

# Tạo dòng gene mã hóa cho protein vỏ miền III của virus Dengue típ 1, 2, 3, 4 vào plasmid biểu hiện pGEX-2T

Trần Thanh Loan<sup>1</sup>, Phan Thị Minh Phương<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Lương<sup>2</sup>, Alberto Alberti<sup>3</sup>

(1) Bộ môn Miễn dịch – Sinh lý bệnh, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(2) Bộ môn Công nghệ sinh học – Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

(3) Bộ môn Vi sinh và Miễn dịch học - Thú y, Đại học Sassari, Ý

## Tóm tắt

**Mục tiêu nghiên cứu:** Tạo dòng gene EDIII của mỗi típ DENV-1, 2, 3, 4 vào plasmid pGEX-2T. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Đối tượng nghiên cứu là gene EDIII của mỗi típ huyết thanh của DENV. Sau khi được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR, sản phẩm được cắt bởi cặp enzyme cắt giới hạn BamHI/EcoRI và đưa vào plasmid pGEX-2T đã được cắt bằng cặp enzyme tương tự, thông qua phản ứng gắn. Plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *Escherichia coli* (E.coli) NEB® 10-Beta để nhân dòng. **Kết quả:** Kết quả điện di sau PCR cho thấy gene EDIII của mỗi típ DENV đã được khuếch đại bởi những cặp mồi thích hợp. Kết quả điện di kiểm tra đối với các plasmid tái tổ hợp phân lập từ tế bào E.coli sau biến nạp, sau đó được cắt bởi cặp enzyme cắt giới hạn BamHI/EcoRI cho thấy gene EDIII đã được tạo dòng vào plasmid biểu hiện pGEX-2T. **Kết luận:** Gene EDIII mã hóa protein vỏ miền III của virus Dengue típ 1, 2, 3, 4 đã được tạo dòng thành công vào plasmid biểu hiện pGEX-2T.

**Từ khóa:** virus Dengue, pGEX-2T

## Abstract

# Cloning of gene coding for envelope protein domain III of dengue virus type 1, 2, 3, 4 into the plasmid pGEX-2T

Tran Thanh Loan<sup>1</sup>, Phan Thi Minh Phuong<sup>1</sup>, Nguyen Ngoc Luong<sup>2</sup>, Alberto Alberti<sup>3</sup>

(1) Department of Immunology and Pathophysiology, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(2) Department of Biochemistry, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

(3) Department of Biotechnology, Hue University of Sciences, Hue University

(4) Department of Veterinary Medicine, University of Sassari, Italy

**Objectives:** To clone gene EDIII of each type of DENV-1, 2, 3, 4 into plasmid pGEX-2T. **Subjects and methods:** EDIII gene of each serotype of DENV was amplified by PCR technique. Then the products were cut by BamHI/EcoRI restriction enzyme and inserted into pGEX-2T plasmids, which were cut with the same enzymes, through the ligation reaction. Recombinant plasmids pGEX-2T-EDIII were transformed into *Escherichia coli* (E.coli) NEB® 10-Beta for cloning. **Results:** The electrophoresis analysis after PCR indicated that the EDIII gene of each type of DENV was amplified by appropriate primers. To confirmed the successful cloning into pGEX-2T, recombinant plasmids were isolated from transformed E.coli cells, then cut by the restriction enzymes BamHI/EcoRI and analyzed by electrophoresis. The results demonstrated that EDIII genes were cloned into the plasmids pGEX-2T. **Conclusions:** Genes EDIII encodes the envelope protein domain III of Dengue virus types 1, 2, 3, and 4 were successfully cloned into plasmids pGEX-2T.

**Keywords:** Dengue virus, pGEX-2T

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sốt xuất huyết là một trong những căn bệnh lây truyền qua đường muỗi đốt quan trọng nhất hiện nay. Ước tính khoảng 2.5 tỷ người thuộc hơn 100 quốc gia đang sống trong vùng dịch tễ sốt xuất huyết [1]. Tại Việt Nam, theo Tổ chức Y tế thế giới, từ năm 2005, mặc dù tỷ lệ tử vong do sốt xuất huyết đã được kiểm soát ở mức thấp hơn 1 trên 1000 trường hợp, nhưng tỷ lệ mắc lại không giảm qua các năm. Dịch sốt xuất huyết thường xảy ra, đặc biệt vào mùa hè, đạt đỉnh từ tháng 6 đến tháng 11. Tại miền Nam, dịch sốt xuất huyết hầu như diễn ra quanh năm [2].

Virus Dengue (DENV) được truyền sang người chủ yếu qua muỗi *Aedes aegypti*. Cả bốn típ huyết thanh khác nhau của DENV, được đặt tên là DENV

-1, 2, 3, 4, thuộc họ *Flaviviridae*, đều có khả năng gây bệnh. Mỗi trường hợp nhiễm DENV với bất kỳ típ huyết thanh nào đều có thể gây ra trên người bệnh đầy đủ các triệu chứng từ nhẹ nhàng đến nghiêm trọng: từ các triệu chứng nhẹ đến sốt xuất huyết cổ điển (thể nhẹ), sốt xuất huyết chảy máu và cuối cùng là sốc xuất huyết [3]. Việc chẩn đoán sớm có vai trò quan trọng trong điều trị, dự đoán nguy cơ bùng phát dịch cũng như kiểm soát vector truyền bệnh một cách hiệu quả. Bên cạnh đó, việc phát triển vắc-xin phòng bệnh sốt xuất huyết là vô cùng cấp thiết. Cho tới nay, vẫn chưa có loại vắc-xin nào thực sự hiệu quả cho công tác dự phòng và điều trị bệnh sốt xuất huyết [4]. Vắc-xin sốt xuất huyết Dengvaxia®, được phát triển bởi Sanofi Pasteur, dù đã được thử

nghiệm tại Việt Nam nhưng chưa được chính thức cấp phép và vẫn còn nhiều vấn đề cần xem xét.

Hầu hết các đặc tính quan trọng của DENV như liên kết với thụ thể tế bào đích, phản ứng ngưng kết hồng cầu và khả năng kích thích tạo phản ứng trung hòa đều phụ thuộc vào lớp vỏ của virus. Vỏ của DENV bao gồm hai loại protein: protein E và protein M, trong đó protein E là một glycoprotein có 3 miền (I, II và III) với miền III chịu trách nhiệm cho sự gắn của virus lên tế bào đích

. Quan trọng hơn, cấu trúc của miền này có khả năng kích thích cơ thể tạo đáp ứng miễn dịch bảo vệ lâu dài kháng lại virus Dengue. Protein vỏ miền III (EDIII) mang nhiều epitope phụ thuộc cấu trúc đặc hiệu cho từng típ huyết thanh. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng protein EDIII có thể được sử dụng không chỉ như một kháng nguyên trong các chẩn đoán huyết thanh học mà còn là một ứng cử viên sáng giá cho các nghiên cứu phát triển vắc-xin dự phòng nhiễm DENV [5], [6]. Hiện nay, hầu hết các

nghiên cứu sản xuất vắc-xin Dengue tái tổ hợp đều tập trung vào ứng dụng của protein EDIII [7]. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu tạo dòng gene mã hóa cho protein EDIII của DENV típ 1, 2, 3, 4 vào plasmid biểu hiện pGEX-2T.

**2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**2.1. Đối tượng nghiên cứu**

Plasmid mang gene EDIII của mỗi típ huyết thanh của DENV được cung cấp bởi phòng thí nghiệm thuộc khoa Công nghệ sinh học, Đại học Khoa học Huế và đã được xác nhận thông qua giải trình tự.

**2.2. Phương pháp nghiên cứu**

**2.2.1. Thiết kế mồi đặc hiệu cho gene EDIII**

Mỗi cặp mồi được thiết kế để khuếch đại cho gene EDIII của mỗi típ huyết thanh của virus Dengue. Sản phẩm sau khuếch đại là chuỗi trình tự mã hóa cho gene EDIII gắn thêm chuỗi trình tự của vùng cắt giới hạn cho enzyme BamHI và EcoRI lần lượt tại đầu 5' và 3', với kích thước khoảng 312bp. Các đoạn mồi được thiết kế lần lượt có trình tự như sau:

Típ	Forward primer	Reverse primer
I	CGCGGATCCGGGATGTCATATGTGATG	CGCGGAATTCATTTCTTGAACCAGCTTAG
II	CGCGGATCCATGTCATACTCTATGTGT	CGCGGAATTCATTTCTTGAACCAGTTGAG
III	CGCGGATCCATGAGCTATGCAATGTGC	CGCGGAATTCACACTTCTGTACCAGTT
IV	CGCGGATCCATGTCATACACGATGTGC	CGCGGAATTCATTTCTTGAACCAATG

**2.2.2. Khuếch đại gene mã hóa cho protein EDIII của DENV típ 1, 2, 3, 4.**

Gene EDIII của mỗi típ huyết thanh được khuếch đại bằng PCR: hỗn hợp 50µl gồm 2µl (6ng) pladmid DNA mang gene EDIII, 0.5 µM mỗi mồi, 200 µM dNTPs, 1 đơn vị dung dịch đệm phản ứng Q5, 1 đơn vị Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs Inc.). Chu kỳ phản ứng: 98°C trong 30 giây, sau đó lặp lại 30 chu kỳ với mỗi chu kỳ: 98°C trong 10 giây, sau đó 55°C trong 10 giây và cuối cùng là 72°C trong 10 giây. Cuối phản ứng đưa về nhiệt độ 72°C trong 2 phút rồi giữ ở nhiệt độ 4°C. Sản phẩm sau khuếch đại được điện di kiểm tra trên gel agarose 1.5% có 1X thuốc nhuộm GelRed™ (Biotium Inc.), ở điện thế 80V trong 60 phút. Sản phẩm PCR với kích thước khoảng 312bp sau đó được tinh sạch bởi DNA Clean & Concentrator™-25 Kit (Catalog No D4034 – Zymo Research Corp., United States).

**2.2.3. Tạo dòng gene mã hóa cho protein EDIII của DENV típ 1, 2, 3, 4 vào plasmid biểu hiện pGEX-2T.**

Sản phẩm PCR và vector pGEX-2T được cắt bởi cặp enzyme cắt giới hạn là BamHI và EcoRI. Các sản phẩm PCR được cắt theo công thức kết hợp 28µl (khoảng 4.7µg) sản phẩm PCR mỗi típ, 4.5µl dung dịch đệm 10X CutSmart® (New England BioLab Inc.), 11.3µl nước cất miliQ và 0.6µl mỗi loại enzyme cắt.

Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Đối với vector pGEX-2T, sử dụng công thức như sau: 5µl (2µg) plasmid, 4.5µl dung dịch đệm 10X CutSmart®, 34.5µl nước cất miliQ và 0.5µl mỗi loại enzyme. Hỗn hợp cũng được ủ ở 37°C trong 2 giờ. Sau 2 giờ ủ, sản phẩm PCR đã cắt được tinh sạch bởi Kit DNA Clean and Concentrator™-25. Vector pGEX-2T đã cắt được điện di trên gel agarose 1.5% chứa 1X thuốc nhuộm GelGreen™ (Biotium Inc.) và sau đó được tinh sạch từ gel với Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Catalogue No D4008, Zymo Research Corp, USA).

Vector pGEX-2T được đề phosphoryl hóa bởi rAPid DNA Dephos and Ligation Kit (Cat. No. 04898117001, Sigma-Aldrich®) theo công thức sau: 17µl (0.51µg) plasmid, 2µl dung dịch đệm 10X rAPid Alkaline phosphatase (1), 1µl dung dịch rAPid Alkaline phosphatase (2). Hỗn hợp được trộn đều, li tâm nhẹ rồi ủ ở 37°C trong 30 phút, sau đó men rAPid Alkaline phosphatase bị bất hoạt ở 75°C trong 2 phút.

Cuối cùng, sản phẩm PCR và vector pGEX-2T đã cắt bởi hai enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI được gắn lại với nhau bởi rAPid DNA Dephos and Ligation Kit (Cat. No. 04898117001, Sigma-Aldrich®). Phản ứng gắn có tỷ lệ đoạn gene cần gắn và vector là 2:1. Công thức phản ứng là 2µl pGEX-2T, 1µl sản phẩm PCR, 5X dung dịch đệm DNA, 5µl nước cất, trộn đều, sau đó

cho vào 10 µl dung dịch đệm 2X T4 DNA, cuối cùng là 1µl T4 Ligase. Sau khi trộn đều, hỗn hợp được để ở nhiệt độ phòng trong 5 phút rồi ủ ở 16°C qua đêm.

#### 2.2.4. Biến nạp vào tế bào *E.coli* NEB® 10-Beta

Các plasmid tái tổ hợp mới tạo thành được biến nạp vào tế bào khả nạp *E.coli* NEB® 10-Beta (High Efficiency) (C3019, New England BioLabs). Lấy 50µl hỗn hợp tế bào khả nạp đã tan băng cho vào mỗi ống nghiệm ly tâm, sau đó cho 2µl plasmid DNA vào và trộn đều. Hỗn hợp được đặt ngay vào đá và ủ trong 30 phút. Tiếp theo, gây shock nhiệt tế bào trong nước nóng 42°C trong 30 giây rồi ủ ngay trở lại vào đá. Cho 250µl dung dịch môi trường SOB (Super Optimal Broth) vào mỗi ống nghiệm rồi ủ ở 37°C trong 1 giờ, lắc ngang với tốc độ 220 vòng/phút. Cuối cùng, lấy lần lượt 50µl và 100µl hỗn hợp dung dịch trong mỗi ống nghiệm trải trên đĩa LB (Luria

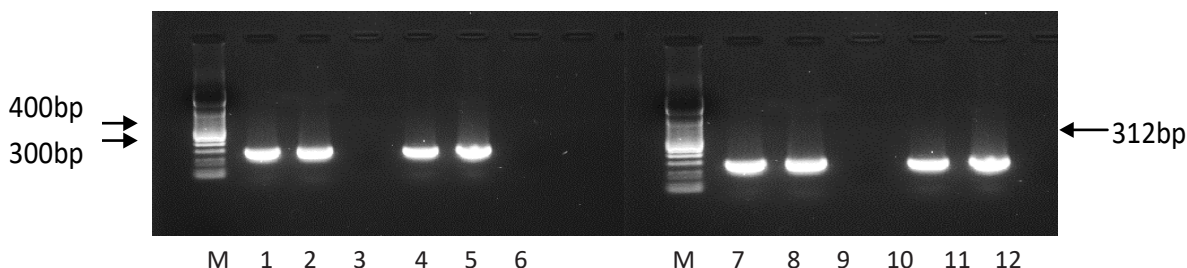
Bertani) chứa ampicillin nồng độ 100µg/ml, ủ qua đêm ở 37°C.

Để phân lập plasmid mới tái tổ hợp và xác nhận sự hình thành của plasmid tái tổ hợp mới, 2 khuẩn lạc trên mỗi đĩa được bắt và cấy vào môi trường lỏng SOB chứa ampicillin nồng độ 100µg/ml, ủ ở 37°C qua đêm, lắc ngang với tốc độ 220 vòng/phút. Sau đó thực hiện miniprep bằng Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (D4020, Zymo Research Corp., USA) để phân lập plasmid.

Plasmid tái tổ hợp sau khi phân lập được kiểm tra bằng cách cắt với hai enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI theo công thức: 5µl (khoảng 500ng) plasmid sau phân lập cho vào hỗn hợp gồm 3µl dung dịch đệm 10X CutSmart®, 21.4µl nước miliQ và 0.3µl enzyme mỗi loại. Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 2 giờ, sau đó được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 1% chứa 1X GelRed™ tại điện thế 80V trong 60 phút.

### 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### 3.1. Khuếch đại gene EDIII bằng PCR



Hình 1. Sản phẩm PCR khuếch đại gene EDIII của virus Dengue típ 1, 2, 3 và 4.

M: 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen™).

Cột 1, 2: Sản phẩm PCR của gene EDIII DENV típ 1; Cột 3: chứng âm.

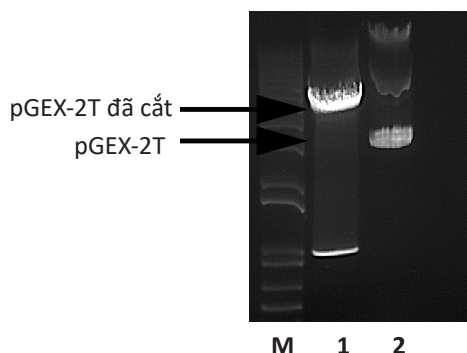
Cột 4, 5: Sản phẩm PCR của gene EDIII DENV típ 2; Cột 6: chứng âm.

Cột 7, 8: Sản phẩm PCR của gene EDIII DENV típ 3; Cột 9: chứng âm.

Cột 10, 11: Sản phẩm PCR của gene EDIII DENV típ 4; Cột 12: chứng âm.

Sản phẩm sau khuếch đại có kích thước khoảng 312bp khi phân tích trên thạch điện di, tương ứng với kích thước của gene EDIII. Kết quả trên cho thấy gene EDIII của cả 4 típ huyết thanh của virus Dengue đều đã được khuếch đại bằng PCR.

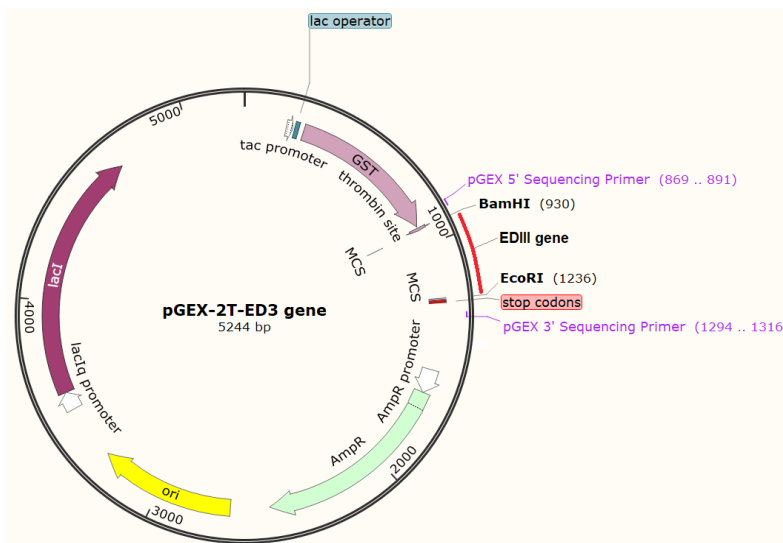
#### 3.2. Tạo dòng gene EDIII vào plasmid pGEX-2T



Hình 2. Plasmid pGEX-2T được cắt bởi 2 enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI.

M: 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen™); Cột 1: plasmid pGEX-2T được cắt bởi 2 enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI; Cột 2: plasmid pGEX-2T (4948bp).

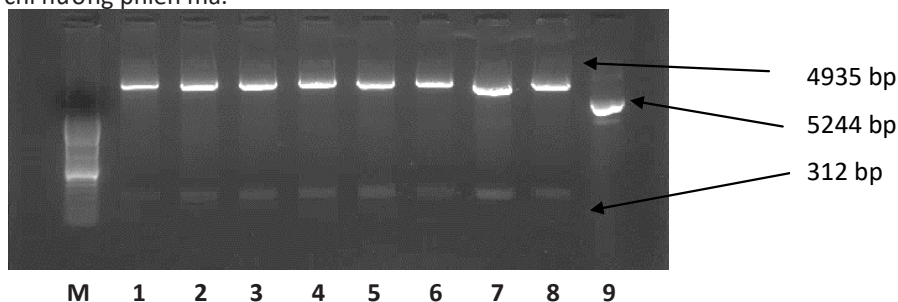
Plasmid pGEX-2T sau khi cắt được duỗi thẳng ở dạng chuỗi nên di chuyển chậm hơn so với plasmid không cắt có dạng vòng trong thạch điện di. Đoạn plasmid đã cắt sau đó được tinh sạch để tạo plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp.



**Hình 3.** Sơ đồ plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp.

Trong plasmid này, gene EDIII được tạo dòng vào giữa hai vị trí cắt của enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI lần lượt tại đầu 5' và 3' và gắn vào đuôi C-terminal của gene GST. Lac operator bị ức chế trong E.coli khi có mặt chất ức chế Lac. Sự có mặt của Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) sẽ cạnh tranh với chất ức chế Lac và giải phóng hoạt động cho Lac operator, kích thích phiên mã gene GST – EDIII.

Các chữ viết tắt khác là: LacI: gene ức chế Lac; Amp<sup>r</sup>: chất đánh dấu Ampicilline; Ori: trình tự khởi đầu phiên mã. Các mũi tên chỉ hướng phiên mã.



**Hình 4.** Plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp phân lập từ tế bào E.coli NEB10 beta được cắt bởi 2 enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI.

M: 100bp DNA ladder (Invitrogen™).

Cột 1, 2: plasmid pGEX-2T-EDIII gene - **típ 1** được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 3, 4: plasmid pGEX-2T-EDIII gene - **típ 2** được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 5, 6: plasmid pGEX-2T-EDIII gene - **típ 3** được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 7, 8: plasmid pGEX-2T-EDIII gene - **típ 4** được cắt bởi BamHI và EcoRI.

Cột 9: plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp.

Plasmid không cắt có dạng vòng nên di chuyển nhanh hơn plasmid đã cắt được duỗi thẳng trong gel agarose, giải thích cho kết quả điện di này. Các plasmid đã cắt (dạng chuỗi) (cột 2-9) không di chuyển nhanh bằng plasmid không cắt dạng vòng (cột 10) trong thạch điện di ngay cả khi chúng có

trọng lượng phân tử thấp hơn. Gen EDIII có trọng lượng phân tử nhỏ nhất do đó di chuyển nhanh nhất trong gel (Hình 3.4). Các gene EDIII của 4 kiểu huyết thanh DENV đã được tạo dòng vào các vector biểu hiện pGEX-2T để tạo ra các plasmid tái tổ hợp pGEX-2T-EDIII với kích thước khoảng 5,2 kb. Các vector này

đã được biến nạp vào tế bào *E.coli* NEB® 10-Beta để nhân dòng. Plasmid tái tổ hợp được phân lập từ các tế bào *E.coli* NEB® 10-B được cắt bởi các enzyme hạn chế (BamHI / EcoRI) và được hiển thị bằng điện di trên gel agarose (Hình 3.4). Kích thước của gene EDIII khoảng 312 bp, tương ứng với kích thước của đoạn được cắt từ plasmid tái tổ hợp trên kết quả điện di, chứng minh rằng việc tạo dòng đã thành công.

#### 4. BÀN LUẬN

Gene EDIII mã hóa cho protein vỏ miền III của virus Dengue của các tít huyết thanh, với kích thước trung bình khoảng 312bp, đã được khuếch đại bằng PCR. Sản phẩm sau khuếch đại được cắt bởi 2 enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI lần lượt tại đầu 5' và 3' của gene, sau đó được tạo dòng vào plasmid biểu hiện pGEX-2T để thu được plasmid tái tổ hợp pGEX-2T-EDIII. Plasmid tái tổ hợp, sau khi

biến nạp vào *E.coli* NEB® 10-B để nhân dòng, được phân lập và cắt bởi BamHI và EcoRI. Kết quả phân tích điện di cho thấy plasmid tái tổ hợp sau khi cắt tạo ra một đoạn trình tự kích thước 312bp, xác nhận rằng gene EDIII đã được chèn vào plasmid pGEX-2T. Plasmid pGEX-2T-EDIII tái tổ hợp được giải trình tự và so sánh với kết quả giải trình tự gene EDIII trước đó, cho thấy sự tương đồng 100% giữa cả hai chuỗi. Plasmid tái tổ hợp được dự đoán sẽ mã hóa một protein khoảng 104 acid amin, là protein vỏ miền III của DENV với trọng lượng phân tử là 16 kDa, hợp nhất với protein GST với trọng lượng phân tử là 28 kDa tại đuôi N-terminal của protein EDIII.

#### 5. KẾT LUẬN

Gene EDIII mã hóa protein vỏ miền III của virus Dengue tít 1, 2, 3, 4 đã được tạo dòng thành công vào plasmid biểu hiện pGEX-2T.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. S. Hasan, S. Jamdar, M. Alalowi, and S. Al Ageel Al Beajji, "Dengue virus: A global human threat: Review of literature," *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.*, vol. 6, no. 1, p. 1, 2016.
2. D. Le Quyen *et al.*, "Epidemiological, serological, and virological features of dengue in Nha Trang City, Vietnam," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 98, no. 2, pp. 402–409, 2018.
3. S. Kalayanarooj, "Clinical Manifestations and Management of Dengue/DHF/DSS," *Trop. Med. Health*, vol. 39, no. 4SUPPLEMENT, pp. S83–S87, 2011.
4. H. Fahimi, M. Mohammadipour, and H. H. Kashani, "Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines," pp. 2977–2996, 2018.
5. J. P. Babu, P. Pattnaik, N. Gupta, A. Shrivastava, M. Khan, and P. V. L. Rao, "Immunogenicity of a recombinant envelope domain III protein of dengue virus type-4 with various adjuvants in mice," *Vaccine*, vol. 26, no. 36, pp. 4655–4663, 2008.
6. S. Jaiswal, N. Khanna, and S. Swaminathan, "High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 33, no. 1, pp. 80–91, 2004.
7. M. Wang, S. Jiang, and Y. Wang, "Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*," *Bioengineered*, vol. 7, no. 3, pp. 155–165, 2016.