

NGHIÊN CỨU THIẾT KẾ VECTOR VÀ BIỂU HIỆN PROTEASE CỦA VIRUS CHIKUNGUNYA TRÊN HỆ E.COLI

VŨ XUÂN NGHĨA, NGUYỄN THU THỦY

TÓM TẮT

Virus Chikungunya (CHIKV) là một alphavirus gây ra các vụ dịch sốt xuất huyết với các biểu hiện sốt, phát ban, viêm đa khớp ở Châu Phi và Châu Á. Những enzyme được mã hóa bởi virus, nsP2-protease có vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của virus, bởi vậy đây là protein đích để phát triển ứng dụng các thuốc mới trong điều trị virus. Trọng lượng phân tử của nsP2-protease khoảng 45 kDa hoạt động như enzyme papain và thuộc phân C-terminal của nsP2. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa protein nsP2-protease được thiết kế và biểu hiện tốt trên hệ E.coli và định hướng ứng dụng trong kiểm định thuốc kháng virus.

SUMMARY

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus that causes epidemic fever, rash and polyarthralgia in Africa and Asia. Among the virus-encoded enzymes, nsP2-protease is an essential enzyme whose proteolytic activity is critical for virus replication, so it is an attractive target for the development of antiviral drugs. It is a protein of approximately 45 kDa and the papain-like protease activity resides in the C-terminal portion of the nsP2 protein. In this study, a recombinant CHIKV nsP2pro were well expressed in Escherichia and for further may be useful for future drug screening.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Virus Chikungunya (CHIKV) là một alphavirus gây ra các vụ dịch sốt xuất huyết với các biểu hiện sốt, phát ban, viêm đa khớp ở Châu Phi và Châu Á. Mặc dù, nó được phân lập từ những năm 50 nhưng những báo cáo về đặc điểm dịch tễ cũng như lâm sàng trong vụ dịch gần đây ở Ấn Độ Dương, khu vực Đông Nam Châu Á và đặc biệt ở nước ta báo động của một mặt bệnh mới. Nhiều bệnh cảnh lâm sàng diễn biến nặng cho thấy nhấn sự thiếu hụt các phương pháp điều trị virus một cách hiệu quả. Cấu trúc của CHIKV bao gồm các protein tham gia cấu trúc và các protein không tham gia cấu trúc. Trong những protein không tham gia cấu trúc, protein nsP2-protease có vai trò quan trọng trong quá trình nhân lên của virus. Để nghiên cứu và phát triển các thuốc chống virus, hầu hết các thuốc đều được thử nghiệm trên mô hình ức chế protease. Bởi vậy, protein nsP2-proteasae là một trong những đích thử nghiệm nhằm phát triển ứng dụng các thuốc mới trong điều trị virus. Protein nsP2-proteasae là một enzyme có nhiều chức năng, trọng lượng phân tử khoảng 45 kDa hoạt động như enzyme papain và thuộc phân C-terminal của nsP2. Để thu được protein nsP2-protease, trong nghiên cứu này, gen mã hóa protein nsP2-protease được thiết kế và biểu hiện trên

hệ E.coli. Kết quả cho thấy, khả năng biểu hiện của protein này là rất tốt, mở ra triển vọng xây dựng mô hình ứng dụng kiểm định thuốc kháng virus.

CHẤT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Tạo vector biểu hiện CHIKV protein nsP2-protease tái tổ hợp.

Tách dòng gen mã hóa CHIKV protein nsP2-protease protein: CHIKV-Wue1 được nuôi cấy và phân lập từ tế bào muỗi C6/36. Toàn bộ Genome của CHIKV được tách chiết bởi kit RNeasy mini kit (Qiagen, Đức). ứng dụng kỹ thuật RT-PCR tổng hợp cDNA của đoạn gen mã hóa protein nsP2-protease. Trình tự mỗi tham gia phản ứng: nsP2-protease-s 5'-CACCACACTTTCGGCGACCCGTG-3'; nsP2-protease-as 5'-CTAACATCCTGCTCGGGTGACCTG-3'; Phản ứng RT-PCR được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất với một số thay đổi để tối ưu hóa điều kiện phản ứng. Thành phần tham gia phản ứng RT-PCR bao gồm: 5x Qiagen Onestep RT-PCR buffer x 5 μ l, dNTP 10mM/ μ l x 0,4 μ l, cặp mỗi 10pmol/ μ l x 1 μ l (mỗi primer), enzyme taq-polymerase x 2,5U, RNA của virus và nước khử ion RNAfree vừa đủ 50 μ l. Chu trình nhiệt được thực hiện theo 45 C trong 45 phút cho chuyển đổi từ RNA sang cDNA. Tiếp đến là 95°C trong 2 phút và 40 vòng của các giai đoạn: đun xoắn ở 94 °C trong 30 s, bám mỗi 55 °C trong 1 phút, kéo dài 72°C trong 1 phút. Cuối cùng là giai đoạn kéo dài 72°C trong 10 min. Sau khi nhân lên, sản phẩm PCR được chạy trên Agarose Gel 1,2% ở 100v và được chụp trên hệ thống máy đọc gel.

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCRII topo (Invitrogen, Germany), sau đó gen mã hóa cho protein nsP2-protease được gắn vào vector biểu hiện protein pET200/D (Invitrogen, Germany). Kết quả, plasmid pET200/D- nsP2protease được sử dụng biểu hiện protein tái tổ hợp của virus.

2. Biểu hiện và phân tích protein nsP2-protease tái tổ hợp.

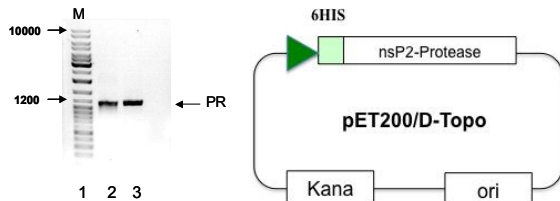
Biến nạp plasmid vào tế bào BL21 star, nuôi cấy tế bào trên đĩa thạch LB chứa kháng sinh kanamycine (50 μ g/ml) qua đêm. Lấy một colony đơn lẻ cho vào 3ml dung dịch LB chứa kháng sinh kanamycine (50 μ g/ml). Lắc ủ qua đêm ở 37°C. Ngày hôm sau, lấy 500 μ l cho vào 10ml dung dịch LB chứa Kanamycine. Lắc, ủ ở 37°C trong 2 giờ đến khi đạt mid-log (OD₆₀₀ là 0.5-0.7). Cho IPTG với nồng độ cuối cùng là 1mM vào dung dịch nuôi cấy. Tại các thời điểm 0, 2, 4 giờ lấy 1ml dung dịch tế bào, phát hủy tế bào bằng siêu âm. Dịch phân hủy được ly tâm, phần nước nổi và phần cặn tế bào được phân tích bằng SDS-PAGE khi nhuộm coomassie blue và Western blot sử dụng kháng thể kháng HIS-Tag.

KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Tách dòng và tạo vector biểu hiện protein nsP2-protease tái tổ hợp.

Dựa trên khuôn RNA của virus, cDNA đoạn gen mã hóa protein nsP2-protease được tổng hợp bằng phản ứng RT-PCR. Sản phẩm là đoạn DNA có kích thước khoảng 1100bp (hình 1).

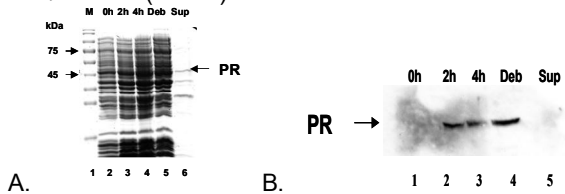
Gen mã hóa protein nsP2-protease được khuếch đại và gắn vào vector pCRII. Trình tự của gen mã hóa được xác định qua giải trình tự. Sau đó, gen mã hóa tiếp tục được gắn vào vector pET200/D. Vector này được sử dụng biểu hiện protein nsP2-protease tái tổ hợp.



Hình 1: Sản phẩm PCR của gen mã hóa protein nsP2-protease và sơ đồ vector biểu hiện protein tái tổ hợp

2. Biểu hiện protein tái tổ hợp nsP2-protease

Plasmid pET200/D- nsP2protease được biến nạp vào E.coli BL21 star và biểu hiện protein tái tổ hợp. Biểu hiện protein được phân tích bởi SDS-PAGE và Western blot (Hình 2)



Hình 2: (A). Protein tái tổ hợp nsP2protease được phân tích bằng SDS-PAGE. Lane 1: Protein marker; lane 2,3,4: protein biểu hiện sau 0, 2, 4 giờ; lane 5: protein có trong cận tế bào; lane 6: protein trong nước nổi.

(B). Protein tái tổ hợp nsP2protease được phân tích bằng Western blot. Lane 1, 2, 3: protein biểu hiện sau 0, 2, 4 giờ; lane 4: protein có trong cận tế bào; lane 5: protein trong nước nổi.

Protein tái tổ hợp sau khi biểu hiện được phân tích bằng SDS-PAGE nhuộm Coomassie blue. Kết quả cho thấy, protein tái tổ hợp được biểu hiện sau 2, 4 giờ khi cho IPTG vào trong dịch nuôi. Nhưng biểu hiện rõ nhất là sau 4 giờ ở lane 4(A). Trong dịch cận tế bào và dịch nổi, protein tái tổ hợp có nhiều trong dịch cận tế bào, trong khi đó trong dịch nổi có rất ít. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn, protein tái tổ hợp được phát hiện bằng phương pháp Western blot sử dụng kháng thể kháng HIS-Tag. Kết quả cho thấy tương tự như SDS-PAGE. Đặc biệt, trong dịch nổi không phát hiện protein tái tổ hợp.

Điều này cho thấy, Protein tái tổ hợp nsP2protease khi được biểu hiện trên hệ E.coli là protein không hòa tan và biểu hiện rõ nhất tại thời điểm sau 4 giờ gây kích hoạt bằng IPTG.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã thành công thiết kế vector biểu hiện Protein tái tổ hợp nsP2protease trên hệ E.coli BL21 Star. Plasmid này biểu hiện protein tái tổ hợp mạnh nhất tại thời điểm sau 4 giờ kích hoạt bằng IPTG.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adebajo, A. O. (1996). Rheumatic manifestations of tropical diseases. *Curr Opin Rheumatol* 8, 85–89.
2. Campos, L.E. et al. (1969). Isolation of chikungunya virus in the Philippines. *Acta Med. Philippina* 5, 152–155.
3. Chastel C (2005). Chikungunya virus: its recent spread to the southern Indian Ocean and Reunion Island (2005–2006). *Bull Acad Natl Med* 189:1827–1835.
4. Hardy, W.R., Strauss, J.H., (1989). Processing the nonstructural polyproteins of Sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in *cis* and in *trans*. *J. Virol.* 63, 4653–4664.
5. Panning M, Grywna K, van Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C (2007). Chikungunya fever in travellers returning from the Western Indian Ocean in 2006. *Emerg Infect Dis.*