

Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trên gia cầm của các epitope tế bào B liên tục từ các kháng nguyên virus cúm gia cầm H5N1 đã được dự đoán *in silico*

• Trần Thị Hồng Kim
• Trần Linh Thuớc

Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 20 tháng 03 năm 2013, nhận đăng ngày 10 tháng 9 năm 2013)

TÓM TẮT

Nhằm phát triển vaccine có hiệu lực ổn định đối với virus dễ biến đổi như virus cúm A/H5N1, chúng tôi sử dụng công cụ tin sinh học để dự đoán các epitope bảo tồn từ các kháng nguyên của virus dùng làm vật liệu để phát triển vaccine đa giá phòng chủng virus cúm này. Với cách tiếp cận này, chúng tôi đã dự đoán được các epitope tế bào B liên tục và không liên tục trên vùng bảo tồn của kháng nguyên HA và NA của virus cúm A H5N1. Để kiểm chứng tính sinh miễn dịch của epitope này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen để tổng hợp trong tế bào *E. coli* các epitope tái tổ hợp ở dạng dung hợp với kháng nguyên roi H:1,2 của *Salmonella Typhimurium* và glutathione *S*-transferase. Các kháng nguyên tái tổ hợp này được thu nhận, tinh chế và được dùng làm kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch trên động vật. Trong báo cáo này, chúng tôi trình bày

kết quả kiểm tra tính sinh miễn dịch của các epitope tế bào B liên tục tái tổ hợp trên gà. Bằng thử nghiệm HI (Hemagglutination Inhibition), chúng tôi chứng minh rằng kháng huyết thanh từ những lô gà đã được gây miễn dịch bởi các epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc đều có kháng thể đặc hiệu ức chế khả năng ngưng kết hồng cầu của kháng nguyên virus cúm H5N1 đã được phân lập từ bệnh phẩm gà tại Việt Nam. Hiệu giá HI trung bình (GMT-geometric mean titer) của kháng huyết thanh gà tiêm GST-H:1,2-NeBc là 113,00 cao hơn 1,19 lần so với hiệu giá HI trung bình của kháng huyết thanh gà tiêm GST-H:1,2-HeBc (95,00), trong khi kháng huyết thanh từ lô gà gây nhiễm bởi vaccine bất hoạt thương mại phòng chống virus cúm A H5N1 dùng cho gia cầm đạt hiệu giá HI trung bình là 291,58.

Từ khóa: epitope tế bào B, thử nghiệm HI, virus cúm A/H5N1.

MỞ ĐẦU

Dịch cúm A/H5N1 là một bệnh dịch có khả năng lây lan rộng và gây thiệt hại nghiêm trọng ở gia cầm cũng như ảnh hưởng đến sức khỏe con

người. Tại Việt Nam, dịch cúm do virus cúm A/H5N1 bùng phát từ năm 2003 đến nay đã có 121 ca mắc bệnh cúm gia cầm A/H5N1, trong đó có 61 trường hợp tử vong tại 30 địa phương [1].

Hiện nay, các tổ chức thế giới cũng như trong nước đã và đang nỗ lực tìm phương thức phòng chống virus cúm một cách hữu hiệu. Trong đó, vắc-xin tái tổ hợp là một trong các chiến lược được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu và khuyến khích sử dụng bởi tính an toàn và đảm bảo khả năng gây đáp ứng miễn dịch [2-3].

Tuy nhiên, virus cúm có khả năng biến đổi kháng nguyên một cách liên tục và nhanh chóng, tạo ra nhiều chủng virus mới có thể làm giảm hiệu lực bảo vệ của các vaccine phòng cúm gia cầm. Do đó, các phương pháp mới để phát triển vaccine vẫn tiếp tục được nghiên cứu nhằm cải thiện các loại vaccine hiện có, khắc phục vấn đề hàng năm phải tạo vaccine mới cho các chủng virus cúm mới, đồng thời nhằm nghiên cứu tạo ra một loại vaccine đa trị có khả năng phòng ngừa được nhiều chủng virus cúm khác nhau [4-5].

Trước đây, bằng công cụ tin sinh học, chúng tôi đã dự đoán được một số epitope tế bào B và tế bào T từ vùng bảo tồn của các kháng nguyên virus cúm A/H5N1 [6-8]. Các epitope bảo tồn này được tổng hợp bằng phương pháp hóa học và bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen trong tế bào vi khuẩn *Escherichia coli*. Một số epitope tế bào T và B đã được thực nghiệm kiểm chứng tính sinh miễn dịch *in vitro* và khả năng gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu virus cúm gia cầm A/H5N1 trên mô hình chuột [9-10]. Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo kết quả tổng hợp, thu nhận 02 epitope tế bào B tái tổ hợp bằng kỹ thuật gen tái tổ hợp và kiểm chứng thực nghiệm tính sinh miễn dịch đặc hiệu của các kháng nguyên này trên gà. Đây là một bước quan trọng nhằm tìm ra những ứng viên kháng nguyên mới, góp phần cho chiến lược tạo vaccine virus cúm có phổ kháng rộng phòng bệnh cúm gia cầm H5N1 cho vật nuôi và gia cầm.

Để tăng cường khả năng gây đáp ứng miễn dịch của epitope dự đoán ở vật chủ, các epitope này được gắn với kháng nguyên flagellin (H:1,2) của vi khuẩn *Salmonella typhimurium*, được biết

có vai trò kích thích đáp ứng miễn dịch ở vật chủ, bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Gen mã hóa protein tái tổ hợp này được thiết kế để biểu hiện trong tế bào *E. coli* bằng hệ thống vector biểu hiện ở dạng dung hợp với glutathione S transferase (GST) [11].

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu sinh học

Chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) (*F- dcm ompT hsdSB (r-B m-B) gal λ(DE3)*) được sử dụng để biểu hiện các epitope tái tổ hợp.

Vector pVFT được sử dụng cho mục đích biểu hiện epitope tái tổ hợp, có kích thước 6023 bp, mang gen mã hóa cho glutathione S transferase (GST) nằm ngay sau promoter T7 được điều khiển bằng cách cảm ứng với IPTG. pVFT là dẫn xuất của vector biểu hiện pET-28a(+) (Novagen) được cải biến để protein mục tiêu được biểu hiện ở dạng dung hợp với GST và trình tự peptide nhận diện bởi TEV protease.

Gà ta (*Gallus domesticus*) 3 tuần tuổi, không nhiễm virus cúm A/H5N1, trọng lượng 200-300 g được dùng để tiêm epitope tái tổ hợp, thu nhận kháng huyết thanh và kiểm chứng khả năng nhận diện và gắn kháng thể trong kháng huyết thanh với kháng nguyên chuyên biệt.

Vaccine H5N1 thương mại dạng virus bất hoạt dùng cho gia cầm (Reassortant Avian Influenza Virus Vaccine, Inactivated – H5N1 subtype, Re-1 strain; mã lô: 2009020; ngày sản xuất: 30/09/2009; Harbin Weike Biotechnology Development Co. – Harbin Veterinary Research Institute, CAAS) được cung cấp bởi Công ty thuốc Thú y Trung ương 2 được dùng làm chứng dương trong phương pháp ELISA và HI để kiểm chứng khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu của kháng thể kháng epitope đã dự đoán.

Virus cúm H5N1 bất hoạt (chủng A/H5N1/Chicken13Vietnam/LA/2006) đã được phân lập từ bệnh phẩm gà tại Việt Nam (được cung cấp bởi Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford - Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TP. Hồ

Chí Minh) được dùng làm kháng nguyên trong phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu nhằm kiểm chứng sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu virus H5N1 trong kháng huyết thanh gà tiêm epitope tái tổ hợp.

Tạo các dòng *E. coli* mang plasmid tái tổ hợp chứa gen *hebc/nebc* dung hợp với gen mã hóa GST và gen mã hóa lông roi H:1,2

Hai epitope đã dự đoán từ các kháng nguyên HA, ký hiệu là HeBc, có trình tự axit amin FGAIAGFIEGGWQGMVDGWYG và kháng nguyên NA, ký hiệu là NeBc, có trình tự axit amin SPHRTLMSCPVGEAPSYPNSR, là các epitope mở rộng kết hợp từ 02 epitope được dự đoán từ vùng bảo tồn kháng nguyên HA và 02 epitope được dự đoán từ vùng bảo tồn kháng nguyên NA gồm 20 axit amin có 19 axit amin trùng lặp (phần trình tự gạch dưới) [8]. Gen mã hóa các epitope này (ký hiệu lần lượt là *hebc*, *nebc*) với hai đầu dính của enzyme cắt giới hạn *Sall* và *XhoI* được thu nhận bằng phản ứng PCR tái tổ hợp với cặp oligonucleotide *hebc-F Sall* (5'-

ggccatgtcgactttggcgcgattgcgggctttattgaaggcggtg gcaggg-3')/ *hebc-R XhoI* (5'-gaaggcggtggcagggcatgggtggctggctggatggctaactc gagatggcc-3') và *nebc-F Sall* (5'-ggccatgtcgacagcccgcatgcaccctgatgagctgcccgggtg ggcaagc-3')/ *nebc-R XhoI* (5'-ggccatctcgagttagcggctgttatcgggctcggcgcttcgcca ccgggca-3'). Các gen *hebc*, *nebc* và plasmid pVFT được xử lý bằng hai enzyme *Sall* và *XhoI* để tạo đầu dính và nối bằng enzyme T4 ligase tạo plasmid tái tổ hợp pVFT-*hebc/nebc*. Các plasmid tái tổ hợp này được lưu trữ trong tế bào *E.coli* DH5 α .

Gen *fljB* mã hóa lông roi H:1,2 được thu nhận bằng phản ứng PCR tái tổ hợp với cặp mồi *fljB-F* (5'-ggccatgaattgcacaagtaatacaactaactag-3') và *fljB-R* (5'-gcacaagtaatacaactaactagtcgacatggcc-3'). Gen *fljB* thu được và các plasmid pVFT-*hebc/nebc*

được xử lý bằng hai enzyme *EcoRI-Sall* và nối bằng T4 ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Tế bào biến nạp *E. coli* chứa plasmid tái tổ hợp được sàng lọc bằng môi trường LB-Kan 30 và xác nhận bằng PCR khuẩn lạc, PCR plasmid và giải trình tự.

Cảm ứng và biểu hiện các epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-HeBc NeBc trong chủng chủ *E.coli* BL21 (DE3)

Các plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc* và pVFT-*fljB-nebc* được biến nạp vào chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) để tạo các dòng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp có khả năng biểu hiện epitope ở dạng dung hợp với GST và H:1,2 là GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc. Cảm ứng sinh tổng hợp protein tái tổ hợp bằng IPTG 0,5 mM. Tiếp tục nuôi cấy canh khuẩn trong 4 giờ. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu sinh khối. Tế bào *E. coli* được phá bằng sóng siêu âm, thu nhận protein tổng và kiểm tra sự biểu hiện của epitope tái tổ hợp bằng điện di SDS-PAGE và lai Western với kháng thể kháng GST.

Thu nhận, tinh chế các epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc

Nuôi cấy dòng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp trong 200 ml môi trường LB-Kan 30, lắc 150 vòng/phút trong 4 giờ, 37°C và cảm ứng tổng hợp protein tái tổ hợp bằng IPTG 0,5 mM. Sinh khối tế bào được huyền phù hóa trong 20 ml dung dịch PBS 1X (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3). Bổ sung lysozyme 1 μ g/ml, ủ 37°C trong 30 phút; bổ sung 0,1 mM PMSF (phenyl methyl sulphonyl fluoride). Phá tế bào bằng sóng siêu âm 12W trong 30 giây, nghỉ 30 giây, lặp lại 20 lần. Thu dịch nổi sau ly tâm (13.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4°C) và lọc qua màng lọc có đường kính 0,45 μ m. Nạp mẫu vào cột GSTrap FF 5ml (GE healthcare), rửa cột bằng 25 ml dung dịch PBS 1X, ly giải protein tái tổ hợp bằng 5 ml dung dịch ly giải pH 8 (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutathione khử); tốc độ chảy khi cân bằng cột và

rửa cột là 0,5 ml/phút, tốc độ chảy khi nạp mẫu và ly giải protein là 0,2 ml/phút. Thu nhận các phân đoạn ly giải và kiểm tra sự hiện diện protein tái tổ hợp bằng SDS-PAGE và lai Western với kháng thể kháng GST. Xác định hàm lượng protein tái tổ hợp tinh sạch bằng phương pháp Bradford.

Gây đáp ứng miễn dịch trên gà bằng epitope tái tổ hợp và thu nhận tế bào kháng huyết thanh

Gà ta 3 tuần tuổi (*Gallus domesticus*), không nhiễm virus H5N1, được chia thành 4 nhóm (n = 3). (i) Nhóm chứng âm, gà chỉ được tiêm protein GST-H:1,2 (1 µg/ g thể trọng); (ii) Nhóm thử nghiệm 1, gà được tiêm GST-H:1,2-HeBc (1 µg/ g thể trọng); (iii) Nhóm thử nghiệm 2, gà được tiêm GST-H:1,2-NeBc (1 µg/ g thể trọng); (iv) Nhóm chứng dương: gà được tiêm vaccine thương mại (1 µl/ g thể trọng). Tá chất Complete Freund Adjuvant (CFA-Difco) được sử dụng cho lần tiêm đầu tiên (kháng nguyên: CFA = 1:1). Tiến hành tiêm nhắc vào các ngày 28 và 35 với liều kháng nguyên bằng ½ liều kháng nguyên ban đầu với tá chất là Incomplete Freund Adjuvant (IFA-Difco). Sau lần tiêm cuối 7 ngày, thu 500 µl máu, thu kháng huyết thanh và trữ lạnh ở -30°C.

Xác định hiệu giá kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên epitope tế bào B trong kháng huyết thanh gà bằng phương pháp ELISA

Cổ định protein tái tổ hợp của epitope tế bào B (GST-H:1,2-HeBc/GST-H:1,2-NeBc) trên giếng của đĩa ELISA 96 giếng (100 µl/giếng). Khóa các vị trí không gắn kháng nguyên bằng 100 µl dung dịch sữa gầy (PBS bổ sung 5% sữa tách béo, PBS: 14,61g NaCl, 1ml Tween 20) trong 1 giờ. Rửa giếng bằng PBS, kháng huyết thanh gà được pha loãng bậc 2 từ 1:50 đến 1:1600 được bổ sung vào các giếng (100 µl/giếng) và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Bổ sung kháng thể anti-IgG gà cộng hợp Horseradish peroxidase (HRP) (Anti-Chicken IgG-HRP; Thermo, SA1-300) ở độ pha loãng 1:200 (100 µl/giếng), ủ 37°C

trong 1 giờ. Phản ứng được phát hiện bằng cơ chất o-phenylenediamine (OPD; Sigma) (40µg OPD/1ml citrate buffer pH 5), H₂O₂ 0,5 µl (100 µl/giếng). Phản ứng hiện màu được kết thúc bằng 100 µl H₂SO₄ 2N sau 20 phút. Ghi nhận cường độ màu của đĩa phản ứng ở bước sóng 492nm bằng máy đọc đĩa ELISA (Thermo Multiskan Ascent).

Kiểm chứng sự hiện diện kháng thể đặc hiệu virus H5N1 bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu

Sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu virus H5N1 được kiểm chứng bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (Hemagglutination inhibition test – HI test). Kháng huyết thanh thu nhận từ gà đã được gây nhiễm kháng nguyên lần lượt được xử lý bằng RDE (Receptor-destroying enzyme) nhằm loại bỏ các chất kim hãm không đặc hiệu. Pha loãng bậc hai kháng huyết thanh đã xử lý RDE trong đĩa 96 giếng đáy hình chữ V (25 µl/giếng). Bổ sung 25 µl kháng nguyên virus H5N1 bất hoạt tương đương 4 đơn vị HA vào các giếng kháng huyết thanh, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 50 µl hồng cầu gà (0,5%), lắc đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Quan sát kết quả dựa trên hiện tượng ức chế ngưng kết hồng cầu trong các giếng. Phản ứng dương tính khi kháng thể ức chế kháng nguyên HA ngăn không cho các phân tử này ngưng kết hồng cầu, làm cho hồng cầu không ngưng kết và bị lắng xuống. Ngược lại, phản ứng âm tính khi kháng nguyên không bị ức chế và gây ngưng kết hồng cầu. Đơn vị hiệu giá kháng thể kháng HA là giá trị nghịch đảo độ pha loãng cao nhất của huyết thanh vẫn còn ngăn ngưng kết hồng cầu [12].

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

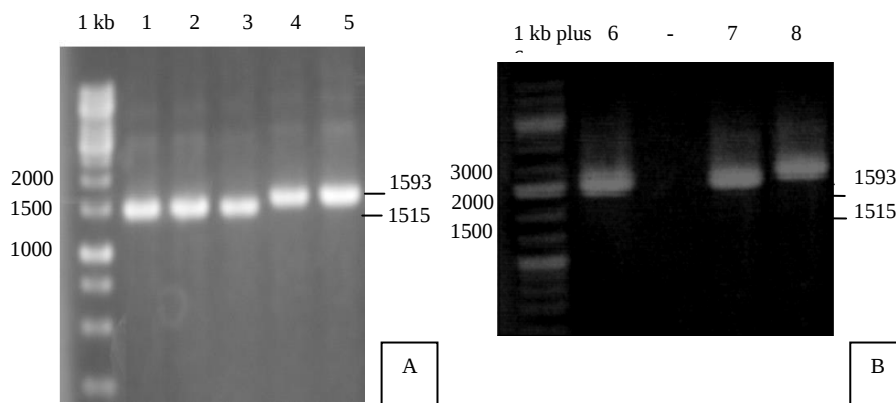
Tạo các dòng *E. coli* BL21 (DE3) mang các plasmid tái tổ hợp chứa gen mã hóa epitope tế bào B dung hợp với GST và kháng nguyên lông roi H:1,2 của vi khuẩn *Salmonella* Typhimurium

Trước tiên, chúng tôi tổng hợp gen các gen *hebc*, *nebc* mã hóa epitope HeBc, NeBc có kích thước 78 bp (bao gồm hai đầu nối chứa trình tự nhận biết của hai enzyme cắt giới hạn và codon kết thúc) bằng phương pháp PCR tái tổ hợp và dung hợp với gen mã hóa GST trong plasmid biểu hiện pVFT để tạo plasmid tái tổ hợp pVFT-*hebc/nebc* trong đó gen *hebc/nebc* được dung hợp vào đầu 3' của gen mã hóa GST. Mục đích của việc dung hợp GST với epitope là nhằm hỗ trợ việc thu nhận, tinh chế epitope tái tổ hợp thông qua GST và phân tích khẳng định sự biểu hiện của epitope tái tổ hợp bằng lai Western sử dụng kháng thể kháng GST. Plasmid tái tổ hợp pVFT-*hebc/nebc* được thu nhận bằng cách tạo dòng trong *E.coli* DH5 α . Kết quả phân tích plasmid tái tổ hợp chứa gen *hebc* và *nebc* bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu được trình bày trong các công bố trước đây [10, 13].

Để tăng cường mức đáp ứng miễn dịch ở gia cầm thông qua việc sử dụng kháng nguyên lông roi H:1,2 của *Salmonella* Typhimurium như là tá chất sinh học trong gây đáp ứng miễn dịch, chúng tôi tiến hành tạo plasmid tái tổ hợp cho phép biểu hiện các epitope tế bào B ở dạng dung hợp với kháng nguyên lông roi H:1,2 (bên cạnh việc dung hợp với GST ở thí nghiệm trên). Gen *fljB* mã hóa lông roi H:1,2 của *Salmonella* Typhimurium được tổng hợp bằng phương pháp

PCR tái tổ hợp và chèn đồng khung dịch mã vào plasmid pVFT-*hebc/nebc* tạo plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc/nebc* để biểu hiện epitope ở dạng dung hợp GST-H:1,2-HeBc/NeBc. Các plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc/nebc* được biến nạp vào chủng chủ biểu hiện *E. coli* BL21(DE3) và sàng lọc dòng *E.coli* mang plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc/nebc* bằng môi trường LB-Kan 30. Tuyển chọn và xác nhận sự hiện diện các gen *fljB* và gen mã hóa epitope tế bào B *hebc/nebc* bằng PCR và giải trình tự. Kết quả phân tích plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc/nebc* thu nhận từ dòng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp bằng phản ứng PCR với cặp mồi *fljB*-F, *fljB*-R cho sản phẩm có kích thước 1515 bp (giếng 3, Hình 1A) khi sử dụng plasmid pVFT-*fljB-hebc* làm khuôn và (giếng 7, Hình 1B) khi sử dụng pVFT-*fljB-nebc* làm khuôn. Trong khi đó, phản ứng PCR sử dụng plasmid này làm khuôn và cặp mồi *fljB*-F, *hebc*-R/*nebc*-R cho sản phẩm có kích thước 1593 bp (lần lượt ở giếng 4-5, Hình 1A và giếng 8, Hình 1B). Sự chênh lệch về kích thước sản phẩm của hai phản ứng PCR này là 78bp tương ứng với trình tự gen mã hóa epitope lần lượt *hebc* và *nebc*.

Kết quả giải trình tự gen *fljB* trong plasmid pVFT-*fljB-hebc/nebc* cho thấy các trình tự gen *fljB* và *hebc/nebc* là đồng khung, độ tương đồng là 100% [10, 13].

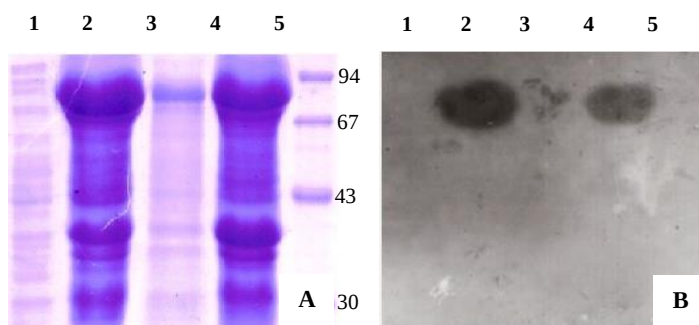


Hình 1. Kết quả phân tích plasmid pVFT-*fljB-hebc* (A) và pVFT-*fljB-nebc* (B) ly trích từ dòng *E. coli* BL21(DE3) tái tổ hợp bằng phản ứng PCR. 1-2 và 6, *fljB* được tổng hợp bằng PCR tái tổ hợp; 3, Sản phẩm PCR với khuôn là pVFT-*fljB-hebc*, cặp mồi *fljB-F*, *fljB-R*; 4-5, Sản phẩm PCR với khuôn là pVFT-*fljB-hebc*, cặp mồi *fljB-F*, *hebc-R*; 7, Sản phẩm PCR với khuôn là pVFT-*fljB-nebc*, cặp mồi *fljB-F*, *fljB-R*; 8, Sản phẩm PCR với khuôn là pVFT-*fljB-nebc*, cặp mồi *fljB-F*, *nebc-R*

Biểu hiện và thu nhận các epitope tế bào B tái tổ hợp

Chúng *E. coli* tái tổ hợp (ký hiệu là BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* và BL21(DE3)/pVFT-*fljB-nebc*) được nuôi cấy và cảm ứng biểu hiện các epitope tái tổ hợp lần lượt là GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc. Hình 2 và 3 trình bày các kết quả phân tích và kiểm chứng sự biểu hiện lần lượt epitope tái tổ

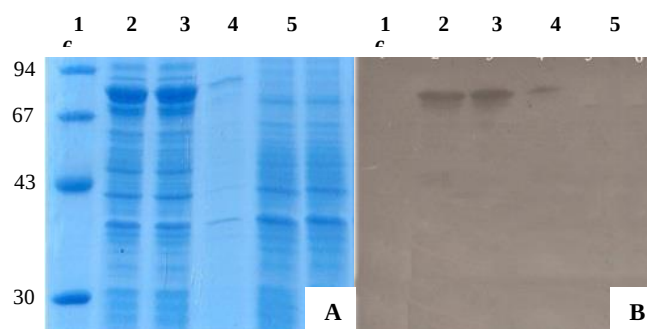
hợp GST-H:1,2-HeBc bằng điện di SDS-PAGE (Hình 2A), lai Western (Hình 2B) và epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-NeBc bằng điện di SDS-PAGE (Hình 3A), lai Western (Hình 3B). Khi được cảm ứng bằng IPTG, chủng *E. coli* tái tổ hợp tổng hợp vượt mức một protein có khối lượng 87,3 kDa tương ứng với kích thước của protein dung hợp lần lượt là GST-H:1,2-HeBc (Hình 2A, giếng 2) và GST-H:1,2-NeBc (Hình 3A, giếng 2).



Hình 2. Phân tích sự biểu epitope tế bào B tái tổ hợp dung hợp GST-H:1,2-HeBc bằng SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng GST (B). 1, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc*, IPTG (-); 2, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc*, IPTG (+); 3, BL21(DE3)/ pVFT-*fljB-hebc*, IPTG (+), pha tủa; 4, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc*, IPTG (+), pha tan; 5, Thang protein.

Các protein này hiện diện chủ yếu ở pha tan (giếng 4, Hình 2A) cho trường hợp protein biểu hiện là GST-H:1,2-HeBc và (giếng 3, Hình 3A) cho trường hợp protein biểu hiện là GST-H:1,2-

NeBc. Các vạch protein này cũng cho vạch lai tương ứng với kháng thể kháng GST (Hình 2B, giếng 2 và 4) và (Hình 3B, giếng 2 và 3).



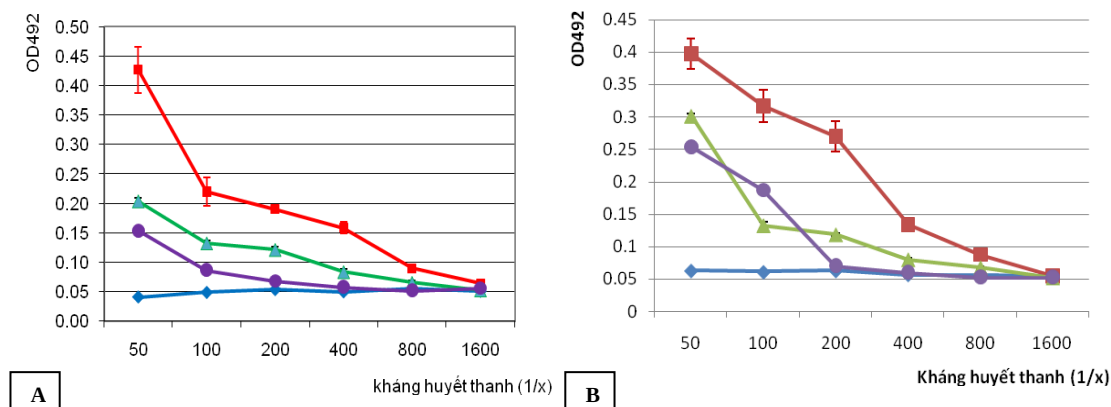
Hình 3. Phân tích sự biểu hiện epitope tế bào B tái tổ hợp dung hợp GST-H:1,2-NeBc bằng SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng GST (B). 1, thang protein; 2, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-nebc*, IPTG (+); 3, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-nebc*, IPTG (+), pha tan; 4, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-nebc*, IPTG (+), pha tủa; 5, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-nebc*, IPTG (-); 6, BL21(DE3).

Kết quả này cho phép kết luận là các chủng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* và *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-nebc* đều có khả năng biểu hiện vượt mức epitope dung hợp GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc trong tế bào. Vạch protein 87,3 kDa này chiếm 11,3% tổng protein trong tế bào cho trường hợp biểu hiện GST-H:1,2-HeBc và 10,5% cho trường hợp biểu hiện GST-H:1,2-NeBc (định lượng bằng phần mềm Quantity One) (Hình 2 và 3).

Để thu nhận epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc dùng làm nguyên liệu gây nhiễm gia cầm, chủng *E. coli* BL21(DE3) mang plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc/nebc* đã

được nuôi cấy, cảm ứng tổng hợp epitope tái tổ hợp bằng IPTG và tinh chế bằng cột sắc ký ái lực chuyên biệt GSTrap FF 5 ml. Kết quả chúng tôi đã thành công trong việc thu nhận và tinh chế các protein tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc. Phần lớn các vạch protein tạp trong dịch đồng nhất ban đầu đã được loại bỏ sau khi tinh chế với độ tinh sạch lần lượt là 74,3% và 75,2% (kết quả không thể hiện hình ảnh).

Kiểm tra sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên epitope tế bào B tái tổ hợp trong kháng huyết thanh gà bằng phương pháp ELISA



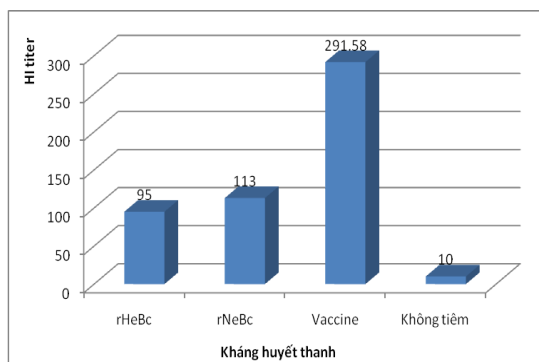
Hình 4. Kết quả ELISA phân tích hiệu giá kháng thể IgG trong kháng huyết thanh gà tiêm kháng nguyên nhận diện và gắn đặc hiệu với GST-H:1,2-HeBc (A) và GST-H:1,2-NeBc (B). (■) GST-H:1,2-HeBc; (■) GST-H:1,2-NeBc; (▲) GST-H:1,2; (●) Vaccine thương mại; (◆) chưa tiêm kháng nguyên.

Hình 4 là kết quả ELISA kiểm tra sự hiện diện của kháng thể kháng kháng nguyên GST-H:1,2-HeBc (Hình 4A) và kháng kháng nguyên GST-H:1,2-NeBc (Hình 4B) trong lần lượt kháng huyết thanh gà gây nhiễm chỉ protein dung hợp GST-H:1,2, epitope tế bào B tái tổ hợp (GST-H:1,2-HeBc/ GST-H:1,2-NeBc) hoặc vaccine thương mại. Giá trị OD_{492} của kháng huyết thanh gà tiêm GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc ở độ pha loãng 1/50 lần lượt là 0,439 (Hình 4A) và 0,398 (Hình 4B), gấp 10 và 6,3 lần so với kháng huyết thanh gà trước khi tiêm. Hiệu giá kháng thể nhận diện và gắn đặc hiệu kháng nguyên GST-H:1,2-HeBc của kháng huyết thanh gà tiêm kháng nguyên này là 100 ($OD_{492} = 0.22$). Trong khi đó, kháng thể trong kháng huyết thanh gà tiêm GST-H:1,2 cũng nhận diện và gắn đặc hiệu kháng nguyên GST-H:1,2-HeBc và đạt hiệu giá kháng thể là 50 ($OD_{492} = 0.204$) (Hình 4A). Hiệu giá kháng thể nhận diện và gắn đặc hiệu kháng nguyên GST-H:1,2-NeBc của kháng huyết thanh gà tiêm kháng nguyên này là 200 ($OD_{492} = 0.27$), trong khi đó kháng thể trong kháng huyết thanh gà tiêm GST-H:1,2 cũng nhận diện và gắn đặc hiệu kháng nguyên GST-H:1,2-NeBc và đạt hiệu giá

kháng thể là 50 ($OD_{492} = 0.301$) (Hình 4B). Như vậy, các epitope tế bào B tái tổ hợp có khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên gà.

Bên cạnh đó, kháng huyết thanh gà tiêm vaccine cúm gia cầm thương mại có hiện diện kháng thể kháng epitope tái tổ hợp thấp (giá trị OD_{492} lần lượt là 0.153 và 0,253). Giải thích vấn đề này là do vaccine cúm thương mại đã sử dụng là vaccine được tạo trên cơ sở virus cúm A/H5N1 toàn phần bất hoạt nên kháng thể tạo ra từ gia cầm tiêm vaccine này phần nhiều sẽ gắn đặc hiệu với kháng nguyên virus cúm toàn phần hơn là gắn với một kháng nguyên epitope có trình tự peptide ngắn.

Xác định hiệu giá kháng thể đặc hiệu kháng nguyên virus cúm A/H5N1 bất hoạt hiện diện trong kháng huyết thanh gà tiêm epitope tế bào B tái tổ hợp bằng thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu



Hình 5. Kết quả HI phân tích hiệu giá kháng thể đặc hiệu trong kháng huyết thanh gà tiêm kháng nguyên tái tổ hợp gây ngăn ngưng kết hồng cầu của kháng nguyên HA virus A/H5N1 bất hoạt.

Kết quả ở Hình 5 cho phép kết luận các kháng nguyên epitope tế bào B tái tổ hợp có thể gây đáp ứng miễn dịch trên gà, tạo kháng thể nhận diện và gắn đặc hiệu virus cúm gia cầm phân lập từ bệnh phẩm gà ở Việt Nam (chủng A/H5N1/Chicken13Vietnam/LA/2006). Hiệu giá kháng thể đặc hiệu ức chế hiệu quả ngưng kết hồng cầu của kháng nguyên virus cúm A/H5N1 hiện diện trong kháng huyết thanh gà tiêm kháng nguyên epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-NeBc là 113, gấp 1,19 lần so với hiệu giá kháng thể trong kháng huyết thanh gà tiêm GST-H:1,2-HeBc. Tuy vậy, các hiệu giá này vẫn không cao hơn hiệu giá kháng thể đặc hiệu virus cúm trong kháng huyết thanh gà tiêm vaccine cúm gia cầm thương mại

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* và *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-nebc* có khả năng biểu hiện epitope tế bào B lần lượt HeBc và NeBc ở dạng dung hợp với GST và flagellin H:1,2 của *Salmonella Typhimurium* là GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc. Sự biểu hiện các protein tái tổ hợp này được phân tích bằng SDS-PAGE và xác nhận bằng lai Western với kháng thể kháng GST. Các protein tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc và GST-H:1,2-NeBc lần lượt được thu nhận, tinh chế và được dùng để gây đáp ứng miễn dịch trên gà nhằm kiểm chứng tính sinh miễn dịch của các epitope tế bào B đã được dự đoán bằng phương pháp Tin Sinh học trên gia cầm. Sử dụng phương pháp ELISA và thử nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu, chúng tôi đã xác nhận được rằng các epitope tế bào B tái tổ hợp có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch trên gà, tạo kháng thể có khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu với các kháng nguyên của virút cúm A/H5N1 phân lập từ bệnh phẩm gà ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin cảm ơn TS. Lê Văn Bình đã cung cấp plasmid pVFT, GS Đỗ Quang Hà đã cung cấp kháng nguyên virus toàn phần bất hoạt, Cô Mai (Gò Vấp) đã cung cấp gà và trang thiết bị nuôi gà. Nghiên cứu này được tài trợ bởi ĐHQG-HCM trong khuôn khổ đề tài mã số C2013-18-01.

Immunogenicity in poultry of *in silico* predicted - continuous B-cell epitopes from influenza virus H5N1

- Tran Thi Hong Kim
- Tran Linh Thuoc

University of Science, VNU-HCMC

ABSTRACT

In order to develop vaccine with stable efficiency against easily transforming virus such as influenza H5N1 virus, bioinformatic tools were used to predict conserved epitopes from viral antigens to be used as materials for the development of polyvalent vaccine against this virus. Using this approach, we have successfully predicted B-cell continuous and discontinuous epitopes on conserved domains of HA and NA antigens from H5N1 influenza A virus. To confirm the immunogenicity of these epitopes, genetic manipulating techniques have been employed, to prepare the recombinant epitopes in E. coli as a fusion form with H:1,2 flagellin antigen from Salmonella Typhimurium and with glutathione S-transferase. These recombinant antigens have been collected,

purified and used for animal immunizing. This study shows the results in specific immunogenicity of recombinant B-cell epitopes continuous in chickens. Using HI test (Hemagglutination Inhibition Test), we could successfully prove that the antiserum from both of chicken groups immunized with GST-H:1,2-HeBc and GST-H:1,2-NeBc had specific antibodies could inhibit the agglutination of antigens derived from an influenza H5N1 virus strain isolated from infected chickens in Vietnam. The HI titer of anti-GST-H:1,2-NeBc antibodies was 113,00, that is 1,19 times higher than the HI titer of anti-GST-H:1,2-HeBc antibodies (95,00), while the HI titer of antibodies from chickens immunized with commercial inactivated vaccine H5N1 reached 291,58.

Key words: B-cell epitope, HI test, influenza A virus H5N1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [9]. Ban Chỉ đạo Quốc gia, Báo Cáo Công Tác Phòng Chống Dịch Cúm Gia Cầm. Hà Nội, Tài liệu phục vụ cuộc họp giao ban trực tuyến về công tác phòng chống dịch cúm gia cầm (2012).
- [2]. W. Fiers, M. De Filette, K.E. Bakkouri, B. Schepens, K. Roose, M. Schotsaert, A.Birkett, X.Saelens, M2e-based universal influenza A vaccine, *M2e-based universal influenza A vaccine*, 27, 6280-6283 (2009).
- [3]. A.W. Hampson, Vaccines for pandemic influenza, The history of our current vaccines, their limitations and the requirements to deal with a pandemic threat,

- Annals Academy of Medicine Singapore*, 37, 510 (2008).
- [4]. W. Gerhard, K. Mozdzanowska, D. Zharikova, Prospects for universal influenza virus vaccine, *Emerging infectious diseases*, 12, 569-574 (2006).
- [5]. Z. Staneková, E. Varečková, Conserved epitopes of influenza A virus inducing protective immunity and their prospects for universal vaccine development, *Virology journal*, 7 1-13 (2010).
- [6]. N.T.T. Minh, N.Đ. Duy, T.T.D. Trang, V.C. Quy, T.L. Thước, Dự đoán epitope tế bào B trên protein virus cúm A H5N1, *Kỷ yếu Hội nghị CNSH toàn quốc: CNSH phục vụ nông lâm nghiệp, thủy sản, công nghiệp, y dược và bảo vệ môi trường*, ĐH Thái Nguyên, 828-633 (2009).
- [7]. V.H. Vân, L.T.T. Thùy, C.T.N. Phương, V.T. Bích, T. L. Thước, Xác định vùng bảo tồn chức năng và dự đoán epitope tế bào T trên các protein virus cúm A, *Tạp chí Phát triển KH & CN*, 12, 38-46 (2009).
- [8]. B.V. Lê, Nghiên cứu, ứng dụng Tin sinh học trong việc thiết kế phát triển vắc xin và thuốc, Báo cáo tổng hợp kết quả đề tài khoa học công nghệ trọng điểm cấp nhà nước, (mã số KC.04.18/06-10), Cục Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Bộ Khoa học và Công nghệ) (2010).
- [9]. T.T.H. Kim, H.H. Dũng, N.T.T. Vy, T.L. Thước, Kiểm tra tính sinh miễn dịch của các epitope tế bào T trên kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 được dự đoán in silico, *Tạp chí CNSH* 9, 4B, 907-913 (2011).
- [10]. T.T.H. Kim, T.T.N. Thùy, T.L. Thước, Tổng hợp và kiểm chứng tính sinh miễn dịch của epitope tế bào B được dự đoán bằng phương pháp tin sinh học từ kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1, *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 15, 45-55 (2012).
- [11]. C. Cuadros, F.J. Lopez-Hernandez, A.L. Dominguez, M. McClelland, J. Lustgarten, Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses, *Infection and immunity*, 72 2810-2816 (2004).
- [12]. R. Webster, WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. World Health Organization (2002).
- [13]. T.T.H. Kim, T.T. Thiện, T.L. Thước, Tạo dòng và biểu hiện các epitope tế bào B của virus cúm A/H5N1 được dự đoán in silico, *Hội nghị Khoa học cấp Trường lần thứ VII* (2011).