

TỔNG HỢP VÀ BIỂU HIỆN GEN *CAFI* MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN F1 CỦA VI KHUẨN *YERSINIA PESTIS*

Nguyễn Thị Thu Hà¹, Nguyễn Phương Minh¹, Lê Trọng Tài¹, Phạm Tiến Dũng², Lê Quang Hòa²

¹Viện Hóa học, Môi trường Quân sự, Bộ Tư lệnh Hóa học

²Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

Ngày nhận bài: 05.4.2016

Ngày nhận đăng: 20.6.2016

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Yersinia pestis* là tác nhân gây bệnh dịch hạch, một trong những loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất được biết cho đến nay đã gây ra hàng triệu ca tử vong trên thế giới và có thể được sử dụng như một vũ khí sinh học có tính hủy diệt cao. Để chẩn đoán bệnh dịch hạch ở người cũng như phát hiện *Y. pestis* trong môi trường, người ta thường dựa trên việc phát hiện kháng nguyên nang F1 của loại vi khuẩn này. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm tạo kháng nguyên F1 của *Y. pestis* để làm nguyên liệu cho que thử sắc ký miễn dịch phát hiện nhanh *Y. pestis*. Do việc nuôi cấy *Y. pestis* để thu nhận kháng nguyên F1 hoặc DNA của vi khuẩn này rất khó khăn nên chúng tôi đã tiến hành tổng hợp nhân tạo gen mục tiêu *cafI*, mã hóa kháng nguyên F1, nhằm biểu hiện trong tế bào *Escherichia coli*. Sau khi tối ưu hóa mã bộ ba mã hóa amino acid (codon) cho *E. coli*, gen *cafI* đã được tổng hợp bằng phương pháp “gapless” PCR. Kết quả giải trình tự cho thấy phương pháp này cho phép tổng hợp được trình tự gen mục tiêu với độ chính xác là 2/6 dòng plasmid. Tiếp đó, trình tự gen này đã được đưa vào vector pET-52b(+) và biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) ở dạng dung hợp với đuôi ái lực (His)₁₀. Các kết quả điện di protein SDS-PAGE, tinh sạch protein bằng sắc ký ái lực Ni và Western blot cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp F1 đã được tạo ra thành công với hiệu suất lớn ở dạng thể vùi trong tế bào *E. coli*.

Từ khóa: Biểu hiện, dịch hạch, kháng nguyên F1, tổng hợp gen, *Yersinia pestis*

MỞ ĐẦU

Dịch hạch là một bệnh truyền nhiễm tiến triển cấp tính, cực kỳ nguy hiểm do vi khuẩn *Yersinia pestis* gây ra. Bệnh lưu hành trong quần thể một số loài động vật gặm nhấm (chủ yếu là chuột) và bộ chết ký sinh trên chúng rồi từ đó lây truyền sang người qua trung gian bộ chết nhiễm khuẩn. Trong lịch sử loài người được ghi nhận cho đến nay, dịch hạch là loại bệnh truyền nhiễm với số ca tử vong cao nhất (khoảng 200 triệu ca) (Perry, Fetherston, 1997). Hiện nay, bệnh dịch hạch vẫn đang lưu hành rải rác tại một số quốc gia trên thế giới. Trong những năm gần đây, tại Việt Nam không ghi nhận trường hợp nào mắc bệnh dịch hạch. Tuy nhiên, nguy cơ lây lan bệnh dịch hạch từ nước ngoài vào Việt Nam là rất lớn. Mặt khác, *Y. pestis* còn có thể được sử dụng như vũ khí sinh học với tính hủy diệt rất lớn, gây lo ngại cho cộng đồng quốc tế đặc biệt trong thời điểm hiện nay khi các vụ khủng bố liên tiếp diễn ra trên thế giới.

Về tác nhân gây bệnh, *Y. pestis* là trực khuẩn, Gram âm, không di động, không hình thành bào tử thuộc họ *Enterobacteriaceae*. Ở người và động vật,

vi khuẩn này sinh trưởng trong đại thực bào, lan tràn trong các tế bào dạng biểu mô sau đó lan ra toàn bộ cơ thể (Zhou *et al.*, 2006). Sau khi nhiễm vào cơ thể, *Y. pestis* tiết ra một protein nang được gọi là kháng nguyên F1, chỉ có ở *Y. pestis*. Do vậy, kháng nguyên này thường được sử dụng trong chẩn đoán bệnh dịch hạch hay phát hiện *Y. pestis* trong môi trường. Ở *Y. pestis*, quá trình tổng hợp và tiết kháng nguyên F1 được mã hóa bởi operon F1 bao gồm 4 gen *cafI*, *cafIM*, *cafIA* và *cafIR* nằm trên plasmid pMT1, trong đó *cafI* mã hóa kháng nguyên F1, *cafIM* và *cafIA* đóng vai trò trong việc tạo cấu trúc và tiết protein ra bên ngoài tế bào, *cafIR* đóng vai trò trong điều hòa quá trình phiên mã các gen trên operon (Zhou *et al.*, 2006). Về mặt cấu trúc, kháng nguyên F1 là một chuỗi polypeptide bao gồm 170 amino acid, khối lượng phân tử từ 17-17,6 kDa, điểm đẳng điện 4,1 - 4,4 (Andrews *et al.*, 1996; Galyov *et al.*, 1990). Kháng nguyên F1 là một protein có tính kỵ nước với cấu trúc bậc hai gấp nếp β (Andrews *et al.*, 1996; Galyov *et al.*, 1990).

Nhằm tạo kháng nguyên F1 làm nguyên liệu để chẩn đoán bệnh dịch hạch, nhiều nghiên cứu đã biểu

hiện protein kháng nguyên này trong tế bào *E. coli* (Andrews *et al.*, 1996; Erova *et al.*, 2013; Tsui *et al.*, 2015). Cách tiếp cận được sử dụng phổ biến là biểu hiện toàn bộ operon trong *E. coli* để tạo kháng nguyên F1 ở dạng ngoại bào tương tự như ở *Y. pestis* (Andrews *et al.*, 1996; Tsui *et al.*, 2015). Bên cạnh đó, Erova *et al.* (2013) đã biểu hiện trực tiếp gen *cafI* trong nội bào của *E. coli* với việc sử dụng vector biểu hiện pET-20b(+) (Erova *et al.*, 2013). Khi được biểu hiện ở dạng dung hợp với đuôi ái lực (His)₆ ở đầu cacboxyl, kháng nguyên F1 có thể được tạo ra ở trạng thái hòa tan (Erova *et al.*, 2013). Trong nghiên cứu này, để tránh các vấn đề liên quan đến an toàn sinh học, chúng tôi đã tiến hành tổng hợp nhân tạo gen *cafI* và đưa gen này vào vector pET-52b(+) để biểu hiện kháng nguyên F1 ở dạng dung hợp với đuôi ái lực (His)₁₀ ở đầu cacboxyl tương tự như nghiên cứu của Erova và đồng tác giả.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật

Chủng *E. coli* TOP10 [F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139* Δ(*araleu*)7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*] (Thermoscientific) được sử dụng để nhân dòng gen. Chủng *E. coli* BL21 (DE3) [F- *ompT hsdSB* (rBmB-) *gal dcm* (DE3)] (Thermo Scientific Inc.) được sử dụng để biểu hiện.

DNA và hệ vector

Vector pJET 1.2 (Thermo Scientific Inc.) được sử dụng để nhân dòng gen. Hệ vector pET52b(+) (Merck) được sử dụng cho mục đích biểu hiện gen. Trình tự gen mã hóa cho CafI được lấy trên GenBank (mã số KM880026) và tối ưu hóa mã bộ ba mã hóa amino acid.

Thiết kế gen *cafI*

Dựa trên trình tự gen *cafI* trên GenBank, chúng tôi sử dụng công cụ tìm kiếm chuỗi bắt cặp (BLAST) và công cụ phân tích mã bộ ba hiếm (GenScript) để tối ưu bộ ba mã hóa cho chuỗi amino acid.

Tổng hợp gen *cafI*

Với trình tự DNA đã tối ưu, chúng tôi thiết kế 22 oligos (Bảng 1), độ dài các đoạn dao động từ 30 đến 50 mer (Lei, Qihan, 2002). Các oligo liền kề có các trình tự DNA được gộp lên nhau. Một cặp mỗi ngắn (Mỗi F1) được thiết kế thêm vị trí cắt của 2 enzyme

giới hạn *NcoI* và *SacI* để ghép nối gen sau này (Bảng 1). Các đoạn oligos và môi được tổng hợp bởi Công ty Sinh hóa Phù Sa. Quá trình tổng hợp gen gồm 2 giai đoạn:

Giai đoạn 1 (tạo đoạn gen) với 22 đoạn oligos được thiết kế gộp lên nhau, đoạn oligonucleotide được tổng hợp bằng phản ứng PCR tự môi, hỗn hợp môi 0,3 μM, sử dụng enzyme *Pfu* polymerase. Chu trình nhiệt: 94°C/30 giây, 53°C/15 giây, 72°C/15 giây.

Giai đoạn 2: nhân gen bằng kỹ thuật PCR bình thường với khuôn là sản phẩm PCR của giai đoạn 1, enzyme *Pfu* polymerase. Chu trình nhiệt: 94°C/2 phút, 58°C/30 giây, 72°C /15 giây.

Xây dựng hệ vector biểu hiện gen *cafI* (pET52b(+)-*cafI*)

Sản phẩm tổng hợp gen *cafI* được gắn vào vector tách dòng pJET1.2 và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10. Các dòng tế bào đã chọn lọc được PCR kiểm tra bằng cặp môi đặc hiệu và giải trình tự để xác định trình tự DNA.

Gen *cafI* trong vector tách dòng được cắt và gắn vào vector biểu hiện pET52b(+) bằng vị trí cắt của 2 enzyme *NcoI* và *SacI*. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3).

Biểu hiện gen

Vector biểu hiện mang gen *cafI* được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E. coli* BL21 để kiểm tra khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp. Sau khi nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB lỏng có chứa ampicilin 100 μg/ml (LBA), dòng tế bào mang gen được chuyển sang môi trường LBA lỏng mới với tỉ lệ 1/100. Nuôi cấy tế bào biểu hiện ở nhiệt độ 37 °C cho đến khi OD 600 của môi trường nuôi cấy đạt giá trị 0,6 - 0,8. Ngay sau đó, chất cảm ứng IPTG được thêm vào tới nồng độ cuối là 0,5 mM. Kết quả của sản phẩm protein tái tổ hợp được kiểm tra trên gel polyacryamide 12% (Hoefler, 1994).

Kiểm tra protein tái tổ hợp bằng Western blot

Protein tổng số thu được từ tế bào biểu hiện được xử lý bằng dịch phá mẫu (0,125 M Tris-HCl; 4% SDS; 20% Glycerol; 0,02% Bromophenol Blue; pH 6,8). Dịch protein được kiểm tra bằng SDS-PAGE trên gel polyacryamide 12% và chuyển lên màng PVDF nhờ hệ thống chuyển màng Trans blot semi dry (Bio-Rad). Màng chứa kháng nguyên được phủ bằng dung dịch khóa màng (Blocking) (5% sữa tách bơ trong dung dịch

đệm TBST (0,1% Tween 20 trong đệm Tris-saline)) trong 1 giờ. Sau khi rửa màng 3 lần bằng đệm TBST, màng được ủ với kháng thể 1 (kháng thể kháng His - HyTest), độ pha loãng 5.000 lần. Sau 1 giờ, màng được rửa lại bằng TBST 3 lần để loại bỏ hoàn toàn liên kết không đặc hiệu. Tiếp tục ủ màng với kháng thể 2 (kháng thể cộng hợp

enzyme peroxidase kháng chuột - HyTest), độ pha loãng 10.000 lần. Sau 2 giờ, màng được rửa lại 3 lần với đệm TBST và phát hiện bằng dung dịch chứa cơ chất cho peroxidase (Promega). Màng trong dung dịch cơ chất được ủ ở nhiệt độ phòng 5 - 10 phút, sau đó được dừng phản ứng bằng H₂O. Kết quả được xác định trên ánh sáng thường.

Bảng 1. Trình tự DNA các đoạn oligo.

STT	Tên oligos	Trình tự (5' - 3')	Chú thích
1	Oligo1	ATGAAGAAAATTCCTCTGTAATTGCCATTGCGCTCTTTG	
2	Oligo2	CAGCATTTCGAGTTGCAATGGTGCCAAAGAGCGCAATGGCAAT	
3	Oligo3	ATTGCAACTGCGAATGCTGCGGATCTGACCGCCTCG	
4	Oligo4	CGTAATACGTGCCGTTCTACAAGGGTCGCGGTGGCGGTAGTCGAGG CGGTCAGATCCG	
5	Oligo5	TAGAACCGGCACGTATTACGCTGACGTATAAAGAAGGTGCG	
6	Oligo6	TACCATTGTCCATAATGGTAATTGGCGCACCTTCTTTATACGTCAG	
7	Oligo7	CCAATTACCATTATGGACAATGGTAACATCGATACGGAACCTTTTAGTG	
8	Oligo8	ACCCAGCGTCAGAGTACCCACTAAAAGTTCGGTATCGATGT	
9	Oligo9	GGTACTCTGACGCTGGGTGGGTACAAAACCGGTACCAC	
10	Oligo10	CGGTGAAGTTCACGGAGGTGGAGGTGGTACCGGTTTTGTACCC	
11	Oligo11	CCTCCGTGAACCTTACCGACGCGGCAGGAGATCC	
12	Oligo12	CTGGCTGGTAAAGGTCAGATACATTGGATCTCCTGCCGCGT	
13	Oligo13	TATCTGACCTTTACCAGCCAGGACGGCAACAATCACCAGTTTAC	
14	Oligo14	TCTTTGCCAATCACTTTGGTCGTAAACTGGTGATTGTTGCCG	
15	Oligo15	GACCAAAGTGATTGGCAAAGACAGCCGCGATTTTCGATATCT	
16	Oligo16	TCGCCATTGACTTTCGGCGAGATATCGAAATCGCGGCTG	
17	Oligo17	GCCGAAAGTCAATGGCGAAAACCTGGTGGGAGATGATGTAGTTCTCGC CACGGG	
18	Oligo18	CCGATGCTCCGCACGAAAAAGTCCTGGGAGCCCGTGGCGGAGAACTACA	
19	Oligo19	TCGTGCGGAGCATCGGTAGCAAGGGAGGAAAGCT	
20	Oligo20	GGTATATTTACCCGCCAGCTTTCCCCCTTGCTA	
21	Oligo21	GGCGGCGGGTAAATATACCGACGCTGTTACCGTCACG	
22	Oligo22	TCACTGGTTGCTCACCGTGACGGTAAACAGCGTC	
23	F1-NcoI-F	ATACCATGGTGAAGAAAATTCCTCTGTAATTGC	Mỗi xuôi, thêm trình tự nhận biết của enzyme giới hạn NcoI
24	F1-SacI-R	TTAGAGCTCCTGGTTGCTCACCGTGAC	Mỗi ngược, thêm trình tự nhận biết của enzyme giới hạn SacI

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cải biến mã bộ ba và tổng hợp gen *cafl*

Dựa trên trình tự DNA trên GenBank, chúng tôi đã cải biến mã bộ ba: tỉ lệ GC ban đầu từ 44% lên

52,3%, chỉ số tương thích mã bộ ba (CAI) từ 0,67 lên 0,79 (Hình 1).

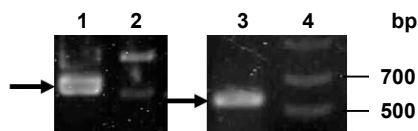
Sau đó 22 đoạn oligo được thiết kế để tổng hợp gen mà không cần trình tự khuôn của gen này. Để tổng hợp thành công, quá trình được thiết lập gồm

hai giai đoạn chính. Giai đoạn 1 là tạo gen khuôn từ 22 đoạn oligo bằng kỹ thuật PCR tự môi. Giai đoạn 2 là tạo thành đoạn gen *cafI* hoàn chỉnh bằng kỹ thuật PCR với khuôn là sản phẩm PCR của giai đoạn 1.

```

atgaagaaaatttcctctgtaattgccattgcgctctttggcaccattgcaactgccaat
M K K I S S V I A I A L F G T I A T A N
gctgcgatctgaccgcctcgactaccgccaccgacccctttagaaccggcacgtatt
A A D L T A S T T A T A T L V E P A R I
acgctgacgtataaagaaggtgcgccaattaccattatggacaatggtaacatcgatacg
T L T Y K E G A P I T I M D N G N I D T
gaacttttagtggtactctgacgctgggtgggtacaaaaccgggtaccacctccacctcc
E L L V G T L T L G G Y K T G T T S T S
gtgaacttcaccgacgcggcaggagatccaatgtatctgacctttaccagccaggacggc
V N F T D A A G D P M Y L T F T S Q D G
aacaatcaccagtttacgaccaaagtgattggcaaagacagccgcatctcgatctcg
N N H Q F T T K V I G K D S R D F D I S
ccgaaagtcaatggcgaaaacctgggtgggagatgatgtagttctcgccacgggctccag
P K V N G E N L V G D D V V L A T G S Q
gacttttctgtagcgcgagcatcggtagcaaggaggaaagctggcggcgggtaaatatacc
D F F V R S I G S K G G K L A A G K Y T
gacgctgtaccgtcacggtgagcaaccagtga
D A V T V T V S N Q -
    
```

Hình 1. Trình tự gen *cafI* sau cải biến.



Hình 2. Sản phẩm tổng hợp gen *cafI* trên gel agarose 1,5%. 2,4: Thang DNA chuẩn 1kb (Thermo Scientific); 1: Sản phẩm PCR với 22 môi oligo; 3: Sản phẩm PCR với môi F1 (Bảng 1).

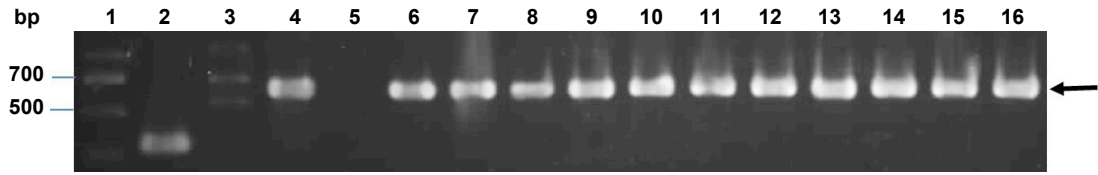
Bằng DNA thể hiện trên đường chạy số 1, cho thấy sản phẩm PCR tự môi chỉ cho 1 băng đặc hiệu, kích thước khoảng 500 bp. Sản phẩm của giai đoạn 2 được thể hiện tại đường chạy số 3, cho 1 băng DNA khá đặc hiệu với kích thước mong muốn (khoảng 500 bp) (Hình 2). Kết quả khẳng định, sản phẩm PCR phù hợp với tính toán lý thuyết và đủ điều kiện để tiến hành tách dòng gen.

Tạo vector tách dòng

Sau khi đã tổng hợp được DNA có kích thước

mong muốn, sản phẩm này được gắn nối vào vector tách dòng pJET 1.2/blunt. Vector này có khả năng ghép nối các đoạn DNA đầu bằng, sau biến nạp chỉ những dòng tế bào mang gen mới có thể sinh trưởng trên môi trường chọn lọc. Đặc tính này do vị trí chọn dòng nằm trong gen gây độc cho tế bào *E. coli*, gen *Eco47IR*. Các dòng tế bào tiếp tục được chọn lọc bằng phương pháp PCR với cặp môi pJET primer, từ 15 dòng tế bào chọn lọc, 12 dòng tế bào cho kích thước sản phẩm PCR như mong muốn (khoảng 500 bp) (Hình 3).

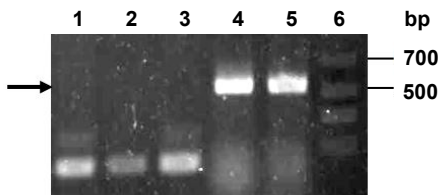
Chọn ngẫu nhiên 6 dòng tế bào, tách DNA plasmid và đọc trình tự để xác định dòng plasmid mang gen chính xác nhất. Kết quả đọc trình tự cho thấy, có 2 trên tổng số 6 dòng cho trình tự hoàn toàn tương đồng với trình tự gen *cafI* ban đầu. Cả 2 dòng đều có thể sử dụng cho mục đích tạo vector biểu hiện. Vì vậy, 1 trong 2 dòng thể bào mang gen *cafI* được chọn ngẫu nhiên cho mục đích tạo vector biểu hiện.



Hình 3. Sàng lọc các dòng tế bào mang gen *caf1* bằng cặp mồi pJET1.2 (Invitrogen). 1: Thang DNA chuẩn 1kb (Thermo Scientefitic); 2-16: Sản phẩm PCR từ khuẩn lạc các dòng tế bào.

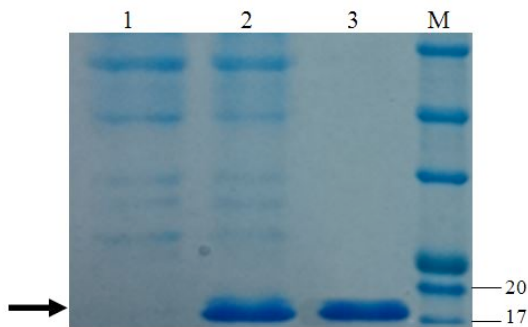
Tạo vector biểu hiện

Gen *caf1* từ dòng tế bào đã chọn được cắt với 2 enzyme giới hạn *NcoI* và *SacI*, sau đó tinh sạch và gắn vào vector biểu hiện pET52b(+) đã được xử lý với 2 enzyme *NcoI* và *SacI*. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21. Các thể biến nạp được sàng lọc bằng phản ứng PCR với cặp mồi T7. Từ 5 dòng sàng lọc, chúng tôi chọn được 2 dòng mang gen với kích thước mong muốn và đúng với tính toán lý thuyết (khoảng 700 bp) (Hình 4). Vector biểu hiện mang gen *caf1* được đặt tên là pET52b-*caf1*.



Hình 4. Sàng lọc pET52b-*caf1* với cặp mồi T7. 1-5: Sản phẩm PCR sàng lọc các thể biến nạp. 6: Thang DNA chuẩn.

Biểu hiện gen *caf1* trong tế bào *E. coli* BL21

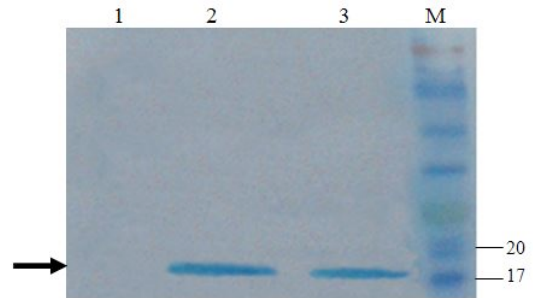


Hình 5. Kiểm tra khả năng biểu hiện gen *caf1* trên gel acryamide 12%. 1: Dòng tế bào mang vector pET52b-*caf1* trước cảm ứng; 2: Dòng tế bào mang vector pET52b-*caf1* sau cảm ứng; 3: Sản phẩm biểu hiện gen *caf1* tinh sạch qua cột sắc ký ái lực Ni; M: Protein chuẩn (Gangnam).

Như mô tả ở phần phương pháp, protein thô thu nhận sau biểu hiện được xử lý và kiểm tra trên gel acryamide 12%. Kết quả cho thấy, sau cảm ứng thu được băng protein có kích thước đúng như tính toán tại đường chạy số 2 (khoảng 18 kDa). Sản phẩm biểu hiện xử lý ở dạng tan không cho băng protein quan tâm, sản phẩm xử lý ở dạng thể vùi được tinh sạch qua cột sắc ký ái lực Ni và cho một băng protein duy nhất đúng với kích thước tính toán (Hình 5) (Kết quả xử lý dạng tan không được trình bày). Chứng tỏ protein sinh ra ở dạng thể vùi. Có thể khẳng định bước đầu gen *caf1* đã được biểu hiện thành công.

Kiểm tra Caf1 tái tổ hợp bằng Western blot

Trong quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp, một điểm thiết yếu cần phải xác định là protein biểu hiện phải chính xác là protein mong muốn. Một trong những kỹ thuật đây là Western blot.



Hình 6. Phân tích sự biểu hiện của protein Caf1 bằng kỹ thuật Western blot. 1: Protein từ chủng mang vector pET52b-*caf1* trước cảm ứng; 2: Protein từ chủng mang vector pET52b-*caf1* sau cảm ứng; 3: Protein từ chủng mang vector pET52b-*caf1* tinh sạch qua cột sắc ký ái lực Ni; M: Protein chuẩn (Gangnam).

Trong thí nghiệm này, dựa trên đặc tính của protein là sự dung hợp của protein đích với đuôi His-tag nên protein đích được xác định gián tiếp qua protein gắn kết đuôi His. Dựa vào sản phẩm kháng

thể kháng protein gắn kết đuôi His (kháng thể 1) đã được thương mại, protein đích được nhận biết qua kỹ thuật Western blot. Kết quả hình 6 cho thấy, protein dung hợp được thể hiện qua 1 băng với kích thước đúng như tính toán (khoảng 18 kDa). Điều này có thể khẳng định, protein Caf1 đã được biểu hiện thành công trong hệ vector pET52b(+).

Tuy nhiên, với các kết quả trên, *caf1* mới chỉ được biểu hiện thành công ở dạng dung hợp, thể vùi. Để có thể tạo ra sản phẩm Caf1 có hoạt tính kháng nguyên, sản phẩm protein cần được tiếp tục xử lý và kiểm tra hoạt tính kháng nguyên.

KẾT LUẬN

Với mục tiêu tạo ra sản phẩm protein kháng nguyên vỏ Caf1 bằng con đường tái tổ hợp, gen *caf1* đã được tổng hợp thành công dựa trên quá trình PCR 2 bước. Kết quả này cho phép tổng hợp các gen khác mà không cần trình tự DNA mạch khuôn. Hơn nữa, bước đầu đã biểu hiện thành công protein độc này trong tế bào *E. coli*. Kết quả này mở ra triển vọng trong việc sử dụng nguồn kháng nguyên tái tổ hợp để chế tạo các kit chẩn đoán nhanh vi khuẩn dịch hạch.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng nguồn kinh phí Đề tài Nghiên cứu khoa học công nghệ cấp Bộ Quốc phòng theo Hợp đồng nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp Bộ Quốc phòng, mã số đề tài: 216.33.051.

SYNTHESIS AND EXPRESSION OF *CAF1* GENE ENCODING F1 ANTIGEN OF *YERSINIA PESTIS*

Nguyen Thi Thu Ha¹, Nguyen Phuong Minh^{1,✉}, Le Trong Tai¹, Pham Tien Dung², Le Quang Hoa²

¹Viện Hóa học, Môi trường Quân sự, Bộ Tư lệnh Hóa học

²School of Biotechnology and Food Technolog, Hanoi University of Science and Technology

SUMMARY

Yersinia pestis is the etiologic agent of plague, one of the most deadly infectious diseases described in the history of humanity. It was responsible for millions of deaths all over the world. *Yersinia pestis* also can be used as a highly lethal biological potential weapon. For plague diagnosis in humans as well as to detect *Y. pestis* in the environment, fraction 1 capsular antigen (F1) of the bacteria was usually used as a good marker. The aim of this study is to produce *Y. pestis* F1 antigen to serve as a material for development of immunochromatographic test strips for rapid detection of *Y. pestis*. Because of the difficulty in *Y. pestis* culture for DNA extraction as well as F1 antigen production, we artificially synthesized the target *caf1* coding for F1

✉ Author for correspondence: E-mail: nguyenminh_ctet@yahoo.com.vn

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andrews GP, Heath DG, Anderson GW Jr, Welkos SL, Friedlander AM (1996) Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and from an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect Immun.* 64(6): 2180-2187.

Erova TE, Rosenzweig JA, Sha J, Suarez G, Sierra JC, Kirtley ML, van Lier CJ, Telepnev MV, Motin VL, Chopra AK (2013) Evaluation of protective potential of *Yersinia pestis* outer membrane protein antigens as possible candidates for a new-generation recombinant plague vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 20(2): 227-238.

Galyov EE., Smirnov OY, Karlishev AV, Volkovoy KI, Denesyumk AI, Nazimov IV, Rubtsov KS, Abramov VM, Dalvadyanz SM, and Zav'yalov VP (1990) Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. *FEBS Lett* 277: 230-232.

Hoefler (1994) Protein electrophoresis, *User Manual*.

Lei Young, Qihan Dong (2004) Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Research*, 32: 7e59.

Perry RD, Fetherston JD (1997) *Yersinia pestis* etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* 10(1): 35-66.

Tsui PY, Tsai HP, Chiao DJ, Liu CC, Shyu RH (2015) Rapid detection of *Yersinia pestis* recombinant fraction 1 capsular antigen. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99(18): 7781-7789.

Zhou D, Han Y, Yang R (2006) Molecular and physiological insights into plague transmission, virulence and etiology. *Microbes Infect* 8(1): 273-284.

antigen for expression in *Escherichia coli*. After the codon optimization step, *caf1* was synthesized by “gapless” PCR using 22 overlapping oligonucleotides cover the complete sequence of this gene. The sequencing result showed that we successfully synthesized the target gene. In total 6 clones sequence, there are 2 clones sequence which were 100% identity with reference sequence. The target sequence was then introduced into pET-52b(+) vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) in the form of (His)₁₀ affinity tag fusion. As the result of SDS-PAGE, the recombinant protein Caf1 of 18 kDa was highly expressed in *E. coli* as inclusion body form and was purified by His-tag affinity chromatography. The recombinant Caf1 was then confirmed by Western blot with His-tag antibody.

Keywords: *Expression, F1 antigen, gene synthesis, plague, Yersinia pestis*