

**TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN
TÁI TỔ HỢP NS1 CHUNG BỐN CHỦNG VI RÚT *DENGUE*
TRONG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI***

*Hoàng Xuân Cường^{1,3}, Đỗ Như Bình¹, Vũ Minh Thương²
Bùi Thùy Linh², Nguyễn Thị Thanh Thảo¹, Trương Công Định¹
Bùi Minh Trường¹, Bùi Thế Ngọc¹, Lâm Thảo Nguyên¹, Võ Thị Bích Thủy^{2*}*

Tóm tắt

Mục tiêu: Tách dòng, biểu hiện và tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp NS1 chung có các điểm epitope nhận biết được kháng thể kháng bốn chủng vi rút *Dengue* (DENV). **Phương pháp nghiên cứu:** Đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên NS1 chung bốn chủng được gắn chèn vào vector pET22b+ sau đó được biến nạp vào chủng tế bào *E.coli* BL21. Sản phẩm tái tổ hợp được kiểm tra bằng các phương pháp PCR, enzyme cắt giới hạn, giải trình tự và SDS-PAGE. **Kết quả:** Đoạn gen mã hóa kháng nguyên tái tổ hợp NS1 có kích thước 417 bp, mã hóa tạo chuỗi polypeptide dài 139 amino acid, và tương đồng 100% với trình tự chuỗi polypeptide của kháng nguyên NS1 chung cho bốn chủng DENV đã được công bố trên GenBank. Kết quả điện di trên SDS-PAGE cho thấy protein tái tổ hợp 6xHis-rNS1 có khối lượng phân tử khoảng 18 kDa. **Kết luận:** Biểu hiện thành công kháng nguyên tái tổ hợp NS1 chung bốn chủng DENV trong tế bào *E.coli*. Đây là kết quả nghiên cứu bước đầu định hướng tạo kháng thể đơn dòng chẩn đoán phát hiện bốn chủng DENV tại Việt Nam.

Từ khóa: Vi rút *Dengue*; *E.coli*; NS1; Kháng nguyên tái tổ hợp.

¹Học viện Quân y

²Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Sốt rét ký sinh trùng Trung ương, Bộ Y tế

*Tác giả liên hệ: Võ Thị Bích Thủy (thuytbvo.igr@gmail.com)

Ngày nhận bài: 07/6/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 28/7/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48i6.388>

CLONING AND EXPRESSION OF GENE ENCODING RECOMBINANT
NS1-DENV1-4 SEROTYPE ANTIGEN IN *ESCHERICHIA COLI*

Abstract

Objectives: To study the cloning, expression, and purification of the general NS1 antigen with epitope-detectable antibodies against four Dengue virus (*DENV*) serotypes. **Methods:** The gene coding for NS1 antigen generally four serotypes was inserted into pET22b+ vector then transformed into *E.coli* BL21. Recombinant products were examined by PCR, restriction enzyme, sequencing, and SDS-PAGE methods. **Results:** The gene encoding the recombinant NS1 antigen with a size of 417 bp, 139 amino acids, and 100% homology with the polypeptide sequence of the NS1 antigen was published on GenBank. SDS-PAGE electrophoresis results showed that the recombinant protein 6xHis-rNS1 has a molecular weight of approximately 18 kDa. **Conclusion:** Successful expressed the recombinant NS1 antigen in *E.coli*. It was the initial result of research aimed at creating monoclonal antibodies to detect four serotype *DENVs* in Vietnam.

Keywords: Dengue virus; *E.coli*; NS1; Recombinant antigen.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi rút Dengue là một vi rút RNA sợi dương được phân lập lần đầu tiên vào năm 1943 ở Peru bởi một nhóm các nhà khoa học do tiến sĩ Albert Sabin đứng đầu nghiên cứu [1]. Các nhà khoa học đã phân lập vi rút từ máu của bệnh nhân và sau đó xác định đây là một kiểu vi rút thuộc họ *Flaviviridae*, chi *Flavivirus* [2]. Chi này bao gồm vi rút West Nile, vi rút *Dengue*, vi rút *Zika*, vi rút Yellow fever,... Cho đến nay, người ta xác

định bốn tít vi rút sốt xuất huyết là vi rút DENV-1, DENV-2, DENV-3 và DENV-4 [3]. Các biến thể này của vi rút *Dengue* có tính kháng nguyên và di truyền tương đối khác nhau. Nếu nhiễm một loại DENV nào đó thường sẽ tạo miễn dịch với loại DENV đó, nhưng chỉ tạo miễn dịch một phần và tạm thời đối với những loại DENV khác. Tác nhiễm sau đó với một loại DENV khác làm tăng nguy cơ mắc bệnh nghiêm trọng hơn và có thể đe dọa đến tính mạng [4].

Bộ gen của DENV có chiều dài xấp xỉ 11 kilobase, với một khung đọc mở duy nhất gồm 3400 amino acids. Polyprotein này được phân cắt bởi các protease của vi rút và tế bào để thành ba protein cấu trúc (C, prM và E) và bảy protein phi cấu trúc (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B và NS5) [6]. Trong đó NS1 là vùng có khả năng sinh miễn dịch và có tính ứng dụng cao nhất để trở thành chỉ thị phân tử (biomarker) phát hiện và phòng chống sốt xuất huyết Dengue [4]. Trong giai đoạn đầu của quá trình lây nhiễm vi rút, protein NS1 giúp RNA của virus xâm nhập vào hệ thống miễn dịch của vật chủ, đồng thời nó cũng hỗ trợ hình thành phức hợp sao chép vi rút. NS1 được tiết ra từ các tế bào nhiễm bệnh và lưu thông trong máu của bệnh nhân [5]. Có thể phát hiện NS1 bằng các xét nghiệm chẩn đoán khác nhau như test nhanh, ELISA PCR.... Những kháng thể được sinh ra trong hệ thống miễn dịch bệnh nhân có vai trò chống lại NS1 và loại bỏ vi rút ra khỏi cơ thể nếu chẳng may người bệnh bị nhiễm lại lần tiếp theo. Vì thế, một nghiên cứu tạo ra kháng nguyên tái tổ hợp NS1 với các điểm epitope có thể nhận biết cùng lúc các kháng thể kháng các serotype của vi rút Dengue trong huyết thanh bệnh

nhân là cần thiết để xây dựng một biomarker phát hiện các chủng DENV ở Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (Thermo Fisher Scientific) được sử dụng làm chủng tạo dòng và biểu hiện protein đích dưới sự cảm ứng của IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside). Plasmid pET1.2 được tổng hợp nhân tạo bởi Genscript Biotech (Piscataway, New Jersey, Hoa Kỳ) có mang đoạn oligonucleotide NS1 mã hóa cho protein NS1 theo thiết kế với 2 vị trí cắt enzyme giới hạn *NdeI* và *XhoI*. Plasmid pET22b+ (Novagen) dùng để thiết kế vector biểu hiện NS1 dưới sự kiểm soát của promoter T7 và có mang gen kháng kháng sinh ampicillin để sàng lọc thể biến nạp. Các kit tách chiết và tinh sạch plasmid tái tổ hợp, môi T7 promotor, hóa chất tách chiết ADN, PCR và một số môi trường, vật liệu thường dùng trong phòng thí nghiệm được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Thiết kế plasmid mang gen NS1 và biến nạp vào E.coli BL21:*

Cắt đoạn gen *NS1* ra khỏi đoạn oligonucleotide tổng hợp nhân tạo và cắt mở vòng vector pET22b+ bằng 2 enzym *NdeI* và *XhoI*, sản phẩm cắt được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Sau đó gắn đoạn gen *NS1* vào vector pET22b+ đã được cắt mở vòng bằng enzym T4 ligase ở 22°C trong 3 giờ. Plasmid pET22b+_ *NS1* được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* BL21 bằng phương pháp sốc nhiệt. Huyền phù tế bào ngay sau đó được cấy trải trên đĩa thạch Luria Bertani (LB agar) (1% peptone; 0,5% cao nấm; 0,5% NaCl; 2% agar) có bổ sung 100 µg/mL ampicillin.

* *Sàng lọc các khuẩn lạc mang gen NS1:*

Sau một đêm nuôi cấy, chọn các khuẩn lạc đã mọc trên đĩa LB agar tiến hành nuôi lỏng ở 37°C trong 18 giờ và sau đó tách ADN plasmid. Các ADN plasmid này sẽ được kiểm tra bằng phản ứng PCR với mỗi đặc hiệu *NS1_Cl_F* (mũi xuôi): 5'–CATATGAAGTATTCATGGAAAACA TGGGG–3' và *NS1_Cl_R* (mũi ngược): 5'–CTCGAGGTAACCCGGAGG–3'. Sản phẩm PCR đúng kích thước (khoảng 417bp) sẽ được đem đi giải

trình tự Sanger tại Công ty 1st BASE (Singapore) bằng cặp môi thương mại T7 promoter.

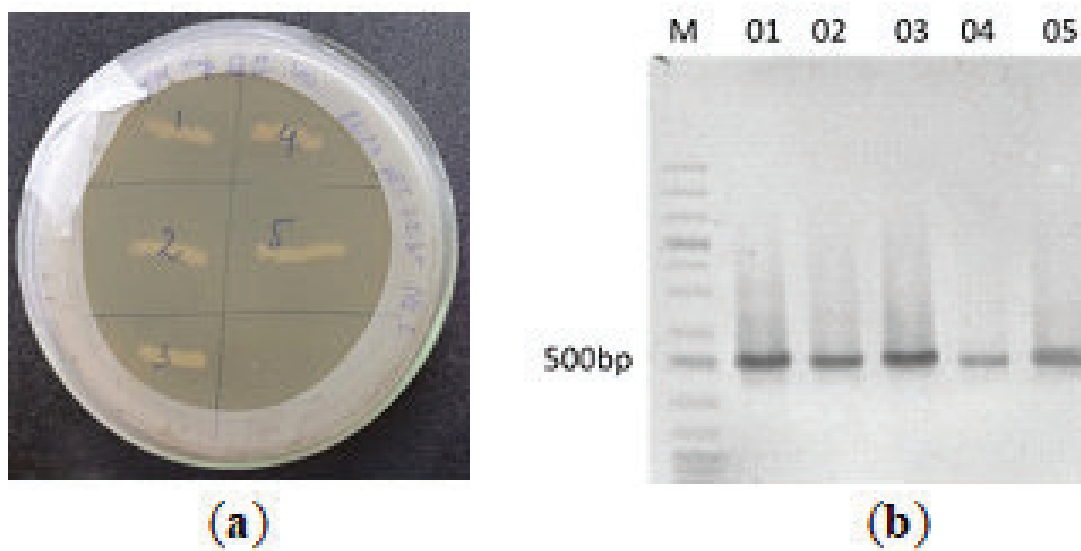
* *Cảm ứng biểu hiện và tinh sạch NS1:*

Chúng biểu hiện protein *NS1* được nuôi cấy trong 400mL môi trường LB lỏng (chứa 100 µg/mL ampicillin) ở nhiệt độ 30°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút, khi mật độ nuôi cấy vi khuẩn OD₆₀₀ nm đạt 0,4 - 0,8, chất IPTG được bổ sung vào ống dịch vi khuẩn sao cho nồng độ cuối đạt 0,1mM. Sau 16 giờ cảm ứng biểu hiện, thu sinh khối tế bào bằng ly tâm với tốc độ 3.000rpm trong 5 phút ở 4°C. Hòa cặn vi khuẩn sau biểu hiện với dung dịch đệm PBS (pH 7,4; 137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na₂HPO₄; 1,8mM KH₂PO₄). Phá màng tế bào bằng sóng siêu âm được giữ trong đá lạnh 2 phút. Dịch phá tế bào được ly tâm với tốc độ 13.000rpm trong 5 phút ở 4°C, sau đó được cho lên cột tinh sạch HisPur™ Ni-NTA Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Rửa các protein tạp bằng Wash Buffer (pH 7,4; 20mM Na₃PO₄; 300mM NaCl; 25mM imidazole), thu protein đích *NS1* bằng Elution Buffer (pH 7,4; 20mM Na₃PO₄; 300mM NaCl; 250mM imidazole). Đánh giá mức độ biểu hiện và quy trình tinh sạch protein tái tổ hợp *NS1* bằng kỹ thuật điện di biến tính SDS-PAGE.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Sàng lọc các khuẩn lạc mang gen NS1

Sản phẩm pET22b+_ NS1 được biến nạp vào tế bào *E.coli* BL21, sau nuôi cấy qua đêm chỉ những thể biến nạp nào nhận plasmid pET22b+_ NS1 mới có khả năng kháng ampicilin và hình thành khuẩn lạc trên môi trường có chứa kháng sinh này (Hình 1a). Các thể biến nạp này sẽ được kiểm tra bằng phương pháp PCR khuẩn lạc để sàng lọc những dòng mang plasmid mục tiêu. Trong quá trình sàng lọc bằng phương pháp PCR với cặp mồi T7 promoter và T7 terminator, chúng tôi thu được năm dòng tế bào *E.coli* xuất hiện một băng vạch có kích thước giữa 400bp và 500bp, phù hợp với kích thước gen NS1 đã thiết kế là 471bp (Hình 1b).

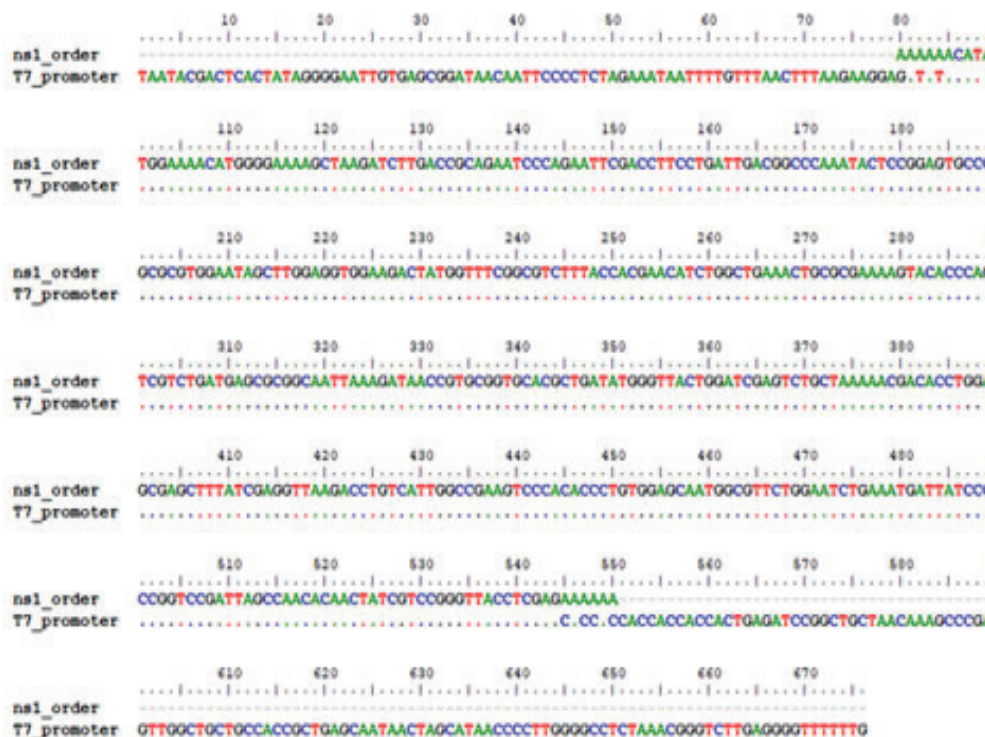


Hình 1. (a) Các dòng NS1 được sàng lọc sau biến nạp.

(b) Kiểm tra ADN plasmid với mồi đặc hiệu. **M:** Thang ADN 1kb plus.

Tiếp tục giải trình tự Sanger các mẫu ADN plasmid cho thấy có sự tương đồng 100% với trình tự gen NS1 theo thiết kế ban đầu (Hình 2). Gen NS1 được gắn

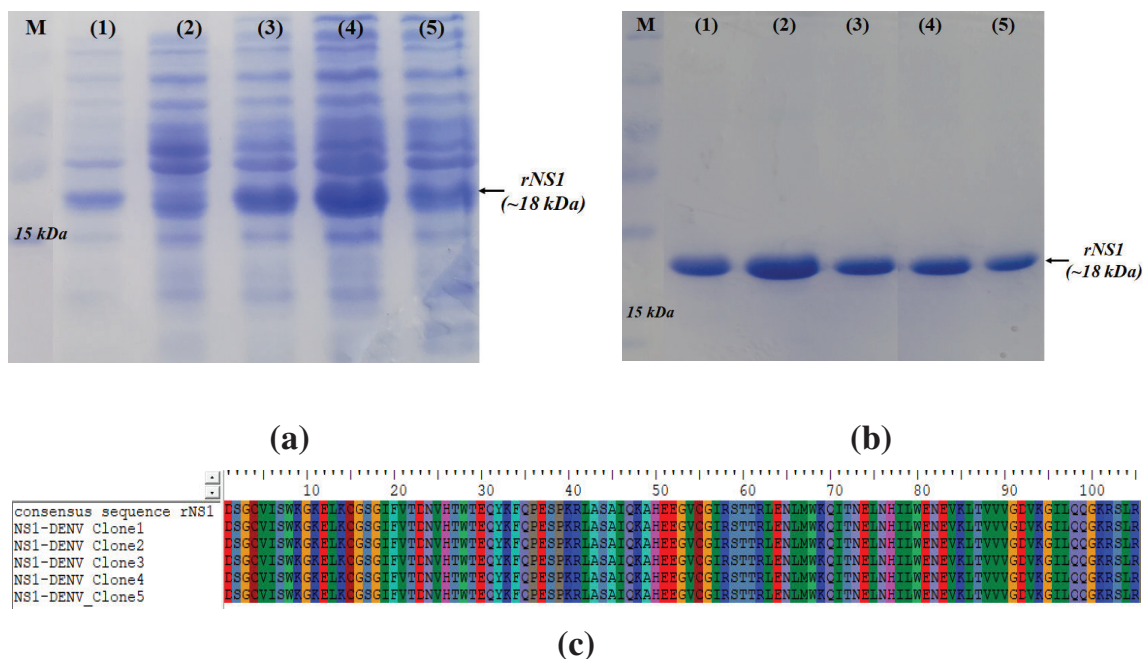
chèn vào đúng vị trí của enzym *NdeI* và tương đồng khung dịch mã. Như vậy, *vector* pET22b+ mang gen NS1 tái tổ hợp đã được biến nạp thành công vào tế bào *E.coli* BL21.



Hình 2. Giải trình tự plasmid tái tổ hợp pET22b+_ NS1 với mỗi T7 promoter và T7 terminator.

2. Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp NS1

Khuẩn lạc cho kết quả đúng kích thước sản phẩm với phản ứng PCR được chọn để biểu hiện protein NS1. Kết quả phân tích SDS-PAGE (Hình 3a) cho thấy, các mẫu protein tổng số của chủng *E.coli* BL21 mang plasmid pET22b+_NS1 được cảm ứng biểu hiện trong điều kiện tối ưu về nồng độ IPTG (0,1 mM), thời gian (16 giờ), nhiệt độ (37°C) có xuất hiện một vạch protein đậm nằm trên vạch 15 kDa của thang chuẩn, tương ứng với kích thước theo tính toán của kháng nguyên tái tổ hợp NS1 (khoảng 18 kDa).



Hình 3. (a) Protein tổng số *E.coli* BL21 mang gen NS1.

(b) Protein NS1 đã được tinh sạch. **(c)** Một phần kết quả giải trình tự acid amin của năm protein NS1 tái tổ hợp so sánh với trình tự acid amin của protein chung của bốn serotype Dengue M: Thang protein.

Điện di SDS-PAGE kiểm tra sản phẩm sau tinh sạch cho thấy có duy nhất một băng protein có kích thước khoảng 18 kDa (Hình 3b), đây là sản phẩm có gắn đuôi histidine 6X thu được sau khi đi qua cột tinh sạch, giải trình tự cũng cho kết quả trình tự acid amin của năm khuôn lạp là tương đồng với trình tự acid amin của protein NS1 chung cho cả 4 serotype (Hình 3c), như vậy xác định chính xác là protein NS1 tái tổ hợp.

KẾT LUẬN

Đã tạo dòng và biểu hiện thành công năm dòng tế bào *E.coli* mang vector tái tổ hợp pET22b+_NS1. Các dòng tế bào này biểu hiện protein tái tổ hợp NS1 chung cho bốn chủng vi rút *Dengue*. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở cho

những nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo ra kháng thể đơn dòng phát hiện được cùng lúc bốn chủng *DENV* tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Sở Khoa học Công nghệ Hà Nội trong đề tài mã số 01C-08/01-2020-3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Snow, G. E., Haaland, B., Ooi, E. E., & Gubler, D. J. Review article: Research on dengue during World War II revisited. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014; 91(6):1203-1217. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0132>.
2. Muller, D. A., & Young, P. R. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Research*. 2013; 98(2): 192-208. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.03.008>.
3. Tuiskunen Back, A., & Ake, L. *Dengue viruses-an overview*. 2013. <https://doi.org/10.3402/iee.v3i0.19839>.
4. Reyes-Sandoval, A., & Ludert, J. E. The Dual Role of the Antibody Response Against the Flavivirus Non-structural Protein 1 (NS1) in Protection and Immuno-Pathogenesis. *Frontiers in Immunology*. www.Frontiersin.Org. 2019; 1:1651. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01651>.
5. Fisher, R., Lustig, Y., Sklan, E. H., & Schwartz, E. The Role of NS1 Protein in the Diagnosis of Flavivirus Infections. 2023; 15(2). In *Viruses*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/v15020572>.
6. Rastogi, M., Sharma, N., & Singh, S. K. *Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein*. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0590-7>