

BIỂU HIỆN GEN NEURAMINIDASE MÃ HÓA CHO PHẦN *EPITOPE* KHÁNG NGUYÊN (*NAE*) CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 TRONG TẾ BÀO *E. COLI*

Trần Ngọc Tân, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải

¹Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Neuraminidase (NA) phân type 1 là một trong những protein cấu trúc bề mặt chính của virus cúm A/H5N1. Với kích thước phân tử khoảng 450 amino acid, neuraminidase vừa có chức năng của một enzyme vừa mang chức năng của một kháng nguyên. Sau khi phân tích trình tự amino acid của NA, gen mã hóa cho phần chứa *epitope* của kháng nguyên NA đã được xác định (*Nae*). Đoạn gen này được nhân lên bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu. Trình tự sản phẩm PCR qua cột QIA-quick và cắt sản phẩm này bằng cặp enzyme hạn chế *HindIII* và *XhoI*. Nối ghép sản phẩm cắt với vector pET22-trx và biến nạp vào chủng tế bào biểu hiện *E. coli* BL21. Sau khi được biểu hiện, tính kháng nguyên của sản phẩm protein dung hợp (*Nae*), được kiểm tra với kháng thể do neuraminidase tự nhiên (kháng thể kháng protein N1) bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả của kỹ thuật này đã chỉ ra rằng, protein *Nae* tái tổ hợp có thể kết hợp đặc hiệu với kháng thể kháng N1 của virus H5N1 trong tự nhiên. Hy vọng rằng, với thành công này, protein *Nae* có thể sử dụng bổ trợ với vaccine phòng cúm H5N1.

Từ khóa: Biểu hiện gen, chủng H5N1, kháng nguyên tái tổ hợp, Neuraminidase, virus cúm A

ĐẶT VẤN ĐỀ

Kể từ lần đầu tiên bùng phát (HongKong, 1997) đến nay, dịch cúm gia cầm do virus cúm A/H5N1 đã gây ra nhiều thiệt hại trên toàn thế giới (Subbarao, Michael, 2000). Theo ước tính của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), tính đến tháng 1 năm 2007, đã có đến hơn 271 trường hợp người bị nhiễm virus cúm H5N1 trên toàn thế giới, trong đó có 165 trường hợp tử vong (http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/influenza/avian/situation_update.htm). Thêm vào đó, thiệt hại kinh tế do những lần tiêu hủy gia cầm nghi nhiễm virus cúm gia cầm H5N1 là vô cùng lớn, chưa thể thống kê hết. Chính vì vậy, giải pháp vaccine để phòng virus cúm này là rất cấp thiết.

Hiện nay, vaccine phòng cúm được chế tạo chủ yếu bằng hai phương pháp chính. Một là việc sản xuất vaccine theo phương pháp di truyền ngược (Fedson, 2003); hai là sản xuất bằng việc nuôi cấy trên phôi gà và tinh chế kháng nguyên để sử dụng làm vaccine (Fluzone®, 2006; Fedson, 2005). Ngoài 2 dạng vaccine trên, gần đây còn có nhiều công trình nghiên cứu để tiến hành tạo vaccine tái tổ hợp phòng cúm. Việc tạo vaccine tái tổ hợp chủ yếu dựa trên cấu trúc kháng nguyên bề mặt của virus cúm là: kháng nguyên Hemagglutinin (HA), Neuraminidase (NA), Matrix 2 (M2). Trong 3 loại kháng nguyên này, kháng nguyên HA được coi là thành phần quyết

định để tạo vaccine. Những nghiên cứu trên chuột về sự bảo vệ của kháng thể đặc hiệu kháng nguyên HA cho thấy, chuột đã được tiêm kháng nguyên HA có thể giảm khả năng mắc bệnh và khả năng tử vong khi được gây nhiễm bởi virus cúm (Gerhard *et al.*, 2006). Một loại kháng nguyên bề mặt khác được quan tâm trong việc tạo vaccine là kháng nguyên M2. Đây là kháng nguyên có kích thước phân tử khá nhỏ, đặc biệt là phần kháng nguyên bề mặt M2e (23 amino acid). Những nghiên cứu trong việc sử dụng M2e làm vaccine trên chuột cho thấy kháng nguyên này không có khả năng ngăn cản sự lây nhiễm của virus nhưng lại có khả năng làm giảm sự đau ốm và tỷ lệ tử vong (Fan *et al.*, 2004). Một loại kháng nguyên bề mặt quan trọng khác của virus cúm A là NA. Tương tự như kháng nguyên HA, hàm lượng kháng nguyên NA trên bề mặt virus khá lớn. Tuy nhiên, nghiên cứu ảnh hưởng của kháng nguyên này trong vaccine phòng cúm ở chuột cho thấy: NA không có khả năng bảo hộ hoàn toàn để giúp cơ thể chủ chống lại virus nhưng lại có khả năng hạn chế hữu hiệu sự phát triển của virus (Fan *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2005; Douglas *et al.*, 1996). Chính vì vậy, trong việc tạo vaccine phòng cúm A, kháng nguyên NA sử dụng như một nhân tố bổ trợ giúp tăng khả năng bảo vệ của vaccine.

Với mục đích tạo ra vaccine tái tổ hợp phòng cúm A/H5N1 tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành biểu

hiện các gen mã hóa cho kháng nguyên HA, M2 và NA trong vi khuẩn và trong nấm men. Sau đó xác định khả năng bảo hộ khi sử dụng bổ sung các loại kháng nguyên tái tổ hợp này trong vaccine tái tổ hợp. Tuy nhiên, trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi chỉ trình bày những kết quả đạt được trong việc biểu hiện phần kháng nguyên NA trong tế bào *E. coli* và kiểm tra tính kháng nguyên của kháng nguyên tái tổ hợp. Với kết quả này, hy vọng rằng, tính kháng nguyên của protein tái tổ hợp bước đầu có thể xác định trong việc hỗ trợ tạo vaccine phòng cúm gia cầm H5N1.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật

Trong nghiên cứu này, chủng *E. coli* DH5 α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 lac U169* (ϕ 80 *lacZM15*)] của hãng Invitrogen được sử dụng để chọn dòng và nhân dòng gen. Chủng *E. coli* BL21 [*F-omp hsd SB (rBmB) gel dcm (DE3) plysS (CamI)*] của hãng Novagen được sử dụng làm tế bào biểu hiện.

DNA và hệ vector

Plasmid pET22-trx (pET22b(+)) mang gen mã hóa thioredoxin do Phòng Kỹ thuật Di truyền, Viện Công nghệ Sinh học thiết kế) được sử dụng làm vector biểu hiện gen trong tế bào *E. coli* BL21 (Nguyễn Phước Hải *et al.*, 2006). Gen NA trong vector tách dòng pCR-NA1 do Phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp đã được công bố trong Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AJ867075.

Thiết kế hệ vector biểu hiện mang gen *Nae* (pET22tNae)

Từ vector pCR-NA1, gen *Nae* được nhân lên với số lượng lớn bằng kỹ thuật PCR. Quá trình nhân gen *Nae* gồm 25 chu kỳ với 3 bước sau: bước 1, biến tính sợi DNA khuôn ở 94°C trong 4 phút; bước 2: mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 61°C trong 30 giây; bước 3: tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút 30 giây. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 6 phút và ủ mẫu ở 4°C. Cặp mỗi đặc hiệu được tổng hợp bởi hãng Amersham Pharmacia Biotech. Trình tự chi tiết của cặp mỗi như sau:

Mỗi xuôi: 5'- TTAAAGCTTGGAGGAGGTGGG AGTGGAGGAGGTGGGAGTATCAGCAATACC AATTTT- 3';

Mỗi ngược: 5'- TTAAGCTGAGCTTGTCAATGGTG AATGGCAACTCAG -3'.

Sản phẩm của kỹ thuật PCR tiếp tục được tinh sạch nhờ cột QIAquick Purification kit (QIAGEN) và tiến hành cắt bằng 2 enzyme hạn chế *Hind*III và *Xho*I (Fermentas). Ghép nối đoạn gen đã xử lý enzyme hạn chế trên với vector biểu hiện pET22-trx bằng enzyme T4-ligase (Fermentas). Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α để tiến hành chọn lọc dòng tế bào mang vector chứa gen mong muốn. Kiểm tra các dòng plasmid đã chọn lọc được bằng chính cặp enzyme hạn chế *Hind*III và *Xho*I. Để xác định chính xác gen ngoại lai là gen mong muốn, các dòng mang gen đã được kiểm tra tiếp tục được xác định trình tự DNA và so sánh với trình tự trên Ngân hàng gen (GENBANK).

Biểu hiện gen

Vector biểu hiện mang gen đích được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E. coli* BL21 để tiến hành kiểm tra khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp. Sau khi nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB lỏng, dòng tế bào mang gen được cấy chuyển sang môi trường LB lỏng mới với tỷ lệ 1/10. Nuôi cấy tế bào biểu hiện ở nhiệt độ 37°C cho đến khi OD tại bước sóng 600 nm của môi trường nuôi cấy đạt giá trị 0,6 đến 0,8 thì tiến hành cảm ứng. Chất cảm ứng với hệ biểu hiện này là IPTG với nồng độ cuối cùng là 0,5 μ M. Nhiệt độ biểu hiện tối ưu để chủng biểu hiện tiết protein tái tổ hợp là 28°C. Lấy mẫu tế bào biểu hiện trong theo thời gian 2, 3, 4, 5 h, và qua đêm. Kết quả của sản phẩm biểu hiện được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12%.

Western blot

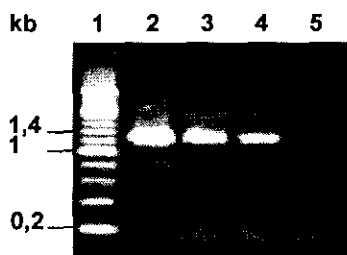
Protein tổng số thu được từ tế bào biểu hiện được xử lý bằng dịch phá mẫu (0,125M Tris-Cl, 4%SDS, 20% Glycerol, 0,02% Bromophenol Blule, pH 6,8). Dịch protein được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp đã được miêu tả của hãng Hoefer). Kháng nguyên sử dụng trong kỹ thuật Western blot là dịch protein tái tổ hợp được chuyển sang màng PVDF (Milipore) nhờ hệ thống chuyển màng của Bio-Rad. Màng chứa kháng nguyên được che chắn bởi dung dịch Blotto (5% sữa tách bơ trong dung dịch TPBS (0,3% Tween 20, trong đệm phosphate-saline)) trong 2 h. Sau khi rửa màng 3 lần bằng TPBS, màng được ủ tiếp với kháng thể 1 trong 2 h. Kháng thể này được cung cấp bởi phòng Vi sinh vật học phân tử, Viện Công nghệ sinh học. Về bản chất, kháng thể này là huyết thanh thu

được từ thỏ sau khi đã tiêm kháng nguyên của virus cúm (A/Hatay/2004/(H5N1)). Độ pha loãng của huyết thanh sử dụng trong kỹ thuật này là 400 lần. Sau 2 h ủ kháng thể 1, màng được rửa lại bằng TPBS 3 lần để loại bỏ hoàn toàn sự liên kết không đặc hiệu. Tiếp tục ủ màng với kháng thể 2 (kháng thể cộng hợp enzyme peroxidase kháng thỏ (Bio-Rad)) với độ pha loãng 1/10000 trong 2 h. Màng được bổ sung vào dung dịch chứa cơ chất cho peroxidase sau khi đã rửa lại 3 lần bằng TPBS. Màng trong dung dịch cơ chất được ủ tại nhiệt độ phòng 30 phút, sau đó được dừng phản ứng bằng H₂O. Kết quả của thí nghiệm được xác định trên thiết bị soi gel bằng ánh sáng thường.

KẾT QUẢ

Thiết lập hệ vector biểu hiện *pET22-Trx* mang gen *Nae*.

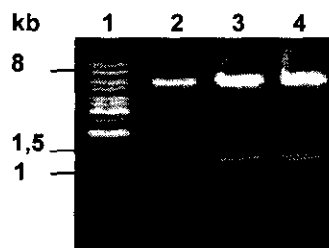
Để tạo hệ vector biểu hiện mang gen ngoại lai, gen *Nae* được tiến hành khuếch đại lên với số lượng lớn. Trong thí nghiệm này, chúng tôi đã thiết kế trên cặp mồi đặc hiệu để nhân gen *Nae* vị trí cắt của 2 enzyme *Hind*III và *Xho*I trên mỗi mồi xuôi và mỗi ngược. Chính vì vậy, khi kỹ thuật PCR tạo ra lượng lớn DNA của gen *Nae*, sản phẩm này có thể xử lý trực tiếp với cặp enzyme hạn chế trên để chuyển gen này vào thẳng vector biểu hiện. Theo tính toán, nếu như nhân thành công gen *Nae* này bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế, sản phẩm PCR sẽ là băng DNA với kích thước khoảng 1,2 kb. Thêm vào đó, để xác định nhiệt độ tối ưu nhất cho quá trình bắt cặp của cặp mồi đặc hiệu, kỹ thuật PCR được tiến hành trên chạy theo gradient nhiệt độ khác nhau. Khoảng nhiệt độ trong kỹ thuật này được dao động từ 62 đến 65°C.



Hình 1. Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agrose 0,8%. Thang DNA chuẩn 200 bp (Fermentas), 2 - 5: Sản phẩm PCR theo thứ tự thay đổi nhiệt độ từ 62 - 65°C.

Kết quả (Hình 1) cho thấy, cặp mồi đã thiết kế phù hợp nhất với nhiệt độ gắn mồi là 62°C. Tại điều kiện này, sản phẩm PCR cho lượng lớn nhất, sản phẩm DNA là 1 băng duy nhất với kích thước đúng như mong muốn (khoảng 1,2 kb). Vì vậy, sản phẩm DNA này được tinh chế qua cột QIA-quick Purification kit (QIAGEN) để tiến hành các bước tiếp theo.

Trong định hướng để tiến hành thí nghiệm, cặp mồi đặc hiệu trong kỹ thuật PCR đã được thiết kế thêm trình tự cắt của 2 enzyme cắt tạo đầu dính khác nhau là *Hind*III và *Xho*I. Việc thiết kế trên tạo thuận lợi cho việc đưa thẳng sản phẩm của kỹ thuật PCR vào trong vector biểu hiện mà không cần phải tạo dòng gen trong 1 hệ vector khác. Hơn nữa, việc sử dụng 2 loại enzyme hạn chế khác nhau trên còn giúp cho gen chuyển vào vector biểu hiện đúng theo chiều để tiến hành dịch mã tạo protein ngoại lai mong muốn. Do đó, sau khi tiến hành nối ghép gen từ sản phẩm PCR vào vector biểu hiện, việc cắt kiểm tra bằng chính cặp enzyme hạn chế trên với các plasmid tái tổ hợp cũng có thể dễ dàng kiểm tra được sự tồn tại của gen ngoại lai (Hình 2).



Hình 2. Kiểm tra sản phẩm cắt plasmid với cặp enzyme *Hind*III và *Xho*I trên gel agarose 0,8%. 1: Thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas), 2: Sản phẩm cắt vector pET22-trx, 3, 4: Sản phẩm cắt vector pET22-trx mang gen ngoại lai.

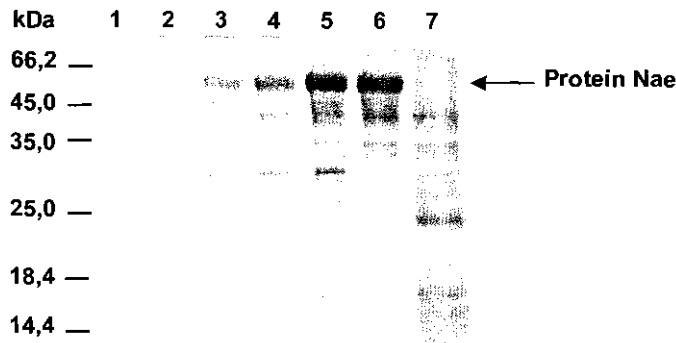
Kết quả kiểm tra trên hình 2 cho thấy, hai dòng plasmid tái tổ hợp (đường chạy số 3 và 4) có mang gen ngoại lai. Sản phẩm cắt plasmid là 2 băng DNA với kích thước đúng như tính toán (DNA vector khoảng 6 kb, DNA của gen khoảng 1,2 kb). Với kết quả này, có thể khẳng định 2 dòng plasmid đã mang gen *Nae*. Tuy nhiên, để khẳng định chắc chắn hơn, dòng plasmid mang gen ngoại lai được tiến hành xác định trình tự nucleotide và so sánh với trình tự lý thuyết của gen *Nae*. Kết quả đọc trình tự đã khẳng định, gen ngoại lai trong plasmid tái tổ hợp chính

xác là gen *Nae*. Vì vậy, chúng tôi đặt tên vector biểu hiện chứa gen *Nae* này là *pET22tNae*.

Biểu hiện gen *Nae* trong tế bào *E. coli* BL21

Sau khi thiết lập được vector biểu hiện gen *pET22tNae*, vector này được biến nạp vào trong hệ tế bào biểu hiện phù hợp với vector là *E. coli* BL21. Quá trình biểu hiện như đã miêu tả ở phần phương pháp. Kết quả biểu hiện gen (Hình 3) cho thấy, gen *Nae* có khả năng biểu hiện khá mạnh trong tế bào *E.*

coli BL21. Mức độ biểu hiện được thể hiện ở trên bằng protein tái tổ hợp với kích thước khoảng 57 kDa. Hơn thế nữa, bằng việc kiểm tra khả năng biểu hiện theo thời gian thu mẫu cho thấy, tại thời điểm 5 h (sau khi cảm ứng) lượng protein tái tổ hợp tiết ra là đủ lớn. So sánh với lượng protein tái tổ hợp thu được sau khi biểu hiện qua đêm là tương đương. Do đó, chúng tôi xác định, thời điểm 5 h sau khi cảm ứng là thời gian phù hợp nhất để biểu hiện thu protein tái tổ hợp *Nae*.

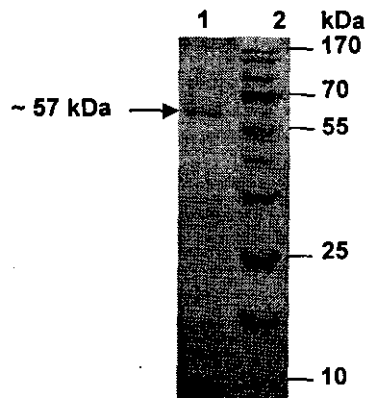


Hình 3. Kiểm tra khả năng biểu hiện gen *Nae* trên gel polyacrylamide 12%. 1: Thang protein chuẩn SM0431 (Fermentas), 2-6: Sản phẩm prorein biểu hiện theo thời gian 2, 3, 4, 5 và qua đêm, 7: Sản phẩm protein đối chứng (pET22-trx).

Western blot

Đối với protein tái tổ hợp sử dụng trong vaccine, một điểm rất quan trọng là phải có tính kháng nguyên giống với tính kháng nguyên của protein tự nhiên. Vì lý do này, protein tổng số thu được sau khi biểu hiện gen *Nae* được tiến hành thử khả năng đáp ứng đặc hiệu với kháng thể kháng virus cúm A (H5N1) thu được từ thỏ bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả thí nghiệm cho thấy, tại vị trí kích thước khoảng 57 kDa (so với thang protein chuẩn), có xuất hiện băng protein có khả năng kết hợp đặc hiệu với kháng thể kháng virus cúm A/H5N1. Chúng tôi khẳng định rằng, băng protein này chính là protein tái tổ hợp *Nae* vì cũng có cùng kích thước với protein *Nae* trong dịch protein tổng số khi biểu hiện. Tuy nhiên, tại các vị trí khác thấp hơn trên màng cũng xuất hiện một số dải protein cũng có khả năng kết cặp với kháng thể kháng virus cúm. Lý giải cho điều này có thể là trong quá trình biểu hiện ra protein *Nae*, một phần protein tái tổ hợp đã bị cắt bởi các enzyme protease. Chính vì vậy, phần protein đã bị

cắt ngắn nhưng còn mang vi cấu trúc kháng nguyên vẫn có thể kết cặp đặc hiệu với kháng thể kháng virus cúm. Vệt protein thấp hơn chính là kết quả của protein tái tổ hợp đã bị cắt bởi protease



Hình 4. Western blot của protein tái tổ hợp. 1: Sản phẩm biểu hiện protein tái tổ hợp *Nae*, 2: Thang protein chuẩn SM0671 (Fermentas).

THẢO LUẬN

NA là 1 trong những kháng nguyên bề mặt chính của virus cúm A. Cấu trúc không gian của NA có dạng tetramer với 4 tiểu phần được ổn định nhờ ion Ca^{++} trong trung tâm (Laver, Garman, 2002). Về mặt chức năng, NA vừa có đặc điểm của một enzyme vừa mang đặc điểm của một kháng nguyên bọc lộ trên bề mặt virus. Với hoạt tính của sialidase, NA hoạt động như một enzyme phá hủy thụ thể trên bề mặt tế bào chủ. Nếu không có quá trình này, các virus mới trong tế bào chủ không thể giải phóng ra khỏi tế bào chủ để lây nhiễm sang tế bào mới (Whittaker, 2001). Do vậy, NA thực sự rất quan trọng đến khả năng giải phóng virus. Dựa vào đặc điểm này cùng với tính kháng nguyên của NA, việc kích thích hệ miễn dịch cơ thể chủ nhằm đáp ứng với NA rất quan trọng để giới hạn sự phát tán của virus.

Trong định hướng thí nghiệm này, việc biểu hiện protein tái tổ hợp Nae nhằm sử dụng bổ trợ cho vaccine phòng virus cúm A/H5N1 tại Việt Nam. Vì vậy, gen mã hóa cho Nae được lấy từ chủng virus của Việt Nam (A/Hatay/2004/(H5N1)). Mặt khác, trong cấu trúc kháng nguyên bề mặt chính của virus cúm A, kháng nguyên NA là một glycoprotein dạng II (Air, Laver, 1989) với đầu amino nằm xuyên qua vỏ của virus, đầu carboxyl nằm bọc lộ trên bề mặt. Với kích thước 450 amino acid, NA có 6 amino acid đầu là amino acid bảo thủ mang tính kỵ nước, từ 7 đến 35 amino acid tiếp theo là phần định vị trên màng, từ 36 đến 75 là những amino acid đóng vai trò bản lề trong việc tạo sự linh động trong cấu trúc không gian của NA (Block, Air, 1982). Nghiên cứu về sự tồn tại của đoạn protein bản lề này với tính kháng nguyên, Castrucci và Kawaoka (1993) nhận thấy rằng có thể bỏ đoạn protein bản lề này mà không ảnh hưởng đến cấu trúc kháng nguyên NA. Tuy nhiên, sự mất đi đoạn amino acid bản lề lại làm giảm đi hoạt tính của enzyme sialidase. Dựa vào các đặc điểm đó, trong việc biểu hiện Neuraminidase tái tổ hợp, chúng tôi chỉ biểu hiện phần protein mang amino acid mã hóa cho phần kháng nguyên mà không tập trung vào phần hoạt tính của protein. Đoạn protein tái tổ hợp biểu hiện trong hướng nghiên cứu này chính là Nae có kích thước khoảng 375 amino acid.

Ngoài ra, trong quá trình thiết kế hệ biểu hiện protein Nae, chúng tôi đã sử dụng hệ vector pET22-trx. Đây là hệ vector tự thiết kế dựa trên hệ vector biểu hiện pET22b(+) và gen mã hóa cho protein thioredoxin (trx). Khi gen ngoại lai được chuyển vào

vector, chúng sẽ được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp với protein thioredoxin. Việc thiết kế thêm protein thioredoxin trong vector vừa làm tăng khả năng biểu hiện protein dạng tan mà còn làm protein dung hợp này được tiết ra ngoài khoang chu chất dễ dàng (Nguyễn Phước Hải *et al.*, 2006). Do đó, nếu protein dung hợp được biểu hiện, kích thước của nó sẽ bao gồm kích thước của protein ngoại lai cộng với kích thước của thioredoxin (khoảng 12 kDa).

Như vậy, vector biểu hiện pET22tNae sau khi chuyển vào trong *E. coli* BL21 sẽ biểu hiện ra protein dung hợp Nae với protein Trx. Tổng kích thước của protein dung hợp Nae sẽ có kích thước khoảng 57 kDa. Việc kiểm tra protein dung hợp trong sản phẩm biểu hiện bằng kỹ thuật Western blot cho thấy, protein dung hợp Nae có thể kết hợp đặc hiệu với kháng thể kháng NA tự nhiên từ đó cho phép khẳng định protein dung hợp Nae cũng có tính kháng nguyên giống với kháng nguyên NA tự nhiên của virus. Kết quả này mở ra triển vọng trong việc sử dụng bổ trợ nguồn kháng nguyên tái tổ hợp Nae trong vaccine phòng cúm.

KẾT LUẬN

Trong hướng nghiên cứu này, đoạn gen mã hóa cho phần kháng nguyên Neuraminidase của virus cúm A/H5N1 được tiến hành phân tích và xác định trình tự amino acid sử dụng trong biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp khoảng 375 amino acid. Đoạn gen mã hóa cho protein này được ghép nối chính xác vào vector biểu hiện pET22-trx để biểu hiện ra protein dung hợp Nae. So sánh tính kháng nguyên của Nae với tính kháng nguyên của protein NA tự nhiên cho thấy: Protein tái tổ hợp Nae có tính kháng nguyên giống kháng nguyên NA (N1) có trong tự nhiên.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí đề tài: "Nghiên cứu sản xuất vaccine phòng bệnh cúm gia cầm bằng chủng H5N1 Việt Nam" do Viện Thú y chủ trì và Dự án thuộc Quỹ nghiên cứu Việt Nam - Thụy Điển, mã số 01-RF2, cấp cho PGS. TS. Trương Nam Hải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Air GM, Laver WG (1989) The neuraminidase of influenza virus proteins: structure, function, and genetics. *Proteins* 6: 341-356.
- Block J, Air GM (1982) Variation in the membrane-

inertion and stalk sequences in eight subtypes of influenza type A virus neuraminidase. *Biochemistry* 21: 4001-4007.

Castrucci MR, Kawaoka Y (1993) Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* 67: 759-764.

Douglas CP, Edwin DK, Bert EJ (1996) Neuraminidase-specific antibody responses to inactivated influenza virus vaccine in young and elderly adults. *Clin Diagn Lab Immunol* 13(5): 511-516.

Edwin D, Kilbourne, Barbara A, Pokorny, Bert J, Jan B, Youli M, James TM (2004) Protection of mice with recombinant influenza virus neuraminidase. *J Infect Dis* 189: 459-461.

Fan J, Liang X, Horton MS, Perry HC, Citron MP, Heidecker G (2004) Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets and rhesus monkeys. *Vaccine* 22: 2993-3003.

Fedson DS (2005) Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development. *J Public Health Policy* 26: 4-29.

Fedson DS (2003) Pandemic influenza and the global vaccine supply. *Clin Infect Dis* 36: 1551-1561.

Gerhard W, Mozdzanowska K, Zharikova D (2006) Prospects for universal influenza virus vaccine. *Emer*

Infect Dis 12(4): 569-574.

Hoefer (1994) *Protein electrophoresis*, Copyright © Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA 94107-0387 USA.

http://www.hpa.org.uk/infections/topics_az/influenza/avian/situation_update.htm.

Fluzone® (2005-2006) Influenza virus vaccine formula. Aventis Pasteur, Inc., *Swiftwater, PA, License #1277*.

Laver G, Garman E (2002) Pandemic influenza: its origin control. *Microb Infect* 4: 1309-1316.

Nguyễn Phước Hải, Đỗ Thị Huyền, Trần Ngọc Tân, Trương Nam Hải (2006) Biểu hiện gen *Ha2* mã hóa tiểu phần kháng nguyên Hemagglutinin (HA) của virus cúm A/H5N1 trong *Escherichia coli*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 4(3): 297-302.

Subbarao K, Michael WS (2000) Molecular aspects of avian influenza (H5N1) viruses isolated from humans. *Rev Med Virol* 10: 337-348.

Tamura S-I, Tanimoto T, Kurata T (2005) Mechanisms of broad cross-protection provided by influenza virus infection and their application to vaccines. *Jpn J Infect Dis* 58: 195-207.

Whittaker GR (2001) Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. *Expert reviews*, Cambridge University Press.

EXPRESSION NAE GENE ENCODING NEURAMINIDASE ANTIGENIC DETERMINANT OF INFLUENZA VIRUS A/H5N1 IN *E. COLI*

Tran Ngoc Tan, Do Thi Huyen, Truong Nam Hai*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Neuraminidase is one of the main influenza A surface antigens. Having the length of 450 amino acids, NA has both portion enzymatic and antigenic properties. After analyzing NA amino acid sequence, the gene encoding NA epitope antigen protein (Nae) was cloned. This gene fragment was amplified by PCR with specific primer pairs. Using QIA-quick column to purify the PCR product, *Nae* gene was excised by restriction enzymes *Hind*III and *Xho*I and ligated into the pET22-trx vector then transformed into the *E. coli* BL21 host. After fusion *Nae* protein was expressed, the antigenic ability to match the natural NA (N1) antigen was determined by Western blot technique. The result of Western blot showed that *Nae* recombinant protein has specific binding ability to natural antibody against H5N1. With this result, *Nae* protein is promising to be develop to a s supplemented product for a vaccine against avian influenza virus H5N1.

Keywords: Expression, H5N1 strain, influenza vius Aneuraminidase, recombinant antigen

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7562790; Fax: 84-4-8363144; E-mail: tnhai@hn.vnn.vn