

TÁCH DÒNG VÀ BIỂU HIỆN ĐOẠN GEN MÃ HÓA VÙNG QUYẾT ĐỊNH KHÁNG NGUYÊN 56 KDa CỦA VI KHUẨN *ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI* TRONG *ESCHERICHIA COLI*

LÊ THỊ LAN ANH⁽¹⁾, NGUYỄN VĂN MINH⁽¹⁾, TRỊNH VĂN TOÀN⁽²⁾,
BÙI THỊ THANH NGÀ⁽¹⁾, VÕ VIỆT CƯỜNG⁽¹⁾

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh sốt mò hay sốt bụi rậm (scrub typhus) là bệnh truyền nhiễm cấp tính, lây truyền từ động vật sang người thông qua vector truyền bệnh là ấu trùng mò. Tác nhân gây bệnh sốt mò là vi khuẩn *Orientia tsutsugamushi* ký sinh nội bào bắt buộc và bắt màu Gram âm. Bệnh lưu hành phổ biến ở khu vực Châu Á-Thái Bình Dương. Hàng năm có xấp xỉ 1 triệu ca bệnh và trên 1 tỷ người có nguy cơ mắc bệnh [5]. Dựa trên đặc điểm của kháng nguyên bề mặt đặc hiệu 56 kDa, *O. tsutsugamushi* được chia thành các nhóm huyết thanh khác nhau như: Gilliam, Kato, Karp, Boryong, TA763... Bằng Western blot, các nhà khoa học đã phát hiện ra 4 kháng nguyên của vi khuẩn có kích thước 22 kDa, 47 kDa, 56 kDa và 110 kDa. Trong đó, kháng nguyên 56 kDa chiếm 10-15% protein tổng số tế bào, mang tính đặc hiệu cao và không biểu hiện ở các *Rickettsia* khác [3]. Trong huyết thanh bệnh nhân sốt mò mang kháng thể kháng kháng nguyên 56 kDa với hiệu giá cao, do đó xét nghiệm chẩn đoán huyết thanh dựa trên kháng nguyên 56 kDa được sử dụng rộng rãi để chẩn đoán bệnh sốt mò [4, 9].

Sự lưu hành của các nhóm *O. tsutsugamushi* thay đổi theo khu vực địa lý, giữa các nhóm *O. tsutsugamushi* có sự khác biệt cao về mặt di truyền gen mã hóa cho kháng nguyên 56 kDa [5]. Vì vậy, để tăng độ nhạy các sinh phẩm phát hiện nhiễm *O. tsutsugamushi* hỗn hợp protein 56 kDa tái tổ hợp của các nhóm *O. tsutsugamushi* [7, 14] đã được nghiên cứu phối trộn. Gen mã hóa kháng nguyên 56 kDa có 4 vùng biến đổi đóng vai trò quan trọng trong quyết định kháng nguyên, việc loại bỏ 80 axit amin đầu N và 80 axit amin đầu C của kháng nguyên không làm ảnh hưởng đến vai trò đó [3, 4]. Kết quả một số nghiên cứu cho thấy nhóm Karp lưu hành phổ biến ở Việt Nam [11, 12]. Trong số 12 mẫu bệnh phẩm thu thập năm 2016 tại Bệnh viện Quân y 105 dương tính với *O. tsutsugamushi* đã xác định 8 chủng thuộc nhóm Karp [1]. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả trình bày kết quả tách dòng và biểu hiện đoạn gen mã hóa vùng quyết định kháng nguyên 56 kDa của *O. tsutsugamushi* thuộc nhóm Karp từ mẫu HT-09 thu thập ở Bệnh viện Quân y 105 trong tế bào *E. coli* BL21. Kháng nguyên 56 kDa tái tổ hợp (HT-09) sau đó được tinh chế và sử dụng làm nguyên liệu để tạo bộ kit ELISA phát hiện *O. tsutsugamushi*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chủng vi sinh vật, plasmid và huyết thanh

- Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5 α [*end A1 rec A1 hsd R17 sup E44 gyp A96 thi-1 relA1 Δ lac U169 (p80 lacZM15)*], *E. coli* BL21 [*F-omp hsd SB (rBmB) gel dem (DE3) plysS (Caml)*] (Invitrogen) được sử dụng để nhân dòng và biểu hiện đoạn gen mã hóa kháng nguyên 56 kDa.

- Vector tách dòng và biểu hiện pET22b(+) (Invitrogen).
- DNA tổng số tách chiết từ mẫu máu bệnh nhân sốt mò (HT-09) do Bệnh viện Quân y 105 (Sơn Tây, Hà Nội) cung cấp được sử dụng làm khuôn để nhân đoạn gen mã hóa kháng nguyên 56 kDa.
- Huyết thanh bệnh nhân sốt mò (xác định bằng nested PCR) [5], dương tính với kháng thể kháng kháng nguyên 56 kDa *O. tsutsugamushi* (xác định bằng test nhanh SD-bioline, Hàn Quốc) được sử dụng để lai Western blot.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế vector tách dòng và biểu hiện pET22b(+) mang trình tự mã hóa cho kháng nguyên 56 kDa

Đoạn gen *ht-09* mã hóa cho một phần kháng nguyên 56 kDa có kích thước 1149 bp được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi P2BKARPF 5'-AAG GCC ATG GCT ATG ACA ATT GCT CAA GGT TTT AGA-3' / *Nco*I và P22BKARPR 5'-GAC GTC GAC AAG CTT CTC GAG AAC ACC AGC ATA TAT TGA -3'/*Xho*I (phần chữ được gạch chân là trình tự nhận biết của enzyme giới hạn tương ứng). Chương trình phản ứng PCR như sau: 98°C trong 30 giây, 25 chu kỳ với mỗi chu kỳ gồm 98°C trong 10 giây, 53°C trong 30 giây và 72°C trong 1 phút và giai đoạn kéo dài được thực hiện ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng PCR purification kit (Thermo Scientific). Sản phẩm PCR sau tinh sạch được cắt tạo đầu dính bằng enzyme giới hạn *Nco*I và *Xho*I, sau đó ghép nối vào vector pET22b(+) bằng enzyme nối T4 DNA ligase (Thermo Scientific) tạo thành plasmid tái tổ hợp pET22b_ *ht-09*.

2.2.2. Biểu hiện đoạn gen *ht-09* trong tế bào *E. coli* BL21

Tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22b_ *ht-09* được nuôi trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung 100 µg/ml ampicillin (LBamp), ở 37°C, qua đêm. Chuyển 1% dịch nuôi cấy trên vào môi trường LBamp, nuôi cấy ở cùng điều kiện đến khi OD₆₀₀ đạt 0,4÷0,6 tiến hành cảm ứng với 0,5 mM IPTG. Tế bào tiếp tục được nuôi cấy ở cùng điều kiện trong 4 giờ. Thu mẫu bằng li tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Protein tổng số được phân tích bằng điện di SDS-PAGE và Western blot.

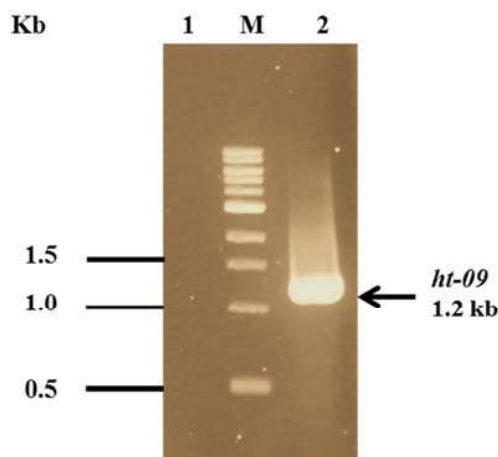
2.2.3. Kiểm tra khả năng bắt cặp đặc hiệu của protein tái tổ hợp với huyết thanh kháng *O. tsutsugamushi*

Protein tổng số sau điện di trên gel polyacrylamide 12,6% và sau đó chuyển lên màng PVDF sử dụng thiết bị chuyển màng (Cleaver Scientific) trong 1 giờ. Màng sau đó được ủ trong dung dịch sữa gầy 5% pha trong dung dịch TBS (0,5M Tris HCl, pH7,5; 2,5M NaCl) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Tiến hành rửa màng bằng dung dịch TTBS (TBS bổ sung 0,05% Tween-20) và TBS 3 lần, mỗi lần 5 phút. Màng sau đó được ủ với huyết thanh kháng *O. tsutsugamushi* pha loãng 2000 lần trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Màng sau đó tiếp tục được rửa bằng dung dịch TTBS và TBS. Sau đó, ủ màng trong kháng thể 2 là kháng thể kháng IgM cộng hợp HRP, pha loãng 10000 lần trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Màng sau đó được rửa bằng dung dịch TBS và TTBS. Cuối cùng màng được hiện màu bằng dung dịch hiện màu TMB (Thermo Scientific).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tạo dòng tế bào *E. coli* DH5 α mang vector tái tổ hợp pET22b_ht-09

Đoạn gen *ht-09* mã hóa kháng nguyên 56 kDa (HT-09) của chủng *O. tsutsugamushi* được nhân lên bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu đã được đề cập trong phần phương pháp. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kết quả điện di trên hình 1 cho thấy, sản phẩm PCR là một băng đậm có kích thước khoảng 1,2 kb đúng như tính toán (hình 1, đường chạy 2). Như vậy, đoạn gen *ht-09* đã được khuếch đại thành công bằng phản ứng PCR.



Hình 1. Nhân đoạn gen *ht-09* bằng PCR

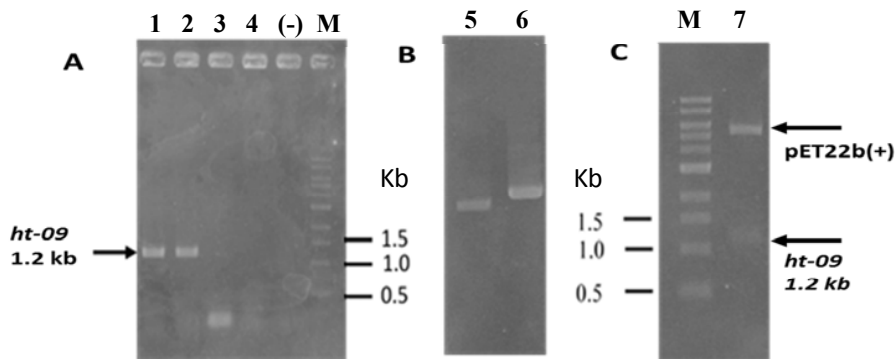
Đường chạy 1: Đối chứng; Đường chạy 2: Sản phẩm PCR đoạn gen *ht-09*,

M: DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và cắt tạo đầu so le bằng enzyme giới hạn *Nco*I và *Xho*I sau đó được ghép nối vào vector pET22b(+) đã được cắt mở vòng bằng 2 enzyme trên để tạo plasmid tái tổ hợp pET22b_ht-09. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt và được sàng lọc trên môi trường LB thạch có bổ sung ampicillin. Các khuẩn lạc sinh trưởng trên môi trường LBamp thạch được tiến hành PCR để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen *ht-09* (hình 2A). Chọn ngẫu nhiên 4 khuẩn lạc *E. coli* DH5 α /pET22b_ht-09 sử dụng trực tiếp làm khuôn DNA cho phản ứng PCR. Kết quả cho thấy, trong 4 khuẩn lạc được lựa chọn sản phẩm PCR của khuẩn lạc số 1 và số 2 xuất hiện vạch băng có kích thước khoảng 1,2 kb tương ứng với kích thước tính toán của đoạn gen *ht-09* (hình 2A, đường chạy 1 và 2).

Khuẩn lạc số 1 sau đó được tiến hành nuôi cấy trong môi trường LBamp lỏng, ở 37°C qua đêm để tách chiết DNA plasmid. Plasmid tái tổ hợp pET22b_ht-09 và vector pET22b(+) không mang gen được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Theo nguyên lý của điện di DNA trên gel agarose, plasmid tái tổ hợp pET22b_ht-09 có kích thước lớn hơn sẽ chạy chậm hơn plasmid pET22b(+) trên trường điện di. Kết quả trên hình 2B cho thấy, vạch băng trên đường chạy số 5 là plasmid pET22b(+) thấp hơn so với vạch băng trên đường chạy số 6 là plasmid dự đoán pET22b_ht-09.

Để khẳng định plasmid trên mang đoạn gen *ht-09*, plasmid pET22b_ *ht-09* được cắt kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn *Nco*I và *Xho*I. Kết quả trên hình 2C cho thấy sản phẩm cắt là 2 băng DNA có kích thước 5,5 kb tương ứng với kích thước của plasmid pET22b(+) và 1,2 kb tương ứng với kích thước của đoạn gen *ht-09*. Như vậy, đoạn gen *ht-09* đã tách dòng thành công trong vector pET22b(+). Plasmid tái tổ hợp pET22b_ *ht-09* được kiểm tra bằng phương pháp giải trình tự gen sử dụng cặp môi T7 promoter và T7 terminator nằm trong vector pET22b(+). Kết quả phân tích trình tự gen cho thấy đoạn gen *ht-09* có trình tự nguyên vẹn, không chứa đột biến và được ghép nối đúng chiều vào vector pET22b(+) đặt dưới sự kiểm soát của T7 promoter.



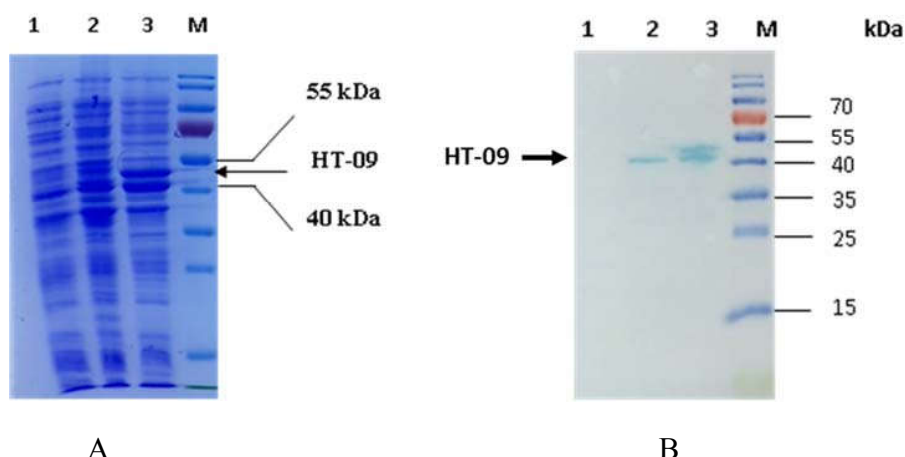
Hình 2. Điện di đồ kết quả thiết kế vector biểu hiện pET22b_ *ht-09*.

A: PCR khuẩn lạc *E. coli* DH5α mang pET22b_ *ht-09*; B: Kiểm tra plasmid pET22b_ *ht-09*; C: Kiểm tra sản phẩm cắt plasmid tái tổ hợp pET22b_ *ht-09* bằng enzyme giới hạn *Nco*I và *Xho*I. Đường chạy 1-4: các khuẩn lạc *E. coli* DH5α mang pET22b_ *ht-09*; Đường chạy 5: Vector pET22b(+) không mang gen; Đường chạy 6: Vector pET22b(+) mang đoạn gen *ht-09* khuẩn lạc số 1; Đường chạy 7: Sản phẩm cắt plasmid pET22b_ *ht-09*; M: DNA chuẩn 1kb.

3.2. Biểu hiện kháng nguyên HT-09

Plasmid tái tổ hợp pET22b_ *ht-09* được biến nạp vào tế bào biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) bằng phương pháp sốc nhiệt. Dòng tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22b_ *ht-09* được nuôi cấy trong môi trường LBA ở 37°C và cảm ứng biểu hiện protein HT-09 ở 0,5 mM IPTG trong 4 giờ. Dịch tế bào sau cảm ứng được thu lại bằng ly tâm. Tủa tế bào chứa protein tổng số được hòa lại trong đệm Tris-HCl 20 mM và điện di kiểm tra trên gel polyacrylamide 12,6%. Theo như tính toán, kháng nguyên HT-09 có khối lượng phân tử khoảng 42 kDa. Tuy nhiên, đoạn gen mã hóa cho kháng nguyên HT-09 được thiết kế có gắn thêm 6 histidine ở đầu C. Do đó, protein HT-09 được tổng hợp cùng với histidine có khối lượng phân tử khoảng 46 kDa. Kết quả phân tích protein tổng số chủng *E. coli* BL21 mang plasmid tái tổ hợp pET22b_ *ht-09* bằng điện di SDS-PAGE trên hình 3 cho thấy, vùng kích thước phân tử 40÷50 kDa xuất hiện băng protein đậm dự đoán là protein HT-09, băng này không quan sát thấy ở dòng đối chứng (hình 3A, đường chạy 3).

Để khẳng định bằng protein trên là protein HT-09 tái tổ hợp, nhóm tác giả đã tiến hành lai miễn dịch Western blot sử dụng kháng thể nhận biết là huyết thanh bệnh nhân sốt mò dương tính với *O. tsutsugamushi*. Kết quả (hình 3) cho thấy, trên màng lai PVDF, mẫu tế bào *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pET22b_ht-09 không cảm ứng với IPTG (đường chạy 2) và mẫu được cảm ứng với 0,5 mM IPTG trong 4 giờ (đường chạy 3) đều xuất hiện một băng protein có kích thước tương đương với HT-09, khoảng 46 kDa. Vạch băng này không xuất hiện ở mẫu tế bào *E. coli* mang plasmid pET22b(+) (đường chạy 1). Điều này chứng tỏ rằng băng xuất hiện ở giếng số 2 và số 3 là protein HT-09. Protein HT-09 được quan sát ở mẫu tế bào mang plasmid tái tổ hợp pET22b_ht-09 không cảm ứng với IPTG được giải thích là do hiện tượng biểu hiện rò rỉ khi không có chất cảm ứng IPTG (leaky expression) [8]. Ngoài ra, tế bào *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp pET22b_ht-09 khi được cảm ứng với IPTG còn xuất hiện băng thứ 2 có kích thước khoảng 50 kDa (giếng số 3). Kết quả này gợi ý rằng đây có thể là băng protein mới sinh nằm trong nội bào và chưa được chuyển qua khoang chu chất, vì vậy có thể tín hiệu tiết pelB chưa được cắt.



Hình 3. Điện di đồ kiểm tra sự biểu hiện của kháng nguyên HT-09 trong tế bào *E. coli* BL21 bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B).

Đường chạy 1: Tế bào *E. coli* BL21 mang vector pET22b(+) cảm ứng với 0,5mM IPTG;
Đường chạy 2: Tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid pET22b_ht-09 không cảm ứng với IPTG;
Đường chạy 3: Tế bào *E. coli* BL21 mang plasmid pET22b_ht-09 được cảm ứng với 0,5 mM IPTG trong 4 giờ; M: Protein chuẩn (Thermo Scientific).

Kiểm tra sự biểu hiện của protetin HT-09 tái tổ hợp bằng phương pháp miễn dịch Western Blot sử dụng kháng thể là mẫu huyết thanh bệnh nhân sốt mò dương tính với kháng thể kháng kháng nguyên 56 kDa của *O. tsutsugamushi* cho thấy protein HT-09 đã xuất hiện trên màng lai PVDF với kích thước theo đúng tính toán. Bên cạnh đó, protein HT-09 được thiết kế biểu hiện có gắn 6 gốc histidine vì vậy nhóm tác giả đã tiến hành kiểm chứng một lần nữa sự biểu hiện của protein HT-09 bằng phương pháp miễn dịch Western Blot sử dụng kháng thể kháng His-tag (Thermo Scientific). Kết quả cho thấy trên màng lai PVDF xuất hiện vạch băng

đúng kích thước tương tự như kết quả trên hình 3B (dữ liệu không chỉ ra). Hiện nay, trên thế giới có rất nhiều công bố về biểu hiện kháng nguyên 56 kDa của *O. tsutsugamushi* ứng dụng trong phát hiện và chẩn đoán sốt mò [10, 2, 6]. Bên cạnh đó, để nâng cao hiệu quả trong chẩn đoán sốt mò, các nhà nghiên cứu đã sử dụng hỗn hợp protein 56 kDa từ các nhóm *O. tsutsugamushi* khác nhau [7, 13, 14]. Trong nghiên cứu này, protein tái tổ hợp HT-09 chứa 4 vùng biến đổi của kháng nguyên 56 kDa liên kết đặc hiệu với kháng thể kháng *O. tsutsugamushi* trong huyết thanh bệnh nhân sốt mò đã được biểu hiện thành công trong tế bào *E. coli*. Kết quả này là cơ sở quan trọng để chế tạo bộ kit ELISA phát hiện nhiễm *O. tsutsugamushi* dựa trên kháng nguyên 56 kDa tái tổ hợp.

4. KẾT LUẬN

1. Đã tách dòng và biểu hiện thành công đoạn gen *ht-09* có kích thước 1149 bp mã hóa vùng quyết định kháng nguyên 56 kDa của *O. tsutsugamushi* trong vector pET22b(+). Protein HT-09 biểu hiện tốt trong tế bào *E. coli* BL21 ở điều kiện 37°C, nồng độ chất cảm ứng 0,5 mM IPTG trong 4 giờ.

2. Protein HT-09 tái tổ hợp có khả năng liên kết đặc hiệu với kháng thể kháng *O. tsutsugamushi* trong huyết thanh bệnh nhân sốt mò. Kết quả này là cơ sở quan trọng để chế tạo bộ kit ELISA phát hiện nhiễm *O. tsutsugamushi* dựa trên kháng nguyên 56 kDa tái tổ hợp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Viết Cường, Nguyễn Văn Minh, Phạm Thị Hà Giang, Dương Tuấn Linh, Nguyễn Văn Tình, *Nghiên cứu sự đa dạng di truyền của vi khuẩn O. tsutsugamushi trên bệnh nhân nghi nhiễm sốt mò tại Bệnh viện Quân y 105*, Hội nghị Đào tạo và Nghiên cứu Y học quân sự năm 2017, tr.169-173.
2. Chen W.J., Niu D.S., Zhang X.Y., Chen M.L., Cui H., Wei W.J., Wen B.H., Chen X.R., *Recombinant 56-kilodalton major outer membrane protein antigen of Orientia tsutsugamushi shanxi and its antigenicity*, Infect Immun, 2003, **71**(8):9-4772.
3. Ching W.M., Wang H., Eamsila C., Kelly D.J., Dasch G.A., *Expression and refolding of truncated recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of Orientia tsutsugamushi and its use in enzyme-linked immunosorbent assays*, Clin Diagn Lab Immunol, 1998, **5**(4):26-519.
4. Ching W.M., Chao C.C., *Recombinant chimeric antigens for diagnostic and prevention of scrub typhus*, US patent, 2012, US 8,287,876 B2.
5. Kelly D.J., Fuerst P.A., Ching W.M., Richards A.L., *Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of Orientia tsutsugamushi*, Clin. Infect. Dis., 2009, **48**:S203-30.

6. Kim I.S., Seong S.Y., Woo S.G., Choi M.S., Chang W.H., *High-level expression of a 56-kilodalton protein gene (bor56) of Rickettsia tsutsugamushi Boryong and its application to enzyme-linked immunosorbent assays*, J Clin Microbiol, 1993, **31**(3):598-605.
7. Kim Y.J., Yeo S.J., Park S.J., Woo Y.J., Kim M.W., Kim S.H., Chang I.A., Jeon S.H., Park B.J., Song G.J., Lee M.G., Kim I.S., Kim Y.W., *Improvement of the diagnostic sensitivity of scrub typhus using a mixture of recombinant antigens derived from Orientia tsutsugamushi serotypes*, J Korean Med Sci. 2013, **28**(5):9-672.
8. Kitagawa M.A., Takeshi A., Mohammad I.N., Tomoko I., Eiji T., Hiromi M., Hirotada, *Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (A complete set of E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research*, DNA Research., 2005, **12**(5):291-299.
9. Land M.V., Ching W.M., Dasch G.A., Zhang Z., Kelly D.J., Graves S.R., Devine P.L., *Evaluation of a commercially available recombinant-protein enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies produced in scrub typhus rickettsial infections*, J Clin Microbiol, **38**(7): 2701-2705
10. Min C., Hengbin G., Tang T., Changjun W., Xianfu L., Xiuzhen P., Zhu J., Jiaqi T., *Preparation of recombinant antigen of O. tsutsugamushi Ptan strain and development of rapid diagnostic reagent for scrub typhus*, Am. J. Trop. Med. Hyg, 2007, **76**(3): 553-558.
11. Nhiem L.V., Maureen L., Hoa L.T.P., Nho L.V., Oleg M., Didier R., Philippe P., *Use of eschar swabbing for the molecular diagnosis and genotyping of Orientia tsutsugamushi causing scrub typhus in Quang Nam province, Vietnam*, PLoS Negl Trop Dis, 2017, **11**(2): e0005397.
12. Nguyen H.L.K., Pham H.T.T., Nguyen T.V., Hoang P.V., Le M.T.Q., Takemura T., Hasebe F., Hayasaka D., Yamada A., Hotta K., *The genotypes of Orientia tsutsugamushi, identified in scrub typhus patients in northern Vietnam*, Trans R Soc Trop Med Hyg, 2017, **111**(3):137-139.
13. Rodkvamtook W., Zhang Z., Chao C.C., Huber E., Bodhidatta D., Gaywee J., Grieco J., Sirisopana N., Kityapan M., Lewis M., Ching W.M., *Dot-ELISA rapid test using recombinant 56-kDa protein antigens for serodiagnosis of scrub typhus*, Am J Trop Med Hyg, 2015, **92**(5):71-967.
14. Tay S.T., Rohani M.Y., Ho T.M., Devi S., *Expression of recombinant proteins of Orientia tsutsugamushi and their applications in the serodiagnosis of scrub typhus*, Diagn Microbiol Infect Dis, 2002, **44**(2):137-142.

SUMMARY

CLONING AND EXPRESSION OF DETERMINANT REGION OF 56 KDA TYPE-SPECIFIC ANTIGEN OF *ORIENTIA* *TSUTSUGAMUSHI* IN *ESCHERICHIA COLI*

The 56-kDa type-specific antigen is a major outer membrane protein located on the surface of *Orientia* species. This 56-kDa antigen has widely applied for evaluation and diagnosis of scrub typhus. However, these antigens are diversity among serotype. Therefore, most of diagnostic test for scrub typhus must be a combination of all types of 56 kDa antigens. In the previous study, we found that the most common genotype was identified in Vietnam belong to Karp, Kato, TA763, Gilliam genotypes. In order to create an ELISA kit for diagnose scrub typhus in Vietnam, these common genotypes are cloned and expressed in *E. coli* cells for producing recombinant proteins. In this study, a determinant antigen of 1149 bp gene encoding for 56 kDa antigen specific to Karp serotype of *O. tsutsugamushi* was cloned into pET22b(+) plasmid and expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells. The result indicated that the truncated 56 kDa antigen was successfully expressed in *E. coli* BL21 cells by inducing with 0.5 mM IPTG in 4 hours. Western blotting showed that HT09 protein reacted with the antiserum against *O. tsutsugamushi*. This recombinant HT-09 protein is able to use as a specific antigen for developing *O. tsutsugamushi* diagnostic.

Từ khóa: Sốt mò, kháng nguyên 56 kDa, tách dòng và biểu hiện gen; Scrub typhus, *Orientia tsutsugamushi*, 56 kDa type specific antigen, gene cloning and expression.

Nhận bài ngày 24 tháng 8 năm 2017

Hoàn thiện ngày 20 tháng 10 năm 2017

⁽¹⁾Viện Y sinh nhiệt đới, Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga,

⁽²⁾Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội