

Trao đổi KHKT - Hoạt động ngành

VAI TRÒ PROTEIN CẤU TRÚC CỦA VIRUS DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI ĐỐI VỚI KHẢ NĂNG LÂY NHIỄM

Ning Jia,¹ Yunwen Ou,^{1,2} Zygmunt Pejsak,³
Yongguang Zhang², Jie Zhang²

GIỚI THIỆU

Dịch tả lợn châu Phi (ASF) lần đầu tiên được phân lập tại Kenya vào năm 1921. Trước năm 1957, bệnh chỉ được phát hiện vùng cận Sahara; tuy nhiên, virus đã lây lan sang các khu vực khác và gây ra các vụ dịch ở Lisbon (Bồ Đào Nha) vào năm này. Nhờ áp dụng thành công các quy định an toàn sinh học, virus dịch tả lợn châu Phi (ASFV) sau đó đã được loại trừ khỏi hầu hết các vùng bị ảnh hưởng. Tuy nhiên, nó vẫn tiếp tục tồn tại ở các nước cận Sahara và Sardinia. Cho đến nay, ASF đã được xác định ở Caucasus và khu vực Trung và Đông Âu, và ở các nước như Armenia, Azerbaijan, Belarus, Ukraina, Estonia, Latvia, Litva và Ba Lan. Tại Ba Lan, ASFV được phát hiện lần đầu tiên ở hạt Sokółka vào năm 2014. Kể từ tháng 2 năm 2014 và tại thời điểm này, 80 trường hợp ASF ở lợn hoang dã và 3 vụ dịch ở lợn nuôi đã được chẩn đoán ở Ba Lan. Bệnh đã gây ra tổn thất kinh tế nặng nề cho ngành chăn nuôi lợn công nghiệp và ảnh hưởng đáng kể về mặt xã hội trên thế giới. ASF gây ra bởi ASFV là một virus DNA sợi đôi, lớn, có bộ gen tuyến tính và là thành viên duy nhất của họ *Asfarviridae*. Lợn hoang dã, lợn nòi, lợn rừng và ve mềm thuộc các loài *Ornithodoros* là các vật chủ tự nhiên của ASFV và chúng có thể bị nhiễm virus liên tục mà không có biểu hiện bệnh.

ASFV có thể lây lan giữa lợn hoang dã và ve mềm trong quá trình ve hút máu, và đôi khi, có thể lây lan giữa các con lợn hoang dã với nhau bằng cách truyền trực tiếp. Sau khi nhiễm vào quần thể lợn nuôi, ASFV có thể lây truyền trực tiếp giữa các con lợn và gây tỷ lệ chết gần như là 100%. Các dấu hiệu lâm sàng đặc trưng gồm sốt cao, tổn thương xuất huyết, tím tái, bỏ ăn và loạn choạng (ataxia). Các cơ quan khác nhau cho thấy những biến đổi mạch máu nghiêm trọng dạng cấp tính và á cấp tính của ASF, chẳng hạn như thận xuất huyết lâm thâm và xuất huyết lan rộng trong các hạch bạch huyết, phù nề phổi, đông máu nội mạch rải rác, giảm tiểu cầu. Các nghiên cứu gần đây cho thấy rằng các tế bào nội mô sinh học và động mạch chủ là các dòng tế bào chủ tự nhiên hỗ trợ hiệu quả cho sự lây nhiễm ASFV trong nuôi cấy tế bào.

ASFV là loại virus DNA có bao ngoài, kích thước bộ gen biến đổi trong khoảng 170 đến 193 kb. Các gen mã hóa nằm gần nhau trong bộ gen, tuy nhiên hướng mã hóa của các gen liền kề thì giống với một số vùng gen. ASFV có sự tương đồng với *Poxvirus* và *Iridovirus*, bởi vì chúng đều là virus DNA tế bào chất. Chủng virus Tây Ban Nha BA71V đã được giải trình tự toàn bộ gen đầu tiên, nó là chủng đã được thích nghi và phát triển tốt trong nuôi cấy tế bào. Tiếp đó, bộ gen của 11 chủng

¹ Trường Cao đẳng Thú y, Đại học Nông nghiệp Cam Túc, Lan Châu, Trung Quốc

² Phòng Thí nghiệm tham chiếu quốc gia về bệnh LMLM, Viện nghiên cứu thú y Lan Châu, Trung Quốc

³ Bộ môn Bệnh lợn, Viện nghiên cứu thú y quốc gia, Ba Lan

ASFV đã được giải trình tự toàn bộ gen và số lượng khung đọc mở (ORFs) của chúng là khác nhau, tùy thuộc vào từng chủng. Bộ gen của ASFV mã hóa khoảng 151 đến 167 ORFs. Trong đó, 110 ORFs có tính ổn định cao trong 11 chủng. ASFV là virus hình khối đa diện (icosahedral virus) và chúng nhân lên trong tế bào chất của tế bào bị nhiễm. Các hạt ASFV có đường kính 170 đến 190 nm và được cấu thành bởi nhiều lớp phức tạp. Các protein cấu trúc được mã hóa có liên quan đến sự nhân lên bộ gen và nhiễm virus. Một số kết quả nghiên cứu cho thấy rằng hơn 50 protein được gói gọn trong virion và tham gia vào quá trình lây nhiễm của virus, chẳng hạn như p220, p62, p72, p54, p30, CD2v, p10, p12, p14.5 và p17. P220 và p62 là tiền chất polyprotein của ASFV, các protein có thể được phân cắt để hình thành các protein trong virion trưởng thành. P54 và p30 là các protein cấu trúc kháng nguyên rất quan trọng của ASFV. P72 là thành phần chính của các virus hình khối hộp đa diện, rất quan trọng trong việc hình thành lớp vỏ virus trong các biểu hiện nhiễm virus sau này. CD2v là một glycoprotein, có thể có vai trò trong sinh bệnh học của sự nhiễm ASFV, vai trò trong tế bào đích và trốn hệ miễn dịch của vật chủ. Các protein p10, p12, p14.5 và p17 có liên quan đến việc hấp phụ và chuyển virion của ASFV. Do đó các protein này có thể được khai thác để phục vụ các nghiên cứu với mục tiêu phân tích cơ chế lây nhiễm của ASFV. Trong bài viết tổng quan này, chúng tôi thảo luận về các protein cấu trúc mã hóa của ASFV tham gia vào lây nhiễm virus, và cơ chế phân tử của sự tương tác giữa các protein này với các tế bào vật chủ.

PROTEIN P220 VÀ P62

Cho đến nay, 110 ORFs có tính ổn định cao của ASFV đã được tìm thấy. Hai ORFs mã hóa tiền chất polyprotein ASFV là p220 và p62 (hoặc p60). P220 với trọng lượng phân tử khoảng 281,5 kDa thuộc về các protein tham gia muộn trong quá trình nhiễm virus.

Protein này được mã hóa bởi gen *CP2475L* và được phân cắt protein để tạo ra các protein virion trưởng thành p150, p37, p14, và p34 bởi protease mã hóa SUMO-like S273R của virus. P62 với trọng lượng phân tử khoảng 60,5 kDa được mã hóa bởi gen *CP530R*, và có thể được phân cắt thành protein virion trưởng thành p35 và p15 bởi S273R. P150, p37, p14, p34, p35, và p15 đóng một vai trò quan trọng trong quá trình lắp ráp capsid của virus. Chúng chiếm khoảng 30% tổng lượng protein của virus, hình thành các phần chính của vỏ lõi virion. Phân tích Pulse-chase cho thấy rằng quá trình sản sinh 2 polyprotein p220 và p62 và lắp ráp virus xảy ra đồng thời. Nghiên cứu bước đầu gợi ý rằng các hạt virus được lắp ráp trong các khu vực tế bào chất riêng rẽ gần với hạt nhân, đây được gọi là nơi sản xuất ra virus. Các nghiên cứu bằng kính hiển vi điện tử cho thấy rằng các cấu trúc màng lắp ráp virion xuất hiện tại những nơi sản xuất ra virus. Các nghiên cứu khác cho thấy quá trình hình thành polyprotein p220 và p62 đòi hỏi sự biểu hiện của protein capsid chủ yếu là p72, và sự biểu hiện của p220 tạo ra nền tảng cho quá trình hình thành p62. Quá trình hình thành p220 và p62 chính xác là một dấu hiệu quan trọng của virion trưởng thành. Virus không có lõi hoặc thiếu tính lây nhiễm có thể xuất hiện nếu quá trình hình thành p220 và p62 bị cản trở. Gallardo *et al.* đã phân tích các yếu tố kháng nguyên của p62, p32 và p54 biểu hiện trong các tế bào côn trùng, các protein tái tổ hợp này đã được sử dụng làm kháng nguyên trong thử nghiệm ELISA và Immunoblot (IB) cho chẩn đoán huyết thanh học ASF. Kết quả cho thấy rằng tính phản ứng đặc hiệu trong thử nghiệm IB cao hơn so với ELISA, và độ đặc hiệu của p62 và p32 cao hơn so với độ đặc hiệu của p54.

P37 là một trong những protein màng lõi chính và được phân cắt từ p220 bởi protease S273R của virus cùng có trình tự tương đồng với các protease của họ SUMO-1. P37 được xếp trong vùng màng lõi của virus và cũng là

protein nhân tế bào chất đầu tiên được mã hóa bởi ASFV. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng sự xuất hạt nhân của protein p37 được điều hành bởi cả hai vùng nhiễm sắc thể bảo trì 1 (CRM1)-phụ thuộc và CRM1-không phụ thuộc vào đường xuất hạt nhân. Trong nghiên cứu phát hiện các vị trí của protein p37 trong các tế bào nhiễm ASFV đã chỉ ra rằng ở giai đoạn nhiễm đầu, p37 nằm trong các khu vực nhân riêng biệt; ở giai đoạn sau, protein nằm tập trung trong tế bào chất. Tất cả những kết quả này củng cố tầm quan trọng của protein p37 trong vận chuyển hạt nhân đối với chu trình nhân bản ASFV. Protein p34, giống như protein p37, là một trong những protein cấu trúc chính. Nó chỉ được phát hiện trong phần màng, và chỉ được bảo vệ khỏi trypsin. Các quá trình hình thành p34 không đúng có thể được phục hồi từ cả phần tương bào và phần màng. Một thí nghiệm ly tâm mật độ sucrose cho thấy rằng màng kết hợp với hình dạng của p34 và p150 hợp thành các cấu trúc lớn như một mạng lưới virus. Hầu hết sự hình thành không hoàn thiện của p150 có thể được phục hồi ở tương bào; tuy nhiên các sản phẩm chuẩn xác của p150 được bổ sung chọn lọc cho màng. P35 và p15 là các sản phẩm trưởng thành của polyprotein p62, và trọng lượng phân tử của hai protein này lần lượt là khoảng 35 kDa và 15 kDa. Phân tích mật độ một và hai chiều gel chỉ ra rằng các protein và các sản phẩm có nguồn gốc từ p220 xuất hiện trong các phân tử lượng tương đương với hạt virus. Soi kính hiển vi miễn dịch thấy rằng các sản phẩm có nguồn gốc p62 nằm trong vỏ lõi như vùng mạng lưới được đặt giữa các DNA chứa nhân và khép kín bên trong. Tóm lại, p220, p62 và các protein trưởng thành của chúng có chức năng quan trọng trong việc lắp ráp virion và sự lây nhiễm virus.

PROTEIN P54 VÀ P30

Protein p54 và p30 là các protein cấu trúc có liên quan đến sự xâm nhập của virus, nhưng trong khi các protein có vai trò tương tự trong quá trình nhiễm virus, thì về mặt vật chất vai

trò của chúng cũng khác nhau. P54 được mã hóa bởi gen *E183L*, là một protein cấu trúc kháng nguyên ASFV rất quan trọng với trọng lượng phân tử khoảng 25 kDa. Protein chứa một khu vực xuyên màng /transmembrane và một dạng Gly-Gly-X, cũng như một trình tự ghi nhận xử lý sự tiến triển một số protein cấu trúc khác nhau của ASFV. Phân tích dịch nổi và phân tủa của các hạt virus có chứa p54 thấy rằng các protein nằm trong màng ngoài lipid của các virion. P54 cũng được quan sát thấy trong các khu vực tế bào bị nhiễm bệnh được nhân lên, bằng kính hiển vi miễn dịch điện tử. Để theo dõi hoạt động của ASFV trong các tế bào bị nhiễm bệnh theo thời gian thực tế, các nhà nghiên cứu đã tạo ra một ASFV tái tổ hợp truyền nhiễm để xác định quỹ đạo và tốc độ di chuyển nội bào của virus và từ đó quan sát được hoạt động của các khu vực sản xuất ASFV. Trong quá trình thích ứng với nuôi cấy tế bào, khối lượng phân tử của protein p54 thay đổi rõ ràng. P54 tương tác với phức hợp động cơ vi ống bằng cách gắn trực tiếp với chuỗi ánh sáng 8 (LC8) của dynein qua một bộ phận gần với C-terminus của protein. Hai protein cùng nằm ở trung tâm vi cấu trúc hình ống trong quá trình nhiễm virus. Sự tương tác trực tiếp của DYNLL1 (chuỗi ánh sáng dynein nhỏ nhất) với giàn protein tiếp nhận gephyrin và protein cấu trúc p54 đã được chứng minh bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR). Kết quả cho thấy rằng p54 và gephyrin là hai mục tiêu của DYNLL1 và trình tự của các protein này chứa phần GIQVD và KXTQT với một glutamine, điều này quan trọng đối với sự gắn virus. P54 cần thiết cho việc bổ sung tiền chất bao ngoài virus để tập hợp các điểm và đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển của virus, kích thích tạo ra các kháng thể đặc hiệu sau khi gây nhiễm cho lợn với các chủng virus giảm độc lực. Do đó, p54 được biểu hiện trong một hệ thống *Baculovirus* và *E. coli* đã được khai thác trong chẩn đoán huyết thanh học. Kháng thể kháng với protein p54 đã ức chế bước đầu tiên của chu kỳ nhiễm virus có liên

quan đến việc gắn của virus. Các thí nghiệm biểu hiện nhất thời của p54 trong các tế bào Vero đã chứng minh rằng p54 có thể kích hoạt quá trình tự phân hủy của caspase-3 trong giai đoạn đầu của nhiễm ASFV, và đây là lần đầu tiên một protein ASFV được báo cáo là tác nhân gây tự phân hủy tế bào.

Giống như p54, p30 là một trong những protein virus ban đầu. Protein được mã hóa bởi gen *CP204L*, có trọng lượng phân tử khoảng 30 kDa, và là một trong những protein cấu trúc kháng nguyên liên quan nhất đến việc xâm nhập của ASFV. Biểu hiện của protein thường được quan sát thấy từ khoảng 2 đến 4 h sau nhiễm và tiếp tục trong suốt chu kỳ nhiễm virus. Do đó, biểu hiện của p30 chỉ ra rằng virus đã xâm nhập, đã cởi bỏ vỏ, và biểu hiện gen virus sớm đã bắt đầu. Hệ thống lai đôi đã được sử dụng để sàng lọc một thư viện cDNA đại thực bào ở lợn để tìm các protein tế bào mà có thể tương tác với p30, và Ribonucleoprotein K không đồng nhất hạt nhân (hnRNP-K) đã được xác định là phối tử tế bào đầu tiên của p30. P54 và p30 là các protein kháng nguyên. Các nhà nghiên cứu đã chứng minh rằng một chimeric protein p54/30 giữ lại kháng nguyên tố quyết định và protein được biểu hiện bằng một *Baculovirus* tái tổ hợp trong các tế bào côn trùng và ấu trùng *Trichoplusia ni*. Chimeric protein phản ứng mạnh mẽ với huyết thanh của lợn với biểu hiện nhiễm ASFV không rõ ràng. Oviedo *et al.* thấy rằng p30 tái tổ hợp đặc hiệu hơn so với p54 cho phát hiện kháng thể bằng ELISA. Do đó, p30 nên được sử dụng như kháng nguyên ELISA, còn p54 nên được coi là kháng nguyên chỉ định cho phát hiện kháng thể ASFV bằng Western blot. Tuy nhiên, việc sử dụng kết hợp các protein p54 và p30 cho chẩn đoán huyết thanh học ASFV có thể cải thiện độ nhạy của phương pháp. Cubillos *et al.* đánh giá phản ứng của protein tái tổ hợp p30, p54 và p72 đồng thời trong cùng một phản ứng. Kết quả cho thấy rằng p30 là kháng nguyên chẩn đoán tốt nhất. Sau đó, Giménez *et al.* phát triển một

mạng lưới ELISA gián tiếp với p30 tái tổ hợp để phát hiện linh hoạt các kháng thể ASFV trong huyết thanh và các mẫu dịch miệng. Cơ chế miễn dịch qua trung gian kháng thể có một chức năng quan trọng trong miễn dịch đối với ASF. Các vaccine DNA mã hóa p54 và p30 hợp lại với nhau, cụ thể là plasmid DNA mã hóa hai gen ASFV trong một khung (pCMV-PQ) gây ra phản ứng kháng thể tốt ở chuột. Tuy nhiên, việc kháng thể trung hòa phản ứng với p54 và p30 là không đủ để bảo vệ kháng thể trung gian ở lợn. Argilaguet *et al.* thấy rằng miễn dịch DNA ở lợn có thể được cải thiện theo cấp số nhân bằng cách thêm phần ngoại bào của ASFV haemagglutinin (sHA) vào p54 và p30, và pCMV-sHAPQ có thể gây ra đáp ứng dịch thể và tế bào mạnh mẽ. Protein p54 và p30 có vai trò như là protein cấu trúc kháng nguyên quan trọng trong nhiễm virus.

PROTEIN P72

Protein p72 có trọng lượng phân tử khoảng 73,2 kDa là protein cấu trúc chính của ASFV, và nó là protein kháng nguyên quan trọng được mã hóa bởi gen *B646L* (*VP72*). P72 với đặc tính kháng nguyên và sinh miễn dịch cao có vai trò như là thành phần chính của virus hình khối đa diện. Nó rất quan trọng trong việc hình thành vỏ capsid của virus trong giai đoạn biểu hiện cuối của nhiễm virus. P72 mới tổng hợp được phân phối đồng đều trong hỗn hợp tế bào chất hòa tan và hỗn hợp màng gắn với màng lưới endoplasmic (ER), và lắp ráp trên màng ER để tạo thành capsid lớn hoặc tiền chất màng. Protein p72 đã được kết tủa miễn dịch đặc hiệu bởi kháng thể đơn dòng mAb 135D4 trong ống nghiệm. Kết quả cho thấy rằng dư lượng amino acid 400 và 404 là cần thiết cho mAb 135D4 phản ứng, điều này gợi ý rằng epitope p72 cũng hình thành đồng thời với quá trình xâm nhập của ASFV và biểu hiện của nó là một chỉ thị cho sự nhân lên của virus. Một vaccine tái tổ hợp dựa trên p72 và các protein virus khác được biểu hiện trong một hệ thống *Baculovirus* được áp dụng cho gây miễn dịch ở lợn. Kháng thể kháng p72

ngăn ngừa ASFV liên kết với đại thực bào, nhưng không đóng vai trò quyết định trong bảo vệ miễn dịch kháng thể trung gian. Chen *et al.* đã thiết lập một virus gây bệnh Newcastle tái tổ hợp rNDV/p72 biểu hiện ASFV p72 bằng di truyền ngược, và đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào của nó trên chuột thí nghiệm. Kết quả cho thấy những con chuột đã sản sinh một lượng kháng thể IgG đặc hiệu với p72 cao. Phân tích trình tự gen p72 mã hóa từ hai chủng ASFV từ Uganda và Cộng hòa Dominica chứng minh rằng p72 có tính bảo tồn cao trong các chủng được phân lập từ các vùng khác nhau trên thế giới. Điều này chứng minh rằng đặc tính kháng nguyên của p72 là ổn định và tạo ra một cơ sở phân tử hữu ích cho các xét nghiệm huyết thanh học ASFV. Liên quan đến vấn đề này, gen *VP72* của ASFV đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* bằng cách sử dụng một hệ thống RNA polymerase T7. Protein tái tổ hợp được tinh chế bởi sắc ký lỏng hiệu suất cao và được sử dụng trong các xét nghiệm huyết thanh học. Sastre *et al.* đã phát triển một thử nghiệm duplex pen-side để phát hiện đồng thời và phân biệt kháng thể đặc hiệu đối với virus dịch tả lợn cổ điển (CSFV) và với ASFV, các xét nghiệm này dựa trên protein p72 của ASFV và protein cấu trúc E2 của CSFV. Một số nhà nghiên cứu sử dụng RNA can thiệp nhỏ (siRNA) nhắm vào các gen *VP72* và *A151R* để kiểm soát sự sao chép của ASFV trong ống nghiệm. Kết quả cho thấy siRNA nhắm vào các gen có thể làm giảm cả sự sao chép virus và mức độ dịch mã của RNA thông tin.

Có thể thấy rõ các serotype của ASFV còn thiếu. Do đó, các chủng từ thực địa được tập hợp di truyền dựa vào trình tự các C-terminus của protein p72, và nó cung cấp các công cụ có giá trị bổ sung cho đánh giá dịch tễ học trong tương lai và làm sáng tỏ các mối quan hệ tương đồng về kiểu gen giữa các kiểu gen của ASFV. Muangkram *et al.* đã thiết lập một phân tích phát sinh loài và so sánh dịch tễ học dựa trên trình tự các gen *VP72*. Họ nhận

thấy rằng 516 trình tự của ASFV thu thập từ GenBank thuộc về 44 kiểu gen khác nhau, các quần thể ASFV của lục địa châu Phi được chia thành bốn nhánh bằng cách phân tích các biến đổi di truyền không gian. Các protein miễn dịch p72 chiếm ưu thế cho thấy rằng 13 kiểu gen riêng rẽ đã có mặt ở Đông Phi. Để nghiên cứu được các Polymorphisms nucleotide đơn (SNPs) ở đầu C-terminal của vùng gen *VP72* trong bộ gen, phương pháp suspension microarray đã được phát triển để xác định kiểu gen của ASFV, Gallardo *et al.* đã khẳng định phương pháp kết hợp đặc tính gen p72-p54-pB602L (CRV) là hữu ích trong điều tra sự tương đồng về mặt dịch tễ của ASF. Chủng ASFV đầu tiên từ Tây Phi đã được xác định thành công thông qua việc khuếch đại PCR và giải trình tự gen từ một đoạn 280 bp trên gen *VP72*, những thay đổi đã được tìm thấy cho đến nay đều do sự mất đi 2 trong số 7 điểm N-Glycosylation tiềm năng của gen này mà chúng được bảo tồn trong số tất cả các chủng khác. Cho đến nay, nhiều phương pháp khảo nghiệm đã được phát triển dựa trên gen *VP72* để phát hiện ASFV, chẳng hạn như nhân dòng sau khuếch đại PCR (LATE-PCR), PCR và Realtime-PCR (q-PCR).

CD2V PROTEIN

CD2v protein, cũng có tên PEP402R, giống như thụ thể bám dính bề mặt CD2 của tế bào lympho T và có trọng lượng phân tử khoảng 105 kDa. Nó là một glycoprotein được tạo thành từ một peptide tín hiệu (SP), vùng xuyên màng (TM) và hai miền immunoglobulin – like (IG). Khu vực tương bào C-terminal của CD2v (CD2v-CT) cùng chung trình tự amino acid không đặc trưng với các tế bào chất khu vực CD2. Protein CD2v được biểu hiện trên các tế bào T và NK. Hơn nữa, kết quả soi kính hiển vi đồng tiêu gợi ý rằng phần lớn các protein CD2v được biểu hiện nằm trong các tế bào chứ không phải trên bề mặt tế bào. CD2v nằm xung quanh các khu sản xuất virus trong quá trình nhiễm ASFV và hệ điều hành mạng lưới trans-Golgi (TGN) phức hợp

protein AP-1 là mục tiêu của nó. Phần lớn các CD2v xuất hiện để được nằm trong khu vực quanh nhân trong sự vắng mặt của một phối tử ngoại bào. Protein được biểu hiện muộn trong nhiễm virus, và hiện tượng hấp phụ hồng cầu là cần thiết cho biểu hiện CD2v trong tế bào bị nhiễm ASFV. CD2v có thể được phân cắt thành dạng N-terminal glycosylated và C-terminal non-glycosylated, và sự phân cắt này xảy ra trong mạng lưới nội chất hoặc thể Golgi; tuy nhiên cả hai hình thức cùng tồn tại trong tế bào bị nhiễm với protein hoàn chỉnh. CD2v có liên quan đến sự bám dính giữa tế bào- tế bào, tăng cường độc lực và điều tiết phản ứng miễn dịch. Nó có thể có vai trò trong sinh bệnh học của nhiễm ASFV, vai trò khác nữa trong tính hướng mô bào, trốn miễn dịch, và tăng cường sự nhân lên của virus trong vật chủ đã được chứng minh. CD2v có thể gây hại đến chức năng của tế bào lympho, sự biểu hiện của protein này có liên quan đến sự lây lan của ASFV trong đàn lợn nuôi. Hệ thống lai đôi đã chỉ ra rằng các phần đuôi tế bào chất của CD2v có thể tương tác với các protein điều chỉnh tế bào chất SH3P7 (protein SH3P7 tham gia vào các chức năng tế bào đa dạng như vận chuyển và dẫn truyền tín hiệu). Vùng tế bào chất của protein CD2v đã được đề xuất như một điểm đánh dấu di truyền mới. Đặc điểm này có thể được sử dụng để phân tích các chủng ASFV từ các địa điểm khác nhau và theo dõi sự lây lan của virus. Phân nhóm huyết thanh các chủng trên toàn thế giới dựa trên phần ngoại bào của protein có thể được thiết lập. Điểm mã hóa di truyền CD2v và các protein lectin loại C ảnh hưởng đến tính đặc trưng của phản ứng huyết thanh học HAI; giải trình tự CD2v và lectin loại C là một phương pháp đơn giản để phân nhóm huyết thanh của ASFV. Vì vậy, nó dễ dàng được khai thác để phục vụ nghiên cứu tính đa dạng của các chủng ASFV trong tự nhiên và tạo ra một nền tảng tốt cho thiết kế vaccine. Protein CD2v được mã hóa bởi gen *EP402R*. Các nhà nghiên cứu đã phát hiện rằng việc xóa gen *EP402R* từ virus BA71V không ảnh hưởng

đến sự sinh trưởng của virus trong môi trường nuôi cấy tế bào Vero. Fraczyk *et al.* lần đầu tiên báo cáo biến đổi di truyền trong gen liên quan đến trốn hệ thống miễn dịch của vật chủ, và họ tìm ra sự đa dạng di truyền nhỏ nhưng đáng chú ý trong gen *EP402R* và đã chứng minh sự tiến hóa phân tử chậm của các chủng ASFV lưu hành. So sánh gen *EP402R* của các chủng ASFV thu thập từ năm 1978 đến năm 2014 cho thấy virus Sardinia có thể được chia thành hai subgroup: Một nhóm bao gồm các các chủng phân lập từ 1978 đến 1990 và nhóm thứ hai chứa các virus được lưu giữ từ 1990 đến 2014. Người ta cũng phát hiện rằng các gen *EP402R* và *EP153R* bị gián đoạn trong bộ gen của một chủng tự nhiên không hấp phụ hồng cầu (non-HAD) có độc lực thấp (chủng ASFV/NH/P68). Tuy nhiên, hai virus HAD tái tổ hợp đã được sao chép để định lượng cao hơn khoảng 1.000 lần so với chủng non-HAD khi gen *EP153R* còn nguyên vẹn đã được khôi phục. Mặc dù sự phục hồi này không tăng độc lực của virus, triệu chứng nhiễm virus huyết đã được quan sát thấy ở một số con lợn và những kết quả này đã chứng minh một vai trò mới của protein CD2v trong sự nhân lên của virus trên ve.

CÁC PROTEIN CẤU TRÚC KHÁC

Protein p220, p62, p54, p30, p72 và CD2v đã được xác định là các protein cấu trúc quan trọng trong giai đoạn gắn, xâm nhập, điều tiết phản ứng miễn dịch trong các vật chủ và là thành phần chính của các virion. Bên cạnh đó, một số protein cấu trúc khác của ASFV như p10, p12, p 14.5 và p17 cũng có vai trò quan trọng trong nhiễm virus.

Protein p10 với trọng lượng phân tử khoảng 8,4 kDa, được mã hóa bởi gen *K78R*. Protein là một polypeptide rất dễ hòa tan trong nước với hàm lượng chất cơ bản tương đối cao (23%) và được tích lũy trong hạt nhân tế bào trong quá trình nhiễm virus. P10 tham gia vào sự hấp phụ ASFV và có khả năng liên kết DNA, cả sợi đơn và sợi đôi. Khả năng thu

nap hạt nhân của p10 được kiểm tra bởi thử nghiệm thu nạp hạt nhân nhờ vào nấm men (yeast-based nuclear import assay) và định vị dưới tế bào của p10 trong các tế bào động vật có vú được kiểm tra bởi kính hiển vi huỳnh quang. Kết quả cho thấy rằng protein nhanh chóng được thu nạp vào hạt nhân, và 71- 73 amino acid của p10 là quan trọng đối với việc thu nạp hạt nhân.

Protein p12 với một miền giàu cysteine trong khu vực C-terminal được mã hóa bởi gen *O61R*, và được tổng hợp trong giai đoạn cuối của nhiễm virus. Vị trí của nó trong lớp phủ virion đã được chứng minh qua kính hiển vi miễn dịch. P12 có liên quan đến sự gắn virus vào tế bào vật chủ, và các protein màng trên bề mặt của các tế bào có thể hoạt động như các thụ thể cho ASFV.

Protein p14.5 còn được gọi là pE120R, được mã hóa bởi gen *E120R*. Nó là một protein liên kết DNA với trọng lượng phân tử khoảng 13,6 kDa. P14.5 được tổng hợp trong giai đoạn cuối của nhiễm virus và là protein cần thiết tham gia vào quá trình chuyển giao virion từ các nơi sản xuất virus đến màng tương. Các sửa đổi sau dịch mã của pE120R đã được mô tả bằng cách sử dụng điện di gel hai chiều (2DE) và MASS spectrometry (MS). Người ta thấy rằng các protein đã được acetyl hóa tại alanine (ALA) ở N-terminal trong khi nhiễm virus.

P17 là một protein cấu trúc chính của ASFV và là một protein xuyên màng nằm ở trong bao ngoài của virus. Protein này cần thiết cho sự phát triển của tiền chất màng đối với virus trung gian hình khối đa diện và khả năng tồn tại của virus.

KẾT LUẬN

Có nhiều protein được mã hóa bởi bộ gen ASFV. Những protein này có vai trò trong các giai đoạn khác nhau của chu kỳ lây nhiễm virus (bảng 1). Hơn 50 protein được gói gọn trong các hạt virus và là thành phần chính của hạt virus, đóng một vai trò trong giai đoạn

đầu nhiễm virus. Protein p220 và p62 cấu thành các thành phần chính của vỏ lõi trong các virion. P220 và p62 có thể được phân cắt để hình thành các protein virion trưởng thành p150, p37, p14, p34, p35 và p15 bởi protease mã hóa virus SUMO-like S273R. Những protein này có một vai trò quan trọng trong quá trình lắp ráp capsid của virus. P54 nằm trên màng ngoài lipid của các hạt virus, tham gia vào quá trình xâm nhập của ASFV và có vai trò như là protein cấu trúc xuyên màng. P54 rất quan trọng cho việc bổ sung và chuyển đổi của các màng ER thành tiền chất của bao ngoài của virus. Protein này, cùng với p30 và các protein khác, được coi là một protein kháng nguyên khả thi trong việc phát triển chẩn đoán huyết thanh học. P72 với tính chất kháng nguyên và khả năng gây miễn dịch cao có vai trò như là thành phần chính của virus hình khối đa diện. Protein nằm trên bề mặt capsid của virus và được thể hiện muộn trong nhiễm virus. Gen *VP72* được sử dụng để phân loại gen ASFV theo trình tự của C-terminus trong gen *VP72*, và nó là trung tâm của một phương pháp mới cho nghiên cứu dịch tễ học phân tử. CD2v là một glycoprotein và có thể gây hấp phụ hồng cầu xung quanh các tế bào bị nhiễm ASFV và các hạt virus ngoại bào. Các cơ chế phân tử về chức năng của protein CD2v không rõ ràng, nhưng các nhà nghiên cứu nhận thấy rằng protein nằm xung quanh các nơi sản sinh virus trong nhiễm ASFV. Một số protein cấu trúc khác như p10, p12, p14.5 và p17 có liên quan đến quá trình gắn, xâm nhập, và nhân lên của ASFV.

Các tế bào đích chính của ASFV là tế bào đơn bào-đại thực bào ở lợn, nhưng virus được tìm thấy trong nhiều tế bào khác trong giai đoạn cuối của nhiễm virus. Cơ chế xâm nhập virus xác định tính hướng và sinh bệnh học của virus, và con đường xâm nhập vào các tế bào đích thì phụ thuộc dynamin và quá trình đại ẩm bào qua trung gian clathrin (clathrin-mediated macropinocytosis). Ngày nay, một số protein virus đã được công nhận là có liên

quan đến sự gắn và xâm nhập của ASFV, nhưng thụ thể của các protein này không rõ ràng. Lõi virus chuyển đến vùng quanh nhân sau khi ASFV xâm nhập vào các tế bào, và nó bắt đầu phiên mã sớm mRNA và dịch mã bằng cách sử dụng enzyme và cytokin. Những enzyme và cytokin này được gói gọn vào trong virion để cung cấp cho sự kéo chuỗi DNA để virus nhân lên. Các protein cấu trúc và các enzyme đã được gói gọn trong virion trưởng thành được mã hóa ở giai đoạn này. Truyền các biểu

hiện từ gen đầu đến gen cuối là một chỉ thị về sự bắt đầu nhân lên của ASFV. Các thụ thể tiếp theo bao gồm lắp ráp virion ở tế bào chất xung quanh hạt nhân, và lõi nucleoprotein của virus được gói gọn để tạo thành capsid virus hình khối đa diện bởi màng từ màng kép của ER. ASFV sau khi đóng gói được chuyển sang màng tương bởi các vi cấu trúc hình ống và sau đó các hạt virus chồi qua màng tương. Cuối cùng, các hạt virus trưởng thành thoát khỏi các tế bào vật chủ.

Bảng 1. Các protein cấu trúc tham gia vào sự lây nhiễm của ASFV

Tên protein	Tên gen	Ước lượng kích thước protein (kDa)	Vai trò của protein
p11.5	<i>A137R</i>	21,1	Tham gia vào quá trình gắn của virus
p10	<i>A78R</i>	8,4	Tham gia vào quá trình gắn của virus
p72	<i>B646L</i>	73,2	Vỏ protein chính, tham gia vào sự xâm nhập của virus
pp220	<i>CP2475L</i>	281,5	Tiền polyprotein p150, p37, p14, và p34; cần thiết cho quá trình bao gói của lõi nucleoprotein
p32(p30)	<i>CP204L</i>	23,6	Protein phosphoryl hóa và kháng nguyên, tham gia vào việc xâm nhập của virus
p62 (p60)	<i>CP530R</i>	60,5	Tiền polyprotein p35 và p15
p12	<i>O61R</i>	6,7	Gắn protein
p17	<i>D117L</i>	13,1	Cần thiết cho sự phát triển của tiền chất màng đến khối đa diện trung gian
54 (j13L)	<i>E183L</i>	19,9	Liên kết với chuỗi LC8 của dynein, tham gia vào quá trình xâm nhập của virus; cần thiết để tuyển dụng tiền chất bao ngoài cho nơi sản xuất
p14.5	<i>E120R</i>	13,6	Protein gắn DNA, cần thiết cho sự chuyển động của virion đến màng tương
CD2v (PEP402R)	<i>EP402R</i>	45,3	Tương tự như protein CD2 của vật chủ, cần thiết cho việc gắn các tế bào hồng cầu với tế bào bị nhiễm bệnh và các hạt virus ngoại bào; chèn glycoprotein vào bao ngoài của virus

Mặc dù nhiều nghiên cứu chuyên sâu đã được thực hiện, chúng ta vẫn cần nhiều thí nghiệm khác để minh họa cơ chế phân tử của các protein cấu trúc liên quan đến nhiễm ASFV ở các tế bào đích. Những hiểu biết tốt

hơn về cơ chế chính xác sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho việc phòng ngừa và kiểm soát sự lây lan của ASF trên thế giới.

Người dịch: Ngô Chung Thủy - Viện Thú y.