

NHÂN ĐỒNG VÀ BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN VP28 CỦA VIRUS ĐÓM TRẮNG TRÊN LỚP ÁO NGOÀI CỦA BÀO TỬ *Bacillus subtilis*

Phạm Kiên Cường¹, Bùi Thị Ngọc Ánh¹, Trần Thị Thanh Quỳnh¹, Nguyễn Thị Vân Anh¹, Bùi Thị Việt Hà^{1,2}, Phạm Thị Lương Hằng^{1,2}, Nguyễn Thị Hồng Loan^{1,2}, Nguyễn Hòa An³, Phan Tuấn Nghĩa^{1,2}

¹Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội

³Công ty ANABIO Research & Development JSC

Ngày nhận bài: 14.4.2014

Ngày nhận đăng: 18.6.2014

TÓM TẮT

Virus hội chứng đốm trắng (WSSV) là loại virus gây bệnh nghiêm trọng và phổ biến nhất ở tôm nuôi. Cho đến nay chưa có giải pháp hiệu quả để ngăn ngừa sự tấn công của loại virus này ở tôm. Có trên 35 protein khác nhau trên vỏ của WSSV đã được phát hiện, trong đó VP26 và VP28 là hai protein chủ yếu, chiếm tới khoảng 60% tổng số protein bề mặt. VP28 của WSSV đóng vai trò quan trọng trong quá trình virus gắn bám, xâm nhập tế bào tôm, có tính kháng nguyên cao và có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch ở tôm. Chính vì vậy, VP28 được xem là một protein đích để phát triển các kit phát hiện WSSV cũng như tạo vaccine phòng ngừa bệnh virus đốm trắng. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa cho VP28 đã được nhân bản bằng PCR và nhân dòng vào vector pDG364-cotB để tạo ra vector tái tổ hợp pDG364-cotB-VP28. Tiếp theo, gen *cotB-vp28* từ vector pDG364-cotB-VP28 được cài thành công vào nhiễm sắc thể của *B. subtilis* chủng PY79 tạo nên dạng tái tổ hợp *B. subtilis* CotB-VP28, với gen tổng hợp amylase bị phá hủy. Các khuẩn lạc thu được mất khả năng thủy phân tinh bột, kết quả phân tích thẩm tách miễn dịch sử dụng kháng thể kháng VP28 cho thấy sự có mặt của bằng protein dung hợp 63 kDa trong dịch chiết của bào tử *B. subtilis* CotB-VP28, chứng tỏ VP28 đã được biểu hiện ở vi khuẩn này. Sự biểu hiện của CotB-VP28 trên bề mặt của bào tử *B. subtilis* cotB-VP28 đã được kiểm tra bằng phương pháp miễn dịch huỳnh quang. Việc nâng cao mức biểu hiện của VP28 và đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch và phòng ngừa bệnh ở tôm đang được tiếp tục trên khía:

Từ khóa: Virus đốm trắng (WSSV), VP28, Bào tử *B. subtilis*

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, vi khuẩn Gram dương *B. subtilis* được sử dụng trong nhiều nghiên cứu như một trong những mô hình của hệ thống nhân sơ. Đặc tính nổi bật của vi sinh vật này là khả năng tạo ra các bào tử trong chu trình phát triển của chúng khi điều kiện môi trường trở nên khắc nghiệt. Bào tử là các dạng sống bị bất hoạt khả năng trao đổi chất nên chúng có khả năng chịu được nhiệt độ cao (thậm chí đến 90°C), hóa chất độc hại và tồn tại vô thời hạn trong trạng thái khô. Do đó, hệ thống biểu hiện trên bào tử có những lợi thế đáng kể hơn so với trên các tế bào vi khuẩn. Sự bền vững của bào tử cho phép dễ dàng bảo quản chúng ở dạng sấy khô, an toàn, thuận tiện cho việc áp dụng về sau.

Có 25 loại protein khác nhau đã được xác định trên hai lớp áo bào tử khác nhau (lớp áo trong và lớp áo ngoài) của bào tử *B. subtilis*. Lớp áo ngoài của

bào tử là nơi tập trung của 5 loại polypeptide chính là CotA (65 kDa), CotB (59 kDa), CotG (24 kDa), CotC (11 kDa) và CotF (8 kDa) (Ricca, Cutting, 2003). Trong số những loại protein đã được xác định ở lớp áo bào tử, CotB và CotC thường được lựa chọn làm protein dung hợp để biểu hiện protein ngoại lai trên lớp áo ngoài của bào tử *B. subtilis* (Douce *et al.*, 1995; Helting, Zwisler, 1977; Isticato *et al.*, 2001).

Virus đốm trắng (WSSV) được phát hiện lần đầu tiên ở Đài Loan vào năm 1992 và sau đó nhanh chóng được biết đến là một tác nhân gây bệnh nghiêm trọng và phổ biến ở tôm nuôi (Escobedo *et al.*, 2005; Sanchez-Martinez *et al.*, 2007). Virus đốm trắng thuộc họ *Nimaviridae* và chi *Whispovirus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/>). Cho đến nay, rất nhiều gen bao gồm các gen mã hóa cho các protein cấu trúc như VP15, VP19, VP26, VP28, VP35 và các gen mã hóa cho ribonucleotide reductase, endonuclease, protein kinase... của

WSSV được phân lập từ các chủng WSSV ở nhiều nước khác nhau trên thế giới (Chen *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2001; van Hulten *et al.*, 2000a,b; Wang *et al.*, 2008; Witteveldt *et al.*, 2001).

VP28 là một loại protein vỏ chính của WSSV, đóng vai trò chủ đạo giúp virus gắn đặc hiệu lên tế bào tôm, là bước khởi đầu cho quá trình lây nhiễm. Protein VP28 được mã hóa bởi gen WSV421 và có khối lượng phân tử khoảng 27,5 kDa. Những nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng VP28 liên quan trực tiếp tới lây truyền hệ thống của tôm bởi WSSV (van Hulten *et al.*, 2000b). Hơn nữa, một số bằng chứng cho thấy rằng VP28 giữ vai trò quan trọng trong quá trình lây nhiễm, giúp cho virus bám vào tế bào tôm và xâm nhập vào bên trong tế bào chất (Yi *et al.*, 2004), có thể là thông qua một số vị trí gắn gốc đường (Tsai *et al.*, 2004). Chính vì vậy, VP28 là protein được lựa chọn để tạo kháng thể chẩn đoán WSSV cũng như tạo vaccine cho tôm phòng bệnh đốm trắng (Rout *et al.*, 2007; Witteveldt *et al.*, 2001). Đã có một số báo cáo về nghiên cứu tạo vaccine tái tổ hợp phòng ngừa WSSV sử dụng protein VP28 làm kháng nguyên, tuy vậy, các kết quả thu được chỉ mang tính khởi đầu (Rout *et al.*, 2007; Witteveldt *et al.*, 2001). Vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã nhân dòng gen mã hóa cho protein VP28 và biểu hiện dưới dạng protein dung hợp CotB-VP28 trên bề mặt bào tử *B. subtilis* nhằm hướng đến việc sử dụng chúng như một vaccine phòng bệnh virus đốm trắng ở tôm trong các nghiên cứu tiếp theo.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chúng vi khuẩn *B. subtilis* PY79 (spo+) và vector pDG364-cotB là quà tặng của Giáo sư Simon Cutting, Đại học Hoàng Gia Holloway London. Chúng *E. coli* DH5a được mua từ hãng Invitrogen.

Hỗn hợp dNTP, thang chuẩn DNA được mua từ hãng Fermentas; Taq DNA polymerase, enzyme giới hạn được mua từ hãng Enzymomics, T4 DNA ligase của hãng Promega, bộ kit tinh sạch plasmid của hãng Bioneer và kit đọc trình tự của hãng Beckman Coulter. Các hóa chất còn lại đều đạt độ tinh sạch dành cho phân tích và được mua từ các hãng tin cậy (Sigma, Merck...).

Phương pháp

Tạo đoạn gen dung hợp

Gen mã hóa cho VP28 được nhân bản trực tiếp bằng phương pháp PCR sử dụng plasmid tái tổ hợp pGEMT-VP28 đã được tạo trong nghiên cứu trước đây (Pham *et al.*, 2012). Đoạn mã được sử dụng trong phản ứng PCR này có chứa trình tự nhận biết của enzyme *Hind*III (mũi VP28Fw: 5'-CCCAAGCTTGTACTCTTTCTTCTACTC-3') và *Eco*RI (mũi VP28Rv: 5'-AAAGAATTCTTACTCGGTCTCAGTG-3')

PCR chứa 1xTaq polymerase buffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, and 2,5 đơn vị Taq polymerase với tổng thể tích cuối là 25 µl. Quá trình nhân bản được tiến hành bởi máy GeneAmp PCR System 9700 với 1 vòng ở 95°C trong 5 phút để khởi động nóng, tiếp theo là 35 chu kì gồm 1 phút ở 95°C, 1 phút ở 59°C, và 30 giây ở 72°C, tiếp theo là kéo dài ở 72°C trong 7 phút và bảo quản ở 4°C cho đến khi sử dụng.

DNA được tinh sạch từ sản phẩm PCR và plasmid pDG364 cotB được cắt đồng thời bằng enzyme giới hạn *Hind*III và *Eco*RI, tạo ra các đầu dính tương ứng. Sau đó, gen *vp28* được gắn vào plasmid pDG364-cotB bằng T4 DNA ligase để tạo thành plasmid tái tổ hợp pDG364 cotB-*vp28* và biến nạp vào *E. coli* DH5a. Các khuẩn lạc dương tính mang vector tái tổ hợp được phát hiện bằng phương pháp PCR sử dụng trực tiếp khuẩn lạc làm nguồn cho DNA khuôn với cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen *cotB* và cặp mồi đặc hiệu cho đoạn gen *vp28*. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Các plasmid tái tổ hợp được tạo dạng mạch thẳng bằng enzyme *Xho*I và biến nạp vào tế bào khả biến *B. subtilis* PY79. Các dòng *B. subtilis* tái tổ hợp kháng chloramphenicol (Cm^R) được tạo ra thông qua quá trình trao đổi chéo kép tương đồng, tại vùng gen *amyE* ở nhiễm sắc thể của *B. subtilis*, vì vậy làm mất khả năng tổng hợp amylase của nó. Sự có mặt của gen *cotB-vp28* được chứng minh bằng việc mất đi hoạt tính phân hủy amylase ở những chủng tái tổ hợp khi kiểm tra trên môi trường LB chứa 1% tinh bột và nhuộm iodine. Chúng tái tổ hợp tạo ra được ký hiệu là *B. subtilis* CotB-VP28.

Chuẩn bị bào tử và chiết protein lớp áo bào tử

Quá trình tạo bào tử của 2 chủng *B. subtilis* PY79 và *B. subtilis* CotB-VP28 được tiến hành trong môi trường tạo bào tử DSM (Difco - sporulation media) ở 37°C sử dụng phương pháp làm cạn kiệt Dịch bào tử được thu sau 60 giờ nuôi cấy. Quá trình tinh sạch bào tử được tiến hành theo như quy trình mô tả bởi Harwood, Cutting (1990) sử dụng

lysozyme để phá tế bào mẹ mang bào tử, sau đó rửa trong NaCl 1M, KCl 1M và nước. Protein lớp áo bào tử được tách chiết từ dịch chứa khoảng 1×10^9 bào tử sử dụng 40 μ l đệm chiết có chứa SDS1% - DTT 50mM.

Điện di trên gel polyacrylamide có SDS và phân tích thâm tách miễn dịch

Sự có mặt của protein CotB-VP28 (khối lượng phân tử khoảng 63 kDa) trong dịch chiết bào tử *B. subtilis* CotB-VP28 được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12% có SDS theo phương pháp của Laemmly (1970) và thâm tách miễn dịch sử dụng kháng thể sơ cấp là kháng thể đa dòng kháng VP28 (gây trên thỏ) và kháng thể thứ cấp là kháng thể kháng IgG của thỏ có gắn phosphatase kiềm với cơ chất p-nitro blue tetrazolium chloride 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP).

Phân tích miễn dịch huỳnh quang

Khoảng 4×10^7 bào tử PY79 và CotB-VP28 trong đệm PBS IX, pH 7.4 được nhỏ trên phiến thủy tinh (coverlip) đã được cố định bởi poly-D-lysine 100 kDa với nồng độ 1 mg/ml. Dung dịch trên được ủ trong 15 phút ở 37°C, sau đó phiến mẫu được rửa 3 lần trong PBS (pH 7.4), được ủ tiếp 1 giờ ở nhiệt độ phòng với kháng thể sơ cấp của thỏ kháng VP28

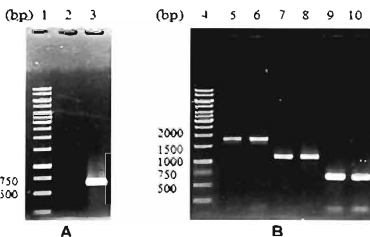
(pha loãng 1: 2000 trong BSA 3%). Sau đó, phiến mẫu được rửa 3 lần và ủ với kháng thể thứ cấp kháng thỏ có gắn Alexa546 (pha loãng 1:4000) trong 45 phút ở nhiệt độ phòng, trong tối. Sau khi rửa 3 lần, phiến mẫu được đặt trên lamena, được cố định bằng dung dịch Paraflores (Beckman Coulter) và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang LS-5 (Carl-Zeiss).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân dòng đoạn gen dung hợp cotB-*vp28* vào hệ gen của *B. subtilis*

Đoạn gen mã hóa VP28 được nhân bản bằng PCR sử dụng plasmid pGEMT-VP28 làm khuôn. Kết quả thu được (Hình 1A) cho thấy sự có mặt băng DNA nhân bản kích thước khoảng 615 bp, tương ứng với kích thước của đoạn gen *vp28* (đường chạy 3), chứng tỏ chúng tôi đã nhân bản thành công đoạn gen *vp28*.

Đoạn gen *vp28* sau đó được nhân dòng vào vector pDG36-cotB và biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α . Các khuẩn lạc được lựa chọn ngẫu nhiên để làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi 364Fw và 364Rv để kiểm tra sự có mặt của gen dung hợp *cotB-*vp28** ở mỗi khuẩn lạc.



Hình 1. Nhân dòng gen *vp28* vào plasmid pDG364cotB. A Điện di sản phẩm PCR nhân bản gen *vp28* từ hệ gen của WSSV trên gel agarose 1% . 1: Thang chuẩn DNA 1kb, 2 Sản phẩm PCR từ đối chứng âm (không có DNA); 3 Sản phẩm PCR sử dụng pGEMT-*vp28* làm khuôn; B Điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc dương tính chứa cấu trúc pDG364-cotB-*vp28* sử dụng hệ thống các mồi khác nhau. 4: Thang chuẩn DNA 1kb; 5,6: Sản phẩm PCR với mồi đặc hiệu cho plasmid pDG364; 7,8. Sản phẩm PCR với mồi đặc hiệu cho *cotB*, 9 10: Sản phẩm PCR với mồi đặc hiệu cho *vp28*

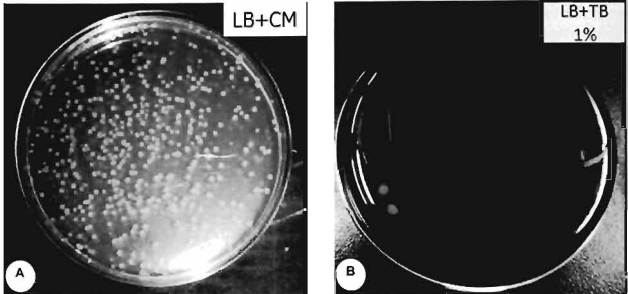
Kết quả thu được (Hình 1B) cho thấy sự có mặt của các băng ADN kích thước khoảng 1,9 kb (ở đường chạy 4 và 5), tương ứng với tổng kích thước của gen *vp28* và *cotB* cộng với đoạn gen

của vector giữa hai vị trí gắn mồi, chứng tỏ plasmid đã chứa đoạn gen mong muốn hay gen *vp28* đã được nhân dòng thành công vào vector pDG364 *cotB*. Việc gắn đoạn gen *vp28* vào vector

pDG364-cotB dùng vị trí và khung đọc được khẳng định bằng cách xác định trình tự nucleotide (dẫn liệu không trình bày). Vector tái tổ hợp mới được ký hiệu pDG364-cotB-vp28.

Vector pDG364-cotB-vp28 sau đó được tạo mạch thẳng và chèn trình tự cotB-vp28 vào vị trí gen *amyE* back và *amyE* front trên nhiễm sắc thể của *B. subtilis* PY79 để tạo chủng *B. subtilis* tái tổ hợp CotB-VP28 có

khả năng kháng chloramphenicol (CM). Các khuẩn lạc được hình thành từ chủng tái tổ hợp được sàng lọc thông qua khả năng phân giải cơ chất của amylase trên môi trường LB có bổ sung 1% tinh bột. Kết quả thu được (Hình 2) cho thấy có một vòng phân hủy tinh bột rõ rệt quan sát được ở chủng chuẩn PY79 trong khi đó không có vòng phân hủy tinh bột nào xuất hiện quanh khuẩn lạc *B. subtilis* CotB-VP28.



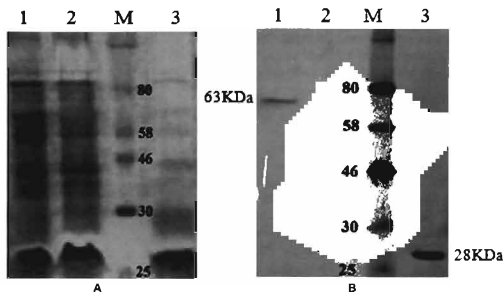
Hình 2. Kiểm tra sự có mặt của gen dung hợp trong ADN hệ gen *Bacillus subtilis*. A. Đĩa thạch LB chứa các khuẩn lạc *B. subtilis* mọc được trên môi trường có kháng sinh CM; B. Khuẩn lạc lựa chọn từ Đĩa (A) được cấy chuyển sang đĩa LB+ tinh bột 1%, để kiểm tra vòng phân giải tinh bột+ 1-30 các khuẩn lạc kiểm tra 1-30. + ĐC(-): *B. subtilis* PY 79 dạng ban đầu không chứa đoạn gen dung hợp.

Biểu hiện của protein dung hợp CotB-VP28 ở bào tử *B. subtilis*

Để khẳng định CotB-VP28 có thực sự biểu hiện trên bề mặt bào tử hay không, dịch chiết sinh khối bào tử *B. subtilis* PY79 và của chủng tái tổ hợp đã được cho kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamide 12% có chứa SDS và thẩm tách miễn dịch. Kết quả điện di protein (Hình 3A) cho thấy phổ băng protein của hai loại dịch chiết bào tử không có sự khác biệt rõ rệt. Tuy nhiên, kết quả phân tích thẩm tách miễn dịch, sử dụng kháng thể đa dòng kháng VP28 (Hình 3B) cho thấy dịch chiết bào tử chủng CotB-VP28 có sự xuất hiện của một băng protein khoảng 63 kDa được nhận ra bởi kháng thể kháng VP28 (Hình 3, đường chạy 1). Băng protein này có kích thước tương ứng với kích thước tổng số của 2 protein thành phần là CotB (35 kDa) và VP28 (28 kDa) theo tính toán lý thuyết. Ở mẫu đối chứng, chủng chuẩn PY79, không có sự xuất hiện của băng

protein nào có kích thước tương ứng. Điều này chứng tỏ có sự biểu hiện của cấu trúc gen tái tổ hợp *cotb-vp28*.

Để khẳng định CotB-VP28 có thực sự biểu hiện trên bề mặt bào tử hay không, chúng tôi đã dùng phương pháp miễn dịch huỳnh quang sử dụng kháng thể đa dòng kháng VP28 (gây trên thỏ) và kháng thể kháng thỏ có gắn Alexa 546. Kết quả miễn dịch huỳnh quang (Hình 4) cho thấy dưới ánh sáng trắng các bào tử kiểm tra PY79 hay tái tổ hợp đều không phát huỳnh quang. Khi có ánh sáng kích thích (543 nm) các bào tử *B. subtilis* CotB-VP28 tái tổ hợp phát huỳnh quang màu đỏ rất rõ nét, trong khi đó các bào tử PY79 chỉ có tín hiệu huỳnh quang yếu (tín hiệu nền do tương tác không đặc hiệu của kháng nguyên-kháng thể). Kết quả thu được khẳng định sự có mặt của VP28 trên bề mặt của bào tử tái tổ hợp *B. subtilis* CotB-VP28.

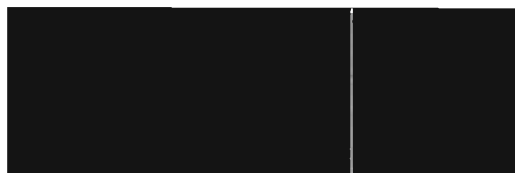


Hình 3. Điện di gel polyacrylamide có SDS A: và thẩm tách miễn dịch kiểm tra sự biểu hiện của CotB-VP28 ở bào tử *B. subtilis* CotB-VP28. B M: Thang chuẩn protein, 1 dịch chiết bào tử CotB-VP28, 2 dịch chiết PY79, 3. protein đối chứng dương VP28. Biểu hiện của protein dung hợp CotB-VP28 trên bề mặt bào tử *B. Subtilis*

Ảnh sáng huỳnh quang
Alexa (543nm)

Ảnh sáng trắng

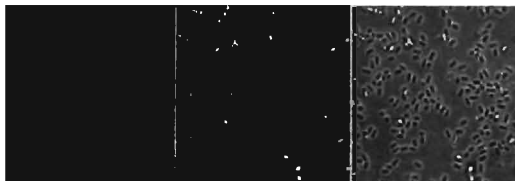
Kết hợp



A1

A2

A3



B1

B2

B3

Hình 4. Biểu hiện của protein dung hợp CotB-VP28 trên bề mặt bào tử *B. subtilis* CotB-VP28, dưới kính hiển vi huỳnh quang sử dụng kháng thể sắc ập kháng VP28 và kháng thể thứ cấp gắn Alexa 546 A: Bào tử chủng chuẩn PY79, B: Bào tử CotB-VP28.

Ở Việt Nam, (Phan et al., 2003) đã tạo dòng và biểu hiện thành công VP28 của WSSV ở *E. coli* và tinh sạch được protein này. Tuy nhiên, mục đích của nghiên cứu là sử dụng protein VP28 để sản xuất kháng thể đơn dòng phục vụ việc chẩn đoán sự có mặt của WSSV.

Theo hướng nghiên cứu tương tự như công trình của chúng tôi, một số nghiên cứu trước đây (Fu et al., 2010; Ning et al., 2011) cũng đã tạo được chủng vi khuẩn *B. subtilis* tái tổ hợp biểu hiện gen mã hóa cho protein VP28 của WSSV. Mặc dầu, mức độ biểu hiện của protein VP28 khi được kiểm tra bằng điện di gel polyacrylamide là không thật rõ rệt, nhưng các kết quả thử nghiệm ban đầu khẳng định chế phẩm tạo ra có khả năng giúp tôm kháng lại sự tấn công của virus đốm trắng. Nghiên cứu của chúng tôi khẳng định sự biểu hiện thành công của VP28 trên bề mặt bào tử *B. subtilis*, tuy vậy, mức độ biểu hiện của VP28 còn khá thấp, chúng tôi đang triển khai một số cách thức để nâng cao mức độ biểu hiện của gen cũng như đánh giá khả năng đáp ứng miễn dịch và phòng ngừa bệnh ở tôm chống lại virus đốm trắng.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nhân dòng thành công đoạn DNA 615 bp của gen mã hóa cho VP28 của virus gây bệnh đốm trắng vào plasmid pDG364 cotB, tạo thành dạng pDG364 cotB-VP28 và dung hợp được đoạn gen CotB-VP28 vào hệ gen của *B. subtilis*. Sự biểu hiện của protein dung hợp CotB-VP28 trên bề mặt bào tử *B. subtilis* chủng PY79 đã được kiểm tra bằng phương pháp thẩm tách miễn dịch và miễn dịch huỳnh quang.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hiện trong khuôn khổ Đề tài mã số KC 04-09/11-15 do Bộ Khoa học Công nghệ cấp kinh phí. Các tác giả chân thành cảm ơn GS. Simon Cutting và TS. Huỳnh Anh Hồng, Đại học Hoàng Gia Holloway London đã hỗ trợ kỹ thuật biểu hiện gen trên bề mặt bào tử *B. subtilis* và cung cấp chủng *B. subtilis* PY79.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chen LL, Liu JH, Huang CJ, Chou CM, Chen SM, Wang CH (2002) Identification of a nucleocapsid protein (VP35) gene of shrimp white spot syndrome virus and characterization of the motif important for targeting VP35 to the nuclei of transfected insect cells. *Virology* 293:44-53.

Phạm Kiên Cường, Bùi Thu Thủy, Nguyễn Việt Dũng, Bùi Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Văn Anh, Simon Cutting, Phan Tuấn Nghĩa (2012) Polymorphism analysis of capsid

protein VP28 encoding gene of white spot syndrome virus isolated from *Penaeus monodon* shrimp in Vietnam, *VNU J Sci* 28: 88-95

Douce G, Turcotte C, Cropley I, Roberts M, Pizzi M., Domenghini M, Rappuoli R, Dougan G (1995) Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:1644-1648

Escobedo-Bonilla CM., Wille M., Alday-Sanz V, Sorgeloos P, Pensaert MB, Nauwynck HJ (2005) *In vivo* titration of white spot syndrome virus (WSSV) in SPF Litopenaeus vannamei by intramuscular and oral routes. *Dis Aquat Org* 66: 63-170.

Fu LL, Shuai JB, Xu ZR, Li JR, Li WF (2010) Immune responses of *Fenneropenaeus chinensis* against white spot syndrome virus after oral delivery of VP28 using *B. subtilis* as vehicles. *Fish Shellfish Immunol* 28: 49-55.

Harwood CR & Cutting SM (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus* Chichester, England., John Wiley & Sons Ltd. Chichester United Kingdom P: 27-74

Helling TB, Zwisler O (1977) Structure of tetanus toxin I Breakdown of the toxin molecule and discrimination between polypeptide fragments. *J Biol Chem* 252: 194-198.

Isticato R, Cangiano G, Tran HT, Ciabattini A, Medagliani D, Oggioni MR, Felice MD, Pozzi G, Ricca E (2001) Surface display of recombinant protein on *Bacillus subtilis* spore. *J Bacteriol* 183: 6294-6301.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Liu WJ, Yu HT, Peng SE, Chang YS, Pien HW, Lun CJ (2001) Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of a shrimp white spot syndrome virus gene that encodes a protein kinase. *Virology* 289: 362-377.

Ning D, Leng X, Li Q, Xu X (2011) Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. *J Appl Microbiol* 111: 1327-1336.

Phan Thị Phương Trang, Phạm Hồng Ánh, Nguyễn Đức Hoàng, Trần Linh Thuộc (2003) Sử dụng vector pQE 30 để biểu hiện và tinh chế protein vỏ virus gây hội chứng đốm trắng trên tôm sú. *J Biotechnol* 1: 299-307.

Ricca E & Cutting SM (2003) Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology. *J Nanobiotechnol* 1: 1-6.

Rout N, Kumar S, Jaganmohan S, Murugan V (2007) DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine* 15: 2778-86

Sanchez-Martinez JG, Aguirre-Guzman G, Mejia-Ruiz H (2007) White spot syndrome virus in cultured shrimp: A review. *Aquac Res* 38, 1339-1354.

Tsai JM, Wang HC, Lwu JH, Hsiao HH, Wang AHJ, Kou GH, Lo CF (2004) Genomic and proteomic analysis of thirty-nine structural proteins of shrimp white spot syndrome virus, *J Virol* 78:11360-11370.

Van Hulst MC, Westenberg M, Goodall SD, Vlaskovics JM (2000a) Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266: 227-236.

Van Hulst MC, Goldbach RW, Vlaskovics JM (2000b) Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J Gen Virol* 81: 2525-2529.

Van Hulst MC, Witteveldt J, Peters S, Kloosterboer N, Tarchini R, Fiers M, Sandbrink H, Lankhorst RK, Vlaskovics JM (2001) The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology* 286: 7-22.

Wang Y, Zhang X, Yuan L, Xu T, Rao Y, Li J, Dai H (2008) Generation of recombinant monoclonal antibodies to study structure-function of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus from shrimp. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 902-906.

Witteveldt J, Van Hulst MC, Vlaskovics JM (2001) Identification and phylogeny of a non-specific endonuclease gene of white spot syndrome virus of shrimp. *Virus Genes* 23: 331-337.

Witteveldt J, Cifuentes CC, Vlaskovics JM, van Hulst MCW (2004) Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol* 78: 2057-2061.

Yi G, Wang Z, Qi Y, Yao L, Qian J, Hu L (2004) VP28 of shrimp white spot syndrome virus is involved in the attachment and penetration into shrimp cells. *J Biochem Mol Biol* 37: 726-34

CLONING AND EXPRESSION OF VP28 ANTIGEN ENCODING GENE OF WHITE SPOT SYNDROME VIRUS ON OUTER COAT OF *Bacillus subtilis* SPORES

Pham Kien Cuong¹, Bui Thi Ngoc Anh¹, Tran Thi Thanh Quynh¹, Nguyen Thi Van Anh¹, Bui Thi Viet Ha^{1,2}, Pham Thi Luong Hang^{1,2}, Nguyen Thi Hong Loan^{1,2}, Nguyen Hoa Anh³, Phan Tuan Nghia^{1,2,*}

¹Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology

²Faculty of Biology, VNU University of Science and Technology

³ANABIO Research & Development JSC

SUMMARY

White spot disease caused by white spot syndrome virus (WSSV) leads to a devastating loss in shrimp farming. Up to date there is no effective way to prevent the attack by WSSV to shrimps. The WSSV viral envelop consists of at least 35 different proteins, of which VP28 and VP26 are the most abundant, accounting for approximately 60% of the envelope. The WSSV envelope protein VP28 has been found to play a key role in viral attachment and penetration into shrimp cells. This protein is highly antigenic and can stimulate the immune response in shrimps and that is why this envelop protein has been used as target protein in WSSV diagnostics and vaccine production to protect shrimps against the WSSV. In this study, VP28 encoding gene was amplified by PCR and cloned into pDG364-cotB vector to form a recombinant construct pDG364-cotB-VP28. The targeted gene *cotB-vp28* from pDG364-cotB-VP28 was then successfully integrated into the chromosome of *B. subtilis* PY79 in the form of CotB-VP28, disrupting the amylase encoding gene of the host. The obtained colonies lost their starch hydrolyzing activity and the Western blotting analysis data showed the presence of 63 kDa protein band using polyclonal antibodies against VP28. These results confirmed the successful expression of CotB-VP28 on the recombinant *Bacillus subtilis* spores. The expression of CotB-VP28 on the spore surface was also detected by immunofluorescence analysis. The improvement of VP28 expression and evaluation of immune response and protection of shrimps by the recombinant *Bacillus subtilis* spores against WSSV are in progress.

Keywords: White Spot Syndrome Virus, *B. subtilis* Spore, VP28

* Author for correspondence: E-mail: phantuannghia@vnu.edu.vn