

BIỂU HIỆN VÀ TÍNH SẠCH PROTEIN M CỦA VIRUS PRRS GÂY BỆNH LỢN TẠI XANH BÀNG CÔNG NGHỆ BIỂU HIỆN TẠM THỜI TRONG LÁ THUỐC LÁ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Nguyễn Thị Minh Hằng^{1,2}, Hồ Thị Thương¹, Nguyễn Thu Giang¹, Phạm Thị Vân¹, Phạm Bích Ngọc¹, Nguyễn Trung Nam¹, Chu Hoàng Hà¹✉

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

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

Ngày nhận bài: 07.9.2016

Ngày nhận đăng: 26.9.2017

TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) do virus PRRS gây ra đã và đang gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành chăn nuôi ở nhiều quốc gia trên thế giới. Protein M là protein cấu trúc bảo thủ nhất của virus PRRS (PRRSV) và không bị glycosyl hóa. Protein M là yếu tố kích thích việc sản sinh kháng thể trung hòa trong miễn dịch dịch thể ở lợn. Trong nghiên cứu này, đoạn gen mã hóa cho protein M của chủng virus gây Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (VN07196) được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn là plasmid pGEM-PRRS (VN07196) với cặp mồi đặc hiệu, được gắn kết với promoter 35S, Histag và Cmyc, ELP, nhân dòng trong vector pRTRA và thiết kế vào cấu trúc vector chuyển gen thực vật pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP. Protein M được biểu hiện trong mô lá cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện gen tạm thời nhờ *Agrobacterium tumefaciens*, protein M gắn ELP được tinh sạch bằng phương pháp mITC đạt hiệu suất 2,1% trên tổng số protein hòa tan, 208 mg/kg lá tươi, hiệu suất thu hồi là 86,5%. Kết quả này góp phần chứng minh sự thành công của thí nghiệm biểu hiện tạm thời kháng nguyên M của PRRSV trong mô lá thuốc lá *N. benthamiana*. Đây là cơ sở khoa học quan trọng để tiến hành biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên M ở quy mô lớn nhằm sản xuất vaccine tiểu đơn vị phòng chống PRRSV.

Từ khoá: Biểu hiện tạm thời, ELP, *Nicotiana benthamiana*, protein M, PRRSV, tinh sạch protein

MỞ ĐẦU

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) do virus PRRS gây ra đã và đang gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành chăn nuôi ở nhiều quốc gia trên khắp thế giới. PRRSV gây thiệt hại khoảng 664.000.000 USD/năm cho người sản xuất thịt lợn ở Hoa Kỳ (Holtkamp *et al.*, 2011). PRRSV cũng gây thiệt hại lớn cho ngành công nghiệp chăn nuôi ở nhiều quốc gia khác như Canada, Mexico, Úc, Nam Mỹ, Đông Âu, Bắc Âu và nhiều nước châu Á. Tại Việt Nam, thống kê đến tháng 6/2012 có 33.778 con lợn bị nhiễm bệnh, 21.708 con lợn bị tiêu hủy và năm 2013, có 18.452 con bị tiêu hủy. Từ 2013 đến nay, dịch vẫn bùng phát mạnh ở nhiều tỉnh, thành trong cả nước. Năm 2013, từ các mầm bệnh thu được tại các ổ dịch, qua xét nghiệm là virus PRRS nhóm

II, có tính tương đồng cao với các chủng gây bệnh tại Trung Quốc, là một chủng mới đột biến gần đây. Sự xuất hiện của chủng virus PRRS mới làm cho virus có độc lực mạnh hơn đồng thời làm mất tính bảo hộ của các vaccine đang được sử dụng (Feng *et al.*, 2008).

PRRSV thuộc loại Arterivirus, họ Arteriviridae và bộ Nodovirales. Genome là sợi sRNA đơn dương, dài 15.000 bp với 9 khung đọc mở (ORFs) (Fang, Snijder, 2010). Trong đó, gen *gp5*, *m* mã hoá glycoprotein và protein màng là 2 protein được dùng để thiết kế vaccine tiểu đơn vị chống lại sự xâm nhiễm của PRRSV. Các nghiên cứu phát triển vaccine chống lại PRRSV đã được ghi nhận trong hai thập kỷ qua. Việc thiết kế vacxin tiểu đơn vị, tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể là đặc biệt quan trọng vì cả hai cơ chế này đều liên quan đến việc bảo vệ chống lại virus. Protein M là protein cấu

trúc bảo thủ nhất của virus và không bị glycosyl hóa. Ở các hạt virus, GP5 liên kết với protein M bằng cầu disulfit giúp cho việc lắp ráp và lây nhiễm của virus. Như vậy, protein M được biết như yếu tố kích thích việc sản sinh kháng thể trung hòa ở lợn và đây là một vấn đề then chốt của miễn dịch dịch thể. Một số hướng phát triển các loại vaccine chống PRRSV khác nhau đã được triển khai như vacxin DNA (Hou *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2006b), virus vector pseudorabies biểu hiện GP5 (Qiu *et al.*, 2005), adenovirus biểu hiện GP5/M (Jiang *et al.*, 2006a), pseudotype baculovirus biểu hiện GP5/M (Wang *et al.*, 2007), virus vaccinia biểu hiện GP5/M (Zheng *et al.*, 2007) và cây thuốc lá biểu hiện GP5 (Chia *et al.*, 2010).

Công trình này thông báo kết quả nghiên cứu thiết kế vector chuyển gen thực vật mang gen mã hoá protein M của chủng virus PRRS (VN07196) và biểu hiện trong mô lá cây thuốc lá bằng phương pháp biểu hiện gen tạm thời (Agroinfiltration), làm cơ sở cho việc sản xuất vaccine tiểu đơn vị.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn

Bảng 1. Trình tự mỗi sử dụng trong nghiên cứu

| STT | Tên môi | Trình tự (5'-3') |
|--|-----------|---------------------------------|
| <i>I. Môi dùng trong khuếch đại gen m có gắn thêm các vị trí cắt của enzyme giới hạn BamHI</i> | | |
| 1 | M-BamHI F | AGT TGG ATC CGG AAC TAT GGG GTC |
| 2 | M-BamHI R | AGG GAT CCT TTG GCA TAT TTA AC |
| <i>II. Môi dùng trong giải trình tự gen m trên vector pRTRA</i> | | |
| 1 | 35S-SQF | CACTGACGTAAGGGATGACGC |
| 2 | 35STerm | CTGGGAAGTACTCACACA |

Phương pháp

Nhân dòng gen mã hoá protein M của virus PRRS

Đoạn gen M được khuếch đại bằng PCR sử dụng khuôn là plasmid pGEM-PRRS (VN07196) với cặp môi M-BamHI F và M-BamHI R (Bảng 1). Thành phần phản ứng PCR: 50 µl hỗn hợp, gồm 0,3 µM primers, 0,2 µM dNTPs, 2,5U Pwo SuperYield DNA polymerase, 5 µl đệm 10X Pwo SuperYield PC và 20 ng khuôn. Chu trình PCR: 94°C/ 3 phút; 32 chu kỳ lặp lại các bước 94°C/ 30 giây, 55°C/ 50 giây,

72°C/ 1 phút; 72°C/ 10 phút, sản phẩm được giữ ở 4°C, điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Sản phẩm PCR nhân gen M thu được và plasmid pRTRA 35S-TBAG-100xELP tinh sạch được phân cắt bằng BamHI. Đoạn gen m được ghép nối vào vector pRTRA tạo plasmid tái tổ hợp và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α, chọn dòng khuẩn lạc trên môi trường có bổ sung kháng sinh chọn lọc. Plasmid được tách chiết và giải trình tự sử dụng cặp môi đặc hiệu trong Bảng 1. Các trình tự nucleotide được phân tích bằng phần mềm BioEdit 7.0 và Lasergen 7 (DNASTarinc, Madison, WI, USA).

Các vector và vật liệu thực vật

Trình tự 100xELP trong vector pRTRA được tổng hợp và mô tả bởi Scheller và đồng tác giả (2004). Vector pRTRA-35S-H5-100xELP (Hoang, 2012) được thiết kế từ vector gốc pRTRA35S-TBAG-100xELP của Floss *et al.*, (2010a). Vector chuyển gen pCB301-Kan (dựa vào pCB301 của Xiang và đồng tác giả, 1999), plasmid mang gen m của virus PRRS chủng Việt Nam, ký hiệu pGEM-PRRS (VN07196) và cây thuốc lá *N. benthamiana* do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Các cặp môi sử dụng

Các cặp môi sử dụng để khuếch đại và giải trình tự gen m trong nghiên cứu này được thiết kế dựa trên trình tự gen m và được tổng hợp bởi công ty IDT (Integrated DNA Technologies), Hoa Kỳ (bảng 1).

Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen m của PRRSV phục vụ chuyển gen

Vector pRTRA tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên M và vector pCB301 được phân cắt bằng *Hind*III, sản phẩm cắt (M/ELP) được ghép nối vào khung vector pCB301 và được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Tiến hành chọn dòng khuẩn lạc trên môi trường thạch LB có 50 mg/l Kanamycin bằng colony-PCR. Plasmid tái tổ hợp pCB301-M/ELP được cắt kiểm tra bằng enzyme *Nco*I, sau đó được biến nạp vào *A. tumefaciens* C58C1 bằng phương pháp xung điện theo quy trình của Mersereau *et al.*, (1990) để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời protein ở thực vật.

Biểu hiện tạm thời protein tái tổ hợp trong mô lá thuốc lá *N. benthamiana*

Khuẩn lạc của chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301M/ELP và chủng mang vector chứa gen mã hóa cho protein Hc-pro hỗ trợ biểu hiện gen ở thực vật được nuôi trong môi trường YEB có bổ sung kháng sinh chọn lọc (50 μ g/ml Caberimicin 50 μ g/ml, Rifamicin và 100 μ g/ml Kanamycin). Vi khuẩn được nuôi lắc 200 rpm/phút, 16-18 giờ ở 28°C. Tiếp tục nuôi tăng sinh khối vi khuẩn đến thể tích cần thiết và có OD₆₀₀ đạt 0,5-1. Khuẩn được thu nhận bằng ly tâm 5000 rpm/phút, 15 phút ở 4°C. Cặn khuẩn của 2 chủng hòa tan trong đệm MES (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5,6) có giá trị OD₆₀₀ đạt 0,8-1 và được trộn với nhau theo tỷ lệ 1:1. Dịch huyền phù vi khuẩn được dùng cho biến nạp vào lá cây thuốc lá bằng phương pháp hút chân không trong thời gian 1,5 phút, 27 inches, 0 atm. Các cây thuốc lá sau khi biến nạp được tiếp tục nuôi và chăm sóc trong buồng sinh trưởng có điều kiện ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm phù hợp. Lá cây thuốc lá được thu hoạch sau 6 ngày biến nạp và bảo quản ở -80°C để tách chiết protein.

Kiểm tra sự biểu hiện của protein M bằng phản ứng Western blot

Mẫu lá thuốc lá được nghiền mịn, hòa tan trong đệm mẫu SDS (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0,1% (w/v) Bromophenolblue, 10% (v/v) Glycerol, pH 6,8), biến tính mẫu ở 95°C trong 10 phút, điện di ở 100V, 20mA trong 3 giờ; 10-30 μ g protein sau khi được phân tách bằng điện di SDS-PAGE (10% polyacrylamide), sau đó chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter (Thermoscientific) ở 25V, 1.3A trong 20 phút. Blocking màng bằng sữa tách béo 5% trong 5 giờ, màng tiếp tục được ủ với kháng thể qua đêm, ủ màng

với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 2 giờ. Phát hiện sự có mặt của protein M trong dung dịch hiện màu có chứa cơ chất DAB (Diaminobenzidine) trong 15 phút (Phan, 2012).

Tinh sạch protein M

Tối ưu nồng độ PEG trong quá trình tinh sạch

PEG (polyethylene glycol) được sử dụng nhằm kết tủa những protein tạp mà không làm mất protein mục tiêu. Khoảng 10 g lá được nghiền trong nitor lỏng, bổ sung 60 ml Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) lạnh, ly tâm ở 13.000 rpm, 30 phút, ở 4°C. PEG được bổ sung ở dải nồng độ (2% - 12%) vào 2 ml dịch chiết lá thực vật. Dịch chiết lá sau đó được ly tâm ở 13.000 v/p, trong 30 phút, ở 4°C. Dung dịch được biến tính và kiểm tra bằng Western blot.

Tinh sạch protein M tái tổ hợp có gắn ELP bằng phương pháp mITC (Membrane-based inverse transition cycling)

Nghiền nhỏ 100g lá tươi trong nitor lỏng, bổ sung 200 ml Tris-HCl 50 mM (pH8.0) lạnh, ly tâm 25000 v/p trong 30 phút ở 4°C, bổ sung NaCl đến nồng độ 2M. Dung dịch được ly tâm ở 15.000 v/p trong 30 phút, ở 4°C. Dung dịch sau ly tâm được đưa qua màng polyethersulfone (PES) 0,22 μ m ở 4°C, thu dịch chiết trước xử lý. Dịch chiết được làm ấm đến nhiệt độ phòng và lọc qua màng cellulose acetate 0,2 μ m, màng được rửa 2 lần bằng NaCl 2M để loại protein lẫn. Nước Milipore-Q lạnh được chuyển qua màng lọc để thu hồi protein mục tiêu gắn ELP (Phan, 2012).

Phương pháp tính hiệu suất thu hồi protein tinh sạch

Hiệu suất thu hồi protein tinh sạch là tỷ lệ phần trăm giữa lượng protein tinh sạch thu được và lượng protein đích có trong dịch chiết thực vật ban đầu theo tính toán lý thuyết. Lượng protein đích có trong dịch chiết thực vật ban đầu và lượng protein tinh sạch thu được sau quá trình tinh sạch được tính toán và định lượng bằng Bradford và Western blot sử dụng protein chuẩn (Single-chain fragment variable-ScFv-cmyc).

Phương pháp tính độ tinh sạch của protein

Độ tinh sạch của protein được tính dựa trên tỷ lệ phần trăm giữa lượng protein tinh sạch thực tế (được định lượng dựa vào Western blot sử dụng protein chuẩn (Single-chain fragment variable-ScFv-cmyc) và lượng protein tinh sạch lý thuyết (được đo bằng Bradford assay).

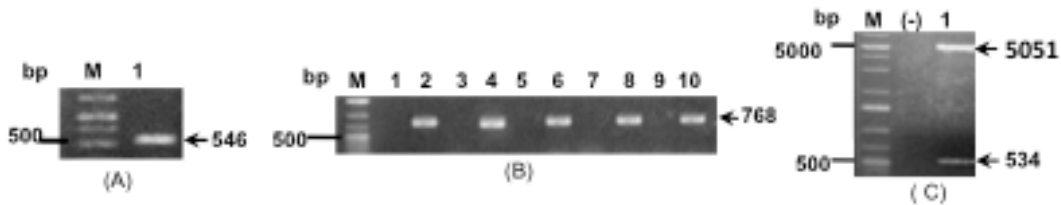
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector tách dòng pRTRA tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên M gắn kết Elastin like-polypeptide (M-ELP)

Khuếch đại gen mã hóa protein M của PRRSV (Hình 1A) cho thấy đã thu được phân đoạn DNA đặc hiệu với kích thước 0,54 kb (546 bp) bao gồm 534 bp trình tự gen mã hóa cho kháng nguyên M và đoạn trình tự enzyme cắt giới hạn *Bam*HI (12 bp). Chọn dòng tế bào *E. coli* bằng colony-PCR (Hình 1B) thu được các đoạn DNA có kích thước 768 bp. Kết quả này phù hợp với tính toán ban đầu, phân đoạn DNA 768 bp bao gồm gen mã hóa protein M

(534 bp) và một đoạn promoter (234 bp). Kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI (Hình 1C) thu được các phân đoạn DNA có kích thước 5051 bp và 534 bp. Kích thước của các phân đoạn này trùng với kích thước tính toán lý thuyết của vector pRTRA35S-100xELP là 5051 bp và của gen *m* là 534 bp.

Kết quả giải trình tự plasmid pRTRA35S-M-Histag-Cmyc-100xELP sử dụng cặp mồi 35S-SQF/35STerm cho thấy đã tách dòng và gắn kết thành công gen mã hóa protein M của PRRSV với promoter 35S, Elastin like-polypeptide (ELP), Cmyc và His-tag (Hình 2).



Hình 1. Thiết kế vector tái tổ hợp pRTRA 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP; (A) PCR nhân gen mã hóa protein M-PRRSV; M: marker 1 kb; 1: sản phẩm PCR chứa gen mã hóa kháng nguyên M; (B) Colony-PCR chọn dòng; M: marker 1 kb; 1: Đối chứng âm; 2-10: Sản phẩm PCR chứa gen mã hóa protein M. (C) Sản phẩm cắt pRTRA 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP bằng *Bam*HI; (-): Đối chứng âm; 1: sản phẩm cắt plasmid.

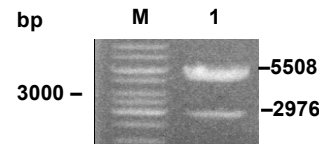


Hình 2. Sơ đồ cấu trúc biểu hiện mang gen mã hoá protein M gắn kết ELP.

Thiết kế vector chuyển gen tái tổ hợp mang gen mã hóa kháng nguyên M - ELP

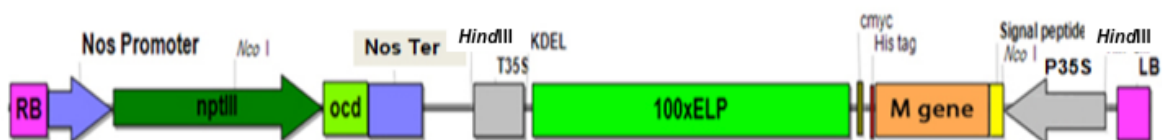
Plasmid pRTRA35S-M-Histag-Cmyc-100xELP và vector pCB301 được xử lý bằng enzyme *Hind*III thu được phân đoạn gồm cấu trúc 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP có kích thước 2976 bp, khung vector pCB301 mở vòng có kích thước khoảng 5,6 kb. Khung vector pCB301 được ghép nối với cấu trúc 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP tạo vector chuyển gen pCB30135S-M-Histag-Cmyc-100xELP. Kiểm tra vector chuyển gen mang cấu trúc biểu hiện bằng enzyme giới hạn *Hind*III (Hình 3) đã thu được hai phân đoạn DNA với kích thước của khung vector pCB301 5,6 kb và phân đoạn có kích thước 2,976 kb

là kích thước của cấu trúc biểu hiện đúng theo tính toán lý thuyết.



Hình 3. Kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pCB301 tái tổ hợp bằng enzyme cắt giới hạn *Hind*III; M: Marker 1 kb; 1: Sản phẩm cắt plasmid pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP.

Vector chuyển gen pCB301 mang cấu trúc biểu hiện 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP đảo chiều được thiết kế thành công (Hình 4). Vector tái tổ hợp này được biến nạp vào các chủng *A. tumefaciens*.



Hình 4. Sơ đồ vector chuyển gen pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP.

Biểu hiện tạm thời và tinh sạch protein M của PRRSV ở lá cây thuốc lá *N. benthamiana*

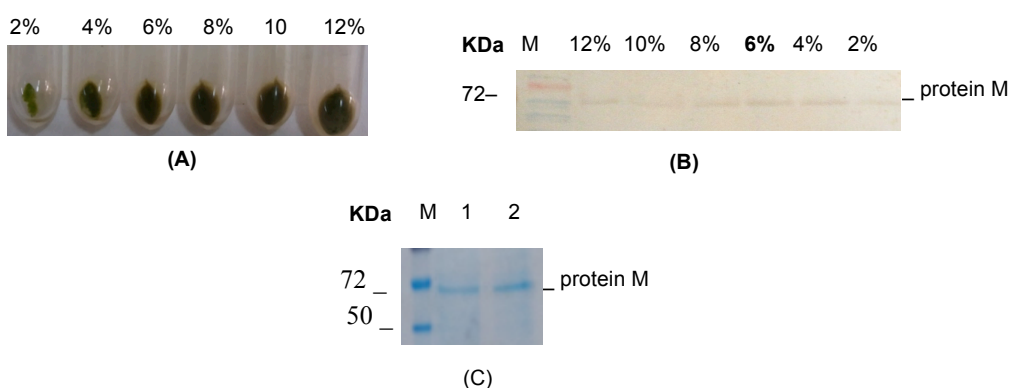
Chủng *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp pCB301 chứa cấu trúc 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP được sử dụng để biểu hiện protein M trong mô lá thuốc lá bằng phương pháp biểu hiện tạm thời.

Tối ưu nồng độ PEG cho quá trình tinh sạch protein M:

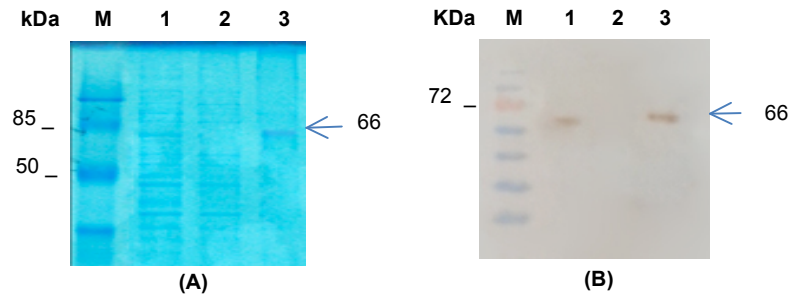
Nồng độ PEG cần được tối ưu nhằm loại bỏ các protein tạp trong dịch chiết thực vật, mà không làm mất protein mục tiêu. Ở các nồng độ được nghiên cứu (Hình 5A) cho thấy sự kết tủa của protein tạp trong dịch chiết lá thuốc lá tăng lên rõ rệt khi tăng nồng độ PEG từ 2 – 12%. Ở nồng độ PEG 12% kết tủa protein lắng cặn là nhiều nhất.

Phát hiện protein M tinh sạch ở các mẫu có nồng độ PEG tương ứng bằng phản ứng Western blot (Hình 5B) cho thấy ở tất cả các nồng độ đều thu được protein mục tiêu M. Tuy nhiên, ở nồng độ

PEG 2% xuất hiện một băng vạch đặc hiệu nhưng băng mờ nhạt, cho thấy ở nồng độ này vẫn tinh sạch được protein M nhưng do protein tạp còn nhiều chưa được loại bỏ hết dẫn đến hạn chế việc phát hiện protein mục tiêu. Ở nồng độ 6% băng vạch thu được đậm nhất, chứng tỏ tại nồng độ này protein tinh sạch thu được nhiều nhất. Khi tăng nồng độ PEG từ 8% đến 12% băng vạch nhạt dần, có thể do protein mục tiêu bị mất dần. Như vậy, nồng độ PEG càng cao, protein M có thể bị kết tủa cùng các protein tạp. Do đó, rất có thể nếu nồng độ PEG tiếp tục tăng đến một giới hạn nào đó sẽ làm mất protein mục tiêu. Từ kết quả thu được, nồng độ PEG 6% được lựa chọn và sử dụng bổ sung vào dịch chiết thực vật trong quá trình tinh sạch protein M bằng phương pháp mITC. Kiểm tra độ tinh sạch của protein M khi sử dụng PEG 6% trên SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (Hình 5C) cho thấy băng vạch protein M tinh sạch, băng vạch đậm nét, không lẫn protein tạp. Như vậy, nồng độ PEG phù hợp cho tinh sạch protein M bằng phương pháp mITC là 6%.



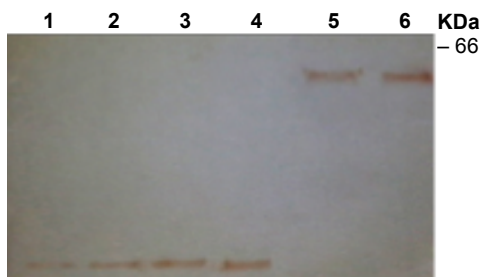
Hình 5. Kết quả tối ưu nồng độ PEG. (A): 2 ml dịch chiết thực vật có bổ sung PEG ở các nồng độ (2%-12%) sau ly tâm; (B): kết quả Western blot protein M ở các nồng độ PEG (2%-12%); (C): kiểm tra độ tinh sạch protein M trên SDS-PAGE; 1,2: protein M tinh sạch có bổ sung PEG 6% .



Hình 6. Đánh giá sự tinh sạch của protein M bằng SDS-PAGE (6A) và Western blot (6B). (A): M: Marker; 1: Dịch chiết thô chứa protein M-ELP trước xử lý; 2: Dịch chảy qua màng khi đưa dịch thô qua màng; 3: M-ELP tách rửa khỏi màng bằng nước lạnh. (B) M: Marker; 1: Dịch chiết thô chứa protein M-ELP trước xử lý; 2: Dịch chảy qua màng sau khi đưa dịch thô qua màng; 3: M-ELP tách rửa khỏi màng bằng nước lạnh.

Tinh sạch protein M bằng phương pháp mITC

Điện di kiểm tra trên gel polyacrylamid các mẫu sau mỗi bước tinh sạch gồm: dịch chiết thô, dịch chảy qua màng và protein M-ELP tinh sạch tách rửa khỏi màng (Hình 6A) cho thấy ở giếng số 1 (dịch thô) và giếng số 2 (dịch qua màng) xuất hiện nhiều băng vạch tương đương có kích thước khác nhau, ở giếng số 3 xuất hiện một băng duy nhất kích thước khoảng 66 KDa tương ứng với kích thước của M-ELP (66 kDa), phân đoạn này cũng xuất hiện ở giếng số 1 và không xuất hiện ở giếng số 2. Như vậy, có thể thấy protein M được tinh sạch bằng phương pháp mITC có độ tinh sạch cao. Phát hiện protein M bằng Western blot (Hình 6B) cũng cho thấy ở giếng số 1 và 3 xuất hiện băng màu nâu duy nhất có kích thước khoảng 66 kDa và không xuất hiện ở giếng số 2 tương ứng với dịch chảy qua màng. Điều này chứng tỏ protein M có gắn ELP có trong dịch thô đã được giữ lại trên màng. Định lượng protein M bằng phương pháp đo Bradford, lai miễn dịch và phân mềm ImageJ trên màng lai (Hình 7) cho thấy đã tinh sạch và thu hồi đúng protein M với kích thước mong muốn.



Hình 7. Định lượng protein tái tổ hợp bằng lai miễn dịch. 1,2,3,4: ScFV (đối chứng dương) 50, 100, 150, 200 ng/giếng; 5: Dịch chiết thô chứa protein M-ELP trước xử lý; 6: M-ELP tinh sạch được tách rửa khỏi màng bằng nước lạnh với protein tổng số mỗi giếng là 30µg/ giếng.

Kết quả cho thấy hiệu suất thu hồi protein M là 86,5%, mức độ tinh sạch của protein M là 82,1%. Hiệu suất thu hồi protein phụ thuộc vào nhiều yếu tố như loại màng sử dụng, phương pháp xử lý dịch thô trước khi đưa qua màng, nhiệt độ gắn màng, hiệu suất thu hồi của M chưa cao. Hàm lượng protein tái tổ hợp M-ELP trên tổng protein hòa tan là 2,1%, đạt 208 mg/kg lá tươi. Tỷ lệ này tương đương so với các kết quả trước đó về hàm lượng protein tái tổ hợp trên tổng protein hòa tan: 2% (Lamphear *et al.*, 2002, 2004; Streatfield *et al.*, 2002), 155 mg GP5/kg lá tươi (Min *et al.*, 2011), 250 mg GP5/kg (Hồ Thị Thương *et al.*, 2015), 400 mg NA/kg (Mett *et al.*, 2008), 200 mg HA/ kg lá tươi (Shoji *et al.*, 2009).

KẾT LUẬN

Vector biểu hiện mang gen mã hoá kháng nguyên M của chủng PRRSV gây bệnh lợn tai xanh của Việt Nam (VN07196) đã được thiết kế thành công. Protein M của PRRSV được biểu hiện trong mô lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện gen tạm thời nhờ *A. tumefaciens*, tinh sạch protein M với hàm lượng protein tái tổ hợp M-ELP trên tổng protein hòa tan là 2,1%, hiệu suất thu hồi protein bằng phương pháp mITC với protein M là 86,5%, mức độ tinh sạch của protein M là 82,1%, đạt 208 mg/kg lá tươi. Vector biểu hiện pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP sẽ được sử dụng cho nghiên cứu biểu hiện, sản xuất protein M tái tổ hợp. Kết quả này đã góp phần chứng minh sự thành công của thí nghiệm biểu hiện tạm thời kháng nguyên M của PRRSV trong mô lá thuốc lá *N. benthamiana* nhằm phục vụ sản xuất vaccine tiểu đơn vị chống lại PRRSV.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện với kinh phí từ đề tài thuộc nhiệm vụ nghiên cứu thường

xuyên của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học: “Nghiên cứu sản xuất kháng nguyên của virus gây bệnh lợn tai xanh trong cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp agroinfiltration”. Các thí nghiệm được tiến hành 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

- Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Do YY, Huang PL, Chang HW, Tsai YC, Lin CM, Pang VF, Jeng CR (2010) Immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant. *Vet Immunol Immunopathol* 135: 234-242.
- Chia MY, Hsiao SH, Chan HT, Huan 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 Immunopathol* 140: 215-225.
- Derald J, Holtkamp, Dale D Polson, Montserrat Torremorell, Dyneah M, Classen, Torremorell M (2011) Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. *J Swine Health Prod* 19 (1): 44-56.
- Fang Y, Snijder EJ (2010) The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res* 154: 61-76.
- Feng Y, Zhao T, Nguyen T, Inui K, Ma Y, Nguyen TH, Nguyen VC, Liu D, Bui QA, To LT, Wang C, Tian K and Gao GF (2008) Porcine respiratory and reproductive syndrome virus variants, Vietnam and China, 2007. *Emerg Infect Dis* 14 (11): 1774-1776.
- Floss D M, Mockey M, Zanello G, Brosson D, Diogon M, Frutos R, Bruel T, Rodrigues V, Garzon E, Chevaleyre C, Berri M, Salmon H, Conrad U, Dedieu L (2010) Expression and immunogenicity of the mycobacterial Ag85B/ESAT-6 antigens produced in transgenic plants by elastin-like peptide fusion strategy. *J Biomed Biotechnol* 2010: 1-15.
- Hou YH, Chen J, Tong G Z, Tian Z J, Zhou YJ, Li GX, Li X, Peng J M, An T Q, Yang H C (2008) A recombinant plasmid co-expressing swine ubiquitin and the GP5 encoding-gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces protective immunity in piglets. *Vaccine* 26: 1438-1449.
- Jiang W, Jiang P, Li Y, Tang J, Wang X, Ma S (2006a) Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet Immunol Immunopathol* 113: 169-180.
- Jiang Y, Xiao S, Fang L, Yu X, Song Y, Niu C, Chen H (2006b) DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* 24: 2869-2879.
- Lamphear BJ, Jilka JM, Kest L, Welter M, Howard JA, Streatfield Si (2004) A corn-based delivery system or animal vaccines: an oral transmissible gastroenteritis virus vaccine boosts lactogenic immunity in swine. *Virology* 22: 2420-2424.
- Lamphear BJ, Streatfield Si, Jilka JM, Brooks CA, Barker DK, Turner DD, Delaney DF, Garcia M, Wiggins B, Woodard SL, Flood EE, Tizard IR, Lawhorn B, Howard JA (2002) Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J Control Release* 85: 169-180.
- Mersereau M, Pazour GJ, Das A (1990) Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation. *J Gene* 90 (1): 149-51.
- Mett V, Musyichuk K Bi H, Farrance CE, Horsey A, Ugulava N, Shoji Y, Rosa P, Palmer GA, Rabindran S, Streatfield SJ, Boyers A, Russell M, Mann A, Lambkin R, Oxford, JS, Schild GC, Yusibov V (2008) A plant-produced influenza subunit vaccine protects ferrets against virus challenge. *Influenza Other Respi. Viruses* 2: 33-40.
- Phan HT (2012) ELPylated avian flu vaccines from plants: Improvement of expression and development of a new purification strategy. Ph.D Dissertation, IPK, Gatersleben, Germany.
- Qiu HJ, Tian ZJ, Tong GZ, Zhou YJ, Ni JQ, Luo YZ, Cai XH (2005) Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 106: 309-319.
- Shoji Y, Bi H, Musyichuk K, Rhee A, Horsey A, Roy G, Green B, Shamloul M, Farrance C E, and Taggart, B. (2009a) Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. *Vaccine* 27: 1087-1092.
- Streatfield SI, Mayor IM, Barker DK, Brooks C, Lamphear Bi, Woodard SL, Beifuss KK, Vicuna DV, Massey LA, Horn ME, Delaney DE, Nikolov ZL, Hood EE, Jilka JM, Howard JA (2002) Development of edible subunit vaccine in corn against enterotoxigenic strains of *Escherichia coil*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 28:11-17.
- Hồ Thị Thương, 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(1): 53-61.

Wang S, Fang L, Fan H, Jiang Y, Pan Y, Luo R, Zhao Q, Chen H, Xiao S (2007) Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 25: 8220-8227.

Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver D (1999)

A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* 40: 711-717.

Zheng Q, Chen D, Li P, Bi Z, Cao R, Zhou B, Chen P (2007) Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* 35: 585-595.

EXPRESSION AND PURIFICATION OF PROTEIN M OF PATHOGENIC PRRSV BY TRANSIENT EXPRESSION TECHNOLOGY IN TOBACCO LEAVES OF *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Nguyen Thi Minh Hang^{1,2}, Ho Thi Thuong¹, Nguyen Thu Giang¹, Pham Thi Van¹, Pham Bich Ngoc¹, Nguyen Trung Nam¹, Chu Hoang Ha¹

¹*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*College of Forestry Biotechnology, Vietnam National University of Forestry*

SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) caused by PRRS virus has resulted in huge economic losses to the livestock sector in many countries around the world. PRRSV belongs to Arterivirus, Arteriviridae and Nodovirales. The genome is a 15,000 bp single-stranded sRNA with 9 open reading frames (ORFs). In 2013, pathogens are type II PRRSVs obtained from the germs in the outbreak that have high homology with a pathogenic strain in China. M protein is the most conservative non-glycosylated structural protein of PRRSV containing one ectodomain-cellular region. M protein is a factor to stimulate the production of neutralizing antibodies in humoral immunity in pigs. In this study, the M gene fragment was amplified by PCR using the plasmid pGEM-PRRS (VN07196) with specific primers M-BamHI F và M-BamHI R linked to the 35S promoter, Histag, Cmyc and ELP. This cassette 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP was cloned into pRTRA to create an expression vector pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP that expressed protein M in tissues of *N. benthamiana* tobacco leaves using gene transient expression technology by *Agrobacterium tumefaciens*. M protein was purified by the method of Membrane-based inverse transition cycling. The concentration of PEG (polyethylene glycol) was added with appropriate plant extracts to recover high-purified M protein (6%). Recombinant purified protein M-ELP was obtained at 2.1% of the total soluble protein with recovery efficiency reached 86.5%. This result contributed to prove the success of transient expression of antigen M in tissues of *N. benthamiana*. This is the first step to conduct expression and purification of antigen M in large-scale that aims to study the production of subunit vaccine against PRRSV.

Keywords: *Nicotiana benthamiana*, Protein M, PRRSV, transient expression, protein purification