

THIẾT KẾ VÀ TÁCH DÒNG GEN NA CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 VÀO VECTOR pHW2000 LÀM NGUYÊN LIỆU TẠO CHỨNG GỐC VACCINE CÚM

Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Hoàng Thị Thu Hằng², Nguyễn Hùng Chí², Vũ Huyền Trang^{2,3}, Chu Hoàng Hà^{2,3}, Nguyễn Trung Nam^{2,3,✉}

¹Trường Đại học Lâm nghiệp

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nam@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 11.11.2017

Ngày nhận đăng: 28.3.2018

TÓM TẮT

Virus cúm A/H5N1 là virus RNA thuộc họ *Orthomyxoviridae*. Virus H5N1 độc lực cao có khả năng gây chết với tỷ lệ cao ở gia cầm và lây nhiễm từ gia cầm sang người. Công nghệ tạo giống gốc cho sản xuất vaccine phòng chống virus cúm A/H5N1 ứng dụng kỹ thuật di truyền ngược đòi hỏi phải có bước tạo bộ vector tái tổ hợp mang các phân đoạn gen của virus. Với mục tiêu tạo vector pHW2000 tái tổ hợp mang phân đoạn gen mã hóa neuraminidase (NA) - một trong hai loại kháng nguyên bề mặt quan trọng của virus cúm, chúng tôi đã thiết kế hai cấu trúc gen N1 NA dựa trên trình tự nucleotide gen NA của hai clade virus cúm A/H5N1 độc lực cao (clade 1.1 và clade 2.3.2.1c), đã được chứng minh có tính tương đồng về kháng nguyên, đặc tính di truyền với nhiều chủng cúm, được khuyến cáo có thể sử dụng đặc điểm di truyền kháng nguyên cho sản xuất vaccine phòng chống cúm gia cầm, sau đó tách dòng vào vector pHW2000. Cấu trúc gen NA của hai clade có kích thước 1453 bp, gồm: ngoài cùng (phía hai đầu gen) là hai đoạn nucleotide không mã hóa (46 bp và 57 bp) chứa vị trí gắn mỗi đặc hiệu và vị trí cắt của enzyme *Bsal*; ở giữa là một vùng mã hóa kích thước 1350 bp, dịch mã đầy đủ và đúng trình tự 449 amino acid, đảm bảo chức năng xúc tác và tính kháng nguyên của protein NA. Hai gen NA tương ứng với hai clade đã được tách dòng thành công vào vector pHW2000 tạo hai vector tái tổ hợp pHW2000-NA clade 1.1 và pHW2000-NA clade 2.3.2.1c. Các vector tái tổ hợp này sẽ được sử dụng làm nguồn vật liệu tạo kháng nguyên NA, chuẩn bị cho sự kết hợp với các vector mang các phân đoạn gen còn lại trong hệ gen virus cúm để tái tạo chủng virus tái tổ hợp làm chủng gốc cho sản xuất vaccine phòng chống cúm A/H5N1 ở gia cầm.

Từ khóa: H5N1, NA, pHW2000, tách dòng, vaccine

MỞ ĐẦU

Virus cúm A (influenza A virus) có hệ gen gồm 8 phân đoạn RNA sợi đơn, âm, mã hóa 10 protein, và được phân thành nhiều subtype khác nhau dựa trên hai loại glycoprotein kháng nguyên bề mặt là hemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA) với 18 subtype HA (H1- H18) và 11 subtype NA (N1 - N11) (Chen *et al.*, 2012; Ferhangi *et al.*, 2015). Trong số các subtype NA, subtype N1 có khả năng gây bệnh cho người với khả năng lây nhiễm nhanh, tỷ lệ tử vong cao, là nguyên nhân của nhiều đại dịch cúm đã từng diễn ra trên thế giới (dịch cúm H1N1 năm 1918 khiến gần 50 triệu người chết, cúm H5N1 năm 2003 - 2006 gây thiệt hại hàng trăm triệu gia

cầm và 157 người tử vong...) (Reid *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2009).

Kháng nguyên NA dạng nút lồi hình nấm, cấu trúc gồm một đầu dạng tetramer được hợp thành từ 4 tiểu đơn vị (monomer) hình cầu và một cuống mảnh dài khoảng 60 Å chứa vùng kỵ nước xuyên qua vỏ của virus (Gamblin, Skehel, 2010). Phân bố trên bề mặt hạt virus, NA vừa có vai trò kháng nguyên, vừa có hoạt tính neuraminidase với trung tâm hoạt động được hợp thành từ một số gốc amino acid nằm chính giữa mỗi tiểu đơn vị ở phần đầu (Yano *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2015). Vai trò của neuraminidase là xúc tác phản ứng phân giải liên kết glycoside giữa thụ thể chứa sialic acid trên bề mặt tế bào chủ và gai glycoprotein trên vỏ virus,

giúp virus xâm nhiễm vào tế bào (giai đoạn xâm nhập) và giải phóng các virion mới tạo thành ra khỏi bề mặt tế bào nhiễm (giai đoạn phóng thích) (Hausmann *et al.*, 1995; Fanning *et al.*, 2000).

Việt Nam là một trong những nước đã từng xuất hiện nhiều dịch cúm A/H5N1 ở gia cầm và luôn tiềm ẩn nguy cơ bùng phát các vụ dịch mới nếu công tác giám sát, phòng dịch không được chú trọng thường xuyên. Để phòng dịch, cần sử dụng vaccine có hiệu quả phòng vệ với các chủng virus đang lưu hành. Trong số các loại vaccine phòng chống cúm A ở gia cầm, vaccine tạo ra bằng kỹ thuật di truyền ngược (reverse genetics) luôn được đánh giá cao do an toàn, nhanh chóng đáp ứng nguồn giống gốc cho sản xuất vaccine có hiệu quả bảo vệ cao. Theo quy trình chuẩn của WHO về sản xuất vaccine cúm dựa trên kỹ thuật di truyền ngược, chủng virus gốc cho sản xuất vaccine được tái tạo bằng phương pháp tạo dòng các vector tái tổ hợp mang các phân đoạn cDNA genome virus, sau đó biến nạp các vector tái tổ hợp này vào tế bào động vật nuôi cấy để tái tạo hạt virus hoàn chỉnh (Ping *et al.*, 2015).

Với mục tiêu tạo nguồn vật liệu cho sản xuất vaccine cúm A/H5N1 bằng công nghệ di truyền ngược, chúng tôi tiến hành tách dòng riêng rẽ 8 phân đoạn cDNA genome virus cúm A vào các vector pHW2000 để tạo 8 vector tái tổ hợp theo phương pháp của Hoffmann *et al.*, (2000). Trong công bố của Nguyễn Thị Thu Hằng *et al.*, (2017), nhóm nghiên cứu đã trình bày thành công trong việc tách dòng 6 phân đoạn gen khung và phân đoạn gen mã hóa kháng nguyên HA của virus cúm vào các vector pHW2000. Công bố này mô tả công việc tiếp theo để tạo nguồn vật liệu vector pHW2000 tái tổ hợp mang phân đoạn gen N1 NA có nguồn gốc từ chủng A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1, nguồn gốc từ clade 1 ở Việt Nam) và chủng A/duck/Vietnam/HT-02/2014(H5N1) (clade 2.3.2.1c, nguồn gốc từ clade 2.3.2 ở Hong Kong) - là hai clade virus cúm độc lực cao, đã được chứng minh có tính tương đồng về kháng nguyên và đặc tính di truyền với nhiều clade cúm khác, nên gen NA của cả hai clade này được lựa chọn làm ứng viên nguyên liệu cung cấp nguồn gen kháng nguyên cho sản xuất vaccine cúm A/H5N1.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Thông tin về trình tự gen NA của virus cúm

A/H5N1 clade 1.1 và clade 2.3.2.1c đã được GS. TS. Lê Thanh Hòa – Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, cung cấp. Gen NA sau khi thiết kế được tổng hợp nhân tạo bởi Hãng Phusa Biochem (Việt Nam). Vector pHW2000 do Bệnh viện Nhi St. Jude (Hoa Kỳ) cung cấp. Các enzyme giới hạn (*Bsa*I, *Nhe*I, *Sma*I, *Sac*I, T4 ligase) và các cặp môi được cung cấp bởi Hãng Fermentas/Thermo Fisher Scientific/Invitrogen (Hoa Kỳ). Các bộ kit dùng để tách chiết và tinh sạch DNA plasmid, tinh sạch sản phẩm PCR của các Hãng Qiagen/Roche (Đức).

Phương pháp

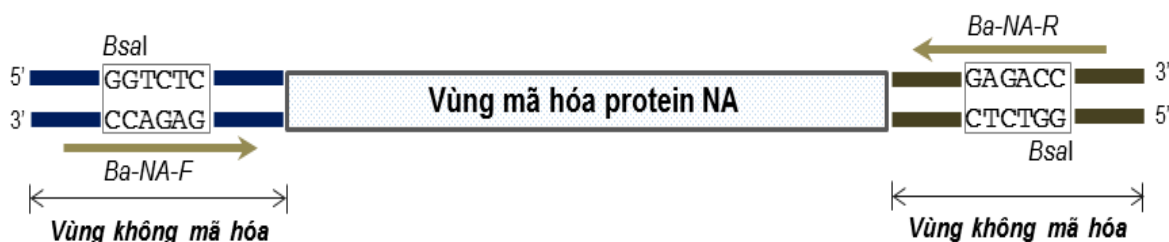
Thiết kế gen N1 NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c

Nguyên tắc của việc thiết kế gen N1 NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c sử dụng làm gen biểu hiện kháng nguyên cho sản xuất vaccine bằng kỹ thuật di truyền ngược là: (i) đảm bảo tính kháng nguyên và hoạt tính neuraminidase; (ii) thích hợp với mục tiêu tách dòng vào vector pHW2000 theo phương pháp của Hoffmann *et al.*, (2000). Do vậy, gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c được thiết kế có cấu trúc: tương ứng ở hai đầu gen là hai đoạn nucleotide không mã hóa chứa điểm bắt cặp đặc hiệu của mỗi xuôi (Ba-NA-F) và mỗi ngược (Ba-NA-R) trong phản ứng PCR nhân gen và vị trí nhận biết của *Bsa*I (Ba); ở giữa là vùng mã hóa (có mã khởi đầu, mã kết thúc) chứa trình tự nucleotide đầy đủ của gen N1 NA từ chủng A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1) và A/duck/Vietnam/HT-02/2014(H5N1) (clade 2.3.2.1c) (Hình 1). Trình tự cặp mỗi nhân gen NA (Bảng 1) được thiết kế theo Hoffmann *et al.*, (2001).

Gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c sau khi thiết kế được đặt tổng hợp nhân tạo dưới dạng lưu giữ trong vector pJET1.2.

Biến nạp và nhân gen NA trong *E. coli* DH5a

Hai vector pJET1.2 mang riêng rẽ hai gen NA được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5a bằng phương pháp sốc nhiệt, cấy trải dịch vi khuẩn sau biến nạp trên môi trường LB bổ sung kháng sinh chọn lọc. Các dòng khuẩn lạc dương tính với plasmid tái tổ hợp được chọn dòng bằng phương pháp colony-PCR và nhân sinh khối trong môi trường LB lỏng bổ sung ampicillin 100 ug/ml. Sinh khối vi khuẩn được thu nhận để tiến hành tách chiết, tinh sạch DNA plasmid và xác định trình tự gen đích của mỗi loại vector tái tổ hợp. Tương ứng với mỗi gen lựa chọn các dòng có kết quả trình tự nucleotide gen đích đạt độ tương đồng 100% so với trình tự gen đã thiết kế để tách dòng vào vector pHW2000.



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc của gen N1 NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c với hai vùng không mã hóa ở hai đầu chứa vị trí gắn của mồi (Ba-NA-F, Ba-NA-R), vị trí nhận biết của *BsaI* (5'-GGTCTC-3') và ở giữa là vùng mã hóa protein NA.

Tạo vector pHW2000 tái tổ hợp mang gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c

DNA plasmid của các dòng *E. coli* DH5α dương tính với pJET1.2-NA clade 1.1 và pJET1.2-NA clade 2.3.2.1c được tách và tinh sạch, sử dụng kit High Pure Plasmid Isolation (Roche, Đức). Plasmid tái tổ hợp được cắt bằng *BsaI*. Sản phẩm phản ứng cắt được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,2%, nhuộm với ethidium bromide và phát hiện các phân đoạn gen dưới máy soi gel bằng đèn UV. Gen NA có kích thước đúng theo lý thuyết được cắt để tiến hành thôi gel, tinh sạch gen bằng kit GeneJET™ Gel Extraction Kit (Qiagen, Đức).

Đồng thời với việc thực hiện phản ứng cắt và phân lập gen NA từ vector tái tổ hợp pJET1.2 mang gen quan tâm, tiến hành cắt mở vòng vector pHW2000 bằng *BsaI*. Thực hiện phản ứng ghép nối gen NA clade 1.1 và NA clade 2.3.2.1c vào vector pHW2000 để tạo hai vector tái tổ hợp, sử dụng T4 DNA ligase. Sản phẩm phản ứng ghép nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α, sau đó chọn dòng *E. coli* DH5α mang plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp conoly-PCR. Các dòng dương tính với plasmid tái tổ hợp được nhân dòng, tách chiết và tinh sạch DNA plasmid.

Kiểm tra sự có mặt của gen NA clade 1.1 và NA

clade 2.3.2.1c trong vector pHW2000 tái tổ hợp bằng phản ứng PCR khuếch đại gen NA với 2 cặp mồi là cặp mồi đặc hiệu bắt cặp trên gen NA (Ba-NA-F và Ba-NA-R), và cặp mồi đặc hiệu bám vector pHW2000 (pHW2000-F và pHW2000-R) với trình tự các cặp mồi trình bày trong bảng 1. Chu trình nhiệt phản ứng PCR: 94°C/5 min, 30 chu kỳ (94°C/30 s, 58°C/30 s, 72°C/1 min 30 s), 72°C/10 min, 4°C/∞.

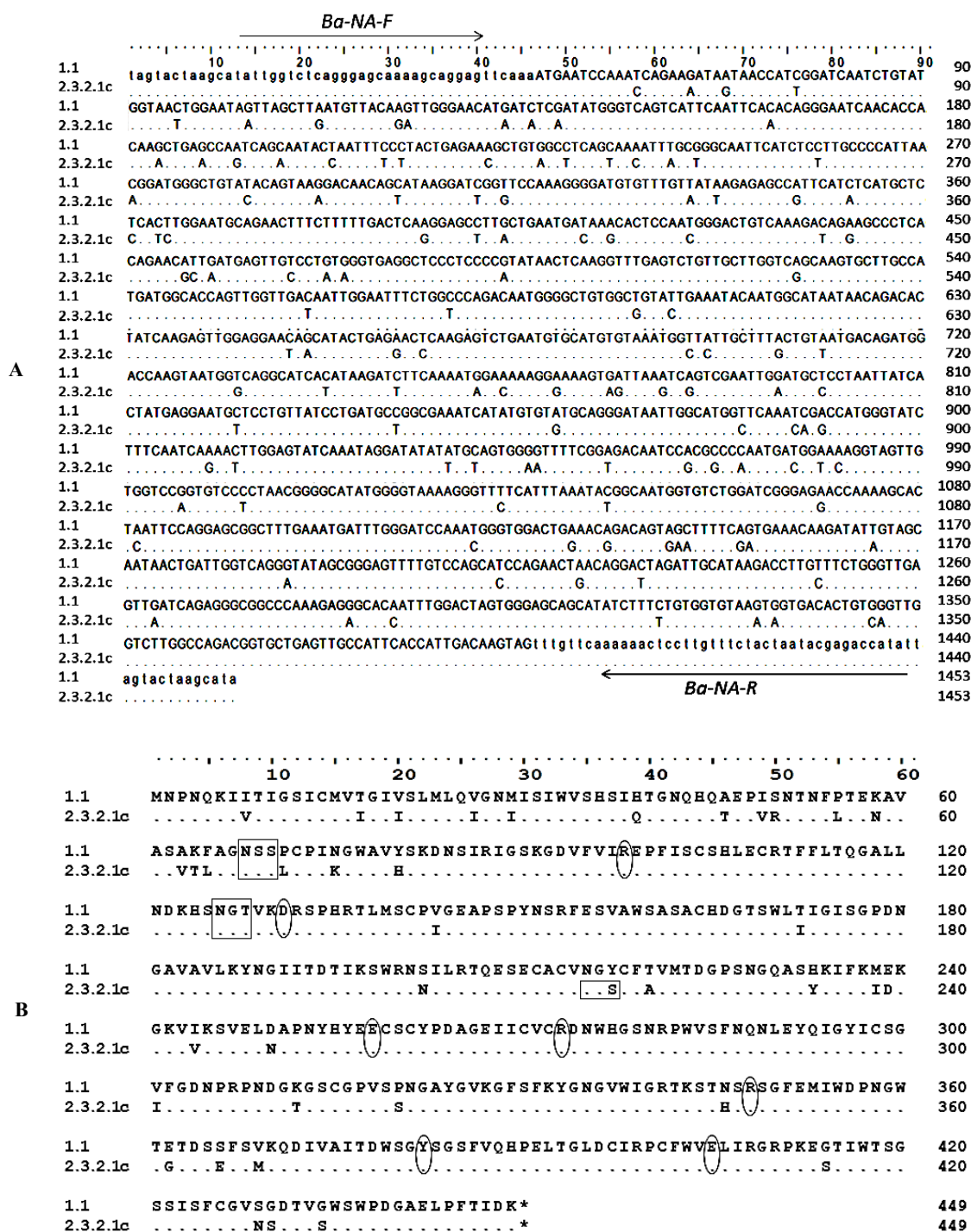
Bên cạnh đó, kết quả tách dòng còn được kiểm tra bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn. Do vị trí tách dòng gen NA vào vector pHW2000 nằm giữa điểm cắt của *NheI* và *SmaI* trên vector, và cũng chèn giữa hai điểm cắt của *SacI* trên vector, nên quá trình cắt kiểm tra được thực hiện với 2 phản ứng: (i) cắt bằng cặp *NheI* và *SmaI*; (ii) cắt bằng *SacI*.

Độ chính xác và tính đầy đủ của các trình tự gen NA đã tách dòng vào vector pHW2000 cũng được kiểm tra bằng xác định trình tự gen với cặp mồi bám vector, thực hiện trên máy đọc trình tự tự động ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ), sử dụng bộ hóa chất BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Kết quả xác định trình tự gen theo cả chiều xuôi và chiều ngược được ghép nối và phân tích bằng phần mềm DNA Star và BioEdit (Hoa Kỳ).

Bảng 1. Các cặp mồi đặc hiệu sử dụng trong tách dòng gen.

Gen/vector	Ký hiệu mồi	Trình tự mồi
NA	Ba-NA-F	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAGCAGGAGT
	Ba-NA-R	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTT
pHW2000	pHW2000F	CGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC
	pHW2000R	ACAGGTGTCCGTGTCGCGCGTCGCC

Ghi chú: Các nucleotide gạch chân là điểm nhận biết và cắt của *BsaI* (GGTCTC/N1/N5).



Hình 2. Trình tự nucleotide (A) và amino acid (B) của gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c. Gen NA của hai clade đều có trình tự nucleotide chứa vị trí gắn mỗi (mũi tên) và trình tự amino acid chứa 7 amino acid tạo thành vị trí thực hiện chức năng xúc tác của neuraminidase (khung hình bầu dục) và các vị trí N-glycosyl hóa (khung hình vuông/chữ nhật).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế gen kháng nguyên N1 NA

Trình tự nucleotide gen N1 NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c (Hình 2A) được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen NA đã phân lập từ chủng A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1) và A/duck/Vietnam/HT-02/2014(H5N1) (clade 2.3.2.1c) tương ứng, có kích thước và cấu trúc đều gồm 1453 bp với: 1 vùng mã hóa kích thước 1350 bp, trong đó 1347 bp (bắt đầu bằng bộ ba khởi đầu dịch mã - ATG) mã hóa 449 amino acid, và 3 bp tương ứng với 1 bộ ba kết thúc không mã hóa; 2 vùng không mã hóa nằm ở hai đầu với kích thước và trình tự tương ứng là 46 bp - 5' tagtactaagcatattgggtctcaggagcaaaagcaggagtcaaa 3' và 5' tttgttcaaaaaactccttgttctactaatacagaccatattagta ctaagcata 3', trong đó các nucleotide in nghiêng là vị trí gắn đặc hiệu của mỗi xuôi và ngược trong phản ứng PCR nhân gen, và các nucleotide gạch chân là vị trí nhận biết/trình tự bổ sung với vị trí nhận biết của *Bsa*I. Với cấu trúc gen NA đã thiết kế của cả hai clade, khi thực hiện phản ứng PCR nhân gen NA sẽ tạo sản phẩm đặc hiệu có kích thước gồm vùng mã hóa và hai đoạn nucleotide không mã hóa ở hai đầu gen, bắt đầu ở vị trí gắn mỗi đặc hiệu, với tổng số nucleotide là 1434 bp (1350 bp + 84 bp).

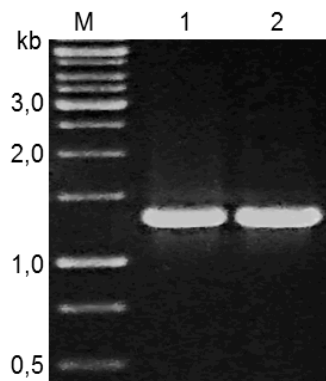
Khi so sánh sự tương đồng về trình tự amino acid do gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c mã hóa bằng chương trình ClustalW và BLAST thì độ tương đồng giữa hai trình tự là 92%. Đặc biệt, protein do gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c mã hóa đều gồm 449 amino acid (Hình 2B) với đầy đủ các vị trí quan trọng đảm bảo chức năng và tính kháng nguyên của protein NA như:

Vị trí thực hiện chức năng xúc tác (catalytic site) của neuraminidase: Ở cả hai clade đều được hợp thành từ 7 amino acid nằm đúng vị trí, phân bố trên bề mặt của cả 4 tiểu đơn vị hợp thành đầu tetramer dạng cầu của NA, gồm: Arg (R) - 98, Asp (D) - 131, Glu (E) - 258, Arg (R) - 273, Arg (R) - 348, Tyr (Y) - 382, Glu (E) - 405. Các công bố về trình tự gen NA của virus H5N1 clade 1.1 và clade 2.3.2.1c trên ngân hàng NCBI (National Center for Biotechnology Information) đã khẳng định vai trò của những vị trí này trong việc đảm bảo chức năng thực hiện hoạt tính enzyme của NA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/408717469>).

Vị trí N-glycosyl hóa (glycosylation site): Ở protein NA clade 1.1 có 2 vị trí glycosyl hóa là 68NSS và 126NGT. Protein do gen NA clade 2.3.2.1c mã hóa có 3 vị trí glycosyl hóa với 2 vị trí có trình tự và thứ tự amino acid giống protein NA clade 1.1 và thêm 1 vị trí là 215NGS.

Vùng cuống (stalk region): Ở subtype N1 NA, vùng cuống được tạo thành bởi khoảng gần 50 amino acid, tương ứng với vị trí amino acid 40 - 90 tính từ đầu tận cùng N của protein, và cần có ít nhất 1 gốc Cys (C) và 1 vị trí glycosyl hóa (Reid *et al.*, 2000). Các đặc điểm này đều có ở protein mã hóa bởi hai trình tự gen NA đã thiết kế. Cụ thể, trong vùng amino acid vị trí 40 - 90 mã hóa bởi gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c đều có 1 gốc Cys ở amino acid 72 và 1 vị trí glycosyl hóa là 68NSS.

Như vậy, trình tự nucleotide gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c đã thiết kế đảm bảo chức năng, tính kháng nguyên và thích hợp cho mục tiêu tạo dòng gen NA vào vector pHW2000 (có vị trí nhận biết của *Bsa*I) theo phương pháp của Hoffmann *et al.*, (2000) để tạo vector tái tổ hợp pHW2000-NA.



Hình 3. Kiểm tra sản phẩm conoly-PCR các dòng *E. coli* DH5 α biến nạp pJET1.2-NA clade 1.1 và pJET1.2-NA clade 2.3.2.1c. M: marker 1kb (Fermentas); 1: dòng khuẩn lạc dương tính với pJET1.2-NA clade 1.1; 2: dòng khuẩn lạc dương tính với pJET1.2-NA clade 2.3.2.1c.

Nhân gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c

Kết quả chọn dòng *E. coli* DH5 α chứa plasmid tái tổ hợp mang gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c cho thấy đã biến nạp thành công 2 vector tái tổ hợp pJET1.2-NA clade 1.1, pJET1.2-NA clade 2.3.2.1c vào *E. coli* DH5 α , với một phần kết quả được thể hiện ở hình 3: sản phẩm phản ứng conoly-PCR chỉ xuất hiện một băng vạch đặc hiệu duy nhất có kích thước tương ứng với kích thước tính toán theo lý

thuyết của 2 gen NA đã thiết kế là 1434 bp - bằng tổng kích thước vùng mã hóa các amino acid của protein NA và hai đoạn nucleotide không mã hóa ở hai đầu gen tính từ vị trí gắn mỗi đặc hiệu.

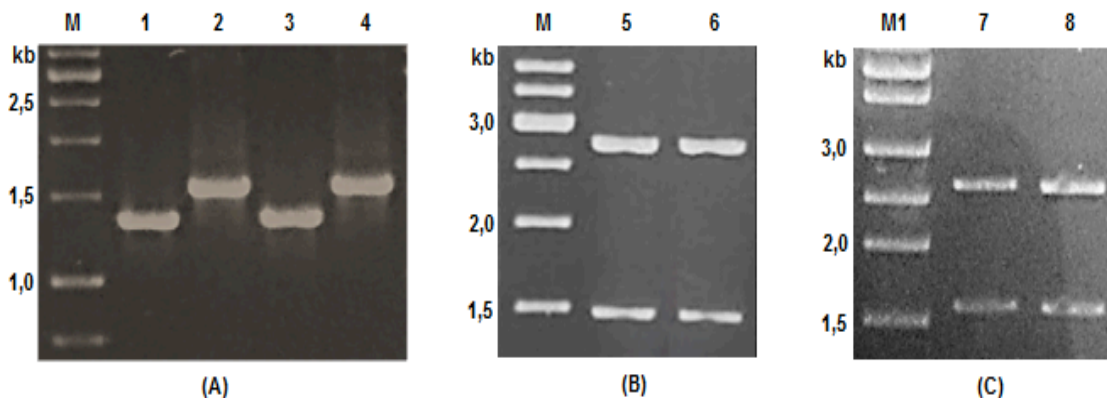
DNA plasmid của các dòng khuẩn lạc dương tính với phản ứng conoly-PCR được tách, tinh sạch và đọc trình tự nucleotide gen NA theo cả chiều xuôi và chiều ngược. Tương ứng với mỗi gen lựa chọn các dòng có kết quả đọc trình tự nucleotide gen đích được xác định có độ chính xác 100% so với trình tự gen đã thiết kế để tiếp tục dòng hóa vào vector pHW2000, sử dụng *BsaI* và T4 DNA ligase.

Tạo hai vector tái tổ hợp pHW2000-NA clade 1.1 và pHW2000-NA clade 2.3.2.1c

Sau khi tách dòng và kiểm tra sự có mặt của gen NA trong vector pHW2000 bằng PCR với hai loại mỗi là mỗi đặc hiệu gen và mỗi đặc hiệu vector, kết quả chỉ ra đã biến nạp thành công hai gen NA tương ứng với hai clade vào hai vector pHW2000: sản phẩm PCR của từng phân đoạn gen khi nhân lên với

mỗi đặc hiệu gen hay mỗi bắt cặp vector cũng chỉ xuất hiện một băng đặc hiệu duy nhất có kích thước đúng theo lý thuyết: khoảng 1430 bp khi nhân bằng mỗi đặc hiệu gen, và khoảng 1600 bp khi nhân bằng mỗi bám vector (Hình 4A).

Kết quả tạo dòng cũng được kiểm tra bằng 2 phản ứng cắt vector tái tổ hợp với enzyme giới hạn: cắt bằng cặp *NheI* và *SmaI*, và cắt bằng *SacI*. Sản phẩm phản ứng cắt được điện di kiểm tra trên gel agarose cho thấy: sản phẩm cắt pHW2000-NA clade 1.1 và pHW2000-NA clade 2.3.2.1c bằng cặp *NheI* và *SmaI* (Hình 4B) hay bằng *SacI* (Hình 4C) cũng đều xuất hiện hai băng vạch: một băng có kích thước lớn tương ứng với kích thước vector pHW2000, và một băng kích thước nhỏ tương ứng kích thước gen NA. Bên cạnh đó, do điểm cắt của *SacI* trên vector pHW2000 nằm xa hơn so với điểm cắt của *NheI* và *SmaI* trên pHW2000 tính từ vị trí gắn gen NA, nên sản phẩm phản ứng cắt cho băng vạch tương ứng chứa gen NA khi cắt bằng *SacI* có kích thước lớn hơn so với cắt bằng *NheI* và *SmaI*.



Hình 4. Kiểm tra kết quả tách dòng gen NA vào vector pHW2000 bằng PCR sử dụng cặp mỗi đặc hiệu gen và cặp mỗi đặc hiệu vector (A), cắt bằng cặp *NheI* và *SmaI* (B) và *SacI* (C). M: marker 1kb (Fermentas); 1, 2: sản phẩm PCR gen NA clade 1.1; 3, 4: sản phẩm PCR gen NA clade 2.3.2.1c; 5, 6: cắt bằng *NheI* và *SmaI*; M1: marker HighRanger 1kb DNA Ladder; 7, 8: cắt bằng *SacI*.

Kết quả xác định trình tự nucleotide của gen đích trong vector tái tổ hợp cũng khẳng định gen NA clade 1.1 và clade 2.3.2.1c đã được tách dòng thành công vào hai vector pHW2000, với kích thước cả hai gen đều là 1434 bp, và trình tự nucleotide của từng gen khi so sánh với trình tự đã thiết kế đều đạt độ chính xác 100%.

DNA plasmid của các dòng biến nạp gen NA đã được tách chiết và tinh sạch để sẵn sàng cho thí nghiệm biến nạp và tái tạo virus trong tế bào động vật nuôi cấy - được thực hiện khi cho kết hợp vector pHW2000 tái tổ hợp mang gen mã hóa protein N1

NA có tính kháng nguyên mạnh với các vector pHW2000 mang 7 phân đoạn gen còn lại của virus cúm A để tái tạo chủng virus gốc làm vaccine phòng chống cúm A/H5N1 cho gia cầm bằng kỹ thuật di truyền ngược.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế và tổng hợp nhân tạo thành công gen kháng nguyên bề mặt N1 NA của virus cúm A/H5N1 clade 1.1 và clade 2.3.2.1c làm ứng viên gen nguyên liệu sản xuất vaccine cúm gia cầm.

Đã tách dòng thành công gen NA của hai clade virus cúm A/H5N1 vào vector pHW2000, tạo hai vector tái tổ hợp pHW2000-NA clade 1.1 và pHW2000-NA clade 2.3.2.1c phục vụ tạo chủng virus gốc làm vaccine phòng chống cúm A/H5N1 cho gia cầm bằng kỹ thuật di truyền ngược.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin cảm ơn GS. TS. Lê Thanh Hòa - Phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã cung cấp thông tin về trình tự gen NA của virus A/duck/Vietnam/ST0970/2009(H5N1) (clade 1.1) và A/duck/Vietnam/HT-02/2014(H5N1) (clade 2.3.2.1c). Công trình được thực hiện bằng kinh phí của đề tài cấp Nhà nước “Nghiên cứu tạo giống gốc để sản xuất vắc-xin cúm A/H5N1” 2016 - 2018 (Mã số SPQG.05b.03).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chen W, Zhong Y, Qin S, Sun S, Li Z (2012) The evolutionary pattern of glycosylation sites in influenza virus (H5N1) hemagglutinin and neuraminidase. *Plos One* 7(11): 1-14.

Da Silva DV, Nordholm J, Dou D, Wang H, Rossman J, Daniels R (2015) The influenza virus neuraminidase protein transmembrane and head domains have coevolved. *J Virol* 89(2): 1094-1104.

Fanning TG, Reid AH, Taubenberger JK (2000) Influenza A virus neuraminidase: regions of the protein potentially involved in virus - host interactions. *Virology* 276: 417-423.

Ferhangí A, Goliaei B, Kavousi K, Ashtari A, Bayatzadeh MA, Pourbakhsh A (2015) Bioinformatics study of complete amino acid sequences of neuraminidase (NA) antigen of H1N1 influenza viruses from 2006 to 2013 in Iran. *Vaccine Res* 2(5): 123-129.

Gamblin SJ, Skehel JJ (2010) Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoprotein. *J Biol Chem* 285(37): 28403-28409.

Hausmann J, Kretzschmar E, Garten W, Klenk HD (1995) N1 neuraminidase of influenza virus A/FPV/Rostock/34 has haemadsorbing activity. *J Gen Virol* 76: 1719-1728.

Hoffmann E, Neumann G, Kawaoka Y, Hobom G, Webster RG (2000) A DNA transfection system for generation influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6108-6113.

Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR (2001) Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146: 2275-2289.

Lin T, Wang G, Li A, Zhang Q, Wu C, Zhang R, Cai Q, Song W, Yuen KY (2009) The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus. *Virology* 392: 73-81.

Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Hùng Chí, Hoàng Thị Thu Hằng, Vũ Huyền Trang, Chu Hoàng Hà, Nguyễn Trung Nam (2017) Tách dòng sáu gen khung virus cúm vào vector pHW2000 phục vụ tạo chủng gốc vaccine cúm A/H5N1 bằng kỹ thuật di truyền ngược. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội* 33(2): 9-16.

Nguyễn Thị Thu Hằng, Hoàng Thị Thu Hằng, Nguyễn Hùng Chí, Chu Hoàng Hà, Nguyễn Trung Nam (2017) Nhân dòng vector pHW2000 tái tổ hợp mang gen HA làm nguyên liệu tạo chủng gốc ứng dụng sản xuất vaccine cúm A/H5N1. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội* 33(1S): 159-167.

Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK (2000) Characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12): 6785-6790.

Ping J, Lopes TJ, Nidom CA, Ghedin E, Macken CA, Fitch A, Imai M, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y (2015) Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses. *Nat Commun* 6: 1-15.

Yano T, Nobusawa E, Nagy A, Nakajima S, Nakajima K (2008) Effects of single-point amino acid substitutions on the structure and function neuraminidase proteins in influenza A virus. *Microbiol Immunol* 52: 216-223.

DESIGNING AND CLONING NA GENE OF INFLUENZA A/H5N1 VIRUS INTO pHW2000 VECTOR FOR PREPARATION OF A CANDIDATE VACCINE MASTERSEED STRAIN

Nguyen Thi Thu Hang¹, Hoang Thi Thu Hang², Nguyen Hung Chi², Vu Huyen Trang^{2,3}, Chu Hoang Ha^{2,3}, Nguyen Trung Nam^{2,3}

¹Vietnam Forestry University

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The influenza A/H5N1 virus is an RNA virus belonging to the family of *Orthomyxoviridae*. The highly

pathogenic influenza A/H5N1 virus exhibit the ability to cause high mortality in poultry and infect humans. Technology for vaccine seed strain production of influenza A virus using reverse genetics requires the creation of recombinant vectors carrying viral genomic segments. To create recombinant pHW2000 vectors containing the neuraminidase (NA) gene segment encoding an important surface antigen of influenza A virus, two N1 NA gene structures were designed based on the NA gene sequences of two subtypes of highly pathogenic influenza A/H5N1 clade (clade 1.1 and clade 2.3.2.1c) and then inserted into pHW2000 vector. These two clades of highly pathogenic avian influenza viruses that are still circulating in Vietnam, with antigen homology and genetic relationships to many strains of influenza A viruses, have been suggested to be used for producing vaccines against emerging avian influenza A/H5N1 virus. Each NA gene construct consists of 1453 nucleotides in which two ends of the gene are two non-coding regions (46 nucleotides and 57 nucleotides) containing primer binding site and cleavage site of *BsaI*. In the middle of each NA gene is one region of 1350 nucleotides encoding 449 amino acids, ensuring catalytic function and antigenicity of NA protein. Two NA segments corresponding to the two clades of influenza A viruses were successfully cloned into pHW2000 vectors for the generation of two recombinant vectors pHW2000-NA clade 1.1 and pHW2000-NA clade 2.3.2.1c. These recombinant vectors will be used for production of candidate avian influenza vaccine strains using reverse genetics technique.

Keywords: *Cloning, H5N1, NA, pHW2000, vaccine*