

XÁC ĐỊNH KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH TẠO KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU CỦA KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP GP5-ELP CỦA VIRUS PRRS GÂY HỘI CHỨNG RỐI LOẠN SINH SẢN VÀ HÔ HẤP Ở LỢN TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM

Nguyễn Thị Minh Hằng^{1,2}, Hồ Thị Thương¹,
Phạm Bích Ngọc¹, Nguyễn Trung Nam¹, Chu Hoàng Hà¹

TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) do virus PRRS thuộc chi *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*, thuộc bộ *Nidovirales* gây ra đã và đang gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành chăn nuôi ở nhiều quốc gia trên khắp thế giới. Glycoprotein 5 (GP5) là một protein vỏ quan trọng của virus PRRS, có khối lượng phân tử là 24-25 kDa, được biết đến như yếu tố kích thích việc sản sinh kháng thể trung hòa ở lợn. GP5 được nghiên cứu để thiết kế vaccine tiểu đơn vị phòng chống PRRS. Để có cơ sở khoa học cho việc nghiên cứu phát triển vaccine tiểu đơn vị có nguồn gốc thực vật phòng chống PRRS, GP5 đã được dung hợp với ELP tạo protein tái tổ hợp và tích lũy trong cây thuốc lá bằng phương pháp biểu hiện gen tạm thời. Protein GP5-ELP từ mô lá thuốc lá *N. benthamiana* được tách chiết, tinh sạch bằng phương pháp mITC và thu hồi protein mục tiêu. Hiệu suất thu hồi protein GP5-ELP là 98%, mức độ tinh sạch của protein GP5-ELP là 81,1%. Protein tinh sạch được sử dụng để gây miễn dịch trên chuột bạch, chủng BALB/C 4-6 tuần tuổi và thu huyết thanh từ máu chuột ở các thời điểm: Trước khi tiêm kháng nguyên, ngày thứ 21 và 35 sau lần tiêm kháng nguyên đầu tiên. Kháng nguyên tinh sạch GP5-ELP được tạo ra có khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng GP5-ELP trên chuột. Kháng thể IgG đặc hiệu kháng GP5-ELP đã tăng lên hơn 2,4 lần sau ba lần tiêm so với sau hai lần tiêm. Như vậy, có thể khẳng định rằng kháng nguyên GP5-ELP được tổng hợp trong mô lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp biểu hiện gen tạm thời trong thực vật có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch trên động vật thí nghiệm. Đây là căn cứ khoa học quan trọng để nghiên cứu sử dụng GP5-ELP như một ứng viên trong việc phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng chống PRRS.

Từ khóa: PRRS, kháng nguyên tái tổ hợp, GP5-ELP, tính sinh miễn dịch, virus PRRS.

Possibility in creating specific antibody of GP5-ELP recombinant antigen of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on experimental animals

Nguyễn Thị Minh Hằng, Hồ Thị Thương,
Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Chu Hoàng Hà

SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) caused by PRRS virus has resulted in huge economic losses to the livestock sector in many countries around the world. PRRSV belongs to *Arterivirus*, *Arteriviridae* and *Nidovirales*. GP5 is an important PRRSV envelope glycoprotein with molecular weight of 24-25 kDa, known as the stimulant for the production of

¹. Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

². Trường Đại học Lâm nghiệp Việt Nam

neutralizing antibodies in pigs, consequently to design the PRRS subunit vaccine. In order to have a scientific evidence for the development of a PRRS-derived plant-derived subunit vaccine, GP5 was fused with ELP to create recombinant protein and accumulated in tobacco tree by transient gene expression. The GP5-ELP protein from *N. benthamiana* leaf extract was purified by mITC and recovered target protein, with 98% GP5-ELP protein recovery efficiency and 81.1% GP5-ELP purity protein. Pure protein was used to induce immunity in 4-6 week BALB/C mice and blood samples were collected at the times: before antigen injection and day 21, 35 after the first antigen injection. IgG antigen-specific antibody to GP5-ELP antigen in mouse serum was detected by ELISA and Western blot analysis. The studied results showed that GP5-ELP purified antigen was capable of stimulating production of GP5-ELP-specific IgG antibody in mice. GP5-ELP-specific IgG production was increased more than 2.4 times after three injections compared to two injections. Thus, it can be concluded that GP5-ELP antigen synthesized in tobacco leaf tissue by transient gene expression was capable of inducing immune responses in mice. This is an important scientific evidence for using GP5-ELP as a candidate to develop a PRRS subunit vaccine.

Keywords: PRRS, recombinant antigen, GP5-ELP, immunogenicity, virus PRRS.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine reproductive and respiratory syndrome - PRRS) do virus PRRS gây ra, đã và đang gây thiệt hại lớn về kinh tế cho ngành chăn nuôi ở nhiều quốc gia trên khắp thế giới. Virus PRRS thuộc chi *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*, thuộc bộ *Nidovirales*. Genome là sợi sRNA đơn dương, dài 15.000 bp với 9 khung đọc mở (ORF - open reading frame) 1a, 1b, 2a, 2b và 3 – 7 (ORFs) (Fang, Snijder, 2010). Trong đó, ORF 1a và 1b mã hóa cho protein phi cấu trúc replicase và polymerase tham gia vào quá trình nhân bản của virus, ORF 2-7 mã hóa các protein cấu trúc. Glycoprotein 5 (GP5), protein màng (M) và nucleoprotein (N) được mã hóa bởi các ORF 5-7, là các thành phần chính của hạt virus.

Glycoprotein 5 (GP5) được mã hóa bởi ORF 5, là một trong những thành phần chính của hạt virus với vùng ngoại bào 40 acid amin và vùng nội bào 50 đến 70 acid amin (Dea *et al.*, 2000). GP5 có trọng lượng phân tử từ 24-25 kDa, là protein liên kết vô bọc kết hợp glycogen. GP5 là protein cấu trúc thay đổi nhiều nhất của virus PRRS, có một đoạn peptide định hướng tại đầu cuối N của protein và bị glycosyl hóa sau sao chép từ 2 đến 4 vị trí N30, N33, N44 hoặc N51 (Zhou *et al.*, 2009). Vị trí được glycosyl hóa rất quan trọng cho quá trình hình thành cấu trúc

và duy trì hoạt tính của protein (Ansari *et al.*, 2006). GP5 được biết như yếu tố kích thích việc sản sinh kháng thể trung hòa ở lợn, là một vấn đề then chốt của miễn dịch dịch thể. Các kháng thể trung hòa chủ yếu liên kết trực tiếp với các epitope có trên bề mặt của protein GP5, do vậy virus có thể bị trung hòa. Những epitope trung hòa này nằm sát ngay cạnh các vị trí glycosyl hoá (Cancel-Tirado SM *et al.*, 2004). Trong các protein cấu trúc của virus PRRS, kháng nguyên GP5 là protein không thể thiếu cho sự giải phóng các hạt virus, đồng thời GP5 tạo đáp ứng miễn dịch mạnh chống virus. Vì vậy, protein GP5 được dùng để thiết kế vacxin tiểu đơn vị phòng chống PRRS. Các nghiên cứu phát triển vacxin chống lại virus PRRS đã được ghi nhận trong hai thập kỷ qua, việc thiết kế vacxin tiểu đơn vị, tạo ra đáp ứng miễn dịch tế bào và dịch thể là đặc biệt quan trọng vì cả hai cơ chế này đều liên quan đến việc bảo vệ chống lại virus.

Elastin-like polypeptides (ELP) là một trong những polypeptide (Fusion tag) đã được chứng minh là làm tăng sự tích tụ các protein tái tổ hợp trong thực vật (Conley *et al.*, 2009, Joensuu *et al.*, 2010).

Nghiên cứu này trình bày kết quả tinh sạch protein (kháng nguyên) tái tổ hợp GP5 dung hợp elastin-like polypeptides (GP5-ELP) đã được tổng hợp, tích lũy trong mô lá thuốc lá

loài *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*) bằng phương pháp mITC (Membrane-based inverse transition cycling), nhằm loại bỏ các protein tạp có trong mô lá thực vật, thu hồi kháng nguyên tinh sạch và đánh giá hoạt tính sinh học của kháng nguyên, khả năng kích thích sản sinh kháng thể đặc hiệu trên động vật thí nghiệm khi được tiêm kháng nguyên GP5-ELP tái tổ hợp đã được tinh sạch.

II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Tinh sạch protein tái tổ hợp GP5-ELP của virus PRRS bằng phương pháp mITC, thu hồi protein tinh sạch.

- Xác định hoạt tính sinh học (tính kháng nguyên) của protein tái tổ hợp GP5-ELP trên động vật thí nghiệm.

2.2. Nguyên liệu, hoá chất

Cây thuốc lá *N. benthamiana* đã được biến nạp dịch khuẩn *Agrobacterium* mang vector chuyển gen mã hoá kháng nguyên tái tổ hợp GP5-ELP 6 tuần tuổi, do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Chuột bạch chủng BALB/C do Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Kháng thể kháng cmyc được Phòng thí nghiệm trọng điểm - Viện Công nghệ sinh học tổng hợp từ vi khuẩn; kháng thể anti-mouse IgG cộng hợp HRP (Horseradish Peroxidase; Promega - USA), anti-pig rabbit IgG cộng hợp peroxidase, kháng nguyên scFv (50 ng/μl) có trình tự cmyc được Phòng thí nghiệm trọng điểm - Viện Công nghệ sinh học tổng hợp. Hóa chất hiện màu TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine), DAB (Diaminobenzidine), kit hiện phim Super Signal West Pico Trial (Thermo Scientific), Vacxin nhược độc phòng bệnh lợn tai xanh (Hanvet)...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Tách chiết và xác định nồng độ protein tổng số

Protein tổng số từ mẫu lá được tách bằng dịch chiết: PBS (Phosphate-buffered saline, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4), 0,05% Tween theo tỷ lệ 1:2 (trọng lượng mẫu (gam) : thể tích dịch chiết (ml)) và bảo quản -20°. Nồng độ protein tổng số được đo ở bước sóng 595 nm theo phương pháp của Bradford năm 1976 với đường chuẩn được xây dựng dựa vào protein chuẩn đã biết trước nồng độ BSA (Bovine Serum Albumin).

2.3.2. Kiểm tra độ tinh sạch và sự biểu hiện của các gen bằng điện di SDS-Page và phản ứng lai miễn dịch Western blot

2.3.2.1. Điện di SDS-PAGE

Bản gel SDS-PAGE 4-10% được chuẩn bị theo công thức của Laemmli, 1970. Biến tính mẫu ở 95°C trong 10 phút trước khi tra mẫu lên gel. Tất cả các giếng ở các thí nghiệm đều được đưa vào cùng một lượng protein tổng số (30 μg). Điện di ở 22 mA trong 2 giờ.

2.3.2.2. Western blot

Mẫu lá thuốc lá được nghiền mịn, hòa tan trong đệm mẫu SDS (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 0,1% (w/v) Bromophenol blue, 10% (v/v) Glycerol, pH 6,8), biến tính mẫu ở 95°C trong 10 phút, điện di ở 100V, 20mA trong 3 giờ; 10-30 μg protein được phân tách bằng điện di trên SDS-PAGE (10% polyacrylamide), sau đó được chuyển lên màng nitrocellulose bằng máy chuyển màng Pierce Fast blotter (Thermoscientific) ở 25V, 1,3A trong 20 phút. Màng chứa kháng nguyên được phủ bằng sữa tách béo 5% (pha trong dung dịch PBS 0,05% Tween) trong 5 giờ; màng tiếp tục được ủ với kháng thể kháng kháng nguyên (kháng thể 1) qua đêm; ủ màng với kháng thể 2 anti-mouse IgG cộng hợp HRP (Horseradish Peroxidase) trong 2 giờ. Phát hiện sự có mặt của protein tái tổ hợp (kháng nguyên) trong dung dịch hiện màu có chứa cơ chất DAB (Diaminobenzidine) trong 15 phút (Phan, 2012).

Độ đậm nhạt của băng protein ở các thí nghiệm Western blot được so sánh bằng phần mềm Image J.

2.3.3. Phương pháp tinh sạch protein GP5-ELP

Tinh sạch protein GP5-ELP bằng phương pháp mITC (Membrane-based inverse transition cycling)

Nghiền nhỏ 100g lá tươi trong nitor lỏng, bổ sung 200 ml Tris-HCl 50 mM (pH8.0) lạnh, ly tâm 25000 v/p trong 30 phút ở 4°C, bổ sung NaCl đến nồng độ 2M. Dung dịch được ly tâm ở 15.000 v/p trong 30 phút, ở 4°C. Dung dịch sau ly tâm được đưa qua màng polyethersulfone (PES) 0,22 μ m ở 4°C, thu dịch chiết trước xử lý. Dịch chiết được làm ấm đến nhiệt độ phòng và lọc qua màng cellulose acetate 0,2 μ m, màng được rửa 2 lần bằng NaCl 2M để loại protein lẫn. Nước Milipore-Q lạnh được chuyển qua màng lọc để thu hồi protein mục tiêu dung hợp ELP (Phan, 2012).

Phương pháp tính hiệu suất thu hồi protein tinh sạch

Hiệu suất thu hồi protein tinh sạch là tỷ lệ phần trăm giữa lượng protein tinh sạch thu được và lượng protein đích có trong dịch chiết thực vật ban đầu theo tính toán lý thuyết. Lượng protein đích có trong dịch chiết thực vật ban đầu và lượng protein tinh sạch thu được sau quá trình tinh sạch được tính toán và định lượng bằng Bradford và Western blot sử dụng protein chuẩn (Single-chain fragment variable-ScFv-cmyc).

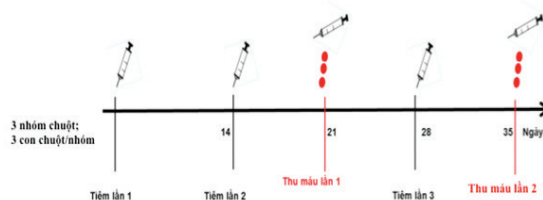
Độ tinh sạch của protein được tính dựa trên tỷ lệ phần trăm giữa lượng protein tinh sạch thực tế (được định lượng dựa vào Western blot sử dụng protein chuẩn (Single-chain fragment variable-ScFv-cmyc) và lượng protein tinh sạch lý thuyết (được đo bằng Bradford assay).

2.3.4. Đánh giá khả năng kích thích sản sinh kháng thể đặc hiệu của protein tái tổ hợp GP5-ELP trên động vật thí nghiệm

Gây miễn dịch trên chuột bạch BALB/C

Protein tái tổ hợp GP5-ELP sau khi tinh sạch, được chuẩn về nồng độ 50 μ g/ml và được sử dụng để gây miễn dịch trên chuột bạch (chuột trắng cái chủng BALB/C, 6 tuần tuổi). Protein được trộn đều, đồng nhất với chất bổ trợ Complete Freud's adjuvant/Incomplete Freud's adjuvant (Sigma) với tỷ lệ 1:1 bằng sóng siêu âm. Chuột BALB/C được chia làm 3 nhóm, mỗi nhóm 3 con. Nhóm 1: Tiêm vaccin PRRS (đối chứng dương), nhóm 2: Tiêm PBS (đối chứng âm), nhóm 3: Tiêm protein GP5-ELP. Nhóm 1 được tiêm vaccin phòng PRRS nhược độc một lần duy nhất (theo hướng dẫn sử dụng vaccin của nhà sản xuất). Nhóm 2 và nhóm 3 được tiêm kháng nguyên nhắc lại 3 lần.

Chuột được tiêm dưới da, nhắc lại 3 lần vào ngày 1, 14 và 28 với 200 μ l dung dịch protein/lần tiêm. Sử dụng chất bổ trợ Complete Freud's adjuvant cho lần tiêm thứ nhất; sử dụng chất bổ trợ Incomplete Freud's adjuvant cho 2 lần tiêm nhắc lại thứ hai (ngày thứ 14 sau lần tiêm 1) và lần thứ ba (ngày thứ 28 sau lần tiêm 1). Mẫu máu của chuột được thu để chiết huyết thanh tại ba thời điểm: Trước khi tiêm protein kháng nguyên (ngày 0), ngày thứ 21 và ngày thứ 35 (tính từ lần tiêm 1) theo sơ đồ thí nghiệm như trên hình 1 đối với cả ba nhóm chuột. Chuột BALB/C sau khi gây miễn dịch được chăm sóc và theo dõi trong các điều kiện phù hợp.



Hình 1. Sơ đồ thí nghiệm gây miễn dịch trên chuột bạch BALB/C

Phương pháp ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

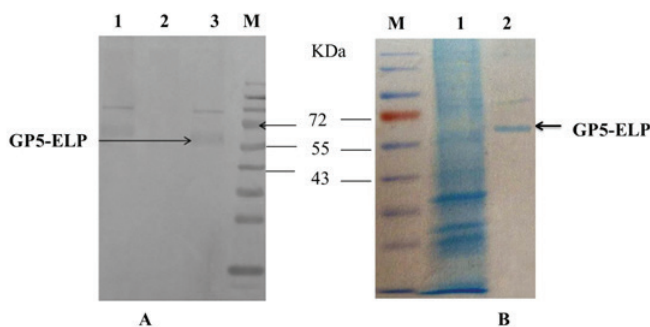
Các giếng trong đĩa microtiter (ImmunoPlate Maxisorp, Nalgen Nunc International, Roskilde, Denmark) được phủ với 100 ng kháng nguyên

trong đệm PBS 1X và ủ qua đêm ở 4°C. Sau đó, đĩa được phủ trong dung dịch PBS 1X chứa 5% sữa tách bơ, trong 2 giờ và được rửa lại 5 lần với PBS 1X. Đĩa được phủ với huyết thanh (đã được pha loãng 5000 lần) trong 2 giờ. Sau đó, đĩa được rửa lại 5 lần với PBS 1X; phủ đĩa với kháng thể anti-mouse IgG có gắn HRP (kháng thể 2) với độ pha loãng 500 lần, trong 2 giờ, rửa lại bằng dung dịch PBS 1X 5 lần. Đĩa được hiện màu trong dung dịch hiện màu có chứa cơ chất 3,3',5,5'- Tetramethylbenzidine (TMB) trong 15 phút, sản phẩm phản ứng cho màu xanh, sau đó cố định màu bằng HCl 1N, màu vàng của phản ứng được đo ở bước sóng 450nm. Số liệu được phân tích trên phần mềm Excel.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tinh sạch protein tái tổ hợp GP5-ELP bằng phương pháp mITC

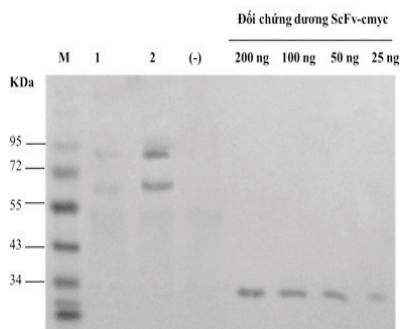
Kết quả điện di kiểm tra trên gel SDS-PAGE các mẫu sau mỗi bước tinh sạch gồm: dịch chiết thô, dịch chảy qua màng sau khi rửa bằng NaCl và dịch chứa protein GP5-ELP tinh sạch được tách rửa khỏi màng, hoà tan bằng nước deion lạnh. Kiểm tra bằng Western blot (Hình 2A) cho thấy ở giếng số 1 xuất hiện băng vạch duy nhất có kích thước tương ứng với kích thước của GP5-ELP (65 kDa). Phân đoạn này không xuất hiện ở dịch chảy qua màng khi rửa bằng dung dịch muối NaCl. Kiểm tra độ tinh sạch của protein tái tổ hợp GP5-ELP khi sử dụng PEG 9% trên SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (Hình 2B) cho thấy băng vạch protein GP5-ELP tinh sạch, băng vạch đậm nét, không lẫn protein tạp. Như vậy, protein GP5-ELP đã được tinh sạch thành công bằng phương pháp mITC.



Hình 2. Đánh giá sự tinh sạch của kháng nguyên GP5-ELP bằng Western blot
(A): Kết quả Western blot, M:Marker; 1: Dịch chiết thô chứa protein GP5-ELP; 2: Dịch chảy qua màng khi rửa bằng NaCl; 3: Protein GP5-ELP được tách rửa khỏi màng bằng nước deion lạnh. (B): Kết quả điện di SDS-PAGE nhuộm Coomassie blue, M: Marker; 1: Dịch chiết thô chứa protein GP5-ELP trước khi tinh sạch; 2: Protein GP5-ELP thu được sau khi tinh sạch.

Định lượng protein GP5-ELP bằng phương pháp đo Bradford, lai miễn dịch và phân mềm Image J trên màng lai cho thấy đã tinh sạch và thu hồi đúng protein GP5-ELP với kích thước mong muốn (hình 3). Phân tích kết quả Western blot bằng phần mềm Image J dựa vào protein đối chứng dương ScFc đã được định lượng cho

thấy rằng, hiệu suất thu hồi protein GP5-ELP là 98%, mức độ tinh sạch của protein GP5-ELP là 81,1%. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu khác, hiệu suất thu hồi protein M của virus PRRS là 86,5% và mức độ tinh sạch là 82,1% (Nguyễn Thị Minh Hằng *et al.*, 2017).

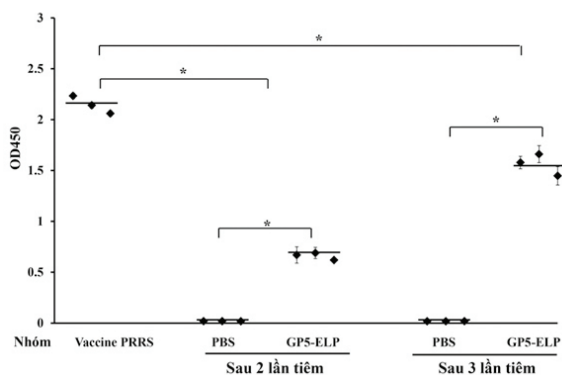


Hình 3. Định lượng protein tái tổ hợp GP5-ELP bằng lai miễn dịch

ScFV (đối chứng dương) được đưa vào giếng với các nồng độ 50, 100, 150, 200 ng/giếng; 10 μ l protein GP5-ELP tinh sạch được tách rửa khỏi màng bằng nước lạnh với protein tổng số đưa vào giếng là 20 μ g/giếng.

3.2. Khả năng kích thích tạo kháng thể đặc hiệu của kháng nguyên tái tổ hợp GP5-ELP trên động vật thí nghiệm

Kết quả ELISA (hình 4) cho thấy kháng thể IgG đặc hiệu đã xuất hiện ở nhóm chuột được tiêm protein tái tổ hợp GP5-ELP. Hơn nữa, có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về khả năng sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu GP5-ELP giữa ba nhóm chuột được tiêm PBS, vaccin và protein GP5-ELP tinh sạch với $P < 0,05$. Khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu GP5-ELP đã tăng lên hơn 2,4 lần sau ba lần tiêm so với sau hai lần tiêm. Tuy nhiên, khả năng sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên GP5-ELP là thấp hơn so với nhóm chuột tiêm vaccin nhược độc PRRS. Trong khi đó, ở nhóm chuột đối chứng âm được tiêm PBS, trong huyết thanh không xuất hiện kháng thể đặc hiệu kháng GP5-ELP. Như vậy, kháng nguyên tinh sạch GP5-ELP tái tổ hợp được tạo ra có khả năng kích thích phản ứng miễn dịch sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu trên chuột.

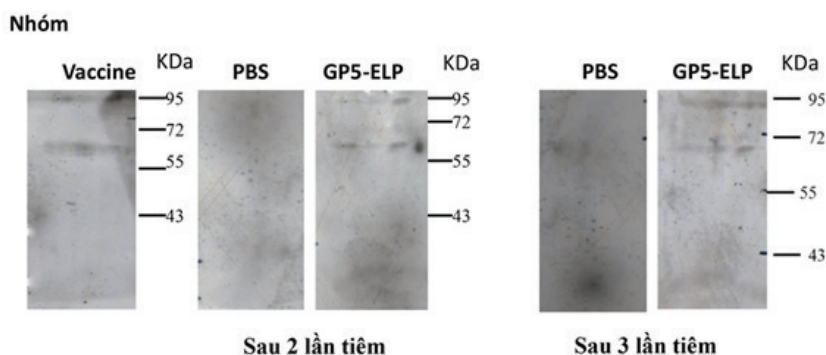


Hình 4. Phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng GP5-ELP bằng kỹ thuật ELISA;

Giá trị ELISA trung bình của mỗi huyết thanh chuột kèm theo sai số (SD) được thể hiện ở từng chấm đen. Giá trị trung bình cho huyết thanh của từng nhóm chuột (3 con chuột/nhóm) được xác định, thể hiện ở vạch ngang và so sánh với các nhóm chuột khác sử dụng t-test với *: $P < 0.05$

Kết quả xác định kháng thể đặc hiệu IgG kháng GP5-ELP bằng lai miễn dịch (hình 5) cho thấy: Trong huyết thanh của nhóm chuột được tiêm vaccin nhược độc phòng PRRS, đã sản sinh kháng thể đặc hiệu kháng GP5-ELP. Trong khi đó, không phát hiện được kháng thể này trong huyết thanh của nhóm chuột được tiêm PBS sau cả ba lần tiêm. Huyết thanh thu được ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên tái tổ hợp GP5-ELP đã phát hiện được kháng nguyên GP5-ELP đúng như tính toán lý thuyết ở cả hai lần phân tích: Sau hai lần tiêm và sau ba lần tiêm kháng nguyên mục tiêu, xuất hiện vạch nâu đậm, đúng kích thước của protein GP5-ELP (65 KDa). Như vậy, đã xuất hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng GP5-ELP trên các con chuột được thí nghiệm.

Từ các kết quả thu được, cho phép nhận định rằng, huyết thanh chuột được tiêm vaccin và protein tái tổ hợp sau 2 lần tiêm và sau 3 lần tiêm đều xuất hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng GP5-ELP. Đặc biệt, kết quả lai miễn dịch, khi sử dụng huyết thanh thu từ nhóm chuột được tiêm vaccin nhược độc phòng PRRS, sử dụng



Hình 5. Kết quả lai miễn dịch (Western blot) xác định kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên GP5-ELP

Nhóm vaccin được tiêm 1 lần duy nhất, kháng nguyên là GP5-ELP, kháng thể sơ cấp là huyết thanh thu từ nhóm được tiêm vaccin, kháng thể thứ cấp là anti-mouse IgG gắn HRP

kháng thể anti-mouse IgG gắn HRP là kháng thể 2 (kháng thể kháng kháng thể) đã xác định được kháng thể IgG đặc hiệu kháng GP5-ELP. Điều này chứng tỏ rằng kháng nguyên tái tổ hợp GP5-ELP được tạo ra vẫn giữ được hoạt tính sinh học, có khả năng sinh miễn dịch như của kháng nguyên GP5 tự nhiên của virus PRRS. Theo Luping Du và cộng sự (2013), nghiên cứu trên các nhóm chuột đã được tiêm hai lần với 100 µg vaccin DNA pcDNA3.1-SynORF5, pcDNA3.1-PolIFN-λ1-SynORF5, kết quả cũng cho thấy rằng vaccin DNA có thể tăng đáng kể kháng thể ELISA đặc hiệu GP5 trong khoảng thời gian 2 tuần.

Từ kết quả phát hiện kháng thể kháng kháng nguyên tái tổ hợp GP5-ELP bằng kỹ thuật ELISA và Western blot trong huyết thanh của chuột bạch ở các lô chuột thí nghiệm, cho thấy kháng nguyên GP5-ELP được tổng hợp trong mô lá thuốc lá bằng phương pháp biểu hiện gen tạm thời trong thực vật đã được tinh sạch thành công với hiệu suất thu hồi cao bằng phương pháp mITC, có khả năng kích thích hình thành kháng thể đặc hiệu IgG kháng kháng nguyên GP5 trên động vật thí nghiệm (chuột bạch). Điều này cho phép khẳng định rằng protein tái tổ hợp GP5-ELP của virus PRRS gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn trong nghiên cứu này

có hoạt tính sinh học (tính kháng nguyên), giữ nguyên được tính kháng nguyên như của virus chủng độc lực cao ban đầu. GP5-ELP là một ứng viên tốt cho các nghiên cứu phát triển sản xuất vaccin tiểu đơn vị phòng chống PRRS.

IV. KẾT LUẬN

- Protein tái tổ hợp GP5-ELP của virus PRRS gây triệu chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn được tổng hợp trong mô lá thuốc lá đã được tinh sạch thành công bằng phương pháp tinh sạch protein mITC với hiệu suất thu hồi protein GP5-ELP là 98%, mức độ tinh sạch protein GP5-ELP là 81,1%.

- Protein GP5-ELP tái tổ hợp của virus PRRS có nguồn gốc thực vật có khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu trên động vật thí nghiệm (trên chuột) với hàm lượng kháng nguyên tinh sạch được tiêm là 5 µg/con chuột. Kháng thể IgG đặc hiệu kháng GP5-ELP ở ngày thứ 35 tăng lên 2,4 lần so với ngày thứ 21 sau khi tiêm protein tái tổ hợp GP5-ELP.

- GP5-ELP có nguồn gốc thực vật trở thành ứng viên tốt để tiếp tục nghiên cứu phát triển vaccin. Đây là căn cứ khoa học quan trọng để tiếp tục nghiên cứu phát triển sản xuất vaccin tiểu đơn vị phòng chống virus PRRS từ thực vật.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện với kinh phí từ đề tài thuộc nhiệm vụ nghiên cứu thường xuyên của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học: “Nghiên cứu sản xuất kháng nguyên của virus gây bệnh lợn tai xanh trong cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp agroinfiltration”. Các thí nghiệm được tiến hành có sử dụng các trang thiết bị của Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ansari IH, Kwon B, Osorio FA, and Pattnaik AK (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80 (8): 3994 – 4004.
2. Cancel-Tirado SM, Evans RB, Yoon KJ (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 102: 249 – 262.
3. Conley AJ, Joensuu JJ, Jevnikar A, Menassa R and Brandle JE (2009). Optimization of elastin-like polypeptide fusions for expression and purification of recombinant proteins in plants. *Biotechnol Bioeng* 103: 562-573.
4. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, Pirzadeh B and Rogan D (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Archives of Virology* 145(4): 659-688.
5. Fang Y, Snijder EJ (2010). The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins. *Virus Res* 154: 61-76.
6. Joensuu JJ, Conley AJ, Lienemann M, Brandle JE, Linder MB and Menassa R (2010). Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 152: 622-633.
7. Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
8. Luping Du, Bin Li, Kongwang He, Haibin Zhang, Kehe Huang and Shaobo Xiao (2013). Encoding Fusion Protein of Porcine IFN-1 and GP5 Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *BioMed Research International*. Volume 2013, Article ID 318698, 9 pages: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/318698>.
9. Nguyễn Thị Minh Hằng, Hồ Thị Thương, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Chu Hoàng Hà và cộng sự (2017). Biểu hiện và tinh sạch protein M của virus PRRS gây bệnh lợn tai xanh bằng công nghệ biểu hiện tạm thời trong lá thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 15 (3): 1-8.
10. Nguyễn Thị Minh Hằng, Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Chu Hoàng Hà (2017). Tách dòng và đồng biểu hiện gen mã hóa hai loại kháng nguyên vỏ GP5ecto (vùng ngoại bào) và M của virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, Tập 33, Số 1S: 150-158.
11. Phan HT (2012). ELPylated avian flu vaccines from plants: Improvement of expression and development of a new purification strategy. Ph.D Dissertation, IPK, Gatersleben, Germany.
12. Zhou YJ, Yu H, Tian ZJ, Li GX, Hao XF, Yan LP, Peng JM, An TQ, Xu AT, Wang YX, Wei TC, Zhang SR, Cai XH, Feng L, Li X, Zhang 97. GH, Zhou LJ, Tong GZ (2009). Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008. *Virus Res.* 144, 136–144.

Ngày nhận 16-3-2018

Ngày phản biện 5-5-2018

Ngày đăng 1-7-2018