

NGHIÊN CỨU TỐI ƯU CÁC ĐIỀU KIỆN BIỂU HIỆN TẠM THỜI GEN MÃ HOÁ KHÁNG NGUYÊN M CỦA VIRUS PRRS TRONG LÁ CÂY THUỐC LÁ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Nguyễn Thị Minh Hằng^{1,2}, Hồ Thị Thương¹, Nguyễn Thu Giang¹, Phạm Bích Ngọc^{1,3}, Nguyễn Trung Nam^{1,3}, Chu Hoàng Hà^{1,3,✉}

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

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 09.3.2017

Ngày nhận đăng: 25.6.2017

TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) là một bệnh truyền nhiễm, do virus PRRS gây ra, có tốc độ lây lan nhanh và gây chết hàng loạt khi lợn bị nhiễm bệnh. Protein M là một trong những protein cấu trúc chính của virus PRRS có trọng lượng phân tử khoảng 19 kDa, mã hóa bởi khung đọc mở số 6 (ORF6), được sử dụng để thiết kế vaccine tiểu đơn vị chống lại virus PRRS. Trong nghiên cứu này, các điều kiện để biểu hiện tạm thời gen mã hóa protein M của virus PRRS trong lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp thâm lọc nhờ *Agrobacterium tumefaciens* đã được xác định. Kết quả nghiên cứu cho thấy, điều kiện tối ưu để biểu hiện protein tạm thời trong lá cây thuốc lá bằng phương pháp này là sử dụng đồng thời chủng *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen mang gen mã hóa protein M và *A. tumefaciens* chứa vector hỗ trợ mang gen mã hóa protein HC-Pro PVY; nồng độ chất dẫn dụ và cảm ứng AS 450 μ M; mật độ tế bào vi khuẩn được sử dụng để xâm nhiễm vào lá có giá trị OD₆₀₀ bằng 0,5; tuổi sinh lý của lá phù hợp cho vi khuẩn xâm nhiễm bằng phương pháp hút chân không là lá non và lá bánh tẻ của các cây thuốc lá 4 - 6 tuần tuổi và thời gian biểu hiện tạm thời gen mã hóa protein M của virus PRRS trong lá cây thuốc lá hiệu quả nhất là 6 ngày sau chuyển gen. Phương pháp này có thể áp dụng để biểu hiện lượng lớn protein – kháng nguyên M của virus PRRS ở cây thuốc lá để sản xuất vaccine phòng chống loại virus này.

Từ khoá: Biểu hiện gen tạm thời, *Nicotiana benthamiana*, protein M, PRRSV, thâm lọc nhờ *Agrobacterium*

MỞ ĐẦU

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) còn được gọi là “Bệnh lợn tai xanh”, do virus PRRS gây ra, có tốc độ lây lan nhanh, gây chết hàng loạt khi lợn nhiễm bệnh. Cách phòng chống bệnh lợn tai xanh hiệu quả là sử dụng vaccine và biện pháp thú y. Nhưng hiện nay, chỉ có một số lượng hạn chế các vaccine bất hoạt và nhược độc cho bệnh lợn tai xanh, sử dụng các chủng virus của châu Mỹ hoặc châu Âu và chủ yếu là vaccine phục vụ cho việc phòng trị virus thể độc lực thấp. Virus gây dịch bệnh lợn tai xanh ở Việt Nam được xác định là thể độc lực

cao, việc chữa trị khó khăn, dịch cũng nguy hiểm hơn nên cần phải có loại vaccine phù hợp. Vaccine tái tổ hợp được đánh giá là có hiệu quả nhất. Vì vậy, việc nghiên cứu biểu hiện được loại protein của virus PRRS có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao sử dụng làm vaccine tiểu đơn vị là rất cần thiết.

Protein M là một trong những protein cấu trúc chính của virus PRRS, có trọng lượng phân tử khoảng 19 kDa, được mã hóa bởi khung đọc mở số 6 (ORF6). Protein M không được glycosyl hóa, có tính kháng nguyên và có mức độ bảo thủ cao trong số các protein của virus PRRS (Meulenberg *et al.*, 1995). Trong virion, protein M liên kết với protein GP5 bằng cầu nối disulfide và được cho là tham gia vào

quá trình lắp ráp virus. Protein M đã được dùng để thiết kế vaccine tiểu đơn vị tái tổ hợp chống lại sự xâm nhiễm của virus PRRS (Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004; Ansari *et al.*, 2006) và protein M gây đáp ứng miễn dịch tế bào mạnh (Bautista *et al.*, 2002). Vaccine tiểu đơn vị được sản xuất trong thực vật là hướng nghiên cứu có triển vọng và nhiều ưu điểm như ổn định và bền vững, đảm bảo hoạt tính sinh học; dễ dàng sản xuất với khối lượng lớn, giá thành thấp. Tuy nhiên, đối với hệ thống biểu hiện thực vật, mức độ tổng hợp protein cao thường bị cản trở bởi cơ chế cân gen phiên mã và sau phiên mã của thực vật (Fagard *et al.*, 2000). Protein 2b của virus khảm dưa chuột *Cucumber mosaic virus* (CMV) và Hc-Pro của virus gây bệnh khoai tây *Potato virus Y* (PVY) là những protein gây ức chế cơ chế làm cân gen ở tế bào thực vật. Các protein này đã được nghiên cứu sử dụng để tăng cường sự biểu hiện tạm thời protein tái tổ hợp trong thực vật (Du *et al.*, 2008). Tế bào thực vật cho phép thực hiện việc định vị chính xác protein tái tổ hợp trong tế bào, cho phép protein có những biến đổi sau dịch mã (Wagner *et al.*, 2004). Protein tái tổ hợp được tích lũy trong tế bào thực vật có thể đạt mức cao (Verwoerd *et al.*, 1995), đặc biệt khi được gắn với elastin-like polypeptids (ELP) (Scheller *et al.*, 2006). Thêm vào đó, protein tái tổ hợp sản xuất từ thực vật sẽ tránh

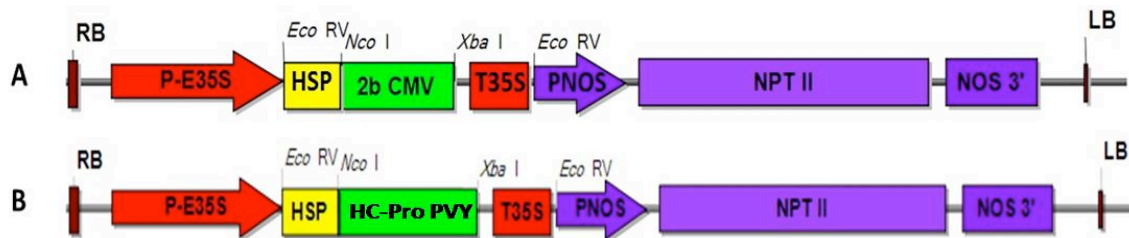
được sự tập nhiễm của các virus và vi khuẩn (Daniell *et al.*, 2001).

Trong bài báo này, trình bày kết quả nghiên cứu tối ưu các điều kiện biểu hiện tạm thời gen mã hóa cho protein M của virus PRRS trong lá cây thuốc lá (*Nicotiana benthamiana*). Hệ thống biểu hiện tạm thời ở thực vật là phương pháp hữu ích để sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp vì phương pháp này nhanh, có mức độ biểu hiện cao, không bị ảnh hưởng bởi vị trí gắn gen đích trong hệ gen của tế bào và biểu hiện được trong các mô đã biệt hóa hoàn toàn nên có thể sản xuất vaccine với số lượng lớn, nhanh chóng đáp ứng kịp thời khi dịch bệnh xảy ra.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 chứa vector pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP mang gen mã hóa protein M-ELP tái tổ hợp dưới sự điều khiển của promoter 35S (Nguyễn Thị Minh Hằng *et al.*, 2017); các chủng *A. tumefaciens* C58C1 chứa vector pIBT-35S-2b CMV và pIBT-35S-HC-Pro PVY có gen mã hóa protein 2b CMV và HcPro PVY; cây thuốc lá *N. benthamiana* do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc các vector chuyển gen pIBT-35S-2b CMV (A); pIBT-35S-HC-Pro PVY (B).

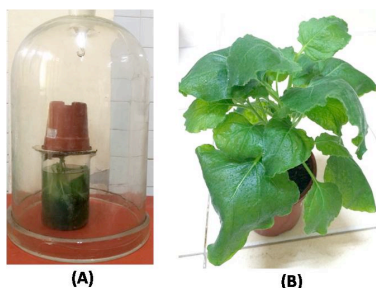
Phương pháp

Chuẩn bị dịch khuẩn

Các chủng *A. tumefaciens* C58C1 mang vector chuyển gen được nuôi tăng sinh trong 500 mL môi trường YEB có bổ sung 50 µg/mL kanamicin và 50 µg/mL rifamicin, ở 28°C trong 12h. Khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 5.000 v/p ở 4°C trong 10 min. Khuẩn được hòa tan trong dịch đệm 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES).

Phương pháp biến nạp gen đích vào lá cây thuốc lá

Quá trình biến nạp được tiến hành với cây thuốc lá trồng từ 3 - 8 tuần. Cây được úp ngược và nhấn chìm toàn bộ phần lá vào bình chứa dịch khuẩn *A. tumefaciens* đã được chuẩn bị ở trên, tiếp theo hệ thống này được chuyển vào bình hút chân không. Áp suất bình hút chân không được chỉnh tới 27 inches Hg, hút trong 1,5 min, sau đó giảm áp suất bình về áp suất không khí và mở nắp. Các cây thuốc lá sau khi biến nạp được tiếp tục nuôi và chăm sóc trong buồng sinh trưởng có điều kiện ánh sáng 5.000 - 7.000 Lux, nhiệt độ 25 ± 2°C, độ ẩm 60 - 70%.



Hình 2. Chuyển gen tạm thời vào lá cây thuốc lá nhờ *A. tumefaciens* bằng phương pháp hút chân không. (A): Cây được nhúng chìm trong bình chứa *A. tumefaciens* bên trong bình hút chân không; (B): Cây sau khi biến nạp.

Đánh giá ảnh hưởng của vector hỗ trợ đến mức độ biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Để đánh giá ảnh hưởng của vector hỗ trợ đến mức độ biểu hiện của gen *m* trong lá thuốc lá, vector biểu hiện pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP được lây nhiễm vào lá thuốc lá với dịch khuẩn đơn chỉ mang vector biểu hiện này hoặc dịch vi khuẩn kép mang cả vector biểu hiện và vector hỗ trợ có gen mã hóa cho protein 2b CMV, HcPro PVY. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, mỗi lần 3 cây cho một công thức. Mẫu lá được thu sau 3, 4, 5, 6 ngày biến nạp, tách chiết protein tổng số để đánh giá mức độ biểu hiện của gen chuyển. Mức độ biểu hiện gen *m* được đánh giá so sánh giữa các thí nghiệm có và không có vector hỗ trợ bằng phương pháp lai Western blot.

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Acetosyringone đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Để xác định nồng độ AS thích hợp cho biểu hiện gen tạm thời ở lá thuốc lá, thí nghiệm được bố trí với dịch khuẩn *Agrobacterium* không được bổ sung AS và bổ sung AS với nồng độ 450 μ M và 600 μ M. Lá cây thí nghiệm được thu sau 6 ngày biến nạp, tách chiết protein tổng số để đánh giá mức độ biểu hiện của gen chuyển. Mức độ biểu hiện gen *m* được đánh giá thông qua phản ứng lai Western blot. Nồng độ AS cho mức độ biểu hiện của gen mạnh hơn sẽ được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn OD₆₀₀ đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* được tiến hành với các dịch khuẩn có giá trị OD₆₀₀ = 0,2; 0,5 và 1,0 và bổ sung AS ở nồng độ thích hợp đã được xác định ở thí

nghiệm trên. Lá cây của các mẫu thí nghiệm được thu 6 ngày sau biến nạp, tách chiết protein tổng số để đánh giá mức độ biểu hiện của gen chuyển. Mức độ biểu hiện gen được đánh giá thông qua phản ứng lai Western blot.

Đánh giá ảnh hưởng của tuổi sinh lý của lá đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Để xác định vị trí lá thích hợp cho biểu hiện tạm thời gen *m* mã hóa protein M tái tổ hợp; lá thuốc lá trên các cây thí nghiệm được phân vùng như sau: Lá non gồm lá thứ 1, 2, 3 từ ngọn xuống; lá bánh tẻ gồm những lá tại vị trí chính giữa của thân cây; lá già gồm những lá 1, 2, 3 từ gốc lên. Sau khi lây nhiễm với dịch khuẩn ở nồng độ AS thích hợp đã được xác định ở thí nghiệm trên, mẫu lá ở các vùng được thu riêng rẽ sau 6 ngày biến nạp để tách chiết protein tổng số và đánh giá sự biểu hiện của gen mã hóa protein M bằng phương pháp lai Western blot.

Đánh giá ảnh hưởng của tuổi cây đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Để xác định tuổi cây thích hợp cho xâm nhiễm của *Agrobacterium* và biểu hiện gen *m*, cây thuốc lá 3, 4, 5, 6, 7 và 8 tuần tuổi được xâm nhiễm với dịch khuẩn có bổ sung AS ở nồng độ tối ưu. Mẫu lá của các cây riêng rẽ được thu 6 ngày sau biến nạp, tách chiết protein tổng số để đánh giá mức độ biểu hiện của gen mã hóa protein M bằng phương pháp lai Western blot.

Tách chiết và xác định hàm lượng protein tổng số

Protein tổng số từ mẫu lá được tách bằng dịch chiết PBS (Phosphate-buffered saline; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4), 0,05% Tween theo tỉ lệ 1 : 2 [trọng lượng mẫu (g) : thể tích dịch chiết (mL)] và bảo quản ở -20°C. Hàm lượng protein tổng số được đo ở bước sóng 595 nm theo phương pháp của Bradford (1976) với đường chuẩn được xây dựng dựa vào protein BSA chuẩn đã biết trước nồng độ.

Điện di SDS-PAGE và lai Western blot

Điện di protein tổng số bằng phương pháp điện di trên SDS-PAGE và đánh giá mức độ biểu hiện của gen mã hóa protein M tái tổ hợp trong lá thuốc lá bằng lai Western blot theo phương pháp của Burnette và đồng tác giả (1981), như sau:

Điện di SDS-PAGE: Bản gel SDS-PAGE 10% polyacrylamide được chuẩn bị theo công thức của Laemmli (1970). Protein tổng số được biến tính ở 95°C trong 10 min trước khi tra mẫu lên gel. Tất cả

các giếng ở các thí nghiệm đều được đưa vào cùng một lượng protein tổng số (30 µg). Điện di được tiến hành ở điện di ở 100V, 20mA trong 3h.

Western blot: Sau khi điện di protein tổng số trên gel SDS-PAGE, protein được chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter (Thermoscientific) ở 25V, 1.3A trong 20 min. Màng chứa kháng nguyên được phủ bằng sữa tách béo 5% pha trong dung dịch PBS 0,05% Tween, trong 5h. màng được ủ với kháng thể 1 kháng cmyc qua đêm, sau đó màng được ủ với kháng thể 2 anti-mouse IgG có gắn HRP trong 2h. Phát hiện sự có mặt của protein M gắn cmyc bằng cách ngâm màng lại trong dung dịch hiện màu có chứa cơ chất DAB (Diaminobenzidine) trong 15 phút (Phan, 2012).

Phân tích hình ảnh bằng phần mềm Image J

Độ đậm nhạt của băng protein ở các thí nghiệm lai Western blot được so sánh bằng phần mềm Image J.

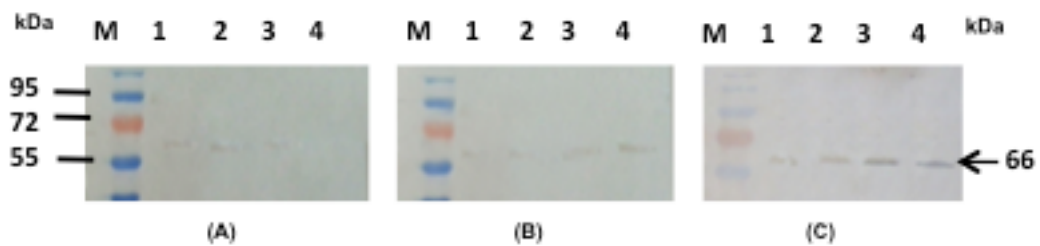
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của vector hỗ trợ đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Biểu hiện gen tạm thời ở thực vật có mức độ tổng hợp protein cao (Verwoerd *et al.*, 1995; Scheller *et al.*, 2006). Tuy nhiên, đã có một số

nghiên cứu chỉ ra rằng việc biểu hiện trong thực vật thường bị cản trở bởi cơ chế câm gen phiên mã và sau phiên mã (Fagard *et al.*, 2000). Có ít nhất ba phương thức làm câm gen trong thực vật, vai trò của các phương thức này đã được xác định bao gồm cơ chế phòng thủ chống lại virus, điều hòa sự biểu hiện gen và sự ngưng tụ của chất nhiễm sắc thành heterochromatin (Baulcombe, 2004). Để khắc phục hiện tượng này, đã có hơn 30 loại protein ức chế sự câm gen của virus thực vật đã được tìm thấy. Vì vậy, việc biểu hiện đồng thời các gen mã hóa protein ức chế câm gen và gen mục tiêu trong tế bào thực vật sẽ làm tăng mức độ biểu hiện protein đích. Protein 2b có thể ức chế RNA silencing và sự methyl hóa DNA bằng cách liên kết và cô lập siRNA và kéo dài tiền dsRNA (Duan *et al.*, 2012). Trong nghiên cứu biểu hiện gen GFP sử dụng protein hỗ trợ HC-Pro PPV mức độ biểu hiện của GFP tăng 3-4 lần trong lá cây thuốc lá (*N. benthamiana*) sau 7 ngày xâm nhiễm dịch khuẩn (Stephan *et al.*, 2011).

Để đánh giá mức độ hoạt động của vector mang gen mã hóa cho protein tái tổ hợp M-ELP và vector hỗ trợ mang gen mã hóa cho protein 2b CMV, HcPro PVY ức chế câm gen hoạt động dưới sự điều khiển của promoter CaMV 35S; thí nghiệm không sử dụng vector hỗ trợ và sử dụng vector hỗ trợ đã được thực hiện đồng thời. Thu lá cây thuốc lá sau 3, 4, 5 và 6 ngày biến nạp, tách chiết protein tổng số và lai Western blot.



Hình 3. Biểu hiện protein tái tổ hợp khi không sử dụng và có sử dụng vector hỗ trợ. A : Biểu hiện protein M khi không sử dụng vector hỗ trợ; B: Biểu hiện protein M khi sử dụng vector hỗ trợ pIBT/2bCMV; C: Biểu hiện protein M khi sử dụng vector hỗ trợ pIBT/Hc-Pro PVY. M: Marker; 1: Protein sau 3 ngày xâm nhiễm; 2: Protein sau 4 ngày xâm nhiễm; 3: Protein sau 5 ngày xâm nhiễm; 4: Protein sau 6 ngày xâm nhiễm.

Kết quả lai Western blot (Hình 3) cho thấy đã thu được băng màu nâu có kích thước khoảng 66 kDa đúng với kích thước của protein M dung hợp với ELP do cassette gen 35S-M-Histag-Cmyc-100xELP mã hóa, theo tính toán lý thuyết. Như vậy, gen mã hóa cho protein M-ELP đã hoạt động dưới sự điều khiển của promoter CaMV 35S và protein M đã được biểu hiện thành công ở lá thuốc lá bằng phương pháp thẩm

lọc nhờ *Agrobacterium*. So sánh các băng protein ở các thí nghiệm không sử dụng và sử dụng vector hỗ trợ bằng phần mềm Image J cho thấy, độ đậm của băng protein khi không sử dụng vector hỗ trợ là thấp nhất. Điều này có thể giải thích là do cơ chế câm gen ở thực vật hoạt động và ức chế sự biểu hiện protein ngoại lai (Fagard *et al.*, 2000). Protein Hc-Pro ức chế cơ chế câm lặng RNA ở thực vật bằng cách ngăn cản

sự phân giải các mRNA và RNA sợi đôi từ đó giảm lượng siRNA hoặc làm hỏng chức năng cắt của enzyme cắt sợi đôi Dicer và RISC (Zhang *et al.*, 2008). Dựa vào cơ sở khoa học của các nghiên cứu trên, các gen mã hóa protein 2b CMV và Hc-pro PVY từ các chủng virus ở Việt Nam đã được phân lập và sử dụng để tiến hành đánh giá khả năng tăng cường biểu hiện protein tái tổ hợp trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời. Biểu hiện của protein tái tổ hợp M khi sử dụng chủng vi khuẩn mang vector hỗ trợ chứa gen mã hóa protein 2b CMV và Hc-Pro PVY được thể hiện trên Hình 3B, 3C; phân tích bằng phần mềm Image J, kết quả cho thấy rằng băng protein rõ nét ở tất cả các mẫu, đặc biệt ở mẫu lá thu ngày thứ 6 sau biến nạp có băng rõ nét, đậm nhất. Điều này chứng tỏ vector hỗ trợ mang gen mã hóa protein 2b CMV và Hc-Pro PVY hoạt động tốt và đã tăng cường sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M trong lá thuốc lá. Trong đó, Hc-Pro PVY cho thấy khả năng hỗ trợ tăng cường biểu hiện protein M tốt hơn so với 2b CMV thể hiện ở băng protein đậm hơn (Hình 3C). Vì vậy, Hc-Pro PVY được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của nồng độ AS đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

AS là các hợp chất phenol do tế bào thực vật khi bị thương tiết ra, có vai trò quan trọng trong việc nhận biết và gắn kết vi khuẩn. Vì vậy, trong các thí nghiệm chuyển gen hay biểu hiện gen tạm thời sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*, AS thường được thêm vào như là chất dẫn dụ và cảm ứng hoạt động của nhóm gen gây độc của *A. tumefaciens* giúp cho vi khuẩn dễ dàng xâm nhiễm và chuyển gen vào tế bào thực vật. Để đánh giá ảnh hưởng của AS đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M; thí nghiệm đã được thiết kế với 3 công thức gồm không bổ sung AS và bổ sung AS với nồng độ 450 μM và 600 μM , sử dụng chủng khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector pCB301-35S-M-Histag-Cmyc-100xELP và chủng khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector hỗ trợ pIBT-35S-HC-Pro PVY. Thu lá cây thuốc lá sau 6 ngày biến nạp, tách chiết protein tổng số và lai Western blot. Kết quả lai Western blot (Hình 4) xuất hiện băng màu nâu có kích thước đúng với kích thước tính toán lý thuyết của protein M dung hợp ELP (66 kDa). Ở giếng 2 thu được băng protein tương ứng với nồng độ AS bằng 450 μM đậm nhất, điều này chứng tỏ rằng nồng độ AS 450 μM có hiệu quả tốt nhất cho biểu hiện tạm thời gen mã hóa protein M. Sự tăng lượng protein M là do lượng khuẩn xâm nhiễm và chuyển gen vào tế bào cây tăng lên khi có mặt AS. Tuy nhiên, khi nồng

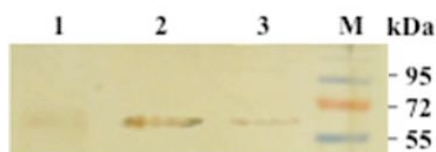
độ AS tăng lên 600 μM thì biểu hiện protein M lại giảm đi, đây có thể là do lượng khuẩn vào cây quá nhiều kích hoạt cơ chế hoại tử sản sinh protease phân hủy protein tích lũy trong cây. Trong một thí nghiệm trước đó của Wydro và đồng tác giả (2006) cũng chỉ ra mức độ biểu hiện cao nhất của protein GFP đạt được khi xâm nhiễm dịch khuẩn được bổ sung AS nồng độ từ 450 - 600 μM . Vì vậy, nồng độ chất dẫn dụ tốt nhất cho biểu hiện tạm thời gen mã hóa protein M được xác định là AS = 450 μM .



Hình 4. Ảnh hưởng của nồng độ AS lên biểu hiện protein M. M: marker; 1: AS = 0; 2: AS = 450 μM ; 3: AS = 600 μM .

Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Mật độ tế bào vi khuẩn được xác định bởi giá trị quang phổ OD ở bước sóng 600 nm của dịch lỏng vi khuẩn, có liên quan tới sinh khối tế bào của chúng hay số lượng tế bào trong một thể tích nhất định. Trong nghiên cứu biểu hiện tạm thời, việc xác định mật độ vi khuẩn phù hợp, giai đoạn vi khuẩn sinh trưởng mạnh mẽ có ý nghĩa quan trọng để hiệu quả chuyển gen được cao nhất. Để xác định nồng độ khuẩn phù hợp nhất cho biểu hiện tạm thời gen mã hóa protein M, thí nghiệm biến nạp được tiến hành với dịch khuẩn có các giá trị OD₆₀₀ khác nhau, kết hợp với các điều kiện đã được tối ưu trước đó: sử dụng vector hỗ trợ pIBT-35S-HC-Pro PVY, nồng độ AS = 450 μM . Thu lá cây thuốc lá sau 6 ngày biến nạp, tách chiết protein tổng số và lai Western blot để đánh giá mức độ biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M.



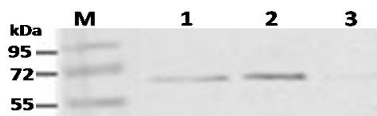
Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn đến biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M. M: Marker; 1,2,3: Mẫu lá xâm nhiễm với nồng độ khuẩn OD₆₀₀ lần lượt là 0,2; 0,5 và 1, tương ứng.

Từ kết quả lai miễn dịch (Hình 5) và phân tích bằng phần mềm Image J để so sánh độ đậm của băng protein, cho thấy protein biểu hiện tốt nhất, băng đậm nét nhất ở giếng số 2 tương ứng với dịch khuẩn có giá trị OD₆₀₀ = 0,5. Dịch khuẩn có giá trị OD₆₀₀ bằng 0,5

đến 1 là giai đoạn mà sự sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn đang ở pha logarit, vi khuẩn tăng nhanh về số lượng cũng như năng lực sinh tổng hợp mạnh mẽ nhất. Từ kết quả này có thể thấy rằng, với mật độ vi khuẩn $OD_{600} = 0,5$ là hoàn toàn phù hợp cho biểu hiện tạm thời gen mã hóa protein M tốt nhất. Trong thí nghiệm tối ưu hệ thống biểu hiện tạm thời ở lá cây thuốc lá *N. benthamiana* của Wydro và đồng tác giả (2006) cũng đã đánh giá ảnh hưởng của nồng độ khuẩn xâm nhiễm lên sự biểu hiện tạm thời protein GFP với các nồng độ khuẩn thử nghiệm 0,1; 0,5; 1,0 và 1,5; kết luận không thấy sự khác biệt đáng kể mức độ biểu hiện protein GFP khi xâm nhiễm cây ở các nồng độ khuẩn khác nhau. Tuy nhiên, trong kết quả nghiên cứu này cho thấy nồng độ vi khuẩn ảnh hưởng rõ rệt đến mức độ biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M.

Ảnh hưởng của tuổi sinh lý của lá đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Tuổi sinh lý của lá ảnh hưởng không nhỏ đến quá trình biến nạp vector đích vào lá. Với đặc tính lá cây lúc còn non khả năng sinh trưởng khỏe và khả năng tổng hợp các chất cao, lá già khả năng sinh trưởng kém, đặc biệt sự tổng hợp các chất hữu cơ diễn ra rất chậm. Bên cạnh đó, khả năng xâm nhập của vi khuẩn vào lá non cũng dễ hơn ở lá già. Vì vậy, trong thí nghiệm này, vai trò của vị trí lá ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện protein đích trong cây được kiểm tra. Dịch khuẩn được xâm nhiễm ở các vị trí lá khác nhau của cây như đã mô tả ở phần phương pháp. Thu lá cây sau 6 ngày biến nạp, tách chiết protein tổng số và lai Western blot; kết quả lai Western blot (Hình 6), cho thấy ở cả 3 mẫu lá đều cho băng có kích thước tương tự kích thước lí thuyết của protein M-ELP. Phân tích bằng phần mềm Image J để so sánh độ đậm nhạt của băng protein, cho thấy băng protein tách chiết từ mẫu lá bánh tẻ đậm nét nhất, sau đó đến băng protein tách chiết từ mẫu lá non và cuối cùng là băng protein tách chiết từ mẫu lá già; điều này thấy rằng tuổi sinh lý của lá ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả biểu hiện protein tạm thời bằng phương pháp thâm lọc nhờ *Agrobacterium*.



Hình 6. Ảnh hưởng của vị trí lá đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M. M: Marker; Mẫu lá ở các vị trí lá non (1), lá bánh tẻ (2), lá già làm (3).

Ảnh hưởng của tuổi cây đến sự biểu hiện tạm thời của gen mã hóa protein M

Tuổi của cây liên quan chặt chẽ đến khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn mang gen đích, ảnh hưởng đến sự tổng hợp protein tái tổ hợp và sinh khối lá thu được sau xâm nhiễm. Vì vậy, cây dùng cho biểu hiện tạm thời phải đạt tiêu chuẩn về số lượng lá, giai đoạn phát triển của lá, độ cứng cáp của cây. Để xác định tuổi cây phù hợp, thí nghiệm đã được thiết kế với các cây thuốc lá có độ tuổi khác nhau; cây sau khi biến nạp được nuôi 6 ngày, thu lá, tách protein tổng số và lai Western blot để kiểm tra mức độ biểu hiện protein trong lá. Kết quả lai Western blot (Hình 7), cho thấy lá ở tất cả các độ tuổi của cây (3-8 tuần tuổi) sau khi biến nạp đều biểu hiện protein; lá của cây 4, 5, 6 tuần tuổi biểu hiện protein cao nhất, thể hiện ở băng protein đậm nét nhất trên màng lai và lá của cây 8 tuần tuổi có mức độ biểu hiện protein thấp nhất.



Hình 7. Ảnh hưởng tuổi cây đến sự biểu hiện của gen mã hóa protein M. M: Marker; 1,2,3,4,5,6: Mẫu lá thu từ cây 3,4,5,6,7,8 tuần tuổi sau 6 tuần chuyển gen.

KẾT LUẬN

Điều kiện tối ưu cho sự biểu hiện tạm thời gen mã hoá protein M của virus PRRS trong lá cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp thâm lọc nhờ *Agrobacterium* là sử dụng vector hỗ trợ mang gen mã hóa protein Hc-Pro PVY, nồng độ chất dẫn dụ và cảm ứng AS 450 μM , mật độ tế bào vi khuẩn được sử dụng để xâm nhiễm vào lá có giá trị OD_{600} bằng 0,5, vị trí lá cho xâm nhiễm là lá non và lá bánh tẻ, tuổi cây phù hợp để tiến hành cho xâm nhiễm là từ 4-6 tuần tuổi và ngày thu mẫu lá tách chiết protein là sau 6 ngày biến nạp.

Các điều kiện đã được tối ưu có thể áp dụng để biểu hiện, tinh sạch protein M của virus PRRS bằng phương pháp biểu hiện gen tạm thời nhờ *Agrobacterium* nhằm thu lượng lớn protein cho mục đích sản xuất vaccine thực vật phòng chống virus PRRS.

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

- Ansari IH, Kwon B, Osori FA, Pattnai AK (2006) Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J Virol* 80: 3994–4004.
- Baulcombe (2004) RNA silencing in plants. *Nature* (431): 356-363.
- Bautista EM, Faaberg KS, Mickelson D and McGruder ED (2002) Functional properties of the predicted helicase of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 298 (2): 258-270.
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 6: 219-226.
- Du Z, Chen F, Zhao Z, Liao Q, Palukaitis P, Chen J (2008) The 2b protein and the C-terminus of the 2a protein of cucumber mosaic virus subgroup I strains both play a role in viral RNA accumulation and induction of symptoms. *Virology* 380: 363-370.
- Duan CG, Fang YY, Zhou BJ, Zhao JH, Hou WN, Zhu H, Ding SW, Guo HS (2012) Suppression of Arabidopsis ARGONAUTE1-mediated slicing, transgene-induced RNA silencing, and DNA methylation by distinct domains of the Cucumber mosaic virus 2b protein. *Plant Cell* 24: 259–274.
- Fagard M, Vaucheret H (2000) (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms?. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 167-194.
- Meulenberg JM, Peter Sen-Den Besten A, Kluiver EP, Moormann RJM, Schaaper WMM, Wensvoort G (1995) Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206:155-163.
- Nguyễn Thị Minh Hằng, Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Phạm Thị Vân, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Chu Hoàng Hà (2017) Biểu hiện và tinh sạch protein m của virus prrs gây bệnh lợn tai xanh bằng công nghệ biểu hiện tạm thời trong lá thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15(3): 547-554.
- Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, Lopez OJ (2002) Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J Virol* 76: 4241-4250.
- Phan HT (2012) ELPylated avian flu vaccines from plants: Improvement of expression and development of a new purification strategy. PhD Dissertation, IPK, Gatersleben, Germany.
- Plagemann PG (2004) GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res* 102: 225-230.
- 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: 243-249.
- Stephan D, Slabber C, George G, Ninov V, Francis KV and Burger JT (2011) Visualization of plant viral suppressor silencing activity in intact leaf lamina by quantitative fluorescent imaging. *Plant Methods* 186: 1746-4811.
- Verwoerd TC, van Paridon PA, van Ooyen AJ, van Lent JW, Hoekema A, Pen J (1995) Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves. *Plant Physiol* 109: 1199-1205.
- Wagner B, Fuchs H, Adhami F, Ma Y, Sc Verwoerd heiner O, Breiteneder H (2004) Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. *Methods* 32: 227-234.
- Wydro M, Kozubek E, Lehmann P (2006) Optimization of transient Agrobacterium-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*. *Regular Paper* 53: 289-298.
- Zhang X, Du P, Lu L, Xiao Q, Wang Q, Cao X, Ren B, Wei C, Li Y (2008) Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology* 374: 351-360.

OPTIMIZATION OF EXPRESSION CONDITIONS OF GENE ENCODING ANTIGEN M OF PRRSV IN LEAVES OF *NICOTIANA BENTHAMIANA* BY AGROINFILTRATION METHOD

Nguyễn Thị Minh Hằng^{1,2}, Ho Thi Thuong¹, Nguyen Thu Giang¹, Pham Bich Ngoc^{1,3}, Nguyen Trung Nam^{1,3}, Chu Hoang Ha^{1,3}

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

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

³*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Reproductive disorders and respiratory swine (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome - PRRS) is an infectious disease caused by the PRRS virus (PRRSV), spread fast speeds, causing mass death when infected pigs. M protein is one of the major structural protein of the PRRSV, has a molecular weight of about 19 kDa, encoded by the open reading frame 6 (ORF6), which is used to design a subunit vaccine against back PRRSV. In this study, conditions for transient expression of the gene encoded the M protein of PRRSV in leaves of the *Nicotiana benthamiana* by agroinfiltration method were determined. The results show that optimal conditions for transient expression of protein M in the leaf are used the simultaneous of the *A. tumefaciens* strain containing vector carrying the gene encoding the protein M and *A. tumefaciens* containing vector carrying gene encoding supported protein HC-Pro PVY, concentration of acetosyringone with 450 μ M, the bacterial cell density used to infect into leaf with OD₆₀₀ is 0.5, The physiological age of the leaf suitable for infecting bacteria was young leaf and mature leaf of tobacco plants 4 to 6 weeks of age, and the transient expression time of gene encoding protein M of PRRSV in tobacco leaves is most effective 6 days after infecting. This agroinfiltration method can be used to express large amounts of protein - antigen M of PRRSV in tobacco plants to produce vaccines against this virus.

Keywords: *Agroinfiltration, Nicotiana benthamiana, protein M, PRRSV, transient expression*