

## BIỂU HIỆN GEN HA5 MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN HEMAGGLUTININ (HA) CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Đỗ Thị Huyền<sup>1</sup>, Bùi Hồng Vân<sup>3</sup>, Văn Thị Như Ngọc<sup>1</sup>, Trương Văn Dung<sup>2</sup>, Trương Nam Hải<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học

<sup>2</sup>Viện Thú y

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Hà Nội

### TÓM TẮT

Bệnh cúm gia cầm gây ra bởi virus thể độc lực cao là một bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do có tốc độ lây lan nhanh và tỷ lệ gây chết cao trong đàn gia cầm nhiễm bệnh. Hiện nay, chủng virus cúm A/H5N1 là chủng virus gây ra dịch bệnh chủ yếu ở nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện toàn bộ gen *ha0* mã hóa cho kháng nguyên HA5 của virus cúm A/H5N1 trong tế bào *E. coli* BL21. Gen *ha5-0* được thiết kế dung hợp với gen mã hóa cho protein thioredoxin trong vector pET22trx và dưới hai dạng: 1) Toàn bộ gen *ha5-0* trừ bộ ba mở đầu và phần tín hiệu tiết; 2) Thay thế đoạn đoạn peptide nối giữa hai tiểu phần HA1 và HA2 bằng một đoạn polylinker (*ha5-1-2*). Khả năng biểu hiện của chúng tôi tổ hợp *E. coli* BL21 mang các dòng gen *ha5-0* và *ha5-1-2* được khảo sát trong môi trường LB với nhân tố chọn lọc ampicillin và chất cảm ứng IPTG. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng IPTG được khảo sát ở các giá trị 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5 và 2 mM. Khả năng biểu hiện của các dòng tế bào tái tổ hợp được khảo sát ở các nhiệt độ 22, 25, 28, 30 và 37°C. Kết quả thu được cho thấy, protein dung hợp TrxHa5-0 và TrxHa5-1-2 có kích thước khoảng 66 kDa đã được biểu hiện tốt nhất trong tế bào *E. coli* dưới sự điều khiển của *T7 lac* promoter với chất cảm ứng IPTG và ở nhiệt độ cảm ứng là 25°C. Protein tái tổ hợp không được tổng hợp khi trong môi trường không có chất cảm ứng IPTG. Tuy nhiên, nồng độ chất cảm ứng không ảnh hưởng nhiều đến mức độ biểu hiện gen của tế bào, protein tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện tốt ngay ở nồng độ chất cảm ứng rất thấp là 0,05 mM và tăng lên không đáng kể ở các nồng độ cao hơn. Bên cạnh đó, protein TrxHa5-1-2 có mức độ biểu hiện và khả năng tan cao hơn so với protein TrxHa5-0 khi được biểu hiện ở cùng điều kiện nhiệt độ và hàm lượng chất cảm ứng. Tỷ lệ tan của protein TrxHa5-1-2 đạt tới trên 70% protein tổng số khi được biểu hiện ở nhiệt độ 25°C. Cấu trúc gen dung hợp này sẽ được đưa vào vector pPIC9 để biểu hiện gen trong nấm men *P. pastoris* nhằm nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp dựa vào chủng nấm men.

**Từ khóa:** *E. coli* BL21, *ha5-1*, pET22trx, protein tái tổ hợp, vaccine

### MỞ ĐẦU

Dịch cúm hàng năm gây ra bởi virus cúm gia cầm thể độc lực cao là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm, tốc độ lây lan nhanh, tỷ lệ gây chết cao trong đàn gia cầm và có khả năng lây lan sang người và gia súc dẫn đến tử vong (Bridges *et al.*, 2002, Simonsen *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2003). Số người tử vong do các đại dịch cúm trong lịch sử được ước tính là cao hơn nhiều so với số người chết trong chiến tranh thế giới (Potter, 1998). Tính từ năm 2003 đến tháng 5 năm 2008, số ca nhập viện vì bệnh cúm trên toàn thế giới là 383, trong đó số ca tử vong là 241, đại đa số được xác định là nhiễm virus cúm A/H5N1 (<http://who.int>). Cùng với đó là những thiệt hại to lớn về kinh tế, một số lớn gia cầm thường xuyên bị tiêu hủy khi có dịch bệnh xuất hiện gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành chăn nuôi và đời sống của người dân.

Sự thay đổi thường xuyên và mạnh mẽ của các kháng nguyên bề mặt (HA và NA) dẫn đến sự thay đổi về độc tính của virus cúm và đồng thời cũng là nguyên nhân chủ yếu gây ra tính mùa vụ, một trong những đặc tính nguy hiểm của dịch bệnh này (Laemmli, 1970; Nayak *et al.*, 1985). Kháng nguyên HA bao gồm 2 tiểu phần nối với nhau bởi một đoạn 6 amino acid. Sự thay đổi về trình tự của đoạn amino acid này dẫn đến sự thay đổi về độc tính của virus (Ross *et al.*, 2000; Saelens *et al.*, 1999). Hầu hết vaccine phòng cúm đang được sử dụng là vaccine bất hoạt được sản xuất trên phôi gà, trong đó kháng nguyên HA được chứng tỏ là đích tác động chủ yếu để tạo ra đáp ứng miễn dịch phòng vệ (Skehel *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2001). Mặc dù loại vaccine này được công nhận là toàn diện và hiệu quả, nhưng đòi hỏi thời gian sản xuất dài do đó không đáp ứng được nhu cầu sử dụng vaccine phòng cúm trên toàn thế giới. Để đáp ứng

được nhu cầu này, nhiều đối tượng và phương thức tiếp cận khác nhau đã được triển khai thực hiện (Ghendon et al., 2005; Kistner et al., 2007; Pau et al., 2001). Vaccine dưới đơn vị là một trong những phương thức tiếp cận mới, cho phép sản xuất được vaccine trong một thời gian ngắn và dễ dàng mở rộng quy mô sản xuất. Các đối tượng được áp dụng nhiều trong nghiên cứu sản xuất vaccine dưới đơn vị phòng cúm là tế bào côn trùng (Nwe et al., 2006; Treanor et al., 2006), tế bào thực vật (Karasev et al., 2005; Williamson et al., 2005) và tế bào vi sinh vật (Davis et al., 1983; Deltito et al., 1995; Rong et al., 2007; Saelens et al., 1999).

Trong những năm gần đây, nhiều loại protein, enzyme và kháng nguyên đã được biểu hiện thành công trong tế bào vi sinh vật và nhiều trong số đó đã được áp dụng rộng rãi trong thực tế cuộc sống như dùng làm thuốc, thực phẩm chức năng... Kháng nguyên HA của một số virus cúm A như, H0N1, H3N2, H7N9 và H5N1 đã được nghiên cứu biểu hiện trong tế bào vi sinh vật như *E. coli*, Baculovirus, nấm men *P. pastoris* và *S. cerevisiae* (Jabbar et al., 1985; Yi-Ming et al., 2006). Năm 1981, Davis và đồng tác giả đã tiến hành biểu hiện kháng nguyên HA của virus cúm A/H0N1 trong *E. coli* dưới dạng dung hợp với protein  $\beta$ -galactosidase. Protein HA tái tổ hợp được chứng tỏ là chứa quyết định kháng nguyên do được nhận biết miễn dịch bởi kháng thể kháng virus cúm, tuy nhiên mức độ biểu hiện là rất thấp (Davis et al., 1981). Nấm men *P. pastoris* đã được sử dụng làm tế bào biểu hiện kháng nguyên HA của một số subtype trong nghiên cứu của Yi-Ming Xu và đồng tác giả năm 2006. Các protein HA tái tổ hợp trong nghiên cứu đó được nhận biết miễn dịch bởi kháng thể kháng virus cúm và được coi là đối tượng tiềm năng để sản xuất vaccine dưới đơn vị phòng bệnh cúm.

Trong các nghiên cứu trước (Nguyen Phuoc Hai et al., 2006; Văn Thị Như Ngọc et al., 2007), chúng tôi đã tách dòng và biểu hiện thành công từng tiểu phần riêng rẽ của kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 (HA5-1 và HA5-2) trong *E. coli*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành biểu hiện toàn bộ kháng nguyên HA5 trong *E. coli* dưới dạng HA5-1-linker-HA5-2 (trình tự nối giữa hai tiểu phần kháng nguyên được thay thế bằng một đoạn polylinker), đồng thời tách dòng gen và biểu hiện toàn bộ cấu trúc nguyên vẹn của kháng nguyên HA5-0.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Chủng vi sinh vật: *E. coli* DH5 $\alpha$  [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 $\Delta$  lac U169 ( $\phi$ 80 lacZM15)*] được sử dụng để chọn dòng và nhân dòng gen. Chủng *E. coli* BL21 [*F-omp hsd SB (rBmB) gel dcm (DE3) physS (CamI)*] được sử dụng làm tế bào chủ cho biểu hiện gen.

Plasmid: Plasmid pCR2.1 (Invitrogen) được sử dụng làm vector tách dòng trong tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$ . Plasmid pET22trx, pET22trxhal và pET22trxha2 mang gen *ha5-1* và *ha5-2* do Phòng Kỹ thuật di truyền, Viện Công nghệ sinh học thiết kế. Vector pCRH5 mang gen *ha5* và huyết thanh gà chứa kháng thể kháng virus cúm A/H5N1 do PGS. TS. Đinh Duy Kháng, Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

### Phương pháp

#### Kỹ thuật PCR và tách dòng gen

Gen *ha5-0* được nhân lên bằng RCR với chu trình như sau: Biến tính DNA khuôn diễn ra ở 94°C trong 4 phút, sau đó thực hiện tiếp với 25 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước: Bước 1: Biến tính sợi DNA khuôn ở 94°C trong 1 phút; bước 2: Mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 55°C trong 1 phút; bước 3: Tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 8 phút và ủ mẫu ở 4°C. Khuôn DNA là dòng gen pCRH5 được tách từ hệ gen virus trong các nghiên cứu trước. Mỗi nhân gen do hãng Amersham Pharmacia Biotech tổng hợp, trong đó mỗi xuôi chứa trình tự của *NcoI* (chữ gạch chân) và mỗi ngược có trình tự của *HindIII* (chữ gạch chân) với trình tự như sau:

Mỗi *ha5-0f*: tccatggatgagaaaatagtgtcttc; Mỗi *ha5-0r*: taagcttaatgcaaatctgcattg

Các phương pháp về sinh học phân tử như cắt, nối các đoạn gen, biến nạp plasmid vào tế bào *E. coli*, điện di kiểm tra sản phẩm trên gel agarose, polyacrylamid... được tiến hành theo phương pháp chuẩn (Sambrook, Russell, 2001).

#### Thiết kế vector biểu hiện

Gen *ha5-0* được nhân lên từ dòng pCRH5 bằng cặp mỗi đặc hiệu có chứa hai trình tự của enzyme hạn chế *NcoI* và *HindIII*. Sản phẩm PCR được nối trực tiếp vào vector tách dòng pCR2.1. Trong

vector tách dòng, chúng tôi tiến hành kiểm tra và đọc trình tự gen. Sau đó gen *ha5-0* được cắt bằng hai enzyme hạn chế trên và đưa vào vector biểu hiện pET22trx để tạo thành vector pET22trxha5-0. Protein thioredoxin mã hóa từ gen *trx* giúp cho protein tái tổ hợp biểu hiện ổn định hơn và cuộn xoắn chính xác hơn, hạn chế lỗi trong quá trình cuộn xoắn. Plasmid pET22trxha5-0 được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để biểu hiện gen.

Gen *ha5-1-linker-ha5-2* (*ha5-1-2*) được thiết kế dựa trên hai dòng gen *ha5-1* và *ha5-2* đã thiết kế trong các nghiên cứu trước. Gen *ha5-2* được cắt ra từ vector pET22trxha5-2 bằng cặp enzyme hạn chế *Bam*HI và *Hind*III, đồng thời, vector pET22trxha5-1 cũng được cắt mở vòng bằng chính cặp enzyme hạn chế này. Sau khi tinh chế, các sản phẩm cắt được lai ghép với nhau và sàng lọc trong tế bào *E. coli* DH5 $\alpha$ . Dòng plasmid được lựa chọn tiếp tục biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 để nghiên cứu biểu hiện.

### Biểu hiện gen *ha5*, *ha5-1-2*

Các chủng *E. coli* BL21 mang gen *ha5*, *ha5-1-2* được nuôi cấy trong môi trường LBA đến khi OD<sub>600</sub> đạt khoảng 0,6 - 1,0. Sau đó, tế bào được cảm ứng bằng 1 M IPTG để kích thích sinh tổng hợp protein tái tổ hợp. Sau 4 h nuôi cấy trong môi trường cảm ứng, tế bào được thu lại bằng ly tâm và được hòa lại bằng đệm PBS sao cho OD<sub>600</sub> = 10. Sau đó, tế bào được phá bằng đệm phá mẫu để kiểm tra protein tổng số bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Protein pha tan được chuẩn bị bằng cách siêu âm dịch tế bào bằng máy siêu âm đến khi dịch trở nên trong, không nhớt. Ly tâm 13000 rpm trong 10 phút để thu pha protein tan. Cặn sau khi ly tâm được hòa lại trong đệm PBS với thể tích bằng thể tích trước khi ly tâm và được xử lý bằng đệm xử lý mẫu. Protein được hòa rã từ cặn là pha protein không tan.

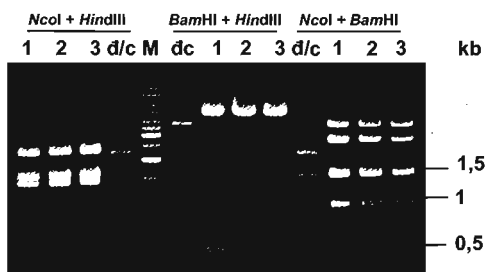
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Thiết kế vector biểu hiện gen

Bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu, gen *ha5-0* đã được khuếch đại thành công từ DNA khuôn là gen *ha5* trong vector pCRH5 theo chu trình nhiệt đã mô tả ở phần vật liệu và phương pháp. Sản phẩm PCR trên gel là một băng đặc hiệu, có kích thước khoảng 1,5 kb đúng như kích thước của gen *ha5-0* theo tính toán lý thuyết. Kết quả giải trình tự gen cho thấy, dòng gen lựa chọn có trình tự tương đồng 100% với gen *ha5-0* đã được đăng ký trên Ngân hàng gen mã số AJ867074. Dòng gen này

sau đó được chuyển vào vector biểu hiện pET22trx (kết quả không trình bày) và nghiên cứu biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21.

Bên cạnh đó, dòng gen *ha5-1-2* được thiết kế như mô tả trong phần đối tượng và phương pháp. Dòng plasmid lựa chọn được cắt kiểm tra bằng một số enzyme hạn chế (Hình 1). Kết quả trên điện di cho thấy các băng DNA thu được có kích thước đúng như tính toán lý thuyết. Trình tự DNA xác định được của dòng gen này đã khẳng định dòng plasmid lựa chọn mang gen *ha5-1-2* mong muốn.



Hình 1. Sản phẩm cắt kiểm tra các dòng plasmid tái tổ hợp pCRha5-1-2 trên gel agarose 0,8%. 1 - 3: Các dòng plasmid số 1, 2, 3 tương ứng; đ/c: Đối chứng là vector pCR2.1; M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas).

Dòng gen thu được tiếp tục chuyển sang vector pET22b(+)*trx* (kết quả không trình bày) và nghiên cứu biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21.

### Biểu hiện gen *ha5*

Các dòng *E. coli* BL21 tái tổ hợp mang plasmid pET22trx mang gen *ha5-0/pET22trxha5-1-2* được nuôi cấy ở 37°C qua đêm trong 2 ml môi trường LB có bổ xung ampicillin 100  $\mu$ g/ml (LBA). Tế bào sau đó được cấy chuyển sang môi trường LBA mới sao cho mật độ tế bào ban đầu đạt OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,1 và được nuôi tiếp ở cùng điều kiện cho đến khi OD<sub>600</sub> đạt khoảng từ 0,5 đến 0,8 (pha log). Protein tái tổ hợp được cảm ứng biểu hiện bằng IPTG nồng độ 1 mM, ở nhiệt độ 30°C trong khoảng thời gian là 4 h. Protein tổng số thu được từ dịch chiết tế bào biểu hiện được kiểm tra trên SDS-PAGE. Kết quả được trình bày trên hình 2 và 3.

Kết quả trên hình 2 và 3 cho thấy, trên đường chạy của các dòng tế bào mang plasmid tái tổ hợp xuất hiện một protein lạ có kích thước khoảng 66 kDa, tương đương với kích thước dự đoán của protein HA5 dung hợp với thioredoxin theo tính toán lý thuyết. Mức độ tổng hợp của cả HA5-0 và HA5-1-

2 là không cao, tuy nhiên, HA5-1-2 được tổng hợp mạnh hơn (chiếm 5% protein tổng số) so với HA5-0 (chiếm 1,5% protein tổng số). Trong các nghiên cứu trước đây (Nguyễn Phước Hải *et al.*, 2006; Văn Thị Như Ngọc *et al.*, 2007), khi kháng nguyên HA5 được biểu hiện thành 2 tiểu phần riêng rẽ HA5-1 và HA5-2, mức độ biểu hiện của kháng nguyên tăng lên đáng kể, chiếm từ 15 - 18% protein tổng số của tế bào. Do đó, mức độ biểu hiện thấp hơn của các kháng nguyên tái tổ hợp trong nghiên cứu này có thể một phần được giải thích do kích thước lớn hơn của kháng nguyên. Ngoài ra, tỷ lệ cao của mã hiếm trong gen *ha5*, tế bào chủ không nhận biết được do đó dẫn đến mức độ biểu hiện. Trong nghiên cứu của Deltino và đồng tác giả (1995) cũng thu được kết quả biểu hiện rất thấp khi đưa gen *hal-0* vào biểu hiện trong *E. coli*. Trong nghiên cứu này, khi gen *ha5* được biểu hiện dưới dạng dung hợp với thioredoxin mức độ biểu hiện gen đã được cải thiện, đặc biệt khi đoạn peptide nối hai tiểu phần kháng nguyên được loại bỏ. Các chủng tái tổ hợp được khảo sát biểu hiện ở các điều kiện lên men khác nhau nhằm thu được đủ lượng kháng nguyên cho các nghiên cứu tiếp theo.

### Tối ưu điều kiện biểu hiện gen

#### Nhiệt độ lên men

Tế bào *E. coli* sinh trưởng tối ưu ở 37°C, tuy nhiên trong quá trình biểu hiện gen, tế bào *E. coli* tái tổ hợp thường được nuôi cấy ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ này (Davis *et al.*, 1983; Nguyễn Phước Hải *et al.*, 2006; Văn Thị Như Ngọc *et al.*, 2007). Về mặt nguyên lý, điều này được giải thích là khi sinh trưởng ở nhiệt độ tối thích protein ngoại lai do được điều khiển bởi promotor mạnh sẽ được tổng hợp ở một lượng rất lớn trong một thời gian ngắn. Trong khi đó, các thành phần protein khác tham gia vào các cấu trúc bậc cao hơn của protein lại không được tổng hợp với tốc độ tương ứng, do đó ảnh hưởng đến cấu trúc thứ cấp của protein ngoại lai và thông thường làm cho protein được tổng hợp ra dưới dạng không tan, có hoạt tính thấp hoặc thậm chí mất hoạt tính. Đồng thời, 37°C là nhiệt độ tối thích cho các protease nội bào hoạt động, do đó các protein ngoại lai sẽ bị phân cắt sau khi tổng hợp, ảnh hưởng đến hiệu suất biểu hiện và chất lượng protein.

Trong thí nghiệm này, để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đối với quá trình tổng hợp kháng nguyên HA5-0 và HA5-1-2 tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành nuôi cấy cảm ứng ở các nhiệt độ 22, 25, 30 và 37°C. Sau 4 h nuôi cấy cảm ứng, tế bào được thu lại để kiểm tra mức độ biểu hiện và tính chất của protein

tái tổ hợp. Dịch chiết và phần cặn tế bào được kiểm tra trên SDS-PAGE. Kết quả trình bày trên hình 4.

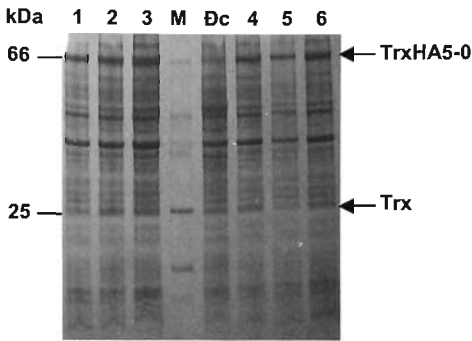
Kết quả cho thấy, mức độ biểu hiện TrxHA5-0 của tế bào tăng lên khi được nuôi cấy cảm ứng ở nhiệt độ cao hơn, ở 30°C protein ngoại lai được tổng hợp nhiều nhất. Tuy nhiên, khả năng tan của TrxHA5-0 tái tổ hợp lại tăng lên khi nhiệt độ nuôi cấy cảm ứng giảm. Ở 22°C, tỷ lệ tan của protein là trên 70%, trong khi đó tỷ lệ này chỉ còn khoảng 50% ở 30°C. Ở 25°C, TrxHA5-0 tái tổ hợp được tổng hợp ở mức độ tương đối cao với tỷ lệ protein tan khoảng 70%.

Thí nghiệm tiến hành tương tự đối với dòng tế bào mang plasmid pET22trxha5-1-2. Kết quả thu được (Hình 5) cho thấy, protein TrxHA5-1-2 cũng được tổng hợp tốt và có tỷ lệ tan cao ở 25°C.

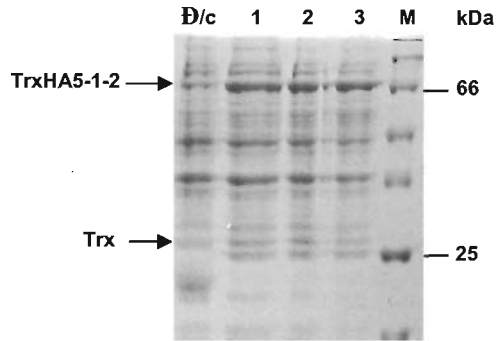
Theo các nghiên cứu của Davis và đồng tác giả (1981, 1995), khi được biểu hiện dưới dạng dung hợp với protein Trp, toàn bộ protein TprH1-0 được tổng hợp trong tế bào *E. coli* tồn tại ở dạng không tan. Protein này chỉ tan một phần rất nhỏ khi được biến tính trong dung dịch đệm Tris chứa Urê với nồng độ 8 M. Trong nghiên cứu này, protein dung hợp TrxHA5-0 và TrxHA5-1-2 được tổng hợp với tỷ lệ tan cao hơn nhiều so với các nghiên cứu trước đây. Đồng thời, khi đoạn peptide dung hợp được loại bỏ, TrxHA5-1-2 tái tổ hợp có tỷ lệ tan cao hơn so với TrxHA5-0.

#### Nồng độ chất cảm ứng IPTG

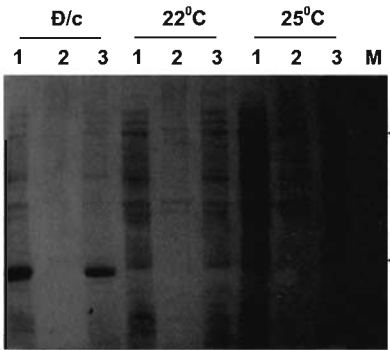
Protein ngoại lai được điều khiển tổng hợp bởi promotor T7 trên vector pET22trx. Promoter này được cảm ứng bởi sự có mặt của IPTG trong môi trường nuôi cấy. Nồng độ chất này ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein ngoại lai của tế bào, ở nồng độ quá cao nó gây độc cho tế bào, trong khi ở nồng độ quá thấp protein ngoại lai thường được tổng hợp kém. Chúng tôi tiến hành khảo sát lên men các chủng tái tổ hợp ở các nồng độ IPTG là 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 và 2 mM với nhiệt độ cảm ứng là 25°C. Protein tổng số được kiểm tra bằng SDS-PAGE 12,6%. Kết quả thu được trên hình 6 cho thấy, khi không có mặt IPTG trong môi trường, TrxHA5-0 và TrxHA5-1-2 tái tổ hợp không được tổng hợp trong tế bào. Tuy nhiên, khi môi trường được bổ xung IPTG thì nồng độ chất này không ảnh hưởng nhiều đến mức độ tổng hợp protein ngoại lai, lượng protein tái tổ hợp thu được là gần tương đương nhau ở các nồng độ chất cảm ứng khác nhau. Đây là một trong những yếu tố góp phần làm giảm chi phí khi mở rộng quy mô biểu hiện trong bình tam giác lớn hơn và trong nồi lên men.



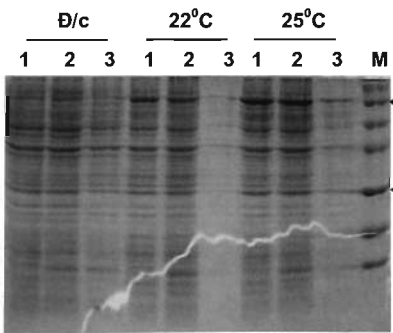
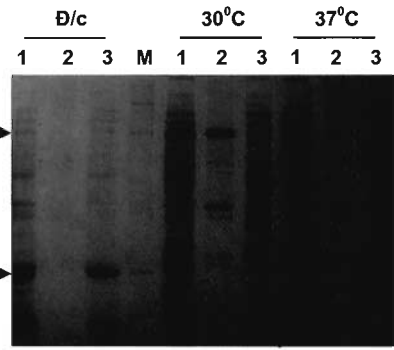
**Hình 2.** Protein tổng số từ các dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22trxha5-0 trên SDS-PAGE 12,6%. 1 - 6: Các dòng tế bào tái tổ hợp; Đ/c: dòng tế bào đối chứng chỉ mang vector pET22trx; M: Thang protein chuẩn (Fermentas).



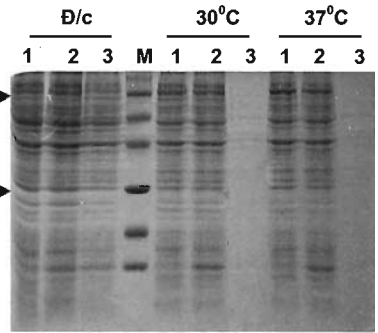
**Hình 3.** Protein tổng số từ các dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22trxha5-1-2 trên SDS-PAGE 12,6%. 1 - 3: Các dòng-tế bào tái tổ hợp; Đ/c: dòng tế bào đối chứng chỉ mang vector pET22trx; M: Thang protein chuẩn (Fermentas).

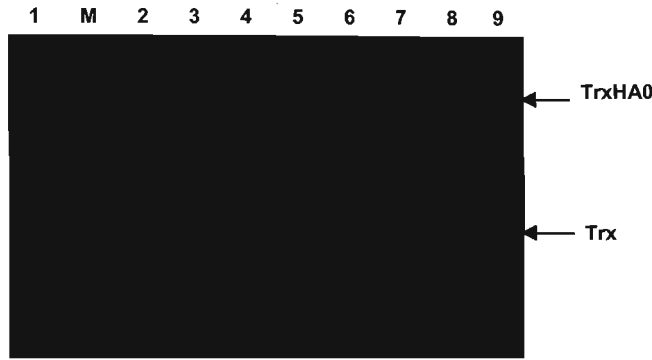


**Hình 4.** Protein từ các dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22trxha5-0 được nuôi cấy cảm ứng ở các nhiệt độ khác nhau trên SDS-PAGE 12,6%. 1: Protein tổng số; 2: Protein không tan; 3: Protein tan; M: Thang protein chuẩn (Fermentas). Đ/c: Dòng tế bào mang plasmid pET22trx.

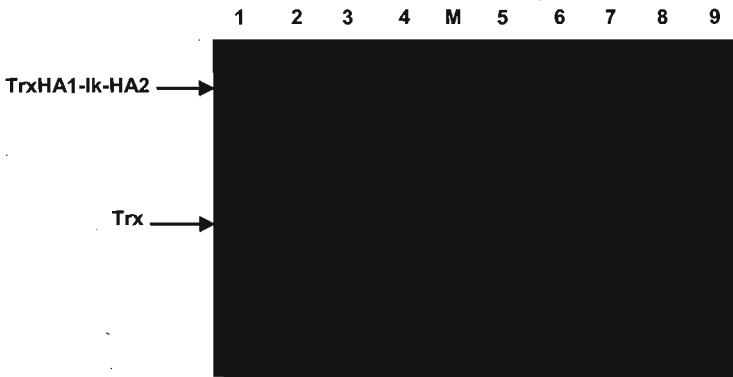


**Hình 5.** Protein tái tổ hợp từ các dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22trxha5-1-2 được nuôi cấy cảm ứng ở các nhiệt độ khác nhau trên SDS-PAGE 12,6%. 1: Protein tổng số; 2: Protein không tan; 3: protein tan; M: Thang protein chuẩn (Fermentas). Đ/c: Dòng tế bào mang plasmid pET22trx.





**Hình 6.** Protein tổng số từ các dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22trxha5-0 được nuôi cấy ở các nồng độ chất cảm ứng khác nhau trên SDS-PAGE 12,6%. 1 - 9: Nồng độ chất cảm ứng IPTG tương ứng là: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 và 2 mM. M: Thang protein chuẩn (Fermentas).



**Hình 7.** Protein tổng số từ các dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22trxha5-1-2 được nuôi cấy ở các nồng độ chất cảm ứng khác nhau trên SDS-PAGE 12,6%. 1 - 9: Nồng độ chất cảm ứng IPTG tương ứng là: 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 và 2 mM. M: Thang protein chuẩn (Fermentas).

**KẾT LUẬN**

Như vậy, gen *ha5* đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL 21 ở dạng dung hợp với thioredoxin và dưới hai thiết kế khác nhau là *ha5-0* và *ha5-1-2*. Việc loại bỏ đoạn peptide dung hợp giữa hai tiểu phần của kháng nguyên HA5 giúp cho tế bào tăng khả năng biểu hiện gen cũng như làm tăng tỷ lệ protein tan được tổng hợp. Kết quả này là cơ sở để chúng tôi tiến hành thiết kế đưa gen vào biểu hiện trong tế bào nấm men *P. pastoris*.

**Lời cảm ơn:** Bài báo được thực hiện bằng kinh phí đề tài: “Nghiên cứu sản xuất vaccine tái tổ hợp phòng bệnh cúm gia cầm bằng kỹ thuật biểu hiện

gen mã hóa kháng nguyên HA của chủng virus cúm A/H5N1 Việt Nam trong nấm men *Pichia pastoris*.” do Viện Thú y chủ trì và Dự án thuộc Quỹ nghiên cứu Việt Nam - Thụy Điển cấp cho PGS. TS. Trương Nam Hải. Dòng gen pCRh5 sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi PGS. TS. Đinh Duy Kháng. Công trình được thực hiện nhờ trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Bridges CB, Harper SA, Fukuda K, Uyeki TM, Cox NJ, Singleton JA (2002) Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on

Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 51(RR-3): 1-31

Davis AR, Nayak DP, Ueda M, Hiti AL, Dowbenko D, Kleid DG (1981) Expression of antigenic determinants of the hemagglutinin gene of a human influenza virus in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(9): 5376-5380.

Davis AR, Bos T, Ueda M, Nayak DP, Dowbenko D, Compans RW (1983) Immune response to human influenza virus hemagglutinin expressed in *Escherichia coli*. *Gene* 21(3): 273-84.

Deltito BJ, Ward JM, Hodgson J, Gershater CJL, Edwards H, Wysocki LA, Watson FA, Sanesh S, Kan JF (1995) Effect of a minor isoleucyl tRNA on heterologous protein translation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177(24): 7086-7091.

Ghendon YZ, Markushin SG, Akopova II, Koptiaeva IB, Nechaeva EA, Mazurkova LA, Radaeva IF, Kolokoltseva TD (2005) Development of cell culture (MDCK) live cold-adapted (CA) attenuated influenza vaccine. *Vaccine* 23(38): 4678-4684.

Jabbar MA, Sivasubramanian N, Nayak DP (1985) Influenza viral (A/WSN/33) hemagglutinin is expressed and glycosylated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2019-2023.

Karasev AV, Foulke S, Wellens C, Rich A, Shon KJ, Zwierzynski I, Hone D, Koprowski H, Reitz M (2005) Plant based HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach. *Vaccine* 23(15): 1875-1880.

Kistner O, Howard MK, Spruth M, Wodal W, Brühl P, Gerencer M, Crowe BA, Savidis-Dacho H, Livey I, Reiter M, Mayerhofer I, Tauer C, Grillberger L, Mundt W, Falkner FG, Barrett PN (2007) Cell culture (Vero) derived whole virus (H5N1) vaccine based on wild-type virus strain induces cross-protective immuneresponses. *Vaccine* 25(32): 6028-6036.

Laemmli EK (1970) Cleavage of structure proteins during assembly of the heat of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Nayak DP, Davis AR, McQueen NL, Bos TJ, Jabbar MA, Sivasubramanian N, Lionelli G (1985) Biological and immunological properties of haemagglutinin and neuraminidase expressed from cloned cDNAs in prokaryotic and eukaryotic cells. *Vaccine* 3(3 Suppl): 165-171.

Nguyễn Phước Hải, Văn Thị Như Ngọc, Nguyễn Thanh Nhân, Trần Ngọc Tân, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải (2006) Biểu hiện gen *ha2* mã hóa tiểu phần kháng nguyên hemagglutinin (HA) của virus cúm A/H5N1 trong *Escherichia coli*. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 4(3): 297-302.

Nwe N, He Q, Damrongwatanapokin S, Du Q, Manopo I, Limlamthong Y, Fenner BJ, Spencer L, Kwang J (2006) Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system

significantly enhanced by suspension culture. *BMC Microbiol* 24: 6-16.

Pau MG, Ophorst C, KoldijkMH, Schouten G, Mehtali M, Uytdehaag F (2001) The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* 19(17-19): 2716-2721.

Potter CW (1998) Chronicle of influenza pandemics. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ, editors. *Textbook of influenza*. Malden: Blackwell Scientific Publication: 3-18

Rong J, Jiang T, Cheng T, Shen M, Du Y, Li S, Wang S, Xu B, Fan G (2007) Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens. *Vaccine* 25(46): 7900-7908.

Ross TM, Xu Y, Bright RA, Robinson HL (2000) C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nature Immunity* 1(2): 127-131.

Saelens X, Vanlandschoot P, Martinet W, Maras M, Neiryck S, Contreras R, Fiers W, Jou WM (1999) Protection of mice against a lethal influenza virus challenge after immunization with yeast-derived secreted influenza virus hemagglutinin. *Eur J Biochem* 260: 166-175.

Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2nd ed*. Cold Spring Harbor Press, NY.

Simonsen L, Fukuda K, Schonberger LB, Cox NJ (2000) The impact of influenza epidemics on hospitalizations. *J Infect Dis* 181(3): 831-837.

Skehel JJ, Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69: 531-569.

Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Cox N, Anderson LJ, Fukuda K (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 289(2): 179-186.

Treanor JJ, Schiff GM, Couch RB, Cate TR, Brady RC, Hay CM, Wolff M, She D, Cox MM (2006) Dose-related safety and immunogenicity of a trivalent baculovirus-expressed influenza virus hemagglutinin vaccine in elderly adults. *J Infect Dis* 193: 1223-1225.

Văn Thị Như Ngọc, Đỗ Thị Huyền, Nguyễn Thanh Nhân, Nguyễn Phước Hải, Trương Văn Dung, Trương Nam Hải (2007) Biểu hiện gen *ha5-1* mã hóa tiểu phần kháng nguyên Hemagglutinin (HA) của virus cúm A/H5N1 trong *Escherichia coli*. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 5(3): 313-320.

Webster DE, Thomas MC, Huang Z, Wesselingh SL (2005) The development of a plantbased vaccine for measles *Vaccine* 23(15): 1859-1865.

Williamson ED, Flick-Smith HC, Lebutt C, Rowland CA, Jones SM, Waters EL, Gwyther RJ, Miller J, Packer PJ, Irving M (2005) Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens *Infect*

*Immun* 73(6): 3598-3608.

Wright P, Webster RG (2001) Orthomyxoviruses. In: Knipe H, Griffin, Marton, Lamb, Roizman, editors. *Fields virology*, vol. 1. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins: 1533-1578.

Yi-Ming Xu, Ning-Yi JIN, Zhi-Ping XIA, Ming-Xiao MA,

Hui-Jun LU, Song HAN, Kuo-Shi, Guo-Dong LIANG (2006) Expression of AIV subtype H5HA, H7HA and H9NA hemagglutinin gene in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech* 22(2): 231-236.

[http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2008\\_05\\_28/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_05_28/en/index.html)

## EXPRESSION OF HA5 GEN CODING FOR HEMAGGLUTININ (HA) ANTIGEN OF INFLUENZA VIRUS A/H5N1 IN *ESCHERICHIA COLI*

Do Thi Huyen<sup>1</sup>, Bui Hong Van<sup>3</sup>, Van Thi Nhu Ngoc<sup>1</sup>, Truong Van Dung<sup>2</sup>, Truong Nam Hai<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology*

<sup>2</sup>*Institute of Veterinary Research*

<sup>3</sup>*Natural Science University, Hanoi*

### SUMMARY

Influenza virus is a highly contagious and acute respiratory disease with a high degree of morbidity and mortality. The highly pathogen subtype of H5N1 is currently circulating throughout many countries in the world. In this research, we studied on expression of the *ha5-0* gene coding for hemagglutinin of avian influenza A/H5N1 in *E. coli* BL21 cell. The *ha5-0* gene was fused with *trx* gene coding for Thioredoxin in pET22 $_{trx}$  and was constructed in two different forms: 1) The whole native *ha5-0* gene except codon ATG and signal peptide; 2) Replaced the cleavage site between HA1 and HA2 by the artificial polylinker (*ha5-1-2*). The expression of recombinant strains harbouring gene *ha5-0* or *ha5-1-2* was studied in LB medium with the addition of ampicillin and IPTG. The effects of concentration of induction factor IPTG (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,5 and 2 mM) and temperature (22, 25, 28, 30, and 37°C) were investigated. The obtained results have showed that, the fusion protein of TrxHa5-0 and TrxHa5-1-2 with the molecular mass of 66 kDa were synthesized successfully in *E. coli* BL21 cells at 25°C with the regulation of T7 promoter which is induced by IPTG. These recombinant proteins were not observed when IPTG was not added into the medium and it was synthesized when IPTG was added even with a very low concentration (0.05 mM). However, the expression level was not increased linearly with the increasing of concentration of IPTG. Interestingly, TrxHa5-1-2 was expressed at the higher level and higher proportion of soluble form in compare with TrxHa5-0. The solubility of TrxHa5-1-2 was over 70% as expressing at the temperature of 25°C. This gene construct will be integrated into the genome of *P. pastoris* in order to create a sub unit vaccine protect poultry against influenza virus.

**Keywords:** *E. coli* BL21, *ha5-1*, pET22-*trx*, recombinant protein, sub-unit vaccine

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562790; Fax: 84-4-38363144; E-mail: [tnhai@hn.vnn.vn](mailto:tnhai@hn.vnn.vn)