

RNA CAN THIỆP LÊN GEN VP28 CỦA WSSV BIỂU HIỆN BẰNG BACULOVIRUS TÁI TỔ HỢP TRÊN TẾ BÀO CÔN TRÙNG

Dặng Thị Hoàng Oanh¹, Marielle van Hunten² và Peter John Wakker³

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) has been widely used to inhibit virus infection. To target White spot syndrome virus (WSSV) in shrimp using RNAi, envelop protein gene VP28 was selected. To test if high level expression of the target gene could be inhibited using RNAi, the efficacy of selected dsRNAs were tested in insect cells using recombinant baculovirus expressing the WSSV VP28 from the polyhedrin promoter. Efficient silencing was demonstrated for gene target with levels of knock-down ranging from 80-100%.

Keywords: RNAi, WSSV, dsRNA

Title: RNA interference on recombinant baculovirus expressing wssv vp28 gene in insect cell system

TÓM TẮT

RNA can thiệp (RNAi) hiện đang được sử dụng rất phổ biến để ức chế sự lây nhiễm của vi-rút. Gen VP28 của WSSV được chọn làm gen mục tiêu để ức chế sự lây nhiễm WSSV ở tôm bằng RNAi. Để đánh giá khả năng can thiệp của RNAi lên gen mục tiêu có biểu hiện ở mức độ cao, hiệu quả ức chế của dsRNA lên gen VP28 biểu hiện bằng baculovirus tái tổ hợp từ khởi điểm polyhedrin trên tế bào côn trùng được xác định. Kết quả cho thấy hiệu quả ức chế gen mục tiêu đạt được ở mức 80-100%.

Từ khóa: RNAi, WSSV, dsRNA

1 GIỚI THIỆU

RNA can thiệp (RNA interference-RNAi) hiện đang được sử dụng rất phổ biến trong nghiên cứu chức năng gen và ức chế sự sao chép của vi-rút ở người, động vật và thực vật (Haasnoot *et al.*, 2003; Stram & Kuzntzova, 2006). RNAi là quá trình sinh học xảy ra trong tế bào được kích hoạt bởi các RNA xoắn kép (double-stranded RNA-dsRNA). Sự hiện diện của các dsRNA sẽ làm hoạt hóa men RNase III-like nuclease (còn gọi là DICER) để cắt các dsRNA thành những đoạn ngắn có kích thước khoảng 22-25 nucleotide (gọi là short interfering RNA-siRNA). Các siRNA sẽ kết hợp với một nuclease nhiều thành phần (còn gọi là RISC) để làm hủy các RNA thông tin (mRNA) có chứa trình tự các nucleotid tương đồng (homology) với các dsRNA đó (Bernstein *et al.*, 2001). RNAi hiện đang được xem như là một biện pháp mới có thể giúp phòng bệnh vi rút ở người và động vật trong đó có thủy sản. Gen mục tiêu phù hợp cho RNAi là những gen cần thiết cho sự sao chép hay

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

² Intervet Schering-Plough Animal Health, Wim de Körverstraat 35, 5831 AN Boxmeer, the Netherlands

³ CSIRO Livestock Industries, Australian Animal Health Laboratory, 5 Portarlington Road, Geelong VIC 3220, Australia

sự lây nhiễm của vi-rút trên vật chủ (Valdes *et al.*, 2003; Leung & Whittaker, 2005).

Trong số các vi-rút gây bệnh ở tôm thì vi-rút đốm trắng (WSSV) gây thiệt hại nhiều nhất cho nghề nuôi tôm khắp thế giới từ những năm 1990 (Nadala *et al.*, 1998, Wongteerasupaya *et al.*, 1995). WSSV là loài chuẩn của giống Whispovirus thuộc họ *Nimaviridae* (Vlak *et al.*, 2005). VSSV là vi-rút DNA có hệ gen khoảng 300 kbp (van Hulten *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2001) và có ít nhất 39 protein (Tsai *et al.*, 2006). VP28 là một trong số các protein vỏ nằm ở OFR1 của WSSV (van Hulten *et al.*, 2001) là protein có vai trò gây lây nhiễm hệ thống của WSSV (van Hulten *et al.*, 2001). Các dòng tế bào côn trùng được sử dụng rất phổ biến cho các nghiên cứu về chức năng của gen (Cherbas *et al.*, 1994, Schneider & Blumenthal, 1978) và các baculovirus tái tổ hợp trên tế bào côn trùng như tế bào *Spodoptera frugiperda* (Sf) được cũng sử dụng rất phổ biến để biểu hiện gen (Summers & Smith, 1987). Trong nghiên cứu này các gen VP28 của WSSV được chọn để biểu hiện bằng baculovirus tái tổ hợp (AcMNPV) trên tế bào côn trùng *Spodoptera frugiperda* và *Drosophila melanogaster* nhằm xác định hiệu quả can thiệp của dsRNA lên sự biểu hiện của gen này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nuôi tế bào

Tế bào côn trùng *Spodoptera frugiperda* (Sf21) được nuôi ở 27 °C trong chai nuôi tế bào 25cm² có chứa 4 ml môi trường Grace's (Sf21) (Gibco BRL, Life Technologies) có bổ sung 10 % foetal bovine serum. Qui trình cấy chuyển các dòng tế bào được thực hiện theo phương pháp của (Summers & Smith, 1987).

2.2 Tạo dsRNA

Đoạn DNA của gen mục tiêu được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng trình tự mỗi ở bảng 1 (Oanh, 2008). dsRNA được tổng hợp bằng kit megascript T7 RNAi (Ambion) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 1: Trình tự mỗi sử dụng khuếch đại các gen mục tiêu bằng phương pháp PCR để tạo dsRNA

Gen mục tiêu	Sản phẩm PCCR (bp)	Mạch khuôn	Trình tự
VP15	203	WSSV DNA	fw: 5'-CTGCAGAAAAATGGTTGCCCGAAGC-3' rv: 5'-GGAAGAATTAACGCCTTGACTTGC-3'
VP28	631	WSSV DNA	fw: 5'-GGATCCATGGATCTTTCTTTCACTCTTTC-3' rv: 5'-CACGATTTATTTACTCGGTCTCAG-3'
GP64	598	AcMNPV DNA	fw: 5'-TCACGCCGTCTCGATGAAGCACAG-3' rv: 5'-TTGGCGGCGGCGGCATTCTG-3'
IE1	556	AcMNPV DNA	fw: 5'-ACGACTACAATTCCAACAGGTCTC-3' rv: 5'-ATTTGACTCACATACGGCGATAC-3'

2.3 Baculovirus tái tổ hợp biểu hiện gen VP28 của WSSV

2.3.1 Tái tổ hợp *AcMNPV-D/G-VP28*

Hệ thống biểu hiện gen baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen) được sử dụng để biểu hiện cùng lúc green fluorescent protein (GFP) từ khởi điểm p10 và gen VP28 của WSSV từ khởi điểm polyhedrin trên tế bào *Sf21* (van Hulten *et al.*, 2002).

2.3.2 Kỹ thuật xung điện, chuyển gen và chiết tách bacmid DNA

Một μ l Fastbac-D/G-VP28 véc tơ (300ng/ μ l) (van Hulten *et al.*, 2002) được đưa vào 50 μ l tế bào khả nạp *E. coli* DH10BTM (Invitrogen) bằng kỹ thuật xung điện sử dụng thiết bị Bio-Rad MicroPulser. Tế bào *E. coli* sau đó lập tức được phục hồi trong 1 ml môi trường Luria-Bertani (LB) và ủ 2.5 giờ ở 37°C trên máy lắc 225 vòng/phút. 100 μ l tế bào vi khuẩn sau đó được tán lên mặt đĩa thạch LB có chứa Bluo-gal (100 μ g/ml), IPTG (40 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml), tetracycline (10 μ g/ml) và gentamycin (7 μ g/ml). Đĩa thạch LB sau đó được ủ 48 giờ ở 37°C. Để xác định khuẩn lạc có chứa bacmid tái tổ hợp, các khuẩn lạc màu trắng được cấy chuyển sang đĩa thạch LB có chứa Bluo-gal (100 μ g/ml), IPTG (40 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml), tetracycline (10 μ g/ml) và gentamycin (7 μ g/ml) và ủ qua đêm ở 37°C. Sau đó khuẩn lạc được nuôi qua đêm ở trong 5 ml môi trường LB có chứa kanamycin (50 μ g/ml) và gentamycin (7 μ g/ml) ở 37°C trên máy lắc 225 vòng/phút. Dung dịch vi khuẩn được ly tâm 2000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C rồi rút bỏ môi trường và hoà tan trong 200 μ l đệm lạnh GTE (50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.1 mg/ml RNase). Sau đó cho vào 400 μ l dung dịch NaOH/SDS solution (0.2 N NaOH; 1 % SDS), 300 μ l 3 M sodium acetate, pH 5.5 và để 5 phút trong nước đá rồi ly tâm 14,000 vòng/phút trong 10 phút. Phần dung dịch được chuyển sang ống ependorft mới và cho vào 600 μ l isopropanol lạnh, trộn đều, và ly tâm 14,000 vòng/phút trong 15 phút. Phần dịch được rút bỏ và phần viên được rửa bằng 500 μ l dung dịch 70 % ethanol. DNA sau đó được làm khô ở nhiệt độ phòng trong 15 phút và hoà tan trong 40 μ l TE có chứa 20 μ g/ml RNase A. Tái tổ hợp bacmid DNA được xác định bằng phương pháp PCR sử dụng mồi xuôi M13 (5'- GTTTCCAGTCACGAC-3') và mồi ngược gentamycin (5'-AGCCACCTACTCCCAACATC-3').

2.3.3 Chuyển nạp bacmid DNA vào tế bào *Sf21* để tạo baculovirus tái tổ hợp

Tế bào *Sf21* được nuôi trong đĩa 96 giếng có chứa 2 ml môi trường Grace's bổ sung 10 % FBS ở mật độ khoảng $0.5-1 \times 10^6$ tế bào/ml. Bacmid DNA (1 μ g/ml tế bào) được chuyển nạp vào tế bào côn trùng bằng dung dịch chuyển nạp Cellfectin (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ba ngày sau khi chuyển nạp, dung dịch nuôi tế bào côn trùng được thu và giữ ở 4 °C.

2.3.4 Nhân bản vi-rút

Tế bào *Sf21* cells (1.2×10^7 tế bào) được nuôi trong chai 75 cm² ở 27°C. Sau khi nuôi qua đêm, dung dịch nuôi tế bào được rút bỏ và tế bào được gây nhiễm với 3 ml môi trường Grace's có chứa 10 % FBS và baculovirus tái tổ hợp ở mức độ nhiễm (multiplicity of infection-moi) là 0.5 TCID₅₀/tế bào. Sau đó tiếp tục ủ tế bào ở 27 °C trong 1 giờ và lắc nhẹ mỗi 20 phút rồi rút bỏ dung dịch gây nhiễm và rửa

tế bào với 3 ml môi trường Grace's có chứa 10 % FBS. Sau đó cho vào 12 ml môi trường và ủ ở 27 °C từ 48-72 giờ. Tế bào Sf21 sau đó được chuyển sang ống nghiệm 10 ml và li tâm 2,000 vòng/phút trong 5 phút. Phần dung dịch sau khi li tâm được chuyển sang ống nghiệm mới và giữ ở 4 °C.

2.3.5 Xác định hàm lượng pha loãng tối đa (End-point dilution)

Dịch chiết chứa vi-rút sau khi gây nhiễm với tế bào Sf21 được pha loãng 10 lần từ 10^{-1} đến 10^{-9} trong ống eppendorf. Sf21. Sau đó 90 μ l tế bào Sf21 (mật độ 1.5×10^6 tế bào/ml trong môi trường Grace's có bổ sung 10 % FBS) được cho vào các ống eppendorf có chứa vi-rút đã được pha loãng. Tiếp đến, 10 μ l dung dịch vi-rút/tế bào được chia vào các giếng của đĩa 60 giếng. Mỗi mật độ vi-rút được lập lại 6 lần (A đến F), bắt đầu từ mật độ thấp nhất. Dãy giếng 6 cuối cùng của đĩa được cho vào (10 μ l/giếng) dung dịch tế bào không nhiễm vi-rút để làm đối chứng. Đĩa được ủ 3-7 ngày ở 27 °C trong hộp giữ ẩm. Hàm lượng pha loãng tối đa được xác định bằng cách quan sát hiệu ứng gây độc tế bào ở từng giếng dưới kính hiển vi. Liều gây nhiễm 50% tế bào (TCID₅₀/ml) được tính theo công thức của Reed và Muench (1938): $TCID_{50}/ml = 10^{(a+x)} * 200$, trong đó: a = log n; n = độ pha loãng cao nhất mà số tế bào nhiễm vi-rút lớn hơn 50 %; x = (b-50 %)/(b-c); b = phần trăm số tế bào nhiễm vi-rút ở giếng có độ pha loãng n; c = phần trăm số tế bào nhiễm vi-rút ở giếng có độ pha loãng n gấp 10 lần độ pha loãng n.

2.4 Chuyển nạp dsRNA vào tế bào côn trùng

dsRNA (0.5 μ g/ml tế bào) được chuyển nạp vào tế bào côn trùng (khoảng 1×10^6 tế bào/ml) bằng dung dịch chuyển nạp Cellfectin (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5 Xác định mức độ biểu hiện gen

Hoạt tính của GFP (protein phát huỳnh quang) trên tế bào côn trùng được xác định bằng kính hiển vi quỳnh quang sau 24 và 48 giờ chuyển nạp véc tơ tái tổ hợp AcMNPV-D/G-VP28.

2.6 Đếm tế bào nhiễm vi-rút

Tế bào nhiễm vi-rút và phần trăm số tế bào nhiễm (tế bào phát huỳnh quang) được xác định sau 48 giờ gây nhiễm bằng máy đếm tế bào phát huỳnh quang (fluorescence-activated cell sorter-FACS caliber, Becton Dickinson). Số liệu được xử lý bằng phần mềm CellQuest (Becton Dickinson).

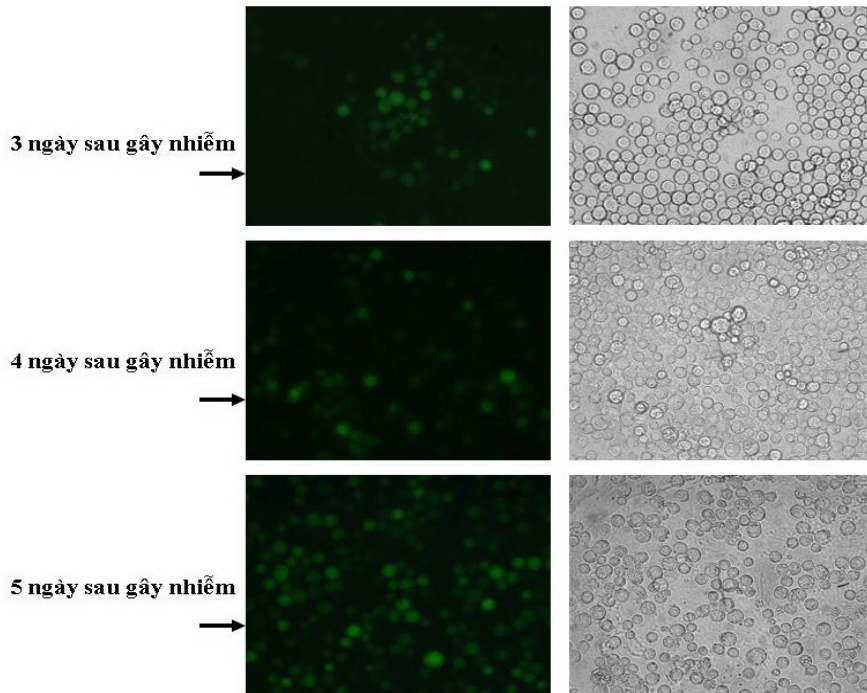
2.7 RT-PCR (Reverse transcriptase PCR)

RNA được chiết tách từ tế bào Sf21 bằng dung dịch TriZol (Invitrogen) và cDNA được tạo bằng kit reverse transcriptase superscript III (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. cDNA (100 ng) được sử dụng để phát hiện gen VP28 của WSSV bằng RT-PCR sử dụng trình tự môi ở bảng 1.

3 KẾT QUẢ

3.1 Gây nhiễm tế bào côn trùng với AcMNPV-WSSV VP28

Hệ thống biểu hiện gen baculovirus Bac-to-Bac được sử dụng để tạo baculovirus tái tổ hợp biểu hiện gen VP28 của WSSV trên tế bào *Sf21*. Gen VP28 được tạo dòng từ khởi điểm polyhedrin trong véc tơ pFastBac-D/GFP. Véc tơ này cũng chứa gen GFP nằm sau khởi điểm p10. Baculovirus tái tổ hợp được đặt tên là *AcMNPV-WSSV-VP28* và khi biểu hiện có thể nhận ra nhờ gen phát huỳnh quang (GFP). Các tế bào *Sf21* nhiễm *AcMNPV-WSSV-VP28* được trình bày ở hình 1.

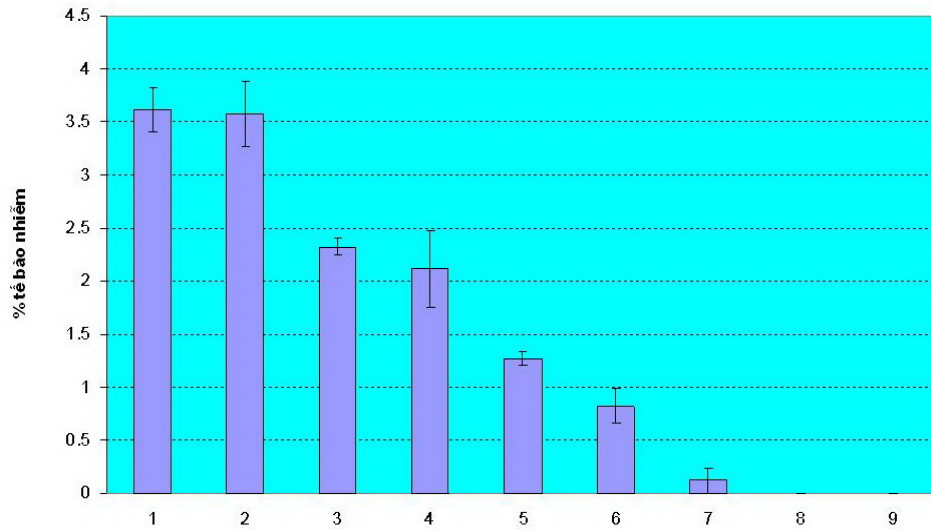


Hình 1: Tế bào SF21 phát huỳnh quang sau khi gây nhiễm baculovirus tái tổ hợp *AcMNPV-WSSV VP28*. Hình bên trái quan sát dưới kính hiển vi phản pha. Hình bên phải quan sát cùng thị trường với hình bên trái nhưng ở chế độ huỳnh quang

3.2 dsRNA can thiệp baculovirus tái tổ hợp biểu hiện gen VP28 của WSSV trên tế bào *Sf21*

Để xác định sự ức chế lây nhiễm baculovirus tái tổ hợp trên tế bào côn trùng *Sf21*, dsRNA được thiết kế có trình tự tương đồng với gen phiên mã IE1 (dsRNA-*AcMNPV-IE1*) gen glycoprotein GP64 của baculovirus (dsRNA-*AcMNPV-GP64*) (Bảng 1). dsRNA cũng được thiết kế có trình tự tương đồng với gen VP28 của WSSV (dsRNA-*WSSV-VP28*; bảng 1) để xác định khả năng ức chế biểu hiện gen VP28 của baculovirus tái tổ hợp khi nhiễm vào tế bào côn trùng. dsRNA-luc (Bảng 1) được sử dụng để làm đối chứng không đặc hiệu. Các hàm lượng dsRNA khác nhau (50, 100 và 150 ng) được chuyển nạp vào 0.1×10^6 tế bào *Sf21* để đánh giá hiệu quả ức chế sự nhiễm baculovirus của theo hàm lượng dsRNA. Tế bào *Sf21* được chuyển nạp dsRNAs và được gây nhiễm *AcMNPV-GFP-VP28*

(M.O.I = 0.001) sau khi chuyển nạp dsRNA 48 giờ. Tế bào được chuyển nạp với nước và được gây nhiễm AcMNPV-GFP-VP28 để làm đối chứng. Số lượng tế bào phát huỳnh quang được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang sau 48 giờ gây nhiễm baculovirus. Mức độ ức chế sự lây nhiễm được tính trên tỉ lệ số tế bào phát quang ở nghiệm thức có chuyển nạp dsRNA và nghiệm thức đối chứng.



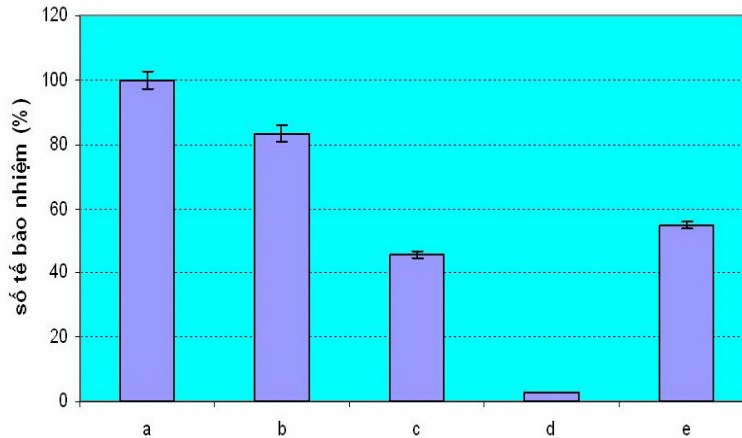
Hình 2: Ảnh hưởng của hàm lượng dsRNA lên sự nhiễm baculovirus trên tế bào côn trùng. (1) đối chứng; (2) dsRNA-luc 100ng; (3) dsRNA-luc 150ng; (4) dsRNA-gp64 100ng; (5) dsRNA-gp64 150ng; (6) dsRNA-IE1 100ng; (7) dsRNA-IE1 50ng; (8) dsRNA-IE1 100ng; (9) dsRNA-IE1 150ng

Hiệu quả can thiệp của dsRNA-AcMNPV-IE1 lên sự nhiễm baculovirus rất cao dao động từ 97-100 %. Sự ức chế lây nhiễm hoàn toàn quan sát được ở nghiệm thức chuyển nạp 100 và 150ng dsRNA (Hình 2). dsRNA có trình tự tương đồng với gen GP64 (dsRNA-AcMNPV-GP64) cũng ức chế sự lây nhiễm baculovirus theo hàm lượng dsRNA được chuyển nạp. Mức độ ức chế giảm khoảng 41 % ở nghiệm thức chuyển nạp 50 ng dsRNA, tăng 65 % ở nghiệm thức chuyển nạp 100ng dsRNA và 77 % ở nghiệm thức chuyển nạp 150 ng dsRNA. Nghiệm thức chuyển nạp dsRNA không đặc hiệu (150 ng dsRNA-luc) thì mức độ ức chế giảm khoảng 26 % so với nghiệm thức đối chứng. Tuy nhiên, dsRNA-luc với hàm lượng 100 ng không ức chế lây nhiễm baculovirus (Hình 2). Kết quả trên cho thấy hiệu quả ức chế tùy thuộc vào hàm lượng dsRNA.

3.3 dsRNA can thiệp sự biểu hiện gen VP28 của baculovirus tái tổ hợp

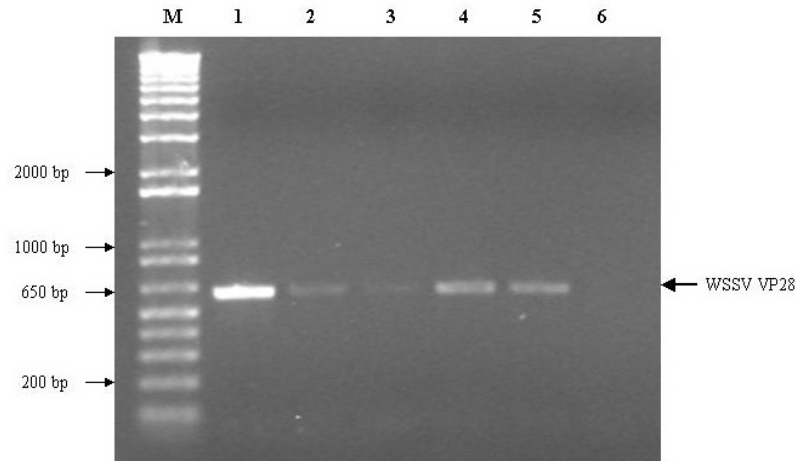
Thí nghiệm được thực hiện để xác định khả năng ức chế lây nhiễm baculovirus tái tổ hợp của dsRNA có trình tự tương đồng với gen VP28 của WSSV (dsRNA-WSSV-VP28). dsRNA đặc hiệu với gen của baculovirus (dsRNA-AcMNPV-IE1 và dsRNA-AcMNPV-GP64) được sử dụng làm đối chứng đặc hiệu và dsRNA-luc được sử dụng làm đối chứng không đặc hiệu. Tất cả các dsRNAs được chuyển nạp với hàm lượng 150 ng vào 10^5 tế bào Sf21. Sau khi chuyển nạp dsRNA 48 giờ, tế bào được gây nhiễm với AcMNPV-GFP-VP28 (M.O.I = 0.001). Tế bào được

chuyển nạp với nước và được gây nhiễm AcMNPV-GFP-VP28 để làm đối chứng. Số lượng tế bào phát huỳnh quang được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang và máy đếm tế bào phát huỳnh quang sau 48 giờ gây nhiễm baculovirus. Dựa trên tỉ lệ số tế bào phát quang ở nghiệm thức có chuyển nạp dsRNA và nghiệm thức đối chứng, mức độ ức chế sự lây nhiễm khoảng 98% được ghi nhận ở nghiệm thức chuyển nạp dsRNA-AcMNPV-IE1. Nghiệm thức chuyển nạp dsRNA-AcMNPV-GP64 có khoảng 71 %, dsRNA-luc không đặc hiệu khoảng 47 %. Nghiệm thức chuyển nạp dsRNA-WSSV-VP28 có mức độ ức chế khoảng 59 % tương đương với nghiệm thức chuyển nạp dsRNA-luc (Hình 3).



Hình 3: Kết quả phân tích FACS tế bào Sf21 sau 48 giờ nhiễm AcMNPV-GFP-VP28. a) đối chứng nhiễm baculovirus (AcMNPV-GFP-VP28); b) tế bào chuyển nạp dsRNA-luc và nhiễm baculovirus; c) tế bào chuyển nạp dsRNA-AcMNPV-GP64 và nhiễm baculovirus; d) tế bào chuyển nạp dsRNA-AcMNPV-IE1 và nhiễm baculovirus; e) tế bào chuyển nạp dsRNA-VP28 và nhiễm baculovirus

Hiệu quả ức chế nhiễm baculovirus biểu hiện gen VP28 của dsRNA-VP28 được xác định qua mức độ biểu hiện của RNA thông tin của gen VP28 (tRNA VP28) được đánh giá bằng RT-PCR sử dụng RNA chiết tách từ tế bào Sf21 thí nghiệm và mỗi phát hiện gen VP28 (bảng 1). Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1.5% agarose cho thấy mức độ biểu hiện của tRNA VP28 ở tế bào Sf21 được chuyển nạp dsRNA-WSSV-VP28 giảm rõ rệt so với tế bào ở các nghiệm thức khác (Hình 4). Từ kết quả này có thể kết luận dsRNA-WSSV-VP28 có khả năng ức chế sự biểu hiện RNA thông tin của gen VP28. Như đã dự đoán, mức độ biểu hiện RNA thông tin của gen VP28 ở nghiệm thức chuyển nạp dsRNA-AcMNPV-IE1 cũng giảm rõ rệt vì dsRNA này gây ức chế rõ rệt sự lây nhiễm baculovirus. Mức độ biểu hiện RNA thông tin của gen VP28 dsRNA-AcMNPV-GP64 thì thấp hơn và dsRNA-luc không đặc hiệu thì không có khả năng ức chế biểu hiện RNA thông tin của gen VP28.



Hình 4: Kết quả điện di trên gel 1.5% agarose mức độ phát hiện RNA thông tin của gen VP28 bằng RT-PCR. M0 thang DNA; 1) tế bào chuyển nạp nước và nhiễm baculovirus; 2) tế bào chuyển nạp dsRNA-WSSV-VP28 và nhiễm baculovirus; 3) tế bào chuyển nạp dsRNA-AcMNPV-IE1 và nhiễm baculovirus; 4) tế bào chuyển nạp dsRNA-AcMNPV-GP64 và nhiễm baculovirus; 5) tế bào chuyển nạp dsRNA-luc và nhiễm baculovirus; 6) tế bào chuyển nạp nước và không nhiễm baculovirus

4 THẢO LUẬN

Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy dsRNA có thể ức chế sự lây nhiễm vi-rút có gen có trình tự tương đồng. Mức độ ức chế của RNAi được đánh giá qua sự biểu hiện gen ở mức độ cao. Rõ ràng dsRNA tương đồng với gen phiên mã (IE1) và gen glycoprotein (GP64) của AcMNPV có thể ức chế sự lây nhiễm của baculovirus trên tế bào Sf21. IE1 là gen cần thiết cho sự khởi đầu của quá trình phiên mã của một số gen sớm ở baculovirus và vì thế ức chế biểu hiện gen IE1 sẽ dẫn đến ức chế sự sao chép của vi-rút (Kovacs *et al.*, 1991). Các thí nghiệm trong nghiên cứu này xác định khả năng ức chế hoàn toàn sự lây nhiễm vi-rút của dsRNA-AcMNPV-IE1. Gen GP64 của AcMNPV là gen cần thiết cho cấu trúc protein của virion giúp cho sự trưởng thành của vi-rút trong tế bào bị nhiễm và d8e63 nhiễm vào tế bào khác (Monsma *et al.*, 1996). Cho nên, khi gen GP64 bị ức chế biểu hiện thì sự hình thành baculovirus cũng bị ức chế dẫn đến sự ức chế khả năng lây nhiễm của chúng. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả của Valdes *et al.* (2003) cho thấy dsRNAs tương đồng với gen IE1 và GP64 của AcMNPV có thể ức chế sự lây nhiễm của baculovirus trong tế bào. Kết quả của nghiên cứu này, bên cạnh trình tự của các dsRNA thì khả năng ức chế sự lây nhiễm vi-rút còn tùy thuộc vào hàm lượng dsRNA sử dụng mà các nghiên cứu trước đây chưa đề cập đến (Means *et al.*, 2003; Valdes *et al.*, 2003).

Westenberg *et al.* (2005) đã chứng minh rằng khi chuyển nạp siRNA tương đồng với gen VP28 của WSSV hoặc siRNA tương đồng với gen GFP vào tế bào Sf21 sẽ gây ức chế baculovirus biểu hiện các gen này nhưng không làm ức chế sự lây nhiễm vi-rút. Như đã nêu ở trên, kết quả nghiên cứu này cho thấy dsRNA không đặc hiệu (dsRNA-luc hoặc dsRNA-VP18) có ảnh hưởng đến sự sao chép

của baculovirus. Cùng với sự giảm đi của mức độ nhiễm vi-rút, mức độ biểu hiện RNA thông tin của gen VP28 ở nghiệm thức có dsRNA-VP28 cũng giảm rõ rệt. Tuy nhiên, mức độ giảm này sai khác không có ý nghĩa so với nghiệm thức có dsRNA-luc. Điều này cho thấy, ngoài hiệu ứng không đặc hiệu của dsRNA lên sự sao chép của vi-rút còn có sự ức chế đặc hiệu lên biểu hiện của gen VP28. Kết quả này tương tự như kết quả của Agrawal *et al.* (2004) đã chứng minh sự ức chế biểu hiện gen aminopeptidase N bằng baculovirus trên tế bào côn trùng bằng dsRNA (khoảng 70%) và siRNAs (khoảng 85%) tương đồng.

5 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu quả ức chế gen VP28 của WSSV gây bệnh ở tôm bằng dsRNA trong điều kiện *in vitro*. dsRNA có trình tự tương đồng với gen VP28 WSSV có thể can thiệp từ 80-100% sự biểu hiện của gen VP28 biểu hiện bằng baculovirus tái tổ hợp. Kết quả mở ra triển vọng cho nghiên cứu ứng dụng RNAi để phòng bệnh đốm trắng ở tôm nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., 2004. SiRNA-directed silencing of transgene expressed in cultured insect cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320, 428-434.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S., and Hannon, G. J. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
- Cherbas, L., Moss, R., Cherbas, P., 1994. Transformation techniques for *Drosophila* cell lines. In: Goldstein, L.S.B., Fyrberg, E.A. (Eds.). *Methods in Cell Biology*. Academic Press, San Diego.
- Dang Thi Hoang Oanh, 2008. Inhibition of viral infection by using RNA interference. PhD thesis. Department of Molecular and Microbial Sciences. The University of Queensland. Australia.
- Haasnoot, P.C.J., Cupac, D., Berkhout, B., 2003. Inhibition of virus replication by RNA interference. *Journal of Biomedical Science* 10, 607-616.
- Kovacs, G.R., Guarino, L.A., Summers, M.D., 1991. Novel regulatory properties of the IE1 and IE0 transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Journal of virology* 65, 5281-5288.
- Leung, R.K.M., Whittaker, P.A., 2005. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics* 107, 222-239.
- Means, J.C., Muro, I., Clem, R.J., 2003. Silencing of the baculovirus Op-iap3 gene by RNA interference reveals that it is required for prevention of apoptosis during *Orgyia pseudotsugata* M nucleopolyhedrovirus infection of Ld652Y cells. *J Virol* 77, 4481-4488.
- Monsma, S.A., Oomens, A.G.P., Blissard, G.W., 1996. The GP64 Envelope Fusion Protein Is an Essential Baculovirus Protein Required for Cell-to-Cell Transmission of Infection. *Journal of Virology* 70, 4607-4616.
- Nadala, E.C.B., Tapay, L.M., Loh, P.C., 1998. Characterization of a non-occluded baculovirus-like agent pathogenic to penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 33, 221-229.
- Reed, L.J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27, 493-497.

- Schneider, I., Blumenthal, A.B., pp. 399, 166–169., 1978. *Drosophila* cell and tissue culture. In: Ashburner, M., Wright, T.R.F. (Eds.), *The Genetics and Biology of Drosophila*. Academic Press, London. 265–315.
- Stram, Y., Kuzntzova, L., 2006. Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus Genes* 32, 299-306.
- Summers, M.D., Smith, G.E., 1987. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555.
- Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Wang, A.H.J., Zhuang, Y., Walker, P.J., Kou, G.H., Lo, C.F., 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument, and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology* 80, 3021-3029.
- Valdes, V.J., Sampieri, A., Sepulveda, J., Vaca, L., 2003. Using Double-stranded RNA to Prevent in Vitro and in Vivo Viral Infections by Recombinant Baculovirus. *J Biol Chem* 278, 19317-19324.
- van Hulten, M. C. W., Reijns, M., Vermeesch, A. M. G., Zandbergen, F. & Vlak, J. M. (2002). Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *Journal of General Virology* 83, 257-265.
- van Hulten, M.C.W., 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, 228-233.
- Vlak, J.M., Bonami, J.R., Flegel, T.W., Kou, G.H., Lightner, D.V., Lo, C.F., Loh, P.C., Walker, P.J., 2005. *Nimaviridae*. In *Virus Taxonomy - Eight report of the international committee on taxonomy of viruses*, pp. 187-192. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier Academic Press.
- Westenberg, M., Heinhuis, B., Zuidema, D. and Vlak, J. M. (2005). siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Research* 114, 133-9.
- Wongteerasupaya, C., Vickers, J.E., Sriurairatana, S., Nash, G.L., Akarajamorn, A., Boonsaeng, V., Panyim, S., Tassanakajon, A., Withyachumnarnkul, B., Flegel, T.W., 1995. A Non-Occluded, Systemic Baculovirus That Occurs in Cells of Ectodermal and Mesodermal Origin and Causes High Mortality in the Black Tiger Prawn *Penaeus Monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 21, 69-77.
- Yang, F., He, J., Lin, X.H., Li, Q., Pan, D., Zhang, X.B., Xu, X., 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *Journal of Virology* 75, 11811-11820.