

BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA PROTEIN MATRIX 1 CỦA VIRUS CÚM A/H5N1 TRONG TẾ BÀO *ESCHERICHIA COLI*

Trần Ngọc Tân¹, Trần Mỹ Hạnh², Đỗ Thị Huyền¹, Trương Nam Hải¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia, Hà Nội

TÓM TẮT

Cúm là một bệnh nguy hiểm do lây nhiễm virus cúm, đặc biệt là virus cúm A. Sự nguy hiểm ấy không những được thể hiện qua khả năng dễ dàng bùng phát thành đại dịch mà còn nguy hiểm bởi những triệu chứng lâm sàng của bệnh cũng tương tự như các bệnh lây nhiễm do các loại virus và vi khuẩn khác nên rất khó phát hiện. Chính vì vậy, việc phát hiện nhanh và chính xác virus cúm A là rất cần thiết. Protein M1 trong cấu trúc của virus cúm A được coi là kháng nguyên đặc hiệu để phân biệt virus cúm A với các loại virus cúm khác như cúm B, C. Do đó, với mục đích tạo ra nguồn kháng nguyên tái tổ hợp phục vụ trong chẩn đoán virus cúm A, gen mã hóa kháng nguyên M1 được chúng tôi lựa chọn để tiến hành biểu hiện trong tế bào *E. coli*. Sau khi biểu hiện, nguồn kháng nguyên tái tổ hợp được làm sạch bằng việc tinh chế qua cột sắc ký ái lực His-tag. Việc xác định khả năng gắn kết miễn dịch đặc hiệu với kháng thể tự nhiên qua kỹ thuật Western blot đã cho thấy: kháng nguyên tái tổ hợp với kích thước phân tử khoảng 45 kDa đã gắn kết đặc hiệu với kháng thể tự nhiên. Kết quả này mở ra triển vọng trong việc sử dụng nguồn kháng nguyên tái tổ hợp để chế tạo bộ sinh phẩm phục vụ chẩn đoán nhanh virus cúm A.

Từ khóa: Biểu hiện gen, chẩn đoán, cúm A/H5N1, matrix 1

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự bùng phát dịch cúm cũng như sự xuất hiện nhỏ lẻ của virus cúm đã và đang là những mối hiểm họa đe dọa đến sức khỏe con người trên toàn thế giới. Gần đây, những trường hợp nhiễm virus cúm A/H5N1 ở người như là sự cảnh báo tiềm tàng cho việc bùng phát đại dịch do virus cúm A gây ra (http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/rapid_testing/en/index.html). Trong điều kiện đó, việc tăng cường khả năng chẩn đoán và sự phát hiện sớm virus cúm có tác động không nhỏ với việc hạn chế nguy cơ sự bùng phát của đại dịch ấy.

Đặc điểm quan trọng nhất của sự lây nhiễm virus cúm A là xu hướng xảy ra theo mùa và sự tử vong do những biến chứng có liên quan đến đường hô hấp. Tuy nhiên, rất nhiều virus đường hô hấp và vi khuẩn cũng có thể gây ra những triệu chứng giống như những triệu chứng khi nhiễm virus cúm A như: adenovirus; rhinovirus; virus parainfluenza; picornavirus; các virus hợp bào đường hô hấp; các vi khuẩn *chlamydia*, *legiona* và *mycoplasma* (Gavin, Thomson, 2003). Do đó, việc lây nhiễm gây ra bởi con đường hô hấp rất khó để phân biệt sự khác nhau từ virus cúm A nếu chỉ dựa trên những triệu chứng

lâm sàng điển hình.

Ngược lại so với đại đa số những trường hợp nhiễm virus khác, ảnh hưởng tốt do xử lý bằng các chất kháng virus và cách phòng bệnh bằng các loại thuốc là có hiệu quả khi sự lây nhiễm virus cúm A xảy ra. Việc điều trị bằng thuốc và hóa chất cho hiệu quả tốt nhất nếu thời gian điều trị không muộn quá 36 h, tính từ lúc xuất hiện triệu chứng (Gavin, Thomson, 2003). Tuy nhiên, kết quả chẩn đoán của những phương pháp thông thường với virus cúm A thường không có ý nghĩa với quá trình điều trị. Sự cần thiết về mặt thời gian cho điều trị cúm A đòi hỏi các phương pháp chẩn đoán cần phải nhanh và chính xác. Vì vậy, việc nghiên cứu nhằm tạo ra bộ sinh phẩm chẩn đoán virus cúm A với khả năng chẩn đoán sớm và đặc hiệu là rất cần thiết.

Hiện nay, trên thế giới có nhiều phương pháp để tiến hành chẩn đoán virus cúm và được chia làm 4 dạng chính: phát hiện qua nuôi cấy virus, phát hiện dựa trên phương pháp huyết thanh học, phát hiện dựa trên kháng nguyên virus và phát hiện dựa trên vật liệu di truyền của virus (Gavin, Thomson, 2003). Với những phương pháp này, nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới đã nghiên cứu và đưa ra nhiều bộ sinh phẩm để sử dụng trong chẩn đoán virus cúm.

Tuy nhiên, tại Việt Nam vẫn chưa có phòng thí nghiệm nào tự sản xuất bộ sinh phẩm để chẩn đoán virus cúm A một cách nhanh và chính xác. Chính vì vậy, để chế tạo bộ sinh phẩm chẩn đoán nhanh và chính xác virus cúm A dựa trên kháng nguyên của virus, chúng tôi tiến hành biểu gen *M1* mã hóa protein Matrix 1 (*M1*) của virus cúm A/H5N1 trong tế bào *E. coli*.

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 Δ 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 thiết kế được sử dụng làm vector biểu hiện gen trong tế bào *E. coli* BL21 (Nguyễn Phước Hải *et al.*, 2006). Gen *M1* trong vector tách dòng pCR-M1 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 (GENBANK) với mã ký hiệu AM040045.

Thiết kế hệ vector biểu hiện mang gen *M1* (pET22t-M1)

Từ vector pCR-M1, gen *M1* được nhân lên với số lượng lớn bằng kỹ thuật PCR. Quá trình nhân gen Na gồm 25 chu kỳ với 3 bước sau: bước 1, Biến tính sợi DNA khuôn ở 94°C trong 2 phút; bước 2: mỗi kết cặp bổ sung với đoạn gen tương đồng trên sợi khuôn ở 59 trong 30 giây; bước 3: tổng hợp, kéo dài chuỗi ở 72°C trong 1 phút. Phản ứng kết thúc ở 72°C trong 6 phút và ủ mẫu ở 4°C. Cặp mỗi đặc hiệu được thiết kế bởi hãng Amersham Pharmacia Biotech.

Sản phẩm của kỹ thuật PCR tiếp tục được tinh sạch nhờ cột QIAquick (hãng QIAGEN) và tiến hành cắt bằng 2 enzyme hạn chế *HindIII* và *BamHI* (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 *HindIII* và *BamHI*. Để xác định chính xác gen ngoại lai là gen *M1*, các dòng mang gen đã được kiểm tra tiếp tục được xác định trình tự DNA và so sánh với trình tự gen trên ngân hàng gen Quốc tế.

Biểu hiện gen

Vector biểu hiện mang gen *M1* 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 1/100. 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 từ 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 để biểu hiện tối ưu để chủng biểu hiện tiết protein tái tổ hợp là 28°C. Kết quả của sản phẩm biểu hiện được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12%.

Tinh chế protein

Sinh khối tế bào sau khi biểu hiện 6 h được thu lại bằng ly tâm (5 phút, 6000 x g, 4°C). Tủa tế bào sau ly tâm được giữ ở điều kiện lạnh -75°C. Sau 2 h, tủa tế bào ngay lập tức được chuyển sang nhiệt độ 37°C trong 30 phút. Dưới sự thay đổi về dải nhiệt độ, tế bào biểu hiện bị phá vỡ đồng thời giải phóng protein trong nội bào. Protein tổng số chứa protein biểu hiện được thu lại nhờ ly tâm (15 phút, 14000 x g, 4°C). Tinh sạch protein tái tổ hợp từ protein tổng số nhờ cột sắc ký ái lực His-Trap (Pharmacia). Chỉ tiết các bước của quá trình tinh chế này được miêu tả theo phương pháp của hãng Pharmacia.

Western blot

Protein tổng số thu được từ tế bào biểu hiện được xử lý bằng dịch phá mẫu (0,125 M Tris-Cl, 4%SDS, 20% Glycerol, 0,02% Bromophenol Blule, pH 6,8). Dịch protein đã được phá được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp đã được miêu tả của hãng Hoefer (Hoefer, 1994). Kháng nguyên sử dụng trong kỹ thuật Western blot là dịch protein tái tổ hợp được chuyển sang màng PVDF (hãng 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 Miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Về bản chất, kháng thể này là huyết thanh thu được từ gà sau khi bị nhiễm virus cúm (A/Hatay/2004/(H5N1)). Độ pha loãng của huyết thanh sử dụng trong kỹ thuật này là 200 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 gà (hãng Bio-Rad)) với độ pha loãng 1/20000 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 dựng phản ứng bằng H_2O_2 . Kết quả của thí nghiệm được xác định trên thiết bị soi gel bằng ánh sáng thường. Các thí nghiệm được tiến hành với trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học.

KẾT QUẢ

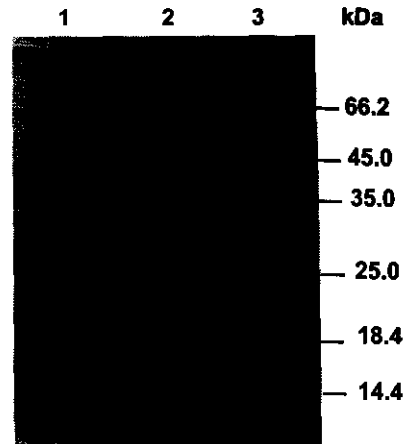
Thiết kế vector biểu hiện pET22t-M1 trong tế bào *E. coli* BL21

Từ vector tạo dòng mang gen *M1*, *pCR-M1*, gen *m1* được tiến hành chuyển vào vector phù hợp để tiến hành biểu hiện trong tế bào *E. coli*. Để quá trình biểu hiện chính xác trình tự DNA mã hóa cho protein M1, chúng tôi đã thiết kế trên cặp mỗi đặc hiệu với 2 điểm cắt của enzyme hạn chế *Hind*III và *Bam*HI. Việc thiết kế trên tạo thuận lợi cho việc đưa thẳng sản phẩm của PCR vào trong vector biểu hiện. 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. 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 *M1*. Kết quả đọc trình tự đã khẳng định, gen ngoại lai trong plasmid tái tổ hợp chính xác là gen *M1*. Vì vậy, chúng tôi đặt tên vector biểu hiện chứa gen *M1* này là *pET22t-M1*.

Biểu hiện gen *m1* trong tế bào *E. coli* BL21

Sau khi tạo được vector biểu hiện gen *pET22t-*

M1, 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 1) cho thấy, gen *M1* có khả năng biểu hiện khá mạnh trong tế bào *E. coli* BL21. Mức độ biểu hiện được thể hiện ở trên băng protein tái tổ hợp với kích thước khoảng 45 kDa (đường chạy 2).



Hình 1. Kiểm tra khả năng biểu hiện gen *M1* trên gel polyacrylamide 12%. 1. Dòng *E. coli* mang vector *pETthio*; 2. Dòng *E. coli* mang vector *pET22t-M1*; 3. Thang protein chuẩn (Fermentas).

Tinh chế protein tái tổ hợp M1

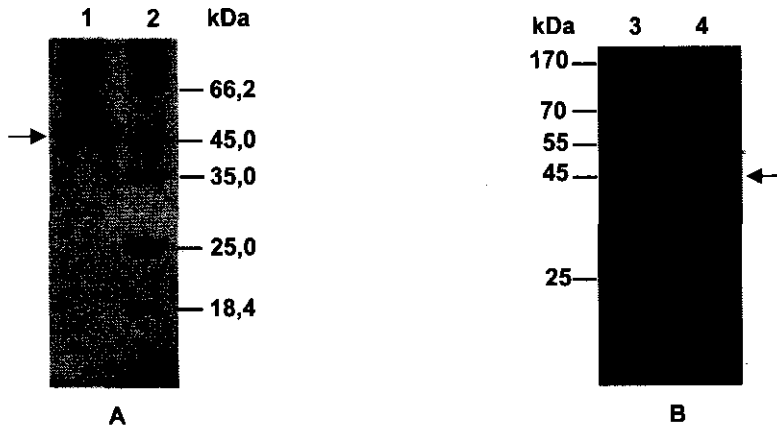
Protein tái tổ hợp M1 sau khi biểu hiện được tiến hành tinh chế qua cột sắc ký ái lực Histag. Điểm thuận lợi của protein M1 tái tổ hợp là đã được dung hợp thêm trình tự của 6 amino acid Histidine. Dưới điều kiện pH thích hợp (pH 7,5), Ion Ni^{2+} gắn trên hạt Sepharose tạo liên kết tĩnh điện với đuôi histidine. Khi đó, protein tái tổ hợp sẽ được giữ lại trên cột. Sau khi đã rửa sạch những protein không mong muốn, protein tái tổ hợp được thu lại nhờ dịch thu có chứa nồng độ Imindazole cao. Sản phẩm protein tái tổ hợp sau khi tinh sạch được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE 12% (Hình 2).

Kết quả điện di trên hình 2 cho thấy, tại đường chạy 1, sản phẩm protein tinh sạch là một băng khá rõ nét với kích thước tương đương 45 kDa, đúng như tính toán. Kết quả này đã khẳng định, protein tái tổ hợp M1 đã được tinh sạch.

Western blot

Đối với protein tái tổ hợp sử dụng trong kỹ thuật chẩn đoán dựa trên kháng nguyên của virus, một điểm rất quan trọng là nó phải có tính kháng nguyên giống với tính kháng nguyên của protein tự nhiên. Vì lý do này, protein M1 sau khi tinh sạch được tiến hành thử khả năng đáp ứng đặc hiệu với kháng thể kháng virus cúm A (H5N1)

thu được từ gà bằng kỹ thuật Western blot. Kết quả thí nghiệm cho thấy, tại vị trí kích thước khoảng 45 kDa (Hình 2, đường chạy 4), có xuất hiện băng protein có khả năng bắt cặp đặc hiệu với kháng thể kháng virus cúm. Chúng tôi khẳng định rằng, băng protein này chính là protein tái tổ hợp M1 vì cũng có cùng kích thước với protein M1 trong dịch protein tổng số khi biểu hiện và protein tinh sạch.



Hình 2. Phân tích protein M1 sau khi đã tinh chế trên gel polyacrylamide 12% (A) và kết quả Western blot của protein tái tổ hợp (B). 1. Sản phẩm protein tinh sạch; 2. Thang protein chuẩn; 3. Thang protein chuẩn SM0671 (Fermentas); 4. Protein tái tổ hợp M1.

THẢO LUẬN

Trong các phương pháp chẩn đoán cúm A hiện nay, phương pháp nuôi cấy virus trong tế bào động vật được xem như “chuẩn vàng” (gold-standard) của các phòng thí nghiệm chẩn đoán virus cúm. Phương pháp này sử dụng các dòng tế bào động vật như tế bào thận khỉ tiên phát (PMK), tế bào thận chó Madin-Darby (MDCK) hoặc tế bào phôi gà để nuôi virus từ bệnh phẩm nên tính nhạy và tính đặc hiệu cao. Ngoài ra, độc tính và hiệu giá của virus cũng có thể xác định khá chính xác dựa trên mức độ huỷ hoại tế bào của virus. Tuy nhiên, kỹ thuật truyền thống này lại đòi hỏi thời gian cho chẩn đoán khá dài, từ 2 đến 14 ngày, nên ảnh hưởng với bệnh nhân nhiễm virus cúm A bị hạn chế (Gavin, Thomson, 2003). Mặc dù vậy, nuôi cấy virus vẫn được xem là kỹ thuật cơ bản nhất trong định hướng nghiên cứu tạo vaccine phòng virus cúm A.

Một phương pháp chẩn đoán virus cúm A được sử dụng khá phổ biến hiện nay là phương pháp dựa trên cấu trúc phân tử của virus cúm. Các kỹ thuật

hiện đại sử dụng trong phương pháp này như Real-time PCR, RT-PCR, RT-LAMP (Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification), DNA microarrays (Gavin, Thomson, 2003; Ito *et al.*, 2006). Tuy nhiên, kỹ thuật cơ bản được sử dụng chủ yếu cho mục đích chẩn đoán là RT-PCR. Khả năng phát hiện virus cúm A của kỹ thuật này là khá lớn (93%) khi so sánh với kỹ thuật nuôi cấy virus (80%) và ELISA (62%). Thêm nữa, RT-PCR còn cho thấy độ nhạy cao hơn 10^3 và 10^6 so với nuôi cấy virus và ELISA, đồng thời kỹ thuật này lại không bị ảnh hưởng bởi tuổi của bệnh nhân (Steininger *et al.*, 2002). Tuy nhiên, kỹ thuật RT-PCR là kỹ thuật có mức chi phí khá đắt trong các kỹ thuật chẩn đoán virus cúm. Thời gian sử dụng cho chẩn đoán cũng khá dài, từ 1 đến 2 ngày.

Phương pháp thứ 3 được sử dụng trong phát hiện virus cúm A là chẩn đoán huyết thanh học. Việc chẩn đoán virus dựa trên phương pháp này được dựa trên sự tăng đột biến của tỷ lệ kháng thể đặc hiệu có trong mẫu huyết thanh giữa cấp tính và ủ bệnh. Tỷ lệ kháng thể đặc hiệu thường được xác định bằng kỹ

thuật miễn dịch như ức chế ngưng kết hồng cầu (HI), phản ứng cổ định bổ thể hay phản ứng trung hòa (Cox, Subbarao, 1999). Nhược điểm của phương pháp này là sự khó khăn trong quá trình thu thập mẫu (mẫu phải thu được ngay khi bệnh nhân nhiễm bệnh và sau 2 tuần sau khi nhiễm bệnh). Do đó, ý nghĩa của phương pháp chẩn đoán huyết thanh học trong việc chẩn đoán lâm sàng là không cao.

Phương pháp chẩn đoán virus cúm A với thời gian chẩn đoán ngắn nhất (khoảng 30 phút) được xác định là phương pháp chẩn đoán dựa trên sự phát hiện kháng nguyên của virus (Petric *et al.*, 2006). Sự kết hợp đặc hiệu giữa kháng thể đơn dòng đặc hiệu với kháng nguyên virus trong các mẫu bệnh phẩm chính là cơ sở cho sự phát hiện nhanh sự tồn tại của virus. Các kháng thể đặc hiệu có thể được gắn trực tiếp với các nhân tố nhận biết (huỳnh quang, enzyme...) hoặc có thể nhận biết qua kháng thể thứ 3. Chính vì vậy, kháng thể đơn dòng đặc hiệu kháng nguyên virus mang ý nghĩa quyết định nhất về độ chính xác của kỹ thuật chẩn đoán.

Trong cấu trúc của virus cúm A, có nhiều loại protein khác nhau như Haemagglutinin (Ha), Neuraminidase (Na), Nucleoprotein (Np), Matrix protein (M)... Tuy nhiên, protein Np và M được xác định là protein quyết định để phân biệt virus cúm A với các nhóm virus cúm khác (cúm B, C). Việc so sánh đặc tính di truyền của hệ gen virus còn cho thấy, gen mã hóa cho kháng nguyên M1 có độ bảo thủ cao nhất (98,5%) giữa các chủng virus cúm A phân lập từ nhiều nguồn gia cầm khác nhau (Subbarao *et al.*, 1998). Hơn nữa, trong cấu trúc của virus cúm A, lượng protein chiếm đa số chính là protein nền M1. Vì vậy, với việc nhận diện kháng nguyên M1, bộ sinh phẩm chẩn đoán virus cúm A có thể cho độ đặc hiệu và độ nhạy cao.

Như đã đề cập ở trên, điểm quyết định cho kỹ thuật chẩn đoán dựa trên kháng nguyên virus là kháng thể đơn dòng đặc hiệu. Việc tạo ra dòng kháng thể đặc hiệu này cần phải có nguồn kháng nguyên virus tinh khiết. Do vậy, để tránh sự phức tạp trong quá trình tinh chế nguồn kháng nguyên M1 từ virus tự nhiên, gen mã hóa cho protein M1 được biểu hiện tái tổ hợp trong tế bào *E. coli*. Việc tạo nguồn protein tái tổ hợp không những chủ động về nguồn kháng nguyên sạch mà còn giảm nguy cơ xảy ra trong quá trình thao tác với virus. Kết quả kiểm tra khả năng gắn kết miễn dịch của protein tái tổ hợp sau khi tinh chế đã cho thấy, nguồn kháng nguyên tái tổ hợp có khả năng thay thế được nguồn kháng

nguyên tự nhiên. Kháng thể đa dòng từ gà nhiễm virus cúm A/Hatay/2004/H5N1 đã bắt cặp đặc hiệu với kháng nguyên tái tổ hợp M1. Điều này đã thể hiện rằng, trong cấu trúc kháng nguyên tái tổ hợp, các vị trí epitope (Bucher *et al.*, 1989) vẫn được duy trì và có thể sử dụng để kích thích hệ miễn dịch trong tế bào chủ tạo ra nguồn kháng thể đặc hiệu với các vị trí epitope ấy.

KẾT LUẬN

Trong định hướng nghiên cứu này, gen mã hóa cho protein M1 của virus cúm A/Hatay/2004/H5N1 được biểu hiện trong tế bào *E. coli* bằng vector pET22thio để biểu hiện. Kết quả nhận được cho thấy, gen M1 đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli* BL21 với mức biểu hiện cao. Hơn nữa, sau khi tinh chế được protein tái tổ hợp bằng cột sắc ký ái lực, kháng nguyên tái tổ hợp M1 được xác định có tính kháng nguyên giống với tự nhiên. Kết quả này mở ra triển vọng trong việc sử dụng nguồn kháng nguyên tái tổ hợp để chế tạo các bộ sinh phẩm phục vụ chẩn đoán nhanh virus cúm A.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí 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

- Bucher D, Popple S, Baer M, Mikhail A, Gong YF, Whitaker C, Paoletti E, Judd A (1989) M protein (M1) of influenza virus: antigenic analysis and intracellular localization with monoclonal antibodies. *J Virol* 63: 3622-3633.
- Cox NJ, Subbarao K (1999) Influenza. *Lancet* 354: 1277-1282.
- Gavin PJ, Thomson RB (2003) Review of Rapid Diagnostic Test for Influenza. *CAIR* 4: 151-172.
- Hoefer (1994) *Protein electrophoresis*, User Manual. Copyright © Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA 94107-0387 U.S.A.
- http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/rapid_testing/en/index.html
- Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, Ihara T, Okuno Y (2006) Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: Comparison

with immunochromatography and virus isolation. *J Virol Meth* 135: 272-275.

Nguyễn Phước Hải, Văn Thị Như Ngọc, Nguyễn Thanh Nhân, Trần Ngọc Tân, Đỗ Thị Huyền, Trương Nam Hải (2006) Biểu hiện gen *Ha5-2* 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.

Petric M, Comanor L, Pettit CA (2006) Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J Infect Dis* 194: S98-110.

Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T (2002) Effectiveness of reverse transcription-

PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J Clin Microbiol* 40(6): 2051-2056.

Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N (1998) Characterization of an Avian Influenza A (H5N1) Virus Isolated from a Child with a Fatal Respiratory Illness. *Science* 279: 393-396.

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

EXPRESSION OF MATRIX 1 PROTEIN (M1) GENE OF INFLUENZA VIRUS A/H5N1 IN *ESCHERICHIA COLI*

Trần Ngọc Tân¹, Trần Mỹ Hạnh², Đỗ Thị Huyền¹, Trương Nam Hải^{1,*}

¹Institute of Biotechnology

²Hanoi University of Sciences, Vietnam National University (VNU)

SUMMARY

Influenza is a dangerous disease caused by viral infections, especially influenza A virus. The danger lies in its capability to promote pandemic outbreak in both human and animal. The clinical symptoms of influenza diseases are similar to that of other viral or bacterial diseases. It makes difficulty to recognize the real disease. Therefore, the creation of simple and efficient method for detection of influenza A virus is necessary. Matrix protein M1 of influenza A virus was used as the specific antigen for distinguishing influenza A virus from others such as influenza B and C. In order to produce recombinant protein M1, we selected gene *M1* coding for M1 antigen to express in *E. coli*. After expression, antigenic recombinant protein M1 was purified by His-tag affinity column. The assay of immune binding between the recombinant antigen with natural antibody by Western blot technique has shown that the recombinant antigen (45 kDa) bound specifically to natural antibody raised against H5N1. The result indicates that, protein M1 can be applied to produce diagnostic Kit for detecting influenza A virus.

Keywords: Diagnosis, gene expression, influenza virus A /H5N1, matrix 1

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