

BIỂU HIỆN GEN *HIV-1 p24* Ở CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN LỤC LẠP

Phan Tường Lộc, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Thị Thanh

Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

(Bài nhận ngày 30 tháng 09 năm 2011, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 09 tháng 02 năm 2012)

TÓM TẮT : Chuyển gen *HIV-1 p24* vào lục lạp đã được thực hiện thành công ở cây thuốc lá V2 (Virginia TBE2). Bằng các kỹ thuật PCR và Southern blot, các gen chuyển được chứng minh đã hòa nhập vào đúng vị trí thiết kế trên lục lạp, giữa gen *trnM* và *trnG*. Kết quả Western blot cho thấy gen *HIV-1 p24* biểu hiện ở các dòng thuốc lá chuyển gen. Hàm lượng protein *p24* được ghi nhận qua phân tích ELISA cho thấy tích lũy ở mức cao nhất là 6,3 % tổng protein hòa tan (total soluble protein - TSP), ở các lá gần ngọn, và thấp nhất là 1,7% TSP. Protein được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel phân tử có độ tinh sạch là 9,694 lần, hiệu suất tinh sạch là 31,94%, tuy nhiên protein *p24* mất hoạt tính nhiều sau khi tinh sạch.

Từ khóa: gen *HIV-1 p24*, cây thuốc lá V2, lục lạp .

MỞ ĐẦU

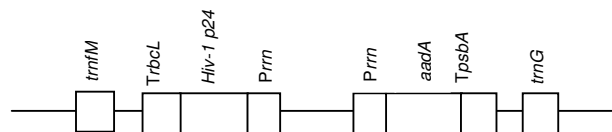
Cây thuốc lá V2 được chuyển gen *HIV-1 p24* và gen *aadA* vào lục lạp, chồi được tái sinh trên môi trường có chất điều hòa sinh trưởng BA 1 mg/l, NAA 0,1 mg/l và kháng sinh chọn lọc spectinomycin và streptomycin ở nồng độ ban đầu tương ứng là 80 mg/l và 125 mg/l. Các chồi chuyển gen giả định sẽ được tiếp tục chọn lọc ở nồng độ cao hơn lên tới 500 mg/l. Có 4 dòng, ký hiệu T1, T2, T5, T6 có khả năng kháng hai loại kháng sinh ở nồng độ cao nhất, phát triển thành cây con và ra rễ. Dòng T3 chỉ kháng được spectinomycin ở mức thấp và chết ở nồng độ 250 mg/l. Các dòng T1, T2, T5, T6 đã kiểm tra bằng PCR cho thấy có sự hiện diện

của gen *HIV-1 p24* [4], sẽ được tiếp tục phân tích bằng các kỹ thuật sinh học phân tử và sinh hóa để xác định di truyền các gen biến nạp, sự biểu hiện protein *p24* và tinh sạch protein tái tổ hợp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây thuốc lá V2 (Virginia TBE2) đã được chuyển tổ hợp gen *Prrn/HIV-1 p24/TrbcL* và *Prrn/aadA/TpsbA* cấu trúc trên vector pITB.HIV-1 *p24* vào lục lạp bằng phương pháp bắn gen. Các dòng chuyển gen nhận được sau khi chọn lọc và kiểm tra có sự hiện diện của gen *HIV-1 p24* bằng phương pháp PCR [4].



Sơ đồ 1. Cấu trúc vector pITB.HIV-1 p24

Cấu trúc vector pITB.HIV-1 p24:

+ *aadA*: gen tạo tính kháng hai loại kháng sinh spectinomycin và streptomycin, dùng để chọn lọc đối tượng chuyển gen.

+ *HIV-1p24*: gen biểu hiện protein HIV-1 p24.

+ *Prrn*: promoter operon rRNA lặp thể.

+ *TrbcL*, *TpsbA*: vùng không dịch mã đầu 3' từ gen *rbcL*, gen *psbA* lặp thể.

+ *trnFM*, *trnG*: vùng flank (vị trí sườn bên) chứa trình tự các gen *trnFM* và *trnG* lục lạp dùng để tái tổ hợp đồng dạng.

Các dòng thuốc lá chuyển gen và cây V2 hoang dại được nuôi cấy *in vitro* và trồng ngoài vườn ươm để làm nguyên liệu cho các thí nghiệm.

Các vật liệu, hóa chất khác sử dụng được trình bày cụ thể theo các phương pháp phân tích.

Phương pháp PCR

DNA thuốc lá, được ly trích từ lá bằng bộ kit tách DNA thực vật mini của QIAGEN (Đức), dùng làm nguyên liệu để kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp vào lục lạp bằng phương pháp PCR với các mồi đặc hiệu (Bảng 1).

Bảng 1. Các mồi đặc hiệu

Gen	Tên mồi	Trình tự các nucleotide (5'-3')	Kích thước (bp)
<i>aadA</i>	aadAp1	AAC CTC CTA TAG ACT AGG C	250
	aadAp2	AGC GAA ATG TAG TGC TTA CG	
<i>HIV-1 p24</i>	p24 for	ATGGCTAGCGGATCCCCTATT	700
	p24 rev	TCTAGAGGAATTCTACTCAGCTTTATGTC	
<i>Gen lục lạp</i> (<i>trnG</i> , <i>trnFM</i>)	cpT1	GGA TTT GGT ATA GTT GGC C	255 (ở lục lạp hoang dại)
	cpT2	CTT GTT TAT CTA TTA GTT TTC AGT	

Quy trình PCR khuếch đại đoạn trình tự dưới 1000 bp

Thành phần vật liệu:

- Nước cất vô trùng	13,8 µl
- 5 X GoTaq flexi buffer	5 µl
- MgCl ₂ (2,5M)	2 µl
- Mồi xuôi (10 pmol)	1 µl
- Mồi ngược (10 pmol)	1 µl
- dNTPs (10 mM)	1 µl
- GoTaq Polymerase	0,2 µl
- DNA template	1 µl
- Thẻ tích cuối:	25 µl

Chu kỳ luân nhiệt: 30 chu kỳ theo các bước sau: 95°C/2 phút [95°C/1 phút , 50-52°C/1 phút, 72°C/2 phút] 72°C/5 phút.

Quy trình PCR khuếch đại đoạn trình tự đặc hiệu trên 1000 bp

Thành phần vật liệu:

- Nước cất vô trùng	38 µl
- 10 X buffer	5 µl
- dNTPs (20 mM)	2 µl
- AccuTaq	1 µl
- DNA template	1 µl
- Mồi xuôi (10 pmol)	1 µl

- Mỗi ngược (10 pmol) 1 µl
- DMSO 1 µl
- Thể tích cuối 50 µl

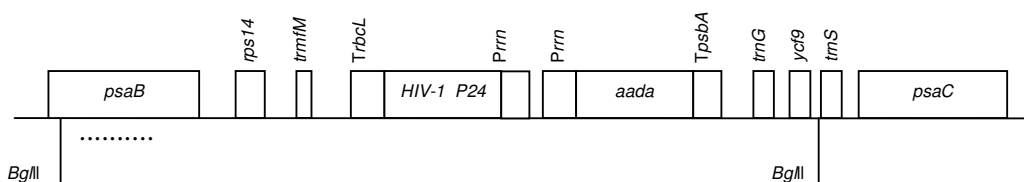
Chu kỳ luân nhiệt: 30 chu kỳ theo các bước sau: 98°C/30 giây [94°C/30 giây, 50-60°C/30 giây, 68°C/4 phút] 68°C/10 phút.

Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C.

Kết quả PCR được điện di trên gel agarose 0,8%, dung dịch đệm TBE 1%, thang DNA chuẩn 1 kb (Biolabs, Anh) [3,13].

Phương pháp Southern blot

Dùng mẫu dò đặc hiệu có đánh dấu để phát hiện trình tự DNA cần kiểm tra thông qua lai phân tử.



Sơ đồ 2. Cấu trúc gen biến nạp vào lục lạp giả định và các vị trí cắt bằng enzyme cắt giới hạn (*rps14*, *trmM*, *trnG*, *ycf9*, *trnS*, *psaB*, *psaC*: các gen lạp thể thuốc lá)

Mẫu dò (probe) đặc hiệu cho gen lục lạp thuốc lá *psaB* được chuẩn bị theo phương pháp tổng hợp mẫu dò đánh dấu DIG bằng PCR, với hai mỗi, mỗi xuôi 5'-AAT TTC TGC CAA TAT CCA CGC C-3' và mỗi ngược 5'-GTT GCC GGG TTG GTT AAA TGC-3' với kích thước trình tự probe là 543 bp.

Quá trình lai được thực hiện ở 37°C trong 16 giờ. Màng lai sau đó được mang đi phát hiện bằng phản ứng quang hóa và ghi lại trên phim X quang [5, 6, 8, 13].

Phương pháp Southern blot không phóng xạ được thực hiện dựa trên quy trình của McCabe và cs (1997) [5]. DNA được chiết tách từ lá theo bộ kit DNeasy của QIAGEN (Đức).

Mẫu DNA thuốc lá (5µg DNA tổng) được cắt bằng enzym giới hạn *Bgl*III. Trên lục lạp hoang dại sẽ có kích thước đoạn cắt có thể lai với probe là 3,5 kb và trên lục lạp chuyển gen là 5,8 kb.

Hỗn hợp DNA sau khi cắt được chạy điện di trên gel agarose 0,8 % trong điện trường 25 V qua đêm (thang chuẩn λ *Hind*III) và sau đó được chuyển lên màng lai Hybond (GE Healthcare).

Phương pháp Western blot

Ly trích protein

Để ly trích protein tổng số, 0,3 g lá được nghiền trong nitrogen lỏng đến khi mịn, sau đó thêm vào 1 ml dung dịch ly trích protein (50 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES)/KOH pH 7,5, 1 mM disodium ethylenediaminetetraacetate, 10 mM potassium acetate, 5 mM magnesium acetate, 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 30 mM 2-mercaptoethanol) được giữ ở 4°C. Trộn đều hỗn hợp khoảng 10 phút trên

đá, sau đó ly tâm 15 phút ở 13000 vòng/p ở 4°C, thu lấy phần dịch trong [6].

Dịch ly trích protein được chuẩn độ bằng phương pháp Bradford. Thang nồng độ chuẩn được dựng với bovine serum albumin (BSA) ở các nồng độ 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 (mg/ml) tương quan với các giá trị OD đo ở bước sóng 595 nm. Dựa vào đồ thị tính các nồng độ protein trong mẫu thí nghiệm theo các giá trị OD đo được [10].

SDS – PAGE

Protein được phân tách bằng điện di trên gel polyacrylamide dựa theo kích thước sau khi được biến tính về cấu trúc bậc 1 bởi thành phần SDS. Bản gel gồm có hai phần, phần trên là phần gel gom (stacking gel) có 4% acrylamide/bisacrylamide và phần dưới là phần gel phân tách (resolving gel) có 12% acrylamide/bisacrylamide (Bio-rad, Mỹ). Protein marker được dùng là GE Rainbow RPN800E. Bản gel điện di protein được nhuộm bằng dung dịch Coomassie Brilliant Blue để quan sát các băng protein có trong dung dịch [8, 10].

Western blot

Bản gel sau khi chạy điện di với các băng protein được phân tách (không nhuộm quan sát) sẽ được chuyển sang màng nitrocellulose bằng thiết bị semi-dry blotter (Apelex) trong điện trường 120 mA trong 30 phút.

Màng được ủ trong dung dịch cố định (5% skimmed milk trong PBS) qua đêm ở nhiệt độ phòng, rồi tiếp tục ủ qua đêm ở 4°C trong dung dịch kháng thể đơn dòng từ cừu kháng HIV-1 p24 pha loãng 1:500 trong dung dịch cố định.

Sau đó màng được rửa trong dung dịch PBS bổ sung 0,1% Tween 20 và được ủ tiếp với kháng thể đơn dòng thứ hai từ dê kháng kháng thể cừu kết hợp với horseradish peroxidase, được pha loãng 1:1000 trong dung dịch cố định [8].

Màng sau đó được cho phản ứng quang hóa với dung dịch phát hiện. Kết quả được ghi nhận trên phim âm bản Kodak. Protein HIV-1 p24 có kích thước khoảng 26 kDa.

Phương pháp ELISA

Lá (100 mg) được nghiền mịn trong 400 µl dung dịch đệm chiết tách protein (2,5% bovine serum albumin (BSA), 0,1% Tween 20, 2 mM PMSF, 30 mM 2-mercaptoethanol).

Đĩa Maxisorp 96 giếng (Nunc/Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) được tráng qua đêm ở 4°C với 50 µl kháng thể đa dòng kháng HIV-1 p24 của cừu (Aalto Bioreagents, Ireland) được pha loãng ở nồng độ 7,5 µg/ml trong dung dịch đệm sodium cacbonat/bicarbonate 100 mM, pH 9,6. Các giếng được rửa ba lần với 200 µl dung dịch rửa (0,1% Tween 20/PBS) và sau đó cố định với 200 µl dung dịch cố định (2,5% BSA/PBS) trong 2 giờ ở 37°C (hoặc qua đêm ở 4°C). Đồ bỏ dung dịch cố định và thay thế bằng 100 µl mẫu kiểm tra kháng nguyên HIV-1 p24 pha loãng 1: 200 với dung dịch cố định, các mẫu này gồm dịch chiết xuất protein của các dòng thuốc lá chuyển gen, cây V2 hoang dại và dung dịch kháng nguyên chuẩn HIV-1 p24 được pha loãng ở các nồng độ 0, 10, 50, 100 (µg/ml). Sau khi ủ 2 giờ ở 37°C, các giếng được rửa bốn lần với dung dịch rửa. Kháng thể đơn dòng kháng p24 biotin hóa phụ thuộc cấu tạo (Aalto

Bioreagents, Ireland), được pha loãng 1: 500 trong dung dịch cố định, rồi cho vào các giếng, ủ đĩa ở 37 ° C trong 1 giờ. Sau khi rửa bốn lần với dung dịch rửa, thêm vào 100 µl phức chất streptavidin–alkaline phosphatase (Hoffmann-La Roche, Basel, Thụy Sĩ), đã được pha loãng ở 1: 1000 trong dung dịch cố định vào các giếng, đĩa được ủ trong 30 phút ở 37°C.

Các giếng được hút sạch dịch và rửa sạch bốn lần dung dịch rửa, rồi thêm vào 200 µl phosphate p-nitrophenyl ở nồng độ 1,0 mg/ml (SIGMA FAST, dạng viên, Sigma, Mỹ). Đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút, và sau đó thêm 100 µl NaOH 1 M để dừng phản ứng màu. Đọc kết quả dưới máy quang phổ ở bước sóng 405 nm (MWG, Ebersberg, Đức) [6].

Phương pháp tinh sạch protein bằng sắc ký lọc gel phân tử

Nghiên 20 g lá trong nitrogen lỏng đến khi mịn. Cho vào hỗn hợp 200 ml dung dịch ly trích, trộn đều sau đó lọc qua vải lọc. Dịch sau lọc được ly tâm 15 phút ở 13000 v/p và thu phần dịch trong. Protein được tủa bằng acetone với tỉ lệ dịch : acetone là 1: 2. Dịch chứa tủa được ly tâm 30 phút ở 13000 v/p.

Đổ bỏ phần acetone và để phần acetone còn thừa trong tủa protein bay hơi. Sau đó hòa tủa

vào 10 ml dung dịch đệm citric/citrate 5 mM pH 6,5. Lọc dịch qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch protein được tinh sạch qua hệ thống sắc ký lọc gel phân tử. Các thông số chạy sắc ký như sau: cột 50 cm x 1,5 cm, flow adaptor 1,5 cm, thể tích mẫu 2 ml, phân đoạn 2 ml, bước sóng hấp thụ 280 nm, tốc độ dòng chảy 0,14 ml/p.

Pha rắn là gel Sephadex G50 (giới hạn phân tách 1,5-3 kDa), pha lỏng là dung dịch đệm citric/citrate 5 mM pH 6,5 [6, 9, 10].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chọn lọc và theo dõi các biểu hiện hình thái của cây chuyển gen

Lục lạp được chuyển gen trong cây ở giai đoạn đầu rất ít so với phần còn lại là lục lạp hoang dại có thể lên tới 10.000 đơn vị trong tế bào, do đó, nuôi cấy mẫu chuyển gen trong môi trường có áp lực chọn lọc cao nhằm để gia tăng số lượng lục lạp chuyển gen và hướng tới đồng nhất toàn bộ trong tế bào. Ở những vòng chọn lọc đầu tiên một số chồi/cây chuyển gen có biểu hiện lá loang lổ đốm mất màu do spectinomycin và streptomycin ức chế hình thành các ribosome tổng hợp protein ở lục lạp hoang dại còn tồn tại, ảnh hưởng đến sự tạo thành diệp lục trong lá (Hình 1).



Hình 1. Cây chuyển gen với lá loang lổ đốm mất màu ở những vòng đầu chọn lọc cao bằng kháng sinh spectinomycin và streptomycin

Để quá trình chọn lọc được triệt để, các dòng cây chuyển gen được cấy truyền liên tục trên môi trường cơ bản có bổ sung spectinomycin và streptomycin ở nồng độ tăng dần từ nồng độ chọn lọc ban đầu đến 500 mg/l. Các cây

chuyển gen được cho tái sinh lại nhiều đợt trên môi trường có spectinomycin và streptomycin 500 mg/l. Các cá thể phát triển tốt nhất sẽ được chọn. Việc tái sinh được thực hiện 4 lần (Hình 2) [1, 2, 7].



Hình 2. Các mảnh lá cây chuyển gen được nuôi cấy tái sinh chồi lại trên môi trường có kháng sinh spectinomycin và streptomycin 500 mg/l so với các mảnh lá từ cây V2 đối chứng

Các dòng chuyển gen sau 4 lần tái sinh trên môi trường chọn lọc không còn biểu hiện loang

lổ đốm mất màu trên lá, phát triển tốt, lá có màu xanh lá cây đồng đều (Hình 3).

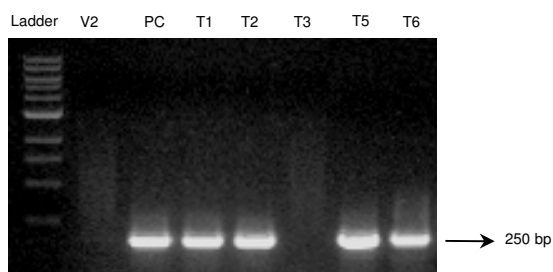


Hình 3. Cây chuyển gen phát triển tốt trên môi trường có kháng sinh spectinomycin và streptomycin ở nồng độ 500 mg/l.

Phân tích PCR

Các dòng chuyển gen sau khi chọn lọc có khả năng sống tốt nhất là T1, T2, T5, T6, đã được kiểm tra sự hiện diện của gen *HIV-1 p24*

[4]. Các dòng này được tiếp tục kiểm tra sự hiện diện của gen *aadA* bằng PCR với các môi đặc hiệu *aadap1* và *aadap2*.



Hình 4. Kết quả PCR kiểm tra sự hiện diện của gen *aadA* trong các dòng thuốc lá chọn lọc sau khi chuyển gen T1, T2, T3, T5, T6 và đối chứng âm từ cây V2 hoang dại. Đối chứng dương từ pITB.HIV-1 p24. Thang chuẩn 1 kb Biolabs.

Kết quả trên bản gel có xuất hiện các băng khuếch đại đoạn trình tự phù hợp với kích thước mong muốn 250 bp (Hình 4). Dòng T3, trong quá trình chọn lọc, có khả năng kháng spectinomycin ở nồng độ khoảng 250 mg/l, nhưng khi chuyển sang nồng độ cao hơn thì cây bị chết. Kiểm tra PCR ở dòng này, kết quả âm tính, không có băng khuếch đại. Hiện tượng này có thể được giải thích do dòng T3 là dòng đột biến gen *rrn16* lục lạp, không phải dòng

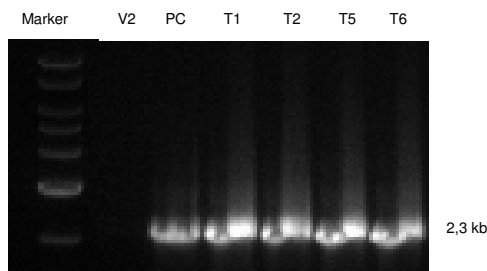
chuyển gen. Với các kết quả kiểm tra bằng PCR, có thể kết luận các dòng thuốc lá T1, T2, T5, T6 đã được biến nạp gen *HIV-1 p24* và gen *aadA* vào trong bộ máy di truyền của cây.

Tuy nhiên để kiểm tra tính ổn định của cấu trúc chuyển gen và vị trí hòa nhập của các gen này trên lục lạp, hai phản ứng PCR được thực hiện trong đó phản ứng thứ nhất với cặp môi gồm 1 môi xuôi cpT1 trên lục lạp ở vị trí gen

trnG và một môi ngược p24 rev ở vị trí gen *HIV-1 p24*.

Kết quả sản phẩm PCR với môi cpT1 và p24 rev ở các dòng T1, T2, T5, T6 cho thấy có các

băng khuếch đại trình tự đặc hiệu liên kết từ gen *trnM* đến *HIV-1 p24* kích thước 2,3 kb (Hình 5).

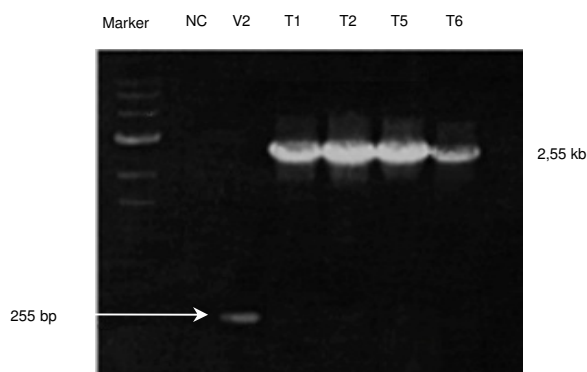


Hình 5. Kết quả PCR kiểm tra sự hiện diện của trình tự liên kết từ gen *trnG* đến *HIV-1 p24* với các môi cpT1 và p24 rev ở các dòng thuốc lá chuyển gen T1, T2, T5, T6 và đối chứng âm từ cây V2 hoang dại. Đối chứng dương từ pITB.HIV-1p24. Thang chuẩn 1 kb Biolabs.

Ở các sản phẩm PCR thực hiện với cặp môi cpT1 và cpT2 bắt cặp trên gen *trnG* và *trnG*, kết quả cho thấy 4 dòng chuyển gen T1, T2, T5, T6 có duy nhất các băng khuếch đại đặc hiệu kích thước 2,55 kb và ở mẫu đối chứng V2 chỉ có băng khuếch đại kích thước 255 bp. Băng 255 bp là đoạn trình tự ở lục lạp hoang dại giữa cpT1 và cpT2, trong khi đó băng 2,55 kb là trình tự gồm cả cấu trúc gen biến nạp

chèn giữa cpT1 và cpT2. Trong trường hợp đối tượng kiểm tra trong tình trạng khảm, không chuyển gen hoặc biến nạp vào nhân sẽ nhận được băng khuếch đại 255 bp.

Điều này chứng tỏ các dòng T1, T2, T5, T6 đã được chuyển gen *HIV-1 p24* ổn định vào vị trí phù hợp trên lục lạp và ở tình trạng đồng nhất nhất lạp thể chuyển gen trong cây (Hình 6).



Hình 6. Kết quả PCR kiểm tra sự hiện diện của trình tự liên kết từ gen *trnG* đến gen *trnM* với các môi cpT1 và cpT2 ở các dòng thuốc lá chuyển gen T1, T2, T5, T6 và đối chứng âm cây V2 hoang dại. Đối chứng dương từ pITB.HIV-1 p24, thang chuẩn 1 kb Biolabs.

Phân tích Southern blot

Các dòng chuyển gen được kiểm tra di truyền bằng lai phân tử Southern blot với probe là trình tự trên gen *psaB*, nằm ngoài các vị trí tái tổ hợp đồng dạng *trnfM* và *trnG* có kích thước là 543 bp. DNA từ các dòng chuyển gen và đối chứng được cắt bằng enzyme cắt giới hạn *BglIII*, tại 1 vị trí cắt trên gen *psaB* và một vị trí cắt bên trong kề cận *trnS*. Kích thước

đoạn cắt giới hạn trong của gen lục lạp hoang dại là 3,5 kb và lục lạp biến nạp gen là 5,8 kb. Kết quả trên phim tự ghi cho thấy ở dòng đối chứng có băng lai DNA ở vị trí 3,5 kb và ở các dòng chuyển gen có các băng lai ở vị trí 5,8 kb (Hình 7).

Như vậy cấu trúc gen cần chuyển đã được biến nạp thành công vào lục lạp và nằm trong liên kết với các gen lục lạp hoang dại phù hợp.



Hình 7. Kết quả phân tích Southern blot các dòng chuyển gen T1, T2, T5, T6 và cây V2 hoang dại. Thang DNA chuẩn λ *HindIII*.

Phân tích biểu hiện protein p24 bằng Western blot

Bốn dòng thuốc lá chuyển gen T1, T2, T5, T6 được kiểm tra sự biểu hiện của protein p24 bằng phương pháp Western blot.

Lá từ các dòng thuốc lá trồng ở vườn ươm khoảng 1 tháng được dùng để ly trích protein.

Kết quả đường chuẩn:

Nồng độ protein mẫu được tính dựa trên đường chuẩn BSA.

Nồng độ mg/ml	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
OD	0,039	0,071	0,127	0,211	0,393

Phương trình đường chuẩn được thành lập $y = 0,4066x$ theo x là giá trị các nồng độ protein chuẩn và y là giá trị OD tương ứng. Nồng độ

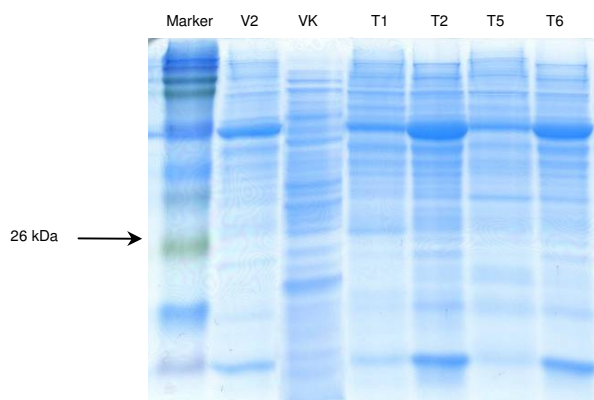
protein tổng của mẫu được tính theo phương trình trên từ giá trị OD như sau (Bảng 2):

Bảng 2. Nồng độ protein tổng ở các dòng phân tích.

Mẫu	V2	T1	T2	T5	T6
OD	0,144	0,225	0,352	0,352	0,217
Nồng độ protein mg/ml	0,708313	1,106739	1,731431	1,067388	0,993606
Nồng độ protein trong lá mg/g	2,361043	3,689129	3,55796	3,55796	3,312018

Protein của các cây V2 hoang dại đối chứng âm, các dòng chuyển gen T1, T2, T5, T6 và protein đối chứng dương từ vi khuẩn *E. coli* được phân tách bằng điện di trên gel

acrylamide trên nền SDS với marker GE Rainbow RPN800E. Các băng protein được nhuộm thể hiện trên bản gel (Hình 8).



Hình 8. Bản gel điện di phân tích các protein ly trích từ các dòng chuyển gen T1, T2, T5, T6, cây V2 hoang dại và từ vi khuẩn *E.coli* mang plasmid pITB.HIV-1 p24.

Các băng protein trên bản gel sẽ được chuyển qua màng lai và kết quả thực nghiệm Western blot xác định được các băng protein p24 ở dòng đối chứng dương và các dòng

chuyển gen T1, T2, T5, T6. Ở cây V2 hoang dại đối chứng âm không có băng protein p24 (Hình 9).



Hình 9. Các băng protein HIV-1 p24 ở các dòng chuyển gen T1, T2, T5, T6 và *E. coli* mang plasmid pITB.HIV-1 p24 được phát hiện bởi phương pháp Western blot

Kết quả Western blot cho thấy protein p24 được biểu hiện ở các dòng thuốc lá chuyển gen T1, T2, T5, T6.

Phân tích hàm lượng protein p24 trong các dòng chuyển gen bằng phương pháp ELISA

Các dòng chuyển gen có biểu hiện protein p24 được chứng minh bằng Western blot sẽ được kiểm tra bằng kỹ thuật ELISA để xác

định hàm lượng protein p24 so với hàm lượng protein tan tổng. Lá của cây chuyển gen và đối chứng được thu nhận ở ngày thứ 55 trên các lá 12 và 20. Mẫu được ly trích protein tổng và cho kết quả như sau:

Nồng độ mg/ml	0,0625	0,125	0,25	0,5	1
OD	0,056	0,116	0,193	0,409	0,665

Phương trình đường chuẩn được thành lập y = 0,7025x theo x là nồng độ protein BSA

chuẩn và y là giá trị OD tương ứng. Nồng độ protein của mẫu được tính theo công thức trên từ giá trị OD như sau (Bảng 3):

Bảng 3. Nồng độ protein tổng ở các dòng phân tích.

Mẫu	V2	T1	T2	T5
OD Lá 12	0,591	0,569	0,606	0,589
mg/OD	1,68256228	1,619929	1,725267	1,676868
mg/g lá	5,60854093	5,399763	5,75089	5,589561
OD lá 20	0,6498	0,659	0,672	0,659
mg/OD	1,84996441	1,876157	1,913167	1,876157
mg/g lá	6,16654804	6,253855	6,377224	6,253855

Các mẫu trên sau đó được phân tích bằng kỹ thuật ELISA để xác định hàm lượng protein p24 dựa trên thang chuẩn là kháng nguyên

protein p24 tinh khiết ở các nồng độ 0, 10, 50, 100 µg/ml.

Nồng độ µg/ml	0	10	50	100
OD	0,013	0,12	0,175	0,35
dOD	0	0,107	0,162	0,337

Phương trình đường chuẩn được thành lập y = 0,0035x theo x là nồng độ protein p24 và y là

giá trị OD tương ứng. Kết quả hàm lượng protein p24 ở các mẫu được tính theo công thức trên từ giá trị OD như sau (Bảng 4):

Bảng 4. Nồng độ protein p24 ở các dòng phân tích ELISA

Mẫu	V2	T1	T2	T5
OD Lá 12	0,079	0,159	0,383	0,348
Δ OD		0,08	0,304	0,269
Protein p24 μ g/ml		23,52941	89,41176	79,11765
Protein p24 μ g/g lá		94,11765	357,6471	316,4706
% protein p24/protein tổng		1,742996	6,218987	5,661815
OD Lá 20	0,085	0,422	0,373	0,252
Δ OD		0,337	0,288	0,167
Protein p24 μ g/ml		99,11765	84,70588	49,11765
Protein p24 μ g/g lá		396,4706	338,8235	196,4706
% protein p24/protein tổng		6,339619	5,313025	3,141592

Nồng độ protein p24 biểu hiện có sự khác biệt ở các vị trí khác nhau.

Tinh sạch protein p24 bằng sắc ký lọc gel phân tử

Lá được thu nhận từ các dòng chuyển gen ở phần gần ngọn được ly trích, tinh sạch và tủa protein bằng aceton trong 1 giờ ở 4°C.

Dịch trích protein có hàm lượng protein tổng hòa tan là 5,122 mg/g lá.

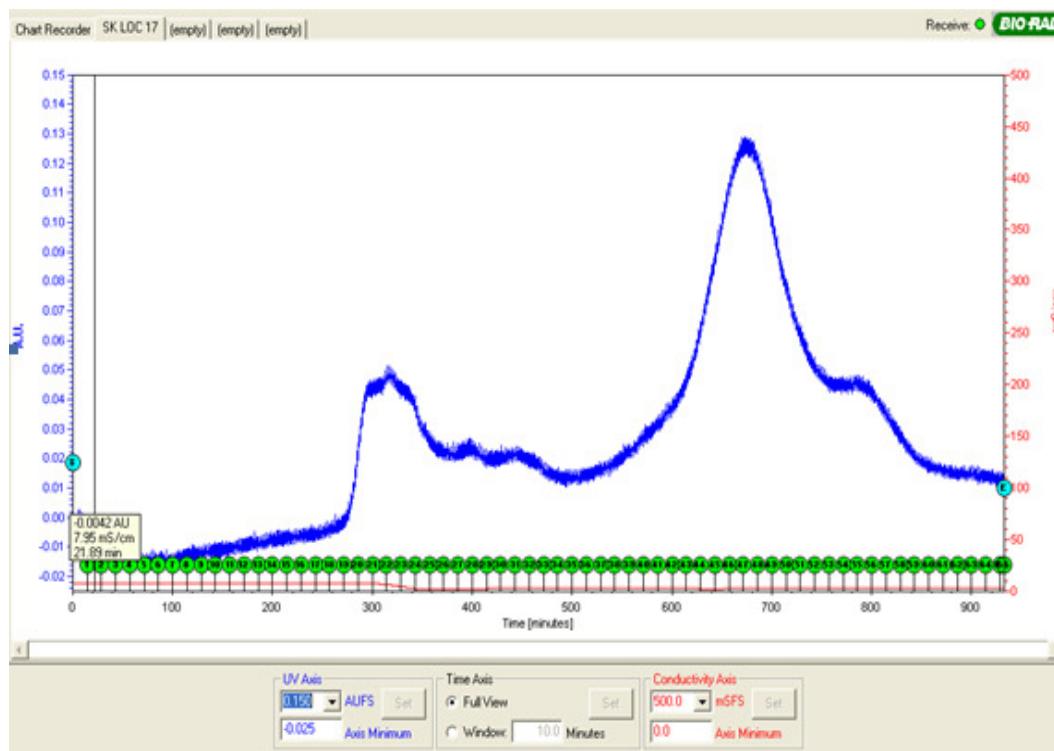
Từ 20 g lá thu được phần tủa rắn là 1,16 g. Lượng tủa này được hòa vào 10ml dung dịch

đệm citrate/citric 5mM pH 6,5 và lọc qua màng lọc 0,45 μ m để thu phần dịch trong. Phần giữ lại trên lọc là 0,249 g.

Kết quả tinh sạch sắc ký lọc gel như sau (Bảng 5, Hình 10):

Bảng 5. Kết quả sắc ký lọc gel

Tên nghiệm thức	Σ Hàm lượng (mg)	Độ tinh sạch (lần)	Hiệu suất (%)
Trước sắc ký	30,348	1	100
Sau sắc ký	9,694	9,694	31,94



Hình 10. Đồ thị chạy sắc ký lọc gel protein p24.

Thể tích dung dịch các phân đoạn sau sắc ký của peak 1 và 2 được đông khô có trọng lượng tương ứng với peak 1 và 2 là 0,11 và 0,065 g. Dùng 1/10 trọng lượng tương ứng với peak1 và

peak 2 hòa tan trong nước để xác định hàm lượng protein p24 bằng phân tích ELISA cho kết quả như sau:

Bảng 6. Hàm lượng protein p24 trong peak 1 và 2 thu nhận sau sắc ký

Mẫu	V2 TB	P1	P2
OD	0,08325	0,102222	0,094815
dOD		0,018972	0,011565
µg/ml		5,580065	3,401416

Lượng protein p24 thu được ở hai mẫu thử là 8,98 µg/ml, Lượng p24 trên tổng số mẫu thu được sau sắc ký lọc gel ở peak 1 và 2 là 89,8 µg. Tỷ lệ phần trăm protein p24 so với lượng protein tổng chỉ đạt 0,92% (theo công thức $[89,8 \times 100 : (9,694 \times 10000)]$). Tỷ lệ này thấp hơn

nhều so với tỷ lệ thu nhận trực tiếp ở dịch ly trích protein chưa qua tinh sạch, Điều này có thể do sự mất hoạt tính của protein p24 trong các quá trình tinh sạch và chạy sắc ký.

Trong nghiên cứu này, hệ thống vector chuyển gen lặp thể pITB.HIV1 được sử dụng,

gồm gen *HIV-1 p24* được điều khiển bởi promoter *rrn* và gen *aadA* cũng được điều khiển bởi promoter *rrn*. Đây là nghiên cứu chuyển gen vào lục lạp thuốc lá tạo protein tái tổ hợp đầu tiên được thực hiện ở Việt Nam, do đó nó mang ý nghĩa mô hình nhằm hoàn thiện các thông số, quy trình chuyển gen lục lạp và phân tích cây chuyển gen trong điều kiện phòng thí nghiệm thực hiện.

Mô lá *in vitro* cây thuốc lá V2 được dùng làm nguyên liệu chuyển gen. Khi kiểm tra mức chống chịu, mô lá khá nhạy cảm với nồng độ kháng sinh chọn lọc, bị ức chế bởi spectinomycin ở nồng độ 80 mg/l và streptomycin 125 mg/l. Tuy nhiên, mô lá sau khi được chuyển gen có thể tái sinh chồi trên môi trường có kháng sinh chọn lọc spectinomycin và streptomycin ở nồng độ cao 500 mg/l, các cây con chuyển gen cũng phát triển tốt trên môi trường có cùng nồng độ kháng sinh. Các nồng độ kháng sinh này cũng được sử dụng trong chọn lọc cây chuyển gen của McCabe và cs (2008) [6] Zhou và cs (2008) [13].

Các dòng thuốc lá chuyển gen sau chọn lọc T1, T2, T5, T6, khi kiểm tra bằng PCR với các môi đặc hiệu khác nhau cho thấy có sự hiện diện của các gen trong cấu trúc gen đã chuyển. Điều đó cho thấy cây thuốc lá V2 *in vitro* có khả năng biến nạp gen vào lục lạp và cấu trúc *Prrn/aadA/TrbcL* biểu hiện tốt. Ngoài ra dòng thuốc lá T3 thu nhận được trong quá trình chọn lọc chỉ kháng được spectinomycin ở nồng độ khoảng 250 mg/l và chết khi chuyển sang nồng độ cao, kiểm tra bằng PCR cho thấy không

phải là cây chuyển gen, có thể là các dòng đột biến tự nhiên gen 16S rRNA trong lục lạp hoang dại, tham khảo theo báo cáo của Maliga (2004) [7].

Trong phân tích Southern blot các dòng chuyển gen T1, T2, T5, T6, khi cắt bộ gen lục lạp bằng enzyme cắt giới hạn *BglII*, vị trí cắt được xác định như trên sơ đồ, hai băng DNA được phát hiện bởi mẫu dò trình tự *psaB*. Băng thứ nhất ở vị trí 3,5 kb xuất hiện ở dòng hoang dại, giống với kết quả thực hiện trên giống thuốc lá Petite Havana hoang dại trong công trình của tác giả Zhou và cs (2008) [13], dùng mẫu dò và enzyme cắt giới hạn tương tự. Băng thứ hai ở vị trí 5,8 kb xuất hiện ở các dòng chuyển gen, trong khi ở các dòng chuyển gen với vector pZF5 trong công trình của Zhou và cs (2008) là 6 kb [13]. pZF5 có cấu trúc khá gần với cấu trúc chúng tôi sử dụng và có cùng vị trí hòa nhập trên lục lạp thuốc lá. Kết quả PCR và Southern blot đã xác định bắt đầu các vị trí gen chuyển trong lục lạp, chứng minh trình tự gen chuyển hòa nhập vào đúng vị trí mục tiêu trên lục lạp với cấu trúc ổn định. Ở phân tích Western blot, dịch chiết xuất protein từ các dòng cây chuyển gen T1, T2, T5, T6 kiểm tra đều có băng protein HIV-1 p24 được phát hiện bằng kháng thể đặc hiệu, giống với kết quả kiểm tra từ dịch chiết xuất protein của vi khuẩn. Kết quả tương tự với kết quả các dòng chuyển gen với vector PZF5 của tác giả Zhou và cs (2008) [13] với vector pZSJH1p24 của McCabe và cs (2008) [6].

Khi phân tích bằng ELISA 3 dòng chuyển gen T1, T2 và T5, hàm lượng protein p24 tái tổ

hợp biểu hiện tích lũy ở các lá 12 và 20 đánh số từ gốc lên ngọn được ghi nhận vào ngày thứ 55. Kết quả cho thấy hàm lượng protein p24 trên tổng protein hòa tan ở lá thứ 12 cây T1 là 1,7%; T2 là 6,2%; T5 là 5,6% và lá thứ 20 cây T1 là 6,3%; T2 là 5,3%, T5 là 3,1% Tham khảo sự biểu hiện protein p24 trong cây thuốc lá ở một số công trình khác cho thấy có sự khác biệt rất lớn ở chuyển gen nhân và chuyển gen lục lạp. Công trình chuyển gen *p24*, *P35S* vào nhân có mức biểu hiện protein p24 là 0,35% TSP (Zhang và cs, 2002) [12]. Trong chuyển gen lục lạp, công trình của Zhou và cs (2008) [13] biểu hiện *p24-nef*, điều khiển bởi trình tự *T7g10* ở mức 40% TSP; công trình của McCabe và cs (2008) [6], trên cây thuốc lá Maryland Mammoth biểu hiện *p24*, điều khiển bởi *Prrn* ở mức 2,5%TSP; biểu hiện *p24-cco*, điều khiển bởi *Prrn-T7g10*, ở mức 4,5% TSP. Tuy nhiên trong các trường hợp biểu hiện *p24* trong lục lạp được điều khiển bởi *T7g10* (Zhou và cs, 2008; McCabe và cs, 2008) có kiểu hình bất thường lá vàng, cây chậm phát triển. Các dòng chuyển gen trong công trình nghiên cứu của chúng tôi có mức biểu hiện khả quan, kiểu hình bình thường, tuy nhiên cần phải kiểm tra thêm trên số lượng mẫu lớn hơn và ở các thời điểm khác nhau để có thể xác định mức biểu hiện rõ ràng hơn.

Trong thí nghiệm tinh sạch protein p24 từ dịch chiết xuất của các dòng thuốc lá, phương pháp sắc ký lọc gel phân tử được sử dụng để thu nhận các protein trong giới hạn 1,5-3 kDa. Tuy nhiên hàm lượng protein p24 sau khi tinh sạch được kiểm tra bằng ELISA biểu thị rất

thấp, điều này có thể do các điều kiện khi tách protein toàn phần bằng aceton chưa thích hợp và thời gian lưu khi phân tích sắc ký lọc gel quá dài. Trong khi đó ở nghiên cứu của mình, McCabe và cs (2008) đã sử dụng tủa phân đoạn với amonium sulphate để thu protein p24 và dùng hệ thống sắc ký trao đổi ion dương, có thời gian lưu rất ngắn, để điều chế p24. Đây cũng là những thông số rất quan trọng có thể cải thiện hiệu suất thu hồi trong các nghiên cứu tiếp theo của chúng tôi.

KẾT LUẬN

Bằng phương pháp chọn lọc kéo dài và tái sinh 4 lần trên môi trường có bổ sung các kháng sinh spectinomycin và streptomycin ở nồng độ cao 500 mg/l, 4 dòng thuốc lá V2 chuyển gen *HIV-1 p24* và gen *aadA* vào lục lạp T1, T2, T5, T6 đã được chọn lọc, có sự phát triển hình thái bình thường và ổn định.

Bốn dòng chuyển gen trên đã được phân tích bằng kỹ thuật PCR và Southern blot cho thấy có mang gen *HIV-1 p24* và gen *aadA* theo đúng cấu trúc trên vector chuyển gen, tổ hợp gen chuyển hòa nhập vào lục lạp đúng vị trí đích và các dòng cây sau chọn lọc có tình trạng đồng nhất lạp thể chuyển gen.

Kết quả phân tích Western blot cho thấy gen *HIV-1 p24* biểu hiện ở 4 dòng T1, T2, T5, T6; và bằng phân tích ELISA ghi nhận sơ bộ được hàm lượng protein p24 thu được trên tổng protein tan của lá tương ứng với các dòng T1, T2, T5 sau 55 ngày trồng ở lá thứ 12 là 1,7%, 6,2%, 5,7% và lá 20 là 6,3%, 5,3%, 3,1%.

Dùng sắc ký lọc gel phân tử để tinh sạch hỗn hợp protein ly trích từ lá, lượng protein sau sắc

ký thu được đạt hiệu suất tinh sạch 31,94%, độ tinh sạch đạt 9,964 lần. Phân tích bằng ELISA cho thấy hàm lượng protein p24 trong hỗn hợp protein sau sắc ký là 0,92%.

Protein p24 biểu hiện trong lá có sự khác biệt ở các vị trí và thời điểm khác nhau. Do đó, để thu nhận được hàm lượng cao nhất, cần thực

hiện thêm các thí nghiệm khảo sát sự biểu hiện protein theo vị trí và thời gian nuôi cấy ở quy mô lớn hơn.

Cần xác định lại các điều kiện ly trích, kết tủa và tinh sạch để bảo đảm protein p24 không mất hoạt tính trong quá trình thu hồi.

HIV-1 P24 EXPRESSION IN TRANSPLASTOMIC TOBACCO PLANTS

Phan Tuong Loc, Nguyen Huu Ho, Nguyen Thi Thanh

Institute of Tropical Biology, VAST

ABSTRACT: Expression of HIV-1 p24 gene in chloroplasts was achieved in a tobacco variety V2 (Virginia TBE2). Through PCR and Southern blot analyses, it was demonstrated that the transgene integrated into the target site in the chloroplasts, between *trnFM* and *trnG*. Western blot results showed that HIV-1 p24 gene expressed in transplastomic tobacco plants. p24 protein accumulations were detected by ELISA in the range from 1.7% to 6.3% TSP and the high concentrations in the leaves near the top. p24 protein was purified by gel filtration chromatography demonstrated that the purification is 9.694 folds and the performance is 31.94%, however, protein p24 largely was inactive after purification.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R. Bock, Transgenic chloroplasts in basic research and plant biotechnology, *J. Mol. Biol.*, 312, 425–438 (2001).
- [2]. H. Daniell, Transformation and foreign gene expression in plants mediated by microprojectile bombardment, *Methods Mol. Biol.*, 62, 453–488 (1997).
- [3]. H. Daniell, A. Dhingra, O. N. Ruiz, Chloroplast genetic engineering to improve agronomic traits, *Methods Mol. Biol.*, 286, 111 – 137 (2004).
- [4]. P. T. Lộc, N. H. Hồ, N. T. Thanh, Bước đầu chuyển gen HIV-1 p24 vào lục lạp cây thuốc lá giống V2 bằng phương pháp bắn gen, *Tạp chí Phát triển khoa học và công nghệ* 14, 35-46 (2011).
- [5]. M. S. McCabe, J. B. Power, A. M. de Laat, M. R. Davey, Detection of single-copy genes in DNA from transgenic plants by nonradioactive Southern blot analysis, *Mol. Biotechnol.*, 7, 79–84 (1997).
- [6]. M. S. MaCable, M. Klaas, G. N. Rabade, M. Poage, C. A. J. Badillo, F. Zhou, D.

- Karcher, R. Bock, J. C. Gray, J. P. Dix, Plastid transformation of high-biomass tobacco variety Maryland Mammoth for production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) p24 antigen, *Plant Biotechnology Journal* 6, 914-929 (2008).
- [7]. P. Maliga, Plastid transformation in higher plants, *Annu. Rev.Plant Biol.*, 55, 289–313 (2004).
- [8]. N. D. Singh, Y. Ding, H. Daniell, *Methods in molecular biology, recombinant proteins from plants*, Humana Press, Chapter 10, 169-192 (2009).
- [9]. H. Thiellement, M. Zivy, C. Damerval, V. Méchin, *Plant Proteomics, Methods and Protocols*, Humana Press (2007).
- [10]. M. J. Walker, *The Protein Protocols Handbook, Second Edition*, Humana Press (2002).
- [11]. D. Walls, S. T. Loughran, *ProteinChromatography: Methods and Protocols*, Humana-Press (2011).
- [12]. G. G. Zhang, L. Rodrigues, B. Rovinski, K. A. White, Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants, *Molecular Biotechnology* 20, 131-136 (2002).
- [13]. F. Zhou, C. J. A. Badillo, D. Karcher, G. N. Rabadez, K. Piepenburg, M. I. A. Borchert, P. A. Maloney, A. T. Kavanagh, C. J. Gray, R. Bock, High level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes, *Plant Biotechnology Journal*, 6, 897-913 (2008).