



TẠO DÒNG VÀ BIỂU HIỆN GENE MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN RHOPTRY-ASSOCIATED PROTEIN-1 CỦA *BABESIA BOVIS* TRONG *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3)

Đinh Thị Bích Lân¹, Lê Đức Thọ¹, Lê Quốc Việt², Đặng Thị Hương², Lê Việt Quân²,
Đông Hữu Rin², Phùng Thăng Long^{1*}

¹ Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế, Việt Nam

² Công ty TNHH MTV Thương mại Dịch vụ và sản xuất Minh Nhật Việt, 18 Hùng Vương, Huế, Việt Nam

Tóm tắt: Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tạo dòng và biểu hiện thành công đoạn gene mã hóa kháng nguyên Rhoptyry-Associated Protein (*RAP-1*) của *Babesia bovis* phân lập từ mẫu máu bò thu thập tại tỉnh Thừa Thiên Huế. Đoạn gene mã hóa cho kháng nguyên *RAP-1* được tạo dòng và gắn vào plasmid pGEX-4T-1, sau đó biến nạp vào chủng *Escherichia coli* BL21 (DE3). Kết quả cho thấy đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* có chiều dài 300 bp, mã hóa chuỗi polypeptide dài 100 axit amin, tương đồng 99% so với đoạn gene mã hóa cho *RAP-1* đã được công bố trên GenBank (LC157851). Kết quả điện di trên SDS-PAGE cho thấy protein dung hợp GST-*RAP-1* có khối lượng phân tử khoảng 38kDa.

Từ khóa: *Babesia bovis*, *RAP-1*, pGEX-4T-1, *E. coli* BL21, tạo dòng, Thừa Thiên Huế

1 Đặt vấn đề

Babesia bovis (*B. bovis*) là một loại ký sinh trùng đường máu lây qua ve bét, thường gặp ở trâu bò và được phát hiện ở nhiều nước trên thế giới, trong đó có Việt nam [8]. *Babesia bovis* ký sinh trong hồng cầu khiến hồng cầu bị vỡ, dẫn đến hiện tượng hemoglobin niệu, thiếu máu, giảm sức sản xuất, thậm chí gây tử vong ở bò [1].

RAP-1 (Rhoptyry-associated protein 1) là một protein có trên bề mặt sporozoites của *B. bovis*, có vai trò quan trọng trong cơ chế sinh bệnh, giúp ký sinh trùng xâm nhập vào tế bào hồng cầu [9]. Gene mã hóa protein *RAP-1* là một gene có tính bảo thủ cao ở các chủng *B. bovis* phân lập từ nhiều vùng địa lý khác nhau [3]. Nhiều nghiên cứu cho thấy *RAP-1* có khả năng gây đáp ứng miễn dịch cao, do vậy đã có nhiều tác giả nghiên cứu sử dụng *RAP-1* trong phát triển KIT chẩn đoán [2] và vắc xin phòng bệnh [4, 5, 6].

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành phân lập đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* từ máu của bò bị nhiễm *B. bovis*, tạo dòng và biểu hiện kháng nguyên tái tổ hợp *RAP-1* trong tế bào *E. coli* BL 21 nhằm tạo nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu thiết lập KIT chẩn đoán và vắc xin phòng bệnh do ký sinh trùng đường máu *B. bovis* gây ra ở bò.

* Liên hệ: thanglong@huaf.edu.vn

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Vật liệu

Mẫu máu được lấy từ bò vàng nuôi thả trên địa bàn huyện Phú Vang, tỉnh Thừa Thiên Huế. Môi trường LB (1% tryptone, 0,5% dịch chiết nấm men, 1% NaCl), các chủng vi khuẩn *E. coli* (TOP10, BL21), vector pGEM®-T Easy (Promega), vector pGEX-4T-1 (Sigma Aldrich), KIT tách chiết ADN tổng số (QIAamp®DNABlood Mini KIT (50), Qiagen), KIT tinh sạch ADN từ gel (KIT Isolate II PCR and Gel, Bioline), KIT tách chiết plasmid tái tổ hợp (DNA plasmid Extraction KIT, ABT), hóa chất tách chiết protein từ vi khuẩn (B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo scientific), Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) đã được sử dụng.

2.2 Phương pháp

Phân lập gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*

ADN từ các mẫu dương tính với *B. bovis* được tách bằng KIT tách chiết ADN (QIAamp® DNABlood Mini KIT) và được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR phân lập đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*. Cặp mồi đặc hiệu để thu nhận gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide đã công bố trên GenBank (mã số: LC157851), vị trí cắt cho enzyme giới hạn *Bam*HI được thiết kế trên mồi xuôi *RAP-1.F*: 5'-*gcggatcc*AACTATCTGAAAGCCAA-3' và cho enzyme giới hạn *Sall* được thiết kế trên mồi ngược *RAP-1.R*: 5'-*gccgtcgac*TCAAGCAATATTCTCGC-3' [7].

Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 12,5 µL 2X Go taq green master Mix, 1 µL mồi xuôi (10 pmol/µL), 1 µL mồi ngược (10 pmol/µL), 1 µL ADN khuôn mẫu và 9,5 µL nước cất vô trùng. PCR được thực hiện với chu trình luân nhiệt như sau: biến tính genome 95°C/5 phút, tiếp đến là 30 chu kỳ: 95°C/60 giây, 56°C/45 giây và 72°C/45 giây, cuối cùng là 72°C/7 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di agarose gel 1% với thuốc nhuộm ethidium bromide (0,5 µg/L).

Tạo dòng đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* trong vector pGEM®-T Easy

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng KIT Isolate II PCR and Gel (Bioline) được tạo dòng trong vector pGEM®-T Easy (Promega) theo phương pháp dòng hóa TA. Thành phần phản ứng gắn bao gồm: 50 ng vector pGEM®-T Easy, 5 µL 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µL T4 DNA ligase (3 đơn vị/µL), 1 µL (15 ng/µL) sản phẩm PCR, sau đó bổ sung nước cất vô trùng để đạt thể tích cuối cùng 10 µL, phản ứng được ủ ở 25°C trong 1 giờ, sau đó để qua đêm ở 4°C. Tiếp theo, sản phẩm gắn được biến nạp vào 50 µL tế bào *E. coli* TOP 10 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt ở 42°C trong 45 giây, sau đó ủ trong đá lạnh 3 phút. Thêm 950 µL môi trường LB vào ống chứa sản phẩm biến nạp và nuôi trong 1,5 giờ ở 37°C, lắc 150 vòng/phút, sau đó cấy trải 200 µL dịch nuôi cấy lên môi trường LB agar có bổ sung 100 mM IPTG (0,1M) + 100 µL X-Gal (20 mg/mL), ủ tại 37°C trong 16 giờ. Kiểm tra sự có mặt của gene mã hóa kháng nguyên trong khuẩn lạc trắng bằng phản ứng

PCR với cặp mồi đặc hiệu *RAP-1* (RAP1.F và RAP1.R) và cặp mồi M13 (M13F: 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' và M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC-3') được thiết kế sẵn trên vector pGEM®-T Easy.

Vector tái tổ hợp pGEM®-T Easy/RAP-1 được tách bằng DNA plasmid Extraction KIT (ABT) và gửi đi giải trình tự nucleotide tại Công ty Phù sa Biochem. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên ngân hàng gene.

Gắn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* vào vector PGEX-4T-1 và biểu hiện trong *E. coli* BL21 (DE3)

Plasmid tái tổ hợp pGEM®-T Easy/RAP-1 được cắt bằng enzyme hạn chế để thu nhận gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*. Phản ứng cắt chứa 5 µL 10X buffer D (Promega), 2 µL enzyme *Bam*HI (10 U/µL), 2 µL enzyme *Sal*I (10 U/µL), 0,5 µL BSA (10 µg/µL) và 40,5 µL DNA plasmid tái tổ hợp (60 ng/µL). Ủ hỗn hợp phản ứng cắt ở 37°C trong 4 giờ và điện di kiểm tra kết quả cắt hạn chế trên gel agarose 1%. Tiến hành tinh sạch ADN bằng KIT Isolate II PCR and Gel (Bioline).

Sau khi có được gene *RAP-1* đã xử lý với enzyme cắt giới hạn cắt giới hạn *Bam*HI và *Sal*I, tiến hành phản ứng gắn gene *RAP-1* vào vector pGEX-4T-1. Thành phần phản ứng gắn gồm 50 ng vector pGEX-4T-1, 5 µL 2X Rapid Ligation Buffer, 3 đơn vị T4 DNA ligase, 1 µL T4 DNA ligase (3 đơn vị/µL), 1 µL ADN *RAP-1* (20 ng/µL), nước cất vô trùng vừa đủ 10 µL; phản ứng được tiến hành ở 16°C trong 16 giờ. Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 khả biến. Sản phẩm biến nạp được trải trên môi trường chọn lọc chứa Ampicillin. Khuẩn lạc mọc được trên môi trường chọn lọc sẽ được kiểm tra sự có mặt của gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* bằng phản ứng PCR.

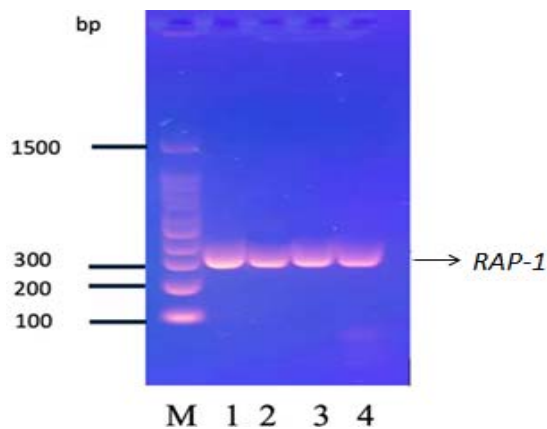
Các tế bào *E. coli* BL21 chứa vector biểu hiện mang gene *RAP-1* (pGEX-4T-1/RAP-1) được nuôi trong 50 mL môi trường LB có bổ sung 100 µg/mL Ampicillin ở 37°C; tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khi mật độ tế bào đo ở bước sóng 600 nm đạt tới mật độ quang bằng 1 (OD₆₀₀ = 1,0) thì bổ sung 40 µL chất cảm ứng IPTG 1M (Bio-Rad) và tiếp tục nuôi ở 25°C. Sau 4 giờ cảm ứng, thu sinh khối và tách chiết protein tổng số bằng KIT B-PER® Bacterial Protein Extraction. Protein dung hợp GST-*RAP-1* được tinh sạch bằng Glutathion Sepharose 4B gel.

Sự biểu hiện protein của đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* trong *E. coli* BL21 được đánh giá bằng phương pháp điện di SDS-PAGE.

3 Kết quả và thảo luận

3.1 Phân lập gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* của *B. bovis*

Tiến hành nhuộm Giemsa 50 mẫu máu bò được thu thập trên địa bàn nghiên cứu, chúng tôi phát hiện có 4 mẫu dương tính với *B. bovis*. Những mẫu này được sử dụng để tách ADN và tiến hành PCR với cặp mồi đặc hiệu được thực hiện để nhân đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*. Kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 1) cho thấy các băng ADN được khuếch đại có kích thước khoảng 300 bp, phù hợp với nghiên cứu của Boonchit [2]. Sản phẩm PCR chỉ cho một băng, nồng độ cao, sáng và rõ nét.

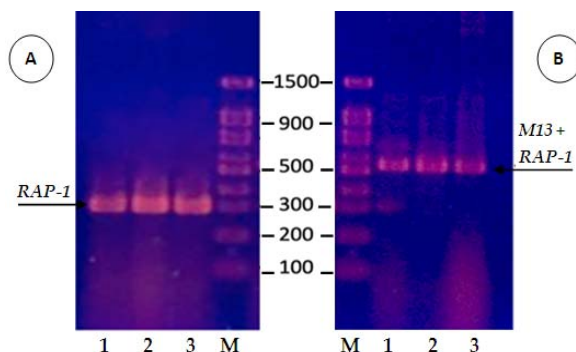


Hình 1. Ảnh điện di kiểm tra sản phẩm PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*, M: Maker 100-1500 bp (Bioline). 1, 2, 3, 4: Sản phẩm PCR với các mẫu ADN khác nhau

3.2 Tạo dòng gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*

Sản phẩm PCR được sạch từ gel agarose và được gắn vào vector pGEM®-T Easy. Tiến hành biến nạp sản phẩm gắn chứa plasmid pGEM®-T Easy/*RAP-1* vào tế bào *E. coli* TOP 10. Sau khi biến nạp thu được hai dòng khuẩn lạc xanh, trắng. Chọn các khuẩn lạc trắng để làm PCR với cặp mồi đặc hiệu (*RAP1.F* và *RAP1.R*) và cặp mồi M13 để kiểm tra sự có mặt của gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*. Kết quả được trình bày ở Hình 2.

Kết quả phân tích cho thấy các khuẩn lạc được kiểm tra đều cho kết quả PCR dương tính. Băng ADN khuếch đại có kích thước khoảng 300 bp khi thực hiện PCR với cặp mồi *RAP-1* (Hình 2A) và khoảng 500 bp khi thực hiện PCR với cặp mồi M13 (Hình 2B). Các khuẩn lạc dương tính được chuyển vào nuôi trong môi trường LB có bổ sung Ampicillin (100 µg/mL) trong 14 giờ ở 37 °C, sau đó tiến hành tách plasmid và gửi đi giải trình tự.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của plasmid tái tổ hợp pGEM®-T Easy/RAP-1 trong tế bào *E. coli* Top 10, M: Maker 100–1500 bp (Bioline). 1, 2, 3: Các khuẩn lạc dương tính được kiểm tra bằng cặp mồi đặc hiệu cho RAP-1(A) và cặp mồi M13 (B)

Kết quả giải trình tự cho thấy đoạn gene mã hóa cho kháng nguyên *RAP-1* phân lập được có độ tương đồng cao (99%) so với đoạn gene mã hóa cho kháng nguyên *RAP-1* đã được công bố trên GenBank (mã số LC157851). Sự sai khác của nucleotide ở vị trí 191 (G được thay bằng A) và 270 (T được thay bằng C) không làm ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện protein (Hình 3 và Hình 4).

<i>RAP-1</i>	7	AACTATCTGAAAGCCAATGTTGCTGAGCCCACTAAAAAGTTTATGCAGGACACTCACGAA	66
LC157851	385	AACTATCTGAAAGCCAATGTTGCTGAGCCCACTAAAAAGTTTATGCAGGACACTCACGAA	444
<i>RAP-1</i>	67	AAAACCAAAGGCTATCTGAAAGAGAATGTAGCCGAACCTACTAAGACTTTTTTCAAGGAG	126
LC157851	445	AAAACCAAAGGCTATCTGAAAGAGAATGTAGCCGAACCTACTAAGACTTTTTTCAAGGAG	504
<i>RAP-1</i>	127	GCTCCTCAAGTCACCAAACACTTCTTCGATGAGAACATTGGCCAACCCACCAAGGAGTTT	186
LC157851	505	GCTCCTCAAGTCACCAAACACTTCTTCGATGAGAACATTGGCCAACCCACCAAGGAGTTT	564
<i>RAP-1</i>	187	TTCAAGGAAGCTCCCCAAGCCACTAAACATTTCTAGACGAAAACATCGGTCAACCAACC	246
LC157851	565	TTCAAGGAAGCTCCCCAAGCCACTAAACATTTCTAGACGAAAACATCGGTCAACCAACC	624
<i>RAP-1</i>	247	AAGGAGTTCTTCAGGAGGCTCCCCAAGCCACTAAGCACTTCTAGGCGAGAATATGCT	306
LC157851	625	AAGGAGTTCTTCAGGAGGCTCCCCAAGCCACTAAGCACTTCTAGGCGAGAATATGCT	684

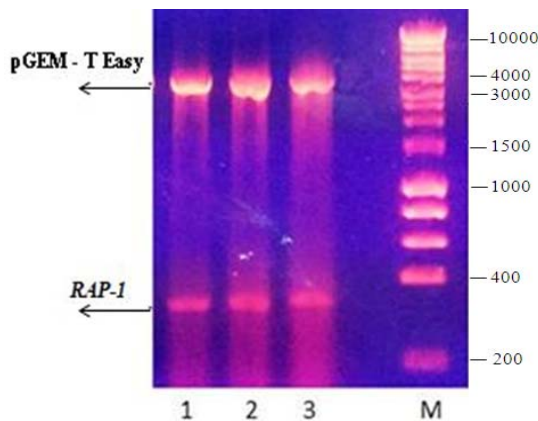
Hình 3. Mức độ tương đồng của trình tự nucleotide giữa đoạn gene mã hoá kháng nguyên *RAP-1* phân lập được với đoạn gene mã hoá kháng nguyên *RAP-1* đã được công bố trên Genbank (mã số LC157851)

<i>RAP-1</i>	12			
NYLKANVAEPTKKFMQDTHEKTKGYLKENVAEPTKTFKKEAPQVTKHFFDENIGQPTKEF				
BBD20329	12			71
NYLKANVAEPTKKFMQDTHEKTKGYLKENVAEPTKTFKKEAPQVTKHFFDENIGQPTKEF				
<i>RAP-1</i>	72	FKEAPQATKHFLDENIGQPTKEFFREAPQATKHFLGENIA		111
BBD20329	72	FREAPQATKHFLDENIGQPTKEFFREAPQATKHFLGENIA		111

Hình 4. Mức độ tương đồng của trình tự axit amin giữa kháng nguyên *RAP-1* phân lập được và kháng nguyên *RAP-1* đã được công bố trên GenBank (mã số BBD20329)

3.3 Biểu hiện đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1*

Tiến hành cắt giới hạn plasmid pGEM[®]-T Easy/*RAP-1* bằng enzyme *Bam*HI và *Sal*I. Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose và đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* được tinh sạch bằng KIT ISOLATE II PCR and Gel (BIOLINE). Kết quả điện di (Hình 5) cho thấy plasmid tái tổ hợp sau khi cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Sal*I cho ra hai băng sản phẩm: một băng có kích thước trên 3000 bp là sản phẩm plasmid pGEM[®]-T Easy, một băng có kích thước khoảng 300 bp tương ứng với đoạn gene mã hóa một phần kháng nguyên *RAP-1*.



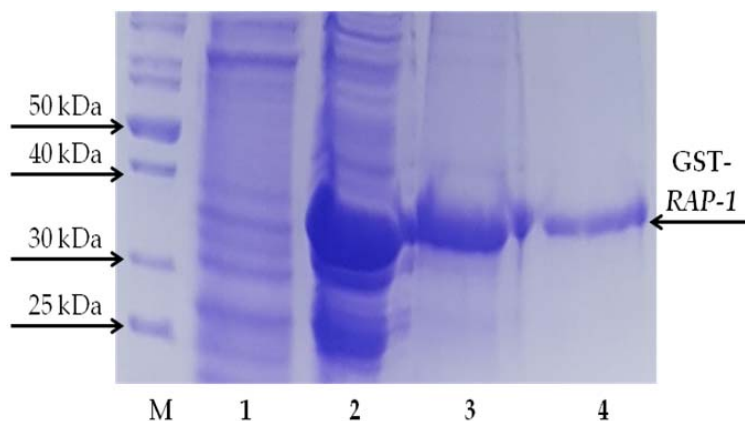
Hình 5. Kết quả cắt plasmid tái tổ hợp pGEM[®]-T Easy/*RAP-1* bằng enzyme giới hạn, M: Thang chuẩn khối lượng ADN (1kb, Bioline), 1, 2, 3: Sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pGEM[®]-T Easy/*RAP-1* bằng enzyme *Bam*HI và *Sal*I

Sau khi tinh sạch từ gel agarose, đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* được gắn vào plasmid pGEX-4T-1 (đã được xử lý bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Sal*I). Sản phẩm gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Sự có mặt của đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* trong các khuẩn lạc được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu cho *RAP-1*.

Tiến hành biểu hiện gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* trong chủng *E. coli* BL21 (DE3) với chất

cảm ứng IPTG 1M (Bio-Rad). Kết quả biểu hiện được thể hiện ở Hình 6.

Đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* có chiều dài 300 bp, mã hóa cho polypeptide dài 100 axit amin. Theo tính toán lý thuyết thì protein này có kích thước khoảng 11,59 kDa và đuôi dung hợp GST có kích thước khoảng 26 kDa. Vì vậy, protein dung hợp GST-*RAP-1* có kích thước khoảng 38 kDa. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy tế bào *E.coli* mang gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* được cảm ứng bằng IPTG sẽ biểu hiện protein dung hợp với khối lượng phân tử khoảng 38 kDa (bao gồm cả GST). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với tính toán lý thuyết. Vì vậy, có thể khẳng định đoạn gene mã hóa kháng nguyên *RAP-1* đã được biểu hiện thành công.



Hình 6. Kết quả điện di đánh giá khả năng biểu hiện protein dung hợp GST-*RAP-1*

M: khối lượng thang chuẩn protein (10–200 kDa, Biobase). 1: dịch protein thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp không cảm ứng. 2: dịch protein thu được từ tế bào *E. coli* mang vector tái tổ hợp được cảm ứng bằng IPTG. 3: protein kháng nguyên dung hợp GST-*RAP-1* sau lọc lần 1. 4: protein kháng nguyên dung hợp GST-*RAP-1* sau lọc lần 2.

4 Kết luận

Đoạn gene mã hóa cho kháng nguyên *RAP-1* của *B. bovis* đã được tạo dòng thành công vào vector tạo dòng pGEM®-T Easy và vector biểu hiện pGEX-4T-1. Đoạn gene này có chiều dài 300 bp và tương đồng 99% so với gene mã hóa cho *RAP-1* đã được công bố trên GenBank (mã số LC157851). Protein dung hợp GST-*RAP-1* có khối lượng phân tử khoảng 38 kDa.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Đại học Huế (mã số: DHH2018-15-08). Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm Trung tâm, Khoa Chăn nuôi Thú y, Trường đại học Nông Lâm, Đại học Huế đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

1. Phạm Sỹ Lăng, Nguyễn Bá Hiên, Nguyễn Văn Diên, Nguyễn Hữu Hưng và Bạch Quốc Thắng (2015), *Bệnh ký sinh trùng ở gia súc, gia cầm Việt Nam*, Nxb. Nông nghiệp, Hà Nội, 48–49.
2. Boonchit S., Xuan X., Yokoyama, N., Goff W. L., Waghela S. D., Wagner G. and Igarashi I. (2004), Improved enzyme-linked immunosorbent assay using C-terminal truncated re-combinant antigens of *Babesia bovis* rhoptry-associated protein-1 for detection of specific antibodies, *J. Clin. Microbiol*, 42, 1601–1604.
3. Brown W. C., McElwain T. F., Ruef B.J., Suraz C. E., Shkap V., Chitko-Mckown C. G., Tuo W., Riece-Fitch A. C. and Palmer G. H. (1996), *Babesia bovis*: rhoptry-associated protein 1 is immunodominant for T helper cell epitopes conserved among geographically distant *B. bovis* strains, *Infect. Immun*, 64, 3341–3350.
4. Brown W. C. and Palmer G. H. (1999), Designing a blood-stage vaccine against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitol. Today*, 15, 275–281.
5. Dalrymple B. P. (1993), Molecular variation and diversity in candidate vaccine antigens from *Babesia*, *Acta Trop*, 53, 227–238.
6. Palmer G. H. and McElwain T. F. (1995), Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis, *Vet. Parasitol*, 57, 233–253.
7. Sivakumar T., Kothalawala H., Weerasooriya G., Silva S. S. P., Puvanendiran S., Munkhjargal T., Igarashi I. and Yokoyama N. (2016), A longitudinal study of *Babesia* and *Theileria* infections in cattle in Sri Lanka, *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports* 6, 20–27.
8. Sivakumar T., Lan D. T. B., Long P. T., Viet L. Q., Weerasooriya G., Kume A., Suganuma K., Igarashi I. and Yokoyama N. (2018), Serological and molecular surveys of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* among native cattle and cattle imported from Thailand in Hue, Vietnam, 80(2), 333–336.
9. Yokoyama N., Suthisak B., Hirata H., Matsuo T., Inoue N., Sugimoto C., and Igarashi I. (2002), Cellular localization of *Babesia bovis* merozoite rhoptry-associated protein 1 and its erythrocyte-binding activity, *Infect. Immun*, 70, 5822–5826.

CLONING AND EXPRESSION OF GENE ENCODING RHOPTRY-ASSOCIATED PROTEIN- 1 OF *BABESIA BOVIS* IN *ESCHERICHIA COLI* BL21 (DE3)

Dinh Thi Bich Lan¹, Le Duc Thao¹, Le Quoc Viet², Dang Thi Huong², Le Viet Quan²,
Dong Huu Rin², Phung Thang Long^{1*}

¹University of Agriculture and Forestry, Hue University, 102 Phung Hung St., Hue, Vietnam

²Minh Nhat Viet Services Trading Production Company, 18 Hung Vuong St., Hue, Vietnam

Abstract: In this study, we successfully cloned and expressed a fragment of gene encoding rhoptry-associated protein 1 (*RAP-1*) of *Babesia bovis* isolated from cattle blood samples collected in Thua Thien Hue province, Vietnam. The fragment of the gene encoding for *RAP-1* was amplified and cloned into plasmid pGEX-4T-1 and then transformed into the *E. coli* BL21(DE3) strain. The results show that the fragment of gene encoding *RAP-1* with a length of 300 bp can encode a polypeptide chain with 100 amino acid residues, which performed at 99% similarity to the polypeptide chain of GenBank (accession number: LC157851). The results of SDS-PAGE electrophoresis indicate that GST-RAP-1 fusion protein has a molecular weight of about 38 kDa.

Keywords: Cloning, *Babesia bovis*, *RAP-1*, pGEX-4T-1, *E. coli* BL21, Thua Thien Hue