

BUỚC ĐẦU TINH CHẾ PROTEIN TÁI TỔ HỢP TRXHA5.1 NGUYÊN LIỆU SẢN XUẤT VACCINE PHÒNG VIRUS CÚM A/H5N1

• Trương Nam Hải (*), Đỗ Thị Huyền (*),
Văn Thị Như Ngọc (*), Nguyễn Thị Thảo (**),
Võ Viết Cường (***)

TÓM TẮT

*Hemagglutinin (HA) là một trong những kháng nguyên bề mặt của virus cúm H5N1. Phân tử HA gồm 2 tiểu phần là HA1 và HA2. Trong đó, HA1 mang hầu hết các vị trí kháng nguyên của kháng nguyên bề mặt HA. Do vậy, tiểu phần này rất được quan tâm trong các nghiên cứu tạo vaccine dưới đơn vị phòng cúm A cho gia cầm. Trong nghiên cứu này, để tiến tới mục đích xa hơn là tạo được vaccine phòng cúm A/H5N1 cho gia cầm ở Việt Nam, chúng tôi đã tinh chế protein tái tổ hợp TRXHA5.1 từ sản phẩm biểu hiện gen trxha5.1 trong nấm men *Pichia pastoris* SMD1168 bằng phương pháp sắc ký ái lực. Kết quả bước đầu cho thấy TRXHA5.1 đã được tinh chế thành công.*

1. Mở đầu

Đối với dịch cúm A/H5N1 ở gia cầm và dự phòng dịch cúm trên người, nghiên cứu phát triển vaccine không những ngăn ngừa và làm giảm được bệnh ở gia cầm, mà còn khống chế nguồn truyền virus nguy hiểm này sang người. Việt Nam là một trong hai nước trên thế giới được coi là điểm nóng của dịch cúm gia cầm 0. Tiêm vaccine phòng virus cúm A/H5N1 cho gia cầm là một biện pháp hữu hiệu nhất và kinh tế nhất. Tuy nhiên, hiện nay, Việt Nam chưa sản xuất được vaccine phòng dịch này. Hàng năm, chính phủ phải nhập khẩu hàng triệu liều vaccine phòng cúm gia cầm nhưng vẫn không khống chế được dịch cúm triệt để 0. Do đó, chủ động tạo ra vaccine với nguyên liệu từ chính virus cúm A/H5N1 gây dịch cúm gia cầm ở Việt Nam là rất cần thiết.

Hemagglutinin (HA) của virus cúm A là một trong những kháng nguyên bề mặt của virus có bản chất là glycoprotein đóng vai trò quan trọng trong quá trình xâm nhiễm của virus cúm 0. Phân tử HA bao gồm 2 tiểu phần HA1 và HA2 được tách ra từ một phân tử và nối với nhau bởi một cầu nối disulphide sau khi quá trình dịch mã hoàn thành. Hiện tượng thay đổi tính

(*) Viện Công nghệ Sinh học

(**) Trường Đại học Vinh

(***) Trung tâm Nhiệt đới Việt-Nga

kháng nguyên dẫn đến nâng cao độc lực của virus là một trong những nguyên nhân chính gây bùng phát các dịch cúm mới. Người ta đã chứng minh rằng, các biến đổi này chủ yếu gây ra bởi các biến đổi về mặt di truyền trong phân tử HA 0. HA1 là tiểu phần đầu của phân tử HA với kích thước phân tử khoảng 48.1 kDa, là vùng mang hầu hết các vị trí kháng nguyên (Antigenic sites) của phân tử HA và đồng thời cũng là vùng dễ bị thay đổi nhất về mặt di truyền so với toàn bộ phần còn lại của phân tử. Do đó, tiểu phần HA1 rất được quan tâm trong các nghiên cứu tạo kit chuẩn đoán cũng như tạo vaccine dưới đơn vị phòng cúm A cho người và gia cầm 0.

Ở công bố trước 0, chúng tôi đã tối ưu biểu hiện gen ha5.1 của virus cúm A/H5N1 dưới dạng dung hợp với trx (làm tăng hiệu quả sản xuất protein tái tổ hợp và làm tăng tính sinh miễn dịch của kháng nguyên trên gà) trong nấm men *Pichia pastoris* SMD1168 thành công. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục tinh chế TRXHA5.1 có trong sản phẩm biểu hiện gen trxha5.1 từ dịch nuôi *Pichia pastoris* SMD1168 để tiến tới tạo vaccine phòng cúm gia cầm A/H5N1.

Sắc ký ái lực là một phương pháp hiệu quả và được ứng dụng rộng rãi trong việc tinh sạch protein. Phương pháp này dựa trên ái lực cao của protein cần tinh sạch với những nhóm hóa học chuyên biệt. Một trong những phương pháp phổ biến hiện nay là gắn đuôi ái lực vào các protein mong muốn. Nhiều đuôi ái lực đã được thiết kế 0, dựa vào khả năng của một số amino acid như histidine, tryptophan, cysteine... có thể hoạt động như các chất cho electron trên bề mặt của protein và liên kết thuận nghịch với một số ion kim loại có hóa trị 2 như Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Peptide được sử dụng rộng rãi nhất để tinh sạch protein được biểu hiện là His-tag (5xHis-tag đến 10xHis-tag) và phổ biến nhất là 6xHis-tag. His-tag có ái lực mạnh nhất đối với Co^{2+} và Ni^{2+} , do đó, cho phép tinh sạch các protein được gắn His-tag. Việc gắn His-tag vào protein mong muốn không ảnh hưởng đến tính chất của protein, không gây ra đáp ứng miễn dịch 0. Trong nghiên cứu của chúng tôi, đuôi His (6X) được biểu hiện cùng với protein tái tổ hợp TRXHA5.1 và gắn ngay sau TRX (đã được nhà sản xuất - Promega thiết kế sẵn).

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Dịch nuôi *P. pastoris* SMD1168 có gen ngoại lai *trxha5.1*

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tinh chế protein TRXHA5.1 bằng cột sắc ký ái lực His-tag

Dịch nuôi cấy nấm men có protein mong muốn được thu lại và điều chỉnh về pH 6,5 bằng dung dịch rửa mẫu.

Cho CoCl_2 0,1 M qua cột HisTrap™ HP 5 ml với tốc độ 2ml/phút để cố định Co^{2+} lên chất giá. Cột được rửa bằng nước khử ion vô trùng. Cân bằng cột bằng dung dịch rửa mẫu (20 mM sodium phosphate; 0,5 M sodium chloride; 20 mM imidazole, pH 7,4) với tốc độ dòng chảy 4 ml/phút. Cho mẫu qua cột với tốc độ dòng chảy 1ml/phút (thể tích dịch mẫu bằng thể tích chất giá của cột). Cho dung dịch rửa mẫu qua cột với tốc độ dòng chảy 4 ml/phút. Cho dung

dịch thu mẫu (20 mM sodium phosphate; 0,5 M sodium chlorid; 500 mM imidazole, pH 7,4) qua cột với tốc độ dòng chảy 1ml/phút và thu mẫu ở 5 phân đoạn. Mỗi phân đoạn thu 2ml mẫu. Kiểm tra sản phẩm tinh chế trên gel SDS-PAGE.

2.2.2. Điện di protein trên gel polyacrylamide-SDS

Mẫu protein được xử lý biến tính bằng đệm xử lý mẫu (treatment buffer 6X) và ủ ở 100°C trong 10 phút. Sau đó, mẫu được tra vào giếng và chạy với cường độ dòng điện 10 mA cho mỗi bản gel cho đến khi mẫu qua hết lớp gel cô. Sau đó, cường độ dòng điện được tăng lên 20 mA cho mỗi bản gel khi mẫu đến lớp gel tách.

2.2.3. Nhuộm bạc protein điện di trên gel polyacrylamide-SDS

Bản gel polyacrylamide được ngâm trong dung dịch cố định (50% ethanol; 12% acetic acid; 0,05% formaldehyde), lắc nhẹ trong 1 giờ. Rửa bản gel 2 lần bằng ethanol 50%, mỗi lần 20 phút. Chuyển bản gel vào dung dịch tăng độ nhạy (0,5% sodium thiosulfate) trong 1 phút. Rửa bản gel 3 lần bằng nước khử ion, mỗi lần 20 giây. Chuyển bản gel vào dung dịch nhuộm bạc (0,2% silver nitrate; 0,075% formaldehyde), lắc nhẹ trong 20 đến 30 phút. Rửa bản gel 3 lần bằng nước khử ion, mỗi lần 20 giây. Chuyển bản gel vào dung dịch hiện màu (6% sodium carbonate; 0,0004% sodium thiosulfate, 0,05% formaldehyde) cho đến khi băng protein xuất hiện. Rửa bản gel 3 lần bằng nước khử ion, mỗi lần 2 phút. Đặt bản gel vào dung dịch dừng phản ứng (1% glycine) trong 5-10 phút và quan sát kết quả.

2.2.4. Kiểm tra tính bắt cặp đặc hiệu với kháng thể kháng virus cúm A/H5N1 bằng phương pháp Western blotting

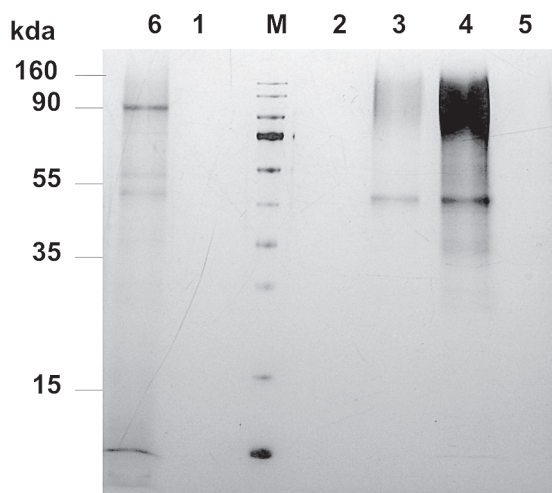
Sản phẩm tinh sạch được điện di biến tính bằng SDS-PAGE. Khi điện di gần kết thúc, ngâm bộ chuyển màng Trans-blot® (Bio-rad) trong đệm blotting đã được làm lạnh và ngâm màng PVDF (polyvinylidene difluoride) 5 phút trong methanol và rửa lại bằng đệm blotting. Sau đó, xếp màng và bản gel trong hệ thống chuyển màng. Chuyển màng trong 60 phút, ở 4°C, khuấy từ nhẹ và hiệu điện thế $U = 100$ V đến 120 V. Phủ màng bằng skimmed milk 5% pha trong TBS 1 giờ ở nhiệt độ phòng (có thể để qua đêm ở 4°C) để che chắn những vị trí không gắn protein. Rửa màng bằng TTBS 3 lần, mỗi lần 10 phút và bằng TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút. Phủ kháng thể 1 là kháng thể đơn dòng kháng His-tag chuột đặc hiệu được pha loãng 2000 lần trong skimmed milk 5% và lắc ở nhiệt độ phòng 1 giờ. Rửa màng bằng TTBS 3 lần, mỗi lần 10 phút và bằng TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút. Phủ kháng thể 2 là kháng thể kháng lại IgG chuột. Kháng thể 2 được pha loãng 5000 lần trong skimmed milk 5% và lắc ở nhiệt độ phòng 1 giờ. Rửa màng bằng TTBS 3 lần, mỗi lần 10 phút và bằng TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút. Hiện màu trong dung dịch màu chứa alkaline phosphatase blue A và alkaline phosphatase blue B. Lắc nhẹ ở nhiệt độ phòng trong 5 đến 10 phút và quan sát kết quả.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Tinh sạch protein TRXHA5.1

Với sự có mặt của đuôi His gồm 6 gốc histidine (His-tag) trong protein tái tổ hợp

TRXHA5.1, chúng tôi đã tiến hành thử tinh chế protein mong muốn trên cột ái lực đã cố định 2 loại ion khác nhau là Ni^{2+} và Co^{2+} ở các điều kiện mẫu được chỉnh pH từ 2,5 đến 7,5 (pH được chỉnh bằng dịch rửa mẫu). Tất cả các sản phẩm tinh chế ở các trường hợp đều được điện di trên gel polyacrylamide và nhuộm bạc. Kết quả, với cột ái lực đã được cố định ion Co^{2+} và dịch mẫu được chỉnh tới pH 6,5, TRXHA5.1 đã được tinh chế sạch, không bị lẫn bởi các protein khác, là một dải có kích thước từ 35 kda đến 160 kda (đặc biệt nhiều ở vùng 54 đến 160 kda) (Hình 1). Như đã lý giải trước đây 0, theo lý thuyết, protein tái tổ hợp TRXHA5.1 có kích thước khoảng 54 kda, nhưng sản phẩm tinh sạch là TRXHA5.1 có kích thước khác nhau, điều này là do protein này bị glycosyl hoá ở các mức độ khác nhau. Sự xuất hiện protein ở vùng kích thước khoảng hơn 35 kda và nhỏ hơn 54 kda là do trong gen ha5.1 có một vị trí cắt của thrombin nên trong một số trường hợp gen ha5.1 bị cắt tại vị trí đó dẫn đến kích thước của TRXHA5.1 bị giảm.

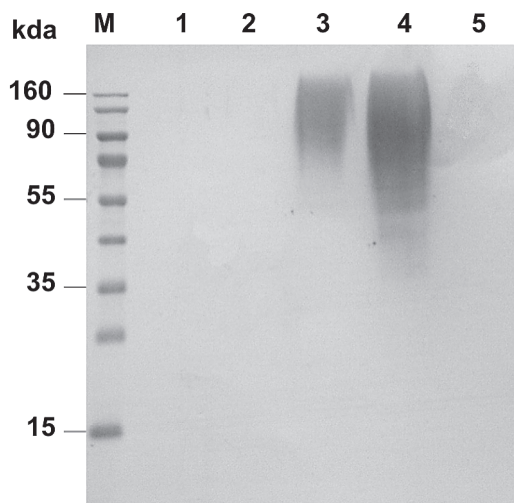


Hình 1. Điện di đồ sản phẩm tinh chế protein TRXHA5.1 bằng cột ái lực His-tag trên gel polyacrylamide đã qua nhuộm bạc. 6: Protein tổng số từ dịch lên men.

1 - 5: 5 phân đoạn thu protein. M: Thang protein chuẩn (Fermentas).

3.2. Kiểm tra sản phẩm tinh sạch - protein tái tổ hợp TRXHA5.1 bằng western blot

Để khẳng định protein thu được chính là protein TRXHA5.1, chúng tôi tiến hành lai western blot sử dụng kháng thể một là kháng thể đơn dòng kháng His-tag sinh ra từ chuột và kháng thể 2 là kháng thể kháng IgG chuột, có nghĩa là chỉ có protein nào có chứa đuôi His mới xuất hiện trên màng lai. Kết quả, tương ứng với các sản phẩm tinh sạch thể hiện ở hình 1, các protein thu được đã bắt cặp với kháng thể kháng His-tag và hiện màu ở vùng kích thước từ 35 kda đến hơn 160 kda. Điều này chứng tỏ, bước đầu, protein TRXHA5.1 đã được tinh chế thành công.



Hình 2. Kiểm tra sản phẩm tinh chế protein TRXHA5.1 bằng lai western blot. 1 - 5: 5 phân đoạn thu protein. M: Thang chuẩn protein (Fermentas).

4. Kết luận

Bước đầu, chúng tôi đã tinh chế thành công protein mong muốn - TRXHA5.1. Mặc dù, hiệu quả của việc tinh sạch chưa được định lượng, tuy nhiên, qua quan sát định tính cho thấy hiệu quả tinh sạch protein là cao. Đây là kết quả thuận lợi ban đầu để có thể tiến tới mục đích khó khăn, phức tạp sau này là tạo được vaccine phòng chống cúm gia cầm A/H5N1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Lê Thanh Hòa, Đinh Duy Kháng, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Phạm Việt Cường, Nguyễn Thị Bích Nga, Lê Trần Bình (2009), "*Tổng quan về virus cúm A/H5N1: vấn đề dịch tễ học, tiến hóa, hình thành genotype và tương đồng kháng nguyên-miễn dịch-vaccine*". <http://www.impe-qn.org.vn/impe-qn/vn/portal/InfoPreview.jsp?ID=3194>.

[2]. Nguyễn Thị Thảo, Văn Thị Như Ngọc, Lê Thị Thu Hồng, Võ Viết Cường, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải, *Tối ưu biểu hiện ha5.1 của virut cúm A/H5N1 trong nấm men Pichia pastoris SMD1168*, kỷ yếu hội nghị khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (2010), 238-243.

[3]. Chen Z, *Medical progress, Influenza DNA vaccine: an update*, CMJ, Vol.117, No.1 (2004), 125-132.

[4]. Chiu FF et al, *Immunological study of HA1 domain of hemagglutinin of influenza H5N1 virut*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (2009), doi:10.1016/j.bbrc.03.106.

[5]. Daly JM, Mumford JA, *Influenza infection. International Veterinary Information Service*. Ithaca, New York, USA (2001).

[5]. Horimoto T, Fukuda N, Iwatsuki-Horimoto K, Guan Y, Lim W, Peiris M, Sugii S, Odagiri T, Kawaoka Y, *Antigen differences between H5N1 human influenza viruses isolated in 1997 and 2003*, J Virol. Vol.66. No.3 (2004), 303-305.

[6]. Mike Brownleade, *His-tagged protein purification: Insight into a new kit on the block*. www.protein-chem.com/Resources/Proteus%20MC.pdf.

[7]. Natalie Betz, *Purification his-tagged proteins from insect and mammalian cells*, Promega corporation. www.promega.com/cnotes/cn009/cn009_06.pdf.

[9]. Steinhauer DA, *Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus*, J Virol, Vol.258 (1999), 1-20.

[10]. Terpe K, *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*, Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol.60, No.5 (2003), 523-533.

[11]. Webster RG, *Influenza: An emerging disease*, Emer Infect Dis, Vol.4 (1998), 436-441.

ABSTRACT

INITIAL PURIFICATION OF RECOMBINANT PROTEIN TRXHA5.1 - PRODUCTION MATERIAL OF VACCINE AGAINST AVIAN INFLUENZA A/H5N1

Hemagglutinin (HA) is one of the surface antigens of virus H5N1. HA consists of two subunits HA1 and HA2. Since HA1 contains most of the surface antigenic sites of HA, it has been greatly noticed in Avian Influenza vaccine production researches. In this study, to achieve the further aim of creating vaccine against Avian Influenza A/H5N1, we purified recombinant protein - TRXHA5.1 from the observable product of gene *trxha5.1* in yeast *Pichia pastoris* SMD1168 by affinity chromatography. The results showed that initially TRXHA5.1 has been purified successfully.