

NGHIÊN CỨU TẠO BACULOVIRUS TÁI TỔ HỢP BIỂU HIỆN HEMAGGLUTININ (HA) CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 Clade 2.3.2.1b

Nguyễn Thị Hoa, Đồng Văn Quyền*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, *dvquyen@gmail.com

TÓM TẮT: Hiện nay, cúm gia cầm A/H5N1 vẫn là mối đe dọa đối với sức khỏe cộng đồng, đặc biệt sự xuất hiện của các clade mới thời gian gần đây với tính độc lực cao hơn, có khả năng kháng lại các vaccine được phát triển từ các clade lưu hành trước đó. Với mục đích tạo vaccine phòng cúm A/H5N1 bằng công nghệ tạo hạt giả virus (virus-like particles, VLPs), trong nghiên cứu này chúng tôi tạo baculovirus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên bề mặt Hemagglutinin (HA) từ chủng virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1b phân lập tại Quảng Ngãi (DkQN37/11), chủng virus kháng lại vaccine cúm NIBRG14 (clade 1) hiện đang được sử dụng tại Việt Nam. Gene mã hóa HA được khuếch đại bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu có gắn thêm trình tự Kozak, mã khởi đầu và vị trí nhận biết *Bam*HI ở đầu 5' của mỗi xuôi và trình tự nhận biết của *Hind*III ở đầu 5' của mỗi ngược. Sản phẩm PCR được tách dòng vào vector pCR[®]2.1 và xác định trình tự, sau đó được gắn vào vector trung gian baculovirus pBluBac4.5/V5-His-TOPO (Invitrogen) tại vị trí *Bam*HI và *Hind*III, nằm xen giữa gene *lacZ* và ORF1629 tạo plasmid tái tổ hợp pBluBacHA. Vector pBluBacHA sau đó được đồng chuyển nạp cùng với DNA của baculovirus vào tế bào loài sâu khoang, *Spodoptera frugiperda* (Sf9) để tạo baculovirus tái tổ hợp. Sự có mặt của gene *ha* và sự biểu hiện của protein HA trong virus tái tổ hợp được kiểm tra bằng PCR và Western blot sử dụng kháng thể kháng HA. Kết quả PCR và Western blot đều khẳng định chúng tôi đã tạo thành công baculovirus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên bề mặt của virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1b. Đây là tiền đề quan trọng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển vaccine VLP cúm A/H5N1 ở Việt Nam.

Từ khóa: Baculovirus, hemagglutinin, pBluBac4.5/V5-His-TOPO, virus cúm A/H5N1.

MỞ ĐẦU

Virus cúm H5N1 thuộc type A, họ Orthomyxoviridae, là chủng độc lực cao gây tỷ lệ tử vong trên 50% gia cầm và người bị nhiễm theo thống kê của Fedson (2005) và WHO (2011) [4, 13]. Để ngăn chặn sự lan truyền của virus cúm và những thiệt hại do virus cúm gây ra, theo New et al. (2006) [10] phương pháp hiệu quả nhất là dùng vaccine gây miễn dịch phòng virus.

Vaccine cúm hiện đang được sử dụng bao gồm vaccine dưới đơn vị (subunit), vaccine nhược độc và vaccine bất hoạt. Ước tính, với công nghệ sản xuất vaccine cúm hiện nay, hàng năm khoảng 300 triệu liều vaccine được tạo ra. Như vậy, trong trường hợp đại dịch xảy ra sẽ không cung cấp đủ lượng vaccine cần thiết. Ngoài ra, các vaccine này cũng còn bộc lộ những hạn chế nhất định được chứng minh bởi nghiên cứu của Glarza et al. (2005) [5]: vaccine nhược độc tạo được đáp ứng miễn dịch dài hạn nhưng có nguy cơ virus trở lại virus độc lực “lại độc” cho chính những người tiêm vaccine;

vaccine dưới đơn vị có độ an toàn cao nhưng tính sinh miễn dịch thấp, thường đòi hỏi liều kháng nguyên cao, cần phải tiêm lặp lại thường xuyên và kết hợp với các chất bổ trợ khác, bên cạnh đó việc tổng hợp các protein tái tổ hợp có tính sinh miễn dịch giống với protein tự nhiên cũng rất khó khăn.

Có nhiều hướng đi mới trong công nghệ sản xuất vaccine để tăng cường độ an toàn, hiệu lực của vaccine và hiệu suất sản xuất. Gần đây, hướng nghiên cứu tạo các hạt giả virus (virus-like particles, VLPs) đang được xem là một hướng mới trong việc tạo ra các vaccine thể hệ mới như Grgacic & Anderson (2006) [6]. VLPs được tạo ra bởi các protein cấu trúc của virus, có cấu trúc tương tự như các hạt virus tự nhiên nhưng không mang vật liệu di truyền của virus, do đó không có khả năng lây nhiễm. Bright et al. (2007) [1] đã chỉ ra rằng, do có cấu trúc tương tự virus tự nhiên và là tập hợp của các protein kháng nguyên quan trọng của virus nên VLPs sẽ được hệ thống miễn dịch phòng vệ của vật chủ nhận biết và tạo đáp ứng miễn dịch

phòng vệ cao tương tự như khi bị nhiễm virus tự nhiên. Vaccine VLP viêm gan B và vaccine VLP ung thư cổ tử cung là 2 vaccine đầu tiên được sản xuất bằng công nghệ tiên tiến này và đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chứng nhận bởi nghiên cứu của Chackerian (2007) [2]. Hệ thống biểu hiện baculovirus trong tế bào côn trùng đang được ứng dụng rộng rãi để biểu hiện các kháng nguyên virus cúm A/H5N1 và phát triển vaccine VLP cúm như nghiên cứu của Nerome et al. (2015), Ren et al. (2015) [9, 12].

HA là kháng nguyên bề mặt quan trọng của virus cúm A, kích thích cơ thể sinh ra đáp ứng miễn dịch dịch thể đặc hiệu với từng type HA và tham gia vào phản ứng trung hòa virus. Keawcharoen et al. (2005), Horimoto et al. (2006) [7, 8] đã chứng minh HA là protein vừa quyết định tính kháng nguyên, vừa quyết định độc lực của virus và là đích của bảo vệ miễn dịch nhằm ngăn chặn sự xâm nhiễm của virus ở cơ thể nhiễm đồng thời là cơ sở điều chế các vaccine phòng cúm hiện nay. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tạo baculovirus tái tổ hợp biểu hiện HA của virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1b nhằm mục đích phát triển vaccine VLP cúm A/H5N1.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1b (DkQN37/11) phân lập ở Quảng Ngãi vào năm 2011 do Trung tâm Chẩn đoán Thú y trung ương, Cục Thú y Việt Nam cung cấp để làm nguyên liệu nhân gene *ha*.

Vector pCR2.1 (Invitrogen, Hoa Kỳ) được

dùng để tách dòng gene *ha* trong tế bào *E. coli* chủng DH5 α . Vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO trong bộ kit của hãng Invitrogen (Cat# K2100-20) được sử dụng làm vector baculovirus trung gian mang hộp gene *ha*.

Các hóa chất dùng cho nghiên cứu được cung cấp từ các hãng BioRad, Invitrogen, New England Biolabs, Sigma (Hoa Kỳ), Fermentas, Merck (Đức), các enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III (New England Biolabs, Hoa Kỳ), T₄ DNA ligase (Invitrogen, Hoa Kỳ), Kit tinh sạch sản phẩm PCR (Fermentas, Đức).

Dòng tế bào côn trùng Sf9; môi trường nuôi cấy tế bào côn trùng (Grace's Insect Cell Culture Medium, Unsupplemented); huyết thanh bò (Gibco™ Fetal Bovine Serum, Qualified, Heat-Inactivated); đệm PBS (Phosphate-Buffered Saline (PBS), pH 7,4); cellfectinR II Reagent từ hãng Invitrogen. Kháng thể kháng HA của virus A/H5N1 do Viện Thú y và Kiểm dịch Hàn Quốc cung cấp.

Phương pháp nhân đoạn gene *ha* của virus cúm A/H5N1 bằng PCR

Do gene *ha* không mang trình tự Kozak, trình tự đóng vai trò quan trọng trong việc khởi đầu quá trình dịch mã ở sinh vật nhân chuẩn (Kozak, 1987) và vị trí cắt của các enzyme giới hạn phù hợp cho việc thiết kế vector để biểu hiện gene trong tế bào côn trùng tạo VLPs sau này, chúng tôi thiết kế cặp mồi mới để đưa trình tự nhận biết của enzyme *Bam*HI, trình tự Kozak và mã khởi đầu vào đầu 5' của mồi xuôi (HApBac-F) và vị trí nhận biết của *Hind* III tại đầu 5' của mồi ngược (HApBac-R), với trình tự như sau:

HApBac-F: 5' - ACG GGA TCC GGT CAT GGA GAA AAT AGT GCT TC - 3'

*Bam*HI trình tự Kozak

HApBac-R: 5' - TCG GAA GCT TGA TTG CCA GAG CTA GGG - 3'

*Hind*III

Phản ứng PCR khuếch đại gene *ha* được tiến hành trong tổng thể tích 25 μ l bao gồm: 5 μ l cDNA chủng DkQN37/11, 2,5 μ l đệm phản ứng 10X, dNTP mỗi loại 0,25 mM, 1 pmol mỗi mồi loại, 1 đơn vị DNA Dream® *Taq* polymerase của hãng Fermentas. Chương trình PCR được tiến hành theo các bước: 1 chu kỳ

94°C trong 3 phút; 35 chu kỳ 94°C trong 30 giây; 58°C trong 30 giây; 72°C trong 1 phút 30 giây; 1 chu kỳ ở 72°C trong 8 phút và cuối cùng giữ phản ứng ở 4°C.

Chọn dòng plasmid pCR®2.1 mang gene *ha*

Sản phẩm PCR được gắn vào vector pCR®2.1 bằng T₄ DNA ligase tạo vector

pCRHA và biến nạp vào tế bào *E. coli* (DH5 α). Các dòng vi khuẩn mang plasmid tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB đặc có bổ sung X-gal, kháng sinh ampicillin. Tách chiết DNA plasmid tái tổ hợp và kiểm tra khả năng mang gene *ha* bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III và xác định trình tự gene bằng máy xác định trình tự động.

Thiết kế vector trung gian baculovirus mang gene *ha*

Gene *ha* được tách ra khỏi vector pCRHA bằng *Bam*HI và *Hind*III, điện di phân tách trên gel agarose 1% và thu nhận lại bằng Kit thô gel của Fermentas (Đức). Sản phẩm tinh sạch sau đó được gắn vào vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO tại 2 vị trí enzyme tương ứng là *Bam*HI và *Hind*III nhờ T4 DNA ligase tạo nên vector tái tổ hợp pBluBacHA. Theo chiến lược thiết kế này, gene *ha* được gắn vào vùng xen giữa gene *lacZ* và ORF 1629. Đây là hai vị trí sẽ xảy ra sự trao đổi chéo trình tự tương đồng giữa pBluBac4.5/V5-His-TOPO và DNA của baculovirus để tạo ra baculovirus tái tổ hợp mang gene *ha*.

Đồng chuyển nạp tạo baculovirus tái tổ hợp

Quá trình đồng chuyển nạp (co-transfection) được thực hiện theo hướng dẫn trong bộ Kit do nhà sản xuất cung cấp. Hút 10 μ l DNA của baculovirus (Bac-N-Blue™ DNA) vào ống eppendorf 1.5 ml vô trùng, sau đó cho tiếp 4 μ l pBuBacHA vào ống và trộn nhẹ nhàng bằng pipet 1-2 lần. Bổ sung 1 ml môi trường nuôi cấy (Grace's insect medium) không có FBS. Bổ sung 20 μ l hóa chất cellfectin vào ống, trộn đều hỗn hợp chuyển nạp bằng pipet khoảng 2-3 lần, để hỗn hợp ở nhiệt độ phòng khoảng 5-10 phút. Chuyển toàn bộ hỗn hợp chuyển nạp vào đĩa tế bào Sf9 bằng cách nhỏ từng giọt một vào đĩa, lắc nhẹ đĩa bằng tay 2-3 lần cho hỗn hợp trải đều trên toàn bộ bề mặt đĩa tế bào. Chuyển đĩa tế bào đã được chuyển vào tủ nuôi cấy 28°C. Quan sát sự hình thành các CPE (Cytopathic effect) sau chuyển nạp, nếu đạt 70-80% lượng tế bào chết thì tiến hành thu virus.

Kiểm tra sự biểu hiện của kháng nguyên HA trong tế bào Sf9

Đĩa tế bào Sf9 sau lây nhiễm virus tái tổ hợp

được thu lại bằng ly tâm. Tế bào chứa virus được hòa trong đệm biến tính protein (Sample buffer) và ủ ở 95°C trong 5 phút, điện di phân tách trên gel polyacrylamide 12,5%. Protein được chuyển sang màng PVDF, ủ màng với kháng thể kháng thể 1 kháng HA trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó ủ với cộng hợp kháng thể 2 gắn enzyme Horseradish peroxidase (HRP) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Bổ sung cơ chất và chất hiện màu (HRP* colour development reagent) rồi đọc kết quả.

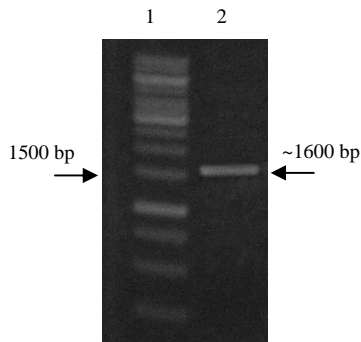
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng gene *ha* trong vector pCR2.1

Năm 2011, Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương phân lập được 1 chủng virus cúm A/H5N1 từ 1 con vịt chết do nhiễm virus cúm A/H5N1 tại tỉnh Quảng Ngãi, ký hiệu là DkQN37/11. Điều đáng chú ý là đàn vịt trước đó đã được tiêm phòng vaccine cúm gia cầm A/H5N1 (NIBRG14)-vaccine được phát triển bằng công nghệ di truyền ngược từ chủng virus cúm clade 1 (A/Vietnam/1194/2004) hiện đang được sử dụng ở Việt Nam. Điều này cho thấy đã xuất hiện các clade mới có khả năng chống lại sự bảo hộ của vaccine NIBRG14, do đó cần phát triển vaccine phù hợp với các clade mới nổi.

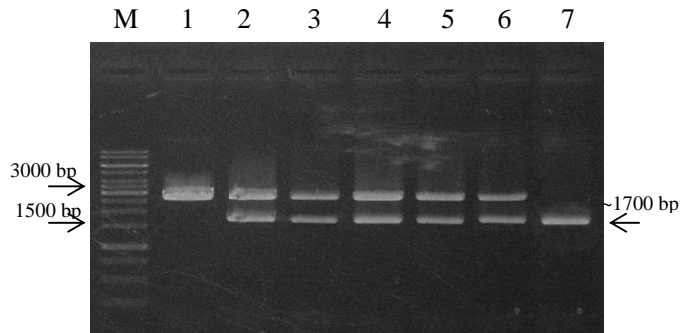
Gene *ha* từ chủng DkQN37/11 được khuếch đại bằng PCR và tách dòng trong vector pCR2.1 mô tả ở trên. Kết quả cho thấy, đoạn gene *ha* được khuếch đại đặc hiệu, chỉ xuất hiện một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 1.600 bp, tương đương với kích thước theo tính toán lý thuyết là 1.664 bp của gene *ha* sau khi gắn thêm trình tự Kozak và vị trí nhận biết của các enzyme cắt giới hạn (hình 1).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR purification Kit (Fermentas), gắn vào vector pCR2.1, biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* (DH5 α) và cấy chủng trên đĩa môi trường LB chọn lọc có bổ sung Ampicilin (100 μ g/ml), X-gal (100 μ g/ml). Tách chiết DNA plasmid và chọn lọc các dòng plasmid tái tổ hợp mang gene *ha* bằng cắt với enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Chúng tôi đã chọn được 5 dòng plasmid (pCRHA) có khả năng mang gene *ha*, khi cắt bằng 2 enzyme trên đều văng ra đoạn DNA có kích thước bằng kích thước sản phẩm PCR gene *ha* (hình 2).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR nhân gen *ha* bằng cặp mồi (HApBac-F và HApBac-R) trên gel agarose 1%

1: Thang DNA 1 kb chuẩn (Fermentas, Đức);
2: Sản phẩm PCR



Hình 2. Điện di đồ sản phẩm cắt DNA plasmid bằng *Bam*H I và *Hind* III trên gel agarose 1%

1: Thang DNA 1 kb; 2: Plasmid pCR2.1 gốc; 2-6: Plasmid tái tổ hợp từ khuẩn lạc trắng cắt bằng *Bam*H I và *Hind* III; 7: Sản phẩm PCR gen *ha*.

Để khẳng định chắc chắn các dòng plasmid pCRHA trên mang gen *ha*, chúng tôi tiến hành xác định trình tự gene. Sau khi phân tích trình tự gene bằng phần mềm BLAST và Bioedit chúng tôi khẳng định đã tách dòng thành công gene *ha* từ clade 2.3.2.1b. Phân tích trình tự còn cho thấy, gene khuếch đại đã gắn thêm các trình tự thiết yếu như trình tự Kozak, trình tự nhận biết của *Bam*HI và *Hind*III. Trình tự gene *ha* của chủng DkAN37/11 đã được đăng ký trên ngân hàng gene với mã số JQ898146.1.

Kết quả phân tích trình tự của gene *ha* cho thấy, gene chứa chuỗi amino acid SPQRRRRK-R/G tại vùng phân cắt trong phân tử HA, đây là trình tự đặc trưng của các chủng virus cúm A/H5N1 độc lực cao. Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện nhiều đột biến được xem là chỉ có ở chủng DkQN37/11 và giải thích cơ chế virus này có thể kháng lại vaccine NIBRG14, các kết quả này đã được công bố ở công trình nghiên cứu trước bởi Tung et al. (2013) [3].

Thiết kế vector trung gian baculovirus tái tổ hợp mang gene *ha*

Quá trình thiết kế vector baculovirus trung gian được mô tả ở trên. Gene *ha* được thu nhận từ vector pCRHA bằng cắt với *Bam*HI và *Hind*III sau đó gắn vào vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO tại vị trí 2 enzyme tương ứng tạo vector pBluBacHA. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* (DH5 α). Tiến hành tương

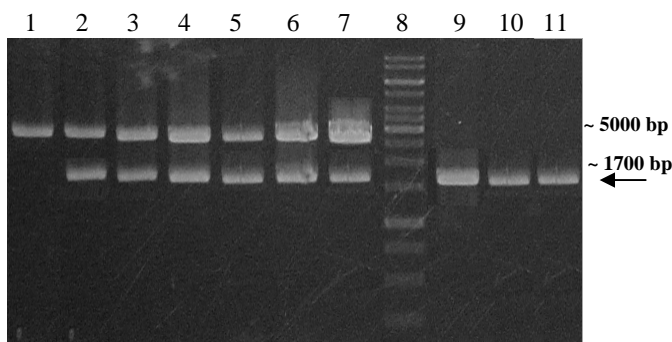
tự như lựa chọn pCR[®]2.1 tái tổ hợp mang gene *ha* ở trên chúng tôi thu được 6 plasmid pBluBacHA mang gen *ha*. Khi xử lý đồng thời vector pBluBacHA bằng hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III chúng tôi thu được băng DNA có kích thước bằng kích thước gene *ha* gắn trong pCRHA (hình 3, đường chạy 2-7). Trong khi đó, pBluBac4.5/V5-His-TOPO gốc không mang gene *ha* chỉ được cắt mở vòng, thể hiện băng DNA với kích thước tương ứng của vector gốc (hình 3, đường chạy số 1).

Sự có mặt của gene *ha* trong các dòng plasmid pBluBacHA tái tổ hợp được khẳng định lại bằng PCR sử dụng cặp mồi lai là polyhedrin forward sequencing primer (mồi xuôi-PFSP-F) bám vào vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO và mồi ngược HApBac-R bám vào gene *ha*. Với cặp mồi này chỉ có plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO mang gene *ha* mới cho sản phẩm PCR đặc hiệu. Kết quả điện di (hình 3, đường chạy 8-10) cho thấy, sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi PFSP-F và HApBac-R cho một băng có kích thước khoảng 1.800 bp (gene *ha* 1.664 bp và 120 bp của vector). Kết quả này chứng tỏ chúng tôi đã thiết kế thành công vector baculovirus trung gian mang gene *ha*.

Gene *ha* chỉ có thể biểu hiện trong tế bào Sf9 khi cấu trúc và trình tự hộp gene của chúng không bị biến đổi. Vì vậy, gene *ha* trong pBluBacHA được xác định lại bằng giải trình tự DNA bằng máy giải trình tự tự động. Kết quả

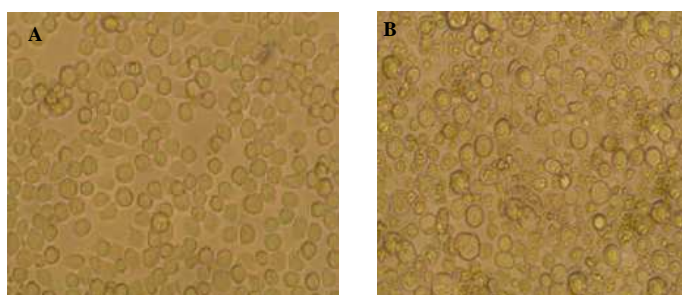
xác định trình tự (không nêu ở đây) một lần nữa khẳng định chắc chắn chúng tôi tạo thiết kế thành công vector trung gian baculovirus mang

hộp gene *ha*, gene nguyên vẹn được dịch mã thông suốt.



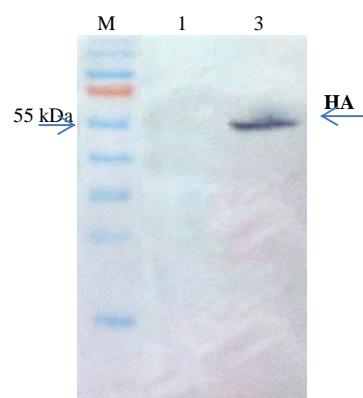
Hình 3. Điện di đồ kiểm tra plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO tái tổ hợp mang gen *ha*.

1: pBluBac4.5/V5-His-TOPO không mang gen; 2-7: pBluBacHA tái tổ hợp được cắt bằng *BamH I* và *Hind III*; M: thang DNA chuẩn 1 kb; 8-10: sản phẩm PCR nhân đoạn gen *ha* từ pBluBacHA bằng cặp mồi PFSP-F và HApBac-R



Hình 4. Kết quả đồng chuyển nạp tạo baculovirus tái tổ hợp

A. Hình ảnh tế bào Sf9 trước khi chuyển nạp; B. baculovirus tái tổ hợp sau 96 giờ lây nhiễm.



Hình 5. Kiểm tra biểu hiện gen *ha* trong baculovirus tái tổ hợp bằng Western blot với kháng thể kháng HA

M. Thang protein chuẩn (Fermentas), Đường chạy 1: Tế bào Sf9 không lây nhiễm; Đường chạy 2: Tế bào Sf9 lây nhiễm với baculovirus tái tổ hợp mang gen *ha*.

Tạo baculovirus tái tổ hợp mang gene *ha*

Để tạo virus tái tổ hợp mang gene *ha*, vector pBluBacHA và DNA khung của baculovirus đã được xử lý với enzyme *Bsu36 I* (cung cấp bởi nhà sản xuất) được đồng chuyển nạp vào tế bào sf9. Việc xử lý với *Bsu36 I* đã loại bỏ các thành phần quan trọng (đầu C của ORF1269, promoter polyhedrin và polyhedrin ORF) cần thiết cho việc tổng hợp và nhân lên của baculovirus trong tế bào. Cách duy nhất để DNA của baculovirus có thể tổng hợp nên virus khi được đưa vào trong tế bào Sf9 là chúng phải được bổ sung lại vùng bị loại bỏ này.

Khi đồng chuyển nạp với pBluBacHA, các vùng thiết yếu (ORF1629) sẽ được bổ sung từ vector trung gian bằng cơ chế tái tổ hợp trình tự tương đồng, đồng thời gene *ha* cũng được chuyển sang DNA khung của baculovirus tạo virus tái tổ hợp. Trong tế bào chủ, virus tái tổ hợp được nhân nên và ức chế chuyển hoá của tế bào chủ, tạo ra nhiễm độc hay thay đổi chức năng tế bào kết quả cuối cùng là tạo hiệu ứng bệnh lý (cytopathic effect - CPE) hoặc tế bào chết. Kết quả sau 96 giờ lây nhiễm cho thấy baculovirus đã xâm nhiễm vào toàn bộ tế bào Sf9 có trong đĩa nuôi cấy, thể hiện ở việc xuất hiện hạt nhỏ trên hầu hết bề mặt các tế bào,

lượng tế bào chết và ly giải nhiều cùng với hiện tượng một số tế bào tách khỏi bề mặt đĩa nuôi cấy dẫn đến mật độ tế bào giảm mạnh (hình 4, B), đây là thời điểm thu nhận baculovirus tái tổ hợp (ký hiệu p1) theo khuyến cáo của nhà sản xuất Invitrogen khi mà lượng tế bào chết khoảng 70-80%. Tuy nhiên do chưa tối ưu hóa các điều kiện nên thời gian xâm nhiễm và biểu hiện của baculovirus chậm hơn so với các công trình nghiên cứu trước của New et al. (2006), Pushko et al. (2005) [10, 11], các tác giả này nhận thấy virus tái tổ hợp tạo ra mạnh nhất ở thời điểm 72 giờ sau lây nhiễm.

Đánh giá sự biểu hiện của HA

Để biểu hiện protein đích trong tế bào côn trùng Sf9, chúng tôi lây nhiễm lại virus p1 với nồng độ 1 pfu/tế bào (khuyến cáo của nhà sản xuất Invitrogen cho lần đầu biểu hiện là từ 0,5-10 pfu/tế bào) vào tế bào Sf9 đĩa (6×10^5 tế bào/đĩa), tiếp tục nuôi cho đến khi tạo CPE. Để khẳng định sự biểu hiện của protein HA chúng tôi thu mẫu tế bào Sf9 sau khi nhiễm virus p1 tại thời 96 giờ, điện di trên gel polyacrylamid và kiểm tra bằng Western blot với kháng thể kháng HA. Kết quả Western blot cho thấy băng protein tái tổ hợp phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng HA của virus cúm A/H5N1 (hình 5).

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tạo được baculovirus tái tổ hợp biểu hiện kháng nguyên hemagglutinin HA của virus cúm A/H5N1 clade 2.3.2.1b. Kết quả nghiên cứu này là cơ sở khoa học và nguyên liệu cho các nghiên cứu tiếp theo để tạo vaccine VLP virus cúm A/H5N1 thế hệ mới.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bởi kinh phí đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số VAST02.04/13-14. Đề tài thực hiện tại phòng Vi sinh vật phân tử và sử dụng trang thiết bị Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bright R. A., Carter D. M., Daniluk S., Toapanta F. R., Atmad A., 2007. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated

- influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine*, 25: 3871-3878.
- Chackerian B., 2007. Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines*, 6(3): 381-390.
- Fedson D. S., 2005. Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development. *J. Public Health Policy*, 26(1): 4-29.
- Galarza J. M., Latham T., Cupo A., 2005. Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunology*, 18: 244-251.
- Grgacic E. V., Anderson D. A., 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*, 40: 60-65.
- Horimoto T., Kawaoka Y., 2006. Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses. *Trends. Mol. Med.*, 12: 506-514.
- Keawcharoen J., Amonsin A., Oraveerakul K., Wattanodorn S., Papravasit T., Karnda S., Lekakul K., Pattanarangsarn R., Noppornpanth S., Fouchier R. A., Osterhaus A. D., Payungporn S., Theamboonlers A., Poovorawan Y., 2005. Characterization of the hemagglutinin and neuraminidase genes of recent influenza virus isolates from different avian species in Thailand. *Acta Virologica*, 49(4): 277-280.
- Nerome K., Sugita S., Kuroda K., Hirose T., Matsuda S., Majima K., Kawasaki K., Shibata T., Poetri O. N., Soejoedono R. D., Mayasari N. L., Agungpriyono S., Nerome R., 2015. The large-scale production of an artificial influenza virus-like particle vaccine in silkworm pupae. *Vaccine*, 33(1): 117-125.
- New N., He Q., Damrongwatanapokin S., Du Q., Manopo I., Limlamthong Y., Fenner B. J., Spencer L., Kwang J., 2006. Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significant enhanced by suspension culture. *BMC Microbiology*, 24: 6-16.

10. Pushko P., Tumpey T. M., Bu F., Knell J., Robinson R., Smith G., 2005. Influenza virus-like particles comprised of the HA, NA, and M1 proteins of H9N2 influenza virus induce protective immune responses in BALB/c mice. *Vaccine*, 23(50): 5751-5759.
11. Ren Z., Ji X., Meng L., Wei Y., Wang T., Feng N., Zheng X., Wang H., Li N., Gao X., Jin H., Zhao Y., Yang S., Qin C., Gao Y., Xia X., 2015. H5N1 influenza virus-like particle vaccine protects mice from heterologous virus challenge better than whole inactivated virus. *Virus Res.*, 16(200): 9-18.
12. Tung D. H., Van Quyen D., Nguyen T., Xuan H. T., Nam T. N., Duy K. D., 2013. Molecular characterization of a H5N1 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.2.1b circulating in Vietnam in 2011. *Veterinary Microbiology*, 165(3-4): 341-348.
13. WHO, 2011, Avian Influenza http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html.

CONSTRUCTION OF A RECOMBINANT BACULOVIRUS EXPRESSING THE HEMAGGLUTININ (HA) OF AN A/H5N1 Clade 2.3.3.1B VIRUS

Nguyen Thi Hoa, Dong Van Quyen

Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus is still a threat to public health, especially, the emergence of a new clade recently with more virulent and resistant to the vaccine developed from the previously circulating clade has raised the need for development of new vaccines. With the ultimate aim of producing influenza virus-like particles (VLPs) vaccine, in this study we created recombinant baculovirus expressing Hemagglutini (HA) from H5N1 virus clade 2.3.2.1b isolated in Quang Ngai province (DkQN37/11) which is resistant to NIBRG14 (clade 1) currently used in Vietnam. The HA - encoding gene was amplified by PCR with a specific pair of primers, which has Kozak sequence, initiation codon and *Bam*HI site at the 5' of the forward primer and the recognition sequence of *Hind*III at the 5' of the reverse primer. The PCR product was cloned into pCR2.1 and sequenced then inserted into the baculovirus vector (pBluBac4.5/V5-His-TOPO, Invitrogen) at *Bam*HI and *Hind*III sites to yield pBuBacHA. Vector pBluBacHA then co-transfected with baculovirus DNA into insect cells (Sf9) to generate recombinant baculovirus. The presence of *ha* gene and the expression of recombinant HA protein in the recombinant virus were determined by PCR and Western blot using anti-HA antibody. PCR and Western blot results confirmed that we have successfully created a recombinant baculovirus expressing surface antigens of influenza A/H5N1 clade 2.3.2.1b. Our work provided essential material for further study to develop A/H5N1 VLP vaccine in Vietnam.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, avian influenza A (H5N1) virus, baculovirus transfer vector, pBluBac4.5/V5-His-TOPO, hemagglutinin, virus-like particles vaccine.

Ngày nhận bài: 30-12-2014