

## THIẾT KẾ VECTOR MANG CẤU TRÚC GEN HA1 BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN BỀ MẶT VIRUS CÚM A/H5N1 Ở THỰC VẬT

Nguyễn Huy Hoàng<sup>1\*</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>2</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>2</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Đại học Thái Nguyên, <sup>2</sup>Viện công nghệ sinh học, VAST

### TÓM TẮT

Virus H5N1 là một biến thể của cúm A thường được gọi là cúm gà hoặc cúm gia cầm. Virus H5N1 có khả năng lây nhiễm rất cao giữa các loài chim và như vậy có thể gây ra đại dịch cúm gia cầm trên toàn cầu và làm cho ngành công nghiệp gia cầm bị phá sản. Hơn nữa, nó còn ảnh hưởng đến sức khỏe con người do tiếp xúc trực tiếp với gia cầm nhiễm bệnh. Giống như tất cả các phân nhóm khác cúm A, các biến thể của virus H5N1 có vật liệu di truyền là RNA. Virus H5N1 có một hệ gen phân đoạn gồm 8 sợi đơn RNA, mã cho 8 protein. Trong đó, protein HA, NA và M có liên quan nhiều nhất đối với thuốc kháng virus và kháng thể. Để ngăn chặn sự lây nhiễm virus, phương pháp phổ biến nhất là tiêm phòng. Hiện nay, đã có nhiều vaccine có sẵn phòng bệnh cúm A. Hiện nay, đã có nhiều loại vaccine phòng cúm A. Tuy nhiên, vaccine thực vật là mục tiêu của nhiều nhà nghiên cứu trên khắp thế giới bởi vì loại vaccine tiểu đơn vị này có thể được đưa vào qua đường ăn, uống, dễ quản lý và hiệu quả hơn so với vắc xin tiêm khác. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả thiết kế vector mang cấu trúc gen HA1 biểu hiện kháng nguyên bề mặt virus cúm A/H5N1 ở thực vật.

**Từ khóa:** biểu hiện gen, cúm gà, virus H5N1, vaccine thực vật, RNA.

### MỞ ĐẦU

Cúm gà (avian influenza) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính của các loài chim, kể cả gia cầm và thủy cầm, do các biến thể (Subtypes) khác nhau thuộc nhóm virus cúm A gây nên. Do có sức đề kháng tự nhiên tốt nên một số loài chim mang virus gây bệnh, nhưng không có biểu hiện của bệnh. Đây là mối nguy hiểm lan truyền bệnh cho các loài gia cầm khác. Ngoài ra, chúng còn là nơi cung cấp nguồn tàng trữ biến đổi nguồn gen tạo nên các biến thể mới. Các biến thể virus cúm A gây bệnh trên người đều có nguồn gốc tiến hoá biến thể và biến chủng từ động vật và sau khi thích ứng trên người thì gây bệnh, trước đây đã tạo nên những vụ dịch thảm khốc, rồi biến mất sau một thời gian lại tái hiện và gây nên đại dịch mới.

Virus cúm gia cầm (avian flu) thuộc họ Orthomyxoviridae type A là virus RNA, chứa hệ gen là RNA âm sợi đơn (-ssRNA) bao gồm 8 phân đoạn, có độ dài tổng số 13.500 nucleotide. Phân đoạn 1-3 mã hóa cho

protein PB1, PB2 và PA có chức năng là enzyme polymerase, điều khiển tổng hợp ribonucleic acid nguyên liệu cho hệ gen và RNA thông tin. Phân đoạn 4 mã hóa cho protein hemagglutinin (HA) là protein “độc” mang tính chất gây bệnh, có tính kháng nguyên và có khả năng ngưng kết với hồng cầu gà. Phân đoạn 5 mã hóa cho nucleoprotein (NP) là protein có trách nhiệm bao bọc hệ gen. Phân đoạn 6 là gen chịu trách nhiệm tổng hợp protein enzyme neuraminidase (NA), cắt thụ thể giải phóng virus khỏi tế bào, sau chu kì nhân lên của chúng. Phân đoạn 7 mã hóa cho hai tiểu phần protein đệm M1 và M2 (matrix protein) có chức năng tập hợp virus và tạo kênh vận chuyển ion qua màng nhân. Hai protein này được mã hóa từ một RNA nhưng có các khung đọc khác nhau. Phân đoạn 8 mã hóa cho hai tiểu phần protein không cấu trúc NS1 và NS2 (non-structural protein) đa chức năng.

Chuyển gen mã hóa protein kháng nguyên vào cây trồng là nguồn thức ăn chính cho con người, động vật nuôi là một trong những hướng nghiên cứu phục vụ sản xuất vaccine

\* Tel: 0915 456024, Email: huyhoangntn@gmail.com

tái tổ hợp hiện nay. Bên cạnh đó, một xu hướng cũng được bắt đầu quan tâm nghiên cứu và ứng dụng là sử dụng hệ thống nuôi cấy tạo sinh khối lớn để sản xuất các dược phẩm sinh học tái tổ hợp. Do tế bào thực vật có ưu thế nuôi cấy dễ dàng, môi trường nuôi cấy đơn giản, rẻ tiền, dễ dàng sản xuất một lượng sinh khối lớn trong khoảng thời gian ngắn và quan trọng hơn cả tế bào thực vật nuôi cấy *in vitro* không mang các mầm bệnh cho người. Với mục đích tạo cơ sở cho việc sản xuất vaccine A/H5N1 ăn được, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu thiết kế vector mang gen HA1 biểu hiện kháng nguyên HA của virus H5N1 và bước đầu tạo dòng rẽ tơ chuyển gen ở cây thuốc lá. Đây sẽ là nguồn nguyên liệu cơ sở để biến nạp và biểu hiện kháng nguyên của virus trong cây trồng.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Chúng vi khuẩn *E. coli* One Shot TOP 10 (Invitrogen). Chúng *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834 (Viện Sinh học phân tử và Dược học, Trường Đại học Heidelberg, CHLB Đức).

Vector pUC18/HA1 (HAop) của virus H5N1 đã được tối ưu hóa mã để biểu hiện ở thực vật. Vector chuyển gen pK7WG2D(1). Vector pENTR221/cal nhận từ Viện Sinh học phân tử và Dược học, Trường Đại học Heidelberg, CHLB Đức. Vector chuyển gen pPTN289/gus.

Giống thuốc lá *Nicotiana tabacum* L. K326 đang nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* do Phòng Công nghệ Tế bào Thực Vật-Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

### Phương pháp

#### Thiết kế vector chuyển gen thực vật

Gen HAop được nhân lên bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *HA1\_SacI\_F/HA1\_HindIII\_R/HA1* theo chu

trình: 95°C / 3 phút, 30 chu kì ( 95°C/30 giây, 57°C/30 giây, 72°C/1 phút 30 giây), 72°C/10 phút và 4°C/20 giờ.

Các phương pháp ghép nối vào vector theo Sambrook và Russell (2002) và theo quy trình Gateway kit của Invitrogen. DNA plasmid được biến nạp vào *E. coli* theo phương pháp sốc nhiệt của Cohen và đồng tác giả (1972) và biến nạp vào *Agrobacterium rhizogenes* bằng phương pháp xung điện. DNA plasmit được tách chiết và làm sạch theo phương pháp của Sambrook và Russell (2002). DNA tái tổ hợp được kiểm tra bằng phương pháp clony PCR với cặp mồi đặc hiệu *HA1\_SacI\_F/HA1\_HindIII\_R/HA1* và xác định trình tự bằng máy phân tích trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer theo nguyên lí của Sanger với bộ kit BigDye Terminator v. 3.2 Cycle Sequencing.

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Chuyển đổi mã bộ ba nucleotid biểu hiện cao trong thực vật

Sự biểu hiện protein tái tổ hợp là hướng cơ bản của công nghệ sinh học hiện đại. Tuy nhiên các protein rất khó biểu hiện trong cơ thể khác loài gốc. Một số mã bộ ba rất dễ dàng biểu hiện cao trong loài này nhưng không biểu hiện hoặc biểu hiện thấp trong loài khác. Sự thay đổi trình tự mã hóa thông qua sự thay đổi tối ưu bộ ba, làm tăng mức độ biểu hiện protein đang trở thành mối quan tâm làm tăng mức biểu hiện gen ngoại lai. Do vậy, gen HA của virus A/H5N1 phải được thay đổi một số mã bộ ba giúp biểu hiện mức độ cao trong các cây trồng. Chúng tôi đã tạo ra sự thay đổi một số mã bộ ba nucleotide nhưng không làm thay đổi trình tự amino acid (Hình 1).

Gen HAop là gen có cấu trúc tối ưu biểu hiện trong thực vật và được tổng hợp nhân tạo bởi công ty Geneart, Germany và được ghép nối vào vector pUC18.

ATGGAGAAAATAGTGCTTCTTCTTGC AATAGTCAGTCTTGTTAAAAGTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAACAA  
M E R T Y L L L A T V S L V K S D Q T C T G Y H A N N  
ATN L A A A A A W T H T G R I T T T G C T T G C A T T G T G T T C T T G T G A A G T T G A T C A G A T C T G C A T T G G A T A C C A C G C T A A C A A

CTCGACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCAAGACATACTGGAAAAGACACACA

CTCTACTGAGCAAGTGGATACAATTATGGAAAAGAAGCGTGAAGTCTACTCAGGATATTCTTGAAAAGACTCACA  
ACGGGAAGCTCTGCGCTCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTTGAGAGATGTAGTGTAGCTGGATGGCTCCTCGGAAC  
AGKLCALDGVKPLILEDCSVAGWLLGN  
ACCGAAATCTTCCGCTCTTCATGCTGTTAAGCCACTTATCTTAGGGATTGCTCTGTTGCTGGATGCGCTTCTTGAAAAC  
CCAATGTGTGACGAATTCATCAATGTGCCGAATGGTCTTACATAGTGGAGAAGGCCAATCCAGTCAATGACCTCTGTTA  
PNCDEFINVPESYIVEFAHEVNDLQY  
CCATGTGTGATGAGTTCATTAACGTGCCAGAGTGGTCTTATATTGTGGAGAAGGCTAACCCAGTGAACGATCTTTGCTA  
CCCAGGGGATTTCAATGACTATGAAGAATTGAAACACCTATTGAGCAGAATAAACCTTTTGGAGAAAATTCAGATCATCC  
FGDFNDYEELRHLLSRINHFELIQII  
CGGTGATTTCAACGATTACGAAGAGCTTAAGCACCTTCTTTCTAGGATTAACCACCTTCGAGAAGATTACAGATTATTC  
CCAAAAGTTCTTGGTCCAGTCATGAAGCCTCATTAGGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACCAGGGAAAGTCCCTCTTTTTC  
PKSSWSSEASLGVSSACP YQGKSSFF  
CAAGTCATCTTGGTTCATCTCAGGAGCTTCTCTTGGAGTTTCTTCTGCTTGGCCATACCAGGGAAAGTTCATCTTTCTTC  
AGAAATGTGGTATGGCTTATCAAAAAGAAGTACATACCCAACAATAAAGAGGAGCTACAATAATACCAACCAAGAAGA  
RNVVWLIKKNSTYPTTIKRSYNNNTNQED  
AGGAACGTGTGTTGGCTTATTAAGAAGAAGTCTACTTACCCAAGTATTAAAGAGTETTACAACAAGACTTACCGAAGA  
TCTTTTGGTACTGTGGGGGATTCACCATCCTAATGATGCGGCAGAGCAGATAAAGCTCTATCAAAACCAACCACCTATA  
LLVLDWGIHHPNDAAEQIYLYQNFITY  
TCTTTTGGTCTTCTTGGGGAATTCAGCACCAAAATGATGCTGCTGAACAGATTAAGTGTACAGAAACCAACTACTTACA  
TTTCCGTTGGGACATCAACACTAAACCAGAGATTGGTACCAAGAATAGCTACTAGATCCAAAGTAAACGGGCAAGTGGAA  
ISVGTSTLNQPLVPRIPATRSKVNNGQSG  
TTTCTGTGGGAAGTCTACTCTTAACCAGAGGCTTGTGCCAAGAATTGCTACTAGGCTTAAGGTGAACGGACAATCTGGA  
AGGATGGAGTCTTCTTGACAATTTTAAACCGAATGATGCAATCAACTTCGAGAGTAAATGGAAATTTTCATTGCTCCGGA  
RMEFFFWTILKPNDAINFESNGNF TAP E  
AGGATGGAAATTTCTTGAGTATTCTTAAGCCAAACGATGCTATTAACTTCGAGTCTAACGGAAACTTCATTGCTCCAGA  
ATATGCATACAACTTGTCAGAAAAGGGGACTCAACAATATGAAAAGTGAATGGAAATATGGAACTGCAACACCAAGT  
YAYRLVKKGDSTIMKSELEYGNHNTK  
GTAGCTTACAAGTTGGTGAAGAAGGGTATAGTACTATTGAAGTGTGAGCTTGAGTACGGAAACTGCAACACTAAGT  
GTCAAACCTCAATGGGGCGATAAAGTCTAGTATGCCATTCCACAATATACACCTCTCACCATCGGGGATGCCCCAAA  
CQTFMGAINS SMPFHNIHPLTIGECFY  
GCCAACTCCAATGGGAGCTATTAAGTCTTCTATGCCATTCCACAACATTCAACCACTTACTATTGGAGAGTGGCCAAAG  
TATGTGAAATCAACAGATTAGTCTTGGCAGTGGGCTCAGAAATAGCCCTCAACGAGAGACGCGAGGATTATTTGGAGC  
YVFSNRILVLA TGRNSPQRE RRFGLFGA  
TAGGTGAAGTCTAACAGCTTGTGCTTGGTACTTGGACTTAGGAATCTCCACAGAGAGAAAAGAAGGGGACTTTTGGAGC  
TATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTATAGTGGTGGTATGGGTACCACCATAGCAACGAGCAGGGGA  
IAGFEIGGWQGMVDGWYGHHSNEDQ  
TATTGCTGGATTCAITGAGGGAGGATGGGAGGGAATGGTGGATGGTACGGATACCATCACTCTAADGAGCAGGAT  
GTGGGTACGCTGCAGACAAAAGTCCACTCAAAAGGCAATAGATGGAGTACCAATAAGGTCAACTCGATTATTGACAAA  
EGYAADKESTQKATDGV T N K V N S I I D K  
CTGGATATGCTGCTGATAAGGAATCTACTCAGAAAGCTATTGATGGTGTACTAACAGGTGAAGTCTATTATTGATAAG  
ATGAACACTCAGTTTGAAGCCGTTGGAAGGGAATTAACAACCTTAGAAAGGAGAATAGAGAATTTAAACAAGAAGATGGA  
MNTQFEAVGREFN NLEPFIENLNK KME  
ATGAACACTCAGTTTGAAGCTGTTGGAAGAGAGTTCACAACCTTCAGAGAAGGATTGAGAACCTTAACAGAAAATGGA  
AGACGGGTTCTAGATGCTGAGACTTATAATGCTGAAGTCTAGTCTCATGAAAACGAGAGAAGTCTAGACTTTCATG  
DGF LDVW TYN A E L L V L M E N E R T L D F H  
AGATGGATTCTTGTGATGCTGAGCTTACAACGCTGAGTGGTGTGCTTATGGAACGAGAGGACTCTTCAATTCCAGC  
ACTCAAATGTCAAGAAGCTTTACGACAAGGTCGACTACAGCTTAGGGATAATGCAAAGGAGCTGGGTAACGGTGTGTTTC  
FSHVFNLYDFVRLQLRDHAFELGNGLF  
ATTGTAACCTCAACAAGCTTTACGATAAAGTGAAGCTTACGCTTAGGGATAACGCTAAAGAGCTTGGAAACGGTGTGCTTC  
GAGTCTATCATAAATGTGATAATGAATGATGGAAGTGTAAAGAAACGGAACGATGACTACCCGCAGTATTGAGAAGA  
YFVHFQBNECMESYRS GTYDYFQYSEF  
GAGTCTACCAACAAGTGGGATAACGAGTGCATGGAATCTGTGAGATCTGGAAGTACAGATTACCCACAGTACTTGAAGA

```

AGCAAGACTAAAAAGAGAGAAATAAGTGGAGTAAAATTGGAATCAATAGGAATTTACCAAATATTGTCAATTTATTCTA
          P E L A T V F L E S I G I Y Q I L S I Y S T Q M
          S I R I L I A A H A I K I R A C A G A T T T T G G T T T A A A T T G G A G T C T A T T G G T A T T T A C C A G A T T C T T T C T A T T T A C T C T A
CAGTGGCGAGCTCCCTAGCACTGGCAATCATGGTAGCTGGTCTATCCTTATGGATGTGCTCCAATGGGCGTTACAATGC
          T V E S S L A L A T M V A G L S L W M C S N G S L Q C
          C T G T G G C T T A T T C T T G C T C T G C T A T T A T G G T G G T G G A C T T T C T C T T G G A T G T G C T C T A A C G G A T C T C T C A G T G C
AGAATTTGCATTTAA
          P E L A T V F L E S I G I Y Q I L S I Y S T Q M
          S I R I L I A A H A I K I R A C A G A T T T T G G T T T A A A T T G G A G T C T A T T G G T A T T T A C C A G A T T C T T T C T A T T T A C T C T A
    
```

**Hình 1.** Trình tự gen HA của chủng virus A/Hatay/2004/(H5N1) (AJ867074), trình tự amino acid và trình tự gen HA đã được thay đổi mã bộ ba (HAop)

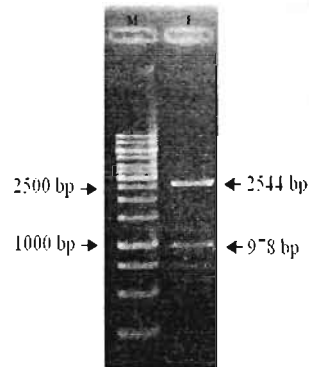
**Thiết kế vector tái tổ hợp chứa cấu trúc gen HA1**

Dựa trên trình tự gen HAop, cặp môi đặc hiệu *HA1\_SacI\_F/HA1\_HindIII\_R* được thiết kế có trình tự như sau:

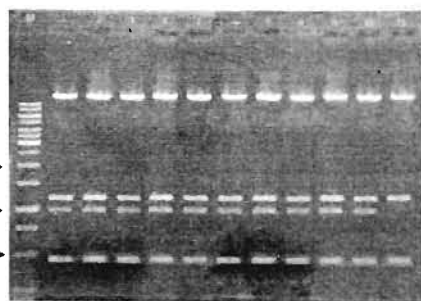
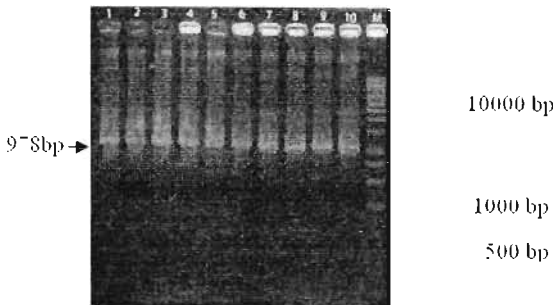
F: GGGGAGCTCGATCAGATCTGCATTGGAT  
 R: GGAAGCTTTTACCTTCTTTCTCTCTGTGG

Các nucleotid in đậm là trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *SacI* và *HindIII*, các nucleotid in thường là trình tự tương đồng với gen HAop. Gen HA1 được nhân bằng cặp môi đặc hiệu *HA1\_SacI\_F/HA1\_HindIII\_R*, sản phẩm PCR điện di có kích thước khoảng 978bp. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và xử lý cắt đồng thời bởi 2 enzyme *SacI/HindIII* và được nối vào vector pENTR221/cal Vector tái tổ hợp pENTR/cal/HA1 được kiểm tra bằng PCR và bằng phản ứng cắt bởi *SacI/HindIII* (Hình 2). Điện di sản phẩm cắt cho thấy 2 phân đoạn gen có kích thước khoảng 978bp và 2544 bp, tương ứng với kích thước của gen HA1 và vector pENTR221. Cấu trúc gen chứa HA1 và các gen mã hóa các peptide chức năng được chuyển vào vector pK7WG2D (1) bằng phản ứng LR Gateway. Kết quả kiểm tra vector tái

tổ hợp bằng PCR và cắt enzyme hạn chế *SacI/HindIII* cho thấy sản phẩm PCR với cặp môi đặc hiệu *HA1\_SacI\_F/HA1\_HindIII\_R* có kích thước khoảng 978 bp, sản phẩm cắt vector pK7WG2D/cal/HA1 bằng *SacI/HindIII* thu được 4 đoạn gen kích thước khoảng 434bp, 978 bp, 1201bp và 11159 bp kích thước này phù hợp với tính toán theo lý thuyết (Hình 3). Như vậy, cấu trúc gen HA1 đã được thiết kế thành công vào vector biểu hiện thực vật pK7WG2D. Dòng plasmid 1 được lựa chọn cho biến nạp vào *Agrobacterium* và tạo dòng rễ tơ chuyển gen.



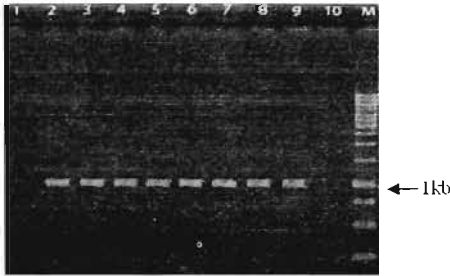
**Hình 2.** Cắt pENTR221/cal/HA1 bằng *SacI/HindIII*



**Hình 3.** Điện di kiểm tra vector tái tổ hợp pK7WG2D/cal/HA1 bằng PCR (A) và cắt bởi enzyme hạn chế *SacI/HindIII* (B). M: Thang chuẩn 1 Kb; Giếng 1 - 10: mẫu vector tái tổ hợp tách từ các dòng khuẩn lạc

**Biến nạp cấu trúc gen vi khuẩn *A.rhizogens***

Chúng tôi sử dụng 50-100 ng plasmid pK7WG2D/cal/HA1 để biến nạp vào tế bào khả biến *A.rhizogenes*. Sản phẩm của quá trình biến nạp được nuôi trên môi trường YMP chọn lọc có chứa 100 mg/L Spectinomycin, ủ đĩa ở 28°C. Sau 2 ngày, kết quả thu được một lượng lớn khuẩn lạc trên đĩa thạch. Để chọn ra những dòng khuẩn lạc như mong muốn (mang vector chuyển gen), chúng tôi đã tiến hành kiểm tra bằng phản ứng colony-PCR.



**Hình 4.** Kết quả clony-PCR bằng cặp mồi HA1\_SacI\_F và HA1\_Hind III\_R

M: *Thang marker DNA 1kb*;

Giếng 1 - 10: *Các dòng khuẩn lạc*

Chọn 10 dòng khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch để tiến hành phản ứng PCR colony bằng cặp mồi đặc hiệu trên gen: HA1\_Sac I \_ F và HA1\_Hind III\_R. Sản phẩm phản ứng được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Kết

quả thu được ở Hình 4 cho thấy có 8 trong 10 dòng khuẩn lạc được lựa chọn cho kết quả dương tính với phản ứng PCR với 1 băng duy nhất có kích thước 978bp (trừ dòng số 1 và 10 cho kết quả âm tính).

Với tỷ lệ như vậy, cho thấy đã biến nạp thành công vector pK7WG2D/cal/HA1 vào vi khuẩn *A. rhizogens*.

Như vậy, chúng tôi đã tạo được chủng *A.rhizogens ATCC15834* mang plasmid tái tổ hợp pK7WG2D/cal/HA1. Đây chính là nguồn nguyên liệu phục vụ cho mục đích biểu hiện gen ở thực vật phục vụ sản xuất vaccine qua đường miệng.

**KẾT LUẬN**

Bằng việc sử dụng nguồn gen HA của virus H5N1 phân lập ở Việt Nam, chúng tôi đã thiết kế thành công vector mang cấu trúc gen HA1 phù hợp biểu hiện ở thực vật.

**LỜI CẢM ƠN**

*Công trình được hoàn thành trong chương trình đào tạo Thạc sỹ của Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học. Nghiên cứu được tiến hành có sự dụng các trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và công nghệ Việt Nam.*

```
GATCAGATCT GCATTGGATA CCACGCTAAC AACTCTACTG AGCAAGTGGA TACAATTATG GAAAAGAACG
TGACTGTTAC TCACGCTCAG GATATTCTTG AAAAGACTCA CAACGGAAAG TTGTGCGCTC TTGATGGTGT
TAAGCCACTT ATTCTTAGGG ATTGCTCTGT TGCTGGATGG CTTCTTGGA ACCCAATGTG TGATGAGTTC
ATTAACGTGC CAGAGTGGTC TTATATTGTG GAGAAGGCTA ACCCAGTGAA CGATCTTTGC TACCCTGGTG
ATTTCAACGA TTACGAAGAG CTTAAGCACC TTCTTTCTAG GATTAACCAC TTCGAGAAGA TTCAGATTAT
TCCAAAGTCA TCTGGTCAT CTCACGAGGC TTCTCTTGA GTTCTTCTG CTTGCCATA CCAGGGAAAG
TCATCTTTCT TCAGGAACGT TGTTTGGCTT ATTAAGAAGA ACTCTACTTA CCCAACTATP AAGAGGTCTT
ACAACAACAC TAACCAGGAA GATCTTTTGG TTCTTTGGGG AATTCACCAC CCAAAATGATG CTGCTGAACA
GATTAAGTTG TACCAGAACC CAACTACTTA CATTCTGTG GGAACTTCTA CTCTTAACCA GAGGCTTGTG
CCAAGAATTG CTA CTACTAGGTC TAAGGTGAAC GGACAATCTG GAAGGATGGA ATTCTTCTGG ACTATCTTA
AGCCAAACGA TGCTATTAAC TTCGAGTCTA ACGGAAACTT CATTGCTCCA GAGTACGCTT ACAAGTTGGT
GAAGAAGGGT GATAGTACTA TTATGAAGTC TGAGCTTGAG TACGGAAACT GCAACACTAA GTGCCAAACT
CCAATGGGAG CTATTAACTC TTCTATGCCA TTCCACAACA TTCACCCACT TACTATTGGA GAGTGCCCAA
AGTACGTGAA GTCTAACAGG CTTGTGCTTG CTA CTACTGGACT TAGGAACTCT CCACAGAGAG AAAGAAGG
```

**Hình 5.** Trình tự cấu trúc gen HA1

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Alexander, D.J. (2007), Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002-2006. *Avian Dis*, 51(1 Suppl): 161-6.
- [2]. Basler, C. (2007), Influenza viruses: basic biology and potential drug targets, *Infect Disord Drug Targets*, 7(4): 282-93.
- [3]. Bosch, F., M. Orlich, H. Klenk, and R. Root (1979), The structure of the hemagglutinin: a determinant for the pathogenicity of Influenza virus, *Virology*, 95: 197-207.
- [4]. Britton, M.T., M.A. Escobar, and A.M. Dandekar (2008), The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* in *Agrobacterium*: From Biology to Biotechnology, T. Tzfira and V. Citovsky, Editors. Springer: New York, 524-65.
- [5]. Chen, H., G. Deng, Z. Li, G. Tian, Y. Li, and P. Jiao (2004), The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 10452-10457.
- [6]. Chen, L., C. Davis, H. Zhou, N. Cox, and R. Donis (2008), Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS Pathog*, 4(5): e1000072.
- [7]. Chilton, M.D., and e. al. (1982), *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells, *Nature*, 432-34.
- [8]. Christey and M.C. (2001), Use of Ri-mediated transformation for production of transgenic plants. In *Vitro Cell, Dev, Biol-Plant*, 687-700.
- [9]. De Wit, E. and R.A.M. Fouchier (2008), Emerging influenza, *J Clin Virol*, 41: 1-6.
- [10]. Doherty, P., S. Turner, R. Webby, and P. Thomas (2006), Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol*, 7(5): 449-55.
- [11]. Doran, P.M. (2000), Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol*, 11(2): 199-204.
- [12]. Drake PMW, Chargelegue DM, Vine ND, van Dolleweerd CJ, Obregon P, and M. JKC (2003), Rhizosecretion of a monoclonal antibody protein complex from transgenic tobacco roots. *Plant Molecular Biology*, 52(1): 233-241.
- [13]. Wu, W., Y. Chen, P. Wang, W. Song, S. Lau, J. Rayner, G. Smith, R. Webster, J. Peiris, T. Lin, N. Xia, Y. Guan, and H. Chen (2008), Antigenic profile of avian H5N1 viruses in Asia from 2002 to 2007. *J Virol*, 282(4):1798-17807.
- [14] Yamada, S., Y. Suzuki, T. Suzuki, M. Le, C. Nidom, Y. Sakai-Tagawa, Y. Muramoto, M. Ito, M. Kiso, T. Horimoto, KShinya, T. Sawada, M. Kiso, T. Usui, T. Murata, Y. Lin, A. Hay, L. Haire, D. Stevens, R. Russell, S. Gamblin, J. Skehel, and Y. Kawaoka (2006), Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature*, 444(7117): 378-382.
- [15]. Zhao, Z., K. Shorridge, M.G. M, Y. Guan, and X. Wan (2008), Genotypic diversity of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *J Gen Virol*, 89(9): 2182-2193.
- [16]. Zhou, H., M. Jin, Z. Yu, X. Xu, Y. Peng, H. Wu, J. Liu, H. Liu, S. Cao, and H. Chen (2007), Effective small interfering RNAs targeting matrix and nucleocapsid protein gene inhibit influenza A virus replication in cells and mice. *Antiviral Res*, 76(2): 186-93.

## SUMMARY

**VECTOR CONSTRUCTION TO EXPRESS THE ENFLUENZA A/H5N1 SURFACE ANTIGENS IN PLANT**

Nguyen Huy Hoang<sup>1\*</sup>, Pham Bich Ngoc<sup>2</sup>, Chu Hoang Ha<sup>2</sup>, Chu Hoang Mau<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University, <sup>2</sup>Institute of Biotechnology, VAST

H5N1 is a subtype of influenza A, commonly called avian flu or bird flu. H5N1 is highly transmissible between birds and so may cause globally poultry pandemic that ruins the poultry industry. Moreover, it may also affect human health by directly contact with infected poultry. Like all other influenza A subtypes, the H5N1 subtype is an RNA virus. It has a segmented genome of eight negative sense, single-strands of RNA, code for 8 proteins. Among those, HA, NA and M proteins are most medically relevant as targets for antiviral drugs and antibodies. To prevent the viral infection, the most common method is vaccination. Currently, there have been many flu A vaccines available. However, plant-based oral vaccine is targeted by many researchers around the world because this subunit vaccine can be eaten, easy to administer and more effective than other injection vaccines. In this study, we present the results of vector construction to express the enfluenza A/H5N1 surface antigens in plant.

**Key words:** *Avian influenza, gene expression, H5N1 virus, plant vaccine, RNA.*

\* Tel: 0915 456024. Email: huyhoangyt@gmail.com