

PHÁT HIỆN PROTEIN P74 TRÊN VI-RÚT GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG (WHITE SPOT SYNDROME VIRUS) Ở TÔM: PROTEIN TIỀM NĂNG TẠO VẮC-XIN

Trần Thị Mỹ Duyên¹, Peng Ke² và Just M. Vlak²

ABSTRACT

White spot syndrome virus (WSSV) is one of the most devastating viral diseases in shrimp and a major threat in the shrimp aquaculture industry. Currently there are no comprehensive strategies demonstrate that white spot disease can be treated. Many scientific research efforts have shown that a protein vaccine, including the envelope proteins VP28 and VP19 as a target for intervention, can be a possible treatment to protect WSSV infection. Peroral infectivity factors (PIFs) are absolutely required for oral infectivity, not only in Baculoviruses but most likely also in other large invertebrate circular double stranded ADN viruses. These PIFs could be alternative targets for immune-intervention. Recent computational investigations indicate that WSSV also has so-called per os infectivity factors. In this report, a recombinant bacterium was generated by inserting a fragment of the gene (WSSV ORF 72) encoding for a putative WSSV P74 protein in expression plasmid pET28a. Expression of a recombinant WSSV P74 protein fragment of 66 kDa was performed in E. coli. Protein expression level was optimized by various approaches to obtain the highest level for high yield protein purification. Polyclonal antibodies were raised in rabbit against the isolated WSSV P74 protein. These antibodies specifically reacted against a 108 kDa protein (and some other, smaller proteins), which is the size expected from a full-length P74 protein. During antibody generation, Penaeus vannamei (P. vannamei) were infected with WSSV for virus isolation. After that, antibodies will be used to detect recombinant bacterial WSSV P74 protein and used to further investigate the location of P74 on the surface of WSSV virions and for virus neutralization experiments. This result shows that P74 protein was present on WSSV. Although it still need more research to determine its location and function, this information also give a good starting point for further studies on an intervention strategy to control WSSV.

Keywords: WSSV, P74, per oral infectivity

Title: Towards immune intervention of white spot syndrome virus (wssv) infection in penaeid shrimp: Detection of a P74 homolog

TÓM TẮT

Vi-rút gây bệnh đốm trắng (WSSV) là một trong những vi-rút gây bệnh nguy hiểm trên tôm và là mối đe dọa lớn cho nghề nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, chưa có biện pháp hữu hiệu để điều trị bệnh đốm trắng. Hiện nay nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng protein VP28 và VP19 là những protein giúp tạo vắc-xin protein để kháng lại sự xâm nhiễm của WSSV cho tôm. Phương thức lan truyền bệnh qua đường miệng (peroral infectivity) luôn luôn cần sự hiện diện của các nhân tố truyền bệnh qua đường miệng (peroral infectivity factor – PIFs). Các nhân tố này không chỉ hiện diện ở Baculovirus mà hiện diện trên hầu hết các loài vi-rút có vật chất di truyền là ADN của động vật không xương sống. Những nhân tố truyền bệnh này có thể là những yếu tố thay thế tiềm năng trong quá trình can thiệp

¹Bộ môn Sinh học và Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Laboratory of Virology, Wageningen University and Research Center

miễn dịch giúp động vật kháng lại sự nhiễm bệnh. Trong nghiên cứu này, protein tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào vi khuẩn *E. coli* bằng cách nối gen mã hóa cho protein P74 (WSSV ORF 72) trên WSSV với vector biểu hiện pET28a. Để thu được lượng protein nhiều nhất cho quá trình tinh sạch tiếp theo, mức độ biểu hiện của protein được chuẩn hóa qua các thông số khác nhau để đạt được mức độ cao nhất. Sau khi tinh sạch, protein P74 được gửi đi tạo kháng thể đa dòng kháng lại protein P74 của WSSV trên thỏ. Protein WSSV-P74 có kích thước là 108 kDa. Trong thời gian tạo kháng thể, WSSV được tăng sinh trên tôm thẻ chân trắng *Penaeus vannamei* (*P. vannamei*). Dịch chiết vi-rút được sử dụng cho các thí nghiệm nhận diện và xác định vị trí của protein P74 trên WSSV. Kết quả đã xác định sự hiện diện của protein P74 trên WSSV. Mặc dù vị trí và chức năng của protein cần nghiên cứu thêm nhưng kết quả này cũng tạo tiền đề cho các nghiên cứu kế tiếp trong việc tạo ra các loại vắc-xin protein hiệu quả trong việc phòng bệnh đốm trắng trên tôm.

Từ khóa: WSSV, P74, phương thức lan truyền bệnh qua đường miệng

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Nuôi tôm là một trong những ngành mũi nhọn của nghề nuôi trồng thủy sản, đã và đang phát triển nhanh chóng trên toàn thế giới trong những năm gần đây. Tuy nhiên tôm nuôi thường gặp nhiều dịch bệnh khác nhau dẫn đến tổn thất nặng nề cho người nuôi. Bệnh đốm trắng, do white spot syndrome virus (WSSV) gây ra là một trong những bệnh nguy hiểm thường gặp trên tôm. Bệnh lây lan nhanh, tỉ lệ chết cao và chưa có phương pháp điều trị hữu hiệu. Hiện nay nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng protein VP28 và VP19 là những protein giúp tạo vắc-xin protein để kháng lại sự xâm nhiễm của vi-rút gây bệnh đốm trắng cho tôm (Witteveldt *et al.*, 2003).

Phương thức lan truyền bệnh qua đường miệng (peroral infectivity) luôn luôn cần sự hiện diện của các nhân tố truyền bệnh qua đường miệng (peroral infectivity factors – PIFs). Yếu tố này không chỉ hiện diện ở Baculovirus mà hiện diện trên hầu hết các loài vi-rút có vật chất di truyền là ADN của động vật không xương sống. Những nhân tố truyền bệnh này có thể là những yếu tố thay thế tiềm năng trong quá trình can thiệp miễn dịch giúp động vật kháng lại sự nhiễm bệnh. Bên cạnh đó, kết quả phân tích hệ giữa 3 dòng vi-rút thuộc nhóm ADN cho thấy Baculovirus, Hytrosavirus, Nudivirus có chung tổ tiên và đều mang các gen bảo tồn mã hóa cho PIF. Tuy rằng WSSV không cùng chung tổ tiên với các loài vi-rút trên, nhưng WSSV cũng là vi-rút thuộc nhóm ADN, sao chép trong nhân tế bào và có cấu trúc virion giống 3 loài vi-rút trên. Do vậy, câu hỏi liệu WSSV có mang những gen tiềm năng tương tự đã được đặt ra. Wang *et al.* (2010) đã xác định bộ gen của WSSV dòng Thái Lan (AF369029) có chứa các vùng mã hóa (open reading frame – ORF) cho các protein với trình tự tương đồng với PIF1 (ORF108), PIF2 (ORF41), PIF3 (ORF150) và P74 (ORF72). Cho đến nay, PIF1 và PIF2 được xác định hiện diện trên virion của WSSV và có khả năng vô hiệu hóa sự nhiễm bệnh đốm trắng trên tôm (Li H.Y. *et al.*, 2006; Li L. *et al.*, 2006). Tính năng của protein P74 chưa được nghiên cứu mặc dù protein P74 được xác định là protein màng của WSSV (Li Z. *et al.*, 2007). Thêm vào đó, protein P74 trên Baculovirus đã được chứng minh là cần thiết trong quá trình truyền bệnh qua đường miệng của vật chủ (Kuzio *et al.*, 1989). Khi tạo Baculovirus tái tổ hợp không chứa gen mã hóa cho protein P74 thì tính truyền bệnh qua đường miệng bị bất hoạt nhưng nếu bổ sung protein tái tổ hợp P74 thì tính năng truyền bệnh được phục hồi.

Với tính năng quan trọng của protein P74, nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định sự hiện diện của protein P74 trên hệ gen của WSSV. Kết quả của nghiên cứu sẽ tạo tiền đề cho các nghiên cứu kế tiếp trong việc tạo ra các loại vắc-xin protein hiệu quả trong việc phòng bệnh đốm trắng trên tôm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Dòng WSSV Thái Lan (AF369029)

Chủng vi khuẩn *E. coli* (DH5 α , BL21)

Chủng plasmid pJet1.2/blunt, pET28 α

Tôm thẻ chân trắng *P. vannamei* (200 con có kích thước từ 5 đến 7 gam).

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho protein P74

Đoạn ADN có kích thước 1554 bp thuộc gen mã hóa cho protein P74 (WSSV-P74) được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR. Thành phần hóa chất cho mỗi phản ứng (50 μ l/phản ứng) gồm có 10 ng hàm lượng ADN, 200 μ M dNTP mix; 10 pmol mỗi primer, 0,02U High Fidelity ADN polymerase (Finnzymes), 1X PCR buffer có chứa 1,5 mM MgCl₂. Môi sử dụng là WSSV-P74-F (5'-GCGGGATCCATGGCAACATTTACTGAACAG-3') và môi WSSV-P74-R (5'-GCGAAGCTTTTAGAAAACACTCGCCTTTTCT-3'). Môi được thiết kế có vị trí cắt giới hạn của enzyme BamHI trên môi xuôi và HindIII trên môi ngược. Điều kiện phản ứng PCR được thực hiện ở nhiệt độ 98°C trong 1 phút, ở nhiệt độ 98°C trong 10 giây, 52°C trong 30 giây, 72°C trong 50 giây, chu kỳ này lặp lại 30 lần và bước tổng hợp cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR tiếp tục được tinh sạch bằng kit (PCR ADN and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare). Tiến hành nối sản phẩm PCR đã tinh sạch với vector pJet 1.2/blunt (CloneJETTM PCR cloning kit, Fermentas) bằng enzyme T4-ligase (Fermentas). Plasmid tái tổ hợp này được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5 α để chọn dòng tế bào mang vector chứa gen mong muốn. Kiểm tra các dòng tế bào *E. coli* mang gen WSSV-P74 bằng kỹ thuật colony PCR và enzyme BamHI và HindIII. Để xác định chính xác gen chuyển vào là gen mong muốn, dòng plasmid sau khi kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn tiếp tục được giải trình tự và so sánh kết quả với trình tự trên ngân hàng gen (GenBank). Sau đó, xử lý plasmid pJet-WSSV-P74 bằng enzyme BamHI và HindIII để gắn vào vector biểu hiện pET28 α (pET28 α -WSSV-P74) chuẩn bị cho quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp.

2.2.2 Kỹ thuật biểu hiện protein tái tổ hợp

Plasmid tái tổ hợp pET28 α -WSSV-P74 được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. coli* BL21. Sau khi nuôi cấy qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung Kanamycin (0,1mg/ml), dòng tế bào mang gen tái tổ hợp WSSV-P74 được cấy chuyển sang môi trường LB lỏng mới với tỷ lệ 1/100. Mỗi dòng plasmid tái tổ hợp được nuôi cấy biểu hiện trong 2 ống nghiệm giống nhau ở 37°C đến khi OD (optical density) tại bước sóng 600nm đạt 0,6 đến 0,8 thì một ống được tiến hành cảm ứng, ống còn lại vẫn tiếp tục nuôi cấy biểu hiện để đối chứng. Chất cảm ứng của hệ biểu hiện

này là IPTG. Kết quả của quá trình được kiểm tra trên gel SDS PAGE 10% nhuộm Coomassie Blue (CBB) và kỹ thuật chuyển màng lai Western Blot. Do protein tái tổ hợp có 6 histidine ở đầu N nên kháng thể thứ nhất đặc hiệu sử dụng là kháng thể kháng lại histidine được tạo ra trên chuột (mouse-anti-His), tiếp đến kháng thể thứ hai có đánh dấu liên kết enzyme (kháng thể goat-anti-mouse) để phức hợp này gắn với cơ chất tạo màu NBT/BCIP.

2.2.3 Kỹ thuật tinh sạch protein tái tổ hợp

Gel SDS PAGE không gắn lược được chuẩn bị để nạp lượng lớn mẫu protein WSSV-P74. Sau khi điện di gel được nhuộm trong dung dịch 250mM KCl lạnh. Tiến hành cắt gel chứa vạch protein tái tổ hợp và nghiền đến độ có thể dùng kim tiêm rút được hỗn hợp. Protein sau khi tinh sạch cũng được kiểm tra độ tinh sạch bằng gel SDS PAGE và Western Blot.

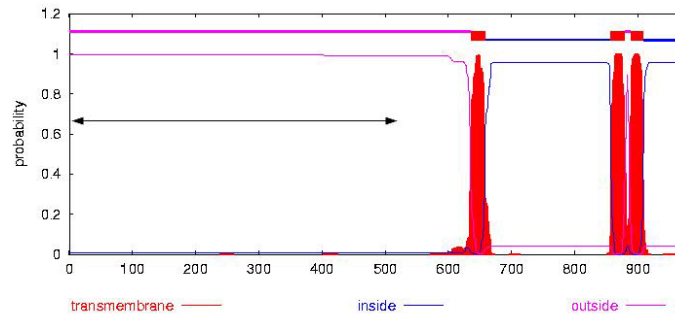
2.2.4 Kỹ thuật chiết tách vi-rút gây bệnh đốm trắng

Gây cảm nhiễm tôm thẻ chân trắng *P. vannamei* bằng phương pháp tiêm vào cơ đốt bụng thứ ba. Dịch chiết vi-rút đốm trắng được pha loãng ở nồng độ 10^{-3} . Sau đó theo dõi biểu hiện của tôm từ 4 đến 10 ngày, tôm lờ đờ có đốm trắng được thu ngẫu nhiên để kiểm tra sự hiện diện của WSSV bằng phương pháp PCR (Dieu *et al.*, 2004) trước khi tiến hành thu tôm nhiễm bệnh để tinh sạch vi-rút theo phương pháp của van Hulten *et al.* (2000).

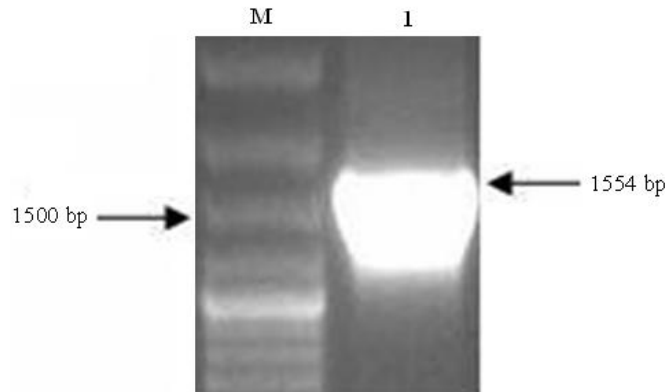
3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa cho protein P74

Dựa trên kết quả nghiên cứu proteome WSSV của Li Z. *et al.* (2007) và kết quả so sánh trên ngân hàng gen, gen mã hóa cho protein P74 của WSSV được xác định. Gen này đồng thời cũng là gen mã hóa cho ORF72 của vi-rút đốm trắng dòng Thái Lan. Từ đó, xác định được kích thước của protein WSSV-P74 tương đối lớn (108,19 kDa). Việc biểu hiện protein tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* nhằm mục đích tạo kháng thể đặc hiệu nhận diện protein P74 trên WSSV nên đoạn gen mã hóa cho phần ưa nước, ngoài màng của protein được chọn để thực hiện thí nghiệm (Hình 1). Tính ưa nước và vị trí trên màng của protein được dự đoán nhờ chương trình TMHMM Prediction of transmembrane helices in proteins (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Nhằm tạo đầu gắn tương thích khi đưa vào vector biểu hiện, đoạn gen mã hóa cho protein P74 được khuếch đại với cặp mồi có gắn trình tự cắt của enzyme BamHI và HindIII. Sản phẩm PCR có kích thước là 1554 bp. Kết quả điện di trên gel agarose 1% ở Hình 2 cho thấy kích thước đoạn gen phù hợp với dự đoán.



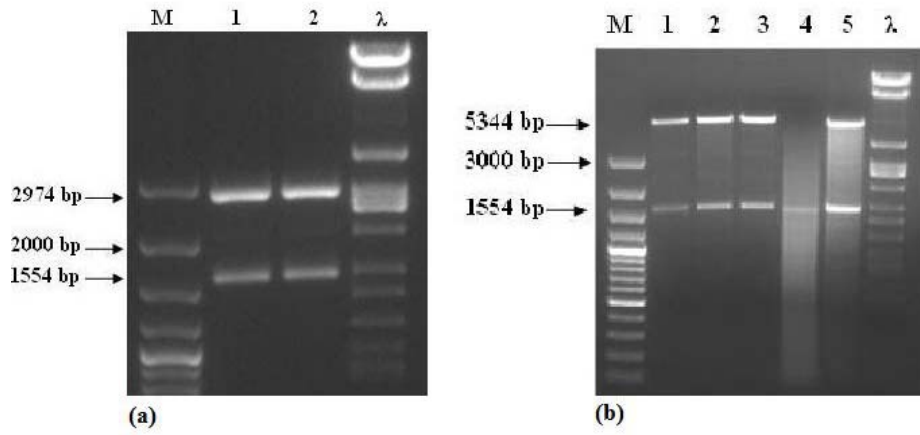
Hình 1: Dự đoán tính ưa nước và vị trí trên màng của protein. Trục hoành biểu hiện số lượng amino acid, trục tung biểu diễn giá trị ưa nước, đoạn gen được khuếch đại được biểu diễn bởi dấu (<=>)



Hình 2: Kết quả PCR khuếch đại đoạn gen mã hóa protein WSSV-P74. Giếng M: thang ADN 1 kb plus. Giếng 1: sản phẩm PCR của WSSV-P74

Vector tái tổ hợp được tạo ra bằng cách nối trực tiếp sản phẩm PCR của WSSV-P74 vào vector tạo dòng pJet1.2/blunt. Sau đó, nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường LB có bổ sung Ampicilin (0,1mg/ml) và chọn 10 khuẩn lạc thực hiện phản ứng colony PCR kiểm tra. Trong 10 khuẩn lạc đó, chọn ra 2 khuẩn lạc để tăng sinh và tách chiết plasmid, kiểm tra bằng enzyme cắt giới hạn BamHI và HindIII (hình 3a). Căn cứ vào kết quả ở hình 3, giếng 1 và 2 cho 2 vạch có kích thước 2974 bp (vector pJet1.2/blunt) và 1554 bp (WSSV-P74) chứng tỏ plasmid tái tổ hợp mang gen mong muốn.

Sau khi so sánh kết quả giải trình tự plasmid tái tổ hợp với trình tự trên ngân hàng gen cho thấy đã thiết kế thành công plasmid tái tổ hợp pJet1.2-WSSV-P74. Plasmid tái tổ hợp có trình tự đúng, có mã mở đầu và mã kết thúc đảm bảo cho quá trình biểu hiện. Tiếp đến, cắt plasmid pJet1.2-WSSV-P74 và vector pET28α với enzyme BamHI và HindIII, gắn tạo vector biểu hiện pET28α-WSSV-P74 sau đó biến nạp vào tế bào khả nạp DH5α. Tương tự, plasmid pET28α-WSSV-P74 này cũng được kiểm tra bằng kỹ thuật colony PCR và enzyme cắt giới hạn BamHI và HindIII. Kết quả điện di trên gel agarose 1% ở Hình 3b cho thấy giếng 1, 2, 3 và 5 cho 2 vạch có kích thước 5344 bp (vector pET28α) và 1554 bp (WSSV-P74) chứng tỏ vector biểu hiện mang gen mong muốn.

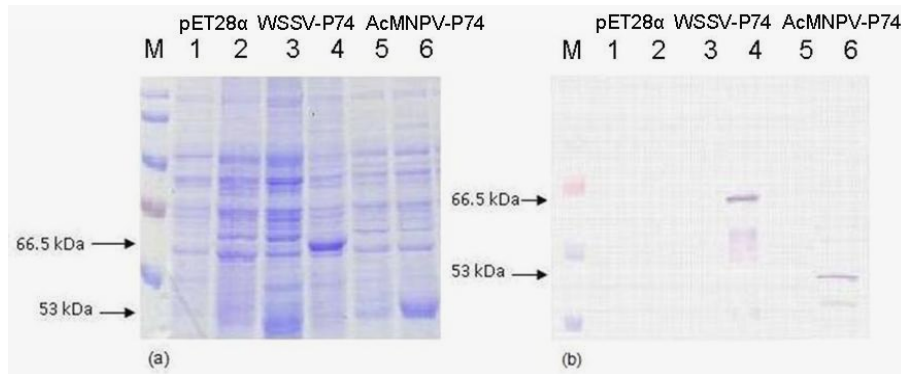


Hình 3: Kết quả kiểm tra plasmid pJet1.2-WSSV-P74 và pET28α-WSSV-P74 bằng enzyme BamHI và HindIII. (a) Plasmid pJet1.2-WSSV-P74. Giếng M: thang ADN 1 kb plus; giếng 1,2: plasmid pJet1.2-WSSV-P74; giếng λ: thang ADN λ. (b) Plasmid pET28α-WSSV-P74: Giếng M: thang ADN 1 kb plus; giếng 1, 2, 3, 4, 5: plasmid pET28α -WSSV-P74; giếng λ: thang ADN λ

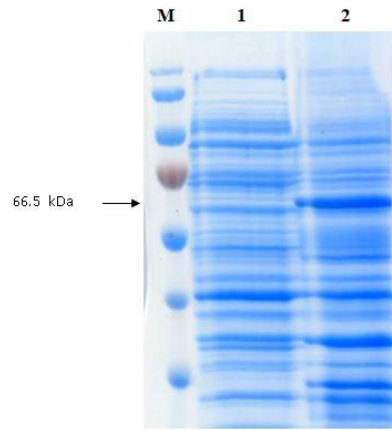
3.2 Biểu hiện protein tái tổ hợp

Vector pET28α-WSSV-P74 được biến nạp vào *E.coli* BL21 để nuôi cấy biểu hiện. Vector pET28α trống cũng được biến nạp vào *E.coli* BL21 để làm đối chứng âm. Đối chứng dương là protein tái tổ hợp P74 trên AcMNPV đã được biểu hiện thành công với kích thước 53 kDa. Nuôi cấy plasmid trong môi trường LB lỏng ở 37°C có bổ sung Kanamycin (0,1 mg/ml) và 1mM IPTG, thu protein sau 4 giờ cảm ứng.

Nhằm thu được lượng lớn protein để tinh sạch, các thông số nhiệt độ, thời gian và nồng độ IPTG cảm ứng được tối ưu hóa. Tuy nhiên, tính tan của protein được xác định trước khi tiến hành tối ưu. Tế bào *E.coli* sau khi thu sẽ được ly tâm để tách phần kết tủa bên dưới và phần dịch nổi bên trên, sau đó kiểm tra sự hiện diện của protein trên gel SDS PAGE.



Hình 4: Kết quả biểu hiện của protein tái tổ hợp WSSV-P74. (a) Gel SDS PAGE nhuộm CBB (b)Phản ứng Western Blot. Giếng M: thang protein. Giếng 1,2: vector pET28α trống không cảm ứng và được cảm ứng. Giếng 3,4: protein pET28α-WSSV-P74 không cảm ứng và được cảm ứng. Giếng 5,6:protein pET28α-AcMNPV không cảm ứng và được cảm ứng



Hình 5: Kết quả tính tan của protein pET28α-WSSV-P74. Giếng M: thang protein. Giếng 1: Phần dịch nổi. Giếng 2: Phần kết tủa

Theo kết quả trên gel SDS PAGE, protein pET28α-WSSV-P74 là protein không tan, hầu như hiện diện hoàn toàn ở phần kết tủa. Do đó, các điều kiện biểu hiện sẽ được khảo sát trên phần kết tủa. Mức độ biểu hiện cao hay thấp của protein được đánh giá qua độ đậm nhạt của vạch protein trên gel SDS PAGE (Bảng 2).

Bảng 1: Mức độ biểu hiện protein với các thông số nhiệt độ, thời gian và nồng độ IPTG cảm ứng

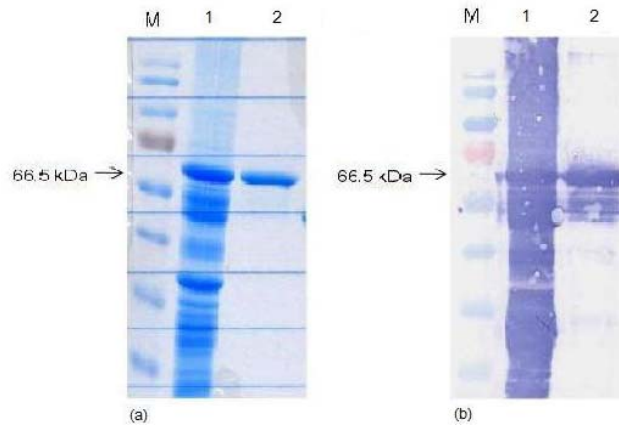
Điều kiện	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	IPTG (mM)	Mức độ biểu hiện
1	37	4	1	++
2	37	5	1	+++
3	25	qua đêm	1	+++
4	37	5	5	+/-

+/-: Mức độ biểu hiện thấp, khó quan sát được trên gel SDS PAGE, +: Mức độ biểu hiện thấp, quan sát được trên gel SDS PAGE, ++: Mức độ biểu hiện trung bình, +++: Mức độ biểu hiện cao

Tùy theo tính chất của mỗi protein nhưng thông thường khi tăng hay giảm nồng độ của chất cảm ứng sẽ dẫn đến sự tăng hoặc giảm mức độ biểu hiện của protein. Tuy nhiên, đối với protein này, việc tăng nồng độ IPTG lên 5mM không như thế. Mức độ biểu hiện của protein sau khi tăng nồng độ chất cảm ứng giảm nhanh, điều này có thể giải thích do ở nồng độ cao, chất cảm ứng kích hoạt protein dịch mã nhanh hơn sự phát triển của tế bào, dẫn đến tế bào bị phá vỡ làm cho lượng protein thu được sau khi cảm ứng giảm. Qua kết quả ở bảng 1, protein WSSV-P74 được nuôi biểu hiện ở điều kiện 2 và 3 có mức độ biểu hiện tương đương tuy nhiên điều kiện 3 có thời gian cảm ứng dài hơn nên điều kiện 2 là điều kiện tối ưu nhất.

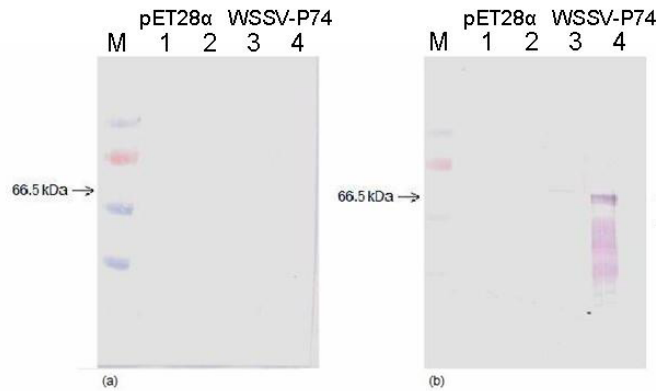
3.3 Tinh sạch protein

Kết quả và độ tinh sạch được kiểm tra lần nữa trên gel SDS PAGE và Western Blot (Hình 6). Để tạo kháng thể, độ tinh sạch của protein phải đạt từ 80 đến 90%. Theo đó, dù trên kết quả Western blot vẫn còn vạch của những protein biến tính (giếng 2, Hình 6b) nhưng độ tinh sạch của protein vẫn trong khoảng chấp nhận để tạo kháng thể. Protein tinh sạch được chích vào thỏ để tạo kháng thể đa dòng tại công ty Eurogentec (Bi).



Hình 6: Kết quả tinh sạch protein WSSV-P74 (a) Trên gel SDS PAGE (b) Phản ứng Western blot Giếng M: thang protein. Giếng 1: Protein trước khi tinh sạch. Giếng 2: Protein sau khi tinh sạch

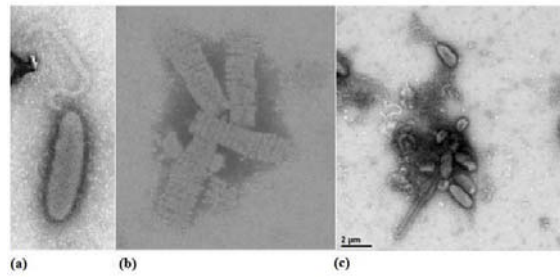
Tính đặc hiệu của kháng thể WSSV-P74 được kiểm tra trên phản ứng Western Blot với protein tái tổ hợp trước khi xác định sự hiện diện của protein P74 trên dịch chiết của vi-rút gây bệnh đốm trắng trên tôm. Huyết thanh thử trước khi tiêm protein tinh sạch được dùng làm đối chứng âm (Hình 7).



Hình 7: Kết quả tính đặc hiệu của kháng thể kháng protein WSSV-P74 (a) Phản ứng với huyết thanh thử trước khi tiêm protein tinh sạch (b) Phản ứng với kháng thể kháng protein WSSV-P74. Giếng M: thang protein. Giếng 1,2: vector pET28α trống không cảm ứng và được cảm ứng. Giếng 3,4: protein pET28α-WSSV-P74 không cảm ứng và được cảm ứng

3.4 Chiết tách vi-rút gây bệnh đốm trắng

Vi-rút được tinh sạch từ máu tôm nhiễm bệnh. Máu tôm khỏe cũng được chiết tách vi-rút như là đối chứng âm. Sự hiện diện và độ tinh sạch của vi-rút sau khi chiết tách được kiểm tra dưới kính hiển vi điện tử. Ở mẫu tôm khỏe, không có vi-rút nào được tìm thấy còn ở mẫu tôm nhiễm bệnh quan sát thấy được nucleocapsids và virions của WSSV.

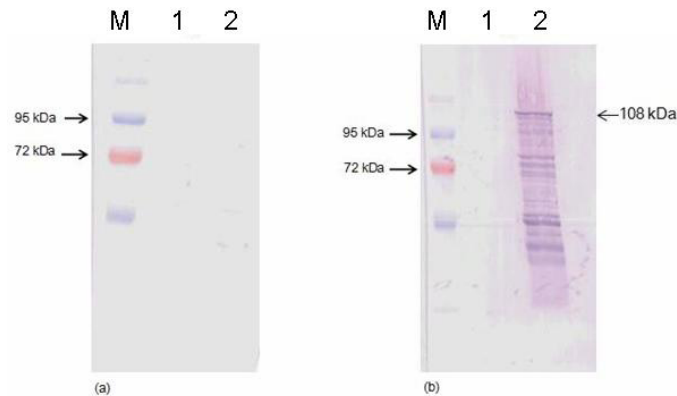


Hình 8: Hình ảnh của vi-rút gây bệnh đốm trắng dưới kính hiển vi điện tử. (a) Virion. (b) Nucleocapsids. (c) Virions và nucleocapsids

3.5 Phát hiện protein WSSV-P74

Không quan sát được vạch protein WSSV-P74 cũng như vạch của protein VP28 và VP19 – hai protein chính hiện diện trên virion của WSSV khi điện di dịch chiết vi-rút trên gel SDS PAGE. Theo kết quả nghiên cứu của van Hulst *et al.* (2000), trên gel SDS PAGE quan sát được vạch của protein VP28 và VP19, do đó có thể số lượng virion trong mẫu chiết tách chưa đủ để thể hiện trên gel SDS PAGE. Điều này có thể do khác biệt vật chủ giữa tôm hùm nước ngọt (crayfish) và tôm thẻ chân trắng trong thí nghiệm tăng sinh vi-rút.

Mặc dù không quan sát được vạch của protein trên gel SDS PAGE nhưng có thể protein vẫn có hiện diện. Protein vẫn được chuyển sang màng Nitrocellulose để thực hiện phản ứng Western Blot.



Hình 9: Kết quả Western Blot phát hiện protein WSSV-P74 trên dịch chiết WSSV. (a) Phản ứng với huyết thanh thỏ trước khi tiêm protein tinh sạch. (b) Phản ứng với kháng thể kháng protein WSSV-P74. Giếng M: thang protein. Giếng 1: Dịch chiết WSSV từ tôm khỏe. Giếng 2: Dịch chiết WSSV từ tôm nhiễm bệnh

Kết quả Western Blot cho thấy vạch protein ở 108 kDa, kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Li *et al.* (2007). Trên kết quả Western Blot, kháng thể kháng protein WSSV-P74 vẫn nhận diện được một số protein có kích thước nhỏ hơn, có thể là protein WSSV-P74 bị vỡ. Không quan sát được vạch protein nào trên phản ứng với huyết thanh của thỏ và trên mẫu tôm khỏe. Do đó, kháng thể kháng lại protein WSSV-P74 có tính đặc hiệu để nhận diện protein trên dịch chiết vi-rút.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1 Kết luận

Protein tái tổ hợp WSSV-P74 được biểu hiện thành công trong tế bào vi khuẩn. Protein P74 đã được xác định hiện diện trên WSSV thông qua phản ứng đặc hiệu với kháng thể đa dòng được tạo ra trên thỏ.

4.2 Đề nghị

Tiếp tục nghiên cứu vai trò, chức năng của protein WSSV-P74. Tiếp tục nghiên cứu vai trò, chức năng của những PIFs khác như PIF1, PIF2, PIF3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Dieu B. T.M, Marks H, Siebenga J. J, Goldbach R. W, Zuidema D, Duong T. P and Vlak J. M. (2004) Molecular epidemiology of White spot syndrome virus within Vietnam. *Journal of Virology*, Vol. 85, p. 3607–3618.
- Witteveldt J, Carolina C. Cifuentes, Just M. Vlak, and Marielle C. W. van Hulten. 2003. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by Oral Vaccination. *Journal of Virology*, Vol. 78, p. 2057–2061.
- Kuzio J, Jaques R, Faulkner P. 1989. Identification of P74, a Gene Essential for Virulence of Baculovirus Occlusion Bodies. *Virology* 173: 759-763.
- Li HY, Zhu YB, Xie XX, Yang F. 2006. Identification of a novel envelope protein (VP187) gene from shrimp white spot syndrome vi-rút. *Virus Research* 115: 76-84.
- Li L, Lin SM, Yang F. 2006. Characterization of an envelope protein (VP110) of White spot syndrome virus. *Journal of General Virology* 87: 1909-1915.
- Li Z, Lin Q, Chen J, Wu JL, Lim TK, Loh SS, Tang X, Hew CL. 2007. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Mol Cell Proteomics* 6: 1609-1620.
- Van Hulten MC, Westenberg M, Goodall SD, Vlak JM. 2000. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology* 266: 227-236.
- Yao LG, Zhou WK, Xu H, Zheng Y, Qi YP. 2004. The *Heliothis armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus envelope protein P74 is required for infection of the host midgut. *Virus Research* 104: 111-121.