

BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN HA CỦA VIRUS H5N1 TRONG HẠT ĐẬU TƯƠNG

Nguyễn Thu Hiền¹, Chu Hoàng Mậu¹, Hoàng Hà², Lê Văn Sơn², Chu Hoàng Hà²

¹Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

²Viện công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

H5N1 là virus gây nên đại dịch cúm gia cầm ở các quốc gia trên thế giới, gây thiệt hại rất lớn về kinh tế và ảnh hưởng tới sức khỏe con người. Virus H5N1 chứa hệ gen RNA âm đơn sợi gồm 8 phân đoạn mã hóa cho 8 loại protein. Trong đó HA, NA và M là những protein có khả năng gây đáp ứng miễn dịch mạnh trên cơ thể động vật. Vì thế, các kháng nguyên này là đối tượng đang được quan tâm trong sản xuất vaccine phòng chống sự lây lan dịch bệnh. Hiện nay, có nhiều loại vaccine đã và đang được nghiên cứu sử dụng. Trong đó, vaccine ăn được sản xuất từ thực vật là một loại vaccine dưới đơn vị hay protein tái tổ hợp, đưa vào cơ thể theo đường tiêu hóa, sản xuất trong hệ thống thực vật, đang là hướng đi mới trong sản xuất vaccine. Vaccine thực vật có nhiều tính ưu việt như ổn định bền vững trong cơ thể, dễ dàng sản xuất khối lượng lớn và có độ an toàn cao, dễ bảo quản, sử dụng và kinh tế. Trong bài báo này, chúng tôi đã sử dụng gen HA1 của virus H5N1 phân lập từ gia cầm Việt Nam để đưa gen vào vector biểu hiện trong thực vật. Kết quả cho thấy vector hoạt động tốt, protein HA1 đã được tổng hợp trong hạt đậu tương giống ĐT12 với mức độ cao (ki hiệu là *halop*). Đây sẽ là cơ sở để cho bước thử nghiệm phản ứng miễn dịch ở gia cầm, tiến tới sản xuất vaccine. Hơn nữa kết quả này sẽ được áp dụng nghiên cứu biểu hiện các kháng nguyên khác trong hệ thống hạt của thực vật.

Từ khóa: Biểu hiện, kháng nguyên, H5N1, vaccine thực vật, thực vật chuyển gen

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cúm gia cầm (Avian Influenza, AI) là bệnh truyền nhiễm cấp tính của gia cầm, do nhóm virus cúm A, thuộc họ Orthomyxoviridae gây ra. Đây là nhóm virus có biên độ chủ rộng, được phân chia thành nhiều phân type khác nhau dựa trên kháng nguyên HA và NA có trên bề mặt capsid của hạt virus (de Wit, Fouchier, 2008). Nhóm virus cúm A có 16 phân type HA (từ H1 đến H16) và 9 phân type NA (từ N1 đến N9), và sự tái tổ hợp (reassortment) giữa các phân type HA và NA, về mặt lý thuyết, sẽ tạo ra nhiều phân type khác nhau về độc tính và khả năng gây bệnh. Mặt khác, virus cúm A có đặc tính quan trọng là dễ dàng đột biến trong gen/hệ gen (đặc biệt ở gen NA và HA), hoặc trao đổi các gen kháng nguyên với nhau, trong quá trình xâm nhiễm và tồn tại lây truyền giữa các loài vật chủ. Họ Orthomyxoviridae đã được phát hiện bao gồm 4 nhóm virus, đó là: nhóm virus cúm A (Influenza A); nhóm virus cúm B (Influenza B); nhóm virus cúm C (Influenza C); và nhóm Thogotovirus. Các nhóm virus khác nhau bởi các kháng nguyên bề mặt capsid, ở virus cúm A và B là Hemagglutinin (HA), ở virus cúm C là Hemagglutinin Esterase Fusion (HEF), và ở Thogotovirus là Glycoprotein. Theo Tổ chức y tế thế giới (WHO) tính từ 2003 đến nay toàn thế giới

ghi nhận 562 trường hợp mắc cúm A/H5N1 ở 15 quốc gia trong đó có 329 trường hợp tử vong còn ở Việt Nam có 119 trường hợp mắc trong đó 59 trường hợp tử vong (WHO, 2011). Đối với dịch cúm trên người, nghiên cứu phát triển vaccine không những ngăn ngừa làm giảm được bệnh ở gia cầm, mà còn khống chế nguồn truyền lây của loại virus nguy hiểm này sang người. Kháng thể đặc hiệu có thể được cơ thể sinh ra do kích thích của kháng nguyên trong vaccine, và đó là các kháng thể kháng HA, NA, MA và nhiều loại hình khác của virus đương nhiễm, góp phần vô hiệu hóa virus cúm đúng đối tượng khi chúng xâm nhập vào. Có nhiều loại kháng thể, nhưng trước hết chỉ kháng thể kháng HA (H5) có vai trò tiên quyết quan trọng trong quá trình trung hòa virus của hai loại vaccine chính hiện nay: vaccine truyền thống và vaccine thể hệ mới (SuBbarao, Luke, 2007; Capua, Alexander, 2008). Mặc dù đã có một số vaccine khác nhau được sản xuất, nhưng các nhà khoa học trên thế giới vẫn đang tiếp tục phát triển những loại vaccine mới có tính ưu việt hơn, rẻ hơn, dễ bảo quản và phân phối hơn, an toàn và hiệu quả hơn. Bề mặt niêm mạc là vị trí xâm nhập quan trọng nhất đối với nguồn bệnh, nhất là đối với vi khuẩn và virus, việc cung cấp kháng nguyên qua đường miệng là một hướng nghiên cứu rất nhiều hứa hẹn (Streatfield, 2006).

Vaccine ăn được ở thực vật là vaccine tiêu phần protein được sản xuất dựa trên hệ thống thực vật để thu được protein làm miễn dịch thể dịch và miễn dịch tế bào. Vaccine này bền vững trong dịch tiêu hóa, đi qua đường tiêu hóa mà không bị phân hủy. Chuyển gen vào cây trồng với mục đích tạo ra protein kháng nguyên để sản xuất vaccine phòng chống bệnh cho người và gia cầm đang thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học trên thế giới, nhiều protein kháng nguyên đã được biểu hiện thành công ở thực vật như: kháng nguyên bề mặt virus viêm gan B (Kapusta *et al.*, 1999), protein G của virus dại (Rojas-Anaya *et al.*, 2009); protein của *E.coli* (Kang *et al.*, 2003); protein CTB của *Vibrio cholerae* (Arkawa *et al.*, 1997; Oszvald *et al.*, 2008). Vì vậy, việc sản xuất vaccine dựa vào thực vật là một phương pháp đầy hứa hẹn, an toàn thuận lợi, giá thành thấp và dễ sử dụng.

Nhằm tạo ra nguồn nguyên liệu cho việc thử nghiệm khả năng đáp ứng miễn dịch ở gia cầm chúng tôi đã nghiên cứu biểu hiện kháng nguyên HA của H5N1 trong hạt của cây đậu tương. Kết quả lai Western blot cho thấy kháng nguyên HA đã được biểu hiện cao trong hạt của cây đậu tương chuyển gen ở thể hệ T1.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Các chủng vi khuẩn *Agrobacterium*, chủng *E. coli* mang vector chứa cấu trúc gen HA1 của virus H5N1 do phòng Công nghệ tế bào thực vật cung cấp.

Giống đậu tương ĐT12 do Trung tâm Nghiên cứu Phát triển cây đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm cung cấp.

Kháng thể kháng HA do phòng Vi sinh phân tử cung cấp.

Phương pháp

Thiết kế vector chuyển gen thực vật

Gen HA1 được nhân lên bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *XhoI*-HA/*HindIII*-HA theo chu trình: 94°C/5 phút, 30 chu kì (94°C/30 giây, 54°C/30 giây, 72°C/1 phút 30 giây), 72°C/7 phút và 4°C/30 phút. Các phương pháp ghép nối vào vector theo Sambrook và Russell (2002) và theo quy trình Gateway kit của Invitrogen. DNA plasmid được biến nạp vào *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt của Cohen và đồng tác giả (1972) và biến nạp vào

Agrobacterium bằng phương pháp của Hofgen và đồng tác giả (1988). DNA plasmid được tách chiết và làm sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (2002). DNA tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu *XhoI*-HA/*Hind III*-HA và xác định trình tự bằng máy phân tích trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye Terminator v. 3.2 Cycle Sequencing.

Biến nạp gen vào cây thuốc lá

Cấu trúc gen HA1 được chuyển vào giống đậu tương ĐT12 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* theo phương pháp của Topping có cải tiến (1998). Chuẩn bị các mảnh lá có kích thước khoảng 1 cm² sau đó đặt lên môi trường GM trong 2 ngày, các mảnh lá sau 2 ngày nuôi cảm ứng trên môi trường GM được nhúng vào dung dịch huyền phù có chứa *Agrobacterium* có nồng độ OD~ 0,8. Khoảng 10 phút sau chuyển mảnh cây lên giấy thấm tiệt trùng, thấm khô và cấy lên môi trường GM không có kháng sinh trong 2 ngày, chuyển mảnh cây sang môi trường GM có bổ sung kháng sinh cefotaxim 400 mg/l và 30 mg/l kanamycine, sau 2-3 tuần các chồi hình thành được chuyển sang môi trường GM chứa kháng sinh cefotaxim 400 mg/l và 50 mg/l kanamycine. Khi chồi dài 2-3 cm cắt và chuyển sang môi trường ra rễ RM có bổ sung kháng sinh cefotaxim 400 mg/l và 30 mg/l kanamycine. Khi các cây con cao 5-7 cm cắt chồi chuyển sang môi trường RM có chứa kháng sinh 50 mg/l kanamycine, sau đó ra cây trong bầu đất ở nhà kính. Các dòng cây chuyển gen được kiểm tra.

Kiểm tra cây chuyển gen bằng phản ứng PCR

DNA của cây được tách chiết theo phương pháp của Edwards (1991). Tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen HA1 theo chu kì nhiệt: 94°C/5 phút 30 chu kì (94°C/30 giây, 54°C/30 giây, 72°C/1 phút 30 giây 72°C/7 phút và 4°C/30 phút). Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8%.

Tách chiết protein từ hạt

Hạt thực vật được nghiền trong đệm 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) có bổ sung 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% SDS và 0.1% β-mercaptoethanol. Sau đó ly tâm 10000 vòng/phút trong 10 phút. Thu lấy phần dịch và phân tích Western blot. Phần còn lại được tinh chế bằng kit ProFound™ c-Myc Tag IP/Co-IP Kit (Pierce, Mỹ).

Phân tích protein bằng Western blot

Protein tổng số được chạy trên gel SDS polyacrylamide 12.5% theo phương pháp của Laemmli (1970), sau đó được chuyển lên màng nitrocellulose Hybond™ (Amersham). Sau khi đã chuyển màng thành công tiến hành phủ màng bằng các kháng thể. Trong cấu trúc biểu hiện có gắn phần đuôi c-myc nên chúng tôi đã sử dụng kháng thể 1 là kháng thể kháng c-myc để phủ màng trong 2 giờ. Kháng thể này sẽ gắn đặc hiệu với c-myc. Sau đó rửa hết những phần kháng thể 1 không gắn kết và các chất bẩn. Tiếp tục phủ kháng thể 2 là kháng thể chuột cộng hợp horseradish peroxidase trong vòng 1 giờ sau đó rửa để loại kháng thể 2 không gắn kết. Để màng khô sau đó đặt màng lên 1 tấm nilon mỏng. Trộn 2 cơ chất rồi đổ đều lên màng trong vòng 70 giây sau đó thấm khô. Đặt thêm một lớp nilon mỏng trên màng rồi cho vào hộp X-ray cassette rồi hiện phim trong phòng tối.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector tái tổ hợp chứa cấu trúc gen *HA1op*

Dựa trên trình tự gen HA1 của virus A/H5N1 sau khi thay đổi một số mã bộ ba giúp biểu hiện mức độ cao amino acid trong các cây trồng gen này được ký hiệu là *ha1op* (Nguyễn Thu Hiền và cộng sự 2010), cặp mồi đặc hiệu *XhoI*- HA/*Hind* III-HA1 được thiết kế như bảng 2 để nhân đoạn *ha1op*. Trong đó các nucleotid in nghiêng đậm là trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *XhoI* và *Hind*III, các nucleotid in thường là trình tự tương đồng với gen.

Gen *HA1op* được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu *XhoI*-HA/*Hind*III-HA1, sản phẩm PCR điện di có kích thước khoảng 1,2 kb.

Sản phẩm PCR sau đó được xử lý cắt đồng thời 2 enzyme *XhoI*/*Hind*III và được nối vào vector pDONN201 chứa các gen mã hóa peptide chức năng bao gồm peptide tín hiệu (2S2), một protein niêm mạc ruột (LTB), một đoạn peptide phục vụ nhận biết (C-myc) và một trình tự nhận dạng của mạng lưới nội chất (KDEL).

Vector pBeta-Phaso-dest là vector mang promotor phasoline điều khiển tổng hợp protein đặc trưng trong hạt. Cấu trúc gen chứa *HA1op* và các gen mã hóa các peptide chức năng được chuyển vào vector pBeta-phaso-dest bằng phản ứng LR Gateway.

Kết quả kiểm tra vector tái tổ hợp tạo thành được cắt kiểm tra bằng enzyme *EcoRI*. Theo tính toán của lý thuyết khi cắt bằng enzyme *EcoRI* sẽ thu được 3 đoạn gen kích thước khoảng 2,2, 5 và 10 kb. Theo hình 1 sau khi kiểm tra bằng điện di cho ba băng theo tính toán. Như vậy, cấu trúc gen HA đã được xen vào vector thành công và không bị lệch khung đọc. Cấu trúc vector biểu hiện mang gen *HA1op* được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* và chuyển vào cây đậu tương.

Chuyển các cấu trúc *HA1op* vào nách lá mầm giống đậu tương

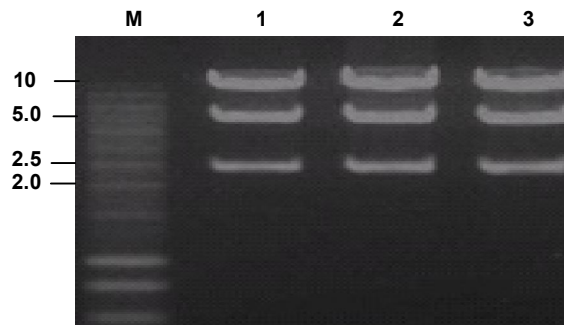
Ba lô thí nghiệm với tổng số 375 mẫu được biến nạp cụ thể được tiến hành như sau: thí nghiệm 1 số mẫu biến nạp sử dụng là 125, số chồi tạo được là 50 số chồi kéo dài là 10, số chồi ra rễ là 8, số cây sống trên giá thể là 7. Tuy nhiên, số cây dương tính với phản ứng PCR là 0. Thí nghiệm 2 thu được 1 cây cho kết quả dương tính với phản ứng PCR sau khi đã tiến hành 120 mẫu biến nạp và số cây sống được trên giá thể là 10. Tương tự với lô thí nghiệm 3 được tiến hành 130 mẫu biến nạp và thu được 1 cây có kết quả dương tính với phản ứng PCR. (chi tiết miêu tả rõ tại bảng 1).

Bảng 1. Kết quả chuyển cấu trúc gen *ha1op* vào nách lá mầm giống đậu tương ĐT12

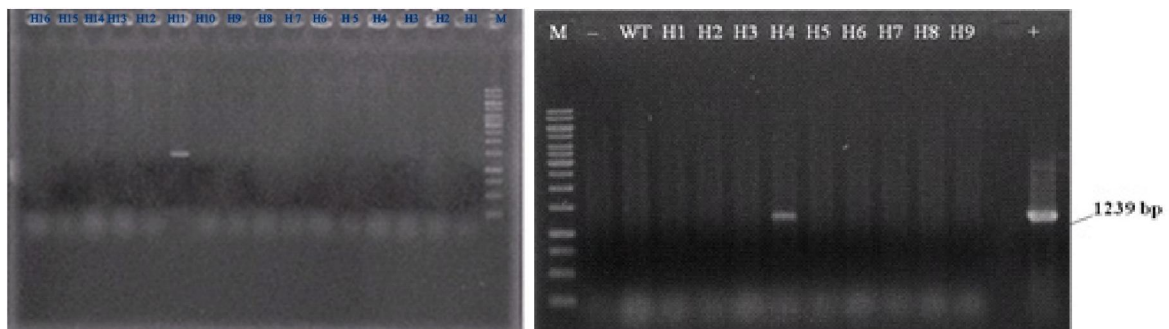
Lô TN	Số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo chồi	Số chồi kéo dài	Số chồi ra rễ	Số cây sống trên giá thể	Số cây dương tính PCR
1	125	50	10	8	7	0
2	120	55	20	15	10	1
3	130	45	12	12	8	1
Tổng	375	150	42	35	25	2

Bảng 2. Trình tự cặp mồi

Tên mồi	Trình tự
<i>XhoI</i> -HA	CCGCTCGAGATCTGCATTGGATACCACGCT
<i>HindIII</i> -HA1	CCCAAGCTTCTCGTTAGAGTGATGGTATCCGT



Hình 1. Phân tích sản phẩm cắt vector tái tổ hợp mang gen *HA1op* bằng enzyme hạn chế *EcoRI* (B). M: Thang chuẩn 1 Kb; 1, 2, 3: mẫu vector tái tổ hợp tách từ các dòng khuẩn lạc.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu *XhoI*-HA/ *HindIII*-HA với 25 dòng cây đậu tương chuyển gen thế hệ T_0 . M: Marker, (-) đối chứng âm, (+) đối chứng dương, (wt) dòng cây không chuyển gen H1-H9, H1-H16: 25 dòng cây thế hệ T_0

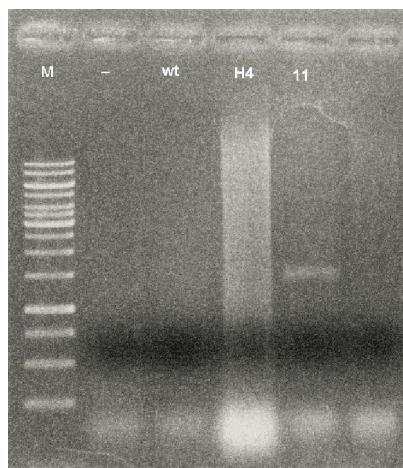
Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy dòng H3 và dòng H11 cho kết quả dương tính, băng DNA có kích thước khoảng 1,2 đúng bằng kích thước gen *HA1op* đã được đưa vào. Hai dòng này tiếp tục được thu hạt và lá cây thế hệ T1 để tiếp tục phân tích kiểm tra khả năng biểu hiện protein trong hạt của cây.

Đánh giá sự có mặt của gen *ha1op* ở thế hệ T_1

Chúng tôi thu ngẫu nhiên lá của hai cây của dòng H11 và dòng H4 ở giai đoạn T1, tách chiết

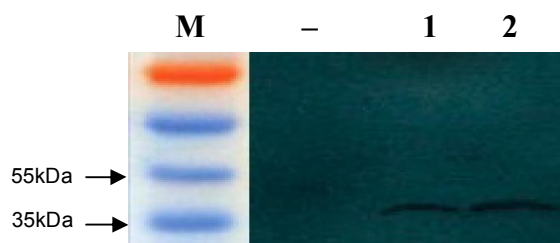
DNA và tiến hành PCR với cặp mồi đặc hiệu *XhoI*-HA/ *HindIII*-HA.

Hình 4 cho thấy cây của dòng 11 có kết quả dương tính với phản ứng PCR. Sản phẩm PCR là đoạn DNA có kích thước đúng với kích thước gen *halop*. Như vậy có thể khẳng định gen *halop* đã được biến nạp thành công vào cây đậu tương và có di truyền cho thế hệ sau. Với cây H4 chúng tôi chưa thu được kết quả như mong muốn nên nhiều khả năng gen *halop* bị phân ly.



Hình 3. Phân tích sản phẩm PCR bằng cặp mồi đặc hiệu *XhoI*-HA/ *HindIII*-HA với các dòng cây đậu tương thể hệ T₁. M: Marker, (-) đối chứng âm, (wt) cây không chuyển gen, H4, 11: hai dòng đậu tương cần phân tích ở giai đoạn T₁

Phân tích biểu hiện protein ở hạt của cây đậu tương chuyển gen



Hình 5. Phân tích protein HA1op trong hạt đậu tương chuyển gen bằng Western blot. M: Protein chuẩn; (-): cây không chuyển gen; 1-2: các mẫu hạt thu được của cây đậu tương H11.

Protein tổng số của hạt đậu tương chuyển gen ở thể hệ T₁ được tách chiết và kiểm tra với kháng thể HA bằng kỹ thuật lai Western blot. Kết quả cho thấy HA1op được phát hiện ở kích thước 40 kDa tương ứng kích thước của protein HA1op theo lý thuyết. Nồng độ protein tái tổ hợp HA1 được biểu hiện trong hạt khá thấp (Hình 5). Như vậy, bước đầu chúng tôi khẳng định rằng protein HA1 đã biểu hiện được trong hạt đậu tương chuyển gen. Đây sẽ là nguồn nguyên liệu để đánh giá hoạt tính miễn dịch của

protein tái tổ hợp với virus A/H5N1 trên gia cầm.

KẾT LUẬN

Đã tạo được 25 dòng cây chuyển gen HA1op thể hệ T₀, trong đó có 2 dòng dương tính với PCR bằng cặp mồi đặc hiệu *XhoI*-HA, *HindIII* HA1. Biểu hiện gen biến nạp ở thể hệ T₁ cho thấy HA1op được phát hiện ở kích thước 40 kDa tương ứng kích thước của protein HA1op theo lý thuyết

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành trong chương trình đào tạo Tiến sỹ của nghiên cứu sinh Nguyễn Thu Hiền. Nghiên cứu có sử dụng các trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arakawa O, K Kanno, A Kanetsuka, Y Shiozaki (1997) Effect of girdling and bark inversion on tree growth and fruit quality of apple. *Proc. 6. Int. S ymp. on Integrating Canopy. Acta Hort* 451: 579-586.
- Capua I, DJ Alexander (2008) Ecology, epidemiology and human health implications of avian influenza viruses.
- Jimenez- Bremont JF (2007) Expression of Escherichia coli heat- labile enterotoxin B subunit (ltb) in carrot (Daucus carota L.). *Plant Cell Reports* 26: 969-976.
- Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A and Legocki AB (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FAS EB J* 13: 1796-1799.
- Kang KH, Jang JK, Pham TH, Moon H, Chang IS, Kim BH (2003) A microbial fuel cell with improved cathode reaction as a low biochemical oxygen demand sensor. *Biotechnol Lett* 25 (16) 1357-1361.
- Oszvald M, Tömösközi A, Tamás L, Békés F (2008) Role of rice and added wheat protein in the mixing properties of different rice flours. *Acta Alimentaria* 37: 399-408.
- Rosales-Mendoza S, Soria-Guerra RE, Olivera-Flores MTD, Lopez-Revilla R, Argullo-Astorga GR, E. De Wit & R.A.M. Fouchier, J Clin Virol (2008), Avian influenza A virus. *Adaptation*.
- Streathfield SJ (2006) Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* 38: 150-157
- Subbarao K, Luke C (2007) H5N1 viruses and vaccines. *PLoS Pathog* 3(3): e40.

EXPRESSION OF H5N1 VIRUS ANTIGEN HA IN SOYBEAN SEEDS

Nguyen Thu Hien¹, Chu Hoang Mau¹, Hoang Ha², Le Van Son², Chu Hoang Ha^{2,*}

¹*University of Education, Thai Nguyen University,*

²*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

The avian influenza virus H5N1 causes disease in avian of many countries, and has already caused more than \$10 billion in losses to poultry farmers. This virus genome consists of eight segments of negative-stranded RNA, which code for 11 proteins. In there, matrix proteins (M), hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) are important proteins, which are targets for vaccine production. Vaccination is considered as the most important measure to prevent pandemics. Although different types of influenza vaccines including “inactivated” vaccines, vaccines with immunopotentiators, live attenuated vaccines and DNA vaccines have been developed, scientists around the world are developing better vaccines, which are less expensive, easier to store and deliver, safer and more efficacious. Plant produced oral vaccines are particularly attractive because they are economical, easily adaptable to large-scale production, present a minimal risk of contamination with animal or human pathogens, and are stable at room temperature for a long time allowing them to be used in remote areas. This paper, ha1op gene have successful constructed in plant expression vector. Protein HA1 fused a mucosal adjuvant protein LTB and C-myc tag is expressed in high level in Arabidopsis seeds. These results are the base for immunological evaluation and protection of orally administered seed produced antigens. Moreover, these results will be applied for other antigen of virus.

Keywords: *Antigen, expression, H5N1, transgenic plant, plant vaccine*

* Author for correspondence: E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn