



# TẠO DÒNG VI KHUẨN *ESCHERICHIA COLI* MANG VECTOR BIỂU HIỆN KHÁNG NGUYÊN S<sub>1</sub>C và S<sub>1</sub>C-CT24 CỦA VIRUS GÂY DỊCH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN

Nguyễn Quang Đức Tiến<sup>1\*</sup>, Lê Quang Mẫn<sup>1</sup>, Nguyễn Duy Khiêm<sup>1</sup>,  
Đặng Thị Trang<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Lương<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế

<sup>2</sup> Viện Nghiên cứu Hoạt chất Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế, 77 Nguyễn Huệ, Huế

**Tóm tắt.** Virus PED (PEDV, Porcine epidemic diarrhea virus) thuộc họ Coronaviridae là nguyên nhân gây dịch tiêu chảy cấp trên lợn. Bệnh lây lan rất nhanh và gây tỷ lệ chết cao; PEDV là một trong những mối lo ngại lớn của ngành chăn nuôi lợn trên toàn thế giới. Trình tự nucleotide mã hoá vùng quyết định kháng nguyên S<sub>1</sub>C và peptide CT24 được chứng minh có khả năng cảm ứng tạo kháng thể trung hòa, thích hợp cho việc phát triển vắc-xin PEDV tái tổ hợp. Gần đây, chủng PEDV mới (HUA-PED45) thuộc nhóm G2b được phát hiện tại Việt Nam gây thiệt hại lớn cho các trại chăn nuôi heo. Hiện chưa có vắc-xin hiệu quả với chủng virus này. Trong nghiên cứu này, gen mã hóa S<sub>1</sub>C và gen dung hợp S<sub>1</sub>C-CT24 của chủng virus HUA-PED45 lần lượt được tổng hợp, phân tích trình tự và ghép nối vào vector biểu hiện pQE30 (Qiagen, Đức). Các vector biểu hiện được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng M15 sẽ tạo cơ sở cho các nghiên cứu biểu hiện và sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp S<sub>1</sub>C và S<sub>1</sub>C-CT24, góp phần ngăn ngừa dịch bệnh nguy hiểm này.

**Từ khóa:** PEDV, S<sub>1</sub>C, S<sub>1</sub>C-CT24, dịch tiêu chảy cấp ở lợn, *E. coli* chủng M15

## 1 Đặt vấn đề

Virus gây tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV, Porcine Epidemic Diarrhea Virus) thuộc nhóm Coronavirus là một trong những chủng virus nguy hiểm với tỉ lệ chết gần như 100%, gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho ngành chăn nuôi lợn ở Việt Nam cũng như trên thế giới [2, 12, 13, 17]. Năm 1971, PEDV lần đầu tiên được phát hiện ở Châu Âu; sau đó dịch bệnh bùng phát mạnh sang các nước khác trên thế giới như Cộng hòa séc, Hungary, Hàn Quốc, Nhật Bản, Trung Quốc, Ý, Philipin, Việt Nam, Thái Lan... [13]. Vắc-xin là chế phẩm có tính kháng nguyên được dùng để tạo miễn dịch đặc hiệu chủ động nhằm tăng sức đề kháng của cơ thể đối với tác nhân gây bệnh cụ thể. Vùng spike glycoprotein của virus PED được chia thành 2 miền S<sub>1</sub> và S<sub>2</sub>. Trong đó miền S<sub>1</sub> được chia thành 4 vùng S<sub>1A</sub>, S<sub>1B</sub>, S<sub>1C</sub> và S<sub>1D</sub> [14, 15]. Trình tự nucleotide chứa vùng mã hóa kháng nguyên S<sub>1C</sub> được xem là ứng viên thích hợp cho việc sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp [1]. Ngoài ra, phát hiện của Cruz và cs. cho thấy trình tự motif (24 axit amin) ở đầu carboxyl

\* Liên hệ: [nqductien@gmail.com](mailto:nqductien@gmail.com)

terminator của vùng S2 (CT24) có khả năng cảm ứng tạo kháng thể trung hòa virus PED [3, 4]. Giữa năm 2008–2009, virus PED lần đầu được phát hiện và gây thiệt hại nặng nề cho các trại chăn nuôi heo ở các tỉnh miền nam Việt Nam [5, 17]; sau đó dịch bệnh lan truyền sang các tỉnh miền bắc và miền trung [16]. Gần đây, chủng virus PED mới (HUA-PED45) thuộc nhóm G2b được phát hiện tại Việt Nam gây thiệt hại lớn cho các trại chăn nuôi heo [9, 18]. Theo nghiên cứu của Kim và cs., phần lớn trình tự acid amin (503–643) ở vùng quyết định kháng nguyên của chủng virus này bị thay đổi hoàn toàn [9]. Đột biến các vị trí amino acid ở vùng quyết định khác nguyên của virus PED có thể dẫn đến làm giảm và mất khả năng bảo hộ của vắc-xin đối với chủng thực địa. Hiện nay, ở Việt Nam một số vắc-xin PED có nguồn gốc từ Hàn Quốc, Nhật Bản đã được thương mại hóa, nhưng chúng vẫn không đạt hiệu quả như mong muốn; điều quan trọng nhất là sử dụng đúng loại vắc-xin đặc hiệu theo chủng PEDV đang lưu hành. Trong nghiên cứu này, hai dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng M15 mang vector biểu hiện chứa trình tự gen S<sub>1</sub>C và gen dung hợp S<sub>1</sub>C-CT24 của virus HUA-PED45 được tạo ra, làm nguyên liệu cho các nghiên cứu biểu hiện và sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp có tiềm năng ứng dụng làm vắc-xin hoặc kit chẩn đoán bệnh nguy hiểm này.

## 2 Vật liệu và phương pháp

### 2.1 Vật liệu

Trình tự gen dung hợp S<sub>1</sub>C-CT24/pJET của chủng virus HUA-PEDV45 (GenBank: KP455313.1) và các môi được sử dụng trong nghiên cứu được tổng hợp ở công ty TNHH MTV Hóa Sinh Phù Sa, Việt Nam (<http://www.phusabiochem.com/vi/.html>). Trình tự peptide gpgp (*glycine-proline-glycine-proline*) được sử dụng để liên kết giữa 2 chuỗi peptide S<sub>1</sub>C và CT24 [2].

Vector biểu hiện pQE30 (Qiagen, Đức) và chủng vi khuẩn *E. coli* M15 do phòng thí nghiệm Viện nghiên cứu Hoạt chất Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

### 2.2 Phương pháp

**Tạo dòng gen S<sub>1</sub>C và phân tích trình tự DNA:** Đoạn gen S<sub>1</sub>C được tổng hợp bằng phương pháp PCR [8] dựa trên khuôn mẫu DNA plasmid pJET/S<sub>1</sub>C-CT24 với cặp mồi đặc hiệu (Hình 1D). Để thuận tiện cho việc gắn kết gen đích vào vector biểu hiện pQE30, mồi đặc hiệu được bổ sung thêm trình tự nhận biết enzyme cắt giới hạn *Bam*HI ở đầu 5' (mồi xuôi) và *Kpn*II ở đầu 3' (mồi ngược). Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction kit (Thermo Scientific) được gắn vào vector tạo dòng pGEM-T easy. Hỗn hợp dung dịch gắn qua đêm ở nhiệt độ phòng được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng TOP10. Tế bào biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB agar có bổ sung 50 mg/L ampicillin. Tiến hành sàng lọc các dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* mang DNA plasmid tái tổ hợp pGEM-T easy/S<sub>1</sub>C bằng phương pháp enzyme cắt giới hạn [10]. Sau khi nhân dòng thành công vào vector pGEM-T easy, trình tự DNA chính xác của gen

S<sub>1</sub>C được xác nhận bằng phương pháp cải tiến BigDye® Terminator v3.1 của công ty First BASE, Malaysia với mỗi T7 promoter: 5'- TAATACGACTCACTATAGGG. Trình tự DNA được phân tích bằng phần mềm ApE plasmid editor v2.0.55 (<http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

**Ghép nối gen S<sub>1</sub>C, S<sub>1</sub>C-CT24 vào vector biểu hiện:** Gen S<sub>1</sub>C và gen dung hợp S<sub>1</sub>C-CT24 lần lượt được tách dòng từ vector pGEM-T/S<sub>1</sub>C và pJET/S<sub>1</sub>C-CT24 bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Kpn*I. Hỗn hợp phản ứng cắt được phân tách trên gel agarose cùng với thang chuẩn DNA 1 kb plus (Thermo scientific). Sản phẩm cắt được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit trước khi tiến hành gắn vào vector biểu hiện pQE30. Hỗn hợp dung dịch gắn được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng TOP10 trước khi chọn lọc trên môi trường LB agar có bổ sung 50 mg/L ampicillin. Sàng lọc các dòng vi khuẩn *E. coli* TOP10 mang DNA plasmid tái tổ hợp pQE30/S<sub>1</sub>C và pQE30/S<sub>1</sub>C-CT24 bằng phương pháp enzyme cắt giới hạn [10].

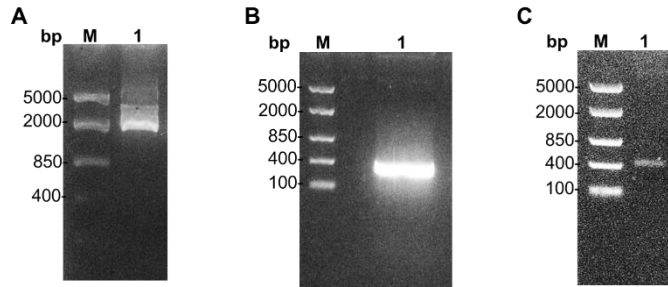
**Tạo dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* M15 mang vector biểu hiện:** Các plasmid tái tổ hợp được tách chiết và lần lượt biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng M15 bằng phương pháp shock nhiệt [7]. Thể biến nạp được chọn lọc trên môi trường LB agar bổ sung 50 mg/L ampicillin và 50 mg/L kanamycin. Tách chiết DNA plasmid [6] từ các thể biến nạp và kiểm tra sự hiện diện của chúng bằng phương pháp enzyme cắt hạn chế [10].

### 3 Kết quả và thảo luận

#### 3.1 Tạo dòng gen S<sub>1</sub>C và giải trình tự

**Tạo dòng gen S<sub>1</sub>C:** Trên cơ sở trình tự DNA mã hóa miền spike glycoprotein của virus HUA-PED45 (GenBank: KP455313.1), chúng tôi đã thiết kế mỗi đặc hiệu để tổng hợp đoạn gen S<sub>1</sub>C bằng phương pháp PCR (Hình 1D) [8]. Sản phẩm PCR khuếch đại dựa trên khuôn mẫu DNA plasmid pJET/S<sub>1</sub>C-CT24 (Hình 1A) được kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR thể hiện 1 băng đặc hiệu có kích thước 423 bp, phù hợp với kích thước tính toán dựa trên lý thuyết (Hình 1C).

Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được tạo dòng vào vector pGEM-T easy (Promega, Mỹ). Tiến hành sàng lọc dòng khuẩn lạc tái tổ hợp trên môi trường LB agar bổ sung 50 mg/L ampicillin. Để xác nhận sự hiện diện của gen S<sub>1</sub>C trong thể tái tổ hợp, 10 dòng khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên để tách DNA plasmid trước khi kiểm tra bằng phương pháp enzyme cắt giới hạn sử dụng *Bam*HI/*Kpn*I. Kết quả điện di cho thấy các mẫu DNA plasmid có kích thước khác nhau. Trong đó, các plasmid có kích thước lớn hơn (#6, #7, #9 và #10) được chọn để kiểm tra thể tái tổ hợp mong muốn (Hình 2A). Kết quả xử lý đồng thời DNA plasmid bằng *Bam*HI và *Kpn*I cho thấy cả 4 dòng khuẩn lạc đều xuất hiện băng DNA có kích thước xấp xỉ 435 bp và 3,5 kb tương ứng với kích thước của đoạn gen S<sub>1</sub>C và plasmid pGEM-T easy mạch thẳng theo tính toán dựa trên lý thuyết (Hình 2B).

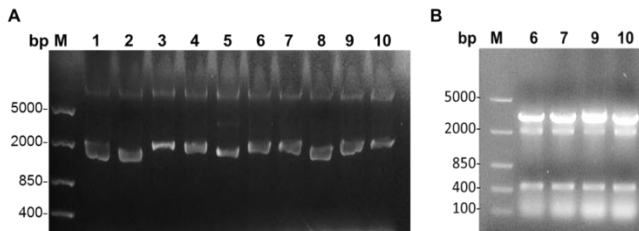


D

Tên môi	5'- Trình tự nucleotide-3'
<i>Bam</i> HI-S <sub>1</sub> C-F	<u>ggatcc</u> GTTACTTTGCCATCATTT
<i>Kpn</i> I-S <sub>1</sub> C-R	<u>ggtacc</u> TTAAACGTCCGTAACACCTTC

**Hình 1.** Kết quả khuếch đại PCR và tinh sạch gen S<sub>1</sub>C

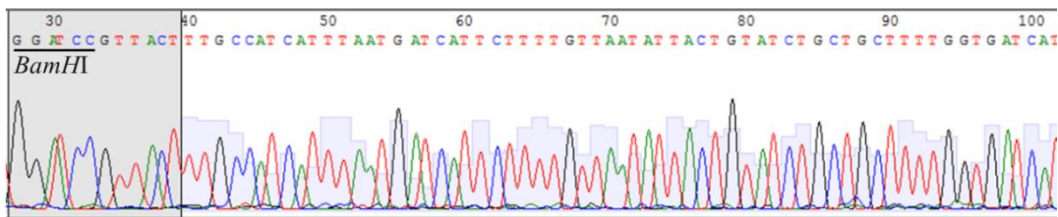
M: Thang chuẩn DNA (Fast ruler middle range, Thermo); DNA plasmid pJET/S<sub>1</sub>C-CT24 được dùng làm khuôn mẫu (A); sản phẩm PCR gen S<sub>1</sub>C trước (B); sau khi tinh sạch (C) và các môi sử dụng trong nghiên cứu (D)



**Hình 2.** Kết quả điện di DNA plasmid (A) và sản phẩm cắt bởi BamHI/KpnI (B)

M: Thang chuẩn DNA (Fast ruler middle range, Thermo scientific); giếng 1–10: các mẫu DNA plasmid tách chiết từ các dòng khuẩn lạc tái tổ hợp.

**Giải trình tự DNA:** Sau khi nhân dòng thành công đoạn gen S<sub>1</sub>C vào vector pGEM-T easy/S<sub>1</sub>C, trình tự DNA chính xác của gen S<sub>1</sub>C được xác nhận bằng phương pháp cải tiến BigDye® Terminator v3.1 của công ty First BASE, Malaysia. Hình ảnh các peak trong giải trình tự gen S<sub>1</sub>C thể hiện ở hình 3. Kết quả phân tích cho thấy trình tự gen S<sub>1</sub>C trong dòng tế bào *E. coli* TOP10 tái tổ hợp (dòng #10) tương đồng 100% với trình tự DNA của PEDV đã công bố trên GenBank (mã số: KP455313.1) (Hình 4). Plasmid tái tổ hợp này được đặt tên thành pVT4. Chúng vi khuẩn *E. coli* TOP10 mang plasmid tái tổ hợp pVT4 được bảo quản với glycerol ở -20 °C.



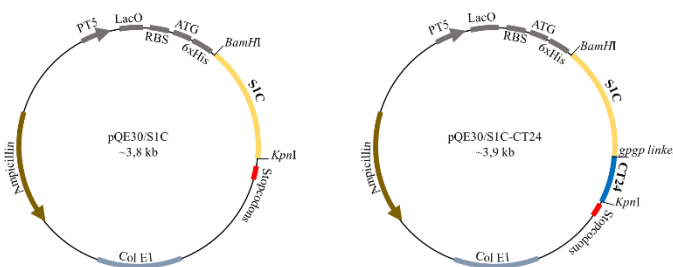
**Hình 3.** Hình ảnh peak giải trình tự nucleotide đoạn gen S<sub>1</sub>C

S1C	-----	BamHI	ggaTCCGTTA	CITTGCCATC	ATTTAATGAT	CAITCTITTTG
HUA-PED45	AACCTTCTGA	GTCATGAACA	GCCAACTTCT	---TTTGTTA	CITTGCCATC	ATTTAATGAT
S1C	TTAATATTAC	TGTAICTGCT	GCTTTTGGTG	ATCATAGTGG	TGCCAACCTT	ATTGCATCTG
HUA-PED45	TTAATATTAC	TGTAICTGCT	GCTTTTGGTG	ATCATAGTGG	TGCCAACCTT	ATTGCATCTG
S1C	CAATGGGTTT	AGTTCCTTCT	GTGTTGACAC	TAGACAATTT	ACCATTTCAC	TGTTTTATAA
HUA-PED45	CAATGGGTTT	AGTTCCTTCT	GTGTTGACAC	TAGACAATTT	ACCATTTCAC	TGTTTTATAA
S1C	AGTTAIGTTT	ATGTGTCTAA	ATCACAGGAC	AGTAATTGCC	CITTTACCTT	GCAATCTGTT
HUA-PED45	AGTTAIGTTT	ATGTGTCTAA	ATCACAGGAC	AGTAATTGCC	CITTTACCTT	GCAATCTGTT
S1C	TGTCITTTAG	CAAATTTTGT	GTTTCTACCA	GCCITTTGGC	TAGTGCCTGT	ACCATAGATC
HUA-PED45	TGTCITTTAG	CAAATTTTGT	GTTTCTACCA	GCCITTTGGC	TAGTGCCTGT	ACCATAGATC
S1C	CCCTGAGTTT	GGTAGTGGTG	TTAAGTTCAC	GTCCCTTTAC	TTTCAATTCA	CAAAGGGTGA
HUA-PED45	CCCTGAGTTT	GGTAGTGGTG	TTAAGTTCAC	GTCCCTTTAC	TTTCAATTCA	CAAAGGGTGA
S1C	GGCAGCGCTA	AACCACITGA	AGGTGTTACG	GACGTTTAAg	gtacc-----	-----
HUA-PED45	GGCAGCGCTA	AACCACITGA	AGGTGTTACG	GACGTTTCTT	TTATGACTCT	GGGTGTGTGT

Hình 4. Kết quả so sánh trình tự gen S1C trong dòng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp với trình tự DNA của virus HUA-PED45 trên Genbank (Mã số: KP455313.1)

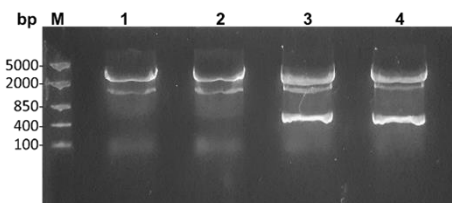
### 3.2 Ghép nối gen S1C và S1C-CT24 vào vector biểu hiện

Trình tự DNA mã hóa S1C và S1C-CT24 được tách dòng từ vector pVT4 (pGEM-T easy/S1C) và vector pJET/S1C-CT24 tương ứng (Hình 5). DNA plasmid của chúng được xử lý đồng thời bằng 2 enzyme *Bam*HI và *Kpn*I; sản phẩm cắt được kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 6) trước khi tiến hành tinh sạch vector pQE30 mở vòng (~3,4 kb) và gen dung hợp S1C-CT24 (~519 bp) bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

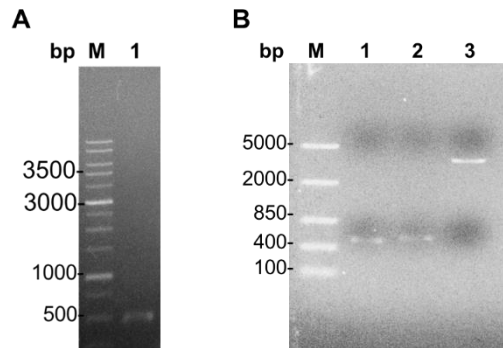


Hình 5. Cấu trúc vector biểu hiện pQE30/S1C và pQE30/S1C-CT24

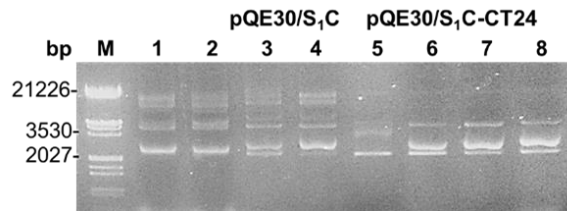
Gen chọn lọc kháng sinh ampicillin, Col E1: điểm khởi đầu sao chép; PT5: vùng khởi động phiên mã; LacO: operator lactose; RBS: vùng liên kết ribosome; mã khởi đầu ATG; gpgp linker: glycine-proline-glycine-proline được sử dụng để liên kết 2 chuỗi peptide



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm cắt vector pQE30 và pJET/S1C-CT24  
M: Thang chuẩn DNA (Fast ruler middle range, Thermo scientific); sản phẩm cắt vector pQE30 (giếng 1–2) và pJET/S1C-CT24 (giếng 3–4) bằng *Bam*HI và *Kpn*I.



**Hình 7.** Kết quả điện di sản phẩm tinh sạch gen S<sub>1</sub>C (A), gen dung hợp S<sub>1</sub>C-CT24 và vector pQE30 mở vòng (B)

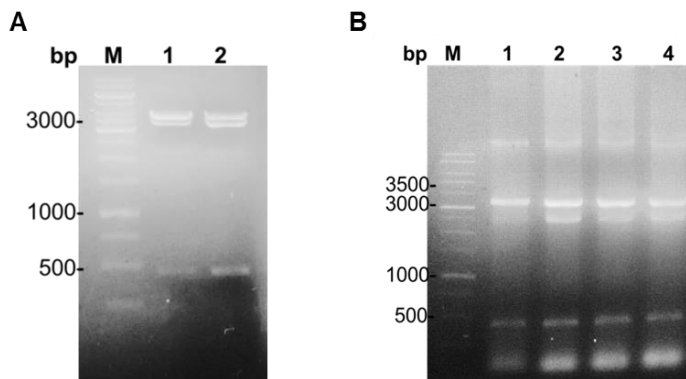


**Hình 8.** Kết quả điện di DNA plasmid pQE30/S<sub>1</sub>C  
 M: Thang chuẩn DNA (*Lambda DNA/HindIII*, Thermo Scientific); mẫu DNA plasmid pQE30/S<sub>1</sub>C (giếng 3–4) và pQE30/S<sub>1</sub>C-CT24 (giếng 5–8)

Sản phẩm của phản ứng cắt được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) và kiểm tra trên gel agarose 1% (Hình 7A, B). Kết quả điện di cho thấy sản phẩm sau khi tinh sạch đạt yêu cầu về nồng độ và mức độ tinh sạch, có thể sử dụng làm nguyên liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Sản phẩm tinh sạch sau khi thu hồi được ghép nối vào vector biểu hiện pQE30 (Qiagen, Đức) đã mở vòng và biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng TOP10. Các dòng khuẩn lạc tái tổ hợp được sàng lọc trên môi trường LB agar bổ sung 50 mg/L ampicillin. Để xác nhận sự hiện diện của gen S<sub>1</sub>C và S<sub>1</sub>C-CT24 trong thể tái tổ hợp, 8 dòng khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra bằng phương pháp enzyme cắt giới hạn. DNA plasmid của chúng được tách chiết bằng phương pháp Alkaline prep [6] (Hình 8).

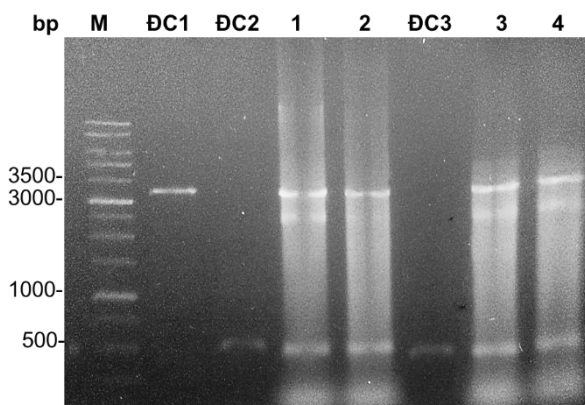
Kết quả điện di cho thấy DNA plasmid tách chiết từ các dòng vi khuẩn *E. coli* tái tổ hợp có kích thước khá tương đồng. Kết quả xử lý DNA plasmid đồng thời với *Bam*HI và *Kpn*I cho thấy tất cả các dòng khuẩn lạc được chọn đều xuất hiện băng DNA có kích thước xấp xỉ 435 bp, 519 bp và 3,4 kb phù hợp với kích thước của đoạn gen S<sub>1</sub>C, S<sub>1</sub>C-CT24 và vector pQE30 mạch thẳng tương ứng, theo tính toán dựa trên lý thuyết (Hình 9A, B). Plasmid tái tổ hợp mang đoạn gen mong muốn S<sub>1</sub>C hoặc S<sub>1</sub>C-CT24 lần lượt được đặt tên thành pVT5 và pVT6.



**Hình 9.** Kết quả điện di sản phẩm cắt vector biểu hiện pQE30/S<sub>1</sub>C (A) và pQE30/S<sub>1</sub>C-CT24 (B)  
M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific); giếng 1–4: các mẫu DNA plasmid xử lý đồng thời với *Bam*HI và *Kpn*I.

### 3.3 Biến nạp vector pVT5, pVT6 vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng M15

Vector biểu hiện pVT5 và pVT6 mang đoạn gen S<sub>1</sub>C và S<sub>1</sub>C-CT24 lần lượt được biến nạp vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng M15 bằng phương pháp shock nhiệt. Các thể biến nạp được chọn ngẫu nhiên để tách chiết DNA plasmid bằng phương pháp Alkaline prep trước khi tiến hành cắt kiểm tra với đồng thời 2 enzyme *Bam*HI và *Kpn*I. Kết quả điện di sản phẩm cắt (Hình 10) cho thấy xuất hiện bằng DNA tương đồng với đối chứng có kích thước 432 bp, 519 bp và 3,4 kb phù hợp với kích thước của đoạn gen S<sub>1</sub>C, S<sub>1</sub>C-CT24 và vector pQE30 mạch thẳng. Kết quả thể hiện vector pVT5 (pQE30/S<sub>1</sub>C) và pVT6 (pQE30/S<sub>1</sub>C-CT24) đã biến nạp thành công vào tế bào vi khuẩn *E. coli* chủng M15.



**Hình 10.** Kết quả điện di cắt plasmid pQE30/S<sub>1</sub>C và pQE30/S<sub>1</sub>C-CT24  
M: Thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo scientific); giếng ĐC1: sản phẩm tinh sạch vector pQE30 mạch thẳng; giếng ĐC2: sản phẩm tinh sạch đoạn gen S<sub>1</sub>C-CT24; giếng ĐC3: sản phẩm tinh sạch đoạn gen S<sub>1</sub>C; mẫu DNA plasmid pVT6 (giếng 1–2) và pVT5 (giếng 3–4) sau khi xử lý với *Bam*HI và *Kpn*I

## 4 Kết luận

Bằng các kỹ thuật sinh học phân tử, chúng tôi đã nhân bản thành công và xác định trình tự DNA chính xác của gen S<sub>1</sub>C trong vector pGEM-T easy. Gen S<sub>1</sub>C và gen dung hợp S<sub>1</sub>C-CT24 đã tạo dòng thành công vào vector biểu hiện pQE30. Hai dòng tế bào vi khuẩn *E. coli* M15 tái tổ hợp mang vector biểu hiện pVT5 và pVT6 đã được sàng lọc sẽ là cơ sở cho nghiên cứu biểu hiện cũng như sản xuất các kháng nguyên tái tổ hợp này.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu khoa học cấp Đại học Huế (mã số: DHH2018-04-127). Các tác giả xin chân thành cảm Phòng thí nghiệm bộ môn Công nghệ Sinh học, Khoa Sinh học và Viện nghiên cứu hoạt chất sinh học – Trường Đại học Khoa học – Đại học Huế đã tạo điều kiện cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

## Tài liệu tham khảo

1. Chang, S. H., Bae, J. L., Kang, T. J., Kim, J., Chung, G. H., Lim, C. W., Jang, Y. S. (2002). Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus. *Molecules and cells*, 14(2), 295–299.
2. Chia, M. Y., Hsiao, S. H., Chan, H. T., Do, Y. Y., Huang, P. L., Chang, H. W., Jeng, C. R. (2010). The immunogenicity of DNA constructs co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus conjugated by GPGP linker in pigs. *Veterinary microbiology*, 146(3–4), 189–199.
3. Cruz, D. J. M., Kim, C. J., & Shin, H. J. (2006). Phage-displayed peptides having antigenic similarities with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) neutralizing epitopes. *Virology*, 354(1), 28–34.
4. Cruz, D. J. M., Kim, C. J., & Shin, H. J. (2008). The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize Porcine epidemic diarrhea virus. *Virus research*, 132(1–2), 192–196.
5. Duy, D. T., Toan, N. T., Suphasawatt, P., & Thanawongnuwech, R. (2011). Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009–2010 outbreaks. *Thai J Vet Med*, 41(1), 55–64.
6. Ehrt, S., & Schnappinger, D. (2003). Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. In *E. coli Plasmid Vectors*. Humana Press (235), 75–78.
7. Froger, A., & Hall, J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments*, (6): 253.
8. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (2012). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic press.
9. Kim, Y. K., Lim, S.-I., Lim, J.-A., Cho, I.-S., Park, E.-H., Hien, N. B., An, D.-J. (2015). A novel strain of porcine epidemic diarrhea virus in Vietnamese pigs. *Archives of virology*, 160(6), 1573–1577.
10. Klein, R. D., Selsing, E., & Wells, R. D. (1980). A rapid microscale technique for isolation of recombinant plasmid DNA suitable for restriction enzyme analysis. *Plasmid*, 3(1), 88–91.
11. Lei, X., Yang, Y., Xu, Y., Zhao, P., Wang, B., & Huang, Y. (2018). Progress in serology and clinical diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 44(2), 149–156.



12. Song, D., Moon, H., & Kang, B. (2015). Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines. *Clinical and experimental vaccine research*, 4(2), 166–176.
13. Song, D., & Park, B. (2012). Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus genes*, 44(2), 167–175.
14. Sun, D. (2008). Identification of porcine epidemic diarrhea virus S protein epitope and preliminary screening of receptor binding domain. (Luận án Tiến sĩ), Chinese Academy of Agricultural Sciences.
15. Sun, D., Feng, L., Shi, H., Chen, J., Cui, X., Chen, H., Tong, G. (2008). Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein. *Veterinary microbiology*, 131(1–2), 73–81.
16. Tiến, N. T., Hằng, V. T. T., Lê, H. T. M., Hiên, N. B., & Phan, L. V. (2013). Một số đặc điểm sinh học phân tử của virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine Epidemic Diarrhea-PED) tại Quảng trị, Thái nguyên và Thái bình từ năm 2011–2013. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 13(7), 1089–1100.
17. Toàn, N. T., Duy, Đ. T., & Lò, T. (2013). Đặc trưng kiểu gene S và gene M của porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) gây bệnh tiêu chảy cấp trên heo trong giai đoạn từ 2011–2013. *Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh*.
18. Trí, H. M., Việt, N. H., & Hải, N. N. (2017). Khảo sát tỷ lệ nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy cấp (Porcine epidemic diarrhea virus-PEDV) trên heo nái và xác định các yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh PED tại tỉnh Tiền Giang. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52, 1–7.

## CLONING *ESCHERICHIA COLI* HARBORING EXPRESSION OF NEUTRALIZING EPITOPES (S<sub>1</sub>C AND S<sub>1</sub>C-CT24) OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA VIRUS

Nguyen Quang Duc Tien<sup>1\*</sup>, Le Quang Man<sup>1</sup>, Nguyen Duy Khiem<sup>1</sup>,  
Dang Thi Trang<sup>1</sup>, Nguyen Ngoc Luong<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, College of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

<sup>2</sup> Institute of Bioactive Compounds, College of Sciences, Hue University, 77 Nguyen Hue St., Hue, Vietnam

**Abstract.** Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) belongs to family Coronaviridae and causes acute diarrhea in swine. The disease spreads rapidly and causes a high mortality rate. Thus, PEDV is considered as one of the major concerns of the pig industry around the world. The nucleotide sequence encoding epitope S<sub>1</sub>C and peptide CT24 has been shown to induce neutralizing antibody responses, which are suitable for the development of recombinant PEDV vaccines. Recently, a novel strain of PEDV (HUA-PED45) belonging to the G2b group was discovered in Vietnam causing great losses to pig farms. Research of this PEDV strain at the molecular level in Vietnam is necessary to provide materials for the production of the recombinant PEDV vaccines or diagnostic kit. In this study, the S<sub>1</sub>C alone or S<sub>1</sub>C-CT24 fusion gene of the HUA-PED45 strain was synthesized, sequenced and cloned in expression vector pQE30 (Qiagen, Germany). These expression vectors transformed into *E. coli* strain M15 could provide the expression constructs for further experiments.

**Keywords:** PEDV, S<sub>1</sub>C, S<sub>1</sub>C-CT24, *E. coli* strain M15