

VECTOR CONSTRUCTION FOR AFRICAN SWINE FEVER VIRUS CD2V ANTIGEN EXPRESSION ON BACULOVIRUS-INSECT CELL SYSTEM, USING THE Q5-SITE-DIRECTED MUTAGENESIS KIT

Nguyen Thu Giang¹, Tran Ngoc Lan², Nguyen Thi Thu Hien¹, Le Thi Thanh¹, Pham Bich Ngoc^{1*}

¹Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology

²University of Science and Technology of Hanoi

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 15/11/2023	African swine fever virus (ASFV) is the cause of African swine fever - one of the most dangerous infectious diseases in pigs with a 100% mortality rate. However, currently there is still no licensed vaccine for ASFV prevention. CD2v, a glycoprotein in the outer shell of ASFV, plays an important role in the process of virus infection and suppression of host immunity, and is a potential antigen for developing a subunit vaccine to prevent ASFV. In this study, the CD2v sequence of strain VNUAHY-ASFV/Vietnam2019 was optimized for expression on the baculovirus-insect cell system, artificially synthesized and cloned in the pUC57 vector. The entire CD2vFull-Foldon-His construct was cut and ligated into the pLIB vector to create the recombinant vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His. Vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His was used as a template to construct vector pLIB-CD2vED-Foldon-His carrying the trimeric CD2v extracellular domain, using the Q5 directed mutagenesis kit based on enzymatic PCR reaction with ADN Polymerase Q5 High-Fidelity. Next, vector pLIB-CD2vED-Foldon-His was used to design vector pLIB-CD2vED-His for expression of monomeric CD2vED using the Q5 kit also. Then, two vectors pLIB-CD2vED-Foldon-His and pLIB-CD2vED-His were transformed into <i>E. coli</i> DH10Bac to create recombinant bacmid for monomer/trimeric CD2vED expression on baculovirus-insect cell system for vaccine production against ASF.
Revised: 05/01/2024	
Published: 03/02/2024	
KEYWORDS	
ASFV	
CD2v ectodomain	
Q5 directed mutagenesis kit	
Baculovirus	
Insect cell	

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN CD2V CỦA VIRUS TẢ LỌN CHÂU PHI TRÊN HỆ THỐNG BACULOVIRUS-TẾ BÀO CÔN TRÙNG SỬ DỤNG KIT GÂY ĐỘT BIẾN ĐỊNH HƯỚNG Q5

Nguyễn Thu Giang¹, Trần Ngọc Lan², Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Lê Thị Thanh¹, Phạm Bích Ngọc^{1*}

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

²Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 15/11/2023	Virus tả lợn Châu Phi (ASFV) là nguyên nhân gây ra tả lợn Châu Phi - một trong những bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất ở lợn với tỷ lệ tử vong 100%. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có vắc xin được cấp phép cho phòng, chống ASFV. CD2v, một glycoprotein ở lớp vỏ ngoài của ASFV, đóng vai trò quan trọng trong quá trình lây nhiễm virus và giảm miễn dịch ở vật chủ, là kháng nguyên tiềm năng để phát triển vắc xin tiểu đơn vị phòng ASFV. Trong nghiên cứu này, trình tự CD2v của chủng VNUAHY-ASFV/Vietnam2019 được tối ưu mã cho biểu hiện trên hệ thống baculovirus - tế bào côn trùng và đặt tổng hợp nhân tạo trong vector pUC57. Toàn bộ cấu trúc CD2vFull-Foldon-His được cắt nối vào vector pLIB để tạo vector tái tổ hợp pLIB-CD2vFull-Foldon-His. Vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His được dùng làm khuôn để thiết kế vector pLIB-CD2vED-Foldon-His mang trình tự biểu hiện vùng ngoại bào của CD2v dạng trimer bằng kit gây đột biến định hướng Q5 dựa trên phản ứng PCR với enzyme Polymerase ADN Q5 High-Fidelity. Vector pLIB-CD2vED-Foldon-His được dùng để thiết kế vector pLIB-CD2vED-His cho biểu hiện CD2vED dạng monomer bằng bộ kit Q5. Hai vector pLIB-CD2vED-Foldon-His và pLIB-CD2vED-His được biến nạp vào <i>E. coli</i> DH10Bac để tạo bacmid tái tổ hợp cho biểu hiện kháng nguyên CD2v trên hệ thống baculovirus - tế bào côn trùng, định hướng sản xuất vắc xin phòng ASF.
Ngày hoàn thiện: 05/01/2024	
Ngày đăng: 03/02/2024	
TỪ KHÓA	
Virus gây tả lợn Châu Phi	
Vùng ngoại bào của CD2v	
Kit gây đột biến định hướng Q5	
Baculovirus	
Tế bào côn trùng	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.9236>

* Corresponding author. Email: pbngoc@ibt.ac.vn

1. Giới thiệu

Tả lợn Châu Phi (ASF) là bệnh xuất huyết cấp tính virus ASFV gây ra ở lợn mọi lứa tuổi với tỷ lệ tử vong lên tới 100%. ASFV thuộc chi *Asfivirus*, họ *Asfarviridae* [1], có genome là chuỗi ADN thẳng, kép, kích thước lớn từ 170 đến 190kb, mã hóa cho 150-200 protein với 160 khung đọc mở (ORF) và cấu trúc nhiều lớp phức tạp: nucleoid, lõi-vỏ, lớp vỏ bên trong, capsid và lớp vỏ bên ngoài [2]. Sự kết hợp giữa bộ gen lớn và cấu trúc protein phức tạp góp phần vào khả năng phục hồi và khả năng vượt trội của ASFV trong việc lây nhiễm và gây bệnh ở cả lợn nhà và lợn hoang, khiến cho việc kiểm soát bệnh cũng như nghiên cứu vắc xin phòng ASFV gặp rất nhiều khó khăn. Cho đến nay, chưa có vắc xin thương mại chống lại bệnh tả lợn Châu Phi.

CD2v là một glycoprotein xuyên màng ở lớp vỏ ngoài của ASFV, được mã hóa bởi gen *EP402R*. Về mặt cấu trúc, CD2v bao gồm peptit tín hiệu (SP), vùng xuyên màng (TM) và hai miền giống globulin miễn dịch (IG) như miền ngoại bào (ED) và miền tế bào chất (ID) [3]. Về mặt chức năng, CD2v tham gia quá trình lây nhiễm ASFV và giảm miễn dịch ở vật chủ [4]. Trong quá trình lây nhiễm, CD2v được biểu hiện trên bề mặt tế bào bị nhiễm ASFV và hoạt động như một thụ thể môi cho CD2 trên tế bào lympho T. Bằng cách bắt chước protein CD2 của vật chủ, CD2v có thể liên kết với các thụ thể CD2 trên tế bào T, làm gián đoạn con đường truyền tín hiệu miễn dịch bình thường, dẫn đến giảm phản ứng miễn dịch của vật chủ, cho phép ASFV trốn tránh sự phát hiện và loại bỏ của hệ thống miễn dịch, dẫn đến tăng sự nhân bản và lây lan của virus [5]. Một số vị trí liên kết kháng nguyên trong CD2vED đã được phát hiện, đáng kể trong số đó là hai vùng giống globulin miễn dịch rất quan trọng đối với sự kết dính và khả năng sinh miễn dịch của tế bào hồng cầu (RBC) [6]. Plasmid ADN chứa miền ngoại bào CD2v (CD2vED)-p54-p30 tạo ra các kháng thể đặc hiệu và phản ứng của tế bào T nhưng không tạo ra sự bảo vệ, trong khi ubiquitin-CD2vED-p54-p30 chứa ADN plasmid đã tạo ra sự bảo vệ một phần với 2 trên 6 con lợn (33%) sau khi tiêm chủng hai lần [2]. Vector virus Bacman chứa CD2vED-p54-p30 gây ra phản ứng tế bào T nhưng không có kháng thể đặc hiệu, bảo vệ một phần cho 4 trong số 6 con lợn [7]. Những kết quả trên chỉ ra CD2v, đặc biệt CD2vED được xem là một trong những kháng nguyên quan trọng nhất cho phát triển vắc xin tiểu đơn vị phòng chống ASFV.

Hệ thống biểu hiện baculovirus được sử dụng rộng rãi để sản xuất glycoprotein tái tổ hợp trong tế bào côn trùng sử dụng baculovirus làm nền tảng biểu hiện. Hệ thống này cho phép biểu hiện hiệu quả và ở mức độ cao của nhiều loại protein, bao gồm cả các protein phức tạp và khó biểu hiện [8]. Trong nghiên cứu trước đó, CD2v được biểu hiện bằng hệ thống baculovirus và được tinh chế trong tế bào côn trùng, đã thành công kích thích kháng thể đặc hiệu chống lại các kháng nguyên và bảo hộ 100% lợn trong thí nghiệm công cường độc với chủng độc ASFV E75 [5].

Kít đột biến định hướng Q5 hiện là một công cụ gây đột biến ADN được sử dụng rộng rãi trong các phòng thí nghiệm trên thế giới. Kít được xây dựng trên nền tảng của enzyme Polymerase ADN Q5 High-Fidelity có khả năng khuếch đại chính xác ADN với hiệu suất cao, cho phép tạo ra các đột biến điểm đơn, đa điểm, chèn, xóa và thậm chí cả sửa đổi chuỗi phức tạp [9].

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên kít đột biến định hướng tại chỗ Q5 được sử dụng để thiết kế hai vector chuyển gen pLIB-CD2vED-Foldon-His và pLIB-CD2vED-Foldon-His dựa trên plasmid pLIB-CD2vFull-Foldon-His mang trình tự CD2v đầy đủ của chủng ASFV gây bệnh tại Việt Nam VNUAHY-ASF1/Vietnam2019. Hai vector này tiếp tục được sử dụng để tạo bacmid biểu hiện CD2vED dạng trimeric và monomer trong tế bào côn trùng, định hướng sản xuất vắc xin tiểu đơn vị phòng chống bệnh tả lợn Châu Phi.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các dòng tế bào vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu này bao gồm *Escherichia coli* 10G (Biosearch technologies) và *E. coli* DH10Bac (Invitrogen).

Plasmid vector pLIB (Addgene).

Các cặp mồi sử dụng:

ED Q5 F1: 5'-GAGAACCTATACTTCCAGGG-3'

ED Q5 R1: 5'-TTTGAAGAAAGTATAAAAGTAATTTGAGG-3'

ED Q5 F2: 5'-CATCACCATCATCACCCTAAAG-3'

ED Q5 R2: 5'-GCCCTGGAAGTATAGGTTCTC-3'

pBac F: 5'-GTATCGATTGCGACCTACTCCG-3'

pBac R: 5'-CAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAG-3'

ED F: 5'-TCAATACATTGGCGACGTGTGGC-3'

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His và tạo chủng *E. Coli* 10G mang vector tương ứng

Trình tự gen mã hóa cho kháng nguyên CD2v (MK757459) của ASFV gây bệnh tả lợn Châu Phi ở Việt Nam VNUAHY-ASF1/Vietnam2019 được thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), và tối ưu mã cho hệ thống biểu hiện ở côn trùng. Trình tự nucleotide và trình tự acid amin của các đoạn gen trước và sau khi đổi mã được phân tích và so sánh sử dụng phần mềm Bio Edit. Đoạn gen sau đó được bổ sung trình tự nucleotide mã hóa motif Foldon tạo cấu trúc Foldonic và polyhistidine tag gồm 6 Histidine ở đầu 3'; calmodulin-binding peptide ở đầu 5' trình tự gen; điểm nhận biết và phân cắt protein (TEV tobacco etch virus protease recognition and cleavage site) ở điểm đầu và điểm cuối trình tự gen; và trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Trình tự nucleotide cuối cùng được gửi để tổng hợp nhân tạo bởi công ty Genewiz (Mỹ) và được nhân đồng trong vector pUC57.

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên CD2v và vector pLIB mở vòng được thu nhận bằng xử lý enzyme *Bam*HI và *Hind*III, sẽ được nối ghép bằng enzyme ligase. Vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His sau đó biến nạp vào chủng *E. coli* 10G khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt. Khuẩn được chọn trên môi trường LB đặc bổ sung 50 µg/mL ampicillin và PCR khuẩn lạc với cặp mồi pBac F/R và cắt kiểm tra bằng *Bam*HI và *Hind*III.

2.2.2. Thiết kế vector pLIB-CD2vED-Foldon-His và tạo chủng *E. Coli* 10G mang vector tương ứng

Vector chuyển gen mang trình tự ngoại bào của CD2v gắn motif Foldon (CD2vED): pLIB-CD2vED-Foldon-His được thiết kế bằng phương pháp đột biến định hướng tại chỗ Q5 sử dụng bộ kit Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs, Mỹ) trên khuôn là vector pLIB-CD2Full-Foldon-His. Đột biến định hướng tại chỗ Q5 bắt đầu bằng phản ứng PCR với cặp mồi ED Q5 F1/R1, loại bỏ các trình tự nội bào (ID), xuyên màng (TM). Phản ứng được tiến hành trong thể tích 10 µl nước đã khử ion chứa 5 µL Q5 Hot start High Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs), 0,5 µL mỗi mồi 10 pmol và 10 ng ADN mẫu. Quy trình khuếch đại: 98°C / 3 phút, 30 chu kỳ [98°C / 10 giây – 52 - 54°C / 25 giây - 72°C / 30 giây mỗi kb], 1 chu kỳ 72°C / 5 phút, giữ ở 15°C. Sản phẩm PCR được xử lý bằng hỗn hợp enzyme *Kinase*, *Ligase* và *Dpn*I (KLD) nhằm nối vòng vector, trước khi chuyển vào tế bào *E. coli* 10G bằng phương pháp sốc nhiệt. Khuẩn được chọn trên môi trường LB đặc bổ sung 50 µg/mL ampicillin, PCR khuẩn lạc với cặp mồi pBac F/R và cắt kiểm tra bằng *Bam*HI và *Hind*III.

2.2.3. Thiết kế vector pLIB-CD2vED-His và tạo chủng *E. Coli* 10G mang vector tương ứng

Vector pLIB-CD2vED-Foldon-His được dùng làm khuôn để tạo vector pLIB-CD2vED-His bằng phản ứng PCR Q5 với cặp mồi ED Q5 F2/R2 loại bỏ motif Foldon. Thành phần và quy trình phản ứng như mục 2.2.2.

2.2.4. Tạo Bacmid tái tổ hợp mang đoạn trình tự biểu hiện CD2vED-Foldon-His và CD2vED-His

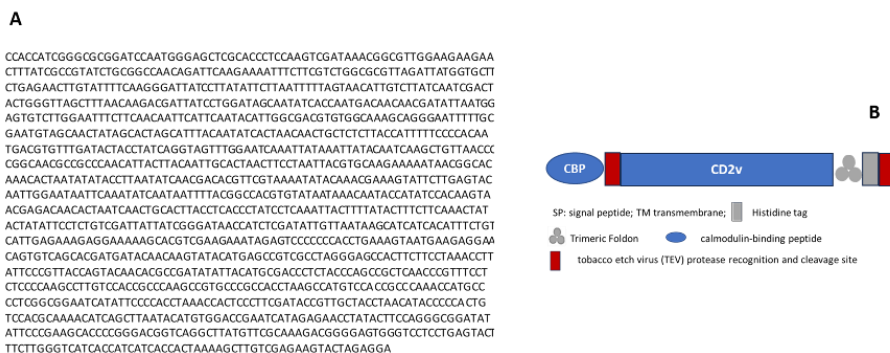
Plasmid pLIB-CD2vED-Foldon-His và pLIB-CD2vED-His được tách từ tế bào *E. coli* 10G sử dụng kit ADN INTRON Plasmid (Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm sau tinh sạch được biến nạp vào *E. coli* DH10Bac (Invitrogen) bằng phương pháp sốc nhiệt. Khuẩn

lạc được chọn lọc xanh/trắng trên môi trường LB bổ sung 50 µg/mL kanamycin, 10 µg/mL tetracycline, 10 µg/mL gentamicin, 40 µg/mL XGal, 40 µg/mL IPTG. Khuẩn lạc trắng được chọn và kiểm tra PCR khuẩn lạc với cặp mồi ED F/ ED Q5 R1 và PCR với bacmid tinh sạch sử dụng cặp mồi như PCR khuẩn lạc.

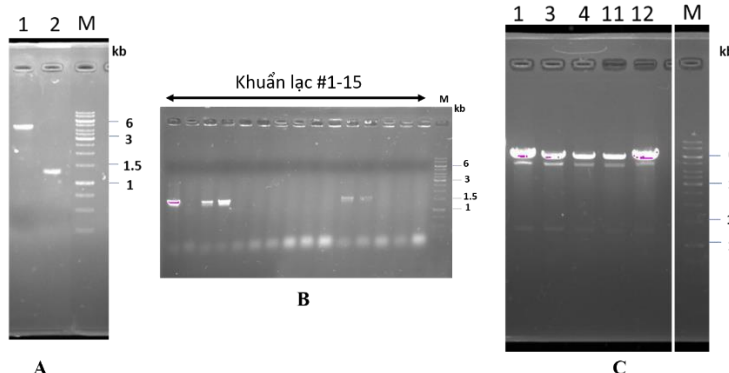
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Thiết kế vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His và tạo chủng *E. Coli* 10G mang vector tương ứng

Trình tự gen mã hóa cho kháng nguyên CD2v (MK757459) của ASFV gây bệnh tả lợn Châu Phi ở Việt Nam VNUAHY-ASF1/Vietnam2019 đã được tối ưu mã cho hệ thống biểu hiện ở côn trùng và bổ sung các trình tự hỗ trợ: trình tự nucleotide mã hóa poly-histidine tag gồm 6 Histidine được bổ sung vào đầu 3' và calmodulin-binding peptide được bổ sung vào đầu 5' cho mục đích tinh sạch protein CD2v; trình tự nucleotide mã hóa motif Foldon tạo cấu trúc trimer được bổ sung trước trình tự mã hóa polyhistidine tag. Foldon là một vùng gấp nhỏ tự động được tìm thấy trong protein vỏ chính của thực khuẩn thể T4, một loại virus lây nhiễm vi khuẩn *E. Coli*. Foldon bao gồm 27 axit amin, đóng một vai trò quan trọng trong quá trình lắp ráp virus [10]; trình tự nhận biết và phân cắt protein (TEV tobacco etch virus protease recognition and cleavage site); trình tự cắt của enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III (Hình 1).



Hình 1. Trình tự nucleotide của gen CD2v tối ưu mã biểu hiện trong tế bào côn trùng (A) và Sơ đồ cấu trúc gen CD2v (B)



Hình 2. Kết quả thiết kế pLIB-CD2vFull-Foldon-His

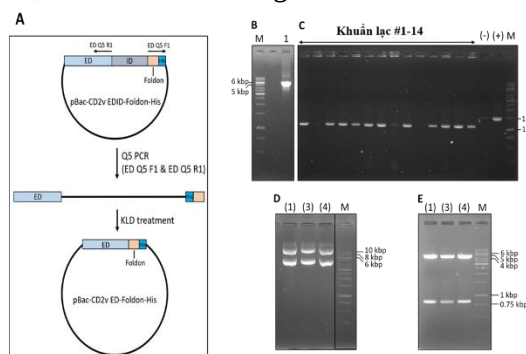
- A. Kết quả tinh sạch vector pLIB và đoạn gen CD2v sau khi xử lý với *Bam*HI và *Hind*III;
 B. Kết quả PCR khuẩn lạc với cặp mồi pBC F/R; C. Kết quả cắt kiểm tra pLIB-CD2vFull-Foldon-His với enzyme *Bam*HI và *Hind*III

Vector pUC57 mang đoạn gen CD2v và vector pLIB được xử lý bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III, sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di gel agarose (Hình 2A). Đoạn ADN đích và vector pLIB đã mở vòng được ghép nối để tạo các plasmid tái tổ hợp chứa cassette biểu hiện mang ADN đích mong muốn pLIB-CD2vFull-Foldon-His. Plasmid pLIB tái tổ hợp được

dòng hoá trong tế bào khả biến *E.coli* 10G. Khuẩn lạc được chọn bằng phản ứng colony PCR sử dụng cặp mồi pBac F/R. Những dòng khuẩn dương tính cho băng có kích thước khoảng 1.3 Kb với colony PCR (Hình 2B) được lựa chọn để nuôi, tách chiết plasmid, cắt kiểm tra bằng *Bam*HI và *Hind*III. Kết quả Hình 2C cho thấy đã thu được 5 khuẩn lạc mang vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His. Các khuẩn lạc sau đó được nuôi lượng lớn, tách chiết và tinh sạch plasmid để phục vụ cho thiết kế các cấu trúc biểu hiện gen của CD2vED ở pLIB bằng kit gây đột biến Q5.

3.2. Thiết kế vector pLIB-CD2vED-Foldon-His và tạo Bacmid tái tổ hợp mang trình tự biểu hiện CD2vED-Foldon-His

Trong nghiên cứu này, vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His được dùng làm khuôn để thiết kế pLIB-CD2vED-Foldon-His biểu hiện vùng ngoại bào của CD2v (CD2vED) dạng trimer bằng kit đột biến định hướng Q5. Các bước PCR xóa gen thể hiện ở hình 3A. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,9%, cho thấy kích thước sản phẩm khoảng 6 kb (Hình 3B). Kích thước này phù hợp với kích thước tính toán của vector mục tiêu, cho thấy phản ứng PCR Q5 đã thành công loại bỏ vùng xuyên màng và nội bào của CD2v. Sản phẩm PCR được xử lý bằng KLD trước khi biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* 10G. 14 khuẩn lạc thu được từ đĩa thạch LB chứa ampicillin được sàng lọc bằng colony PCR sử dụng cặp mồi pBacF/R. Mẫu âm tính được thực hiện bằng cách bỏ qua mẫu trong phản ứng PCR. Trong khi đó, mẫu dương tính sử dụng thực hiện bằng cách sử dụng vector pLIB-CD2vFull-Foldon-His làm mẫu. Sản phẩm PCR ở các mẫu xóa gen thành công có kích thước 1128 bp, trong khi phản ứng dương tính sẽ tạo ra sản phẩm có kích thước 1521 bp. Kết quả hình 3C cho thấy có 11 khuẩn lạc cho băng có kích thước như dự đoán, cho thấy việc xóa đoạn gen thành công. Các khuẩn lạc dương tính 1, 3 và 4 được tách chiết plasmid (Hình 3D) và được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Theo lý thuyết, sau khi xử lý 2 enzyme này sẽ thu được sản phẩm có kích thước khoảng 850 bp. Kết quả điện di trên gel agarose trong hình 3E phù hợp với tính toán này. Như vậy, vector pLIB-CD2vED-Foldon-His đã được thiết kế thành công.

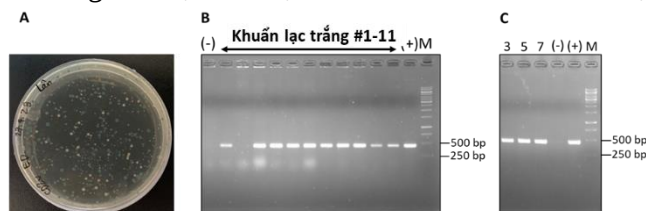


Hình 3. Thiết kế vector pLIB-CD2vED-Foldon-His bằng phương pháp gây đột biến định hướng Q5

- A. Sơ đồ biểu diễn các bước PCR xóa gen; B. Phân tích điện di trên gel agarose sản phẩm của phản ứng PCR Q5 (M: marker ADN; 1: sản phẩm PCR); C. Phân tích điện di trên gel agarose sản phẩm PCR khuẩn lạc (M: marker ADN; 1-14: sản phẩm PCR từ khuẩn lạc; (-): đối chứng âm; (+): đối chứng dương); D. Phân tích điện di trên gel agarose của các plasmid được tách chiết (M: marker ADN; 1, 3, 4: plasmid từ khuẩn lạc 1, 3, 4); E. Phân tích điện di trên gel agarose sản phẩm của phản ứng cắt enzyme *Bam*HI-*Hind*III (M: marker ADN; 1, 3, 4: Sản phẩm cắt enzyme *Bam*HI-*Hind*III từ plasmid 1, 3, 4).

Vector pLIB-CD2vED-Foldon-His được biến nạp vào *E. coli* DH10Bac bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C, vì khuẩn sau khi sốc nhiệt được trải trên các đĩa thạch LB chứa kanamycin (50 µg/mL), tetracycline (10 µg/mL), gentamicin (10 µg/mL), XGal (40 µg/mL) và IPTG (40 g/mL). Kết quả chọn lọc xanh/trắng thể hiện hình 4A, trong đó các khuẩn lạc màu trắng mang bacmid tái tổ hợp chứa CD2vED. Để tránh dương tính giả, 11 khuẩn lạc màu trắng đã được chọn để sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi ED Q5 F/ED Q5 R1, bacmid tái tổ hợp thành công sẽ có sản

phẩm PCR kích thước 460 bp. Phân tích điện di trong hình 4B cho thấy 10/11 khuẩn lạc trắng có sản phẩm PCR đúng với kích thước được tính toán. 3/10 khuẩn lạc màu trắng (3, 5, 7) được tách bacmid làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR sử dụng cặp mồi như PCR khuẩn lạc để xác nhận sự có mặt của gen mục tiêu trong bacmid. Kết quả hình 4C cho thấy sản phẩm PCR có kích thước như dự đoán. Chứng tỏ, bacmid mang trình tự biểu hiện CD2vED-Foldon-His đã được tạo thành công.



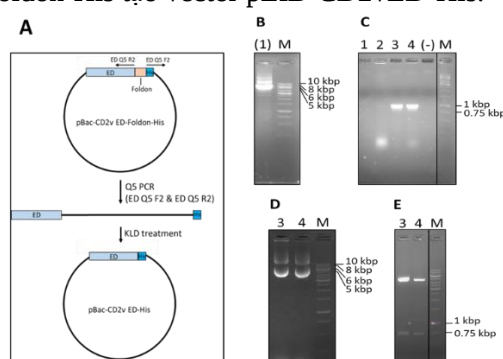
Hình 4. Tạo bacmid tái tổ hợp mang trình tự biểu hiện CD2vED-Foldon-His

A. Kết quả sàng lọc kháng sinh/ sàng lọc vi khuẩn xanh trắng trên đĩa thạch; B. Phân tích điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR khuẩn lạc (M: marker ADN; 1-11: sản phẩm PCR từ khuẩn lạc trắng);

C. Phân tích điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR sử dụng bacmid tinh sạch làm mẫu (M: ADN marker; 3, 5, 7: Sản phẩm PCR từ bacmid được chiết xuất từ khuẩn lạc trắng lần lượt là 3, 5, 7, (-): đối chứng âm, (+): vector pLIB-CD2vED-Foldon-His làm mẫu).

3.3. Thiết kế vector pLIB-CD2vED-His và tạo Bacmid tái tổ hợp mang trình tự biểu hiện CD2vED-His

Để nghiên cứu chức năng của motif Foldon, vector không có Foldon pLIB-CD2vED-His đã được thiết kế dựa trên vector gốc pLIB-CD2vED-Foldon-His bằng phương pháp gây đột biến định hướng Q5. Quy trình tạo vector được thể hiện trong hình 5A. Phản ứng PCR Q5 được tiến hành sử dụng cặp mồi ED Q5 F2/ED Q5 R2. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarose có kích thước đúng như dự đoán (Hình 5B). Vector tái tổ hợp này tiếp tục được biến nạp vào chủng *E. coli* G10 sau khi xử lý KLD. Các khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch LB được tiếp tục sàng lọc bằng PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi pBacF/R. Nếu việc xóa gen xảy ra, sản phẩm PCR có kích thước 1047 bp. Kết quả tại hình 5C cho thấy, hai khuẩn lạc số 3 và 4 cho băng có kích thước như tính toán lý thuyết. Hai khuẩn lạc này tiếp tục được tách plasmid (Hình 5D) bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III (Hình 5E). Kết quả cho thấy các băng ADN có độ dài theo đúng tính toán lý thuyết. Cùng với dữ liệu giải trình tự, đã xác nhận rằng vùng Foldon đã được xóa thành công khỏi vector pLIB-CD2vED-Foldon-His tạo vector pLIB-CD2vED-His.

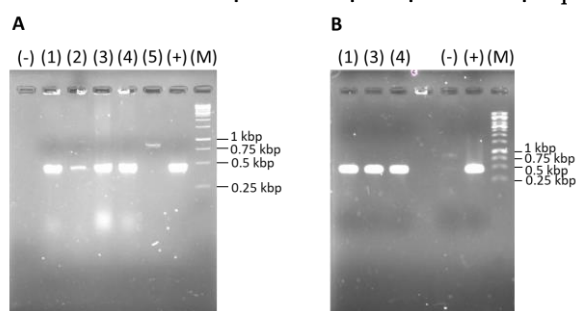


Hình 5. Kết quả thiết kế vector pLIB-CD2vED-His bằng phương pháp gây đột biến định hướng Q5

A. Sơ đồ biểu diễn các bước PCR xóa gen. B. Phân tích điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR Q5 (M: marker ADN; 1: sản phẩm PCR). C. Phân tích điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR khuẩn lạc (M: marker ADN; 1-4: sản phẩm PCR từ khuẩn lạc 1 đến 4; (-): đối chứng âm). D. Phân tích điện di trên gel agarose của các plasmid (M: marker ADN; 3, 4: plasmid từ khuẩn lạc 3, 4). E. Phân tích điện di trên gel agarose của sản phẩm phản ứng cắt enzyme *Bam*HI-*Hind*III (M: marker ADN; 3, 4: sản phẩm cắt enzyme *Bam*HI-*Hind*III từ plasmid 3, 4).

Vector pLIB-CD2vED-His được biến nạp vào *E. coli* DH10Bac nhằm tạo bacmid tái tổ hợp mang cassette biểu hiện CD2vED-His. Khuẩn lạc trắng được chọn trên môi trường LB bổ sung kháng sinh chứa kanamycin (50 µg/mL), tetracycline (10 µg/mL), gentamicin (10 µg/mL), X-Gal (40 µg/mL) và IPTG (40 g/mL) được kiểm tra bằng PCR khuẩn lạc. Phân tích điện di cho thấy có 3/5 khuẩn lạc màu trắng được thử nghiệm đã tạo ra sản phẩm PCR với kích thước CD2vED như tính toán (Hình 6A). Các khuẩn lạc màu trắng này (1, 3 và 4) được tách bacmid, thực hiện phản ứng PCR (sử dụng cùng cặp mồi như đối với PCR khuẩn lạc) để xác nhận sự có mặt của gen mục tiêu trong bacmid. Phân tích kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 6B) cho thấy kết quả PCR tương tự được quan sát thấy khi sử dụng bacmid tinh sạch làm khuôn. Như vậy, bacmid mang trình tự biểu hiện CD2vED-His đã được tạo thành công.

Các bacmid sau khi được tạo thành công được tách chiết từ tế bào *E. coli* và đưa vào tế bào côn trùng. Khi baculovirus tái tổ hợp sao chép và lây lan trong môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng, protein CD2vED trimer/monomer được biểu hiện một cách hiệu quả.



Hình 6. Tạo bacmid tái tổ hợp mang trình tự biểu hiện CD2vED-His

A. Phân tích điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR khuẩn lạc (M: marker ADN; 1-5: sản phẩm PCR từ khuẩn lạc trắng từ 1 đến 5; (-) đối chứng âm, (+): đối chứng dương. B. Phân tích điện di trên gel agarose của sản phẩm PCR sử dụng bacmid tinh sạch (M: ADN marker; 1, 3, 4: Sản phẩm PCR từ bacmid tách chiết từ khuẩn lạc 1, 3, 4, (-) đối chứng, (+): đối chứng dương.

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, 2 vector pLIB-CD2vED-Foldon-His và pLIB-CD2vED-His đã được thiết kế thành công sử dụng công nghệ tạo đột biến Q5. Các vector này được sử dụng để tạo 2 bacmid tái tổ hợp mang đoạn gen CD2v mã hóa vùng ngoại bào protein CD2v dạng trimer và vùng ngoại bào CD2v dạng monomer, định hướng sản xuất vắc xin tiểu đơn vị trên hệ thống baculovirus - tế bào côn trùng.

Lời cảm ơn

Kết quả nghiên cứu này thuộc đề tài “Nghiên cứu biểu hiện kháng nguyên CD2v của vi rút gây bệnh tả lợn Châu Phi ASF sử dụng hệ thống biểu hiện baculovirus” trong chương trình Hỗ trợ hoạt động nghiên cứu khoa học cho nghiên cứu viên cao cấp năm 2023. Mã số: NVCC08.02/23-23 do Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cấp kinh phí. Đề tài có sự dụng trang thiết bị của phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] S. Liu, P. Ding, Y. Du *et al.*, "Development and characterization of monoclonal antibodies against the extracellular domain of African swine fever virus structural protein, CD2v," *Frontiers in Microbiology*, vol. 2018, no. 1125, pp. 1–10, 2022.
- [2] J. M. Argilaguet, E. Perez-Martín, M. Nofrarias *et al.*, "ADN Vaccination Partially Protects against African Swine Fever Virus Lethal Challenge in the Absence of Antibodies," *PLOS ONE*, vol. 7, no. 9, pp. 1–11, 2012.
- [3] N. Jia, Y. Ou, Z. Pejsak *et al.*, "Roles of African swine fever virus structural proteins in viral infection," *Journal of Veterinary Research (Poland)*, vol. 61, no. 2, pp. 135-143, 2017.

-
- [4] D. P. Núñez, E. G. Urdiales, M. M. Bonet *et al.*, "CD2v interacts with Adaptor Protein AP-1 during African swine fever infection," *PLoS ONE*, vol. 10, no. 4, pp. 1–19, 2015.
 - [5] F. R. Gonzalvo, F. R. Guez, and J. M. Escribano, "Functional and Immunological Properties of the Baculovirus-Expressed Hemagglutinin of African Swine Fever Virus," *Virology*, vol. 289, no. 218, pp. 285–289, 1996.
 - [6] P. L. Monteagudo, A. Lacasta, and E. López, "BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities," *Journal of Virology*, vol. 91, no. 21, pp. 1-17, 2017.
 - [7] J. M. Argilaguet, E. P. Martín, and S. López, "BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus," *Antiviral Research*, vol. 98, no. 1, pp. 61-65, 2013.
 - [8] A. C. Chambers, M. Aksular, and L. P. Graves, "Overview of the Baculovirus Expression System," *Current Protocols in Protein Science*, vol. 91, no. 1, pp. 541-546, 2018.
 - [9] K. Zhang, X. Yin, and K. Shi, "A high-efficiency method for site-directed mutagenesis of large plasmids based on large ADN fragment amplification and recombinational ligation," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, pp. 1-16, 2021.
 - [10] Y. Tao, S. V. Strelkov, V. V. Mesyanzhinov *et al.*, "Structure of bacteriophage T4 fibrin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain," *Structure*, vol. 5, no. 6, pp. 789-798, 1997.