

BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH HAI PROTEIN VỎ CP VÀ CPm TÁI TỔ HỢP CỦA VIRUS CTV TRONG VI KHUẨN *E. COLI*

Đặng Thị Hương, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Citrus Tristeza virus (CTV) là nguyên nhân gây bệnh tàn lụi (Tristeza) ở các loài cây ăn quả có múi. Protein vỏ của virus (CP và CPm) có chức năng bao bọc nucleic acid tránh sự phân huỷ của enzyme nuclease, giữ cho hình thái và kích thước virus ổn định, đồng thời tham gia vào sự hấp thụ của virus lên vị trí đặc hiệu trên tế bào mẫn cảm. Protein vỏ mang tính kháng nguyên đặc hiệu nên thường được chọn làm nguyên liệu trong việc tạo cây chuyển gen có khả năng kháng được virus gây bệnh ở thực vật và để sản xuất kháng thể từ để xác định chính xác virus gây bệnh ở cây trồng cũng như kiểm tra mức độ nhiễm bệnh của cây trồng. Kiểm soát giống sạch bệnh là một trong những biện pháp quan trọng đối với việc sản xuất giống cây ăn quả có múi. Từ nguồn nguyên liệu ban đầu là gen mã hóa CTV-CP và CTV-CPm phân lập ở Việt Nam, chúng tôi đã thiết kế vào vector biểu hiện pET21a(+) và biến nạp vào chủng *E.coli* Rosetta-gamiTM. Dưới điều kiện cảm ứng 1 mM IPTG ở 22°C trong 16 giờ CTV-CP và CTV-CPm đã được biểu hiện có kích thước tương ứng khoảng 25 kDa và 27 kDa. Trên cơ sở xác định CTV-CP và CTV-CPm trong phần dịch tan của tế bào, chúng tôi đã tinh sạch được kháng nguyên này với một lượng lớn, đủ tiêu chuẩn gây miễn dịch tạo kháng thể. Đây là cơ sở cho công tác phục vụ phân tích nhanh tác nhân gây bệnh cũng như đánh giá mức độ sạch bệnh của cây trồng.

Từ khóa: Vector biểu hiện, Virus vàng lụi (CTV), protein vỏ (CP), tinh sạch protein

MỞ ĐẦU

Citrus Tristeza virus (CTV) là nguyên nhân gây bệnh tàn lụi (Tristeza) ở các loài cây ăn quả có múi, làm thiệt hại nghiêm trọng cho ngành nông nghiệp nhiều quốc gia trên thế giới (Vives *et al.*, 1999; Ayllón *et al.*, 1999). Biểu hiện của cây bị bệnh là: phiến lá cong hình thìa, ở mặt gỗ nơi tiếp giáp gốc ghép và thân ghép có các vết lõm hình thoi nhỏ li ti. Khi cây bị bệnh cho ra rất nhiều hoa và quả nhưng chỉ vài năm cây tàn lụi và chết (Trần Thế Tục, 1997). Dựa vào triệu chứng của bệnh, người ta chia CTV thành 5 chủng chính: seedling yellows virus, grapefruit stem pitting virus, grapefruit stunt bush virus, lime die-back virus, Ellendale mandarin decline virus (Price, 1970).

CTV thuộc chi *Closterovirus*, họ *Closteroviridae* (Saponari *et al.*, 2008). Virion của CTV có dạng sợi xoắn kích thước khoảng 2000 × 12 nm. Genome của CTV là sợi đơn dương RNA có kích thước khoảng 19,3 kb bao gồm 12 khung đọc mở (ORF) và 2 vùng không mã hóa (UTR) đầu 5' và đầu 3', mã hóa cho ít nhất 19 protein bao gồm 2 enzyme protease tương tự papain, các protein liên quan tới sự tái bản (RNA polymerase, helicase, methyltransferase), protein giống với heat shock

protein HSP70, protein p23 tương tác với RNA, protein p20 được tích lũy trong thể vùi và mã hóa cho một số protein chưa rõ chức năng như p61, p13, p18 (Saponari *et al.*, 2008; Rubio *et al.*, 2001; Satyanarayana *et al.*, 1999). Vỏ protein bao gồm 2 protein CP và CPm có kích thước phân tử tương ứng khoảng 25 kDa (chiếm 95%) và 27 kDa (chiếm 5%) (Yang *et al.*, 1997). Protein CP cấu tạo nên thành phần vỏ chủ yếu (major coat protein) của virus còn protein CPm cấu tạo nên thành phần vỏ thứ yếu (minor coat protein) tạo thành cấu trúc kiểu "rắn đuôi chuông" ở đầu 5' của virion. Cấu trúc virion bất thường này lần đầu tiên được phát hiện trong BYV (Gago-Zachert *et al.*, 1999).

Hiện nay, ở nước ta bệnh Tristeza được coi là một trong các bệnh nguy hiểm ảnh hưởng tới năng suất và phẩm chất cây ăn quả có múi. Kiểm soát giống sạch bệnh là một trong những biện pháp quan trọng đối với sản xuất giống cây ăn quả có múi. Việc phát hiện bệnh sớm có ý nghĩa to lớn trong công tác phòng trừ, kiểm soát được nguồn gây bệnh và giảm thiểu thất thoát trong thu hoạch. Với mong muốn giảm chi phí cho các phát hiện virus *Citrus Tristeza* trên cây ăn quả có múi, dần thay thế các bộ Kit nhập từ nước ngoài bằng chính những bộ Kit được sản xuất trong nước. Trong bài báo trước, chúng tôi công

bổ đã phân lập gen mã hóa cho protein vỏ (CPm và CP) của hai dòng virus gây bệnh Tristeza từ mẫu lá quýt Cần Thơ và cam sành Vĩnh Long (Ngô Ngọc Lan *et al.*, 2008). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả biểu hiện và làm sạch protein CP và CPm của virus CTV phân lập từ cam sành Vĩnh Long. Đây là nguồn vật liệu để sản xuất kháng thể, làm cơ sở cho chế tạo bộ kit phát hiện bệnh Tristeza trên cây ăn quả có múi Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Plasmid pBT mang gen mã hoá cho protein vỏ CP và CPm của Tristeza (CTV) gây bệnh ở cây cam sành Vĩnh Long do Phòng CNTBT - Viện CNSH cung cấp.

Thiết kế vector biểu hiện

Gen mã hóa cho CTV-CP và CTV-CPm được nhân lên bằng cặp mồi đặc hiệu PVY - CPF-*BamHI*/CPR-*XhoI* và CPmF-*BamHI*/CPmR-*XhoI*. Chu trình thực hiện bao gồm: biến tính đầu tiên ở 94°C/5 phút; thực hiện trong 25 chu kỳ (biến tính 94°C/30 giây, bắt cặp mồi 52°C/30 giây, kéo dài 72°C/1 phút 30 giây); kéo dài hoàn toàn ở 72°C/10 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C. Sản phẩm PCR được tiến hành tinh sạch bằng Kit AccuPrep® Gel Purification (Bioneer). Sau đó được ghép nối vào vector biểu hiện pET21a(+) ở 2 vị trí *BamHI* và *XhoI*. Sản phẩm lai được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α bằng phương pháp biến nạp của Cohen (1972). Các dòng vector tái tổ hợp được chọn lọc bằng colony-PCR với cặp mồi PVY - CPF-*BamHI*/CPR-*XhoI* và CPmF-*BamHI*/CPmR-*XhoI*, cắt plasmid bằng enzyme giới hạn *BamHI* và *XhoI* và xác định trình tự bằng máy phân tích trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lý của Sanger với bộ kit BigDye Terminator v. 3.2 Cycle Sequencing.

Biểu hiện và tinh sạch PVY-CP

Gen CTV-CP và CTV-CPm được biểu hiện trong tế bào *E. coli* Rosetta-gami™ (Novagene) theo qui trình sau: cho 1 ml dịch khuẩn đã được nuôi qua đêm vào 50 ml môi trường LB lỏng có chứa kháng sinh ampicillin 100 mg/l, kanamycin 15 mg/l, chloramphenicol 34 mg/l ở 37°C trên máy lắc đến lúc OD_{600 nm} đạt 0,5 - 0,6. Tiến hành cảm ứng 1 mM

IPTG ở nhiệt độ 37°C. Sau các khoảng thời gian là 0 h và 3 h, ly tâm thu lấy sinh khối. Phá vỡ tế bào vi khuẩn bằng siêu âm ở cường độ 60 trong đệm PBS 1X. Ly tâm thu lấy dịch tan của tế bào, cặn tiếp tục được hòa tan trong đệm PBS 1X có chứa Urea 6 M. Các sản phẩm thu được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamid 12,6%.

Protein tái tổ hợp được tinh sạch theo quy trình của Ni-NTA spin kit (Qiagen), sau đó được kiểm tra trên gel polyacrylamid 12,6% và loại bỏ urea bằng phương pháp thẩm tích. Sản phẩm được bổ sung glycerol và bảo quản ở -20°C để phục vụ cho bước gây miễn dịch thử nghiệm trên động vật làm cơ sở cho việc nghiên cứu sản xuất kháng thể sau này.

KẾT QUẢ

Thiết kế vector biểu hiện protein CP và CPm

Trên cơ sở trình tự gen CP và CPm đã được công bố (Ngô Hoàng Lan *et al.*, 2008), các cặp mồi đặc hiệu CPF-*BamHI*/CPR-*XhoI* và CPmF-*BamHI*/CPmR-*XhoI* đã được thiết kế để biểu hiện protein CP và CPm (Bảng 1). Sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu được tinh sạch và điện di kiểm tra trên gel agarose. Kết quả cho thấy, gen CP và CPm thu được có kích thước tương ứng 650 bp và 720 bp, kích thước này phù hợp với tính toán lý thuyết (không dẫn hình).

Sản phẩm đã tinh sạch được cắt đồng thời 2 enzyme giới hạn *BamHI* và *XhoI*, sau đó gắn vào vector pET21 a(+) đã mở vòng tại vị trí 2 enzyme tương ứng. Các vector tái tổ hợp mang gen đích: CP-pET21 a(+) và CPm-pET21 a(+) được chọn lọc bằng colony-PCR với các cặp mồi đặc hiệu và cắt với 2 enzyme hạn chế *BamHI*/*XhoI*. Kết quả điện di trên gel agarose thu được sản phẩm PCR chứa các băng có kích thước khoảng 650 bp và 720 bp tương ứng với kích thước của gen CP và CPm (không dẫn hình). Kích thước này tương ứng với các băng thu được ở sản phẩm cắt bởi các enzyme hạn chế. Chúng tôi sản phẩm PCR đã ghép nối thành công vào vector pET21(+).

Để khẳng định thêm 2 đoạn gen đã nhân là gen mã hóa cho CP và CPm, đồng thời để biết được gen đích đã ghép vào đúng vị trí mong muốn, plasmid chứa gen CP và CPm được làm sạch và đọc trình tự trên máy xác định trình tự tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer. Kết quả cho thấy đoạn gen CPm nhân được có kích thước 723

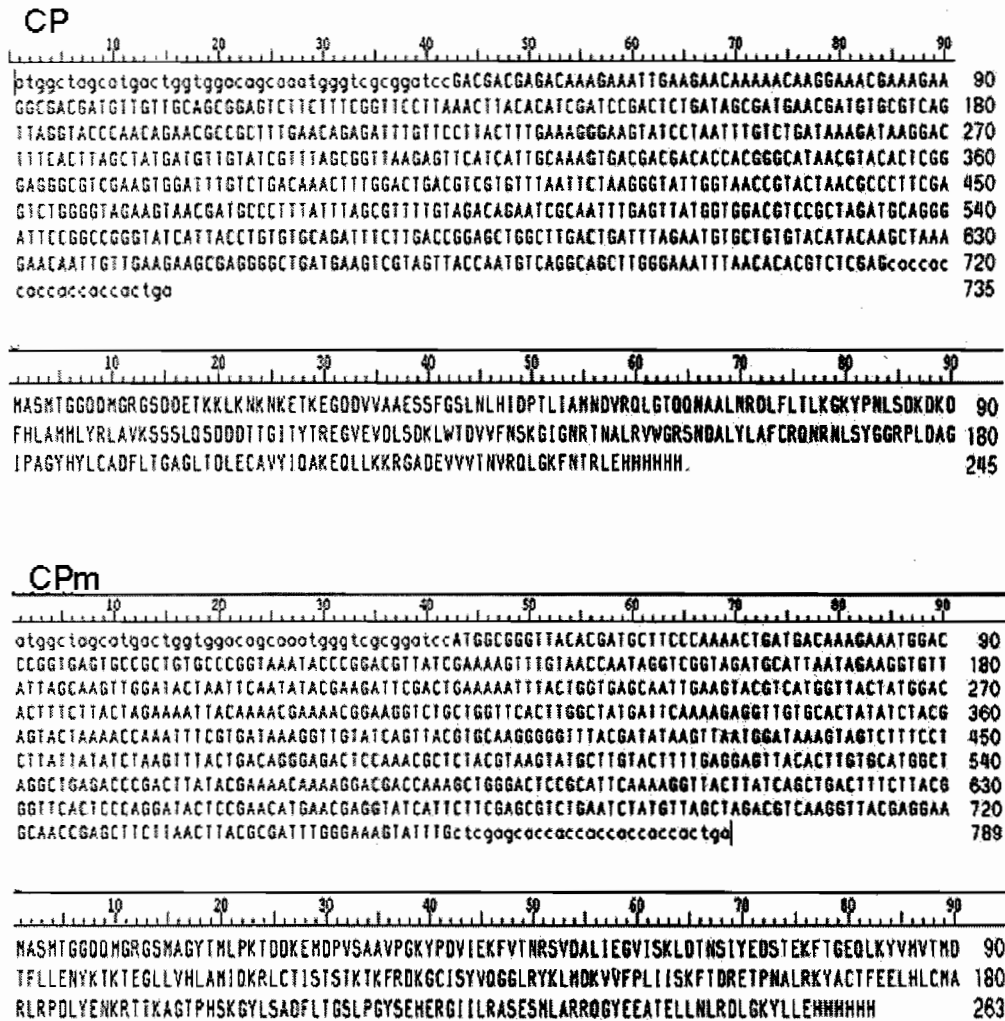
nucleotide, đoạn gen CP có kích thước 672 nucleotide. Trình tự nối ghép gen đúng vị trí đã thiết kế trong vector pET21(+) (Hình 1).

So sánh trình tự thu được với các dòng khác trên thế giới cho thấy, trình tự nucleotide của gen CP giống tới 97 - 98% so với các dòng khác đã công bố

trên ngân hàng gen. Trình tự nucleotide của gen CPm cũng giống tới 98% so với các dòng khác trên thế giới. Tuy nhiên, khi so sánh trình tự amino acid cho thấy dòng CTV tách từ mẫu lá cam sành Vĩnh Long lại ít có sự sai khác trong trình tự amino acid với các dòng khác trên thế giới.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi tách dòng gen CP và CPm.

Mồi	Trình tự mồi
CPF- <i>Bam</i> HI	5'- AGGATCCGACGACGAGACAAAGAAATTG -3'
CPR- <i>Xho</i> I	5'- AACTCGAGAACGTGTGTTAAATTTCCC -3'
CPmF- <i>Bam</i> HI	5'- AAGGATCCATGGCGGGTTACACGATGC -3'
CPmR- <i>Xho</i> I	5'- TTCTCGAGCAAATACTTTCCCAAATCGC -3'



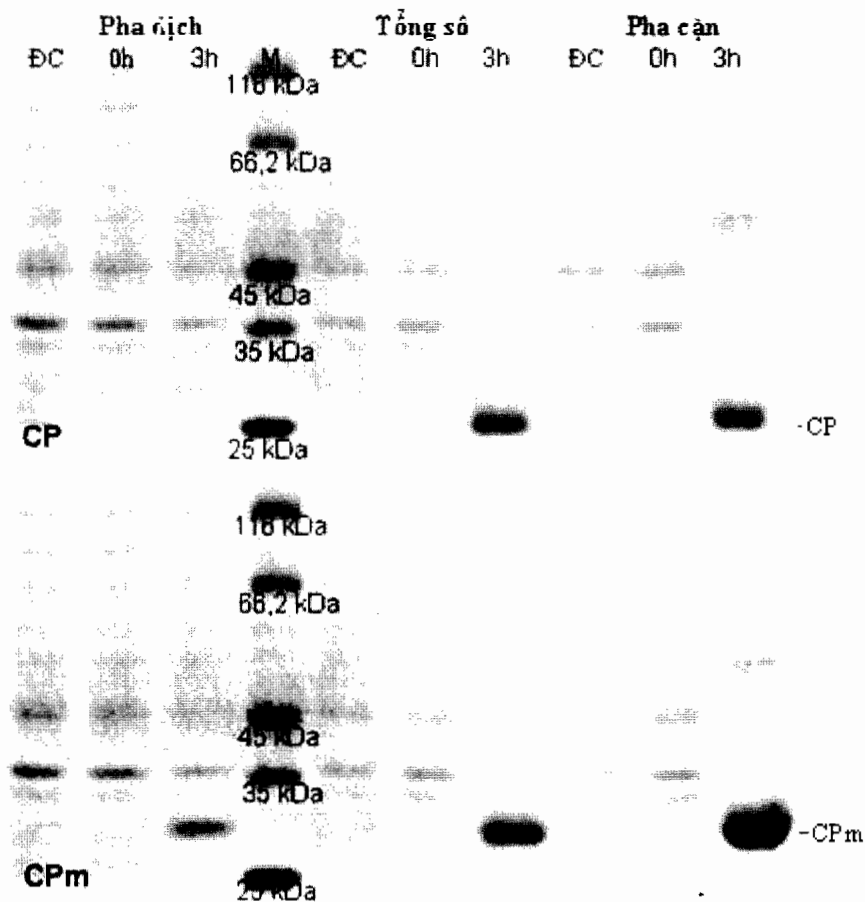
Hình 3. Trình tự nucleotide và amino acid của CP và CPm.

Biểu hiện CP và CPm trong *E. coli* Rossetta gami™

Chủng vi khuẩn biểu hiện *E. coli* Rossetta gami™ là chủng đã được cải biến có khả năng dịch mã thêm 6 bộ ba mã hóa hiếm không có ở vi khuẩn nhưng thường có ở virus. Vì thế chủng vi khuẩn này đã được lựa chọn để biểu hiện protein CP và CPm của CTV. Chủng vi khuẩn được biến nạp các vector tái tổ hợp chứa gen CP và CPm, sau đó được kiểm tra bằng colony-PCR.

Kết quả (không dẫn hình) cho thấy, sản phẩm colony-PCR chứa các băng có kích thước khoảng 650bp và 720bp tương ứng với kích thước của gen CP và CPm. Dòng tế bào vi khuẩn này sẽ được sử dụng cảm ứng biểu hiện protein.

Hai dòng *E. coli* Rossetta gami™ mang vector tái tổ hợp CP-pET21 a(+) và CPm-pET21 a(+) và dòng *E. coli* Rossetta gami™ đối chứng chỉ chứa vector pET21 a(+), được nuôi lắc trong môi trường LB có bổ sung kháng sinh và glucose. Sau khi OD_{600nm} đạt từ 0,5-0,6 thì tiến hành cảm ứng với IPTG. Sinh khối tế bào được thu sau 3 giờ cảm ứng và được tách protein tổng số. Kết quả điện di trên gel polyacrylamide cho thấy cả hai gen CP và CPm biểu hiện tốt, protein thu được có kích thước tương ứng khoảng 25 và 27 kDa (Hình 2). Trong khi protein tái tổ hợp CP chủ yếu nằm trong pha cặn thì protein CPm xuất hiện trong cả pha hòa tan nhưng ít hơn so với pha cặn. Kết quả này cho thấy protein tái tổ hợp chủ yếu dạng không hòa tan trong PBS.



Hình 2. Kết quả điện di protein tổng số của dòng *E. coli* chứa gen CP và CPm. M: Marker protein; ĐC: Đối chứng pET21 a(+); 0 h, 3 h: thời gian cảm ứng IPTG.

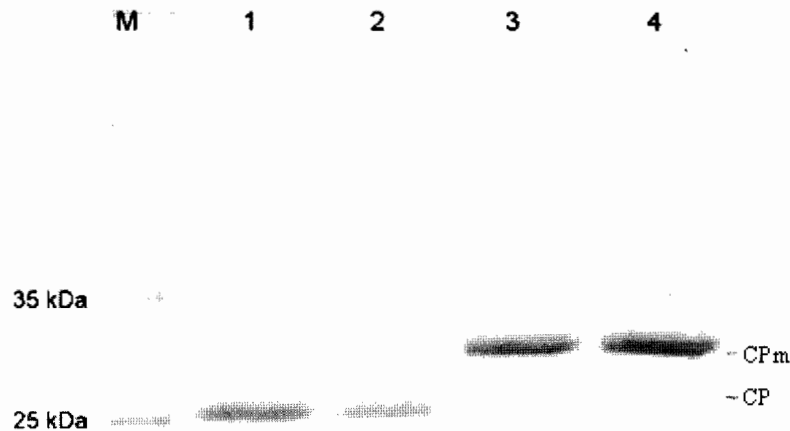
Tinh sạch protein

Dựa vào đặc điểm thuận lợi của kháng nguyên tái tổ hợp CTV-CP và CTV-CPm là có mang thêm 6 amino acid Histidine (6X His) ở đầu -COOH. Protein CTV-CP và CTV-CPm được tinh sạch bằng cột ái lực His-tag của Ni-NTA spin kit (Qiagen). Các bước tinh sạch protein được thực hiện dựa trên tính ái lực của ion Nikel gắn trên hạt sepharose tạo liên kết tĩnh điện với đuôi Histidine.

Để nâng cao độ tinh sạch của sản phẩm chúng tôi đã thay đổi một số điều kiện phù hợp với qui trình: giảm lượng protein tổng số khi gắn kết với

niken, tăng nồng độ imidazol trong dịch rửa lên 40 mM và tăng số lần rửa protein bám không đặc hiệu ở trong cột niken. Sản phẩm tinh sạch được thu bằng các phân đoạn và được điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 12,6% (Hình 3). Kết quả cho thấy sản phẩm protein CTV-CP và CTV-CPm đã được tinh sạch có một băng duy nhất với kích thước của CTV-CP và CTV-CPm, chứng tỏ protein đã tinh sạch có độ tinh sạch cao.

Protein CTV-CP và CTV-CPm sau khi tinh sạch sẽ được gây miễn dịch, sản xuất kháng thể tái tổ hợp, đây sẽ là vật liệu xây dựng bộ Kit xác định kiểm soát bệnh CTV ở mức độ miễn dịch.



Hình 3. Điện di protein CTV-CP và CTV-CPm tinh sạch trên polyacrylamide. M: thang protein chuẩn; 1-2: sản phẩm tinh sạch protein CP; 3-4: sản phẩm tinh sạch protein CPm.

KẾT LUẬN

Gen mã hoá protein vỏ của virus gây bệnh tàn lụi Tristeza (CTV-CP và CTV-CPm) đã được nhân bằng PCR với cặp môi đặc hiệu PVY-BamHI-F1/PVY-HindIII-R1 có kích thước 801bp bằng với kích thước tính toán theo lý thuyết. Sản phẩm này đã được thiết kế thành công vào vector biểu hiện pET21a(+).

CTV-CP và CTV-CPm đã được biểu hiện trong tế bào *E.coli* Rosetta-gamiTM với điều kiện tối ưu là 1mM IPTG ở 37°C trong 3 giờ. CTV-CP và CTV-CPm đã được biểu hiện chủ yếu trong pha cận của tế bào có kích thước tương ứng là 25 kDa và 27 kDa. Dựa vào tính tan của protein và điểm thuận lợi của kháng nguyên vỏ tái tổ hợp của CTV chúng tôi đã tinh

sạch được CTV-CP và CTV-CPm, đạt tiêu chuẩn để phục vụ cho bước sản xuất kháng thể tiếp theo.

Lời cảm ơn: Công trình được tài trợ bởi đề tài cấp nhà nước với mã số KC.04.03/06-10: "Nghiên cứu tạo giống cây ăn quả kháng bệnh virus phổ rộng bằng kỹ thuật chuyển gen đa đoạn". Các thí nghiệm được tiến hành có sự dụng trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ayllón MA., López C, Navas-Castillo J, Mawassi M, Dawson WO, Guerri J, Flores R, Moreno P (1999) New defective RNAs from *Citrus Tristeza Virus*: evidence for a

replicase-driven template switching mechanism in their generation. *J General Virol* 80(3): 817-838.

Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria- genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Nat Acad Sci USA* 69: 2110-2114.

Gago-Zachert S, Costa N, Semorile L, Grau O (1999) Sequence variability in p27 gene of Citrus Tristeza Virus (CTV) revealed by SSCP analysis. *Elec J Biotech* 2, DOI: 10.2225/vol2-issue1-fulltext-3.

Ngô Ngọc Lan, Đặng Thị Hương, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2008) Tách dòng và xác định trình tự các gen mã hóa protein vỏ của hai dòng Citrus Tristeza virus trên cây cam sành trồng tại Vĩnh Long và trên cây quýt trồng tại Cần Thơ. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(4A): 671-678.

Price CW (1970) Description of plant viruses. <http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=033#st rains>

Rubio L, Ayllón MA, Kong P, Fernández A, Polek M, Guerri J, Moreno P, Falk BW (2001) Genetic Variation of Citrus Tristeza Virus Isolates from California and Spain: Evidence for Mixed Infections and Recombination. *J Virol* 75: 8054-8062.

Trần Thế Tục (1997) *Sổ tay người làm vườn*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.

Saponari M, Manjunath K, Yokomi RK (2008) Quantitative Detection of Citrus tristeza virus (CTV) in Citrus and Aphids by Real-time Reverse Transcription-PCR (TaqMan®). *J Virol Meth* 147: 43-53.

Satyanarayana T, Gowda S, Boyko PV, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Navas-Castillo J, Karasev VA, Dolja V, Hilf EM, Lewandowski JD, Moreno P, Bar-Joseph M, Garnsey MS, Dawson OW (1999) An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *PNAS* 96 (13): 7433-7438.

Vives MC, Rubio L, Lopez C, Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Dawson WO, Guerri J, Flores R, Moreno P (1999) The complete genome sequence of the major component of a mild Citrus Tristeza Virus isolate. *J General Virol* 80: 811-816.

Yang G, Mawassi M, Gofman R, Gafny R, Bar-Joseph M (1997) Involvement of a subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective citrus tristeza virus molecules. *J Virol* 71: 9800-9802.

OVEREXPRESSION AND PURIFICATION OF CP AND CPm PROTEINS OF CITRUS TRISTEZA VIRUS IN *E. COLI*

Dang Thi Huong, Le Van Son, Le Tran Binh, Chu Hoang Ha*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Tristeza, caused by the citrus tristeza virus (CTV), is one of the most important factors limiting citrus production worldwide. The capsid protein (CTV-CP và CTV-CPm) of CTV is required for various steps during plant infection, such as virion assembly, cell-to-cell movement, and long-distance transport. In this paper, we present our results on overexpression and purification of CTV-CP và CTV-CPm recombinant in *E.coli*. CTV-CP và CTV-CPm encoding gene was inserted into pET21a(+) and recombinant expressed in Rosetta-gami™ strain under induction of IPTG. The highest level for expression of CTV-CP và CTV-CPm in recombinant *E. coli* has been obtained after induction by 1mM of IPTG at 37°C for 3 h. All most of CTV-CP và CTV-CPm was detected in cytoplasm of cells with the molecular weight of 25 and 27 kDa, respectively. Finally, this protein has been successfully purified using affinity chromatography with Ni-NTA column.

Keywords: Capsid protein (CP), Citrus Tristeza virus (CTV), Expression vector, protein purification

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562368; Fax: 84-4-38363144; E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn