

BIỂU HIỆN TÁI TỔ HỢP VÀ TINH SẠCH NUCLEOPROTEIN (N) CỦA VIRUS ĐẠI TRONG VI KHUẨN *E. COLI*

Phan Trọng Hoàng, Bùi Văn Thắng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Để chủ động tạo ra nguồn kháng nguyên tái tổ hợp và sử dụng chúng trong nghiên cứu tạo kit phát hiện bệnh và nghiên cứu phát triển vaccine tái tổ hợp phòng bệnh dại ở người, chúng tôi đã tiến hành biểu hiện tái tổ hợp kháng nguyên nucleoprotein (N) của virus dại trong vi khuẩn *E. coli*. Gen mã hóa nucleoprotein có kích thước khoảng 1,35 kb được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu và được thiết kế vào vector biểu hiện pET21a(+) tại vị trí *Bam*HI và *Sac*I. Vector tái tổ hợp pET21a(+)N được biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* Rosetta-gamiTM. Dưới sự điều khiển của promoter T7 được cảm ứng bằng IPTG ở nồng độ 1 mM, 28°C, sau 5 h, protein N có kích thước 51 kDa đã được tổng hợp. P51 tái tổ hợp được tinh sạch bằng sắc ký ái lực dựa vào ái lực giữa đuôi His-tag của protein tái tổ hợp và phức nickel. Kết quả phân tích khối phổ (MALDI-TOF MS và MS/MS) cho thấy trình tự amino acid của các đoạn peptide thu được hoàn toàn trùng hợp với trình tự amino acid của protein N đã công bố trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế NCBI.

Từ khóa: MALDI-TOF, nucleoprotein, tinh sạch protein, vector biểu hiện, virus dại

MỞ ĐẦU

Virus dại (rabies virus; RV) là nguyên nhân gây ra bệnh dại cho các động vật máu nóng trong đó có con người. Bệnh thường lây theo vết cắn do các động vật bị nhiễm loại virus này gây ra (Baer *et al.*, 1991; 1996). Theo ước tính của tổ chức Y tế thế giới (WHO) hàng năm có khoảng 60.000 trường hợp tử vong do bệnh dại trên toàn thế giới mà chủ yếu tập trung ở châu Á và châu Phi. Tuy vậy, số lượng thực tế các ca bệnh liên quan đến bệnh dại có thể cao gấp 100 lần so với con số chính thức (Knobel *et al.*, 2005).

Virus dại thuộc loại virus RNA có bộ gen là một sợi RNA đơn (-) (Mononegavirales), thuộc họ Rhabdoviridae, giống *Lyssavirus*. Bộ gen của virus dại mã hóa cho 5 protein bao gồm: protein nhân (nucleoprotein: N), phosphoprotein (P), protein matrix (M), glycoprotein (G) và polymerase (L). Virus dại được tạo thành từ lõi ribonucleoprotein (RNP) và được gói chặt bằng nucleoprotein. Hai protein P và L cũng có vai trò gắn với lõi RNP. Còn protein G tạo thành những trimer hình gai bao phủ toàn bộ bề mặt của virus. Protein M kết hợp cả với vỏ và lõi RNP của virus và có vai trò trung tâm trong quá trình lắp ráp của virus (Conzelmann, 1998).

Cho đến nay, bệnh dại vẫn chưa có thuốc điều trị

đặc hiệu, do vậy chỉ có biện pháp điều trị dự phòng bằng tiêm vaccine phòng dại hay là truyền huyết thanh kháng dại (anti-rabies immunoglobulin) nhằm tạo miễn dịch chủ động là hiệu quả nhất (Hemachuda, Phuapradit, 1997; Hooper *et al.*, 1998). Glycoprotein là kháng nguyên quan trọng nhất trong việc tạo đáp ứng miễn dịch đối với virus dại, nó có tác dụng kích thích các kháng thể trung hòa và được sử dụng làm thành phần chính trong các loại vaccine tái tổ hợp (Morimoto *et al.*, 2001; Nel *et al.*, 2003). Qua nghiên cứu tinh kháng nguyên của các chủng virus dại hoang dại và các chủng quan hệ gần gũi, cho thấy có sự khác biệt đáng kể về tính kháng nguyên và trong trình tự amino acid của kháng nguyên G giữa các chủng khác nhau, sự khác biệt này phụ thuộc vào vùng địa lý và loài chủ khác nhau (Flamand *et al.*, 1980; Dietzschold *et al.*, 1987a; 1988). Kháng nguyên N cũng được xem như một ứng cử viên để phát triển vaccine (Ertl *et al.*, 1989; Fu *et al.*, 1991), đặc biệt nucleoprotein có tính bảo thủ về trình tự cũng như tính kháng nguyên cao hơn nhiều so với glycoprotein (Flamand *et al.*, 1980; Dietzschold *et al.*, 1988). Nhiều nghiên cứu cho thấy tuy nucleoprotein không có khả năng kích thích tạo kháng thể trung hòa virus, nhưng cũng có khả năng bảo vệ một phần khi được sử dụng như một thành phần duy nhất kích thích tạo miễn dịch (Dietzschold *et al.*, 1987a; Summer *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1991;

Lodmell *et al.*, 1991). Nucleoprotein có thể được sử dụng bổ sung cho glycoprotein trong các loại vaccine tái tổ hợp và có tác dụng điều khiển việc tạo ra kháng thể trung hòa của vaccine (Dietzschold *et al.*, 1987b; Fu *et al.*, 1991; Astoul *et al.*, 1996; Drings *et al.*, 1999). Đặc biệt, nucleoprotein có các tính chất đặc trưng như một siêu kháng nguyên có khả năng cảm ứng tế bào lympho B và T_H (helper T cell) đặc hiệu cho virus dại có khả năng nhận biết tất cả các chủng virus dại và các chủng họ hàng, vì vậy có thể sử dụng cho các chẩn đoán phát hiện bệnh dại.

Ở Việt Nam, theo thống kê của Viện Pasteur chỉ tính riêng thành phố Hồ Chí Minh năm 2001 đã có tới 82 nghìn người bị súc vật cắn và phải đi tiêm phòng tại các cơ sở y tế. Ngoài ra, trên địa bàn cả nước cũng có tới hàng triệu con chó, mèo cần được tiêm phòng. Nhu cầu về vaccine với độ an toàn, giá thành thấp và hiệu quả cao trong phòng bệnh dại hiện nay là rất lớn. Cùng với sự phát triển của công nghệ sinh học, việc sản xuất vaccine tái tổ hợp ở một số đối tượng khác như cây trồng, cũng đã và đang thu được những thành tựu nổi bật góp phần vào công việc đa dạng nguồn cung cấp vaccine (Burger *et al.*, 2002; Ronald *et al.*, 2001; McGarvey *et al.*, 1995; Streatfield *et al.*, 2003; Dus Santos, Wigdorovitz 2005; Ashraf *et al.*, 2005; Marquet-Blouin *et al.*, 2003). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thành công trong việc biểu hiện và tinh sạch protein N của virus dại, nhằm tạo ra nguồn vật liệu cho các nghiên cứu gây miễn dịch, sản xuất kháng thể phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đoạn gen nucleoprotein của virus dại thuộc chủng Vnucovo-32 được tách dòng và giữ trong vector pCR2.1 (Chu Hoàng Hà *et al.*, 2005). Cặp môi đặc hiệu để nhân đoạn gen n: RabN-F1-*Bam*HI (5'- gag gat cca tgg atg ccg aca aga ttg t -3') và RabN-R1-*Sac*I (5'- gag agc tct gag tca ctc gaa tat gtc t -3').

Phương pháp

Thiết kế vector biểu hiện: pET-21a(+)*N*

Sau khi dùng RabN-F1-*Bam*HI/RabN-R1-*Sac*I để tiến hành PCR nhân gen n, sản phẩm PCR và vector pET21a(+) được cắt đồng thời bằng enzyme *Bam*HI và *Sac*I. Gen n được ghép nối vào vector pET21a(+) nhờ T₄ DNA ligase.

Biểu hiện và tinh chế protein N

Gen n mã hóa cho protein N của virus dại được biến nạp vào chủng biểu hiện *E. coli* Rosetta-gamiTM, chọn lọc trên môi trường chứa 50 µg/ml ampicillin, 15 µg/ml kanamycin, 34 µg/ml chloramphenicol. Gen n được biểu hiện dưới sự cảm ứng 0,1 - 1 mM IPTG, ở các nhiệt độ 22, 28, 30 và 37°C; trong các thời gian cảm ứng 1, 5 và 16 h. Tinh sạch protein tái tổ hợp thực hiện theo phương pháp của kit ProBondTM Purification System (Invitrogen).

Thủy phân protein tái tổ hợp bằng trypsin

Băng protein được cắt từ bản gel đã qua SDS-PAGE và nhuộm bằng Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB) và được xử lý mẫu theo các phương pháp đã mô tả (Cohen, Chait, 1997; Shevchenko *et al.*, 2000; Stensballe, Jensen, 2001). Các peptide sau thủy phân được chiết rút ra khỏi gel bằng dung dịch chiết (60% acetonitrile, 1% TFA). Dịch chiết có chứa các peptide được làm khô bằng máy SPD1010 SpeedVac System (ThermoSavant, Mỹ). Hỗn hợp peptide được hòa lại bằng 5 µl dung dịch chứa 50% acetonitrile, 0,1%TFA.

So sánh và tìm kiếm trên cơ sở dữ liệu của NCBI

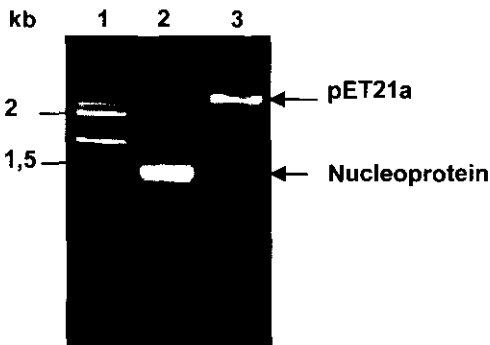
Chương trình BioanalystTM 1.1 cho phép tự động tính toán, đánh dấu các mảnh ion trong phổ ghi. Phổ MS và MS/MS được sử dụng để tìm kiếm và so sánh với cơ sở dữ liệu của NCBI bằng chương trình MATRIX SCIENCE MASCOTTM V1.8 (<http://www.matrixscience.com/>) (Perkins *et al.*, 1999; Đặng Thành Nam *et al.*, 2003). Phổ tìm kiếm trong cơ sở dữ liệu được định dạng theo kiểu MASCOT. Sai số khối cho phép trong tìm kiếm dữ liệu được đặt ở 100 ppm đối với những mảnh peptide gốc và 0,5 Da đối với những mảnh ion.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Thiết kế vector biểu hiện pET21a(+)*N*

Gen n có độ dài 1350 bp mã hóa cho 450 amino acid chứa toàn bộ vùng quyết định kháng nguyên của protein N. Để nhân được đầy đủ gen này, chúng tôi thiết kế cặp môi đặc hiệu RabN-F1-*Bam*HI/RabN-R1-*Sac*I. Sản phẩm PCR sau khi làm sạch được ghép nối vào vector pET21a(+) ở vị trí *Bam*HI và *Sac*I. Vector tái tổ hợp pET21a(+)*N* được biến nạp vào tế bào vi khuẩn chủng DH5α. Dùng kỹ thuật colony-PCR để chọn những dòng tế bào mang cấu trúc

pET21a(+)^N. Những dòng tế bào cho kết quả PCR dương tính được tách plasmid và kiểm tra lại bằng phản ứng cắt với *Bam*HI và *Sac*I. Kết quả ở hình 1 cho thấy, bằng cấp mỗi đặc hiệu gen n đã được nhận bản rõ nét và đúng với kích thước dự tính ban đầu khoảng 1350 bp. Khi cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pET21a(+)^N với *Bam*HI và *Sac*I, sản phẩm cắt thu được gồm 2 băng DNA tương ứng kích thước của vector pET21a và gen n (Hình 1). Điều này chứng tỏ chúng tôi đã thành công trong việc gắn gen n vào vector biểu hiện pET21a(+).



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR và sản phẩm cắt. 1: marker 1 kb; 2: sản phẩm PCR nhận gen nucleoprotein; 3: cắt plasmid tái tổ hợp bằng *Bam*HI và *Sac*I.

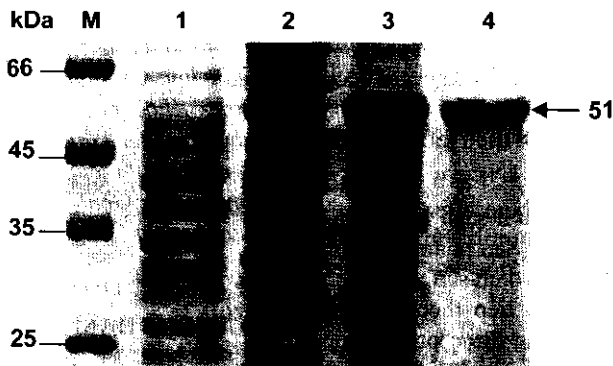
Biểu hiện nucleoprotein trong chủng vi khuẩn Rosetta-gamiTM

Chủng vi khuẩn *E. coli* Rosetta-gamiTM là chủng tái tổ hợp được thiết kế đặc biệt có khả năng dịch mã

được thêm 6 bộ ba mã hiếm không có ở vi khuẩn nhưng thường có ở virus. Do vậy, chúng tôi đã chọn lựa chủng vi khuẩn này để biểu hiện protein N của virus dại. Cấu trúc vector tái tổ hợp pET21a(+)^N sau khi biến nạp vào tế bào biểu hiện, dưới sự cảm ứng của IPTG ở các nồng độ từ 0,1 mM đến 1 mM trong các điều kiện nhiệt độ: 22, 28, 30 và 37°C và các thời gian cảm ứng khác nhau. Protein tổng số sau khi tách chiết từ các sinh khối tế bào được kiểm tra trên gel 12,6% polyacrylamide, kết quả cho thấy ở điều kiện cảm ứng 1 mM IPTG, ở 28°C trong 5 h là thích hợp nhất để tổng hợp protein N. Qua kết quả điện di polyacrylamide (Hình 2) cho thấy phân đoạn protein thu được ở điều kiện thích hợp có kích thước xấp xỉ 51 kDa, phân đoạn protein này không thu được ở mẫu đối chứng không cảm ứng bằng IPTG. Kết quả này còn cho thấy protein N thu được chủ yếu trong pha cận của tế bào, ở trạng thái không tan trong *E. coli* Rosetta-gamiTM.

Tinh sạch protein N tái tổ hợp

Hầu hết protein N được biểu hiện ra đều nằm trong pha cận, do đó để tinh sạch đạt hiệu quả, chúng tôi tiến hành tinh sạch dưới điều kiện biến tính sử dụng guanidinium. Sinh khối tế bào sau khi hòa tan trong đệm chứa guanidinium, dùng máy siêu âm để phá vỡ các tế bào. Dịch protein thu lại bằng ly tâm và được cho qua cột sắc ký ái lực chứa nickel. Vì protein N được thiết kế có gắn thêm 6 amino acid histidine ở đầu -COOH nên chỉ có protein này kết bám vào cột sắc ký. Sau khi rửa sạch, protein N sẽ được thu lại bằng các phân đoạn. Kết quả điện di trên hình 2 cho thấy, protein N đã được thu lại dạng tinh sạch có kích thước khoảng 51 kDa đúng với kích thước tính toán lý thuyết.



Hình 2. Điện di kiểm tra biểu hiện nucleoprotein trong *E. coli* Rosetta-gamiTM. M: thang protein chuẩn; 1: protein tổng số của đối chứng không biến nạp pET21a/N; 2: protein ở dịch tan của tế bào biến nạp pET21a/N; 3: protein ở phần cận tế bào biến nạp pET21a/N; 4: protein N sau khi tinh sạch.

Nhận dạng và xác định protein N

Để có thể khẳng định thêm phân đoạn protein đã tổng hợp là protein N, chúng tôi tiến hành cắt phân đoạn protein này bằng trypsin và phân tích khối phổ *MALDI-TOF MS* và *MS/MS* trên hệ thống QSTAR XL (MDS Sciex, Toronto, Canada). Kết quả cho thấy, các protein tìm được có số điểm cao nhất (526)

đều là nucleoprotein của virus dại (Bảng 1). Phân tích khối phổ liên tục chúng tôi thu được các peptide có trình tự phù hợp với trình tự lý thuyết và khi đối chiếu với ngân hàng về protein bằng chương trình *MATRIX SCIENCE MASCOT™ V1.8* (<http://www.matrixscience.com/>) (Perkins *et al.*, 1999) thì nhận thấy kết quả đúng là nucleoprotein của virus dại.

Bảng 1. Các peptide của protein N phân tích bằng chương trình *MATRIX SCIENCE MASCOT™ V1.8*.

Số TT	Trọng lượng ion (amu)	Trọng lượng thực tế (Da)	Trọng lượng lý thuyết (Da)	Sai số	Trình tự	Vị trí
1	468.73	935.44	935.43	0.01	NFEEEIR	264 - 270
2	475.74	949.47	949.49	-0.02	SVLSGMSAAK	55 - 64
3	551.30	1100.58	1100.60	-0.01	IEHLYSAIR	217 - 225
4	474.61	1420.80	1420.76	0.04	IEQIFETAPFVK	169 - 180
5	712.37	1422.72	1422.69	0.03	ELQEYEAELTK	365 - 376
6	727.84	1453.66	1453.67	-0.01	FLAGTYDMFFSR	205 - 216
7	694.06	2079.16	2079.14	0.02	DPTVPEHASLVGLLSLYR	131 - 149
8	695.72	2084.14	2084.04	0.10	EAILYFFHKNFEEEIR	255 - 270
9	698.05	2091.12	2091.10	0.02	TNIADRIEQIFETAPFVK	163 - 180
10	574.03	2292.08	2292.08	0.00	MFEPGQETAVPHSYFIHFR	272 - 290
11	784.10	2349.29	2349.16	0.13	VGTWVTAYEDCSGLVSFTGFIK	226 - 247
12	599.57	2394.25	2394.17	0.08	YVSVSSNHQARPNNSFAEFLNK	424 - 444
13	735.63	2938.47	2938.40	0.07	SPYSSNAVGHVFNLIHFVGCYMGQVR	298 - 323
14	1023.52	3067.53	3067.48	0.05	SLNATVIAACAPHEMSVLGGYLGEEFFGK	324 - 352

KẾT LUẬN

Gen *n* của virus dại được thiết kế vào vector pET21a(+) và được biểu hiện thành công trong chủng *E. coli* Rosetta-gami™ với điều kiện cảm ứng 1 mM IPTG, 28°C và 5 h.

Protein N tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột ái lực giữa phức nickel và His-tag. Sản phẩm tinh sạch đảm bảo chất lượng để gây miễn dịch sản xuất kháng thể để phục vụ các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả phân tích khối phổ đã nhận dạng được protein biểu hiện trong tế bào Rosetta-gami™ chính là protein N. Các peptide của protein N đã được xác định trình tự amino acid, và trình tự này trùng khớp với protein N của virus dại.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình Nghiên cứu Khoa học cơ bản trọng điểm 2006 - 2007, thuộc hướng Khoa học Tự nhiên, Bộ Khoa học và Công nghệ. Nghiên cứu được thực hiện có sử dụng các trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ashraf S, Singh PK, Yadav DK, Shahnawaz M, Mishra S, Sawant SV, Tuli R (2005) High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves

- and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol* 119: 1-14.
- Astoul E, Lafage M, Lafon M (1996) Rabies superantigen as a beta T-dependent adjuvant. *J Exp Med* 183: 1623-1631.
- Baer GM (Ed.) (1991) The Natural History of Rabies. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Baer GM, Neville N, Turner GS (1996) *Rabbis and rabies: a pictorial history of rabies through the ages*. Mexico DF: Laboratorios Baer SA, DE CV.
- Burger SB, Remaley AT, Danley JM, Moore J, Muschel RJ, Wunner WH, Spitalnik SL (2002) Effect of the contents and form of rabies glycoprotein on the potency of rabies vaccination in cattle (2002) *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 97(2): 265-268.
- Chu Hoàng Hà, Nguyễn Minh Trang, Lê Thị Hồng Ngọc, Lê Trần Bình, Nông Văn Hải (2005) Phân tích trình tự gen mã hóa nucleoprotein (N) của virus dại. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 3(3): 339-346.
- Cohen SL, Chait BT (1997) Mass spectrometry of whole proteins eluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis gels. *Anal Biochem* 247(2): 257-267.
- Conzelmann KK (1998) Nonsegmented negative-stranded RNA viruses: Genetics and manipulation of viral genomes. *Ann Rev Genet* 32: 123-162.
- Đặng Thành Nam, Lê Thị Bích Thảo, Phan Văn Chi (2003) Nhận dạng và xác định những biến đổi về trình tự của trichobakin và các dẫn xuất bằng phương pháp khối phổ MALDI-TOF MS/MS. *Tap chí Công nghệ Sinh học* 1(2): 161-168.
- Dietzschold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattei J, Wiktor TJ, Koprowski H (1988) Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies-related viruses: implications for epidemiology and control of rabies. *Rev Infect Dis* 10(Suppl 4): S785-S798.
- Dietzschold B, Tollis M, Rupprecht CE, Celis E, Koprowski H (1987a) Antigenic variation in rabies and rabies-related viruses: cross-protection independent of glycoprotein-mediated virusneutralizing antibody. *J Infect Dis* 156: 815-822.
- Dietzschold B, Wang HH, Rupprecht CE, Celis E, Tollis M, Ertl H, Heber-Katz E, Koprowski H (1987b) Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9165-9169.
- Drings A, Jallet C, Chambert B, Tordo N, Perrin P (1999) Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? *Vaccine* 17: 1549-1557.
- Dus Santos MJ, Wigdorovitz A (2005) Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol Cell Biol* 83: 229-238.
- Ertl HC, Dietzschold B, Gore M, Otvos LJr, Larson JK, Wunner WH, Koprowski H (1989) Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. *J Virol* 63: 2885-2892.
- Flamand A, Wiktor TJ, Koprowski H (1980) Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2001-2005.
- Fu ZF, Dietzschold B, Schumacher CL, Wunner WH, Ertl HC, Koprowski H (1991) Rabies virus nucleoprotein expressed in between rabies and rabies-related virus proteins II. The glycoprotein. *J Gen Virol* 48: 105-109.
- Hemachuda T, Phuapradit P (1997) Rabies. *Curr Opin Neurobiol* 10: 260-267.
- Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weihem E, Koprowski H, Dietzschold B (1998) Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol* 72: 3711-3719.
- Knobel DL, Cleaveland S, Coleman PG, Fevere EM (2005) Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ* 83: 1-11.
- Lodmell DL, Sumner JW, Esposito JJ, Bellini WJ, Ewalt LC (1991) Raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies virus nucleoprotein protects mice against lethal rabies virus infection. *J Virol* 65: 3400-3405.
- Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP (2003) Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin. *Plant Mol Biol* 51: 459-469.
- McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels FH (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology (N/Y)* 13(13): 1484-1487.
- Morimoto K, McGettigan JP, Foley HD, Hooper DC, Dietzschold B, Schnell MJ (2001) Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine* 19: 3543-3551.
- Nel LH, Niezgodka M, Hanlon CA, Morrill PA, Yager PA, Rupprecht CE (2003) A comparison of DNA

vaccines for the rabies-related virus, Mokola. *Vaccine* 21: 2598-2606.

Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.

Ronald WE (2001) *New Vaccine Technologies*, Landes Bioscience, Texas.

Shevchenko A, Chernushevich I, Wilm M, Mann M (2000) In *Protein and Peptide Analysis*. Chapman JR, Ed Humana Press, Totowa, NJ 146: 1-16.

Stensballe A, Jensen ON (2001) Simplified sample

preparation method for protein identification by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: in gel digestion on the probe surface. *Proteomics* 1: 955-966.

Streatfield SJ, Lane JR, Brooks CA, Barker DK, Poage ML, Mayor JM, Lamphear BJ, Drees CF, Jilka JM, Hood EE, Howard JA (2003) Corn as a production system for human and animal vaccines. *Vaccine* 21: 812-815.

Summer JW, Fekadu M, Shaddock JH, Esposito JJ, Bellini WJ (1991) Protection of mice with vaccinia virus recombinants that express the rabies nucleoprotein. *Virology* 183: 703-710.

OVEREXPRESSION AND PURIFICATION OF RECOMBINANT NUCLEOPROTEIN (N) OF RABIES VIRUS IN *E. COLI*

Phan Trong Hoang, Bui Van Thang, Le Van Son, Chu Hoang Ha, Le Tran Binh*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

In order to obtain the recombinant nucleoprotein to develop rabies diagnostic test and recombinant rabies vaccine, nucleoprotein of rabies virus was expressed in recombinant *E. coli*. The 1.35 kb of nucleoprotein gene was amplified by PCR technique using specific primers. PCR products were digested with *Bam*HI, *Sac*I and inserted into pET21a(+) vector which were treated with the same enzymes to form recombinant pET21a(+)N vector. This was transformed into *E. coli* Rosetta-gamiTM cells. The expression of N protein gene was regulated by T7 promoter using 1 mM IPTG as an inducer, at 28°C, for 5 hours. The recombinant N protein with the molecular weight of 51 kDa was checked by 12.6% SDS-PAGE and purified by using His-tag affinity column. MALDI-TOF and MS/MS analyses of peptides of recombinant N protein showed that amino acids of these peptides perfectly matched with those of N protein in NCBI protein Database.

Keywords: expression vector, MALDI-TOF, nucleoprotein, protein purification, rabies virus

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37564691; Fax: 84-4-38363144; E-mail: binh@ibt.ac.vn