

# BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH PROTEIN CAPSID CỦA VIRUT CHIKUNGUNYA TRÊN HỆ *E. COLI*

Vũ Xuân Nghĩa\*; Nguyễn Thu Thủy\*; Axel Rethwilm\*\*

## TÓM TẮT

Để phát triển test chẩn đoán huyết thanh học virus *Chikungunya* (CHIKV), protein capsid tái tổ hợp của CHIKV được biểu hiện trên hệ *E. coli* và tinh sạch bởi Ni-NTA matrix. Sau đó, đánh giá protein tái tổ hợp bằng SDS-PAGE nhuộm Coomassie blue và Western blot với kháng thể kháng HIS-Tag.

\* Từ khóa: Virus *Chikungunya*; Protein tái tổ hợp; *E. coli*.

## PURIFYING CHIKUNGUNYA VIRUS CAPSID PROTEIN ON *E. COLI* EXPRESSION SYSTEM

### SUMMARY

To develop a CHIKV-specific diagnostic test, CHIKV capsid protein was expressed using an *E. coli* expression system and purified by the Ni-NTA matrix. Then, the recombinant CHIKV capsid protein was evaluated by Coomassie blue stained SDS-PAGE and Western blot using anti-HIS-Tag antibodies.

\* Key words: Virus *Chikungunya*; Recombinant protein; *E. coli*.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus *Chikungunya* (CHIKV) là *Alphavirus*, thuộc họ *Togaviridae*. CHIKV gây dịch sốt xuất huyết với biểu hiện: sốt cao, phát ban và đau đa khớp [4]. CHIKV truyền bệnh thông qua vector là muỗi *A. aegypti* và *A. albopictus* [1, 2]. Genome của CHIKV có độ lớn khoảng 12 kb chứa gen mã hóa cho protein không cấu trúc và protein cấu trúc. Protein cấu trúc gồm capsid protein và hai protein vỏ E1, E2 [5]. Protein tái tổ hợp có nhiều ưu thế và được ứng dụng rộng rãi trong chẩn đoán huyết thanh. Bởi vậy, trong nghiên cứu này, protein tái tổ hợp capsid của CHIKV

được biểu hiện trên hệ *E. coli* và tinh sạch bởi Ni-NTA nhằm ứng dụng trong chẩn đoán huyết thanh học CHIKV.

### ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

\* Vector và hệ biểu hiện protein tái tổ hợp: thiết kế vector biểu hiện khi gen mã hóa capsid protein có độ lớn 781 bp (bảng 1) được gắn vào vector pET200/D (invitrogen) tạo vector biểu hiện pET200/D-recombinant capsid protein. Vector được biến nạp vào tế bào BL21 star để biểu hiện protein capsid tái tổ hợp.

\* Học viện Quân y

\*\* Đại học Tổng hợp Wuerzburg-CHLB Đức

Phản biện khoa học: PGS. TS. Nguyễn Thái Sơn

PGS. TS. Trần Văn Khoa

Bảng 1: Gen mã hóa capsid protein.

PRIMERS	SEQUENCES (5'-3')	SẢN PHẨM PCR
C-7567s	CACCATGGAGTTCATCCCAACCC	781 bp
C-8350as	CTACCACTCTTCGGCTCCCTCAG	

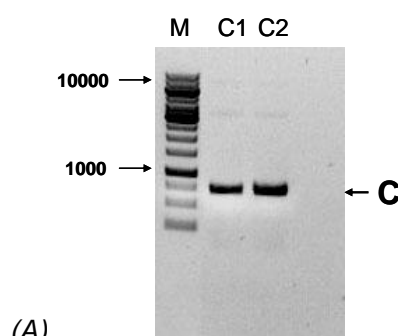
\* **Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp:** vector *pET200/D-recombinant capsid protein* được biến nạp vào tế bào BL21 star, nuôi tế bào trong 50 ml môi trường LB với Kanamycine 50 µg/ml qua đêm ở 37°C trên máy lắc. Ngày hôm sau, pha dung dịch nuôi cấy với LB-Kana-medium mới và tiếp tục nuôi đến giá trị OD<sub>600</sub> = 0,6. Để biểu hiện protein, cho IPTG vào dung dịch nuôi cấy với nồng độ cuối 1 mM. Thu vi khuẩn sau 4 giờ và bị phá hủy bởi buffer B (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8.0). Ly tâm dung dịch tế bào trong 30 phút, 13.000 rpm trên máy siêu ly tâm Rotor SS34, loại phần cặn tế bào không hòa tan. Trộn phần nước nổi chứa protein tái tổ hợp với Ni-NTA-Agarose beads, tỷ lệ 1:10. Rửa hỗn dịch với 4 ml buffer C (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 6.3) và protein tái tổ hợp được tách tinh sạch bằng 0.5 ml buffer D (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 5.9) và buffer E (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 4.5). Phân tích protein tái tổ hợp bằng SDS-PAGE nhuộm Coomassie blue và Western blot khi sử dụng monoclonal anti-HIS-antibodies.

\* **Western blot:** chạy protein tái tổ hợp trên SDS-PAGE và nhuộm Coomassie blue. Protein sau khi phân tích trên SDS-PAGE, điện di chuyển sang màng nitrocellulose. Ủ màng với PBS 2% sữa và kháng thể kháng HIS-Tag 1:10000. Sau 1 giờ, rửa sạch màng và ủ với HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibodies theo tỷ lệ 1:10.000 ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Phát hiện protein bằng Biomax films (Kodak) chemiluminescence (ECL kit, Amersham).

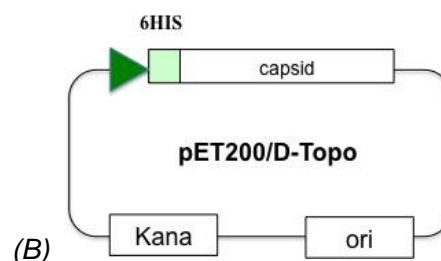
## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

### 1. Vector biểu hiện protein.

Dựa trên khuôn ARN của virus, tổng hợp cADN đoạn gen mã hóa *protein capsid* bằng phản ứng RT-PCR. Gắn sản phẩm ADN 781 bp vào vector biểu hiện pET200/D-Topo. Vector này được sử dụng biểu hiện *protein capsid* tái tổ hợp. Protein tái tổ hợp có kích thước khoảng 45 kDal, bao gồm protein được mã hóa bởi 6HIS đặt tại N-terminal và protein capsid (hình 1).



(A)



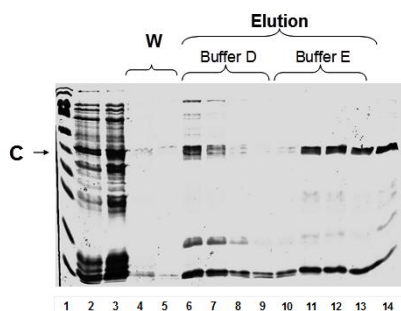
(B)

Hình 1: (A). Sản phẩm PCR của gen mã hóa protein capsid; M: Thang ADN chuẩn 100bp; C, C1, C2: Sản phẩm PCR gen mã hóa protein capsid. (B) sơ đồ vector biểu hiện protein tái tổ hợp: pET200/D-Topo: vector biểu hiện protein; 6HIS, capsid: Gen mã hóa protein tái tổ hợp capsid và histag.

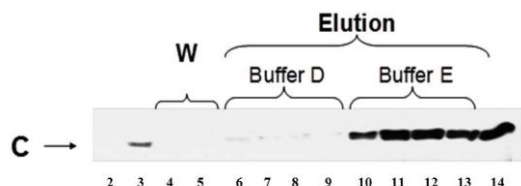
### 2. Biểu hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp.

Biến nạp vector *pET200/D-recombinant capsid protein* vào BL21 star, tạo hệ biểu hiện protein. Để tối ưu hóa quy trình biểu hiện, tiến hành hệ biểu hiện ở qui mô nhỏ (pilot). Kết quả cho thấy, hệ biểu hiện protein tốt nhất tại thời điểm 4 giờ sau kích hoạt bằng IPTG 1 mM và protein tái tổ hợp ở dạng không

hòa tan. Bởi vậy, tinh sạch protein thực hiện theo phương pháp biến tính protein. Quá trình tinh sạch thu được các phân đoạn protein. Toàn bộ phân đoạn protein tái tổ hợp được phân tích bởi SDS-PAGE nhuộm Coomassie blue (hình 2) và Western blot (hình 3).



Hình 2: Protein tái tổ hợp capsid được phân tích bằng Coomassie blue stained PAGE. Bacteria được phá vỡ trước và sau kích hoạt IPTG (đường 2, 3); phân đoạn rửa (đường 4 - 5) và các phân đoạn tách protein với buffer D (đường 6 - 9); buffer E (đường 10 - 13). Cặn Ni-NTA (đường 14). Đường 1: protein marker.



Hình 3: Phân tích các phân đoạn tinh sạch bằng Western blot với monoclonal His-tag antibody hòa tan trong PBS 1:10000.

Cả 2 phương pháp phân tích cho thấy: các băng protein đều phù hợp với kích thước của protein capsid tái tổ hợp. Tách protein bắt đầu ra khỏi hỗn dịch trong hai phân đoạn đầu tiên khi sử dụng buffer D nhưng chưa nhiều. Khi tách với buffer E, protein tái tổ hợp tách nhiều và tập trung vào các phân đoạn cuối của quá trình tách (đường 10 - 13, hình 3). Đáng chú ý, protein tái tổ hợp không xuất hiện ở phân đoạn rửa trước khi tách khỏi hỗn hợp (đường 4 và 5). Trong quá trình tinh sạch với buffer D cũng xuất hiện

những băng không phù hợp (protein của *E.coli* không đặc hiệu, đường 6 - 8, hình 2). Nhưng đến các phân đoạn sau (đường 11 - 13, hình 2) protein khá sạch và đặc hiệu.

## KẾT LUẬN

Protein tái tổ hợp capsid của CHIKV được biểu hiện thành công trên hệ *E.coli* và được tinh sạch theo phương pháp biến tính protein. Kết quả này mở ra hướng nghiên cứu, phát triển kit chẩn đoán huyết thanh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Xuân Nghĩa, Phạm Đức Minh. Nghiên cứu và thiết kế vector biểu hiện protein capsid của virus *Chikungunya* trên hệ *E.coli*. Y học Việt Nam. 2012, No.2, tr.76-78.
2. Bodenmann. P, Genton. B. *Chikungunya*: an epidemic in real time. Lancet 368, 258. Clinical burden of *chikungunya* virus infection. Lancet Infect. 2006, Dis. 8, pp.2-3.
3. Mourya. D.T, Yadav. P. Vector biology of dengue & chikungunya viruses. Indian. 2006.
4. Queyriaux. B., Simon. F, Grandadam. M., Michel. R., Tolou. H., Boutin. J.P, 2008.
5. Simizu. B, Yamamoto. K, Hashimoto. K, Ogata. T. Structural proteins of *Chikungunya* virus. J Virol. 1984, 51, pp.254-258.

**Ngày nhận bài: 16/3/2012**  
**Ngày giao phản biện: 1/6/2012**  
**Ngày giao bản thảo in: 26/7/2012**