

THIẾT KẾ VECTOR TRUNG GIAN BACULOVIRUS MANG HỘP GEN HEMAGGLUTININ (HA) ĐỂ TẠO VIRUS-LIKE PARTICLE CỦA VIRUS Cúm A/H5N1 SẢN XUẤT VACCINE

Lê Phương Hằng, Nguyễn Thị Phương, Đinh Duy Kháng, Đồng Văn Quyền

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Công nghệ tạo hạt giả virus (virus-like particles – VLPs) đang là một hướng đi đầy triển vọng trong việc sản xuất vaccine thể hệ mới với những cải tiến về độ an toàn và hiệu lực. Với mục đích tạo chủng cúm A/H5N1 bằng công nghệ VLPs làm vaccine, chúng tôi tiến hành thiết kế vector trung gian baculovirus mang hộp gen HA từ chủng cúm A/H5N1 phân lập tại Việt Nam (A/chicken/haty/2004(H5N1)) với các thành tố thiết yếu (trình tự Kozak, mã khởi đầu, mã kết thúc) cho việc biểu hiện gen HA trong tế bào côn trùng. Gen mã hóa HA5 được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu có gắn thêm trình tự Kozak, mã khởi đầu và vị trí nhận biết *Bam*HI ở đầu 5' của mồi xuôi và trình tự nhận biết của *Hind*III ở đầu 3' của mồi ngược. Sản phẩm PCR sau đó được tách dòng vào vector pCR2.1 và xác định trình tự để kiểm tra. Hộp gen HA5 sau đó được cắt ra khỏi vector tách dòng bằng *Bam*HI và *Hind*III và gắn vào vector trung gian baculovirus (pBluBac4.5/V5-His-TOPO) đã được mở vòng bằng 2 enzyme tương ứng và nối xen giữa gen lacZ và ORF1629 tạo plasmid tái tổ hợp pBluBacHA. Cấu trúc và trình tự hộp gen HA trong vector pBluBacHA được kiểm tra bằng phân tích enzyme cắt giới hạn và đọc trình tự kiểm tra. Vector pBluBacHA sẽ được đồng chuyển nạp với DNA của baculovirus vào tế bào côn trùng *Spodoptera frugiperda* (Sf9) để tạo vaccine VLP virus cúm H5N1.

Từ khóa: baculovirus, hemagglutinin, pBluBac4.5/V5-His-TOPO, virus cúm A/H5N1, virus-like particle

MỞ ĐẦU

Virus cúm H5N1 thuộc type A, họ *Orthomyxoviridae*, là chủng độc lực cao, có tỷ lệ gây tử vong trên 50% gia cầm bị nhiễm (Fedson, 2005). Theo thông báo của Tổ chức Y tế Thế giới, tính đến 04/03/2010, tổng số ca mắc cúm gia cầm lên đến 486 trường hợp, trong đó có 287 ca tử vong. Việt Nam và Indonesia là hai quốc gia có tỷ lệ tử mắc và tổn thất cao nhất do cúm gia cầm. Để ngăn chặn sự lan truyền của virus cúm và những thiệt hại do virus cúm gây ra, phương pháp hiệu quả nhất là dùng vaccine gây miễn dịch phòng virus H5N1 (New *et al.*, 2006).

Vaccine cúm hiện nay bao gồm vaccine dưới đơn vị (subunit), vaccine nhược độc và vaccine bất hoạt. Ước tính, với công nghệ sản xuất vaccine cúm hiện nay, hàng năm khoảng 300 triệu liều vaccine được tạo ra. Như vậy, trong trường hợp đại dịch xảy ra, sẽ không cung cấp đủ vaccine cần thiết. Ngoài ra, các vaccine này cũng còn bộc lộ những hạn chế nhất định: vaccine nhược độc tạo virus trở lại virus độc lực ("lại độc") cho chính những người tiêm vaccine; vaccine dưới đơn vị có độ an toàn cao nhưng tính sinh miễn dịch thấp, thường đòi hỏi liều kháng nguyên cao, mang tính lặp lại thường xuyên và cần

phải kết hợp với các chất bổ trợ khác, đồng thời việc tổng hợp các protein tái tổ hợp có tính sinh miễn dịch giống với protein tự nhiên cũng rất khó khăn (Glarza *et al.*, 2005).

Có nhiều hướng đi mới trong công nghệ sản xuất vaccine để tăng cường độ an toàn, hiệu lực của vaccine và hiệu suất sản xuất. Gần đây, hướng nghiên cứu tạo các hạt giả virus (virus-like particle - VLP) đang được xem là một hướng mới trong việc tạo ra các vaccine thể hệ mới (Grgacic, Anderson, 2006). VLP được tạo ra bởi các protein cấu trúc của virus, có cấu trúc tương tự như các hạt virus tự nhiên nhưng không mang vật liệu di truyền của virus do đó không có khả năng lây nhiễm. Do có cấu trúc tương tự virus tự nhiên và là tập hợp của các protein kháng nguyên quan trọng của virus, VLP sẽ được hệ thống miễn dịch phòng vệ của vật chủ nhận biết và tạo đáp ứng miễn dịch phòng vệ cao tương tự như khi bị nhiễm virus tự nhiên (Bright *et al.*, 2007). Vaccine VLP viêm gan B và vaccine VLP ung thư cổ tử cung là 2 vaccine đầu tiên được sản xuất bằng công nghệ tiên tiến này và đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chứng nhận (Chackerian, 2007).

Hemagglutinin (HA) là một trong hai

glycoprotein bề mặt quan trọng nhất của virus cúm, có chức năng gắn hạt virus với axit sialic trên thụ thể tế bào vật chủ và đóng vai trò trung gian trong quá trình dung hợp màng virus và màng tế bào vật chủ. Do đó HA được tập trung nghiên cứu để tìm ra liệu pháp phòng chống sự lây nhiễm của loại virus này, cũng như để phát triển vaccine. Để tạo chủng vaccine VLP cúm A/H5N1 sản xuất trên tế bào côn trùng, phải có vector trung gian baculovirus mang hợp gen HA. Vector trung gian này sau đó sẽ được đồng chuyển nạp (co-transfection) với DNA của vector baculovirus vào tế bào côn trùng Sf9 để tạo lên VLP-A/H5N1 nhờ cơ chế trao đổi chéo trình tự tương đồng (homologous recombination). Rất nhiều công trình nghiên cứu gần đây trên mô hình động vật thực nghiệm cho thấy vaccine cúm sản xuất bằng công nghệ VLP cho đáp ứng miễn dịch phòng vệ tốt, an toàn. VLP đang được coi là hướng phát triển vaccine cúm thế hệ mới bổ sung thêm cho các công nghệ sản xuất vaccine truyền thống (Song *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2009; Amon, Ben-Yedidia, 2009; Grgacis, Anderson, 2006).

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày tiến trình thiết kế vector trung gian baculovirus mang hợp gen HA (gene cassette) của virus cúm A/H5N1 làm nguyên liệu ban đầu cho các bước tiếp theo để tạo chủng vaccine cúm theo công nghệ VLP.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Vector pCR2.1 (Invitrogen, Mỹ) được dùng để tách dòng gen HA5 trong tế bào *E. coli* chủng DH5α. Vector pBlueBac4.5/V5-His-TOPO trong bộ kit của hãng Invitrogen (Cat# K2100-20) được sử dụng làm vector baculovirus trung gian mang hợp gen HA. Ưu điểm nổi bật của vector này là sử dụng promoter polyhedrin của virus đa nhân (AcMNPV) để biểu hiện các gen mong muốn ở mức độ cao (Crawford, Miller, 1998). Ngoài ra, vector này còn có thêm một số đặc điểm ưu việt cho việc biểu hiện, gồm có: (i) có đoạn peptide đầu C mã hóa epitop V5 và 6 Histidine thích hợp cho việc phát hiện và tinh sạch protein tái tổ hợp; (ii) có tín hiệu polyadenin hóa của SV40 tăng cường kết thúc dịch mã và tính ổn định cho mRNA; (iv) mang promoter early-to-late (ETL) để biểu hiện β-galactosidase thích hợp cho việc chọn lọc các dòng tế bào côn trùng mang virus tái tổ hợp bằng X-gal (Vialard *et al.*, 1990).

Gen HA (/chicken/hatay/2004(H5N1)) đã được

chúng tôi lưu giữ trong vector pCR2.1 và trình tự được đăng ký trong Ngân hàng gen Quốc tế với mã số AJ867074 (Duong *et al.*, 2004)

Các hóa chất dùng cho nghiên cứu được cung cấp từ các hãng BioRad, Invitrogen, New England Biolabs, Sigma (Mỹ), Fermentas, Merck (Đức), các enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III (New England Biolabs, Mỹ), T₄ DNA ligase (Invitrogen, Mỹ), kit tinh sạch sản phẩm PCR (Fermentas, Đức).

Phương pháp

Phương pháp nhân đoạn gen HA5 của virus cúm A/H5N1 bằng PCR

Do gen HA5 lưu giữ trong vector pCR2.1 trước đây (Duong *et al.*, 2004) không mang trình tự Kozak, trình tự đóng vai trò quan trọng trong việc khởi đầu quá trình dịch mã ở sinh vật nhân chuẩn (Kozak, 1987) và vị trí cắt của các enzyme giới hạn phù hợp cho việc thiết kế vector để biểu hiện gen trong tế bào côn trùng tạo VLP sau này, chúng tôi thiết kế cặp mồi mới để đưa trình tự nhận biết của enzyme *Bam*HI I, trình tự Kozak và mã khởi đầu vào đầu 5' của mỗi xuôi (HApBac-F) và vị trí nhận biết của *Hind*III tại đầu 5' của mỗi ngược (HApBac-R), với trình tự như sau:

HApBac-F: 5' - ACG GGG TCC GGT CAT GGA
*Bam*HI trình tự Kozak

GAA AAT AGT GCT TC - 3';

HApBac-R: 5' - TCG GAA GCT TGA TTG CCA
*Hind*III

GAG CTA GGG - 3'

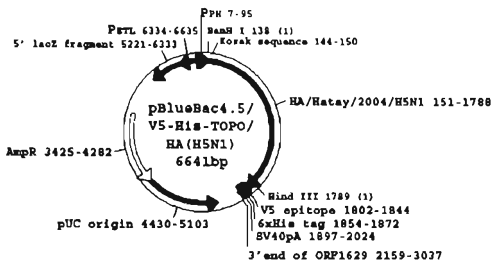
PCR được tiến hành trong tổng thể tích 25 μl bao gồm: 50 ng DNA plasmid (vector pCR2.1 mang gen H5), 2,5 μl đệm phản ứng 10X, dNTP mỗi loại 0,25 mM, 1 pmol mỗi mồi, 1 đơn vị DNA Dream® *Taq* polymerase của hãng Fermentas. Chương trình PCR được tiến hành theo các bước: 94°C trong 3 phút; 94°C trong 30 giây; 60°C trong 30 giây; 72°C trong 1,5 phút (35 chu kỳ lặp lại từ bước 2); 72°C trong 8 phút và giữ ở 4°C cho đến khi phản tích.

Sản phẩm PCR (hợp gen HA) được tinh sạch qua kit tinh sạch PCR (Fermentas, Đức) và gắn vào vector tách dòng pCR2.1 tạo lên plasmid tái tổ hợp pCRHA. Các plasmid tái tổ hợp mang hợp gen HA được chọn lọc bằng cắt kiểm tra bằng 2 enzyme *Bam*HI và *Hind*III.

Thiết kế vector trung gian baculovirus mang hợp gen HA

Đoạn DNA chứa hợp gen HA được tách ra khỏi vector pCRHA bằng *Bam*HI và *Hind*III, phân tách trên gel agarose 1% và thu nhận lại bằng kit thời gel của Fermentas (Đức). Sản phẩm tinh sạch sau đó được gắn vào vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO

tại 2 vị trí enzyme tương ứng là *Bam*HI và *Hind*III nhờ T_4 DNA ligase tạo nên vector tái tổ hợp pBluBacHA (Hình 1). Theo chiến lược kể này, hợp gen HA được gắn vào vùng xen giữa gen lacZ và ORF 1629. Đây là hai vị trí sẽ xảy ra sự trao đổi chéo trình tự tương đồng giữa pBluBac4.5/V5-His-TOPO và DNA của baculovirus để tạo ra bộ khung của baculovirus tái tổ hợp.



Hình 1. Sơ đồ minh họa dự kiến vector tái tổ hợp pBluBacHA mang hợp gen HA. Hợp gen được chèn vào vector tại 2 vị trí *Bam*HI và *Hind*III, nằm giữa gen lacZ và ORF 1629.

Chọn lọc các dòng plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO mang hợp gen HA

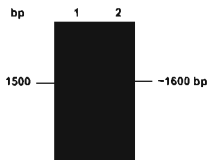
Vector pBluBacHA tái tổ hợp mang hợp gen HA được chọn lọc bằng cách cắt kiểm tra với 2 enzyme là *Bam*HI 1 và *Hind* III. Trình tự và cấu trúc và hợp gen HA trong pBluBacHA sau khi cắt kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn được khẳng định lại bằng đọc trình tự DNA nhờ hệ thống đọc trình tự tự động ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems, Mỹ). Các dòng plasmid tái tổ hợp mang gen HA được tách lượng lớn và bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khuếch đại gen HA của virus cúm A/H5N1

Với DNA vector tách dòng pCR2.1 mang gen HA làm khuôn, sử dụng cặp mồi HapBac-F – HapBac-R, phản ứng PCR được tiến hành để thu nhận DNA tạo lên hợp gen HA. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% (Hình 2). Kết quả điện di cho thấy có một băng DNA quan sát

được với kích thước khoảng 1,6 kb, tương đương với kích thước hợp gen HA theo lý thuyết chúng tôi thiết kế là 1664 bp. Như vậy, có thể kết luận đoạn gen HA của virus cúm A/H5N1 đã được khuếch đại đặc hiệu.

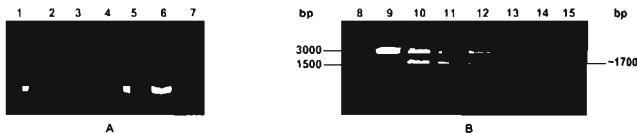


Hình 2. Sản phẩm PCR nhân gen HA bằng cặp mồi (HapBac-F và HapBac-R) trên gel agarose 1%. 1: thang DNA 1 kb chuẩn (Fermentas, Đức); 2: sản phẩm PCR.

Tách dòng hợp gen HA vào vector pCR2.1

Trước khi thiết kế vào vector trung gian baculovirus, sản phẩm PCR của hợp gen HA được

tách dòng vào vector pCR2.1 (Invitrogen, Mỹ). Quy trình được mô tả ngắn gọn như sau: sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch được gắn trực tiếp vào vector pCR2.1 và biến nạp vào tế bào *E. coli* (DH5 α) và được nuôi cấy trên môi trường LB chọn lọc có bổ sung Ampicilin (100 μ g/ml), IPTG (1 mM) và X-gal (100 μ g/ml). Chúng tôi chọn ngẫu nhiên 6 khuẩn lạc trắng và 1 khuẩn lạc xanh để tách plasmid và chọn các plasmid mang hộp gen HA bằng cách cắt với hai enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Sản phẩm phân cắt sau đó được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả kiểm tra bằng điện di (Hình 3) cho thấy, 5 trong 6 dòng plasmid tái tổ hợp chọn lọc có khả năng mang gen HA (tương ứng với đường chạy 10 đến 14, Hình 3B).



Hình 3. Chọn lọc các dòng plasmid pCR2.1 tái tổ hợp mang hộp gen HA bằng điện di trên gel agarose 1%. A: DNA plasmid tách từ các khuẩn lạc trắng (1-6) và khuẩn lạc xanh (7); B: DNA plasmid pCR2.1 tái tổ hợp được xử lý bằng hai enzyme hạn chế *Bam*HI và *Hind*III, thang DNA chuẩn 1 kb (8), plasmid tái tổ hợp từ khuẩn lạc xanh (9) và khuẩn lạc trắng (10-14) cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III, đối chứng: sản phẩm PCR gen HA (15)

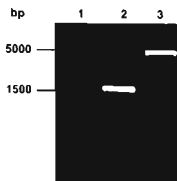
Thiết kế vector trung gian baculovirus mang hộp gen HA

Vector pCRHA và vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO được xử lý đồng thời bằng *Bam*HI và *Hind*III, phân tách sản phẩm cắt trên gel agarose 1% sau đó cắt riêng biệt từng vùng gel chứa DNA hộp gen HA và DNA bộ khung vector mở vòng, tinh sạch và thu lại các sản phẩm cắt bằng kit thôi gel của Fermentas (Đức). Sản phẩm phân cắt sau khi tinh sạch và thu nhận bằng kit thôi gel, được kiểm tra lại bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di cho thấy, một băng có kích thước khoảng 1600 bp (hộp gen HA) và một băng có kích thước khoảng 5000 bp (vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO) ở các đường chạy tương ứng (Hình 4). Kết quả này chứng tỏ hộp gen HA và bộ khung vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO sau khi cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III đã được tinh sạch và thu nhận.

Để tạo vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO tái tổ hợp mang hộp gen HA, chúng tôi tiến hành nối ghép

Chúng tôi chọn DNA plasmid từ các khuẩn lạc số 5 và số 6 (3A), tương ứng với đường chạy số 13, 14 (3B), để phân tích tiếp bằng xác định trình tự nhằm khẳng định chắc chắn trình tự và cấu trúc hộp gen HA trong vector pCR2.1 tái tổ hợp. Kết quả đọc trình tự (không nêu ở đây) cho thấy trình tự nucleotide của gen HA trong vector pCR2.1 tái tổ hợp tương đồng 100% với trình tự của gen này đã được chúng tôi tách dòng trước đây (Dương *et al.*, 2004) và có thêm trình tự nhận biết của enzyme hạn chế *Bam*HI, trình tự Kozak và bộ ba mã khởi đầu ở đầu 5' và trình tự nhận biết của *Hind*III ở đầu 3'. Plasmid pCR2.1 mang gen HA của virus cúm A/H5N1 được ký hiệu là pCRHA.

2 đoạn DNA tinh sạch thu được ở trên lại với nhau nhờ enzyme T4 DNA ligase. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α và chọn lọc các khuẩn lạc trên môi trường LB có bổ sung Ampicilin 100 μ g/ml. Chúng tôi chọn ngẫu nhiên 6 khuẩn lạc từ đĩa nuôi cấy sản phẩm gắn nối và một khuẩn lạc từ plasmid gốc để tách plasmid và kiểm tra sự có mặt của hộp gen HA bằng cắt phân tích với hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Kết quả điện di sản phẩm phân cắt plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO tái tổ hợp bằng *Bam*HI và *Hind*III trình bày ở hình 5. Các plasmid tái tổ hợp có kích thước lớn hơn plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO gốc không mang gen ngoại lai, khi cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III cho ra hai đoạn DNA có kích thước khoảng 5000 bp và 1600 bp tương ứng với kích thước của plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO và hộp gen HA (giếng số 2-7, Hình 5A). Trong khi đó plasmid gốc chỉ được cắt mở vòng với kích thước khoảng 5000 bp đúng với kích thước của vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO (giếng 2, Hình 5A). gen HA.

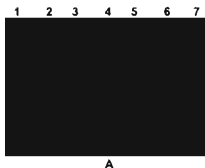


Hình 4. Gen HA từ vector tách dòng PCRHA và vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO được thu nhận lại từ gel agarose 1% sau khi xử lý bằng *Bam*HI và *Hind*III. 1: thang DNA chuẩn 1 kb (Fermentas); 2: gen HA; 3: vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO.

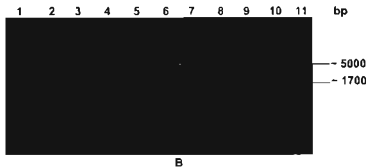
Các dòng plasmid tái tổ hợp mang hộp gen HA chọn lọc bằng cắt kiểm tra phân tích enzyme cắt giới hạn được kháng định lại bằng PCR sử dụng cặp mồi lai là Polyhedrin forward sequencing primer (mồi xuôi-PFSP-F) bám vào vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO và mồi ngược HAPBac-R bám vào hộp gen

HA. Với cặp mồi này chỉ có plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO tái tổ hợp mang hộp gen HA mới có thể cho sản phẩm PCR đặc hiệu. Chúng tôi chọn 3/6 plasmid đã kiểm tra trên để phân tích tiếp bằng PCR. Kết quả điện di (Hình 5B) cho thấy, sản phẩm PCR sử dụng cặp mồi PFSP-F và HAPBac-R cho một băng có kích thước khoảng 1800 bp (hộp gen HA (1652 bp) + 120 bp của vector). Kết quả này chứng tỏ vector baculovirus trung gian mang hộp gen HA của virus cúm A/H5N1 đã được thu nhận. Plasmid tái tổ hợp này được ký hiệu là pBluBacHA.

Gen HA chỉ có thể biểu hiện trong tế bào Sf9 khi cấu trúc và trình tự hộp gen của chúng không bị biến đổi. Vì vậy, 2 trong số 3 plasmid chọn lọc trên (Hình 5B) được phân tích tiếp bằng đọc trình tự DNA sử dụng cặp mồi đọc trình tự bám vào vector pBluBac4.5/V5-His-TOPO theo thiết kế của nhà sản xuất. Kết quả xác định trình tự (không nêu ở đây) một lần nữa khẳng định chắc chắn chúng tôi tạo thiết kế thành công vector trung gian baculovirus mang hộp gen HA.



A



B

Hình 5. Điện di plasmid pBluBac4.5/V5-His-TOPO tái tổ hợp kiểm tra khả năng mang hộp gen HA. A: pBluBac4.5/V5-His-TOPO không mang gen (1), pBluBacHA (2-7). B: pBluBac4.5/V5-His-TOPO được cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III (1), pBluBacHA được cắt bằng *Bam*HI và *Hind*III (2-7), thang DNA chuẩn 1 kb (8), sản phẩm PCR nhân đoạn gen HA từ pBluBacHA clone 2, 3, 4 bằng cặp mồi PFSP-F và HAPBac-R (9-11).

KẾT LUẬN

Hộp gen HA của virus cúm A/H5N1 mang đầy đủ các thành phần cần thiết cho sự biểu hiện của gen trong hệ thống tế bào côn trùng bao gồm trình tự Kozak, mã khởi đầu và mã kết thúc và vector trung gian baculovirus mang hộp HA đã được thiết kế thành công. Vector trung gian này sẽ được chúng tôi tiếp tục nghiên cứu đồng chuyển nạp vào tế bào côn trùng cùng với DNA khung của baculovirus để tạo ra các VLP biểu hiện HA.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bởi kinh

phi Đề tài cơ sở của Viện Công nghệ sinh học và sử dụng một số trang thiết bị của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amor R, Ben-Yedidia T (2009) Preclinical efficacy of a virus-like particle-based vaccine against avian influenza H5N1. *Future Microbiol* 4: 503-5.
- Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Atmad A (2007) Influenza virus-like particles elicit broader immunoresponses than whole virion inactivated influenza virus or

recombinant hemagglutinin. *Vaccine* 25: 3871-3878.

Chackerman B (2007) Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 6 (3): 381-390.

Crawford AM, Miller LK (1998) Characterization of an early gene accelerating expression of late genes of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* 62: 2773-2781.

Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, Smith G, Garcia M, Stone H, Perdue ML (1999) Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infection by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine* 17: 2265-2274.

Duong HQ, Nguyen TM, Le TH, Kumar P, Lal SK, Le TB, Dinh DK (2004) Influenza A virus (A/Hatay/2004(H5N1)) HA gene for hemagglutinin, genomic RNA, EBI/GenBank Database ANo. AJ867074.

Fedson DS (2005) Preparing for pandemic vaccination: an international policy agenda for vaccine development. *J Public Health Policy* 26: 4-29.

Galarza JM, Latham T, Cupo A (2005) Virus-like particle (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral Immunol* 18: 244-251.

Grgacic EV, Anderson DA (2006) Virus-like particles:

passport to immune recognition. *Methods* 40: 60-15.

Kang SM, Pushko P, Bright RA, Smith G, Compans RW (2009) Influenza virus-like particles as pandemic vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 333: 269-289.

Kozak M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl Acids Res* 15: 8125-8148.

Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W (1999) A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 5(10): 1157-1163.

New N, He Q, Damrongwatanapokin S, Du Q, Manopo I, Limlamthong Y, Fenner BJ, Spencer L, Kwang J (2006) Expression of hemagglutinin protein from the avian influenza virus H5N1 in a baculovirus/insect cell system significant enhanced by suspension culture. *BMC Microbiol* 24: 6-16.

Nicholson KG (2009) Influenza and vaccine development: a continued battle. *Expert Rev. Vaccines* 8: 373-374.

Song JM, Hossain J, Yoo DG, Lipatov AS, Davis CT, Quan FS, Chen LM, Hogan RJ, Donis RO, Compans RW, Kang SM (2010) Protective immunity against H5N1 influenza virus by a single dose vaccination with virus-like particles. *Virology* 405: 165-175.

CONSTRUCTION OF BACULOVIRUS TRANSFER VECTOR CARRYING THE HEMAGGLUTININ (HA) GENE CASSETTE OF AN A/H5N1 VIRUS FOR GENERATION OF INFLUENZA VIRUS-LIKE PARTICLE (VLP) VACCINE

Le Phuong Hang, Nguyen Thi Phuong, Dinh Duy Khang, Dong Van Quyen*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

Virus-like particle (VLP)-based vaccines represent a promising approach for production of new generation vaccine with improved safety and efficacy. In order to construct a VLP-based A/H5N1 vaccine; herein we constructed a baculovirus transfer vector, which is able to support the independent expression of different open reading frames (ORFs), carrying a gene cassette containing hemagglutinin sequence from the strain A/chicken/hatay/2004(H5N1). The gene encoding hemagglutinin was amplified by PCR using a specific primer set PFSP-F and HapBac-R which has initiation codon, Kozak sequence, and *Bam*HI site at 5' of forward primer and *Hind*III site at 5' of reverse primer. The PCR product (HA gene cassette) was cloned into pCR2.1 vector and sequenced. The HA gene cassette was then excised from recombinant pCR2.1 vector by *Bam*HI and *Hind*III and inserted into the baculovirus transfer vector (pBluBac4.5/V5-His-TOPO) previously digested by the same restriction enzymes to yield recombinant pBluBacHA plasmid. The structure and nucleotide sequences of HA gene cassette in pBluBacHA plasmid was confirmed by restriction enzyme analysis and DNA sequencing. The correct clones, in the next step, will be co-transfected with DNA of baculovirus into *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells to generate H5N1 VLP - based vaccine.

Keywords: avian influenza A (H5N1) virus, baculovirus transfer vector, pBluBac4.5/V5-His-TOPO, hemagglutinin, virus-like particle vaccine

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37563386; E-mail: dvquyen@gmail.com