

PHÂN LẬP VÀ BIỂU HIỆN ĐOẠN GEN MÃ HÓA POLYPEPTIT GIÀU TÍNH KHÁNG NGUYÊN TRÊN PROTEIN VỎ P10 CỦA VIRUS GÂY BỆNH LÚA LÙN SỌC ĐEN

Đỗ Thị Hạnh¹, Phạm Thanh Tâm², Phạm Xuân Hội²

¹Đại học Phương Đông, ²Viện Di truyền Nông nghiệp

Email: dohanhcnsh@gmail.com/xuanhoi.pham@gmail.com

Ngày gửi bài: 26.03.2015

Ngày chấp nhận: 09.10.2015

TÓM TẮT

Virus gây bệnh lúa lùn sọc đen (*Southern rice black-streaked dwarf virus - SRBSDV*) là một virus mới, thuộc *Fijivirus*, họ *Reoviridae*; gây dịch bệnh nghiêm trọng trên lúa với diện tích hàng chục triệu hecta tại các vùng trồng lúa ở phía Nam Trung Quốc và miền Bắc, Trung Việt Nam vào năm 2009 - 2010. Để tạo ra kháng thể đặc hiệu SRBSDV phục vụ chẩn đoán bằng kỹ thuật ELISA, đoạn gen mã hóa polypeptit giàu tính kháng nguyên P10.1 trên phân đoạn S10 của virus SRBSDV đã được phân lập và biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*. Đoạn gen *P10.1* có kích thước 525bp được nhân dòng vào vector pGEM®-T, sau đó ghép nối vào vùng biểu hiện trên vector pET28a và biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng Rossetta để nuôi cấy biểu hiện polypeptit tái tổ hợp. Polypeptit dung hợp có gắn nhãn His được biểu hiện ở điều kiện nuôi cấy tế bào 37°C trong thời gian 16h, với nồng độ chất cảm ứng IPTG 1,0mM. Sử dụng cột sắc ký ái lực Ni-NTA, một polypeptit tái tổ hợp có kích thước khoảng 35kDa gồm polypeptit P10.1 và hai đoạn polypeptit ở hai đầu 5' và 3' của vector pET28a đã được tinh sạch từ dịch chiết tế bào tổng số. Polypeptit tái tổ hợp tinh sạch sẽ được sử dụng làm nguồn vật liệu cho nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu virus SRBSDV.

Từ khóa: Polypeptit giàu tính kháng nguyên, P10.1, protein tái tổ hợp, SRBSDV, vector biểu hiện pET28a.

Purification and Expression of DNA Segment Encoding Highly-Antigenic Polypeptide from Capsid Protein P10 of Southern Rice Black-Streaked Dwarf Virus

ABSTRACT

Southern rice black-streaked dwarf virus-SRBSDV is a new virus species of the genus *Fijivirus* in the family *Reoviridae* which caused serious rice losses in tens of millions of hectares throughout southern China and northern and central Vietnam during 2009-2010 period. To develop sensitive and specific antibody for the diagnosis of SRBSDV based on ELISA method, a DNA fragment, namely P10.1, of the SRBSDV S10 segment, that encodes a highly-antigenic polipeptide, was cloned and expressed in *E. coli*. P10.1 consisting of 525 nucleotides was cloned into vector pGEM®-T, then inserted into the expression region of pET28a and transformed into *E. coli* strain Rosetta to express recombinant polypeptide. Polypeptide fused with His-tag was expressed at 37°C, for 16h with 1.0 mM IPTG inducer. Using Ni-NTA chromatographic column recombinant polypeptide of about 35 kDa from cell extracts was purified. The purified polypeptide will be used as antigen for inducing specific antibody against outer capsid protein of SRBSDV.

Keywords: Highly-antigenic polipeptide, P10.1, recombinant protein, SRBSDV, pET28a expression vector.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

SRBSDV gây bệnh lúa lùn sọc đen được phát hiện lần đầu tiên vào năm 2001 ở Quảng Đông, Trung Quốc, sau lây lan ra các tỉnh Giang Tây, Hồ Nam, Phúc Kiến, Hải Nam, Quý Châu,

Vân Nam... và phát dịch với diễn tích 13 triệu hecta tại các tỉnh miền Nam Trung Quốc năm 2009 - 2010 (Xu et al., 2014). Dựa vào các kết quả nghiên cứu về môi giới truyền bệnh, cấu trúc đặc trưng của các tiểu thể virus dưới kính hiển vi điện tử và bản chất hệ gene, SRBSDV

được xác định là một thành viên mới thuộc phân nhóm 2 trong chi *Fijivirus*, họ *Reoviridae* (Wang et al., 2010; Zhang et al., 2008). SRBSDV lan truyền qua rầy lưng trắng và rầy nâu nhỏ, tuy nhiên chỉ có rầy lưng trắng là truyền được virus từ lúa sang ngô. Phương thức truyền bệnh qua chích hút, không qua hạt giống, sinh sản (Guo et al., 2008). Đến thời điểm hiện tại, bệnh chỉ mới ghi nhận gây hại ở Việt Nam, Trung Quốc và gần đây tại Nhật Bản (Matshukura et al., 2013). Ở Việt Nam, bệnh lúa lùn sọc đen lần đầu tiên xuất hiện ở Nghệ An vào năm 2009 và nhanh chóng phát dịch trong năm 2009 - 2010 trên nhiều tỉnh thành Bắc Bộ và Bắc Trung Bộ với diện tích trên 40.000 ha, trong đó 18.000ha nhiễm nặng và gần như không cho thu hoạch. Triệu chứng bệnh đa dạng tùy thuộc vào tuổi của cây bị nhiễm bệnh, thông thường cây bệnh có các triệu chứng thấp lùn, lá xanh đậm, ở mặt sau lá và các đốt thân xuất hiện các nốt sần nhỏ (Ha et al., 2009; Hoang et al., 2011).

Hệ gen SRBSDV có chiều dài 29,124bp, gồm 10 phân đoạn RNA sợi đôi, có kích thước từ 1,8 - 4,5kb và được đặt tên theo thứ tự từ S1 đến S10 theo kích thước giảm dần (Guo et al., 2008). Phân đoạn S10 là phân đoạn nhỏ nhất, có chiều dài 1,797bp chứa một ORF (Open reading frame) có chiều dài 1,674 nucleotide mã hoá protein gai vỏ ngoài (P10) của hạt virus (Nguyễn Hoàng Quang và cs., 2013). Protein P10 có trọng lượng phân tử 62,6 kDa, phối hợp với protein P8 thuộc phân đoạn 8 tạo thành cấu trúc vỏ điển hình của các *Fijivirus* là dạng hình cầu đa diện đối xứng icosahedral ($T = 13$) (Wang et al., 2010). Protein P10 có liên quan đến tính tương tác đặc hiệu với vật chủ trung gian truyền bệnh là rầy lưng trắng, do đó có vai trò quan trọng trong sự tiến hoá của virus. Ngoài ra, phân đoạn S10 cũng như gen *P10* mã hóa protein vỏ của SRBSDV còn có vai trò quan trọng trong các nghiên cứu chẩn đoán nên được các nhà khoa học đặc biệt quan tâm nghiên cứu (Ngô Vĩnh Viễn và cs., 2009; Ha et al., 2009).

Triệu chứng bệnh do SRBSDV không điển hình, giống với các triệu chứng bệnh do virus lùn xoắn lá nên việc chẩn đoán dựa vào triệu chứng bệnh không mang lại hiệu quả (Ha et

al., 2009). Hiện nay, kỹ thuật chẩn đoán SRBSDV phổ biến nhất là phản ứng trùng hợp chuỗi (RT-PCR) sử dụng các cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự có tính bảo thủ cao trên phân đoạn S10 của hệ gen virus (Ha et al., 2009; Ngô Vĩnh Viễn và cs., 2009). Gần đây, kỹ thuật chẩn đoán SRBSDV bằng real-time RT-PCR cũng đang được áp dụng để định lượng virus phục vụ công tác chẩn đoán sớm (Zhang et al., 2013). Tuy nhiên, chẩn đoán SRBSDV dựa trên kỹ thuật PCR yêu cầu trang thiết bị hiện đại, kỹ thuật viên có chuyên môn, hoá chất đắt và đặc biệt là không thể áp dụng rộng rãi trên đồng ruộng. Chẩn đoán SRBSDV bằng kỹ thuật ELISA chưa được áp dụng do chưa có kháng thể đặc hiệu. Gần đây, các phòng thí nghiệm ở Trung Quốc đã phối hợp sản xuất kháng thể kháng SRBSDV bằng tổng hợp nhân tạo các đoạn polypeptit tương ứng với trình tự trên phân đoạn S10 có chiều dài 7 - 10 amino acid và phát triển kỹ thuật chẩn đoán bằng dot - ELISA. Tuy nhiên, độ đặc hiệu kháng thể chỉ ở mức độ pha loãng 1:1500 (Wang et al., 2012). Để tạo kháng thể đặc hiệu cho chẩn đoán bệnh lúa lùn sọc đen một cách nhanh chóng và hiệu quả bằng kỹ thuật ELISA, trong một nghiên cứu trước chúng tôi đã biểu hiện và tinh sạch thành công protein gai vỏ tại tổ hợp P10 (Phạm Thanh Tâm và cs., 2013). Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu biểu hiện và tinh sạch polypeptit tái tổ hợp giàu tính kháng nguyên trên protein gai vỏ P10 để tăng tính đặc hiệu kháng thể kháng SRBSDV.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Vector nhân dòng pGEM®-T mang phân đoạn S10 của SRBSDV (pGEM®-T/S10) phân lập từ mẫu lúa bệnh thu thập tại tỉnh Sơn La do Phòng Bệnh học phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp (Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam) cung cấp. Chủng vi khuẩn *E. coli* Rossetta sử dụng cho nghiên cứu biểu hiện protein do Trung tâm Kỹ thuật Di truyền và Công nghệ Sinh học Quốc tế (Ấn Độ) cung cấp.

Bảng 1. Trình tự các oligo sử dụng trong nghiên cứu

Tên oligo	Trình tự
S10-P1-Fw	5'-GAATTCATTCTGTTTCTGCAC-3'
S10-P1-Rv:	(5'-CTCGAGCTTACCACGTTTCCAG-3').
T7-Fw	5'-AATACGACTCACTATAG-3'
SP6	5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7-Rv	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

Vector nhân dòng pGEM®-T, vector biểu hiện pET28a và các hóa chất được mua của hãng Promega, Novagen, Invitrogen...

Các cặp oligo sử dụng làm mẫu cho phản ứng PCR đặt mua từ hãng Sigma (Mỹ)

2.2.1. Phân tích đặc điểm kháng nguyên của protein P10

Đặc điểm kháng nguyên của protein P10 (tính ưa nước, khả năng nằm trên bề mặt phân tử, cấu trúc không gian ba chiều) được phân tích bằng phần mềm Immune Epitope Database (IEDB) Analysis Resource. Tính thiên vị mã trên protein P10 được phân tích bằng phần mềm Rare codon calculator% (codon.org).

2.2.2. Nhân dòng đoạn gen P10.1

Đoạn gen P10.1 được nhân bản từ vector pGEM®-T/S10 bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu S10-P1-Fw/S10-P1-Rv với chu kỳ nhiệt: 94°C/5 phút, 30 chu kỳ (94°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/40 giây và 72°C/7 phút). Sản phẩm PCR được tinh sạch và nhân dòng bằng bộ kit pGEM®-T Vector System II của hãng Promega.

2.2.3. Thiết kế vector biểu hiện gen P10.1

Vector tái tổ hợp pGEM®-T/P10.1 và vector biểu hiện pET28a được xử lý đồng thời với EcoRI/XhoI. Đoạn gen P10.1 được ghép nối vào vùng biểu hiện của vector pET28a bằng enzyme T4 Ligase.

2.2.4. Biểu hiện và tinh sạch protein P10.1

Vector tái tổ hợp pET28a/P10.1 được biến nạp vào tế bào E. coli Rossetta bằng phương pháp sốc nhiệt, chọn lọc trên môi trường chứa kanamycin 50 µg/ml, chloramphenicol 34 µg/ml.

P10.1 được biểu hiện với điều kiện nuôi cấy tế bào ở 37°C, trong thời gian 16h, có bổ sung chất cảm ứng IPTG nồng độ 1,0mM. Protein dung hợp chứa đoạn P10.1 được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Ni-NTA (Invitrogen), sử dụng đệm Tris đầy cột chứa Imidazol nồng độ 250mM.

2.2.5. Thẩm tách miễn dịch (Western blot)

Protein sau khi điện di trên gel SDS-PAGE được điện chuyển lên màng nitro-cellulose theo phương pháp của Sambrook et al., 2001 và cố định bằng dung dịch BSA 5%. Màng nitro-cellulose được ủ với kháng thể sơ cấp anti-His-tag và kháng thể thứ cấp có gắn enzyme HRP (Invitrogen) để tạo liên kết protein-protein, sau đó hiện màu bằng dung dịch cơ chất 4CN (4-chloro-1-naphthol).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

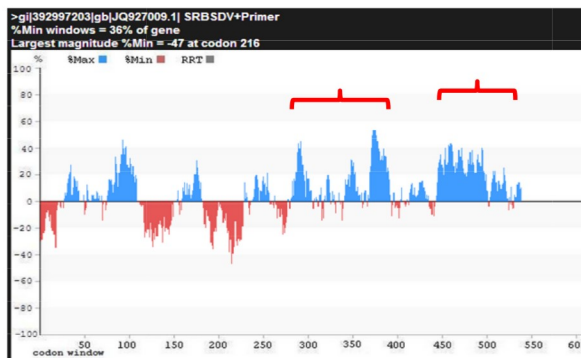
3.1. Xác định polypeptit giàu tính kháng nguyên trên protein P10

3.1.1. Phân tích tính thiên vị mã

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra rằng sự có mặt của các codon hiếm và các cụm codon hiếm có thể ảnh hưởng đến chất lượng và số lượng trong biểu hiện protein tái tổ hợp có nguồn gốc từ sinh vật khác trong E. coli. Những vấn đề thường xảy ra ở cấp độ dịch mã gồm: các codon hiếm làm giảm tốc độ dịch mã của gen đích, lượng protein đích biểu hiện được thấp hoặc không phát hiện được, dịch khung trong dịch mã, các axit amin bị dịch mã sai, dịch mã không hoàn toàn hoặc dịch mã thiếu axit amin.

Phân tích các bộ ba mã hiếm trên protein P10 cho thấy có 16 codon hiếm gặp, điều này có thể là nguyên nhân làm giảm hiệu suất biểu

Phân lập và biểu hiện đoạn gen mã hóa polypeptit giàu tính kháng nguyên trên protein vỏ P10 của virus gây bệnh lúa lùn sọc đen



Hình 1. Biểu đồ tính phổ biến/hiếm gặp của các codon trên gen P10

Ghi chú: Vùng màu xanh là vùng các axit amin phổ biến; vùng màu đỏ là vùng các axit amin hiếm gặp.

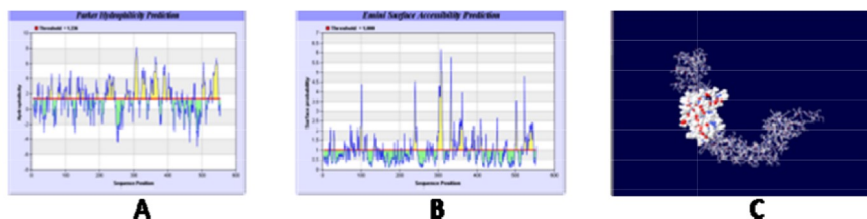
hiện trong tế bào *E. coli*. Sử dụng phần mềm Rare codon calculator% (codon.org) để xác định những vùng ít tập trung các codon hiếm gặp, kết quả cho thấy có hai đoạn polypeptit nằm trên protein P10 ít xuất hiện cụm codon hiếm thuộc vùng axit amin vị trí khoảng 280 - 400 và vùng axit amin vị trí khoảng 450 - 550 (Hình 1).

3.1.2. Phân tích tính kháng nguyên của protein P10

Để có thể xác định được đặc điểm kháng nguyên trên protein, sử dụng phần mềm dự đoán dựa theo tính ưa nước, kỵ nước và khả năng nằm trên bề mặt phân tử của từng axit amin theo hệ thống số liệu thu được từ ma trận thống kê trên nhiều loại phân tử protein đã

được phân tích trước đó cho thấy có hai đoạn polypeptit nằm trên protein P10 được dự đoán giàu tính kháng nguyên nằm trong vùng axit amin vị trí 290-S409 và axit amin vị trí 446-R557 (Hình 2A, B). Tiếp tục sử dụng phần mềm IEDB để nghiên cứu cấu trúc không gian 3 chiều protein P10 cho thấy vùng axit amin vị trí 290 - 409 được cho là giàu tính kháng nguyên (Hình 2C).

Tổng hợp kết quả phân tích tính thiên vị mã và tính kháng nguyên trên protein P10 cho thấy đoạn ADN ở vị trí từ 870 - 1230 mã hóa polypeptit ở vị trí 290 - 409 được xem là có hiệu suất biểu hiện cao ở trong tế bào *E. coli* và giàu tính kháng nguyên.



Hình 2. Biểu đồ tính ưa nước/kỵ nước của các axit amin trên protein P10

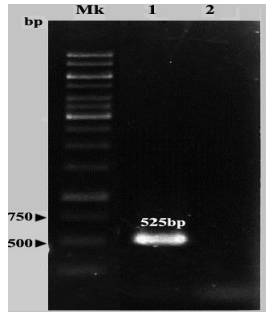
Ghi chú: A. Tính ưa nước của axit amin trên phân tử protein P10; vùng màu vàng là vùng các axit amin ưa nước; vùng màu xanh là vùng các axit amin kỵ nước. B. Khả năng nằm trên bề mặt phân tử của axit amin trên phân tử protein P10; vùng màu vàng là vùng axit amin nằm trên bề mặt. C. Cấu trúc không gian của protein P10.

3.2. Nhân dòng đoạn gen P10.1 vào vector pGEM®-T

Sử dụng pGEM®-T/S10 làm khuôn cho phản ứng PCR nhân bản đoạn gen *P10.1* bằng cặp mồi đặc hiệu S10-P1-Fw/S10-P1-Rv được thiết kế cho phép nhân bản trình tự đoạn gen *P10.1* có kích thước 525bp, chứa vùng mã hóa đoạn polypeptit P10.1. Như đã trình bày ở mục 2.1, cặp mồi được thiết kế thêm vị trí nhận biết 2 enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *XhoI* ở đầu 5' để thuận tiện cho việc thiết kế vector biểu hiện sau này. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy đã nhân bản được một đoạn DNA có kích thước khoảng 525bp - tương ứng với kích thước tính toán lý thuyết của đoạn gen *P10.1* (Hình 3, Giếng 1).

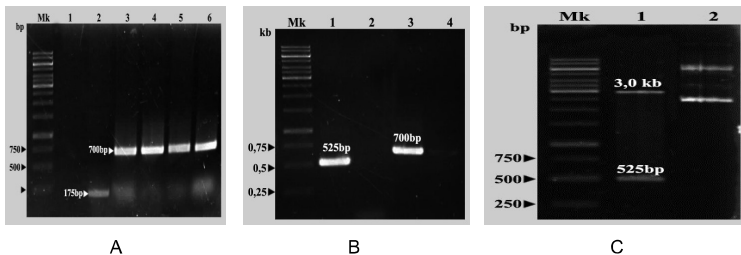
Sản phẩm PCR được ghép nối vào vector pGEM®-T, biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* chủng DH5α và cấy trải trên môi trường chọn lọc LB có bổ sung chất kháng sinh ampicillin 50 µg/ml, chất cảm ứng IPTG và cơ chất X-Gal. Chọn khuẩn lạc màu trắng và tiến hành PCR trực tiếp từ khuẩn lạc, sử dụng cặp mồi T7/SP6. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% cho thấy đã thu được các băng DNA có kích thước khoảng 0,7kb (Hình 4A, giếng 3 - 6) tương ứng với kích thước theo tính toán lý thuyết của đoạn gen *P10.1* cộng với một đoạn trình tự 186bp trên vector pGEM®-T.

Khuẩn lạc dương tính được chọn và nuôi cấy để tách chiết plasmid theo quy trình của bộ kit GenJET™ Plasmid Miniprep, sau đó kiểm



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân bản gen *P10.1*

Ghi chú: Giếng Mk: thang chuẩn DNA 1 kb; Giếng 1: khuôn là pGEM -T/S10; Giếng 2: đối chứng trắng



Hình 4. Kết quả nhân dòng gen *P10.1* vào vector pGEM®-T

Ghi chú: A. Kết quả điện di sản phẩm PCR từ các khuẩn lạc 3-6, với cặp mồi T7/SP6; B. Kết quả điện di sản phẩm PCR với khuôn là pGEM®-T/S10 sử dụng cặp mồi S10-P1- Fw/S10-P1-Rv (giếng 1 và 2) và cặp mồi T7/SP6 (giếng 3 và 4); C. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn plasmid tinh sạch từ khuẩn lạc bằng *EcoRI*.

Phân lập và biểu hiện đoạn gen mã hóa polypeptit giàu tính kháng nguyên trên protein vỏ P10 của virus gây bệnh lúa lùn sọc đen

tra sự có mặt của đoạn gen *P10.1* bằng phương pháp PCR và xử lý với enzyme cắt giới hạn. Phản ứng PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được thực hiện với 2 cặp mỗi: cặp mỗi đặc hiệu của vector pGEM®-T (T7/SP6) và cặp mỗi đặc hiệu của đoạn gen *P10.1*. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên hình 4B cho thấy đã thu được hai băng ADN có kích thước 525bp và 700bp phù hợp với tính toán lý thuyết. Trên vector pGEM®-T có 2 vị trí nhận biết của *EcoRI* ở hai đầu vị trí chèn đoạn DNA ngoại lai. Chính vì vậy, khi thực hiện phản ứng cắt bằng enzyme *EcoRI*, vector tái tổ hợp pGEM®-T sẽ bị cắt thành hai đoạn DNA có kích thước khoảng 3,0kb (là bộ khung nguyên bản của vector pGEM®-T) và 525bp (là đoạn gen *P10.1*) (Hình 4C, giếng 1). Kết quả thu được ở trên hình 3 cho thấy đã nhân dòng thành công đoạn gen *P10.1* vào vector pGEM®-T.

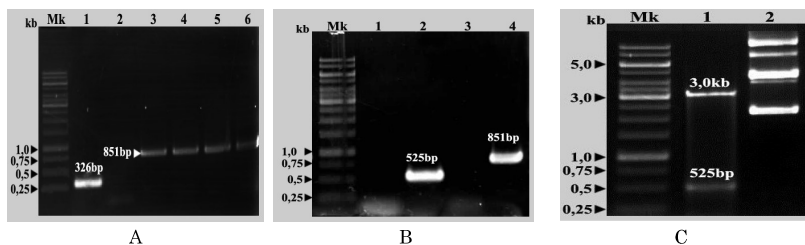
3.3. Thiết kế vector biểu hiện pet28a/P10.1

Tiến hành xử lý đồng thời 2 vector pGEMT/P10.1 và pET28a bằng *EcoRI/XhoI* và sản phẩm là băng DNA 525bp và 5,3kb tương ứng với đoạn gen *P10.1* và vector pET28a mạch thẳng được cắt khỏi bản gel agarose 1% và tinh sạch bằng bộ kit GenJET™ Gel Extraction (Fermentas). Phản ứng ghép nối đoạn gen *P10.1* vào vector pET28a được tiến hành bằng enzyme T4 ligase sau đó biến nạp vào tế bào khả biến

E. coli chủng DH5α, cấy trải trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung chất kháng sinh kanamycin (100 µg/ml) và nuôi qua đêm ở 37°C.

Các khuẩn lạc xuất hiện trên môi trường chọn lọc được sàng lọc bằng PCR với cặp mỗi đặc hiệu vector T7-Fw/T7-Rv. Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy tất cả các phản ứng sử dụng khuôn là khuẩn lạc đều cho băng ADN có kích thước khoảng 850bp, đúng với kích thước tính toán lý thuyết (Hình 5A, giếng 3-6).

Plasmid tái tổ hợp tinh sạch từ khuẩn lạc dương tính sau đó được kiểm tra bằng phản ứng PCR và phản ứng cắt enzyme giới hạn. Phản ứng PCR kiểm tra plasmid tái tổ hợp được thực hiện bởi cặp mỗi đặc hiệu vector (T7-Fw/T7-Rv) và cặp mỗi đặc hiệu đoạn ADN *P10.1* (S10-P1-Fw/S10-P1-Rv) cho thấy, sản phẩm PCR từ plasmid với cặp mỗi đặc hiệu đoạn ADN *P10.1* cho một băng ADN có kích thước khoảng 525bp và sản phẩm PCR từ plasmid với cặp mỗi vector cho một băng ADN có kích thước khoảng 850bp, đúng với kích thước dự tính (Hình 5B). Phản ứng cắt enzym giới hạn *EcoRI/XhoI* thu được băng ADN có kích thước khoảng 5,3kb là bộ khung nguyên bản của vector pET28a và băng ADN kích thước 525 bp là *P10.1* (Hình 5C). Kết quả thu được chứng tỏ đã nhân dòng thành công đoạn gen *P10.1* vào vector pET28a.



Hình 5. Kết quả ghép nối đoạn gen *P10.1* vào vector biểu hiện pET28a

Ghi chú:

A. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn lạc bằng mỗi T7-Fw/T7-Rv; Giếng Mk: thang chuẩn DNA 1kb; Giếng 1: đối chứng dương (khuôn là vector pET28a nguyên bản); Giếng 2-6: khuôn là các khuẩn lạc.

B. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra pET28a/P10.1 sử dụng cặp mỗi S10-P1-Fw/S10-P1-Rv (giếng 1 và 2) và cặp mỗi vector T7-Fw/T7-Rv (giếng 3 và 4). Giếng 1,3: đối chứng trắng. Giếng 2, 4: Khuôn là pET28a/P10.1.

C. Kết quả điện di sản phẩm cắt giới hạn pET28a/P10.1 bằng *EcoRI/XhoI*; Giếng Mk: thang chuẩn DNA 1kb; Giếng 1: sản phẩm cắt giới hạn pET28a/P10.1 bằng *EcoRI/XhoI*; Giếng 2: plasmid tái tổ hợp pET28a/P10.1 tinh sạch.

3.4. Biểu hiện protein tái tổ hợp P10.1 trong tế bào *E.coli* Rossetta

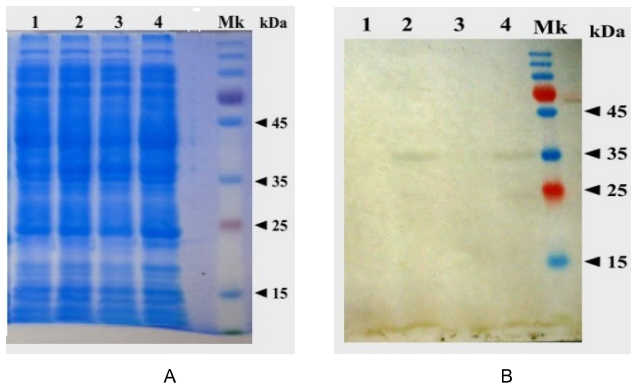
Vector pET28a mang đoạn gen *P10.1* được biến nạp vào tế bào Rosetta, PCR kiểm tra các khuẩn lạc phát triển trên môi trường LB có bổ sung kanamycin và cloramphenicol. Chọn khuẩn lạc dương tính nuôi để biểu hiện polypeptit P10.1 trong môi trường LB lỏng, cảm ứng bởi 1mM IPTG ở điều kiện nhiệt độ 37°C, trong 16h. Dịch chiết tế bào được điện di trên gel SDS-PAGE và lai thẩm tách miễn dịch, sử dụng kháng thể liên kết đặc hiệu với đuôi His-tag trong polypeptit dung hợp P10.1. Kết quả nhuộm màng nitrocellulose cho thấy không xuất hiện polypeptit dung hợp. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh protein tái tổ hợp chỉ có thể biểu hiện ở thể cặn mà không biểu hiện ở thể tan nên nghiên cứu tiếp tục lai thẩm tách miễn dịch để xác định liệu polypeptit P10.1 có biểu hiện ở thể cặn. Kết quả cho thấy một polypeptit dung hợp có kích thước khoảng 35kDa gồm polypeptit P10.1 và hai đoạn polypeptit ở hai đầu 5' và 3' của vector pET28a chỉ xuất hiện trong pha cặn của dịch chiết tế bào (Hình 6B; giếng 2, 4) mà không xuất hiện ở thể tan (Hình 6B; giếng 1, 3).

Kết quả này cho phép khẳng định đã bước đầu biểu hiện thành công polypeptit P10.1 trong tế bào vi khuẩn *E. coli*.

3.5. Tinh sạch protein tái tổ hợp P10.1

Do đoạn gen P10.1 được thiết kế chèn vào vị trí của *EcoRI/XhoI* trên vector pET28a, do đó polypeptit tái tổ hợp được biểu hiện sẽ là polypeptit P10.1 dung hợp với trình tự His-tag. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này để tách polypeptit tái tổ hợp. Dịch chiết tế bào tổng số được đưa lên cột sắc kí, sau đó được rửa bằng đệm Tris có chứa imidazol 30mm. Các phân đoạn protein tinh sạch sau đó được đẩy ra bằng đệm Tris chứa imidazol 250mm và điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE 12,5%.

Kết quả điện di cho thấy đã thu được bằng protein có kích thước khoảng 35kDa (Hình 7, Giếng 5-14). Kết quả này cho phép khẳng định bước đầu tinh sạch thành công polypeptit tái tổ hợp P10.1 từ dịch chiết tế bào vi khuẩn *E.coli*. Sản phẩm của nghiên cứu sẽ được sử dụng làm nguyên liệu trong nghiên cứu tạo kháng thể đặc hiệu phát hiện sự có mặt của SRBSDV trong các mẫu lúa.

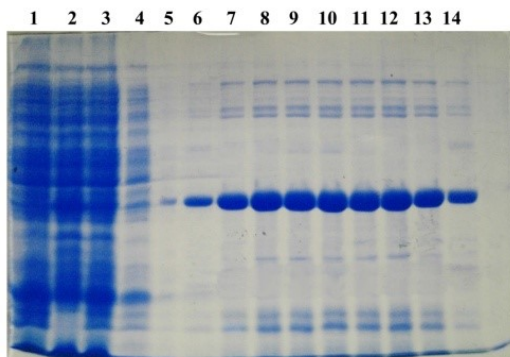


Hình 6. Kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*

Ghi chú:

A. Kết quả điện di dịch chiết tế bào trên gel polyacrylamide 12% (SDS-PAGE).

B. Kết quả lai thẩm tách miễn dịch sử dụng kháng thể kháng His-tag. Giếng Mk: thang chuẩn protein; giếng 1-4: dịch chiết tế bào mang pET28a/P10.1; giếng 1, 3: pha nổi của dịch chiết tế bào; giếng 2, 4: pha cặn của dịch chiết tế bào.



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm sau tinh sạch dịch chiết tế bào

Ghi chú: Giếng 1-4: các phân đoạn rửa cột bằng imidazol 30mM; giếng 5 - 14: Phân đoạn đẩy cột bằng imidazol 250mM.

4. KẾT LUẬN

Đoạn gen *P10.1* chứa vùng mã hóa đoạn polypeptit P10.1 giàu tính kháng nguyên với kích thước 525bp đã được phân lập từ phân đoạn S10 của SRBSDV và nhân dòng vào hệ thống vector biểu hiện protein pET28a, đặt dưới sự điều khiển của promoter T7.

Polypeptit dung hợp P10.1 đã được biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* Rossetta ở điều kiện nuôi cấy 37°C, chất cảm ứng IPTG nồng độ 1,0mM, trong thời gian 16h. Polypeptit dung hợp P10.1 chỉ có mặt trong pha cận của dịch chiết tế bào tổng số.

Polypeptit dung hợp P10.1 được tinh sạch bằng cột sắc kí ái lực Ni-NTA với nồng độ imidazol trong đệm Tris đẩy cột là 250mM. Sản phẩm polypeptit có đủ lượng và độ tinh khiết để sử dụng cho nghiên cứu gây kháng thể đa dòng kháng kháng protein gai vỏ virus SRBSDV.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

GuoH. Z., Jung W. J., Jiang C. D., Peng L., Lin X. D., Guang Z. S. (2008). "Southern rice black-streaked dwarf virus: A new proposed Fijivirus species in the family Reoviridae", Chin. Sci. Bullet., 53: 3677 - 3685.

Ha, V.C., Nguyen, V.H., Vu, T.M., Masaru, M. (2009). Rice dwarf disease in North Vietnam in 2009 is caused by southern rice black-streaked dwarf virus

(SRBSDV). Bull. Inst. Trop. Agric. Kyushu. Univ., p. 85 - 92.

Hoang A. T., Zhang H. M., Yang J., Chen J. P., Hebrard E., Zhou G. H., Vinh V. N., Cheng J. A. (2011). "Identification, characterization, and distribution of southern rice black-streaked dwarf virus in Vietnam", Plant. Dis., 95: 1063 - 1069.

Li Y., Xia Z., Peng J., Zhou T., Fan Z. (2013). "Evidence of recombination and genetic diversity in southern rice black-streaked dwarf virus", Archives of virology, p. 1 - 5.

Matshukura K., Towata T., Sakai J., Onuki M., Matsumura M. (2013). Dynamics of southern rice black-streaked dwarf virus in rice and implication for virus acquisition. Phytopath, 103: 509 - 512.

Nguyễn Hoàng Quang, Đỗ Thị Hạnh, Phạm Thị Vân, Trần Thị Như Hoa, Hà Viết Cường, Phạm Xuân Hội (2013). "Phân tích trình tự phân đoạn S10 của các chủng virus gây bệnh lúa lùn sọc đen ở Việt Nam". Tạp chí Khoa học và công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, 2: 26 - 31.

Phạm Thanh Tâm, Phạm Thị Vân, Nguyễn Hoàng Quang, Nguyễn Duy Phương, Phạm Xuân Hội (2013) Biểu hiện và tinh sạch protein vỏ P10 của virus SRBSDV gây bệnh lúa lùn sọc đen trong tế bào vi khuẩn *E. coli*. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, 231(2): 35 - 40

Ngô Vĩnh Viễn, Phạm Thị Vượng, Nguyễn Như Cường, Tạ Hoàng Anh, Nguyễn Thị Me, Phan Bích Thu, Phạm Hồng Hiến, Hà Viết Cường (2009). Kết quả chẩn đoán bệnh virus lúa lùn sọc đen ở một số tỉnh miền Bắc Việt Nam. Tạp chí Bảo vệ thực vật, 6: 8 - 18.

- Wang Q., Yang J., Zhou G. H., Zhang H. M., Chen J. P., Adams M. J. (2010). "The complete genome sequence of two isolates of southern rice black-streaked dwarf virus, a new member of the genus Fijivirus". *J. Phytopathol.*, 158: 733 - 737.
- Wang Z., Yu D., Li X., Zeng M., Chen Z., Bi L., Liu J., Jin L., Hu D., Yang S., and Song B. (2012) The development and application of a Dot-ELISA assay for diagnosis of southern rice black-streaked dwarf virus in the field. *Viruses*, 4: 167 - 183.
- Xu H., He S., Zheng X., Yang Y., Tian J., and Lu Z. (2014). Southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) directly affects the feeding and reproduction behavior of its vector, *Sogatella furcifera*. *Virology journal*, 11: 55.
- Yin X., Xu F. F., Zheng F. Q., Li X. D., Liu B. S., Zhang C. Q. (2011). "Molecular characterization of segments S7 to S10 of a southern rice black-streaked dwarf virus isolate from maize in Northern China". *Virol. Sin.*, 26: 47 - 53.
- Zhang H. M., Yang J., Chen J. P., Adams M. J. (2008). "A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus", *Arch. Virol.*, 153: 1893 - 1898.
- Zhang S., Zhang D., Liu Y., Luo X., Cheng J., and Peng J. (2013). Development of a real-time RT-PCR method for detection and qualification of southern rice black-streaked dwarf virus in rice. *Journal of Plant pathology & Microbiology*, 4: 7.