

TẠO DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA INTERFERON GÀ TÁI TỔ HỢP THU NHẬN TỪ HỆ THỐNG NẤM MEN *Pichia pastoris*

**Võ Thị Minh Tâm, Nguyễn Thị Thanh Giang,
Nguyễn Đăng Quân, Nguyễn Quốc Bình***

Trung tâm Công nghệ sinh học tp. Hồ Chí Minh, *binhbiji@gmail.com

TÓM TẮT: Các bệnh dịch do virus luôn là mối đe dọa thường xuyên và gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi gà ở Việt Nam. Vì vậy, cần tạo ra được chế phẩm sinh học có hoạt tính tăng cường sức đề kháng các bệnh do virus ở gà. Bài báo trình bày kết quả tạo dòng, biểu hiện và xác định hoạt tính kháng virus của interferon- α và interferon- γ gà tái tổ hợp thu nhận từ hệ thống nấm men *Pichia pastoris*. Đoạn gene mã hóa cho ChIFN- α và ChIFN- γ được tạo ra bằng phản ứng PCR và PCR/SOE (Splicing Overlapping Extension) trên khuôn mẫu là DNA bộ gen gà. Các vector biểu hiện ChIFN- α và ChIFN- γ đã được đồng hóa và hai dòng *P. pastoris* biểu hiện ổn định ChIFN- α và ChIFN- γ đã được tạo ra. Sự biểu hiện của ChIFN- α và ChIFN- γ trong dịch nuôi cấy *P. pastoris* đã được xác định bằng SDS-PAGE. Hoạt tính sinh học của ChIFN- α tái tổ hợp được xác định trên mô hình nguyên bào sợi phôi gà gây nhiễm virus IBDV và NDV. Khi gây nhiễm tế bào với virus IBDV, tỷ lệ tế bào sống ở lô xử lý với ChIFN- α liều 1,6 $\mu\text{g/ml}$ là 79-88% trong khi tỷ lệ tế bào sống ở lô đối chứng âm là 33-34%. Khi gây nhiễm tế bào với virus NDV, tỷ lệ tế bào sống ở lô xử lý với ChIFN- α liều 1,6 $\mu\text{g/ml}$ là 81-90%, cao hơn đáng kể tỷ lệ tế bào sống ở lô đối chứng là 27-32%. Như vậy, protein tái tổ hợp ChIFN- α và ChIFN- γ đã được biểu hiện thành công trên hệ thống *P. pastoris* và ChIFN- α có hoạt tính kích thích tế bào kháng virus IBDV và NDV.

Từ khóa: *Pichia pastoris*, cúm gia cầm, hoạt tính sinh học, interferon alfa, interferon gamma.

MỞ ĐẦU

Các bệnh gây ra bởi virus như cúm, Gumboro, Newcastle là mối đe dọa thường trực cho ngành công nghiệp chăn nuôi và chế biến gia cầm ở Việt Nam. Theo báo cáo của Ban chỉ đạo quốc gia phòng chống dịch cúm gia cầm, từ năm 2007 đến 2012 dịch cúm gia cầm luôn bùng phát tại Việt Nam và gây nhiều thiệt hại. Trong năm 2011, cả nước có 22 tỉnh thành xảy ra dịch với số gia cầm bị chết và tiêu hủy hơn 150.000 con. Chỉ riêng 2 tháng đầu năm 2012, dịch cúm gia cầm đã xảy ra ở 12 tỉnh thành làm chết gần 52.000 con gia cầm [bộ Nông nghiệp PTNT]. Hiện tại chưa có thuốc điều trị bệnh đặc hiệu các bệnh do virus gây ra trên gia cầm, và việc sử dụng vaccine để phòng bệnh vẫn còn nhiều điều bất lợi. Các chủng virus thường xuyên biến đổi để thích ứng và khả năng phát sinh chủng virus mới cũng làm giảm hiệu quả của vaccine phòng bệnh. Vì vậy, rất cần có một chế phẩm sinh học có hoạt tính tăng cường sức đề kháng của gia cầm với nhiều loại virus gây bệnh khác nhau.

Interferon (IFN) là một họ cytokine đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch

kháng virus của cơ thể và đã được ứng dụng trong điều trị bệnh nhiễm virus ở người [2]. Việc sử dụng IFN gà (ChIFN) trong điều trị bệnh do virus trên gia cầm đã được nghiên cứu và ứng dụng cách đây nhiều năm. ChIFNs đã được chứng minh có hoạt tính kháng virus mạnh. Các protein này có khả năng kìm hãm sự nhân lên của các virus như Rous Sarcoma Virus (RSV) [13], Marek's Disease Virus (MDV) [7], Newcastle Disease Virus (NDV) [10], Avian Influenza Virus (AIV) [16, 20], Vesicular Stomatitis Virus (VSV), Semliki Forest Virus (SFV) [15], và Infectious Bronchitis Virus (IBV) [12].

Cũng như IFN các loài khác, IFN gà gồm có 2 typ: typ I (IFN- α) và typ II (IFN- γ) có chức năng và cơ chế hoạt động khác nhau. Gen *chifn- α* mã hóa cho ChIFN- α không có intron, mã hóa cho 1 protein dài 193 amino acid (aa) với đoạn peptide tín hiệu dài 31 aa và protein trưởng thành có chiều dài 162 aa (khối lượng phân tử là 18,96 kDa) [15]. ChIFN- α được sản xuất khi cơ thể động vật phản ứng lại sự xâm nhiễm của virus, và được sản xuất bởi nhiều loại tế bào

khác nhau. ChIFN- α ức chế sự tăng sinh của virus bằng cách kích thích tế bào phân hủy RNA virus, ức chế quá trình tổng hợp protein và tăng apoptosis của tế bào nhiễm virus [12]. Gen mã hóa cho ChIFN- γ gồm 4 exon và 3 intron. Trong đó, exon 1 chứa trình tự 5' UTR và trình tự mã hóa cho đoạn peptide tín hiệu dài 19 aa, và 22 aa đầu tiên của protein trưởng thành. Exon 2, 3, 4 mã hóa cho đoạn peptide dài 23, 60, và 40 aa tiếp theo của ChIFN- γ trưởng thành (theo thứ tự tương ứng). Cả 3 intron ở ChIFN- γ đều làm gián đoạn khung đọc mở tại vị trí chính xác nằm giữa 2 codon (frame 0) [8]. cDNA của ChIFN- γ mã hóa cho một protein dài 164 aa chứa vùng peptide tín hiệu dài 19 aa và ChIFN- γ trưởng thành dài 145 aa (khối lượng phân tử khoảng 16,8 kDa) [11]. Tương tự như ở động vật có vú, ChIFN- γ được sản xuất từ các tế bào T được hoạt hóa và các đại thực bào. ChIFN- γ có khả năng kích thích hoạt động của các đại thực bào [9, 17]. ChIFN- γ có tác dụng cảm ứng sự biểu hiện MHC nhóm II trên bề mặt các đại thực bào và các loại tế bào trình diện kháng nguyên khác ở gà [6, 18].

Với hoạt tính sinh học đã được biết rõ, ChIFN- α và - γ có nhiều tiềm năng ứng dụng trong phòng và trị các bệnh do virus gây ra ở gà. Do nhu cầu về một chế phẩm kháng virus ở gà và gia cầm rất lớn, việc sản xuất được ChIFNs tái tổ hợp có giá trị thực tiễn cao và có thể mang lại lợi ích kinh tế, xã hội to lớn. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tạo dòng, biểu hiện và đánh giá hoạt tính của protein ChIFN- α và ChIFN- γ tái tổ hợp thu nhận từ hệ thống nấm men *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* là hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp nhiều triển vọng vì biểu hiện protein dạng tiết, dễ nuôi cấy, có thể nâng cấp lên quy mô sản xuất công nghiệp và giá thành sản xuất thấp. Do đó, việc tạo được dòng *P. pastoris* biểu hiện ChIFNs sẽ mở ra triển vọng sản xuất được các protein này với giá thành hợp lý phục vụ cho ngành chăn nuôi gia cầm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng *E. coli* DH5 α và chủng nấm men *Pichia pastoris* GS115 do hãng Invitrogen cung cấp. Vector pPIC9K do hãng Invitrogen cung

cấp. Virus gây bệnh Gumboro (IBDV) và Newcastle (NDV) do Bộ môn Thú y, Khoa Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Trứng gà có phôi 9-10 ngày tuổi từ gà mẹ không tiêm phòng vaccine được thu mua từ các hộ dân khu vực thành phố Cần Thơ.

Tổng hợp gen mã hóa cho ChIFN- α

Trên khuôn mẫu là DNA bộ gen gà, đoạn gen mã hóa cho ChIFN- α trưởng thành (aa 32-aa 193, mã số trên GenBank: U07868) được khuếch đại bằng phản ứng PCR với mỗi xuôi ChIFNA-F 5'-AATTGAATTCTGCAACCACC TTCGCCCCCA-3' và mỗi ngược ChIFNA-R 5'-AATTGCGGCCGCCTAAGTGCGCGTGT TGCCT-3' [mỗi tự thiết kế] có mang trình tự nhận biết của *EcoRI* và *NotI* (gạch dưới) tương ứng. Chương trình luân nhiệt được thực hiện như sau: 95°C-5 phút; 94°C-30 giây, 52°C-30 giây, 72°C-30 giây (lặp lại 25 chu kỳ); 72°C-10 phút.

Tổng hợp gen mã hóa cho ChIFN- γ

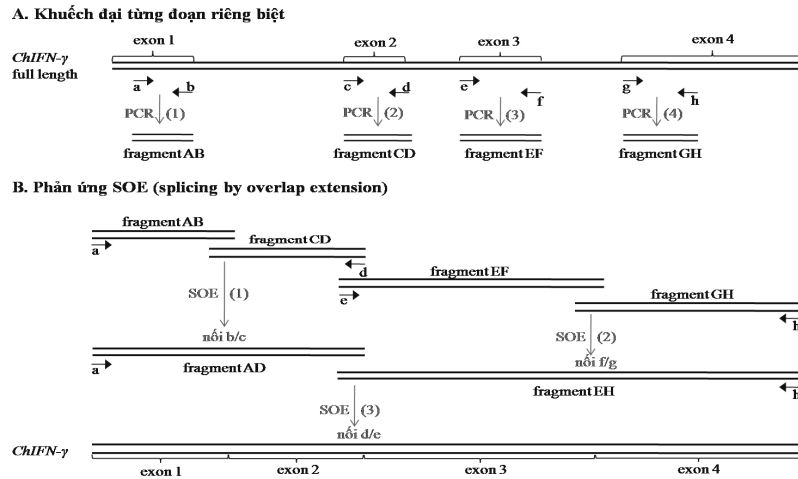
Trên khuôn mẫu là DNA bộ gen của gà, 4 exon của gen mã hóa protein ChIFN- γ trưởng thành (aa 20-aa 164, mã số trên GenBank: U27465) được khuếch đại bằng phản ứng PCR với 4 cặp môi:

ChIFNG1-F: 5'-ATGGCAGGAATTCAT AC TGCAAGTAGTCTAA-3'; ChIFNG1-R: 5'-ATGACTTGAGTTAAAGTCAGCTTTCAG TTT -3'; ChIFNG2-F: 5'-GAAAGCTGACTTT AAC TCAAGTCATTCAGA-3'; ChIFNG2-R: 5'-TTTCTCATTCTCTCTGTCCAGTTCTT CA-3'; ChIFNG3-F: 5'-GAACTGGACAGAG AGAAATGAGAAAAGGATC-3'; ChIFNG3-R: 5'-TTCATCGGGAGCTTGGCCAGGTCC-3'; ChIFNG4-F: 5'-CTGGCCAAGCTCCCGATG AACGACTTGAGAA-3'; ChIFNG4-R: 5'-TT AAAAGCGGCCGCAGAGGAGATGCAATT GCTAA-3' [tự thiết kế].

Các môi có mang trình tự nhận biết của *EcoRI* và *NotI* (gạch dưới) và các trình tự chồng lấn giữa các exon kề nhau (in nghiêng đậm). Đoạn gen mã hóa cho ChIFN- γ hoàn chỉnh được tạo ra bằng phản ứng SOE (Splicing Overlapping Extension) qua 2 bước. Bước 1, 2 phản ứng SOE được thực hiện riêng rẽ với cặp môi ChIFNG1-F/ChIFNG2-R và cặp môi ChIFNG3-

F/ChIFNG4-R trên khuôn mẫu là hỗn hợp sản phẩm khuếch đại của 2 cặp exon 1/exon 2 và exon 3/exon 4 tương ứng. Sản phẩm phản ứng SOE bước 1 là 2 trình tự DNA mã hóa exon 1-2 và exon 3-4 của gen ChIFN- γ . Bước 2, 1 phản ứng SOE được thực hiện với cặp mỗi ChIFNG1-

F/ChIFNG4-R trên khuôn mẫu là hỗn hợp 2 đoạn DNA mã hóa exon 1-2 và exon3-4 được tạo ra ở trên. Sản phẩm cuối cùng của quá trình SOE là DNA mạch đôi hoàn chỉnh mã hóa cho ChIFN- γ trưởng thành. Quá trình tổng hợp gen mã hóa ChIFN- γ được mô tả ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ phản ứng SOE tổng hợp gen mã hóa cho ChIFN- γ

Chương trình luân nhiệt được áp dụng cho tất cả các bước PCR/SOE là: 95°C-5 phút; 94°C-30 giây, 52°C-30 giây, 72°C-30 giây (lặp lại 25 chu kỳ), 72°C-10 phút.

Tạo dòng plasmid pPIC9K tái tổ hợp chứa gen mã hóa ChIFN- α và ChIFN- γ

Sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa ChIFN- γ được đồng hóa trực tiếp vào vector pCR2.1 sử dụng bộ kit thương mại TOPO[®] TA cloning kit (Invitrogen) theo quy trình của nhà sản xuất. Plasmid pCR2.1 tái tổ hợp mang gen *chifn-gamma* được kiểm tra bằng phản ứng cắt giới hạn với *EcoRI* và *NotI* (New England Biolabs) và giải trình tự.

Đoạn gen mã hóa cho ChIFN- α (sản phẩm PCR) hoặc ChIFN- γ trưởng thành đúng trình tự (trong plasmid pCR2.1 tái tổ hợp) được cắt hoặc bằng enzyme *EcoRI* và *NotI*. Sản phẩm cắt được chèn vào vector pPIC9K bằng phản ứng nối đầu dính với enzyme T4 ligase (New England Biolabs). Các dòng plasmid pPIC9K tái tổ hợp có chứa gen mục tiêu được kiểm tra lại phản ứng cắt giới hạn với *EcoRI* và *NotI* và giải trình tự bằng môi α -factor.

Tạo dòng nấm men *P. pastoris* biểu hiện ổn định ChIFN- α và ChIFN- γ

Quá trình tạo dòng các nấm men *P. pastoris* biểu hiện ổn định ChIFN- α và ChIFN- γ được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt quá trình này như sau, plasmid pPIC9K tái tổ hợp mang gen mã hóa cho ChIFN- α và ChIFN- γ được cắt mở vòng bằng *SalI* và được điện biến nạp vào *P. pastoris*, các dòng nấm men mang gen mục tiêu được sàng lọc trên môi trường MD (Pichia expression kit-Invitrogen); các dòng *P. pastoris* tái tổ hợp có mang gen mục tiêu được nuôi cấy liên tục trên môi trường YPD Pichia expression kit-Invitrogen chứa G418 với nồng độ tăng dần (2, 4, 6, 8, 10 mg/ml) nhằm tìm ra các dòng có mang nhiều bản sao của gen mục tiêu trong bộ gen.

Biểu hiện ChIFN- α và ChIFN- γ trên quy mô nuôi cấy lắc (shaking flask)

Phương pháp nuôi cấy *P. pastoris* biểu hiện protein tái tổ hợp được thực hiện theo quy trình nhà sản xuất đề nghị (Pichia expression kit-Invitrogen). Một khuẩn lạc *P. pastoris* mang gen mục tiêu được tăng sinh qua đêm trong 25

ml môi trường BMGY [Pichia expression kit-Invitrogen] ở 28°C, lắc 250 vòng/phút đến khi OD₆₀₀ đạt 5-6. Sinh khối nấm men được thu nhận bằng ly tâm 6000 vòng/phút trong 15 phút, và chuyển sang 50 ml môi trường BMMY sao cho OD₆₀₀ đạt 1. Nấm men được nuôi cấy lắc ở 250 vòng/phút, nhiệt độ 20°C. Sau mỗi 24 giờ nuôi cấy, MeOH 100% được thêm vào môi trường nuôi cấy đạt nồng độ cuối là 1%. Kiểm tra hàm lượng protein tổng trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp đo Bradford theo quy trình của nhà sản xuất (Biorad) và phân tích bằng Tricine SDS-PAGE theo phương pháp đã được mô tả bởi Hermann (2006) [3].

Sơ chế dịch protein ChIFNs biểu hiện từ Pichia pastoris

Dịch sau lên men được ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 10 phút để loại tế bào nấm men thu nhận dịch nổi có chứa protein mục tiêu. Dịch nổi được xử lý qua máy lọc tiếp tuyến với cột lọc kích thước lọc giới hạn 10 kDa để loại bỏ dịch lên men và trao đổi buffer. Protein sau khi qua lọc tiếp tuyến được thu nhận trong Phosphate buffered saline (PBS) và bảo quản ở -80°C.

Khảo sát độc tính của dịch ChIFNs đối với nguyên bào sợi phôi gà

Nguyên bào sợi phôi gà được tách và nuôi cấy theo phương pháp đã được mô tả trước đây bởi Janardhana et al. (2007) [6], Xia et al. (2004) [20], Yeh et al. (1999) [21]. Nguyên bào sợi phôi gà được cấy vào các giếng của đĩa 96 giếng ở mật độ 4×10^4 tế bào/giếng và nuôi cấy 24 giờ trong môi trường DMEM (Sigma) 10% FBS, 37°C, 5% CO₂. Tế bào được xử lý với dịch ChIFN- α hoặc ChIFN- γ ở nhiều nồng độ khác nhau từ 160 μ g/ml đến 2,5 μ g/ml (dãy pha loãng bậc 2 từ 1/2-1/64). Ngoài ra, dịch nuôi cấy *P. pastoris* GS115 không xử lý cũng được sơ chế và xử lý tế bào ở các độ pha loãng tương ứng để làm đối chứng. Sau 72 giờ xử lý với dịch ChIFNs, mật độ tế bào ở các giếng được đánh giá bằng giá trị OD₅₉₀ trong phương pháp MTT ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [19]. Độc tính tế bào của dịch ChIFN- α và dịch nuôi cấy nấm men không xử lý được đánh giá qua tỷ lệ % giá

trị OD₅₉₀ của các lô tế bào xử lý như trên so với giá trị OD₅₉₀ của lô tế bào chỉ xử lý PBS.

Thử nghiệm hoạt tính kháng virus của dịch ChIFN- α

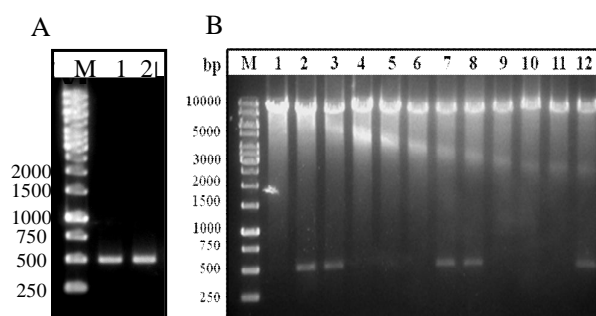
Hoạt tính kháng virus của dịch ChIFN- α tái tổ hợp được đánh giá bằng mô hình nguyên bào sợi phôi gà bị gây nhiễm với virus IBDV và NDV. Trước khi được sử dụng để gây nhiễm tế bào, mẫu virus được chuẩn độ hoạt lực theo quy trình của Hussain & Rasool (2005) [5] và chỉ số TCID₅₀/0,1 ml dịch virus được tính toán theo công thức của Reed & Muench (1938) [14].

Nguyên bào sợi phôi gà được cấy vào các giếng của đĩa 96 giếng ở mật độ 4×10^4 tế bào/giếng và nuôi cấy ở điều kiện như trên trong 24 giờ. Tế bào được xử lý với dịch ChIFN- α ở 4 nồng độ từ 16 μ g/ml đến 0,016 μ g/ml (dãy pha loãng bậc 10) ở các thời điểm trước 24 giờ, 0 giờ và sau 24 giờ bị gây nhiễm virus IBDV hoặc NDV ở liều 100 lần TCID₅₀/0,1 ml. Ngoài ra, các mẫu đối chứng âm là tế bào được gây nhiễm với virus mà không được xử lý với dịch ChIFN- α và đối chứng tế bào không xử lý cũng được thực hiện. Sau khi gây nhiễm virus được 72 giờ, mật độ tế bào sống ở các lô thử nghiệm được xác định bằng phương pháp MTT thông qua giá trị OD₅₉₀. Hoạt tính bảo vệ nguyên bào sợi phôi gà kháng virus IBDV và NDV được đánh giá qua tỷ lệ % giá trị OD₅₉₀ của các lô tế bào xử lý như trên so với giá trị OD₅₉₀ của mẫu tế bào chỉ xử lý PBS.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo plasmid pPIC9K mang gen mã hóa ChIFN- α

Trên khuôn mẫu là DNA bộ gen gà, phản ứng PCR được thực hiện với cặp môi đặc hiệu ChIFNA-F/R nhằm khuếch đại đoạn gen mã hóa cho ChIFN- α trưởng thành có chiều dài 162 aa. Kích thước lý thuyết của sản phẩm PCR là 508 bp bao gồm đoạn gen mục tiêu và các trình tự bổ sung ở đầu 5' của 2 môi. Kết quả điện di trên gel agrose 1% cho thấy, phản ứng PCR tạo một sản phẩm khuếch đại có kích thước khoảng 500 bp, tương ứng gen mục tiêu *chifn-a* (hình 2A).



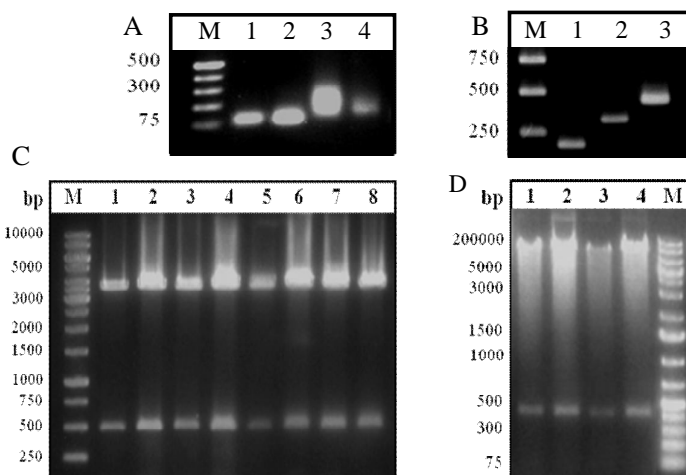
Hình 2. Tạo plasmid pPIC9K mang gen mã hóa ChIFN- α

A. Khuếch đại gen *chifn- α* bằng phản ứng PCR với mồi CHIFNA-F/R. M: thang DNA; giếng 1, 2: sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa ChIFN- α ; B. Phản ứng cắt giới hạn bằng *EcoRI* và *NotI* kiểm tra sự hiện diện của gen *chifn- α* trong plasmid PIC9K tái tổ hợp; M: thang DNA; giếng 1-12: sản phẩm cắt của 12 dòng plasmid.

Sản phẩm PCR này được tinh sạch và được cắt bằng enzyme *EcoRI* và *NotI*. Sản phẩm cắt được nối vào vector pPIC9K đã được cắt mở vòng bằng 2 enzyme trên. Sản phẩm nối sau đó được điện biến nạp vào *E. coli* DH5 α và được sàng lọc trên môi trường LB Agar-Amp (50 μ g/ml). Plasmid từ 12 khuẩn lạc mọc được trên môi trường chọn lọc được tách chiết và kiểm tra bằng phản ứng cắt giới hạn với *EcoRI* và *NotI*. Kết quả điện di trên gel agarose 1%

cho thấy, phản ứng cắt với 5/12 dòng plasmid được chọn cho sản phẩm kích thước khoảng 500 bp, tương ứng với gen mục tiêu *chifn- α* (hình 2B). Như vậy, 5 dòng plasmid này là vector tái tổ hợp pPIC9K/ChIFN- α . Kết quả giải trình tự của một dòng plasmid tái tổ hợp pPIC9K/ChIFN- α cho thấy gen *chifn- α* đã được tạo đúng trình tự và khung đọc.

Tạo plasmid pPIC9K mang gen mã hóa ChIFN- γ



Hình 3. Tạo plasmid pPIC9K mang gen mã hóa ChIFN- γ

A. Sản phẩm PCR khuếch đại 4 exon của gen *chifn- γ* . M: thang DNA; giếng 1, 2, 3, 4: exon 1, 2, 3, 4; B. Tổng hợp gen *chifn- γ* bằng phản ứng SOE. M: thang DNA; giếng 1: sản phẩm kéo dài exon 1-2; giếng 2: sản phẩm kéo dài exon 3-4; giếng 3: gen *chifn- γ* hoàn chỉnh; C. Phản ứng cắt giới hạn bằng *EcoRI* và *NotI* kiểm tra sự hiện diện của gen *chifn- γ* trong plasmid pCR 2.1 tái tổ hợp. M: thang DNA; giếng 1-8: sản phẩm cắt của 8 dòng plasmid được chọn ngẫu nhiên; D. Phản ứng cắt giới hạn bằng *EcoRI* và *NotI* kiểm tra sự hiện diện của gen *chifn- γ* trong plasmid pPIC9K tái tổ hợp. M: thang DNA; giếng 1-4: sản phẩm cắt của 4 dòng plasmid được chọn ngẫu nhiên.

Trên khuôn mẫu là DNA bộ gen gà, phản ứng PCR đã được thực hiện thành công để khuếch đại 4 exon riêng lẻ của gen *chifn-γ* với kích thước sản phẩm tương ứng là 91 bp, 95 bp, 198 bp và 138 bp (hình 3A). Sử dụng các sản phẩm khuếch đại ở trên, các phản ứng SOE (Splicing Overlapping Extension) đã được thực hiện để tạo đoạn DNA bao gồm exon 1 và exon 2 nối tiếp (kích thước 161bp), exon 3 và exon 4 nối tiếp (kích thước 316bp). Phản ứng SOE cuối cũng được thực hiện thành công tạo mạch đôi DNA mã hóa ChIFN- γ trưởng thành có kích thước 451bp. Kết quả phân tích trên gel agarose 1% cho thấy, các sản phẩm PCR thu được đều có kích thước tương ứng với kích thước mong đợi (hình 3B). Như vậy, đoạn gen *chifn-γ* đã được khuếch đại thành công từ DNA bộ gen của gà.

Sản phẩm khuếch đại của đoạn gen mã hóa cho ChIFN- γ trưởng thành được đồng hóa trực tiếp vào vector pCR2.1, sản phẩm nối được biến nạp vào *E. coli* DH5 α . Các dòng *E. coli* DH5 α mang plasmid tái tổ hợp được sàng lọc khuẩn lạc trắng/xanh trên môi trường LB Agar-Amp có bổ sung X-gal, IPTG. Plasmid tách từ 8 khuẩn lạc trắng được cắt kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *NotI*. Kết quả điện di trên gel agarose 1% cho thấy, phản ứng cắt với cả 8 dòng plasmid được chọn đều cho sản phẩm kích thước khoảng 500 bp tương ứng với gen mục tiêu *chifn-γ* (hình 3C). Như vậy, 8 dòng plasmid này đều là vector tái tổ hợp pCR2.1/ChIFN- γ . Kết quả giải trình tự của một dòng plasmid tái tổ hợp pCR2.1/ChIFN- γ cho thấy gen *chifn-γ* đã

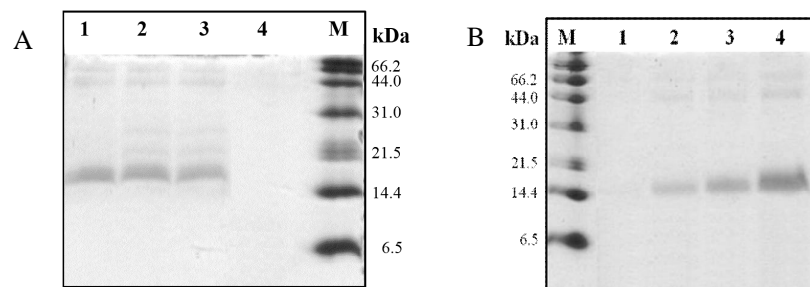
được tạo dòng đúng trình tự.

Đoạn gen *chifn-γ* được cắt khỏi plasmid pCR2.1/ChIFN- γ bằng enzyme *EcoRI* và *NotI* và được tinh sạch. Sản phẩm cắt được đồng hóa vào vector pPIC9K và plasmid pPIC9K/ChIFN- γ tái tổ hợp được sàng lọc tương tự như ở trường hợp ChIFN- α . Kết quả kiểm tra sự hiện diện của gen mục tiêu trong các dòng plasmid tái tổ hợp ứng viên cho thấy cả 4 dòng plasmid này đều là vector tái tổ hợp pPIC9K/ChIFN- γ (hình 3D). Trình tự và khung đọc của gen *chifn-γ* trong một dòng plasmid tái tổ hợp pPIC9K/ChIFN- γ cũng đã được xác nhận.

Tạo dòng nấm men *P. pastoris* mang gen mã hóa cho ChIFNs

Quá trình xử lý plasmid và biến nạp gen vào nấm men *P. pastoris* được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất. Qua quá trình sàng lọc ban đầu trên môi trường MD, 167 dòng nấm men ứng viên mang gen *chifn-α* và 86 dòng nấm men ứng viên mang gen *chifn-γ* đã được chọn. Các dòng nấm men mang nhiều bản sao gen mục tiêu được tiếp tục sàng lọc trên môi trường YPD có chứa kháng sinh G418 sulfate với nồng độ tăng dần 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml. Kết quả, có 9 dòng nấm men chuyển gen mã hoá ChIFN- α và 14 dòng nấm men chuyển gen mã hoá ChIFN- γ mọc được trên môi trường YPD chứa G418 với nồng độ 10 mg/ml (kết quả không được trình bày). Các dòng nấm men này ước lượng có chứa hơn 10 bản sao của gen mục tiêu trong bộ gen.

Biểu hiện và sơ chế dịch ChIFN- α và ChIFN- γ



Hình 4. Biểu hiện ChIFN- α và ChIFN- γ tái tổ hợp từ nấm men *P. pastoris*

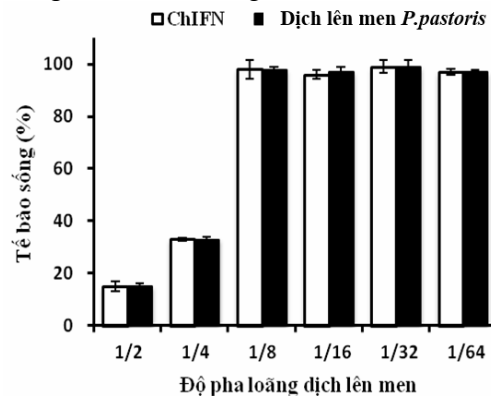
a. Phân tích Tricine SDS-PAGE dịch lên men *P. pastoris* biểu hiện ChIFN- α . M: thang protein; giếng 1, 2, 3, 4: mẫu dịch protein sau 72 giờ, 48 giờ, 24 giờ và 0 giờ lên men; b. Phân tích Tricine SDS-PAGE dịch lên men *P. pastoris* biểu hiện ChIFN- γ . M: thang protein; giếng 1, 2, 3, 4: mẫu dịch protein sau 0 giờ, 24 giờ, 48 giờ, và 72 giờ lên men.

Một trong các dòng *P. pastoris* mang nhiều bản sao của gen mục tiêu được chọn để biểu hiện ChIFNs ở điều kiện nuôi cấy lác. Sinh khối nấm men trong dịch nuôi cấy được loại bỏ bằng li tâm và dịch ChIFN- α và ChIFN- γ được sơ chế bằng phương pháp lọc tiếp tuyến. Hàm lượng protein tổng trong dịch ChIFNs sơ chế được xác định bằng phương pháp Bradford và thành phần protein được phân tích bằng Tricine SDS-PAGE. Kết quả phân tích bằng Tricine SDS-PAGE cho thấy, vạch protein biểu hiện vượt mức trong dịch sơ chế ChIFNs có kích thước khoảng 19 kDa và 16 kDa tương ứng với ChIFN- α và ChIFN- γ . Vạch protein này không thấy ở thời điểm lên men 0 h, và đậm dần theo thời gian lên men từ 24 h-72 h. Nồng độ protein tổng số biểu hiện trong môi trường nuôi cấy lác sau 72 h lên men đạt 150-190 $\mu\text{g/ml}$ (hình 4). Kết quả cũng cho thấy protein mục tiêu chiếm đa số trong thành phần protein tổng số của dịch nuôi cấy nấm men *P. pastoris* vì nấm men tiết rất ít protein nội sinh ra ngoài môi trường nuôi cấy (hình 4). Đây là một điểm thuận lợi cho giai đoạn tinh sạch và thử nghiệm hoạt tính ChIFNs sau này.

Khảo sát độc tính của dịch ChIFNs đối với nguyên bào sợi phôi gà nuôi cấy

Nguyên bào sợi phôi gà được xử lý với dịch sơ chế ChIFN- α ở nhiều độ pha loãng bậc 2 khác nhau 1/2-1/64 (tương ứng với hàm lượng protein 160 $\mu\text{g/ml}$ -2,5 $\mu\text{g/ml}$). Mật độ tế bào sau khi xử lý được xác định bằng giá trị $\text{OD}_{590\text{nm}}$ trong phương pháp MTT. Độc tính tế bào của dịch ChIFN- α và dịch nuôi cấy *P. pastoris* không xử lý ChIFN- α được đánh giá bằng tỷ lệ % của giá trị $\text{OD}_{590\text{nm}}$ ở lô xử lý so với lô đối chứng PBS. Kết quả ghi nhận cho thấy, dịch sơ chế ChIFN- α gây độc cho nguyên bào sợi phôi gà ở độ pha loãng 1/2 và 1/4 (tương đương nồng độ protein tổng 80 và 40 $\mu\text{g/ml}$). Tỷ lệ tế bào sống là 15% và 33% so với mẫu tế bào xử lý PBS. Từ độ pha loãng 1/8 trở lên (tương đương nồng độ protein tổng 20 $\mu\text{g/ml}$), dịch sơ chế ChIFN- α không gây độc cho nguyên bào sợi phôi gà, tỷ lệ tế bào sống tương đương lô đối chứng. Tuy nhiên, thử nghiệm với mẫu dịch nuôi cấy nấm men không xử lý cũng cho kết quả gây độc tế bào tương tự như dịch sơ chế

ChIFN- α (hình 5). Như vậy, có thể nhận định độc tính tế bào của dịch sơ chế ChIFN- α không phải do bản thân protein này mà do các thành phần nền của dịch lên men nấm men *P. pastoris*. Do đó, để tránh tác động gây độc cho nguyên bào sợi phôi gà, độ pha loãng thích hợp của mẫu dịch sơ chế ChIFN- α trong thử nghiệm đánh giá hoạt tính kháng virus từ 1/8 trở lên.



Hình 5. Độc tính của dịch ChIFN- α trên nguyên bào sợi phôi gà

Hoạt tính kháng virus của dịch ChIFN- α trên mô hình nguyên bào sợi phôi gà nhiễm virus IBDV và NDV

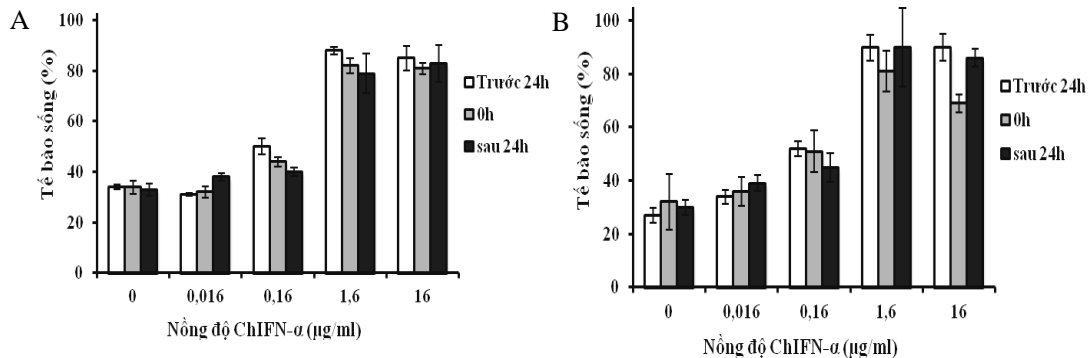
Nguyên bào sợi phôi gà được xử lý với dịch sơ chế ChIFN- α ở nhiều độ protein khác nhau 16 $\mu\text{g/ml}$ -0,016 $\mu\text{g/ml}$ (tương ứng với độ pha loãng 1/10¹-1/10⁴) ở 3 thời điểm 24 giờ trước, ngay khi và 24 giờ sau khi gây nhiễm virus với liều 100 $\text{TCID}_{50}/0,1$ ml. Mật độ tế bào sống trong các lô tế bào nhiễm virus được xử lý và không được xử lý ChIFN- α cũng như mẫu tế bào chỉ xử lý với PBS được đánh giá bằng giá trị $\text{OD}_{590\text{nm}}$ trong phương pháp MTT.

Kết quả thực nghiệm cho thấy, dịch sơ chế ChIFN- α có hiệu quả bảo vệ nguyên bào sợi phôi gà kháng lại sự nhiễm virus IBDV (hình 6A). Ở lô xử lý ChIFN- α 24 giờ trước khi gây nhiễm virus, xử lý ChIFN- α ở liều 0,16 $\mu\text{g/ml}$ -16 $\mu\text{g/ml}$ làm tăng tỷ lệ tế bào sống khi bị gây nhiễm virus đạt 50-88%. Trong khi ở lô tế bào nhiễm virus nhưng không được xử lý ChIFN- α tỷ lệ tế bào sống chỉ là 34%. Nhìn chung việc xử lý ChIFN- α trước khi nhiễm virus IBDV cho hiệu quả bảo vệ tế bào tốt hơn là khi xử lý ChIFN- α cùng lúc

hoặc sau khi gây nhiễm virus. Tuy nhiên, sự khác biệt này không đáng kể.

Tương tự như với virus IBDV, dịch sơ chế ChIFN- α cũng có hiệu quả bảo vệ nguyên bào sợi phôi gà kháng lại sự nhiễm virus NDV (hình 6B). Ở lô xử lý ChIFN- α 24 giờ trước khi gây nhiễm virus, xử lý ChIFN- α ở liều 0,016 $\mu\text{g/ml}$ -16 $\mu\text{g/ml}$ làm tăng tỷ lệ tế bào sống khi bị gây

nhiễm virus đạt 34-90%. Trong khi ở lô tế bào nhiễm virus nhưng không được xử lý ChIFN- α tỷ lệ tế bào sống chỉ là 27%. Cũng như trường hợp virus IBDV, việc xử lý ChIFN- α trước khi nhiễm virus NDV cho hiệu quả bảo vệ tế bào tốt hơn so với xử lý ChIFN- α cùng lúc hoặc sau khi gây nhiễm virus. Nhưng sự khác biệt này cũng không rõ ràng.



Hình 6. Hoạt tính kháng virus của dịch ChIFN- α trên mô hình nguyên bào sợi phôi gà nhiễm virus IBDV (A) và NDV (B)

Như vậy, thử nghiệm trên mô hình nguyên bào sợi phôi gà nhiễm virus cho thấy dịch sơ chế protein ChIFN- α biểu hiện từ *P. pastoris* tạo ra trong nghiên cứu có hoạt tính sinh học kích thích khả năng kháng virus của tế bào. Đây là công bố đầu tiên ở Việt Nam về việc tạo dòng và biểu hiện ChIFN- α gà có hoạt tính sinh học trên hệ thống nấm men *Pichia pastoris*. Nguyễn Ngọc Ân và nnk. (2009) [1] đã tạo ra dòng *Bacillus subtilis* tái tổ hợp biểu hiện ChIFN- α và bào tử dòng vi khuẩn này có hoạt tính kháng virus NDV và IBDV trên nguyên bào sợi phôi gà [1]. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này protein ChIFN- α tái tổ hợp đã không được thu nhận và đánh giá hoạt tính trực tiếp. Trên thế giới, ChIFN- α tái tổ hợp từ *P. pastoris* đã được biểu hiện và đánh giá hoạt tính kháng virus NDV và virus VSV (vesicular stomatitis virus) trong công bố của Hou et al. (2011) [4].

KẾT LUẬN

Để biểu hiện protein tái tổ hợp ChIFN- α và ChIFN- γ hướng đến ứng dụng trong phòng và trị các bệnh do virus ở gia cầm, hai loại

interferon gà đã được biểu hiện trên hệ thống *Pichia pastoris*. Trên mô hình nguyên bào sợi phôi gà nuôi cấy, ChIFN- α tái tổ hợp tạo ra trong nghiên cứu này đã cho thấy hoạt tính bảo vệ tế bào kháng virus IBDV và NDV gây nhiễm nhân tạo. Kết quả cho thấy chế phẩm ChIFN- α có thể sử dụng trong việc tăng tính đề kháng của gà đối với hai loại virus IBDV và NDV.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện bằng nguồn kinh phí khoa học của Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh, mã số đề tài: YD01/11-12.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Ngọc Ân, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Thanh Tố Nhi, Hồ Thị Việt Thu, Nguyễn Ngọc Hải, Trần Thu Hoa, 2009. Tác dụng *in vitro* kháng virus gây bệnh Gumboro và tả gà của *Bacillus subtilis* tái tổ hợp biểu hiện interferon alpha gà. Tuyển tập hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc khu vực phía Nam. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

2. Fleischmann W. R. Jr., Georgiades J. A., Osborne L. C., Johnson H. M., 1979. Potentiation of interferon activity by mixed preparations of fibroblast and immune interferon. *Infect. Immun.*, 26(1): 248-253.
3. Hermann S., 2006, Tricine-SDS-PAGE, nature protocols, DOI: doi:10.1038/nprot.2006.4
4. Hou F., Liu K., Shen T., Zhou B., Cao R., Li P., Chen P., 2011. Antiviral activity of rChIFN- α against vesicular stomatitis virus and Newcastle disease virus: a novel recombinant chicken interferon- α showed high antiviral activity. *Res. Vet. Sci.* DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.11.015.
5. Hussain I., Rasool M. H., 2005. Adaptation of indigenous very virulent infectious bursal disease virus on Vero cell line. *Pak. Vet. J.*, 25(3): 103-106.
6. Janardhana V., Ford M. E., Bruce M. P., Broadway M. M., O'Neil T. E., Karpala A. J., Asif M., Browning G. F., Tivendale K. A., Noormohammadi A. H., Lowenthal J. W., Bean A. G., 2007. IFN-gamma enhances immune responses to *E. coli* infection in the chicken. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 27(11): 937-946.
7. Jarosinski K. W., Jia W., Sekellick M. J., Marcus P. I., Schat K. A., 2001. Cellular responses in chickens treated with IFN-alpha orally or inoculated with recombinant Marek's disease virus expressing IFN-alpha. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 21(5): 287-296.
8. Kaiser P., Wain H. M., Rothwell L., 1998. Structure of the chicken interferon-gamma gene, and comparison to mammalian homologues. *Gene*, 207(1): 25-32.
9. Lowenthal J. W., York J. J., O'Neil T. E., Rhodes S., Prowse S. J., Strom D. G., Digby M. R., 1997. *In Vivo* effects of chicken interferon-gamma during infection with eimeria. *J. Int. Cyt. Res.*, 17(9): 551-558.
10. Marcus P. I., Heide L. V. D., Sekellick M. J., 1999. Interferon action on avian viruses. *J. Int. Cyt. Res.*, 19(8): 881-885.
11. Michalski W. P., Shiell B. J., O'Neil T. E., Beddome G., Lowenthal J. W., 1999. Recombinant chicken ifn-gamma expressed in *Escherichia coli*: analysis of c-terminal truncation and effect on biologic activity. *J. Int. Cyt. Res.*, 19(4): 383-392.
12. Pei J., Sekellick M. J., Marcus P. I., Choi I. S., Collisson E. W., 2001. Chicken interferon type i inhibits infectious bronchitis virus replication and associated respiratory illness. *J. Int. Cyt. Res.*, 21(12): 1071-1077.
13. Plachý J., Weining K. C., Kremmer E., Puehler F., Hala K., Kaspers B., Staeheli P., 1999. Protective effects of type i and type ii interferons toward rous sarcoma virus-induced tumors in chickens. *Virology*, 256(1): 85-91.
14. Reed L. J., Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497.
15. Sekellick M. J., Ferrandino A. F., Hopkins D. A., Marcus P. I., 1994. Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *J. Int. Res.*, 14(2): 71-79.
16. Sekellick M. J., Carra S. A., Bowman A., Hopkins D. A., Marcus P. I., 2000. Transient resistance of influenza virus to interferon action attributed to random multiple packaging and activity of ns genes. *J. Int. Cyt. Res.*, 20(11): 963-970.
17. Song K. D., Lillehoj H. S., Choi K. D., Zarlenga D., Han J. Y., 1997. Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 48(3-4): 321-323.
18. Weining K. C., Schultz U., Münster U., Kaspers B., Staeheli P., 1996. Biological properties of recombinant chicken interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.*, 26(10): 2440-2447.
19. Xia C., Dan W., Wen-Xue W., Jian-Qing W., Li W., Tian-Yao Y., Qin W., Yi-Bao N., 2004. Cloning and expression of

- interferon-alpha/gamma from a domestic porcine breed and its effect on classical swine fever virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 104(1-2): 81-89.
20. Xia C., Liu J., Wu Z. G., Lin C. Y., Wang M., 2004. The interferon-alpha genes from three chicken lines and its effects on h9n2 influenza viruses. *Anim. Biotechnol.*, 15(1): 77-88.
21. Yeh H. Y., Winslow B. J., Junker D. E., Sharma J. M., 1999. *In Vitro* effects of recombinant chicken interferon-gamma on immune cells. *J. Int. Cyt. Res.*, 19(6): 687-691.

A STUDY ON CLONING, EXPRESSING AND INVESTIGATING BIOLOGICAL ACTIVITY OF RECOMBINANT CHICKEN INTERFERON PRODUCED FROM YEAST *Pichia pastoris*

**Vo Thi Minh Tam, Nguyen Thi Thanh Giang,
Nguyen Dang Quan, Nguyen Quoc Binh**

Biotechnology Center of Ho Chi Minh city

SUMMARY

Virus-infectious diseases are permanent threats and cause serious lost for chicken industry of our country. Thus, the development of a bio-product enhancing the immune system against viral-caused diseases on chicken is highly necessary. Aims of this study were to clone, to express and to investigate anti-viral activity of recombinant chicken interferon- α and interferon- γ (ChIFN) produced from yeast *Pichia pastoris*. Gene fragments encoding ChIFN- α and ChIFN- γ were obtained by PCR and PCR/SOE (Splicing Overlapping Extension) based on the chicken genome DNA. Expressing vectors pPIC9K bearing gene-encoding ChIFN- α or ChIFN- γ were cloned and two clones of *P. pastoris* stably expressing ChIFN- α and ChIFN- γ were generated. The expression of ChIFN- α and ChIFN- γ in *P. pastoris* culture supernatant was identified by Tricine SDS-PAGE. The biological activity of recombinant ChIFN- α was investigated on the model of chicken embryo fibroblast infected with IBDV and NDV. In case of IBDV-infected cells, the survival rate of cells treated by 1.6 $\mu\text{g/ml}$ ChIFN- α was 79-88%, significantly higher than that of cells treated by PBS which was 33-34%. With NDV-infected cells, the survival rate of cells treated by 1.6 $\mu\text{g/ml}$ ChIFN- α was 81-90%, also obviously higher than that of cells treated by PBS which was 27-32%. In conclusion, recombinant ChIFN- α and ChIFN- γ were expressed successfully on yeast *P. pastoris* and ChIFN- α was functional to stimulate anti- IBDV and NDV activities of cells.

Keywords: *Pichia pastoris*, chicken interferon- α , chicken interferon- γ .

Ngày nhận bài: 15-7-2013