

Nghiên cứu chuyển gen Interleukin-2 của người vào cây ngô (*Zea mays* L.) phục vụ sản xuất vaccine thực phẩm điều trị bệnh ung thư

Nguyễn Xuân Thắng^{1*}, Nguyễn Chí Thành¹, Mariam Sticklen², Bùi Mạnh Cường¹

¹Viện Nghiên cứu Ngô

²Trường Đại học Michigan, Mỹ

Ngày nhận bài 4/2/2016, ngày chuyển phân biện 29/2/2016, ngày nhận phân biện 28/3/2016, ngày chấp nhận đăng 18/4/2016

Trong nghiên cứu này, gen Interleukin-2 (*rhIL-2*) của người được chuyển vào hệ gen của cây ngô bằng phương pháp súng bắn gen và cuối cùng thu được các dòng ngô hữu thụ thế hệ T3. Plasmid được thiết kế với cấu trúc gồm có gen *rhIL-2* được điều khiển bởi gen promoter rubisco ở lục lạp, một chuỗi peptide mã hóa đặc thù trong mạng lưới nội chất, đoạn đánh dấu 6X histodin và gen terminator NOS. Thông qua phân tích PCR và quá trình hoạt hóa (quá trình phiên mã và dịch mã), các tác giả đã xác định được sự có mặt của gen chuyển trong các cây ngô chuyển gen ở thế hệ T3. Những nghiên cứu cần thực hiện tiếp theo là việc đánh giá sự tổng hợp *rhIL-2* trong cây ngô chuyển gen trên đồng ruộng và tiến hành các thí nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng về khả năng thương mại hóa sản phẩm *rhIL-2* từ cây ngô chuyển gen trong việc điều trị các bệnh ung thư.

Từ khóa: chuyển gen, gen Interleukin-2, ngô, ung thư, vaccine thực phẩm.

Chỉ số phân loại 4.6

Transplantation of recombinant human IL-2 in maize for production of edible vaccine against human cancer cells

Summary

Recombinant human IL-2 (*rhIL-2*) is normally produced in *E. coli* via genetic engineering and used for treatment of various cancer cells. However, when produced in *E. coli*, it is very expensive because *E. coli* requires sugar containing media for its growth. This study explored the feasibility of producing biologically active *rhIL-2* in the green tissues of transgenic *Zea mays* (corn) plants in large quantity because the plants can cheaply produce recombinant proteins while getting their energy from freely available sun via photosynthesis. The *rhIL-2* gene was initially optimized to maximize its expression in plants. Then, a plasmid structure containing *rhIL-2*, Rubisco green-specific promoter, endoplasmic reticulum transit peptide, NOS terminator and 6-histodin tag was developed and bombarded into immature embryo cell lines to produce fertile corn plants. Molecular analyses (PCR, Reverse transcriptase PCR and western blotting) confirmed that the human *IL-2* had integrated, transcribed and translated in up to T3 transgenic maize plants. The next studies will be carried out in the preclinical and clinical tests of *rhIL-2* products and also their commercialization ability for the treatment of cancer.

Keywords: cancer, edible vaccine, human IL-2, maize, transformation.

Classification number 4.6

Giới thiệu

Phát triển từ cuối những năm 70 của thế kỷ trước, cây trồng biến đổi gen đã mang lại nhiều lợi ích to lớn cho con người về sản xuất lương thực, thức ăn chăn nuôi, năng lượng và các sản phẩm công nghiệp [1]. Gần đây, nhiều tác giả đã tiến hành nghiên cứu việc sử dụng các cây trồng nông nghiệp biến đổi gen để sản xuất các vaccine thực phẩm như chuyển gen viêm gan B [2], gen kháng nguyên bề mặt vỏ HIV-1 gp 120 vào khoai tây [3]; chuyển gen kháng nguyên cholera kháng bệnh dịch tả [4], gen kháng nguyên phòng bệnh than vào cây thuốc lá [5]; gen kháng nguyên HIV vào cây rau chân vịt [6]...

Ưu điểm của cây trồng chuyển gen để sản xuất vaccine thực phẩm là dễ trồng, sản lượng cao, dễ bảo quản và sử dụng, phương thức sản xuất vaccine đơn giản

*Tác giả liên hệ: Email: nxthangmri@gmail.com

và an toàn. Ngô đã được sử dụng trong chuyển gen để tạo ra các vaccine thực phẩm và các sản phẩm khác như chất dẻo sinh học do có sinh khối cao, có thể bảo quản trong thời gian dài ở nhiệt độ thường so với những cây chuyển gen tạo vaccine có tế bào chứa hàm lượng nước cao như các loại rau củ quả [7]. Với nhu cầu về vaccine thực phẩm ngày càng tăng và yêu cầu giảm chi phí trong sản xuất thì cây ngô được cho là một trong những cây trồng lý tưởng cho việc sản xuất vaccine thực phẩm.

Interleukin-2 (*IL-2*), hay còn gọi là yếu tố kích thích sinh trưởng dòng tế bào T đã được chứng minh là có hiệu quả trong việc điều trị các bệnh ung thư như ung thư phổi, bạch cầu, buồng trứng, vú, máu hay thận. Trên thực tế, *IL-2* được tạo ra thông qua hệ thống *E. coli* đã được FDA kiểm định và được Novartis Pharmaceuticals thương mại hóa với tên nhóm hoạt chất là “Aldesleukin” hay “Proleukin” và được bán trên thị trường với tên sản phẩm là Roleukin hay Aldesleukin để điều trị ung thư da và thận giai đoạn cuối. Việt Nam cũng đã thành công trong việc hoàn thiện quy trình công nghệ sản xuất *IL-2* tái tổ hợp trên dòng tế bào *E. coli* và hiện tại Công ty TNHH MTV Vaccine và Sinh phẩm số 1 (Bộ Y tế) đang triển khai dự án sản xuất thử nghiệm trong hỗ trợ điều trị bệnh ung thư ở Việt Nam (<http://vpct.gov.vn/>).

Hiện nay, các sản phẩm *IL-2* tái tổ hợp của người (*rhIL-2*) thương mại hóa trên thị trường được tạo ra bằng *E. coli* thường có giá cao, chi phí cho mỗi lần điều trị lên tới 11.400 USD [8]. Năm 2013, các nhà khoa học công bố đã sản xuất *rhIL-2* trong mạng lưới nội chất (ER) từ các cơ quan sinh dưỡng ở cây thuốc lá. Sản phẩm *rhIL-2* đã được tinh chế và đánh giá khả năng ức chế tế bào lá lách CD4⁺ T-Cells [8]. ER là hệ thống các khoang và túi màng nằm trong tế bào thực vật, có chức năng biến đổi protein [9]. Việc tích lũy protein tái tổ hợp trong ER ở tế bào thực vật không ảnh hưởng tới cây chủ. Mặt khác, ER chứa nhiều phân tử chaperones, mang glycosyl hóa protein và vắng mặt enzym proteases, điều này giúp cho việc giải mã và hình thành các protein tái tổ hợp. ER cũng có vai trò định hướng quá trình vận chuyển protein ở thực vật và do đó được xem như hệ thống lý tưởng cho việc sản xuất hầu hết các protein tái tổ hợp, trong đó có các chất được phẩm ở thực vật [8, 10, 11].

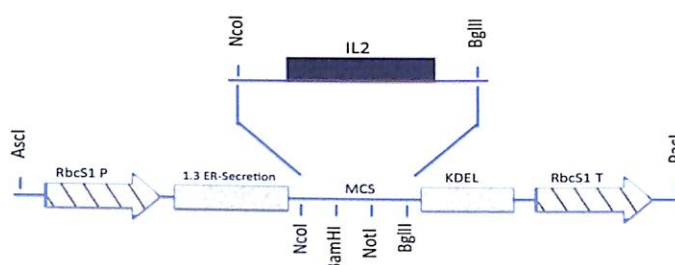
Trong khuôn khổ bài viết này, chúng tôi trình bày việc đánh giá sự biểu hiện của *rhIL-2* trong cây ngô

chuyển gen ở thể hệ T3 và việc sản xuất *rhIL-2* trong ER ở các cơ quan sinh dưỡng của cây ngô. Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm kỹ thuật gen, được phẩm sinh học và nguyên liệu sinh học, Khoa Khoa học cây trồng thổ nhưỡng, Trường Đại học Michigan, Mỹ.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Cấu trúc vector

Vector chuyển gen thực vật (hình 1) chứa gen *rhIL-2* được điều khiển bởi promoter đặc hiệu màu xanh rubisco-peptide vận chuyển trong ER; chuỗi kết thúc NOS và đoạn đánh dấu 6-histodin [8].



Hình 1: cấu trúc vector biểu hiện *IL-2* của người được sử dụng trong thí nghiệm chuyển gen vào ngô. *RbcS1 P*: ribulose biphosphate carboxylase promoter; 1:3 ER secretion: peptide tín hiệu giúp gen đích *rhIL-2* định hướng trong ER; MCS: vùng đa nối; KDEL: chuỗi amino axit; *RbcS1 T*: ribulose biphosphate carboxylase terminator

Plasmid thứ 2, pBY520 mang gen chịu hạn *HVA1* được điều khiển bởi promoter actin từ lúa và Nos terminator cũng được sử dụng đồng chuyển (co-transformation) vào cây ngô sử dụng súng bắn gen.

Vật liệu ngô chuyển gen là nguồn Hi II (A188xB73) được cung cấp bởi Phòng Chuyển gen thực vật, Khoa Nông học, Trường Đại học Iowa, bang Iowa, Mỹ.

Quy trình tái sinh và chuyển gen

Ngô nguồn Hi II được trồng trong nhà kính tới giai đoạn trưởng thành, phơi non chưa trưởng thành khoảng 2 tuần sau thụ phấn được thu hoạch, tách và nuôi cấy trong môi trường MS chứa vitamin, sucrose và myo-innsitol [12]. Chuyển cấu trúc vector chứa gen *rhIL-2* vào các mô sẹo có kích thước 2-3 mm bằng phương pháp bắn gen với áp suất 25-26 PSI theo quy trình cải tiến của Nguyen Thang và Mariam Sticklen (2013) [13], sử dụng dung dịch gồm 150 µl M10 Tungsten, 150 µl canxi chloride và 60 µl spermidine. Sau 2 tuần chuyển gen, các mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc trong điều kiện tối, sau đó là môi trường tái sinh tạo chồi MS và vitamin, bổ sung acid indole butyric (IBA) [13]. Các thể hệ dòng ngô chuyển

gen *rhIL-2* tạo ra bằng phương pháp tự thụ và được trồng trong nhà kính ở nhiệt độ 25°C với quang chu kỳ là 16 h chiếu sáng/8 h tối.

Xác định sự có mặt và biểu hiện của gen đích

Phản ứng PCR: tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB. Sử dụng mỗi IL-2OPT_F1 và IL-2OPT_R1 để xác định sự có mặt của gen đích *rhIL-2* ở dòng ngô thể hệ T3. Trình tự của đoạn mỗi này là: CATGGCCACACCCACTTCAA (mỗi xuôi) và GGCGGTCAGGTCAGCGTATT (mỗi ngược). Các mẫu này sẽ nhân đoạn ADN có kích thước 343 bp của gen *rhIL-2*. Sử dụng chu kỳ nhiệt PCR như sau: 94°C trong vòng 3 phút (1 chu kỳ); và sau đó 94°C trong vòng 30 giây, 62°C trong vòng 30 giây, 72°C trong vòng 45 giây (35 chu kỳ); 72°C trong vòng 5 phút (1 chu kỳ) và 4°C cho tới kết thúc. Sử dụng plasmid mang đoạn gen *rhIL-2* làm đối chứng dương cho các thí nghiệm này.

Phản ứng PCR phiên mã ngược (RT-PCR): sử dụng bộ Kit RNeasy để tách chiết ARN từ mẫu lá ngô. Sử dụng SuperScript® III Reverse Transcriptase để tổng hợp cADN bậc 1. Actin mRNA dùng làm đối chứng chuẩn hóa lượng cADN. Các mẫu đặc hiệu được thiết kế dựa trên mRNA của gen *rhIL-2* CATGGCGGCACCCACTTCAA làm mỗi xuôi và GGCGGTCTCGTCAGCGTATT làm mỗi ngược; mỗi xuôi CTGGATTCTGGAGACGGTGT và mỗi ngược GCCATACAGGTCCTTCCTGA sử dụng cho phản ứng RT-PCR và được thiết kế dựa trên cấu trúc mRNA của gen actin. Chu kỳ phản ứng gồm: 94°C trong vòng 3 phút (1 chu kỳ); sau đó 94°C trong vòng 30 giây, 62°C trong vòng 30 giây, 72°C trong vòng 45 giây (35 chu kỳ); 72°C trong vòng 5 phút (1 chu kỳ) và 4°C cho tới kết thúc. Các sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5%, cADN của gen actin sử dụng làm đối chứng chuẩn.

Western blotting

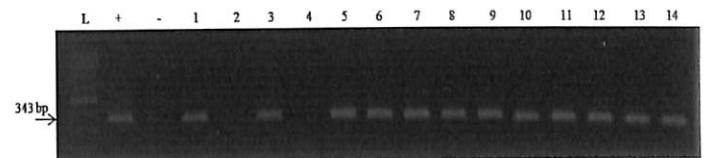
Tách chiết protein: các mẫu lá tươi của các dòng ngô được chuyển gen *rhIL-2* được thu và nghiền trong dung dịch đệm phosphate chứa 100 mM muối natri phosphate pH 5,8, 1 mM EDTA, 10 mM diethyldithio carbamic acid và 0,5% Tween 20. Hỗn hợp ức chế enzym 2X (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) được bổ sung vào dung dịch đệm để ngăn cản hoạt động của enzym proteases phân giải *rhIL-2* trong quá trình tách chiết protein.

Tất cả các công đoạn tách chiết và tinh chế protein được thực hiện trong điều kiện đá lạnh. Các mẫu protein

sau đó sẽ được ủ ở 80°C trong vòng 10 phút trước khi tiến hành phân tích Western blotting. Western blotting được thực hiện theo phương pháp chuẩn sử dụng kháng thể đơn dòng đối với gen *rhIL-2* [8]. Bàn gel được điện di ở điều kiện 30 V trong 1 h. Màng lai được ủ trong 20 ml dung dịch chứa 1X PBS 0,1% Tween 20 và 5% sữa khô không béo trong 45 phút. Màng lai sau đó được lắc nhẹ trong dung dịch kháng thể sơ cấp (20 ml 1X PBS với 0,2 ug/ml IgG (R&D AF-202-NA) và dung dịch thứ cấp (R&D HAF-109) trong vòng 1,5 h mỗi lần). Màng lai được rửa với dung dịch đệm trước khi hiện phim và chụp ảnh sử dụng Premier Autoradiography Film, E3018, Denville Scientific Inc, Metuchen, NJ theo quy trình của nhà sản xuất.

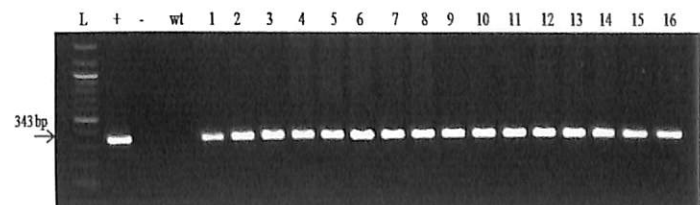
Kết quả và thảo luận

Các phân tích PCR, RT-PCR và Western blot tuy đã được thực hiện nhằm xác định sự có mặt của gen, quá trình sao mã và dịch mã của gen *rhIL-2* trong mô lá của cây ngô chuyển gen qua các thể hệ T2 và T3. Kích thước băng ADN chuẩn của gen *rhIL-2* là 343 bp (hình 2 và 3) và kích thước protein là 15 kDa (hình 6).



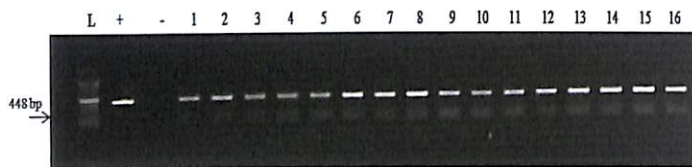
Hình 2: sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen *IL-2* của các cây chuyển gen thể hệ T2 trên gel agarose 1%; L: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid chứa gen *rhIL-2*); -: đối chứng âm (H_2O); 1-14: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T2

Kết quả phân tích PCR (hình 2) cho thấy, hầu hết các mẫu ADN tách chiết từ các cây chuyển gen *rhIL-2* ở thể hệ T2 đều dương tính với PCR và thể hiện kích thước band mong muốn 343 bp tương đương với kích thước đối chứng dương. Hai trong số 14 mẫu không xuất hiện band (mẫu 2 và 4) thể hiện các cây này không chứa gen chuyển *rhIL-2*, nguyên nhân có thể do các cây ở dòng ngô thể hệ T2 đang có sự phân ly và các gen chưa có tính ổn định cao về mặt di truyền.



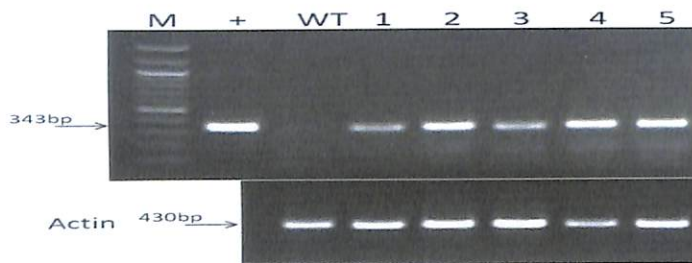
Hình 3: sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen *IL-2* của các cây chuyển gen thể hệ T3 trên gel agarose 1%; L: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid chứa gen *rhIL-2*); -: đối chứng âm (H_2O); WT: cây không chuyển gen; 1-16: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T3

Ở thể hệ T3, tất cả các cây thí nghiệm đều mang gen chuyển *rhIL-2* thông qua phân tích PCR. Các mẫu đều thể hiện kích thước band mong muốn là 343 bp, trong khi đối chứng âm là nước và cây wildtype (cây không chuyển gen) đều không xuất hiện band (hình 3). Kết quả cho thấy tính ổn định của gen chuyển trong các cây ở nguồn dòng ngô thể hệ T3.



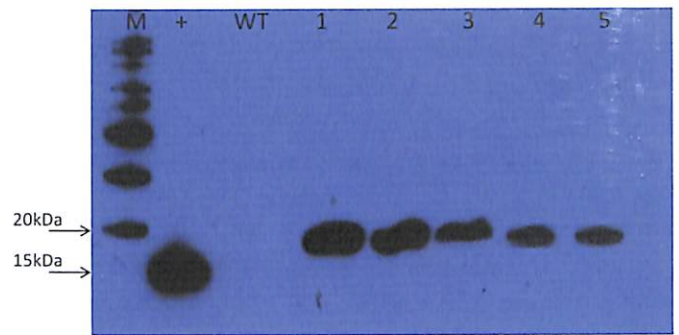
Hình 4: sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt gen đồng chuyển *HVA1* ở các cây chuyển gen thể hệ T3 trên gel agarose 1%; L: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid pBY520 chứa gen *HVA1*); -: đối chứng âm (H_2O); 1-16: các cây chuyển gen thể hệ T3

Đồng thời với việc đánh giá sự có mặt của gen *rhIL-2*, chúng tôi cũng tiến hành đánh giá sự có mặt của gen đồng chuyển *HVA1* thông qua phân tích PCR. Kết quả cho thấy, sau 4 đời chọn lọc đã xác định được các dòng mang cả 2 gen chuyển, gen *rhIL-2* và gen đồng chuyển *HVA1* (hình 4). Các phân tích phân tử sâu hơn cũng đã khẳng định sự có mặt và sự biểu hiện của gen chuyển *HVA1* trong cây ngô. Hơn thế nữa, các thí nghiệm gây hạn nhân tạo cũng đã chỉ ra khả năng chịu hạn của các dòng ngô mang gen *HVA1* ở thể hệ T3 [13].



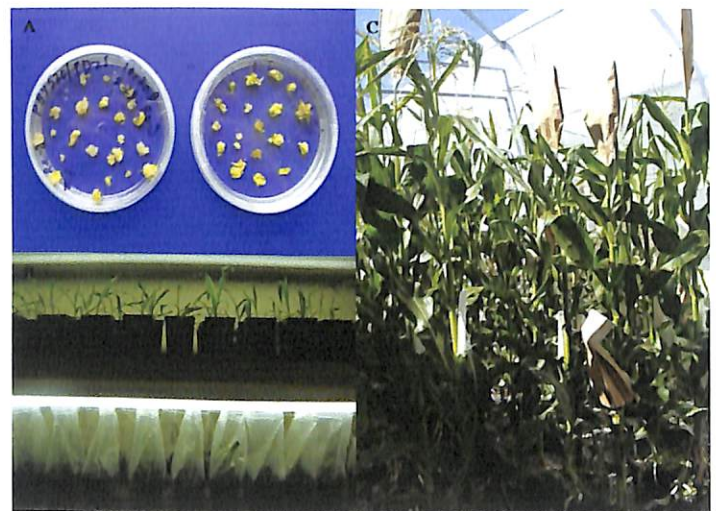
Hình 5: kết quả phân tích RT-PCR của gen *rhIL-2* thể hệ T3 trên gel agarose 1%; kích thước băng mong muốn đối với gen *rhIL-2* là 343 bp và sự biểu hiện của gen actin ngô là 430 bp; M: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương (plasmid chứa gen *rhIL-2*); WT: cây không chuyển gen; 1-5: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T3

Qua kết quả phân tích RT-PCR cho thấy, mức độ biểu hiện gen ở 5 cây chuyển (1-5) thể hệ T3 là tương đương nhau và đều thể hiện kích thước băng là 343 bp, tương đương với kích thước băng đối chứng plasmid. Khi sử dụng cặp mồi actin của ngô làm đối chứng trong phản ứng RT-PCR cho thấy, sự có mặt của gen actin ngô với kích thước băng là 430 bp kể cả mẫu đối chứng âm là cây không chuyển gen (WT). Điều này khẳng định tính chính xác trong phản ứng RT-PCR và sự không biểu hiện của gen *rhIL-2* trong cây không chuyển gen (hình 5).



Hình 6: kết quả phân tích Western blot tuy chỉ ra sự dịch mã của gen *rhIL-2* trong cây ngô chuyển gen; M: thang chuẩn ADN; +: đối chứng dương; WT: cây không chuyển gen; 1-5: các cây chuyển gen *IL-2* thể hệ T3

Thông qua phân tích Western blot, tuy đã xác định được sản phẩm protein của gen *rhIL-2* thể hiện ổn định với kích thước band đơn khoảng 18,3 kDa ở cả 5 mẫu cây chuyển gen thể hệ T3. Kích thước này lớn hơn so với kích thước đối chứng dương là protein chuẩn, nguyên nhân là do cấu trúc plasmid chứa gen *rhIL-2* có gắn thêm đoạn đuôi và các trình tự khác như C-myc, 6X HIS tag hay chuỗi trình tự KDEL nhằm mục đích tích tụ sự biểu hiện gen trong ER và dễ dàng trong quá trình phân tích protein. Kết quả này cũng trùng với kết quả của Matakas và cs (2013) [8] khi sử dụng vector 1.3 chứa gen *rhIL-2* chuyển vào cây thuốc lá và cho rằng hệ thống vector này có thể được lựa chọn cho những nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính sinh học tiếp theo.



Hình 7: một số hình ảnh chuyển gen *rhIL-2* vào cây ngô; A: callus mang gen trong môi trường tái sinh; B: cây con được ra ngô và luyện trong phòng sinh trưởng; C: cây chuyển gen thể hệ T3 được chọn tạo trong điều kiện nhà kính

Kết luận

Kết quả ban đầu của nghiên cứu đã chuyển thành công gen *rhIL-2* và xác định được sự có mặt và biểu hiện của gen chuyển trong cây ngô thông qua các phân

tích phân tử như PCR, RT-PCR hay Western blot. Nghiên cứu cần thực hiện thêm nhằm đánh giá về các thí nghiệm lâm sàng từ sản phẩm *rhIL-2*. Tuy nhiên, nghiên cứu này được xem là tiền đề cho hướng nghiên cứu tiếp theo trong việc sản xuất protein tái tổ hợp từ sinh khối cây ngô hay sử dụng ngô thực phẩm (nếp, đường) chuyển gen *rhIL-2* như thực phẩm chức năng trong điều trị bệnh ung thư.

Tài liệu tham khảo

- [1] Phyllips Theresa (2008), "Genetically Modified Organisms (GMOs): Transgenic Crops and Recombinant DNA Technology", *Nature Education*, **1**(1), p.213.
- [2] Q. Kong, L. Richter, Y.F. Yang, C.J. Arntzen, H.S. Mason, Y. Thanavala (2001), "Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, pp.11539-11544.
- [3] T.G. Kim, D.R. Galloway, W.H. Langridge (2004), "Synthesis and assembly of anthrax lethal factor-cholera toxin B-subunit fusion protein in transgenic potato", *Mol. Biotechnol.*, **28**, pp.175-183.
- [4] H. Daniell, S.B. Lee, T. Panchal, P.O. Wiebe (2001), "Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts", *J. Mol. Biol.*, **311**, pp.1001-1009.
- [5] M.A. Aziz, S. Singh, P.A. Kumar, R. Bhatnagar (2002), "Expression of protective antigen in transgenic plants: a step towards edible vaccine against anthrax", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **299**, pp.345-351.
- [6] A.V. Karasev, S. Foulke, C. Wellens, A. Rich, K.J. Shon, I. Zwierzynski, D. Hone, H. Koprowski, M. Reitz (2005), "Plant based HIV-1 vaccine candidate: tat protein produced in spinach", *Vaccine*, **23**, pp.1875-1880.
- [7] Zhong Heng, Farzaneh Teymouri, Brad Chapman, Shahina Maqbool, Robab Sabzikar, Yahia El-Maghraby, Bruce Dale, Mariam Sticklen (2003), "The dicot pea (*Pisum sativum* L.) rbcS transit peptide directs the *Alcaligenes eutrophus* polyhydroxybutyrate enzymes into the monocot maize (*Zea mays* L.) chloroplasts", *Plant Science*, **165**, pp.455-462.
- [8] Matakas Jason, Venkatesh Balan, William F. Carson, Dahai Gao, Federica Brandizzi, Steven Kunkel, Mariam Sticklen (2013), "Plant-produced recombinant human interleukin-2 and its activity against splenic CD4+T-cells", *Intl. J. Life Sci. Biotechnol. & Pharma Res.*, **2**(2), pp.192-203.
- [9] A. Vitale, J. Denecke (1999), "The endoplasmic reticulum: gateway of the secretory pathway", *Plant Cell*, **11**, pp.615-628.
- [10] Mei Chuansheng, SangHyuck Park, Robab Sabzikar, Qi, Callista Ransom, Mariam Sticklen (2008), "Green Tissue-Specific Production of a Microbial Endo-Cellulase in Maize (*Zea mays* L.) Endoplasmic-Reticulum and Mitochondria Converts Cellulose into Fermentable Sugars", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **10**, pp.75-83.
- [11] B. Kleizen, I. Braakman (2004), "Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. Curr. Opin", *Cell Biol.*, **16**, pp.343-349.
- [12] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum*, **15**, pp.473-497.
- [13] Nguyen Thang, Mariam Sticklen (2013), "Barley HVA1 Gene Confers Drought and Salt Tolerance in Transgenic Maize (*Zea Mays* L.)", *Adv. Crop Sci. & Technol.*, **1**(1), 8 pages (online), <http://dx.doi.org/10.4172/acst.1000105>.