

PURIFICATION AND EVALUATION OF THE BIOACTIVITY OF THE RECOMBINANT P54 ANTIGEN OF THE AFRICAN SWINE FEVER VIRUS EXPRESSED FROM *Nicotiana benthamiana*

Nguyen Thi Tra^{1,2}, Nguyen Thu Giang¹, Ho Thi Thuong^{1,2}, Trinh Thai Vy^{1,2}, Hoang Thi Thu Hang^{1,2}, Vu Duy Thai Son¹, Le Thi Tra My¹, Nguyen Thi Thu Hien¹, Le Thi Thanh¹, Pham Bich Ngoc^{1,2*}

¹Institute of Biotechnology – VAST, ²Graduate University of Science and Technology - VAST

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 24/7/2023 Revised: 30/8/2023 Published: 13/9/2023	African swine fever is a dangerous infectious disease caused by ASFV (African swine fever virus) in pigs, with mortality rates up to 100%. Currently, no officially licensed commercial vaccine against African swine fever is on the market. p54 is considered one of the main target proteins for ASFV vaccine development and ASFV diagnostic kit production. In this study, the DNA sequence encoding the ectodomain of p54 of the VNUAHY-ASFV/Vietnam2019 strain was optimized for expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>, then artificially synthesized and inserted into the pRTRA vector containing the trimer and oligomer motifs. Next, the entire expression cassettes were inserted into the pCB301 vector and successfully transformed into <i>Agrobacterium tumefaciens</i> for transient expression in <i>Nicotiana benthamiana</i>. The expression of recombinant p54 protein in plants was determined by Western blot. The better expression motif was selected for purification by Immobilized affinity chromatography, tested for the immune response in mice, and evaluated for ASFV-specific IgG antibody titer by ELISA reaction. P54-pII-tp was selected to purify and induce an immune response in mice. ELISA results showed that recombinant p54-pII-tp stimulated ASFV-specific antibody production in laboratory mice. This result is a premise for research and development of subunit vaccines and diagnostic kits against ASFV infection in <i>Nicotiana benthamiana</i>.
KEYWORDS	
Transient expression	
<i>A. tumefaciens</i>	
<i>N. benthamiana</i>	
ASFV strain in Vietnam	
Recombinant p54 protein	

TINH SẠCH VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA KHÁNG NGUYÊN P54 TÁI TỔ HỢP CỦA VIRUS GÂY BỆNH TẢ LỢN CHÂU PHI (AFRICAN SWINE FEVER VIRUS) BIỂU HIỆN TRÊN CÂY THUỐC LÁ *Nicotiana benthamiana*

Nguyễn Thị Trà^{1,2}, Nguyễn Thu Giang¹, Hồ Thị Thương^{1,2}, Trịnh Thái Vy^{1,2}, Hoàng Thị Thu Hằng^{1,2}, Vũ Duy Thái Sơn¹, Lê Thị Trà My¹, Nguyễn Thị Thu Hiền¹, Lê Thị Thanh¹, Phạm Bích Ngọc^{1,2*}

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

²Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 24/7/2023 Ngày hoàn thiện: 30/8/2023 Ngày đăng: 13/9/2023	Dịch tả lợn Châu Phi là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm do ASFV (African swine fever virus) gây ra trên lợn với tỉ lệ chết lên đến 100%. Hiện nay, chưa có vaccine thương mại nào chính thức được cấp phép phòng ASFV và được bán trên thị trường. p54 được xem là một trong những protein mục tiêu chính để phát triển vaccine phòng chống và sản xuất kit chẩn đoán ASFV. Trong nghiên cứu này, trình tự ectodomain p54 của chủng VNUAHY-ASFV/Vietnam2019 được tối ưu mã biểu hiện trên <i>Nicotiana benthamiana</i>, sau đó được tổng hợp nhân tạo và chèn vào vector pRTRA có chứa các motif trimer, oligomer. Toàn bộ các cassette biểu hiện protein được chèn vào vector pCB301 và biến nạp thành công vào <i>Agrobacterium tumefaciens</i> để biểu hiện tạm thời trên thuốc lá. Biểu hiện của protein p54 tái tổ hợp được đánh giá bằng Western blot. Lựa chọn motif biểu hiện tốt hơn để tinh sạch bằng sắc kí ái lực, gây đáp ứng miễn dịch trên chuột và đánh giá hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu ASFV bằng ELISA. Lựa chọn p54-pII-tp tinh sạch và gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. Kết quả ELISA cho thấy p54-pII-tp kích thích sinh kháng thể đặc hiệu với ASFV trên chuột thí nghiệm. Kết quả trên là tiền đề cho các nghiên cứu vaccine tiểu đơn vị và kit chẩn đoán phòng chống sự lây nhiễm ASFV trên <i>Nicotiana benthamiana</i>.
TỪ KHÓA	
Biểu hiện tạm thời;	
<i>A. tumefaciens</i> ;	
<i>N. benthamiana</i> ;	
Chủng ASFV gây bệnh tại Việt Nam;	
Protein p54 tái tổ hợp	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8404>

* Corresponding author. Email: pbngoc@ibt.ac.vn

1. Giới thiệu

Tả lợn Châu Phi (African swine fever, ASF) do ASF virus (ASFV) gây ra, là bệnh truyền nhiễm cấp tính được quan tâm nhất ở lợn hiện nay. Lợn ở mọi lứa tuổi có thể nhiễm bệnh với các triệu chứng nguy hiểm như sốt cao lên đến 42°C, nằm nghiêng, nôn, tần số hô hấp cao hơn bình thường, chảy nước mắt, nước mũi, bỏ ăn, xuất huyết dưới da, dạ dày, ruột. Lợn mắc bệnh ở thể cấp tính thường chết sau 6 - 13 ngày phát bệnh hoặc kéo dài nhiều nhất được 20 ngày [1]-[3]. Tả lợn Châu Phi xuất hiện đầu tiên tại Kenya năm 1920; tới năm 2018, bệnh đã lây lan và bùng phát tại nhiều quốc gia trên thế giới gây thiệt hại nặng nề cho ngành chăn nuôi. Tại Việt Nam, tả lợn Châu Phi đã xuất hiện vào tháng 02/2019. Chỉ sau 7 tháng, bệnh đã lây lan khắp cả nước tại 63 tỉnh, thành phố, khiến các địa phương phải tiêu hủy trên 4,4 triệu con lợn [4].

ASFV có hệ gene là DNA sợi đôi với kích thước khoảng 170-190 kb, mã hóa cho khoảng 160 protein. ASFV có cấu trúc hình đa diện đều, kích thước đường kính trung bình là 200 nm, gồm nhiều lớp: phần lõi trung tâm chứa hệ gene của virus được bao bọc bởi một lớp màng protein dày; phần vỏ lipid bao quanh phần lõi (màng trong); lớp vỏ capsid bên ngoài tạo thành hạt virion tập hợp trong các tế bào chất; lớp vỏ ngoài cùng có nguồn gốc từ màng tế bào sẽ bao bọc toàn bộ virion (màng ngoài) [5]. Vì cấu trúc phức tạp với hệ gene DNA sợi kép rất khó xử lý nên hiện nay vẫn chưa có vaccine thương mại chính thức được cấp phép và bán để phòng ngừa dịch tả lợn Châu Phi.

p54 là một trong những protein cấu trúc chính nằm ở màng trong của ASFV, tham gia vào quá trình hình thành và lây nhiễm virus. P54 được mã hóa bởi gene E183L, có trọng lượng phân tử khoảng 25 kDa [6]. Protein p54 hình thành các homodimer liên kết với nhau qua một cầu disulfide cysteine-cystein, cấu tạo lên các cấu trúc màng tiền thân và hạt virus trưởng thành nội bào và ngoại bào. Rodríguez và cộng sự (2004) đã chứng minh p54 tham gia huy động các tiền chất cấu tạo màng để lắp ráp hạt virus và việc ức chế tổng hợp p54 sẽ ngăn chặn sự phát sinh hình thái của virus ở giai đoạn rất sớm, ngay cả trước khi hình thành tiền chất [7]. P54 cũng được chứng minh là tham gia vào quá trình lây nhiễm virus thông qua liên kết trực tiếp với chuỗi nhẹ 8 (LC8) của dynein- một loại protein vận động liên kết với vi ống định hướng đầu âm liên quan đến vận chuyển chất trong tế bào chất. Huyết thanh kháng p54 được phát hiện có tác dụng ức chế ASFV gắn vào các tế bào nhạy cảm, cho thấy vai trò của nó trong sự xâm nhập của virus [8]. Các nghiên cứu miễn dịch học cũng cho thấy ở lợn nhiễm ASFV tạo đáp ứng kháng thể đặc hiệu mạnh kháng p54, và kháng nguyên p54 cũng có khả năng kích thích kháng thể trung hòa cũng như đáp ứng miễn dịch tế bào cao ở lợn. Vì vai trò quan trọng của p54 nên nó được xem là một trong những mục tiêu quan trọng nhất trong nghiên cứu vaccine phòng chống ASFV. Bên cạnh đó, các kháng thể chống lại p54 xuất hiện sớm nhất là 7-10 ngày và tồn tại trong máu của động vật bị nhiễm bệnh trong vài tuần [8], [9] khiến gen p54/E183L trở thành một trong những mục tiêu kháng nguyên ASFV tốt nhất để phát triển xét nghiệm chẩn đoán huyết thanh học.

Hệ thống biểu hiện tạm thời ở thực vật với các ưu điểm: chi phí sản xuất thấp, protein tái tổ hợp được cải biến sau dịch mã và định vị chính xác trong tế bào, mức độ biểu hiện khá cao 14,4% lượng protein tổng số trong lá trưởng thành, và không lo ngại sự tạp nhiễm của các virus (HIV, HBV, SV40...) và vi khuẩn, được xem là hệ thống sản xuất protein tái tổ hợp tiềm năng đang được phát triển thương mại ở nhiều quốc gia như Canada, Nhật Bản, Hàn Quốc,... [10], [11]. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên kháng nguyên p54 tái tổ hợp có nguồn gốc từ chủng VNUAHY-ASFV/Vietnam2019 được biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana*. Kháng nguyên sau biểu hiện được tinh sạch bằng sắc ký ái lực, gây đáp ứng miễn dịch trên chuột và đánh giá hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu ASFV bằng phản ứng Elisa và Western blot. Kết quả của nghiên cứu tạo tiền đề cho phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng chống ASFV dựa trên công nghệ biểu hiện tạm thời.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Nguồn nguyên liệu thực vật

Cây thuốc lá thủy canh *N. benthamiana* được trồng tại Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.1.2. Chủng vi sinh vật, plasmid, trình tự gen

Chủng *E. coli* 10G, chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen vào cây thuốc lá để biểu hiện tạm thời gen do Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Virus ASFV bất hoạt được cung cấp bởi công ty NAVETCO

Vector tách dòng: Vector pRTRA_35S_H5pII_his_cmyc_KDEL và vector pRTRA_35S_H5pII_100xELP_his_cmyc_KDEL. Vector chuyển gen pCB301-35S-H5pII-His_cmyc_KDEL được cung cấp bởi phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

Các cặp mồi sử dụng:

Ecto-P54-BamHI-F: agGGATCCTCTTCTAGGAAGAAGAAGGC

Ecto-p54-PspOMI-R: gcggggcccTGGCCTCTGTGGAGTAGAGT

35S-F: CACTGACGTAAGGGATGACG; 35S-R: ATCTGGGAAGTACTCACACA

2.1.3. Nguồn nguyên liệu động vật

Chuột cái BALB/C được cung cấp bởi phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen p54 và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector tương ứng

Trình tự gen mã hóa kháng nguyên p54 của ASFV xuất hiện ở Việt Nam được thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI của chủng VNUAHY-ASFV/Vietnam2019 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), được phân tích và so sánh sử dụng phần mềm BioEdit và MegAlign/Lasergene 7.0. Trình tự sau đó được bổ sung trình tự nhận biết của enzyme cắt hạn chế *Bam*HI và *Psp*OMI cho mục đích chèn gen vào vector chuyển gen, tối ưu mã ở cây thuốc *N. benthamiana* và được gửi để tổng hợp nhân tạo bởi công ty Genewiz (Mỹ).

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên p54 ASFV sau khi được thu nhận bằng xử lý enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI, sẽ được nối thay thế vị trí gen H5 trong các các vector pRTRA-SP-His-H5-GCN4pII-cmyc-KDEL, hoặc pRTRA-SP-His-H5-GCN4pII-tp-cmyc-KDEL, tại vị trí *Bam*HI và *Psp*OMI. Vector pRTRA gắn p54 sau đó biến nạp vào chủng *E. coli* khả biến 10G bằng phương pháp sốc nhiệt. Khuẩn được chọn trên môi trường LB đặc bổ sung kháng sinh carbenicilin (Carbe) 50 mg/l và colony-PCR với cặp mồi 35S-F/R và cắt kiểm tra bằng *Bam*HI và *Psp*OMI. Tiếp theo, vector pRTRA có gắn đoạn gen p54 và vector chuyển gen thực vật pCB301 được phân cắt bằng *Hind*III. Sản phẩm ghép nối DNA đã xử lý enzyme cắt giới hạn vào vector pCB301 được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* chủng 10G bằng phương pháp sốc nhiệt và chọn lọc khuẩn lạc trên môi trường thạch LB có bổ sung kháng sinh thích hợp kanamycin (Kana) 50 mg/l. Các dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng colony-PCR sử dụng cặp mồi 35S-F/R, sau đó tách plasmid và thực hiện phản ứng cắt với enzyme *Not*I. Những plasmid mang vector pCB301 tái tổ hợp dương tính được biến nạp vào chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện và chọn lọc trên môi trường LB đặc có chứa kháng sinh chọn lọc rifamycin (Rifa) 50 mg/l, carbe 50 mg/l, kana 50 mg/l. Kiểm tra và chọn lọc các dòng khuẩn lạc dương tính bằng phản ứng colony-PCR phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện tạm thời ở lá cây thuốc lá.

2.2.2. Phương pháp biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng Agro-infiltration

Phương pháp biểu hiện tạm thời được thực hiện theo hướng dẫn của Hồ Thị Thương và cộng sự. Mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp trong mẫu protein tách chiết từ lá xâm nhiễm khuẩn được đánh giá bằng lai miễn dịch Western blot như miêu tả của Hồ Thị Thương và cộng sự [12].

2.2.3. Phương pháp tinh sạch bằng sắc ký ái lực (IMAC) của kháng nguyên p54 ASFV tái tổ hợp từ thực vật

Protein p54 ASFV (dung hợp GCN4pIItp) được tinh sạch IMAC theo quy trình được mô tả trong công bố của Phạm Bích Ngọc và cộng sự (2017) [13] với đệm tách chiết chứa 500 mM NaCl, 20 mM sodium phosphate, pH 7,4 và đệm thu mẫu chứa 500 mM Imidazol, 20 mM Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, pH 7,4. Dịch protein sau đó được thẩm tích trong PBS ở 4°C, qua đêm và cô lại bằng PEG 6000.

2.2.4. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột

Protein p54 tái tổ hợp của ASFV tinh sạch và dịch chiết của cây thuốc lá không chuyển gen được sử dụng để đánh giá tính sinh miễn dịch trên chuột. 200 μ l hỗn hợp chứa 10 μ g kháng nguyên được trộn đều với tá dược EMULSIGEN®-D (MVP) tỷ lệ 4:1 được tiêm dưới da cho mỗi con chuột cái trắng BALB/C 6 tuần tuổi. Mỗi con chuột được tiêm với kháng nguyên tinh sạch 3 lần tại các thời điểm ngày 0, ngày 14, ngày 28. Huyết thanh từ máu chuột được thu vào ngày thứ 7 sau lần tiêm thứ 3.

2.2.5. Đánh giá đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu ASFV bằng phản ứng Elisa

Kháng thể IgG đặc hiệu ASFV được sản sinh từ các con chuột sau khi gây đáp ứng miễn dịch được đánh giá bằng phản ứng ELISA theo quy trình như sau:

Đĩa microtiter (ImmunoPlate Maxisorp, Nalgen Nunc International, Roskilde, Denmark) được phủ với virus ASF và ủ qua đêm ở 4°C. Đĩa được phủ trong dung dịch PBS1X có chứa sữa tách béo 5% (100 μ l) trong 2 giờ. Sau đó đĩa được ủ với huyết thanh của chuột tiêm kháng nguyên p54-pII-tp tinh sạch/ PBS (đôi chứng âm) với độ pha loãng 1:1000 trong dung dịch PBS có 5% sữa trong 2 giờ. Rửa đĩa 5 lần với PBS 1X chứa 0,1% Tween20. Đĩa được ủ với kháng thể anti-mouse IgG có gắn HRP (horseradish Peroxidase) với độ pha loãng 500 lần trong 2 giờ. Đĩa được rửa bằng dung dịch PBS 1X 5 lần. Tín hiệu được phát hiện sử dụng dung dịch 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 450 nm.

2.2.6. Phương pháp xử lý thống kê

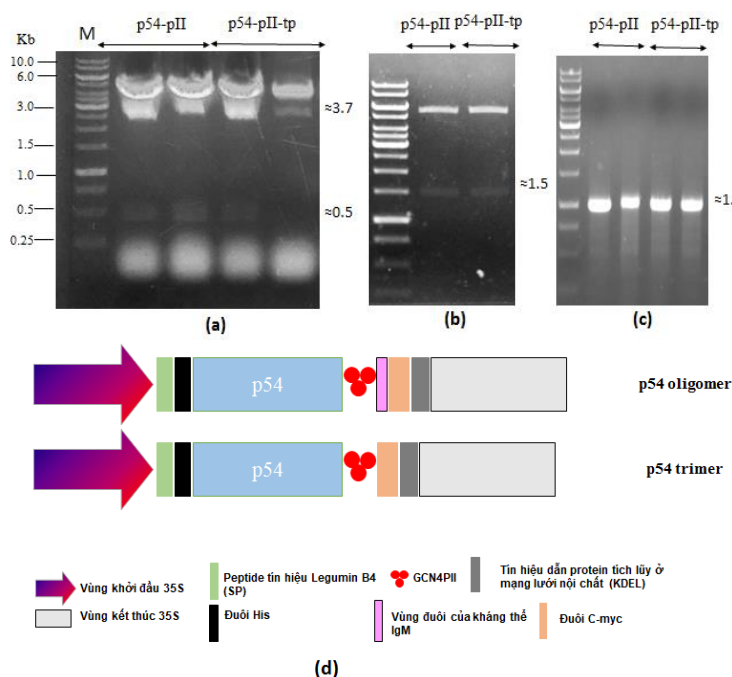
Phân tích thống kê cho ELISA được tiến hành sử dụng phần mềm Excel. Sự sai khác giữa giá trị trung bình được biểu diễn $X \pm SD$. Giá trị $P < 0,001$ được xác định là sai khác có ý nghĩa thống kê.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo vector biểu hiện gen mã hóa protein p54 của ASFV

Protein p54 là một protein màng loại II gồm 32 amino acid ở đầu N bên trong, theo sau là một miền xuyên màng 21 amino acid và một ectodomain 131 amino acid ở đầu C. Vùng ectodomain được dự đoán là có một số vị trí glycosyl hóa và phosphoryl hóa cũng như các vùng peptide bảo thủ và biến đổi có tính kháng nguyên. Do đó trong nghiên cứu này, vùng ectodomain từ vị trí amino acid 52 – 181 của kháng nguyên p54 đã được lựa chọn để thiết kế cấu trúc biểu hiện.

Vùng ectodomain của p54 được tách dòng trong vector pRTRA và tạo chủng *E. coli*. Kết quả cắt kiểm tra các dòng khuẩn lạc mang plasmid pRTRA p54 tái tổ hợp với *Bam*HI và *psp*OMI cho ra các băng có kích thước tương ứng là khoảng 0,5 kb (kích thước của gen p54) và 3,7 kb (kích thước của khung vector pRTRA), chứng tỏ đoạn gen mã hóa p54 của ASFV đã được chèn thành công vào vector pRTRA (Hình 1a). Vùng cassette biểu hiện mang gen mã hóa p54 được thu nhận bằng cách xử lý plasmid pRTRA tái tổ hợp với *Hind*III, sau đó chèn vào vector pCB301 tại vị trí *Hind*III. Kết quả kiểm tra các dòng plasmid pCB301 tái tổ hợp với *Not*I cho thấy các băng theo đúng tính toán lý thuyết 5,5 kb và 1,5 kb, (Hình 1b). Điều này chứng tỏ đã thiết kế thành công vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa p54 của ASFV. Cấu trúc vector được thể hiện ở Hình 1d vector tái tổ hợp pCB301 đã được biến nạp thành công vào chủng *A. tumefaciens*, thể hiện ở kết quả colony- PCR với đúng kích thước tính toán lý thuyết (1 kb, Hình 1c).

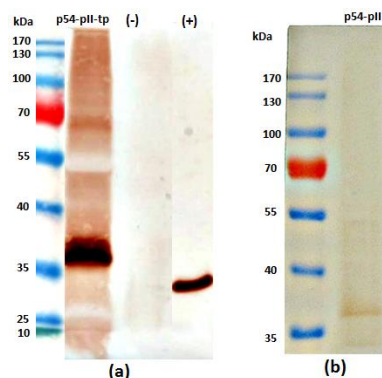


Hình 1. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa protein p54 của ASFV

(a) Kiểm tra các plasmid pRTRA-p54-pII và pRTRA-p54-pII-tp tái tổ hợp bằng BamHI và pspOMI; (b) Kiểm tra plasmid pCB301-p54-pII và pCB301-p54-pII-tp tái tổ hợp bằng NotI; (c) Colony-PCR kiểm tra khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R; (d) Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện pCB301-p54-pII (p54 trimer) và pCB301-p54-pII-tp (p54 oligomer).

3.2. Biểu hiện tạm thời protein tái tổ hợp ASFV p54 trên cây thuốc lá *N. benthamiana*

Protein p54-pII và p54-pII-tp được biểu hiện trên cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp biểu hiện tạm thời. Kết quả biểu hiện được đánh giá bằng Western. Hình 2 cho thấy các kháng nguyên p54-pII và p54-pII-tp đều đã được biểu hiện thành công trên thuốc lá sau 5 ngày biến nạp vào *N. benthamiana*. Trong đó, kháng nguyên p54-pII-tp có sự biểu hiện mạnh hơn p54-pII theo một dải dài, đặc biệt là ở kích thước 35 kDa. Kháng nguyên p54-pII-tp có kích thước khác nhau có thể được giải thích do (1) sự cải biến của protein sau dịch mã như sự glycosylation và phosphorylation; (2) sự hình thành các cấu trúc dimer, trimer và oligomer nhờ gắn đuôi pII-tp. Từ kết quả trên, p54-pII-tp là cấu trúc được lựa chọn biến nạp lượng lớn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

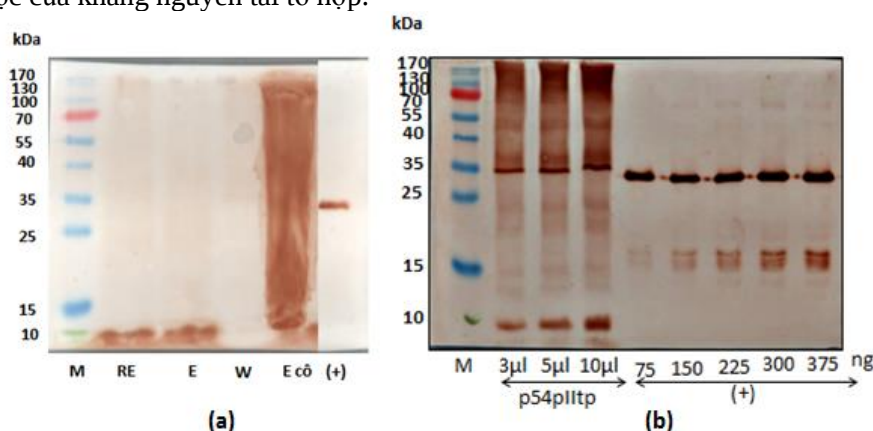


Hình 2. Hình ảnh kiểm tra kết quả phân tích sự biểu hiện protein p54 tái tổ hợp ở *N. benthamiana* bằng Western blot (a) Mức độ biểu hiện của protein p54-pII-tp; (b) Mức độ biểu hiện của protein p54-pII.

(-): Đối chứng âm là dịch chiết từ lá cây *N. benthamiana* không biến nạp; (+): Đối chứng dương là protein đã biểu hiện thành công

3.3. Tinh sạch kháng nguyên ASFV p54 tái tổ hợp

Kháng nguyên p54-pII-tp sau khi biểu hiện được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực. Sản phẩm tinh sạch được đánh giá bằng Western Blot. Kết quả cho thấy, protein p54-pII-tp bám được với Ni-agarose và ở phân đoạn cuối cùng đã thu được protein p54-pII-tp tái tổ hợp thể hiện ở dải protein p54-pII-tp đậm nét trong ảnh Western blot (Hình 3a). Tiến hành bán định lượng protein sau khi cô bằng Western blot và phần mềm ImageQuant TL 1D v8.2.0. Nồng độ protein thu được cuối cùng là 120 ng/ μ l (Hình 3b). Đặc biệt, protein p54-pII-tp vẫn xuất hiện dải băng vạch rất đậm trên 35 kDa, cho thấy p54-pII-tp không bị biến tính qua quá trình tinh sạch và vẫn giữ được các cấu trúc oligomer. Cấu trúc oligomer tạo ra đáp ứng miễn dịch tốt hơn nhờ sự hiện diện của các siêu kháng nguyên, tăng độ bền của kháng nguyên giúp kéo dài thời gian trình diện kháng nguyên với các tế bào miễn dịch của cơ thể. Vì vậy, biểu hiện thành công cấu trúc p54-pII-tp dạng oligomer và giữ được nguyên vẹn cấu trúc này sau tinh sạch rất cần thiết để đảm bảo hoạt tính sinh học của kháng nguyên tái tổ hợp.



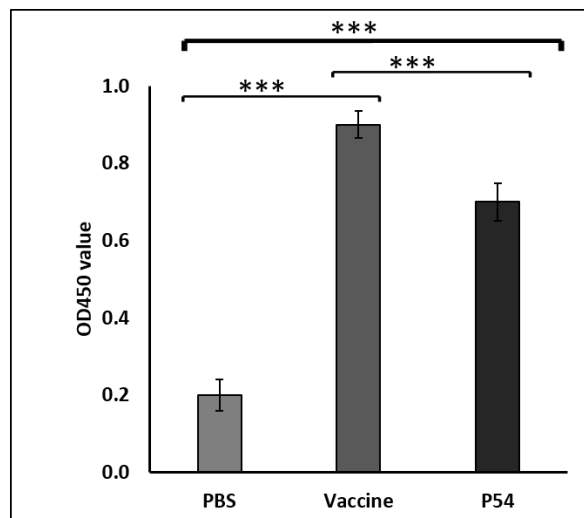
Hình 3. Kết quả tinh sạch p54-pII-tp được đánh giá bằng Western blot (a) và bán định lượng protein p54-pII-tp bằng Western blot và phần mềm ImageQuant TL 1D v8.2.0 (b)

RE: dịch chiết thô; FT: dịch chảy qua sau khi ủ với hạt Ni-NTA Sepharose; W1, W2: dịch chảy qua sau khi rửa cột với đệm rửa; E: dịch rửa giải protein, quá trình rửa giải sẽ được thực hiện 2 lần kí hiệu lần lượt E1, E2; (+): mẫu đối chứng dương

3.4. Đánh giá hoạt tính sinh học của protein p54-pII-tp

P54 là một trong những kháng nguyên virus được sử dụng nhiều nhất trong nghiên cứu tạo vaccine phòng chống ASFV cũng như tạo kit xét nghiệm chẩn đoán lợn nhiễm ASFV. Trong các nghiên cứu trước đó, kháng nguyên p54 đã được ứng dụng để tạo vaccine DNA, vaccine tái tổ hợp và vaccine vector virus [9]. Bên cạnh đó, p54 tái tổ hợp đã được sử dụng sản xuất kit phát hiện ASFV thương mại trên thị trường. P54 tái tổ hợp và kháng thể đơn dòng kháng p54 cũng được chứng minh có thể nhận biết huyết thanh lợn nhiễm bệnh với độ nhạy 92,5% và độ đặc hiệu 98,9% trong thí nghiệm ELISA cạnh tranh [8].

Để đánh giá tiềm năng ứng dụng p54-pII-tp cho sản xuất vaccine và kit, trong nghiên cứu này, p54-pII-tp sau tinh sạch bằng IMAC được dùng để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. Mẫu huyết thanh chuột được thu sau 7 ngày tiêm lần 3 được sử dụng để phát hiện kháng thể kháng virus ASFV bằng phản ứng ELISA. Kết quả phân tích ELISA cho thấy giá trị OD₄₅₀ sau lần tiêm thứ ba của nhóm chuột tiêm p54-pII-tp cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng âm với giá trị $p < 0,001$ (Hình 4), chứng tỏ p54-pII-tp có khả năng kích thích sinh kháng thể đặc hiệu với virus ASFV rất mạnh. Kết quả này cho thấy, (1) p54-pII-tp là kháng nguyên tiềm năng cho sản xuất vaccine phòng ASFV, (2) protein tái tổ hợp p54-pII-tp tinh sạch có thể được dùng làm kit xét nghiệm chẩn đoán lợn nhiễm ASFV nhờ nhận diện kháng thể kháng ASFV trong huyết thanh lợn nhiễm bệnh.



Hình 4. Kết quả ELISA gián tiếp đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch kháng thể đặc hiệu với ASFV trên chuột của kháng nguyên p54-pII-tp sau 3 lần tiêm với kháng nguyên tinh sạch. *** tương đương $p < 0,001$

4. Kết luận

Trong nghiên cứu này, protein ASFV p54 tái tổ hợp đã được biểu hiện thành công trên cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp biểu hiện tạm thời. Kháng nguyên p54-pII-tp đã được tinh sạch lượng lớn thành công, xác định được nồng độ là 120 ng/μl. Kết quả ELISA đã xác định được p54-pII-tp tái tổ hợp có kích thích sinh kháng thể đặc hiệu với ASFV trên chuột thí nghiệm. Từ đó cho thấy p54-pII-tp tái tổ hợp ASFV có nguồn gốc thực vật tiềm năng cho việc định hướng sản xuất vaccine tiểu đơn vị phòng chống ASF trên lợn cũng như kit chẩn đoán lợn nhiễm ASFV.

Lời cảm ơn

Kết quả nghiên cứu này thuộc đề tài “Nghiên cứu biểu hiện và đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của một số kháng nguyên tái tổ hợp của virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi (African Swine Fever virus) từ cây thuốc lá định hướng phát triển vắc xin tiểu đơn vị” mang mã số VINIF.2020.DA2022 do Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup, Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VINIF-VinBigdata) cấp kinh phí. Nghiên cứu có sử dụng thiết bị Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] G. Woźniakowski, M. Frączyk, K. Niemczuk, and Z. Pejsak, "Selected Aspects Related to Epidemiology, Pathogenesis, Immunity, And Control of African Swine Fever," *Vet. Res.*, vol. 60, pp. 119–125, 2016.
- [2] J. Pikalo, L. Zani, J. Hühr, M. Beer, and S. Blome, "Pathogenesis of African Swine Fever in Domestic Pigs and European Wild Boar—Lessons Learned from Recent Animal Trials," *Virus Res.*, vol. 271, 2019, Art. no. 197614.
- [3] P. J. Sánchez-Cordón, M. Montoya, A. L. Reis, and L. K. Dixon, "African Swine Fever: A Re-Emerging Viral Disease Threatening the Global Pig Industry," *Vet. J.*, vol. 233, pp. 41–48, 2018.
- [4] R. E. Montgomery, "On a form of swine fever occurring in British East Africa," *J Comp Pathol.*, vol. 34, pp. 59–191, 1921, doi: 10.1016/S0368-1742(21)80031-4.
- [5] M. L. Salas and G. Andrés, "African swine fever virus morphogenesis," *Virus Research*, vol. 173, no. 1, pp. 29–41, 2013.

-
- [6] F. Rodríguez, V. Ley, P. Gómez-Puertas, R. García, J. F. Rodríguez, and J. M. Escribano, "The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability," *Virus Res.*, vol. 40, pp. 161-167, 1996.
- [7] J. M. Rodríguez, R. García-Escudero, M. L. Salas, and G. Andrés, "African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites," *J Virol.*, vol. 78, no. 8, pp. 4299-4313, 2004.
- [8] W. Tesfagaber, L. Wang, G. Tsegay, Y. T. Hagoss, Z. Zhang, J. Zhang, H. Huangfu, F. Xi, F. Li, E. Sun, Z. Bu, and D. Zhao, "Characterization of anti-p54 monoclonal antibodies and their potential use for African swine fever virus diagnosis," *Pathogens*, vol. 10, no. 2, p. 178, 2021.
- [9] N. N. Gaudreault and J. A. Richt, "Subunit vaccine approaches for African swine fever virus," *Vaccines (Basel)*, vol. 7, no. 2, p. 56, 2019.
- [10] M. Malm, A. Diessner, K. Tamminen, M. Liebscher, T. Vesikari, and V. Blazevec, "Rotavirus VP6 as an adjuvant for bivalent norovirus vaccine produced in *Nicotiana benthamiana*," *Pharmaceutics*, vol. 11, p. 229, 2019.
- [11] B. J. Ward, A. Séguin, J. Couillard, S. Trépanier, and N. Landry, "Phase III: Randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age," *Vaccine*, vol. 39, pp. 1528-1533, 2021.
- [12] T. T. Ho, V. T. Trinh, H. X. Tran, P. T. T. Le, T. T. Nguyen, H. T. T. Hoang, M. D. Pham, U. Conrad, N. B. Pham, and H. H. Chu, "The immunogenicity of plant-based COE-GCN4pII protein in pigs against the highly virulent porcine epidemic diarrhea virus strain from genotype 2," *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 9, 2022, Art. no. 940395.
- [13] N. B. Pham, T. T. Ho, G. T. Nguyen, T. T. Le, N. T. Le, and H. C. Chang, "Nanodiamond enhances immune responses in mice against recombinant HA/H7N9 protein," *J Nanobiotechnol*, vol. 15, 2017, Art. no. 69.