

TÁCH DÒNG, BIỂU HIỆN VÀ TINH SẠCH GEN MÃ HÓA POLYHEDRIN CỦA MONODON BACULOVIRUS (MBV) Ở VI KHUẨN

Nguyễn Thị Giang An^{1,2}, Hà Thị Thu², Vũ Thị Hiền², Đồng Văn Quyền², Đinh Thương Văn², Đinh Duy Kháng²

¹Trường Đại học Vinh

²Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Monodon baculovirus (MBV) là thành viên của nhóm virus nucleopolyhedrosis (NPV), một trong những tác nhân gây bệnh nghiêm trọng đối với tôm nuôi. Polyhedrin là một protein chính trong thể ẩn (OB) của MBV, đồng thời là một kháng nguyên, dấu ấn quan trọng được sử dụng để chẩn đoán sự lây nhiễm của MBV. Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả tách dòng và biểu hiện gen *polh* mã hóa polyhedrin ở *E. coli*. *polh* được khuếch đại trực tiếp từ genome của MBV phân lập từ mẫu tôm bệnh tại Việt Nam bằng cặp mồi đặc hiệu, được thiết kế dựa trên trình tự của gen công bố trên GenBank (EU251062), gắn thêm vị trí nhận biết của *NcoI* và *HindIII* ở đầu 5' tương ứng của mỗi xuôi và mỗi ngược. Sản phẩm PCR được gắn vào vector tách dòng pCR2.1 tạo ra pCPolh và được xác định trình tự. So sánh với trình tự nucleotide công bố trên GenBank cho thấy độ tương đồng của gen này với gen *polyhedrin* của baculovirus gây bệnh ở *Penaeus monodon* là 80-90%. Đoạn gen này sau đó được cắt ra khỏi pCPolh bằng *NcoI* và *HindIII* và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) tại vị trí của 2 enzyme tương ứng. Trong cấu trúc này, polyhedrin được biểu hiện dưới dạng dung hợp gắn thêm 6-histidine và Trx ở đầu N. Phân tích bằng điện di trên gel polyacrylamide cho thấy, polyhedrin tái tổ hợp được biểu hiện cao nhất ở 37°C, 1 mM IPTG và sau 3 giờ cảm ứng. Polyhedrin tái tổ hợp được tinh sạch bằng sắc ký ái lực ProbondTM Nickel-Chelating Resin. Lai Western cho thấy polyhedrin tái tổ hợp phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng polyhedrin tự nhiên. Polyhedrin tái tổ hợp có thể được sử dụng để tạo kit chẩn đoán MBV.

Từ khóa: Biểu hiện trong *E. coli*, *Monodon baculovirus*, MBV, *polyhedrin*

MỞ ĐẦU

MBV là virus dạng thể ẩn (occlusion bodies, OB) trong tổ chức gan tụy của tôm sú (*Penaeus monodon*) được Lightner và Redman (1981) phân lập đầu tiên tại Đài Loan. Khi nghiên cứu dưới kính hiển vi điện tử, người ta xác định virus này thuộc họ Baculoviridae, chi Nucleopolyhedrovirus với vật chất di truyền là DNA xoắn kép có khối lượng phân tử 80 - 100x10⁶ Da. Ban đầu virus này được đặt tên là monodon baculovirus (MBV) do được tìm thấy trên tôm sú (*Penaeus monodon*). Tuy nhiên, sau đó người ta thấy chúng còn có mặt trong các loại tôm khác như *P. merguensis*, *P. semisulcatus*, *P. penicillatus*, *P. vannamei* (Lightner, Redman, 1981).

Năm 1997, Bonami đặt tên MBV là *PmSNPV* (*Penaeus monodon* single nucleocapsid polyhedrosis virus). Sau đó, Ủy ban phân loại virus Quốc tế (ICTV) đã thống nhất tên gọi là *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus viết tắt là *PemoNPV* (Regenmortel *et al.*, 2000; Fauquet *et al.*, 2005). Tuy nhiên MBV là tên được dùng phổ biến nhất. MBV có

mặt ở nhiều khu vực khác thuộc Châu Á như Trung Quốc, Triều Tiên, Đài Loan, Malaysia, Philippines, Thái Lan, Ấn Độ, Indonesia, Australia, Việt Nam (Đỗ Thị Hòa, 2004; Walker, Mohan, 2009). Ở Trung Đông, Kuwait, Israel, châu Phi, châu Mỹ, Hawaii, Mexico, Ecuador, Brazil với một type khác là BP (Baculovirus penaei) trên tôm thẻ chân trắng (Bonami *et al.*, 1995).

Virus này nhiễm vào tất cả các giai đoạn phát triển của tôm từ ấu trùng đến trưởng thành. Mặc dù độc lực của virus không cao, không gây chết hàng loạt, nhưng cũng chính vì thế mà tỷ lệ nhiễm virus này ở tôm rất cao 30-90% (Đỗ thị Hòa, 2004). Con đường vector truyền bệnh của virus thường là qua phân, thức ăn, nguồn nước và tôm mẹ nhiễm bệnh (Lightner, 1996). Khi xâm nhập vào cơ thể vật chủ, chúng tấn công vào tổ chức gan tụy và hình thành OB, làm ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa thức ăn trong cơ thể vật chủ, dẫn đến sự hấp thu thức ăn kém, tôm sẽ còi cọc chậm lớn và làm cho hệ thống miễn dịch của vật chủ suy giảm tạo cơ hội cho các bệnh bội nhiễm khác phát triển như WSSV, IHHV,

Taura ... tạo thành các trận dịch lớn và gây chết hàng loạt (Lightner, 1998).

Polyhedrin là loại protein tinh thể đặc trưng của virus thuộc họ *Baculoviridae*, có vai trò là chất nền bảo vệ vỏ của virion, giữ cho hạt virus ổn định trong điều kiện biến đổi của môi trường, tránh được sự phân giải của các enzyme từ gan tụy. Polyhedrin cũng là phần quyết định kháng nguyên khi virus xâm nhiễm vào cơ thể vật chủ và tạo đáp ứng miễn dịch kháng lại sự lây nhiễm của MBV (Satidkanitkul *et al.*, 2005).

Hiện nay, việc chẩn đoán MBV được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau như: phát hiện OB trong mô gan tụy bằng cách tách gan tụy tôm, nhuộm xanh malachite 0,05% (Fegan *et al.*, 1991) hoặc nhuộm với hematoxylin và eosin (H&E) (Alday de Graindorge, Flegel, 1999), quan sát dưới kính hiển vi quang học. Các kỹ thuật sinh học phân tử cũng được áp dụng trong việc chẩn đoán MBV như phương pháp PCR (Belcher, Young, 1998). Tuy nhiên, việc xét nghiệm này phụ thuộc nhiều vào thiết bị, hoá chất và kinh nghiệm của kỹ thuật viên, đồng thời chi phí cao. Một đoạn genome của MBV bước đầu đã được nhân dòng bởi Mari và đồng tác giả (1993). Boonsanongchokying và đồng tác giả (2006) cũng đã nghiên cứu và sản xuất kháng thể đơn dòng kháng polyhedrin của MBV ở Thái Lan. Tiếp theo đó, Chaivisuthangkura và đồng tác giả (2008) cũng đã tiến hành giải trình tự gen và biểu hiện thành công protein polyhedrin tái tổ hợp trong vi khuẩn. Mặc dù vậy hiện nay trên thị trường vẫn chưa có các kit chẩn đoán nhanh MBV. Với mong muốn lần đầu tiên tại Việt Nam nghiên cứu thành công kháng thể đa dòng và kháng thể đơn dòng kháng polyhedrin của MBV nhằm phục vụ cho việc phát triển kit chẩn đoán chính xác và nhanh chóng MBV phù hợp với chủng virus Việt Nam, chúng tôi đã nhân dòng và biểu hiện gen mã hóa polyhedrin của MBV từ tôm nhiễm virus, sử dụng protein này như một kháng nguyên phục vụ cho việc tạo kháng thể kháng MBV trên tôm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Vector pCR2.1 và pET32a(+) (Invitrogen, Mỹ) lần lượt được dùng để tách dòng gen mã hóa polyhedrin (viết tắt *polh*) ở *E. coli* chủng DH5α (Invitrogen, Mỹ) và biểu hiện protein tái tổ hợp ở *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Mỹ).

Taq polymerase, T4 ligase, X-gal và IPTG của hãng Fermentas. Các enzyme giới hạn *NcoI* và *HindIII* (New England Biolabs); kit tách chiết DNA (Bioneer, Hàn Quốc), kháng thể kháng polyhedrin tự nhiên (anti-Polh) sản xuất trên chuột BALB/c (do Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học cung cấp).

Tách dòng gen mã hóa polyhedrin (*polh*)

Genomic DNA của MBV được tách từ mô gan tụy của tôm nhiễm virus bằng kit tách chiết DNA (Bioneer, Hàn Quốc). Đoạn gen mã hóa polyhedrin *polh* (783 bp) được khuếch đại trực tiếp từ genomic DNA bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu thiết kế dựa trên trình tự gen trong GenBank mã số EU251062 (Chaivisuthangkura *et al.*, 2008) có vị trí nhận biết của *NcoI* ở mỗi cuối PF: 5'-TAC CCA TGG CCT TCG ACG ATA GCA TGA TG-3'; và *HindIII* ở mỗi ngược PR: 5'-CTA GAA GCT TAC CAT TAG CAT TGG CAC C-3'.

Hỗn hợp PCR gồm: 2 µl DNA (50 - 100 ng), 2,5 µl đệm taq, 1 µl mỗi muối, 1 µl ngược, 2,5 µl dNTP, 0,3 µl Taq polymerase và 15,7 µl H₂O. Chu trình nhiệt của PCR: 94°C/3', 30 chu kỳ (95°C/50", 53°C/40", 72°C/1'20"); 72°C/8'. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng PCR Purification kit (QIAGEN) và chèn vào vector tách dòng pCR2.1 (Invitrogen) tạo ra plasmid pCPolh. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào *E. coli* DH5α và phát triển thành các khuẩn lạc xanh, trắng trên môi trường LB bổ sung Amp, X-gal và IPTG. Những khuẩn lạc màu trắng là do nhận được plasmid tái tổ hợp pCPolh, DNA ngoại lai đã xen vào giữa *lac* promoter và gen cấu trúc *lac-Z* của operon *Lac*, làm cho gen cấu trúc không dịch mã thành β-galactosidase. Trình tự gen được xác định theo Sanger và đồng tác giả (1997) trên máy ABI PRISM®3100 Genetic Analyzer. Dữ liệu được xử lý bằng phần mềm Bioedit và BLAST.

Thiết kế plasmid pEPolh và biểu hiện Polh tái tổ hợp ở *E. coli*

Đoạn gen *polh* được cắt ra khỏi pCPolh bằng *NcoI* và *HindIII* và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) được mở vòng cũng bằng 2 enzyme trên tạo ra plasmid pEPolh. Sản phẩm nối ghép được biến nạp vào *E. coli* chủng DH5α, các dòng plasmid tái tổ hợp được chọn lọc và cắt kiểm tra bằng hai enzyme trên.

Để biểu hiện, pEPolh được biến nạp vào *E. coli* chủng BL21 Star™ (DE3). Chủng *E. coli* BL21/pEPolh được nuôi lắc ở 37°C trong 3 h (OD₆₀₀

đạt 0,6 - 1) thì cảm ứng bằng 1 mM IPTG. Protein tái tổ hợp được thu nhận sau 3 h nuôi cấy cảm ứng ở 37°C và điện di trên gel 12,5% polyacrylamide (Laemmli, 1970).

Để tối ưu mức độ biểu hiện protein tái tổ hợp, một số điều kiện nuôi cấy được thay đổi: nhiệt độ (37, 30, 25 và 20°C), nồng độ IPTG (1, 0,5 và 0,2 mM) và thời gian thu mẫu sau cảm ứng (1, 2, 3 và 4 h).

Tính chất Polh bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin

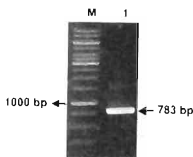
Polh sau khi xác định trạng thái hòa tan được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen, Mỹ) và điện di biến tính trên gel polyacrylamide. Các phân đoạn sau tinh sạch được thu lại, tái gấp nếp bằng cách thẩm tích trong đệm có thành phần 50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM NaCl và 1% glycerol, sau đó chia nhỏ và bảo quản ở -70°C.

Hàm lượng protein được xác định bằng phương pháp Bradford (1976). Tính đặc hiệu của polyhedrin tái tổ hợp được xác định bằng phản ứng Western giữa Polh với kháng thể kháng polyhedrin tự nhiên sản xuất trên dòng chuột BALB/c.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng và xác định trình tự gen *polh* của virus MBV

Gen mã hóa *polyhedrin* được khuếch đại từ genomic DNA tách chiết ở gan tụy của mẫu tôm nhiễm MBV bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu PF và PR. Sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel agarose thể hiện một băng DNA duy nhất với khối lượng phân tử phù hợp với lý thuyết (783 bp) (Hình 1).



Hình 1. Điện di đồ sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi PF và PR. Đoạn gen *polh* (783 bp) được khuếch đại đặc hiệu

```

atggccttcgacgatagcatgatgatggaaaatatggacgaccttagtggagatcagaag
M A F D D S M M M E N M D D L S G D Q K
atgggtcgtcagctcgctgacgtggtgctgtggctggagcatcaagatgttgaatgag
M V L T L A A A G A V A S K M L N B
gctgcggacctaagaaaaattataaggatactccactcgaagaatatttcaaagataag
A A D L K K N Y K D T P L E E Y F K D K
tattcaaccaacaacaaaagcgaagatcactgaacaggaattcggacttctaagtctatg
Y S T N K K R K I T E Q E F G L P K S M
aatgaaccaatggatccacttgagcttccctatcacaaattcaccaaatcattttaagaa
N E P M D P L E L P Y H N S P N H F K E
atgccactctctcgctaggttcctcgaatggcaaacagcttgcaagaaaatgaacgac
M P H P R V G P R M A K Q L A K K M N D
aagaaactccattacaaatttaacagttttcagacaacaaacgcttttaacaccacaca
K K L H Y K F N S F Q T N K R F N T H T
atctacaagcgacaacaaattcacttcttctaagctcatgggcttctcgggtcagagtgat
I Y K R T N L T S S K L M G F S G Q S D
gttgvcgtaccacaaatacaacagcgagtcacgcttctcctggaagtggtggaattttgg
V G V P K Y N S A V T L P L E F W
gtaggtgacaacacaaatcctaattgttgaacattctaagggtagtatggcattgaaaaat
V G D N T N P N V E H S K G S M A L K N
agtgaatgtatagcatctatgaaacttaaaacttagtaattcgaaaattctagaagac
S E C M I A S M K L K L S N L Q I L E D
acagagcttgaccatacaggagttgctatatctagcagtaggaatgtcaatgaagttagt
T E L D H T G V A I S S S R N V N E V S
agctatattattccagtagaatctcatttgggtgccaatgctaagtgtaagctt
S Y I I P V E S H L G A N A N G K L
    
```

Hình 2. Trình tự nucleotide và amino acid suy diễn đoạn gen mã hóa polyhedrin của MBV.

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit PCR purification kit (QIAGEN) và gắn vào vector pCR2.1 tạo ra plasmid tái tổ hợp *pCPolh*, sau đó được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và phát triển thành các khuẩn lạc xanh, trắng trên môi trường LB có bổ sung Amp, X-gal và IPTG. *pCPolh* được tách chiết từ các khuẩn lạc trắng và xanh (đối chứng) và cắt kiểm tra bằng *EcoRI*. Do pCR2.1 có hai vị trí cắt của *EcoRI* ở hai đầu của vùng cắt nối đa vị và ở sát vị trí gắn của DNA ngoại lai, vì vậy sản phẩm cắt bằng *EcoRI* của *pCPolh* sẽ cho đoạn DNA có kích thước bằng kích thước của đoạn gen *polh* nếu plasmid mang gen ngoại lai. Kết quả thu được 3 dòng plasmid mang đoạn DNA (783 bp) và được kháng định lại bằng xác định trình tự gen (Hình 2).

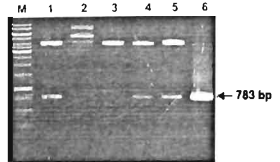
Phân tích bằng chương trình BLAST cho thấy, trình tự gen *polh* có độ tương đồng lần lượt là 90% và 80% so với gen *polyhedrin* mã số EU251062 và HQ22280 công bố trong Genbank. Sự sai khác giữa trình tự gen *polh* của MBV phân lập tại Việt Nam và Thái Lan (EU251062) không cao, song điều đáng chú ý là trong trình tự đó xuất hiện các đoạn gen chèn vào mà trong trình tự gen của Thái Lan không có (kết quả không nêu ở đây). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi gợi ý rằng, nếu đoạn gen này mang các quyết định kháng nguyên quan trọng thì việc sử dụng các kit chẩn đoán ngoại nhập để chẩn đoán chúng virus của Việt Nam sẽ có độ đặc hiệu không cao. Nói cách khác, việc phát triển kit chẩn đoán MBV trên cơ sở các kháng nguyên có nguồn gốc từ các chủng virus đang lưu hành trong nước là điều cần thiết và có ý nghĩa thực tiễn lớn.

Thiết kế plasmid pEPolh và biểu hiện protein tái tổ hợp

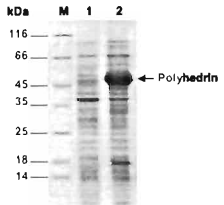
Đoạn gen *polh* được cắt ra khỏi *pCPolh* và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) tạo thành plasmid tái tổ hợp *pEPolh*. Plasmid *pEPolh* được biến nạp vào *E. coli* chủng DH5 α và được cắt kiểm tra bằng *NcoI* và *HindIII*. Ba dòng plasmid *pEPolh* (Hình 3, giếng 1, 4 và 5) mang đúng gen *polh* và sau đó được biến nạp vào *E. coli* chủng BL21 Star™ (DE3) để biểu hiện gen.

Chủng *E. coli* BL21/pEPolh được nuôi biểu hiện và cảm ứng bằng IPTG. Hỗn hợp protein tổng số được điện di trên gel polyacrylamide. Theo thiết kế polyhedrin được biểu hiện dưới dạng protein dung hợp với thioredoxin (Trx, 14 kDa) và đoạn 6-His ở đầu N với kích thước khoảng 48 kDa (Hình 4). Chúng tôi đã tiến hành tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện như thay đổi nhiệt độ, nồng độ chất cảm ứng IPTG và thời gian thu mẫu sau cảm ứng.  pĐiều kiện

biểu hiện tốt nhất để biểu hiện polyhedrin là ở 37°C, 1 mM IPTG và sau 3 h cảm ứng (kết quả không trình bày ở đây). Ngoài ra, kết quả điện di cũng cho thấy, Polh luôn biểu hiện ở dạng thể vùi.



Hình 3. Điện di đồ sản phẩm cắt pEPolh bằng *NcoI* và *HindIII* (1-5); sản phẩm PCR của *polh* (6) và thang chuẩn 1 kb (M).

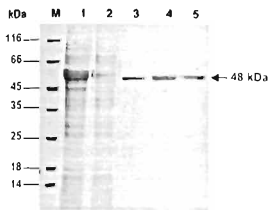


Hình 4. Điện di đồ mẫu biểu hiện protein tái tổ hợp tổng số trước cảm ứng (1) và sau cảm ứng IPTG (2) và thang protein chuẩn (Fermentas) (M).

Tinh chế protein tái tổ hợp

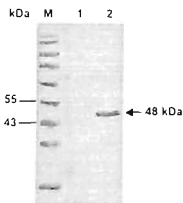
Nỗ lực biểu hiện polyhedrin trong vi khuẩn ở dạng hòa tan như thay đổi nhiệt độ, giảm nồng độ chất cảm ứng IPTG đều không thành công. Hầu hết protein tái tổ hợp được biểu hiện ở *E. coli* ở dạng không tan (kết quả không nêu ở đây). Kết quả này phù hợp với công bố của Suwannaka và đồng tác giả (2006), trong đó các tác giả chỉ ra rằng polyhedrin biểu hiện ở dạng thể vùi ở *E. coli* và được tái gấp nếp trong đệm thích hợp. Đây là một điều kiện rất thuận lợi để biểu hiện, tinh sạch và thu hồi Polh phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo. Như trình bày ở trên, polyhedrin được thiết kế có gắn thêm 6 histidine ở đầu N, vì thế protein tái tổ hợp dễ dàng được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực. Polh ở cả dạng hòa tan và thể vùi được tinh chế theo phương pháp Hybrid như hướng dẫn của hệ thống tinh sạch ProBond™ Nickel-

Chelating Resin (Invitrogen). Sau khi tinh chế, kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide cho thấy polyhedrin tái tổ hợp đã được tinh chế và có độ tinh sạch cao (Hình 5, giếng 3 - 5).



Hình 5. Điện di độ Polh tinh chế trên gel polyacrylamide. Dịch pha tế bào trước khi tinh chế (1); dịch chảy qua cột (2); các phân đoạn sau khi tinh sạch (3 - 5); protein marker (M).

Polh tái tổ hợp phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng polyhedrin tự nhiên



Hình 6. Lai Western giữa Polh tinh sạch với kháng thể kháng polyhedrin tự nhiên từ tôm bị nhiễm bệnh. Protein tổng số của *E. coli* (1); Polh tái tổ hợp tinh sạch (2). Thang protein chuẩn (Fermentas) (M).

Mục đích cuối cùng của chúng tôi là sử dụng Polh để phát triển kit chẩn đoán MBV gây bệnh trên tôm. Để khẳng định chắc chắn protein tinh sạch này chính là polyhedrin tái tổ hợp, chúng tôi kiểm tra khả năng tương tác giữa Polh với kháng thể kháng Polh bằng lai Western, kháng thể này được tổng hợp từ polyhedrin tự nhiên tinh chế từ MBV. Kết quả cho thấy Polh phản ứng rất đặc hiệu với kháng thể kháng MBV tự nhiên (Hình 6), thể hiện là một băng protein với kích thước khoảng 48 kDa tương ứng với kích thước của Polh. Trong khi đó ở mẫu đối chứng là

protein tổng số của *E. coli* không mang gen polyhedrin nên không xuất hiện băng phản ứng này. Điều này khẳng định polyhedrin tái tổ hợp có nguồn gốc từ chủng virus MBV gây bệnh trên tôm sú Việt Nam đã được biểu hiện và tinh sạch thành công. Kết quả này còn cho thấy đoạn gen mã hóa polyhedrin tách dòng này mang quyết định kháng nguyên quan trọng của polyhedrin, có thể sử dụng để sản xuất kháng thể kháng polyhedrin làm nguyên liệu cho việc phát triển kit chẩn đoán MBV.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nghiên cứu thành công tách dòng, biểu hiện và tinh sạch polyhedrin tái tổ hợp của virus dưới dạng dung hợp với 6xHis và thioredoxin (Trx). Polyhedrin tái tổ hợp sau khi tinh sạch và tái cấu trúc (refolding) vẫn giữ được hoạt tính của chúng, được khẳng định thông qua phản ứng đặc hiệu với kháng thể kháng polyhedrin tự nhiên từ tôm nhiễm MBV.

Lời cảm ơn: Nhóm đề tài xin chân thành cảm ơn phòng Vi sinh phân tử đã tạo điều kiện giúp đỡ chúng tôi về thiết bị và kinh phí trong quá trình thực hiện các nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alday de Graindorge V, Flegel TW (1999) *Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the black tiger prawn Penaeus monodon*. Multimedia Asia, Bangkok.
- Belcher CR, Young PR (1998) Colourimetric PCR-based detection of monodon baculovirus in whole *Penaeus monodon* postlarvae. *J Virol Methods* 74: 21-29.
- Bonami JR, Bruce LD, Poulos BT, Mari J, Lightner DV (1995) Partial characterization and cloning of the genome of PvsNPV (=BP-type virus) pathogenic for *Penaeus vannamei*. *Dis Aquat Org* 23: 59-66.
- Bonami JR, Aubert H, Mari J, Poulos BT, Lightner DV (1997) The polyhedra of the occluded baculoviruses of marine decapod crustacea: A unique structure, crystal organization, and proposed model. *J Struct Biol* 120: 134-45.
- Boonsanongchokying C, Sang-um W, Sithirongkul P, Sriurairatana S, Flegel TW (2006) Production of monoclonal antibodies to polyhedrin of Monodon baculovirus (MBV) from Shrimp. *Sci Asia* 32: 371-376.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Chaivisuthangkura P, Tawilert C, Tejangkura T, Rukpratanporn S, Longyant S, Sithigorngul W, Sithigorngul P (2008) Molecular isolation and characterization of a novel occlusion body protein gene from *Penaeus monodon* nucleopolyhedrovirus. *Virology* 381: 261-267
- Đỗ Thị Hòa (2004) Bệnh monodon type baculovirus (MBV) ở tôm hạc. Bệnh học thủy sản. Nhà xuất bản Nông nghiệp: 194-204.
- Fegan DF (1991) The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in Southern Thailand. *Aquaculture* 96: 205-17
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lightner DV (1996) *A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of penaeid shrimp*. The World of Aquaculture Society: Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Lightner DV, Redman RM (1981) A baculovirus-caused of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*. *J Invertebr Pathol* 38: 299-302.
- Lightner DV, Redman RM (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* 64: 201-220
- Mari J, Bonami JR, Poulos B, Lightner D (1993) Preliminary characterization and partial cloning of the genome of a baculovirus from *Penaeus monodon* (PmSNPV = MBV). *Dis Aquat Org* 16: 207-215.
- Sanger N, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
- Satidkanitkul, Sithigorngul, Sang-oum, Rukpratanporn, Sriurairatana, Withayachumnankul, Flegel T (2005) Synthetic peptide used to develop antibodies for detection of polyhedrin from monodon baculovirus (MBV). *Dis Aquat Org* 65: 79-84.
- Thiwatchai Suwannaka, Parin Chaivisuthangkura, Sombat Rukpratanporn, Siwaporn Longyant, Patarin Sridulyakul and Paisarn Sithigorngul (2006) Production of monoclonal antibodies against recombinant polyhedrin protein of monodon baculovirus (MBV). *35th Congress on Science and Technology of Thailand*.
- Walker PJ, Mohan CV (2009) Viral disease emergence in shrimp aquaculture: origins, impact and the effectiveness of health management strategies. *Aquaculture* 1: 125-154.

MOLECULAR CLONING, EXPRESSION AND PURIFICATION OF THE GENE ENCODING POLYHEDRIN FROM MONODON BACULOVIRUS (MBV)

Nguyễn Thị Giang An^{1,2}, Hà Thị Thu², Vũ Thị Hiền², Dong Van Quyen², Dinh Thuong Van², Dinh Duy Khang^{1,*}

¹Department of Biology, University of Vinh

²Institute of Biotechnology (IBT), Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Polyhedrin, the major constituent protein of occlusion bodies of Monodon baculovirus (MBV), has been shown to prompt immune responses in previous studies and is thus considered one of the major immunogenic proteins from MBV that can be used for both diagnostics purposes and vaccine development. This study aimed to clone and express the polyhedrin in *E. coli*. To achieve this, the gene encoding polyhedrin was PCR amplified using genomic DNA extracted from MBV-infected *Penaeus monodon* as template. The PCR product was cloned into pCR2.1 vector, sequenced and finally cloned into the pET32a(+) expression vector. In this construct, the protein was expressed along with the His(6)-tagged followed by Trx protein at its N-terminus. The His(6)-tagged-Trx-Polyhedrin was purified by affinity chromatography using Probond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) under hybrid condition as described by the manufacture. Upon SDS-PAGE analysis it was found that the recombinant protein was expressed optimally as a 48 kDa protein after 3 hours of induction with 1 mM IPTG at 37°C. The Western blot analysis indicated that purified recombinant polyhedrin was specifically recognized by antibodies raised against native polyhedrin. This recombinant protein will be used for development of a MBV diagnostic kit.

Keywords: *E. coli*, Monodon Baculovirus, MBV, polyhedrin, pET32a(+)

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37563386; E-mail: khangvspr@ibt.ac.vn