

TỐI ƯU MÃ DI TRUYỀN ĐỂ BIỂU HIỆN PROTEIN ORF2 CỦA PORCINE CIRCOVIRUS TRONG *ESCHERICHIA COLI*

Trương Quốc Phong¹, Khuất Hữu Thanh¹,
Trần Thị Thanh Hà², Đặng Vũ Hoàng²

TÓM TẮT

Bài báo này trình bày một số kết quả về tối ưu hóa mã di truyền gen ORF2 của porcine circovirus và biểu hiện ORF2 trong vi khuẩn chủ *Escherichia coli* BL21(DE3). Gen ORF2 tối ưu đã được tách dòng thành công trong vector biểu hiện pET22b(+) và chuyển vào *E. coli* BL21(DE3). Sự biểu hiện của protein ORF2 trong *E. coli* BL21(DE3) đã được kiểm tra bằng điện di gel polyacrylamide và lai Western blot. Kết quả nghiên cứu tối ưu hóa điều kiện biểu hiện của chủng tái tổ hợp cho thấy protein ORF2 tái tổ hợp được biểu hiện mạnh ở nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,05 mM, nhiệt độ 37°C và thời gian cảm ứng là 4 giờ. Protein ORF2 tái tổ hợp đã được tinh sạch sử dụng sắc ký ái lực đặc hiệu đuôi His-tag. Protein ORF2 tái tổ hợp dạng tinh sạch này có thể được sử dụng làm kháng nguyên gây miễn dịch trên động vật tạo kháng thể đặc hiệu. Việc biểu hiện thành công protein kháng nguyên ORF2 của porcine circovirus trong *E. coli* BL21(DE3) sẽ giúp cung cấp nguồn kháng nguyên phục vụ cho các nghiên cứu ứng dụng trong tạo sinh phẩm chẩn đoán và phát triển vaccine thể hệ mới.

Từ khóa: *Escherichia coli*, biểu hiện gen, mã di truyền tối ưu, ORF2, porcine circovirus 2 (PCV2)

Codon optimization for expression of porcine circovirus ORF2 protein in *Escherichia coli*

Truong Quoc Phong, Khuat Huu Thanh,
Tran Thi Thanh Ha, Dang Vu Hoang

SUMMARY

In this paper, some results of codon optimization of porcine circovirus ORF2 gene and expression of ORF2 protein in *Escherichia coli* were presented. Optimal ORF2 gene was successfully cloned in expression vector pET22b (+) and transformed into *E. coli* BL21(DE3) host. Expression of ORF2 protein in *E. coli* BL21(DE3) was checked by polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot method. Optimization studies of expression conditions for recombinant strain indicated that the highest level of recombinant ORF2 was achieved in conditions of 0.05% isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) inducer, 37°C temperature after 4 hours induction. Recombinant ORF2 protein was purified using His-tag specific affinity chromatography and could be used as antigen for animal immunization to generate specific antibodies. Successful expression of porcine circovirus ORF2 protein in *E. coli* BL21(DE3) could provide antigen source for applied studies in diagnosis and development of novel vaccines.

Keywords: *Escherichia coli*, gene expression, optimal codon, ORF2, porcine circovirus 2 (PCV2)

I. MỞ ĐẦU

Hội chứng còi cọc sau cai sữa (post-weaning multisystemic wasting syndrome – PMWS) ở

lợn được xác định là do porcine circovirus 2 (PCV2) gây ra. Virus PCV2 gây ra bệnh lý còi cọc, chậm lớn, rối loạn hô hấp và có thể chết, do đó gây thiệt hại rất lớn về kinh tế cho người chăn nuôi. Cho đến nay, PCV2 có mặt ở hầu hết

¹ Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

² Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch - Viện Thú y Quốc gia

các quốc gia trên thế giới [1]. tỷ lệ nhiễm PCV2 ở Việt Nam tương đối cao và tăng hàng năm [3]. Để giảm thiểu thiệt hại, biện pháp phòng bệnh bằng vaccin và chẩn đoán sớm tác nhân gây bệnh PCV2 để đưa ra phác đồ điều trị hợp lý là giải pháp tối ưu được lựa chọn. PCV2 là virus không vỏ chứa DNA, hệ gen dạng vòng sợi đơn. Hệ gen của PCV2 gồm 1768 nucleotid chứa hai khung đọc mở chính (ORF), trong đó ORF1 mã hóa cho 2 protein liên quan với quá trình sao chép (Rep và Rep'), ORF2 mã hóa một protein capsid của virus (Cap) [8]. ORF2 là protein cấu trúc duy nhất của virus và liên quan đến đáp ứng miễn dịch của vật chủ. Do đó, protein ORF2 được coi là kháng nguyên quan trọng ứng dụng trong chẩn đoán và phát triển vaccin phòng bệnh.

Escherichia coli là một trong những vật chủ biểu hiện gen ngoại lai hiệu quả và đang được sử dụng để sản xuất nhiều loại protein tái tổ hợp. Tuy nhiên, vật chủ biểu hiện này gặp khó khăn khi biểu hiện gen từ virus và sinh vật nhân thực do sự không tương thích về mã di truyền. Gen ORF2 của PCV2 có chứa nhiều mã hiếm, đặc biệt là cụm mã hiếm nằm ở đầu N của gen [6]. Các nghiên cứu trước đây cho thấy rằng: protein ORF2 không được biểu hiện trong *E. coli* BL21(DE3), nhưng lại được biểu hiện trong chủng cải biến *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL hoặc *E. coli* BL21-Rosetta (DE3) từ trình tự gen *ORF2* tự nhiên [4,11]. Protein ORF2 được biểu hiện thành công trong *E. coli* BL21(DE3) khi gen *ORF2* được biến đổi bằng cách thay thế 15 mã hiếm [6] hoặc loại bỏ trình tự đầu N chứa mã hiếm [12]. Protein ORF2 tái tổ hợp cũng được tổng hợp khi được biểu hiện đồng thời cùng với glutathione-S-transferase (GST) hoặc protein bám maltose (MBP) [7]. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của gen *ORF2* trong *E. coli* còn thấp. Để tăng cường biểu hiện protein ORF2 của PCV2 trong *E. coli* BL21(DE3), chúng tôi đã tiến hành tối ưu hóa toàn bộ trình tự gen *ORF2* sử dụng phần mềm OptimumGene của Genscript (Mỹ). Việc tối ưu không chỉ thay thế các mã hiếm mà còn thay đổi cấu trúc bậc 2

của mRNA thuận lợi cho quá trình dịch mã tổng hợp protein.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Chủng *E. coli* BL21 (DE3), vector pET22b(+) được chuyển giao từ Viện Công nghệ Sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam. Các hóa chất dùng cho sinh học phân tử, điện di protein được nhập từ Sigma-Aldrich (Mỹ), New England Biolabs (Mỹ), Merck (Đức). Kháng thể kháng đuôi His-tag, kháng thể bậc 2 kháng IgG thể thỏ gắn cộng hợp alkaline phosphatase được mua từ Genscript, Sigma-Aldrich (Mỹ). DNA tối ưu được tổng hợp hóa học bởi Genscript (Mỹ).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tối ưu mã di truyền

Việc tối ưu mã di truyền phù hợp chủng chủ *E. coli* được thực hiện bằng phần mềm OptimumGene của Genscript. Chất lượng của trình tự tối ưu được đánh giá thông qua chỉ số CAI và FOP. Chỉ số CAI = 1,0 được coi là điều kiện tốt nhất để biểu hiện trong vật chủ lựa chọn.

Khuếch đại gen ORF2

DNA tối ưu được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại gen *ORF2_{opt}* sử dụng cặp mồi đặc hiệu Orf2-F (5'- TTA CCA TGG CTT ATC CGC GTC GCC G -3') và Orf2-R (5'- ATA CTC GAG CGG TTT CAG CGG CGG GT -3'). Hỗn hợp phản ứng PCR bao gồm 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 μM mỗi loại mồi, 1X đệm, 1,25 U Taq DNA polymerase, 1 μl DNA khuôn. Phản ứng được thực hiện 30 chu trình nhiệt bao gồm 95°C trong 30s, 59°C trong 30s, 68°C trong 60s. Sản phẩm của phản ứng được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

Tách dòng gen ORF2_{opt} vào vector biểu hiện pET22b(+)

Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu có gắn 2 vị trí cắt enzyme hạn chế *NcoI* và *XhoI*

vào 2 đầu 5' và vector pET22b(+) được xử lý đồng thời bằng cặp enzyme *NcoI/XhoI* và tinh sạch. Các sản phẩm cắt được nối ghép sử dụng enzyme T4 DNA ligase và biến nạp vào *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Sự có mặt của gen *ORF2* trong vector biểu hiện pET22b(+) được kiểm tra bằng phản ứng PCR và cắt enzyme *NcoI/XhoI* [9].

Biểu hiện protein ORF2

Cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp pET22: *ORF2_{opt}* trong *E. coli* BL21(DE3) được sử dụng để biểu hiện protein ORF2. Quá trình biểu hiện được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Sambrook và Russell (2001) (Sambrook, Russell, 2001). Sự biểu hiện được cảm ứng bởi 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ở 37°C trong 4h. Sinh khối được thu hồi và xử lý bằng đệm điện di (0,125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10 mM EDTA; 1% SDS, 1 % mercaptoethanol, 8 M urea) ở 95°C trong 5 phút. Protein thể vùi được tách chiết như sau: sinh khối vi khuẩn được hòa tan trong đệm Tris-HCl, pH 6,8 và phá vỡ bằng siêu âm. Cặn tủa thu được bằng ly tâm đem xử lý bằng đệm (Tris-HCl, pH 6,8; 8 M Urea). Dịch protein được phân tích bằng điện di trên gel polyacrylamide (SDS-PAGE) và hiện màu bằng thuốc nhuộm coomassie blue [5].

Điều kiện biểu hiện protein ORF2 được tối ưu đơn yếu tố bao gồm nồng độ IPTG (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 và 1,3 mM), nhiệt độ (20, 25, 30 và 37°C), thời gian (0, 1, 2, 3, 4, 5h).

Phương pháp lai Western blot

Phương pháp lai Western blot được thực hiện theo mô tả bởi Hammer và cộng sự (2010) [2] và được tóm tắt như sau: protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE sau đó được chuyển lên màng PVDF theo kỹ thuật bán khô; màng được phủ bởi 5% sữa gầy và ủ với kháng thể bậc 1 kháng His-tag (0,01 μ g/ml) ở 4°C qua đêm; sau khi rửa thành phần không bám, màng

được ủ với kháng thể bậc 2 cộng hợp alkaline phosphatase kháng kháng thể bậc 1 (pha loãng 1:50000); tín hiệu trên màng được hiển thị bởi cơ chất NBT/BCIP.

Phương pháp phân tích hình ảnh gel và thống kê

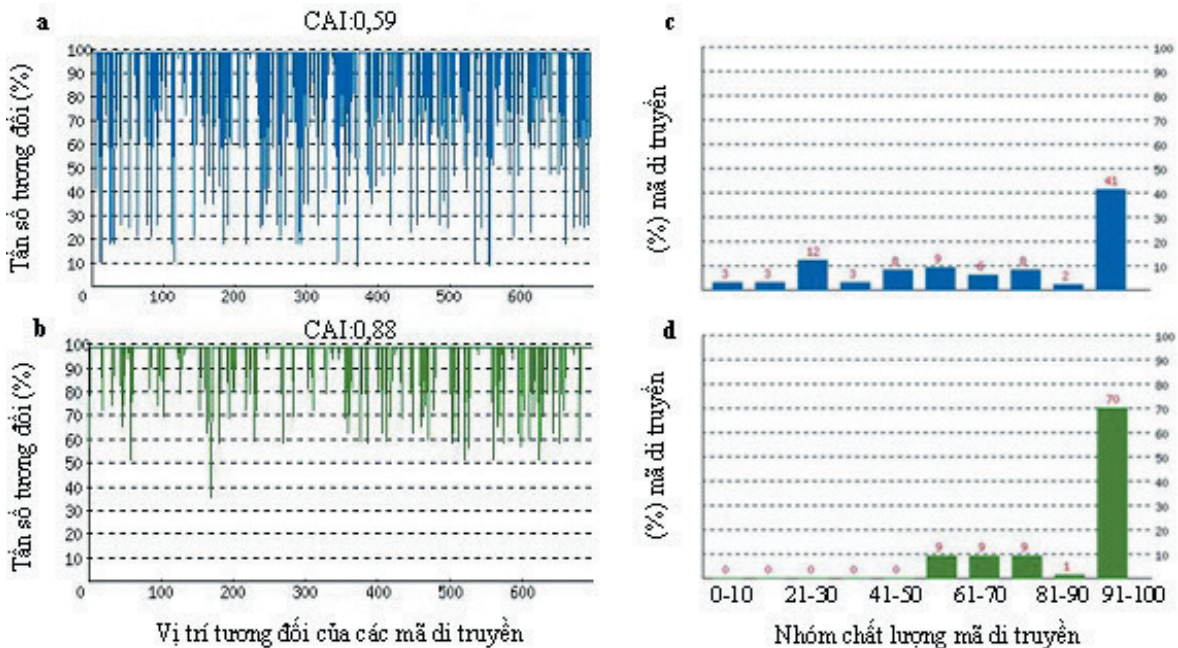
Cường độ băng protein trên bản gel điện di được phân tích và xác định bằng phần mềm Quantity One 4.6.9 (Bio-rad, Mỹ). % rORF2 = $C_{\text{rORF2}}/C_{\text{ts}} \times 100$, trong đó C_{rORF2} là cường độ băng protein đích rORF2, C_{ts} là tổng cường độ các băng protein trên một đường chạy.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tối ưu hóa mã di truyền gen ORF2 của porcine circovirus

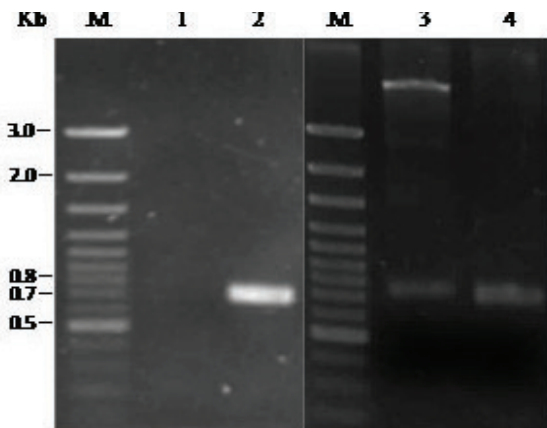
Trong nghiên cứu này, việc tối ưu mã di truyền phù hợp chủng chủ *E. coli* được thực hiện bằng phần mềm OptimumGene (GenScript). Kết quả tối ưu được đánh giá thông qua hai thông số là chỉ số thích ứng mã di truyền (CAI) – tần số sử dụng mã di truyền và tần số mã tối ưu (FOP). Chỉ số CAI > 0,8 được xem là có mức độ biểu hiện tốt, CAI = 1,0 có mức độ biểu hiện cao nhất trong vật chủ được lựa chọn. Kết quả phân tích cho thấy trình tự trước khi tối ưu có chỉ số CAI là 0,59, trong khi đó trình tự tối ưu được lựa chọn là 0,88 (hình 1a, 1b).

Kết quả phân tích tần số mã tối ưu cũng cho thấy trình tự trước tối ưu chỉ có 41% mã di truyền là đạt nhóm chất lượng 91-100, trong khi đó trình tự sau tối ưu là 70%. 30% mã di truyền còn lại trong trình tự sau tối ưu có mức chất lượng thuộc các nhóm từ 51-90, không có mã di truyền nào thuộc nhóm chất lượng < 50; trong khi đó trình tự trước tối ưu có tới 29% mã di truyền có mức chất lượng thuộc nhóm < 50 (hình 1c, 1d). Từ các kết quả thu được chỉ ra rằng: trình tự gen *ORF2* tối ưu lý thuyết sẽ có mức độ biểu hiện cao trong *E. coli*.



Hình 1. Tối ưu mã di truyền gen ORF2 của porcine circovirus. Phân bố tần số sử dụng mã theo chiều dọc của gen trước (a) và sau tối ưu (b); tần số mã tối ưu trước (c) và sau tối ưu (d)

3.2 Tách dòng và biểu hiện gen ORF2



Hình 2. Phổ điện di sản phẩm PCR với mỗi đặc hiệu và xử lý vector pET22::ORF2 bằng cặp enzyme NcoI/XhoI.

Đường chạy M, thang DNA chuẩn 100bp; đường chạy 1, sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen ORF2 và khuôn pET22b(+); đường chạy 2, 4, sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu gen ORF2 và khuôn pET22::ORF2; đường chạy 3, vector pET22::ORF2 được xử lý bằng NcoI/XhoI.

Trình tự gen sau khi được tối ưu lý thuyết ($ORF2_{opt}$) đã được tổng hợp hóa học bởi GenScript (Mỹ), khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu và được đưa vào vector biểu hiện pET22b(+). Kết quả sàng lọc và kiểm tra vector pET22 tái tổ hợp được thể hiện trên hình 2.

Theo lý thuyết, đoạn gen $ORF2_{opt}$ được đưa vào vector pET22b(+) có kích thước 705 bp. Do đó, sự xuất hiện của băng DNA có kích thước khoảng 0,7 kb trên phổ điện di sản phẩm PCR với mồi đặc hiệu và sản phẩm cắt plasmid bằng hai enzyme hạn chế cho thấy đoạn gen ORF2 đã được tách dòng thành công trong vector biểu hiện pET22b(+). Đoạn gen $ORF2_{opt}$ trong vector pET22:: $ORF2_{opt}$ cũng đã được phân tích trình tự để khẳng định kết quả tách dòng, kiểm tra khung đọc và trình tự acid amin. Kết quả cho thấy đoạn gen $ORF2_{opt}$ được tách dòng có khung đọc mở và trình tự acid amin suy diễn hoàn toàn không thay đổi so với trình tự gen gốc (hình 3).

```

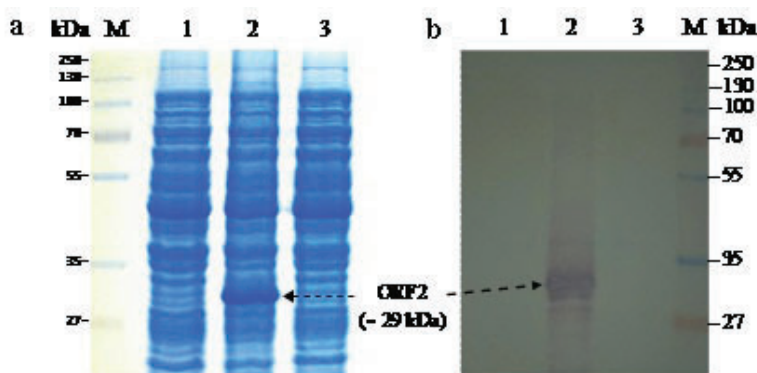
gcgatatccaaggaggcggtttccgcagacgaagacacccgccccgcagccatcttggccag
gcttatccgcgctcgccgcttccgctcgctcgtaaccgctccgctagtcacctgggtcaa
A Y P R R R R F R R R R R H R P R S H L G Q
atccctccgcgcgcgcgcctggctcgctccaccccgccaccgttacccgtggagaaggaaa
atccctgcgctcgccgctccgctgggttcacccgctacccgctacccgttggcgctgcgaaa
I L R R R P W L V H P R H R Y R W R R K
aatggcatcttcaaacacccgcctctcccgccaccttcgggatatactgtgaagaaaaaccaca
aacgggtatcttttaatacccgccctgagccgttaccttcggctataccggtgaagaaaaaccacc
N G I F N T R L S R T F G Y T V K K T T
gtcagaaacgccccctctggggcggtggacatgatgagatttaataattaacgatttccttccc
gtccgtaccccgctcttggggcggttgatgatgacgtttcaacatcaaagacttccctgcog
V R T P S W A V D M M R F N I N D F L P
ccaggaggggggtcaaaacccctcactgtgccccttgaatactacagaataagaaagggtt
gcagttattctggatgacaactttgtccgaaagcgacccgctgacgtatgaccogtac
P G G G S N P L T V P F E Y Y R I R K V
aaggttgaaattctggccctgctccccaatcacccagggtgacaggggagttggatccact
ccggggcggtggcagcaacccgctgacccgtcccggttgaatattaccgcatctgtaaagtg
K V E F W P C S P I T Q G D R G V G S T
gctgttattctagatgataactttgtaccaaaggccacagccctgacttatgatccctat
aaagttgaattctggccgtgcagcccgatcacccagggtgatccggtgtgtgggtctacg
A V I L D D N F V P K A T A L T Y D P Y
gtaaactactcctcccgccataaccataaccagcccttctcctaccactcccggtacttt
gtgaattatagctctgcgcataccatcacgcagccgtttagttaccactcccggtatttc
V N Y S R N H T I T Q P F S Y H S R A Y F
acccccaaacctgttcttgattccactattgattacttccaaacaaagtaaacaaaggaat
accccgaaacccggtgctggattcaacgattgactattttcaacccgtcgaaacaaacgaat
T P K P V L D S T I D Y F Q P S N K R N
cagctttggctgaggctacaaaacctctgcaaatgtggaccacgtaggccctcggcactgcg
cagctgtggctgctgtctgcaaacccagtgcaaatgtcgatcatgtgggtctgggacgggt
Q L W L R L Q T S A N V D H V G L G T A
ttcgaaaacagtatatacgaccaggactacaatatccgtgtaaccatgtatgtacaattc
ttcgaaaactccatctaogatacaagactacaacatccgtgtgacgatgtatgtccagttc
F E N S I Y D Q D Y N I R V T M Y V Q F
agagaatttaattctaaagaccccccaacttaaaccc
cgtgaatttaattctgaaagaccccgccgctgaaaccg
R E F N L K D P P L K P

```

Hình 3. Trình tự nucleotid trước - sau khi tối ưu mã di truyền và trình tự acid amin suy diễn (trình tự gen tối ưu được tô đậm)

Vector biểu hiện tái tổ hợp pET22::*ORF2_{opt}* đã được chuyển vào chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) để biểu hiện protein kháng nguyên ORF2. Kết quả phân tích protein dịch chiết từ sinh khối vi khuẩn bằng điện di gel polyacrylamide cho thấy: xuất hiện một băng protein đậm có kích thước khoảng 29 kDa đối với mẫu mang pET22::*ORF2_{opt}*; trong khi đó, mẫu mang vector pET22b(+) và pET22::*ORF2_{opt}* không cảm ứng, không thấy xuất hiện băng protein đậm này (hình 4A). Kích thước băng protein xuất hiện này là phù hợp với kích thước lý thuyết của sản

phẩm gen *ORF2* dung hợp với trình tự dẫn PeIB và đoạn peptide chứa đuôi His-tag thuộc vector. Để khẳng định chắc chắn thêm sự biểu hiện của protein *ORF2* tái tổ hợp, Western blot đã được thực hiện sử dụng kháng thể đặc hiệu kháng đuôi His-tag. Kết quả cho thấy chỉ xuất hiện băng tín hiệu đậm với kích thước khoảng 29 kDa đối với mẫu pET22::*ORF2_{opt}*, các mẫu đối chứng hoàn toàn không thấy xuất hiện băng tín hiệu nào. Từ các kết quả thu được có thể khẳng định rằng protein *ORF2* đã được tách dòng và biểu hiện thành công trong *E. coli* BL21(DE3).



Hình 4. (a) Phổ điện di protein tổng số từ *E. coli* BL21(DE3) mang vector pET22b(+) (đường chạy 1), pET::ORF2 có cảm ứng IPTG (đường chạy 2) và pET::ORF2 không cảm ứng (đường chạy 3).

(b) Phổ Western blot sử dụng kháng thể kháng đuôi His-tag đối với dịch chiết protein từ sinh khối *E. coli* BL21(DE3) mang pET22b(+)

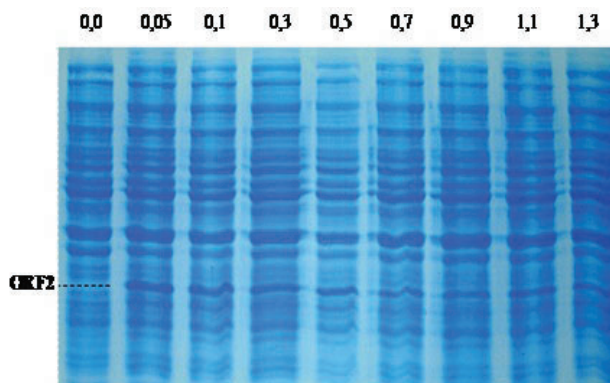
(đường chạy 1), dịch chiết protein từ sinh khối *E. coli* BL21(DE3) mang pET22::ORF2 có cảm ứng (đường chạy 2) và không cảm ứng (đường chạy 3). M, protein chuẩn (Thermo Scientific, Mỹ)

3.3 Tối ưu hóa biểu hiện protein ORF2

Để xác lập được điều kiện phù hợp biểu hiện protein ORF2 trong *E. coli*, một số điều kiện đã được khảo sát bao gồm nồng độ chất cảm ứng, nhiệt độ và thời gian.

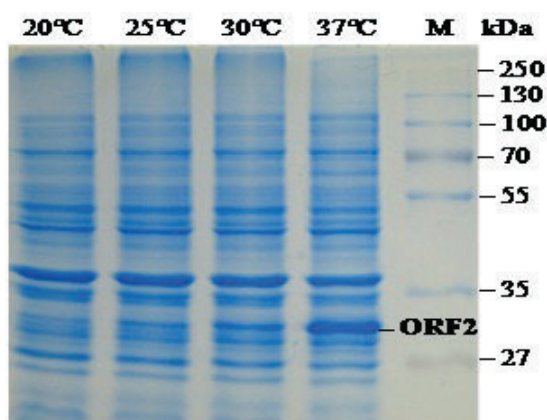
Chất cảm ứng IPTG đóng một vai trò rất quan trọng, ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp trong vật chủ [10]. Trong nghiên cứu này, hệ vector biểu hiện được sử dụng là pET22b(+) và vật chủ là *E. coli* BL21 (DE3), do đó mức độ biểu hiện của gen *ORF2* được kiểm soát trực tiếp bởi T7 promoter và gián tiếp là L8-UV5 *lac* [10].

Trước tiên, chất cảm ứng IPTG sẽ hoạt hóa sự biểu hiện gen mã hóa T7 RNA polymerase dưới sự điều khiển của promoter L8-UV5 *lac*, tiếp theo là bật mở promoter T7 để biểu hiện gen *ORF2_{opt}*. Để xác định nồng độ chất cảm ứng thích hợp, một dải nồng độ IPTG (0,0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 và 1,3 mM) được khảo sát và kết quả cho thấy mức độ biểu hiện protein không có sự tăng lên khi tăng nồng độ IPTG từ 0,05 – 1,3 mM (hình 5), do đó nồng độ chất cảm ứng IPTG 0,05 mM được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Nồng độ này thấp hơn 20 lần so với nồng độ được Kong et al. (2011) [4] sử dụng trong nghiên cứu.



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ chất cảm ứng IPTG (0; 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 và 1,3 mM) lên sinh tổng hợp rORF2

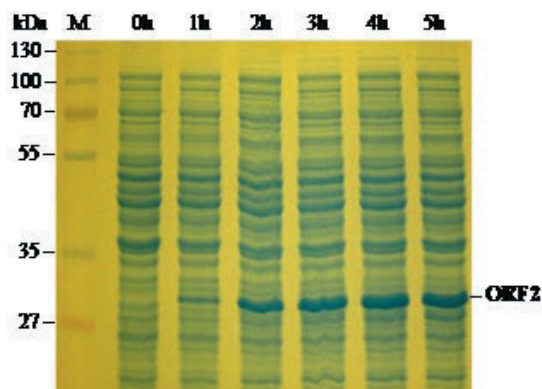
Nhiệt độ là yếu tố thứ hai được lựa chọn để tiến hành tối ưu vì nhiệt độ ảnh hưởng đến tốc độ của các phản ứng sinh hóa trong cơ thể và đồng thời ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, bốn giá trị nhiệt độ được lựa chọn bao gồm 20, 25, 30 và 37°C. Kết quả cho thấy mức độ biểu hiện là thấp nhất ở 20°C, sau đó tăng lên đến 30°C và 37°C (hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ 20, 30, 35 và 37°C lên sinh tổng hợp protein rORF2.

Pha protein tan và pha protein không tan từ sinh khối vi khuẩn sau cảm ứng được phân tích. M, protein chuẩn (Thermo Scientific, Mỹ).

Tuy nhiên, mức độ biểu hiện protein ORF2 ở nhiệt độ 20 – 30°C là rất thấp, chỉ ở điều kiện nhiệt độ 37°C xuất hiện một băng protein ORF2 đậm. Do đó, điều kiện nhiệt độ 37°C được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo, điều kiện này cũng được Kong et al. (2011) [4] sử dụng trong nghiên cứu của mình.

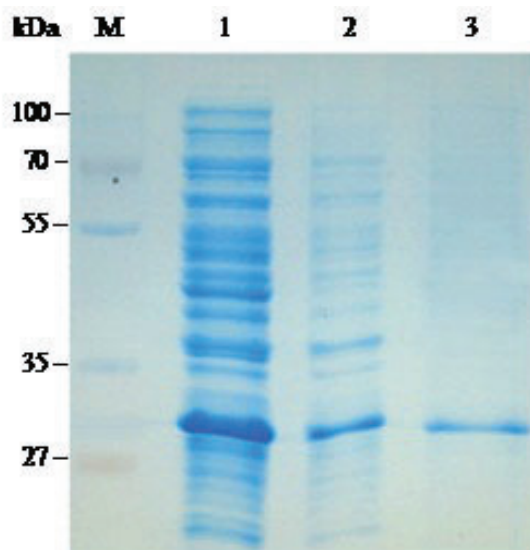


Hình 7. Mức độ biểu hiện protein ORF2 tái tổ hợp theo thời gian (0, 1, 2, 3, 4 và 5 h)
M, thang protein chuẩn (Thermo Scientific, Mỹ)

Kết quả nghiên cứu thời gian cảm ứng cho thấy mức độ biểu hiện protein ORF2 tăng lên theo thời gian trong khoảng thời gian nghiên cứu 0 – 5 giờ (hình 7). Để thuận tiện cho nghiên cứu, thời gian cảm ứng được lựa chọn là 4 giờ. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Kong et al. (2011) [4].

3.4 Tinh sạch protein ORF2 tái tổ hợp

Protein ORF2 tái tổ hợp được gắn thêm đuôi His-tag nên được tinh sạch sử dụng cột Hi-Histrap (GE Healthcare, Mỹ). Kết quả điện di protein cho thấy dịch chiết protein thô (đường chạy 1) xuất hiện rất nhiều băng protein, trong đó có 1 băng protein ORF2 đậm (hình 8).



Hình 8. Tinh sạch protein ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2

1, dịch chiết thô protein; 2, dịch protein không bám cột; 3, dịch protein phân đoạn đẩy bằng 500 mM imidazole. M, protein chuẩn (Thermo Scientific, Mỹ).

Tại phân đoạn không bám cột, xuất hiện tất cả các băng protein như mẫu dịch chiết thô, ngoại trừ băng protein ORF2 giảm đi, điều đó chứng tỏ protein ORF2 đã được giữ lại trên cột. Trong khi đó tại phân đoạn đẩy bằng 500 mM imidazole chỉ thấy xuất hiện băng protein ORF2. Từ kết quả này đưa đến kết luận rằng: protein ORF2 đã được tinh sạch từ dịch chiết sinh khối vi khuẩn *E. coli* bằng sắc ký ái lực đặc hiệu đuôi His-tag.

IV. KẾT LUẬN

Việc tối ưu mã di truyền của gen *ORF2* và xác định điều kiện biểu hiện tối ưu đã biểu hiện thành công protein *ORF2* trong *E. coli* BL21 (DE3). Việc biểu hiện và tinh sạch thành công protein *ORF2* tái tổ hợp có ý nghĩa cung cấp nguồn kháng nguyên gây đáp ứng miễn dịch trên động vật, tạo kháng thể đặc hiệu phục vụ cho phát triển sinh phẩm chẩn đoán và vaccin phòng bệnh do porcine circovirus gây ra.

Lời cảm ơn

Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp của virus PCV2 để chế tạo sinh phẩm chẩn đoán và làm nguyên liệu tiến tới sản xuất vaccin” của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn do Tiến sỹ Đặng Vũ Hoàng, Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch, Viện Thú y. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn PGS.TS Nguyễn Viết Không, nguyên trưởng Bộ môn Hóa sinh miễn dịch – Viện Thú y đã cung cấp chủng PCV2 để thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Guo L. G., Lu Y. H., Wei Y. W., Huang L. P., Liu C. M., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Viol. J.*, 7: 273.
- Hammer E., Phong T. Q., Steil L., Klingel K., Salazar M. G., Bernhardt J., Kandolf R., Kroemer H. K., Felix S. B., Volker U., 2010. Viral myocarditis induced by Coxsackievirus B3 in A.BY/SnJ mice: analysis of changes in the myocardial proteome. *Proteomics*, 10: 1802-1818.
- Huỳnh Thị Mỹ Lê, Nguyễn Văn Giáp, (2013). Phân lập và xác định đặc tính sinh học của porcine circovirus type 2 (PCV2) ở đàn lợn nuôi tại một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(3): 304-309.
- Kong W., Kong J., Hu S., Lu W., Wang K., Ji M., 2011. Enhanced expression of PCV2 capsid protein in *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* by codon optimization. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27: 651-657.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Liu Q., Tikoo S. K., Babiuk L. A., 2001. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2. *Virology* 285(1): 91-99.
- Liu Q., Willson P., Attoh-Poku S., Babiuk L. A., 2001. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein. *Protein Expr. Purif.* 21(1): 115-120.
- Nawagitgul P., Morozov I., Bolin S. R., Harms P. A., Sorden S. D., Paul P. S., 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.*, 81: 2281-2287.
- Sambrook J., Russell D. W., 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Terpe K., 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 211-222.
- Trundova M., Celer V., 2007. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes* 34(2): 199-204.
- Zhou J. Y., Shang S. B., Gong H., Chen Q. X., Wu J. X., Shen H. G., Chen T. F., Guo J. Q., 2005. In vitro expression, monoclonal antibody and bioactivity for capsid protein of porcine circovirus type II without nuclear localization signal. *J. Biotechnol.* 118(2): 201-211.

Nhận ngày 11-7-2016

Phản biện ngày 30-11-2016