

NGHIÊN CỨU SỰ BIỂU HIỆN CỦA KHÁNG NGUYÊN S1 TÁI TỔ HỢP CỦA VIRUS GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN (PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS) TRONG CÂY THUỐC LÁ *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Hồ Thị Thương¹, Lê Thu Ngọc¹, Nguyễn Thu Giang¹, Trịnh Thái Vy¹, Phan Trọng Hoàng², Phạm Bích Ngọc¹, Vũ Huyền Trang¹, Hoàng Thị Thu Hằng¹, Chu Hoàng Hà^{1,✉}

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

²Viện Di truyền thực vật và Nghiên cứu cây trồng, Cộng hoà Liên bang Đức

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

Ngày nhận bài: 07.11.2019

Ngày nhận đăng: 17.01.2020

TÓM TẮT

Tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) là một bệnh truyền nhiễm với tỷ lệ tử vong cao, đặc biệt ở heo con đang bú mẹ. Trong số các protein cấu trúc của virus gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV), protein S gồm 2 tiểu phần S1 và S2 trên bề mặt PEDV, là một homotrimer protein, đóng vai trò quan trọng trong việc gắn virus vào các thụ thể tế bào. Trong đó, tiểu phần S1 được xem như là tiểu phần quan trọng trong việc phát triển vaccine hiệu quả chống lại PEDV. Trong nghiên cứu này, với mục tiêu biểu hiện S1 dưới dạng cấu trúc nguyên bản trimer và oligomer của trimer dựa vào tương tác S-tag và S-protein, đoạn gen mã hóa protein S1 của PEDV được gắn với motif GCN4pII, GCN4pII-Stag, sau đó được gắn vector tách dòng pRTRA dưới sự điều khiển của promoter 35S CaMV, tiếp đến toàn bộ cassette này được chèn vào vector pCB301 và biến nạp vào chủng *Agrobacterium tumefaciens* để biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. Sự biểu hiện của các protein S1 tái tổ hợp trong cây thuốc lá đã được xác định bằng phương pháp Western blot. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện của các protein S1 trimer và S1 trimer S-tag trong cây thuốc lá là bằng nhau, điều này cũng chỉ ra rằng việc dung hợp S-tag không làm ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của protein, tuy nhiên mức độ biểu hiện của các protein S1 là tương đối thấp, đạt 0,005% protein tan tổng số. Thêm vào đó, sự biểu hiện đồng thời của hai protein S1 trimer S-tag và Sprotein-tp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* khi biến nạp đồng thời hai chủng *A. tumefaciens* mang vector tương ứng cũng đã được xác định bằng Western blot. Đây là nghiên cứu tiền đề cho việc phát triển vaccine tiêu đơn vị ở thực vật phòng chống sự lây nhiễm của PEDV.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, biểu hiện tạm thời, PEDV, protein S1 tái tổ hợp, vaccine thực vật

MỞ ĐẦU

Tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) là một bệnh truyền nhiễm với tỷ lệ tử vong cao, đặc biệt ở heo con đang bú mẹ (Jung *et al.*, 2015). Khi lợn khi bị lây nhiễm với PEDV qua đường miệng, PEDV sẽ di chuyển đến ruột non và nhân lên nhanh chóng tại lông nhung ruột non, phá hủy hệ thống lông nhung ruột, làm teo và ngắn lông nhung ruột non. Điều

này làm giảm hoạt động của các enzyme bề mặt ruột non, làm giảm sự hấp thu dinh dưỡng, dẫn đến lợn bị tiêu chảy, còi cọc, nôn mửa, mất nước, cuối cùng lợn bị chết. PED và virus gây bệnh tiêu chảy cấp PEDV được phát hiện ở lợn châu Âu vào những năm 1970 (Oldham *et al.*, 1972), sau đó bùng phát lẻ tẻ ở nhiều nước nuôi lợn ở châu Á, bao gồm Hàn Quốc, Trung Quốc, Thái Lan và Philippines. PEDV được phát hiện ở Việt Nam từ năm 2009 (Kim *et al.*, 2015).

Năm 2010, các chủng PEDV mới và có độc lực cao đã được xác định ở Trung Quốc, đã tấn công vào các trang trại nuôi lợn với tỷ lệ mắc bệnh ở lợn từ 80 đến 100% (Tian *et al.*, 2013). Sau đó dịch bệnh lây lan sang một số quốc gia khác dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi lợn (Chiou *et al.*, 2015).

PEDV thuộc chi *Alphacoronavirus*, họ *Coronaviridae*, là một loại virus có vỏ bọc chứa bộ gen RNA dương, đơn chuỗi dài 28 kb. Bộ gen PEDV bao gồm năm khung đọc mở (ORF) mã hóa cho ba protein phi cấu trúc (ORF1a, 1b, và ORF3) và bốn protein cấu trúc (spike [S], protein vỏ, màng và nucleocapsid) (Song *et al.*, 2012). Trong số các protein cấu trúc của PEDV, protein S trên bề mặt PEDV đóng vai trò quan trọng trong việc gắn virus vào các thụ thể tế bào (Chang *et al.*, 2002). Ngoài ra, protein S là mục tiêu để trung hòa cảm ứng kháng thể vì nó chứa các epitope trung hòa virus và là yếu tố quyết định kháng nguyên (Song *et al.*, 2012). Protein S được lắp ráp tự nhiên tạo thành cấu trúc trimer với một số vị trí glycosyl hóa được dự đoán (Walls *et al.*, 2016). Protein S hình thành dạng trimer và đóng vai trò quan trọng trong việc tương tác với các phân tử thụ thể của tế bào chủ (Cruz *et al.*, 2008). Sự phân cắt của protein S thành S1 và S2 là quan trọng đối với sự xâm nhập của PEDV chủng đại vào trong tế bào nhưng không phải với chủng PEDV đã thích ứng trong nuôi cấy tế bào. Đột biến đa điểm của protein S tạo thành 2 nhóm PEDV khác nhau, G1 và G2 (chủng đại và chủng bị đột biến) (Chen *et al.*, 2013) và những nghiên cứu gần đây cho thấy rằng đã có những biến đổi kháng nguyên xuất hiện giữa G1 và G2 (Wang *et al.*, 2016).

Tiểu phần S1 có chứa amino acid từ 21–793 bao gồm: NTD (từ acid amin 21 đến 324) và CTD (từ acid amin 253 đến 638) (Lee *et al.*, 2015) được liên kết với porcine aminopeptidase N (pAPN). pAPN có vai trò quan trọng trong việc dung hợp màng và xâm nhập của virus, nó cũng là kháng nguyên mục tiêu cho việc sản sinh kháng thể trung hòa (Deng *et al.*, 2016). Do vậy, sự biến đổi của S1 đã được sử dụng rộng rãi cho nghiên cứu về tiến hóa và đa dạng

di truyền của PEDV (Suzuki *et al.*, 2015). Tiểu phần S1 được xem như là tiểu phần quan trọng trong việc phát triển vaccine hiệu quả chống lại PEDV (Makadiya *et al.*, 2016).

Việc phát triển vaccine nhanh chóng, an toàn và hiệu quả để bảo vệ lợn chống lại PEDV là điều hết sức cần thiết. Một số vaccine PEDV sống nhược độc, dựa trên các chủng PEDV đại, như CV777 (Sun *et al.*, 2016), DR13 (Park *et al.*, 2011) và 83P-5 (Sato *et al.*, 2011) đã được phát triển ở châu Á trong nhiều năm. Tại Hoa Kỳ, hai loại vaccine được cấp phép có điều kiện bao gồm vaccine dựa trên vector alphavirus (vaccine Harris) và vaccine PEDV vô hoạt (Zoetis) có sẵn trên thị trường. Tuy nhiên, một số nghiên cứu cho thấy, chúng không hiệu quả trong việc phòng chống PEDV (Langel *et al.*, 2016). Cho đến nay, không có loại vaccine thương mại nào có hiệu quả để kiểm soát PED trên toàn thế giới. Vaccine tiểu đơn vị từ thực vật đã được báo cáo có ưu điểm chung là chi phí sản xuất thấp, dễ mở rộng quy mô, chi phí cơ sở hạ tầng thấp, tính ổn định cao (Topp *et al.*, 2016). Phương pháp biểu hiện tạm thời ở *N. benthamiana* đã được chứng minh là một phương pháp rất nhanh và hiệu quả để tạo ra protein tái tổ hợp trong thực vật (Chen *et al.*, 2013). Như vậy, hướng nghiên cứu sản xuất protein S1 tái tổ hợp ở thực vật nhờ công nghệ biểu hiện tạm thời là có triển vọng.

Để nâng cao hiệu quả của vaccine tái tổ hợp được sản xuất ở thực vật trong việc kích thích khả năng gây đáp ứng miễn dịch chống lại sự xâm nhiễm của PEDV, việc biểu hiện protein S1 dưới dạng cấu trúc nguyên bản trimer là hướng nghiên cứu được quan tâm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu để thiết kế và biểu hiện được protein S1 dưới dạng cấu trúc tự nhiên (trimer) thông qua việc dung hợp motif GCN4pII. Ngoài ra, với mục tiêu tăng khả năng đáp ứng miễn dịch hơn nữa, chúng tôi đã đồng thời nghiên cứu thiết kế và biểu hiện S1 dạng oligomer của trimer dựa vào tương tác S-tag và S-protein. Đây là hai sản phẩm được tạo ra từ sự phân cắt giới hạn của RNase A với subtilisin. S-tag có chứa acid amin từ 1-20, trong khi đó protein S có chứa acid amin từ 21-124. Hai

đoạn này hình thành phức hợp ổn định gọi là RNase S, với khả năng bảo toàn hoạt tính ribonuclease. Phan Trọng Hoàng và đồng tác giả (2017) đã chứng minh rằng việc đồng biểu hiện kháng nguyên H5 trimer dung hợp S tag với kháng nguyên S protein-tp tạo ra H5 oligomer có khối lượng phân tử lớn hơn và có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt hơn khi gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu nào về sự biểu hiện của protein S1 trimer và oligomer ở thực vật. Như vậy, xuất phát từ những cơ sở khoa học và thực tiễn trên, việc nghiên cứu thiết kế và biểu hiện protein S1 trimer và S1 oligomer dựa vào tương tác S-tag và S-protein-tp ở thực vật là có triển vọng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của protein S1 tái tổ hợp trong cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện tạm thời.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vật liệu thực vật

Cây thuốc lá *N. benthamiana* 4-5 tuần tuổi được trồng thủy canh trong nhà kính ở 22°C, chiếu sáng 16 giờ sáng/8 giờ tối, độ ẩm 55% tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học

Vector, chủng vi khuẩn và kháng thể

Vector pRTRA-35S-SP-H5-GCN4pII-His-cmyc-KDEL, pRTRA-35S-SP-H5-GCN4pII-Stag-His-cmyc-KDEL và pCB301-35S-SP-Sprotein-tp-His-cmyc-KDEL do Phan Trọng Hoàng và đtg (2013, 2017) cung cấp. Vector pCB301-Kan được cung cấp bởi Xiang và đtg (1999).

Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α được sử dụng như tế bào chủ cho bước nhân dòng gen; Chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 PGV2260 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Kháng thể kháng cmyc được cung cấp bởi Viện Di truyền thực vật và Nghiên cứu cây

trồng, CHLB Đức. Kháng thể anti-mouse IgG cộng hợp HRP (Invitrogen).

Cấp môi sử dụng

Cấp môi 35S-SQF (5'- CACTGACGTAAG GGATGACGC-3') và 35S-Term (5'- CTGGGAAGTACTCACACA-3') được sử dụng để khuếch đại và giải trình tự gen S1. Môi được tổng hợp bởi Công ty LTD Sinh hóa Phù Sa, Việt Nam.

Phương pháp

Thiết kế vector tách dòng gen mã hóa protein S1 của PEDV

Đoạn DNA mã hóa protein S1 (1-2316 nucleotide) của chủng PEDV đang gây bệnh ở Việt Nam (có mã số truy cập GenBank: KT941120) được gắn hai đầu với trình tự của enzyme *Bam*HI ở đầu N và *Psp*OMI (*Bsp*120I) ở đầu C, tối ưu mã biểu hiện trong thuốc lá và tổng hợp nhân tạo bởi Công ty POCH (Life Science Missouri City, Texas 77489), sau đó được gắn vào vector tách dòng. Để thu đoạn DNA mã hóa protein S1, vector tách dòng được nhân dòng trong *E. coli* DH5 α , sau đó plasmid được tách chiết và xử lý với enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Bsp*120I theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Fisher Scientific). Đồng thời vector tách dòng pRTRA-35S-SP-H5-GCN4pII-His-cmyc-KDEL và pRTRA-35S-SP-H5-GCN4pII-Stag-His-cmyc-KDEL cũng được xử lý bằng *Bam*HI và *Bsp*120I, để loại bỏ gen mã hóa protein H5. Đoạn DNA mã hóa protein S1 sau đó được gắn vào 2 vector pRTRA trên bằng enzyme T4 ligasse theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Fisher Scientific). Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường thạch LB bổ sung kháng sinh chọn lọc carbenicilin 50 mg/L.

Để chọn những dòng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pRTRA-35S-SP-S1-GCN4pII-His-cmyc-KDEL (viết tắt là pRTRA-S1-pII) và pRTRA-35S-SP-S1-GCN4pII-Stag-His-cmyc-KDEL (viết tắt là pRTRA-S1-pII-Stag), chúng tôi tiến hành phản ứng PCR khuẩn lạc sử dụng cặp môi 35S-SQF/35S-Term. Thành phần của phản ứng PCR khuẩn lạc bao gồm: 25 μ L hỗn

hợp bao gồm 0,15 μ M primer; 0,1 μ M dNTP; 1,25U Pwo SuperYield DNA polymerase, 2,5 μ L đệm 10X Pwo SuperYield PC và 20 ng khuôn. Quá trình nhân đoạn gồm các bước sau: 94°C/3 min; 32 chu kỳ lặp lại các bước 94°C/30 s, 55°C/50 s, 72°C/1 min; 72°C/10 min, sản phẩm được giữ ở 4°C và điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Tiếp đến, plasmid tái tổ hợp được xác nhận bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI và *Bsp*120I. Cuối cùng plasmid pRTRA mang gen mã hóa protein S1 được giải trình tự động theo phương pháp của Sanger và đtg (Sanger et al., 1977) sử dụng cặp môi 35S-SQF và 35S-Term. Các trình tự nucleotide được phân tích bằng BioEdit 7.0 và Lasergen 7 (DNASTarinc., Madison, WI, USA).

Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen mã hóa protein S1 của PEDV

Các vector pRTRA có chứa đoạn gen mã hóa của kháng nguyên S1 và pCB301 được phân cắt bằng *Hind*III và loại bỏ gốc phosphate với SAP. Sản phẩm ghép nối DNA vào vector pCB301 được 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. Các plasmid tái tổ hợp pCB301-35S-SP-S1-GCN4pII-His-cmyc-KDEL và vector pCB301-35S-SP-S1-GCN4pII-Stag-His-cmyc-KDEL sau khi được chọn dòng bằng PCR khuẩn lạc với cặp môi 35SQF và 35S-Term được cắt bằng enzyme giới hạn *Nco*I sẽ được biến nạp vào vi khuẩn *A.tumefaciens* C58C1/pGV2260 bằng phương pháp xung điện để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời.

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

Hai khuẩn lạc của chủng *A. tumefaciens* mang vector chứa gen mã hóa cho protein Hcpro và hai khuẩn lạc của hai chủng *A. tumefaciens* mang từng vector pCB301 tái tổ hợp được cho vào mỗi ống falcon riêng biệt có chứa 5 mL LB có bổ sung kháng sinh chọn lọc carbenicilin 50 mg/L, kanamycin 50 mg/L, rifamycin 50 mg/L. Khuẩn được nuôi lắc 120 rpm/min, 14-16 h ở 28°C. Tiếp tục chuyển toàn bộ dịch khuẩn nuôi cấy trên vào bình chứa 50

mL LB và tiếp tục nuôi khoảng 14-16 h. Khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 5000 rpm/min trong 10 min ở 4°C. Cặn khuẩn *A. tumefaciens* chứa cấu trúc mang gen mã protein S1-GCN4pII, protein S1-GCN4pII-Stag hoặc cặn khuẩn chứa cấu trúc mang gen mã protein S1-GCN4pII-Stag và S protein-tp (cho việc đồng biểu hiện S1 oligomer) được trộn với cặn khuẩn mang cấu trúc mang gen mã hóa HcPro, sau đó được hòa tan trong đệm MES (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, pH 5,6) tới khi OD₆₀₀ đạt giá trị 1. Dịch huyền phù vi khuẩn được dùng cho biến nạp vào các lá non trên cây *N. benthamiana* bằng hút chân không trong thời gian 1 min 30 s, 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 6 ngày biến nạp, toàn bộ lá được thu và bảo quản ở -80°C.

Đánh giá sự biểu hiện tạm thời của protein S1 tái tổ hợp trong cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng Western blot

Mẫu lá thuốc lá được cho vào ống 2 mL đã được bổ sung 2 viên bi trước đó, sau đó được làm lạnh trong Nitơ lỏng. Mẫu lá được nghiền bằng máy Mixer Mill MM 300 (Retsch, Haan, Germany), sau đó protein tổng số được chiết 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 min và ly tâm 19.000 rpm, 30 min, 4°C. Mười đến ba mươi 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 (Thermo Fisher scientific) ở 25V, 1,3A trong 20 min. Sau khi được blocking bằng sữa tách béo 5% pha trong PBS qua đêm, màng được ủ với kháng thể kháng cmyc trong 2 h. Tiếp đến màng được rửa ba lần với sữa 0,5% pha trong PBS, mỗi lần cách nhau 5 min. Sau đó màng được ủ với kháng thể anti-mouse IgG cộng hợp HRP trong 1 h. Sau đó, màng tiếp tục được rửa ba lần với sữa 0,5% pha trong PBS, mỗi lần cách nhau 5 min, và lần cuối với PBS. Sự có mặt của S1 gắn cmyc trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất DAB dưới sự có mặt của 0,04% H₂O₂. Mức độ biểu hiện của các protein

được bán định lượng dựa vào độ sáng của băng sau khi định lượng bằng phần mềm ImageJ và đường chuẩn được xây dựng dựa trên nồng độ protein chuẩn TNF-ELP (100 ng, 200 ng, 400 ng, 800 ng).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector tách dòng gen mã hóa protein S1 của PEDV

Thông tin về trình tự gen mã hóa protein S1 của các chủng PEDV đã gây bệnh ở Việt Nam được thu thập từ Ngân hàng gen quốc tế NCBI và dựa trên các công bố của Kim và đồng tác giả (2015). Theo Kim và đtg (2015), khi phân tích đa dạng di truyền của các trình tự nucleotide mã hóa protein S của các chủng PEDV từ Việt Nam cho thấy có 2 nhóm khác nhau. Chủng PEDV (HUA-PED45 và HUA-PED47) thuộc nhóm G2b, cùng nhóm với các chủng của Trung Quốc, Mỹ và Hàn Quốc đã bùng nổ vào các năm 2010, 05/2013 và 11/2013. Trong khi đó, 6 chủng thu thập ở Quảng Trị lại thuộc nhóm G1b, cùng nhóm với các chủng ở Trung Quốc và Mỹ. Như vậy, các chủng PEDV của Việt Nam được xác định trên lơn có genotype thuộc cả 2 nhóm G2b và G1b.

Sau khi tìm kiếm và khai thác thông tin trên Ngân hàng gen quốc tế NCBI, chúng tôi đã lựa chọn được trình tự nucleotide của gen mã hóa cho kháng nguyên S1 của chủng PEDV (với mã số GenBank: KT941120) bao gồm 2316 nucleotide mã hóa cho 772 acid amin. Khi biểu hiện trong tế bào thực vật, với mục đích giữ lại protein kháng nguyên S1 ở lưới nội chất, chúng tôi đã loại bỏ chuỗi peptide tín hiệu gồm 18 acid amin dẫn đầu. Đồng thời, trong quá trình thiết kế vector chuyển gen sau này, chúng tôi sẽ sử dụng đoạn trình tự gồm 75 nucleotide mã hóa cho LeB4 ER-signal peptide là đoạn peptide tín hiệu của gen *LeB4* (mã hóa cho protein legumin type B ở cây đậu ngự *Vicia faba*) để nối ghép với đoạn gen *S1*.

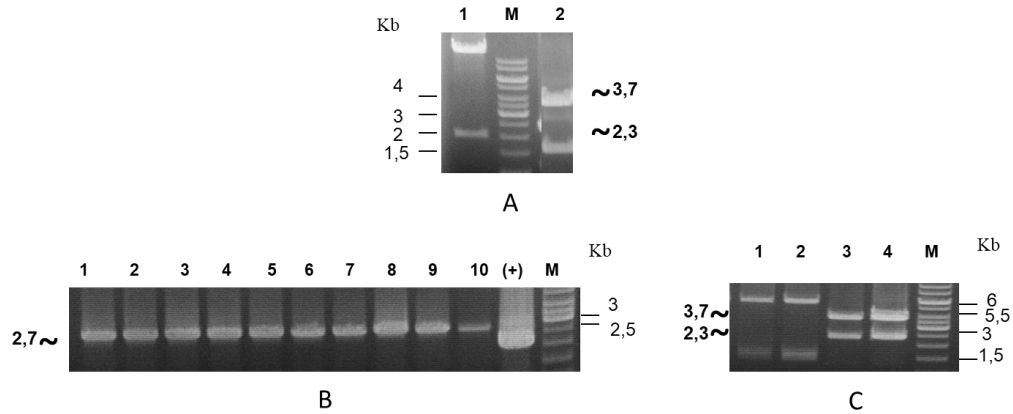
Để cải biến mã theo hướng phù hợp với bộ máy sản xuất protein của thực vật, các codon hiếm và các trình tự gây bất ổn cho quá trình

phiên mã như ATTTA đã được loại bỏ. Mặc khác, để thuận tiện cho việc cắt và nối ghép gen trong quá trình thiết kế vector chuyển gen vào thực vật, hai vị trí nhận biết của *Bam*HI và *Bsp*120I được thêm vào đầu 5' và 3' của gen *S1*. Việc đổi mã được chúng tôi thực hiện dựa trên cơ sở các bộ mã thay đổi sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện ở thực vật nhưng không làm thay đổi trình tự của acid amin. Trình tự nucleotide và trình tự acid amin suy diễn của các đoạn gen trước và sau khi đổi mã được kiểm tra và so sánh bằng phần mềm BioEdit. Kết quả cho thấy, các vị trí sai khác không làm ảnh hưởng đến quá trình dịch mã, trình tự axit amin suy diễn từ các gen vẫn đạt độ tương đồng là 100%. Trình tự gen *S1* đã đổi mã và thiết kế thêm các điểm cắt của *Bam*HI và *Bsp*120I được đặt tổng hợp nhân tạo và nhân dòng trong vector thương mại pEZ-Amp-S1.

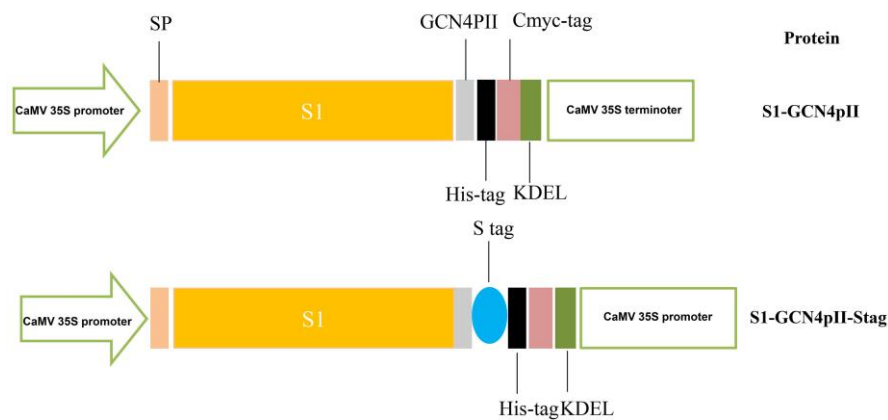
Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pEZ-Amp-S1 với *Bam*HI và *Bsp*120I để thu nhận đoạn gen mã hóa protein S1 và sản phẩm cắt plasmid pRTRA tái tổ hợp với *Bam*HI và *Bsp*120I được thể hiện ở hình 1A. Kết quả thu được các băng đoạn đúng như kích thước lý thuyết của gen mã hóa S1 (khoảng 2,3 kb), khung vector pRTRA chứa cassette biểu hiện (khoảng 3,7 kb). Kết quả kiểm tra các dòng khuẩn lạc mang plasmid pRTRA tái tổ hợp bằng PCR khuẩn lạc được thể hiện ở hình 1B. Kết quả thu được các băng đúng kích thước lý thuyết. Trong phản ứng PCR khuẩn lạc, khi sử dụng cặp môi 35-SQR/35-Term sẽ nhận được đoạn có kích thước 2788 bp. Trong khi đó, để chọn đúng plasmid tái tổ hợp, khi xử lý với *Bam*HI và *Bsp*120I, kết quả cho các băng có kích thước tương ứng là khoảng 2,3 kb (kích thước của gen S1) và 3,7 kb (kích thước của khung vector pRTRA). Dòng khuẩn lạc số 3 và số 4 cho các băng thu được đúng so với tính toán: khoảng 2,7 kb (tương ứng với kích thước của gen S1 + promoter 35S) trong phản ứng PCR khuẩn lạc (hình 1B) và 2 băng khoảng 2,3 kb (tương ứng với kích thước của gen S1) và 3,7 kb (tương ứng với kích thước của khung vector pRTRA) sau khi xử lý bằng *Bam*HI và *Bsp*120I (hình 1C). Kết quả, chúng tôi đã thu

được dòng plasmid tái tổ hợp mang vector pRTRA-S1-pII và vector pRTRA-S1-pII-Stag.

Sơ đồ cassette biểu hiện của hai cấu trúc trên được trình bày ở Hình 2.



Hình 1. Kết quả thiết kế vector tách dòng mang gen mã hóa S1 tái tổ hợp của PEDV. **A.** Kết quả xử lý vector thương mại pEZ-Amp-S1 và vector pRTRA-35S-SP-H5-GCN4pII-His-cmyc-KDEL bằng enzyme *Bam*HI và *Bsp*120I. **B.** Kết quả PCR khuẩn lạc chọn lọc các dòng khuẩn lạc mang gen mã hóa S1 tái tổ hợp bằng cặp mồi 35SSQF /35Term; 1-5: dòng khuẩn lạc mang cấu trúc pRTRAS1-pII; 6-10: dòng khuẩn lạc mang cấu trúc pRTRA S1-pII-Stag. (+): Đối chứng dương; plasmid pRTRA-35S-SP-COE-GCN4pII-Stag-His-cmyc-KDEL. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) **C.** Kết quả điện di sản phẩm sau khi xử lý với enzyme *Bam*HI và *Bsp*120I chọn lọc các dòng khuẩn pRTRA tái tổ hợp mang gen mã hóa S1. 1,3: dòng plasmid mang cấu trúc pRTRAS1-pII; 2,4: dòng plasmid mang cấu trúc pRTRA -S1pII-Stag.



Hình 2. Sơ đồ cassette biểu hiện mang gen mã hóa protein S1 tái tổ hợp.

Thiết kế vector biểu hiện mang cấu trúc pCB301-S1-pII và pCB301-S1-pII-Stag và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp tương ứng

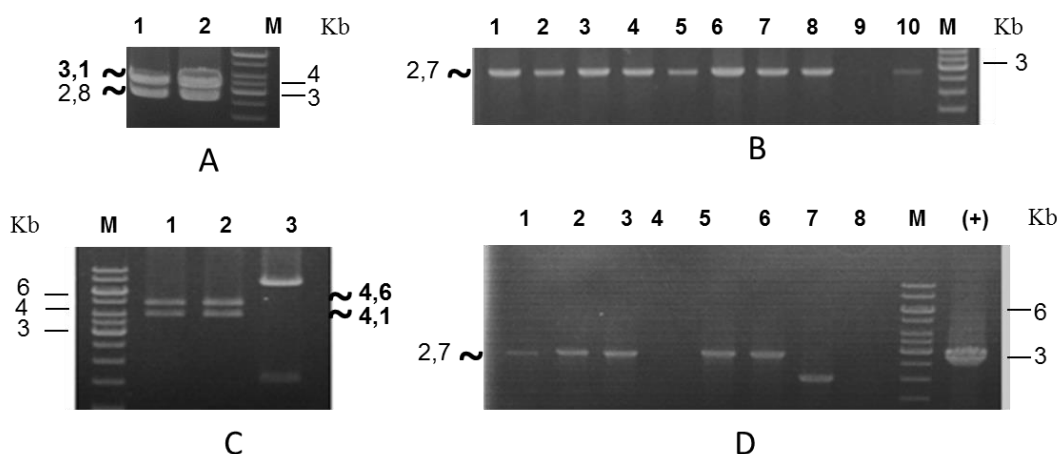
Kết quả điện di sản phẩm sau khi xử lý vector pRTRA tái tổ hợp với *Hind*III để thu cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa S1-GCN4pII và S1-GCN4pII-Stag thu được các

băng vạch đúng theo kích thước tính toán lý thuyết của cassette biểu hiện (khoảng 3,1 kb), được thể hiện ở Hình 3A. Kết quả kiểm tra plasmid pCB301 tái tổ hợp mong muốn bằng phản ứng PCR khuẩn lạc và cắt bằng *Nco*I được thể hiện ở Hình 3B, 3C. Dòng khuẩn lạc số 1 và số 2 cho các băng vạch thu được đều đúng so với tính toán lý thuyết (4,1 kb và 4,6 kb) với đúng chiều quan tâm. Kết quả trên cho thấy

chúng tôi đã thiết kế thành công 2 vector chuyên gen pCB301-S1-pII và pCB301-S1-pII-Stag.

Để biểu hiện các protein tái tổ hợp ở thực vật, các plasmid tái tổ hợp đã được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* C58C1. Kết quả điện

di sản phẩm PCR khuẩn lạc thu được các băng vạch theo đúng kích thước lý thuyết (khoảng 2,7 kb), kết quả thể hiện qua Hình 3D. Kết quả PCR khuẩn lạc cho thấy chúng tôi đã tạo được dòng *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp tương ứng.



Hình 3. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa protein S1 tái tổ hợp. A. Kết quả xử lý vector pRTRA-S1-pII và pRTRA-S1-pII-Stag bằng enzyme *Hind*III. 1. Xử lý vector pRTRA-S1-pII; 2. Xử lý vector pRTRA-S1-pII-Stag; B. Kết quả PCR khuẩn lạc chọn lọc các dòng khuẩn lạc mang gen mã hóa S1; 1-5: Dòng khuẩn lạc chứa vector pCB301S1-pII. 6-10: Dòng khuẩn lạc mang vector pCB301 -S1-pII-Stag. C. Kết quả điện di sản phẩm sau khi xử lý với enzyme *Nco*I chọn lọc các dòng khuẩn pCB301 tái tổ hợp mang gen mã hóa S1. 1: các dòng ngược chiều chứa vector pCB301 -S1-pII; 2: dòng ngược chiều chứa vector pCB301 -S1-pII-Stag; 3: dòng xuôi chiều; D. Kết quả chọn dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp bằng PCR khuẩn lạc; 1-4: Dòng khuẩn lạc chứa vector pCB301 -S1-pII. 6-10: Dòng khuẩn lạc mang vector pCB301S1-pII-Stag, (+) đối chứng dương: plasmid pCB301 tái tổ hợp mang gen S1 được sử dụng làm khuôn. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Đánh giá sự biểu hiện tạm thời của các protein S1 tái tổ hợp ở thực vật

Sự biểu hiện tạm thời của các protein S1 tái tổ hợp được đánh giá bằng phản ứng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc. Kết quả kiểm tra sự biểu hiện của các protein S1 được thể hiện ở Hình 4. Kết quả cho thấy, các protein S1-GCN4pII và S1-GCN4pII-Stag đã được biểu hiện trong thuốc lá, tuy nhiên, theo tính toán lý thuyết, kích thước protein S1 tái tổ hợp là 86,9 kDa, kích thước thực tế thu được là khoảng 150 KDa. Điều này có thể được giải thích là do trên protein S1 có các vị trí N-glycosylation (Makadiya *et al.*, 2016), điều này làm ảnh hưởng đến sự di chuyển của protein trong quá trình điện di. Mức độ biểu hiện của các protein

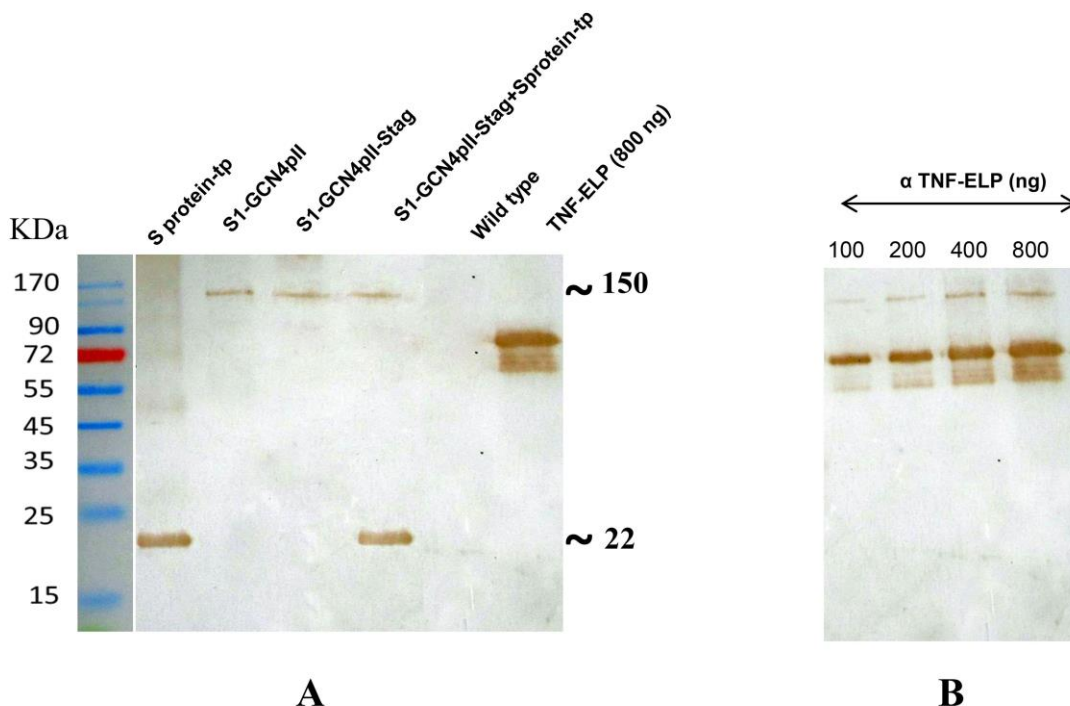
S1 tái tổ hợp trong thực vật được tính toán dựa vào độ đậm, nhạt của các băng vạch khi phân tích bằng phần mềm ImageJ sử dụng đối chứng dương TNF-ELP (Conrad *et al.*, 2011) (100 ng, 200 ng, 400 ng, 800 ng) để xây dựng đường chuẩn. Mức độ biểu hiện của các protein S1 trimer và S1 trimer S-tag sau khi được tính toán là 0,005% protein tan tổng số. Như vậy, việc dung hợp S-tag không làm ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của protein. Trong khi đó, sự biểu hiện của S protein-tp lại cao hơn. Mức độ biểu hiện của S-protein được tính toán là khoảng 0,25% protein tan tổng số.

Khi đồng biến nạp chủng *A. tumefaciens* mang cấu trúc pCB301-35S-SP-S1-GCN4pII-His-cmyc-KDEL và pCB301-35S-SP-S1-

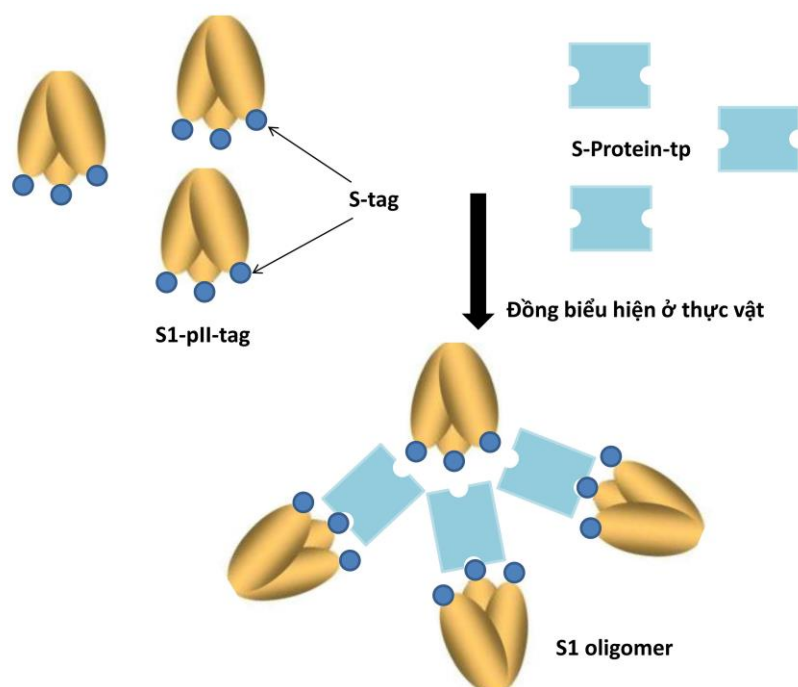
GCN4pII-Stag-His-cmyc-KDEL, S1 oligomer được hình thành dựa vào tương tác của S-tag và S protein, mô hình tạo thành S1 oligomer được mô phỏng ở Hình 5. Nghiên cứu trước đây cho thấy rằng, chỉ có 15 acid amin ở đầu N của RNase A (1-15 aa-S tag) là cần thiết cho việc tái thiết lập toàn bộ hoạt động RNase S với S protein (Kim *et al.*, 1993). Trong quá trình này, S-tag kết hợp với S-protein đã được cuộn gấp và sau đó tái cuộn gấp. Hiện tại, tương tác của S-tag và S-protein đã được áp dụng để phát hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp dựa vào tinh sạch ái lực. Hơn nữa, sự tương tác ái lực cao giữa S-protein và S-tag ($K_d=1.1 \times 10^{-7}$ M) đã được sử dụng để dẫn thuốc (Asai *et al.*, 2005).

Sự biểu hiện của từng protein S1-GCN4-Stag và S protein-tp ở trong thuốc lá khi đồng biểu hiện cũng được xác nhận bằng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của các protein cũng tương đối thấp, chỉ chiếm 0,255% protein tan tổng số. Chưa có một công bố nào về sự biểu hiện của protein S1 ở thực vật. Việc biểu hiện protein S1

tái tổ hợp đã được nghiên cứu trong các đối tượng khác như trong baculovirus, nấm men, tế bào động vật (Makadiya *et al.*, 2016). Các nghiên cứu về sự biểu hiện protein tái tổ hợp của PEDV ở thực vật chủ yếu tập trung vào biểu hiện một phần của S1, vùng chứa epitope trung hòa CO-26K equivalent (COE). Sự biểu hiện của S1-COE trong các cây trồng chuyển gen như lúa, ngô, thuốc lá... dao động từ 0,083% đến 2,1% (Bae *et al.*, 2003; Huy *et al.*, 2012; Kun *et al.*, 2014). Trong những nỗ lực nghiên cứu để tăng cường mức độ biểu hiện protein ở thực vật, Phan Trọng Hoàng và đtg (2013) đã chứng minh rằng protein H5 dung hợp ELP đã giúp tăng cường biểu hiện rất nhiều lần protein H5 không dung hợp ELP (Phan *et al.*, 2013). Vì vậy, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung để tăng cường sự biểu hiện của toàn bộ protein S1 tái tổ hợp bằng cách dung hợp thêm các motif như ELP hoặc biểu hiện vùng S1-COE trong thực vật, sau đó đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên động vật thí nghiệm.



Hình 4. Đánh giá sự biểu hiện của các protein S1 tái tổ hợp ở thực vật bằng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc. Ba mươi µg protein tan tổng số được điện di trên SDS-PAGE gel 4-12%.



Hình 5. Mô phỏng sự hình thành S1 oligomer ở thực vật dựa vào tương tác S-tag và S-protein.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế và biểu hiện thành công protein S1 tái tổ hợp dung hợp GCN4pII, GCN4pII-Stag. Mặc dầu, mức độ biểu hiện của protein S1 trimer và protein S1 oligomer tạo ra nhờ tương tác S-tag và S-protein-tp là tương đối thấp, tuy nhiên đây là nghiên cứu đầu tiên về việc biểu hiện protein S1 ở thực vật, điều này sẽ là tiền đề cho việc phát triển vaccine tiểu đơn vị ở thực vật phòng chống sự lây nhiễm của PEDV.

Lời cảm ơn: Kết quả nghiên cứu này thuộc đề tài “Nghiên cứu biểu hiện S1 oligomer tái tổ hợp của Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) - gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* định hướng tạo vaccine thế hệ mới”, mã số đề tài VAST02.02/18-19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Asai T, Wims LA, Morrison SL (2005) An interaction between S tag and S protein derived from

human ribonuclease 1 allows site-specific conjugation of an enzyme to an antibody for targeted drug delivery. *J Immunol Methods* 299: 63-76.

Bae JL, Lee JG, Kang TJ, Jang HS, Jang YS, Yang MS (2003) Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine* 21: 4052-4058.

Chang SH, Bae JL, Kang TJ, Kim J, Chung GH, Lim CW, Laude H, Yang SM, Jang SY (2002) Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells* 14: 295-299.

Chen Q, Lai H, Hurtado J, Stahnke J, Leuzinger K, Dent M (2013) Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins. *Adv Tech Biol Med* 1: 103. doi: 10.4172/atbm.1000103.

Chiou HY, Huang YL, Deng MC, Chang CY, Jeng CR, Tsai PS, Yang C, Pang VF, Chang HW (2015) Phylogenetic analysis of the spike (S) gene of the new variants of porcine epidemic diarrhoea virus in taiwan. *Transbound Emerg Dis* 64: 157-166. doi: 10.1111/tbed.12357.

- Conrad U, Plagmann I, Malchow S, Sack M, Floss DM, Kruglov AA, Nedospasov SA, Rose-John S, Scheller J (2011) ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol J* 9: 22–31 doi: 10.4172/2379-1764.1000103.
- Cruz DJ, Kim CJ, Shin HJ (2008) The GPRLQPY motif located at the carboxyterminal of the spike protein induces antibodies that neutralize porcine epidemic diarrhea virus. *Virus Res* 132:1926.
- Deng F, Ye G, Liu Q, Navid MT, Zhong X, Li Y, Wan C, Xiao S, He Q, Fu ZF, Peng G (2016) Identification and comparison of receptor binding characteristics of the spike protein of two porcine epidemic diarrheavirus strains. *Viruses*. doi: 10.3390/v8030055.
- Jung K, Saif LJ (2015) Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *Vet J* 204: 134–143.
- Huy NX, Kim SH, Yang MS, Kim TG (2012) Immunogenicity of a neutralizing epitope from porcine epidemic diarrhea virus: M cell targeting ligand fusion protein expressed in transgenic rice calli. *Plant Cell Rep* 31: 1933-1942.
- Khamis Z (2016) Producing a subunit vaccine for porcine epidemic diarrhea virus. Electronic thesis and dissertation. *Repository*: 4296.
- Kim YK, Lim SI, Lim JA, Cho IS, Park EH, Le VP, Hien NB, Thach PN, Quynh do H, Vui TQ, Tien NT, An DJ (2015) A novel strain of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnamese pigs. *Arch Virol* 160(6):1573-7.
- Kim JS, Raines RT (1993) Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins. *Protein Sci* 2: 348–356.
- Kun M, BingY, Jing X, XiangJie Q, HongZhuan Z, FuZhou X, ChengYang X, FengPing Y, LiQuan Z, XiangLong L (2014) Expression of core neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in maize. *JASFT* (Beijing) 16, 28-35.
- Langel SN, Paim FC, Lager KM, Vlasova AN, Saif LJ (2016) Lactogenic immunity and vaccines for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): historical and current concepts. *Virus Res* 226: 93–107.
- Lee C (2015) Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology* 12:193.
- Makadiya N, Brownlie R, van den Hurk J, Berube N, Allan B, Gerds V, Zakhartchouk A (2016) S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. *Virology* 13:57.
- Oldham J (1972) Letter to the editor. *Pig Farming* 10:72-3.
- Park SJ, Kim HK, Song DS, An DJ, Park BK (2012) Complete genome sequences of a Korean virulent porcine epidemic diarrhea virus and its attenuated counterpart. *J Virol* 86: 5964.
- Phan HT, Ho TT, Chu HH, Vu TH, Gresch U, Conrad U (2017) Neutralizing immune responses induced by oligomeric H5N1-hemagglutinins from plants. *Vet Res* 48: 53.
- Phan HT, Pohl J, Floss DM, Rabenstein F, Veits J, Le BT, Chu HH, Hause G, Mettenleiter T, Conrad U (2013) ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice. *Plant Biotechnol J* 11: 582-93.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sato T, Takeyama N, Katsumata A, Tuchiya K, Kodama T, Kusanagi K (2011) Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo. *Virus Genes* 43: 72–78.
- Song D, Park B (2012) Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44: 167-75.
- Suzuki T, Murakami S, Takahashi O, Kodera A, Masuda T, Itoh S, Miyazaki A, Ohashi S, Tsutsui T (2015) Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infect Genet Evol* 36:363– 8.
- Tian Y, Yu Z, Cheng K, Liu Y, Huang J, Xin Y, Li Y, Fan S, Wang T, Huang G, Feng N, Yang Z, Yang S, Gao Y, Xia X (2013) Molecular characterization and phylogenetic analysis of new variants of the

porcine epidemic diarrhea virus in Gansu, China in 2012. *Viruses* 5: 1991–2004.

Topp E, Irwin R, McAllister T, Lessard M, Joensuu JJ, Kolotilin I, Conrad U, Stöger E, Mor T, Warzecha H, Hall JC, McLean MD, Cox E, Devriendt B, Potter A, Depicker A, Viridi V, Holbrook L, Doshi K, Dussault M, Friendship R, Yarosh O, Yoo HS, MacDonald J, Menassa R (2016) The case for plantmade veterinary immunotherapeutics. *Biotechnol Adv* 34:597–604. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.02.007

Wang X, Chen J, Shi D, Shi H, Zhang X, Yuan J, Jiang S, Feng L (2016) Immunogenicity and antigenic relationships among spike proteins of porcine epidemic diarrhea virus subtypes G1 and G2. *Arch Virol* 161:537–47.

Walls AC, Tortorici MA, Bosch BJ, Frenz B, Rottier PJM, DiMaio F (2016) Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature*. 531: 114–117. doi: 10.1038/nature16988.

29. Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver D (1999) A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol Biol* 40:711.

TRANSIENT EXPRESSION OF RECOMBINANT S1 PROTEIN OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS IN *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Ho Thi Thuong¹, Le Thu Ngoc¹, Nguyen Thu Giang¹, Trinh Thai Vy¹, Phan Trong Hoang², Pham Bich Ngoc¹, Vu Huyen Trang¹, Hoang Thi Thu Hang¹, Chu Hoang Ha¹

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

²*Leibniz-Institute for Plant Genetic and Crop Plant Research, Germany*

SUMMARY

Porcine Epidemic Diarrhea (PED) is an infectious disease with high mortality especially in suckling piglets. Among the structural proteins of Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), the S protein (including sub-domain S1 and S2), is a homotrimer protein that plays an important role in attaching the viruses to the cell receptors. In particular, the S1 protein is considered as an important sub-component in the development of effective vaccines against PEDV. In this study, for the purpose of expressing S1 in the original form of trimer and oligomer of trimer based on S-tag and S-protein interactions, the DNA encoding for S1 protein was fused with GCN4pII or GCN4pII-S-tag, was then inserted to the pRTRA cloning vector under the control of the 35S CaMV promoter. After that, the whole cassette was inserted into the pCB301 vector and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* for transient expression on *Nicotiana benthamiana*. The expression of recombinant S1 proteins in tobacco was determined by Western blot. The results showed that the expression levels of S1 trimer and S1 trimer S-tag proteins were equal in plants, which also indicated that S-tag fusion did not affect the expression level of the S1 protein. However, the expression level of S1 proteins was relatively low, reaching 0.005% of total soluble protein. In addition, the expression of S1 trimer S-tag protein and Sprotein-tp protein by co-transformation of two *A. tumefaciens* strains containing corresponding vectors in plants were also determined by Western blot. This is a premise study for the development of subunit vaccines in plants that prevent the spread of PEDV.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, PEDV, plant-based vaccine, recombinant S1 protein, transient expression