

**SYNTHESIS OF DOUBLE STRANDED RNA USING
IN VIVO AND *IN VITRO* APPROACHES TOWARDS
THE DEVELOPMENT OF RECOMBINANT
VACCINES IN GROUPER**

CHIN LAI MUN



**THIS DISSERTATION WAS SUBMITTED IN
FULLFILLMENT OF THE DEGREE OF
MASTERS IN MOLECULAR BIOLOGY**

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
2014**

ABSTRACT

Groupers are a commercially important fisheries resource and have been adopted as a target species by the aquaculture industry. The management of diseases in closed circuit systems remains as a major concern. Grouper Nervous Necrosis Virus (GNNV) is one of the examples of major causative agents of morbidity and mortality that led to heavy economic loss. Therefore, countermeasures such as development of vaccines are important to prevent further damage. RNA vaccines have several major advantages over DNA vaccines and double stranded RNA has been documented to be the key activator of the innate immune response making it a perfect candidate for vaccine development. Hence, this study was directed towards the synthesis of dsRNA using two methods; *in vivo* and *in vitro* transcription. The gene construct for GNNV coat protein-pLITMUS was developed for the expression of RNA encoding the coat protein of GNNV when IPTG was induced. Coat protein of GNNV and vector, pLITMUS 28i were isolated manually from TOP 10 stock and ligated using T4 DNA ligase before being cloned using TOP 10 as the bacterial host forming the gene construct, GNNV coat protein-pLITMUS. Subsequently, the expression recombinant DNA; GNNV coat protein-pLITMUS was transformed into *E. coli* C43 (DE3) and HT115 (DE3) in order to utilize the T7 RNA polymerase expression system present in these strains to produce dsRNA. Production of dsRNA via *in vivo* bacterial induction system was initiated in *E. coli* (C43 and HT115) by addition IPTG. Concurrently, dsRNA was also synthesized through *in vitro* transcription system using T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit. The production of dsRNAs by both approaches was verified via reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Results in RT-qPCR showed that dsRNA could be synthesized via both methods; *in vivo* and *in vitro* where *in vitro* transcription has showed a higher production rate in both C43 and HT115 with average C_T value of 20.28 and 17.94; respectively. On the other hand, *in vivo* transcription using C43 and HT115 had 22.59 and 22.12; respectively. In conclusion, *in vivo* transcription appeared to be a better production approach compared to *in vitro*. Even though *in vivo* transcription showed slightly lower production rate in RT-qPCR results, the production cost is of *in vitro* is very much higher compared to *in vivo* and it is not practical to utilize a costly approach in mass production of dsRNA for a small difference amount in yield.

ABSTRAK

SINTESIS RNA BEBENANG GANDA DUA MENGGUNAKAN PENDEKATAN *IN VIVO* DAN *IN VITRO* UNTUK PEMBANGUNAN RECOMBINAN VAKSIN DALAM IKAN KERAPU

Ikan kerapu merupakan komoditi penting dalam bidang perikanan dan telah dijadikan sebagai sasaran dalam bidang akuakultur. Pengurusan penyakit dalam sistem tertutup ini sering menjadi kebimbangan utama. Virus nekrosis saraf ikan kerapu (GNNV) merupakan salah satu agen utama yang menyumbang kepada morbiditi dan kematian, menyebabkan kerugian ekonomi yang besar. Oleh itu, cara penyelesaian seperti pembangunan vaksin adalah sangat penting untuk mengelakkan kerugian yang lebih besar. Vaksin RNA mempunyai beberapa kelebihan berbanding dengan vaksin DNA dan didokumentasikan sebagai pengaktif utama kepada tindak balas imun semulajadi melalui reseptor pengiktirafan corak (PRRs) menjadikan ia calon terbaik untuk pembangunan vaksin. Oleh itu, dalam kajian ini, RNA berbenang ganda dua (dsRNA) untuk virus nekrosis saraf kerapu telah disintesis menggunakan dua pendekatan; *in vivo* dan *in vitro* transkripsi. Gen konstruk untuk GNNV kot protein -pLITMUS telah dibina untuk mengekspres RNA yang pengkod kot protein GNNV apabila IPTG ditambahkan. GNNV kot protein dan vektor, pLITMUS 28i telah diekstrak secara manual dari TOP 10 stok dan digabungkan menggunakan T4 DNA ligase sebelum diklon dengan TOP 10 untuk membina gen konstruk, GNNV kot protein-pLITMUS. Selepas membina rekombinan ekspresi DNA, GNNV kot protein-pLITMUS telah ditransform ke dalam *E. coli* C43 (DE3) dan HT115(DE3) untuk menggunakan T7 RNA polimerase ekspresi sistem yang ada di strain-strain ini untuk menghasilkan dsRNA. Penghasilan dsRNA menggunakan *in vivo* bakteria induksi sistem telah dimulakan di dalam *E. coli* C43 (DE3 dan HT115) dengan menambah IPTG. Sebaliknya, dsRNA juga disintesis melalui *in vitro* transkripsi sistem dengan menggunakan T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit. Akhirnya, dsRNA yang telah dihasilkan melalui kedua-dua pendekatan telah disahkan dengan menggunakan *reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR). Keputusan dalam RT-qPCR menunjukkan bahawa dsRNA telah dihasilkan dalam kedua-dua cara; *in vivo* dan *in vitro* di mana *in vitro* transkripsi menunjukkan kadar penghasilan yang lebih tinggi dalam kedua-dua C43 dan HT115 dengan mendapat purata nilai C_T 20.28 dan 17.94 masing-masing. Sebaliknya, *in vivo* transkripsi menggunakan C43 dan HT115 mempunyai nilai C_T 22.59 dan 22.12 masing-masing. Kesimpulannya, *in vivo* transkripsi sistem merupakan pendekatan yang lebih baik berbanding dengan *in vitro*. Walaupun *in vivo* transkripsi menunjukkan kadar penghasilan dsRNA yang lebih rendah, kos penghasilan *in vitro* adalah sangat mahal berbanding dengan *in vivo* dan adalah tidak praktikal untuk menggunakan cara penghasilan yang lebih mahal untuk menghasilkan perbezaan hasil yang sedikit.