

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH CYTOKINES CỦA PROTEIN TÁI TỔ HỢP INTERLEUKIN-2 TRÊN TẾ BÀO ĐẠI THỰC BÀO

Trương Anh Đức^{1*}, Trần Thị Thanh Hà¹, Nguyễn Thị Huyền¹, Chu Thị Như¹,
Nguyễn Thị Chinh¹, Hoàng Văn Tuấn¹, Lý Đức Việt¹, Đặng Vũ Hoàng¹, Yeong Ho Hong²

¹Bộ môn Hóa sinh - Miễn dịch, Viện Thú y Quốc gia

²Khoa Công nghệ sinh học động vật, Trường Đại học Chung Ang, Anseong, Hàn Quốc

*Tác giả liên hệ: truonganhduc84@gmail.com

Ngày nhận bài: 20.11.2019

Ngày chấp nhận đăng: 16.06.2020

TÓM TẮT

Interleukin-2 (IL-2) là một cytokine đa chức năng, đóng vai trò điều hòa sự nhân lên, biệt hóa và điều hòa miễn dịch của nhiều loại tế bào và vật chủ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ đồng hóa gene mã hóa cho IL-2 của gà, biểu hiện protein tái tổ hợp IL-2 của gà và đánh giá hoạt tính sinh học của protein tái tổ hợp IL-2 trên tế bào dòng đại thực bào. Gen mã hóa cho protein IL-2 của gà (mã số AF000631 trên Ngân hàng gen quốc tế) được tái tổ hợp cùng tín hiệu Trx-Tag thioredoxin với trình tự nhận biết của hai enzyme hạn chế *EcoRI* ở đầu 5' và *HindIII* ở đầu 3', được đưa vào véc tơ tách dòng pCR2.1-TA. Sau đó toàn bộ đoạn DNA được chuyển vào vị trí *EcoRI*-*HindIII* của véc tơ biểu hiện pET32a(+) để tiến hành biểu hiện protein tái tổ hợp của gen IL-2 trong vi khuẩn *E. coli* BL21. Kết quả cho thấy đã biểu hiện thành công protein tái tổ hợp IL-2 của gà trên hệ thống *E. coli*. Protein IL-2 của gà tái tổ hợp không sản sinh độc tố tế bào, có khả năng kích thích sự nhân lên và sinh trưởng của tế bào dòng đại thực bào của gà. Protein IL-2 tái tổ hợp của gà kích thích tế bào dòng đại thực bào sản sinh IFN γ , IL-1 β và IL-6 mRNA. Kết quả nghiên cứu cho thấy protein IL-2 tái tổ hợp của gà có hoạt tính sinh học tự nhiên, được nhận diện bởi kháng thể kháng IL-2.

Từ khóa: *Escherichia coli*, Interleukin-2, gà, cytokines, protein tái tổ hợp.

Study on Expression of Chicken Interleukin 2 Recombinant Protein and its Modulate Cytokines Production in Macrophage Cell Line

ABSTRACT

Interleukin-2 is a multifunctional cytokine, which modulates the proliferation and differentiation of various types of cells and induces cytokines expression. In this study, chicken IL-2 will be cloned, expressed and its functional characterization was evaluated in Macrophage (HD11) cell line. Genes coding for IL-2 (AF000631 from GenBank) linked with Trx-Tag thioredoxin leader and restriction sequences of *EcoRI* (5'end), *HindIII* (3'end) were cloned and then ligated into a cloning vector pCR2.1-TA. Chicken IL-2 gene was incorporated into pET32a(+) at restriction sites for the expression of the IL-2 gene in *E. coli* BL21. Chicken IL-2 recombinant protein produced in *E. coli* system showed that it did not produce cytotoxicity and enhanced the proliferation of macrophage (HD11) cell line and induced IFN γ , IL-1 β and IL-6 mRNA expression. These results showed that recombinant chicken IL-2 protein production in *E. coli* system was possessed natural biological properties and was recognized by specific antibodies against IL-2.

Keywords: *Escherichia coli*, Interleukin-2, chicken, cytokines, recombinant protein.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Interleukin-2 (IL-2) được sản xuất bởi các

đại thực bào, các tế bào T lympho (CD4⁺ T, CD8⁺ T), tế bào Natural killer (NK) và tế bào đuôi gai được kích hoạt (Itoh & cs., 1985; Mamontov &

cs., 2019; Reichert & cs., 1999). IL-2 đóng vai trò trong miễn dịch và tự miễn của cơ thể; kích thích sản xuất IFN- α dẫn đến sự biệt hóa của các tế bào T trợ giúp (T helper) để trở thành các tế bào Th1, Th2, Th17 và kích thích sản sinh kháng thể chủ động. IL-2 được phát hiện lần đầu trên người năm 1976, có chức năng kích thích sự phân chia tế bào (mitose) của T lympho người và hỗ trợ cho sự phát triển tiếp theo của T lympho trong nuôi cấy trong phòng thí nghiệm (Kawano & Noma, 1996; Lauener & cs., 1995; Morgan & cs., 1976; Toren & cs., 1995). Sự kiện phát hiện ra IL-2 mà lúc đầu người ta gọi là yếu tố phát triển tế bào T lympho (T cell growth factor) là một tiến bộ bước ngoặt về miễn dịch, vì lần đầu tiên mở ra nghiên cứu các cá thể của tế bào T và vai trò của nó trong quan hệ với tế bào B, đại thực bào và tế bào NK (Greene & cs., 1986; Rey & cs., 1984). Nhiều nghiên cứu đã chứng minh, IL-2 được sản xuất từ tế bào T lympho khi có kích thích của kháng nguyên. Tuy nhiên, trong một số điều kiện nhất định, tế bào B và NK cũng sản xuất IL-2, nhưng lượng sản xuất ra rất thấp. Khi T lympho được kích thích khoảng 4 giờ sau có thể phát hiện thấy IL-2 và đỉnh cao là sau 12 giờ (Mamontov & cs., 2019; Piscitelli & Minor, 1995).

Sự hoạt động của IL-2 thông qua hệ thống IL-2 receptor complex bao gồm 03 chuỗi: IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) và IL-2R γ (CD132) và điều khiển miễn dịch thông qua một số con đường miễn dịch chính (immune signaling pathways) như JAK-STAT, PI3K/Akt/mTOR và MAPK/ERK, qua đó kích thích tế bào, cơ thể sản sinh miễn dịch chủ động, sản xuất các lymphokin như TNF γ , TNF α , TGF β , sản xuất các yếu tố kích thích phát triển B lympho như IL-4, IL-6, các yếu tố kích thích sinh máu như IL-3, IL-5, GM-CSF (Kampa & Burnside, 2002). Hiện nay, protein tái tổ hợp IL-2 được sử dụng như một loại thuốc làm chất dẫn trong việc kích thích miễn dịch điều trị ung thư, như ung thư tế bào thận, melanoma, bệnh phong, leukemia dòng T lympho hoặc làm tăng miễn dịch chủ động của cơ thể (McMillan & cs., 1995; Piscitelli

& Minor, 1995; Reichert & cs., 1999; Toren & cs., 1995).

Trên gà, IL-2 lần đầu tiên được dòng hóa và xác định chức năng năm 1997 (Sundick & Gill-Dixon, 1997), vai trò của IL-2 trên gà cũng tương tự trên động vật như tăng hoạt hóa tế bào, kích thích sự phát triển tế bào lympho T, B và kích thích vật chủ sản sinh kháng thể chủ động chống lại các tác nhân gây bệnh như bệnh Newcastle và cúm gia cầm (Susta & cs., 2015; Szatraj & cs., 2014). Trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ dòng hóa gene mã hóa cho IL-2 của gà, biểu hiện protein tái tổ hợp IL-2 của gà bằng hệ thống *E. coli*, đồng thời kiểm tra tính độc cũng như khả năng kích thích sản sinh một số cytokines của protein IL-2 tái tổ hợp trên tế bào dòng đại thực bào (HD11) của gà.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Plasmid pCR2.1-TA do hãng Invitrogen sản xuất được sử dụng làm véc tơ tách dòng trong tế bào *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, Hoa Kỳ). Plasmid pET32a(+) do hãng Novagen sản xuất được sử dụng làm véc tơ biểu hiện protein trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen, Hoa Kỳ).

- Enzyme hạn chế *EcoRI*, *HindIII*, DNA marker, protein thang chuẩn, T4-DNA ligase, Trizol tách chiết RNA, môi trường nuôi cấy tế bào DMEM và IPTG của hãng Invitrogen (Hoa Kỳ).

- Kít tách chiết protein B-PER bacterial protein extraction, cột sắc khí Ni-NTA resin, màng thẩm tích SnakeSkinTM dialysis tubing, cơ chất phát triển màu Western Lightning Plus-ECL, tổng hợp cDNA bằng Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit của hãng Thermo Science (Hoa Kỳ).

- Các hóa chất, sinh phẩm khác: kháng thể His-Taq được gắn HPR (Abcam, Hoa Kỳ), SYBR Green Master Mix (Roche, Hoa Kỳ), QIAQuick gel extraction kit (QIAGEN, Đức).

Tế bào dòng đại thực bào HD11 và kháng thể đơn dòng kháng IL-2 (Mouse Anti-Chicken IL-2) của gà được cung cấp bởi GS Yeong Ho Hong, Đại học Chung-Ang, Hàn Quốc.

2.2. Tách RNA tổng số và sinh tổng hợp cDNA

Mẫu mô lách của gà bảo quản -80°C được lấy ra, nghiền trong Nitơ lỏng cho mịn, đồng nhất rồi hòa vào dung dịch Trizol (Invitrogen, Hoa Kỳ). Tách chiết RNA và tinh khiết RNA theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng hợp cDNA sử dụng 2µg RNA tổng số và sử dụng kit cDNA synthesis của hãng Thermo Scientific, Hoa Kỳ, theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.3. Tạo dòng gen IL-2

Nhân gen bằng kỹ thuật PCR: sử dụng 2X Dream Taq Polymerase (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), với cặp mồi được thiết kế dựa theo trình tự của gen IL-2 kích thước 429bp (Bảng 1) đã được đăng kí trên Ngân hàng Dữ liệu Gen quốc tế NCBI với số đăng kí AF000631. Chu trình nhiệt của kỹ thuật PCR: hỗn hợp được biến tính ở 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kì gồm 94°C: 30 giây, 56°C: 30 giây, 72°C: 30 giây và 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR sau đó được chạy điện di trên thạch 1,5% agarose. Sản phẩm PCR nhân gen IL-2 của gà có kích thước khoảng 429bp được tinh sạch bằng QIAQuick gel extraction kit (QIAGEN, Đức), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được sử dụng ngay cho phản ứng nối ghép gen.

Phản ứng nối ghép gen vào véc tơ tách dòng pCR 2.1-TA: Sản phẩm PCR được gắn vào véc tơ tách dòng pCR 2.1-TA (Invitrogen, Hoa Kỳ) sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* (dòng TOP10) của hãng Invitrogen (Hoa Kỳ) với mục đích chọn lọc các dòng tế bào mang véc tơ tách dòng pCR2.1-TA được gắn thêm sản phẩm PCR. Véc tơ tái tổ hợp được tách chiết theo phương pháp của Truong & cs. (2016) và được sử dụng làm nguyên liệu để đọc trình tự. Trình tự DNA được tiến hành xác định trên máy đọc

trình tự tự động theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Gentis, Việt Nam).

2.4. Biểu hiện gen IL-2 của gà trên hệ thống *E. Coli*

Gen IL-2 của gà trong véc tơ tạo dòng pCR2.1 được lấy ra bằng cách xử lý plasmid pCR-2.1 bằng hai enzyme hạn chế *EcoRI* và *HindIII*, đoạn DNA dài khoảng 429bp chứa gen IL-2 của gà được thu lấy sau khi chạy điện di sản phẩm cắt trên gel agarose và tinh sạch bằng bộ kit Qiaquick Gel Extraction. Đoạn gen thu được được nối với véc tơ pET32a(+) đã được xử lý trước đó bằng 2 enzyme hạn chế trên. Véc tơ tái tổ hợp pET32a(+) chứa gen mã hóa cho protein lai giữa theriodoxin với IL-2 (Trx-rchIL2) hoặc đối chứng véc tơ pET32a(+) chỉ chứa theriodoxin (Trx) được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) và nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung Amp (nồng độ cuối cùng là 100 µg/ml) ở 37°C. Khi giá trị OD600 của dịch nuôi cấy đạt 0,5; IPTG được bổ sung vào dịch nuôi cấy tế bào với nồng độ cuối cùng là 1mM. Các mẫu tế bào được thu sau 12 giờ sau khi cảm ứng bằng IPTG (Invitrogen) theo phương pháp của Truong & cs. (2016).

2.5. Tinh khiết IL-2 protein tái tổ hợp

Thu vi khuẩn bằng cách ly tâm 3,500 vòng/phút trong 30 phút ở 4°C. Phá vỡ màng tế bào thu protein tổng số bằng cách sử dụng kit B-PER bacterial protein extraction reagent (Thermo Scientific). Tinh khiết protein tái tổ hợp bằng cách sử dụng cột sắc khí Ni-NTA resin (Thermo Scientific) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Loại bỏ độc tố endotoxin bằng cách sử dụng khả năng cân bằng điện tích thông qua các lần rửa bằng các dung dịch rửa có độ pH khác nhau đã được mô tả trước đó (Truong & cs., 2016). Protein tái tổ hợp được cô đặc bằng cách sử dụng màng lọc có kích cỡ lỗ màng lọc 3kDa (EMD Millipore). Protein tái tổ hợp thu được được đổi dung dịch đệm bằng PBS, pH7.2 sử dụng SnakeSkin™ dialysis tubing (Thermo Scientific) ở 4°C qua đêm. Nồng độ protein IL-2

tái tổ hợp được đo và tính toán bằng phương pháp Bradford.

2.6. Kiểm tra tính đặc hiệu của IL-2 bằng phương pháp Western Blot

Protein IL-2 tái tổ hợp sau khi tinh khiết được xử lý bằng đệm pha mẫu có 1% SDS và biến tính trong 10 phút, rồi chạy điện di SDS-PAGE. Các băng protein được quan sát sau khi nhuộm Coomassie blue. Sau khi điện di trên gel 12,5% polyacrylamide, các băng protein được chuyển sang màng PVDF. Các vị trí không có protein trên màng được phủ sữa loại béo qua đêm. Tiếp theo màng được phủ kháng thể His-Taq gắn HPR (Abcam, Hoa Kỳ) hoặc kháng thể đơn dòng IL-2 (Mouse Anti-Chicken IL-2) và cuối cùng Goat anti-Mouse IgG (H + L), HRP (Abcam, Hoa Kỳ). Phản ứng hiện màu với cơ chất Western Lightning Plus-ECL (Thermo Scientific).

2.7. Đánh giá tính độc của protein tái tổ hợp IL-2 trên tế bào dòng HD11

Tế bào dòng đại thực bào (HD11) được cung cấp bởi GS Yeong Ho Hong, Đại học Chung-Ang, Hàn Quốc. Tế bào được nuôi trong môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) có bổ sung thêm kháng sinh 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin và 10% huyết thanh bào thai bê sạch vô trùng (FBS, Invitrogen) và nuôi cấy trong điều kiện 5% CO₂ ở 41°C. Protein tái tổ hợp được gây nhiễm trên tế bào HD11 ở mật độ nuôi cấy $1,0 \times 10^6$ tế bào/giếng trên đĩa tế bào 6 giếng ở nồng độ 25, 50 và 100 ng/ml, tế bào sau gây nhiễm được nuôi ở điều kiện 5% CO₂ ở 41°C. Thu tế bào sau gây nhiễm sau 6, 12, 24 và 48 giờ để đánh giá độc tính trên tế bào bằng MTT Cell Proliferation Assay Kit (Abcam, USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.8. Đánh hoạt tính protein tái tổ hợp IL-2 trên tế bào dòng HD11

Protein tái tổ hợp được gây nhiễm trên tế bào HD11 ở mật độ nuôi cấy $1,0 \times 10^6$ tế

bào/giếng trên đĩa tế bào 6 giếng ở nồng độ 25, 50 và 100 ng/ml, tế bào sau gây nhiễm được nuôi ở điều kiện 5% CO₂ ở 41°C. Nồng độ protein IL-2 tái tổ hợp được lựa chọn dựa trên các thí nghiệm trước đây của chúng tôi (pilot experiment) đã cho thấy khả năng kích hoạt một số yếu tố kích thích miễn dịch như JAK1/2, STAT1/3, ERK1/2 trên tế bào dòng đại thực bào và tế bào dòng T lympho. Thu tế bào sau gây nhiễm sau 6, 12, 24 và 48 giờ để đánh giá khả năng kích thích sản sinh của các cytokine gene bằng phương pháp qRT-PCR.

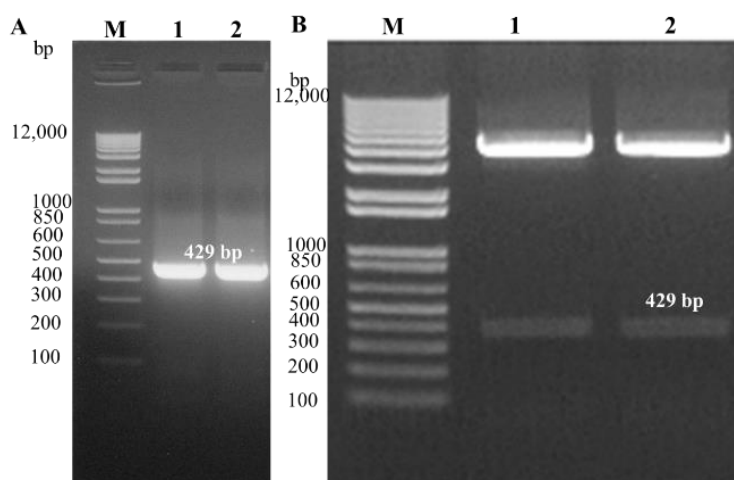
2.9. Phương pháp quantitative real-time PCR (qRT-PCR) xác định biểu hiện của cytokine gen

Thu thập tế bào HD11 sau gây nhiễm, tế bào được rửa qua PBS lạnh 2 lần, tách chiết RNA tổng số bằng TRIzol (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng hợp cDNA, tổng số 2µg RNA được loại bỏ DNA bằng cách thêm vào 1,0 đơn vị (unit) DNase I và 1,0µL of 10 × reaction buffer (Thermo Scientific), sau đó ủ 30 phút ở 37°C. Để dừng sự hoạt động của DNase I, bổ sung 1,0µL of 50mM EDTA vào dung dịch và đun ở 65°C trong 10 phút. Sử dụng sản phẩm này để tổng hợp cDNA bằng Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Để đánh giá mức độ biểu hiện của các cytokines, chúng tôi thiết kế mỗi cho phản ứng qRT-PCR sử dụng phần mềm Lasergene (DNASTAR, Hoa Kỳ) (Bảng 1), và thực hiện phản ứng qRT-PCR bằng cách sử dụng 2 × Power SYBR Green Master Mix (Roche, Hoa Kỳ), theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gene GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) trên gà được sử dụng là gene đối chứng tiêu chuẩn để tính toán mức độ biểu hiện của các gene thông qua quá trình tiêu chuẩn hóa chất lượng RNA. Mức độ biểu hiện của các gene được tính toán bằng phương pháp $2^{-\Delta\Delta Ct}$ thông qua mức độ biểu hiện của gene đối chứng GAPDH.

Bảng 1. Các cặp mồi trong phản ứng nhân gen và realtime PCR

Gen	F/R	Trình tự các cặp mồi (5'-3') F: mồi xuôi; R: mồi ngược	Mã số truy cập trên Genbank	Tham khảo
GAPDH	F	TGCTGCCGAGAACATCATCC	NM_204305	Truong & cs., 2016
	R	ACGGCAGGTCAGGTCAACAA		
IL-2 cloning	F	CGGAATTCATGATGTGCAAAGTACTGATCTT	AF033563	Nghiên cứu này
	R	CCAAGCTTTTTCAGATATCTCACAAAG		
IFN- γ	F	AGCTGACGACGGTGGACCTATTATT	HQ739082	Truong & cs., 2016
	R	GGCTTTGCGCTGGATTC		
IL-6	F	CAAGGTGACGGAGGAGGAC	JQ897539	Truong & cs., 2016
	R	TGGCGAGGAGGGATTCT		
IL-1 β	F	TCGGGTTGGTTGGTGATG	NM_204524	Truong & cs., 2016
	R	TGGGCATCAAGGGCTACA		



Hình 1. (A) Sản phẩm PCR nhân gen IL-2, DNA chuẩn 100bp; Đường chạy 1, 2: Sản phẩm PCR và (B) Kết quả cắt kiểm tra DNA các plasmid bằng enzyme *EcoR I* và *Hind III*. M: DNA chuẩn 100bp; Đường chạy 1, 2 là các plasmid chứa gene IL-2 sau khi được xử lý bằng *EcoR I* và *Hind III*

2.9. Xử lý số liệu

Số liệu được phân tích bằng phương pháp One-way ANOVA. Các giá trị trung bình được so sánh sự khác biệt bằng phương pháp Tukey's multiple comparison test. Sai khác có ý nghĩa được xác định với $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế Plasmid mang gen IL-2 của gà để biểu hiện trong *E. coli*

Gen IL-2 của gà có kích thước khoảng

429bp được nhân lên bằng kỹ thuật RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu và các điều kiện như đã được mô tả trong phần phương pháp. Kết quả trên hình 1A cho thấy xuất hiện một băng DNA có kích thước khoảng 429bp tương đương với kích thước của đoạn gen cần nhân theo thiết kế. Như vậy, sản phẩm PCR thu được là đặc hiệu và có thể sử dụng cho phản ứng nối ghép gắn gen vào véc tơ tách dòng.

Sản phẩm PCR nhân gen IL-2 được gắn vào véc tơ tách dòng pCR 2.1-TA (Invitrogen) và được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* TOP10. Các dòng tế bào được chọn lọc theo

hướng dẫn của hãng Invitrogen. DNA plasmid được tách chiết và làm sạch theo Truong & cs. (2016). Để xác định sự có mặt của đoạn gen mới được chèn trong véc tơ tách dòng pCR 2.1 TA, DNA plasmid của các dòng tế bào này được tách chiết và xử lý bằng enzyme giới hạn *EcoR I* và *Hind III*. DNA plasmid của các dòng tế bào chọn lọc sau khi cắt bằng enzyme *EcoR I* và *Hind III* được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 1B). Kết quả điện di đồ trên Hình 1B cho thấy các plasmid trên đường chạy 1 và 2 sau khi cắt bằng *EcoR I* và *Hind III* có văng ra một băng có kích thước tương đương với sản phẩm PCR (429bp). Như vậy, các dòng plasmid này đã được gắn sản phẩm PCR.

3.2. Xác định trình tự nucleotide của gen IL-2

Để khẳng định sản phẩm đã tách dòng là đoạn gen mã hóa cho IL-2, chúng tôi tiến hành xác định trình tự nucleotide bằng phương pháp giải trình tự gen theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Gentis, Việt Nam). Trình tự nucleotide IL-2 của gà tách dòng được so sánh với trình tự gen IL-2 đã đăng ký trên Ngân hàng Dữ liệu Gen quốc tế NCBI với số đăng ký là AF000631 và phân tích bằng phần mềm DNA Star và Clustal-X (Hình 2). Kết quả phân tích trên hình 2 cho thấy, so với gen IL-2 của gà đã được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế với số đăng ký AAB63150 thì gen IL-2 của gà đã tách dòng có độ tương đồng 100%. Từ các kết quả đã nhận được, chúng tôi rút ra một số kết luận sau: Đã tách dòng và xác định trình tự đoạn gen mã hóa cho IL-2 của gà có kích thước 429bp (143 amino acid) từ RNA tổng số của gà bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả phân tích trình tự gen cho thấy không có sự thay đổi về amino acid so với trình tự AAB63150 của gen IL-2 của gà đã được đăng ký trong Genbank.

3.3. Thiết kế véc tơ chuyển gen pET32a(+)/chIL-2

Những nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng (Hoang & cs., 2017; Truong & cs., 2018), biểu hiện protein của một số cytokine gene sử

dụng véc tơ pET32a(+) trong tế bào *E. coli* cho hiệu quả cao về số lượng và chất lượng, đặc biệt là đơn giản dễ áp dụng. Gen IL-2 và pET32a sau khi xử lý với *EcoR I* và *Hind III* được phân tách trên gel agarose và được tinh sạch bằng kit của Qiagen. Cả hai đoạn DNA pET32a và IL-2 giới hạn bởi *EcoR I* và *Hind III* có kích thước lần lượt là 6,24kb và 429bp đều được cắt và tinh sạch hiệu quả. Đoạn gen IL-2 lần lượt được nối vào véc tơ pET32a để tạo thành véc tơ pET32a-IL2.

Chọn 5 khuẩn lạc dương tính và thực hiện phản ứng colony PCR với cặp mồi đặc hiệu IL2_F và IL2_R, kết quả thể hiện trên hình 3. Trên hình 3 cho thấy, các đường chạy 1-5 đều xuất hiện một băng có kích thước khoảng 429bp tương ứng với kích thước gen IL2 của gà được nhân lên bằng cặp mồi đặc hiệu IL2-F/R theo tính toán lý thuyết. Điều này chứng tỏ đã biến nạp thành công véc tơ pET32a/chIL2 vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) để chuẩn bị cho thí nghiệm tiếp theo.

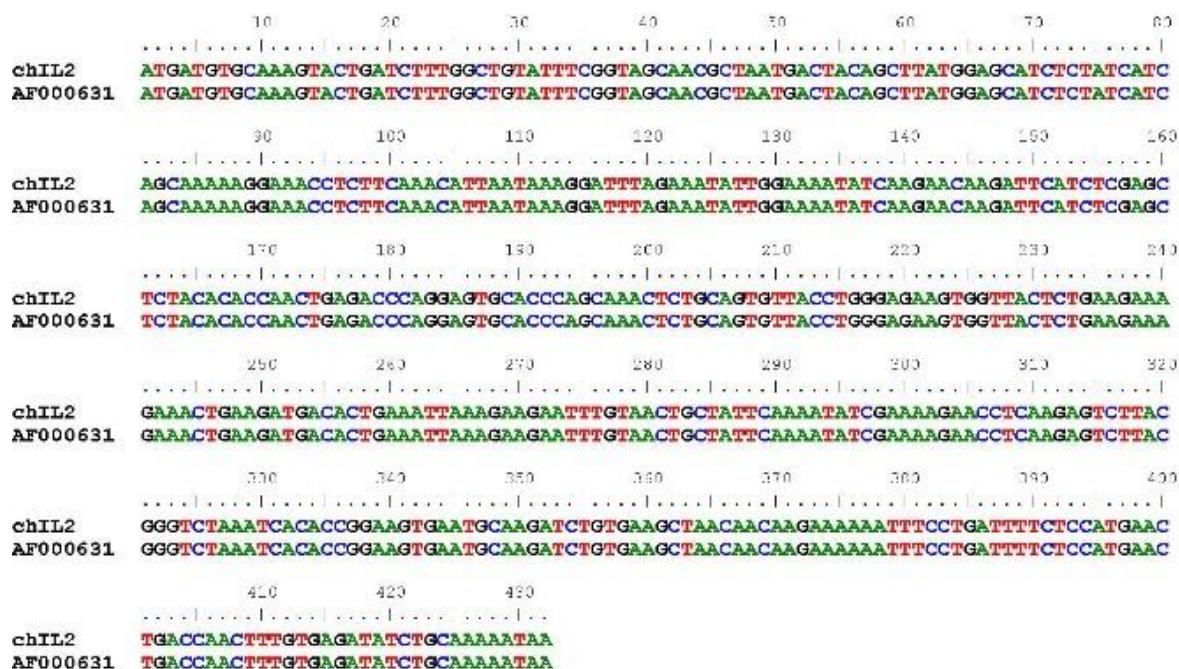
Sự có mặt của gen IL-2 trong véc tơ biểu hiện được kiểm tra bằng chính cặp enzyme hạn chế *EcoR I* và *Hind III* và giải trình tự gen. Kết quả kiểm tra cho thấy không có sự thay đổi nào trong trình tự của gen IL-2 trong véc tơ biểu hiện và trình tự các vùng nối giữa gen Trx và IL-2 có chứa các điểm his-tag và điểm cắt cho enterokinase đều chính xác như dự tính (kết quả không trình bày).

3.4. Biểu hiện và tinh khiết protein pET32a(+)/chIL-2 tái tổ hợp

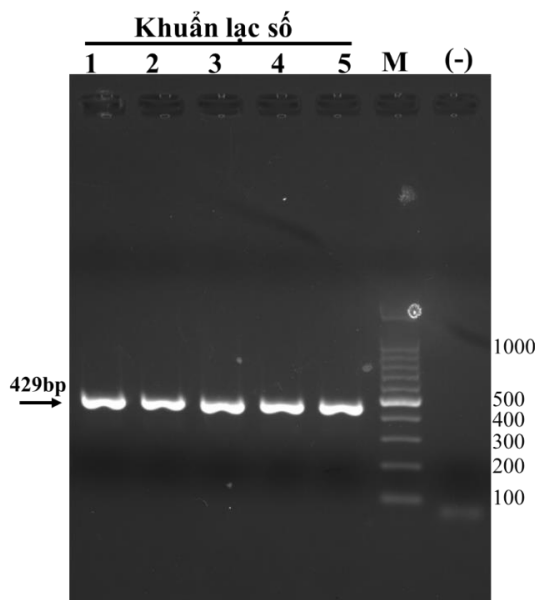
Theo tính toán, đoạn gen chIL2 được gắn vào véc tơ biểu hiện pET32a tại vị trí cắt của enzyme hạn chế *EcoR I* và *Hind III* sẽ tạo ra protein lai giữa protein Trx-Tag thioredoxin với protein tái tổ hợp khi biểu hiện. Kết quả nhuộm Coomassie trên hình 4 cho thấy sau cảm ứng bằng IPTG, trước tinh khiết xuất hiện nhiều băng protein có kích thước khác nhau và một băng protein khác có kích thước khoảng gần 38,5kDa, và sau tinh khiết biểu hiện bằng một băng protein duy nhất có kích thước khoảng 38,5kDa tương ứng với kích thước của IL-2. Kết quả này phù hợp với kích thước protein của IL-2 được

biểu hiện trong hệ thống *E. coli* sử dụng véc tơ pET32a(+), trong đó peptide tín hiệu Trx-Tag thioredoxin có kích thước khoảng 22,3kDa và khối lượng phân tử của chIL2 protein tái tổ hợp khoảng 16,2kDa. Hơn nữa, để khẳng định lại,

chúng tôi tiến hành phản ứng lai western blot dựa trên sự liên kết đặc hiệu giữa kháng nguyên-kháng thể được thực hiện bằng việc sử dụng 02 kháng thể đơn dòng anti-6x-histag và anti-IL2.



Hình 2. Kết quả so sánh trình tự IL-2 nhận được với trình tự trên Ngân hàng Dữ liệu Gen quốc tế NCBI với số đăng ký là AF000631



Ghi chú: M: thang DNA chuẩn; các giếng 1-5 là thứ tự khuẩn lạc, giếng số 7 là đối chứng âm.

Hình 3. Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng môi đặc hiệu gen chIL2F/R trên khuôn plasmid pET32a(+) từ các khuẩn lạc lựa chọn

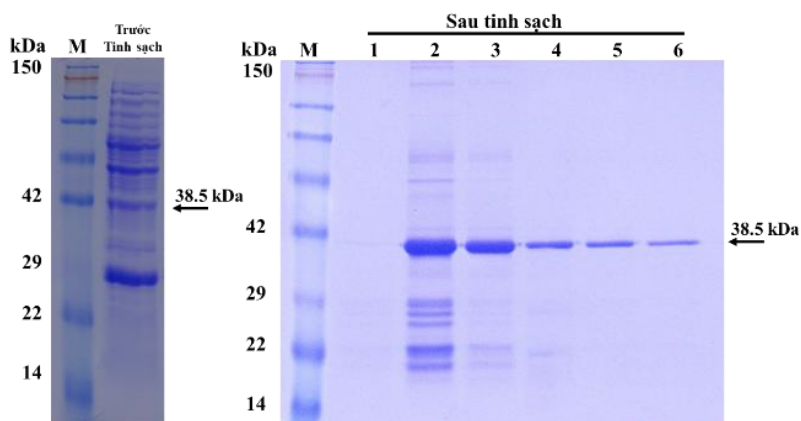
Kết quả trên hình 5 cho thấy, ở đường chạy protein số 2-6 khi dùng anti-6x-Histag antibody xuất hiện một băng màu đậm, rõ nét có kích thước khoảng 38,5kDa, là kích thước protein IL-2 của gà dung hợp với polytag bao gồm: Trx, Thioredoxin, 6xHis-Tag và S-Tag đúng như tính toán lý thuyết (Hình 5A). Kết quả phản ứng lai western blot giữa protein tái tổ hợp IL-2 với kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng IL-2 của gà cho thấy có băng mẫu xuất hiện khoảng 38.5 kDa, đó là băng của protein IL-2 dung hợp với polytag (Hình 5B).

Biểu hiện protein sử dụng véc tơ pET32a(+) trong tế bào *E. coli* thường cho hiệu suất biểu hiện thấp và không phải tất cả protein biểu hiện đều được tiết vào khoang chu chất mà còn tìm thấy ở trong môi trường, trong tế bào chất và màng nguyên sinh chất (Baneyx, 1999). Theo Mergulhao & cs. (2005), kích thước protein có thể ảnh hưởng đến hiệu quả biểu hiện của protein đích. Thành phần amino acid của polytag và protein đích cũng đóng vai trò quan trọng. Tốc độ vận chuyển protein ngoại lai ra khỏi tế bào/chu chất có thể bắt nguồn từ khả năng tiết hạn chế của bộ máy vận chuyển trong *E. coli*. Khi khả năng này bị lấn át thì phần lớn protein biểu hiện ra dưới dạng thể vùi. Vì thế việc tối ưu mức độ biểu hiện là điều rất quan trọng. Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tối ưu hóa được điều kiện biểu hiện của protein IL-2 tái tổ hợp sử dụng tế bào *E. coli* theo như mô tả

phần phương pháp nghiên cứu. Hàm lượng protein IL-2 của gà tái tổ hợp biểu hiện sử dụng véc tơ biểu hiện pET32a trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) thu được là trên 2mg protein IL-2 tái tổ hợp trên tổng số dung tích nuôi biểu hiện là 500ml. Từ kết quả trên cho thấy chúng tôi đã thiết kế và biểu hiện thành công protein tái tổ hợp Trx-chIL2 của gà trong tế bào *E. coli*.

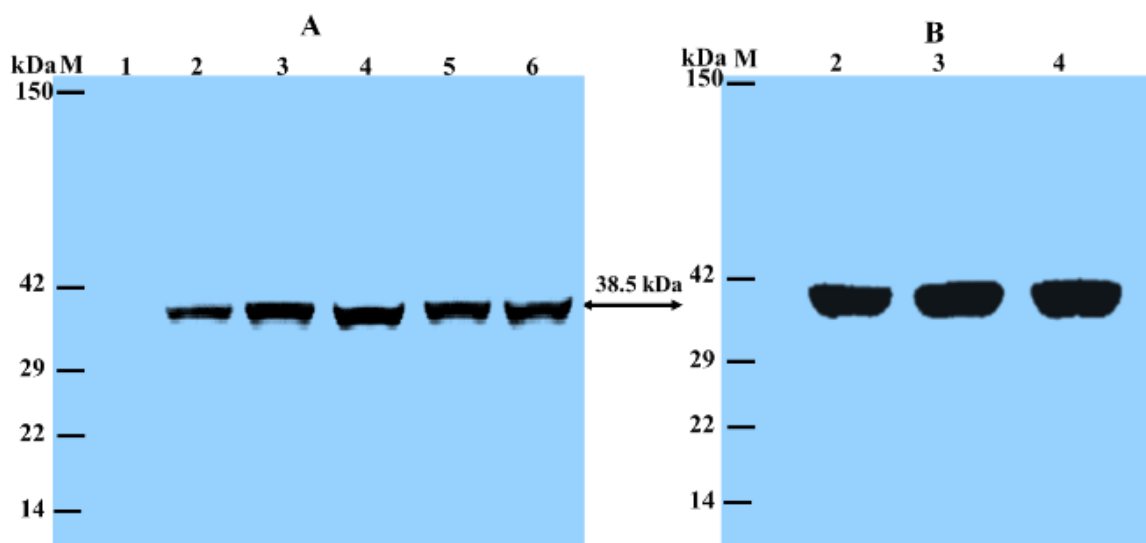
3.5. Kiểm tra tính độc của protein IL-2 tái tổ hợp trên tế bào dòng Macrophage (HD11) của gà

Một số nghiên cứu gần đây chứng minh rằng (Gu & cs., 2010; Hilton & cs., 2002; Reichert & cs., 2000), protein IL-2 tái tổ hợp có khả năng kích thích sự nhân lên phát triển của một số dòng tế bào như tế bào T, B và tế bào đại thực bào. Từ kết quả hình 6 cho thấy, ở nồng độ 25 ng/ml và 50 ng/ml protein IL-2 tái tổ hợp trên hệ thống *E. coli*, không kích thích sự nhân lên của tế bào đại thực bào trong khoảng thời gian nghiên cứu, trong khi đó ở nồng độ 100 ng/ml protein IL-2 tái tổ hợp của gà có khả năng kích thích tế bào đại thực bào phát triển trong vòng 48h so với nhóm đối chứng không dùng và chỉ dùng protein Trx tái tổ hợp. Từ kết quả trên chúng tôi có thể kết luận rằng protein IL-2 của gà tái tổ hợp trên hệ thống *E. coli* không có độc tính hoặc không ảnh hưởng đến sự nhân lên và phát triển của tế bào dòng.



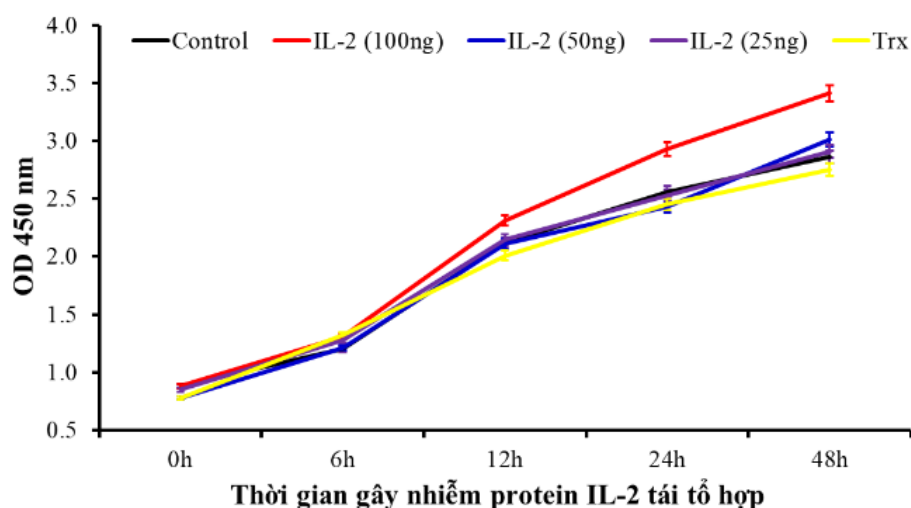
Ghi chú: Đường chạy M: Protein chuẩn; Đường chạy 1-6: Protein Trx-chIL2 được elution ở các lần khác nhau.

Hình 4. Điện di SDS-PAGE protein Trx-chIL2 trên gel polyacrylamide 12,5% trước và sau khi tinh sạch



Ghi chú: Đường chạy M: Protein chuẩn; Đường chạy 1-6: Protein Trx-chIL2 được elution ở các lần khác nhau.

Hình 5. Western blot với kháng thể kháng 6xHisTag (A) và kháng thể đơn dòng IL-2 (B)



Hình 6. Xác định độc tính của chIL-2 protein tái tổ hợp đến sự phát triển của tế bào dòng Macrophage (HD11) của gà

3.6. Kết quả xác định khả năng kích thích tế bào dòng đại thực bào sản sinh cytokine của protein IL-2 tái tổ hợp

Hình 7 cho thấy, IL-1 β và IL-6 mRNA đã tăng biểu hiện ($P < 0,05$) sau 12 và 24 giờ gây nhiễm protein IL-2 tái tổ hợp trên tế bào đại thực bào của gà ở cả 3 nồng độ 25, 50 và 100 ng/ml IL-2 protein và kéo dài đến 48 giờ gây nhiễm, trong đó protein IL-2 tái tổ hợp với nồng độ 100 ng/ml kích thích sản sinh IL-1 β và IL-6

mRNA mạnh nhất (Hình 7). Trong khi đó, protein IL-2 tái tổ hợp kích thích sản sinh INF γ mRNA mạnh nhất, sau 12, 24 và 48 giờ gây nhiễm với protein IL-2 tái tổ hợp ở nồng độ 100 ng/ml lần lượt là $9,23 \pm 0,75$, $23,12 \pm 1,20$ và $52,23 \pm 2,23$ với độ tin cậy $P < 0,05$. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng, IL-2 kích thích sản sinh miễn dịch chủ động của gà cũng thông qua việc kích thích và hoạt hóa các con đường miễn dịch (immune signaling pathway) như JAK/STAT, MAPK, NF- κ B, Toll-Like Receptor,

TGF β signaling pathway (Kampa & Burnside, 2002; Kawano & Noma, 1996; Piscitelli & Minor, 1995). Nghiên cứu của chúng tôi đã chứng minh rằng, protein IL-2 tái tổ hợp kích thích sự sản sinh của một số pro-inflammatory như IFN γ , IL-1 β và IL-6 trên tế bào đại thực bào, điều đó chứng tỏ protein tái tổ hợp thông qua hệ thống *E. coli* có hoạt tính sinh học tự nhiên của IL-2 trên gà.

4. KẾT LUẬN

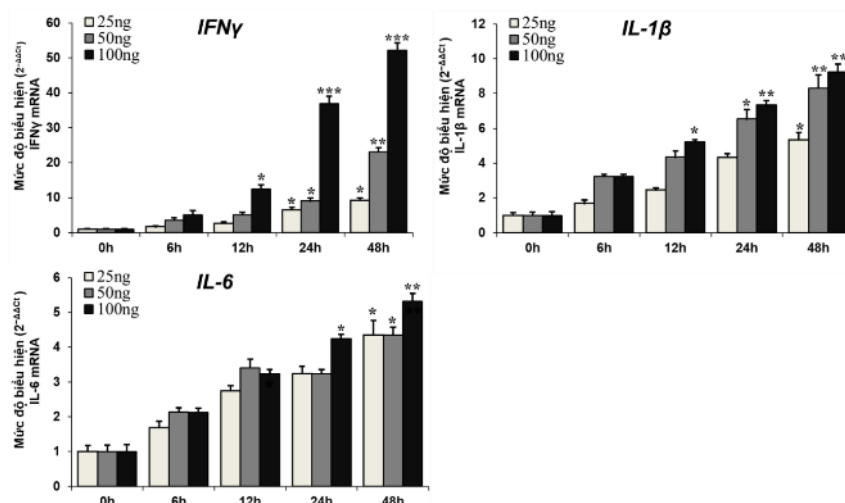
Đã dòng hóa được gen IL-2 của gà, thiết kế gắn với tín hiệu tiết Trx và đưa vào véc tơ biểu hiện pET32a(+) và biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21. Protein IL-2 tái tổ hợp tạo ra trên hệ thống *E. coli* không có tính độc với tế bào dòng, có hoạt tính sinh học tự nhiên và có khả năng kích thích tế bào dòng đại thực bào (HD11) sản sinh các pro-inflammatory như IFN γ , IL-1 β và IL-6 mRNA.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2019.01.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baneyx F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 10: 411-421.
- Greene WC., Depper JM., Kronke M. & Leonard WJ. (1986). The human interleukin-2 receptor: role in normal T-cell growth and association with HTLV-I-induced T-cell leukemia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51(2): 731-737.
- Gu J., Ruan X., Huang Z., Chen J. & Zhou J. (2010). Identification of functional domains of chicken interleukin 2. *Vet Immunol Immunopathol*. 134: 230-238.
- Hilton LS., Bean AG., Kimpton WG. & Lowenthal JW. (2002). Interleukin-2 directly induces activation and proliferation of chicken T cells *in vivo*. *J Interferon Cytokine Res*. 22: 755-763.
- Hoang CT., Hong Y., Truong AD., Lee J., Lee K. & Hong, Y.H. (2017). Molecular cloning of chicken interleukin-17B, which induces proinflammatory cytokines through activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Dev Comp Immunol*. 74: 40-48.
- Itoh K., Tilden AB. & Balch C.M. (1985). Role of interleukin 2 and a serum suppressive factor on the induction of activated killer cells cytotoxic for autologous human melanoma cells. *Cancer Res*. 45: 3173-3178.
- Kampa D. & Burnside J. (2002). Jak3-regulated genes: DNA array analysis of concanavalin a-interleukin-2-activated chicken T cells treated with a specific jak3 inhibitor. *J Interferon Cytokine Res*. 22: 975-980.



Ghi chú: Các ký tự chữ thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ và *** $P < 0,001$).

Hình 7. Protein chIL-2 tái tổ hợp kích thích sản sinh IFN γ , IL-1 β và IL-6 mRNA trên tế bào đại thực bào Macrophage (HD11)

- Kawano Y. & Noma T. (1996). Role of interleukin-2 and interferon-gamma in inducing production of IgG subclasses in lymphocytes of human newborns. *Immunology*. 88: 40-48.
- Lauener P., Huttner S., Buisson M., Hossle J.P., Albisetti M., Seigneurin J.M., Seger R.A. & Nadal D. (1995). T-cell death by apoptosis in vertically human immunodeficiency virus-infected children coincides with expansion of CD8+/interleukin-2 receptor-/HLA-DR+ T cells: sign of a possible role for herpes viruses as cofactors? *Blood*. 86: 1400-1407.
- Mamontov P., Eberwine R.A., Perrigoue J., Das A., Friedman J.R. & Mora J.R. (2019). A negative role for the interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK) in human Foxp3+ TREG differentiation. *PLoS One*. 14: e0215963.
- McMillan D.N., Kernohan N.M., Flett M.E., Heys S.D., Deehan D.J., Sewell H.F., Walker F. & Eremin O. (1995). Interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 localisation in human solid tumor cells in situ and in vitro: evidence for a direct role in the regulation of tumour cell proliferation. *Int J Cancer*. 60: 766-772.
- Mergulhao F.J., Summers D.K. & Monteiro G.A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv*. 23: 177-202.
- Morgan D.A., Ruscetti F.W. & Gallo R. (1976). Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 193: 1007-1008.
- Piscitelli SC. & Minor JR. (1995). Role of interleukin-2 in managing infection with the human immunodeficiency virus. *Am J Health Syst Pharm*. 52: 541-542.
- Reichert T.E., Kashii Y., Stanson J., Zeevi A. & Whiteside T.L. (1999). The role of endogenous interleukin-2 in proliferation of human carcinoma cell lines. *Br J Cancer*. 81: 822-831.
- Reichert T.E., Nagashima S., Kashii Y., Stanson J., Gao G., Dou Q.P., & Whiteside T.L. (2000). Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene*. 19: 514-525.
- Rey A., Klein B., Ilnicki C., Jourdan M. & Serrou B. (1984). The role of interleukin-2 in T colony formation by human pre-T cells (pTCFC). *Clin Exp Immunol*. 58: 154-160.
- Sundick RS. & Gill-Dixon C. (1997). A cloned chicken lymphokine homologous to both mammalian IL-2 and IL-15. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 159: 720-725.
- Susta L., Diel D.G., Courtney S., Cardenas-Garcia S., Sundick S., Miller P.J., Brown C.C. & Afonso C.L. (2015). Expression of chicken interleukin-2 by a highly virulent strain of Newcastle disease virus leads to decreased systemic viral load but does not significantly affect mortality in chickens. *Virology*. 12: 122.
- Szatraj K., Szczepankowska AK., Saczynski V., Florys K., Gromadzka B., Lepek K., Plucienniczak G., Szewczyk B., Zagorski-Ostojka W. & Bardowski J. (2014). Expression of avian influenza haemagglutinin (H5) and chicken interleukin 2 (chIL-2) under control of the ptcB promoter in *Lactococcus lactis*. *Acta Biochim Pol*. 61: 609-614.
- Toren A., Ackerstein A., Slavin S. & Nagler A. (1995). Role of interleukin-2 in human hematological malignancies. *Med Oncol*. 12: 177-186.
- Truong A.D., Hong Y., Rengaraj D., Lee J., Lee K. & Hong Y.H. (2018). Identification and functional characterization, including cytokine production modulation, of the novel chicken Interleukin-11. *Dev Comp Immunol*. 87: 51-63.
- Truong A.D., Park B., Ban J. & Hong Y.H. (2016). The novel chicken interleukin 26 protein is overexpressed in T cells and induces proinflammatory cytokines. *Vet Res*. 47: 65.