

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH CPA-NLUC, NPB1-NLUC, CPA-CLUC, NPB1-CLUC HƯỚNG ĐẾN TẠO MÔ HÌNH SÀNG LỌC THUỐC CHỐNG LẠI VI-RÚT CÚM A

Nguyễn Trọng Bình^{1*}, Ngô Vĩnh Tường², Nguyễn Thiện Phương³, Vũ Thị Diễm Trang⁴, Nguyễn Đăng Quân¹, Dương Hoa Xô¹

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³ Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm, Thành phố Hồ Chí Minh

⁴ Trường Đại học Tôn Đức Thắng, Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Bệnh do vi-rút cúm A có khả năng lây truyền nhanh dẫn đến dịch bệnh và tử vong cao cũng như gây thiệt hại về kinh tế. Bộ gen vi-rút cúm là bộ gen RNA vì vậy kháng nguyên biến đổi rất nhanh, việc nghiên cứu và phát triển vắc-xin ngừa bệnh do vi-rút này gây ra đòi hỏi phải hiểu biết sâu về đặc tính kháng nguyên thay đổi đó, thời gian nghiên cứu lâu, sự bảo vệ không đủ đối với các bệnh nhân thiếu miễn dịch dẫn đến không hiệu quả vắc-xin. Bộ gen của vi-rút cúm A chứa 8 phân đoạn RNA sợi đơn âm mã hóa cho 11 protein. RNA polymerase (PB1, PB2 và PA) của vi-rút cúm có cấu trúc bảo tồn cao thông qua các chủng vi-rút cúm A, B và C. Phức hợp tương tác NPB1-CPA có tiềm năng cho thiết kế thuốc chống vi-rút cúm. Trong nghiên cứu này, để hướng tới tạo mô hình sàng lọc thuốc nhanh và trúng đích NPB1-CPA, chúng tôi tiến hành tạo dòng đoạn gen mã hóa protein dung hợp CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc vào vector pET28a và biểu hiện protein dung hợp CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc trong *Escherichia coli* BL21 (DE3) (RIL), protein thu nhận sau khi cảm ứng bằng 0,2 mM IPTG ở 15°C trong 16h. Những protein dung hợp này được tinh sạch bằng hạt Ni Sepharose (GE). Protein trước và sau tinh sạch được phân tách khi chạy điện di SDS-PAGE và phát hiện chúng bằng nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 và kháng thể chuột đơn dòng chống 6Histag. Thêm vào đó mức độ tinh sạch của những protein dung hợp này cho thấy dao động từ 87-96% có thể sử dụng cho thử nghiệm phân đoạn luciferase và thử nghiệm thuốc.

Từ khóa: CPA-Nluc, NPB1-Cluc, NPB1-CPA, RNA polymerase, thử nghiệm phân đoạn bổ sung luciferase, vi-rút cúm.

MỞ ĐẦU

Vi-rút cúm phân chia thành 4 loại: vi-rút cúm A-D dựa vào sự khác nhau của kháng nguyên nucleoprotein (NP) và kháng nguyên protein nền (matrix protein, M1) (Collin *et al.*, 2015). Trong các loại vi-rút trên, vi-rút cúm A gây ảnh hưởng nghiêm trọng cho sức khỏe con người và gây đại dịch. Dựa vào protein bề mặt như hemagglutinin (HA) hoặc neuraminidase, vi-rút cúm A chia thành các nhóm phụ khác nhau. 18 phân nhóm HA và 11 phân nhóm NA đã được xác định và hơn 100 tổ hợp có thể từ 144 HA-NA (H1-18, N1-9) đã được khám phá (Fouchier *et al.*, 2004). Hơn thế, theo sự phân tích đa dạng và cây phát sinh loài, HA và NA lần lượt được phân ra thành 280 và 202 nhóm phụ, điều này giúp hiểu thêm về sự tiến hóa và dịch tễ học của vi-rút cúm A (Shi *et al.*, 2010). Nhiễm cúm A và B theo mùa dẫn đến khoảng 3-5 triệu người mắc bệnh và khoảng 250.000 - 500.000 người chết hàng năm trên thế giới. Vi-rút cúm A đóng vai trò chính gây ra dịch bệnh lây theo đường hô hấp, tỉ lệ bệnh tật và tử vong cao (Leung *et al.*, 2014).

Vi-rút cúm thuộc họ *Orthomyxoviridae*, có dạng hình cầu với kích cỡ đường kính khoảng 80-120 nm. Bộ gen của vi-rút cúm A chứa 8 phân đoạn RNA sợi đơn âm mã hóa cho 11 protein (PB1, PB2, PA, HA1, HA2, NP, NA, M1, M2 NS1, NS2). Một vi-rút cúm A hoàn chỉnh chứa vỏ lipid lớp đôi, 3 protein xuyên màng của vi-rút được gắn chặt vào trong vỏ: glycoprotein HA (Hemagglutinin), glycoprotein NA (Neuraminidase) và protein kênh ion (M2), trái lại protein nền (M1) giữ phức hợp vRNP của vi-rút. Mỗi vRNP gồm mỗi phân đoạn của bộ gen, nhiều phân tử nucleoprotein (NP) và các tiểu đơn vị RNA polymerase, polymerase basic protein 1 (PB1), polymerase basic protein 2 (PB2) và polymerase acidic protein (PA). Đầu N của PB1 có vị trí 1-15 axit amin tương tác với đầu C của PA (Biswas *et al.*, 1996) và cấu trúc tinh thể của sự tương tác này đã được phân tích (He *et al.*, 2008; Obayashi *et al.*, 2008). Đầu C của PB1, vị trí axit amin 678 - 757 tương tác với đầu N của PB2 (Biswas *et al.*, 1996) và sự tương tác này cũng đã được phân tích bằng tinh thể hóa (Sugiyama *et al.*, 2009).

Trong số các tiểu đơn vị của RNA polymerase của vi-rút cúm thì PB1 chứa các vùng (motif) có bảo tồn cao (Biswas *et al.*, 1994). Để kháng lại dịch nhiễm vi-rút cúm thông thường vắc-xin được dùng để ngừa bệnh hoặc

dùng thuốc để chữa trị. Vắc-xin hiệu quả và an toàn chống lại sự nhiễm vi-rút cúm đã hiện diện và sử dụng hơn 60 năm qua. Tuy nhiên, kiến thức về đặc tính của kháng nguyên của những chủng mới cũng như thời gian để sản xuất vắc-xin, sự bảo vệ không đủ đối với các bệnh nhân thiếu miễn dịch dẫn đến không hiệu quả vắc-xin (Fiore *et al.*, 2009). RNA polymerase của vi-rút cúm là mục tiêu rất phù hợp cho sự phát triển thuốc chống lại vi-rút đặc hiệu ở phổ rộng mới bởi RNA polymerase của vi-rút cúm có cấu trúc bảo tồn cao thể hiện qua các chủng vi-rút cúm A, B và C (Reich *et al.*, 2014). Sự ức chế gắn cap của PB2, hoạt tính endonuclease của PA hoặc các domain trên PB1 đều có ý nghĩa cho liệu pháp chống vi-rút cúm (Fangyuan *et al.*, 2013). Các nghiên cứu gần đây đề nghị rằng những tương tác bề mặt bên trong PB1-PA và PB1-PB2 mà đã xác định bằng phân tích tinh thể là những mục tiêu để tạo ra các thuốc mới chống lại tất cả các chủng vi-rút cúm A (Obayashi *et al.*, 2008; Sugiyama *et al.*, 2009). Đặc biệt vị trí từ axit amin 1-50 PB1 của vi-rút cúm A và B cho thấy độ bảo tồn cao, ngoại trừ vị trí axit amin 16, 27 và 44 (Binh *et al.*, 2013). Dựa vào sự tương tác giữa PB1 và PA chúng tôi thiết kế thí nghiệm bổ sung phân đoạn protein (PCA). Trong PCA, 1 protein chỉ thị luciferase (Fluc) được cắt thành 2 phân đoạn: domain cuối N và domain cuối C. Domain đầu N của luciferase dung hợp với đầu phân tử tương tác PB1 và đầu C của luciferase dung hợp với đầu phân tử tương tác PA hoặc ngược lại. Hoạt tính luciferase được xây dựng lại khi có sự tương tác xảy ra (PB1-PA) và hoạt tính này giảm mạnh khi có sự hiện diện của chất ức chế sự tương tác protein-protein chẳng hạn như thuốc. Với mô hình này được ứng dụng như một hệ thống sàng lọc thuốc nhanh và đặc hiệu ở mức độ phân tử cho polymerase PB1-PA của vi-rút cúm, sàng lọc với số lượng mẫu lớn, chuẩn bị dễ dàng và đặt biệt sàng lọc trúng đích.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nhân dòng, biểu hiện và tinh sạch các protein dung hợp His-Fluc, His-Nluc, His-Cluc, His-CPA-Nluc, His-NPB1-Nluc, His-CPA-Cluc, His-NPB1-Cluc nhằm tạo mô hình sàng lọc thuốc ở mức độ phân tử chống vi-rút cúm A gây bệnh trên người.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vi khuẩn và môi trường nuôi cấy

Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH5 α ; *Escherichia coli* BL21 (DE3) (RIL) và vector pET28a được mua từ công ty Novagen, Đức. Thành phần nuôi cấy vi khuẩn *E.coli* theo hướng dẫn nhà sản xuất Biobasic, Canada.

Vector pHH21-PB1, pHH21-PA, pHH21-LUC lần lượt chứa gen mục tiêu mã hóa protein PB1, PA, luciferase được cung cấp từ Đại học Tsukuba, Nhật Bản.

Nhân dòng gen mã hóa protein Fluc, Nluc, Cluc, CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc

Để khuếch đại gen mục tiêu, chúng tôi dựa vào trình tự từ GenBank: AF093683.1 của NCBI để thiết kế mỗi cho gen mã hóa cho Fluc, Nluc và Cluc. Đối với gen NPB1 và CPA, sau khi thực hiện alignment với 250 nhóm phụ của vi-rút cúm A nhiễm trên người cho thấy vị trí 1-15 axit amin của PB1 gắn lên đầu CPA là bảo tồn cao tất cả nhóm phụ, ngoại trừ A/Singapore/1957/H2N2 có sự khác biệt tại vị trí axit amin 2,3,4 và A/Huston/1945/H1N1 khác biệt tại vị trí axit amin 6 so với 248 nhóm phụ cùng alignment trong đó có A/Wilson-Smith/1933/H1N1 (A/WSN/1933(H1N1)). Vì vậy chúng tôi dựa vào vi-rút cúm A/WSN/1933(H1N1) làm đại diện nhóm phụ để thiết kế mỗi NPB1 (GeneBank: J02178.1) và thiết kế mỗi cho gen mã hóa CPA (GeneBank: X17336.1). Trình tự mỗi được thiết kế theo Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự các môi được thiết kế

Tên môi	Trình tự môi	Kích thước sản phẩm PCR dự kiến (bp)	Enzyme cắt giới hạn
N Luc F aa1	5'- GAAGCGGCCGCATGGAAGACGCCAAAAAC -3'	1311	<i>Not I</i>
N Luc R 1311 aa437	5'- GAAGCGGCCGCTTAGCGGTCAACTATGAAG-3'		<i>Not I</i>
C Luc F 1153 aa394	5'- GAAGCGGCCGCCCTATGATTATGTCCGGTTATG-3'	462	<i>Not I</i>
C Luc R 1641 aa547	5'- GAAGCGGCCGCTTACTTTCCGCCCTTCTTG-3'		<i>Not I</i>
NPB1 F 25 aa1	5'- GAAGGATCCATGGATGTCAATCCGACTTTAC-3'	243	<i>BamHI</i>
NPB1 R 267 aa81	5'- GAAGGATCCACCACTTGTTTCATTGTCTTC-3'		<i>BamHI</i>
CPA F741 aa239	5'- GAAGGATCCAACGGCTACATTGAGGGCAAG-3'	1434	<i>BamHI</i>
CPA R2172 aa716	5'- GAAGGATCCTCTCAATGCATGTGTGAGGAAG-3'		<i>BamHI</i>

Chúng tôi thiết kế mỗi đặc hiệu cho gen mục tiêu mã hóa Fluc Nluc và Cluc gắn vị trí nhận biết enzyme giới hạn *NotI* ở vị trí mỗi xuôi và ngược trong khi đó CPA và NPB1 chứa vị trí nhận biết enzyme cắt giới hạn *BamHI* ở cả mỗi xuôi và ngược. Khuếch đại đoạn gen mục tiêu được thực hiện trong tổng thể tích 50 μ L gồm: 1X Phusion HF Buffer, 200 μ M dNTP, 0,5 μ M của mỗi mỗi (mỗi xuôi và mỗi ngược), 3% DMSO, 10 ng vector (pHH21-PB1 hoặc pHH21-PA hoặc pHH21-LUC) và 0,02 U/ μ L Phusion DNA Polymerase. Sau quá trình biến tính ban đầu ở 98°C trong 30 giây, 30 chu kì khuếch đại được thực hiện với trình tự mỗi chu kì như sau: biến tính ở 98°C trong

10 giây, bắt cặp ở 64°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 90 giây. Bước kéo dài sau cùng ở 72°C trong 10 phút và kết thúc phản ứng giữ ở 10°C.

Để tạo plasmid tái tổ hợp mang gen mục tiêu, sản phẩm PCR của các gen mục tiêu sau khi tinh sạch cùng với vector biểu hiện, pET28a được xử lý với enzyme cắt giới hạn. Sản phẩm cắt được điện di và tiến hành thu nhận gen chuẩn bị cho giai đoạn gắn vào vector biểu hiện pET28a. Kết quả thu nhận đoạn gen được kiểm tra trên gel agarose 1% và được tinh sạch qua gel bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific™). Plasmid pET28a đã mở vòng được nối với đoạn gen mục tiêu đã qua xử lý với enzyme cắt giới hạn tùy vào đoạn gen mục tiêu chứa vị trí cắt giới hạn. Sản phẩm nối được chuyển vào tế bào khả nạp *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp. Chỉ có những tế bào *E. coli* DH5α có mang plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen kháng Kanamycin mới có khả năng tạo khuẩn lạc trên môi trường LB có chứa Kanamycin (20 µg/ml). Các khuẩn lạc dự tuyển được tiến hành kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mỗi T7 promoter và T7 terminator trên vector. Để chắc chắn rằng các sản phẩm tạo dòng biểu hiện đúng protein mong muốn, chúng tôi tiến hành tinh sạch plasmid biểu hiện chứa gen mục tiêu và giải trình tự các mẫu. Chúng tôi sử dụng cặp mỗi T7 promoter/T7 terminator để tiến hành xác định trình tự đoạn gen được chèn vào giữa vùng MCS trên vector pET28a. Kết quả giải trình tự được xử lý theo hai bước: thứ nhất là so sánh với dữ liệu gen mà chúng tôi đã tối ưu hoá trước đó bằng phần mềm Clustal X (SFI) và trình tự axit amin trên ngân hàng gen (NCBI). Tương tự cho việc xây dựng plasmid pET28a chứa gen mã hóa cho NPB1-Nluc, NPB1-Cluc, CPA-Nluc hoặc CPA-Cluc bằng cách đoạn gen mã hóa cho NPB1 hoặc CPA được chèn vào pET28a- Nluc hoặc pET28a- Cluc tại vị trí nhận biết enzyme cắt giới hạn BamHI.

Biểu hiện, tinh sạch và phát hiện các protein dung hợp Fluc, Nluc, Cluc, CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc

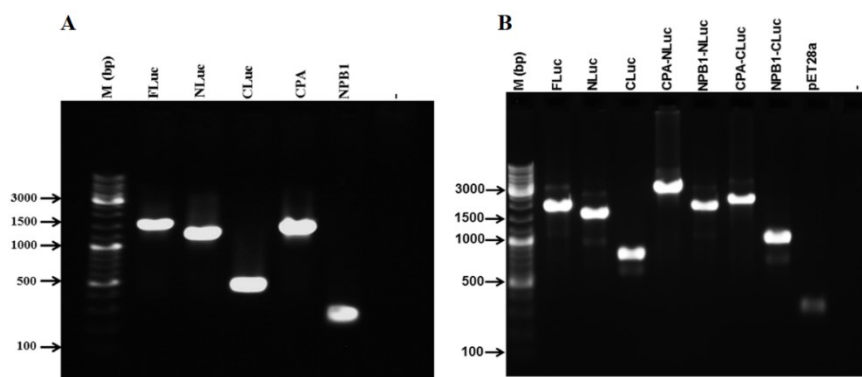
Đối với biểu hiện protein dung hợp, vector biểu hiện chứa gen mục tiêu được biến nạp vào *Escherichia coli* BL21 (DE3)(RIL), tiến hành nuôi cấy vi khuẩn này trong môi trường Luria-Bertani (LB) lỏng chứa kháng sinh Kanamycin nồng độ 20 µg/mL ở 37°C, 250 vòng/phút cho đến khi mật độ dung dịch (OD) đạt từ 0,5 - 0,8 thì tiến hành bổ sung IPTG với nồng độ 0,2 mM để biểu hiện protein. Quá trình biểu hiện protein được thực hiện ở điều kiện 15°C, 250 vòng/phút trong 16h. Sau quá trình lên men biểu hiện protein, dịch nuôi cấy được ly tâm để thu cặn vi khuẩn. Cặn tế bào này được hòa tan vào trong dung dịch đệm chứa (20 mM Tris-HCl; 300 mM NaCl; 10 mM imidazole; pH 7,4), phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm và thu dịch nổi sau khi ly tâm. Dịch nổi thu được lọc qua màng lọc 0,45 µm. Sự biểu hiện được kiểm tra bằng phương pháp chạy điện di SDS-PAGE 15% và nhuộm với Coomassie Brilliant Blue G-250. Protein dung hợp sau lọc sẽ được tinh sạch bằng Ni Sepharose (GE). Protein dung hợp được phát hiện bằng kháng thể đặc hiệu. Sau khi protein dung hợp trước hoặc sau khi tinh sạch được phân đoạn bằng điện di trên SDS-PAGE 12,5%, các vạch protein được chuyển lên màng lai. Sau đó màng lai được ủ với kháng thể thứ nhất (kháng thể chuột đơn dòng kháng 6Histag), bắt đặc hiệu với protein dung hợp. Sau đó màng lai được ủ với kháng thể thứ hai (Goat anti-mouse HRP conjugate) đã được đánh dấu bằng horse-radish peroxidase (kháng thể thứ hai gắn đặc hiệu với đoạn Fc của kháng thể thứ nhất). Sự phát hiện màu dựa vào phản ứng xúc tác của enzyme peroxidase trên cơ chất luminol và H₂O₂ ở bước sóng 425 nm. Trọng lượng phân tử của các protein dung hợp Fluc, Nluc, Cluc, NPB1-Nluc, NPB1-Cluc, CPA-Nluc và CPA-Cluc dự đoán lần lượt khoảng 66 kDa, 56 kDa, 21 kDa, 62 kDa, 31 kDa 108 kDa, 76 kDa.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân dòng gen mã hóa protein Fluc, Nluc, Cluc, CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc

Để tạo dòng gen mã hóa protein, chúng tôi dựa vào trình tự AF093683.1 của ngân hàng gen NCBI để thiết kế mỗi mã hóa cho Fluc, Nluc và Cluc. Việc thiết kế mỗi cho gen mã hóa NPB1 và CPA được dựa vào trình tự J02178.1 và X17336.1 của ngân hàng gen NCBI.

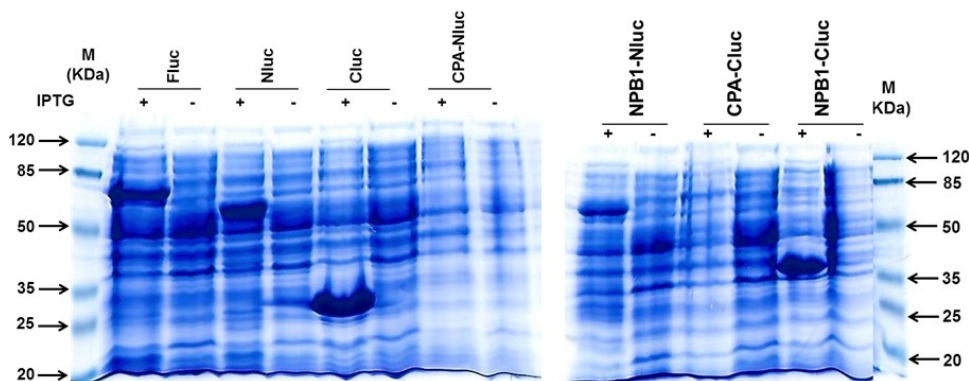
Kết quả điện di sản phẩm PCR của gen mục tiêu Fluc, Nluc, Cluc, CPA, NPB1 có kích thước lần lượt khoảng 1642 bp, 1311 bp, 462 bp, 1434 bp, 243 bp (Hình 1A). Những gen mục tiêu này được nhân dòng vào trong vector biểu hiện pET28a tại vị trí cắt giới hạn để tạo thành pET28a-Fluc; pET28a-Nluc; pET28a-Cluc; pET28a-CPA-Nluc, pET28a-NPB1-Nluc; pET28a-CPA-Cluc; pET28a-NPB1-Cluc. Để kiểm tra gen đã chèn vào vector biểu hiện, vector chứa gen mục tiêu này được thực hiện bằng PCR với cặp mỗi T7 promoter và T7 terminator của vector và cho sản phẩm của Fluc, Nluc, Cluc, CPA - Nluc, NPB1 - Nluc, CPA - Cluc, NPB1 - Cluc, pET28a tương ứng khoảng 2090 bp, 1769 bp, 1007 bp, 3195 bp, 2007 bp, 2346 bp, 1195 bp, 315 bp (Hình 1B). Để chắc chắn rằng các sản phẩm tạo dòng biểu hiện đúng protein mong muốn, chúng tôi đã tiến hành tinh sạch plasmid biểu hiện chứa gen mục tiêu và giải trình tự các mẫu. Chúng tôi sử dụng cặp mỗi T7 promoter/T7 terminator để tiến hành xác định trình tự đoạn gen được chèn vào giữa vùng MCS trên vector pET28a. Kết quả giải trình tự được xử lý theo hai bước: thứ nhất là so sánh với dữ liệu gen mà chúng tôi đã tối ưu hoá trước đó bằng phần mềm Clustal X (SFI) và trình tự axit amin trên ngân hàng gen (NCBI). Kết quả thu nhận được, chúng tôi thấy rằng trình tự nucleotide trên plasmid trùng khớp 100% so với trình tự ban đầu, thành phần và trình tự axit amin cũng không thay đổi. Từ những kết quả trên cho thấy rằng chúng tôi bước đầu đã tạo dòng được đoạn gen mục tiêu vào vector biểu hiện. Và quá trình khuếch đại gen bằng Phusion DNA Polymerase cũng không gây ra bất kì sai khác nào đối với các đoạn gen mục tiêu.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR của gen Fluc, Nluc, Cluc, CPA, NPB1 với các cặp mồi tương ứng
Nluc F aa1 và Cluc R 1641aa 547; Nluc F aa1 và Nluc R aa347; Cluc F aa394 và Cluc R aa547; CPA F aa239 và CPA R aa716; NPB1 F 25 aa1 và NPB1 R aa81; M là thang kích thước DNA (Hình 1A) và sản phẩm PCR của Fluc, Nluc, Cluc, CPA - Nluc, NPB1 - Nluc, CPA - Cluc, NPB1 - Cluc, pET28a với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator (Hình 1B)

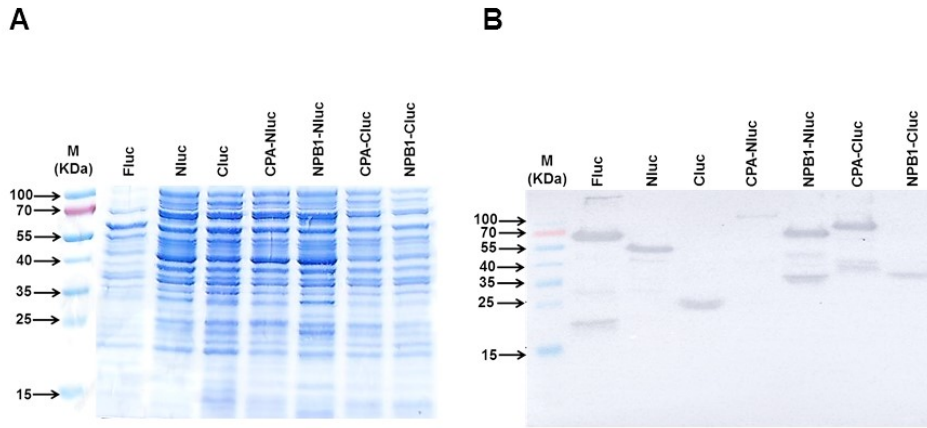
Biểu hiện, tinh sạch và phát hiện các protein dung hợp Fluc, Nluc, Cluc, CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc

Với mục tiêu tạo dòng và biểu hiện protein ngoại lai ở trong tế bào vi khuẩn *Escherichia coli* BL21 (DE3) (RIL), các gen đã được nhân dòng và biểu hiện dưới sự kiểm soát của promoter T7 và điểm bắt đầu phiên mã của vector pET28a. Vector này cũng có một mức độ kiểm soát quá trình phiên mã được cung cấp bởi việc kết hợp của các operator *lac* và trình tự mã hóa *lacI*. Do đó, việc biểu hiện của một trình tự mong muốn có thể được thúc đẩy bằng cách sử dụng isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), một chất tương tự lactose. Ngoài ra, vector pET28a còn được sử dụng với mục đích tổng hợp các protein ngoại lai dung hợp với đuôi 6 histidine ở đầu N của protein, giúp hỗ trợ cho quá trình tinh sạch bằng Ni Sepharose (GE). Sau khi biểu hiện protein ở điều kiện thích hợp thì sẽ thu cặn tế bào được và hòa tan bằng dung dịch đệm phá vỡ mẫu, sau đó tiến hành phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm, tiếp đó thu dịch nổi sau ly tâm. Kết quả kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE 12,5%, sau đó nhuộm với thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 cho thấy sự khác biệt giữa có và không có chất cảm ứng IPTG 0,2 mM (Hình 2). Khi không có chất cảm ứng protein tổng biểu hiện nhiều hơn, thay vào đó khi có chất cảm ứng các protein mục tiêu được biểu hiện tốt hơn, ngoại trừ CPA – Nluc và CPA – Cluc mặc dù đã biểu hiện ở nhiệt độ tối ưu vi khuẩn *E.coli* 37°C. Khi biểu hiện gen mã hóa cho PA trong vector pET28b cho kết quả biểu hiện vượt mức, tuy nhiên khi dung hợp CPA (239–716) với NPB1 (1-81) có thể tinh sạch để phân tích tương giữa đầu CPA và đầu NPB1, mặc dù không có biểu hiện vượt mức (Obayashi *et al.*, 2008). Điều này cho thấy khi dung hợp CPA với Nluc hoặc CPA với Cluc ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein dung hợp.



Hình 2. Điện di SDS-PAGE của protein tổng biểu hiện có cảm ứng IPTG ở 37°C và không cảm ứng IPTG
M là thang phân tử lượng protein

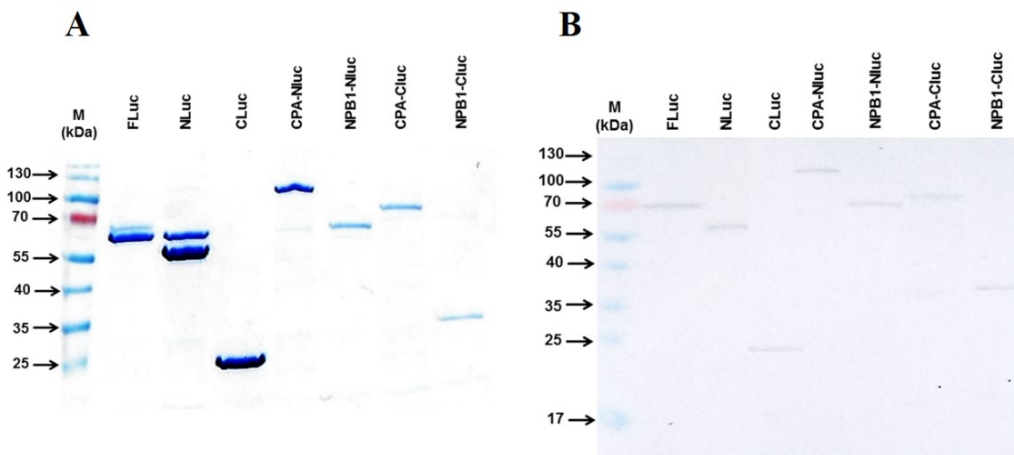
Vì biểu hiện luciferase cũng như xây dựng hoạt tính luciferase từ các phân đoạn bổ sung nên vi khuẩn *Escherichia coli* BL21 (DE3) (RIL) được biểu hiện protein dung hợp có chất cảm ứng IPTG nhiệt độ 15°C thay cho 37°C và dịch nổi của protein tổng sau khi quá vỡ bằng sóng siêu âm được chạy điện di SDS-PAGE 12,5% và kiểm tra song song bằng nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 (Hình 3A) và Western Blotting với kháng thể chống đuôi His (Hình 3B). Kết quả kiểm tra sau điện di cho kích thước khoảng 65 kDa, 56 kDa, 21 kDa, 108 kDa, 62 kDa, 76 kDa, 31 kDa tương ứng với kích thước của protein của Fluc, Nluc, Cluc, CPA - Nluc, NPB1 - Nluc, CPA - Cluc, NPB1 - Cluc.



Hình 3. Kết quả điện di SDS-PAGE protein biểu hiện (A) và Western Blotting trước tinh sạch (B) với kháng thể chuột đơn dòng chống 6Histag
M là thang phân tử lượng protein

Sau khi biểu hiện thành công các protein dung hợp chúng tôi tiến hành tinh sạch protein bằng phương pháp sắc kí ái lực bằng Ni Sepharose (GE). Protein mục tiêu đã được thiết kế mang đuôi 6His ở đầu N nên khi đi qua cột sắc kí HisTrap, protein mục tiêu sẽ được giữ lại trên cột nhờ ái lực của đuôi 6His và ion Ni^{2+} . Sau đó rửa cột bằng dung dịch washing buffer có nồng độ imidazole 10 mM, những protein bám yếu hoặc bám không đặc hiệu bị rửa trôi. Cuối cùng, những protein bám trên cột sẽ được thôi giải bằng dung dịch elution buffer có chứa nồng độ chất cạnh tranh cao là imidazole (400 mM).

Protein dung hợp thu được sau quá trình tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE sau đó được nhuộm với thuốc nhuộm Coomassie Brilliant Blue G-250 và đồng thời kiểm tra với Western Blotting. Kết quả cho thấy quá trình tinh sạch đã loại bỏ được phần lớn các protein tạp có trong dịch ly giải tế bào. Sản phẩm sau tinh sạch thu được chủ yếu là các protein dung hợp với các kích thước khoảng 65 kDa, 56 kDa, 21 kDa, 108 kDa, 62 kDa, 76 kDa, 31 kDa tương ứng với kích thước của protein của Fluc, Nluc, Cluc, CPA - Nluc, NPB1 - Nluc, CPA - Cluc, NPB1 - Cluc (Hình 4). Thêm vào đó mức độ tinh sạch cũng như định lượng protein dung hợp sau khi tinh sạch cũng được thực hiện lần lượt bằng phần mềm imageJ và đo Bradford. Kết quả cho thấy lượng protein (mg) cũng như mức độ tinh sạch (%) của Fluc, Nluc, Cluc, CPA - Nluc, NPB1 - Nluc, CPA - Cluc, NPB1 - Cluc lần lượt là 117,17 mg ($\pm 1,93$), 99,4%; 101,28 mg ($\pm 2,01$), 97,5% ; 201,02 mg ($\pm 2,68$), 95,8%; 87,43 mg ($\pm 2,44$), 89,5%; 106,54 mg ($\pm 2,63$), 96,4%; 90,28 mg ($\pm 3,15$), 89,4%; 199,23 mg ($\pm 3,34$), 87,3% trong 1 lít dịch lên men. Trong thí nghiệm xây dựng hoạt tính luciferase dựa vào các phần tử tương tác chỉ cần lượng nhỏ protein của các phân đoạn cũng đủ tiến hành thử nghiệm (Matsuyama *et al.*, 2013). Điều này cho thấy, độ tinh sạch của protein và lượng protein tinh sạch như trên cũng đáp ứng được cho nghiên cứu tiếp theo.



Hình 4. Kết quả điện di SDS-PAGE protein sau tinh sạch (A) và Western Blotting sau tinh sạch (B)
M là thang phân tử lượng protein. Các protein đều được biểu hiện gắn với trình tự gồm 6 histidine ở đầu N, nhờ đó có thể phát hiện protein dung hợp bằng cách sử dụng kháng thể chống đuôi 6Histag và gần như không có các vạch protein tạp nhiễm, điều này đồng nghĩa rằng quá trình tinh sạch protein đã được thực hiện thành công.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả của nghiên cứu trên cho thấy chúng tôi đã nhân dòng thành công đoạn gen mã hoá cho protein Fluc, Nluc, Cluc, CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc với trình tự đúng 100% với trình tự đã tối ưu hoá; các protein Fluc, Nluc, Cluc, NPB1-Nluc, NPB1-Cluc biểu hiện vượt mức trong tế bào chủ *E. coli* BL21 (DE3) (RIL) khi có mặt chất cảm ứng IPTG. Tuy nhiên, các protein CPA-Cluc và CPA-Nluc không biểu hiện vượt mức trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) (RIL) khi có mặt chất cảm ứng IPTG. Thêm vào đó những protein dung hợp này cũng đã tinh sạch thành công phục vụ cho thử nghiệm xây dựng hoạt tính luciferase cũng như thử nghiệm thuốc ức chế RNA polymerase của vi-rút cúm. Thêm vào đó, cho đến nay chưa có công trình nào công bố biểu hiện và tinh sạch các protein dung hợp CPA - Nluc, NPB1 - Nluc, CPA - Cluc, NPB1 - Cluc để làm mô hình sàng lọc thuốc chống ức chế RNA polymerase của vi-rút cúm.

Lời cảm ơn: Kinh phí thực hiện nghiên cứu này được tài trợ bởi Trung tâm CNSH TP.HCM với mã số DV01/19-20, các vector pHH21-PB1, pHH21-PA, pHH21-LUC sử dụng làm vật liệu nghiên cứu được cung cấp bởi Giáo sư Kyosuke Nagata, Đại học Tsukuba, Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Binh NT, Wakai C, Kawaguchi A, Nagata K (2013). The N-terminal region of influenza virus polymerase PB1 adjacent to the PA binding site is involved in replication but not transcription of the viral genome. *Front Microbiol*4: 398-398.
- Biswas SK, Nayak DP (1994). Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* 68(3): 1819-1826.
- Biswas SK, Nayak DP (1996). Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites. *J Virol* 70(10): 6716-6722.
- Collin EA, Sheng Z, Lang Y, Ma W, Hause BM, Li F. (2015). Cocirculation of Two Distinct Genetic and Antigenic Lineages of Proposed Influenza D Virus in Cattle. *J Virol* 89(2): 1036-1042.
- Fangyuan S, Yuanchao X, Lifang S, Wenfang X (2013) Viral RNA Polymerase: A Promising Antiviral Target for Influenza A Virus. *Curr Med Chem* 20(31): 3923-3934.
- Fiore AE, Bridges CB, Cox NJ (2009). Seasonal Influenza Vaccines. In "Vaccines for Pandemic Influenza", pp. 43-82. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen BR, Osterhaus ADME (2005). Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *J Virol* 79(5): 2814-2822.
- He XJ, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z, Liu Y (2008). Crystal structure of the polymerase PAC-PB1N complex from an avian influenza H5N1 virus. *Nature* 454: 1123.
- Leung CH, Tseng HK, Wang WS, Chiang HT, Wu AYJ, Liu, CP (2014). Clinical characteristics of children and adults hospitalized for influenza virus infection. *J Microbiol Immunol Infect* 47(6): 518-525.
- Matsuyama YO, Chung CI, Ueda H (2013). Demonstration of protein-fragment complementation assay using purified firefly luciferase fragments. *BMC Biotechnol* 13(1): 31.
- Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, Shibayama N, Kawaguchi A, Nagata K, Tame JRH, Park SY (2008). The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase. *Nature* 454: 1127.
- Reich S, Guilligay D, Pflug A, Malet HIN, Berger I, Crépin T, Hart D, Lunardi T, Nanao M, Ruigrok RWH, Cusack S (2014). Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase. *Nature* 516: 361.
- Shi W, Lei F, Zhu C, Sievers F, Higgins DG (2010) A Complete Analysis of HA and NA Genes of Influenza A Viruses. *PLOS ONE* 5(12): e14454.
- Sugiyama K, Obayashi E, Kawaguchi A, Suzuki Y, Tame JRH, Nagata K, Park SY (2009). Structural insight into the essential PB1-PB2 subunit contact of the influenza virus RNA polymerase. *The EMBO J* 28(12): 1803-1811.

EXPRESSION, AND PURIFICATION OF CPA-NLUC, NPB1-NLUC, CPA-CLUC, NPB1-CLUC APPROACH TO CONSTRUCT A DRUG SCREENING MODEL AGAINST INFLUENZA A VIRUSES

Nguyen Trong Binh^{1*}, Ngo Vinh Tuong², Nguyen Thien Phuong³,
Vu Thi Diem Trang⁴, Nguyen Dang Quan¹, Duong Hoa Xo¹

¹ Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Vietnam

² University of Science - Vietnam National University Ho Chi Minh City

³ Ho Chi Minh City University of Food Industry

⁴ Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Influenza, an infectious disease caused by an influenza A viruses, can be dangerous and is known to cause outbreaks and increase economic losses. The influenza virus genome is the RNA so the antigen changes very quickly, to develop a vaccine for influenza A viruses requires a deep understanding of the changing antigenic properties, a long-period design time, and insufficient protection for immunocompromised patients resulting in ineffective vaccines. The influenza A virus genome contains 8 single stranded RNA strands encoding 11 proteins. RNA polymerase (PB1, PB2 and PA) of Influenza virus have a high conservation structure through influenza A, B and C strains. The interaction complex NPB1-CPA is essential for drug design against influenza virus. In this study, towards the model construction of fast and target NPB1-CPA drug screening, The gene segments encoding for protein CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc were cloned into vector pET28a and expressed the fusion proteins CPA-Nluc, NPB1-Nluc, CPA-Cluc, NPB1-Cluc in *Escherichia coli* BL21 (DE3) (RIL) at 15°C for 16 hours in the presence of IPTG 0,2 mM. The fusion proteins were purified by Ni Sepharose (GE). Proteins of pre-purification and post-purification are separated during electrophoresis and detected by Coomassie Brilliant Blue G-250 staining and monoclonal anti-6Histag mouse antibodies. In addition, the purification level of fusion proteins ranging from 87-96%. These proteins can be applied to luciferase assays and drug assays.

Keywords: CPA-Nluc, NPB1-Cluc, NPB1-CPA, RNA polymerase, luciferase complementation assay, influenza virus.

* Author for correspondence: Tel: +84-935255352; E-mail: ntbinh.snn@tphcm.gov.vn