



BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN GRA7 CỦA *TOXOPLASMA GONDII* TRONG HỆ THỐNG PHI TẾ BÀO

Nguyễn Thị Diệu Thúy¹, Se-Eun Choe², Seung-Won Kang² và Đỗ Võ Anh Khoa³

¹ Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

² Viện Nghiên cứu Thú y Quốc gia và kiểm dịch động vật, Anyang, Gyeonggi-do, Hàn Quốc

³ Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 04/10/2012

Ngày chấp nhận: 22/03/2013

Title:

Cell-free protein expression-
the synthesized GRA7 antigen
of *Toxoplasma gondii*

Từ khóa:

Gen GRA7, hệ thống biểu
hiện phi tế bào, *T. gondii*

Keywords:

GRA7 gene, cell-free protein
expression system, *T. gondii*

ABSTRACT

GRA7, belonging to family of dense granule antigenic protein of *Toxoplasma gondii*, was successfully expression as recombinant protein in *E. coli*. *S. cerevisiae* or *Baculovirus* systems. In this study, the GRA7 antigen of *T. gondii* was express in cell-free system. The GRA7 gene of 711bp in length was chemically synthesized based on cDNA sequence of *T. gondii* GRA7 gene. The specific primers containing *Bam*HI and *Xho*I at the 5'-end have been used to amplify the GRA7 gene from vector of pT7CEF1-CHis with positive control of GFP. The size and sequence of GRA7 gene were confirmed by double restriction enzyme digestion and sequencing, respectively. The expression procedure was carried out with two steps of transcription and translation. RT-PCR using specific primers for GRA7 gene amplified target gene with appropriate molecular size. Western blot showed the band of 29 kDa corresponding to molecular weight of GRA7 protein. Positive ELISA result using swine anti-*T. gondii* polyclonal antibody and goat anti-swine HRPO conjugate with dilution of expressed GRA7 antigen in the range of 1,000-4,000 dilutions indicated the successful expression of GRA7 in cell-free protein synthesis system.

TÓM TẮT

GRA7, protein kháng nguyên hạt dày đặc của *Toxoplasma gondii*- một loại ký sinh trùng máu ở động vật, đã được biểu hiện thành công protein tái tổ hợp ở các hệ biểu hiện khác nhau như *E. coli*, *S. cerevisiae* và *Baculovirus*. Trong nghiên cứu này, các kháng nguyên GRA7 của *T. gondii* được biểu hiện trong hệ thống phi tế bào. Gen mã hóa GRA7 *T. gondii* có kích thước phân tử 711 bp được tổng hợp hóa học dựa trên trình tự cDNA của gen GRA7 *T. gondii*. Cặp môi đặc hiệu chứa vị trí nhận biết của *Bam*HI và *Xho*I ở đầu 5'- đã được sử dụng để khuếch đại gen GRA7 từ vector pT7CEF1-Chis, sử dụng GFP là chuẩn dương tính. Kích thước phân tử và trình tự gen mã hóa GRA7 đã được xác nhận bởi enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Xho*I và đọc trình tự tự. Quá trình biểu hiện được tiến hành với hai bước phiên mã và dịch mã. Kết quả RT-PCR sử dụng môi đặc hiệu gen mã hóa GRA7 đã khuếch đại gen đích với kích thước phân tử phù hợp. Hình ảnh lai Western blot thấy xuất hiện băng kích thước khoảng 29 kDa tương ứng với trọng lượng phân tử của protein GRA7. Kết quả ELISA dương tính sử dụng kháng thể đa dòng lợn kháng *T. gondii* và cộng hợp HRPO với độ pha loãng kháng nguyên GRA7 trong khoảng 1/ 1.000 -1/ 4.000x xác nhận sự biểu hiện thành công của GRA7 trong hệ thống tổng hợp protein phi tế bào.

1 MỞ ĐẦU

Toxoplasma gondii là một ký sinh trùng đơn bào sống ký sinh trong máu của động vật máu nóng, gây ra bệnh thần kinh và liên quan đến các hiện tượng sẩy thai, chết non và dị dạng bào thai (Dubey và Beattie, 1988). Vật chủ chính của *T. gondii* là các loài mèo (mèo nuôi, mèo hoang) tương ứng với giai đoạn phát triển hữu tính, giai đoạn phát triển vô tính trong vòng đời diễn ra trong các vật chủ trung gian như động vật máu nóng (Frenkel *et al.*, 1970). Nhiễm *T. gondii* gây ra các căn bệnh nghiêm trọng cho động vật và người, đặc biệt là việc truyền bệnh giữa các vật chủ trung gian từ vật nuôi sang người (Tenter *et al.*, 2000). Vì thế việc phát triển các phương pháp chẩn đoán chính xác, tiện lợi là rất cần thiết. Hầu hết các phương pháp phát hiện ký sinh trùng hiện nay là phát hiện huyết thanh học dựa trên sự có mặt của các kháng thể là các globin miễn dịch đặc hiệu *T. gondii* trong các mẫu. Chẩn đoán nhiễm bệnh cũng có thể sử dụng toàn bộ ký sinh trùng (giai đoạn tachyzoite) hoặc sử dụng các protein kháng nguyên (Lyons *et al.*, 2002). Rất nhiều gen mã hóa kháng nguyên *T. gondii* đã được tách dòng và biểu hiện thành công trong các hệ biểu hiện khác nhau. Kháng nguyên hạt dày đặc (GRA) của *T. gondii* tạo ra đáp ứng miễn dịch kháng thể mạnh đã được xem là các kháng nguyên phục vụ chẩn đoán. GRA7 thuộc họ các protein kháng nguyên hạt của *T. gondii* đã được biểu hiện thành công dưới dạng protein tái tổ hợp ở *E. coli* và hệ biểu hiện baculovirus (Jacobs *et al.*, 1998).

Hiện nay, có 3 chiến lược sản xuất protein được áp dụng: tổng hợp hóa học, biểu hiện *in vivo* và tổng hợp protein ở hệ biểu hiện protein phi tế bào. Hệ thống biểu hiện protein phi tế bào (*cell-free protein expression system*) ngày càng được ứng dụng rộng rãi bởi tính ưu việt có thể tổng hợp các protein gây ảnh hưởng đến các chức năng sinh lý tế bào. Hơn nữa, hệ thống hiện protein phi tế bào có ưu thế trong việc tổng hợp các protein với độ chính xác cao và đặc biệt tiết kiệm thời gian cho việc tinh sạch protein tái tổ hợp (Katzen *et al.*, 2005). Trong nghiên cứu này, gen mã hóa protein kháng nguyên GRA7 của *T. gondii* được

tổng hợp và biểu hiện trong hệ thống biểu hiện protein phi tế bào phục vụ cho mục đích chẩn đoán.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Gen mã hóa protein kháng nguyên GRA7 có kích thước phân tử 711 bp được tổng hợp dựa trên trình tự cDNA của GRA7 *T. gondii* và sau đó tách dòng trong vector pGEM Teasy (Bioneer, Korea).

Môi đặc hiệu chứa vị trí cắt của enzyme cắt hạn chế *Bam*HI and *Xho*I ở đầu 5' và chứa bộ mã mã hóa khởi đầu ATG được thiết kế để khuếch đại toàn bộ đoạn gen mã hóa GRA7 từ vector tách dòng (F: 5'-

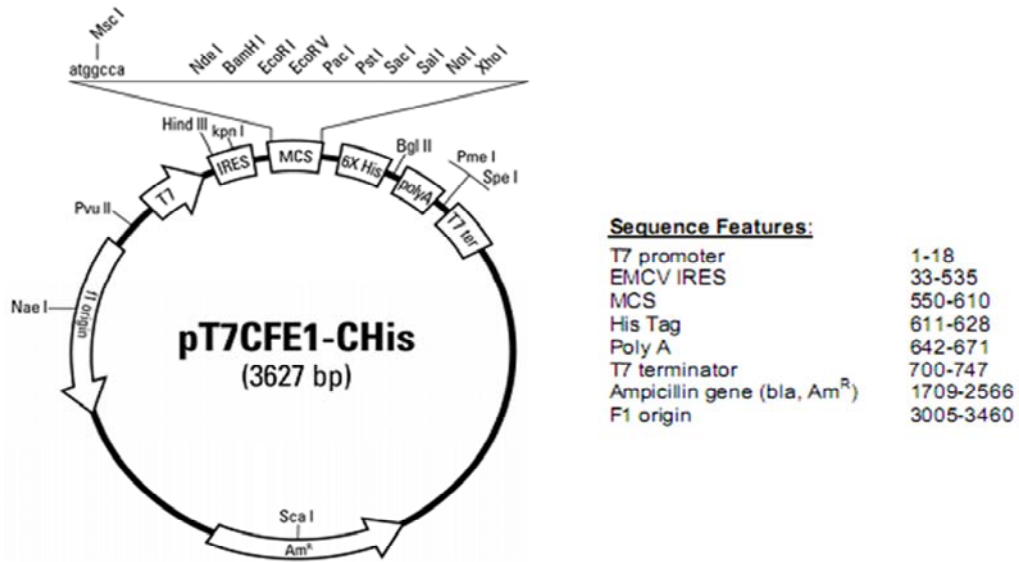
AATCGGATCCATGGCCCCGACACGCAATT TTTTC-3'; R: 5'-

GTTGCTCGAGCTGGCGGGCACTCCCCAT C-3'). Tiếp đó, gen mã hóa GRA7 được chèn

vào vector biểu hiện pT7CFE1-CHis (Thermo Scientific, Mỹ, hình 1). Vector biểu hiện chứa các yếu tố cần thiết cho việc tổng hợp thành công protein mong muốn như: promoter T7 cần thiết cho hoạt động biểu hiện gen, IRES ở đầu 5', đuôi His-Taq ở đầu C phục vụ cho mục đích làm sạch protein sau này, trình tự poly A và yếu tố kết thúc T7 ở đầu 3'. Kích thước phân tử và trình tự nucleotide của gen mã hóa GRA7 được kiểm tra bằng enzyme hạn chế (*Bam*HI và *Xho*I) và đọc trình tự gen.

Biểu hiện gen mã hóa GRA7 trong hệ thống biểu hiện phi tế bào sử dụng kit Pierce Human *In vitro* Protein Expression for DNA template (Thermo Scientific, Mỹ) với 2 bước sao mã (transcription) và dịch mã (translation).

Dịch thu được sau biểu hiện được phân tích bằng phương pháp lai Western và ELISA. Sản phẩm biểu hiện gen được điện di trên gel PAGE 8% trong 40 phút, với cường độ dòng điện 100 A, sau đó được chuyển sang màng lai Nitrocellulose và nhuộm bằng Coomassie blue. Phản ứng ELISA được tiến hành với sản phẩm biểu hiện gen trong hệ thống phi tế bào với các độ pha loãng kháng nguyên GRA7 khác nhau (100x-10.000x) sử dụng kháng thể đa dòng lợn kháng *T. gondii* và cộng hợp HRPO.



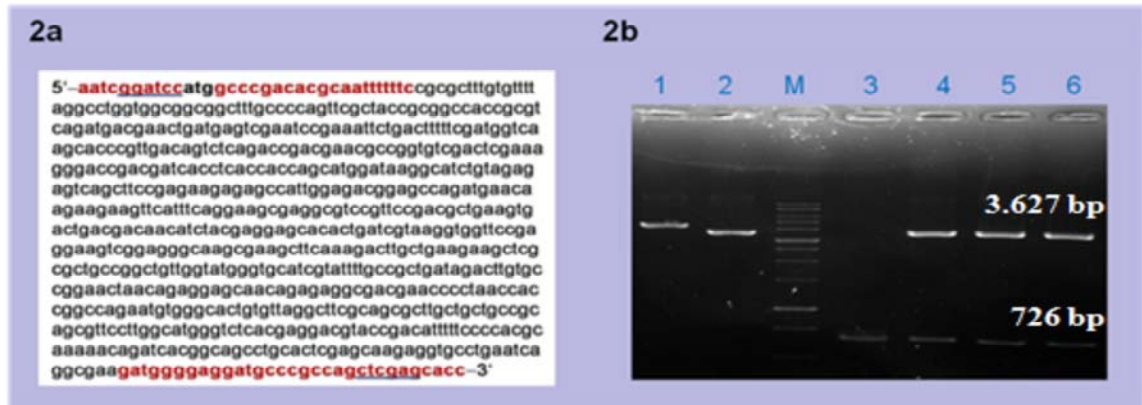
Hình 1: Cấu trúc vector biểu hiện pT7CFE1-CHis (Thermo Scientific, Mỹ)

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Tách dòng và biến nạp đoạn gen mã hóa protein kháng nguyên GRA7 vào vector biểu hiện

Đoạn gen GRA7 có kích thước phân tử 711 bp được tổng hợp hóa học và chuyển vào vector tách dòng pGEM-Teasy (Promega). Cặp mỗi đặc hiệu với GRA7 được nối dài thêm về chiều 5' vị trí cắt của enzyme cắt hạn chế *Bam*HI/*Xho*I, và 4 nucleotide aatc/ggtg. Riêng

đối với mỗi xuôi, 3 nucleotide ATG là mã khởi đầu phiên mã được thêm vào ngay sau vị trí của enzyme cắt hạn chế *Bam*HI. Khi đó kích thước phân tử toàn bộ gen GRA7 tổng hợp nhờ cặp mỗi đặc hiệu là $(711+6 \times 2+4 \times 2+3)=734$ bp). Đoạn gen GRA sau khi được khuếch đại từ pGEM-Teasy được gắn vào vector biểu hiện pT7CFE1-CHis (Thermo Scientific, Mỹ) trong hệ thống biểu hiện phi tế bào. Hình 2b trình bày kết quả điện di đoạn gen GRA7 đã được chèn vào vector biểu hiện pT7CFE1-CHis.



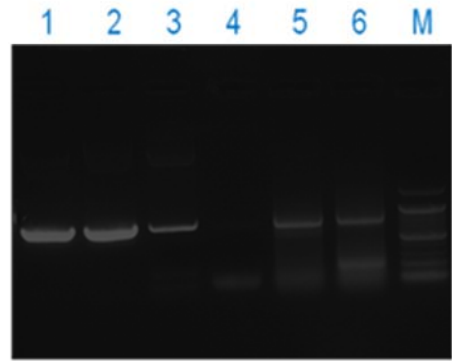
Hình 2a: Trình tự gen GRA7; Trình tự in đậm (33 bp đầu tiên và 31 bp cuối cùng): trình tự primer (mỗi xuôi F và mỗi ngược R) bao gồm vị trí cắt của enzyme cắt hạn chế và vị trí khởi đầu sao chép (ATG); trình tự gạch chân: vị trí cắt enzyme cắt hạn chế. 2b. Kết quả điện di các clone tái tổ hợp mang gen GRA7

M: Chi thị DNA 1kb DNA (iNtRON), Clone tái tổ hợp chứa GRA7 cắt bởi *Bam*HI, Vector pT7CFE1-CHis kích thước 3.627 bp cắt bởi *Bam*HI, Sản phẩm khuếch đại gen GRA7 (734 bp), 4-6. Các clone tái tổ hợp chứa GRA7 cắt bởi *Bam*HI và *Xho*I (3.627 bp + 726 bp)

Hình 2b (giếng 4,5,6) thể hiện 2 băng DNA rõ nét, băng lớn tương ứng với vector pT7CFE1-CHis với kích thước phân tử 3.627 bp và một băng tương ứng với gen GRA7 với kích thước phân tử 726 bp. Kết quả thể hiện vector tái tổ hợp mang đoạn gen GRA7 với kích thước phân tử phù hợp. Tiếp đó, đoạn gen GRA7 được kiểm tra bằng đọc trình tự trực tiếp (Hình 2a). Kết quả này cho thấy gen GRA7 đã được chuyển thành công vào vector biểu hiện pT7CFE1-CHis.

3.2 Biểu hiện protein GRA7 trong hệ thống phi tế bào

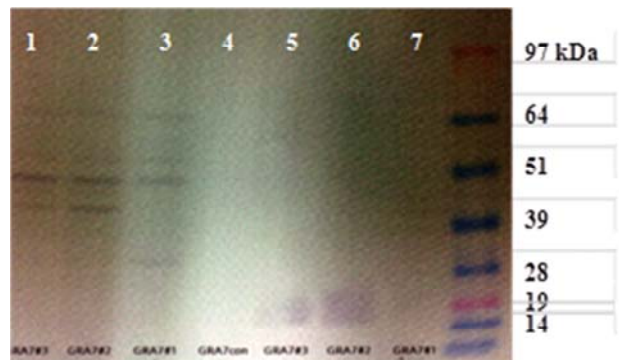
Dòng tế bào người được sử dụng trong kit Pierce Human *In vitro* Protein Expression for DNA template (Thermo Scientific, Mỹ) chứa tất cả các yếu tố cần thiết như là một máy tổng hợp protein như: ribosome, các yếu tố khởi đầu, yếu tố kéo dài và các RNA vận chuyển. Khi được bổ sung các protein cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp, đoạn DNA được chèn vào vector pT7CFE1-CHis có thể tổng hợp thành protein tương ứng trong thời gian ngắn khoảng 6 giờ. Ưu việt của hệ thống biểu hiện protein này là quá trình biểu hiện với quy mô microlit phản ứng và thời gian ngắn. Hơn nữa, lợi ích lớn hơn là có thể tổng hợp được các protein độc hại với cơ thể mà không có thể tổng hợp trong mô hình tế bào sống. Biểu hiện protein GRA7 trong tổ hợp vector biểu hiện pT7CFE1-CHis được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Quá trình biểu hiện gồm 2 bước: phiên mã và dịch mã. Hình 3 trình bày kết quả RT-PCR đánh giá quá trình phiên mã sử dụng sản phẩm phiên mã làm khuôn với cặp mồi đặc hiệu GRA7. Kết quả cho thấy với các clone khác nhau (giếng 3,5,6), sản phẩm RT-PCR xuất hiện băng tương ứng với kích thước phân tử GRA7, và cũng thể hiện ở việc quan sát sản phẩm sau phiên mã có xuất hiện tủa trắng mờ nhẹ trong ống phản ứng, điều này thể hiện kết quả dương tính ở giai đoạn phiên mã trong quá trình biểu hiện GRA7. Tuy nhiên mức độ đặc hiệu ở các clone là khác nhau, có thể do nồng độ vector pT7CFE1-CHis-GRA7 đưa vào các phản ứng có sự khác nhau.



Hình 3: Kết quả RT-PCR sử dụng sản phẩm phiên mã với cặp mồi đặc hiệu GRA7 M: Chỉ thị DNA 100 bp ladder (Enzynomics)

1-2: PCR với vector biểu hiện pT7CFE1-His_GRA7
3,5,6: RT-PCR sản phẩm phiên mã các clone khác nhau
4: Đối chứng âm

Để kiểm tra sản phẩm dịch mã, phương pháp lai Western được tiến hành. Trước tiên sản phẩm dịch mã được điện di trên gel PAGE 8% sử dụng hệ đệm MOPS. Sau đó, toàn bộ protein được chuyển sang màng lai Nitrocellulose ủ với kháng thể đa dòng polyclonal của *T. gondii* được tạo trên lợn với độ pha loãng 100x và cộng hợp kháng lợn đánh dấu HPRO tạo trên dê (HPRO-labeled Goat Anti-Swine IgG – Thermo Scientific) với độ pha loãng 2.500x. Kết quả được trình bày ở hình 4.



Hình 4: Kết quả lai Western

M: Chỉ thị Protein
1-3: Kết quả lai phần dịch nổi với các clone khác nhau
4-7: Kết quả lai phần tủa với các clone khác nhau

Kết quả Hình 4 cho thấy giếng số 3 có xuất hiện băng protein với độ lớn khoảng 29 kDa, tương ứng với kích thước phân tử protein GRA7. Phần dịch nổi này được sử dụng làm kháng nguyên cho phản ứng ELISA. Kết quả

ELISA dương tính với độ pha loãng kháng nguyên GRA7 trong khoảng 1/1.000 – 1/4.000x, xác nhận sự biểu hiện của GRA7 trong hệ thống tổng hợp protein phi tế bào.

4 KẾT LUẬN

Đã biểu hiện thành công gen mã hóa protein kháng nguyên GRA7 của *T. gondii* trong hệ thống biểu hiện phi tế bào. Tuy nhiên, việc tối ưu để nâng cao mức độ biểu hiện của gen GRA7 cần được tiến hành đảm bảo yêu cầu về nồng độ và độ sạch của protein GRA7 dùng trong chẩn đoán nhiễm *T. gondii* ở động vật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dubey J.P., C.P. Beattie (1988). Toxoplasmosis of Animals and Human. CRC Press, Boca Raton, Florida, 220 pages.
2. Frenkel J.K., J.P. Dubey, N.L. Miller (1970). Toxoplasma gondii in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 167, pp. 893–896. DOI: 10.1126/science.167.3919.893.
3. Jacobs D., J.F. Dubremetz, A. Loyens, F. Bosman, E. Saman (1998). Identification and heterologous expression of a new dense granule protein (GRA7) from Toxoplasma gondii. Molecular and Biochemical Parasitology 91, pp. 237-249.
4. Katzen F., G. Chang, W. Kudlicki (2005). The past, present and future of cell-free protein synthesis. TRENDS in Biotechnology 3, pp. 150-156.
5. Lyons R.E., R. McLeod, W.R. Craig (2002). Toxoplasma gondii tachyzoite–bradyzoite Interconversion. TRENDS in Parasitology 18, pp. 198-201.
6. Tenter A.M., A.R. Heckeroth, L.M. Weiss (2000). Toxoplasma gondii: from animals to humans. International Journal for Parasitology 30, pp. 1217-1258.
7. Thermo Scientific. Instruction of Rapid detection Pierce® Human In Vitro Protein Expression Kit for DNA Templates. <http://www.thermoscientific.jp/bid/pierce/protein-expression-system/docs/2195ew9.pdf>.