

**TỔNG HỢP cDNA MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN TOXOCARA
EXCRETORY-SECRETORY (TES) -30 BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA HỌC**

Đỗ Như Bình

Bệnh viện Quân y 103, Học viện Quân y

Tóm tắt

Bệnh giun đũa chó mèo không có các triệu chứng điển hình nên việc chẩn đoán lâm sàng gặp rất nhiều khó khăn, chủ yếu dựa trên kỹ thuật ELISA phát hiện kháng thể IgG kháng lại kháng nguyên chất tiết của *Toxocara spp.* (*Toxocara Excretory-Secretory* - TES). TES-30 là một trong những kháng nguyên chính, quan trọng và mang tính bảo tồn cao của giống *Toxocara*, được tiết ra bởi ấu trùng giai đoạn hai khi di chuyển trong cơ thể vật chủ. Do việc nuôi ấu trùng để thu nhận kháng nguyên TES này rất khó khăn nên chúng tôi đã tiến hành tổng hợp nhân tạo gen mục tiêu mã hóa kháng nguyên TES-30. Đầu tiên, gen mục tiêu (mã số: AB009305.2) được tối ưu trình tự mã bộ ba cho phù hợp biểu hiện trong tế bào vật chủ *E. coli*, và 18 đoạn oligos ngắn được thiết kế và tổng hợp bằng phần mềm DNA works, gen mục tiêu được tổng hợp nhân tạo bằng phương pháp PCR hai bước. Tiếp đó, trình tự gen đã tổng hợp được đưa vào vector tách dòng pJET1.2/blunt để kiểm tra khả năng tổng hợp và giải trình tự gen để đánh giá kết quả biểu hiện. Kết quả giải trình tự cho thấy phương pháp này cho phép tổng hợp được trình tự gen mục tiêu với độ chính xác là 3/7 dòng plasmid. Tổng hợp thành công được trình tự gen mong muốn giúp chủ động được nguồn nguyên liệu và mở ra triển vọng tổng hợp các gen tái tổ hợp khó trong tương lai.

Từ khóa: Tổng hợp gen hóa học, Toxocariasis, TES-30, gapless PCR

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Toxocariasis là bệnh do nhiễm ấu trùng *Toxocara spp.* (*Toxocara canis* từ chó và *Toxocara cati* từ mèo) ở người, có thể không triệu chứng nhưng cũng có thể gây tổn thương nhiều cơ quan khác nhau, tùy thuộc vào vị trí ấu trùng cư trú [1] [6]. Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, các ấu trùng giun đũa chó mèo tiết ra các kháng nguyên gọi là kháng nguyên tiết (*Toxocara spp.* excretory-secretory antigens - TES). Về mặt bản chất, các TES là một nhóm các glycoprotein, bao gồm các protein có kích thước dao động từ 30 đến khoảng 400 kDa với một hàm lượng lớn các gốc đường trong phân tử. Trong đó, TES-30 là một trong những kháng nguyên chính, quan trọng và mang tính bảo tồn cao của giống *Toxocara*, là một proteoglycan protein được tiết ra bởi ấu trùng giai đoạn hai khi di chuyển trong cơ thể vật chủ với trọng lượng phân tử là 30 kDa, bao gồm 227 axit amin [3],[8]. Phương pháp chẩn đoán bệnh giun đũa chó mèo được sử dụng phổ biến hiện nay là dựa trên kỹ thuật ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay- xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzyme) phát hiện kháng thể IgG trong huyết thanh người bệnh kháng lại kháng nguyên của *Toxocara spp.*[3],[8]. Hiện nay một số bộ kit ELISA thương mại ở Việt Nam sử dụng kháng nguyên chất tiết thu nhận được trong quá trình nuôi giun *Toxocara spp.* Tuy nhiên, việc thu nhận kháng nguyên theo phương pháp này tốn rất nhiều thời gian, công sức. Mặt khác, độ đặc hiệu của ELISA sử dụng kháng nguyên tổng số thường thấp do có hiện tượng phản ứng chéo với một số bệnh giun sán khác [5].

Trong khi đó các kit nhập ngoại sử dụng ADN tái tổ hợp thì có giá thành cao, tạo nên gánh nặng kinh tế cho bệnh nhân khi đi xét nghiệm [2],[5], [7]. Do đó việc ứng dụng phương pháp hóa học tổng hợp thành công cDNA mã hóa kháng nguyên tiết (TES)-30 với số lượng lớn tại Việt Nam, sẽ giúp tạo nguồn nguyên liệu dồi dào chế tạo được bộ kit ELISA hoặc test nhanh, góp phần nâng cao độ nhạy và độ đặc hiệu trong chẩn đoán.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi sinh vật: Chủng *E. coli* Top10 được sử dụng để nhân dòng gen. Chủng *E. coli* Rosseta được sử dụng để biểu hiện.

Vector pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific) để nhân dòng gen, pET52b(+) (Merck) để biểu hiện gen; Trình tự gen mã hóa cho kháng nguyên TES-30 được lấy trên GenBank (mã số AB009305.2) để tối ưu hóa mã bộ ba mã hóa amino acid.

- **Hóa chất:** Các kit tinh sạch trực tiếp sản phẩm PCR (Thermo Fisher); Hóa chất điện di: Agarose, 1kb DNA Ladder (Norgen); Enzyme: Pfu DNA polymerase, Taq DNA polymerase, T4 DNA ligase, *Nco*I và *Sac*I.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu mô tả thực nghiệm

- Phương pháp nghiên cứu và kỹ thuật sử dụng:

2.1. Tối ưu hóa gen TES-30

Tối ưu hóa gen được ứng dụng rộng rãi trong các nghiên cứu nhằm tăng khả năng biểu hiện của protein mục tiêu. Kỹ thuật này được thực hiện bằng cách thay đổi trình tự gen để từ đó tăng giá trị CAI (Codon Adaptation Index - giá trị dao động từ 0 đến 1. Giá trị CAI = 1 chỉ các gene có xu hướng sử dụng các codon phổ biến nhất và giá trị CAI = 0 chỉ các gene sử dụng các codon không được dùng trong hệ thống biểu hiện) cũng như loại bỏ các nhân tố có tác động tiêu cực đến sự biểu hiện như trình tự lặp lại, trình tự tương tự Shine-Dalgarno hay các vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn [4]. Dựa trên trình tự gen TES-30 trên GenBank (mã số AB009305.2), chúng tôi sử dụng công cụ tìm kiếm chuỗi bắt cặp (BLAST) và công cụ phân tích mã bộ ba hiếm (GenScript) để tối ưu tỉ lệ GC và chỉ số tương thích mã bộ ba cho chuỗi amino acid nhằm tối ưu hóa gen trên hệ thống biểu hiện *E. coli*. Giá trị mong muốn của chỉ số CAI để gen mục tiêu được biểu hiện tốt trong vật chủ là trên 0,8. Tỷ lệ phần trăm GC trong gen nên nằm trong khoảng từ 30 đến 70% và nên được phân bố đồng đều suốt chiều dài gen. Tỷ lệ sử dụng các codon hiếm để biểu hiện gen của vật chủ (có giá trị dưới 30) nên bằng 0, nếu không có thể làm giảm hiệu quả việc biểu hiện của gen. Yếu tố có khả năng ức chế quá trình phiên mã yêu cầu phải bằng 0. Nếu các chỉ số cho thấy trình tự gen ban đầu không phù hợp để cải thiện các giá trị mong muốn.

2.2. Tổng hợp gen TES-30 bằng phương pháp tổng hợp gen hai bước (two-step synthesis method)

Gen mục tiêu sau khi được tối ưu hóa và bổ sung thêm điểm cắt của enzyme hạn chế sẽ được phân tích bằng phần mềm DNAWorks (v3.2.3) để thu nhận 9 cặp oligo với độ dài mỗi oligo là 60 nucleotids (riêng 2 oligo ngoài có chiều dài ngắn hơn). Các oligo nằm liên tiếp nhau có trình tự nối tiếp nhau, phủ kín toàn bộ chiều dài gen. Một cặp mỗi ngắn (cặp oligo ngoài cùng) được thiết kế thêm vị trí cắt của 2 enzyme giới hạn *Nco*I và *Sac*I để ghép nối gen sau này. Các đoạn oligos và môi được tổng hợp bởi Công ty MacroGen (Hàn Quốc). Quá trình tổng hợp gen gồm 2 giai đoạn:

- Giai đoạn 1 (tạo đoạn gen) với 18 đoạn oligos (Tes30-1 đến Tes30-18) được thiết kế gói lên nhau, đoạn oligonucleotide được tổng hợp bằng phản ứng PCR tự môi, tổng thể tích 50 μ l bao gồm: hỗn hợp oligo (20 μ M mỗi loại) 1 μ l, enzyme *Pfu* polymerase (2U/ μ l) 1 μ l, dNTPs (2,5 mM) 4 μ l, 10X Buffer *Pfu* 4 μ l, H₂O vừa đủ. Chu trình nhiệt: 94°C/30 giây, 53°C/15 giây (lặp lại trong 25 chu kỳ), 72°C/15 giây. Sản phẩm PCR giai đoạn 1 được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR giai đoạn tạo gen mục tiêu.

- Giai đoạn 2: nhân gen bằng kỹ thuật PCR thông thường với khuôn là sản phẩm PCR của giai đoạn 1, mỗi là 2 oligo ở ngoài cùng của đoạn gen. Tổng thể tích 100 μ l bao gồm:

Oligo Tes30-1 (10 μ M) và Oligo Tes30-18 (10 μ M) 5 μ l, enzyme Pfu polymerase (2U/ μ l) 2 μ l, dNTPs (2,5 mM) 8 μ l, 10X Buffer *pfu* 10 μ l, Sản phẩm overlap PCR 4 μ l, H₂O vừa đủ. Chu trình nhiệt: 94^oC/2 phút, 58, 59, 60, 62^oC/30 giây (lặp lại trong 30 chu kỳ), 72^oC /15 giây. Kết quả được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

Sản phẩm PCR được tinh sạch trực tiếp bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) theo hướng dẫn nhà sản xuất.

2.3. Sàng lọc, kiểm tra kết quả tổng hợp gen

Kết quả tổng hợp gen mục tiêu cần được kiểm tra lại thông qua việc giải trình tự đoạn gen đã tổng hợp để kiểm tra đoạn gen thu được có trình tự đúng so với trình tự đoạn gen cần tổng hợp hay không. Đầu tiên, sản phẩm chứa đoạn gen đã tổng hợp sẽ được nối vào vector tách dòng pJET1.2 thông qua phản ứng nối ghép gen đầu bằng với sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase (Thermo Fisher). Sau đó, plasmid này được biến nạp vào tế bào *E. coli* Top10 theo phương pháp sốc nhiệt, lấy 200 μ L dịch nuôi cấy lên đĩa thạch LB có bổ sung ampicillin và nuôi ở 37^oC qua đêm. Kết quả biến nạp được sàng lọc bằng PCR, điện di trên gel agarose 1,5% để kiểm tra kết quả. Chọn khuẩn lạc tương ứng có kết quả sàng lọc đạt yêu cầu cấy chuyển vào ống falcon 50mL chứa 5 mL môi trường LB lỏng có bổ sung Amp, nuôi ở 37^oC, lắc 120 vòng/phút. Cuối cùng, tiến hành tách chiết thu plasmid, tinh sạch và giải trình tự gen bằng phương pháp Sanger tại hãng 1st Base (Malaysia). Kết quả giải trình tự được so sánh với trình tự ban đầu để kiểm tra độ chính xác của gen được tổng hợp.

2.4. Chỉnh sửa đột biến gen bằng PCR và kiểm tra bằng giải trình tự

Để thu được đoạn gen chính xác mã hóa cho TES-30, cần xác định cụ thể vị trí các đột biến điểm xảy ra trong quá trình tổng hợp gen. Từ đó có thể khoanh vùng và lựa chọn các đoạn gen có trình tự chính xác ở các dòng plasmid khác nhau sao cho các đoạn này đều có vùng nằm gối lên nhau và có thể phủ kín hoàn toàn độ dài đoạn gen mục tiêu. Khi đã xác định được, thực hiện phản ứng PCR với các cặp mồi tương ứng để khuếch đại những đoạn gen đó lên. Tiếp theo, cho các đoạn này overlap PCR với nhau để thu được đoạn gen cuối cùng không chứa các điểm đột biến. Cuối cùng, sản phẩm overlap PCR của các đoạn gen này được sử dụng làm khuôn để khuếch đại sản phẩm full length PCR.

3. Xử lý số liệu: Các dữ liệu sinh học được xử lý bằng các phần mềm tin sinh chuyên dụng như Bioedit, Rare codon analysis, Codon optimization để làm sạch và thu nhận dữ liệu nghiên cứu.

3.KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả tối ưu gen mã hóa TES-30 sử dụng phần mềm tin sinh

Trình tự cDNA mã hóa cho TES-30 được lấy từ ngân hàng GenBank với mã hiệu AB009305.2, được phân tích, kiểm tra bằng công cụ Genscript Rare Codon Analysis Tools. Kết quả phân tích cho thấy giá trị chỉ số CAI của gen này đối với *E.coli* là 0,64, không phù hợp để biểu hiện trong *E.coli*. Tiến hành tối ưu hóa trình tự gen mã hóa TES-30 bằng phần mềm codon optimization, thu được trình tự mới có chỉ số CAI là lên 0,80. Đồng thời, tỷ lệ sử dụng các codon hiếm trong gen cũng giảm đáng kể; không còn các codon có giá trị CFD nhỏ hơn 30. Như vậy, trình tự gen sau khi đã tối ưu phù hợp hơn để biểu hiện trong tế bào *E.coli*. Thêm các điểm cắt của hai enzyme giới hạn *Nco*I và *Sac* I vào hai đầu đoạn gen cần tổng hợp để có thể đưa gen mục tiêu vào vector biểu hiện pet52b. Kết quả thu được trình tự gen hoàn chỉnh cần tổng hợp như hình 1.

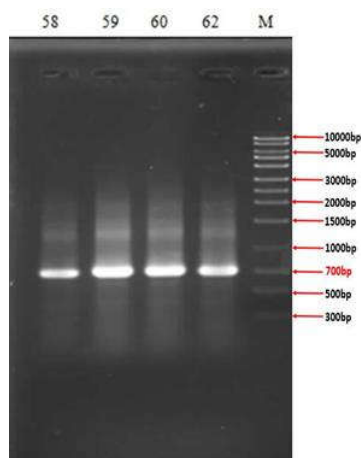
CCATGGGC (Nco I)

ACCCCGACAACACTACACGTCGTATGATCGCTGCTATCGTTGTTCTGCTGTGCCTGC
ACCTGTCTGCTACTAATGCTTGCCTACTAATAACGATTGCGGTATCTTCCAGGT
TTGCGTTAACCAACGTTTGTGTTGCTAACCAATCAAGGTTGTAATCCACCGTGCCTT
CCGCCGCAGGTTTGCCTGCTCCGATGTGCGTTGCTCCTCCACCTGCTGCTACTA
CAACTGCTGCTCCGGGTGTTACAACACTACACGTCCGCGTGCTTGTCTCCAAATTG
GACCCCGTTCAACAACAACACTGCTACATCGCTTCTCTGCCGGGTGTTTTCTGTTT
AACCAGGCTTCTGACTGGTGTACTCAGACTGGTTCTCGTGTTGTTTGGTTCGACC
AGTCTACTGTTGGTAATTTCCGGTCTGAACGAACTTTGTTAATTTCTTTCGCTCT
GGGTGCTGGTGTACTCGTTACTGGATCGGTGTTAACCGTCAGTTCGGTTCAGTGG
GTTTTCACTAATGGTTCCTCCGGTTATCTTCTCTAACTGGCGTCCGTCTCAGCCGG
ACGGTTGCTGCGGTTCTAACGTTACCTGCGCTTTCGTTAACTACGCTAACTTCCT
GGGTGAGTGGGACGACGCTCCGTGCGGTTCTCTGTTTACCACCCCGCAGGTTTC
GTTTGCAAACGTCCGCTG

GAGCTC (Sac I)

Hình 1. Kết quả tối ưu trình tự gen mã hóa kháng nguyên TES-30

2. Tổng hợp gen mã hóa TES-30 bằng phương pháp PCR hai bước



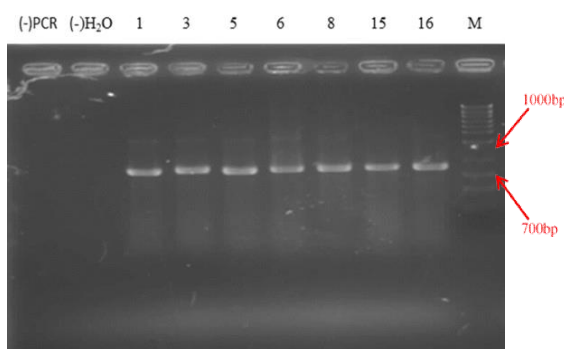
Hình 2. Sản phẩm *full length PCR* tổng hợp gen *TES-30*.

Giếng 58, 59, 60, 62: Sản phẩm *full length PCR* tổng hợp gen *TES-30* với khuôn là sản phẩm của *overlap PCR* với nhiệt độ gắn mỗi lần lượt là 58, 59, 60, 62°C.

Giếng M: HighRanger 1kb DNA Ladder (Norgen)

Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm PCR *full length* cho thấy đoạn gen mục tiêu được tổng hợp ở tất cả các điều kiện thử nghiệm với sản phẩm chính là một băng sáng rõ nét có kích thước khoảng 700bp phù hợp với tính toán lý thuyết là 692 bp. Chúng tôi lựa chọn sản phẩm được tổng hợp ở nhiệt độ bắt cặp mỗi lần là 62°C cho thí nghiệm tiếp theo do nhiệt độ càng cao thì lượng sản phẩm phụ càng được hạn chế.

Sản phẩm PCR tổng hợp gen ở điều kiện nhiệt độ gắn mỗi lần 62°C được tinh sạch trực tiếp bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) và kiểm tra độ tinh sạch bằng máy đo quang phổ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher). Kết quả cho thấy sản phẩm có độ sạch cao (kết quả không trình bày chi tiết) với chỉ số $1,8 < A_{260}/A_{280} < 2,2$ và nồng độ DNA đạt 88ng/ μ L, đủ điều kiện để thực hiện phản ứng nối gen vào vector tách dòng pJET1.2 blunt-end (cắt mở vòng bằng enzyme EcoRV tạo đầu bằng) và biến nạp vào tế bào *E. coli* Top10. Sản phẩm nối của gen mục tiêu với vector tách dòng sau đó được biến nạp vào *E. coli* Top10 và tiến hành nuôi chọn lọc trong môi trường LB rắn có kháng sinh ampicilline qua đêm.



Hình 3. Sàng lọc các dòng khuẩn lạc *E. coli* Top10 bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc. Giếng 1, 3, 5, 6, 8, 15, 16 : Sản phẩm *PCR* dương tính, được sàng lọc với khuôn là DNA từ các dòng khuẩn lạc mang gen *TES-30* đã tổng hợp. Giếng (-)PCR : mẫu âm tính của phản ứng PCR sàng lọc.

Kết quả sau khi sàng lọc 16 dòng khuẩn lạc được lấy ngẫu nhiên trên đĩa nuôi tế bào biến nạp sản phẩm nối bằng kỹ thuật PCR, thu được 7 dòng mang gen tổng hợp cho sản phẩm phù hợp với tính toán lý thuyết là 830bp. Dem giải trình tự ngẫu nhiên 3 dòng plasmid là TS1, TS8 và TS15 tại công ty 1stBase (Malaysia) thu được kết quả cho thấy không có một dòng plasmid nào mang trình tự chính xác tuyệt đối trong cả 3 dòng gửi đi giải trình tự. Cụ thể là ở mỗi dòng lại xuất hiện một số đột biến điểm như mất Nu, thừa Nu hoặc thay thế Nu.

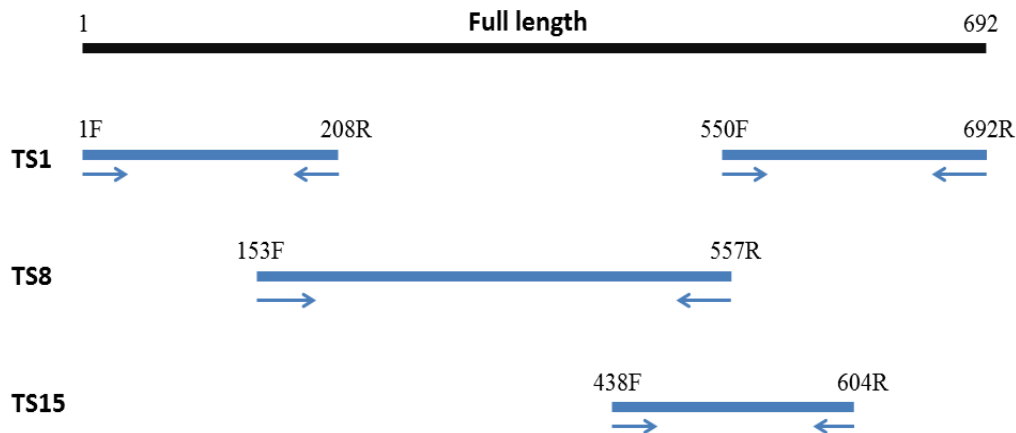
Bảng 1. Vị trí của các *Nucleotide* bị đột biến trên gen cần tổng hợp

Dòng plasmid	Vị trí đột biến
TS1	1, 2, 209, 546
TS8	1, 2, 152, 558, 692
TS15	1, 2, 38, 133, 430, 619

Các đột biến này có thể là do các sai sót trong quá trình tổng hợp oligonucleotid hoặc do các sai sót trong quá trình tổng hợp gen bằng kỹ thuật PCR. Để thu nhận được trình tự như mong muốn, chúng tôi tiến hành sửa gen cũng bằng kỹ thuật PCR dựa trên các đoạn khuôn đã có trình tự chính xác.

3. Chỉnh sửa đột biến gen bằng PCR

Từ vị trí các đột biến có thể thấy trên mỗi plasmid đã giải trình tự đều có những đoạn trình tự chính xác và chúng có thể chồng lấp lên nhau để tạo nên trình tự mục tiêu hoàn chỉnh. Dễ dàng nhận thấy trên plasmid TS8, ta có thể lấy được một đoạn gen chính xác và dài nhất từ vị trí 153 đến vị trí 557, do đó cặp mồi 153F và 557R đã được thiết kế để tổng hợp nên trình tự này. Trên plasmid TS1, bằng cách tiếp cận tương tự, các cặp mồi 1F và 208R cùng với 550F và 692R cũng được thiết kế để tổng hợp nên 2 đoạn gen từ 1 đến 208 và 550 đến 692. Cộng tất cả 3 đoạn gen cần tổng hợp nói trên với nhau, ta đã có đầy đủ trình tự gen từ 1 đến 592. Tuy nhiên, các đoạn gen nhỏ muốn tổng hợp được thành gen lớn phải có một đoạn chồng lấp có nhiệt độ biến tính đủ lớn để đảm bảo độ đặc hiệu. Cụ thể là từ vị trí 550 đến vị trí 557 chỉ có 8 *Nucleotide* chung là quá ít, vì vậy cần có một trình tự bao phủ được vị trí này đồng thời bắt cặp cả 2 đoạn gen thành phần. May mắn là trên plasmid TS15, ta có được một đoạn gen chính xác từ vị trí 431 đến vị trí 618, do đó cặp mồi 438F và 604R được thiết kế để tổng hợp nên trình tự cần thiết này (hình 4).



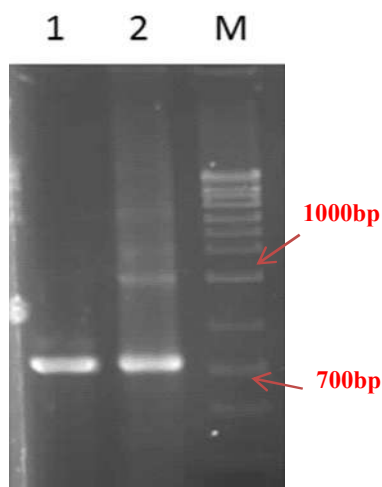
Hình 4. Sơ đồ các vùng gen đúng được chọn để sửa gen mã hóa *TES-30*.

TS1, *TS8*, *TS15*: tên của các *plasmid* đã được giải trình tự.

Các mũi tên 1F, 153F, 438F, 550F: mũi xuôi để sửa gen bắt cặp từ vị trí Nucleotide thứ 1, 153, 438, 550.

Các mũi tên 208R, 557R, 604R, 692R: mũi ngược để sửa gen bắt cặp từ vị trí Nucleotide thứ 208, 557, 604, 692.

Kết quả của phản ứng PCR sử dụng *Pfu* DNA polymerase nhằm tối ưu hóa quy trình sửa gen (Hình 5) cho thấy sản phẩm chứa 1 vạch sáng rõ nét có kích thước phù hợp, tương đương với sản phẩm của các *plasmid* đã giải trình tự. Từ đó, sản phẩm chỉ cần được tinh sạch trực tiếp trước khi tiếp tục được tách dòng lại và giải trình tự gen lại với quy trình tương tự như trong phần tổng hợp gen ban đầu.



Hình 5. Điện di kiểm tra sản phẩm *PCR* sửa gen *TES-30*.

Giếng 1: sản phẩm *PCR* sửa gen *TES-30*. Giếng 2: sản phẩm *PCR* dương tính với khuôn là sản phẩm tổng hợp gen cũ. Giếng M: HighRanger 1kb DNA Ladder (Norgen).

Sản phẩm full length *PCR* tinh sạch, nối vào vector tách dòng pJET1.2 và biến nạp vào *E. coli* Top10.



Hình 6. Kết quả sàng lọc các dòng khuẩn lạc mang gen *TES-30* được sửa bằng kỹ thuật *PCR* khuẩn lạc.

Giếng 1-18: sản phẩm *PCR* sàng lọc với khuôn là DNA từ các dòng khuẩn lạc chứa gen *TES-30* đã sửa. Giếng (-): mẫu âm tính của phản ứng *PCR* sàng lọc. Giếng M: HighRanger 1kb DNA Ladder (Norgen).

Kết quả (Bảng 2, Hình 7) cho thấy có một dòng plasmid là TS-sua-13 cho trình tự hoàn toàn chính xác. Trong hai dòng plasmid còn lại thì một dòng có đột biến thay thế một Nucleotid và một dòng có đột biến thiếu hai Nucleotid. Như vậy, có thể nhận thấy là mặc dù sử dụng *Pfu* DNA polymerase, phản ứng *PCR* vẫn làm phát sinh các đột biến điểm.

Bảng 2. Tổng hợp số lượng các đột biến điểm các dòng plasmid chứa gen đã chỉnh sửa

Dòng plasmid	Đột biến thay thế Nu	Đột biến thừa Nu	Đột biến thiếu Nu
TS-sua-6	1	0	0
TS-sua-13	0	0	0
TS-sua-15	0	0	2



Hình 7. Kết quả giải trình tự gen *TES-13-sua* có trình tự chính xác như gen *TES-30* cần tổng hợp.

Trong các thí nghiệm tiếp theo, dòng plasmid là TS-sua-13 tiếp tục được sử dụng để xây dựng vector biểu hiện và tạo kháng nguyên TES-30 tái tổ hợp.

4.KẾT LUẬN

Với mục tiêu tạo ra sản phẩm protein kháng nguyên TES-30 bằng con đường tái tổ hợp, cDNA mã hóa kháng nguyên TES-30 đã được tổng hợp thành công dựa trên phương pháp tổng hợp hóa học. Kết quả này cho phép tổng hợp các gen khác mà không cần trình tự DNA mạch khuôn, đồng thời mở ra triển vọng trong việc sử dụng nguồn kháng nguyên tái tổ hợp để chế tạo các kit chẩn đoán nhanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Smith H., Holland C., Taylor M., Magnaval JF., Schantz P., Maizels R. (2009), “How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge”, Trends in Parasitology, Vol.25 No.4, 182 – 188.
2. Stephen H., Gillespie., Richard D., Pearson. (2001), *Principles and Practice of Clinical Parasitology*, John Wiley & Sons, LTD.
3. Moreira GMSG, Telmo P de L, Mendonça M, Moreira Ângela Nunes, McBride AJA, Scaini CJ, et al. Human toxocariasis: Current advances in diagnostics, treatment, and interventions. Trends Parasitol. 2014;30(9):456–64
4. Dương Thị Kim Chi, Trần Văn Lăng, Lê Mậu Long (2016), *Xác định tham số quan trọng cho việc thiết kế gen dùng trong tái tổ hợp*. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học Quốc gia lần thứ IX —Nghiên cứu cơ bản và ứng dụng Công nghệ thông tin (FAIR'9)|; Cần Thơ, ngày 4-5/8/2016 DOI: 10.15625/vap.2016.000103
5. Nunes CM, Tundisi RN, Garcia JF, Heinemann MB, Ogassawara S, Richtzenhain LJ. Cross-reactions between *Toxocara canis* and *Ascaris suum* in the diagnosis of visceral larva migrans by western blotting technique. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1997;39(5):253–6.
6. Trần Thị Kim Dung, Trần Phủ Mạnh Siêu (2009), *Bệnh do giun lươn và giun đũa chó mèo*, Nhà xuất bản y học, tr.82-107.
7. WHO (2013), *Managing zoonotic public health risks at the human-animal environment interface*, http://www.who.int/entity/foodsafety/about/flyer_zoonoses.pdf.
8. Santos LMd, Donassolo RA, Berne ME, Leite FPL, Avila LFdC, Scaini CJ, et al. (2019) The serodiagnostic potential of recombinant proteins TES–30 and TES–120 in an indirect ELISA in the diagnosis of toxocariasis in cattle, horses, and sheep. PLoS ONE 14(3): e0213830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213830>

Abstract**CHEMICAL SYNTHESIS OF cDNA ENCODING TOXOCARA EXCRETORY-SECRETORY (TES)-30 ANTIGEN**

Do Nhu Binh

Military Hospital 103- Vietnam Military Medical University

*Toxocariasis has no typical symptoms, mainly based on ELISA technique to detect IgG antibodies against excretory/secretion antigen of *Toxocara* spp. (aka TES). TES-30 is one of the major and highly conserved antigens of the genus *Toxocara*, secreted by the second stage larvae. Due to the difficult cultivation of the second stage larvae to get this antigen, the target gene encoding the TES-30 antigen was artificially synthesized. After the codon optimization step, the target gene was synthesized by two-steps PCR using 18 overlapping oligonucleotides cover the complete sequence of this gene. The sequencing result showed that we successfully synthesized the target gene. In total 7 clones sequence, there are 3 clones sequence which were 100% identity with reference sequence. Successfully synthesized the desired gene sequence helps to open the prospect of having difficult recombinant genes in the future.*

Keywords: chemical synthesis; Toxocariasis, TES-30, gapless PCR**Cán bộ phản biện**

TS. Trương Văn Hạnh

Ngày nhận bài: 18/03/2021

Ngày gửi phản biện: 21/03/2021

Ngày đăng bài: 05/03/2021