

A STUDY ON THE PRODUCTION OF E2 RECOMBINANT ANTIGEN FROM CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS BY USING THE *PICHIA PASTORIS* EXPRESSION SYSTEM

Nghiêm Ngọc Minh^{1*}, Nguyễn Tuấn Hùng², Nguyễn Thị Thùy Linh², Nguyễn Minh Đức¹
 Nguyễn Bảo Trâm¹, Vũ Minh Thương¹, Võ Thị Bích Thủy¹

¹Institute of Genome Research – VAST

²VETVACO National Veterinary Joint Stock Company (VETVACO.,JSC)

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 22/8/2022	Classical swine fever (CSF) is a viral infectious disease with high morbidity and mortality in pigs, which was a particular concern for farmers. CSF virus (CSFV), the etiological agent of CSF, is icosahedral and enveloped positive-strand RNA virus that belongs to the Pestivirus genus of the Flaviviridae family with one serotype. The E2 glycoprotein of CSFV is a major determinant of virulence and is involved in virus attachment and entry into target cells. It is the most important viral antigen that induces a protective immune response against CSF. In this study, the CSFV E2 protein recombinant antigen was produced in <i>Pichia pastoris</i> (<i>P.pastoris</i>)SMD1168 using the yeast expression system. The result suggests that the E2 protein recombinant of classical swine fever virus has biological activity natural, which was site recognized by antibodies against classical swine fever virus. E2 protein recombinant antigen is also a potential candidate for developing a new generation vaccine against classical swine fever in Vietnam.
Revised: 16/9/2022	
Published: 16/9/2022	
KEYWORDS	
Classical swine fever	
Recombination protein	
<i>Pichia pastoris</i> yeast	
pGAPZαC vector	
Expression systems	

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP E2 CỦA VIRUS DỊCH TẢ LỢN CỔ ĐIỂN BẰNG HỆ THỐNG BIỂU HIỆN TRÊN NẤM MEN *PICHIA PASTORIS*

Nghiêm Ngọc Minh^{1*}, Nguyễn Tuấn Hùng², Nguyễn Thị Thùy Linh², Nguyễn Minh Đức¹
 Nguyễn Bảo Trâm¹, Vũ Minh Thương¹, Võ Thị Bích Thủy¹

¹Viện Nghiên cứu hệ gen – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

²Công ty Cổ phần Thuốc thú y Trung ương (VETVACO.,JSC)

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 22/8/2022	Bệnh dịch tả lợn cổ điển (Classical swine fever (CSF) là bệnh do virus truyền nhiễm, có tỉ lệ mắc và tử vong cao cho lợn, là vấn đề mà người chăn nuôi đặc biệt quan tâm. Virus CSF (CSFV) là RNA một sợi dương thuộc chi <i>Pestivirus</i> của họ <i>Flaviviridae</i> . Glycoprotein E2 của virus gây bệnh sốt lợn cổ điển (Classical swine fever virus- CSFV) là một kháng nguyên virus có thể tạo ra phản ứng miễn dịch bảo vệ chống lại CFS. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp protein E2 của CSFV bằng hệ thống biểu hiện trên nấm men <i>Pichia pastoris</i> (<i>P. pastoris</i>)SMD1168. Kết quả nghiên cứu cho thấy protein E2 tái tổ hợp của virus dịch tả lợn có hoạt tính sinh học tự nhiên, được nhận diện bởi kháng thể kháng virus dịch tả lợn. Đồng thời, kết quả thu được cũng cho thấy kháng nguyên E2 tái tổ hợp là ứng cử viên tiềm năng để phát triển vaccine thể hệ mới phòng bệnh dịch tả lợn tại Việt Nam.
Ngày hoàn thiện: 16/9/2022	
Ngày đăng: 16/9/2022	
TỪ KHÓA	
Dịch tả lợn cổ điển	
Protein tái tổ hợp	
Nấm men <i>Pichia pastoris</i>	
Vector pGAPZαC	
Hệ thống biểu hiện	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6388>

*Corresponding author. Email: nghiemminh@igr.ac.vn

1. Đặt vấn đề

Bệnh dịch tả lợn cổ điển có tên tiếng Anh là Classical swine fever – là một bệnh truyền nhiễm của lợn ở mọi lứa tuổi, có tỷ lệ ốm và chết trong vùng dịch bệnh cao, gây thiệt hại kinh tế cho các trại chăn nuôi lợn trên thế giới [1], [2]. Tác nhân gây bệnh được xác định là do một serotype của virus CSF (CSFV) – virus RNA thuộc chi *Pestivirus* của họ *Flaviviridae*. Bộ gen RNA bao gồm khung đọc mở (ORF) mã hóa cho một polyprotein bao gồm tất cả các protein của virus. Các protein cấu trúc bao gồm protein nucleocapsid C và ba glycoprotein vỏ Enns, E1, E2. Trong đó, E2 và Ems có khả năng tạo kháng thể trung hòa trong vật chủ [3].

Protein E2 có kích thước 55 kDa bao gồm 373 axit amin có glycosyl hóa trên bề mặt, mang chức năng như một kháng nguyên trung hòa chính. E2 là protein xuyên màng loại I với C-terminal trong vỏ virus [4], [5] và N-terminal là một vùng ngoại bào chứa bốn miền kháng nguyên: A, B, C và D. Trong đó, miền A có ba miền phụ: A1, A2 và A3 [6].

Hiện nay có rất nhiều hệ thống biểu hiện protein được nghiên cứu và sử dụng, trong đó tiêu biểu nhất là năm hệ thống biểu hiện: vi khuẩn *E.coli*, nấm men, côn trùng, thực vật và trên tế bào động vật có vú. Mỗi hệ thống có đặc điểm riêng phù hợp với mỗi loại protein tái tổ hợp khác nhau cần nghiên cứu. Với các protein tái tổ hợp ngoại lai, hệ hổng biểu hiện *P. pastoris* được ưu tiên lựa chọn vì nhiều tính ưu việt như: Có thể biến đổi sau dịch mã; phát triển với mật độ tế bào rất cao trong môi trường nuôi cấy đơn giản ít tốn kém, phù hợp cho cả quy mô phòng thí nghiệm cũng như công nghiệp. Điều đặc biệt là *P. pastoris* có 2 gen mã hóa cho Alcohol oxidase là *AOX1* và *AOX2* là những inducible promoters (là một promoter chỉ được bắt đầu phiên mã khi nhận được kích thích) cho phép *P. pastoris* sử dụng methanol làm nguồn cung cấp năng lượng [7]-[10]. Việc nghiên cứu và tối ưu hóa protein tái tổ hợp E2 gây bệnh dịch tả lợn cổ điển trên hệ thống biểu hiện nấm men *P. pastoris* được rất nhiều nhà nghiên cứu quan tâm. Han và cộng sự [11], Ding Li và cộng sự [12] đã tối ưu hóa biểu hiện thành công protein E2 trong *P. pastoris*. Ở trong nước, việc sử dụng hệ thống biểu hiện trên nấm men cũng đã và đang được nghiên cứu và ứng dụng trong nhiều đề tài. Tuy nhiên, việc nghiên cứu biểu hiện protein E2 tái tổ hợp của virus gây bệnh dịch tả lợn cổ điển phân lập được tại Việt Nam bằng *P. pastoris* chưa có nhiều. Trong bài báo này, một protein E2 tái tổ hợp được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống biểu hiện nấm men *P. pastoris* và bước đầu đánh giá về hiệu quả vaccine của nó, nhằm hướng tới chủ động nguồn nguyên liệu trong sản xuất vaccine tái tổ hợp E2 trong tương lai gần.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp

2.1. Nguyên liệu

Chủng virus gây bệnh dịch tả lợn cổ điển (chủng C) do Công ty Cổ phần thuốc thú y Trung ương (VETVACO, Việt Nam) cung cấp. Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α (Invitrogen, Mỹ) dùng để tách dòng, chủng nấm men *P. pastoris* SMD1168 (Invitrogen, Mỹ) dùng để biểu hiện protein tái tổ hợp, vector tách dòng pJET1.2 (Invitrogen, Mỹ), vector biểu hiện pGAPZ α C (Invitrogen, Mỹ), enzym cắt giới hạn *Cla*I, *Xba*I (ThermoFisher, Mỹ), cặp mồi khuếch đại gen *E2* (mồi yE2f1: TTATCGATTTCGGCTAGCCTGCAAG, và yE2dCr: CGCTCTAGAAATTCTGCGAAGTA), môi trường nuôi cấy nấm men Yeast extract peptone dextrose (YPD) (Sigma – Aldrich, Mỹ), môi trường Luria Bertani Broth (LB broth) (Sigma – Aldrich, Mỹ), kit tổng hợp cDNA High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher, Mỹ), kit tách và tinh sạch plasmid tái tổ hợp PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Mỹ), đệm TNE (50mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1mM EDTA), zeocine (Biobasic, Canada), Triton X-114 (Sigma – Aldrich, Mỹ), Kháng thể kháng protein E2-Myc Tag Monoclonal Antibody (Invitrogen, Mỹ), kháng thể thứ cấp Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate (Thermo Fisher, Mỹ), cơ chất tạo màu 1-Step™ Ultra TMB -Blotting Solution (Thermo Fisher, Mỹ).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tạo tế bào *E.coli* DH5 α mang plasmid biểu hiện E2-CSFV

Vùng gen E2 mã hóa yếu tố quyết định kháng nguyên đã được phân tích bằng các phần mềm tin sinh để phù hợp với việc tạo kháng nguyên tái tổ hợp và biểu hiện gen trong nấm men *P. pastoris*. Gen sau khi lựa chọn đặt tên là E2 – CSFV. Gen E2 – CSFV được thu nhận từ chủng virus gây bệnh dịch tả lợn cổ điển (chủng C) bằng cách PCR với cặp mồi đặc hiệu yE2f1 và yE2dCr. Sản phẩm thu được có kích thước 1043 bp, mã hóa cho một chuỗi polypeptide gồm 250 acid amin có khối lượng phân tử 28,46 kDa. Hai enzym *Cla*I và *Xba*I được xử lý cắt mở vòng vector pJET1.2 và gen E2 – CSFV đã được tinh sạch để tạo thành vector tạo dòng pJET1.2 – E2 – CSFV. Tiếp tục xử lý *Cla*I và *Xba*I với vector pJET1.2 – E2 – CSFV để chuyển gen E2 – CSFV vào vector pGAPZ α C thành vector biểu hiện pGAPZ α C – E2 – CSFV. Vector biểu hiện này được giữ trong chủng *E.coli* DH5 α bằng phương pháp hóa biến nạp và nuôi cấy trong môi trường LB (tryptone 10g/l; cao nấm men 5g/l; NaCl 10g/l; pH 7,0) có chứa kháng sinh zeocin nồng độ 50 μ g/ml. Các thể biến nạp tiếp tục được sàng lọc và kiểm tra sự có mặt của gen E2 – CSFV bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi F*Cla*I và AOX1 (mồi nằm trên plasmid pGAPZ α C), enzym cắt giới hạn *Cla*I và *Xba*I, giải trình tự.

2.2.2. Tạo dòng tế bào *P. pastoris* SMD1168 mang gen mã hóa E2-CSFV và biểu hiện gen E2-CSFV

Plasmid tái tổ hợp pGAPZ α C- E2-CSFV dùng enzym *Bsp*HI để cắt mở vòng và biến nạp vào tế bào nấm men *P. pastoris* SMD1168 bằng phương pháp xung điện để biểu hiện gen. Các tế bào *P. pastoris* mang vector biểu hiện pGAPZ α C – E2 – CSFV được nuôi cấy sinh tổng hợp protein ngoại lai bằng cách nuôi khuẩn lạc đơn trong 50ml môi trường YPD (peptone 2%; cao nấm men 1%; dextrose 2%) có chứa kháng sinh zeocin 50 μ g/ml, ở 25°C từ 3 – 4 ngày [13].

Tiếp theo, tế bào được hòa đồng thời trên hai môi trường MM (môi trường tối thiểu chứa methanol có chứa YNB 1,34%; biotin 4x10⁻⁵%; methanol 0,5%) và MD (môi trường tối thiểu có chứa dextrose có thành phần YNB 1,34%; biotin 4x10⁻⁵%; glucose 2%), ở 25°C từ 3 – 4 ngày quan sát khả năng sinh tổng hợp của protein E2 – CSFV tái tổ hợp [14].

2.2.3. Xác định số bản sao của vector mang gen trong hệ gen của *P. pastoris* bằng phản ứng PCR bán định lượng

Dịch nuôi tế bào được thu lại sau 12, 24, 48 và 72 giờ bằng cách ly tâm loại tế bào 3000 rpm trong 5 phút. Dịch ngoại bào được giữ lạnh ở -20°C để đánh giá khả năng sinh tổng hợp E2 – CSFV của chủng tái tổ hợp ở các thời điểm khác nhau. DNA tổng số của cá thể biến nạp sau khi được pha loãng xuống 100ng/ μ l được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi F*Cla*I và AOX1 trong 35 chu kỳ. Kết quả khuếch đại được kiểm tra điện di trên gel agarose 1% và phân tích bằng phần mềm QuantityOne (BioRad) nhằm xác định số bản sao gen E2 – CSFV trong bộ gen nấm men. Số bản sao gen E2 – CSFV trong bộ gen nấm men được tính thông qua tỷ lệ sản phẩm khuếch đại chứa gen E2 – CSFV so với sản phẩm khuếch đại gen AOX1 (đây là một gen nội sinh của nấm men).

2.2.4. Đánh giá khả năng tăng trưởng và biểu hiện của thể biến nạp chứa nhiều bản sao

Hai khuẩn lạc được chọn là KL8 và KL12 chứa pGAPZ α C – E2 – CSFV được hoạt hóa bằng môi trường BMGY lỏng (peptone 2%; cao nấm men 1%; YNB 1,34%; 10% citrate buffer 1M pH 4; biotin 4x10⁻⁵%; glycerol 1%) nuôi lắc 250rpm qua đêm ở 30°C đến khi OD₆₀₀ = 2. Sau đó, sinh khối được chuyển vào 10ml môi trường BMMY (giống với môi trường BMGY nhưng glycerol được thay bằng methanol có nồng độ cuối là 0,5%); tiếp tục nuôi lắc ở 250 rpm 30°C [15].

2.2.5. Kiểm tra protein E2-CSFV bằng lai Western blot

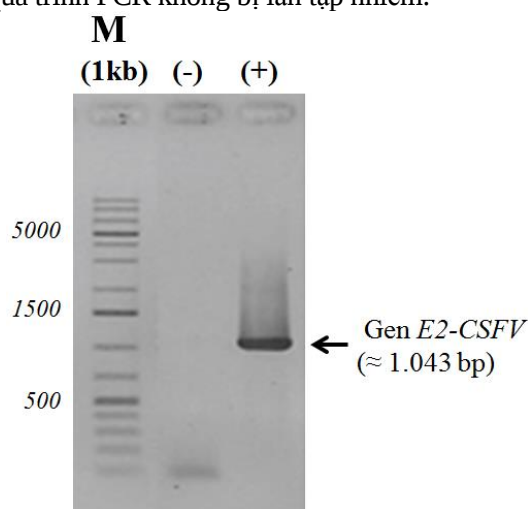
Phân đoạn màng của chủng *P. pastoris* SMD1168 mang gen mã hóa E2 – CSFV đã cảm ứng biểu hiện được thu nhận bằng Triton – X114 [16]. Tiến hành đồng thời một mẫu đối chứng âm là phân đoạn màng *P. pastoris* SMD1168. Sau đó, phân đoạn màng được chuyển lên màng

nitrocellulose, khóa màng bởi skim milk 5% [17]. Kháng thể kháng protein E2-Myc Tag Monoclonal Antibody, và kháng thể thứ cấp Goat Anti-Mouse IgG Antibody, HRP conjugate được bổ sung lên màng. Cuối cùng, cơ chất tạo màu 1-Step™ Ultra TMB -Blotting Solution được bổ sung để kiểm tra sự biểu hiện của protein mục tiêu.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo dòng chủng *E.coli* Dh5α mang vector tái tổ hợp pGAPZαC- E2-CSFV

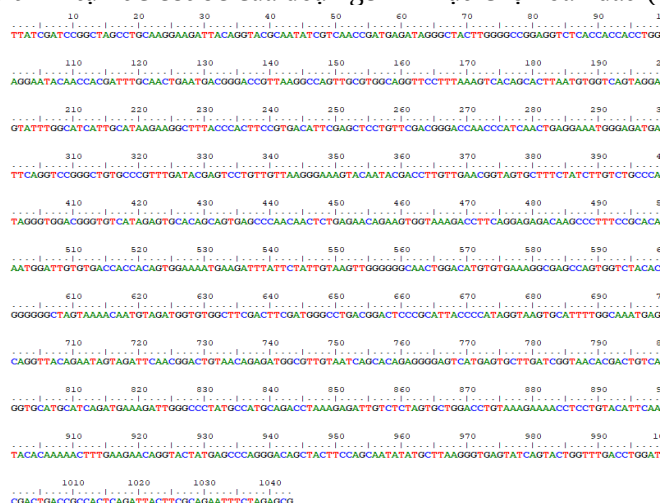
Để có sợi khuôn dùng khuếch đại đoạn gen E2 – CSFV, RNA tổng số đã được tách từ chủng CSFV phân lập tại Việt Nam và tổng hợp cDNA. Đoạn gen E2 – CSFV được thu bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu yE2f1 và yE2dCr. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả điện di cho thấy thu được duy nhất một gen có kích thước 1043 bp (giếng (+), Hình 1), phù hợp với kích thước thiết kế. Đối chứng âm (giếng (-), Hình 1) không xuất hiện băng vạch chứng tỏ sản phẩm trong quá trình PCR không bị lẫn tạp nhiễm.



Hình 1. Thu nhận gen E2-CSFV

M: thang DNA chuẩn; (-): mẫu đối chứng âm; (+): mẫu chủng chuẩn virus dịch tả lợn châu Á

Toàn bộ sản phẩm PCR này được tinh sạch, giải trình tự để kiểm tra trình tự sau đó chuyển vào vector nhân dòng pJET1.2 để lưu giữ. Kết quả giải trình tự đoạn gen E2 – CSFV cho thấy bảo lưu được toàn bộ trình tự nucleotide của đoạn gen E2 lựa chọn ban đầu (Hình 2).



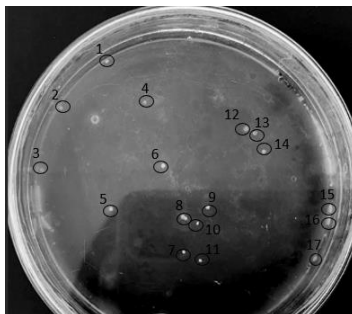
Hình 2. Trình tự đoạn gen E2 mã hóa cho yếu tố quyết định kháng nguyên của CSFV

Sau khi cắt mở vòng plasmid pJET1.2 – E2 – CSFV và vector biểu hiện pGAPZαC bằng hai enzym cắt giới hạn là *Cla*I và *Xba*I tạo đầu dính, gen *E2* – CSFV được nối vào vector biểu hiện nhờ T4 ligase. Plasmid pGAPZαC có gen kháng kháng sinh zeocine nên các thể biến nạp được sàng lọc bước đầu trên môi trường nuôi cấy có chứa kháng sinh zeocine. Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp môi F*Cla*I và AOX1. Gen *E2*-CSFV được chèn vào giữa vùng AOX promoter và AOX terminator của vector pGAPZαC. Do đó, sản phẩm khuếch đại của khuẩn lạc có mang plasmid pGAPZαC – E2 – CSFV sẽ có kích thước 3100+ 1043 bp (4143 bp). Kết quả điện di cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển dương tính có sự xuất hiện vạch DNA kích thước nằm giữa vạch 4000 bp và 5000 bp của thang, phù hợp với kích thước dự đoán ban đầu. Khuẩn lạc dương tính đại diện tiếp tục được nuôi cấy, tách chiết DNA plasmid và xác định trình tự nucleotide theo phương pháp Sanger trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer. Kết quả giải trình tự gen *E2* – CSFV trong vector pGAPZαC giống với kết quả giải trình tự gen *E2* – CSFV trong vector pJET1.2 đã được trình bày ở Hình 2.

Trình tự đoạn gen *E2* của virus dịch tả lợn chủng C này đã được so sánh với trình tự gen *E2* của virus dịch tả lợn cổ điển công bố trên ngân hàng dữ liệu NCBI bằng phần mềm BLAST. Kết quả cho thấy đoạn gen *E2* của virus dịch tả lợn được tách dòng trong nghiên cứu này có độ tương đồng 100% so với gen *E2* của chủng virus dịch tả lợn Hog cholera virus (Classical swine fever virus) “Chinese”.

3.2. Tạo dòng chủng *P. pastoris* SMD1168 mang gen mã hóa *E2*-CSFV

Vector pGAPZαC – E2 – CSFV được tiến hành biến nạp vào chủng *P.pastoris* SMD1168 bằng phương pháp xung điện và được sàng lọc bước đầu trên môi trường đặc hiệu YPD có bổ sung kháng sinh zeocin nồng độ 50μg/ml. Kết quả biến nạp cho thấy xuất hiện 17 khuẩn lạc sống được trên môi trường có chứa 50μg/ml kháng sinh zeocine (Hình 3). Điều này chứng tỏ cấu trúc vector biểu hiện tái tổ hợp pGAPZαC – E2 – CSFV đã được biến nạp thành công vào chủng nấm men SMD1168.

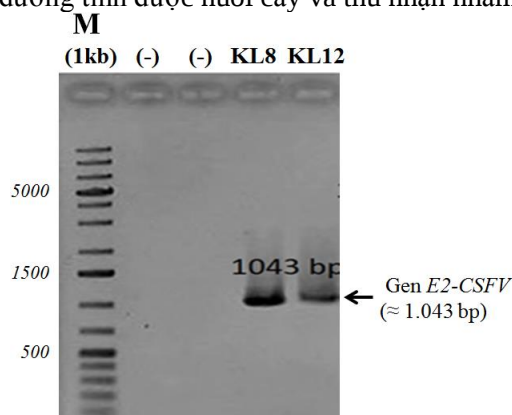


Hình 3. Khuẩn lạc của một số dòng nấm men *P.pastoris* SMD1168 mang gen *E2* - CSFV

Các khuẩn lạc dự tuyển này tiếp tục được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR với cặp môi F*Cla*I và AOX1. Khi DNA plasmid được biến nạp vào tế bào chủ *P. pastoris*, gen AOX1 (mã hóa cho alcohol oxidase – sử dụng methanol làm chất cảm ứng trong quá trình biểu hiện nấm men) có thể bị loại bỏ hoặc giữ lại dẫn đến kiểu hình của thể biến nạp có thể bị thay đổi. Nếu gen AOX1 không bị mất đi, thể biến nạp thu được sẽ có đoạn gen tái tổ hợp chèn vào và phát triển tốt trong môi trường có bổ sung methanol và ngược lại. Kết quả cho thấy tất cả các thể biến nạp đều tăng trưởng tốt trên môi trường có chứa kháng sinh zeocine và bổ sung methanol (Hình 4).

Để kiểm tra các khuẩn lạc thu được có mang gen *E2* – CSFV hay không, khuẩn lạc 8 và 12 (KL8, KL12) được chọn làm khuôn, sử dụng cặp môi yE2f1 và yE2dCr để tiến hành phản ứng PCR. Kết quả điện di cho thấy, các khuẩn lạc dự tuyển có sự xuất hiện vạch DNA với kích thước 1.043 bp như thiết kế (giếng KL8, KL12, Hình 5). Hơn nữa, đối chứng âm không xuất hiện vạch, điều đó cho thấy không có sự tạp nhiễm (giếng (-), Hình 5). Như vậy có thể thấy, plasmid tái tổ

hợp pGAPZαC – E2 – CSFV đã được biến nạp thành công vào chủng nấm men *P. pastoris* SMD1168. Các khuẩn lạc dương tính được nuôi cấy và thu nhận nhằm kiểm tra biểu hiện.



Hình 4. Điện di đồ sản phẩm PCR sử dụng mỗi đặc hiệu gen E2 và khuôn plasmid từ các khuẩn lạc 8 và 12. M: thang DNA chuẩn; giếng 1, 2: đối chứng âm; giếng 3,4: sản phẩm PCR khuẩn lạc 8,12 kiểm tra gen E2 – CSFV

Để khẳng định chắc chắn sản phẩm đã tách dòng là đoạn gen mã hóa cho gen E2 – CSFV của virus tả lợn châu Âu, plasmid tách từ KL8 đã được chọn để kiểm tra trình tự nucleotide theo phương pháp Sanger. Kết quả cho thấy trình tự mà chúng tôi thu được có độ tương đồng 100% với trình tự nucleotide gen E2 của các chủng CSFV đã đăng ký trên GenBank/NCBI. Kết quả so sánh trình tự amino acid suy diễn của gen mã hóa cho protein E2 – CSFV trong nghiên cứu này cũng có độ tương đồng 100% với trình tự amino acid của gen mã hóa protein E2 của virus dịch tả lợn châu Âu đã được công bố trên Ngân hàng gen (Hình 5).

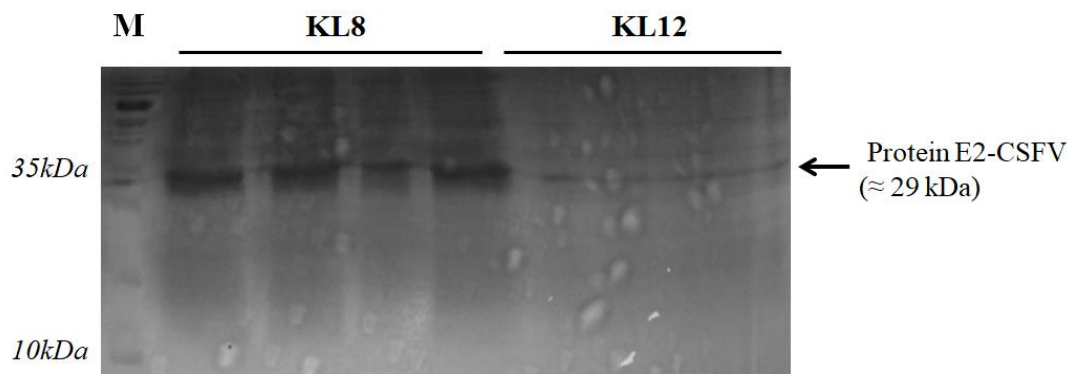
<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGDDFRSGLC	PFDTSPPVVG	KYNTTLLNGS	AFYLVCPIGW	TGVIECTAVS	PTTLRTEVVG
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
TFRRDKPFPH	RMDCVTTTVE	NEDLFYCKLG	GNWTCVKGEF	VVYTGGGLVKQ	CRWCGFDG
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
PDGLPHYPIG	KCILANETGY	RIVDSTDCNR	DGVVISTEGS	HECLIGNTTV	KVHASDERLG
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
PMPCRPKEIV	SSAGPVKKTG	CTFNYTKTLK	NRYYEPRDSY	FQQYMLKGEY	QYWFDDLDATD
<u>250</u>					
RHSDYFAEFL	EX				

Hình 5. Trình tự amino acid suy diễn của gen mã hóa kháng nguyên E2

3.3. Tối ưu biểu hiện và khả năng đáp ứng miễn dịch của protein E2 trong tế bào nấm men

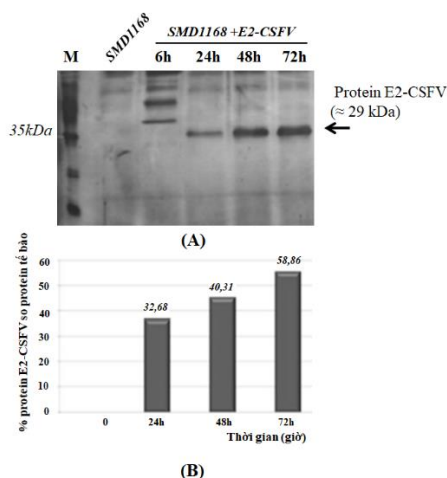
3.3.1. Tối ưu biểu hiện protein E2 tái tổ hợp trong tế bào nấm men

Để đánh giá sự ảnh hưởng của số lượng bản sao gen sát nhập đến khả năng biểu hiện protein mục tiêu, chúng tôi tiến hành cảm ứng biểu hiện E2 – CSFV từ các thể biến nạp thu nhận được. Điều kiện cảm ứng ở môi trường YPD lỏng khi OD₆₀₀ = 1 có bổ sung chất cảm ứng làm methanol đến nồng độ cuối cùng là 0,5%. Kết quả kiểm tra protein bằng SDS-PAGE cho thấy, dịch nuôi cấy của các thể biến nạp xuất hiện 1 vạch protein có kích thước trong khoảng 29 kDa trong điều kiện biến tính tương ứng với kích thước E2 – CSFV, trong khi nấm men *P. pastoris* không chèn gen E2 – CSFV không sản xuất được protein này. Dòng tái tổ hợp KL8 có khả năng biểu hiện protein mục tiêu mức độ cao nhất (Hình 7).



Hình 6. Khả năng biểu hiện protein E2-CSFV của các thể biến nạp
KL8: khuẩn lạc 8, khuẩn lạc 12 của tế bào nấm men đã chuyển gen E2

Dòng tái tổ hợp này được tiếp tục sử dụng để phân tích khả năng biểu hiện protein E2 – CSFV theo thời gian. Dịch cảm ứng được thu nhận sau 24, 48 và 72 giờ, sau đó điện di SDS-PAGE để kiểm tra. Kết quả cho thấy, dịch nuôi cấy của các thể biến nạp 1 sau 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ cảm ứng đều xuất hiện một băng sáng duy nhất tương ứng với vị trí của băng protein kích thước khoảng 29 kDa (Hình 8). Kiểm tra nồng độ protein tái tổ hợp bằng Bradford, chúng tôi nhận thấy trong 72 giờ nuôi cấy, hiệu quả biểu hiện và tiết protein E2 – CSFV của thể biến nạp KL8 ngày càng tăng. Tại thời điểm 72 giờ, protein E2 – CSFV được tiết ra chiếm tới 58,86% so với tổng protein tiết của tế bào.

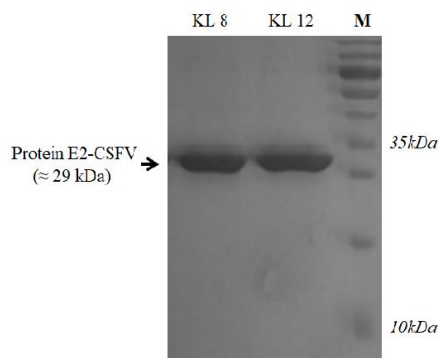


Hình 7. Khả năng biểu hiện protein E2-CSFV theo thời gian của thể biến nạp KL8
M: thang đo protein chuẩn; SMD1168: tế bào nấm men chưa chuyển gen E2;
(A): SDS-PAGE; (B) % E2-CSFV trên tổng protein tiết

3.3.2. Đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp E2

Để đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp E2 – CSFV, protein này được tiến hành tinh sạch qua hệ thống cột resin gắn nickel chuyên dùng cho các protein tái tổ hợp có gắn các gốc Histidine. Protein E2 – CSFV sau khi tinh sạch được xác định nồng độ và tiêm chuột để tạo kháng thể. Chuột nhất trắng sau tiêm một liệu trình ba lần (1, 14 và 21 ngày tuổi), đến ngày 35 tiến hành thu huyết thanh kiểm tra kháng thể được sinh ra có tương ứng với kháng nguyên tái tổ hợp đã tiêm hay không. Kết quả cho thấy, tất cả các chuột trong lô thí nghiệm sau khi tiêm ba lần kháng nguyên tái tổ hợp đều sinh kháng thể đặc hiệu, tương ứng, hiệu giá ngưng kết của phản ứng trung hòa là 1/8 (Kết quả không trình bày ở đây). Bên cạnh đó, các

kháng thể thu được từ chuột tiêm kháng nguyên tái tổ hợp được sử dụng như kháng thể 1 để kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu của kháng nguyên – kháng thể bằng phản ứng Western blot. Kết quả thu được từ phản ứng Western blot cho thấy, kháng thể tạo ra đã bắt cặp đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp E2 – CSFV. Kích thước băng protein phản ứng với kháng thể là khoảng 29 kDa (Hình 8) đúng như kích thước theo tính toán.



Hình 8. Kiểm tra tính sinh kháng thể đặc hiệu của chuột tiêm kháng nguyên tái tổ hợp E2-CSFV.
M: thang đo protein chuẩn

4. Kết luận

Chúng tôi đã thành công trong việc nhân dòng và xác định trình tự nucleotide đoạn gen E2 từ virus dịch tả lợn chủng C phân lập được tại Việt Nam. Đã thiết kế được vector tái tổ hợp và biểu hiện thành công protein E2 của virus dịch tả lợn chủng C bằng hệ thống biểu hiện trên tế bào nấm men SMD1168. Protein E2 tái tổ hợp mang hoạt tính sinh học tự nhiên (được nhận diện bởi kháng thể kháng virus dịch tả lợn chủng C). Kết quả này là cơ sở khoa học và nguồn nguyên liệu phục vụ cho việc nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp chống lại bệnh dịch tả lợn cổ điển chủng C ở lợn tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Kinh phí được hỗ trợ từ hoạt động nghiên cứu khoa học cho nghiên cứu viên cao cấp của Viện Nghiên cứu hệ gen năm 2022, mã số NVCC40.05/22-22 của GS.TS Nghiêm Ngọc Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Edwards, "Survival and inactivation of classical swine fever virus," *Veterinary Microbiology*, vol. 73, pp. 175-181, 2000.
- [2] V. Moennig, "Introduction to classical swine fever virus disease and control policy," *Veterinary Microbiology*, vol. 73, pp. 93-102, 2000.
- [3] B. Zhou, K. Liu, Y. Jiang, J. C. Wei, and P. Y. Chen, "Multiple linear B-cell epitopes of classical swine fever virus glycoprotein E2 expressed in *E.coli* as multiple epitope vaccine induces a protective immune response," *Virology Journal*, vol. 8, pp. 1-7, 2011.
- [4] G. R. Risatti, L. G. Holinka, I. Fernandez Sainz, C. Carrillo, Z. Lu, and M. V. Borca, "N-Linked Glycosylation Status of Classical Swine Fever Virus Strain Brescia E2 Glycoprotein Influences Virulence in Swine," *Journal of Virology*, vol. 81, pp. 924-933, 2007.
- [5] I. Leifer, N. Ruggli, and S. Blome, "Approaches to define the viral genetic basis of classical swine fever virus virulence," *Virology*, vol. 438, pp. 51-55, 2013.
- [6] P. A. van Rijn, H. G. P. van Gennip, E. J. de Meijer, and R. J. M. Moormann, "Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus strain Brescia," *Journal of Virology*, vol. 14, pp. 2053-2060, 1993.
- [7] R. Daly and M. T. Hearn, "Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production," *Journal of Molecular Recognition*, vol. 18, pp. 119-138, 2005.

-
- [8] W. Zhang, M. A. Bevins, B. A. Plantz, L. A. Smith, and M. M. Meagher, "Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 70, pp. 1-8, 2000.
- [9] M. Romanos, "Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression," *Current Opinion in biotechnology*, vol. 6, pp. 527-533, 1995.
- [10] X. Zhou, Y. Yu, J. Tao, and L. Yu, "Production of LYZL6, a novel human c-type lysozyme, in recombinant *Pichia pastoris* employing high cell density fed-batch fermentation," *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 118, pp. 420-425, 2014.
- [11] X. Han, X. Liu, Y. Zhang, Y. Zhang, and Q. Xie, "Codon optimization and expression in *Pichia pastoris* of E2 gene of classical swine fever virus," *Wei Sheng wu xue bao = Acta Microbiologica Sinica*, vol. 43, pp. 560-568, 2003.
- [12] L. Ding, W. Junchen, C. Jin, Z. Dong, Z. Yuanpeng, Q. Xuwen, Y. Xiaoming, Z. Qisheng, and H. Jibo, "Optimized expression of classical swine fever virus E2 protein via combined strategy in *Pichia pastoris*," *Protein Expression and Purification*, vol. 167, pp. 105527, 2020.
- [13] Invitrogen, "Pichia expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins," Catalog, vol. 1, pp. 26, 2010.
- [14] N. K. Khatri and F. Hoffmann, "Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 93, pp. 871-879, 2006.
- [15] T. I. Potgieter, M. Cukan, J. E. Drummond, N. R. Houston-Cummings, Y. Jiang, and M. d'Anjou, "Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*," *Journal of biotechnology*, vol. 139, pp. 318-325, 2009.
- [16] Y. Taguchi and H. M. Schätzl, "Small-scale Triton X-114 extraction of hydrophobic proteins," *Bio-protocol*, vol. 4, p. 1139, 2014.
- [17] E. Z. Lang, K. R. Rupprecht, T. D. Rae, and J. R. Fishpaugh, "Evaluation of rapid western blot incubation system," *The FASEB Journal*, vol. 24, pp. 900, 2010.