

BIỂU HIỆN PROTEIN INTERLEUKIN 7 TÁI TỔ HỢP TRONG DÒNG RỄ TƠ THUỐC LÁ (*Nicotiana tabacum* K326)

Nguyễn Huy Hoàng^{1,2}, Nguyễn Thị Anh¹, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Lê Văn Sơn²

(1) Đại học Y Dược Thái Nguyên

(2) Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Hiện nay, sử dụng liệu pháp sinh học trong khám chữa bệnh cho con người đang được nghiên cứu ngày càng sâu rộng. Một trong những sinh phẩm được nghiên cứu nhiều nhất là các loại cytokine, là thành phần quan trọng trong hệ thống miễn dịch của con người, trong đó nhóm interleukin 7 (hIL-7) đóng vai trò quan trọng nhất. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng biểu hiện protein hIL-7 tái tổ hợp trong dòng rễ tơ thuốc lá, tạo tiền đề nghiên cứu thu nhận protein hIL-7 tái tổ hợp từ hệ thống thực vật. **Phương pháp nghiên cứu:** Tiến hành chuyển đoạn gen mã hóa cho protein hIL-7 đã được nhân dòng vào vector pENTR221/cal/IL7. Sau đó vector này được chuyển vào vector pK7WG2D.1 bằng kỹ thuật Gateway cloning và biến nạp vào vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC15834 bằng phương pháp xung điện nhằm thu được protein hIL-7 tái tổ hợp ứng dụng trong điều trị bệnh. **Kết quả:** Kiểm tra protein thu nhận được bằng lai miễn dịch Western blot cho thấy đã biểu hiện thành công protein hIL-7 tái tổ hợp ở các dòng rễ tơ chuyển gen. Phân tích hàm lượng protein hIL-7 tái tổ hợp bằng phương pháp ELISA cho thấy hàm lượng protein hIL-7 thu nhận từ các dòng rễ tơ thuốc lá chuyển gen dao động từ 17,84 ng/μg đến 23,3 ng/μg protein tan tổng số. **Kết luận:** Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu thu nhận protein hIL-7 tái tổ hợp an toàn ở thực vật để sử dụng trong y học, chữa bệnh cho con người.

Từ khóa: *Nicotiana tabacum* K326, interleukin 7, rễ tơ, miễn dịch, gateway cloning

Abstract

EXPRESSION OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-7 PROTEIN IN HAIRY ROOT TOBACCO CELL LINE (*Nicotiana tabacum* K326)

Nguyễn Huy Hoàng^{1,2}, Nguyễn Thị Anh¹, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Lê Văn Sơn²

(1) Thai Nguyen University of Medicine and Pharmacy

(2) Institute of Biotechnology, VAST

Background: Nowadays, using biological therapies in human examination and treatment is being studied extensively. One of the most studied biologicals is the cytokine, which plays a key role in the human immune system, in which the interleukin 7 (hIL-7) plays the most important role. **Objectives:** To evaluate the expression of recombinant hIL-7 protein in the tobacco strain, creating a premise to study the recombinant hIL-7 protein from the plant system. **Methods:** We transplanted the gene encoding for the hIL-7 protein that was multiplexed into the vector pENTR221/cal/IL7. Then this vector was transferred into the pK7WG2D.1 vector by Gateway cloning technique and transformed into *A. rhizogenes* ATCC15834 by electroporation to obtain recombinant hIL-7 protein for therapeutic use. **Results:** Screening of proteins obtained by Western blot hybridization showed successful expression of recombinant hIL-7 protein in the transgenic silkworm populations. Analysis of recombinant hIL-7 protein content by ELISA showed that the amount of the hIL-7 protein content derived from transgenic tobacco lines ranged from 17.84 ng/μg to 23.3 ng/μg total protein solubility. **Conclusions:** This finding opens the way for researchers to obtain safe recombinant hIL-7 proteins in plants for medicine, treating human coughs.

Key words: *Nicotiana tabacum* K326, interleukin 7, hairy root, immunity, gateway cloning

1. MỞ ĐẦU

Trong y học ngày nay, các protein có hoạt tính sinh học được sử dụng rộng rãi để làm thuốc điều trị

như các loại hormone, enzyme tái tổ hợp... Trước đây, nguồn nguyên liệu để sản xuất các loại protein này chủ yếu là tách chiết từ các bộ phận của động

Địa chỉ liên hệ: Nguyễn Huy Hoàng, email: nguyenhuyhoang@tump.edu.vn

Ngày nhận bài: 17/12/2017, Ngày đồng ý đăng: 9/1/2018; Ngày xuất bản: 18/1/2018

vật. Tuy nhiên, do nhu cầu ngày càng cao trong khi nguồn cung từ động vật rất hạn chế, giá thành lại đắt và dễ nhiễm các mầm bệnh nguy hiểm cho con người, nên việc nghiên cứu tổng hợp protein tái tổ hợp được đặt ra một cách cấp thiết.

Biểu hiện protein tái tổ hợp ở thực vật hiện đang được quan tâm nghiên cứu vì những ưu điểm vượt trội so với các hệ thống biểu hiện khác. Ngày nay, từ những thành tựu của khoa học hiện đại, bao gồm cả công nghệ sinh học phân tử giúp cho thực vật trở thành nguồn sản xuất các hợp chất có giá trị như: các cytokine, kháng nguyên vaccine và kháng thể v.v... [3], [4], [5], [9], [12], trong đó, rễ tơ được sử dụng cho mục đích sản xuất protein tái tổ hợp và các chất chuyển hóa thứ cấp do có nhiều ưu điểm như chi phí sản xuất tương đối thấp, quá trình vận hành đơn giản, sản xuất các hợp chất đặc trưng cho các tế bào nhân chuẩn có hoạt tính sinh học do chúng có khả năng cải biến sau dịch mã, an toàn đối với con người do chúng không có các loại virus và mầm bệnh gây hại cho người [15]. Hiện nay, nuôi cấy rễ tơ đã được sử dụng rộng rãi cho nhiều quá trình sản xuất protein tái tổ hợp [16] và các dược phẩm sinh học tái tổ hợp như SEAP (human secreted alkaline phosphatase) [8], kháng nguyên bề mặt HbsAg của virus viêm gan B, các tiểu đơn vị B của độc tố vi khuẩn *Vibrio cholerae*, protein vỏ L1 của HPV, protein E2 của virus viêm gan E ở người HEV, kháng nguyên HA của virus cúm, protein vỏ của virus Rota, glycoprotein của virus dại [3]; protein huỳnh quang kết hợp với protein ricin B (GFP-ricin B) [13]; các loại kháng thể và các chuỗi nặng, chuỗi nhẹ của kháng thể [6].

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả biểu hiện protein hIL-7 tái tổ hợp thu nhận qua hệ thống rễ tơ thuốc lá. Đây là một trong những nghiên cứu tạo cơ sở nâng cao chất lượng điều trị bệnh cho con người theo hướng sử dụng liệu pháp sinh học và góp phần hoàn thiện các phương pháp nghiên cứu sản xuất các cytokine nói chung và interleukin 7 nói riêng một cách tối ưu.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Giống thuốc lá *N. tabacum* K326 được cung cấp bởi Viện Kinh tế kỹ thuật thuốc lá, Tổng Công ty thuốc lá Thăng Long cung cấp.

Chủng vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC 15834, *A. tumefaciens* Cv58, *E. coli* Rosetta-gami B dùng trong phân lập gen, thiết kế vector chuyển gen và biểu hiện protein hIL-7.

Vector chuyển gen pK7WG2D.1 có hai vị trí attR1 và attR2 được sử dụng làm vector đích trong kỹ thuật Gateway.

Vector pENTR™221/cal nhận từ Viện Sinh học phân tử và Dược học, Trường Đại học Heidelberg, CHLB Đức. Vector này được thiết kế mang đoạn tín hiệu peptide calreticulin nằm giữa hai vị trí tái tổ hợp attL1 và attL2 và hai điểm cắt của enzyme giới hạn là *SacI* và *HindIII* nằm ở đầu 3' của đoạn tín hiệu peptide.

Cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu để kiểm tra sự có mặt của gen *hIL-7*: IL7_F (TCGAGCTCGATTGTGATATT) và IL7_R (AGGAAACACAAGTCATTCAG) được tổng hợp tại công ty MWG, CHLB Đức.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp tối ưu mã di truyền gen *hIL-7* biểu hiện ở thực vật

Quá trình thay đổi mã di truyền của gen *hIL-7* gồm các bước:

Bước 1: Khai thác thông tin trình tự nucleotide gen *hIL-7* trên Ngân hàng Gen quốc tế, mã số 3574 [11] và trình tự mRNA, mã số J04156.1.

Bước 2: Thay thế các codon hiếm trong gen *hIL-7* bằng các codon phổ biến ở thực vật bằng phần mềm Codon Optimization 2.0 dựa trên thông tin tần suất các codon phổ biến ở thực vật trong cơ sở dữ liệu mã di truyền Codon Usage Database [11]. Ngoài ra, trình tự ATTTA được loại bỏ và sử dụng phần mềm Invitrogen để tối ưu nhằm giảm thiểu sự hình thành mRNA thứ cấp.

Bước 3: Bổ sung các vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *SacI*, *NcoI*, *HindIII*, *BamHI* vào trình tự gen nhằm phục vụ cho quá trình cắt và ghép nối gen khi thiết kế vector chuyển gen.

Bước 4: Thêm đoạn trình tự mã hoá cho c-myc tag và His-tag vào đầu 3' của gen *hIL-7* để kiểm tra sự biểu hiện của protein hIL-7 tái tổ hợp trong thực vật thông qua các phương pháp lai miễn dịch Western blot và phân tích ELISA và hỗ trợ thu nhận protein hIL-7 tinh sạch.

Bước 5: Sử dụng phần mềm BioEdit, Graphical Codon Usage Analyzer để kiểm tra và so sánh trình tự nucleotide và trình tự acid amin suy diễn của gen *hIL-7* trước và sau khi đổi mã. Gen *hIL-7* tái tổ hợp được đặt tổng hợp nhân tạo tại hãng Epoch Life Science (Mỹ) và được nhân dòng trong vector pBSK-IL7.

2.2.2. Phương pháp biến nạp vector chuyển gen vào vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC15834

Vector pK7WG2D.1/cal/IL7 sẽ được biến nạp vào tế bào *A. rhizogenes* ATCC15834 bằng phương pháp xung điện, gồm các bước: Tiến hành rửa cuvette bằng cồn 70° và nước deion vô trùng. Sau đó, đặt tế bào khả biến trong đá 15 phút và bổ sung 1 µl plasmid vào 50 µl tế bào khả biến và trộn nhẹ. Tiếp tục chuyển tất cả hỗn hợp dịch tế bào khả biến và plasmid vào cuvette và xung điện ở điều kiện 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω. Sau đó, để trong đá 10 phút, bổ

sung 500 µl YMB và đảo nhẹ rồi chuyển sang ống eppendorf 2ml. Nuôi cấy ở 28°C trong 1 giờ và cấy trải ra đĩa môi trường YMB bổ sung 100 mg/l kháng sinh spectinomycin.

Sự có mặt của vector chuyển gen được kiểm tra bằng kỹ thuật colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu hoặc bằng phản ứng cắt bởi enzyme giới hạn *SacI* và *HindIII*.

2.2.3. Phương pháp tạo rễ tơ thuốc lá chuyển gen hIL-7

Vector chuyển gen pK7WG2D.1 mang cấu trúc *hIL-7* được chuyển vào tế bào vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC15834 bằng phương pháp xung điện.

Phương pháp tạo rễ tơ chuyển gen được thực hiện theo Gaume và cộng sự (2003) [7]

Bước 1. Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn: Nuôi một khuẩn lạc *A. rhizogenes* ATCC15834 mang cấu trúc pK7WG2D.1/cal/IL7 vào 5 ml MS lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/l một ngày trước đồng nuôi cấy ở 28°C và 200 rpm. Hút 1 ml dịch khuẩn nuôi lỏng ở trên cho vào 50 ml MS lỏng, nuôi tiếp cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0.7.

Bước 2. Chuẩn bị mảnh cấy thực vật: Cắt các mảnh lá thuốc lá 1 tuần tuổi có kích thước khoảng 1 cm² và làm tổn thương xung quanh bằng lưỡi dao, đặt lên môi trường WPM trong 2 ngày.

Bước 3. Đồng nuôi cấy: Cho các mảnh lá vào bình tam giác loại 250 ml, bổ sung huyền phù vi khuẩn để lây nhiễm. Sau 30 phút, chuyển các mảnh lá lên giấy thấm đã khử trùng, thấm khô và cấy chuyển các mảnh lá lên môi trường WPM.

Bước 4. Chọn lọc: Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, tiến hành chuyển các mảnh lá sang môi trường WPM đặc bổ sung kháng sinh cefotaxime 500 mg/l và kanamycin 100 mg/l để chọn lọc những mảnh lá chuyển gen thành công. Sau 2 - 4 tuần, các mảnh cấy bắt đầu cảm ứng tạo rễ được cắt và chuyển sang môi trường WPM có bổ sung cefotaxime 400 mg/l và kanamycin 100 mg/l.

2.2.4. Phương pháp phân tích protein hIL-7 bằng sinh học phân tử

Lai Western blot

Tách chiết protein tan tổng số: Thu 1 gam sinh khối nghiền thành bột mịn trong niơ lỏng bằng cối chày sứ, bổ sung đệm PBS 1X. Thu dịch nghiền vào ống Eppendorf 2ml, ly tâm 10.000 rpm ở 4°C, thu dịch protein ở phía trên. Protein tổng số được định lượng bằng phương pháp so màu của Bradford (1976) [2] dựa trên sự thay đổi bước sóng hấp thụ cực đại và sự đổi màu xảy ra khi CBB (Coomassie Brilliant Blue) liên kết với protein trong dung dịch acid.

Điện di protein tổng số và chuyển màng: Protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE 12% trong

điều kiện không khử, sau đó chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Fast blotter G2 (Thermo Scientific Pierce) ở 25V, 1,3A trong 20 phút. Tháo màng, tráng bằng nước khử ion trong 5 phút.

Blocking protein: Protein trên màng lai được blocking bằng sữa tách béo 5% (pha trong PBS 0,05% Tween) trong 10 phút ở nhiệt độ phòng; ủ với kháng thể 1 anti c-myc nồng độ 180 µg/ml pha loãng tỷ lệ 1:100 qua đêm ở 4°C, rửa màng bằng dung dịch PBST 3 lần, mỗi lần 5 phút; ủ với kháng thể 2 là kháng thể IgG cộng hợp HRP pha loãng tỷ lệ 1:10.000 trong 1 giờ. Rửa màng bằng PBST 3 lần, mỗi lần 10 phút.

Phát triển màu protein: Protein hIL-7 trong mẫu được phát hiện nhờ phản ứng hiện màu bằng cơ chất DAB (Diaminobenzidine) trong 15 phút đến khi hiện bằng màu nâu.

Phân tích sự tích lũy hIL-7 tái tổ hợp bằng ELISA

Kỹ thuật ELISA gián tiếp định lượng protein hIL-7 thông qua định lượng protein c-myc được tiến hành theo phương pháp của Sun và cộng sự với một số cải tiến (2006) [14], gồm các bước chính: Bước 1: Pha loãng dịch chiết protein tổng số của các mẫu chứa hIL-7 đạt nồng độ 200 µg/ml, sử dụng 100 µl mẫu tra vào các ô trên đĩa microplate, mỗi mẫu lặp lại 3 lần; Bước 2: Ủ qua đêm ở 4°C; rửa đĩa 2 lần bằng PBS-T (Tween 0,05%); Bước 3: Blocking bằng sữa tách béo 5% pha trong PBS trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng; rửa đĩa 2 lần;

Bước 4: Ủ với kháng thể 1 anti c-myc (180µg/ml) pha loãng 1:100 trong 2 giờ; Ủ với kháng thể 2 là kháng thể IgG cộng hợp HRP pha loãng 1:10.000 trong 1 giờ và cơ chất hiện màu là TMB; Bước 5: Dùng HCl 1N để dừng phản ứng màu; Đo màu ở bước sóng 630nm.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu, phân tích thống kê

Kết quả nghiên cứu của luận án được phân tích thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2016, Table Curve theo các tham số thống kê: giá trị trung bình, độ lệch chuẩn (σ), sự sai khác giữa các giá trị trung bình được kiểm định bằng giới hạn sai khác nhỏ nhất LSD của Fisher với α=0,05, chỉ số ED₅₀ v.v...

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu mã di truyền gen hIL-7 biểu hiện ở thực vật

Chúng tôi sử dụng trình tự gen *hIL-7* ở người được công bố trên Ngân hàng Gen có mã số J04156.1 và bảng tần suất các codon phổ biến ở thực vật (Codon Usage Database) [4], cùng với phần mềm Codon Optimization 2.0 để loại bỏ và thay thế khoảng 10% các codon hiếm trong gen *hIL-7* bằng

các codon phổ biến trong thực vật mà không làm thay đổi thành phần và trật tự các acid amin. Ngoài ra, chúng tôi cũng tiến hành loại bỏ trình tự ATTTA trên gen *hIL-7* được cho là gây bất ổn trong quá trình phiên mã mRNA [10], kết hợp sử dụng phần mềm của Invitrogen để giảm thiểu sự hình thành cấu trúc mRNA thứ cấp.

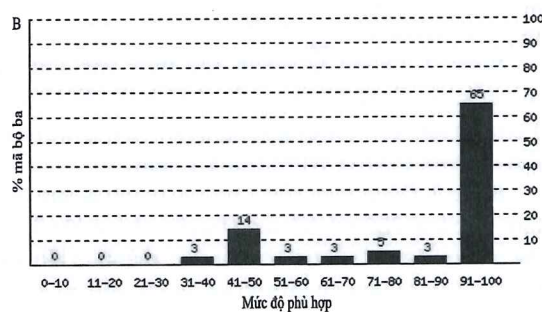
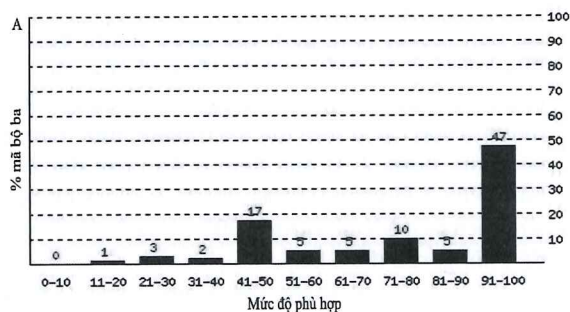
Ngoài ra, để chuẩn bị cho cắt và ghép nối gen trong quá trình thiết kế vector chuyển gen, các trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *NcoI*, *SacI* đã được thêm vào đầu 5' và trình tự nhận biết của enzyme giới hạn *HindIII* được thêm vào đầu 3' của gen *hIL-7*. Đồng thời, chúng tôi thêm các trình tự nucleotide mã hóa cho protein c-myc và his-tag vào đầu 3' của gen *hIL-7*.

Để phân tích và kiểm tra mức độ phù hợp của các codon trên gen *hIL-7* trước và sau khi cải biến mã di truyền, chúng tôi sử dụng công cụ Graphical Codon Usage Analyzer. Các bộ ba hiếm có chỉ số phù

hợp dưới 30% có khả năng ảnh hưởng tới sự biểu hiện của protein *hIL-7* trong hệ thống thực vật đã được thay bằng các bộ ba đồng nghĩa.

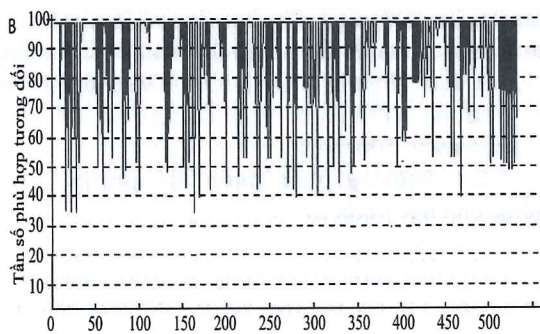
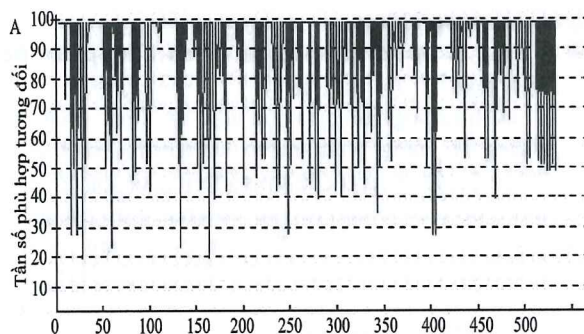
Kết quả phân tích sự phù hợp của gen *hIL-7* trước khi cải biến mã di truyền có số codon mà tần suất sử dụng dưới 30 chiếm 4% (Hình 1.A) được phân bố rải rác trên gen (Hình 2.A). Ngoài ra, chỉ số phù hợp codon CAI (codon adaptation index) của gen *hIL-7* trước cải biến đối với hệ thống biểu hiện thực vật là 0,72. Sau cải biến chỉ số CAI của gen *hIL-7* tăng lên 0,82 và không còn các bộ ba có tần suất sử dụng dưới 30% (Hình 1.B và 2.B), thay vào đó là các mã có tần suất sử dụng cao 90-100% (Hình 2.B).

Kết quả chúng tôi đã thành công trong việc thay đổi mã di truyền của gen *hIL-7* để phù hợp và nâng cao hiệu quả biểu hiện trong thực vật mà không làm thay đổi trình tự acid amin so với gen gốc, với độ tương đồng nucleotide là 63,6%, độ tương đồng acid amin là 100%.



Hình 1. Sự phân bố tỷ lệ % phù hợp của các nhóm mã bộ ba gen *hIL-7* biểu hiện trong hệ thống thực vật

A. Gen *hIL-7* trước cải biến mã di truyền, B. Gen *hIL-7* đã cải biến mã di truyền



Hình 2. Biểu đồ phân bố tần suất sử dụng codon theo chiều dài gen *hIL-7* khi biểu hiện trong hệ thống thực vật

A. Gen *hIL-7* trước cải biến mã di truyền, B. Gen *hIL-7* đã cải biến mã di truyền

Trình tự nucleotide gen *hIL-7* sau khi được tối ưu có kích thước 536bp, được đặt tổng hợp nhân tạo tại hãng Epoch Life Science (Hoa Kỳ) và được nhân dòng trong vector pBSK/IL7.

3.2. Thiết kế vector pK7WG2D.1/cal/IL7 tái tổ hợp

Quá trình thiết kế vector pK7WG2D.1/cal/IL7 tái tổ hợp bằng kỹ thuật Gateway đã được trình bày ở bài báo khác, chúng tôi xin phép không trình bày lại

ở bài báo này. Kết quả chúng tôi đã thiết kế thành công vector pK7WG2D.1/cal/IL7 tái tổ hợp để chuẩn bị cho quá trình biến nạp vào vi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC15834 bằng xung điện tạo rễ tơ chuyển gen.

3.3. Kết quả tạo rễ tơ thuốc lá chuyển gen mang gen *hIL-7*

Chúng tôi tiến hành cảm ứng mảnh lá thuốc lá trong môi trường WPM trước 2 ngày. Đồng thời, tiến hành nuôi khuẩn *A. rhizogenes* ATCC15834 mang vector pK7WG2D.1/cal/IL7 trong môi trường

YMB có bổ sung kháng sinh spectinomycin 100 mg/l.

Sau 2 ngày cảm ứng, các mảnh lá thuốc lá được đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. rhizogenes* mang vector chuyển gen pK7WG2D.1/cal/IL7. Các mảnh lá được nuôi cộng sinh 2-3 ngày và được cấy chuyển sang môi trường WPM có kháng sinh cefotaxime 500 mg/l và kanamycin 100 mg/l để chọn lọc. Số lượng mô lá sống sót trên môi trường chọn lọc giảm dần theo thời gian, sau 3 tuần, những mô lá sống sót bắt đầu cảm ứng tạo rễ tơ, kết quả thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1. Kết quả chuyển gen pK7WG2D.1/cal/IL7 vào mô lá thuốc lá trên môi trường chọn lọc

Lô thí nghiệm	Tổng số mô lá	Số mô lá sống sót sau 1 tuần	Số mô lá sống sót sau 2 tuần	Số mô lá sống sót sau 3 tuần
1	70	49	33	25
2	70	52	36	28
3	70	50	37	26
Tổng số	210	151	106	79

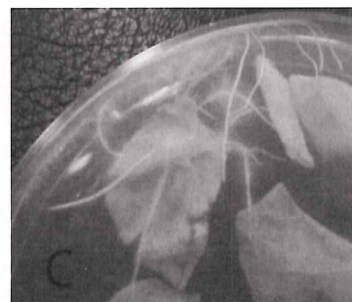
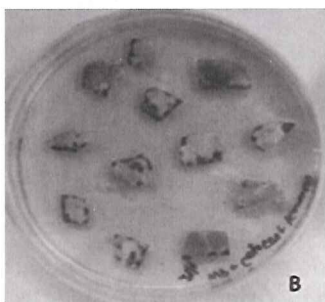
Kết quả tạo dòng và hình ảnh các mảnh lá trên môi trường chọn lọc được thể hiện qua Bảng 2 và Hình 3.

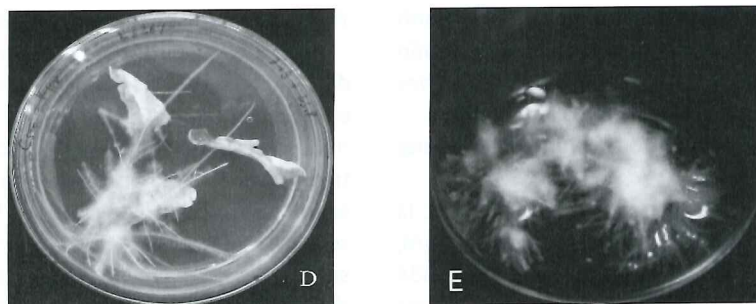
Bảng 2. Kết quả tạo dòng rễ tơ chuyển gen *hIL-7*

Lô thí nghiệm	Số mẫu	Mẫu cảm ứng tạo rễ		Số rễ/mảnh lá		Chọn lọc rễ		
		Số lượng	Tỷ lệ (%)	7 ngày	15 ngày	Số rễ tách riêng	Số rễ sống sót	Tỷ lệ (%)
1	70	25	35,71	2,34±1,15	12,31±1,22	108	108	100
2	70	28	40	2,33±1,45	11,27±1,14	102	102	100
3	70	26	37,14	2,14±1,24	9,56±1,34	95	95	100
Tổng số	210	79	37,62	2,27±1,28	11,04±1,23	305	305	100

Các dòng rễ tơ chuyển gen sẽ được chuyển sang nuôi cấy lỏng thu sinh khối để tách chiết protein *hIL-7* tái tổ hợp. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã sử dụng trình tự nucleotide tín hiệu calreticulin

ở đầu 5' của gen *hIL-7*, đoạn tín hiệu này có chức năng dẫn protein tái tổ hợp biểu hiện ra môi trường nuôi cấy giúp việc tinh sạch các protein tái tổ hợp được dễ dàng hơn.

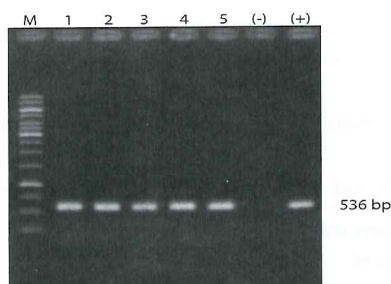




Hình 3. Kết quả quá trình tạo và chọn dòng rễ tơ chuyển gen hIL-7

(A). Giai đoạn đồng nuôi cấy; (B). Mảnh lá trên môi trường chọn lọc; (C). Mảnh lá cảm ứng tạo rễ sau 3 tuần; (D). Rễ tơ sinh trưởng nhanh sau 15 ngày cấy chuyển; (E). Rễ tơ chuyển gen trong môi trường lỏng

Chúng tôi chọn ngẫu nhiên 5 dòng rễ tơ từ các dòng sống sót sau chọn lọc, sinh trưởng ổn định và tiến hành phản ứng PCR bằng cặp mồi đặc hiệu IL7_F và IL7_R. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

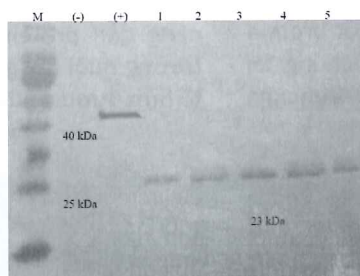


Hình 4. Kết quả PCR 5 dòng rễ tơ bằng cặp mồi IL7_F và IL7_R. M. Thang DNA chuẩn 1 kb; 1 - 5. Các dòng rễ tơ chuyển gen; (-). Đối chứng âm: dòng rễ tơ không chuyển gen; (+). Đối chứng dương: pBSK/IL7

Kết quả thể hiện trên hình 4 cho thấy, ở các giếng 1-5 đều xuất hiện một băng đặc hiệu, kích thước khoảng 536 bp, tương ứng với kích thước gen hIL-7 khi được nhân bằng cặp mồi IL7_F và IL7_R. Điều này chứng tỏ, chúng tôi đã chuyển thành công gen hIL-7 vào rễ tơ thuốc lá, là tiền đề cho các thí nghiệm biểu hiện protein tiếp theo.

3.4. Kết quả phân tích biểu hiện protein hIL-7 tái tổ hợp trong các dòng rễ tơ chuyển gen

Chúng tôi sử dụng kỹ thuật Western blot để phân tích sự biểu hiện của protein hIL-7 ở 5 dòng rễ tơ đã được đánh giá bằng kỹ thuật PCR. Kết quả thể hiện trên hình 5 cho thấy, các dòng rễ tơ chuyển gen mã hóa protein hIL-7 đều xuất hiện một băng kích thước

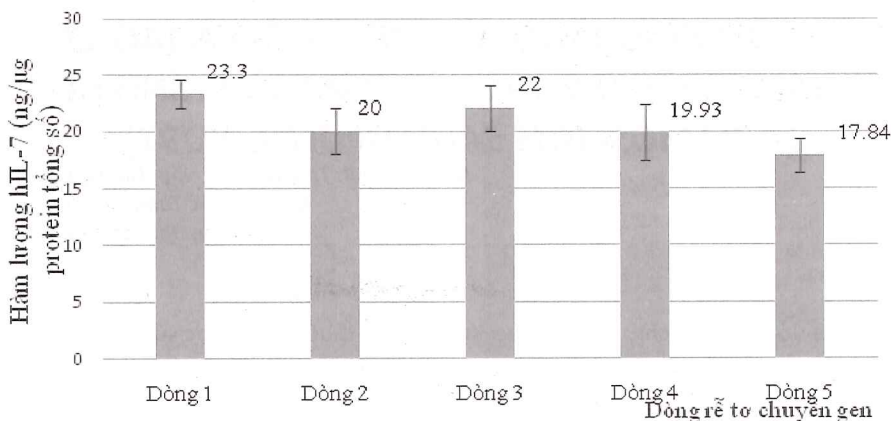


Hình 5. Kết quả biểu hiện protein hIL-7 ở các dòng rễ tơ bằng Western blot. M. Thang protein chuẩn; 1-5: dòng rễ tơ chuyển gen; (+). Đối chứng dương (protein scFv 150 ng), (-). Đối chứng âm: dòng rễ tơ không chuyển gen. Phản ứng lai sử dụng kháng thể kháng c-myc

khoảng 23 kDa, tương ứng với kích thước protein hIL-7 có kèm theo protein c-myc và his-tag theo tính toán lý thuyết. Trong khi ở đường chạy đối chứng âm là dòng rễ tơ không chuyển gen không xuất hiện băng protein. Điều này cho thấy gen mã hóa protein

hIL-7 đã được chuyển và biểu hiện thành công trong rễ tơ thuốc lá.

Chúng tôi sử dụng phương pháp ELISA để xác định hàm lượng protein hIL-7 tái tổ hợp trong các dòng rễ tơ chuyển gen. Kết quả thể hiện ở Hình 6.



Hình 6. Biểu đồ so sánh hàm lượng protein hIL-7 trong 5 dòng rễ tơ chuyển gen

Kết quả trên Hình 6 cho thấy, hàm lượng protein hIL-7 thu nhận từ các dòng rễ tơ chuyển gen dao động từ 17,84 ng/μg đến 23,3 ng/μg protein tan tổng số. Trong đó, biểu hiện protein hIL-7 cao nhất là dòng 1, đạt 23,3 ng/μg protein tan tổng số, thấp nhất là dòng 5, đạt 17,84 ng/μg protein tan tổng số.

4. KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu cho thấy, chúng tôi đã tối ưu thành công mã di truyền gen *hIL-7* biểu hiện ở thực vật và đã biểu hiện thành công protein hIL-7 tái tổ hợp ở dòng rễ tơ thuốc lá với hàm lượng cao nhất đạt 23,3 ng/μg protein tan tổng số. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu thu nhận protein hIL-7 tái tổ hợp an toàn ở thực vật để sử dụng trong y học, chữa bệnh cho con người.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Agnieszka S., Tomas V., Anna G., Patrycja R. (2011), "Recombinant Cytokines from Plants", *Int. J. Mol. Sci.*, 12(6), pp: 3536-3552, doi:10.3390/ijms12063536.
2. Bradford M. M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, 72, pp. 248-254, PubmedID: 942051.
3. Budzianowski J. (2009), "New role for tobacco production of biopharmaceuticals", *Przegl. Lek.*, 66(10), pp. 894-897.
4. Budzianowski J. (2012), "Tobacco a producer of recombinant interleukins", *Przegl. Lek.*, 69(10), pp. 1060-1062.
5. Budzianowski J. (2010), "Tobacco a highly efficient producer of vaccines", *Przegl. Lek.*, 67(10), pp. 1071-1076.
6. Drake P., Chargelegue D., Vine N., van Dolleweerd C., Obregon P., Ma J. (2003), "Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots", *Plant Molecular Biology*, 52(1), pp. 233-241.
7. Gaume A., Komarnytsky S., Borisjuk N., Raskin I. (2003), "Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots", *Plant Cell Rep.*, 21(12), pp. 1188-1193, doi: 10.1007/s00299-003-0660-3.
8. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. (2000), "Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals", *Nat Biotechnol*, 18(11), pp. 1151-1155.
9. Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y. (2005), "High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system", *Plant Biotechnol. J.*, 3(6), pp. 613-620, doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00154.x.
10. Gutierrez R., Macintosh G., Green P. (1999), "Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control", *Trends Plant Sci.*, 4(11), pp. 429-438.
11. Kazusa DNA Res. Inst. (2017), Codon usage database, <http://www.kazusa.or.jp/codon>, ngày 7/01/2017.
12. Liu C., Towler M. J., Medrano G., Cramer C. L., Weathers P. J. (2009), "Production of mouse interleukin-12 is greater in tobacco hairy roots grown in a mist reactor than in an airlift reactor", *Biotechnology Bioeng.*, 102(4), pp. 1074-1086, doi: 10.1002/bit.22154.
13. Mason H., Warzecha H., Mor T., Arntzen C. (2002), "Edible plant vaccines application for prophylactic and molecular medicine", *Trends Mol Med*, 8(7), pp. 324-329.
14. Sun H. J., Cui M., Ma B., Ezura H. (2006), "Functional expression of the tastemodifying protein, miraculin, in transgenic lettuce", *FEBS Lett*, 580(2), pp. 620-626, doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.080, pubmed ID: 16406368.
15. Tomasz K., Marta L., Janusz S., Tomasz S. (2016), "Hairy roots culture as a source of valuable biopharmaceuticals", *Postepy Hig Med Dosw (online)*, 70, pp.1-9, doi: 10.5604/17322693.1192186.
16. Wongsamuth R., Doran P. M. (1997), "Hairy roots as an expression system for production of antibodies", *In: Doran PM, ed: Hairy Roots: Culture and Applications*, Amsterdam: Harwood Academic, pp. 89-97.