



NGHIÊN CỨU TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GENE MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN GLYCOPROTEIN C CỦA VIRUS DỊCH TẢ VỊT PHÂN LẬP TẠI THỪA THIÊN HUẾ

**Đặng Thanh Long^{1*}, Huỳnh Văn Chương¹, Nguyễn Thị Quỳnh Trang²,
Hoàng Thị Kim Hồng³, Phạm Thị Hải Yến⁴, Võ Phước Khánh⁵**

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Tinh lộ 10, Ngọc Anh, Phú Vang, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

² Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 32 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

³ Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế, Việt Nam

⁴ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

⁵ Trường Đại học Quảng Nam, 102 Hùng Vương, Tam Kỳ, Quảng Nam, Việt Nam

Tóm tắt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công gene *UL44* mã hóa tạo glycoprotein C (gC) của virus gây bệnh dịch ở tả vịt. Vùng mã hóa tạo kháng nguyên gC được phân lập từ mẫu bệnh phẩm gan vịt có kích thước 1296 bp, tương đồng 100 % với trình tự gene được công bố trên Genebank (mã số: EU076811.1). Vùng gene *UL44* mã hóa tạo chuỗi polypeptide hoàn chỉnh dài 431 acid amin và tương đồng 100 % với chuỗi polypeptide được công bố trên Genebank (mã số: ABW82653.1). Kết quả phân tích điện di SDS cho thấy protein dung hợp 6xHis-gC có khối lượng phân tử xấp xỉ khoảng 50 kDa.

Từ khóa: gene *UL44*, virus dịch tả vịt, gC

1 Đặt vấn đề

Bệnh dịch tả vịt (duck plague) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính gây tử vong cao cho vịt, ngỗng và thiên nga do một loại Herpesvirus thuộc bộ Alpha herpesvirus gây ra [5]. Bệnh thể hiện thông qua các triệu chứng chủ yếu là sốt cao, chảy nước mắt, sưng đầu, chân mềm yếu, bại liệt, phân xanh và có thể xuất huyết nội tạng [16]. Bệnh đã gây thiệt hại kinh tế nặng nề nhất cho ngành chăn nuôi trên thế giới trong đó có Việt Nam [11].

Về cấu trúc phân tử của virus dịch tả vịt (Duck Enteritis Virus) có hệ gene là một DNA sợi đôi có độ dài khoảng 150-170 kb giống như nhiều loài virus thuộc họ Herpesvirus khác. Mặt khác, hệ gene của nó chia thành hai vùng quan trọng hay còn gọi là vùng độc nhất (unique region, U) đó là vùng dài UL và vùng ngắn US. Hai đầu vùng ngắn được bao bọc bởi hai vùng lặp lại ký hiệu IRS và TRS. Vì hệ gene của virus gây bệnh dịch tả ở vịt tương đối lớn nên cho đến nay chỉ có một vài gene được giải mã [18]. Gần đây, số lượng các gene của Herpesvirus đã được xác định cấu trúc của nó ngày càng tăng lên, như: *UL5* [13], *UL6* [14], *UL22* và *UL23* và *UL24* [7], *UL25*, *UL26*, *UL26.5*, *UL27*, *UL28*, *UL29*, *UL30* [10], *UL32*, *UL33*, *UL34* [1].

* Liên hệ: dtlong@hueuni.edu.vn

Trong đó, gene *UL44* là một gene quan trọng đã có nhiều nghiên cứu về sinh học phân tử công bố và mức độ nghiên cứu cho thấy tương đối khác nhau trong herpesviruses [9]. Kháng nguyên gC là một trong những thành phần thiết yếu cho sự nhân lên của virus và có nhiều chức năng sinh học quan trọng. Là một glycoprotein đa chức năng trong Alphaherpesvirinae, chúng tham gia vào liên kết, phát tán, tính ổn định, độc tính và nhiều chức năng khác của virus [17, 15]. Glycoprotein nằm trên bề mặt vỏ của hạt virus trưởng thành; chúng chứa nhiều yếu tố quyết định kháng nguyên và có thể tạo ra phản ứng miễn dịch hoàn chỉnh [2, 3, 12]. Một số vaccine DNA dựa trên gene *UL44* mã hóa tạo kháng nguyên gC từ Herpesviruses đã được thử nghiệm gây miễn dịch ở chuột thu được kết quả đáp ứng miễn dịch tốt và hiệu quả bảo vệ cao [6, 17]. Mục đích của nghiên cứu này là tạo dòng và biểu hiện thành công gene *UL44* của virus dịch tả vịt trong tế bào vật chủ *E. coli* BL21(DE3) ở dạng dung hợp tái tổ hợp.

2 Nguyên liệu và phương pháp

2.1 Nguyên liệu

50 mẫu gan vịt nghi mắc bệnh dịch tả do Trạm Chẩn đoán xét nghiệm và điều trị bệnh động vật – Chi cục Thú y Thừa Thiên Huế thu nhận ở huyện Phú Vang, Thừa Thiên Huế cung cấp. Chúng vi khuẩn *E. coli* TOP10, BL21 (DE3), vector pGEM®-T Easy (Invitrogen), vector pET200/D-TOPO (Invitrogen), Kit tinh sạch gel: Kit Isolate II PCR and Gel (Bioline) và Kit tách và tinh sạch plasmid tái tổ hợp (EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit, BS6141 (Bio Base INC)).

Đệm TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA); CTAB (Trimethyl Ammonium Bromide); kanamycin, ampicilin.

2.2 Phương pháp

Tách chiết AND: DNA tổng số của mẫu bệnh phẩm gan vịt được tách chiết bằng phương pháp CTAB theo mô tả của Wilson và cs. [19] có cải biến. Mẫu gan được nghiền mịn bằng chày trong ống eppendorf 1,5 mL. Tái huyền phù sinh khối tế bào với 500 μ L đệm TE (0,1M Tris, 0,01 M EDTA, pH 7,4) có bổ sung 0,5 % SDS và 100 μ g/mL proteinase K trộn đều và ủ ở 37 °C trong 1 giờ, tiếp sau bổ sung 100 μ L (5 M NaCl, 80 μ L CTAB/NaCl (10 % CTAB trong 0.7 M NaCl) vào dịch phá vỡ tế bào và ủ ở 65 °C trong 10 phút. Bổ sung một thể tích tương đương của hỗn hợp (Phenol: Chloroform: Isoamyl Alcohol (25:24:1)) vào dung dịch trên và ly tâm 13.000 vòng/phút trong 5 phút. Dùng pipette hút pha lỏng ở phía trên chuyển vào ống ly tâm mới và tiếp tục bổ sung 0,5 thể tích của dung dịch ammonium acetate 7,5 M và 2 thể tích của ethanol 100 %, giữ ở -20 °C qua đêm. Kết tủa được thu nhận bằng ly tâm 13.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4 °C và rửa lại với 70 % ethanol, sau đó sấy khô tủa DNA ở nhiệt độ phòng. Hòa tan kết tủa trở lại với 50 μ L trong đệm TE. DNA tổng số của mẫu gan vịt được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8 % với điện

thể cung cấp là 80 V trong đệm TAE (40 mM Tris pH: 7,6 ; 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA) với thuốc nhuộm ethidium bromide (EtBr) (0,5 µg/L).

Phân lập gene *UL44*: DNA tổng số thu được sau khi tách chiết từ gan vịt được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR phân lập gene *UL44* mã hóa tạo kháng nguyên gC với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide được đăng ký trên Genbank có mã số EU076811.1. Thành phần nucleotide của cặp mồi đặc hiệu cho gene: HvgC-F: 5'- CACCATGGGGCC ATTAGTGATGG-3'; HvgC-R: 5'- TCAAATAATATTGTCTGCTTTATCTCGCG-3'. Thành phần phản ứng PCR gồm có: 50 ng DNA khuôn, 12,5 µL 2×PCR master mix (2,4 mM dNTP mỗi loại, 0,3 đơn vị Taq DNA polymerase), 10 pmol HvgC-F, 10 pmol HvgC-R và bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích phản ứng là 25 µL. Phản ứng PCR được thực hiện trên máy luân nhiệt MJ mini™ Personal Thermal cycler, BioRad với chu trình nhiệt như sau: biến tính ở 95 °C/5 phút, 30 chu kỳ tiếp theo: 95 °C/45 giây, 51 °C/1 phút, 72 °C/1 phút và kéo dài mạch ở 72 °C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1 %, nhuộm màu bằng ethidium bromide (EtBr 0,5 µg/L) và phân tích hình ảnh điện di bằng hệ thống DyNA Light, Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet).

Tạo dòng gene: Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch bằng Kit Isolate II PCR và gel sẽ được gắn vào vector pGEM®-T Easy theo phương pháp tạo dòng TA để tạo thành vector tái tổ hợp pGEM/*UL44*. Thành phần phản ứng gắn được chúng tôi tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất bao gồm: 50 ng vector pGEM®-T Easy, 5 µL đệm gắn 2X, 3 đơn vị enzyme T₄ DNA ligase, 67 ng sản phẩm PCR và bổ sung nước vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µL; phản ứng được ủ ở 25 °C trong 1 giờ, sau đó ủ qua đêm ở 4 °C. Sản phẩm plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp hóa biến nạp. Tế bào biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp khuẩn lạc xanh – trắng theo cơ chế X-gal và kháng sinh; khuẩn lạc màu trắng được chọn lọc để kiểm tra sự hiện diện của gene *UL44* bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTCCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn trên vector pGEM®-T Easy.

Các dòng khuẩn lạc dương tính với sản phẩm PCR được nuôi tăng sinh, thu sinh khối tế bào và tách chiết, tinh sạch plasmid tái tổ hợp theo Kit plasmid EZ-10, BS6141 (BioBase INC). Vùng gene *UL44* được phân tích trình tự bằng phương pháp dideoxy terminator trên máy ABI 3031 Analysis ở công ty Maccrogen, Hàn Quốc, hiệu chỉnh bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên ngân hàng gene NCBI bằng chương trình BLAST.

Biểu hiện gene trong vector pET200/D-TOPO: Vector tái tổ hợp pGEM/*UL44* được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế cho phù hợp khi gắn vào vector biểu hiện pET200/D-TOPO. Mồi xuôi HvgC-F: (5'-CACC_ATGGGG CCATT AGTGATGG-3') được thiết kế có gắn thêm trình tự CACC vào ở đầu 5' giúp tạo dòng định hướng cho sản phẩm PCR trong vector; 4 nucleotide này được thiết kế bổ sung cho phần lồi GTGG của

vector) và mồi ngược HvgC-R: 5'-TCAAATAATATTGTC TGCTTTATCTCGCG-3'. Thành phần phản ứng PCR gồm có 1 μ L vector tái tổ hợp pGEM/UL44 (50 ng), 10 pmol mồi xuôi HvgC-F, 10 pmol mồi ngược HvgC-R, 5 μ L đệm PCR 10X, 1 μ L dNTP (10 pmol/ μ L), 0,5 μ L Enzyme pfu (5 U/ μ L), nước cất vô trùng vừa đủ 50 μ L với chu trình nhiệt như mô tả trên.

Sản phẩm PCR được cắt ra trên gel agarose 1 % và tinh sạch bằng Kit Isolate II PCR và Gel (Bioline), sau đó gắn vào vector pET200/D-TOPO mang promoter T7 (Invitrogene). Thành phần phản ứng gắn bao gồm sản phẩm PCR sau tinh sạch (13 ng), 1 μ L vector pET200 (20 ng/ μ L), 1 μ L đệm gắn, nước cất vô trùng để đạt thể tích gắn 6 μ L.

Trộn nhẹ và ủ ở 25 °C trong 60 phút; sản phẩm phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42 °C trong 60 giây. Thành phần bao gồm 6 μ L phản ứng gắn, 50 μ L tế bào khả biến *E. coli* BL21 (DE3) và 500 μ L môi trường SOC (2 % tryptone, 0,5 % dịch chiết nấm men, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose, pH = 7) [4], nuôi lắc 200 vòng ở 37 °C trong 60 phút. Thể biến nạp sau đó được trải đều trên đĩa petri chứa môi trường LB đặc (1 % tryptone; 0,5 % dịch chiết nấm men; 1 % NaCl; 1,5 % agar, pH 7,0) [4] có bổ sung 100 μ g/mL kanamycin và ủ ở 37 °C qua đêm. Khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc được kiểm tra trực tiếp bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu.

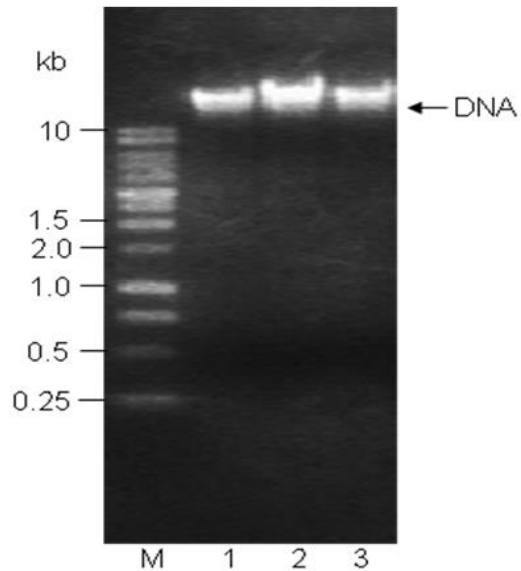
Các tế bào *E. coli* có dương tính với phản ứng PCR được chọn lọc và nuôi tăng sinh trong bình tam giác chứa 50 mL môi trường YJ (2 % glycerol, 1,5 % tryptone, 2 % dịch chiết nấm men, 0,25 % K₂HPO₄.12 H₂O; 0,016 % KH₂PO₄; 0,05 % NaCl; 0,025 % MgSO₄.7 H₂O) [4] có bổ sung 100 μ g/mL kanamycin ở 37 °C; tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào của dịch nuôi cấy ở bước sóng 600 nm đạt tới 1,0 (OD₆₀₀ = 1,0) thì bổ sung 1 mM chất cảm ứng IPTG (Bio-Rad) và tiếp tục nuôi ở 37 °C. Sinh khối tế bào *E. coli* tái tổ hợp sau mỗi 8 giờ cảm ứng được thu nhận bằng ly tâm 15.000 vòng/phút. Tái huyền phù tế bào trong đệm TNE (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) 1 % Triton X-100, 0,008 mg/mL lysozyme, ủ trong đá 60 phút có lắc, phá vỡ tế bào bằng siêu âm ở 40 pusec trong 5 phút. Sự biểu hiện của protein dung hợp 6xHis-gC được kiểm tra bằng điện di-polyacrylamide gel 15 % có SDS ở 80 V.

Xử lý số liệu: Chuỗi trình tự nucleotide được hiệu chỉnh bằng phần mềm Bioedit và so sánh bằng chương trình BLAST.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Tách chiết DNA tổng số của virus dịch tả vịt

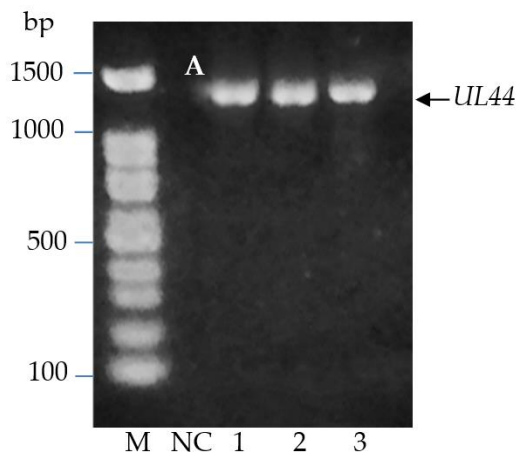
AND tổng số của mẫu bệnh phẩm gan vịt mắc bệnh dịch tả sau khi tách chiết bằng phương pháp CTAB sẽ được kiểm tra bằng cách điện di trên gel agarose 0,8 %. Kết quả thể hiện ở hình 1 cho thấy AND thu được có chất lượng tốt, nồng độ cao, cho một băng ADN rõ nét, đồng đều và sạch, không bị đứt gãy. Nguyên liệu DNA này có thể sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Kết quả tách chiết ADN tổng số trên gel agarose 0,8 %. M khối lượng phân tử AND chuẩn (0,25–10 kb); 1–3: ADN tổng số

3.2 Phân lập gene mã hóa tạo kháng nguyên gC

Vùng gene mã hóa tạo kháng nguyên gC của virus gây bệnh dịch tả ở vịt được phân lập bằng phản ứng PCR trên máy luân nhiệt MJ mini™ Personal Thermal cycler, BioRad. Kết quả cho thấy xuất hiện 1 băng duy nhất có kích thước khoảng 1300 bp (bao gồm cả 4 nucleotide CACC được gắn vào phía đầu 5' của mỗi xuôi) (Hình 2). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với kết quả của Lieu và cs. khi tiến hành phân lập gene *UL44* mã hóa tạo kháng nguyên gC của virus dịch tả vịt có chiều dài khoảng 1296 bp [9].

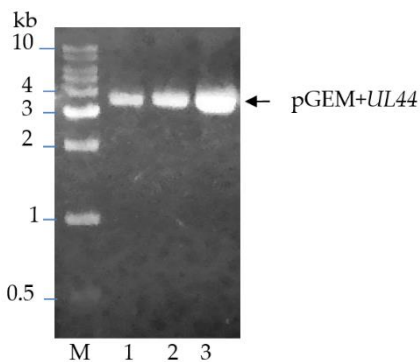


Hình 2. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene *UL44*. M: Thang DNA chuẩn (100–1500 bp), NC: đối chứng âm. 1, 2 và 3: sản phẩm PCR

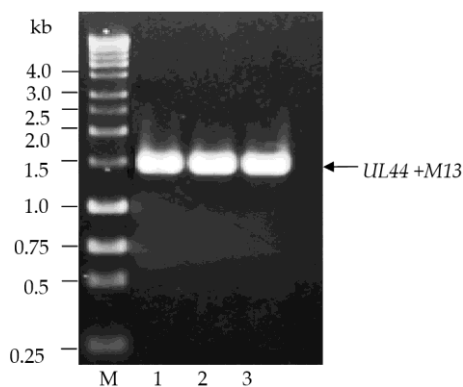
3.3 Tạo dòng và phân tích trình tự gene mã hóa kháng nguyên gC

Sản phẩm PCR thu được sau khi tinh sạch mang gene *UL44* và gắn thêm adenine (dA) vào đầu 3' (do đặc tính của enzyme Taq DNA polymerase) nhằm tạo liên kết bổ sung với thymidine (dT) đã được thiết kế trong vector pGEM[®]-T Easy bằng phương pháp tạo dòng (TA-cloning). Kết quả gắn vào vector và biến nạp vào tế bào vật chủ *E. coli* TOP10 thể hiện thông qua tách chiết plasmid tái tổ hợp và điện di trên gel agarose 1 % trên hình 3 cho thấy chỉ có một băng duy nhất, đậm, rõ nét có kích thước khoảng 4300 bp (bao gồm kích thước của vector pGEM[®]-T Easy là 3015 bp và kích thước của gen *UL44* khoảng 1300 bp) (Hình 3). Qua đây có thể kết luận được rằng chúng tôi đã gắn thành công gene *UL44* vào vector pGEM[®]-T Easy và biến nạp được vào tế bào vật chủ *E. coli* chủng TOP10. Plasmid tái tổ hợp này được chúng tôi gửi phân tích trình tự nucleotide ở Công ty Macrogen, Hàn Quốc.

Sự hiện diện của gene *UL44* trong các tế bào *E. coli* TOP10 được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR gián tiếp thông qua cặp mồi M13. Kết quả cho thấy đã xuất hiện băng ADN có kích thước khoảng 1500 bp (bao gồm kích thước của gene 1300 bp và một đoạn khoảng 200 bp nằm trên vector pGEM[®]-T Easy) (Hình 4).

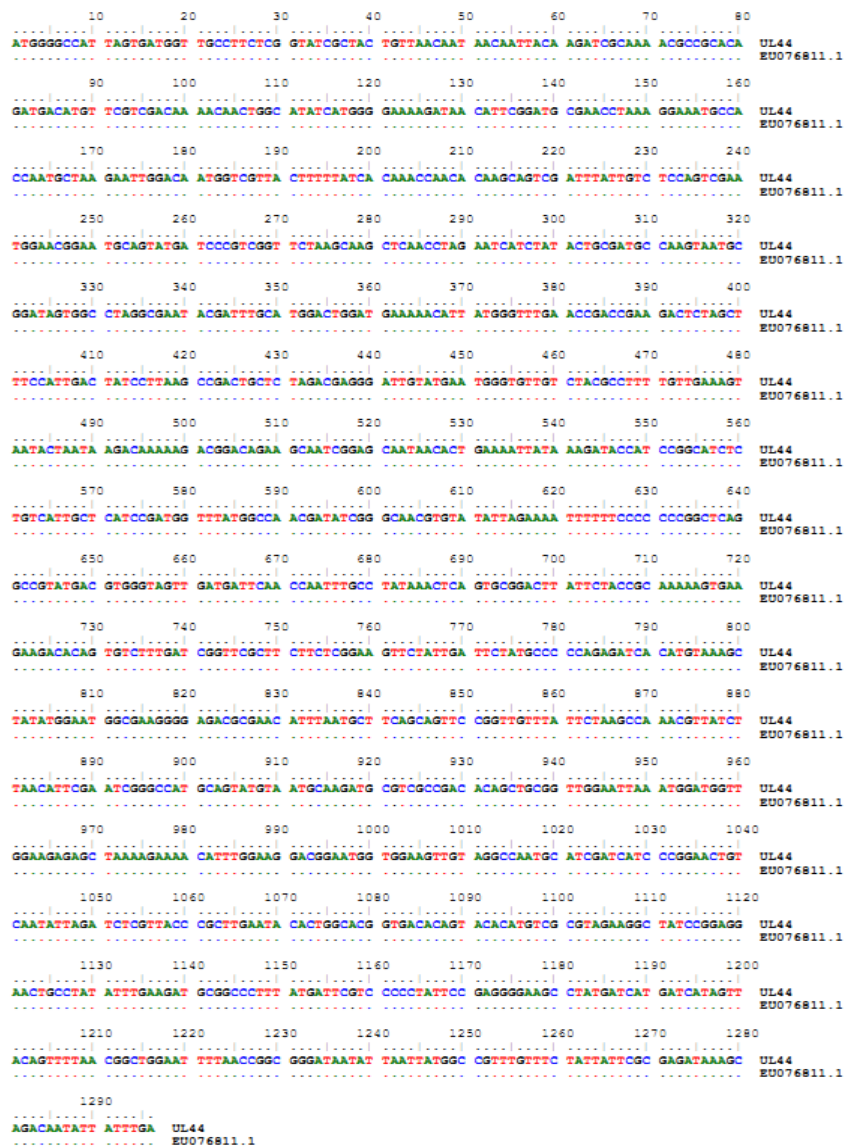


Hình 3. Ảnh điện di kiểm tra plasmid pGEM/gC tái tổ hợp. M: Thang DNA chuẩn (500–10.000 bp, BioBase), 1–3: sản phẩm plasmid tái tổ hợp chứa gene *UL44* tách từ 3 khuẩn lạc

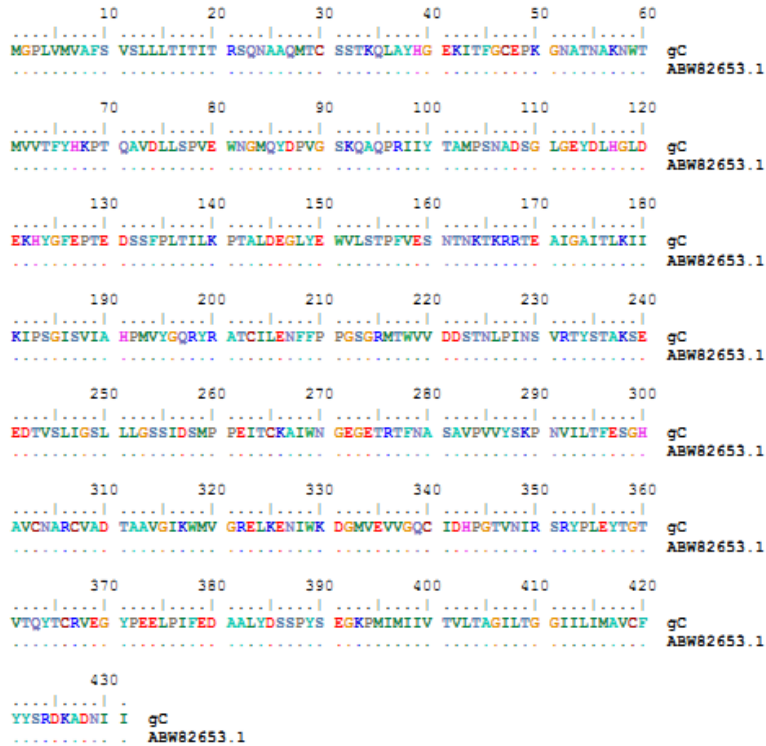


Hình 4. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi M13. M: Thang chuẩn DNA (0,25–10 kb); 1, 2 và 3: sản phẩm PCR

Kết quả phân tích trình tự cho thấy đoạn gene phân lập được có kích thước 1296 bp (bao gồm cả bộ ba mở đầu ATG và bộ ba kết thúc TAG) sau khi loại bỏ đầu nối CACC được thiết kế thêm về phía đầu 5' của mỗi xuôi HvgC-F và tương đồng 100 % đối với trình tự nucleotide công bố trên ngân hàng gene thế giới GenBank với mã số EU076811.1 (Hình 5); trình tự này mã hóa tạo một chuỗi peptide suy diễn hoàn chỉnh và liên tục bao gồm 431 amino acid (không bao gồm bộ ba kết thúc TGA) và tương đồng 100 % với trình tự amino acid công bố với mã số ABW82653.1 (Hình 6). Như vậy, chúng tôi có thể khẳng định rằng đã tách dòng thành công gene *UL44* mã hóa kháng nguyên gC của virus gây bệnh dịch tả ở vịt .



Hình 5. Mức độ tương đồng trình tự nucleotide giữa gene *UL44* đã phân lập và gene *UL44* được công bố trên Genbank (EU076811.1)

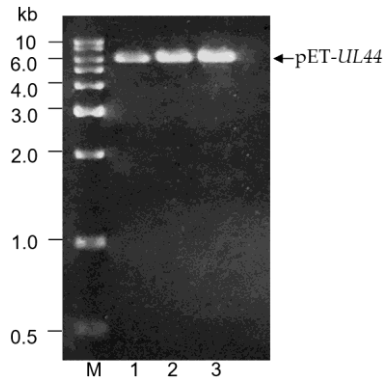


Hình 6. Mức độ tương đồng của trình tự amino acid suy diễn của kháng nguyên gC phân lập và kháng nguyên đã được công bố (mã số ABW82653.1)

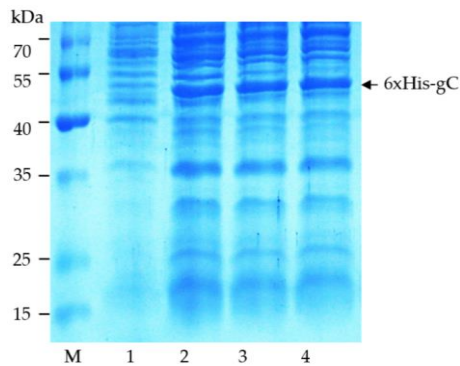
3.4 Biểu hiện gene mã hóa tạo kháng nguyên gC

Plasmid tái tổ hợp pGEM/UL44 được sử dụng làm khuôn mẫu thực hiện phản ứng PCR thu nhận gene mục tiêu với cặp mồi đặc hiệu như trình bày trên nhằm biểu hiện trong tế bào vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) thông qua hệ thống biểu hiện là vector pET/200D-TOPO. Do vector pET200/D không có khả năng tự đóng vòng cho nên những khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc đều là những khuẩn lạc dương tính. Các khuẩn lạc dương tính mọc trên môi trường chọn lọc được chúng tôi tiến hành nuôi tăng sinh trên môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin (100 µg/mL), tách chiết và tinh sạch plasmid tái tổ hợp, sau đó kiểm tra khả năng gắn gene *UL44* với cặp mồi đặc hiệu (Hình 7).

Phân tích trên gel cho thấy kết quả tách chiết DNA plasmid tái tổ hợp giữa các dòng khuẩn lạc khác nhau chọn lọc ngẫu nhiên đều cho một băng duy nhất, đậm, rõ nét và có kích thước khoảng 6500 bp (bao gồm kích thước của vector là 5741 bp và gene *UL44* là 1296 bp) tương đương với kích thước tính toán theo lý thuyết ban đầu (Hình 7). Tế bào *E. coli* BL21 (DE3) tái tổ hợp sau khi được nuôi cảm ứng sinh với 1 mM IPTG ở 37 °C, tốc độ lắc là 200 vòng/phút. Sự biểu hiện của gene mã hóa tạo kháng nguyên gC được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel polyacrylamide 15 % có bổ sung SDS (Hình 8).



Hình 7. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm plasmid pET200D/UL44. M: Thang chuẩn DNA (500–10.000 bp), 1–3: sản phẩm plasmid tái tổ hợp chứa gene mã hóa tạo kháng nguyên gC



Hình 8. Ảnh điện di thăm dò khả năng biểu hiện của gene UL44. M: khối lượng thang chuẩn protein (10–170 kDa, BioBase), 1: dịch protein thu được từ tế bào *E. coli* không mang vector tái tổ hợp, 2–4: dịch protein có chứa kháng nguyên tái tổ hợp 6xHis-gC

Kết quả phân tích cho thấy sự biểu hiện của gene *UL44* tạo ra protein dung hợp có nồng độ cao và không xuất hiện ở mẫu đối chứng, khối lượng phân tử xấp xỉ 50 kDa (bao gồm cả đuôi dung hợp 3,7 kDa của vector pET200D). Điều đó cho thấy rằng vùng gene mã hóa tạo kháng nguyên gC thu được protein có kích thước xấp xỉ 46,3 kDa; kích thước này cao hơn so với nghiên cứu của Lian và cs. trên vùng gene *UL44* mã hóa tạo thành chuỗi peptide gồm 432 amino acid, khối lượng phân tử protein là 45 kDa [8]. Sự sai khác này có thể là do ảnh hưởng của một số yếu tố trong quá trình chạy điện di SDS hoặc do sự ảnh hưởng của hệ thống biểu hiện lên quá trình biểu hiện của gene (Hình 8).

4 Kết luận

Chúng tôi đã phân lập thành công vùng gene *UL44* mã hóa tạo gC của virus gây bệnh dịch tả ở vịt thu được trên địa bàn Thừa Thiên Huế. Vùng gene mã hóa tạo kháng nguyên gC có kích thước 1296 bp; vùng gene này mã hóa tạo thành chuỗi peptide hoàn chỉnh và liên tục gồm

431 amino acid.

Trình tự gene *UL44* đã được biểu hiện trên hệ thống vector pET 200/D-TOPO trong vật chủ *E. coli* BL21 (DE3) thu được protein dung hợp 6xHis-gC có khối lượng phân tử khoảng 50 kDa. Sản phẩm nghiên cứu của chúng tôi sẽ làm nguyên liệu để sản xuất vaccine/kháng thể sử dụng trong phòng trị bệnh dịch tả ở vịt do Duck Enteritis Virus gây ra.

Lời cảm ơn: Xin trân trọng cảm ơn Đại học Huế đã tài trợ cho nghiên cứu này thông qua đề tài khoa học công nghệ cấp Đại học Huế với mã số DHH2017-15-07

Tài liệu tham khảo

1. Chang H., Cheng A.C., Wang M. S., Guo Y. F., Xie W., Lou K. P. (2009), Complete nucleotide sequence of the duck plague virus gE gene, *Arch virol*, 154, 163–165.
2. Denis M. H. E., Rijsewijk F. A., Kaashoek M. J., van Oirschot J. T., Thiry E., Pastoret P. P. (1996), The role of glycoproteins gC, gE, gI, and gG in the induction of cell-mediated immune responses to bovine herpesvirus, *Vet Microbiol*, 53, 121–132.
3. Denis M., Slaoui M., Keil G., Babiuk L. A., Ernst E., Pastoret P. P., Thiry E. (1993), Identification of different target glycoproteins for bovine herpes virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes depending on the method of *in vitro* stimulation, *Immunology*, 78, 7–13.
4. Đinh Thị Bích Lân, Phùng Thăng Long, Huỳnh Văn Chương, Đặng Thanh Long, Hoàng Tấn Quảng, Lê Đức Thọ, Lê Quốc Việt, Lê Công Thịnh, Đặng Thị Hương, Hoàng Thị Thùy Nhung (2016), Cải thiện mức độ biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp 3-1E của *Eimeria* trong *Escherichia coli* BL21, *Tạp chí Khoa học kỹ thuật thú y*, Tập XXII, (7), 60–67.
5. Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L., Swayne D. E. (2008), Duck virus enteritis. In: Saif YM, editor. Diseases of poultry American, *Wiley-Blackwell*, 384–393.
6. Fischer T., Planz O., Stitz L., Rziha H. J. (2003), Novel recombinant parapoxvirus vectors induce protective humoral and cellular immunity against lethal herpesvirus challenge infection in mice, *J Virol*, 77, 9312–9323
7. Li H. X., Liu S. W., Kong X. G. (2006), Characterization of the genes encoding UL24, TK and gH proteins from duck enteritis virus (DEV): a proof for the classification of DEV, *Virus Genes*, 33, 221–227.
8. Lian B. X. C., Cheng A., Author C., Wang M., Zhu D., Luo Q., Jia R., Bi F., Chen Z., Zhou Y., Yang Z., and Chen X. (2010), Identification and characterization of duck plague virus glycoprotein C gene and gene product, *Virology Journa*, *Virology Journa*, 7, 340–349.
9. Liu F. Y. M. B., Zhao Y., Zhang Y., Wu Y. H., Liu X. M., Wang J. W. (2008), Characterization of the gene encoding glycoprotein C of duck enteritis virus, *Virus Genes*, 37, 328–332.
10. Liu S. W., Chen S. H., Li H. X., Kong X. G. (2007), Molecular characterization of the herpes simplex virus 1 (HSV-1) homologues, UL25 to UL30, in duck enteritis virus (DEV), *Gene*, 401, 88–96.
11. Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiên, Trần Thị Lan Hương (2001), *Vi sinh vật Thú y*, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội.
12. Ober B. T., Summerfield A., Mattlinger C., Wiesmuller K. H., Jung G., Pfaff E., Saalmuller A., Rziha H. J. (1998), Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4+CD8+ memory T-helper cells in swine, *J Virol*, 72, 4866–4873.

13. Pan H., Cao R., Liu L., Niu M., Zhou B., Chen P., Hu J. (2008), Molecular cloning and sequence analysis of the duck enteritis virus UL5 gene, *Virus Res*, 136, 152–156.
14. Plummer P. J., Alefantis T., Kaplan S., O'Connell P., Shawky S., Schat K. A. (1998), Detection of duck enteritis virus by polymerase chain reaction, *Avian Dis*, 42, 554–564.
15. Rux A. H., Lou H., Lambris J.D., Friedman H. M., Eisenberg R. J., Cohen G. H. (2002), Kinetic analysis of glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2 binding to heparin, heparan sulfate, and complement component C3b, *Virology*, 294, 324–332.
16. Sandhu T. S., Shawky S. A. (2003), Duck virus enteritis (duck plague). In: Saif YM Barnes HJ Glission JR Fadly AM McDougald LR Swayne DE, editors. Diseases of poultry 11th ed, Ames (IA): Iowa State University Press, 354– 363.
17. Stokes A., Alber D. G., Cameron R. S., Marshall R. N., Allen G. P., Killington R. A. (1996), The production of a truncated form of baculovirus expressed EHV-1 glycoprotein C and its role in protection of C3H (H-2Kk) mice against virus challenge, *Virus Res*, 44, 97–109.
18. Wang J., Höper D., Beer M., Osterrieder N. (2011), Complete genome sequence of virulent duck enteritis virus (DEV) strain 2085 and comparison with genome sequences of virulent and attenuated DEV strains, *Virus Res*. 160(1-2), 316–325.
19. Wilson K. (1987), Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, (eds) Current Protocols in Molecular Biology, 2.4.1–2.4.5. John Wiley & Sons, New York.

CLONING AND EXPRESSION OF GENE ENCODING ANTIGEN GLYCOPROTEIN C OF DUCK PLAGUE VIRUS ISOLATED FROM THUA THIEN HUE PROVINCE

**Dang Thanh Long^{1*}, Huynh Van Chuong¹, Nguyen Thi Quynh Trang²,
Hoang Thi Kim Hong³, Pham Thi Hai Yen⁴, Vo Phuoc Khanh⁵**

¹Institute of Biotechnology, Hue University, provincial road No. 10, Phu Vang, TTHue, Vietnam

²University of Education, Hue University, 32 Le Loi, Hue, Vietnam

³University of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue, Hue, Vietnam

⁴University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung, Hue, Vietnam

⁵Quang Nam University, 102 Hung Vuong, Tam Ky, Quang Nam, Vietnam

Abstract. In this study, we cloned and expressed the *UL44* gene encoding for glycoprotein C (gC) of duck virus enteritis. The length of the *UL44* gene segment extracted from total DNA of duck livers was 1296 bp, identical to a gene sequence in the Genbank (accession number: EU076811.1). The polypeptide chain encoded of 431 amino acid residues was identical to a polypeptide chain in the Genbank (accession number: ABW82653.1). The SDS electrophoresis results showed that fusion protein 6xHis-gC had a molecular weight of approximately 50 kDa.

Keywords: gene *UL44*, gC, duck enteritis virus