá thuốc lá *N. benthamiana* đã được xác nhận bằng phản ứng western-blot sử dụng kháng thể kháng cmyc (Hình 3). Protein H7-ELP có kích thước khoảng 109 kDa (Hình 3A). Việc gắn đuôi cmyc giúp cho việc nhận biết protein tái tổ hợp dựa vào phản ứng lai đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể. Protein (H7pII-ELP)₃ dạng nguyên thể có cấu trúc dạng 3 phân tử H7pII-ELP, tuy nhiên khi được phân tách bằng SDS-PAGE bổ sung β -mercaptoethanol, cấu trúc không gian nguyên thể của protein này đã bị phá vỡ một phần hoặc hoàn toàn. Kết quả xác định bằng western blot cho thấy rằng vạch băng có kích thước khoảng 109 kDa và 224 kDa tương ứng với kích thước dạng monomer của protein H7pII-ELP và dạng dimer của (H7pII-ELP)₃ (hình 3B). Như vậy, các protein H7-ELP và (H7pII-ELP)₃ đã được biểu hiện thành công ở lá cây thuốc lá bằng phương pháp Agro-infiltration.



Hình 3. Kết quả Western-Blot với dịch chiết thô được điện di trên gel SDS – PAGE và phát hiện bằng kháng thể ScFv-Cmyc. M- thang chuẩn protein (17-130 kDa); 2- Wt cây không chuyển gen; 3 – Đối chứng dương ScFv-Cmyc; 1- Protein H7-ELP (A) và Protein (H7pII-ELP)₃ (B).

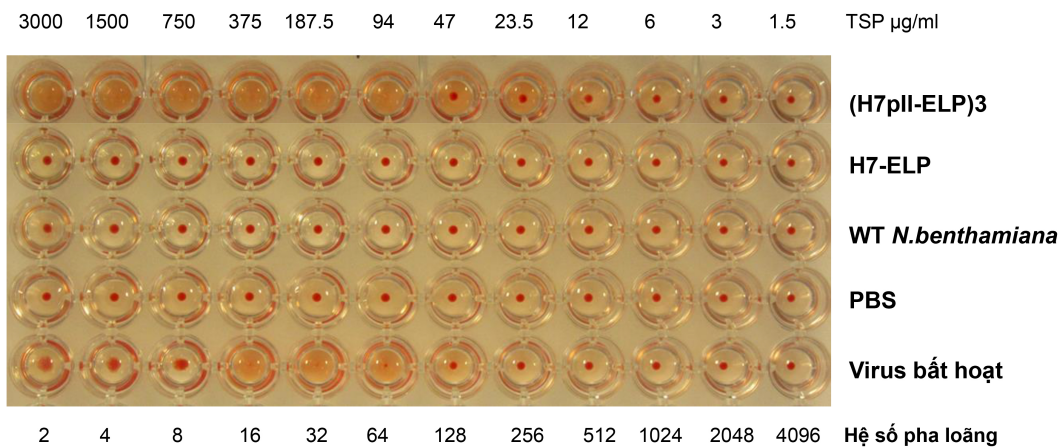
Đánh giá hoạt tính sinh học của kháng nguyên Hemagglutinin bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu

Trong nghiên cứu này, dịch chiết protein tổng số từ lá thuốc lá mang kháng nguyên H7-ELP và kháng nguyên (H7pII-ELP)₃ được sử dụng để đánh giá hoạt tính sinh học bằng phản ứng ngưng kết

hồng cầu. Kết quả của phản ứng ngưng kết hồng cầu với dịch chiết protein tổng số chứa kháng nguyên được thể hiện trong (Hình 4) cho thấy, dịch chiết protein tổng số mang kháng nguyên (H7pII-ELP)₃ có khả năng gây ngưng kết hồng cầu với nồng độ protein 94 μ g/ml, trong khi đó dịch chiết protein tổng số mang kháng nguyên H7-ELP không

có khả năng gây ngưng kết hồng cầu tại nồng độ protein đó và các nồng độ cao hơn từ 3000 µg/ml. Kết quả này là tương tự với nhận định của Phan *et al* (2013). Kết quả này có thể được lý giải dựa cấu trúc tự nhiên của protein hemagglutinin của virus cúm A. Protein hemagglutinin của virus cúm A tự nhiên tồn tại ở dạng cấu trúc phi cộng hóa trị gồm 3 phân tử protein HA đồng nhất. Trong nghiên cứu này, đoạn gen mã hóa protein hemagglutinin (H7) được gắn kết với trimer motif GCN4 (pII) và ELP với mục đích tạo phân tử protein gồm 3 phân tử H7pII-ELP tương tự với cấu trúc dạng tự nhiên của

hemagglutinin. Khả năng gây ngưng kết hồng cầu dựa trên khả năng liên kết của kháng nguyên với các thụ thể hiện diện trên bề mặt tế bào hồng cầu, tạo ra mạng lưới và số vị trí bám càng lớn, mạng lưới càng rộng thì khả năng gây ngưng kết hồng cầu càng cao ở nồng độ protein càng thấp. Do vậy, dịch chiết protein tổng số mang kháng nguyên (H7pII-ELP)3 có khả năng gây ngưng kết hồng cầu tại nồng độ protein tổng số thấp hơn so với dịch chiết protein tổng số mang kháng nguyên H7pII-ELP. Đây là cơ sở để chúng tôi tiến hành cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4. Kết quả phản ứng ngưng kết hồng cầu Hemagglutinin của H7N9. PBS và wt *N. benthamiana* (cây không chuyển gen): đối chứng âm; Virus bất hoạt (chủng H5N1/2004): đối chứng dương; TSP: protein tổng số.

KẾT LUẬN

Như vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế và biểu hiện thành công cấu trúc chuyên gen thực vật mang gen mã hóa kháng nguyên H7-ELP và (H7pII-ELP)3 của virus H7N9 trong cây thuốc lá *N. benthamiana*. Hoạt tính sinh học của kháng nguyên H7 từ dịch chiết protein thực vật (H7pII-ELP)3 đã được chứng minh có khả năng gây ngưng kết hồng cầu tại nồng độ 94 µg/ml.

Lời cảm ơn: Công trình này được hoàn thành với kinh phí từ đề tài: "Nghiên cứu tạo kháng nguyên tái tổ hợp của virus gây bệnh cúm A/H7N9 bằng phương pháp tạm thời nhằm phục vụ cho việc tạo vaccin thế hệ mới, VAST02.03/14-15". Đề tài có sử dụng các trang thiết bị của 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

Alia H, Swayne DE, Suarez DL (2000) Highly pathogenic avian influenza. *Rev sci tech et Off int Epiz* 19: 463–482.

Berinstein A, Vazquez-Rovere C, Asurmendi S, Gomez E, Zanetti F, Zabal O, Tozzini A, Conte GD, Taboga O, Calamante G, Barrios H, Hopp E, Carrillo E (2005) Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine* 23: 5583–5589.

Bùi Phương Thảo, Lê Thị Thuý, Nguyễn Tường Vân, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà, Trần Thanh Thu, Angenon G, Lê Văn Sơn (2009) Nghiên cứu tạo cây đậu tương chuyển gen mang cấu trúc biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1. *Hội nghị KHCN toàn quốc Thái Nguyên*: 868–872.

Campbell CH, Webster RG, Breese SS Jr (1970) Fowl plague virus from man. *J Infect Dis* 122(6): 513–516.

- Fischer R, Schumann D, Zimmermann S, Drossard J, Sack M, and Schillberg S, (1999) Expression and characterization of bispecific single-chain Fv fragments produced in transgenic plants. *Eur. J. Biochem* 262: 810–816.
- Floss DM, Falkenburg D, and Conrad U (2007) Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* 16: 315–332.
- Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, Lu H, Zhu W, Gao Z, Xiang N, Shen Y, He Z, Gu Y, Zhang Z, Yang Y, Zhao X, Zhou L, Li X, Zou S, Zhang Y, Li X, Yang L, Guo J, Dong J, Li Q, Dong L, Zhu Y, Bai T, Wang S, Hao P, Yang W, Zhang Y, Han J, Yu H, Li D, Gao GF, Wu G, Wang Y, Yuan Z, Shu Y (2013) Human infection with a novel avian-origin influenza A/H7N9 virus. *New Engl J Med* 368: 1888–1897.
- Herfst S, Schrauwen EJ, Linster M, Chutinimitkul S, de Wit E, Munster VJ, Sorell EM, Bestebroer TM, Burke DF, Smith DJ, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA (2012) Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* 336: 1534–1541.
- Hồ Thị Thuong, Nguyễn Thu Giang, Chu Thị Kim Hoàng, Phạm Thị Vân, Phạm Bích Ngọc, Đinh Duy Kháng, Chu Hoàng Hà (2015) Nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên GP5 của virus gây bệnh lợn tai xanh trong cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*) bằng phương pháp agro-infiltration. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 31: 53–61.
- Hu Y, Shuihua L, Song Z, Wang W, Hao P, Li J, Zhang X, Yen HL, Shi B, Li T, Guan W, Xu L, Liu Y, Wang S, Zhang X, Tian D, Zhu Z, He J, Huang K, Chen H, Zheng L, Li X, Ping J, Kang B, Xi X, Zha L, Li Y, Zhang Z, Peiris M, Yuan Z (2013) Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance. *The Lancet* 381(9885): 2273–2279.
- Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do Y-Y, Huang PL, Chang HW, Tsai YC, Lin CM, Pang VF, Jeng CR (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 Immunop* 140: 215–225.
- Imai M, Watanabe T, Hatta M, Das SC, Ozawa M, Shinya K, Zhong G, Hanson A, Katsura H, Watanabe S, Li C, Kawakami E, Yamada S, Kiso M, Suzuki Y, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y (2012) Experimental adaptation of an influenza H5/HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 486: 420–428.
- Lê Văn Sơn, Trần Thanh Thu, Chu Hoàng Hà, Angeon G, Lê Trần Bình (2008) Biểu hiện kháng nguyên M1 của virus H5N1 trong hạt *Arabidopsis*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4A): 563–568.
- Marion M. Bradford (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Matsuoka Y, Swayne DE, Thomas C, Rameix-Welti MA, Naffakh N, Warnes C, Altholtz M, Donis R, Subbarao K (2009) Neuraphidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice. *J Virol* 83(9): 4704–4708.
- Phan HT, Pohl J, Floss DM, Rabenstein F, Veits J, Le BT, Chu HH, Hause G, Mettenleiter T, Conrad U (2013) ELPyated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice. *Plant Biotechnol J* 11(5): 582–593.
- Scheller J, Leps M, and Conrad U (2006) Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptides. *Plant Biotechnol J* 4: 243–249.
- Suzuky Y (2005) Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Boil Pharm Bull* 28: 399–408.
- Swayne DE (2008) Influenza A virus. In Swayne DE, ed. Avian influenza. Blackwell Publishing: 3–22.

STUDY ON THE TRANSIENT EXPRESSION OF HEMAGGLUTININ ANTIGEN OF INFLUENZA A/H7N9 VIRUS IN *NICOTIANA BENTHAMIANA* USING AGRO-INFILTRATION

Le Thi Thuy, Le Thu Ngoc, Ho Thi Thuong, Pham Bich Ngoc, Lam Dai Nhan, Chu Hoang Ha

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Avian influenza A/H7N9 is a subtype of influenza viruses that has been detected in birds in the past. This

subtype has not been previously seen in either animals or human until it was found in March 2013 in China. However, since then, infections of modified H7N9 in both human and birds have been observed such as H7N2, H7N3 and H7N5 subtypes. Hemagglutinin (HA) is the most important antigen for induction of immunity, and is a target to develop influenza vaccines. In this study, the gene encoding HA protein was successfully inserted into pRTRA vectors to generate 35S-HA-histag-cmyc-ELP-KDEL and 35S-HApII-histag-cmyc-ELP-KDEL cassettes in the absence and presence of trimer motif GCN4, respectively in order to enhance accumulation of recombinant proteins in plants. These cassettes were inserted into pCB301 binary vectors and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* in order to carry out the transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaves. Five days after infiltration, the total soluble protein was extracted and analysed in SDS-PAGE. The HA-ELP and (HApII-ELP)₃ recombinant proteins were detected by Western blot using anti-cmyc monoclonal antibody. These results showed that HA protein fused ELP was observed in monomeric and trimeric forms. The plant extract containing hemagglutinin protein in monomeric and trimeric forms were characterized bio-function using hemagglutination assay. The plant extract containing hemagglutinin protein in trimeric form agglutinated chicken red blood cells at concentration of 94 µg protein/ml whereas the plant extract containing hemagglutinin protein in monomeric form did not agglutinate chicken red blood cells at the same of protein concentration.

Keywords: *Agro-infiltration, Influenza A/H7N9 virus, Hemagglutinin (HA), Nicotiana benthamiana, recombinant protein, transient expression.*