

Tách dòng sáu gen khung virus cúm vào vector pHW2000 phục vụ tạo chủng gốc vaccine cúm A/H5N1 bằng kỹ thuật di truyền ngược

Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Nguyễn Hùng Chí^{2,3}, Hoàng Thị Thu Hằng^{2,3},
Vũ Huyền Trang^{3,4}, Chu Hoàng Hà^{3,4}, Nguyễn Trung Nam^{2,3,4,*}

¹Trường Đại học Lâm nghiệp, Xuân Mai, Chương Mỹ, Hà Nội

²Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

³Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

⁴Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 17 tháng 5 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 31 tháng 5 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 28 tháng 6 năm 2017

Tóm tắt: Cúm A/H5N1 thuộc nhóm virus cúm A, họ *Orthomyxoviridae*, hệ gen gồm 8 phân đoạn sắp xếp theo thứ tự: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS. Trong nhóm virus cúm A, H5N1 thuộc một trong những phân type có độc lực cao nhất, thường gây chết gia cầm hàng loạt và có khả năng lây sang người với dấu hiệu lâm sàng trầm trọng và tỷ lệ tử vong cao. Phòng chống cúm A/H5N1 hiệu quả nhất vẫn là tiêm phòng vaccine. Vaccine cúm đảm bảo hiệu quả và an toàn hiện nay là vaccine được sản xuất từ giống virus tái tổ hợp tạo ra bằng kỹ thuật di truyền ngược - là kỹ thuật thao tác với các phân đoạn genome của virus, tái tạo hạt virus từ các cDNA tách dòng sau khi chuyển nạp vào tế bào động vật. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày thiết kế và tách dòng thành công sáu phân đoạn RNA hệ gen virus (PB2, PB1, PA, NP, M và NS) của virus cúm vào vector pHW2000. Sáu plasmid pHW2000 tái tổ hợp mang phân đoạn gen khung khi kết hợp với các plasmid pHW2000 mang phân đoạn gen H5 và N1, biến nạp vào tế bào động vật sẽ là nguồn tái tạo chủng virus tái tổ hợp làm giống gốc cho sản xuất vaccine phòng chống cúm H5N1.

Từ khóa: Di truyền ngược, H5N1, pHW2000, tách dòng, vaccine, virus.

1. Mở đầu

Virus cúm A thuộc họ *Orthomyxoviridae*, có genome RNA sợi đơn, âm (ss(-)RNA), gồm

8 phân đoạn genome, trong đó phân đoạn 4 mã hóa protein Hemagglutinin (HA) và phân đoạn 6 mã hóa protein Neuraminidase (NA), là những kháng nguyên vỏ virus. Nhóm virus cúm A được phân thành nhiều phân type khác nhau dựa trên kháng nguyên HA và NA với 19 phân type HA (H1- H16) và 11 phân type NA (N1 - N9), có khả năng tái tổ hợp để tạo nên hàng

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-912011765.

Email: nam@ibt.ac.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4457>

trăm phân type khác nhau về độc tính và khả năng gây bệnh [1-3]. Trong các type virus cúm, H5N1 là phân type xuất hiện từ những năm 1996 trở lại đây, đã được chứng minh có khả năng lây nhiễm từ động vật sang người. Các chủng H5N1 độc lực cao - highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1- có thể lây nhiễm nhanh trên nhiều loại gia cầm, động vật có vú và người với khả năng đột biến cao và tái tổ hợp di truyền lớn [4, 5]. Dịch cúm H5N1 có nguy cơ bùng phát rất cao nên việc nghiên cứu sản xuất vaccine an toàn và có tính bảo hộ cao với chủng virus lưu hành luôn cần thiết.

Một trong những kỹ thuật tạo giống gốc virus vaccine cúm mang lại hiệu quả cao đã được chứng minh trên thế giới là kỹ thuật di truyền ngược (reverse genetics). Vaccine được tạo ra bằng kỹ thuật di truyền ngược có một số ưu điểm: (i) có độ tinh sạch cao (do sử dụng công nghệ nuôi cấy các dòng tế bào đã được kiểm định cho mục đích sản xuất vaccine); (ii) có tính kháng nguyên cao nhưng độc tính thấp (trong quá trình thiết kế vector, gen HA của virus đã được tạo đột biến nhằm loại bỏ độc tính). Theo qui trình chuẩn của WHO về sản xuất vaccine cúm dựa trên kỹ thuật di truyền ngược, chủng vaccine mới tạo ra sẽ bao gồm 8 phân đoạn cDNA genome virus được biến nạp vào các vector, trong đó 6 phân đoạn cDNA (PB2, PB1, PA, NP, M và NS) mã hóa các protein bảo thủ tạo bộ khung (backbone) của virus, 2 phân đoạn mã hóa protein kháng nguyên bề mặt, dễ biến đổi (HA và NA) của các chủng virus đang lưu hành. Trong đó, phân đoạn gen HA phải được cắt bỏ một đoạn nucleotide mã hóa một số amino acid kiềm để loại bỏ khả năng gây độc mà vẫn giữ nguyên đặc tính kháng nguyên của virus [6-9].

Trong số các nghiên cứu ứng dụng hiệu quả kỹ thuật di truyền ngược đáp ứng mục tiêu trong thời gian ngắn tạo ra chủng virus vaccine có tính bảo hộ cao là kỹ thuật tạo dòng bộ genome virus vào vector pHW2000 của Hoffmann và cộng sự [10]. Hệ vector pHW2000 có pol I-pol II cho phép nhân bản tạo sợi âm RNA của virus và mRNA virus từ các sợi khuôn DNA chèn trong plasmid [11], giúp

tái tạo hiệu quả hạt virus sau khi chuyển nhiễm vector tái tổ hợp vào tế bào động vật nuôi cấy thích hợp.

Xuất phát từ nhu cầu cần có vật liệu vector mang các phân đoạn của virus cúm, nghiên cứu của chúng tôi đã tạo dòng riêng rẽ 6 phân đoạn gen PB2, PB1, PA, NP, M và NS vào vector pHW2000, sẵn sàng chuẩn bị cho sự kết hợp với vector chứa phân đoạn HA và NA của các chủng virus đang lưu hành hay mới xuất hiện. Từ đó bằng kỹ thuật di truyền ngược, 8 phân đoạn gen có trong 8 vector riêng rẽ sẽ tái tổ hợp với nhau (reassortment) tạo nên virus cúm hoàn chỉnh làm chủng gốc để sản xuất vaccine, sẽ đáp ứng nhanh chóng nhu cầu về chủng vaccine đặc hiệu phòng chống dịch bệnh cúm A.

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày các công đoạn thiết kế và tách dòng sáu phân đoạn RNA hệ gen từ một chủng virus cúm NIBRG-14 (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) vào vector pHW2000 để chuẩn bị cho việc tổ hợp với các plasmid mang phân đoạn gen H5 và N1, tạo chủng virus tái tổ hợp làm giống gốc cho sản xuất vaccine phòng chống cúm A/H5N1.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Chủng virus NIBRG-14 do NIBSC (Vương quốc Anh) cung cấp làm vật liệu cho tách dòng, là virus cúm A chứa 6 phân đoạn gen (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) mã hóa các protein khung tách từ chủng cúm A/PR/8/34 (H1N1), kết hợp với phân đoạn HA (H5) và NA (N1) từ chủng A/Vietnam/1194/2004 (H5N1).

Các loại vector và tế bào: Gồm vector pHW2000 do Bệnh viện Nhi St. Jude (Mỹ) cung cấp; vector pBT (Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam); tế bào khả biến *E. coli* DH5 α (Mỹ). Các bộ kit dùng để tách chiết và tinh sạch DNA plasmid, tinh sạch sản phẩm PCR của các hãng Qiagen (Đức) và Roche (Đức). Các cặp mồi được cung cấp bởi hãng Invitrogen (Mỹ).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách RNA tổng số từ chủng virus NIBRG-14 và tổng hợp cDNA

Tách chiết RNA tổng số của chủng NIBRG-14 bằng kit Tripure Isolation Reagent (Sigma-Aldrich). RNA sau tách chiết được chuyển thành cDNA sử dụng kit ReverdAid First Stand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) với môi Uni12 có trình tự 5' AGCAAAAGCAGG 3' bao gồm 12 nucleotide bảo thủ ở đầu 3' của tất cả các phân đoạn genome virus cúm A [10].

2.2.2. Tách dòng 6 phân đoạn gen khung mã hóa protein bảo thủ của virus (PB2, PB1, PA, NP, M, NS)

PCR khuếch đại cDNA của 6 phân đoạn gen (PB2, PB1, PA, NP, M, NS), sử dụng enzyme polymerase đọc sửa (proof-reading) để tránh đột biến không mong muốn với các cặp môi đặc hiệu cho từng gen (Bảng 1).

Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose, tinh sạch bằng kit GeneJET TM Gel Extraction Kit (Qiagen) và gắn vào vector pBT, biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α , cấy trải trên môi trường LB bổ sung ampicillin, X-gal, IPTG, và ủ ở 37°C trong 16 giờ. Chọn dòng

khủng lạc mang plasmid tái tổ hợp bằng phương pháp colony-PCR. Tách DNA plasmid sử dụng kit High Pure Plasmid Isolation (Roche). Xác định trình tự 6 phân đoạn gen mã hóa 6 protein khung virus bằng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM® 3100-Avant™ Genetic Analyzer (Applied Biosystems), sử dụng bộ hóa chất BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. Trình tự các gen được phân tích bằng phần mềm DNA Star và BioEdit (Mỹ). Chọn lọc các dòng chứa cDNA của từng gen có trình tự nucleotide chính xác 100% so với các gen của chủng virus chuẩn NIBRG-14 công bố trên Ngân hàng gen (GenBank, NCBI) để tách dòng vào vector pHW2000 theo phương pháp của Hoffmann và cộng sự [10, 12].

Vector pHW2000 và từng phân đoạn gen (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) được cắt với enzyme *Bsm*BI, sau đó thực hiện phản ứng ghép nối từng đoạn gen vào vector sử dụng T4 DNA ligase để tạo 6 vector tái tổ hợp. Biến nạp sản phẩm ghép nối vào tế bào *E. coli* DH5 α , chọn lọc dòng mang plasmid tái tổ hợp theo phương pháp colony-PCR. Các dòng dương tính với plasmid tái tổ hợp được tách chiết DNA plasmid, tinh sạch và xác định trình tự gen để đảm bảo 6 vector mang 6 phân đoạn gen khung của virus không bị đột biến.

Bảng 1. Các cặp môi đặc hiệu sử dụng trong tách dòng gen (theo Hoffmann và cộng sự) [10]

Gen	Môi xuôi	Môi ngược	Sản phẩm (bp)
PB2	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGC AGGTC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACA AGGTCGTTT	2341+29
PB1	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGC AGGCA	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACA AGGCATTT	2341+29
PA	TATTCGTCTCAGGGAGCGAAAGC AGGTAC	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACA AGGTA CTT	2233+29
NP	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGC AGGGTA	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACA AGGGTATTTTT	1565+29
M	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGC AGGTAG	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACA AGGTAGTTTTT	1027+29
NS	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGC AGGGTG	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACA AGGGTGTTTT	890+29

Ghi chú: AGCGAAAGCAGG, AGCAAAAGCAGG và AGTAGAAACAAGG: Trình tự bảo thủ trên gen virus đầu 5' và 3'; CGTCTC: vị trí cắt của enzyme *Bsm*BI (Bm).

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tách RNA tổng số của virus cúm

RNA tổng số tách chiết từ chủng virus cúm NIBRG-14 được kiểm tra bằng dụng cụ quang phổ Nanodrop. Kết quả các mẫu RNA sau tách chiết có nồng độ RNA trong khoảng 30,1 – 46,2 ng/ μ l và độ sạch thể hiện ở tỷ số A260/280 khoảng 1,86 - 1,92. Với nồng độ RNA và độ tinh sạch như vậy đảm bảo tiêu chuẩn dùng làm khuôn để tiến hành phản ứng tổng hợp cDNA.

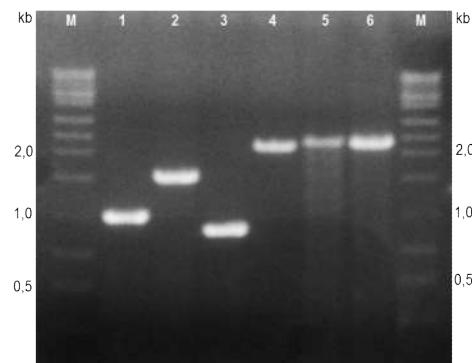
3.2. Khuếch đại, xác định trình tự và chọn dòng 6 phân đoạn gen (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) mã hóa protein khung virus

Các cDNA mã hóa protein bảo thủ (bộ khung virus) được khuếch đại bằng phản ứng phiên mã ngược nhờ enzyme Reverse Transcriptase với mỗi Uni12 được thiết kế dựa theo phương pháp của Hoffmann và cộng sự [10]. Kết quả đã tổng hợp được cả 6 phân đoạn gen đặc hiệu chỉ xuất hiện một băng vạch duy nhất có trọng lượng phân tử đúng theo lý thuyết. Cụ thể, sản phẩm RT-PCR của các phân đoạn thu được khi kiểm tra trên gel agarose 1,5% có kích thước như sau: phân đoạn M khoảng 1100 bp, phân đoạn NP khoảng 1600 bp, phân đoạn NS khoảng 900 bp, phân đoạn PA khoảng 2300 bp, phân đoạn PB1 khoảng 2400 bp, phân đoạn PB2 khoảng 2400 bp (Hình 1).

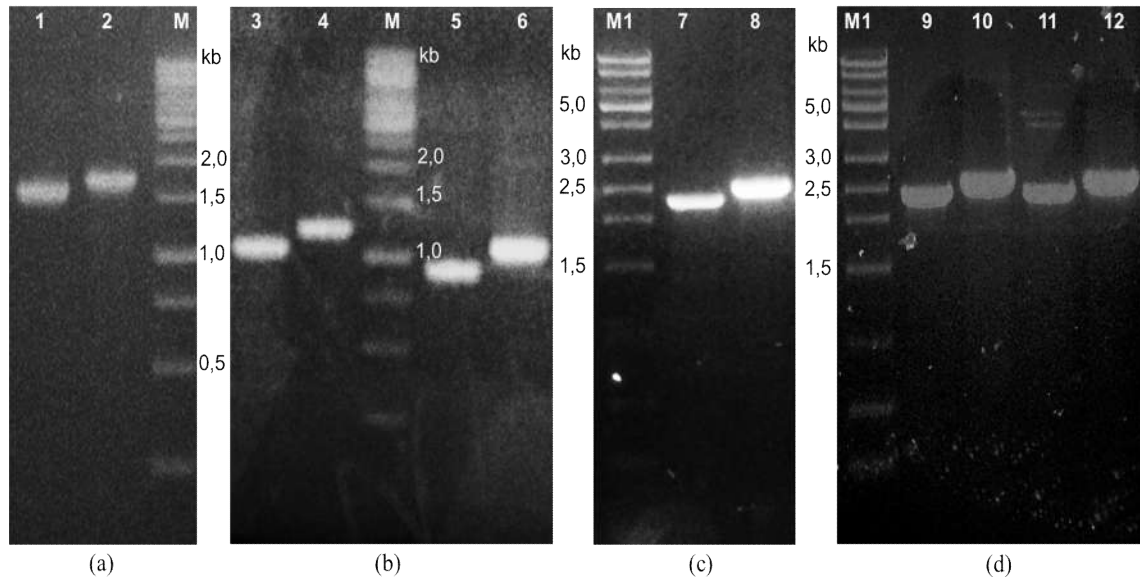
Sáu phân đoạn gồm PB2, PB1, PA, NP, M và NS tách từ chủng virus NIBRG-14 tạo bộ khung virus cúm A sau khi nhân bản bằng RT-PCR được tạo dòng vào vector pBT, biến nạp vào *E. coli* DH5 α và cấy trải trên môi trường LB bổ sung kháng sinh chọn lọc. Các khuẩn lạc trắng, mọc riêng rẽ được lựa chọn để thực hiện phản ứng conoly-PCR với 2 loại môi là môi đặc hiệu bắt cặp trên từng phân đoạn (cho phép nhân bản toàn bộ trình tự nucleotide của phân đoạn đích) và môi pUC18 bắt cặp trên vector pBT (nhân bản toàn bộ gen đích và một phần trình tự nucleotide của vector pBT ở hai đầu gen đích). Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm conoly-PCR trên gel agarose (Hình 2) cho thấy đã biến nạp thành công 6 phân đoạn chứa các

gen mã hóa protein khung virus cúm vào vector pBT (sản phẩm conoly-PCR khi nhân gen với môi đặc hiệu gen chứa một phân đoạn đặc hiệu duy nhất có kích thước tương ứng với kích thước tính toán theo lý thuyết của từng gen, và khi nhân gen với môi pUC18 bắt cặp trên vector chứa chỉ một phân đoạn đặc hiệu có kích thước lớn hơn khoảng 0,15kb so với sản phẩm nhân các phân đoạn gen bằng môi đặc hiệu gen). Điều đó càng được khẳng định sau khi tách DNA plasmid của các dòng khuẩn lạc dương tính với phản ứng conoly-PCR, tinh sạch và đọc trình tự nucleotide của từng gen theo cả chiều xuôi và chiều ngược bằng môi đặc hiệu từng phân đoạn gen: sản phẩm conoly-PCR gen NP có kích thước 1594 bp; gen M - 1056 bp; gen NS - 919 bp; gen PA - 2262 bp; gen PB1 và PB2 - 2370 bp.

Kích thước và trình tự nucleotide của từng gen đã được so sánh với kích thước và trình tự nucleotide tương ứng của từng phân đoạn ở chủng NIBRG-14 công bố trên Ngân hàng gen để lựa chọn các dòng có kết quả đọc trình tự nucleotide phân đoạn gen đích được xác định có độ tương đồng 100% so với trình tự phân đoạn của chủng virus gốc NIBRG-14 đã công bố trên Ngân hàng gen để tiếp tục dòng hóa vào vector pHW2000, sử dụng enzyme cắt *Bsm*BI và enzyme nối T4 DNA ligase.



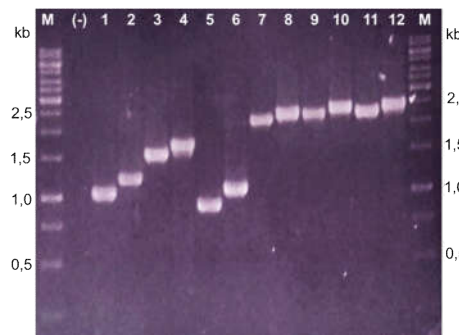
Hình 1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm RT-PCR 6 phân đoạn chứa gen mã hóa protein khung virus cúm. M: Marker 1kb (Fermentas); 1: phân đoạn M; 2: phân đoạn NP; 3: phân đoạn NS; 4: phân đoạn PA; 5: phân đoạn PB1; 6: phân đoạn PB2.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR của 6 phân đoạn NP (a), M và NS (b), PA (c), PB1 và PB2 (d) sử dụng cặp mồi đặc hiệu của từng phân đoạn và cặp mồi pUC18 bắt cặp trên vector. 1,2: phân đoạn NP; M: Marker 1kb (Fermentas); 3,4: phân đoạn M; 5, 6: phân đoạn NS; M1: Marker HighRanger 1kb DNA Ladder; 7,8: phân đoạn PA; 9,10: phân đoạn PB1; 11,12: phân đoạn PB2.

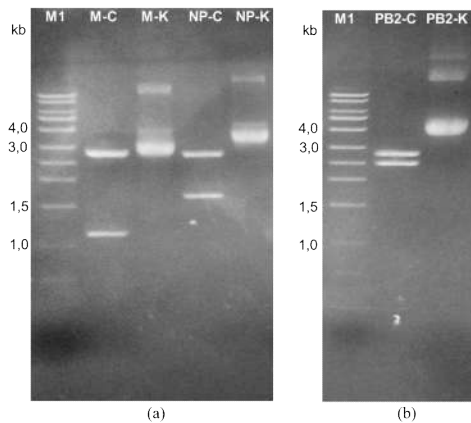
3.3. Tách dòng 6 phân đoạn chứa gen PB2, PB1, PA, NP, M và NS vào vector pHW2000

Kết quả tách dòng và kiểm tra sự có mặt của phân đoạn đích trong vector pHW2000 bằng PCR với hai loại mồi là mồi đặc hiệu của từng phân đoạn và mồi bắt cặp trên vector (Hình 3) chỉ ra đã biến nạp thành công 6 phân đoạn chứa gen mã hóa protein khung virus cúm vào 6 vector pHW2000 với sản phẩm colony-PCR của từng phân đoạn khi nhân lên với mồi đặc hiệu hay mồi bắt cặp trên vector cũng chỉ xuất hiện một băng đặc hiệu duy nhất có kích thước đúng theo lý thuyết. Điều đó chứng tỏ 6 phân đoạn chứa gen PB2, PB1, PA, NP, M và NS đã được biến nạp thành công vào 6 vector pHW2000 (mỗi vector mang một phân đoạn cDNA tương ứng của virus cúm).



Hình 3. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của 6 phân đoạn gen khung với mồi đặc hiệu của từng phân đoạn và mồi vector pHW2000. M: marker 1kb (Fermentas); (-): đối chứng âm; 1, 2: phân đoạn M; 3, 4: phân đoạn NP; 5,6: phân đoạn NS; 7,8: phân đoạn PA; 9, 10: phân đoạn PB1; 11, 12: phân đoạn PB2 (sản phẩm phản ứng PCR sử dụng mồi bắt cặp trên vector có kích thước lớn hơn khoảng 0,2kb so với sản phẩm phản ứng PCR nhân các phân đoạn gen bằng mồi đặc hiệu tương ứng).

Kết quả biến nạp được kiểm tra bằng cắt với enzyme giới hạn: ví dụ với vector pHW2000-M và pHW2000-NP khi cắt bằng cặp enzyme *NheI* và *SmaI* cho sản phẩm cắt khi chạy điện di kiểm tra xuất hiện 2 băng vạch: một băng có kích thước lớn tương ứng với kích thước vector pHW2000 và một băng kích thước nhỏ hơn tương ứng với kích thước của phân đoạn M (1056 bp) và phân đoạn NP (1594 bp); vector pHW2000-PB2 cắt bằng *NheI* và *SmaI* cũng xuất hiện 2 băng, một băng kích thước lớn tương ứng với kích thước vector pHW2000 và một băng kích thước tương ứng với kích thước phân đoạn PB2 là 2370 bp (Hình 4).



Hình 4. Cắt kiểm tra vector tái tổ hợp pHW2000-M, pHW2000-NP (a) và vector pHW2000-PB2 (b) bằng cặp enzyme *NheI* và *SmaI*. M1: marker High Ranger 1kb DNA Ladder; M-C: sản phẩm cắt vector pHW2000-M; M-K: vector pHW2000-M không cắt với enzyme; NP-C: sản phẩm cắt vector pHW2000-NP; NP-K: vector pHW2000-NP không cắt với enzyme; PB2-C: sản phẩm cắt vector pHW2000-PB2; PB2-K: vector pHW2000-PB2 không cắt với enzyme.

Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự và kết quả chứng minh chúng tôi đã tách dòng thành công 6 phân đoạn gen PB2, PB1, PA, NP, M, NS của virus cúm vào 6 vector pHW2000, với trình tự nucleotide của các phân đoạn gen khung đạt độ tương đồng 100% so với trình tự tương ứng của từng phân đoạn ở chủng

NIBRG-14 công bố trên Ngân hàng gen. Bộ khung vector pHW2000 tái tổ hợp này là nguồn vật liệu cho thí nghiệm biến nạp vào tế bào vật chủ, khi kết hợp với vector mang phân đoạn HA (H5) và NA (N1) chứa gen kháng nguyên bề mặt của virus cúm, để tái tạo chủng virus tái tổ hợp làm giống gốc cho sản xuất vaccine phòng chống virus H5N1.

4. Kết luận

Đã tách dòng thành công 6 phân đoạn gen khung virus cúm (PB2, PB1, PA, NP, M, NS) từ chủng NIBRG-14 vào 6 vector pHW2000. Bộ khung gồm 6 vector pHW2000 tái tổ hợp này khi kết hợp với vector chứa phân đoạn gen kháng nguyên HA và NA của virus cúm sẽ cho phép tái tạo chủng virus tái tổ hợp trong tế bào động vật bằng kỹ thuật di truyền ngược.

Các plasmid pHW2000 tái tổ hợp đã được tách chiết, có độ tinh sạch cao, phù hợp cho thí nghiệm biến nạp vào tế bào vật chủ để tái tạo virus tái tổ hợp làm giống gốc cho sản xuất vaccine.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp Nhà nước: “Nghiên cứu tạo giống gốc để sản xuất vắc-xin cúm A/H5N1” 2016-2018 (Mã số SPQG.05b.03), tại Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] Lin T., Wang G., Li A., Zhang Q., Wu C., Zhang R., Cai Q., Song W., and Yuen K.Y. - The hemagglutinin structure of an avian H1N1 influenza A virus, *Virology* 392 (2009) 73–81.
- [2] Bosch F. X., Garten W., Klenk H. D., and Rott R. - Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins, primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability DNA pathogenicity of avian influenza viruses, *Virology* 113 (1981) 725–773.

- [3] Tung D. H., Quyen D. V., Tung N., Hanh T. X., Thang N. N., and Khang D. D. - Molecular characterization of a H5N1 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.2.1b circulating in Vietnam in 2011, *Veterinary Microbiology* 165 (2013) 341–348.
- [4] Hoàng Thị Thu Hằng, Nguyễn Trung Nam, Nguyễn Thị Bích Nga, Đinh Duy Kháng, Lê Thanh Hòa, Lê Trần Bình - Áp dụng phương pháp đột biến điểm định hướng Phoenix để loại bỏ đoạn độc trong gen Hemagglutinin (HA) của virus cúm A/H5N1, *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6 (2008) 555–561.
- [5] Suzuki T., Takahashi T., Guo C. T., Kazuya I. P., Hidari J., Miyamoto D., and Goto H. - Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication, *Journal of Virology* 79 (2005) 11705–11715.
- [6] Ping J., Lopes T. J., Nidom C. A., Ghedin E., Macken C. A., Fitch A., Imai M., Maher E. A., Neumann G., and Kawaoka Y. - Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses, *Nature Communications* 6 (2015) 8148.
- [7] Shigaki T. and Hirschi K. D. - Use of class II restriction enzymes for site-directed mutagenesis: variations on Phoenix mutagenesis, *Analytical Biochemistry* 298 (2001) 118–120.
- [8] Allemandou F., Nusberger J., Brunner H. R., and Brakch N. - Rapid site-directed mutagenesis using two-PCR-generated DNA fragments reproducing the plasmid template, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 3 (2003) 202–207.
- [9] Chen X., Liu W., Quinto I., and Scala G. - High efficiency of site-directed mutagenesis mediated by a single PCR product, *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 682–684.
- [10] Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R. G., and Perez D. R. - Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses, *Arch Virol* 146 (2001) 2275–2289.
- [11] Czudai-Matwich V., Schnare M., and Pinkenburg O. - A simple and fast system for cloning influenza A virus gene segments into pHW2000- and pCAGGS-based vectors, *Archives of Virology* 158 (2013) 2049–2058.
- [12] Hoffmann E., Krauss S., Perez D., and Webster R. G. - Eight-plasmid system for rapid generation of influenza virus vaccines, *Vaccine* 30 (2002) 3165–3170.

Cloning Six Backborn Gene Segments of Influenza into pHW2000 Vector for Preparation of A/H5N1 Vaccine Virus Strains by Reverse Genetics Method

Nguyen Thi Thu Hang¹, Nguyen Hung Chi^{2,3}, Hoang Thi Thu Hang^{2,3},
Vu Huyen Trang^{3,4}, Chu Hoang Ha^{2,3,4}, Nguyen Trung Nam^{2,3,4}

¹ Vietnam Forestry University, Xuan Mai, Chuong My, Hanoi, Vietnam

² Applied DNA Technology Department, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³ National Key Laboratory of Gene Technology, Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

⁴ Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, 18 Hoang Quoc Viet, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Abstract: A/H5N1 virus belongs to the genus of influenza A, within the family *Orthomyxoviridae*. The genome contains 8 segments in order: PB2, PB1, PA, HA, NP, NA, M, NS. Among influenza virus subtypes, H5N1 possesses the highest pathogenicity and causes a high mortality in poultry. This virus subtype is able to infect human with severe respiratory symptoms and even leads to a high

number of death. Vaccination is one of the most effective ways to prevent A/H5N1 influenza infection. Reverse genetics allows the manipulation of influenza genome for the use as a masterseed for vaccine production. This technique is manipulated with all segments of the viral genome generating infectious virions for vaccine preparation using a transfection system of viral cDNA into mammalian cells. In this paper, we present the design and cloning six gene segments (M, NP, NS, PA, PB1, PB2) from NIBRG-14 (WHO) strain into the pHW2000 expression vector. Our results provide the important six-plasmid system which will combine with H5- and N1-plasmids for the rapid and reproducible generation of reassortant influenza A strains.

Keywords: Cloning, H5N1, pHW2000, reverse genetics, vaccine, virus.