

## BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN DUNG HỢP S1D-LL-37 Ở TẾ BÀO MÔ SẸO LÚA CHUYỂN GENE

Nguyễn Xuân Huy<sup>1,2,3\*</sup>, Moon-Sik Yang<sup>3</sup>

**Tóm tắt.** Vùng quyết định kháng nguyên S1D, vị trí acid amin 636-789 của protein gai, là yếu tố quyết định kháng nguyên trung hòa của vi rút gây bệnh tiêu chảy cấp trên lợn (Porcine Epidemic Diarrhea virus - PEDV). PEDV là tác nhân gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn, đặc biệt là lợn sơ sinh. Để tăng phản ứng miễn dịch của vaccine có nguồn gốc từ thực vật trong hệ thống miễn dịch niêm mạc ruột, gene S1D của PEDV đã được dung hợp với Cathelicidin LL-37, đóng vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh bảo vệ các bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn. Gene dung hợp được tạo dòng vào vector biểu hiện ở thực vật dưới sự kiểm soát của promoter 3D amylase của lúa (RAmylase3D) và peptide tín hiệu BiP, sau đó được biến nạp vào mô sẹo của lúa thông qua phương pháp biến nạp gene bằng súng bắn gene. Sự tích hợp ổn định vào hệ gene nhân và biểu hiện phiên mã của gene chuyển được xác nhận lần lượt bằng PCR DNA tổng số và phân tích Northern blot. Sự biểu hiện của protein dị loại S1D-LL-37 được xác nhận bằng phương pháp Western blot. Kết quả cho thấy, sự biểu hiện cao nhất của protein dị loại trong mô sẹo lúa vào ngày thứ 3 sau khi được cấy trong môi trường nuôi cấy huyền phù không chứa sucrose bằng phương pháp Western blot theo thời gian. Việc biểu hiện thành công gene dung hợp S1D-LL-37 ở mô sẹo lúa chuyển gene sẽ được nhân lên và kiểm tra tính khả thi của vaccine sản xuất từ tế bào mô sẹo của lúa.

---

**Từ khóa:** PEDV, S1D, vaccine, mô sẹo lúa, lúa chuyển gene.

---

### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

PEDV là tác nhân gây tiêu chảy cấp ở lợn, đặc biệt ở lợn sơ sinh (Cavanagh và cs., 1993). PEDV phá vỡ các tế bào nhung mao ruột và gây teo nhung mao ở hồng tràng và hồi tràng, dẫn đến tử vong với tỷ lệ tử vong lên tới 95% ở lợn con bị nhiễm bệnh (Ducatelle và cs., 1981). Bệnh tiêu chảy cấp ở lợn được phát hiện lần đầu tiên ở Bỉ, được đặt tên là CV777 (Pensaert & de Bouck, 1978a) và ở Anh (Chasey & Cartwright, 1978) vào năm 1978. Sự bùng phát của căn bệnh này đã được báo cáo ở nhiều quốc gia chăn nuôi lợn dẫn đến thiệt hại kinh tế nghiêm trọng ở Canada (Turgeon và cs., 1980), châu Âu (Pospischil và cs., 1981), Nhật Bản (Takahashi và cs., 1983), Trung Quốc (Qin và cs., 2019), Hàn Quốc (Chae và cs., 2000),... Ở Việt Nam, dịch tiêu chảy cấp ở lợn xảy ra ở nhiều địa phương và gây ảnh hưởng đến kinh tế của người dân chăn nuôi lợn (Lương Trọng Thắng và cs., 2020; Nguyễn Tất Toàn và cs., 2012; Huỳnh Minh Trí và cs., 2017).

---

<sup>1</sup>Đại học Huế

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

<sup>3</sup>Đại học Quốc gia Chonbuk, Hàn Quốc

\*Email: nguyentuanhuy@hueuni.edu.vn

PEDV có hình dạng coronavirus điển hình với cấu trúc phức tạp và bao gồm lớp vỏ và nucleocapsid (Pensaert & de Bouck, 1978b). Bộ gene bao gồm một chuỗi RNA sợi đơn cảm ứng dương (Kocherhans và cs., 2001). Trong các cấu trúc protein, protein S là kháng nguyên quyết định để phát triển vaccine chống lại PEDV (Duarte & Laude, 1994; Yeo, Hernandez và cs., 2003). Protein S có thể được chia thành miền S1 (aa 1-789) và miền S2 (aa 790-1383) (Follis và cs., 2006). S1 được chia thành 2 vùng quan trọng bao gồm vùng quyết định kháng nguyên trung hòa của PEDV (CO-26K equivalent, COE gene) dài 139 aa trải dài trên vùng aa 499-638 (Chang và cs., 2002) và một vùng epitope mới được đặt tên là S1D (aa 636-789) để tạo ra các kháng thể trung hòa virus (Sun và cs., 2008). Trong các nghiên cứu trước đây, gene *SID* và/hoặc dung hợp với Cholera toxin b subunit (*CTB*) đã được biểu hiện ở cây thuốc lá và kiểm tra khả năng miễn dịch của chúng (Huy và cs., 2016; Tien và cs., 2019). Thực vật đã được sử dụng làm hệ thống biểu hiện để tạo ra protein dị loại tái tổ hợp. Các protein dị loại có thể được biểu hiện ở các phần có thể làm thức ăn của cây và có thể được sử dụng làm vaccine thực phẩm (Jacob và cs., 2013; Sala và cs., 2003; Streatfield, 2006). Để tăng khả năng đáp ứng miễn dịch của vaccine thực phẩm ở vật chủ, gene *SID* đã được dung hợp với chất bổ trợ niêm mạc *LL-37*. *LL-37* là sản phẩm từ sự phân cắt protein kháng khuẩn cation cathelicidin ở người (hCAP-18) nhờ tác dụng của protease serine. *LL-37* đã được chứng minh là có hoạt tính kháng khuẩn mạnh và đóng vai trò quan trọng trong khả năng miễn dịch bẩm sinh (Dürr và cs., 2006; Kahlenberg & Kaplan, 2013; Sancho-Vaello và cs., 2020). Trong nghiên cứu này, gene dung hợp *SID-LL-37* được biểu hiện ở mô sẹo lúa dưới sự kiểm soát của promoter Amylase 3D của lúa và được tối ưu hóa để đạt được mức biểu hiện protein cao nhất trong nuôi cấy huyền phù mô sẹo lúa chuyển gene.

## **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Tạo dòng vector biểu hiện gene**

Để tạo vector biểu hiện gene ở tế bào lúa, gene dung hợp *SID-LL-37* được cắt từ plasmid nhân dòng pMYV793 bằng 2 enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Sac*I (Takara Bio, USA). Plasmid chứa promoter Amylase 3D, peptide tín hiệu BiP và vùng 3' không mã hóa đồng thời cũng được cắt mở vòng với 2 enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Sac*I (Takara Bio, USA). Vector biểu hiện và đoạn chèn *SID-LL-37* được tinh sạch bằng Kit tinh sạch DNA (Qiagen). Phản ứng nối vector và đoạn chèn được thực hiện nhờ enzyme ligase (Takara Bio, USA) ở 4 °C qua đêm. Sản phẩm sau khi nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến và nuôi trong môi trường LB bổ sung ampicillin nồng độ 50 µg/mL. Các khuẩn lạc được nuôi cấy, tách chiết plasmid bằng Kit (Takara Bio, USA) và cắt kiểm tra bằng 2 enzyme như ở trên. Plasmid pMYV797, mang gene *SID-LL-37*, được tạo dòng thành công được nhân lên trong môi trường LB có bổ sung kháng sinh, tinh sạch bằng Kit, đo nồng độ và được sử dụng để bắn gene vào mô sẹo tế bào lúa.

### **2.2. Bắn gene vào mô sẹo tế bào lúa**

Hạt lúa (*Oryza sativa* L. cv. Dongin) sau khi bóc vỏ được khử trùng và nuôi cấy trên môi trường chứa muối N6 và vitamin (Chu và cs., 1975) bổ sung thêm axit 2,4-dichlorophenoxyalic (2,4-D) (2 mg/L), sucrose (30 g/L), kinetin (0,2 mg/L) trong 7 ngày

để tạo mô sẹo. Mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch và biến nạp với plasmid pMYV797 (Chen và cs., 1998) và tiếp tục được đồng nuôi cấy có bổ sung 2,4 D (2 mg/L), sucrose (30 g/L, kinetin (0,2 mg/L), glucose (10 g/L) không dùng kháng sinh trong 3 ngày trong điều kiện tối và sau đó chuyển sang môi trường chọn lọc N6 (Chu và cs., 1975) có bổ sung kháng sinh hygromycin B (50 mg/L) để chọn lọc. Sau 2-3 tuần, mô sẹo lúa chuyển gene giả định đã xuất hiện.

### **2.3. Phân tích PCR DNA tổng số**

Sự hiện diện của gene chuyển trong tế bào mô sẹo được phân tích bằng PCR DNA tổng số. DNA tổng số của mô sẹo lúa chuyển gene giả định và không chuyển gene được tách bằng ZR Genomic DNA Kit (Zymo Research, USA). PCR được thực hiện với thể tích 25  $\mu$ L chứa: 500 ng of DNA tổng số, mỗi xuôi (S1D-BamHI-F: 5'- GGATCC GAC GTT TCT TTT ATG AC-3') và mỗi ngược (LL-37-R: 5'- AGG ACT CTG TCC TGG GTA CAA-3') 200  $\mu$ M dNTPs, 1xTaq polymerase buffer và 02 đơn vị iTaq polymerase. Chu kỳ PCR như sau: biến tính 95 °C trong 5 phút, tiếp theo 30 chu kỳ của biến tính 95 °C trong 1 phút; bắt cặp mỗi 55 °C trong 30 giây và tổng hợp sợi mới ở 72 °C trong 30 giây và cuối cùng là 72 °C trong 5 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di 1,0 % gel agarose.

### **2.4. Phân tích Northern blot**

Để cảm ứng quá trình tổng hợp mRNA của mô sẹo lúa chuyển gene dưới sự điều khiển của promoter RAmylease3D, mô sẹo lúa chuyển gene được cảm ứng trong môi trường N6 không chứa sucrose trong 3 ngày. RNA tổng số từ tế bào lúa tự nhiên và chuyển gene được tách chiết bằng Trizol Reagent (Molecular research center, Inc., Ohio, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu RNA (20~30  $\mu$ g) được phân tách bằng điện di 1,2% formaldehyde-agarose gel (Lehrach và cs., 1977) và thấm tách lên màng Hybond N+ membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Màng được lai trong buồng Hybridization Incubator (Finemould Precision Ind. Co., Korea) với môi S1D được đánh dấu <sup>32</sup>P-dCTP (Promega) ở 65 °C trong dung dịch (pH 7.4) chứa 1 mM EDTA, 250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1% hydrolyzed casein, and 7% SDS. Màng được rửa 2 lần với dung dịch A (2x SSC, 0.1% SDS), 02 lần với dung dịch B (2x SSC, 1% SDS) và cuối cùng 2 lần với dung dịch C (0.1x SSC, 0.1% SDS) trong 15 phút/lần ở 65 °C. Ảnh phóng xạ được hiển thị trên phim X-quang (Kodak, USA).

### **2.5. Phân tích Western blot**

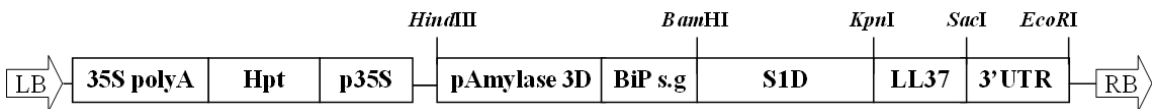
Mô sẹo lúa chuyển gene được cảm ứng trong môi trường N6 không chứa sucrose trong 4 ngày. Protein tổng số được tách chiết bằng đệm Arakawa (Arakawa và cs., 1997) và đo nồng độ protein bằng Bradford protein assay (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Protein tổng số (50~80  $\mu$ g) được phân tách trong gel SDS-PAGE 10% (Bio-Rad, USA). Các band protein trong gel được chuyển lên màng Hybond C (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) sử dụng hệ thống mini-transblot (Bio-Rad, USA). Phản ứng lai protein được thực hiện với mouse anti-S1D serum trong đệm TBST chứa 3,0% non-fat dry milk, rửa màng và lai với kháng thể 2 anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Promega S372B) trong đệm TBST. Màng được phát màu bằng BCIP/NBT

solution, premixed (Sigma, USA). Sau khi chọn các dòng có biểu hiện protien cao, các tế bào lúa được cảm ứng theo thời gian để tối ưu hóa biểu hiện.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Cấu trúc biểu hiện ở tế bào mô sẹo lúa

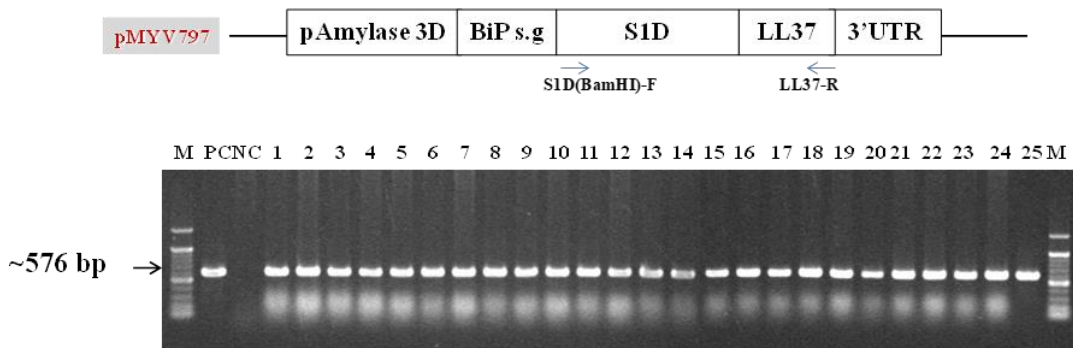
Gene dung hợp *SID-LL-37* chứa trình tự peptide tín hiệu BiP (Morris và cs., 1997; Nguyen et al, 1991) và tín hiệu định hướng đích đến lưới nội chất (SEKDEL) tại đầu 3' (Kang và cs., 2004) được tạo dòng vào vector biểu hiện ở tế bào lúa và đặt tên pMYV797 (Hình 1). Biểu hiện của protien dung hợp S1D-LL37 được điều khiển bởi promoter *RAmylase 3D*. Gene mã hóa hygromycin phosphotransferase (*Hpt*) được sử dụng để chọn lọc các tế bào chuyển gene kháng hygromycin B. Vector này được biến nạp vào tế bào mô sẹo lúa bằng phương pháp bắn gene. Các dòng lúa giả định chuyển gene sẽ xuất hiện 2 -3 tuần sau khi nuôi cấy trong môi trường chọn lọc bổ sung hygromycine B.



**Hình 1.** Cấu trúc plasmid biểu hiện ở lúa, pMYV797. LB, bờ T-DNA trái; RB, bờ T-DNA phải, Nos-t, nos terminator, pRAmy3D, promoter *Amylase 3D* ở lúa; *S1D*, gene *S1D* mã hóa yếu tố quyết định kháng nguyên của PEDV; *Hpt*, gene mã hóa kháng hygromycine B; *p35S*, promoter *CaMV 35 S*; *35S polyA*, trình tự kết thúc của *CaMV 35S*; *BiP s.g*, peptide tín hiệu của *N. benthamiana*; *LL-37*, trình tự gene *LL-37* của *hCAP-18*

#### 3.2. PCR DNA tổng số

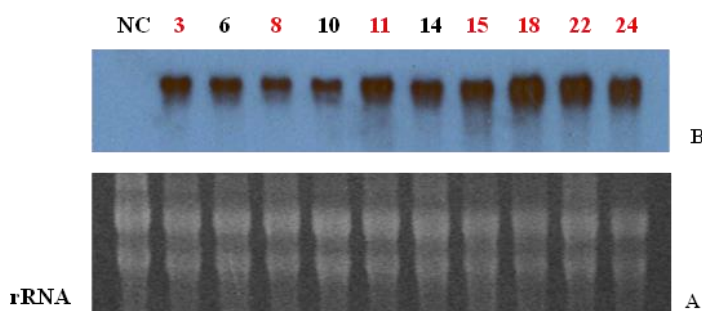
DNA tổng số được tách chiết từ tế bào lúa giả định chuyển gene và tự nhiên bằng ZR genomic DNA kit (Zymo Research, USA). Kết quả PCR cho thấy sự hiện diện của *SID-LL37* trong hệ gene của tế bào lúa chuyển gene với kích thước khoảng 576 bp (Hình 2). Tế bào lúa tự nhiên không xuất hiện band PCR. Thông qua kết quả PCR, 25 dòng lúa chuyển gene đã được chọn lọc cho các thí nghiệm tiếp theo.



**Hình 2.** Kết quả điện di sản phẩm PCR DNA tổng số. NC, đối chứng âm với mô sẹo lúa tự nhiên; PC, đối chứng dương với khuôn mẫu plasmid pMYV797; dòng 1-25, mô sẹo của các dòng lúa giả định chuyển gene; M, 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific)

### 3.3. Phân tích Northern blot

Phiên mã mRNA của gene dung hợp S1D-LL-37 trong tế bào lúa chuyển gene được xác định bằng Northern blot (Hình 3). Các band rRNA giữa các dòng lúa chuyển gene tương đối đồng đều và không bị đứt gãy, điều này một lần nữa khẳng định lượng RNA tổng số được điện di trong các mẫu tương đối đồng đều (Hình 3A). Tuy nhiên, tín hiệu trên màng phim X-quang biến thiên rất lớn giữa các dòng lúa chuyển gene, chứng tỏ có sự sai khác trong quá trình phiên mã thành mRNA của gene chuyển trong các dòng lúa chuyển gene (Hình 3B). Chúng tôi chọn lọc các dòng lúa chuyển gene có tín hiệu cao để phân tích sự biểu hiện của protein. Các dòng lúa chuyển gene #3, #11, #15, #18, #22 và #24 được chọn lọc. Trong đó, 3 dòng chuyển gene gồm #18, #22 và #24 có tín hiệu cao nhất (Hình 3B).

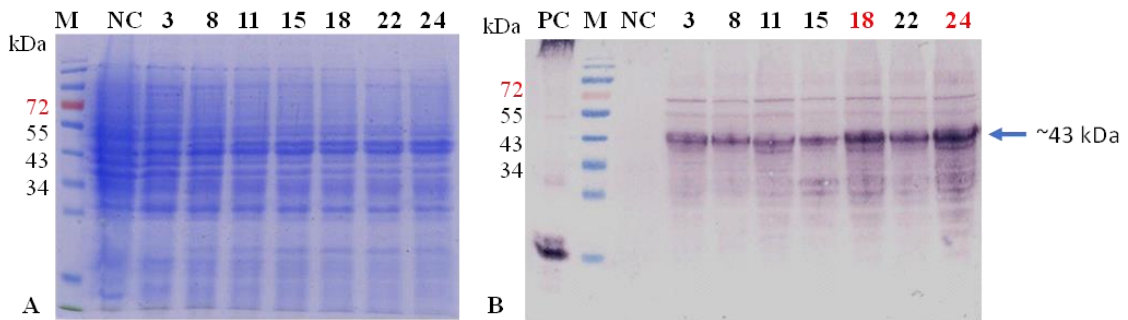


**Hình 3.** Kết quả phân tích Northern của các dòng mô sẹo lúa chuyển gene. RNA tổng số (25  $\mu$ g) từ mô sẹo lúa chuyển gene và tự nhiên được lai với mẫu dò S1D-LL37 có kích thước 576 bp đã đánh dấu phóng xạ. NC, đối chứng âm mô sẹo lúa tự nhiên; dòng 3~24, mô sẹo lúa chuyển gene

### 3.4. Phân tích Western blot

Protein tái tổ hợp S1D-LL-37 trong tế bào lúa chuyển gene được điều khiển từ promoter RAmylase 3D. Quá trình tổng hợp protein này xảy ra khi môi trường cảm ứng không bổ sung sucrose. Để tổng hợp protein S1D-LL-37, tế bào lúa chuyển gene được nuôi cấy trong môi trường muối N6 đặc không bổ sung sucrose trong 4 ngày. Kết quả phân tích Western blot cho thấy các dòng lúa chuyển gene #18, ##22 và #24 có tín hiệu band đậm hơn các dòng còn lại (Hình 4).

Phân tử protein S1D-LL-37 gồm 190 acid amin và được dự đoán có khối lượng 20,78 kDa bao gồm kháng nguyên S1D (17 kDa) và LL-37 (3,78 kDa). Tuy nhiên, kết quả tổng hợp protein này trong tế bào lúa khoảng 43 kDa (Hình 4). Kết quả này được giải thích do quá trình biến đổi protein hậu dịch mã. Sử dụng phần mềm netNGlyc 1.0 để dự đoán các vị trí gắn N-glycosylation cho thấy protein S1D-LL-37 có đến 7 vị trí có khả năng gắn N-glycosylation (Hình 5). Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi trước đây, kháng nguyên S1D tái tổ hợp ở lá cây *N. benthamiana*, có khối lượng phân tử khoảng 34 kDa, được cắt các phân tử đường gắn vào trong quá trình hậu dịch mã bằng enzyme PNGase F(+) và kết quả thu band protein S1D sau xử lý 17 kDa (N.-X. Huy et al 2016). Kết quả nghiên cứu này tương đương với nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Huy et al., 2016).



**Hình 4.** Kết quả phân tích Western blot của các dòng mô sẹo lúa chuyển gene. (A) 12% SDS-PAGE gel; (B) Phân tích Western blot được lai với kháng thể đa dòng 1 anti-S1D sản xuất từ chuột. M, thang chuẩn prestained protein (Thermo Fisher Scientific); PC: S1D được sản xuất từ *E. coli*; NC, mô sẹo lúa tự nhiên; dòng 3~24, mô sẹo lúa chuyển gene

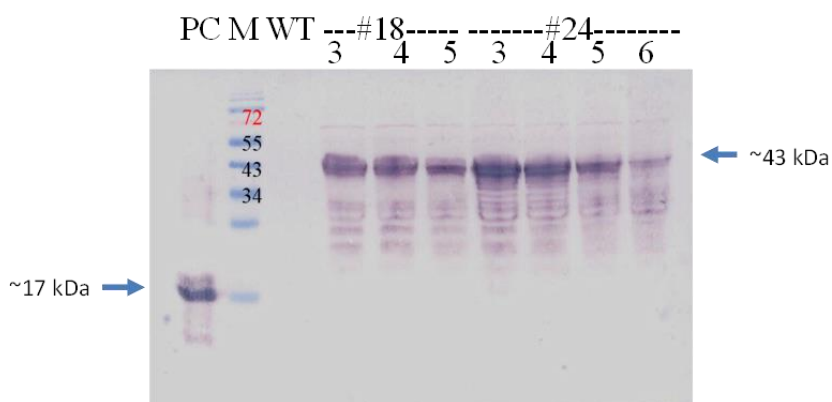
Name: S1D-LL-37                      Length: 190  
 DVSFMTLDVCTKYTIYGFKGEIITLTNSSILAGVYYTSDSGQLLAFKNVTS~~GA~~VYSVTPCSFSEQAAYVND~~DI~~VGVISS                      80  
 L~~SN~~STFNNTRELPGFFYHSNDGSNCTEPVLVYSNIGVCKSGSIGYVPSQYGQVKIAPTVTGNIS~~IP~~TNFSMILLGDFFR                      160  
 KSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES  
 .....N.....n.....                      80  
 ..N..N.....n..N.....n.....N.....                      160  
 .....                      240

(Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	28 NSSI	0.4653	(5/9)	-
Sequence	49 NVTG	0.6667	(9/9)	++
Sequence	71 NDDI	0.6716	(9/9)	++
Sequence	83 NSTF	0.5002	(6/9)	+
Sequence	87 NNTR	0.5169	(3/9)	+
Sequence	88 NTRE	0.3982	(7/9)	-
Sequence	100 NDGS	0.6387	(8/9)	+
Sequence	104 NCTE	0.6447	(9/9)	++
Sequence	114 NIGV	0.6781	(9/9)	++
Sequence	142 NISI	0.6574	(9/9)	++
Sequence	148 NFSM	0.4316	(5/9)	-
Sequence	183 NLVP	0.1462	(9/9)	---

**Hình 5.** Trình tự protein S1D-LL-37 và dự đoán vị trí gắn N-glycosylation bằng netNGlyc 1.0. S1D-LL-37, có 07 vị trí có khả năng gắn N-glycosylation trong quá trình hậu dịch mã

Hai dòng lúa chuyển gene #18 và #24 cho thấy các band protein đậm hơn các dòng chuyển gene còn lại nên được chọn để nghiên cứu cảm ứng theo thời gian sau 3, 5, 7 ngày. Kết quả cho thấy, protein tái tổ hợp được biểu hiện mạnh nhất vào ngày thứ 3 sau cảm ứng. Các ngày tiếp theo protein biểu hiện giảm dần (Hình 6). Dòng lúa #24 được chọn để nuôi sinh khối trong bioreactor để phục vụ cho các nghiên cứu miễn dịch tiếp theo.



**Hình 6.** Nghiên cứu cảm ứng theo thời gian mức độ biểu hiện S1D-LL-37 trong môi trường cảm ứng huyền phù N6 không bổ sung sucrose. Dòng #18 và #24 được chọn lọc để nuôi cấy huyền phù cảm ứng sinh protein tái tổ hợp. M, thang chuẩn prestained protein (Thermo Fisher Scientific); PC: , S1D được sản xuất từ *E. coli*; NC, mô sẹ lúa tự nhiên; lanes dòng 3~6, các ngày thu mẫu sau khi cảm ứng

#### 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng thành công vector biểu hiện ở lúa mang gene dung hợp S1D-LL-37 và biến nạp vào tế bào mô sẹ của lúa. Các dòng lúa chuyển gene được phân tích PCR, Southern blot và Western blot. Dòng lúa chuyển gene #24 được chọn lọc thông qua phân tích Western blot và cảm ứng theo thời gian. Thành công của nghiên cứu này là tiền đề cho các nghiên cứu về tính miễn dịch của protein dung hợp S1D-LL-37 tái tổ hợp ở lúa kháng lại PEDV.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arakawa, T., Chong, D. K., Merritt, J. L., & Langridge, W. H. (1997). Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res*, 6(6), 403-413.
- Cavanagh, D., Brian, D. A., Brinton, M. A., Enjuanes, L., Holmes, K. V., Horzinek, M. C., et al. (1993). The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group. *Adv Exp Med Biol*, 342, 255-257.
- Chae, C., Kim, O., Choi, C., Min, K., Cho, W. S., Kim, J., & Tai, J. H. (2000). Prevalence of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus infection in Korean pigs. *Vet Rec*, 147(21), 606-608.
- Chang, S. H., Bae, J. L., Kang, T. J., Kim, J., Chung, G. H., Lim, C. W., et al. (2002). Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Mol Cells*, 14(2), 295-299.
- Chasey, D., & Cartwright, S. F. (1978). Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res Vet Sci*, 25(2), 255-256.

- Chen, L., Marmey, P., Taylor, N. J., Brizard, J.-P., Espinoza, C., D'Cruz, P., et al. (1998). Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat Biotech*, 16(11), 1060-1064.
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., & Chu, C. Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18, 659-668.
- Duarte, M., & Laude, H. (1994). Sequence of the spike protein of the porcine epidemic diarrhoea virus. *J Gen Virol*, 75 (Pt 5), 1195-1200.
- Ducatelle, R., Coussement, W., Charlier, G., Debouck, P., & Hoorens, J. (1981). Three-dimensional sequential study of the intestinal surface in experimental porcine CV 777 coronavirus enteritis. *Zentralbl Veterinarmed B*, 28(6), 483-493.
- Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., & Ramamoorthy, A. (2006). LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1408-1425.
- Follis, K. E., York, J., & Nunberg, J. H. (2006). Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology*, 350(2), 358-369.
- Huy, N.-X., Tien, N.-Q.-D., Kim, M.-Y., Kim, T.-G., Jang, Y.-S., & Yang, M.-S. (2016). Immunogenicity of an S1D epitope from porcine epidemic diarrhea virus and cholera toxin B subunit fusion protein transiently expressed in infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2), 369-380.
- Jacob, S. S., Cherian, S., Sumithra, T. G., Raina, O. K., & Sankar, M. (2013). Edible vaccines against veterinary parasitic diseases - Current status and future prospects. *Vaccine*, 31(15), 1879-1885.
- Kahlenberg, J. M., & Kaplan, M. J. (2013). Little peptide, big effects: the role of LL-37 in inflammation and autoimmune disease. *J. Immunol.*, 191(10), 4895-4901.
- Kang, T. J., Kang, K. H., Kim, J. A., Kwon, T. H., Jang, Y. S., & Yang, M. S. (2004). High-level expression of the neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus by a tobacco mosaic virus-based vector. *Protein Expr. Purif.*, 38(1), 129-135.
- Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M., & Tobler, K. (2001). Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes*, 23(2), 137-144.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., & Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, 16(21), 4743-4751.
- Morris, J. A., Dorner, A. J., Edwards, C. A., Hendershot, L. M., & Kaufman, R. J. (1997). Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(7), 4327-4334.



- Nguyen, T. H., Law, D. T., & Williams, D. B. (1991). Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(4), 1565-1569.
- Pensaert, M. B., & de Bouck, P. (1978a). A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.*, 58(3), 243-247.
- Pensaert, M. B., & de Bouck, P. (1978b). A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Archives of Virology*, 58(3), 243-247.
- Pospischil, A., Hess, R. G., & Bachmann, P. A. (1981). Light microscopy and ultrahistology of intestinal changes in pigs infected with epizootic diarrhoea virus (EVD): comparison with transmissible gastroenteritis (TGE) virus and porcine rotavirus infections. *Zentralbl Veterinarmed B*, 28(7), 564-577.
- Qin, S., Hu, C., Yang, D., Wu, J., Yue, H., Tang, C., & Zhang, B. (2019). Emergence of porcine epidemic diarrhea viruses with the novel S genes in Tibetan pigs in the Qinghai-Tibetan plateau in China. *Virus Research*, 270, 197652.
- Sala, F., Manuela Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M., & Castiglione, S. (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21(7-8), 803-808.
- Sancho-Vaello, E., Gil-Carton, D., François, P., Bonetti, E.-J., Kreir, M., Pothula, K. R., et al. (2020). The structure of the antimicrobial human cathelicidin LL-37 shows oligomerization and channel formation in the presence of membrane mimics. *Scientific Reports*, 10(1), 17356.
- Streatfield, S. J. (2006). Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods*, 38(2), 150-157.
- Sun, D., Feng, L., Shi, H., Chen, J., Cui, X., Chen, H., et al. (2008). Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Vet Microbiol*, 131(1-2), 73-81.
- Takahashi, K., Okada, K., & Ohshima, K. (1983). An outbreak of swine diarrhea of a new-type associated with coronavirus-like particles in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi*, 45(6), 829-832.
- Lương Trọng Thắng, Vũ Đức Việt, Đặng Lan Anh (2020). Xác định một số đặc điểm bệnh lý của lợn mắc dịch tiêu chảy cấp do Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) gây ra trên lợn con theo mẹ tại các vùng sinh thái ở tỉnh Thanh Hóa. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm Huế*, 4, 1922-1927.
- Tien, N.-Q.-D., Huy, N.-X., & Kim, M.-Y. (2019). Improved expression of porcine epidemic diarrhea antigen by fusion with cholera toxin B subunit and chloroplast transformation in *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 137(2), 213-223.
- Nguyễn Tất Toàn, Nguyễn Đình Quát, Trịnh Thị Thanh Huyền, Đỗ Tiến Duy, Trần Thị Dân, Nguyễn Thị Phước Ninh, Nguyễn Thị Thu Năm (2012). Phát hiện virut gây

bệnh tiêu chảy cấp (PEDV) trên heo ở các tỉnh miền Đông Nam Bộ. *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, 19(5), 23-28.

Huỳnh Minh Trí, Nguyễn Ngọc Hải, Nguyễn Hoàng Việt (2017). Khảo sát tỷ lệ nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy cấp (Porcine epidemic diarrhea virus - PEDV) trên heo nái và xác định các yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh PED tại tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52, 1-7.

Turgeon, D. C., Morin, M., Jolette, J., Higgins, R., Marsolais, G., & DiFranco, E. (1980). Coronavirus-like particles associated with diarrhea in baby pigs in Quebec. *The Canadian Veterinary Journal*, 21(3), 100-xxiii.

Yeo, S. G., Hernandez, M., Krell, P. J., & Nagy, E. E. (2003). Cloning and sequence analysis of the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99. *Virus Genes*, 26(3), 239-246.

## **EXPRESSION OF FUSION EPITOPE S1D-LL-37 IN TRANSGENIC RICE CALLI**

**Nguyen Xuan Huy<sup>1,2,3\*</sup>, Moon-Sik Yang<sup>3</sup>**

**Abstract.** An S1D epitope region, locates on aa residue 636-789 of spike protein, is an alternative neutralizing epitope against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). PEDV is an etiologic agent of diarrhea in pigs, especially newborn pigs. In order to increase immune responses of plant-based vaccines in intestine mucosal immune systems, an *S1D* gene of PEDV was fused with LL-37, a critical role in the innate immune system defending bacterial infections. The fusion gene was cloned into a plant expression vector under the control of rice amylase 3D promoter and BiP signal peptide, subsequently introduced into rice calli via particle bombardment-mediated transformation method. The stable integration and transcriptional expression of the S1D-ligand fusion gene were confirmed by genomic DNA PCR and Northern blot analyses, respectively. The expression of S1D-mucocalmucosal adjuvant fusion protein was confirmed by immunoblot analysis. The highest expression of heterologous protein in induced rice calli was found on day 3 after induction in S- liquid medium using time- course Western blot analysis. The successful expression of the vaccine-mucosal adjuvant fusion gene in transgenic rice calli will be scaled up and test the feasibility of a rice-based vaccine with an oral administration method.

---

**Keywords:** PEDV, S1D, vaccine, rice callus, transgenic rice.

---

---

<sup>1</sup>Technology and International relations, Hue University

<sup>2</sup>University of Education, Hue University

<sup>3</sup>Chonbuk National University, Korea

\*Email: nguyensexuanhuy@hueuni.edu.vn