

TẠO CHỦNG VI TẢO *Chlamydomonas reinhardtii* TÁI TỔ HỢP MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN VP28 CỦA VIRUS GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG TRÊN TÔM

Nguyễn Minh Hường¹, Hà Thị Thu¹, Nguyễn Thị Hoa¹,
Đình Duy Kháng¹, Đặng Diễm Hồng¹, Aidyn Mouradov³, Đồng Văn Quyền^{1,2*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

²Đại học Khoa học & Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³School of Science, Bundoora West Campus, Plenty Road, Bundoora, RMIT University

TÓM TẮT: Virus gây hội chứng đốm trắng (WSSV: white spot syndrome virus) là tác nhân hàng đầu gây chết tôm ở các trang trại nuôi tôm trên thế giới. Ở Việt Nam, WSSV đã được xác định là một trong các tác nhân gây tổn thất lớn nhất cho ngành nuôi tôm. VP28 và VP26 là hai protein bề mặt của WSSV, thường được sử dụng làm marker chẩn đoán virus hoặc kháng nguyên đích cho phát triển vaccine phòng WSSV. Protein VP28 tái tổ hợp (rVP28) đã được nghiên cứu biểu hiện ở nhiều hệ thống khác nhau như *E. coli*, nấm men, baculovirus. rVP28 biểu hiện trong các hệ thống này thể hiện khả năng bảo vệ tôm chống lại sự lây nhiễm WSSV, tuy nhiên, các hệ thống này còn các hạn chế nhất định về hiệu suất biểu hiện và tính an toàn sinh học. Gần đây, hệ thống tảo lục *Chlamydomonas reinhardtii* đã được ứng dụng nhiều trên thế giới để biểu hiện các protein tái tổ hợp và tạo vaccine theo đường ăn ở thủy sản do các ưu thế về tính hiệu quả và tính an toàn cao. *C. reinhardtii* cũng được sử dụng làm thức ăn trong tự nhiên của tôm do chúng mang nhiều thành phần dinh dưỡng, tốt cho sức khỏe và sự tăng trưởng của tôm. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa protein VP28 được cải biến mã di truyền cho phù hợp với hệ thống biểu hiện *C. reinhardtii* và đưa vào hệ gen *C. reinhardtii* bằng phương pháp xung điện. Các chủng *C. reinhardtii* tái tổ hợp được chọn lọc bằng phương pháp PCR và giải trình tự gen; sự biểu hiện của VP28 ở mức độ phiên mã được đánh giá mã bằng phương pháp RT-PCR. Kết quả khẳng định đã tạo được các chủng *C. reinhardtii* tái tổ hợp biểu hiện VP28. Các nghiên cứu đang được thực hiện nhằm phát triển vaccine theo đường ăn phòng bệnh đốm trắng ở tôm.

Từ khóa: *Chlamydomonas reinhardtii*, chủng tái tổ hợp, protein VP28, virus gây bệnh đốm trắng.

MỞ ĐẦU

Virus gây hội chứng đốm trắng WSSV là tác nhân hàng đầu gây chết tôm ở các trang trại nuôi tôm trên thế giới (Lightner et al., 1997; Lo et al., 2005; Cavalli et al., 2008). Đặc điểm của bệnh do WSSV gây ra trên tôm là sự xuất hiện các đốm trắng trên vỏ tôm và gây chết tôm hàng loạt với tỷ lệ từ 80-100% sau nhiễm 3-5 ngày (Chou et al., 1995; Lo et al., 2005). Trong 5-10 năm trở lại đây, WSSV được xác định là một trong các tác nhân gây bệnh và gây tổn thất lớn nhất cho ngành nuôi tôm của Việt Nam. Việc phát triển được các vaccine phòng bệnh WSSV cho tôm có hiệu quả cao, an toàn với người sử dụng là đòi hỏi cấp bách.

WSSV chứa 5 loại protein cấu trúc chính là VP28, VP26, VP24, VP19 và VP15; trong đó VP28 và VP26 là hai protein biểu hiện trên vỏ virus. Do tính kháng nguyên cao và khả năng

kích thích hệ thống miễn dịch của tôm, VP26 và VP28 thường được sử dụng làm marker chẩn đoán virus hoặc kháng nguyên đích cho vaccine phòng WSSV (van Hulten et al., 2001; Witteveldt et al., 2004; Rout et al., 2007; Li X et al., 2010; Syed et al., 2011). rVP28 đã được nghiên cứu biểu hiện ở nhiều hệ thống khác nhau như *E. coli*, nấm men, baculovirus (Rajeev et al., 2005; Syed et al., 2009; Hou et al., 2011). Witteveldt et al. (2004) đã biểu hiện protein VP28 và trộn với thức ăn tôm tạo vaccine đường ăn, thử nghiệm cho tôm sú *Penaeus monodon* cho thấy VP28 tái tổ hợp có hiệu quả bảo hộ miễn dịch lên tới 70%. Tuy nhiên, các hệ thống biểu hiện trên vẫn còn nhiều hạn chế: hệ thống baculovirus thường cho hiệu suất không cao, giá thành đắt; hệ thống *E. coli* lại đòi hỏi việc loại nội độc tố, quá trình này khá phức tạp và làm tăng giá thành của sản phẩm. Vì vậy, cần

có những nghiên cứu, phát triển hệ thống thay thế và khắc phục hạn chế của các hệ thống biểu hiện nói trên.

Tảo lục, *C. reinhardtii*, là loài tảo đơn bào thuộc họ *Chlamydomonadaceae*, chi *Chlamydomonas*, có đường kính khoảng 10 µm và di chuyển bằng hai lông flagella, phân bố rộng rãi trong đất và nước ngọt. *C. reinhardtii* đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ chứng nhận là an toàn “Generally Regarding As Safe (GRAS)”. *C. reinhardtii* hiện được sử dụng rộng rãi trên thế giới, nhiều vaccine đã được sản xuất thành công bằng hệ thống này, như vaccine phòng sốt rét, vaccine virus lở mồm long móng, tụ cầu vàng *Staphylococcus aureus*, virus cúm lợn và papillomavirus ở người (Rosales-Mendosas, 2013). Trong tự nhiên, *C. reinhardtii* cũng là nguồn thức ăn giàu dinh dưỡng của tôm, gần đây rất nhiều nghiên cứu trên thế giới đã ứng dụng hệ thống vi tảo này để phát triển vaccine phòng các bệnh do virus ở tôm (Somchai et al., 2016). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật xung điện để chuyển gen *vp28* của WSSV vào hệ gen nhân của *C. reinhardtii*, nhằm tạo ra chủng tảo lục tái tổ hợp biểu hiện protein VP28 như là vaccine đường ăn cho tôm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vector, chủng giống và điều kiện nuôi cấy

Gene mã hóa protein VP28 của WSSV đã được tách dòng và xác định trình tự như mô tả trong các nghiên cứu trước của chúng tôi (Hà Thị Thu, Đinh Thương Vân, 2007; Hà Thị Thu và nnk., 2011). Vector pChlamy4 (Invitrogen, Hoa Kỳ) được sử dụng để chuyển cấu trúc di truyền biểu hiện rVP28 dưới sự điều hòa của promoter HSP70/RBSC2 vào hệ gen vi tảo *C. reinhardtii*.

Chủng tảo lục *C. reinhardtii* 137c sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp theo kit GeneArt Protein Expression (Invitrogen, Hoa Kỳ). *C. reinhardtii* 137c được nuôi trong môi trường TAP (Gorman et al., 1965), lắc 100 vòng/ phút hoặc nuôi tĩnh và lắc bằng tay 1-3 lần mỗi 12 giờ, chiếu sáng theo chu kỳ 12 giờ sáng/ 12 giờ tối ở 25-27°C.

Cải biến codon

Trình tự codon mã hóa protein VP28 được chúng tôi đánh giá mức độ phù hợp codon (CAI-codon adaptation index) với hệ gen nhân của *C. reinhardtii* bằng phần mềm Sequential v2 (http://gcua.schoedl.de/sequential_v2.html). Các codon hiếm và rất hiếm phát hiện được trong trình tự mã hóa sẽ được thay thế bằng các codon khác theo tiêu chí không làm thay đổi trình tự axit amin của protein được mã hóa. Các codon được lựa chọn để thay thế là các codon có mức độ sử dụng phổ biến nhất trong hệ gen nhân *C. reinhardtii* (chỉ số CAI trong khoảng 0,8-1,0) nhằm đảm bảo tối ưu mức độ biểu hiện của protein VP28. Trình tự mã hóa tối ưu được gửi tổng hợp hóa học bởi Integrated DNA Technology (IDT, Hoa Kỳ).

Chuyển gen bằng phương pháp xung điện

Trình tự cải biến codon của gen *vp28* được cắt bằng enzyme *XbaI* và *EcoRI* và gắn vào vector pChlamy4 tại vị trí tương ứng dưới sự điều khiển của promoter HSP70/RBSC2, tạo thành vector pChlamy4-VP28. Chủng tảo *C. reinhardtii* 137c được nuôi tĩnh trong 25 ml môi trường TAP ở nhiệt độ 25°C với điều kiện chiếu sáng 12 giờ sáng/12 giờ tối. Khi mật độ *C. reinhardtii* 137c đạt 2×10^6 tế bào/ml, tế bào tảo lục được thu bằng cách ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 2.500 vòng/phút. Tủa tế bào được rửa hai lần bằng 5 ml dung dịch MAX Efficiency Transformation for Algae (MAX) (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ), sau mỗi lần rửa tế bào được thu bằng ly tâm như trên. Tủa tế bào sau đó được hòa lại vào 250 µl dung dịch MAX, bổ sung 1 µg plasmid pChlamy4-VP28 và ủ trên đá trong 15 phút. Hỗn hợp tế bào và plasmid sau đó được chuyển sang cuvette xung điện 2mm (Biorad, Hoa Kỳ) để tiến hành xung điện. Quá trình xung điện được thực hiện bằng máy Gene Pulser Xcell (Biorad, Hoa Kỳ) ở hiệu điện thế 300V, điện trở 800 Ω và điện dung 50 µF. Tế bào sau xung điện được ủ trên đá trong 15 phút trước khi bổ sung vào 10 ml môi trường TAP-40 mM sucrose, nuôi lắc 6-9 tiếng trong điều kiện không chiếu sáng ở tốc độ 100 vòng/phút. Tế bào sau phục hồi được thu bằng ly tâm 2500 vòng/phút trong 5 phút và trải lên môi trường thạch chọn lọc TAP-2,5 µg/ml zeocin, nuôi trong điều kiện 12 giờ sáng/ 12 giờ

tối ở 25°C. Khuẩn lạc xuất hiện sau 7-10 ngày nuôi cấy.

Chọn lọc các dòng tảo lục mang gen *vp28* bằng PCR từ khuẩn lạc

Khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa chọn lọc sau chuyển gen được tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen *vp28* cải biến codon bằng phương pháp PCR từ khuẩn lạc. Một phần khuẩn lạc *C. reinhardtii* được bổ sung vào 50 µl EDTA 10 mM để chiết thô DNA bằng cách đun sôi ở 100°C trong vòng 5 phút. 2 µl DNA thu được được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi VP28-F: TACAGAATTCATGGACCTCAGCTTC và VP28-R: CGGAGTAATCTAGACTGCAGAATAG theo chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 3 phút; 35 chu kỳ của 94°C trong 30 giây, 51°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C. Để làm đối chứng, gen rubisco của *C. reinhardtii* được khuếch đại với cặp mồi Rbs-F: ATCTGCACCTGCTTCTGGTT và Rbs-R: ACAAGGCCTACGTGTCCAAC theo chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 3 phút; 35 chu kỳ của 94°C trong 30 giây, 51°C trong 30 giây, 72°C trong 30 giây; 72°C trong 5 phút và giữ ở 4°C.

Kiểm tra sự biểu hiện của rVP28 bằng RT-PCR

Với 2 ml tế bào tảo sau 3 ngày nuôi cấy 100 vòng/phút trong môi trường TAP-5 µg/ml zeocin ở điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ tối 12 giờ, 25-27°C được thu bằng ly tâm với tốc độ 2500 vòng/phút trong 5 phút. RNA tổng số từ tế bào được tinh sạch bằng kit PureLink RNA Extraction (ThermoFisher, Hòa Kỳ). 0.5 µg RNA tinh sạch được dùng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR sử dụng enzyme Superscript III (ThermoFisher, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cặp mồi đặc hiệu VP28F/R được dùng để khuếch đại mRNA của gen *vp28*, và

cặp mồi RbsF/R được dùng để khuếch đại mRNA của gen rubisco.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cải biến trình tự gen vp28 cho hệ biểu hiện trong nhân tảo lục C. reinhardtii

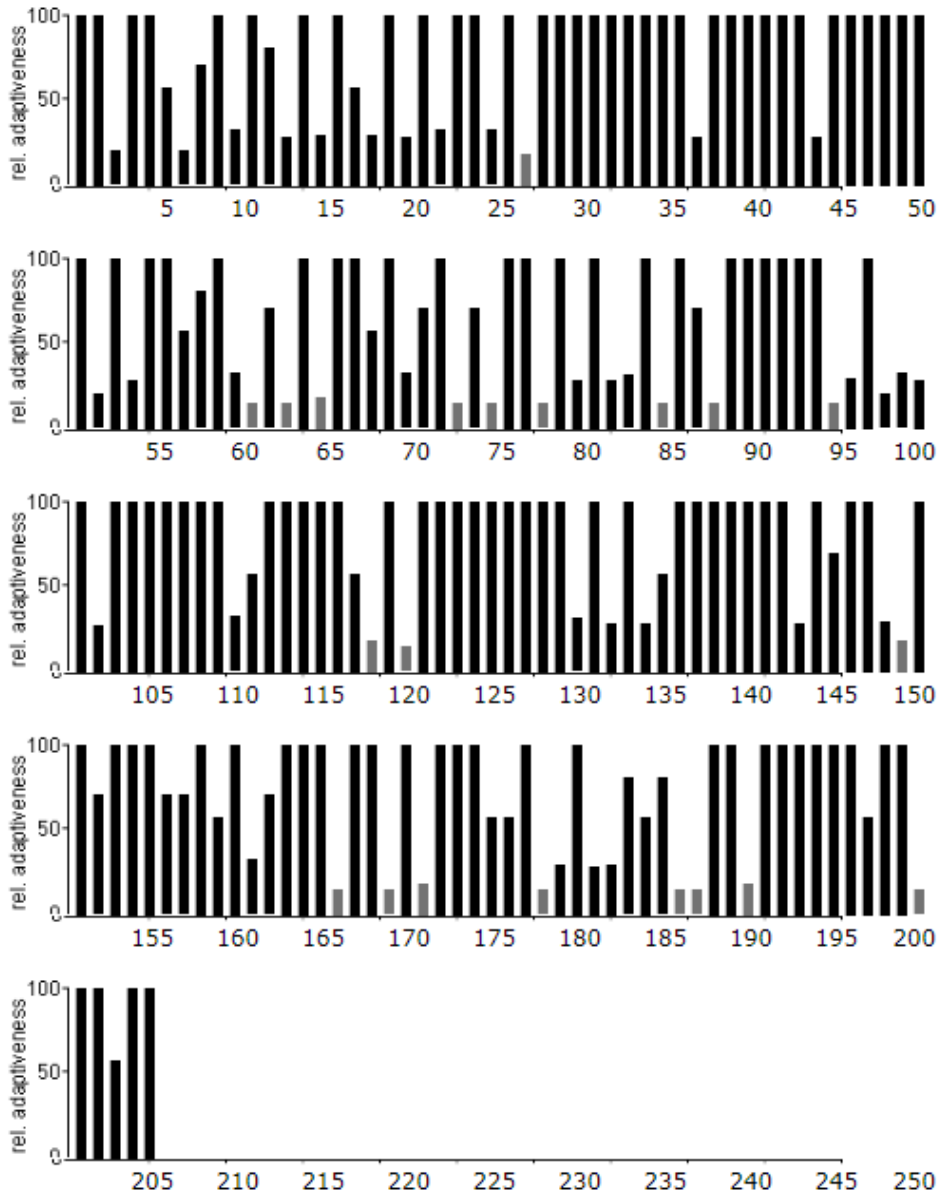
Phân tích mức độ phù hợp codon của gen *vp28* so với hệ codon thường sử dụng của *C. reinhardtii* sử dụng phần mềm (CAI - codon adaptation index) Sequential v2 (http://gcu.schoedl.de/sequential_v2.html) cho thấy, trình tự mã hóa của gen *vp28* mang khá nhiều codon hiếm. Theo đó, trong số 205 codon mã hóa của gen *vp28* kiểu đại, 49 codon (24% gene) có tần số xuất hiện trong hệ gen *C. reinhardtii* dưới 20% (codon hiếm) và 26 codon (13% gene) có tần số xuất hiện dưới 10% (codon rất hiếm). Tần số các codon hiếm và rất hiếm trong trình tự mã hóa của gen *vp28* kiểu đại cho thấy rất khó để biểu hiện protein VP28 ở mức độ cao trong vi tảo *C. reinhardtii*.

Để đảm bảo khả năng biểu hiện của protein VP28 trong hệ gen vi tảo *C. reinhardtii*, chúng tôi đã tiến hành tối ưu các codon của gen *vp28* cho phù hợp nhất với hệ codon của *C. reinhardtii*, sử dụng chỉ số CAI như trình bày bên trên. Trình tự mã hóa sau tối ưu được thể hiện ở hình 1, và mức độ phù hợp codon với hệ gen *C. reinhardtii* được phân tích như trong hình 2. Theo đó, chỉ còn lại 21 codon trong tổng số 205 codon của trình tự mã hóa protein VP28 là không thể được hoàn toàn tối ưu (thuộc nhóm codon hiếm có mức độ xuất hiện <20%, thể hiện bằng màu ghi trong hình 2). Tất cả các codon rất hiếm đều đã được thay thế. Trình tự tối ưu này được chúng tôi tổng hợp hóa học và thiết kế vào vector vector pChlamy4 để biểu hiện protein VP28 trong hệ gen tảo lục *C. reinhardtii*.

ATG GAC CTC AGC TTC ACG CTC TCG GTG GTC AGC GCG ATT CTG GCTATC ACG
GCT GTG ATT GCC GTC TTC ATC GTC ATC TTT CGCTAC CAC AAC ACC GTG ACC
AAG ACC ATTGAG ACC CAC ACC GAC AACATT GAG ACC AAC ATG GACGAG AAC
CTC CGC ATT CCC GTG ACGGCG GAG GTCGGGTCCGGG TAC TTT AAG ATG
ACGGACGTC TCC TTCGATTCGGAT ACC CTG GGG AAGATT AAG ATTCGGAACGGT
AAG TCG GAT GCC CAG ATG AAG GAGGAG GAT GCTGACCTC GTC ATTACCCCTGTG
GAG GGC CGCGCCCTGGAGGTCACG GTG GGC CAG AACCTGACG TTT GAG GGGACC

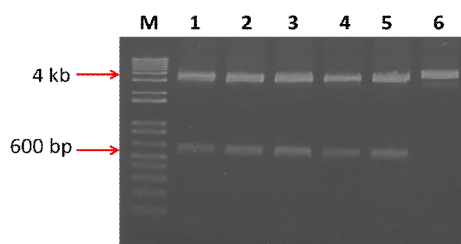
TTC AAG GTG TGG AAC AAC ACCAGCCGG AAG ATT AAC ATTACGGGC ATG CAG
 ATG GTG CCC AAG ATT AAC CCGAGC AAG GCT TTT GTGGGCTCCAGC AAC ACC
TCGTCC TTC ACG CCC GTC TCGATCGAC GAG GAT GAGGTGGGG ACC TTT GTG
TGCGGCACGACGTTTCGGTGCTCCC ATT GCTGCGACGGCG GGT GGTAACCTGTTT GAC
 ATG TAC GTG CAC GTGACG TAC AGCGGTACC GAG ACG GAG TAA

Hình 1. Trình tự codon mã hóa protein VP28 được tối ưu cho phù hợp với bộ codon sử dụng trong hệ gen tảo lục *C. reinhardtii*. Các codon được thay thế là các codon được gạch chân.



Hình 2. Phân tích mức độ phù hợp codon của trình tự mã hóa gen *vp28* đã tối ưu đối với hệ gen tảo lục *C. reinhardtii*. Các codon được thể hiện bằng màu ghi thuộc nhóm codon hiếm (tần số xuất hiện trong hệ gen <20%). Các codon được thể hiện bằng màu đen là các codon phổ biến trong hệ gen

Thiết kế vector biểu hiện protein VP28 trong hệ gen tảo lục *C. reinhardtii*



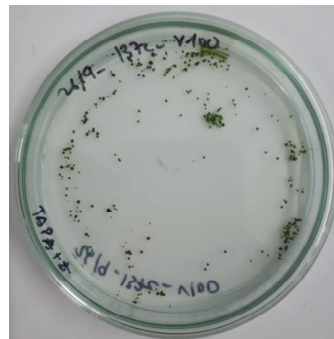
Hình 3. Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm cắt các plasmid bằng *EcoRI* và *XbaI*. M: Thang DNA chuẩn, 1,2,3,4,5,6. Các plasmid tái tổ hợp

Để biểu hiện protein VP28 trong vi tảo *C. reinhardtii*, chúng tôi lựa chọn vector biểu hiện pChlamy4 (Invitrogen, Hoa Kỳ) làm vector chuyên gen. Vector pChlamy4 mang hai gen kháng kháng sinh (Amp^r và Zeo^r) cho phép sử dụng ampicillin để chọn lọc dòng tế bào mang vector tái tổ hợp trong *E. coli* DH5 α và zeocin để chọn lọc dòng tế bào nhận gen *vp28* tái tổ hợp trong *C. reinhardtii*. Promoter HSP70/RBSC2 là promoter lai của hai gen biểu hiện mạnh trong hệ gen nhân của *C. reinhardtii*, hỗ trợ cho việc tối đa mức độ biểu hiện protein VP28. Đoạn gen *vp28* đã tối ưu được chúng tôi gắn vào pChlamy4 ở hai vị trí enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *XbaI*, tạo thành plasmid pChlamy4-VP28. Kết quả phân tích kích thước đoạn chèn cho thấy các plasmid mang đoạn chèn với kích thước xấp xỉ 600 bp, đúng với kích thước thiết kế của gen *vp28* (hình 3). Chúng tôi tiến hành đọc lại trình tự 2 plasmid số 3 và 5, kết quả giải trình tự (không trình bày ở đây) khẳng định đã thiết kế thành công pChlamy4-VP28 tái tổ hợp. Plasmid này sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

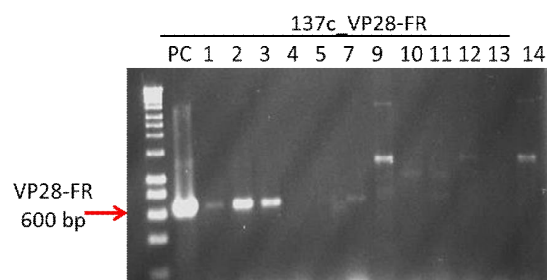
Tạo chủng tảo lục *C. reinhardtii* tái tổ hợp mang gen *vp28*

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng trực tiếp plasmid pChlamy4-VP28 dạng vòng để biến nạp vào hệ gen nhân của tảo lục *C. reinhardtii* bằng phương pháp xung điện. Plasmid được biến nạp vào tế bào bằng hiệu điện thế 1500 V cm^{-1} với thời gian xung điện thực tế từ 18-28 ms. Sau xung điện, tế bào được

nuôi phục hồi trong 6-9 tiếng trước khi được trải lên môi trường thạch chọn lọc chứa zeocin $2,5 \mu\text{g/ml}$. Các khuẩn lạc bắt đầu xuất hiện sau 7-10 ngày (hình 4).



Hình 4. Khuẩn lạc *C. reinhardtii* xuất hiện trên môi trường chọn lọc TAP-2,5 $\mu\text{g/ml}$ zeocin 10 ngày sau xung điện

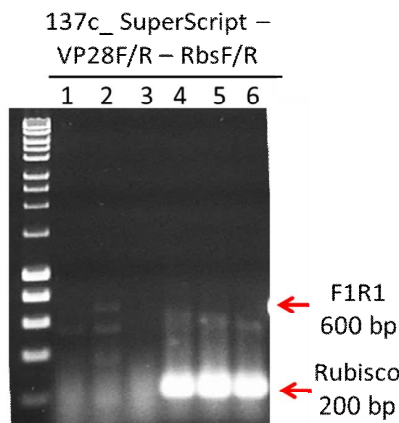


Hình 5. Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm PCR từ 12 khuẩn lạc *C. reinhardtii* sử dụng cặp mồi đặc hiệu VP28-F và VP28-R. PC: đối chứng dương sử dụng plasmid pChlamy4-VP28 làm DNA khuôn. Giếng 1-14: các khuẩn lạc *C. reinhardtii*.

Chọn lọc các dòng tảo lục *C. reinhardtii* tái tổ hợp mang gen *vp28*

Để kiểm tra sự có mặt của trình tự *vp28* cải biến trong hệ gen *C. reinhardtii*, chúng tôi tiến hành PCR từ khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu gen *vp28* là VP28-F/VP28-R. Kết quả PCR từ 12 khuẩn lạc (hình 5) cho thấy 4 trên 12 khuẩn lạc cho sản phẩm PCR đặc hiệu trùng khớp với kích thước thiết kế của *vp28* (khuẩn lạc 1, 2, 3 và 7). Một số khuẩn lạc (9, 10, 11, 14) cho băng khuếch đại yếu với kích thước cao hơn kích thước thiết kế, có thể là những trình tự chèn lặp lại của *vp28*.

Để đánh giá mức độ biểu hiện của gen *vp28* trong chủng tảo *C. reinhardtii* tái tổ hợp, RNA tổng số của *C. reinhardtii* tái tổ hợp sau 3 ngày nuôi cấy lỏng được tinh sạch bằng kit PureLink RNA extraction (ThermoFisher, Hoa Kỳ) và sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu VP28-F/VP28-R. Cặp mồi Rbs-F/Rbs-R đặc hiệu cho gen rubisco của *C. reinhardtii* (nghiên cứu trước của nhóm) được sử dụng làm nội kiểm đánh giá hiệu suất tinh sạch RNA giữa các mẫu. Kết quả RT-PCR (hình 6) cho thấy chủng *C. reinhardtii* 1 và 2 biểu hiện *vp28* mRNA ở mức độ thấp, trong khi không phát hiện được *vp28* mRNA ở chủng 3. Kết quả RT-PCR bước đầu đã khẳng định được sự thành công trong việc chuyển gen *vp28* cải biến vào hệ gen tảo lục *C. reinhardtii* bằng phương pháp xung điện. Một số chủng *C. reinhardtii* tái tổ hợp đã ghi nhận được sự biểu hiện của gen *vp28*. Mức độ biểu hiện khác nhau của gen *vp28* trong các chủng tái tổ hợp có thể được giải thích bằng việc vị trí chèn của gen *vp28* trong hệ gen *C. reinhardtii* là ngẫu nhiên theo cơ chế tái tổ hợp không tương đồng. Một số các nghiên cứu trước đó đã chỉ ra hiện tượng ức chế biểu hiện của gen ngoại lai trong hệ gen tảo lục *C. reinhardtii* do điều hòa epigenetic hoặc RNAi (Schroda et al., 2002; Jeong et al., 2002).



Hình 6. Kết quả điện di trên gel agarose sản phẩm RT-PCR từ 3 chủng *C. reinhardtii* tái tổ hợp (1, 2 và 3) phát hiện mRNA của *vp28* và rubisco. Giếng 1-3: sản phẩm RT-PCR đặc hiệu cho gen *vp28*. Giếng 4-6: sản phẩm RT-PCR đặc hiệu cho gen rubisco.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, trình tự cải biến codon của gen *vp28* mã hóa cho protein VP28 của virus gây hội chứng đốm trắng đã được biến nạp thành công vào hệ gen tảo lục *C. reinhardtii* bằng phương pháp xung điện. Trình tự mã hóa của gen *vp28* đã được cải biến dựa trên chỉ số phù hợp codon CAI nhằm tối đa hóa mức độ biểu hiện của protein VP28 trong hệ gen *C. reinhardtii*.

Chúng tôi đã thiết kế thành công vector biểu hiện và phát hiện, kiểm tra sự có mặt của gen *vp28* cải biến trong hệ gen của chủng *C. reinhardtii* tái tổ hợp. Mức độ phiên mã của gen *vp28* cải biến được kiểm tra bằng phương pháp RT-PCR, kết quả cho thấy có sự khác biệt giữa các chủng chuyển gen. Phát hiện này hoàn toàn phù hợp với cơ chế biến nạp thông qua tái tổ hợp không tương đồng của *C. reinhardtii*.

Các nghiên cứu trong tương lai nhằm thiết kế vector chuyển gen hỗ trợ tái tổ hợp có định hướng trong hệ gen *C. reinhardtii* sẽ đem lại những tiềm năng lớn cho hướng công nghệ sử dụng vi tảo sản xuất protein tái tổ hợp.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài cấp cơ sở Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ VN (mã số CSPN16-01) và đề tài cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn chương trình CNSH Nông nghiệp - Thủy sản năm 2017-2019.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cavalli L. S., Marines L. F., Netto S., Abreu P. C., 2008. Evaluation of white spot syndrome virus (WSSV) in wild shrimp after a major outbreak in shrimp farms at Laguna, Southern Brazil. *Atlantic, Rio Grande*, 30(1): 45-52.
- Chou H. Y., Huang C. Y., Wang C. H., Chiang H. C., Lo C. F., 1995. Pathogenicity of abaculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. *Dis. Aquat. Organ.*, 23(3): 165-173.
- Gorman D. S., Levine R. P., 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of

- Chlamydomonas reinhardi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54(6): 1665-1669.
- Hou C. L., Cao Y., Xie R. H., Wang Y. Z., Du H. H., 2011. Characterization and diagnostic use of a monoclonal antibody for VP28 envelope protein of white spot syndrome virus. Virol Sin., 26(4): 260-266.
- Jeong B., Wu-Scharf D., Zhang C., Cerutti H., 2002. Suppressors of transcriptional transgenic silencing in *Chlamydomonas* are sensitive to DNA-damaging agents and reactivate transposable elements. Proc Natl Acad Sci USA, 99(2): 1076-1081.
- Li X., Liu Q. H., Huang J., 2010. Effect of VP28 DNA vaccine on white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. Aqua. Int., 18(6): 1035-1044.
- Lightner D. V., Redman R. M., Poulos B. T., Nuna L. M., Mari J. L., Hasson K. W., 1997. Risk of spread of penaeid shrimp viruses in the Americas by the international movement of live and frozen shrimp. Rev. Sci. Tech., 16(1): 146-160.
- Lo C. F., Peng S. E., Chang Y. S., Kou G. H., 2005. White spot syndrome-what we have learned about the virus and the disease. In: Walker P., Lester R., Bondad-Reantaso, M. G. (Eds.). Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila: 421-433.
- Parinyachat S., Sarocha J., Siripong T., Metha M., Vanvimon S., 2016. Use of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for production of double-stranded RNA against shrimp virus. Aquaculture Reports., 3: 178-183.
- Rajeev Kumar Jha, Zi-rong Xu., 2005. Production of recombinant enveloped structural proteins from the Chinese WSSV isolate. Indian Journal of Clinical Biochemistry: 136-141.
- Rosales-Mendoza S., 2013. Future directions for the development of *Chlamydomonas*-based vaccines. Expert Rev Vaccines., 12(9): 1011-1019.
- 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, 25(15): 2778-2786.
- Schroda M., Beck C. F., Vallon O., 2002. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. Plant J., 31(4): 445-455.
- Syed Musthaq S., Kwang J., 2011. Oral vaccination of baculovirus-expressed VP28 displays enhanced protection against White Spot Syndrome Virus in *Penaeus monodon*. PLoS ONE, 6(11): e26428.
- Syed Musthaq S., Madhan S., Sahul Hameed A. S., Kwang J., 2009. Localization of VP28 on the baculovirus envelope and its immunogenicity against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. Virology, 91(2): 315-324.
- Hà Thị Thu, Đinh Thương Vân, 2007. Tách dòng và biểu hiện ở *E. coli* gen mã hoá cho protein vỏ (VP28) của virut gây bệnh đốm trắng trên tôm sú Việt Nam. Tuyển tập những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 839-841.
- Hà Thị Thu, Đinh Duy Kháng, Đinh Thương Vân, 2011. Nghiên cứu tạo kháng thể đa dòng kháng protein vỏ VP28 của virus gây bệnh đốm trắng trên tôm sú (*Penaeus monodon*). Tạp chí Công nghệ sinh học, 9(2): 179-185.
- van Hulten M. C., Witteveldt J., Snippe M., Vlak J. M., 2001. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp. Virology, 285(2): 228-233.
- Witteveldt J., Cifuentes C. C., Vlak J. M., van Hulten M. C., 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. J. Virol., 78(4): 2057-2061.

**CREATION OF RECOMBINANT *Chlamydomonas reinhardtii* STRAINS
EXPRESSING CODON OPTIMIZED VP28 GENE
FROM WHITE SPOT SYNDROME VIRUS**

**Nguyen Minh Huong¹, Ha Thi Thu¹, Nguyen Thi Hoa¹,
Dinh Duy Khang¹, Dang Diem Hong¹, Aidyn Mouradov³, Dong Van Quyen^{1,2*}**

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology

³School of Science, Bundoora West Campus, Plenty Road, Bundoora, RMIT University

SUMMARY

White spot syndrome virus (WSSV) is the leading cause of shrimp mortality in farms all over the world. In Vietnam, for the last five to ten years, WSSV has always been among the top causes of diseases and loss in our shrimp aquaculture. VP28 and VP26 are two capsid proteins of WSSV that commonly used as biomarkers for diagnosis and target antigens for vaccine against WSSV. Recombinant VP28 (rVP28) has been studied and expressed in various expression systems including *E. coli*, yeast and baculovirus. rVP28 expressed in these systems showed effective protection against WSSV in shrimps, though there remains limitation on expression efficiency and safety. Recently, green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* has been widely used to express pharmaceutical proteins and edible vaccines for aquaculture thanks to its advantages as a safe and efficient host. *C. reinhardtii* is also used as nutritious natural food for shrimps due to its benefits towards shrimp health and growth. In this study, the codons of *vp28* gene was adapted and chemically synthesized, and transformed into the nucleus genome of *C. reinhardtii* using electroporation. The presence of a codon optimized *vp28* gene in *C. reinhardtii* genome was confirmed by colony PCR and sequencing; and its expression level was examined by RT-PCR. These results proved our success in creating transgenic *C. reinhardtii* expressing rVP28 and set the foundation for our future research on edible vaccine against WSSV for shrimp.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, protein VP28, recombinant strains, white spot syndrome virus.

Citation: Nguyen Minh Huong, Ha Thi Thu, Nguyen Thi Hoa, Dinh Duy Khang, Dang Diem Hong, Mouradov A., Dong Van Quyen, 2018. Creation of recombinant *Chlamydomonas reinhardtii* strains expressing codon optimized *vp28* gene from white spot syndrome virus. Tap chi Sinh hoc, 40(1): 92-99. DOI: 10.15625/0866-7160/v40n1.10988.

*Corresponding author: dvquyen@gmail.com

Received 19 October 2017, accepted 12 January 2018