

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM  
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

**HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**

---



**Nguyễn Thị Trà**

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH  
MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN P30 VÀ P54 TÁI TỔ HỢP  
CỦA VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI (AFRICAN  
SWINE FEVER VIRUS) TRÊN CÂY THUỐC LÁ *Nicotiana  
benthamiana* Domin**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ NGÀNH SINH HỌC**

**Hà Nội – 2023**

**BỘ GIÁO DỤC  
VÀ ĐÀO TẠO**

**VIỆN HÀN LÂM  
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



**Nguyễn Thị Trà**

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH  
MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN P30 VÀ P54 TÁI TỔ HỢP  
CỦA VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI (AFRICAN  
SWINE FEVER VIRUS) TRÊN CÂY THUỐC LÁ *Nicotiana  
benthamiana* Domin**

**Chuyên ngành : Sinh học thực nghiệm**

**Mã số: 8420114**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ : NGÀNH SINH HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC**

Hướng dẫn 1: PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

Hướng dẫn 2 : TS. Hoàng Thị Thu Hằng

**Hà Nội – 2023**

## LỜI CAM ĐOAN

*Tôi xin cam đoan đề tài nghiên cứu trong luận văn này là công trình nghiên cứu của tôi dựa trên những tài liệu, số liệu do chính tôi tự tìm hiểu và nghiên cứu. Chính vì vậy, các kết quả nghiên cứu đảm bảo trung thực và khách quan nhất. Đồng thời, kết quả này chưa từng xuất hiện trong bất cứ một nghiên cứu nào. Các số liệu, kết quả nêu trong luận văn là trung thực nếu sai tôi hoàn toàn chịu trách nhiệm trước pháp luật.*

*Hà Nội, ngày tháng năm*

**Học viên**

Nguyễn Thị Trà

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến thầy cô giáo hướng dẫn PGS.TS. Phạm Bích Ngọc và TS. Hoàng Thị Thu Hằng đã tận tình, hướng dẫn, chỉ bảo, dìu dắt, giúp đỡ tôi thực hiện và hoàn thành luận văn. Đặc biệt tôi muốn gửi lời cảm ơn tới TS. Phạm Thị Vân, ThS. Hồ Thị Thương, ThS. Nguyễn Thu Giang, CN. Trịnh Thái Vy, CN. Ngô Hồng Dương, KTV Nguyễn Thị Trà My cùng tập thể cán bộ Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học đã hết sức tạo môi trường, đào tạo và chỉ dạy rất nhiệt tình cho tôi trong thời gian làm việc, học tập và thực hiện luận văn tốt nghiệp.

Tôi chân thành gửi lời cảm ơn tới Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup, Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VINIF-VinBigdata) với 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 đã cấp kinh phí cho tôi có thể thực hiện được các nghiên cứu trong luận văn.

Ngoài ra, năm 2022 tôi đã may mắn nhận được học bổng do Học bổng Vallet trao tặng. Với tôi, đây vừa là sự động viên và vừa là sự hỗ trợ to lớn trong con đường học tập. Xin gửi lời cảm ơn chân thành tới quỹ học bổng.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và các thầy cô giáo Khoa Công nghệ Sinh học- Học viện Khoa học và Công nghệ- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam về sự dạy dỗ và chỉ bảo tận tình trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi muốn bày tỏ sự biết ơn tới người thân trong gia đình, bạn bè đã luôn kề vai sát cánh, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt nhiều năm qua. Tôi xin chân thành cảm ơn tất cả những sự giúp đỡ vô cùng quý báu đó!

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

**Học viên**

## MỤC LỤC

MỤC LỤC .....	i
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT .....	iv
DANH MỤC HÌNH .....	vi
DANH MỤC BẢNG .....	ix
MỞ ĐẦU .....	1
1. Lý do chọn đề tài.....	1
2. Mục đích nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
4. Ý nghĩa khoa học và tính thực tiễn của đề tài .....	2
Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU .....	4
1.1. Bệnh dịch tả lợn Châu Phi .....	4
1.2. Sự lây truyền và ảnh hưởng nguy hiểm của virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi .....	8
1.3. Vaccine phòng bệnh dịch tả lợn Châu Phi.....	11
1.4. Đặc điểm và vai trò của các protein p54 và p30.....	15
1.5. Hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp tạm thời ở thực vật.....	17
Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	21
2.1. Đối tượng, phạm vi và vật liệu nghiên cứu.....	21
2.1.1. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu .....	21
2.1.2. Vật liệu nghiên cứu .....	21
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	23
2.2.1. Phương pháp thu thập thông tin lựa chọn gen mã hóa protein ASFV, tối ưu mã biểu hiện .....	23
2.2.2. Thiết kế các cấu trúc vector biểu hiện mang gen p30, p54 và tạo chủng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mang vector tương ứng.....	23
2.2.3. Phương pháp biểu hiện tạm thời ở thực vật bằng Agro-infiltration .	27

2.2.4. Phương pháp tinh sạch và xác định đặc điểm cấu trúc của các kháng nguyên p30 và p54 ASFV tái tổ hợp từ thực vật .....	27
2.2.5. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. ....	28
2.2.6. Đánh giá hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu ASFV bằng phản ứng Elisa và Western blot. ....	28
2.2.7. Phương pháp xử lý thống kê .....	29
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	30
3.1. Thiết kế các dạng cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa hai kháng nguyên p30 và p54 ASFV của các chủng virus ASFV đang lưu hành ở Việt Nam dung hợp với các motif khác nhau và tạo chủng <i>Agrobacterium</i> mang vector tương ứng .....	30
3.1.1. Thu thập thông tin, tối ưu mã biểu hiện của gen mã hoá protein p30 và p54 của ASFV từ các chủng virus ASFV đang lưu hành ở Việt Nam và tổng hợp nhân tạo các trình tự gen trên .....	30
3.1.2. Thiết kế các dạng cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa các kháng nguyên p30 và p54 ASFV dung hợp với các motif khác nhau và tạo chủng <i>Agrobacterium</i> mang vector tương ứng .....	35
3.2. Biểu hiện tạm thời protein tái tổ hợp ASFV p30, p54 trên cây thuốc lá <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	45
3.2.1. Chuẩn bị cây thuốc lá <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	45
3.2.2. Đánh giá khả năng biểu hiện tạm thời của protein tái tổ hợp ASFV p30, p54 trên cây thuốc lá <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	46
3.3. Tinh sạch và xác định đặc điểm của các kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp ASFV tiềm năng. ....	50
3.3.1. Tinh sạch và xác định đặc điểm của các kháng nguyên p30 tái tổ hợp ASFV.....	50
3.3.2. Tinh sạch và xác định đặc điểm của các kháng nguyên p54 tái tổ hợp ASFV.....	53
3.4. Đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp ASFV tiềm năng trên chuột thí nghiệm. ....	56

3.4.1. ELISA gián tiếp và Western blot phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên p30pIItp/virus trong huyết thanh.....	56
3.4.2. ELISA gián tiếp và Western blot phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên p54pII-tp/virus trong huyết thanh.....	58
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	60
KẾT LUẬN.....	60
KIẾN NGHỊ .....	60
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	61

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

<b>Chữ viết tắt</b>	<b>Tên đầy đủ</b>
$\mu\text{l}$	Microlitter
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ASF	African swine fever
ASFV	African swine fever virus
bp	Base pair
CaMV35S	<i>Cauliflower mosaic virus</i> 35S promotor
Carbe	Carbenicillin
DAB	Diaminobenzidine
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribo nucleotide triphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
Hc-Pro	Helper component protease
His	Histidine
HRP	Horseradish peroxidase
IgG	Immunoglobulin G
Kana	Kanamycin
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KDEL	Endoplasmic reticulum retrieval signal



LB	Luria-Bertani medium
OD	Optical density
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pII	Trimerization motif GCN4pII
Rifa	Rifamycin
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size exclusion chromatography
tp	Tail piece
v/p	vòng/phút

## DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1: Bản đồ các quốc gia có dịch tả lợn châu Phi được báo cáo từ năm 2015 đến năm 2020 .....	5
Hình 1.2: Tình hình diễn biến của dịch ASF tại Việt Nam 6 tháng đầu năm 2019 .....	6
Hình 1.3: Dấu hiệu lâm sàng và tổn thương ở lợn nhiễm ASFV cấp tính.....	8
Hình 1.4: Cấu trúc hạt của ASFV và các protein liên quan đến sự xâm nhập của ASFV .....	9
Hình 3.1: Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa p30 trước và sau khi tối ưu mã	33
Hình 3.2: Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein kháng nguyên p30 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thuốc lá bằng phần mềm Bioedit .....	33
Hình 3.3: Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa p54 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thuốc lá bằng phần mềm Bioedit.....	34
Hình 3.4: Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein kháng nguyên p54 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thuốc lá bằng phần mềm Bioedit .....	35
Hình 3.5: Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc tế bào <i>E. Coli</i> được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc: pRTRA-p30-pII và pRTRA-p30-pII-tp .....	36
Hình 3.6: Kết quả kiểm tra các dòng đã chọn của cấu trúc pRTRA-p30-pII và pRTRA-p30-pII-tp .....	37
Hình 3.7: Sơ đồ vector tách dòng pRTRA mang gen mã hóa protein p30 dạng trimer và oligomer.....	37
Hình 3.8: Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid pRTRA-p30-pII và pRTRA-p30-pII-tp bằng <i>HindIII</i> .....	38
Hình 3.9: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc tế bào <i>E. Coli</i> được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc p30 trong pCB301 .....	39
Hình 3.10: Sơ đồ vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa protein p30 .....	39
Hình 3.11: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc các cấu trúc p30 trong AGL1 .....	40

Hình 3.12: Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc tế bào <i>E. Coli</i> được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc: pRTRA-p54-pII và pRTRA-p54-pII-tp và cắt enzyme giới hạn bằng <i>Bam</i> HI và <i>Psp</i> OMI (B).....	41
Hình 3.13: Sơ đồ vector tách dòng pRTRA mang gen mã hóa protein p54 dạng trimer và oligomer .....	42
Hình 3.14: Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid pRTRA-p54-pII và pRTRA-p54-pII-tp bằng <i>Hind</i> III.....	42
Hình 3.15: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc tế bào <i>E. Coli</i> được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc p54 trong pCB301 .....	43
Hình 3.16: Sơ đồ vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa protein p54 .....	44
Hình 3.17: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc các cấu trúc p54 trong AGL1 .....	44
Hình 3.18: Kết quả gieo và nhân nhanh cây thuốc lá <i>Nicotiana benthamiana</i> in vitro từ hạt .....	46
Hình 3.19: Cây thuốc lá trồng thủy canh 5 (A),6 (B),7 (C), tuần tuổi.....	46
Cây thuốc lá trong phòng sinh trưởng thủy canh (D). .....	46
Hình 3.20: Sơ đồ cassette biểu hiện mang gen mã hóa protein tái tổ hợp p30, p54 trong thực vật. ....	47
Hình 3.21: Sơ đồ lựa chọn vùng kháng nguyên p30 cho thiết kế và biểu hiện ở thực vật .....	48
Hình 3.22: Hình ảnh Western blot đánh giá sự biểu hiện kháng nguyên p30 trong lá thuốc lá.....	48
Hình 3.23: Sơ đồ lựa chọn vùng kháng nguyên p54 (amino acid 52-181) cho thiết kế và biểu hiện ở thực vật .....	48
Hình 3.24: Hình ảnh Western blot đánh giá sự biểu hiện kháng nguyên p54 trong 1-2 lá thuốc lá .....	49
Hình 3.25: A. Hình ảnh lá cây thuốc lá 5 ngày sau khi biến nạp kháng nguyên p54 bằng agroinfiltration. B. Hình ảnh Western blot đánh giá sự biểu hiện kháng nguyên p54. ....	49

Hình 3.26: Hình ảnh Western blot biểu hiện p54-pII trên số lượng lớn cây thuốc lá.....	50
Hình 3.27: Kết quả tinh sạch p30pIItp được đánh giá bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B).....	51
Hình 3.28: Bán định lượng nồng độ protein p30-pII-tp sau khi cô đặc.....	52
Hình 3.29: Đặc điểm cấu trúc của các protein p30-pII-tp tinh sạch bởi SEC. ...	53
Hình 3.30: Kết quả tinh sạch protein p54-pII-tp được đánh giá bằng SDS-PAGE và Western Blot. ....	54
Hình 3.31: Kết quả bán định lượng protein p54-pII-tp bằng Western blot .....	55
Hình 3.32: Đặc điểm cấu trúc của các protein p54pIItp tinh sạch bởi SEC. ....	55
Hình 3.33: 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 p30pII-tp sau 2 (A) và 3 (B) lần tiêm với kháng nguyên tinh sạch.....	56
Hình 3.34: Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên p30pII-tp bằng Western blot sau lần tiêm thứ 2 và thứ 3. Sử dụng kháng nguyên là virus bất hoạt (A), p30 tinh sạch (B).....	57
Hình 3.35: 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 p54pII-tp sau 2 (A) và 3 (B) lần tiêm với kháng nguyên tinh sạch.....	58
Hình 3.36: Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên p54-pII-tp bằng Western blot sau lần tiêm thứ 2 và thứ 3. Sử dụng kháng nguyên là virus bất hoạt (A) và p54 tinh sạch (B).....	59

**DANH MỤC BẢNG**

Bảng 2.1. Xử lý gen đích bằng enzyme cắt giới hạn <i>Bam</i> HI và <i>Psp</i> OMI.....	24
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng ghép nối gen vào vector pRTRA.....	24
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR khuẩn lạc khuếch đại gen đích.....	25
Bảng 2.4. Chương trình PCR khuếch đại gen đích từ khuẩn lạc.....	25
Bảng 2.5. Xử lý DNA hoặc vector bằng enzyme cắt giới hạn <i>Hind</i> III.....	25
Bảng 2.6. Chọn dòng dương tính đảo chiều bằng enzyme <i>Not</i> I.....	26

## MỞ ĐẦU

### 1. Lý do chọn đề tài

Dịch tả lợn Châu Phi do virus tả lợn châu Phi (African Swine Fever Virus) gây ra. Virus chủ yếu gây nhiễm vào đại thực bào của lợn và gây ra dịch bệnh nghiêm trọng với tốc độ lây lan nhanh, tỷ lệ chết lên đến 100%. Gần đây, từ 2016 đến 5/2019, bệnh đã xuất hiện và lan rộng tại trên 59 quốc gia trên thế giới. Cuối năm 2019, dịch bệnh lan rộng tại Việt Nam, hàng triệu con lợn bị tiêu hủy, gây thiệt hại kinh tế lớn cho ngành chăn nuôi và kim ngạch xuất khẩu của nước ta.

Do tính chất phức tạp của virus và bộ gen lớn, cho đến nay việc phát triển vaccine phòng bệnh dịch tả lợn Châu Phi vẫn là một thách thức. Hiện nay, chưa có vaccine thương mại chính thức được cấp phép phòng bệnh dịch tả lợn Châu Phi được bán trên thị trường. Tuy nhiên, gần đây có một vaccine nhược độc ASFV-G- $\Delta$ I177L được sản xuất trong tế bào động vật có vú có khả năng kích thích cơ thể sinh kháng thể đặc hiệu với virus mạnh và miễn dịch bảo hộ chống lại chủng ASFV Georgia nhưng phương pháp tạo chủng và sản xuất vaccine ASFV-G - $\Delta$ I177L này khá phức tạp và tốn kém. Bên cạnh đó, một số vaccine tiểu đơn vị đang được phát triển có khả năng bảo vệ động vật trước sự tiếp xúc với các chủng ASFV. Việc xác định các kháng nguyên ASFV và các epitope chịu trách nhiệm tạo ra các phản ứng miễn dịch liên quan là chìa khóa để phát triển các loại vaccine hiệu quả chống lại ASFV. Trong đó, p30 và p54 là những protein chiến lược để sản xuất các loại vaccine tiểu đơn vị. Hai protein này đóng vai trò là các protein cấu trúc kháng nguyên quan trọng trong sự xâm nhập của virus.

Hướng sản xuất vaccine tiểu đơn vị trên hệ thống biểu hiện trong thực vật đang được phát triển thương mại ở nhiều quốc gia và cũng đã và đang được thực hiện nghiên cứu hiệu quả tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam để phòng chống các bệnh cúm A/H7N9, cúm A/H5N1, bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV), bệnh lợn tai xanh (PRRS). Quá trình nghiên cứu và sản xuất vaccine tiểu đơn vị từ thực vật có rất nhiều ưu điểm như khả năng cải biến protein sau dịch mã, tính an toàn với môi trường cũng như con người, quy trình đơn giản, thời gian sản xuất rất nhanh chóng, giá thành thấp, dễ dàng tăng quy mô sản xuất. Tuy nhiên, việc

sản xuất vaccine tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật phòng dịch tả lợn Châu Phi hiện vẫn chưa có công bố nghiên cứu nào ở Việt Nam và cũng như thế giới. Xuất phát từ tầm quan trọng đó, đề tài: “Nghiên cứu biểu hiện và đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp của virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi (African Swine Fever virus) trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* Domin” được thực hiện nhằm nghiên cứu cơ sở khoa học và thực nghiệm của việc sản xuất các kháng nguyên tái tổ hợp có khả năng tạo ra kháng thể để trung hòa virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi.

## **2. Mục đích nghiên cứu**

Thiết kế, biểu hiện và tinh sạch được các kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp của ASFV trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*.

Đánh giá được khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên chuột của các kháng nguyên p30 và p54.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

Nội dung 1: Thiết kế các dạng cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa hai kháng nguyên p30 và p54 ASFV của các chủng virus ASFV đang lưu hành ở Việt Nam dung hợp với các motif khác nhau và tạo chủng *Agrobacterium* mang vector tương ứng.

Nội dung 2: Biểu hiện các protein p30 và p54 tái tổ hợp ASFV trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp biểu hiện tạm thời.

Nội dung 3: Tinh sạch và xác định đặc điểm của các kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp ASFV tiềm năng.

Nội dung 4: Đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp ASFV tiềm năng trên chuột thí nghiệm.

## **4. Ý nghĩa khoa học và tính thực tiễn của đề tài**

Dịch tả lợn Châu Phi xuất hiện và lây lan nhanh chóng gây ra thiệt hại nghiêm trọng đến nền kinh tế nông nghiệp của thế giới cũng như Việt Nam. Hiện nay, vẫn chưa có vaccine được sản xuất hay công bố chính thức để chủ động phòng bệnh dịch. Bên cạnh đó, hướng sản xuất vaccine tiểu đơn vị trên hệ thống biểu hiện ở thực vật đã và đang được thương mại hóa trên nhiều quốc gia trên thế giới như: Canada, Hàn Quốc, Nhật Bản,...Quá trình này

cũng được chứng minh là an toàn, hiệu quả và rất tiềm năng. Vì vậy, nội dung trong luận văn này là hướng nghiên cứu cần thiết tiến hành để có cơ sở tạo tiền đề cho những nghiên cứu sâu hơn giúp sẵn sàng đối phó khi có dịch bệnh xảy ra.



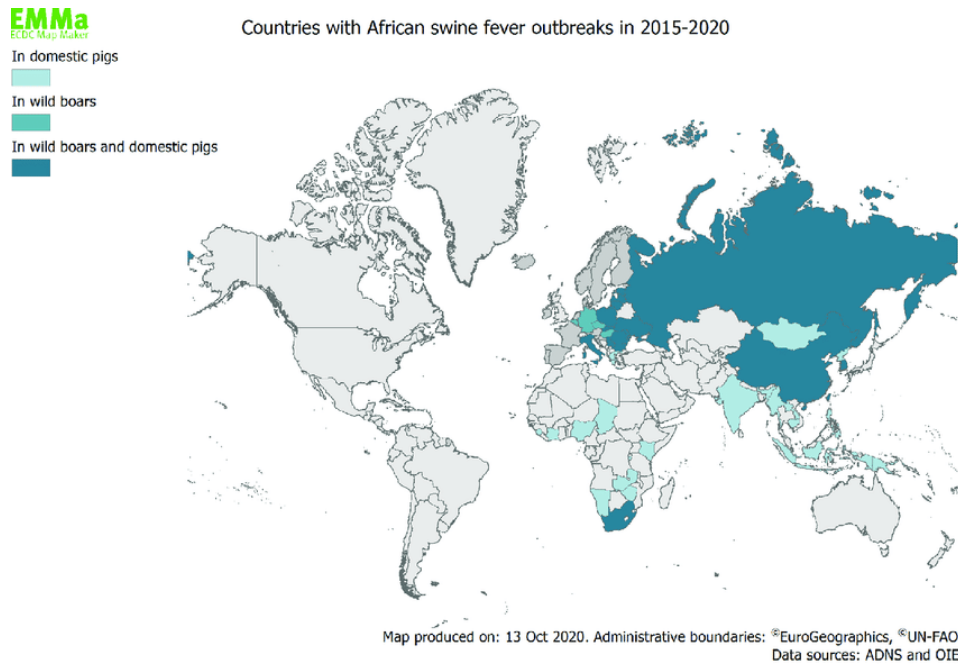
## **Chương 1: TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU**

### **1.1. Bệnh dịch tả lợn Châu Phi**

Lợn là một trong những nguồn cung cấp protein chủ yếu và chất lượng cao cho con người. Nhu cầu tiêu thụ thịt lợn trong tương lai ngày càng một tăng cao trên toàn cầu nên để đáp ứng được thì việc sản xuất cũng phải ngày một tăng lên. Tuy nhiên, nguồn cung thịt lợn đang bị đe dọa bởi các bệnh truyền nhiễm ngày càng nhiều, trong đó dịch tả lợn Châu Phi (African swine fever) hiện đang là mối lo ngại lớn nhất.

Bệnh dịch này được cho là xuất hiện từ năm 1907, sau đó được phát hiện và mô tả lần đầu tiên vào năm 1921 tại Kenya. Dịch lây lan nhanh trong các đất nước thuộc châu Phi cho đến năm 1957, lần đầu phát hiện ở Trung Âu và xuất hiện trở lại ở Georgia vào năm 2007 [1]. Kể từ lúc đó trở đi, bệnh dịch dần lây lan mạnh hơn qua một số nước ở châu Âu trong những năm 1980 và thời gian gần đây đã xuất hiện ở Nga, Nhật Bản, Trung Quốc. Mỗi ngày đều có rất nhiều báo cáo hay thống kê mới về sự gia tăng các ổ dịch tả lợn châu Phi trên khắp thế giới. Từ năm 2016 đến 5/2019, bệnh đã bùng phát tại trên 59 quốc gia trên thế giới (Hình 1.1). Bệnh dịch này hiện đang là mối quan tâm của nhiều nước và các tổ chức quốc tế và vẫn chưa có vaccine. Cao điểm vào tháng 8/2018 bệnh đã được phát hiện tại Trung Quốc, một trong những quốc gia có sản lượng thịt lợn nhất thế giới. Tính đến ngày 31/8/2018, Trung Quốc đã có 5 ổ dịch bùng phát tại 5 tỉnh với hơn 25000 heo buộc phải tiêu hủy. Dịch tả lợn châu Phi đang diễn ra làm tàn phá ngành nông nghiệp chăn nuôi lợn ở Trung Quốc, quốc gia hiện đang có số đầu lợn nhiều nhất thế giới. Theo thống kê, ngân hàng Rabobank của Hà Lan đã tính số đầu lợn của Trung Quốc năm 2019 đã giảm khoảng 200 triệu con, chiếm gần 1/3 số lợn ở quốc gia này và tương đương số lợn ở Mỹ và châu Âu gộp lại.

Từ tình hình thực tế và thiệt hại của dịch bệnh đã đặt các quốc gia khác vào tình trạng cảnh giác cao độ, trong đó bao gồm cả Thái Lan. Tháng 09/2019, Thái Lan đã tiêu hủy 200 con lợn do phát hiện một số cá thể lợn chết không rõ nguyên nhân mặc dù không có trường hợp nào về ASF được báo cáo.



Hình 1.1: Bản đồ các quốc gia có dịch tả lợn châu Phi được báo cáo từ năm 2015 đến năm 2020 (Nguồn dữ liệu: Theo tổ chức Thú y Thế giới- Office International des Epizooties và Animal Disease Notification system) [2].

Vào tháng 2/2019, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã đưa ra thông báo chính thức rằng bệnh dịch tả lợn châu Phi đã xuất hiện tại Việt Nam và bắt đầu công bố các ổ dịch xuất hiện đầu tiên ở hai tỉnh thuộc phía Bắc của Việt Nam. Chi tiết hơn đó là vào tháng 1 năm 2019, một đợt bùng phát dịch bệnh đã được báo cáo tại một trang trại chăn nuôi lợn của một hộ gia đình ở tỉnh Hưng Yên, Việt Nam. Trang trại được nằm cách Hà Nội gần 50 km và xa biên giới Trung Quốc khoảng 250 km, đàn gồm có 20 con lợn nái. Giai đoạn trước ổ dịch thì 1 heo con và 1 heo nái có biểu hiện nổi mẩn đỏ toàn thân, viêm kết mạc, tiêu chảy và xuất huyết. Heo hậu sinh sản có các triệu chứng như tím tái, bắt đầu chán ăn và sốt cao liên tục ( $>40,5^{\circ}\text{C}$ ). Sau đó, vào tháng 2 năm 2019, Lê Văn Phan và đồng nghiệp bắt đầu thu thập các mẫu nội tạng sau khi xác định tỷ lệ tử vong tại trang trại này đã vượt quá 50% [3]. Phối hợp với Học viện Nông nghiệp Việt Nam, virus đã được phát hiện với bộ gen được đăng kí đầy đủ trên Ngân hàng gen: p10 (mã số MK795932), p11.5 (MK795933), p12 (MK795934), p14.5 (MK795935), p17 (MK795936), p22 (MK795937), pE248R (MK795938), p30 (MK757460), p54 (MK554697), p72 (MK554698) và Cd2v (MK757459).

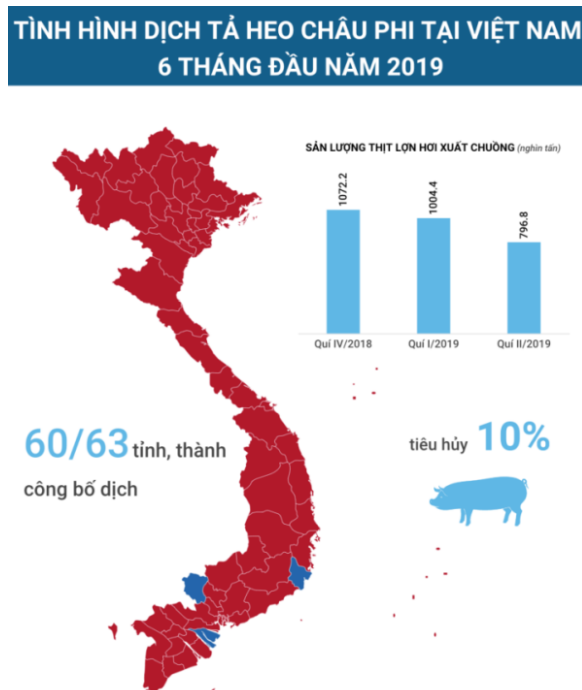
Theo thống kê của chi cục chăn nuôi và thú y thành phố Hồ Chí Minh,

trong tháng 2 năm 2019, bệnh dịch tả lợn Châu Phi đã được ghi nhận tại 202 hộ chăn nuôi, 64 thôn, 33 xã, 14 huyện của 7 thành phố, tỉnh (Hà Nội, Hải Dương, Hải Phòng, Thái Bình, Hưng Yên, Thanh Hóa, Hà Nam), tổng số con lợn có triệu chứng bệnh và tiêu hủy hơn 4200 con tương đương với tổng trọng lượng đã được tiêu hủy là 297 tấn.

Trước tình hình dịch bệnh diễn biến phức tạp, Cục Thú y đã thu thập được 388 mẫu bệnh phẩm của 98 hộ hay trang trại nuôi lợn quanh các hộ đã có lợn mắc bệnh để xét nghiệm. Kết quả là đã phát hiện phần lớn số lợn của các gia đình xung quanh đều âm tính, có một số hộ có lợn nhiễm bệnh đã được các cơ quan chuyên môn thú y đến để xử lý và tiêu hủy ngay lúc đó [3].

Cục Thú y đã thực hiện giải trình tự gen của virus ASF gây bệnh trên lợn tại Việt Nam, kết quả cho thấy gen của virus giống 100% chủng virus ASF gây bệnh trên lợn tại Trung Quốc.

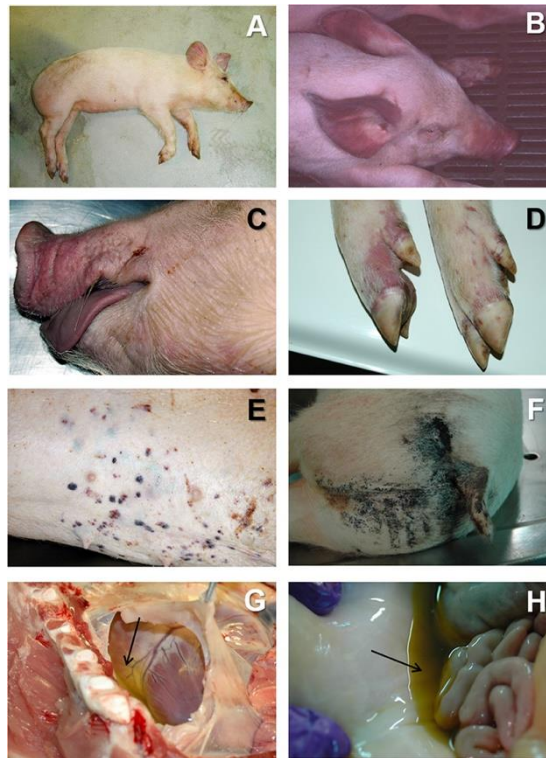
Từ đó, dịch tả lợn Châu Phi đã lây lan trên diện rộng, tính đến 9/2019 bệnh đã lan rộng khắp cả nước tại 63 tỉnh (Hình 1.2), thành phố, khiến các địa phương đã phải tiêu hủy trên 4,4 triệu con lợn.



Hình 1.2: Tình hình diễn biến của dịch ASF tại Việt Nam 6 tháng đầu năm 2019 (Nguồn: Theo thống kê của cục chăn nuôi và thú y Thành phố Hồ Chí Minh) [4].

Do đó, các chiến lược phòng chống ASF rất quan trọng trong thời gian gần đây để tránh thiệt hại kinh tế trên toàn thế giới. Các phép đo phòng ngừa và kiểm soát nên được khuyến nghị và phát triển thông qua sự hợp tác xuyên lục địa.

ASF được cho rằng không lây từ lợn sang người nhưng có khả năng gây bệnh và có các triệu chứng nặng sẽ làm chết rất nhiều lợn từ đó dẫn đến sự thiệt hại vô cùng lớn cho ngành chăn nuôi. Tùy thuộc vào độc lực mạnh hay yếu của virus gây bệnh mà lợn sẽ có những biểu hiện lâm sàng nặng hay nhẹ tương ứng. Virus có tính độc cao có thể gây ra triệu chứng bệnh ở tình trạng cấp tính và quá cấp tính gây nên tỷ lệ tử vong đến 100%. Virus có tính độc trung bình sẽ có các triệu chứng bệnh ở thể á cấp và cấp tính với tỷ lệ chết nằm trong khoảng 60%, trong khi bệnh thể ẩn và mãn tính thường được gây ra bởi virus có độc lực thấp nhất với tỷ lệ chết tương đối thấp từ 2 – 10%. Lợn mắc bệnh dịch ở thể cấp tính thường có những triệu chứng 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 (Hình 1.3A). Ở tai của cá thể lợn bắt đầu có những nốt xuất huyết màu đỏ (Hình 1.3B), đuôi, bụng, ben, mõm (Hình 1.3C) và chân (Hình 1.3D). Lợn có triệu chứng táo bón sau đó là tiêu chảy, phân đôi khi chứa dịch nhày và có lẫn máu (Hình 1.3F) [5, 6, 7]. Khi mổ lợn để phân tích tình hình bệnh tích có thể thấy hiện tượng chảy máu dưới da, sung và chảy máu ở hạch bạch huyết làm nó có màu như cục máu đông. Xoang bao tim tích nước vàng (Hình 1.3G), tràn dịch màng phổi, tích dịch ở xoang bụng. Lá phổi sẽ sung huyết hoặc xuất huyết thành tạo thành các đốm, có hiện tượng tích bọt ở khí phế quản [8, 9]. Trên da lợn xuất hiện tổn thương, có nhiều vết bầm hay xuất huyết (Hình 1.3E). Xuất huyết ở dạ dày và ruột tạo thành các đốm hoặc mảng sẫm màu (Hình 1.3H). Lợn mắc bệnh ở thể cấp tính thường chết sau 6 - 13 ngày phát bệnh hoặc kéo dài nhiều nhất được 20 ngày. Cá thể lợn nếu đang mang thai thì có thể dẫn đến sảy thai, tỉ lệ tử vong cao gần như 100% trong vòng 7 ngày kể từ khi bệnh khởi phát. Trường hợp lợn sau khi hết bệnh hoặc nếu bị nhiễm virus nhưng không có biểu hiện cũng như triệu chứng thì cơ thể sẽ có virus suốt vòng đời và là một nguồn lây nhiễm bệnh dịch.



Hình 1.3: Dấu hiệu lâm sàng và tổn thương ở lợn nhiễm ASFV cấp tính [10].

(A) Lợn bị hôn mê sau khi nhiễm ASFV. (B) Triệu chứng xanh tím ở lợn nhiễm ASFV cấp tính do sốt cao. (C) Tím tái ở mõm và môi. (D) Tím tái ở tứ chi. (E) Các ổ xuất huyết và máu bầm. (F) Vùng quanh hậu môn bị dính máu và phân khi lợn bị tiêu chảy. (G) Tràn dịch màng ngoài tim nghiêm trọng (mũi tên). (H) Xuất huyết ở dạ dày và ruột (mũi tên).

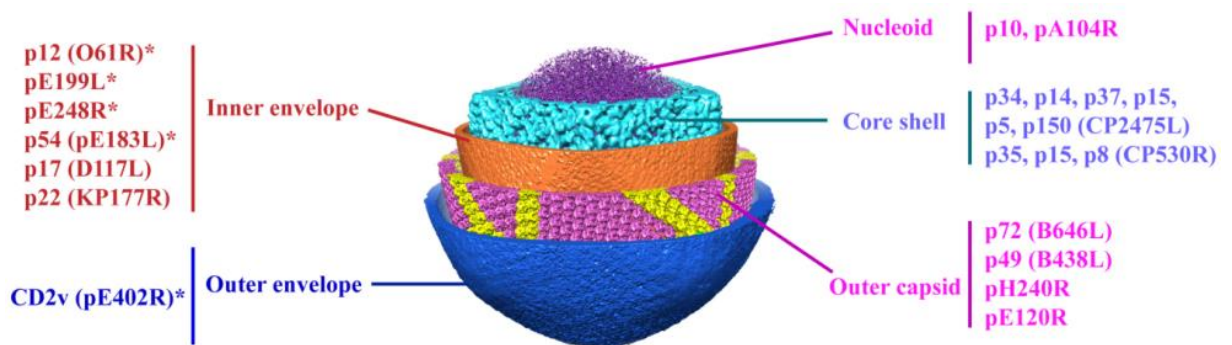
Hiện nay do chưa có vaccine phòng bệnh cũng như biện pháp điều trị nên các biện pháp ngăn chặn trước khi ổ dịch nổ ra có vai trò rất quan trọng, bao gồm: kiểm dịch nhập khẩu, kiểm soát vận chuyển lợn từ các vùng dịch hoặc các vùng có nguy cơ bùng nổ dịch. Đồng thời, việc nghiên cứu phát triển vaccine dự phòng cho bệnh dịch tả heo châu Phi là cấp thiết và cần được đẩy mạnh.

## **1.2. Sự lây truyền và ảnh hưởng nguy hiểm của virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi.**

Bệnh do virus tả lợn châu Phi (African swine fever virus) gây ra. Vector trung gian truyền virus từ lợn rừng sang lợn nhà là loài ve *Ornithodoros*. ASFV xâm nhiễm đại thực bào của lợn, gây các vụ dịch rất nặng cho lợn rừng và lợn nuôi với tốc độ lây truyền rất nhanh, tỷ lệ chết lên đến 100%. ASFV lây theo con đường tiêu hóa và hô hấp, do lợn được nuôi

trong chuồng trại đã có bệnh hoặc tiếp xúc với các phương tiện vận chuyển, nông cụ, đồ bảo hộ và thức ăn thừa bị nhiễm virus.

ASFV là virus duy nhất thuộc họ Asfarviridae, có genome là DNA sợi đôi với kích thước khoảng 170-190 Kb, mã hóa cho khoảng 160 protein. ASFV là loại virus có vỏ bọc với cấu trúc hình đa diện đều, kích thước đường kính trung bình là 200 nm, gồm một số phần chính sau: phần lõi trung tâm chứa bộ gene của virus được bao bọc bởi một lớp màng protein dày; phần vỏ lipid bao quanh phần lõi; 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 [10]. Lớp vỏ ngoài chứa các protein CD2v/EP402Rp, p12/O61Rp và p24; lớp capsid chứa protein như B438Lp, E120Rp và B646Lp (p72); lớp vỏ phía trong cấu thành từ nhiều loại protein, trong đó có E183Lp (p54), O61Rp, D117Lp và E248Rp; lớp vỏ lõi chứa p14, p34, p150, p37 được cắt từ p220 và p15, p35 cắt từ p62; ngoài bộ gene, lõi bên trong còn chứa 104Lp, K78Rp – và RNA polymerase để bắt đầu lây nhiễm virus (xem hình 1.4). Do tính chất phức tạp của virus cùng với bộ genome lớn, cho đến nay trên thế giới chưa có vaccine phòng chống dịch tả lợn Châu Phi.



Hình 1.4: Cấu trúc hạt của ASFV và các protein liên quan đến sự xâm nhập của ASFV (đánh dấu \*) [11].

Hiểu rõ được sự lẩn tránh của virus cũng như các cơ chế lây truyền, bộ máy tế bào cũng như cơ chế lây nhiễm, sao chép được coi là những yếu tố quan trọng đối với vaccine trong tương lai. Một số công trình công bố về cơ chế xâm nhập của ASFV chỉ ra rằng virus sử dụng đại âm bào và nhập bào tấn công đại thực bào của lợn. Sự tác động qua lại của CD2v với AP-1 (yếu tố chuyển đổi tế bào) được chứng minh có sự liên hệ đến sự di chuyển của virus, liên quan đến độc lực và khả năng virus thoát khỏi hệ miễn dịch.

Kollenberger và cộng sự đã tìm ra 14 yếu tố trong huyết thanh của lợn sống sót sau khi nhiễm bệnh nặng, gồm: protein B602Lp, C44Lp, CP312Rp, K145Rp, K205Rp, các protein cấu trúc CP204Lp (p30), E183Lp (p54), K78Rp, A104Rp, B646Lp và protein phi cấu trúc mã hóa cho các enzyme reductase (F778Rp, F34Lp), kinase (K169Rp) và DNA ligase (NP419Lp). Trong đó, p72 được sử dụng phổ biến để phân loại virus tả lợn châu Phi. Dựa trên p72, người ta đã xác định được 23 phân type virus (genotype) ở châu Phi và 2 phân typ virus ở châu Á và châu Âu (genotype I và II). Hiện nay, các dòng virus phân lập được ở Việt Nam đều thuộc genotype II [12].

Tiếp theo quá trình nhập bào, ngay sau khi lớp vỏ lõi được cởi bỏ nhờ sự điều chỉnh pH và dung hợp lớp màng virus, các enzyme cần thiết cho quá trình tái bản DNA của virus được giải phóng ra tế bào chất và thực hiện nhiệm vụ. Quá trình phiên mã hệ gene của ASFV được điều khiển rất chặt chẽ. Có tới 20% bộ gene của virus mã hóa cho các protein liên quan tới hoạt động phiên mã và điều chỉnh RNA của chính virus – một đặc trưng giúp ASFV nâng cao tính độc với vật chủ và bảo toàn khả năng tái bản hệ gene của nó. Sự tái bản DNA cũng như sự tập hợp các protein của virus được diễn ra tại các trung tâm nằm gần nhân hay còn được gọi là các “nhà máy tạo virus” (viral factory). Từ các trung tâm này, sự đóng gói các thành phần của virion được thực hiện và tạo virion trưởng thành. Cuối cùng, virion sẽ rời khỏi trung tâm này và được vận chuyển đến bề mặt tế bào, nơi chúng sẽ giải phóng khỏi tế bào nhờ hình thức nảy chồi (budding) [12, 13]. Cả virus nội bào và ngoại bào đều có khả năng lây nhiễm nhưng với đặc tính kháng nguyên khác nhau [14, 15]. Do vậy, cần chú ý đến khả năng sinh miễn dịch của vật chủ trong hai trường hợp này, đặc biệt khi nghiên cứu các vaccine phòng ASFV.

Những con lợn hồi phục sau khi mắc ASF lại có khả năng kháng lại một số chủng ASFV, chứng tỏ sự hình thành đáp ứng miễn dịch ở những vật chủ này [16, 17]. Tuy vậy, với sự phức tạp về cấu tạo của ASFV với rất nhiều protein được cho rằng tham gia vào quá trình ức chế miễn dịch, những hiểu biết cặn kẽ về cơ chế đáp ứng miễn dịch với ASFV còn chưa đầy đủ và đòi hỏi nhiều nghiên cứu cụ thể hơn nữa. Mặc dù kháng thể được tìm thấy trong các con lợn nhiễm ASFV nhưng mức độ trung hòa virus và khả năng bảo hộ chéo của các kháng thể này là rất đa dạng, đặc biệt khi lợn bị lây nhiễm với

các chủng ASFV có độc tính khác nhau. Lợn được truyền kháng thể thụ động có khả năng sống sót khi bị nhiễm các chủng có độc tính cao. Một nghiên cứu khác lại cho thấy huyết thanh từ lợn phục hồi sau khi nhiễm chủng E75 có khả năng trung hòa các chủng E75, E70, Lisbon60, Malawi 20/1 và một số chủng mới được nuôi cấy trên tế bào, tuy nhiên lại không có tác dụng đối với các chủng đã thích ứng trên tế bào sau nhiều lần cấy chuyển [18].

### **1.3. Vaccine phòng bệnh dịch tả lợn Châu Phi**

Mặc dù bệnh tả lợn châu Phi đã được khoa học biết đến từ năm 1921, cùng với sự phát triển của khoa học công nghệ những năm gần đây, các công trình nghiên cứu để tạo ra vaccine phòng dịch tả lợn Châu Phi vẫn gặp phải nhiều khó khăn do thông tin về đặc tính miễn dịch và cơ chế nhiễm bệnh đang thiếu hụt. Đến bây giờ, bản chất của các đáp ứng miễn dịch bảo vệ chưa được làm rõ cũng như các kháng nguyên có chức năng làm tường thành bảo vệ chưa được công bố chính xác, mặt khác cơ chế virus điều chỉnh đáp ứng của vật chủ khi nhiễm bệnh chưa sáng tỏ được cho là các yếu tố cản trở hiệu quả mà vaccine mang lại.

Vaccine được coi là một trong những biện pháp hiệu quả nhất để phòng chống virus. Vaccine phòng ASFV ra đời nhằm đối phó với những viễn cảnh xấu có thể xuất hiện và xảy ra trong tương lai. Hiện nay cũng có rất nhiều chiến lược phát triển vaccine chống ASFV do sự lây lan rộng rãi của virus này.

Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu phát triển vaccine phòng ngừa dịch tả lợn Châu Phi như vaccine tiểu đơn vị, vaccine vô hoạt, vaccine nhược độc. Trong khi vaccine vô hoạt ở ASF được chứng minh không mang lại hiệu quả bảo hộ, ít được quan tâm [19], vaccine tiểu đơn vị thì phức tạp do genome ASFV quá lớn, việc xác định được các kháng nguyên quan trọng còn cần thêm thời gian thì các nghiên cứu tập trung nhiều hơn vào tạo virus ASFV nhược độc bằng phương pháp truyền thống hay bằng tái tổ hợp sử dụng kỹ thuật di truyền nhằm xóa một số gen độc nhưng vẫn có tính gây miễn dịch cao được dùng làm vaccine phòng bệnh.

#### *Vaccine nhược độc*

Với các chủng virus nhược độc truyền thống thì ưu điểm của vaccine



này là có thể gây ra đáp ứng miễn dịch kéo dài. Thông thường virus nhược độc được tạo ra bằng cách cấy truyền rất nhiều đời trong môi trường tế bào. Trong nhiều nỗ lực nghiên cứu khác nhau, lợn tiêm vaccine được tạo ra từ chủng virus suy yếu tự nhiên OURT88/3 hoặc NH/P68 thuộc genotype I thì tạo ra miễn dịch chống lại các chủng virus thực địa khác cùng genotype [20, 21]. Ngoài ra, các cá thể lợn đó còn có thể được bảo hộ chéo với các chủng virus thực địa thuộc genotype khác. Tùy thuộc vào cá thể lợn và loại virus mà độ bảo hộ có thể thay đổi trong khoảng từ 66% đến 100%. Đường tiêm chủng và liều sử dụng đóng góp vai trò quan trọng làm tăng hay giảm độ bảo hộ [22, 23, 24, 25]. Trong nghiên cứu của Gallardo và cộng sự vào năm 2019, ông đã phân lập được một chủng virus nhược độc tự nhiên thuộc genotype II là lv17/WB/Rie1 từ đàn lợn rừng được nuôi tại ổ dịch tại Latvia năm 2017. Đây cũng chính là genotype đang gây bệnh ở châu Âu, Trung Quốc và Việt Nam hiện nay. Điều đặc biệt là trình tự gen EP402R thiếu một nucleotide gây đột biến dịch khung khiến gen này mất chức năng mã hóa cho protein CD2v chịu trách nhiệm gây ngưng kết hồng cầu đối với các tế bào bị nhiễm ASFV [26]. Chủng virus lv17/WB/Rie1 có triệu chứng và biểu hiện bệnh không đặc trưng cho các lợn thí nghiệm có bệnh tích được chẩn đoán là cận lâm sàng. Các cá thể lợn được lây nhiễm với lv17/WB/Rie1 được bảo vệ hoàn toàn trước virus cường độc ASF genotype 2.

Với công cụ trong công nghệ gen, để có thể giảm động lực và tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch cho lợn thì các nhà nghiên cứu đã thực hiện xóa hoặc gây đột biến gen nhỏ, từ đó các thể hệ ASF mới đã được tổng hợp. Các virus tái tổ hợp phi tái tổ hợp có chứa các gen đặc biệt bị xóa, ví dụ như gen thymidine kinase (TK) thì có thể tạo ra các virus không gây bệnh [27]. Ngoài ra, để tạo ra các chủng virus mới giảm động lực và gây đáp ứng miễn dịch có thể chống lại virus động lực ở nhiều mức độ khác nhau thì người ta đã loại bỏ các gen liên quan đến sự lẫn trốn đáp ứng miễn dịch như là gen DP71L, các họ đa gen 360 và 505 (MGF 360/505) hoặc một số gen có liên quan đến sự nhân lên của virus sự loại bỏ của các gen liên quan đến việc trốn tránh đáp ứng miễn dịch, gen DP71L và nhiều thành viên của các họ đa gen 360 và 505 (MGF 360/505), hoặc các gen liên quan đến sự nhân lên của virus 9GL (B119L). Tuy nhiên, việc loại bỏ gen có thể gây ảnh hưởng đến khả năng làm yếu virus hay khả năng bảo hộ. Điều đó còn phụ thuộc vào từng

chúng mà có những đặc điểm khác nhau, trong một số trường hợp thì khả năng virus bị loại bỏ gen sẽ có thể biểu hiện một kiểu hình độc lực mà ta không thể nào phân biệt với virus gốc.

Trong một trường hợp cụ thể, các nhà khoa học đã phát hiện ra rằng việc loại bỏ gen DP71L của chủng độc lực E70 châu Âu làm giảm độc lực hoàn toàn khi thử nghiệm trên động vật nhưng trái lại loại bỏ gen này không hề có tác dụng với hai chủng virus dịch tả lợn của Châu Phi. Ở một nghiên cứu khác, một số chủng virus tả lợn Châu Phi ở Malaysia và Georgia đều trở nên suy yếu khi thực hiện xóa gen thymidine kinase (TK), nhưng chỉ có chủng virus Maroc đột biến xóa gen TK lại có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo hộ ở động vật bị nhiễm bệnh [28, 29]. Một số công bố gần đây cho rằng, đột biến đa gen trong ASFV có thể ảnh hưởng đến gen gây miễn dịch của virus. Đối với việc loại bỏ một số thành phần trong 6 thành phần MGF360 và 505 kết hợp với gen 9GL đã tạo ra một chủng nhược độc Georgia ASFV làm cho sự an toàn được tăng đáng kể, nhưng lại không có sự bảo hộ cho lợn trước virus có độc lực cao. Ngược lại, với virus độc lực Georgia được chỉnh sửa bằng cách bỏ các yếu tố độc lực 9GL và DP96R/UK thì mang lại kết quả là cải thiện được sự an toàn và bảo hộ so với việc chỉ loại bỏ mỗi 9GL. Từ những nghiên cứu trên thì có thể chứng minh được rằng, việc cắt hay loại bỏ đi các yếu tố độc lực thì có thể tạo được vaccine tái tổ hợp sống với mức độ an toàn cao hơn. Từ đó mở ra nhiều hi vọng cũng như triển vọng cho tương lai.

Gần đây, Borca và đồng tác giả đã thành công trong việc chỉnh sửa gen của virus dịch tả lợn Châu phi (African swine fever viruses-ASFV) với hệ thống CRISPR/Cas9 sử dụng tế bào chủ là đại thực bào macrophage [30]. Vùng mã hóa gen 8-DR của ASFV được chỉnh sửa bằng việc chèn phân đoạn DNA có chứa gen chỉ thị RFP và gen chọn lọc blasticidin với hiệu suất tạo virus tổ hợp mới đạt khoảng 1%. Bên cạnh các nghiên cứu điển hình trên, hệ thống CRISPR/Cas9 đã và đang được tối ưu và ứng dụng thành công trong rất nhiều nghiên cứu khác nhằm chỉnh sửa gen virus và phát triển virus vaccine [31]. Vào tháng 12 năm 2019, sau nhiều năm phát triển, nhóm nghiên cứu của Bộ Nông Nghiệp Hoa Kỳ (United States Department of Agriculture) thông báo đã tìm ra một loại vaccine có thể tạo ra khả năng miễn dịch hoàn toàn

chống lại ASFV. Vaccine USDA dựa trên một chủng phân lập thực địa được lấy từ đất nước Georgia. Trong virus đó, gen I177L đã bị loại bỏ, do đó tên chính thức của ứng cử viên vaccine là “ASFV-G-ΔI177L”. Vào thời điểm đó, vaccine đã được thử nghiệm trong điều kiện thí nghiệm có kiểm soát [32].

### *Vaccine tái tổ hợp*

Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu phát triển vaccine phòng ngừa dịch tả lợn Châu Phi như vaccine tiểu đơn vị, vaccine vô hoạt, vaccine nhược độc. Trong khi vaccine vô hoạt ở ASFV được chứng minh không mang lại hiệu quả bảo hộ, ít được quan tâm [18]. Xu hướng nghiên cứu và phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng dịch ASF bằng cách biểu hiện tái tổ hợp một số kháng nguyên ASFV đã và đang được nghiên cứu. Việc nhận diện các kháng nguyên và epitope của ASFV chịu trách nhiệm cho việc kích thích đáp ứng miễn dịch tốt được xem là chìa khoá của việc phát triển vaccine tiểu đơn vị hiệu quả phòng chống ASFV. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu được tiến hành để phát triển vaccine tiểu đơn vị, tuy nhiên do trong hệ gen ASFV có đến 167 ORF gây khó khăn cho việc lựa chọn một hay một số kháng nguyên đặc hiệu tiềm năng.

Cho đến nay, đã có công bố chỉ ra rằng việc xâm nhiễm của ASFV vào bên trong tế bào bị ức chế *in vitro* bằng các kháng thể kháng protein p30, trong khi đó các kháng thể kháng p12 [33], p72 hoặc p54 ức chế sự gắn của virus vào đại thực bào, điều này chỉ ra vai trò của các protein trong những bước đầu tiên của việc xâm nhiễm virus. Tuy nhiên, lợn được tiêm với protein p30 hoặc p54 đều không được bảo vệ chống lại virus ASF mặc dù có sản sinh được kháng thể trung hoà. Khi tiêm kết hợp p30 và p54 (hoặc trong một cấu trúc khảm) đã cho khả năng bảo hộ trên lợn mặc dù còn thấp [34]. Trong những nỗ lực nghiên cứu khác, khi tiêm với baculovirus-biểu hiện EP402R/CD2v, lợn được bảo vệ chống lại sự công cường độc với đồng chủng [35]. Những kết quả này chỉ ra rằng các protein kháng nguyên đã kích thích sinh đáp ứng tạo kháng thể không trung hoà hoàn toàn ASFV [36]. Sự hoạt hoá đáp ứng miễn dịch tế bào T trong suốt quá trình lây nhiễm ASFV cũng đã được kiểm tra, và p32 được xem là mục tiêu quan trọng của các tế bào bạch cầu T độc [37]. Oura và cộng sự đã cho rằng khả năng bảo hộ ở lợn kém chủ yếu do các tế bào T bị giảm, điều này đã khẳng định vai trò quan trọng của

các tế bào T trong việc bảo vệ cơ thể chống lại ASFV [21].

Argilaguet và cộng sự (2012) đã nghiên cứu tạo vaccine DNA tái tổ hợp bằng nhân dòng gen mã hoá protein p30 và p54 của ASFV trong cùng một khung đọc mở với đoạn gen mã hoá cho vùng biến đổi immunoglobulin nhận diện SLA-II, với mục tiêu định hướng trình diện kháng nguyên virus [38]. Mặc dù các tế bào T đặc hiệu chống lại các protein của ASFV đã được xác định nhưng không có sự sản sinh kháng thể trung hoà cũng như sự bảo vệ chống lại công cường độc được ghi nhận. Tương tự như vậy, lợn được tiêm chủng với DNA mã hoá domain ngoại bào của ASFV-CD2v dung hợp với protein p30 và p54 đã tăng cường đáp ứng miễn dịch tế bào và miễn dịch dịch thể, tuy vậy không bảo vệ được lợn chống lại ASFV. Điều đáng chú ý, khi ubiquitin được biểu hiện cùng khung đọc với các gen mã hoá virus, sự bảo vệ một phần (33%) chống lại ASFV lại được thu nhận, tương ứng với đáp ứng tốt của tế bào T- CD8+, khi vắng mặt kháng thể đặc hiệu [35, 36]. Điều quan trọng là, sự bảo vệ có tương quan với sự hiện diện của vaccine kích thích đáp ứng tế bào T-CD8+ trong các con lợn còn sống sót; các vaccine đã là mục tiêu chính chống lại 2 peptide đặc hiệu định vị trên kháng nguyên CD2v [39].

Như vậy, đáp ứng tế bào T-CD8+ là rất quan trọng trong việc bảo vệ lợn chống lại ASFV. Các nghiên cứu đã xác định được một số protein mục tiêu của virus trung hoà là p72/B646Lp, p54/E183Lp và p30/CP204Lp. Các kháng thể chống lại p72/B646Lp và p54/E183Lp có tác dụng ngăn chặn virus gắn được với các tế bào, mặt khác các kháng thể chống lại p30/CP204Lp ức chế quá trình xâm nhập của virus. Ngoài ra, các protein virion khác nằm trên bề mặt của các hạt virus trưởng thành nội bào hoặc ngoại bào cũng có thể được xem là mục tiêu để trung hoà bằng cách ngăn chặn sự xâm nhập hoặc lây lan của virus bao gồm các loại protein CD2v/EP402R, protein p12/O61Rp, p17/D117L.

#### **1.4. Đặc điểm và vai trò của các protein p54 và p30**

Protein p54 là protein cấu trúc có chức năng tham gia vào quá trình xâm nhập của virus. p54 được mã hóa bởi gen E183L, được biết đến là một protein kháng nguyên của virus dịch tả lợn châu Phi rất quan trọng với khối lượng phân tử tương đối là 25 kDa. Protein chứa miền xuyên màng và motif Gly-Gly-X, cũng như một trình tự nhận dạng để xử lý một số protein cấu trúc

ASFV. Phân tích phần nội phía trên và kết tủa của các hạt virus chứa p54 cho thấy protein này nằm ở màng ngoài lipid của virion [40]. Để theo dõi đường đi của ASFV trong các tế bào bị xâm nhiễm trong thời gian thực, các nhà nghiên cứu tạo ra một ASFV tái tổ hợp lây nhiễm để xác định quỹ đạo và tốc độ của virut nội bào chuyển động và qua đó hình dung quá trình ASFV được hình thành [41]. Protein p54 tương tác với phức hợp vi ống thông qua liên kết trực tiếp với chuỗi nhẹ 8 (LC8) của dynein thông qua một motif đóng đến đầu cuối C của protein.

Protein p54 là đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của virus và sinh đủ miễn dịch tạo kháng thể ở lợn được tiêm chủng virus giảm độc lực [42]. Do đó, p54 tái tổ hợp biểu hiện trong hệ thống baculovirus và *E. coli* đã được sử dụng trong chẩn đoán huyết thanh học [43].

Giống như p54, p30 là một trong những protein đầu tiên tham gia vào quá trình xâm nhập của virus. Tuy có cấu tạo khác nhau nhưng trong quá trình xâm nhập của virus chúng lại là những protein cấu trúc có vai trò tương tự nhau. Protein được mã hóa bởi gen CP204L, có khối lượng phân tử tương đối là 30 kDa [44]. Sự xuất hiện của protein được quan sát được từ khoảng 2 đến 4 giờ sau khi lây nhiễm, và duy trì trong suốt chu kỳ lây nhiễm. Vì thế, sự hiện diện của p30 cho thấy rằng virus đã xâm nhập, không bị bao bọc và biểu hiện gen sớm của virus có thể hình thành. Hệ thống lai đôi ở nấm men được sử dụng để sàng lọc thư viện cDNA đại thực bào của lợn cho protein tế bào có thể tương tác với p30 và ribonucleoprotein K hạt nhân không đồng nhất (hnRNP-K) được xác định là phối tử tế bào đầu tiên của p30 [45].

Tương tự như p54, p30 là các protein kháng nguyên. Oviedo và cộng sự đã thực hiện nghiên cứu để nhận thấy rằng p30 tái tổ hợp hiệu quả hơn p54 cho phát hiện kháng thể bằng ELISA [46]. Vì vậy, p30 nên được sử dụng là kháng nguyên ELISA và p54 nên được coi là kháng nguyên được chỉ định để phát hiện kháng thể ASFV bằng Western Blot. Tuy nhiên, việc sử dụng kết hợp p54 và protein p30 để chẩn đoán huyết thanh học ASFV có thể cải thiện độ nhạy của phương pháp. Cubillos và cộng sự đã đánh giá khả năng phản ứng của p30 tái tổ hợp, p54 và p72 protein đồng thời trong một phản ứng chuẩn đoán huyết thanh học. Kết quả cho thấy p30 là kháng nguyên chẩn đoán tốt nhất [47]. Sau đó, Giménez và cộng sự đã thực hiện ELISA gián tiếp

với p30 tái tổ hợp để phát hiện linh hoạt các kháng thể ASFV trong bệnh phẩm huyết thanh và dịch ở vùng miệng [48]. Việc dung hợp 2 gen p30 và p54 trong một khung đọc mở và đưa vào plasmid để biểu hiện cho thấy protein dung hợp sinh đáp ứng tạo kháng thể tốt ở chuột [49]. Argilaguet và cộng sự phát hiện ra rằng khả năng tạo miễn dịch DNA ở lợn có thể được cải thiện theo cấp số nhân bằng cách thêm miễn ngoại bào của haemagglutinin ASFV (sHA) vào p54 và p30, đồng thời pCMV-sHAPQ có thể tạo ra các phản ứng tế bào và dịch thể mạnh mẽ [50]. Như vậy, protein p54 và p30 đóng vai trò là các protein cấu trúc kháng nguyên quan trọng trong sự xâm nhập của virus.

### **1.5. Hệ thống biểu hiện protein tái tổ hợp tạm thời ở thực vật**

Protein tái tổ hợp được sử dụng cho cả việc điều trị và phòng ngừa bệnh tật ở cả người và động vật. Insulin người là protein tái tổ hợp điều trị bệnh đầu tiên được nghiên cứu, nó được sản xuất ở *E.coli* vào năm 1978 bởi Tiến sĩ David Goeddel và các đồng nghiệp của ông [51] và được FDA chấp thuận vào năm 1982, sau đó được bán dưới tên 'Humulin'. Kể từ đó, hơn 170 loại thuốc protein tái tổ hợp đã được tung ra thị trường và hàng trăm loại thuốc hiện đang được phát triển để điều trị các bệnh, chẳng hạn như viêm khớp và ung thư. Hầu hết các dược phẩm sinh học tái tổ hợp đã được phê duyệt đều được tạo ra trong các dòng tế bào của động vật có vú [52]. Hiện nay, các protein tái tổ hợp được sản xuất trong vi khuẩn, nấm men, tế bào động vật có vú, côn trùng và có cả hệ thống thực vật. Những năm trở lại đây, việc chăm sóc và bảo vệ sức khỏe con người ngày càng được quan tâm thì việc ứng dụng các công nghệ có liên quan đến sinh học thực vật càng ngày càng được chú trọng và đầu tư. Các hệ thống biểu hiện thực vật có một số lợi thế và tiềm năng hơn so với các hệ thống biểu hiện thông thường khác. Bên cạnh đó, độ tin cậy cao của các hệ thống sản xuất protein tái tổ hợp đã được chứng minh [53, 54, 55]. Ví dụ đầu tiên được ghi nhận đó là về chế tạo dược phẩm sinh học từ thực vật là việc sản xuất hoocmon tăng trưởng dành cho con người thông qua mô sẹo của cây thuốc lá và hoa hướng dương chuyển gen vào năm 1986 [56]. Hệ thống sản xuất dược phẩm sinh học bằng hệ thống biểu hiện ở thực vật có chi phí đầu tư thấp hơn so với hệ thống trên động vật có vú [57].

Trong số một số hệ thống biểu hiện thực vật, *Nicotiana benthamiana* là loài thực vật cốt lõi hiện nay được nhiều công ty sử dụng, bao gồm Medicago Inc, Kentucky BioProcessing, Icon Genetics, iBio và UniBio. *Nicotiana benthamiana* mọc tự nhiên ở sa mạc Australia, loài thực vật này đã áp dụng một chiến lược sống là hy sinh khả năng phòng vệ trước mầm bệnh để có một chu kỳ sinh sản nhanh chóng. Do đó, loại cây này thể hiện tính miễn cảm đáng kể đối với mầm bệnh và nó là vật thích hợp cho biểu hiện tạm thời [58]. Đối với quy trình biểu hiện tạm thời này thì *Nicotiana benthamiana* thường được trồng trong 4–7 tuần và sau đó lây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens* chứa các gen quan tâm. Sản phẩm của phương pháp biểu hiện tạm thời này thường đạt mức cao nhất sau 3–7 ngày sau khi nhiễm khuẩn.

Gần đây, Phan và cộng sự đã chứng minh được rằng dịch chiết thô của lá *Nicotiana benthamiana* biểu hiện tạm thời hemagglutinin (H5) của virus cúm đã ngăn chặn sự lây lan của cúm gia cầm (H5N1) khi tiêm vào gà [59]. Hơn nữa, các thí nghiệm thử nghiệm đang được tiến hành ở giai đoạn 3 cho thấy rằng vaccine giả virus cúm được sản xuất từ *Nicotiana benthamiana* bởi Medicago Inc đã chứng minh tính hiệu quả, an toàn và khả năng sinh miễn dịch ở người [60, 61]. Đây là bước tiến quan trọng trong việc sản xuất vaccine tái tổ hợp có nguồn gốc thực vật. Khi các loại vaccine thế hệ tiếp theo này được tung ra thị trường thì công nghệ mới này hứa hẹn khả năng bảo hộ cũng như bảo vệ khỏi dịch bệnh một cách toàn diện hơn.

Khi ứng dụng thực vật trong công nghệ sản xuất các loại protein chức năng hay vaccine thì được định nghĩa thành thuật ngữ “molecular pharming in plants” [62]. Việc sản xuất các protein chức năng ở hệ thống biểu hiện ở thực vật nó có nhiều ưu điểm hơn các hệ thống khác như sau: (1) Một loại protein tái tổ hợp ngẫu nhiên nào đó có thể được sản xuất lượng lớn theo quy mô và phương thức nông nghiệp với chi phí thấp [63]. (2) Thực vật là thể bào nhân thực vì vậy chúng ta có thể dễ dàng định vị được vị trí protein tái tổ hợp trong tế. (3) Ở lá cây trưởng thành thì protein tái tổ hợp được sản xuất có thể đạt được mức tối đa [64]. (4) Các protein chức năng có nguồn gốc từ thực vật sẽ hạn chế được tối đa các chất tạp nhiễm không cần thiết của virus và vi khuẩn.

Hiện nay, hai phương pháp thông dụng nhất để biểu hiện và sản xuất

protein tái tổ hợp ở thực vật đó chính là: biểu hiện tạm thời và tạo cây chuyển gen [65]. Người ta sử dụng virus thực vật làm vector và agroinfiltration là hai phương pháp được sử dụng biểu hiện tạm thời. Thuốc lá *Nicotiana benthamiana* được sử dụng như một nhà máy mô hình để sản xuất nhiều loại sản phẩm điển hình như vaccine, kháng thể, enzyme. Mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp trong *Nicotiana benthamiana* còn cao gấp nhiều lần các *Nicotiana* khác loài và có xu hướng chuyển hóa tương đối thấp các chất chuyển hóa thứ cấp. Do đó khi tinh sạch protein ít gặp phải các vấn đề hơn và lượng protein tái tổ hợp có thể chiết xuất được với nồng độ tinh sạch cao từ đó cũng làm hoạt tính sinh học được nâng cao hơn.

Đối lập với phương thức biểu hiện tạm thời ở thực vật, phương thức chuyển gen được hiểu chính là gắn gen đích mong muốn vào hệ gen của tế bào thực vật. Chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium* là một kỹ thuật phổ biến được sử dụng để chuyển gen vào cây hai lá mầm như thuốc lá, cây đậu tương. Phương pháp Agroinfiltration đã và đang được ứng dụng và biểu hiện thành công rất nhiều protein tái tổ hợp trên nhiều loài thực vật tiềm năng khác nhau. Hai loài *Nicotiana benthamiana* và *Nicotiana tabacum* là hai loài phổ biến nhất để áp dụng phương pháp này. Để nâng cao hiệu suất và mức độ biểu hiện được đạt tối đa thì các cấu trúc cần biểu hiện được điều khiển bởi một promoter như Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S. Có rất nhiều đề tài nghiên cứu đã biểu hiện và sản xuất được kháng nguyên của các virus cúm gia cầm H5N1 với hàm lượng cao như 200 mg HA/kg lá tươi, 675 mg HA/kg,...

Bên cạnh đó, Viện Công nghệ Sinh học đã thành công trong việc nghiên cứu biểu hiện và sản xuất kháng nguyên tái tổ hợp từ cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* thông qua phương pháp agroinfiltration để phòng dịch cúm A/H5N1, cúm A/H7N9, bệnh lợn tai xanh PRRSV, dịch tiêu chảy cấp ở lợn PEDV... Kết quả đã cho thấy rằng các protein tái tổ hợp như hemagglutinin (HA) của virus A/H5N1, A/H7N9, protein GP5-M của virus PRRSV được tạo ra từ cây thuốc lá thủy canh *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp agroinfiltration có khả năng kích thích miễn dịch trên động vật thí nghiệm một cách mạnh mẽ và sản sinh kháng thể trung hòa virus gây bệnh. Đặc biệt, protein tái tổ hợp HA A/H5N1 dạng oligomer khả năng bảo



hộ trên gà lên đến trên 90% [66] mở ra tiềm năng trong việc ứng dụng để sản xuất vaccine cúm A/H5N1 từ protein tái tổ hợp trên gia cầm. Quá trình biểu hiện và sản xuất vaccine tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật có rất nhiều ưu điểm bởi tính an toàn với môi trường cũng như con người, thời gian sản xuất rất nhanh chóng chỉ sau 4 đến 6 tuần có thể sản xuất một lượng lớn để đáp ứng kịp thời khi có nguy cơ bùng dịch và giá thành sản phẩm cũng sẽ thấp hơn các công nghệ vaccine khác. Hướng sản xuất vaccine từ thực vật này đã được rất nhiều quốc gia thương mại hóa như Canada, Nhật Bản, Hoa Kỳ, Hàn Quốc,...

## **Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **2.1. Đối tượng, phạm vi và vật liệu nghiên cứu**

#### **2.1.1. Đối tượng, phạm vi nghiên cứu**

Đối tượng:

Trình tự gen mã hóa cho kháng nguyên p30 và p54 của các chủng virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi đang lưu hành ở Việt Nam.

Phạm vi:

Nghiên cứu sự biểu hiện của các protein p54, p30 trong cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* nuôi cấy *in vivo* ở quy mô phòng thí nghiệm.

Nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của protein p54, p30 trên động vật thí nghiệm (chuột).

#### **2.1.2. Vật liệu nghiên cứu**

##### **2.1.2.1. Nguồn nguyên liệu thực vật**

Cây thuốc lá thủy canh *Nicotiana 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.

##### **2.1.2.2. Chủng vi sinh vật, plasmid, trình tự gen**

Chủng *E. coli* 10G được sử dụng như tế bào chủ cho bước nhân dòng gen.

Chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 [67] được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen vào cây thuốc lá để biểu hiện tạm thời gen trên. *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 mang vector yếu tố phiên mã FUS3 (HcPro) được cung cấp bởi phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học được sử dụng để đồng biểu hiện tạm thời với vector đích chứa trong vi khuẩn *Agrobacterium* cho sự biểu hiện của protein tái tổ hợp dưới sự kiểm soát của promoter CaMV 35S.

Các vector và trình tự gen

Các vector tách dòng: Vector pRTRA\_35S\_H5pII\_his\_cmyc\_KDEL và vector pRTRA\_35S\_H5pII\_100xELP\_his\_cmyc\_KDEL [68]. Vector chuyển gen pCB301-35S-H5pII-His\_cmyc\_KDEL được cung cấp bởi phòng Công

nghe ADN ứng dụng.

### **2.1.2.3. Các cặp môi sử dụng**

p30-*Bam*HI-F:

agGGATCCGATTTTATTCTTAATATTTCTATGAAGATGG

p30-*Psp*OMI-R: gcgggcccAGGCCTCTGTGGAGTAG

Ecto-P54-*Bam*HI-F: agGGATCCTCTTCTAGGAAGAAGAAGGC

Ecto-p54-*Psp*OMI-R: gcgggcccTGGCCTCTGTGGAGTAGAGT

35S-F: CACTGACGTAAGGGATGACG

35S-R: ATCTGGGAACTACTCACACA

### **2.1.2.4. Nguồn nguyên liệu động vật**

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

### **2.1.2.5. Hóa chất**

Kit tinh sạch DNA (intron Gel purification kit) và tách chiết plasmid (intron), Ni-NTA agarose (Invitrogen).

Ni-NTA agarose, Nitor lỏng, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, Tween20, Triton X100, Imidazole, KCl, β-mercaptoethanol, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glycerol, KCl, Sodium Dodecyl Sulfate, Tris-HCl, DAB Substrate Kit, nước khử ion và các hóa chất khác của các hãng Invitrogen, Thermo,... Vaccine nhược độc ASFV được cung cấp bởi NAVETCO, tá dược Emulsigen-D.

### **2.1.2.6. Thiết bị**

Máy ly tâm Eppendorf 5415C (Eppendorf, Đức), máy li tâm Avanti TM30 (Backman, Hoa Kỳ), cột sắc ký, máy điện di Powerpac300(Bio-Rad, Mỹ), máy Vortex (Mimishaker, IKA, Đức), máy ly tâm, máy chuyên màng, máy siêu âm, máy đo OD Multiskan Sky ( Thermo scientific) cùng với các trang thiết bị khác của Phòng ADN ứng dụng, Phòng Công nghệ Tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Phương pháp thu thập thông tin lựa chọn gen mã hóa protein ASFV, tối ưu mã biểu hiện

Thông tin về trình tự gen mã hóa cho các kháng nguyên p30 và p54 của ASFV đã xuất hiện ở Việt Nam được thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database/nph-select.cgi?go=database>). Các trình tự này được phân tích và so sánh sử dụng phần mềm Bio Edit và MegAlign/Lasergene 7.0. Các trình tự gen mã hóa sau khi được lựa chọn, 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, sau đó được tối ưu mã thích hợp cho sự biểu hiện protein ở cây thuốc *Nicotiana benthamiana* sử dụng phần mềm được cung cấp bởi công ty Genewiz (Mỹ). Phần mềm sẽ lựa chọn các bộ mã ưu tiên tương thích để cải biến trình tự gen mã hóa protein p30, p54 của chủng virus ASFV sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện ở thực vật mà không làm thay đổi trình tự axit amin. Sau đổi mã, các trình tự nucleotide này sẽ được so sánh với các trình tự nucleotide gốc, đồng thời dịch mã thành axit amin để so sánh với trình tự axit amin với các trình tự gốc. Các trình tự sau khi tối ưu mã được tổng hợp nhân tạo trong vector pUC57 tại công ty Genewiz (Mỹ).

### 2.2.2. Thiết kế các cấu trúc vector biểu hiện mang gen p30, p54 và tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* mang vector tương ứng

Đoạn gen mã hóa các kháng nguyên p30 và 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 mã hóa protein HA 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. Các đoạn gen đích sau khi xử lý bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI (22°C, 1 giờ), tinh sạch sẽ được nối vào vector tách dòng. Với sự hỗ trợ của enzyme T4-DNA ligase, các cầu nối phosphodiester sẽ được hình thành giữa hai nucleotide sát cạnh nhau (gốc phosphate đầu 5' của nucleotide đoạn DNA này với gốc hydroxyt đầu 3' của nucleotide đoạn DNA kia). Thành phần phản ứng thực hiện như trong bảng 2.1 và 2.2 dưới đây.

Bảng 2.1. Xử lý gen đích bằng enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	Nước deion, khử trùng	18
2	Buffer Smart cut (NEB)	5
3	DNA (150 ng/ $\mu$ l)	25
4	Enzyme <i>Bam</i> HI (10 u/ $\mu$ l)	1
5	Enzyme <i>Psp</i> OMI (10 u/ $\mu$ l)	1
Tổng		50 $\mu$ l

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng ghép nối gen vào vector pRTRA

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu$ l)
1	Nước deion, khử trùng	1,5
2	Buffer 10X T4 DNA ligase	1,5
3	DNA (100 ng/ $\mu$ l)	8
4	Vector pRTRA (50 ng/ $\mu$ l)	3
5	Enzyme T4 DNA ligase (10 u/ $\mu$ l)	1
Tổng		15 $\mu$ l

Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 22°C trong 2h, sau đó biến nạp vào chủng *E. coli* khả biến 10G bằng phương pháp sốc nhiệt [69]. Các bước thực hiện như sau: Bổ sung 15  $\mu$ l vector đã được gắn gen đích vào ống đựng tế bào khả biến và trộn nhẹ. Hỗn hợp được đặt trong đá 5 phút, rồi ủ ở 42°C trong 1 phút 30 giây và sau đó đặt vào đá 5 phút. Bổ sung 500  $\mu$ l môi trường LB lỏng, hỗn hợp được nuôi ở tủ 37°C, lắc 200 v/p trong 30 phút. Sử dụng que cấy trải, trải 100  $\mu$ l dịch khuẩn lên đĩa peptri có chứa môi trường LB đặc đã bổ sung kháng sinh chọn lọc Carbe 50 mg/l. Ủ đĩa ở 37°C trong 16 giờ. Chọn khuẩn lạc trắng được cho là có mang gen ngoại lai được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của gen đích bằng phương pháp colony PCR khuẩn lạc với cặp mồi 35S-F/R (bảng 2.3 và bảng 2.4). Sản phẩm colony PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% để chọn ra các khuẩn lạc mang gen có kích thước như mong muốn.

Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR khuẩn lạc khuếch đại gen đích

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )
1	Dream taq 2X Master mix	7,5
2	Primer 35S-F (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5
3	Primer35S-R (10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5
4	DNA (khuẩn lạc) + Nước deion	6,5
Tổng		15 $\mu\text{l}$

Bảng 2.4. Chương trình PCR khuếch đại gen đích từ khuẩn lạc

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Thời gian	Chu kì
1	Biến tính	94	3 phút	1
2	Biến tính	94	30 giây	25x
3	Gắn mồi	55	30 giây	
4	Kéo dài chuỗi	72	1 phút 30 giây	
5	Hoàn tất kéo dài	72	10 phút	1
6	Kết thúc phản ứng	15	$\infty$	

Sau khi kiểm tra bằng PCR khuẩn lạc, các dòng khuẩn lạc mang gen đã được nuôi cấy, tách plasmid, điện di kiểm tra trên gen agarose 1%. Tiếp theo, vector pRTRA có gắn đoạn gen p30/p54 và vector chuyển gen thực vật pRTRA được phân cắt bằng *HindIII* ở  $37^{\circ}\text{C}$  trong 1 giờ với thành phần phản ứng theo bảng 2.5.

Bảng 2.5. Xử lí DNA hoặc vector bằng enzyme cắt giới hạn *HindIII*

STT	Thành phần	Thể tích ( $\mu\text{l}$ )
1	Nước deion, khử trùng	6
2	Buffer 10X r2.1 (NEB)	2
3	DNA (150 ng/ $\mu\text{l}$ )	6
4	Enzyme <i>HindIII</i> (10 u/ $\mu\text{l}$ )	1
Tổng		20 $\mu\text{l}$

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 50 (mg/l). Đĩa khuẩn được ủ ở điều kiện 37°C trong 16 giờ.

Các dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng colony-PCR (sử dụng cặp mồi 35S-F/35S-R), sau đó tách plasmid và thực hiện phản ứng cắt với enzyme *NotI* (bảng 2.6).

Bảng 2.6. Chọn dòng dương tính đảo chiều bằng enzyme *NotI*

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Nước deion, khử trùng	11
2	Buffer 10X r3.1 (NEB)	2
3	DNA (150 ng/μl)	6
4	Enzyme <i>NotI</i> (10 u/ μl)	1
Tổng		20 μl

Những plasmid mang vector pCB301 tái tổ hợp dương tính được biến nạp vào chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện [70]. Bổ sung plasmid vào tế bào khả biến và trộn nhẹ nhàng, sau đó chuyển vào cuvette. Tiến hành xung điện ở mức 2,5 kV; 25 μF và điện trở 400. Đặt cuvette vào đá, sau 5 phút bổ sung 500 μl LB lỏng và trộn nhẹ. Ủ hỗn hợp ở 28°C trong 1 giờ trên máy lắc. Sử dụng que cấy trái, trái 100 μl dịch khuẩn lên các đĩa môi trường LB đặc có chứa kháng sinh chọn lọc rifa 50 mg/l, carbe 50 mg/l, kana 50 mg/l. Ủ đĩa ở 28°C từ 24 - 48 giờ.

Kiểm tra và chọn lọc các dòng khuẩn lạc dương tính bằng phản ứng PCR khuẩn lạc theo công thức như bảng 2.3 và 2.4. Sau đó dòng vi khuẩn dương tính được nuôi cấy để phục vụ cho thí nghiệm biểu hiện gen tạm thời ở lá cây thuốc lá. Những dòng khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 cho kết quả dương tính sẽ được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng (có bổ sung 3 loại kháng sinh chọn lọc, qua đêm ở tủ lắc 28°C). Đồng thời khuẩn AGL1 này cũng được cấy trái thành khuẩn lạc trên đĩa LB đặc để làm nguyên liệu phục vụ biến nạp gen quan tâm vào cây thuốc lá.

### **2.2.3. Phương pháp biểu hiện tạm thời ở thực vật bằng Agro-infiltration**

Các protein ASFV được biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* theo quy trình đã được mô tả trong công bố của Ho và cộng sự, 2020 [71]. Chủng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 mang vector pCB301 chứa đoạn gen đích và gen mã hóa HcPro được nuôi trong 5 ml môi trường LB có bổ sung Kana 50 µg/ml, Carbe 50 µg/ml và Rifa 50 µg/ml qua đêm. Sau đó chuyển toàn bộ dịch nuôi được nuôi tiếp trong 50 ml LB bổ sung Kana 50 µg/ml, Carbe 50 µg/ml và Rifa 50 µg/ml qua đêm. Toàn bộ dịch nuôi này được dùng để nuôi chuyển tiếp trong 500 ml LB bổ sung Kana 50 µg/ml, Carbe 50 µg/ml và Rifa 50 µg/ml qua đêm. Khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 4000 v/p trong 15 phút ở 4°C. Cặn khuẩn được hoà trong đệm MES (10 mM MES; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; pH=5,6) cho tới khi đạt giá trị OD<sub>600</sub> của hỗn hợp dịch khuẩn biến nạp bằng 1. *Nicotiana benthamiana* thủy canh 7 tuần tuổi được dùng để biến nạp. Toàn bộ lá cây bị nhấn chìm trong bình chứa vi khuẩn bên trong bình hút chân không. Hút chân không ở 25 inches Hg, 2 phút. Xả không khí ra từ từ, mở nắp. Các cây này sau đó được đặt trong nhà kính ở 21- 26°C.

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. Protein tổng số từ mẫu lá được tách bằng SDS-sample buffer 1X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β-mercaptoethanol, 12.5 mM EDTA, 0.02 % bromophenol blue) với tỉ lệ 100 mg lá : 300 µl đệm chiết. Trộn đều mẫu trong 2 phút để quá trình chiết protein tốt hơn. Sau đó quá trình biến tính mẫu được thực hiện ở nhiệt độ 95°C trong 10 phút. Ly tâm 13000 v/p, 30 phút để thu dịch trong làm mẫu phân tích. Quá trình điện di SDS-PAGE được thực hiện theo phương pháp của Laemmli [72]. Mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp trong dịch chiết trong mẫu protein tách chiết từ lá xâm nhiễm khuẩn được đánh giá bằng lai miễn dịch Western Blot theo phương pháp của Burnette [73].

### **2.2.4. Phương pháp tinh sạch và xác định đặc điểm cấu trúc của các kháng nguyên p30 và p54 ASFV tái tổ hợp từ thực vật**

Các protein p30 và p54 ASFV (dung hợp GCN4pIItp) được tinh sạch



sắc ký ái lực (Immobilized immobilized affinity chromatography, IMAC) theo quy trình được mô tả trong công bố của Ho và cộng sự (2020) [74]. Mẫu lá được nghiền trong nitơ lỏng sau đó được tách chiết trong đệm binding buffer (500 mM NaCl, 20 mM sodium phosphate, pH 7.4). Dịch chiết được làm sạch bằng ly tâm 2 lần trong 30 phút, ở 4°C với tốc độ 23 000 rpm/phút. Dịch chiết sau đó được trộn với niken sepharose. Sau khi trộn qua đêm ở 4°C, hỗn hợp được đưa lên cột sắc ký. Sau đó, cột được rửa với đệm rửa binding phosphate. Protein tái tổ hợp sau đó được hòa tan khỏi cột với đệm thu mẫu (500 mM Imidazol, 20 mM Sodium Phosphate, 500 mM NaCl, pH 7.4). Dịch protein sau đó được đổi đệm trong PBS ở 4°C, qua đêm, sau đó được cô lại bằng PEG 6000.

Các protein sau khi tinh sạch bằng IMAC tiếp tục được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel (Size exclusion chromatography, SEC) theo công bố của Phan và cộng sự (2017) [75].

### **2.2.5. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột.**

Các protein p30 và 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. Kháng nguyên được trộn đều với lượng tương đương tá dược EMULSIGEN®-D (MVP) bằng ống trộn. Chuột cái trắng BALB/C 6 tuần tuổi được cung cấp bởi Phòng thử nghiệm sinh học- Viện công nghệ Sinh học được tiêm dưới da ba lần, mỗi lần tiêm cách nhau 7 ngày, mỗi con 200 µl (bao gồm cả protein và tá dược). Mỗi con chuột được tiêm với 10 µg 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 2 và thứ 3 [75].

### **2.2.6. Đánh giá hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu ASFV bằng phản ứng Elisa và Western blot.**

Hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu p30 và p54 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% (100µl) trong 2 giờ. Sau

đó đĩa được ủ với huyết thanh của chuột với độ pha loãng 1:1000 trong dung dịch PBS có 5% sữa trong 2 h. 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.

Hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu p30 và p54 ASFV được sản sinh từ các con chuột sau khi gây đáp ứng miễn dịch được đánh giá bằng phản ứng Western blot theo quy trình như sau:

Virus, kháng nguyên tinh sạch bằng SEC được load vào mỗi giếng và phân tách trên gel SDS-PAGE. Virus, kháng nguyên được chuyển lên màng, sau đó màng được khoá bằng bột sữa không béo 5% (w/v) hòa tan trong dung dịch đệm PBS trong 2 giờ. Sau đó, mỗi làn của màng được tách biệt bằng cách cắt và ủ ở nhiệt độ phòng trong 90 phút với độ pha loãng 1: 10 của hỗn hợp huyết thanh từ chuột của mỗi nhóm sau lần tiêm thứ nhất và thứ hai. Tiếp theo, các màng được ủ với anti-mouse IgG HRP trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Các tín hiệu cụ thể được phát hiện bằng cách ủ màng với 3,3-diaminobenzidine (DAB, Thermo Science Pierce) hòa tan trong 0,05 M Tris hay HCl và 0,04% hydro peroxide trong 10 phút trong bóng tối.

### **2.2.7. Phương pháp xử lý thống kê**

Phân tích thống kê cho ELISA được tiến hành sử dụng phần mềm Sigma Plot. Sự sai khác giữa giá trị trung bình được biểu diễn  $X \pm SD$ . Giá trị  $P < 0.05$  được xác định là sai khác có ý nghĩa thống kê.

### Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

**3.1. Thiết kế các dạng cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa hai kháng nguyên p30 và p54 ASFV của các chủng virus ASFV đang lưu hành ở Việt Nam dung hợp với các motif khác nhau và tạo chủng *Agrobacterium* mang vector tương ứng**

**3.1.1. Thu thập thông tin, tối ưu mã biểu hiện của gen mã hoá protein p30 và p54 của ASFV từ các chủng virus ASFV đang lưu hành ở Việt Nam và tổng hợp nhân tạo các trình tự gen trên**

Sau khi thu thập dữ liệu trên Ngân hàng GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), chúng tôi đã tìm được 01 trình tự của các gen mã hóa protein p54 từ chủng ASFV (VNUATB-ASF1/Vietnam2019) và 02 trình tự của các gen mã hóa protein p30, p54 của chủng ASFV (VNUAHY-ASF1/Vietnam2019) được phân lập tại Việt Nam. Do vậy, các trình tự của các gen mã hóa protein từ chủng VNUAHY-ASF1/Vietnam2019 đã được lựa chọn để làm đối tượng nghiên cứu. Mã số truy cập Genbank của các trình tự gen mã hóa các protein của chủng ASF virus (VNUA/HY-ASF1) lần lượt là: p30 (MK757460), p54 (MK554697).

>p30

```

ATGGATTTTATTTTAAATATATCCATGAAAATGGAGGTCATCTTCAAACGG
ATTTAAGATCATCTTCACAAGTTGTGTTTCATGCGGGTAGCCTGTATAATTG
GTTTTCTGTTGAGATTATCAATAGCGGTAGAATTGTTACGACCGCTATAAAA
ACATTGCTTAGTACTGTTAAGTATGATATTGTGAAATCTGCTCGTATATATG
CAGGGCAAGGGTATACTGAACATCAGGCTCAAGAAGAATGGAATATGATTCT
GCATGTGCTGTTTGAAGAGGAGACGGAATCCTCAGCATCTTCGGAGAACATT
CATGAAAAAATGATAATGAAACCAATGAATGCACATCCTCCTTTGAAACGT
TGTTTGAGCAAGAGCCCTCATCGGAGGTACCTAAAGACTCCAAGCTGTATAT
GCTTGCACAAAAGACTGTGCAACATATTGAACAATATGGAAAGGCACCTGAT
TTTAACAAGGTTATTAGAGCACATAATTTTATTCAAACCATTTATGGAACCC
CTCTAAAGGAAGAAGAAAAAGAGGTGGTAAGACTCATGGTTATTAACTTTT
AAAAAAAAAAGGCCGGGGCCGGTTTTATCCATCATATCATTC AACACCACAA
CGTCCATAA

```

>p54

```

ATGGATTCTGAATTTTTTCAACCGGTTTATCCGCGGCATTATGGTGAGTGTT
TGTCACCAGTCACTACACCAAGCTTCTTCTCCACACATATGTATACTATTCT
CATTGCTATCGTGGTCTTAGTCATCATTATCATCGTTCTAATCTATCTATTC
TCTTCAAGAAAGAAAAAGCTGCTGCTATTGAGGAGGAAGATATACAGTTTA
TAAATCCTTATCAAGATCAGCAGTGGGTAGAAGTCACTCCACAACCAGGTAC
CTCTAAACCAGCTGGAGCGACTACAGCAAGTGTAGGCAAGCCAGTCACGGGC
AGACCGGCAACAAACAGACCAGCAACAAACAAACCAGTTACGGACAACCCAG
TTACGGACAGACTAGTCATGGCAACTGGCGGGCCGGCGGCCGCACCTGCGGC
CGCGAGTGCTCCTGCTCATCCGGCTGAGCCTTACACGACAGTCACTACTCAG
AACACTGCTTCACAAACAATGTCGGCTATTGAAAATTTACGACAAAGAAACA
CCTATACGCATAAAGACCTAGAAAACCTCCTTGGGCCGGGGCCGGTTTTATCC
ATCATATCATTTCAACACCACAACGTCCATAA

```

Để định hướng cho việc biểu hiện protein tái tổ hợp trong nội bào tạo điều kiện thuận lợi cho tách chiết và thu protein tái tổ hợp từ lá cây, đoạn gen 75 bp mã hóa cho peptit tín hiệu của gen LeB4 (mã hóa cho protein legumin type B ở cây đậu răng ngựa *Vicia faba*) đã được thay thế các tín hiệu trên gen p30 và p54.

Các protein từ các sinh vật khác nhau có bộ mã đặc thù khác nhau. Vì vậy để biểu hiện tốt trong cây, bộ mã của gen đã được cải biến. Để tối ưu mã sao cho thích hợp với mô hình sản xuất protein đặc trưng của thực vật, căn cứ vào bảng tần suất sử dụng các codon ở thực vật trên ngân hàng dữ liệu mã di truyền Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>) kết hợp với việc sử dụng phần mềm Codon Optimization 2.0, chúng tôi đã loại bỏ và thay thế các codon hiếm trong các gen mã hóa protein p30, p54. Bên cạnh đó, trình tự ATTTA được cho là gây bất ổn cho quá trình phiên mã cũng được loại bỏ. Để thuận tiện cho việc cắt và nối ghép gen trong quá trình thiết kế vector chuyển gen vào hệ thống biểu hiện trên thực vật, các vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Bam*HI, *Psp*OMI được thêm vào đầu 5' và 3' của gen p54 và p30. Việc đổi mã được thực hiện dựa trên cơ sở các bộ mã thay đổi sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện ở thực vật nhưng không làm thay đổi trình tự của axit amin. Trình tự gen p54 và p30 đã đổi mã và thiết kế thêm các điểm cắt của enzyme hạn chế.

Dưới đây là trình tự p30 sau khi tối ưu mã biểu hiện trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*.

>p30 optimized

```

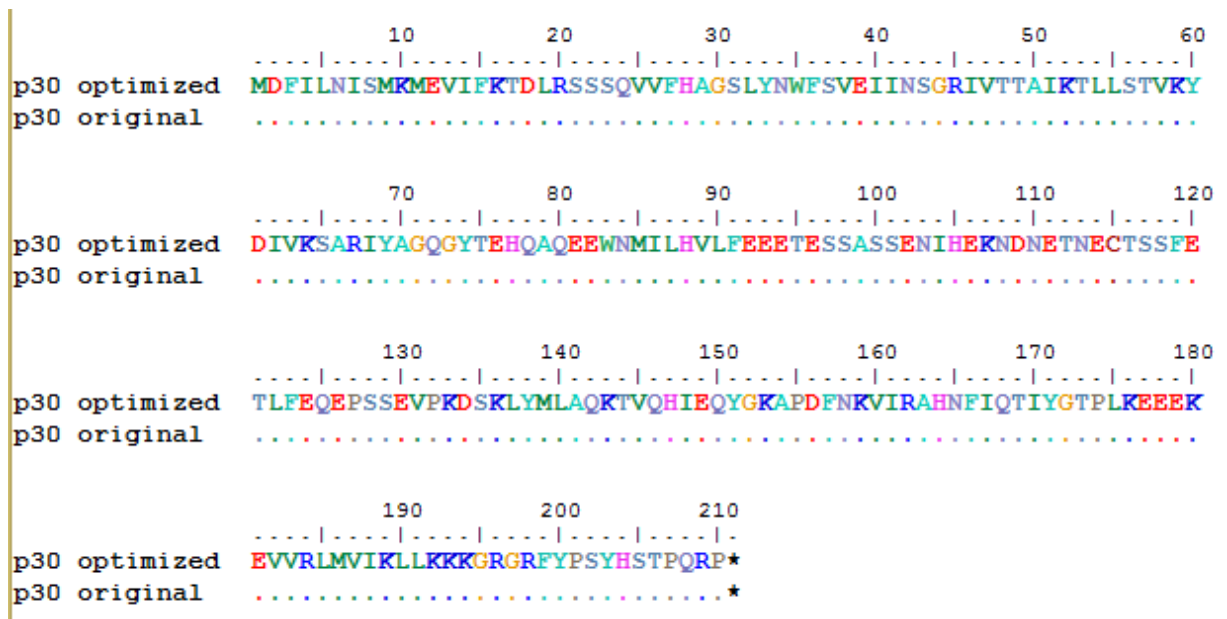
ATGGATTTTATTCTTAATATTTCTATGAAGATGGAGGTTATTTTTAAGACAG
ATCTTAGGTCTTCTTCTCAAGTTGTGTTCCACGCTGGATCTTTGTACAATTG
GTTTTCTGTTGAGATTATTAATTCTGGTAGGATTGTTACTACTGCTATTAAG
ACTCTTCTTTCTACTGTTAAGTATGACATCGTGAAGTCTGCTAGGATCTACG
CTGGTCAAGGTTACACTGAGCATCAAGCTCAAGAAGAGTGGAACATGATCCT
TCACGTGTTGTTTCGAGGAGGAGACTGAGTCTTCTGCTTCATCTGAGAATATT
CACGAGAAGAACGACAACGAGACTAACGAGTGTACTTCTTCTTTTCGAGACAT
TGTTTCGAGCAAGAACCCTTCATCAGAGGTGCCTAAGGACTCAAACCTTTACAT
GTTGGCTCAGAAGACAGTGCAGCACATCGAGCAGTATGGTAAGGCTCCAGAT
TTCAATAAGGTGATTAGGGCTCATAATTTCAATCAAACAATCTACGGTACAC
CATTGAAGGAGGAGGAGAAGGAGGTGGTGAGGTTGATGGTGATTAACTTTT
GAAGAAGAAGGGAAGGGAAGGTTTTACCCTTCATACCACTCTACTCCACAG
AGGCCTTGA
  
```

Hình ảnh so sánh trình tự nucleotide p30 trước (p30 original) và sau khi tối ưu mã biểu hiện (p30 optimized) ở cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* (xem hình 3.1) sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện và thuận lợi cho việc thiết kế vector nhưng không làm thay đổi bất kì một trình tự axit amin nào.

	10	20	30	40	50	60	70	80
p30 original	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	ATGGATTTTATTCTTAATATTTCTATGAAGATGGAGGTTATTTTTAAGACAG							
p30 optimized	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	.....C.T.....T.T.....G.....T.T.T.G.A.C.T.G.T.....T.....C.C..T							
	110	120	130	140	150	160	170	180
p30 original	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	ATGGTTTTCTGTGAGATTATCAATAGCGGTAGAATTGTTACGACCGCTATAAAAACATTGCTTAGTACTGTTAAGTATGATATTG							
p30 optimized	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	.....T..TCT.....G.....T..T.....T..G..TC.T..TC.....C..C..							
	210	220	230	240	250	260	270	280
p30 original	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	TATATATGCAGGGCAAGGGTATACTGAACATCAGGCTCAAGAAGAATGGAATATGATTCTGCATGTGCTGTTTGAAGAGGAGAGCGGA							
p30 optimized	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	G..C..C..T..T.....T..C.....G.....A.....G.....C.....C..T..C..T.....C..G.....T..							
	310	320	330	340	350	360	370	380
p30 original	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	TCGGAGAACATTGATGAAAAAATGATAATGAAACCAATGAATGCACATCCTCCTTTGAAACGTTGTTGAGCAAGAGCCCTCATCG							
p30 optimized	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	.....T.....T.....C..G..G..C..C..C..G..T..C..G..T..T..T..T..C..G..A.....C.....A..T.....A							
	410	420	430	440	450	460	470	480
p30 original	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	ACTCCAAGCTGTATATGCTTGCACAAAAGACTGTGCAACATATTGAACAATATGGAAGGCACCTGATTTTAAACAGGTATTAGAG							
p30 optimized	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	.....A..A..T..C..T..G..T..G.....A.....G..C..C..G..G.....T.....T..A.....C..T.....G.....G..							
	510	520	530	540	550	560	570	580
p30 original	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	TCAAACCATTTATGGAACCCCTCTAAAGGAAGAGAAAAGAGGGTGGTAAGACTCATGGTTATTAACATTTTAAAAAAAAGGCGG							
p30 optimized	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	.....A..C..C..T..A..AT..G.....G..G..G..G.....G..GT..G.....G.....G..G..G..G..AA..							
	610	620	630					
p30 original	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	CCATCATATCATTCAACCCACAACGTCCTATAA							
p30 optimized	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	.....T.....C..C..T..T.....GA.G..T.G..							

Hình 3.1: Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa p30 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thuốc lá bằng phần mềm Bioedit

Sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật, chúng tôi tiến hành so sánh trình tự amino axit của protein p30 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* (xem hình 3.2). Kết quả cho thấy rằng có sự tương đồng 100% giữa trình tự axit amin của protein p30 trước và sau khi đổi mã.



Hình 3.2: Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein kháng nguyên p30 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thuốc lá bằng phần mềm Bioedit

Dưới đây là trình tự mã hóa cho protein kháng nguyên p54 sau khi tối ưu mã biểu hiện trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*.

>p54 optimized

ATGGATTCTGAGTTCTTCCAGCCAGTTTACCCTAGGCACTACGGTGAGTGCT  
 TGTCTCCAGTGACTACTCCATCTTTTTTTTCTACTCATATGTATACTATTTT  
 GATTGCTATTGTTGTTCTTGTATTATTATTATTGTTCTTATTTACTTGTTT  
 TCTTCTAGGAAGAAGAAGGCTGCTGCTATCGAGGAGGAGGACATTCAGTTCA  
 TCAATCCTTACCAAGATCAGCAATGGGTGGAAGTGACTCCACAGCCGGGTAC  
 TTCTAAGCCAGCTGGAGCAACTACAGCATCTGTGGGAAAGCCAGTGACTGGT  
 AGGCCAGCAACTAATAGACCAGCTACTAACAAGCCAGTTACAGACAACCCAG  
 TTAGTATAGACTTGTATGGCTACTGGAGGACCAGCTGCAGCACCAGCTGC  
 TGCTTCTGCACCAGCTCACCCAGCTGAGCCTTACACTACTGTGACAACCTCAA

AATACAGCATCTCAGACTATGTCTGCAATTGAAAATCTTAGACAAAGAAATA  
 CATATACACACAAGGACTTGGAGAACTCTTTGGGTAGGGGTAGGTTCTACCC  
 TTCTTACCACTCTACTCCACAGAGGCCATGA

Hình ảnh so sánh trình tự nucleotide p54 trước (p54 original) và sau khi tối ưu mã biểu hiện (p54 optimized) ở cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* (xem hình 3.3) sao cho phù hợp với hệ thống biểu hiện và thuận lợi cho việc thiết kế vector nhưng không làm thay đổi bất kì một trình tự axit amin nào.

	10	20	30	40	50	60	70	80
p54 original	ATGGATTCTGAATTTTTCAACCGTTTATCCGCGGCATTATGGTGAGTGTGTTGTCCACAGTCACTACACCAAGCTTCTTCTCCACA							
p54 optimized	.....G..C..C..G..A.....C..TA.....C..C.....C.....T.....G.....T.....TCT..T..T..T..T							
	100	110	120	130	140	150	160	170
p54 original	ATGTATACTATTCTCATTGCTATCGTGGTCTTAGTCATCATTATCATCGTTCTAATCTATCTATTCTTTCAAGAAAGAAAAAGCT							
p54 optimized	.....T..G.....T..T..TC..T..T..T.....T..T.....T..T..CT..G..T.....T..G.....G..G...							
	190	200	210	220	230	240	250	260
p54 original	GCTATTGAGGAGGAAGATATACAGTTTATAAATCCTTATCAAGATCAGCAGTGGGTAGAAGTCACTCCACAACCAGGTACCTCTAAA							
p54 optimized	.....C.....G..C..T.....C..C.....C.....A.....G.....G.....G..G.....T.....G							
	280	290	300	310	320	330	340	350
p54 original	GCTGGAGCGACTACAGCAAGTGTAGGCAAGCCAGTCACGGGCAGACCGGCAACAACAGACCAGCAACAACAAACAGTTACGGAC							
p54 optimized	.....A.....TC..G..A.....G..T..T..G..A.....T..T.....T..T.....G.....A...							
	370	380	390	400	410	420	430	440
p54 original	CCAGTTACGGACAGACTAGTCATGGCAACTGGCGGGCCGGCCGCACCTGCGGCCGCGAGTGTCTCTGCTCATCCGGCTGAGCCT							
p54 optimized	.....T..T.....T..T.....T.....A..A..A..T..A.....A..T..TTC...A..A.....C..A.....							
	460	470	480	490	500	510	520	530
p54 original	ACGACAGTCACTACTCAGAACACTGCTTCACAACAATGTCGGCTATTGAAAATTTACGACAAGAAACACCTATACGCATAAAGAC							
p54 optimized	..T..T..G..A.....A..T..A..A..T..G..T.....T..A.....C..TA.....T..A.....A..C..G...							
	550	560	570	580	590	600		
p54 original	GAAAACCTCCTTGGGCGGGGCCGGTTTTATCCATCATATCATTCAACACCACAACGTCATATA							
p54 optimized	..G.....T.....TA.....TA.....C..C..T..T..C..C..T..T.....GA.G.....G							

Hình 3.3: Kết quả so sánh trình tự gen mã hóa p54 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thuốc lá bằng phần mềm Bioedit

Sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật tiến hành so sánh trình tự amino axit của protein p54 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* (xem hình 3.4). Kết quả cho thấy rằng có sự tương đồng 100% giữa trình tự axit amin của protein p54 trước và sau khi đổi mã.



Hình 3.4: Kết quả so sánh trình tự axit amin của protein kháng nguyên p54 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thuốc lá bằng phần mềm Bioedit

Các trình tự gen mã hóa protein kháng nguyên p30, p54 đã đổi mã được đặt tổng hợp nhân tạo tại công ty Genewiz (USA) và được nhân dòng trong vector pUC57.

### 3.1.2. Thiết kế các dạng cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa các kháng nguyên p30 và p54 ASFV dung hợp với các motif khác nhau và tạo chủng *Agrobacterium* mang vector tương ứng

#### 3.1.2.1. Thiết kế các vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên p30 ASFV

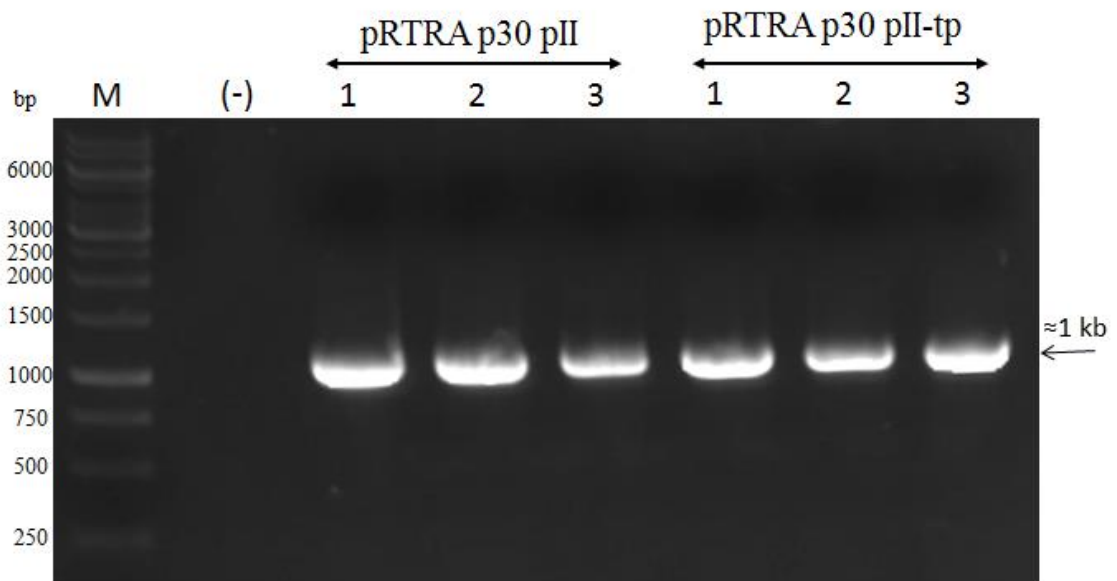
Đầu tiên, đoạn gen p30 được khuếch đại bằng cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR và vector pRTRA tiếp đó được cắt bởi hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI. Sản phẩm cắt sau đó được tinh sạch và gen p30 được nối dưới sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase để tạo thành các plasmid tái tổ hợp (pRTRA-p30-pII và pRTRA-p30-pII-tp). Hình 3.5 là kết quả điện di sản phẩm của phản ứng Colony PCR sử dụng cặp mồi 35S-F/R, các dòng khuẩn *E. coli* 10G xuất hiện bằng vạch có kích thước khoảng hơn 1000 bp (bằng kích thước của đoạn gen p30 + 500 bp), điều này là đúng với tính toán lý thuyết. Các đoạn gen mã hóa cho protein p30 và p54 được gắn với các motif có chứa pII và pII-tp mục đích để tạo các dạng protein trimer, oligomer. Qua quá trình nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* 10G, chọn ra được hai dòng dương tính để xác định trình tự gen p30-pII và p30-pII-tp. Kết quả xác định và phân tích trình tự cho thấy, chúng tôi đã thiết kế thành công hai vector tách dòng tái tổ hợp pRTRA\_35S\_LeB4SP\_His\_ BamHI\_p30\_PspOMI\_pII\_Cmyc\_KDEL và pRTRA\_35S\_LeB4SP\_His\_ BamHI\_p30\_PspOMI\_pII\_tp\_Cmyc\_KDEL



chứa lần lượt gen p30 có trình tự giống như lý thuyết.

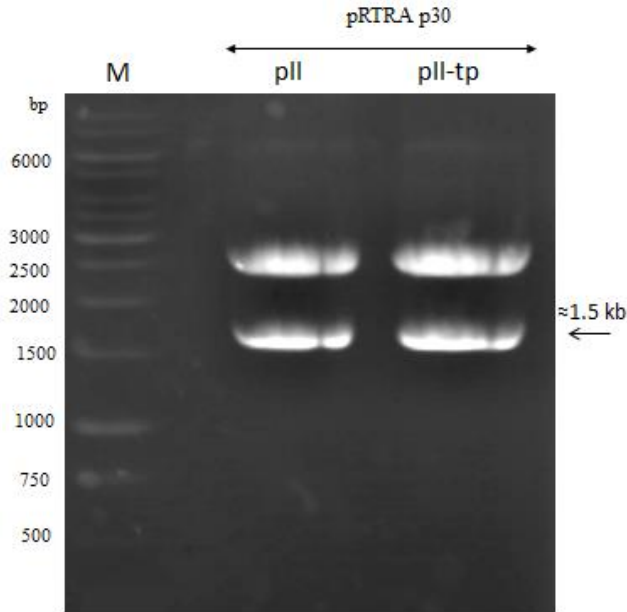
Ngoài ra, để kiểm tra sự hiện diện của các plasmid tái tổ hợp trong các dòng khuẩn, các plasmid được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI. Kết quả điện di ở hình 3.6 cho thấy các plasmid tái tổ hợp pRTRA được kiểm tra cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI cho các băng vạch trùng với kích thước tính toán lý thuyết của pRTRA-pII và pRTRA-pIItp là khoảng xấp xỉ 4700 bp, gen p30 là xấp xỉ 600 bp.

Như vậy, từ kết quả kiểm tra phản ứng colony PCR và cắt bằng enzyme giới hạn đều cho các băng vạch theo đúng kích thước. Qua đó có thể khẳng định đã thiết kế thành công vector pRTRA mã hóa kháng nguyên p30 dạng trimer (GCN4pII) hoặc dạng oligomer (GCN4pII-tp) và vector này đã được biến nạp thành công vào khuẩn *E. coli* 10G. Sơ đồ của hai vector tách dòng pRTRA đề cập ở trên được thể hiện qua hình 3.7.



Hình 3.5: Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc tế bào *E. Coli* được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc: pRTRA-p30-pII và pRTRA-p30-pII-tp

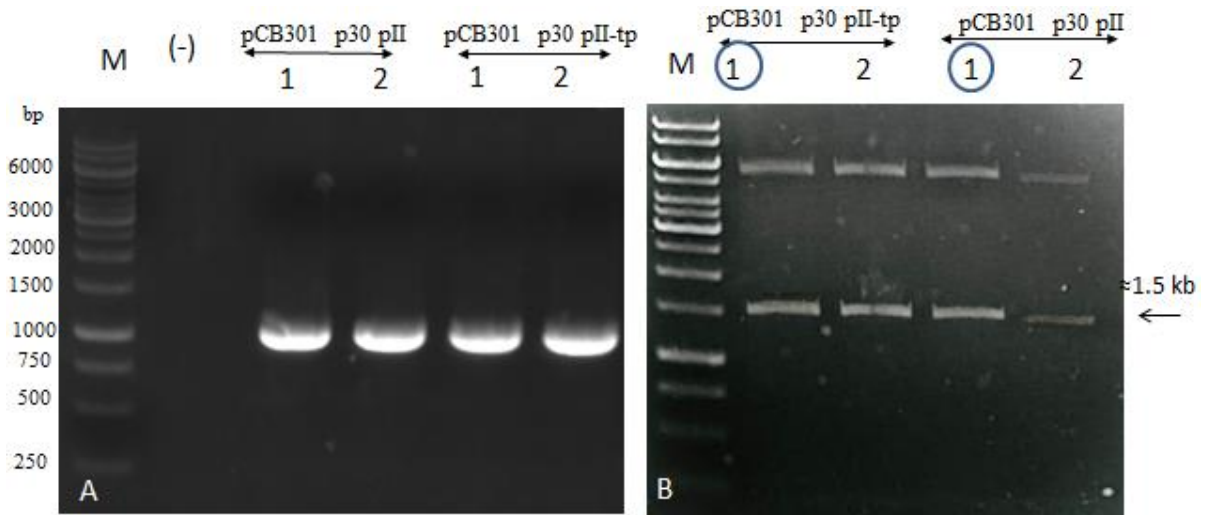




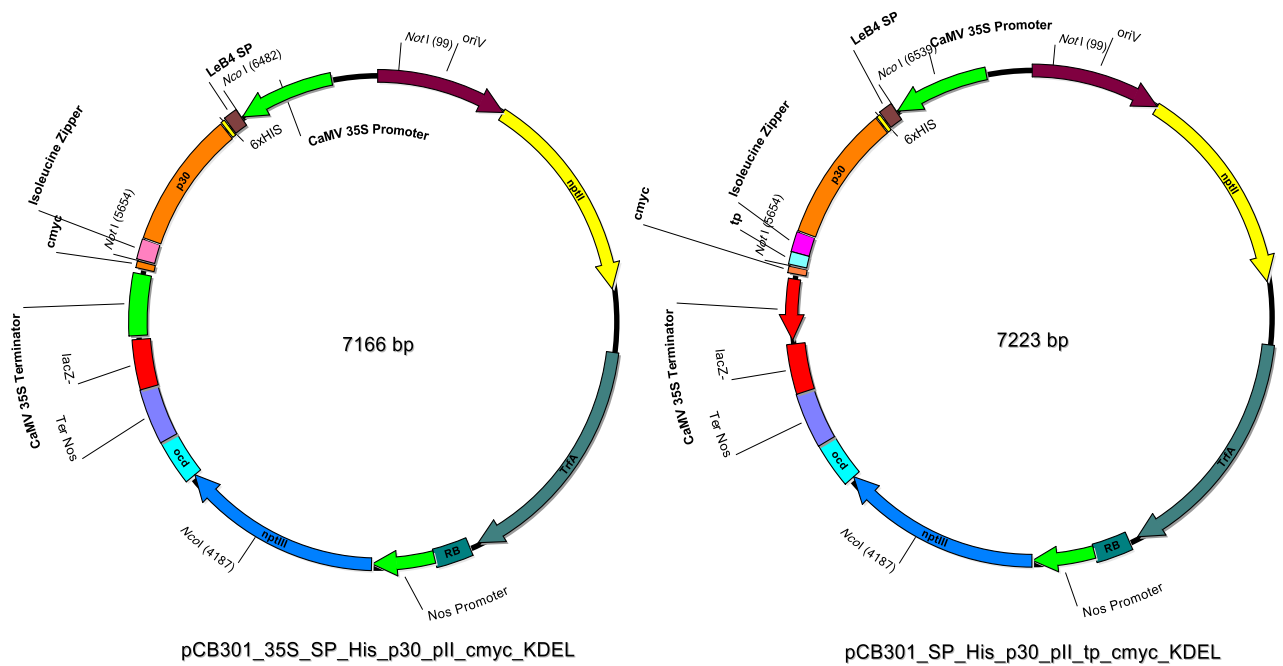
Hình 3.8: Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid pRTRA-p30-pII và pRTRA-p30-pII-tp bằng *HindIII*

Các phân đoạn DNA có kích thước xấp xỉ 1700 kb được thu nhận (xem hình 3.8) và tinh sạch để chuẩn bị cho phản ứng lai để ghép nối đoạn gen vector mở vòng pCB301 đã xử lý với *HindIII*. Plasmid tái tổ hợp được tạo ra từ phản ứng lai sẽ được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* 10G bằng phương pháp sốc nhiệt. Để có thể chọn lọc dòng khuẩn mang vector chứa gen mã hóa một trong hai loại protein p30-pII hoặc p30-pII-tp, và có chiều biểu hiện của protein đích ngược chiều với chiều biểu hiện của gen mã hóa kháng sinh chọn lọc thì thực hiện colony PCR (sử dụng cặp môi 35S-F/R) và cắt plasmid mang gen mã hóa p30 của từng cấu trúc với enzyme giới hạn *NotI*.

Kết quả điện di kiểm tra trên gel agarose 1% (xem hình 3.9A) cho các vạch băng sáng, rõ, có kích thước xấp xỉ 1000 bp trùng với kích thước tính toán theo lý thuyết. Hình 3.9B là kết quả điện di kiểm tra các dòng khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pCB301 bằng cách xử lý với enzyme *NotI* đều cho các băng vạch trùng với kích thước tính toán lý thuyết là khoảng 1600 bp và 5500 bp. Các dòng được lựa chọn để biến nạp tiếp vào *A. tumefaciens* do có chiều biểu hiện của gen mã hóa kháng nguyên p30 ngược chiều với chiều biểu hiện của gen mã hóa kháng sinh chọn lọc. Chúng tôi đã thiết kế thành công vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa kháng nguyên p30. Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện thiết kế thành công được minh họa ở hình 3.10.



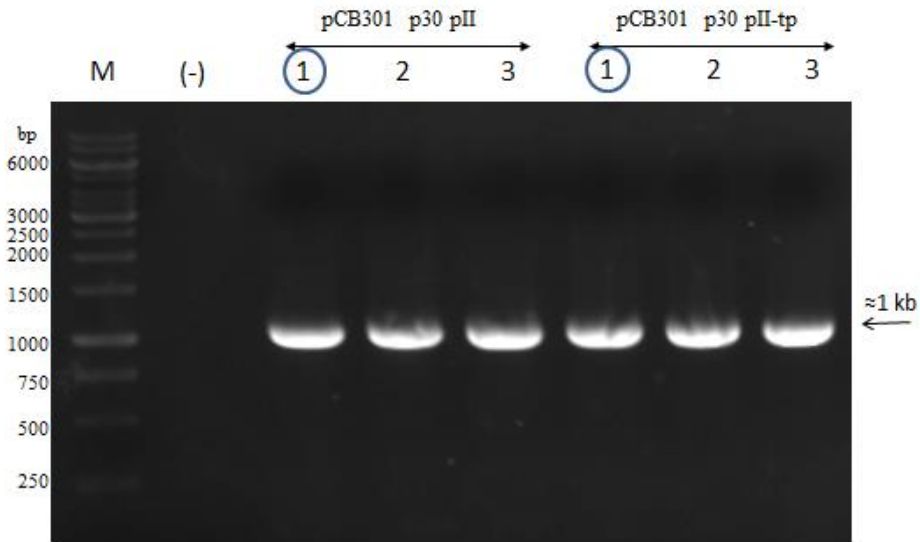
Hình 3.9: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc tế bào E. Coli được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc p30 trong pCB301 (A) và cắt enzyme giới hạn *NotI* chọn dòng đảo chiều (B)



Hình 3.10: Sơ đồ vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa protein p30

Những dòng được chọn ở bước trên sẽ được tinh sạch rồi biến nạp vào *A. tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện rồi được nuôi trên LB đặc bổ sung carbe 50 mg/l, kana 50 mg/l và rifa 25 mg/l qua đêm để hình thành các khuẩn lạc trắng. Tiêu chí chọn khuẩn lạc là các khuẩn lạc mọc riêng rẽ, tròn, đều, không có khuẩn lạc vệ tinh nhỏ bao quanh. Kiểm tra cấu trúc plasmid bên trong có mang gen đích bằng colony-PCR với môi 35S-F và 35S-

R. Kết quả colony-PCR trong AGL1 được thể hiện trên hình 3.11. Giữ chủng trong AGL1 dòng 1 (đối với cả 2 cấu trúc p30-pII và p30-pII-tp) để thực hiện thí nghiệm biến nạp khuẩn mang cấu trúc gen mã hóa protein p30 vào cây thuốc lá.



Hình 3.11: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc các cấu trúc p30 trong AGL1

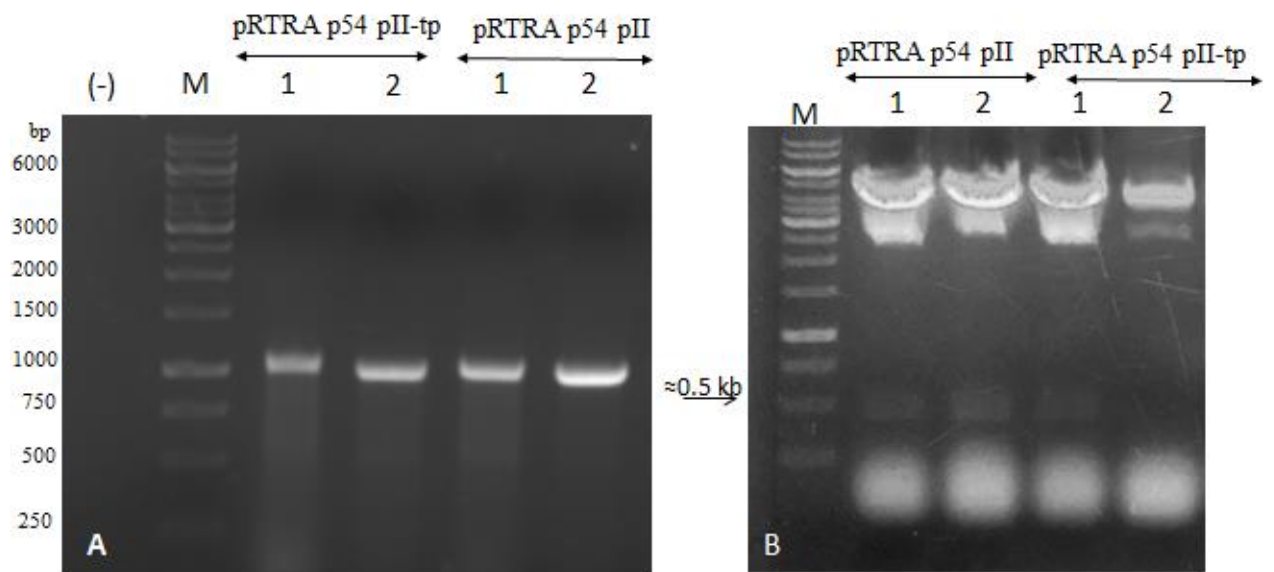
### 3.1.2.2. Thiết kế các vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên p54 ASFV

Tương tự với cách tạo vector tách dòng mang gen mã hóa protein p30, sản phẩm PCR gen p54 và vector pRTRA được cắt bởi hai enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*Omi. Sản phẩm PCR được tinh sạch và gắn kết dưới sự xúc tác của enzyme T4 DNA ligase để tạo thành các vector (pRTRA-p54-pII và pRTRA-p54-pII-tp). Qua quá trình nhân dòng trong vi khuẩn *E. coli* 10G, chúng tôi đã chọn ra được hai dòng dương tính để xác định trình tự gen p54-pII và p54-pII-tp.

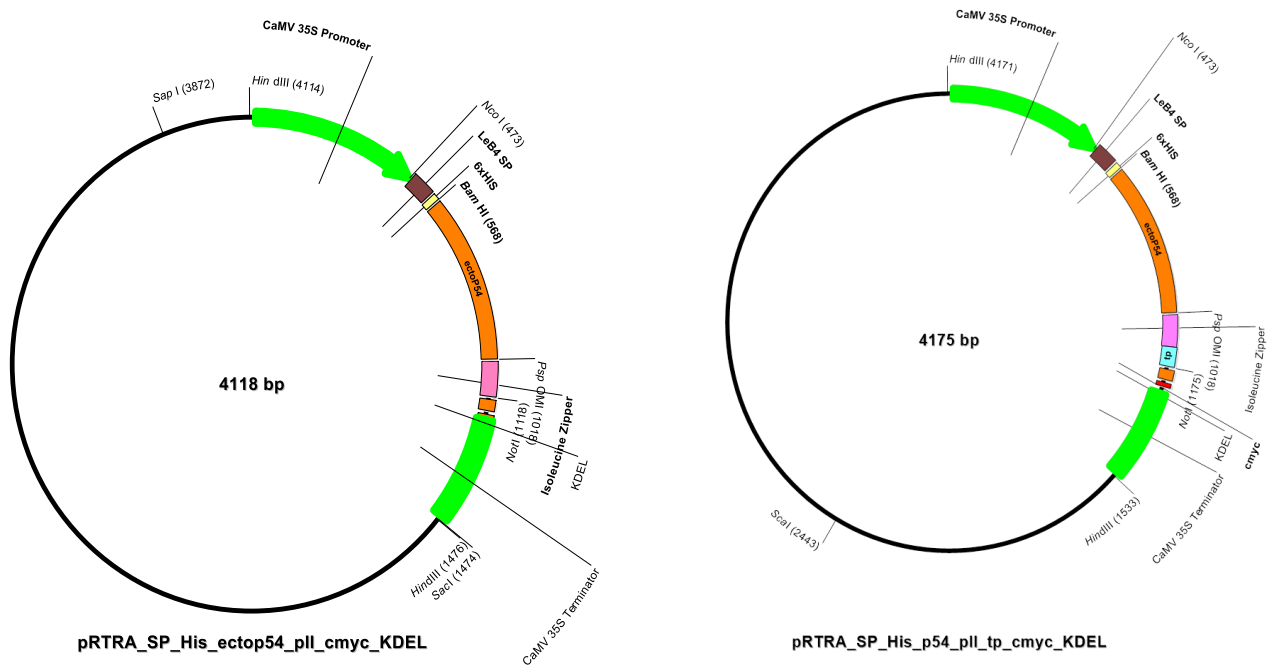
Qua kết quả trên bản điện di và phân tích trình tự cho thấy, đề tài đã thiết kế thành công hai vector pRTRA\_35S\_LeB4SP\_His\_ BamHI\_p54\_PspOmi\_pII\_Cmyc\_KDEL và pRTRA\_35S\_LeB4SP\_His\_ BamHI\_p54\_PspOmi\_pII\_tp\_Cmyc\_KDEL chứa gen p54 có trình tự giống như lý thuyết. Kết quả colony-PCR được thể hiện trên hình 3.12A. Kích thước đoạn DNA được khuếch đại của tất cả các khuẩn lạc được lựa chọn sẽ xấp xỉ 1000 bp phù hợp với tính toán lý thuyết

ban đầu. Bảng điện di sáng rõ chứng tỏ lượng DNA đủ lớn để phục vụ các thí nghiệm tiếp theo. Ngoài ra, để kiểm tra sự hiện diện của các plasmid tái tổ hợp trong các dòng khuẩn, các plasmid được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI. Kết quả điện di ở hình 3.12B cho thấy các plasmid tái tổ hợp pRTRA được kiểm tra cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI cho các băng vạch trùng với kích thước tính toán lý thuyết của pRTRA-pII và pRTRA-pIItp là khoảng xấp xỉ 4700 bp, gen p54 là xấp xỉ 500 bp.

Như vậy, từ kết quả kiểm tra phản ứng colony PCR và cắt bằng enzyme giới hạn đều cho các băng vạch theo đúng tính toán lý thuyết. Qua đó có thể khẳng định đã thiết kế thành công vector pRTRA mã hóa kháng nguyên p54 dạng trimer (GCN4pII) hoặc dạng oligomer (GCN4pII-tp) và vector này đã được biến nạp thành công vào khuẩn *E. coli* G10. Sơ đồ của hai vector tách dòng pRTRA đề cập ở trên được thể hiện qua hình 3.13.

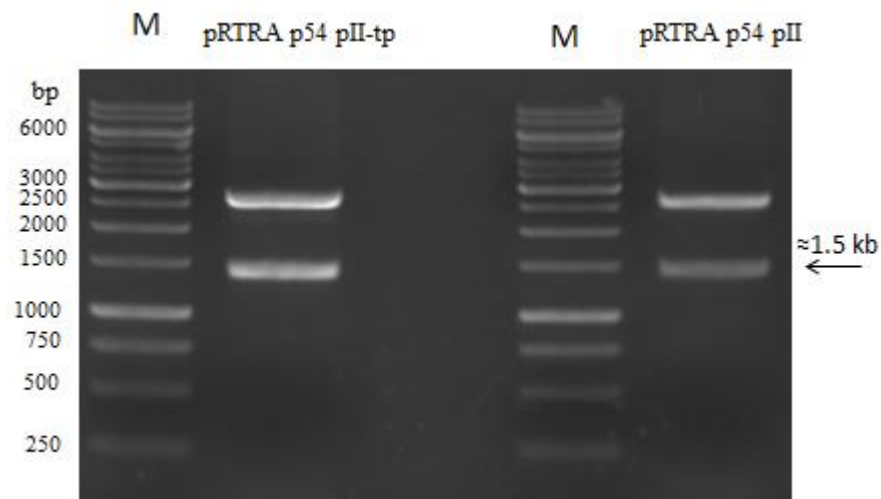


Hình 3.12: Kết quả điện di sản phẩm PCR từ khuẩn lạc tế bào *E. Coli* được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc: pRTRA-p54-pII và pRTRA-p54-pII-tp và cắt enzyme giới hạn bằng *Bam*HI và *Psp*OMI (B)



Hình 3.13: Sơ đồ vector tách dòng pRTRA mang gen mã hóa protein p54 dạng trimer và oligomer

Dòng pRTRA-p54-pII (1) và pRTRA-p54-pII-tp (2) sẽ nuôi trong LB lỏng bổ sung carbe 50 mg/ml và tách chiết plasmid. Các plasmid sẽ được tinh sạch, xử lý với *Hind*III rồi tinh sạch bằng điện di thoi gel để thu băng có kích thước khoảng 1,5 kb phục vụ mục đích gắn vào vector chuyển gene pCB301. Kết quả điện di thoi gel được thể hiện trên hình 3.14.

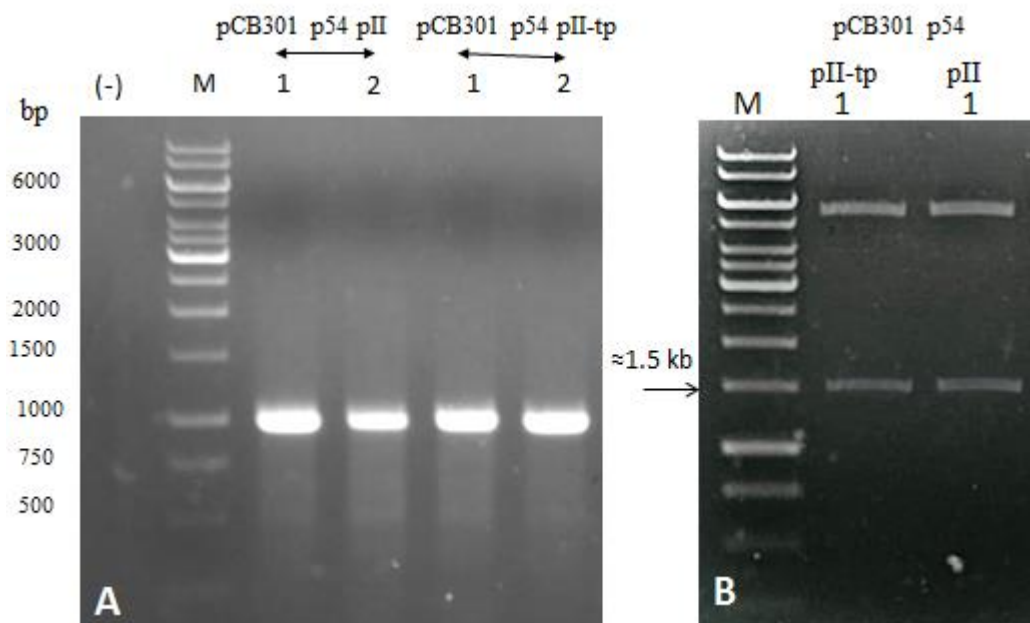


Hình 3.14: Điện di đồ sản phẩm cắt plasmid pRTRA-p54-pII và pRTRA-p54-pII-tp bằng *Hind*III

Băng điện di 1,5 kb sau khi xử lý với *Hind*III sẽ được tinh sạch và lai

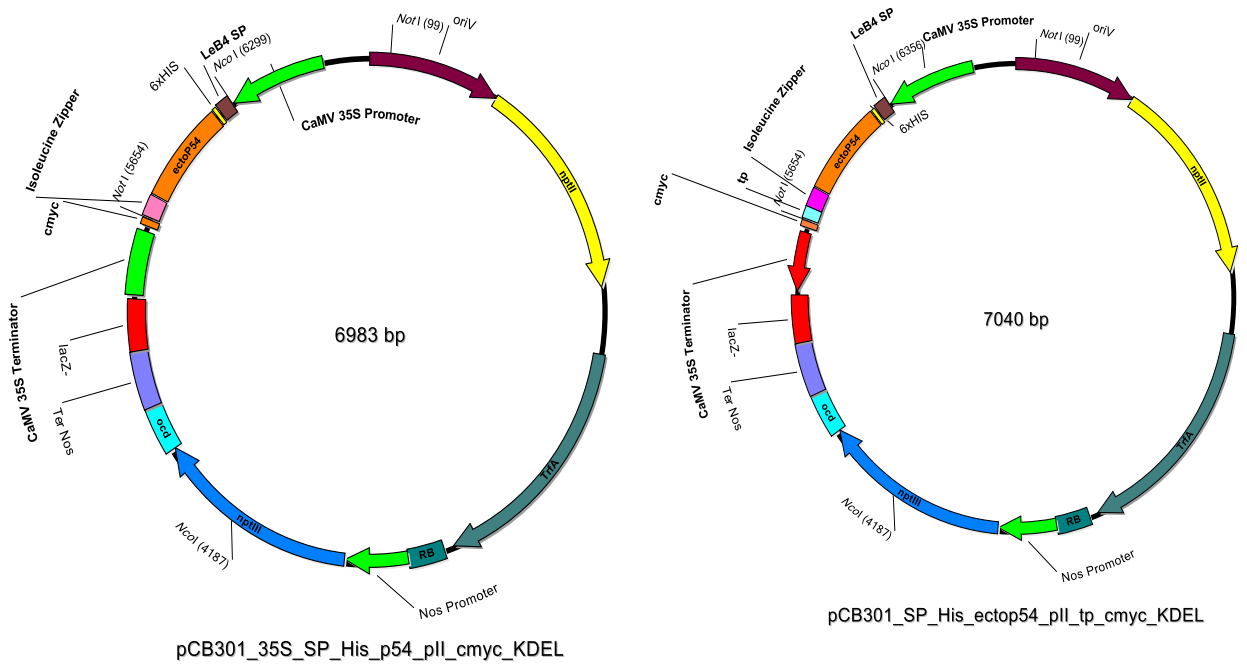
với vector pCB301. Plasmid tái tổ hợp được tạo ra từ phản ứng lai sẽ được biến nạp vào tế bào khả biến *E.coli* 10G. Chọn lọc dòng khuẩn chứa vector pCB301 và gen p54 bằng colony-PCR (xem hình 3.15A). Chọn dòng khuẩn mang vector chứa gen mã hóa một trong hai loại protein p54-pII hoặc p54-pII-tp, và có chiều biểu hiện của protein đích ngược chiều với chiều biểu hiện của gen mã hóa kháng sinh chọn lọc, chúng tôi thực hiện cắt plasmid mang gen mã hóa p54 của từng cấu trúc với enzyme giới hạn *NotI*. Hình 3.15B là kết quả điện di kiểm tra các dòng khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pCB301 bằng cách xử lý với enzyme *NotI* đều cho các băng vạch trùng với kích thước tính toán lý thuyết là xấp xỉ 1500 bp và 5500 bp.

Các dòng được lựa chọn để biến nạp tiếp vào *A. tumefaciens* do có chiều biểu hiện của gen mã hóa kháng nguyên p54 ngược chiều với chiều biểu hiện của gen mã hóa kháng sinh chọn lọc. Chứng tỏ đã thiết kế thành công vector chuyển gen thực vật mang gen mã hóa kháng nguyên p54. Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện thiết kế thành công được minh họa ở hình 3.16



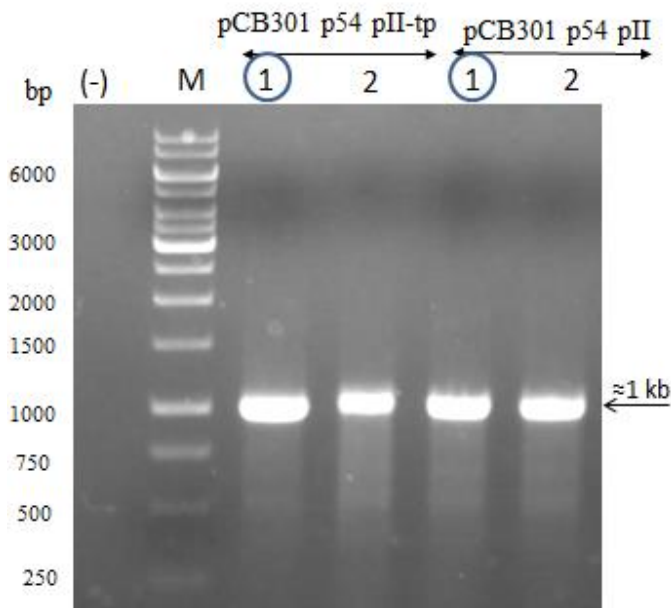
Hình 3.15: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc tế bào *E. Coli* được biến nạp với sản phẩm ghép nối các cấu trúc p54 trong pCB301 (A) và cắt enzyme giới hạn *NotI* chọn dòng đảo chiều (B)





Hình 3.16: Sơ đồ vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa protein p54

Chủng pCB301-p54-pII (1) và pCB301-p54-pII-tp (1) được chọn ở bước trên sẽ được tinh sạch rồi biến nạp vào *A. tumefaciens* AGL1 rồi được nuôi trên LB đặc bổ sung 50 mg/l carbe, 50 mg/l kana và 25 mg/l rifa qua đêm để hình thành các khuẩn lạc. Kết quả colony-PCR trong AGL1 được thể hiện trên hình 3.17.

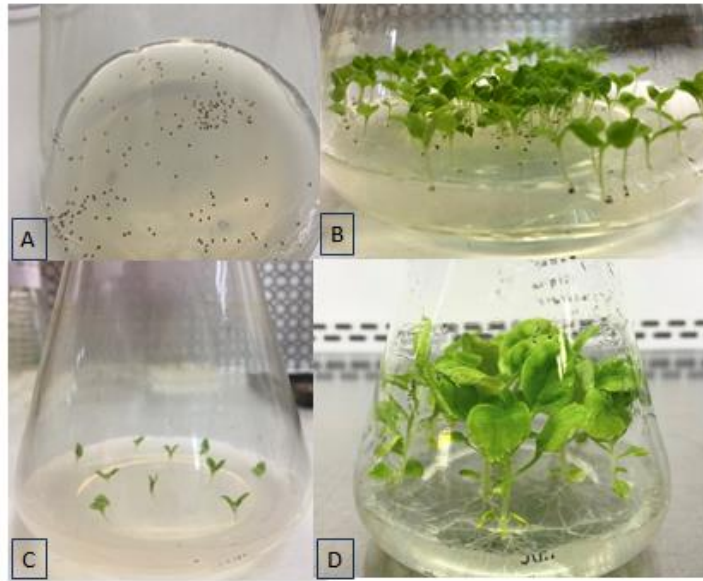


Hình 3.17: Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc các cấu trúc p54 trong AGL1

### **3.2. Biểu hiện tạm thời protein tái tổ hợp ASFV p30, p54 trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana***

#### **3.2.1. Chuẩn bị cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana***

Thuốc lá *Nicotiana benthamiana* là loài cây trồng ôn đới được sử dụng rộng rãi trong thực vật học và là nền tảng quan trọng trong nghiên cứu bệnh học virus, sản xuất protein tái tổ hợp ở quy mô thí nghiệm hoặc công nghiệp... Tuy nhiên *Nicotiana benthamiana* nhạy cảm với nhiều loại tác nhân gây bệnh thực vật khác chẳng hạn như các virus Tobacco mosaic virus, Cucumber mosaic virus, Tobacco leaf curl virus, vi khuẩn, nấm,... cộng với thời tiết khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa tại Việt Nam khiến việc kiểm soát mầm bệnh khi trồng cây thuốc lá trong bầu đất gặp nhiều khó khăn. Cây sau biến nạp được trồng trong hệ thống buồng sinh trưởng với các nhiệt độ, độ ẩm tối ưu khi trồng trong đất vẫn đối mặt với mầm bệnh. Một hệ thống giàn nuôi cây thủy canh được đặt trong buồng sinh trưởng với độ ẩm 75%, nhiệt độ 22° C và hệ thống lưu thông gió luân hồi sẽ tạo sự đồng đều trong quá trình chăm sóc và phát triển của cây, dễ dàng tăng quy mô cũng như thao tác thí nghiệm nhanh gọn. Bởi vậy việc thiết kế và thi công hệ thống thủy canh cho cây thuốc lá sẽ giúp giải quyết những vấn đề khó khăn trong việc trồng *Nicotiana benthamiana* mô hình thí nghiệm ở Việt Nam. Hạt thuốc lá *Nicotiana benthamiana* sau khi được khử trùng sẽ được rắc trên môi trường MS đặc trong bình tam giác, nuôi ở điều kiện *in vivo* (Xem hình 3.18A). Sau 7 đến 10 ngày, cây cao khoảng 0,5cm, ra 2 lá và có rễ (xem hình 3.18B), cắt cây (bỏ rễ cũ) chuyển sang bình mới (xem hình 3.18C). Cây sau khi được cấy chuyển 7 đến 10 ngày đủ điều kiện ra rễ tốt và cao khoảng 3cm là đạt chuẩn để chuyển từ *in vivo* vào trồng trong hệ thống giàn nuôi thủy canh (xem hình 3.18D). Sau 7 tuần tính từ lúc rắc hạt trong bình *in vivo*, cây phát triển toàn diện, các lá cây có diện tích khá to (chiều dài các lá chính dao động từ 10-15 cm), khoảng cách giữa các đốt lá khá xa nhau (dao động 5-6 cm) như quan sát được ở hình 3.19.



Hình 3.18: Kết quả gieo và nhân nhanh cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* in vitro từ hạt. A: Gieo hạt thuốc lá *Nicotiana benthamiana* vào môi trường in vitro. B: Cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* mới nảy mầm sau khi gieo hạt 7-10 ngày. C: Cây được cấy chuyển sang bình môi trường mới. D: Cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* 7-10 ngày cấy chuyển, chuẩn bị nuôi thủy canh.

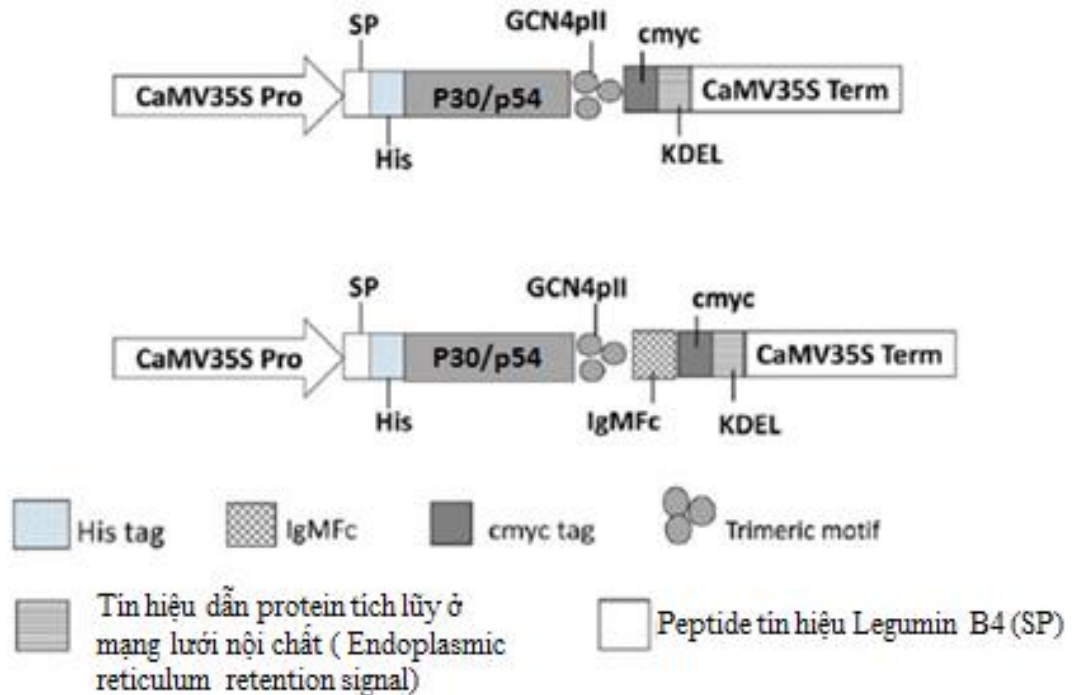


Hình 3.19: Cây thuốc lá trồng thủy canh 5 (A), 6 (B), 7 (C), tuần tuổi.

Cây thuốc lá trong phòng sinh trưởng thủy canh (D).

### 3.2.2. Đánh giá khả năng biểu hiện tạm thời của protein tái tổ hợp ASFV p30, p54 trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*

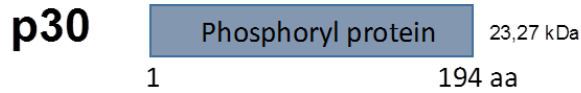
Sơ đồ cassette biểu hiện ở thực vật mang gen mã hóa kháng nguyên gắn GCN4pII hoặc GCN4pII-tp được thể hiện ở hình 3.20.



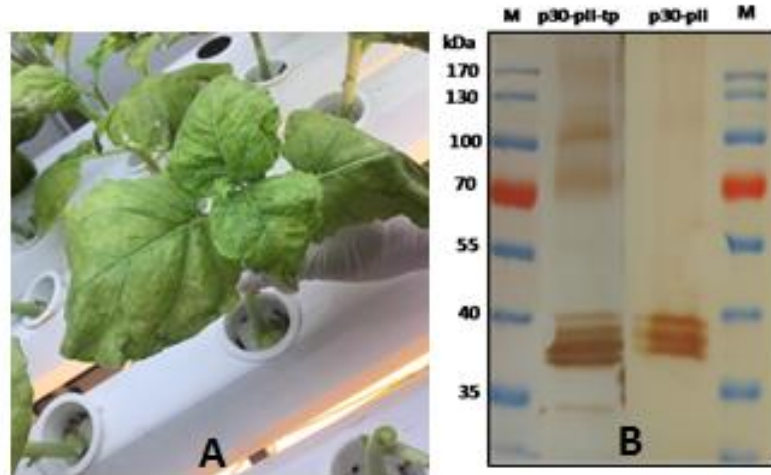
Hình 3.20: Sơ đồ cassette biểu hiện mang gen mã hóa protein tái tổ hợp p30, p54 trong thực vật.

### 3.2.2.1. Đánh giá khả năng biểu hiện tạm thời của protein tái tổ hợp ASFV p30 trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*

Trong luận văn này, sự biểu hiện tạm thời của protein p30 được đánh giá bằng phản ứng Western blot sử dụng kháng thể his-tag. Toàn bộ trình tự protein p30 đã được thiết kế và biểu hiện thành công ở cả hai dạng trimer (p30-pII) và oligomer (p30-pII-tp) trên thuốc lá bằng agroinfiltration (xem hình 3.22A). Mức độ biểu hiện của các protein p30-pII-tp và p30-pII tái tổ hợp trong thực vật được tính toán dựa vào độ đậm, nhạt của các băng vạch khi phân tích bằng phần mềm ImageJ. Mức độ biểu hiện của hai protein này là tương đối giống nhau, tuy nhiên p30-pII-tp có các băng từ 70 kDa trở lên đậm hơn một chút. Cả hai cấu trúc đều đã được biểu hiện trên số lượng lớn 19 cây thuốc lá thu 213,5 g lá sau 6 ngày (đối với p30-pII) và 160 cây thuốc lá thu 1540 g lá sau 6 ngày (đối với p30-pII-tp). Theo tính toán lý thuyết, kích thước protein kháng nguyên p30 tái tổ hợp ở dạng monomer là 30 kDa, kích thước thực tế thu được là khoảng 38 kDa, hơn nữa trên hình 3.22B có những băng vạch có kích thước 70, 100,...kDa. Điều này có thể được giải thích là do trên protein p30 có các vị trí N-glycosylation điều này làm ảnh hưởng đến sự di chuyển của protein trong quá trình điện di.



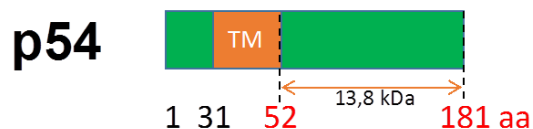
Hình 3.21: Sơ đồ lựa chọn vùng kháng nguyên p30 cho thiết kế và biểu hiện ở thực vật



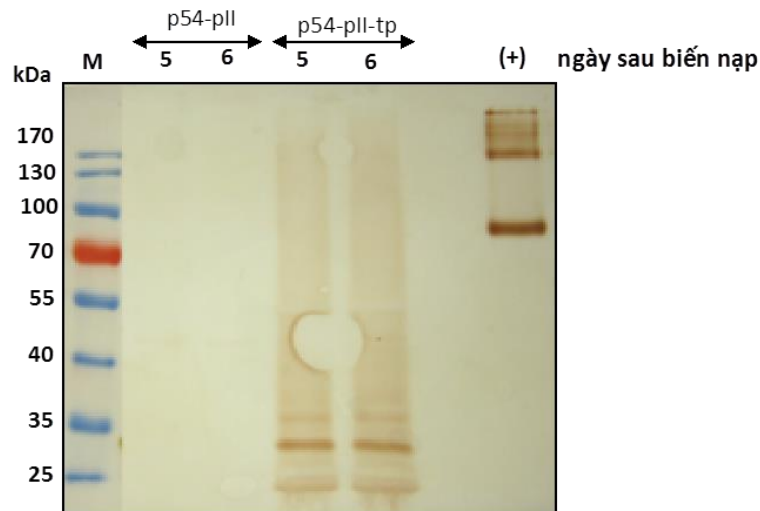
Hình 3.22: Hình ảnh Western blot đánh giá sự biểu hiện kháng nguyên p30 trong lá thuốc lá

3.2.2.2. *Đánh giá khả năng biểu hiện tạm thời của protein tái tổ hợp ASFV p54 trên cây thuốc lá Nicotiana benthamiana*

Trong nghiên cứu này, vùng ectodomain (từ vị trí amino acid 52 – 181) của kháng nguyên p54 (khoảng 13,8 kDa) đã được lựa chọn để thiết kế cấu trúc biểu hiện (xem hình 3.23). Kết quả đánh giá sự biểu hiện bằng Western blot cho thấy, các kháng nguyên p54-pII và p54-pII-tp đều đã được biểu hiện thành công trên thuốc lá biến nạp. Trong đó, kháng nguyên p54-pII có sự biểu hiện kém hơn p54-pII-tp với hai phân đoạn dimer và trimer được quan sát thấy trên bản Western blot. Trong khi đó, kháng nguyên p54-pII-tp có sự biểu hiện mạnh hơn thành một vệt dài từ 17 – 170 kDa với các phân đoạn quan sát rõ nhất là 17 kDa và 34 kDa (xem hình 3.24).



Hình 3.23: Sơ đồ lựa chọn vùng kháng nguyên p54 (amino acid 52-181) cho thiết kế và biểu hiện ở thực vật



Hình 3.24: Hình ảnh Western blot đánh giá sự biểu hiện kháng nguyên p54 trong 1-2 lá thuốc lá

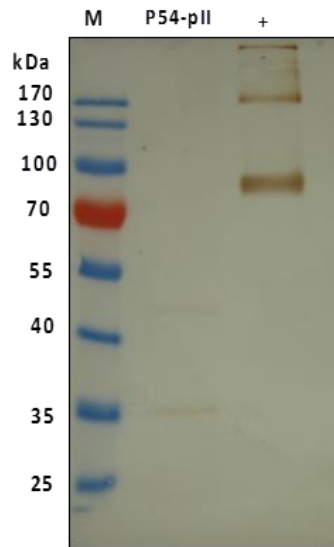
Kháng nguyên p54-pII-tp cũng được lựa chọn để biến nạp vào lượng lớn 150 cây thuốc lá. Sau 5 ngày thu hoạch được 1220 g lá, kiểm tra sự biểu hiện bằng Western blot và cho kết quả rất tốt ở hình 3.25B. Sau 5 ngày biến nạp lá thuốc lá biến nạp vẫn phát triển với một số lá có biểu hiện khảm vàng cục bộ (xem hình 3.25A). Đây là biểu hiện bình thường của cây biến nạp bằng agroinfiltration. Điều này chứng tỏ kháng nguyên p54 không có độc tính với tế bào thuốc lá.



Hình 3.25: A. Hình ảnh lá cây thuốc lá 5 ngày sau khi biến nạp kháng nguyên p54 bằng agroinfiltration. B. Hình ảnh Western blot đánh giá sự biểu hiện kháng nguyên p54.

Phân tích sự biểu hiện p54-pII lượng lớn cũng cho thấy có sự biểu hiện protein này trên thuốc lá với các băng vạch xuất hiện khoảng 35 và 50 kDa

tương đương với dạng dimer và trimer của nó (xem hình 3.26).



Hình 3.26: Hình ảnh Western blot biểu hiện p54-pII trên số lượng lớn cây thuốc lá

### 3.3. Tinh sạch và xác định đặc điểm của các kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp ASFV tiềm năng.

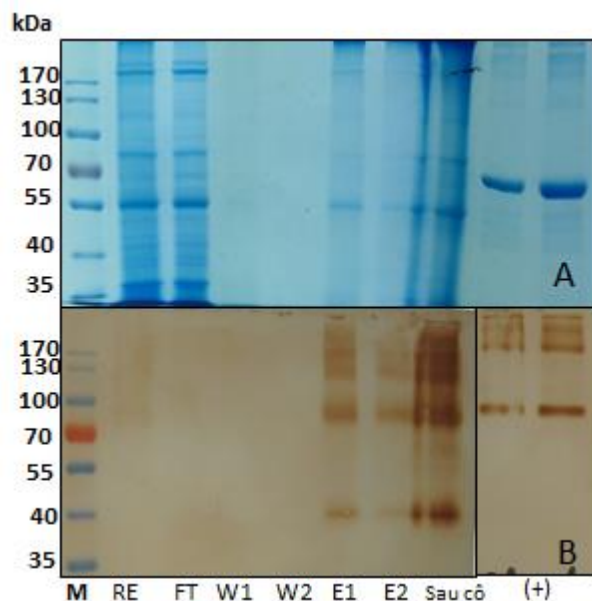
#### 3.3.1. Tinh sạch và xác định đặc điểm của các kháng nguyên p30 tái tổ hợp ASFV

Để có thể biết xác định được chức năng và cấu trúc của các protein p30-pII-tp được biểu hiện trong khuôn khổ luận văn, dịch chiết xuất thô của mỗi protein p30-pII-tp đã được sử dụng cho phương pháp tinh sạch bằng sắc kí ái lực (IMAC). IMAC là một phương pháp thường được sử dụng để tinh chế các protein tái tổ hợp có chứa motif polyhistidine dựa trên sự tương tác đặc hiệu mạnh giữa các axit amin này và các ion kim loại cố định ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  và  $\text{Zn}^{2+}$ ). Dịch chiết thuốc lá có chứa protein p30-pII-tp sau đó được ủ với Ni-NTA agarose ở điều kiện  $4^{\circ}\text{C}$  và khuấy đảo liên tục qua đêm. Các protein p30-pII-tp có chứa các đuôi histidine sẽ được giữ lại một cách đặc hiệu trên cột agarose IMAC. Ở các bước rửa và hoà tan protein ra khỏi cột IMAC, imidazole với các nồng độ khác nhau đã được sử dụng để khảo sát. Đối với p30pII-tp, nồng độ imidazole 30 mM và 500mM lần lượt được sử dụng cho bước rửa và hoà tan protein.

Đối với việc tách chiết kháng nguyên p30-pII-tp, đệm chiết đã được sử dụng trong chính là đệm binding buffer có chứa các muối gồm 20 mM

sodium phosphate:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500 mM NaCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) đã cho thấy sự hiệu quả trong việc tách chiết. Đệm rửa dùng cho tinh sạch có thành phần bao gồm 20 mM sodiumphosphate, 500 mM NaCl, 30 mM imidazole, đệm ly giải protein gồm 20 mM sodiumphosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole.

Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch protein p30-pII-tp bao gồm dịch chiết thô, phân đoạn không bám, phân đoạn rửa và phân đoạn chứa protein tinh sạch sau khi tinh sạch xong được đo nồng độ protein bằng phương pháp đo Bradford, sau đó kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE và nhuộm bằng Coomassiblue (xem hình 3.27A). Các protein p30, p54 được phát hiện bằng kháng thể anti-histag và kháng thể 2 là anti IgG và phản ứng hiện màu bằng (3'-Diaminobenzidine (DAB) có xúc tác bằng hydrogen peroxide. Trong Western blot, vị trí của các protein p30pII-tp, p54pII-tp có thể được phát hiện bằng cách sử dụng DAB làm chất nền tạo thành kết tủa màu nâu hoặc các băng vạch màu nâu. Kết quả cho thấy rằng, protein p30pII-tp bám tốt với Ni-aagarose và ở phân đoạn cuối cùng đã thu được protein p30pII-tp tái tổ hợp. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch protein p30pII-tp tái tổ hợp đồng thời được kiểm tra bằng Western blot. Kết quả Western blot hình 3.27B cho thấy rằng, đã tinh sạch thành công protein p30pII-tp tái tổ hợp bằng phương pháp IMAC.

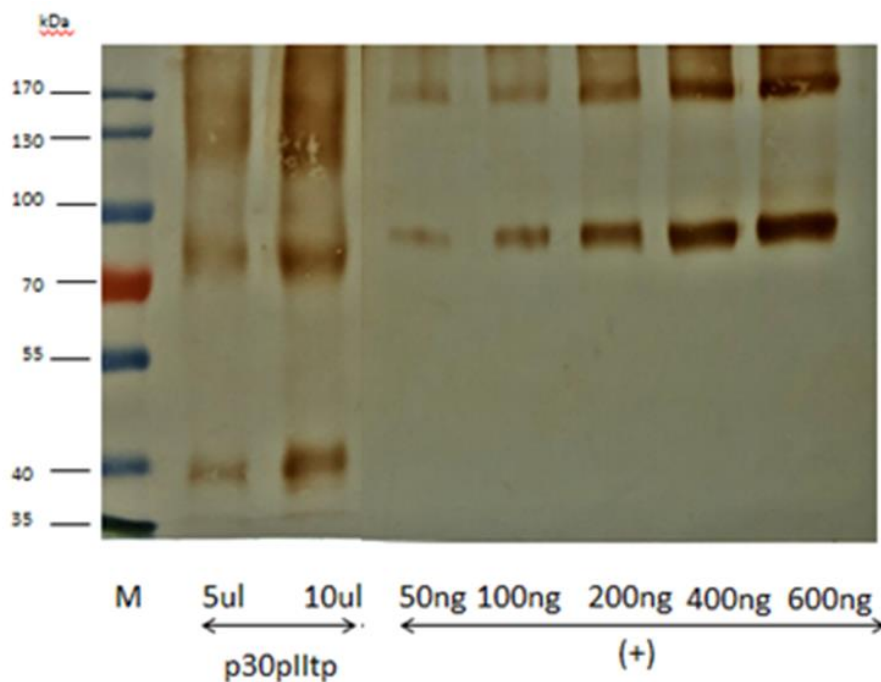


Hình 3.27: Kết quả tinh sạch p30pIItp được đánh giá bằng SDS-PAGE (A) và Western blot (B). RE: dịch chiết thô, FT: dịch chảy qua sau khi ủ với hạt Ni-



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. BSA và AK65: mẫu đối chứng dương.

Sau khi tinh sạch, protein p30 tái tổ hợp thu được đã được đưa vào túi thẩm tích trong đệm PBS không chứa NaCl qua đệm ở 4°C để loại muối (2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4). Protein tinh sạch sau đó được cô lại bằng cột cô protein (Thermo scientific) trong máy ly tâm lạnh ở 4200 vòng/ phút và sau đó được bổ sung 50% glycerol và bảo quản ở -20 °C cho mục đích sử dụng tiếp theo.



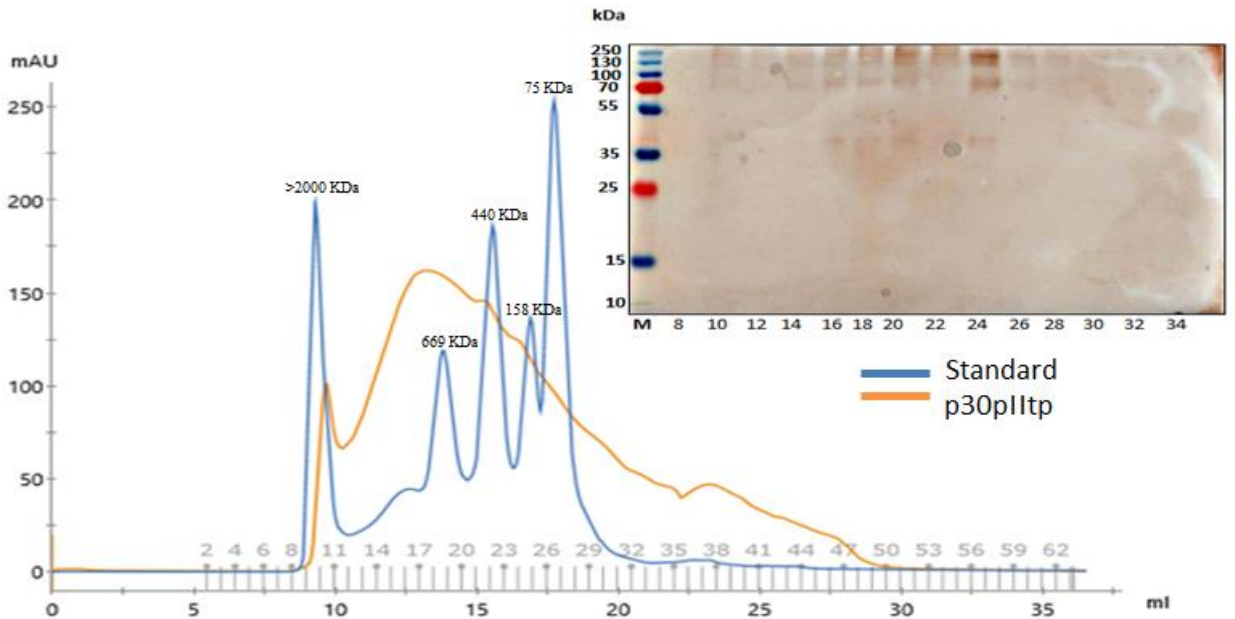
Hình 3.28: Bán định lượng nồng độ protein p30-pII-tp sau khi cô đặc

Sau khi cô protein p30-pII-tp đã được bán định lượng bằng Western blot. Protein p30-pII-tp được tra vào các giếng theo thể tích lần lượt là 5 và 10  $\mu$ l cùng với dải của protein chuẩn đã được định lượng trước đó (nồng độ các giếng lần lượt là 50, 100, 200, 400, 600 ng). Sau đó, protein p30-pII-tp được định lượng bằng phần mềm ImageQuant TL 1D v8.2.0. Nồng độ protein p30-pII-tp thu được là 160,09 ng/ $\mu$ l (xem hình 3.28).

Ngoài ra, qua phân tích bản Western blot cho thấy p30-pII-tp xuất hiện dải băng vạch rất đậm 40 và trên 70 kDa. Điều này cho thấy p30 nghiên cứu có dạng cấu trúc oligomer hoá.

Protein p30-pII-tp được tinh sạch thông qua sắc kí lọc gel như kết quả ở

hình 3.29. Các protein kháng nguyên p30 nằm trong các phân đoạn từ 11 đến 29, trong đó hầu hết các protein p30 nằm ở phân đoạn 16 đến 20 là các phân đoạn chứa protein tiêu chuẩn có khối lượng phân tử cao. Kết quả này chỉ ra rằng hầu hết các protein p30 tinh sạch là oligomer. Các protein p30 oligomer tinh sạch từ các phân đoạn 16 đến 24 đã được thu nhận và sau đó được sử dụng cho các thí nghiệm sau.



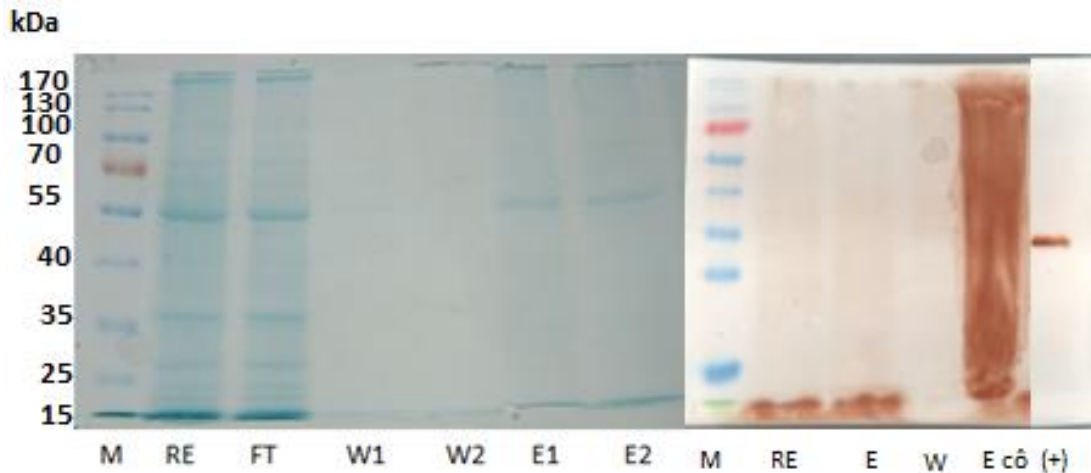
Hình 3.29: Đặc điểm cấu trúc của các protein p30-pII-tp tinh sạch bởi SEC.

### 3.3.2. Tinh sạch và xác định đặc điểm của các kháng nguyên p54 tái tổ hợp ASFV

Đối với việc tách chiết kháng nguyên p54-pII-tp, đệm chiết đã được sử dụng trong tinh sạch chính là đệm binding buffer có chứa các muối sodium photphat bao gồm 20mM sodium phosphate:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100 đã cho thấy sự hiệu quả trong việc tách chiết. Đệm rửa dùng cho tinh sạch có thành phần bao gồm 20 mM sodiumphosphate, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole, đệm ly giải protein gồm 20 mM sodiumphosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole.

Các phân đoạn thu được trong quá trình tinh sạch protein kháng nguyên p54-pII-tp bao gồm dịch chiết thô, phân đoạn không bám, phân đoạn rửa và phân đoạn chứa protein tinh sạch sau khi tinh sạch xong được đo nồng độ protein bằng phương pháp đo Bradford, sau đó kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE và nhuộm bằng Coomassiblue (xem hình 3.30). Kết quả

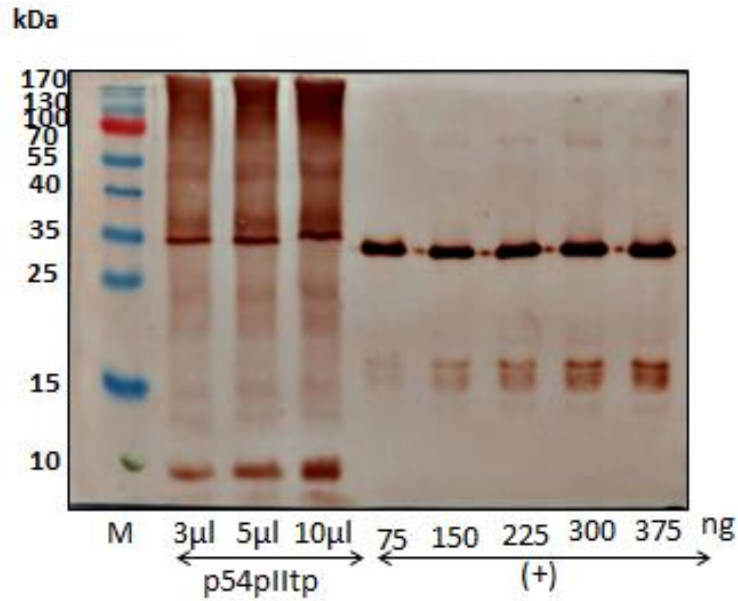
cho thấy rằng, protein p54-pII-tp bám tốt với Ni-agarose và ở phân đoạn cuối cùng đã thu được protein p54-pII-tp tái tổ hợp. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch protein p54-pII-tp tái tổ hợp đồng thời được kiểm tra bằng Western blot. Kết quả Western blot cho thấy rằng, đã tinh sạch thành công protein p54-pII-tp tái tổ hợp bằng phương pháp IMAC.



Hình 3.30: Kết quả tinh sạch protein p54-pII-tp được đánh giá bằng SDS-PAGE và Western Blot.

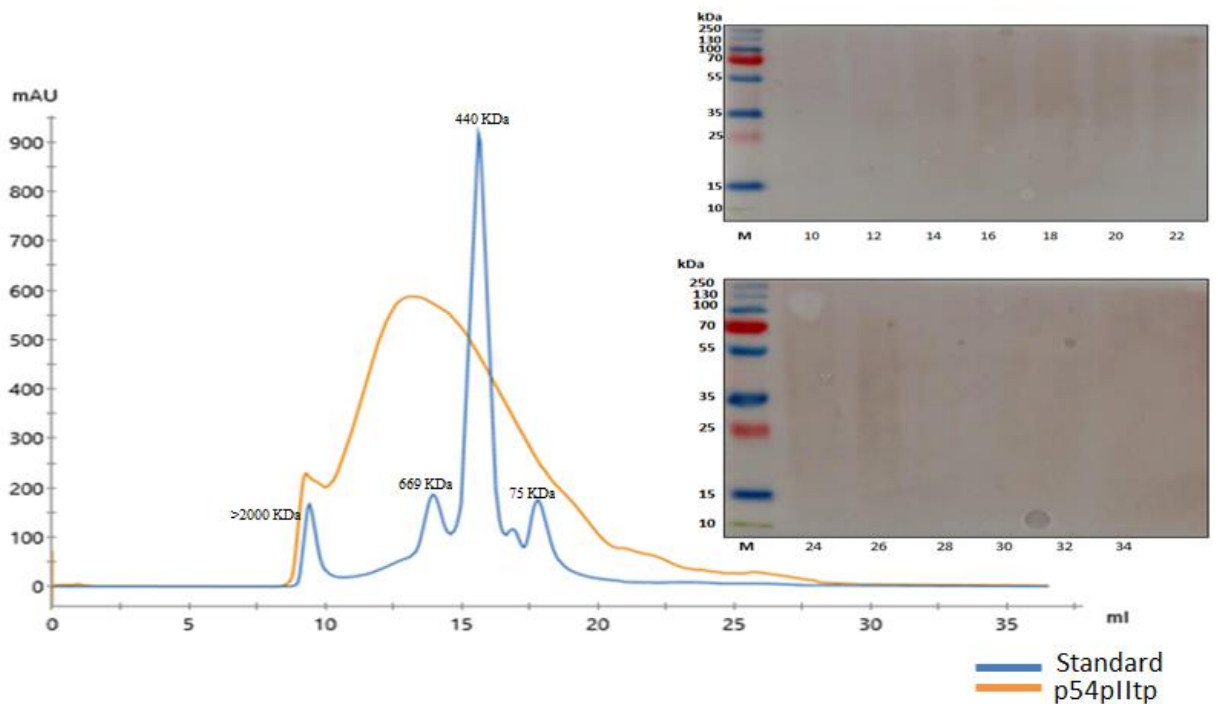
Sau khi tinh sạch thì protein tái tổ hợp thu được sẽ được đưa vào túi thẩm tích trong đệm PBS không chứa NaCl qua đệm ở 4°C để loại muối (2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> và 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4). Protein tinh sạch sau đó sẽ được cô lại bằng cột cô protein (Thermo scientific) trong máy ly tâm lạnh ở 4200 vòng/ phút và sau đó sẽ được bổ sung 50% glycerol và bảo quản ở -20°C cho mục đích sử dụng tiếp theo.

Sau khi cô protein p54-pII-tp sẽ được bán định lượng bằng Western blot. Protein p54pII-tp sẽ được tra vào các giếng theo thể tích lần lượt là 3, 5 và 10 µl cùng với dải của protein chuẩn đã được định lượng trước đó (nồng độ các giếng lần lượt là 75, 150, 225, 300, 375 ng). Sau khi hoàn thành protein p54-pII-tp sẽ được định lượng bằng phần mềm ImageQuant TL 1D v8.2.0. Nồng độ protein thu được sau khi tinh sạch là 120 ng/µl. Ngoài ra, qua phân tích bản Western blot hình 3.31 cho thấy protein p54 xuất hiện dải băng vạch rất đậm trên 15 kDa. Điều này cho thấy p54 nghiên cứu có dạng cấu trúc oligomer hoá.



Hình 3.31: Kết quả bán định lượng protein p54-pII-tp bằng Western blot

Protein p54-pII-tp được tinh sạch thông qua sắc ký lọc gel như biểu diễn trong hình 3.32. Các protein p54 nằm trong các phân đoạn từ 11 đến 32, trong đó hầu hết các protein p54 nằm ở phân đoạn 17 đến 26 là các phân số chứa protein tiêu chuẩn có khối lượng phân tử cao. Kết quả này chỉ ra rằng hầu hết các protein p54 tinh sạch là oligomer. Các protein p54 oligomer tinh sạch từ các phân đoạn 17 đến 26 đã được thu nhận và sau đó được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

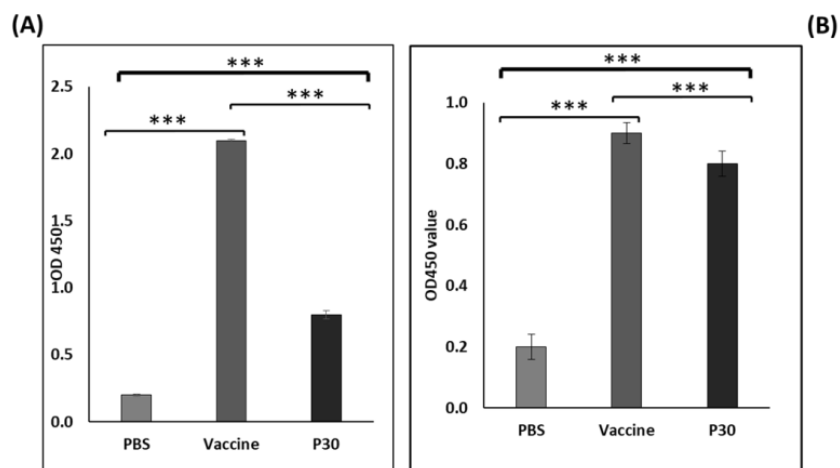


Hình 3.32: Đặc điểm cấu trúc của các protein p54pIItp tinh sạch bởi SEC.

### 3.4. Đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên p30 và p54 tái tổ hợp ASFV tiềm năng trên chuột thí nghiệm.

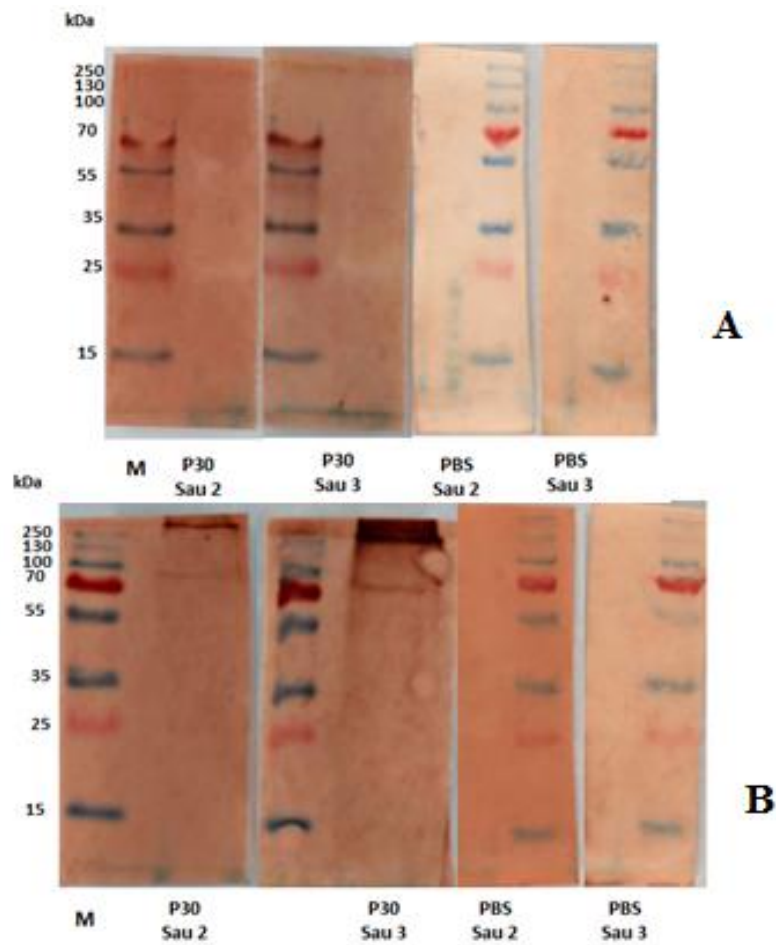
#### 3.4.1. ELISA gián tiếp và Western blot phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên p30pIItp/virus trong huyết thanh.

Kháng nguyên p30-pII-tp được kiểm tra khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể (IgG) đặc hiệu virus ASFV/ kháng nguyên p30 trên chuột bằng cách tiêm chuột với kháng p30-pII-tp tinh sạch. Nhóm 7 con chuột được tiêm dưới da với kháng nguyên p30-pII-tp tinh sạch bằng IMAC. Mỗi con chuột được tiêm với 10  $\mu$ g kháng nguyên tinh sạch 3 lần tại các thời điểm ngày 0, ngày 14, ngày 28. Mẫu huyết thanh chuột được thu sau 7 ngày tiêm lần 2 (ngày 21) và lần 3 (ngày 35). Lượng kháng thể đặc hiệu virus ASFV tạo ra được kiểm tra bằng ELISA gián tiếp. Virus nhược độc được sử dụng như kháng nguyên gắn đĩa, kháng thể 1 là huyết thanh thu từ chuột tiêm p30-pII-tp/PBS (đối chứng âm)/vắc xin ASFV (đối chứng dương) và kháng thể 2 goat antimouse gắn HRP. Tương tác đặc hiệu giữa kháng nguyên kháng thể được nhận biết bằng 1-Step Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) có chứa cơ chất enzyme vào và bổ sung 100  $\mu$ L HCl 1M. Tín hiệu màu (vàng) được đo ở bước sóng OD450. Mỗi mẫu được lặp lại 3 lần. Phân tích T-test được dùng để so sánh kháng thể tạo ra giữa các nhóm chuột. Kết quả cho thấy, nhóm chuột được gây miễn dịch với p30pII-tp tạo kháng thể đặc hiệu với ASFV nhiều hơn đáng kể so với nhóm đối chứng sau cả hai lần tiêm thứ 2 và thứ 3 với  $p < 0.05$  (xem hình 3.33).



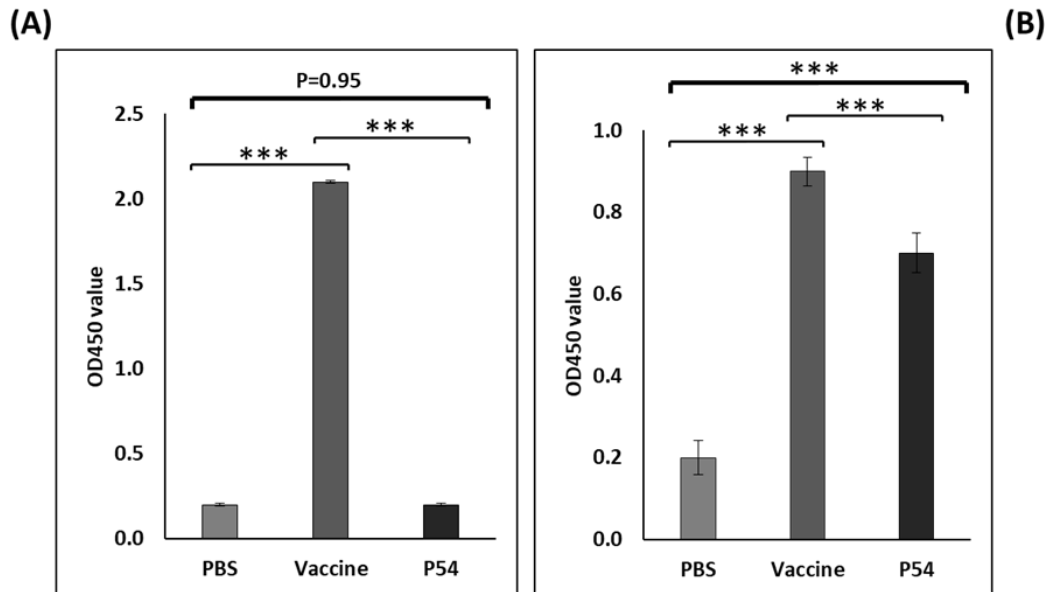
Hình 3.33: Kết quả ELISA gián tiếp đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch kháng thể đặc hiệu với ASFV trên chuột của kháng nguyên p30pII-tp sau 2 (A) và 3 (B) lần tiêm với kháng nguyên tinh sạch. \*\*\* tương đương  $p < 0.05$ .

Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên p30pII-tp được kiểm chứng bằng Western blot (xem hình 3.34). Trong trường hợp kháng nguyên dùng để phủ đĩa chính là virus bất hoạt (xem hình 3.34A) thì chưa có băng đặc hiệu kháng nguyên-kháng thể được phát hiện. Tuy nhiên, nếu thay thế kháng nguyên bằng protein tinh sạch bằng sắc ký lọc gel ta có thể quan sát thấy một cách dễ dàng ở hình 3.34B băng đặc hiệu kháng nguyên- kháng thể. Ở sau lần tiêm thứ 2, băng đặc hiệu này có ở kích thước trên 250 kDa và một băng mờ kích thước xấp xỉ 70 kDa. Nhưng sau 3 lần tiêm, màu sắc các băng đặc hiệu kháng nguyên- kháng thể được thể hiện một cách rất rõ nét. Kết quả này cho thấy hai kết luận như sau: kháng thể đặc hiệu p30-kháng nguyên tinh sạch được nhạy hơn kháng thể đặc hiệu p30- virus. Tương tự khi được phát hiện bằng ELISA tốt hơn là Western blot. Từ đó, chúng tôi kết luận, p30-pII-tp có kích thích sinh kháng thể đặc hiệu với virus ASFV trên chuột thí nghiệm.



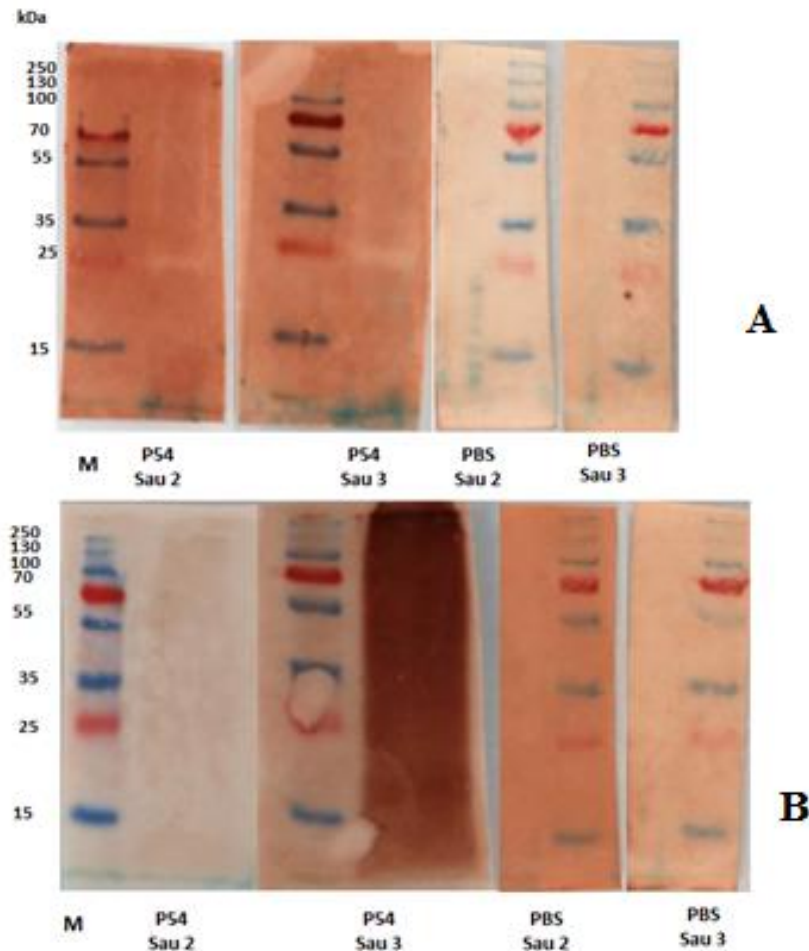
Hình 3.34: Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên p30pII-tp bằng Western blot sau lần tiêm thứ 2 và thứ 3. Sử dụng kháng nguyên là virus bất hoạt (A), p30 tinh sạch (B)

### 3.4.2. ELISA gián tiếp và Western blot phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên p54pII-tp/virus trong huyết thanh.



Hình 3.35: 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 p54pII-tp sau 2 (A) và 3 (B) lần tiêm với kháng nguyên tinh sạch. \*\*\* tương đương  $p < 0.05$ .

p54 là một trong những kháng nguyên virus được sử dụng nhiều nhất trong nghiên cứu tạo vaccine. Trong nghiên cứu này, p54-pII-tp được sản xuất trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* được tinh sạch bằng IMAC và kiểm tra khả năng sinh miễn dịch trên chuột. Nhóm 7 con chuột được tiêm dưới da với kháng nguyên p54 tinh sạch. Mỗi con chuột được tiêm với 10  $\mu$ g kháng nguyên tinh sạch 3 lần tại các thời điểm ngày 0, ngày 14, ngày 28. Mẫu huyết thanh chuột được thu sau 7 ngày tiêm lần 2 (ngày 21) và lần 3 (ngày 35) cho ELISA gián tiếp và Western Blot. Thí nghiệm ELISA gián tiếp sử dụng virus ASFV làm kháng nguyên phủ đĩa, kháng thể 1 là huyết thanh thu được từ nhóm chuột tiêm p54 oligomer/PBS (đối chứng âm)/vắc xin ASFV (đối chứng dương) và kháng thể 2 Goat antimouse-HRP. Tương tác giữa kháng nguyên- kháng thể được nhận biết nhờ cơ chất enzyme tại bước sóng OD450. Kết quả phân tích ELISA cho thấy giá trị OD450 của nhóm chuột tiêm p54-pII-tp không có sự khác biệt đáng kể so với nhóm đối chứng âm tiêm PBS sau lần tiêm thứ 2. Tuy nhiên, sau lần tiêm thứ ba, giá trị OD của nhóm chuột tiêm p54-pII-tp cao hơn đáng kể so với nhóm đối chứng âm với giá trị  $p < 0.05$  (xem hình 3.35).



Hình 3.36: Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên p54-pII-tp bằng Western blot sau lần tiêm thứ 2 và thứ 3. Sử dụng kháng nguyên là virus bất hoạt (A) và p54 tinh sạch (B).

Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên p54-pII-tp cũng được kiểm tra bằng Western blot. Kháng nguyên được sử dụng là virus bất hoạt hoặc protein p54-pII-tp tinh sạch bằng sắc ký lọc gel. Kết quả Hình 3.36A cho thấy băng đặc hiệu với p54 của virus không rõ ràng sau 2 hay 3 lần tiêm. Nhưng khi thay đổi kháng nguyên là protein p54-pII-tp (xem hình 3.26B) thì sau 2 lần tiêm ta có thể thấy các băng đặc hiệu của kháng nguyên- kháng thể xuất hiện theo dải nhưng rất mờ. Sau 3 lần tiêm thì băng đặc hiệu đậm rõ ràng hơn rất nhiều lần và vẫn theo dải từ 10 kDa đến hơn 250 kDa. Từ các kết quả trên chúng ta có thể kết luận rằng huyết thanh ở lần thu máu thứ 2 (sau khi tiêm lần 3) cho thấy p54 oligomer cũng có khả năng kích thích kháng thể đặc hiệu với virus ASFV một cách rất mạnh mẽ. Do đó, chúng ta có thể xác định được p54-pII-tp có tiềm năng kích thích đáp ứng miễn dịch tốt trên chuột.



## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

1. Thiết kế các dạng cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa hai kháng nguyên p30 và p54 ASFV của các chủng virus ASFV đang lưu hành ở Việt Nam dung hợp với các motif trimer, oligomer và tạo chủng *Agrobacterium* mang vector tương ứng.
2. Biểu hiện thành công các protein p30 và p54 tái tổ hợp ASFV trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp biểu hiện tạm thời.
3. Các kháng nguyên p54-pII-tp và p30-pII-tp đã được tinh sạch lượng lớn, xác định được nồng độ và biết được đặc điểm cấu trúc của các protein này thông qua SEC.
4. Đã xác định được các protein kháng nguyên ASFV p30-pII-tp và p54-pII-tp tái tổ hợp có kích thích sinh kháng thể đặc hiệu với virus ASFV trên chuột thí nghiệm.

### KIẾN NGHỊ

Các kháng nguyên p30-pII-tp và p54-pII-tp từ thực vật có tiềm năng cho việc định hướng sản xuất vaccine phòng chống bệnh dịch ASF trên lợn. Vì vậy, cần có những nghiên cứu sâu hơn về p30 và p54 kết hợp cùng với các kháng nguyên khác để đánh giá được khả năng bảo hộ trên lợn.

**DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO**

1. Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D., 2013, African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012, *Virus Research*, 173(1), pp 198–203.
2. OIE Standing Group of Experts on African swine fever in Europe., 2017. African swine fever situation in Romania.
3. Le V.P., Jeong D.G., Yoon S.W., Kwon H.M., Trinh T.B.N., Nguyen T.L., Bui T.T.N., Oh .J., Kim J.B., Cheong K.M., Van Tuyen N., Bae E., Vu T.T.H., Yeom M., Na W., Song D., 2019, Outbreak of African Swine Fever, Vietnam, 2019, *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), pp 1433-1435.
4. <http://chicucntyhcm.gov.vn/new/2019/06/21/Tinh-hinh-dich-benh-dich-ta-heo-Chau-Phi-tren-ca-nuoc-den-20-6-2019.aspx>
5. Moulton J., Coggins L., 1968, Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever, *Cornell University College of Veterinary Medicine*, 58, pp 364–88.
6. Mebus C.A., Dardiri A.H., 1979, Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic, *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*, 1979, pp 227–39.
7. Gomez-Villamandos J.C., Carrasco L., Bautista M.J., Sierra M.A., Quezada M., Hervas J., 2003, African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis, *Deutsche Tierarztliche Wochenschrift*, 110, pp 165–9.
8. Sierra M.A., Carrasco L., Gomez-Villamandos J.C., Martin de las Mulas J., Mendez A., Jover A., 1990, Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with African swine fever virus of differing virulence, *Journal of Comparative Pathology*, 102, pp 323–34.
9. Carrasco L., Nunez A., Salguero F.J., Diaz San Segundo F., Sanchez-Cordon P., Gomez-Villamandos J.C., Sierra M.A., African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages, *Journal of Comparative Pathology*, 126, pp 194–201.

10. Salas M.L., Andrés G., 2013, African swine fever virus morphogenesis, *Virus Research*, 173(1), pp 29-41.
11. Kehui Z., Su L., Sheng L., Shuhong L., Liang Q., George F.G., Hua J.Q., 2021, Spatiotemporally Orchestrated Interactions between Viral and Cellular Proteins Involved in the Entry of African Swine Fever Virus, *Viruses*, 13(12), 2495.
12. Nguyễn Vũ Sơn, Nguyễn Hữu Nam, Bùi Trần Anh Đào, Bùi Thị Tố Nga, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa., 2019, Bệnh dịch tả lợn châu Phi - Tình hình nghiên cứu sản xuất vắc xin và kinh nghiệm ứng phó của các nước, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam 2018*, 16(12), tr. 1131-1142
13. Heath C.M., Windsor M., Wileman T., 2001, Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly, *Journal of Cell Biology*, 153, pp 449–455.
14. Stefanovic S., Windsor M., Nagata K.I., Inagaki M., Wileman T., 2005, Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II, *Journal of Virology*, 79, pp 11766–11775.
15. Andres G., Garcia-Escudero R., Vinuela E., Salas M.L., Rodriguez J.M., 2001, African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity, *Journal of Virology*, 75, pp 6758–6768.
16. Malmquist W.A., 1963, Serologic and immunologic studies with African swine fever virus, *American Journal of Veterinary Research*, 24, 450–459.
17. Ruiz Gonzalvo F., Carnero M.E., Bruyel V., 1983, Immunological responses of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses, In African Swine Fever, Wilkinson P.J., Ed, EUR 8466 EN, Proceedings of CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, Italy, 1981, pp 206–216.
18. Stone S.S., Hess W.R., 1967, Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs, *American Journal of Veterinary Research*, 28(123), pp 475-81.
19. Zsak L., Caler E., Lu Z., Kutish G.F., Neilan J.G., Rock D.L., 1998, A

nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine, *Journal of Virology*, 72, pp 1028–1035.

20. Boinas F.S., Wilson A.J., Hutchings G.H., Martins C., Dixon L.J., 2011, The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal, *PLoS One*, 6:e20383.

21]. Oura C.A., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E., 2005, In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus, *Journal of General Virology*, 86, pp 2445–2450.

22. Burmakina G., Malogolovkin A., Tulman E.R., Zsak L., Delhon G., Diel D.G., Shobogorov N.M., Morgunov Y.P., Morgunov S.Y., 2016, African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever, *Journal of general Virology*, 97, pp 1670–1675.

23. Carmina G., Alejandro S., Angel C., Elena S., Raquel N., Alicia S., Miguel S., Carlos M., Victor B., Yolanda R., 2015, In vivo testing of deletion mutants as candidate vaccines for African swine fever in vaccination/challenge models in pigs, In Proceedings of the 9th Annual Meeting EPIZONE, Montpellier, France, 2–3 September 2015.

24. Carmina G., Alejandro S., Raquel N., Lina M., Covadonga P., Virginia P., Carlos M., José M., Sánchez-Vizcaino., Marisa A., 2012, Protection of European domestic pigs from Armenia virulent African swine fever virus by experimental immunisation using the attenuated and non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68, *In Proceedings of the IX International Congress of Veterinary Virology (ESVV)*, Madrid, Spain, 4–7 September 2012.

25. Paula L., Monteagud., Anna L., Elisabeth L., Laia B., Javier C., Sonia P.P., Florencia C.F., Francesc A., María J.N., 2017, A new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities, *Journal of Virology*.

26. Gallardo C., Soler A., Nieto R., Carrascosa A.L., De Mia G.M., Bishop R.P., Martins C., Fasina F.O., Couacy-Hymman E., Heath L., 2013, Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE

- internationally prescribed serological tests, *Veterinary Microbiology*, 162, pp 32–43.
27. Afonso C.L., Zsak L., Carrillo C., Borca M.V., Rock D.L., 1998, African swine fever virus NL gene is not required for virus virulence, *Journal of General Virology*, 79(10), pp 2543–2547.
28. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F., Rock D.L., 2004, Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection, *Virology*, 319, pp 337–342.
29. Reis A.L., Goatley L.C., Jabbar T., Sanchez-Cordon P.J., Netherton C.L., Chapman D.A.G., Dixon L.K., 2017, Deletion of the African swine fever virus gene DP148R does not reduce virus replication in culture but reduces virus virulence in pigs and induces high levels of protection against challenge, *Journal of Virology*, 91, e01428.
30. Borca M.V., Holinka L.G., Berggren K.A., and Gladue D.P., 2018, CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses, *Scientific reports*, 8, 3154.
31. Okoli A., Okeke M.I., Tryland M., Moens U., 2018, CRISPR/Cas9-Advancing Orthopoxvirus Genome Editing for Vaccine and Vector Development, *Viruses*, 10(1), 50.
32. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., Holinka L.G., Velazquez-Salinas L., Zhu J., Gladue D.P., 2020, Development of a Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine by Deletion of the I177L Gene Results in Sterile Immunity against the Current Epidemic Eurasia Strain, *Journal of Virology* 17, 94(7):e02017-19.
33. Angulo A., Alcamí A., Viñuela E., 1993, Virus-host interactions in African swine fever: the attachment to cellular receptors, *Archives of Virology Supplemeta*, 7, pp 169-83.
34. Barderas M.G., Rodríguez F., Gómez-Puertas P., Avilés M., Beitia F., Alonso C., Escribano J.M., 2001, Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins, *Archives of Virology*, 146(9), pp 1681-91.

35. Ruiz-Gonzalvo F., Rodríguez F., Escribano J.M., 1996, Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus, *Virology*, 1,218(1):285-9.
36. Escribano J.M., Galindo I., 2013, Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts, *Virus Research*, 173(1), pp 101-9.
37. Alonso C., Borca M., Dixon L., Revilla Y., Rodriguez F., Escribano J.M., 2018, Ictv Report, C. ICTV virus taxonomy profile Asfarviridae, *Journal of general Virology*, 99, pp 613–614.
38. Argilaguet J. M., Pérez-Martín E., Nofrarías M., Sanford C., Accensi F., Lacasta A., Rodríguez F., 2012, DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies, *PLoS ONE*, 7, e40942.
39. Lacasta A., Ballester M., Monteagudo P.L., Rodríguez J.M., Salas M.L., Accensi F., Pina-Pedrero S., Bensaid A., Argilaguet J., López-Soria S., Hutet E., Le Potier M.F., Rodríguez F., 2014, Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus, *Journal of Virol*, 88(22), pp 13322-32.
40. Rodriguez F., Ley V., Gómez-Puertas P., García R., Rodriguez J., Escribano J., 1996, The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability, *Virus Research*, 40, pp 161–167.
41. Hernaez B., Escribano J.M., Alonso C., 2006, Visualization of the African swine fever virus infection in living cells by incorporation into the virus particle of green fluorescent protein-p54 membrane protein chimera, *Virology*, 350, pp 1–14.
42. Gallardo C., Blanco E., Rodríguez J.M., Carrascosa A.L., Sanchez-Vizcaino J.M.. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells., 2006, *Journal of Clinical Microbioly*, 44, pp 950–956.
43. Gallardo C., Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M., Taracha E.A., Soler A., Okoth E., Martín E., Kasiti J., Bishop R.P., 2009, Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide

sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes, *Virus Genes*, 38, pp 85–95.

44. Sánchez E.G., Quintas A., Nogal M., Castelló A., Revilla Y., 2013, African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis, *Virus Research*, 173, pp 58–75.

45. Hernaez B., Escribano J.M., Alonso C., 2008, African swine fever virus protein p30 interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k (hnRNP-K) during infection, *Febs Letters*, 582, pp 3275–3280.

46. Oviedo J.M., Rodríguez F., Gómez-Puertas P., Brun A., Gómez N., Alonso C., Escribano J.M., 1997, High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents, *Journal of Virology Methods*, 64, pp 27–35.

47. Cubillos C., Gómez-Sebastian S., Moreno N., Nuñez M.C., Mulumba-Mfumu L.K., Quembo C.J., Heath L., Etter E.M., Jori F., Escribano J.M., 2013, African swine fever virus serodiagnosis: A general review with a focus on the analyses of African serum samples, *Virus Research*, 173, pp 159–167.

48. Giménez-Lirola L.G., Lina M., Belen R., Mark M., Sun Y., Sergio L., Christa G., Hank H.D.L., Rowland R.R.R., Carmina G., 2016, Detection of African swine fever virus antibodies in serum and oral fluid specimens using a recombinant protein 30 (p30) dual matrix indirect ELISA, *Plos One*, 11:e0161230.

49. Argilaguet J.M., Pérez-Martín E., Gallardo C., Salguero F.J., Borrego B., Lacasta A., Accensi F., Díaz I., Nofrarías M., Pujols J., 2011, Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II-bearing cells, *Vaccine*, 29, pp 5379–5385.

50. Argilaguet J.M., Pérez-Martín E., Nofrarías M., Gallardo C., Accensi F., Lacasta A., Mora M., Ballester M., Galindocardi I., López-Soria S., 2012, DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies, *PloS One*, 7:e40942.

51. Goeddel D.V., Kleid D.G., Bolivar F., Heyneker H.L., Yansura D.G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A.D., 1979, Expression

in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 76, pp 106–110.

[52]. Lalonde M.E., Durocher Y., 2017, Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells, *Journal Biotechnology*, 251, pp 128–140.

53. Lindsay B.J., Bonar M.M., Costas-Cancelas I.N., Hunt K., Makarkov A.I., Chierzi S., Krawczyk C.M., Landry N., Ward B.J., Rouiller I., 2018, Morphological characterization of a plant-made virus-like particle vaccine bearing influenza virus hemagglutinins by electron microscopy, *Vaccine*, 36, pp 2147–2154

54. Malm M., Diessner A., Tamminen K., Liebscher M., Vesikari T., Blazevic V., 2019, Rotavirus VP6 as an adjuvant for bivalent norovirus vaccine produced in *Nicotiana benthamiana*, *Pharmaceutics*, 11, pp 229

55. Ward B.J., Séguin A., Couillard J., Trépanier S., Landry N., 2021, 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*, 39, pp 1528–1533.

56. Barta A., Sommergruber K., Thompson D., Hartmuth K., Matzke MA., Matzke A.J., 1986, The expression of a nopaline synthase—Human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue, *Plant Molecular Biology*, 6, pp 347–357

57. <https://protalix.com/technology/procellex-platform/>.

58. Bally J., Nakasugi K., Jia F., Jung H., Ho S.Y.W., Wong M., Paul C.M., Naim F., Wood C.C., Crowhurst R.N., 2015, The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour, *Nature Plants*, 1: 15165.

59. Phan H.T., Pham V.T., Ho T.T., Pham N.B., Chu H.H., Vu T.H., Abdelwhab E.M., Scheibner D., Mettenleiter T.C., Hanh T.X., 2020, Immunization with plant-derived multimeric H5 hemagglutinins protect chicken against highly pathogenic avian influenza virus H5N1, *Vaccines*, 8: 593

60. Tregoning J.S., 2020, First human efficacy study of a plant-derived



influenza vaccine, *The Lancet*, 396, pp 1464–1465.

61. Ward B.J., Makarkov A., Séguin A., Pillet S., Trépanier S., Dhaliwall J., Libman M.D., Vesikari T., Landry N, 2020, Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults ( $\geq 65$  years): Two multicentre, randomised phase 3 trials, *The Lancet*, 396, pp 1491–1503.

62. Fischer R., Emans N., 2000, Molecular farming of pharmaceutical proteins, *Transgenic Research*, 9, pp 279-299.

63. Schillberg S., Fischer R., Emans N., 2003, Molecular farming of recombinant antibodies in plants, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, pp 433-445.

64. Verwoerd T.C., van Paridon P.A., van Ooyen A.J., van Lent J.W., Hoekema A., Pen J., 1995, Stable accumulation of *Aspergillus niger* phytase in transgenic tobacco leaves, *Plant Physiology*, 109, pp 1199-1205.

65. Scheller J., Leps M., and Conrad U., 2006, Forcing single-chain variable fragment production in tobacco seeds by fusion to elastin-like polypeptids, *Plant Biotechnology Journal*, 4: pp 243-249.

66. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J, 1992, Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, pp 11745-11749.

67. Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., 1985, Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium* mediated gene transfer to plants, *Nucleic Acids Research*, 13, pp 4777–4788.

68. Phan H.T., Pohl J., Floss D.M., Rabenstein F., Veits J., Le B.T., Chu H.H., Hause G., Mettenleiter T., Conrad U., 2013, ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice, *Plant Biotechnology Journal*, 11(5), pp 582-593.

68. Phan H.T., Ho T.T, Chu H.H, Vu T.H, Gresch U, Conrad U., (2017), Neutralizing immune responses induced by oligomeric H5N1-hemagglutinins

from plants, *Veterinary Research*, 48.

69. Sambrook J. and Russell D.W., 2006, Transformation of *E. coli* by electroporation, *Cold Spring Harbor Protocols*, 3933.

70. Mersereau M., Pazour G.J. and Das A., 1990, Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation, *Gene*, 90, pp 149-151.

71. Thuong Thi Ho, Giang Thu Nguyen, Ngoc Bich Pham, Van Phan Le, Thi Bich Ngoc Trinh, Trang Huyen Vu, Hoang Trong Phan, Udo Conrad, Ha Hoang Chu., 2020, Plant-Derived Trimeric CO-26K-Equivalent Epitope Induced Neutralizing Antibodies Against Porcine Epidemic Diarrhea Virus, *Frontier in Immunology*, 11.

72. Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), pp 680-685.

73. Burnette W.N., 1981, Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Analytical Biochemistry*, 112(2), pp 195-203.

74. Ho T.T., Trinh V.T., Tran H.X., Le P.T.T., Nguyen T.T., Hoang H.T.T, Pham M.D., Conrad U., Pham N.B., Chu H.H., 2022, 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*, 9, 940395.

75. Phan H.T., Pohl J., Floss D.M., Rabenstein F., Veits J., Le B.T., Chu H.H., Hause G., Mettenleiter T., Conrad U., 2013, ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice, *Plant Biotechnology Journal*, 11(5), pp 582-593.