

**BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO**

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

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Trịnh Thái Vy

**NGHIÊN CỨU THIẾT KẾ, BIỂU HIỆN, TINH SẠCH VÀ
ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG
NGUYÊN H5 VIRUS-LIKE PARTICLE TỪ VIRUS CÚM A/H5N6
TRÊN CÂY THUỐC LÁ *Nicotiana benthamiana* Domin**

LUẬN VĂN THẠC SỸ SINH HỌC THỰC NGHIỆM

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



Trịnh Thái Vy

**NGHIÊN CỨU THIẾT KẾ, BIỂU HIỆN, TINH SẠCH VÀ ĐÁNH GIÁ
HOẠT TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN H5 VIRUS-
LIKE PARTICLE TỪ VIRUS CÚM A/H5N6 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:
PGS.TS. Phạm Bích Ngọc

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.

Hà Nội, ngày 10 tháng 06 năm 2023

Tác giả luận văn

Trịnh Thái Vy

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận văn này, tôi đã nhận được rất nhiều sự giúp đỡ, hỗ trợ nhiệt tình từ các cơ quan, tổ chức và cá nhân. Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới **PGS.TS. Phạm Bích Ngọc** – người hướng dẫn khoa học đã trực tiếp dành nhiều thời gian, công sức hướng dẫn tôi trong quá trình thực hiện nghiên cứu khoa học, luôn cho tôi những lời khuyên vô cùng quý giá về kiến thức chuyên môn. Bên cạnh đó, tôi xin gửi lời cảm ơn đến **Th.S Hồ Thị Thương** – người đồng nghiệp đã đưa ra những góp ý, bình luận rất có giá trị để tôi có được nền tảng kiến thức, hỗ trợ rất lớn cho tôi trong quá trình thực hiện luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng, các thầy cô giáo đang công tác tại Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo điều kiện giúp đỡ, truyền đạt những kiến thức chuyên sâu về chuyên ngành trong suốt thời gian học tập và hết sức giúp đỡ để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới các đồng nghiệp phòng Công nghệ ADN Ứng dụng - Viện Công nghệ Sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, những người đã tận tình dạy dỗ, chỉ bảo, truyền đạt những kiến thức quý báu, luôn tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong cả quá trình công tác và nghiên cứu.

Tôi kính mong quý thầy cô, những người quan tâm đến đề tài, gia đình và bạn bè tiếp tục có những ý kiến đóng góp, giúp đỡ để đề tài được hoàn thiện hơn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ.....	vii
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	ix
MỞ ĐẦU.....	1
Mục tiêu nghiên cứu.....	2
Nội dung nghiên cứu	2
Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
1.1. GIỚI THIỆU VỀ BỆNH CÚM GIA CẦM.....	3
1.1.1. Lịch sử hình thành và bùng phát dịch bệnh trên thế giới	3
1.1.2. Thực trạng bệnh cúm gia cầm tại Việt Nam	5
1.1.3. Đặc điểm dịch tễ của bệnh cúm gia cầm.....	6
1.2.....TỔNG QUAN VỀ TÁC NHÂN GÂY BỆNH CÚM GIA CẦM -VIRUS CÚM A.....	8
1.2.1. Cấu trúc đặc trưng của virus gây bệnh cúm gia cầm.....	8
1.2.1.1. <i>Phân loại virus cúm</i>	8
1.2.1.2. <i>Cấu trúc của hạt virus cúm A và thành phần hệ gene</i>	9
1.2.2. Phương thức lây truyền của virus cúm A	11
1.2.3. Phân loại các chủng cúm A đã xuất hiện trên thế giới	13
1.3. CÁC BIỆN PHÁP PHÒNG DỊCH CÚM GIA CẦM HIỆN NAY.....	14
1.3.1. Những đóng góp trong phòng bệnh cúm gia cầm của vắc-xin.....	14
1.3.2. Tiềm năng sản xuất vắc-xin thực vật từ hạt giả virus (VLP)	16
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	19

2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	19
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	19
2.2.1. Phương pháp thu thập thông tin lựa chọn gen mã hóa protein H5, tối ưu mã biểu hiện	19
2.2.2. Thiết kế các cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5-VLP, kháng nguyên H5-GCN4pII, kháng nguyên H5-GCN4pII-tp và tạo chủng <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mang vector tương ứng	19
2.2.2.1. Phương pháp tạo cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5-VLP	19
2.2.2.2. Phương pháp tạo cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5 dạng trimer pII và H5 dạng oligomer pII-tp.....	21
2.2.2.3. Phương pháp tạo chủng khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mang vector chuyển gen pCB301 tương ứng.....	22
2.2.3. Phương pháp biểu hiện tạm thời kháng nguyên tái tổ hợp ở thực vật bằng agroinfiltration.....	22
2.2.4. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Western blot	23
2.2.5. Tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp H5-VLP , H5-GCN4pII và H5-GCN4pII-tp	24
2.2.6. Phương pháp đánh giá đặc điểm cấu trúc và hoạt tính sinh học của protein kháng nguyên tinh sạch H5 tái tổ hợp.....	24
2.2.6.1. Xác định đặc điểm cấu trúc protein bằng phương pháp Size exclusion chromatography (SEC).....	24
2.2.6.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của kháng nguyên H5 tái tổ hợp bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu	25
2.2.7. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột.....	25
2.2.8. Đánh giá tính sinh miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu trên chuột bằng phản ứng ELISA gián tiếp	25
2.2.9. Phương pháp xử lý thống kê.....	26

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	27
3.1. THIẾT KẾ CÁC CẤU TRÚC VECTOR TÁCH DÒNG VÀ VECTOR BIỂU HIỆN MANG GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN H5-VLP, KHÁNG NGUYÊN H5-GCN4PII, H5-GCN4PII-TP VÀ TẠO CHỦNG <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> MANG VECTOR TƯƠNG ỨNG.	27
3.2.1. Tổng hợp nhân tạo gen mã hoá kháng nguyên H5 của virus cúm A/H5N6 gây bệnh ở Việt Nam.....	27
3.2.2. Tạo chủng <i>Agrobacterium</i> mang vector biểu hiện mã hóa kháng nguyên H5-VLP	27
3.2.3. Tạo chủng <i>Agrobacterium</i> mang vector biểu hiện mã hóa kháng nguyên H5-GCN4pII và kháng nguyên H5-GCN4pII-tp	31
3.2. BIỂU HIỆN TẠM THỜI CỦA CÁC KHÁNG NGUYÊN H5 (H5N6) TÁI TỔ HỢP TRÊN CÂY THUỐC LÁ <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i> BẰNG AGROINFILTRATION.....	36
3.3. TINH SẠCH PROTEIN TÁI TỔ HỢP H5 TRIMER, OLIGOMER VÀ H5-VLP	42
3.3.1. Tinh sạch kháng nguyên H5 dung hợp cấu trúc pII và pII-tp bằng sắc kí ái lực kim loại cố định (IMAC).....	42
3.3.2. Tinh sạch kháng nguyên H5-VLP.....	46
3.4. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP H5 TRÊN CHUỘT THÍ NGHIỆM.....	48
3.4.1. Đánh giá khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu bằng phản ứng ELISA và Western blot.....	49
3.4.2. Đánh giá khả năng kích thích sản sinh kháng thể đặc hiệu bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI).....	52
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	53
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	54
PHỤ LỤC	61

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

<i>Từ viết tắt</i>	<i>Nghĩa Tiếng Anh</i>	<i>Nghĩa Tiếng Việt</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	
DAB	Diaminobenzidine	
dNTP	Deoxyribo nucleotide triphosphate	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
Hc-Pro	Helper component protease	Protein hỗ trợ
His	Histidine	
IgG	Immunoglobulin G	
KDEL	ER retrieval signal	
LB	Luria-Bertani medium	Môi trường nuôi khuẩn (Luria-Bertani)
OD	Optical density (mật độ quang)	
PBS	Phosphate-buffered saline	
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis	
v/p	vòng/phút	Vòng/phút
VLP	Virus like particle	Hạt giả virus

DANH MỤC CÁC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1. Bản đồ về các chủng virus cúm gia cầm lưu hành ở Đông và Đông Nam Á xuất hiện từ năm 2013 [11].	5
Hình 1.2. Bản đồ các tỉnh, thành phố có ổ dịch cúm A/H5N6 tại Việt Nam vào năm 2020 [12].	6
Hình 1.3. Cấu trúc của virus cúm A	10
Hình 1.4. Sự giống nhau về mặt di truyền của virus H5 nhánh 2.3.4.4 ở Đông và Đông Nam Á [11].	14
Hình 1.5. Hình chụp cấu trúc H5-VLP của chủng cúm A/H5N1 bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) [53].	17
Hình 3.1. Sơ đồ cấu trúc vector tách dòng pRTRA_H5_VLP	28
Hình 3.2. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA_H5_VLP	28
Hình 3.3. Kết quả thiết kế vector biểu hiện pCB301_H5_VLP	29
Hình 3.4. Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện pCB301_H5_VLP	30
Hình 3.5. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA mang gen mã hóa protein H5 dạng trimer và oligomer	31
Hình 3.6. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA mang gen mã hóa protein H5 dạng trimer và oligomer	33
Hình 3.7. Kết quả thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên H5 cấu trúc dạng trimer (GCN4pII) và cấu trúc dạng oligomer (GCN4pII-tp)	34
Hình 3.8. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa protein H5 dạng trimer và oligomer	35
Hình 3.9. Ảnh lá thuốc lá sau 5, 6, 7 ngày biến nạp cấu trúc H5 trimer, H5 oligomer và H5-VLP	36
Hình 3.10. Đồ thị đường chuẩn của protein bằng phương pháp Bradford	38
Hình 3.11. Mức độ biểu hiện của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp trong dịch chiết từ lá cây thuốc lá sau 5, 6, 7 ngày biến nạp	40
Hình 3.12. Kiểm tra hoạt tính sinh học của kháng nguyên H5 tái tổ hợp bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA)	41
Hình 3.13. Kết quả Western Blot và điện di SDS-PAGE kiểm tra quá trình tinh sạch các protein H5 trimer (A) và H5 oligomer (B) bằng IMAC	43
Hình 3.14. Kết quả tinh sạch protein H5 trimer (A) và H5 oligomer (B) trimer bằng SEC	44
Hình 3.15. Định lượng protein H5 trimer và H5 oligomer tinh sạch SEC bằng	

Western Blot.....	45
Hình 3.16. Đường chuẩn định lượng được xây dựng từ protein HA bằng phần mềm.....	45
Hình 3.17. Dịch chiết thô chứa kháng nguyên H5-VLP trước (A) và sau (B) khi tinh sạch bằng đệm sucrose kết hợp siêu ly tâm.....	46
Hình 3.18. Biểu hiện của kháng nguyên H5-VLP tinh sạch bằng sucrose. ...	47
Hình 3.19. Hình chụp hạt giả virus của kháng nguyên H5 thuộc chủng cúm A/H5N6 (A) và hạt giả virus của kháng nguyên H5 thuộc chủng cúm A/H5N1 (B) [53].....	47
Hình 3.20. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp và bán định lượng mẫu kháng nguyên bằng Western Blot.....	48
Hình 3.21. Kết quả đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu trên các huyết thanh chuột được tiêm bằng phản ứng ELISA.....	50
Hình 3.22. Đánh giá đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu ở chuột được tiêm bằng phản ứng Western blot.	51

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng xử lý DNA bằng 2 enzyme cắt giới hạn <i>NcoI</i> và <i>NotI</i>	20
Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR khuôn lạc.....	20
Bảng 2.3. Chu kì nhiệt cho phản ứng PCR khuôn lạc	20
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại gen ecto H5	21
Bảng 2.5. Chu kì nhiệt cho phản ứng PCR khuếch đại gen ecto H5.....	21
Bảng 3.1. Giá trị nồng độ protein chuẩn BSA đo tại bước sóng 595 nm.....	37
Bảng 3.2. Kết quả xác định hàm lượng protein tổng số trong mẫu dịch chiết lá bằng phương pháp Bradford	38
Bảng 3.3. Hiệu giá kháng thể HI và kết quả bảo hộ chéo chủng của kháng nguyên H5 tái tổ hợp	52

MỞ ĐẦU

Cúm gà (Avian influenza) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính của các loài chim, kể cả gia cầm và thủy cầm, do các phân nhóm khác nhau thuộc nhóm virus cúm A (Influenzavirus A), họ *Orthomyxoviridae* gây nên. Những loài chim di cư cũng mang mầm bệnh và thường không biểu hiện triệu chứng lâm sàng và bệnh tích, do chúng có sức đề kháng tự nhiên. Những loài thủy cầm mang mầm bệnh cho dù là biến chủng có độc lực cao hay thấp, nhưng có khi không biểu hiện tiến triển bệnh, nên chúng là mối nguy hiểm lan truyền cho các loài gia cầm khác và cung cấp nguồn tàng trữ biến đổi nguồn gen tạo nên các phân nhóm mới của virus cúm A mới. Những chủng cúm đó khi đã thích ứng trên người dẫn đến gây bệnh, trước đây bùng phát những vụ dịch lớn, rồi biến mất sau một thời gian lại tái hiện và gây nên đại dịch mới. Cho đến nay biến chủng virus A có cấu trúc kháng nguyên H5 được xem là loại có độc lực cao gây bệnh ở gia cầm và trên người, cụ thể là biến chủng tái tổ hợp phân nhóm H5N6.

Hạt giả virus (Virus-Like Particle – VLP) hiện nay được biết đến như một ứng viên tiềm năng trong những hướng tạo vắc-xin để chủng ngừa chống lại các tác nhân lây nhiễm khác nhau. VLPs có tính sinh miễn dịch cao và có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào bằng những con đường khác với con đường gây ra bởi vắc-xin virus bất hoạt thông thường. Ưu điểm của dạng cấu trúc VLP là thiếu vật liệu di truyền cốt lõi khiến chúng không thể lây nhiễm cũng như nhân bản nên rất an toàn. Thêm vào đó, dạng cấu trúc này có kích thước tương tự virus nên vắc-xin VLP đáp ứng sinh miễn dịch và hiệu quả phòng bệnh cao.

Đề tài lựa chọn mô hình biểu hiện protein tái tổ hợp tạm thời ở thực vật để có thể sản xuất vắc-xin với số lượng lớn, nhanh chóng (1-2 tháng) và hàm lượng protein tái tổ hợp dạng cấu trúc giả virus thu được ở mức độ cao. Với mục đích tạo tiền đề nghiên cứu cơ sở khoa học và thực nghiệm cho khả năng sản xuất vắc-xin cúm A/H5N6 từ thực vật và căn cứ vào các luận cứ khoa học trên, tôi đã lựa chọn đề tài “Nghiên cứu thiết kế, biểu hiện, tinh sạch và đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của kháng nguyên H5 Virus-Like Particle từ virus cúm A/H5N6 trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* Domin.”

Mục tiêu nghiên cứu

Thiết kế và biểu hiện thành công các dạng H5-VLP của virus cúm A/H5N6 trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* Domin bằng phương pháp biểu hiện tạm thời, đồng thời chứng minh được H5-VLP có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tương thích với kháng nguyên tự nhiên trên chuột.

Nội dung nghiên cứu

Thiết kế các cấu trúc vector tách dòng và vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5-VLP, kháng nguyên H5-GCN4pII, H5-GCN4pII-tp và tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* mang vector tương ứng.

Biểu hiện các kháng nguyên tái tổ hợp trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* Domin bằng phương pháp biểu hiện tạm thời.

Tinh sạch kháng nguyên H5 tái tổ hợp bằng phương pháp thích hợp và xác định đặc điểm cấu trúc của kháng nguyên H5-VLP.

Đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp tương thích với kháng nguyên tự nhiên trên chuột nhắt trắng.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Dịch cúm A/H5N6 đã và đang gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng đối với ngành chăn nuôi gia cầm ở nhiều quốc gia trên thế giới cũng như Việt Nam. Nghiên cứu phát triển vắc-xin không những ngăn ngừa làm giảm được bệnh ở gia cầm, mà còn khống chế nguồn truyền lây của loại virus nguy hiểm này sang người. Những biến đổi di truyền liên tục của virus cúm A/H5N6 độc lực cao là lý do mà chúng ta luôn phải nghiên cứu để tìm ra vắc-xin phòng bệnh hiệu quả nhất. Vắc-xin thế hệ mới được sản xuất từ hệ thống thực vật được xem là loại vắc-xin tiềm năng có thể thay thế các vắc-xin truyền thống. Trong đó, vắc-xin cúm ở thực vật sử dụng các hạt giống virus (virus-like particles, VLP) dựa trên hemagglutinin được biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* Domin mang những ưu điểm vượt trội và có khả năng chủ động tạo ra lượng vắc-xin đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng trong thời gian ngắn, đối phó với đại dịch khi xảy ra bùng phát trên diện rộng.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. GIỚI THIỆU VỀ BỆNH CÚM GIA CẦM

1.1.1. Lịch sử hình thành và bùng phát dịch bệnh trên thế giới

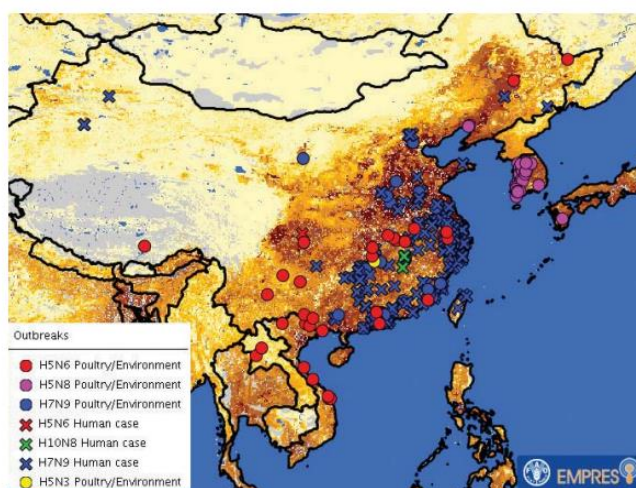
Bệnh cúm hay bệnh cúm gia cầm lần đầu tiên được phát hiện như là bệnh dịch tả gia cầm và được Perroncito công bố vào những năm đầu thập niên 1990 ở Ý. Các triệu chứng của bệnh có thể bị nhầm lẫn với dạng nhiễm trùng huyết cấp tính của bệnh tụ huyết trùng gia cầm [1]. Đại dịch cúm đầu tiên được ghi lại vào năm 1510, bắt đầu ở Đông Á trước khi lan sang Bắc Phi và sau đó là Châu Âu. Tiếp sau đó, bệnh cúm theo mùa xảy ra với các đại dịch tiếp theo vào năm 1557 và 1580 [2]. Đại dịch cúm năm 1557 có khả năng là lần đầu tiên bệnh cúm có liên quan đến sảy thai và tử vong ở phụ nữ mang thai. Vào năm 1580, bắt nguồn từ châu Á trong mùa hè tiếp đến lan sang châu Phi, sau đó là châu Âu và cuối cùng là châu Mỹ [3]. Đại dịch cúm đầu tiên của thế kỷ 18 bắt đầu vào mùa xuân năm 1729 ở Nga, lan rộng ra toàn thế giới trong vòng ba năm với các đợt rõ rệt, những đợt sau gây chết người nhiều hơn. Đại dịch cúm thứ hai của thế kỷ 18 diễn ra vào năm 1781–1782, bắt đầu ở Trung Quốc vào mùa thu [4]. Cúm gia cầm độc lực cao được ghi nhận xuất hiện vào năm 1878 và nhanh chóng được cho là có liên quan đến việc lây truyền sang người [5]. Từ năm 1918 đến năm 1920, đại dịch cúm Tây Ban Nha trở thành đại dịch cúm tàn khốc nhất và là một trong những đại dịch nguy hiểm nhất trong lịch sử. Nguyên nhân dịch bệnh được phát hiện có thể do virus cúm A/H1N1 gây ra, bắt đầu ở Hoa Kỳ trước khi lan rộng ra toàn thế giới thông qua binh lính trong và sau Thế chiến thứ nhất [3]. Đến cuối năm 1920, người ta ước tính rằng khoảng một phần ba đến một nửa số người trên thế giới đã bị nhiễm bệnh, với hàng chục triệu người chết, phần lớn là thanh niên [6]. Trong Chiến tranh thế giới thứ hai, chính phủ Hoa Kỳ đã nghiên cứu phát triển vắc-xin bất hoạt cho bệnh cúm, dẫn đến vắc-xin cúm đầu tiên được cấp phép vào năm 1945 tại Hoa Kỳ. Theo thống kê từ 1957 đến năm 1958, dịch bệnh do chủng A/H2N2 gây ra và bắt đầu ở tỉnh Vân Nam của Trung Quốc đã có số người chết vượt quá một triệu người, chủ yếu là những người già và trẻ nhỏ [3]. Năm 1968, chủng A/H3N2 lây lan sang người thông qua sự biến đổi giữa chủng H3N2 ở gia cầm và chủng H2N2 đang lưu hành ở người. Chủng H3N2 mới xuất hiện ở Hồng Kông và lan rộng ra toàn thế giới, gây ra đại dịch cúm Hồng Kông, dẫn đến

500.000–2.000.000 ca tử vong [7]. Cho đến nay chỉ có hai biến chủng virus A có cấu trúc kháng nguyên H5 và H7 được xem là loại có độc lực cao gây bệnh ở gia cầm và trên người, từ đó chúng đã hình thành nhiều chủng tái tổ hợp phân type như H5N1, H5N6, H5N8, H7N3, H7N7, H7N9, ... Năm 1996, dịch cúm A/H5N1 được phát hiện ở Quảng Đông, Trung Quốc và một năm sau đó xuất hiện trên gia cầm ở Hồng Kông, dần dần lan rộng ra toàn thế giới. Sau đó, một đợt bùng phát H5N1 trên người ở Hồng Kông diễn ra và các ca bệnh lẻ tẻ ở người được ghi nhận từ năm 1997, gây nên tỷ lệ tử vong cao [8]. Vào năm 2011, cúm gia cầm H7N9 được phát hiện ở Trung Quốc và bắt đầu lây nhiễm sang người từ năm 2013, bắt đầu ở Thượng Hải và An Huy và phần lớn còn lại tại Trung Quốc. Các phân nhóm khác như H5N1-3, H5N5-6 và H5N8 đã bắt đầu lây lan trên khắp thế giới kể từ những năm 2010.

Theo thống kê của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) từ tháng 1 năm 2003 đến ngày 16 tháng 9 năm 2021, đã có 863 trường hợp người nhiễm vi rút gia cầm cúm A/H5N1 được báo cáo từ 18 quốc gia. Trong số 863 trường hợp này, 456 trường hợp tử vong (tỉ lệ là 53%). Các trường hợp cuối cùng được báo cáo từ Ấn Độ vào tháng 7 năm 2021. Tháng 3/2013, dịch cúm gia cầm A/H7N9 xuất hiện tại Trung Quốc gây ra tổng trong số 456 trường hợp ở người và cướp đi 172 sinh mạng kể từ ngày 05 tháng 11 năm 2014. Virus ở mức thấp và không có dấu hiệu lâm sàng nào được quan sát thấy ở những con chim bị nhiễm bệnh) nhưng chúng có thể gây ra nhiễm trùng phổi gây chết người ở động vật có vú mà không có sự thích nghi giữa các loài trước đó [9].

Theo báo cáo của OIE, các đợt bùng phát bệnh ở gia cầm do H5N6 độc lực cao được ghi nhận tại Trung Quốc, Lào và Việt Nam vào đầu tháng 5 năm 2014. Không giống như những chủng cúm trước đây, chủng H5N6 tại châu Á nổi lên là một chủng với độc lực gây bệnh rất cao, đi kèm các dấu hiệu lâm sàng ở gia cầm và các bệnh ở người dẫn đến tử vong. Trường hợp nhiễm bệnh và được phát hiện tử vong đầu tiên trên người do phân nhóm cúm gia cầm H5N6 là bệnh nhân 49 tuổi tại tỉnh Tứ Xuyên, Trung Quốc. Người này đã tiếp xúc với gia cầm chết rồi mắc bệnh với các triệu chứng sốt, ho, đau đầu, viêm phổi và qua đời vào ngày thứ 10 sau khi nhiễm bệnh. Ổ dịch gia cầm đầu tiên gây ra bởi H5N6 đã được báo cáo tại thành phố Nanchong, tỉnh Tứ Xuyên, Trung Quốc vào ngày 4 tháng 5 năm 2014 [10]. Ít lâu sau, tại Lào và Việt Nam

đều báo cáo hai và bảy ổ dịch gia cầm H5N6 tương ứng đều xảy ra trong năm 2014. Không chỉ vậy, Trung Quốc thông báo cho OIE vào năm 2014, trong số 24 ổ dịch phát hiện dương tính ở gia cầm hoặc môi trường thì có tới 12 ổ dịch H5N6 khác nhau tại các tỉnh từ Hắc Long Giang ở phía đông bắc của Trung Quốc xuống Tây Tạng ở phía tây nam. Điều này cho thấy rằng dịch cúm A/H5N6 đã lây lan nhanh và khá phổ biến ở Đông Á [11].



Hình 1.1. Bản đồ về các chủng virus cúm gia cầm lưu hành ở Đông và Đông Nam Á xuất hiện từ năm 2013 [11].

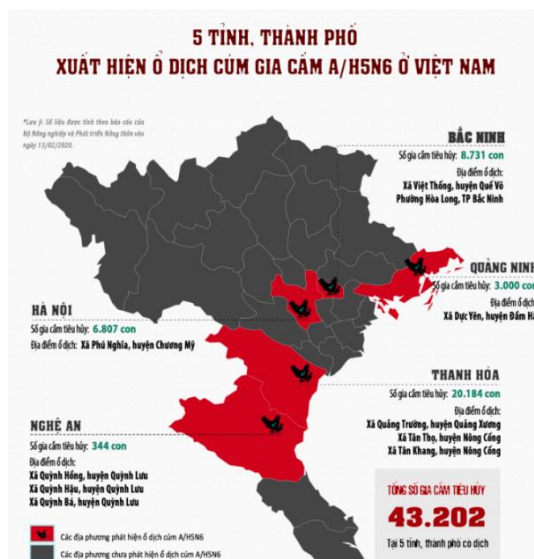
1.1.2. Thực trạng bệnh cúm gia cầm tại Việt Nam

Việt Nam là một trong những nước bị ảnh hưởng nặng nề bởi cúm A/H5N1. Trên bản đồ dịch cúm gia cầm của thế giới, nước ta là một điểm nóng nhất vì đã trải qua gần 10 năm, mầm bệnh vẫn còn khả năng tái phát dịch rất cao. Theo thống kê của Tổ chức Y tế Thế giới vào năm 2014, giai đoạn từ năm 2003 đến tháng 2 năm 2014, tại Việt Nam có 2707 điểm bùng dịch lớn nhỏ trên hầu hết các tỉnh, thành phố làm tổn thất 50 triệu gia cầm bị chết hoặc bị thiêu hủy, đặc biệt nghiêm trọng có tới 125 trường hợp lây nhiễm bệnh phát hiện ở người, trong đó số người tử vong đã lên tới 62 người. Thiệt hại về mặt kinh tế ước tính khoảng 5.000 tỷ đồng.

Trước năm 2014 ghi nhận sự có mặt của virus A/H5N6 tuy nhiên chúng không ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành công nghiệp gia cầm và chưa có liên quan đến sức khỏe cộng đồng. Riêng tại Việt Nam, virus cúm A/H5N6 phát dịch đầu tiên với 7 ổ dịch xảy ra tại Lạng Sơn, Hà Tĩnh, Lào Cai, Quảng Trị, Quảng Ngãi và Quảng Nam. Trong giai đoạn 2018 - 2020, các dịch cúm

gia cầm do virus A/H5N6 lại có xu hướng tăng mạnh mẽ. Theo Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn, trong năm 2020, cả nước có 10 ổ dịch cúm gia cầm chủng H5N6, buộc phải tiêu hủy 43.202 con gia cầm tại 5 tỉnh thành phố: Bắc Ninh, Hà Nội, Quảng Ninh, Thanh Hóa và Nghệ An. So sánh trình tự gen của mẫu virus cúm A/H5N6 tại Việt Nam với chủng cúm gây bệnh tại Trung Quốc nhận thấy có sự tương đồng đến 99%.

Trong quá khứ và hiện tại, Việt Nam là một trong những nước bị ảnh hưởng nặng nề bởi các đợt dịch cúm. Dù đến nay chưa ghi nhận trường hợp lây nhiễm cúm H5N6 từ người sang người, tuy nhiên mức độ lây lan nhanh và ảnh hưởng của dịch cúm đặt ra vấn đề cần thiết nghiên cứu chủ động sản xuất vắc-xin do đây là chủng virus mới, chưa có vắc-xin phòng bệnh, hiện nay cũng không có thuốc điều trị đặc hiệu nên người khi mắc bệnh dễ lây lan và bùng phát thành dịch, khó khăn trong công tác điều trị.



Hình 1.2. Bản đồ các tỉnh, thành phố có ổ dịch cúm A/H5N6 tại Việt Nam vào năm 2020 [12].

1.1.3. Đặc điểm dịch tễ của bệnh cúm gia cầm

Bệnh ở người do nhiễm virus cúm gia cầm có nhiều mức độ nghiêm trọng từ không có triệu chứng hoặc bệnh nhẹ đến bệnh nặng dẫn đến tử vong. Chủng H7N9 và cúm gia cầm độc lực cao như các loại virus H5N1, H5N6 là nguyên nhân gây ra hầu hết bệnh tật ở người do virus cúm gia cầm trên toàn thế giới cho đến nay, bao gồm các bệnh nặng nhất và bệnh có tỷ lệ tử vong cao nhất. Các dấu hiệu và triệu chứng được báo cáo về nhiễm bệnh ở người

thay đổi từ không có triệu chứng hoặc bệnh nhẹ, chẳng hạn như đỏ mắt (viêm kết mạc) hoặc các triệu chứng hô hấp trên giống như cúm nhẹ, đến nặng như viêm phổi cần nhập viện và kèm theo sốt cao 37,8°C hoặc cao hơn. Các dấu hiệu và triệu chứng ít phổ biến hơn bao gồm tiêu chảy, buồn nôn, nôn hoặc co giật. Đặc biệt, chủng virus cúm A/H5N1 gây tỷ lệ tử vong rất cao cả ở gia cầm và người. Khi bệnh trở nặng, cơ thể bị suy sụp và nhanh chóng tử vong do hiện tượng tăng cytokine không kiểm soát, mất cân bằng điều hòa miễn dịch [13].

Những người bị nhiễm bệnh có thể truyền virus cúm qua hơi thở, nói chuyện, ho và hắt hơi, làm phát tán các giọt hô hấp và khí dung có chứa các hạt virus vào không khí. Sau đó, người dễ bị nhiễm trùng có thể mắc bệnh cúm khi tiếp xúc với các hạt này [14]. Hít phải khí dung có thể dẫn đến nhiễm trùng, nhưng hầu hết sự lây truyền bệnh là trong khu vực khoảng hai mét xung quanh người bị nhiễm bệnh qua các giọt hô hấp, tiếp xúc với niêm mạc của đường hô hấp trên [15, 16]. Cúm thường lây truyền từ một ngày trước khi xuất hiện các triệu chứng cho đến 5–7 ngày sau đó. Ở người trưởng thành khỏe mạnh, virus thải ra trong tối đa 3–5 ngày. Ở trẻ em và những người bị suy giảm miễn dịch, virus có thể lây truyền trong vài tuần [17]. Virus cúm lây nhiễm đường hô hấp trên như H1N1 có xu hướng nhẹ hơn nhưng dễ lây lan hơn, trong khi những virus lây nhiễm đường hô hấp dưới như H5N1 có xu hướng gây bệnh nặng hơn nhưng ít lây lan hơn [16].

Các triệu chứng của bệnh xuất hiện trên gia cầm thay đổi và bị chi phối bởi độc lực của virus, loài mắc bệnh, tuổi, thời gian tác động và điều kiện môi trường [18]. Gia cầm mắc bệnh có thời gian ủ bệnh từ vài giờ đến 21 hoặc 28 ngày. Triệu chứng xảy ra quan sát được bằng mắt thường là bệnh thân nhiệt cao, chảy nước mắt, đứng tụm một chỗ, lông xù, phù đầu và mắt, da tím tái, xuất huyết cẳng chân. Điều đó dẫn đến làm giảm hoạt động, giảm tiêu thụ thức ăn. Những triệu chứng trên có thể xảy ra cùng một lúc hoặc riêng rẽ. Tỷ lệ gia cầm chết cao, có khi đến gần 100%. Các biến đổi bệnh tích ở gan và vịt cũng giống như trên gà. Tuy nhiên tần suất biến đổi tập trung chủ yếu ở các cơ quan phổi, túi khí, tim, buồng trứng, xương lồng ngực, cơ quan sinh sản và đường ruột [19, 20].

1.2. TỔNG QUAN VỀ TÁC NHÂN GÂY BỆNH CÚM GIA CẦM - VIRUS CÚM A

1.2.1. Cấu trúc đặc trưng của virus gây bệnh cúm gia cầm

1.2.1.1. Phân loại virus cúm

Virus cúm được phân thành bốn loài. Mỗi loài trong số bốn loài là thành viên duy nhất trong chi riêng của nó và bốn chi cúm bao gồm bốn trong số bảy chi thuộc họ *Orthomyxoviridae*. Đó là: virus cúm A (IAV) - chi *Alphainfluenzavirus*; virus cúm B (IBV) - chi *Betainfluenzavirus*; virus cúm C (ICV) - chi *Gammainfluenzavirus* và virus cúm D (IDV) - chi *Deltainfluenzavirus*.

Virus cúm A gây nên hầu hết các trường hợp bệnh nặng cũng như các dịch bệnh theo mùa và các đại dịch không thường xuyên. Nó lây nhiễm cho mọi người ở mọi lứa tuổi nhưng có xu hướng gây bệnh nặng ở người già, trẻ nhỏ và những người có vấn đề sức khỏe mãn tính. Chim là ổ chứa chính của IAV, đặc biệt là các loài chim sống dưới nước như vịt, ngỗng, chim biển và mòng biển, nhưng virus này cũng lưu hành giữa các động vật có vú, bao gồm lợn, ngựa và động vật có vú ở biển [21, 22]. Virus cúm B chủ yếu lây nhiễm cho người nhưng đã được xác định ở hải cẩu, ngựa, chó và lợn. IBV góp phần gây ra dịch bệnh theo mùa cùng với IAV nhưng chưa bao giờ liên quan đến đại dịch [23]. Virus cúm C, giống như IBV, chủ yếu được tìm thấy ở người, mặc dù nó cũng được phát hiện ở lợn, chó hoang, lạc đà một bướu, gia súc và chó nhà. ICV khi lây nhiễm trên người chủ yếu ảnh hưởng đến trẻ em và thường không có triệu chứng [17] hoặc có các triệu chứng giống như cảm lạnh nhẹ, mặc dù có thể xảy ra các triệu chứng nghiêm trọng hơn như viêm dạ dày ruột và viêm phổi [24]. Không giống như IAV và IBV, ICV không phải là trọng tâm chính của nghiên cứu liên quan đến thuốc kháng virus, vắc-xin và các biện pháp khác chống lại bệnh cúm. Virus cúm D đã được phân lập từ lợn và gia súc. Bệnh được quan sát thấy ở ngựa, lạc đà một bướu và động vật nhai lại nhỏ như dê và cừu nhưng không được biết là lây nhiễm hoặc gây bệnh cho người.

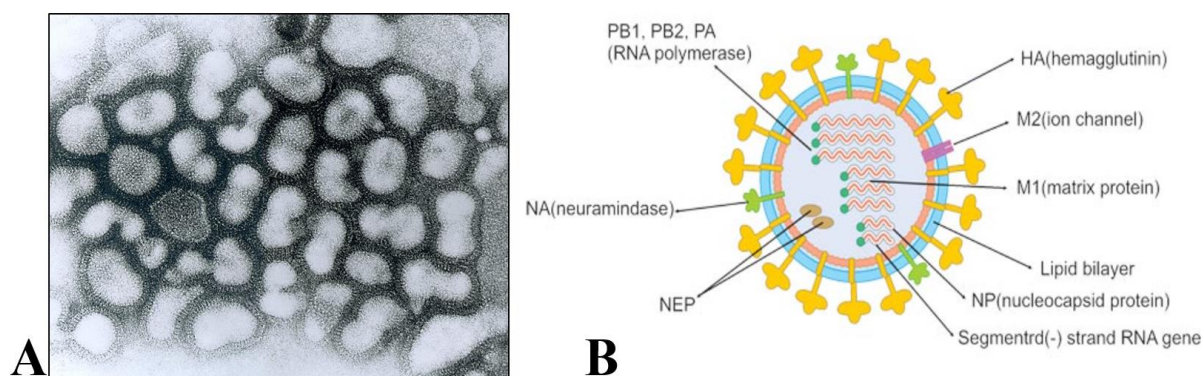
1.2.1.2. Cấu trúc của hạt virus cúm A và thành phần hệ gene

Virus cúm A có cấu trúc rất giống với virus cúm loại B, C và D. Hạt virus (còn gọi là virion) có hình elip với đường kính 80–120 nanomet. Chiều dài của mỗi hạt thay đổi đáng kể, do thực tế là virus cúm đa hình và có thể dài hơn nhiều chục micromet, tạo ra virion dạng sợi [25]. Sự nhầm lẫn về bản chất đa hình virus cúm bắt nguồn từ việc các nhà nghiên cứu quan sát thấy rằng các chủng thích nghi trong phòng thí nghiệm thường mất khả năng hình thành sợi và các chủng thích nghi với phòng thí nghiệm này là những chủng đầu tiên được hiển thị bằng kính hiển vi điện tử.

Mặc dù có nhiều hình dạng khác nhau, nhưng virion của tất cả các loại virus cúm A đều có thành phần giống nhau. Tất cả chúng đều được tạo thành từ một lớp vỏ virus chứa hai loại protein chính, quấn quanh một lõi trung tâm [26]. Thành phần vỏ của virus gồm lớp lipid, trên bề mặt virus có khoảng 500 cấu trúc glycoprotein gọi là kháng nguyên. Mỗi cấu trúc này có độ dài dao động từ 10 đến 14 nanomet. Việc phân loại virus cúm A vào các subtype khác nhau dựa vào hai loại kháng nguyên bề mặt là hemagglutinin (HA) và neuraminidase (NA). Vị trí sắp xếp của các HA thường nằm xen kẽ với NA, trong đó số lượng HA thường nhiều hơn với tỉ lệ (4-5):1. Ngoài hai kháng nguyên bề mặt, hệ gen của virus cúm còn mã hóa cho các protein khác như nucleoprotein (NP), protein màng (M1 và M2), polymerase (PA, PB1 và PB2), protein phi cấu trúc (NS1 và NS2) [27]. M1 tương tác với cả RNA và nucleoprotein của virus, đưa chúng lại với nhau trong phức hợp RNP. Nó cũng liên kết với NEP, làm trung gian cho quá trình xuất phức hệ M1-RNP thông qua nucleoporin vào tế bào chất. M2 là mục tiêu của nhóm thuốc chống cúm amantadine, có tác dụng ức chế hoạt động của kênh ion và ngăn không cho virus lột vỏ. Là một protein bề mặt, nó có thể tham gia như một thành phần của vắc-xin. Protein xuất hạt nhân NEP, cùng với M1 đóng vai trò vào quá trình chuyển M1-RNP vào tế bào chất.

HA là một protein làm trung gian liên kết của virion với các tế bào đích và sự xâm nhập của bộ gen virus vào tế bào đích. NA đóng vai trò trong khởi động quá trình lắp ráp rồi giải phóng virus qua các tế bào thụ cảm, cũng như giải phóng virion thế hệ sau từ các tế bào bị xâm nhiễm [28]. Các glycoprotein vỏ HA và NA liên quan đến tính kháng nguyên đặc hiệu của

từng phân loại virus khác nhau và cũng là nơi mà thuốc kháng virus được sử dụng trong điều trị bệnh sẽ liên kết, từ đó kích hoạt quá trình diệt virus. Hơn nữa, chúng cũng là các protein kháng nguyên mà các kháng thể của vật chủ có thể liên kết và kích hoạt phản ứng miễn dịch. Virus cúm loại A được phân loại thành các phân nhóm dựa trên loại của hai loại protein này trên bề mặt vỏ virus. Hiện nay, có 16 phân nhóm của kháng nguyên HA (ký hiệu H1 đến H16) và 9 phân nhóm của kháng nguyên NA (ký hiệu từ N1 đến N9) được biết đến, nhưng chỉ có H1, 2 và 3, và N 1 và 2 thường được tìm thấy ở người [29]. Thành phần hoá học các hạt virus cúm A có chứa khoảng 0,8 - 1,1% RNA, 70-75% là protein, 20 - 24% lipid và 5 - 8% là carbohydrate [30].



Hình 1.3. Cấu trúc của virus cúm A

A. Hình thái của virus cúm A trên kính hiển vi điện tử truyền qua; B. Mô hình cấu tạo hạt virus [31].

Lõi trung tâm của virion chứa bộ gen virus và các protein virus khác đóng gói và bảo vệ vật liệu di truyền. Bộ gen của virus được tạo thành từ một axit nucleic sợi đơn gọi là RNA. Tuy nhiên, điều đặc biệt đối với một loại virus là bộ gen của virus cúm loại A là một đoạn RNA đơn lẻ mà thay vào đó, nó bao gồm các đoạn RNA âm tính được phân đoạn, mỗi đoạn chứa một hoặc hai gen mã hóa cho một sản phẩm gen (protein). Thuật ngữ RNA được sử dụng để chỉ ra bộ gen virus không thể được dịch trực tiếp thành protein; trước tiên nó phải được phiên mã thành ARN dương tính trước khi có thể được dịch mã thành các sản phẩm protein. Bản chất phân đoạn của bộ gen cho phép trao đổi toàn bộ gen giữa các chủng virus khác nhau [26].

Toàn bộ hệ gen của virus cúm A dài 13.588 bp và được chứa trên tám phân đoạn ARN mã hóa cho ít nhất 10 đến tối đa là 14 protein, tùy thuộc vào

chúng virus. Mức độ liên quan hoặc sự hiện diện của các sản phẩm gen thay thế có thể khác nhau [32, 33]. Phân đoạn 1 mã hóa tiểu đơn vị RNA polymerase (PB2) có chiều dài 2341 nucleotide và khối lượng phân tử theo lí thuyết là 84 kDa. Phân đoạn 2 mã hóa tiểu đơn vị ARN polymeraza (PB1) và protein PB1-F2, protein này gây chết tế bào bằng cách sử dụng các khung đọc khác nhau từ cùng một phân đoạn ARN, khối lượng phân tử ước chừng 87 kDa. Phân đoạn 3 mã hóa tiểu đơn vị RNA polymerase (PA) và protein PA-X, có vai trò ngắt phiên mã của vật chủ. Phân đoạn 4 mã hóa cho HA (hemagglutinin). HA là thụ thể của virus với tế bào đích, gây nên hiện tượng ngưng kết hồng cầu và đóng vai trò vào giai đoạn khởi đầu của quá trình xâm nhiễm do virus. Chính vì vậy, HA được xem như kháng nguyên virus chính tạo ra phản ứng kháng thể trung hòa. Hệ thống miễn dịch dịch thể tạo ra các kháng thể chống lại các kháng nguyên cúm khác nhau. Các kháng thể trung hòa, chủ yếu là IgA, IgG, IgM hoạt động đặc biệt chống lại HA và NA của virus cúm. Phản ứng kháng thể của vật chủ rất quan trọng trong dự đoán mức độ nghiêm trọng của bệnh và để phát triển vắc-xin. Kháng thể đặc hiệu chống lại HA sẽ trung hòa virus nhằm ngăn ngừa bệnh tật thông qua việc gắn vào vị trí hình cầu trimeric của HA, từ đó ức chế sự gắn kết của virus vào tế bào chủ [33, 34]. Ước tính cần khoảng 500 phân tử hemagglutinin để tạo ra một virion. HA có khối lượng phân tử 63 kDa khi không được glycosyl hoá và đạt 77 kDa khi được glycosyl hoá, trong đó HA1 và HA2 có khối lượng phân tử lần lượt là 48 kDa và 29 kDa. Phân đoạn 5 mã hóa NP - một nucleoprotein. Phân đoạn 6 mã hóa NA (neuraminidase), cần khoảng 100 phân tử neuraminidase để tạo ra một virion. NA có khối lượng phân tử theo tính toán lí thuyết 50 kDa, còn thực tế dao động từ 48 đến 63kDa. Phân đoạn 7 mã hóa cho hai protein ma trận M1 và M2 bằng cách sử dụng các khung đọc khác nhau từ cùng một phân đoạn RNA. Cần khoảng 3.000 phân tử protein ma trận để tạo ra một virion. Phân đoạn 8 trong hệ gen mã hóa hai protein phi cấu trúc riêng biệt NS1 và NEP bằng cách sử dụng các khung đọc khác nhau từ cùng một phân đoạn RNA [35, 36].

1.2.2. Phương thức lây truyền của virus cúm A

Vòng đời của virus bắt đầu bằng cách liên kết với một tế bào đích. Sự gắn kết được thực hiện qua trung gian là các protein HA của virus trên bề mặt

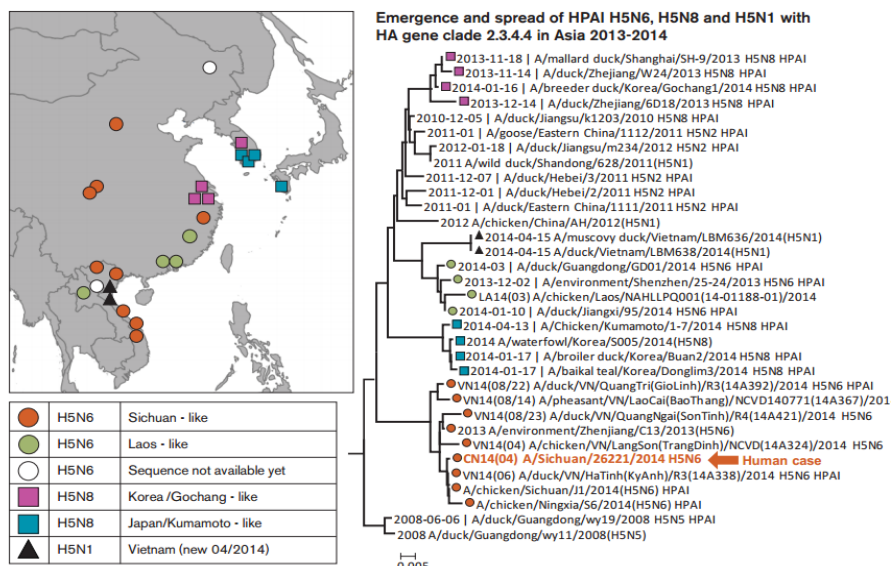
vỏ bọc, protein này sẽ gắn kết với các tế bào có chứa thụ thể axit sialic trên bề mặt màng tế bào. Trước khi liên kết, các protein NA thúc đẩy khả năng tiếp cận các tế bào đích bằng cách phân hủy chất nhầy, giúp loại bỏ các thụ thể môi trường ngoại bào có thể cản trở việc tiếp cận các tế bào đích. Sau khi liên kết, virus được đưa vào trong tế bào bởi một endosome chứa virion bên trong nó. Endosome được axit hóa bởi vATPase tế bào để có độ pH thấp hơn, điều này làm thay đổi về hình dạng HA, cho phép hợp nhất vỏ virus với màng sinh chất. Đồng thời, các ion hydro khuếch tán vào virion thông qua các kênh ion M2, phá vỡ các tương tác giữa protein-protein bên trong để giải phóng RNP vào trong bào chất của tế bào chủ. Vỏ protein M1 bao quanh RNP bị thoái hóa, khiến RNP không bao bọc hoàn toàn trong tế bào chất [7,36]. RNP được nhập vào nhân với sự trợ giúp của tín hiệu định vị virus. Ở đó, RNA polymerase của virus phiên mã mRNA bằng cách sử dụng chuỗi cảm giác âm tính của bộ gen làm khuôn mẫu. Sau khi mRNA của virus được phiên mã, nó sẽ được xuất ra khỏi nhân và được dịch mã bởi các ribosome của vật chủ để tổng hợp protein của virus. Các tiểu đơn vị polymerase của virus mới được tổng hợp và các protein NP được nhập vào nhân để tăng thêm tốc độ nhân lên của virus và hình thành RNP [37]. Các protein HA, NA và M2 được vận chuyển với sự trợ giúp của các protein M1 và NEP đến màng tế bào thông qua bộ máy Golgi [19] rồi được đưa vào màng tế bào. Các protein phi cấu trúc của virus bao gồm NS1, PB1-F2 và PA-X điều chỉnh các quá trình của tế bào chủ để vô hiệu hóa phản ứng kháng virus PB1-F2 tương tác với PB1 để giữ polymerase trong nhân lâu hơn. Các protein M1 và NEP định vị vào nhân trong các giai đoạn sau của quá trình lây nhiễm, liên kết với các RNP của virus và làm trung gian cho quá trình xuất của chúng ra tế bào chất, nơi chúng di chuyển đến màng tế bào với sự trợ giúp của các thể nội nhũ tái chế và được gộp vào các phân đoạn của bộ gen [7, 37, 38].

Virus con rời khỏi tế bào bằng cách nảy chồi từ màng tế bào, được bắt đầu bằng sự tích tụ protein M1 ở phía tế bào chất của màng. Bộ gen của virus được kết hợp bên trong vỏ virus có nguồn gốc từ các phần của màng tế bào có protein HA, NA và M2. Khi kết thúc quá trình nảy chồi, các protein HA vẫn gắn với axit sialic của tế bào cho đến khi chúng bị phân cắt bởi hoạt động của các protein NA. Virion lúc này được giải phóng khỏi tế bào [39, 40].

1.2.3. Phân loại các chủng cúm A đã xuất hiện trên thế giới

Sự biến đổi của virus cúm A dẫn tới thay đổi tính kháng nguyên cũng như sự đáp ứng miễn dịch của gia cầm khi tiêm vắc-xin phòng bệnh trên chúng. Virus cúm A/H5N1 tại Việt Nam có sự đa dạng trong kiểu hình của HA, ảnh hưởng tới đặc tính kháng nguyên. Clade 1 và clade 2 của virus A/H5N1 được xác định là nguồn lây bệnh cho người trong đó những thay đổi ở bộ gen clade 2 dẫn đến thay đổi một số axit amin, phát triển thành các clade khác nhau.

Khi phân tích gen HA của các virus clade 2.3.4.4 mới nổi (H5N1, H5N6 và H5N8), người ta thấy có ba nhóm riêng biệt (Hình 1.4). Nhóm đầu tiên bao gồm các virus H5N8 mới bùng lên thành dịch được phân lập vào năm 2013-2014 tại Trung Quốc và Hàn Quốc (hình vuông màu hồng). Những virus này cho thấy mối quan hệ di truyền gần gũi với một số virus cúm gia cầm độc lực cao H5N1/H5N2 cũ hơn được phân lập ở vịt và chim hoang dã tại Trung Quốc trong năm 2010-2011. Cụm di truyền thứ hai chứa cúm gia cầm độc lực cao H5N1 mới được phân lập từ các chợ gia cầm sống ở Việt Nam (hình tam giác đen), cúm H5N8 được phân lập ở Hàn Quốc và Nhật Bản và chủng H5N6 được phân lập tại Cộng hòa Dân chủ Nhân dân Lào và tại tỉnh Quảng Đông, Trung Quốc (vòng tròn màu xanh lá cây). Nhóm thứ ba trong nhánh 2.3.4.4 này bao gồm tại Việt và Trung Quốc xuất hiện virus H5N6 (vòng tròn màu đỏ). Điều đó cho thấy cả năm trường hợp phát hiện tại Việt Nam đều có liên quan chặt chẽ với nhau, và cũng có liên quan chặt chẽ với virus H5N6 (A/Sichuan/2622/2014) được phát hiện trong một trường hợp nhiễm bệnh ở người vào tháng 4 năm 2014 tại Tứ Xuyên Tỉnh, Trung Quốc cũng như từ các khu vực bị cô lập tại tỉnh Tứ Xuyên. Cây phả hệ cho thấy rằng nhóm virus H5N6 Việt Nam/Trung Quốc hơi khác với virus H5N6 được phát hiện vào tháng 3 năm 2014 tại Cộng hòa Dân chủ Nhân dân Lào và từ một loại virus vịt được phân lập ở tỉnh Quảng Đông, Trung Quốc, do đó chỉ ra sự đa dạng di truyền đã tồn tại trong này dòng virus mới xuất hiện.



Hình 1.4. Sự giống nhau về mặt di truyền của virus H5 nhánh 2.3.4.4 ở Đông và Đông Nam Á [11].

Virus cúm A/H5N6 gây bệnh được chứng minh là một loại virus mới xuất hiện. Trong một báo cáo năm 2015, nhóm nghiên cứu đưa ra các phân tích di truyền và phát sinh loài cho thấy các virus H5N6 này là phân loại mới giữa virus H5N1 dòng 2.3.4 và H6N6 và đã phát triển thành hai dòng riêng biệt. Sự thay thế T160A trong protein HA và sự xóa 11 axit amin trong kháng nguyên bề mặt neuraminidase (NA) ở chủng H5N6 có thể hỗ trợ tăng cường ái lực của virus đối với các thụ thể giống người và độc lực ở động vật có vú [41].

1.3. CÁC BIỆN PHÁP PHÒNG DỊCH CÚM GIA CẦM HIỆN NAY

1.3.1. Những đóng góp trong phòng bệnh cúm gia cầm của vắc-xin

Ngày nay vắc-xin được xem như biện pháp hữu ích nhất trong bảo vệ sức khỏe người và vật nuôi. Hệ miễn dịch được kích thích thông qua tiếp xúc kháng nguyên sẽ sản xuất ra kháng thể giúp cơ thể có khả năng đương đầu với chủng virus đó trong tương lai. Vì hemagglutinin và neuraminidase là hai kháng nguyên quan trọng nhất trong việc gây đáp ứng miễn dịch do đó chúng là hai kháng nguyên đích cho việc phát triển các vắc-xin dự phòng. Để có hiệu lực, vắc-xin cúm phải có các kháng nguyên bề mặt đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt của các chủng virus đang gây bệnh. Điều cốt lõi là trước hết phải xác định rồi tái tạo các type phụ của hai protein bề mặt của virus cúm - HA và NA.

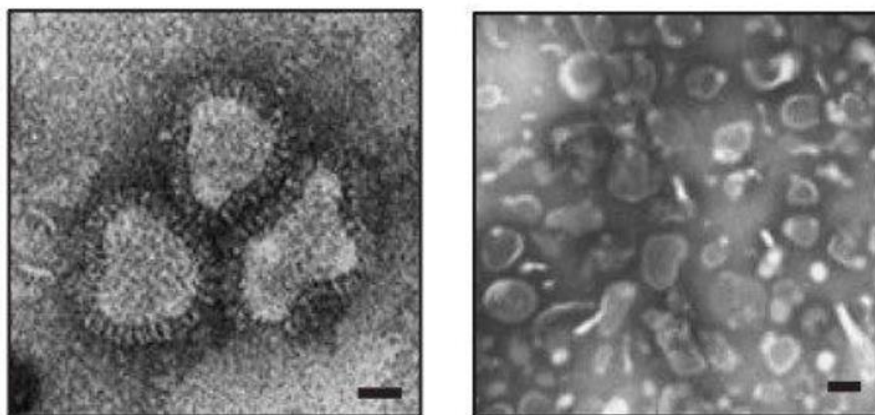
Trong những nghiên cứu về protein tái tổ hợp vài thập kỷ qua, việc ứng dụng chúng vào điều trị bệnh trên người và động vật như vắc-xin, kháng sinh hay hormone sinh trưởng của người,... đã tạo ra một cuộc cách mạng lớn cho nền y học cũng như phát triển lĩnh vực công nghệ sinh học. Rất nhiều hệ thống biểu hiện tái tổ hợp *in vitro* được sử dụng để biểu hiện vắc-xin trong phòng thí nghiệm, nhưng hiện nay công nghệ này chưa được ứng dụng rộng rãi khi đưa ra thành phẩm. Hệ thống biểu hiện rất đa dạng từ tế bào thực vật đến tế bào động vật, nấm men, vi khuẩn, virus.

Đối với dịch cúm A/H5N6 ở gia cầm và phòng chống dịch cúm trên người, việc nâng cao hiệu quả của vắc-xin trong việc gây đáp ứng miễn dịch luôn là một vấn đề rất được quan tâm. Quá trình tiến hóa của virus cúm A/H5N6 trong môi trường tự nhiên có thể làm thay đổi tính kháng nguyên dẫn đến đáp ứng miễn dịch của gia cầm được tiêm vắc-xin cũng biến đổi theo. Việc có một nguồn vắc-xin chủ động khi ấy sẽ giảm chi phí cho nền kinh tế và đáp ứng nhanh nhu cầu khi có các biến chủng virus mới xuất hiện tại Việt Nam. Hướng sản xuất các vắc-xin phòng bệnh cúm gia cầm hiện nay dựa trên cơ sở hai loại vắc-xin truyền thống và vắc-xin thế hệ mới [42]. Tuy nhiên tại Việt Nam, hướng nghiên cứu vắc-xin thế hệ mới, cụ thể là vắc-xin tiểu đơn vị được sản xuất từ hệ thống thực vật được xem là loại vắc-xin tiềm năng, có thể thay thế các vắc-xin truyền thống. Hệ thống biểu hiện protein trong thực vật có chi phí cần thiết rẻ tiền hơn nhiều so với các thiết bị công nghiệp như hệ thống lên men hoặc hệ thống bioreactor. Ngoài ra, protein không bị phân hủy trong các tổ chức nội bào chuyên biệt ở thực vật và khả năng nhiễm các nguồn bệnh cũng như các độc tố ảnh hưởng sức khỏe con người được giảm thiểu đáng kể. Không chỉ vậy, sản phẩm protein tái tổ hợp có thể được sản xuất ở mức độ công nghiệp. Tuy có những ưu điểm trên, cây trồng chuyển gen không mang lại hiệu suất tích lũy protein tái tổ hợp cao. Hệ thống biểu hiện tạm thời là phương pháp hữu ích để giúp khắc phục nhược điểm trên. Phương pháp này giúp nâng cao hàm lượng protein tái tổ hợp tích lũy ở cây, không bị ảnh hưởng từ vị trí gắn gen đích của tế bào thực vật, có thể tiến hành biểu hiện trong các mô lá – tập hợp tế bào đã biệt hóa hoàn toàn nên thời gian biểu hiện nhanh. Hệ thống biểu hiện tạm thời đã được sử dụng trong nhiều nghiên cứu sản xuất kháng nguyên HA dạng dung hợp các motif khác nhau trong phòng chống virus cúm A/H5N1 trên gia cầm. Kháng nguyên HA dung

hợp với motif GCN4pII được chứng minh có khả năng sinh miễn dịch tốt hơn kháng nguyên HA không dung hợp [43]. Ngoài ra, dịch chiết thực vật chứa H5 dung hợp motif GCN4pII-tp đã được chứng minh khả năng gây đáp ứng miễn dịch và khả năng bảo hộ gà chống lại virus cúm A/H5N1 tốt hơn dạng H5 dung hợp motif GCN4pII [44].

1.3.2. Tiềm năng sản xuất vắc-xin thực vật từ hạt giả virus (VLP)

Một hướng tiếp cận để sản xuất vắc-xin cúm gia cầm ở thực vật là sử dụng các hạt giống virus (virus-like particles, VLP) dựa trên hemagglutinin. Các hạt giống virus (VLP) là cấu trúc có nguồn gốc virus được tạo thành từ một hoặc nhiều phân tử khác nhau có khả năng tự lắp ráp, bắt chước hình dạng và kích thước của hạt virus nhưng thiếu vật chất di truyền nên chúng không có khả năng lây nhiễm vào vật chủ [45]. VLP là vật liệu nano phân tán có thể được tổng hợp trong nhiều hệ thống khác nhau gồm động vật có vú, thực vật, côn trùng và vi khuẩn. VLP có thể được sử dụng làm chất mang để vận chuyển vật liệu sinh học và vật liệu nano, chẳng hạn như thuốc, vắc-xin, chấm lượng tử nhờ vào khoang bên trong cấu trúc của chúng [46, 47]. Cấu trúc VLP có hình tứ diện hoặc hình que [48], được xác định vào năm 1968 trong huyết thanh của bệnh nhân mắc hội chứng Down, bệnh bạch cầu và viêm gan [49]. Tuy nhiên, bản chất sinh học của chúng vẫn chưa được biết đến, mặc dù người ta đã chỉ ra rằng có các vị trí kháng nguyên trên bề mặt của các hạt VLP [49]. Sau đó, người ta đã phát hiện rằng vỏ bao và đôi khi cả các protein lõi của virus có thể hình thành cấu trúc VLP. Sự biểu hiện và tự lắp ráp của các protein cấu trúc của virus có thể diễn ra trong các hệ thống biểu hiện sống (như thực vật) hoặc không bào, sau đó các cấu trúc virus được lắp ráp và tái tạo lại [45]. Do kích thước và hình dạng của chúng giống với kích thước và hình dạng thực tế của virus bản địa, những cấu trúc này có thể tạo ra các phản ứng miễn dịch một cách hiệu quả. Trong các VLP thiếu bộ gen nên không có khả năng sao chép tại các tế bào đích, điều này mang lại sự an toàn, đặc biệt là đối với những người bị suy giảm miễn dịch hoặc vắc-xin dành cho người cao tuổi [50]. VLP có thể kích thích cả phản ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào [51], chúng cũng có thể được nạp các chất điều hòa miễn dịch, chẳng hạn như các kích thích hệ miễn dịch bẩm sinh để kích thích các phản ứng miễn dịch hiệu quả hơn [52].



Hình 1.5. Hình chụp cấu trúc H5-VLP của chủng cúm A/H5N1 bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) [53]

VLP đang trở nên phổ biến trong lĩnh vực y tế dự phòng và cho đến nay, một loạt các nghiên cứu về vắc-xin tiềm năng dựa trên VLP đã được phát triển để chủng ngừa chống lại các tác nhân lây nhiễm khác nhau với khả năng tạo ra lượng vắc-xin tương đối lớn và nhanh chóng. Theo nghiên cứu của D'Aoust và đồng nghiệp, VLP rất có triển vọng cho việc phòng ngừa các chủng đại dịch cúm với khả năng bảo hộ của vắc-xin ứng viên H5-VLP khỏi sự xâm nhiễm của virus dị hợp A/Vietnam/1194(H5N1) ở liều thấp tới 0,5 μg [53]. Một nhóm nghiên cứu công bố kết quả vào năm 2010 cho thấy, chỉ trong vòng 3 tuần từ khi có trình tự gen HA, VLP được tạo ra từ thực vật có chứa protein hemagglutinin (HA) của bệnh cúm H5N1 (A/Indonesia/5/5) có thể gây ra phản ứng chéo kháng thể ở chồn sương. Khả năng sinh miễn dịch ở nhóm người lớn khỏe mạnh từ 18–60 tuổi trong nghiên cứu khi tiêm vắc-xin H5-VLPs đạt kết quả gần 96% những người trong nhóm dùng liều cao (2610 hoặc 20 mg) có đáp ứng MN có thể phát hiện được, ngay cả liều lượng thấp của vắc-xin này cũng ngăn ngừa bệnh lý và giảm tải lượng virus [54]. Trong công bố của nhóm nghiên cứu phát triển vắc-xin SARS-CoV-2, ứng cử viên vắc-xin tiềm năng dạng hạt giống virus được sản xuất từ cây *Nicotiana benthamiana* cho COVID-19 (được gọi là CoVLP) được đánh giá tính an toàn, khả năng dung nạp và khả năng sinh miễn dịch bằng các phản ứng kháng thể trung hòa (NAb) và tế bào tại nghiên cứu giai đoạn 1. Những người lớn từ 18 đến 55 tuổi (kích thước mẫu = 180) chọn ngẫu nhiên ở Quebec, Canada được tiêm bắp 2 liều CoVLP (3,75 μg , 7,5 μg và 15 μg) cách nhau 21 ngày, tiêm chỉ vắc-xin CoVLP hoặc kết hợp cùng chất bổ trợ AS03 hoặc

CpG1018. Kết quả phụ trong nghiên cứu này bao gồm cả các đánh giá lên đến 12 tháng sau khi tiêm chủng. Nhóm nghiên cứu đã chỉ ra rằng tất cả các công thức tiêm đều được dung nạp tốt, các tác dụng phụ ngoài ý muốn sau tiêm là từ nhẹ đến trung bình, không có ảnh hưởng của liều CoVLP trên NAbs huyết thanh, nhưng hiệu giá tăng đáng kể với cả hai chất bổ trợ. Sau liều thứ hai, NAbs trong nhóm CoVLP + AS03 cao hơn gấp mười lần so với hiệu giá trong huyết thanh của người đã khỏi bệnh do Coronavirus 2019. Cả hai phản ứng tế bào interferon- γ và interleukin-4 đặc hiệu với protein tăng đột biến cũng được tạo ra [55]. Những nghiên cứu trên đều cho thấy rằng tổng hợp vắc-xin dạng hạt giả virus (VLP) đang mở ra hướng đi mới vô cùng triển vọng. Do không thể dự đoán được chiều hướng lây lan của chủng virus cúm A/H5N6 nên việc có một hệ thống biểu hiện có thể cung cấp lượng vắc-xin đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng trong thời gian ngắn (trường hợp đại dịch) là rất quan trọng. Biểu hiện tạm thời sử dụng cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* là một hệ thống đầy hứa hẹn trong hoàn cảnh này. Việc nghiên cứu biểu hiện các kháng nguyên virus cúm gia cầm H5N6 dạng VLP trên hệ thống biểu hiện ở tế bào thực vật là rất cấp thiết. Bên cạnh đó mô hình tạo kháng nguyên tái tổ hợp bằng phương pháp biểu hiện tạm thời ở thực vật mang lại tiềm năng sản xuất vắc-xin với số lượng lớn trong thời gian nhanh chóng (1-2 tháng), đáp ứng nhu cầu lớn về vắc-xin trong hoàn cảnh dịch bệnh ngày càng nghiêm trọng và bùng phát trên diện rộng.

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- + Chủng vi sinh vật : Chủng *E. coli* 10G được sử dụng như tế bào chủ cho bước nhân dòng gen. Chủng *A. tumefaciens* AGL1 [56] được sử dụng cho thí nghiệm chuyển gen thông qua *Agrobacterium* và biểu hiện tạm thời.
- + Các vector: Vector tách dòng: pRTRA-CaMV35S-H5-GCNpII-his-cmyc-KDEL; pRTRA-CaMV35S-H5-GCNpII-tp-his-cmyc-KDEL; pRTRA-CaMV35S-H5 và vector chuyển gen pCB301 được cung cấp bởi GS. TS. Udo Conrad và TS. Phan Trọng Hoàng [43].
- + Đối tượng thực vật: Cây *Nicotiana benthamiana* 7 tuần tuổi khỏe, chất lượng đồng đều.
- + Đối tượng động vật: Chuột cái trắng BALB/C 6 tuần tuổi được cung cấp bởi phòng thử nghiệm sinh học - 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 H5, tối ưu mã biểu hiện

Thông tin về trình tự gen mã hóa cho kháng nguyên H5 của chủng virus cúm A/H5N6 đang gây bệnh ở Việt Nam được cung cấp bởi Công ty Cổ phần thuốc Thú y Trung Ương NAVETCO. Các trình tự gen mã hóa H5 được bổ sung thêm trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn *NcoI* và *NotI*; *BamHI* và *pspOMI* cho mục đích chèn vào vector chuyển gen, sau đó được tối ưu mã thích hợp cho sự biểu hiện protein ở cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* Domin sử dụng phần mềm được cung cấp bởi công ty Genewiz (Mỹ). 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 mã hóa kháng nguyên H5-VLP, kháng nguyên H5-GCN4pII, kháng nguyên H5-GCN4pII-tp và tạo chủng *Agrobacterium tumefaciens* mang vector tương ứng

2.2.2.1. Phương pháp tạo cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5-VLP

Đoạn gen mã hóa HA của chủng cúm A/H5N6 tổng hợp nhân tạo trong

vector pUC (H5-VLP) sẽ được xử lý bằng 2 enzyme cắt giới hạn *NcoI* và *NotI* (bảng 2.1), gắn vào vector tách dòng pRTRA để tạo thành dạng cấu trúc VLP.

Bảng 2.1. Thành phần phản ứng xử lý DNA bằng 2 enzyme cắt giới hạn *NcoI* và *NotI*

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Buffer 10X Tango	3
2	DNA (150 ng/ μl)	25
3	Enzyme <i>NcoI</i> (10 U/ μl)	1
4	Enzyme <i>NotI</i> (10 U/ μl)	1
Tổng		30 μl

Đoạn gen H5 sau khi được xử lý bằng enzyme giới hạn và tinh sạch theo bộ Kit QIAquick Gel Extraction (hãng QIAGEN) sẽ được ghép nối vào vector tách dòng nhờ sự xúc tác của enzyme T4-DNA ligase (theo bộ kit của hãng Thermo Fisher Scientific). Hỗn hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* 10G khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt [57] để chọn lọc dòng khuẩn mang vector tái tổ hợp. Chọn ngẫu nhiên các khuẩn lạc trắng (sử dụng làm DNA khuôn) để khuếch đại gen bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi đặc hiệu (trình tự mồi xem phụ lục 1) chọn được dòng với kích thước gen mong muốn.

Bảng 2.2. Thành phần phản ứng PCR khuẩn lạc

STT	Thành phần	Thể tích (μl)
1	Dream taq 2X Master mix	7,5
2	Primer-F (10 pmol/ μl)	0,5
3	Primer-R (10 pmol/ μl)	0,5
4	DNA (khuẩn lạc) + Nước deion	6,5
Tổng		15 μl

Bảng 2.3. Chu kì nhiệt cho phản ứng PCR 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	∞	

Sau đó, vector pRTRA có gắn đoạn gen H5-VLP và vector chuyển gen thực vật pCB301 được phân cắt bằng *Hind*III ở 37°C trong 3 giờ với thành phần phản ứng theo hướng dẫn của công ty NEB. 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 [57]. Dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng colony-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu và cắt kiểm tra với enzyme *Not*I tương ứng theo hướng dẫn của công ty NEB.

2.2.2.2. Phương pháp tạo cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5 dạng trimer pII và H5 dạng oligomer pII-tp

Quy trình thiết kế các cấu trúc vector tách dòng và vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5 dạng trimer pII (GCN4pII) và H5 dạng oligomer (GCN4pII-tp) được thực hiện theo mô tả của Phan và cộng sự [44] và Ho và cộng sự [58]. Các cấu trúc này được sử dụng để so sánh với của cấu trúc H5-VLP. Đoạn gen mã hóa HA của chủng cúm A/H5N6 tổng hợp nhân tạo trong vector pUC (ecto-H5) sẽ được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi Ectodomain H5-BamHI-F/ Ectodomain-H5-*psp*OMI-R (Xem phụ lục 1).

Bảng 2.4. Thành phần phản ứng PCR khuếch đại gen ecto H5

STT	Thành phần	Thể tích (μ l)
1	Nước cất khử ion, khử trùng	25,5
2	Buffer 5X HF	10
3	Phusion (2 U/ μ l)	0,5
4	dNTPs (10 mM/ μ l)	1
5	Primer – F/ R (10 pmol/ μ l)	3
6	DNA khuôn (20 ng/ μ l)	10
Tổng		50

Bảng 2.5. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR khuếch đại gen ecto H5

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ ($^{\circ}$ C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	98	3 phút	1
2	Biến tính	98	30 giây	35x
3	Gắn mồi	58	1 phút	
4	Kéo dài chuỗi	72	1 phút	
5	Hoàn tất kéo dài	72	10 phút	1
6	Kết thúc phản ứng	15	∞	

Gen được nhân lên theo quy trình ở bảng 2.4 và 2.5, sau đó sản phẩm PCR được thu nhận rồi xử lý enzyme *Bam*HI và *psp*OMI để thay thế gen mã hóa protein HA (H5N1) trong các các vector tách dòng bằng gen mã hóa HA của chủng H5N6. Thành phần phản ứng tương tự tham khảo bảng 2.1. Nhân dòng trong chủng *E.coli* 10G mang gen đích bằng phương pháp sốc nhiệt [57]. Dòng khuẩn mang các vector pRTRA tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng PCR khuẩn lạc (sử dụng cặp mồi 35S-F/35S-R). Plasmid được tách chiết và cắt kiểm tra với enzyme *Bam*HI và *psp*OMI. Đoạn gen chứa cassette biểu hiện được thu nhận bằng cách xử lý với *Hind*III, sẽ được chèn vào vector pCB301 tại vị trí *Hind*III. Dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng PCR khuẩn lạc (với cặp mồi 35S-F/35S-R) và cắt kiểm tra bằng enzyme *Not*I theo hướng dẫn của công ty NEB.

2.2.2.3. Phương pháp tạo chủng khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang vector chuyển gen pCB301 tương ứng

Những plasmid mang vector PCB301 dương tính được sử dụng cho biến nạp vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện của Mersereau và cộng sự [59]. Các dòng khuẩn lạc dương tính được chọn lọc bằng phản ứng PCR khuẩn lạc với cặp mồi 35S-F/35S-R. Những dòng khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 cho kết quả dương tính sẽ được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng bổ sung 3 loại kháng sinh chọn lọc (rifamycin 50 mg/l, carbenicilin 50 mg/l, kanamycin 50 mg/l), qua đêm ở tủ lắc 28°C. Đồng thời khuẩn AGL1 này cũng được cấy trải thành khuẩn lạc trên đĩa LB đặc (bổ sung kháng sinh như môi trường lỏng) để làm nguyên liệu phục vụ biến nạp gen quan tâm vào cây thuốc lá.

2.2.3. Phương pháp biểu hiện tạm thời kháng nguyên tái tổ hợp ở thực vật bằng agroinfiltration

Chủng *A. tumefaciens* AGL1 mang gen mã hoá protein H5 tái tổ hợp và chủng *A. tumefaciens* AGL1 mang gen mã hóa protein hỗ trợ HcPro được dùng để chuyển gen vào thực vật [60]. Những chủng vi khuẩn này được nuôi phục hồi từ tủ giữ chủng -80°C sang đĩa peptri có môi trường LB đặc chứa 3 loại kháng sinh chọn lọc. Sau 3 ngày nhân nuôi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1, thu nhận cặn khuẩn bằng ly tâm ở 6000 v/p, 30 phút. Cặn khuẩn được hoà trong đệm biến nạp MES (thành phần gồm 10 mM MES, 10 mM MgSO₄,

pH=5,6) đến khi hỗn hợp dịch khuẩn biến nạp có giá trị OD₆₀₀ bằng 1.

Nhúng cây thuốc lá 7 tuần tuổi vào dịch khuẩn *Agrobacterium* mang gen quan tâm, sử dụng máy hút chân không để vi khuẩn *Agrobacterium* thâm nhập vào sâu vào mô thực vật qua khí khổng. Cây thủy canh được giữ lại các lá bánh tẻ và úp ngược ngập nhúng hoàn toàn vào dịch biến nạp, phần rễ cây được ngăn cách với dịch biến nạp qua một tấm chắn. Phần lá cây nằm hoàn toàn trong dung dịch chứa hỗn hợp khuẩn biến nạp bên trong bình hút chân không với điều kiện ở 25 inches Hg, 90 giây. Xả van máy hút ra từ từ rồi mở nắp. Để hoàn tất quá trình biến nạp, cây thuốc lá được đặt trở lại phòng nuôi cây thủy canh với nhiệt độ trong khoảng dao động 21 đến 26°C, 16 giờ chiếu sáng, độ ẩm 75%. Theo dõi sự thay đổi của lá cây vào các ngày sau đó. Thu mẫu lá sau thời gian lây nhiễm 5, 6 và 7 ngày. Lá thuốc lá sau khi được chuyển gen sẽ được bảo quản ở -80°C phục vụ cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

2.2.4. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và 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 : 250 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 13.000 v/p, 30 phút để thu dịch trong làm mẫu phân tích. Nồng độ protein tổng số trong dịch chiết lá được đo tại bước sóng 595 nm theo phương pháp của Bradford và đường chuẩn được dựng bằng BSA (Bovine Serum Albumin).

Thử nghiệm protein Bradford là một trong những phương pháp đơn giản thường được sử dụng để xác định nồng độ protein tổng số của một mẫu.. Nồng độ protein của một mẫu thí nghiệm được xác định bằng cách so sánh với một dãy của protein chuẩn albumin huyết thanh bò (BSA). Bovine Serum Albumin (BSA) là protein chuẩn thường được sử dụng rộng rãi trong phương pháp dựng đường chuẩn xác định hàm lượng protein bằng phương pháp Bradford. Khối lượng của BSA được pha loãng ở các nồng độ khác nhau. Sau khi ủ với dung dịch Bradford chứa Coomassie khoảng 5 phút, mật độ hấp thụ của protein được đo ở OD 595 nm.

Quá trình điện di SDS-PAGE được thực hiện theo phương pháp của Laemmli [61]. Đánh giá mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp từ dịch chiết lá bị xâm nhiễm bằng Western Blot theo phương pháp của Burnette [62].

2.2.5. Tinh sạch kháng nguyên tái tổ hợp H5-VLP , H5-GCN4pII và H5-GCN4pII-tp

Theo phương pháp của Albertha R. van Zyl và Inga I. Hitzeroth [63], mẫu lá H5-VLP sau khi được biến nạp và kiểm tra có sự biểu hiện sẽ được trộn với đệm chiết lạnh: dung dịch PBS - Phosphate Buffered Saline 1X (pH=7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄ và 2 mM KH₂PO₄) với tỉ lệ 1:3 (gam mẫu lá : ml đệm chiết). Ly tâm mẫu ở 13.000 v/p trong 30 phút, 4°C. Lặp lại giai đoạn ly tâm cho tới khi thu được phần dịch nổi phía trên trong. Kết quả thu được phần dịch chiết thô. Tinh sạch phần dịch chiết thô H5-VLP với đệm sucrose: Chuẩn bị 2 dung dịch sucrose nồng độ 20% và 70%. Sử dụng ống tiêm dài cho 10 ml dịch chiết thô thực vật ở giai đoạn trên vào ống siêu ly tâm, các ống ly tâm sử dụng là Ultra-Clear 13,5 ml loại 14 x 89 mm. Tiếp đến cẩn thận bổ sung 2 ml sucrose 20% bên dưới dịch chiết, sau đó là 1 ml sucrose 70% bên dưới lớp đường trước đó. Ly tâm ở tốc độ 60.000 v/p trong 2 giờ ở 4°C. Quan sát dải VLP xuất hiện giữa các lớp 20% và 70% sucrose. Mẫu kháng nguyên H5-VLP tinh sạch được thu hồi bằng ống tiêm, có thể quan sát bằng kính hiển vi điện tử (TEM). Mẫu tinh sạch được bảo quản ở 4°C và kiểm tra bằng SDS-PAGE hoặc Western Blot.

Kháng nguyên tái tổ hợp H5-GCN4pII và H5-GCN4pII-tp được tinh sạch bằng sắc ký ái lực kim loại cố định (IMAC-Immobilized metal affinity chromatography) theo phương pháp được mô tả bởi Ho và cộng sự [58].

2.2.6. Phương pháp đánh giá đặc điểm cấu trúc và hoạt tính sinh học của protein kháng nguyên tinh sạch H5 tái tổ hợp

2.2.6.1. Xác định đặc điểm cấu trúc protein bằng phương pháp Size exclusion chromatography (SEC)

SEC được thực hiện dựa trên phương pháp được mô tả bởi Phan và các đồng nghiệp [43]. Một lượng protein H5 tinh sạch được đưa vào cột Superose™ 6 Increase 10/300GL (GE Healthcare). Để ước tính khối lượng phân tử của protein, một hỗn hợp protein tiêu chuẩn có khối lượng phân tử (44 - 2000 kDa, GE Healthcare) được đưa lên cột. Phân tích kết quả thu được

từ các phân đoạn bằng Western blot. Các protein H5 dạng trimer và oligomer tinh sạch bằng SEC được sử dụng cho thí nghiệm ELISA và Western blot phát hiện kháng thể đặc hiệu.

2.2.6.2. Đánh giá hoạt tính sinh học của kháng nguyên H5 tái tổ hợp bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu

Để chuẩn bị cho phản ứng ngưng kết hồng cầu, máu từ tĩnh mạch cánh của gà khỏe mạnh không được tiêm chủng vắc-xin chống bệnh virus Newcastle hoặc các tác nhân khác được thu trong một kim tiêm khử trùng chứa dung dịch Alserver theo tỉ lệ 1:1 về thể tích. Chuyển toàn bộ dịch máu vào ống ly tâm, lắc đều nhẹ. Bổ sung một tỷ lệ tương đương 0,1 M PBS (pH 7,4) lắc đều và ly tâm ở 1500 v/p, 10 phút cho đến khi tế bào hồng cầu lắng xuống, đổ bỏ dịch trên. Tiếp tục ly tâm lặp lại 3 lần với 0,1 M PBS (pH 7,4), thu cạn. Hút 2 ml tế bào hồng cầu cho vào 198 ml đệm 0,1 M PBS (pH 7,4) để đạt được nồng độ tế bào hồng cầu 1%. Kháng nguyên được bổ sung 50 μ l vào giếng đầu tiên của đĩa nhựa đáy chữ V chứa 50 μ l đệm PBS. Pha loãng 2 lần các giếng trong đĩa theo hàng. Bổ sung thêm 50 μ l PBS, trộn đều, sau đó bổ sung 50 μ l tế bào hồng cầu 1%. Ủ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó đọc kết quả. Điểm pha loãng cuối cùng gây ra phản ứng ngưng kết hồng cầu được xác định là một đơn vị gây ngưng kết hồng cầu (HAU).

2.2.7. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột

Các dịch chiết thực vật biểu hiện protein H5-VLP, H5 trimer, H5 oligomer hoặc 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 tá dược Emusigen-D bằng ống trộn theo tỉ lệ thể tích (4 kháng nguyên: 1 tá dược). Chuột cái trắng BALB/C 6 tuần tuổi được tiêm dưới da háng ba lần, mỗi lần tiêm cách nhau 14 ngày, mỗi con 200 μ l. Sáu chuột cái được sử dụng cho mỗi nhóm thí nghiệm. Huyết thanh từ máu chuột được thu vào ngày thứ 21 và ngày thứ 35 (thu mẫu vào ngày thứ 7 sau khi tiêm lần 2 và lần 3 [43]).

2.2.8. Đánh giá tính sinh miễn dịch tạo kháng thể đặc hiệu trên chuột bằng phản ứng ELISA gián tiếp

Đĩa microtiter được phủ với kháng nguyên H5 (A/H5N6) trimer tinh sạch bằng SEC với nồng độ 1 ng/ μ l (mỗi giếng có 100 μ l) và ủ qua đêm ở

4°C. Đĩa được phủ trong dung dịch PBS 1X chứa 5% sữa tách béo trong 2 giờ. Tiếp đến, ủ đĩa trong 2 giờ với huyết thanh của chuột (độ pha loãng 1000 lần trong dung dịch PBS 1X chứa 5% sữa tách béo). Rửa đĩa 5 lần với dung dịch PBS 1X chứa 0,1% Tween20. Ủ đĩa với kháng thể đặc hiệu anti-Rabbit IgG cộng hợp HRP trong 2 giờ (với độ pha loãng 2500 lần trong dung dịch PBS 1X chứa 5% sữa tách béo). Rửa đĩa 5 lần với dung dịch PBS 1X chứa 0.1% Tween 20. Phát hiện tín hiệu phản ứng bằng cơ chất TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) trong 15 phút đến 30 phút rồi dừng phản ứng với HCl 1N. Sản phẩm phản ứng chuyển từ màu xanh thành màu vàng sau khi được dừng lại. Kết quả được đọc ở bước sóng 450nm.

2.2.9. 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 CẤU TRÚC VECTOR TÁCH DÒNG VÀ VECTOR BIỂU HIỆN MANG GEN MÃ HÓA KHÁNG NGUYÊN H5-VLP, KHÁNG NGUYÊN H5-GCN4PII, H5-GCN4PII-TP VÀ TẠO CHỦNG *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MANG VECTOR TƯƠNG ỨNG.

3.1.1. Tổng hợp nhân tạo gen mã hoá kháng nguyên H5 của virus cúm A/H5N6 gây bệnh ở Việt Nam

Gen mã hóa cho kháng nguyên HA của chủng virus cúm A/H5N6 đang gây bệnh ở Việt Nam (chủng công A/chicken/Vietnam/LaoCai/NCVD-17A261/2017(H5N6) cung cấp bởi Công ty Cổ phần thuốc Thú y Trung Ương NAVETCO được thêm hai vị trí cắt hai đầu gen *NcoI*, *NotI* và bỏ vị trí gây độc giữa HA1 và HA2 để gửi tổng hợp nhân tạo. Trình tự nucleotide gen HA và trình tự amino acid của chủng công H5N6 - NAVETCO được thể hiện ở phụ lục 2 và phụ lục 3.

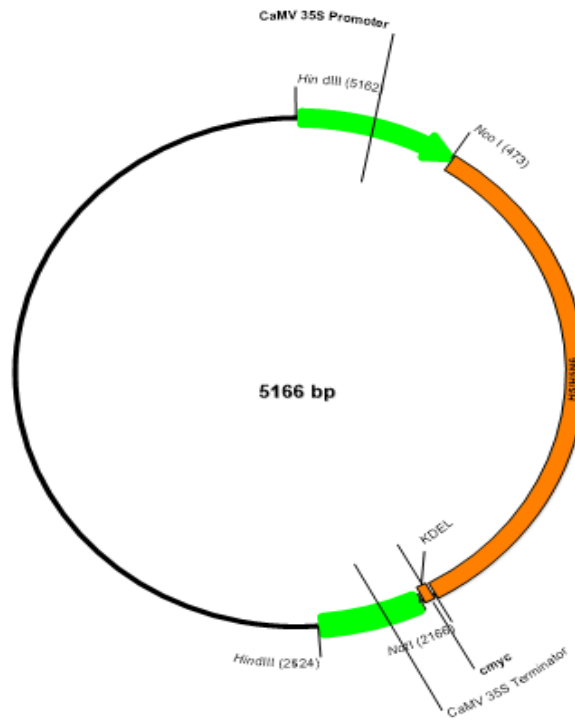
Gen mã hóa trình tự protein H5 được loại bỏ và thay thế các codon hiếm. Bên cạnh đó, trình tự ATTTA có thể làm trình tự phiên mã không ổn định cũng được loại bỏ. Để quá trình cắt và ghép nối gen khi thiết kế vector chuyển gen vào hệ thống biểu hiện trên thực vật, các vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *BamHI*, *PspOMI*, *NcoI* và *NotI* được thêm vào đầu 5' và 3' của gen H5. Trình tự gen mã hóa H5-VLP (H5N6) và Ectodomain H5 (H5N6) đã được loại bỏ signal peptide để thuận lợi cho việc gắn vào vector tách dòng pRTRA-35S-CaMV. Trình tự gen H5 đã đổi mã và thiết kế thêm các điểm cắt của enzyme hạn chế được đặt tổng hợp nhân tạo và được nhân dòng trong vector pUC57 tại công ty Genewiz (Mỹ).

Kết quả trình tự gen mã hóa cho kháng nguyên HA của chủng cúm H5N6 được thể hiện ở phụ lục 4 và phụ lục 5.

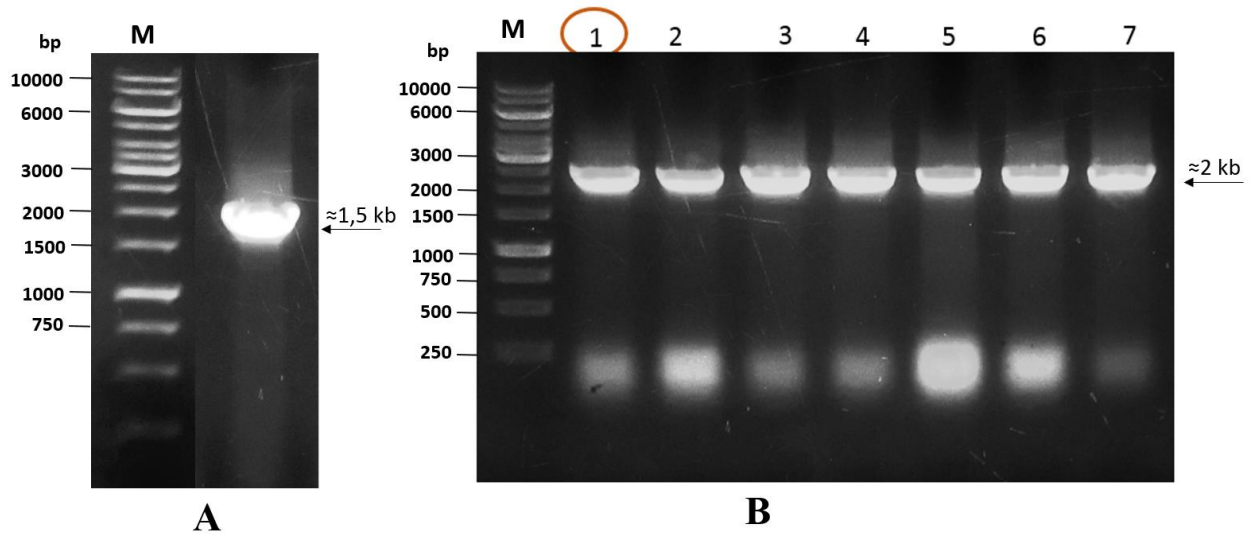
3.1.2. Tạo chủng *Agrobacterium* mang vector biểu hiện mã hóa kháng nguyên H5-VLP

Dòng khuẩn mang các vector pRTRA tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng PCR khuẩn lạc (sử dụng cặp mồi 35S-SQF/35STerm) và phản ứng cắt chọn dòng khuẩn mang plasmid tái tổ hợp pRTRA bằng enzyme cắt giới hạn *NcoI* và *NotI*. Sơ đồ cấu trúc vector tách dòng pRTRA_H5_VLP được mô

tả theo hình 3.1.



Hình 3.1. Sơ đồ cấu trúc vector tách dòng pRTRA_H5_VLP

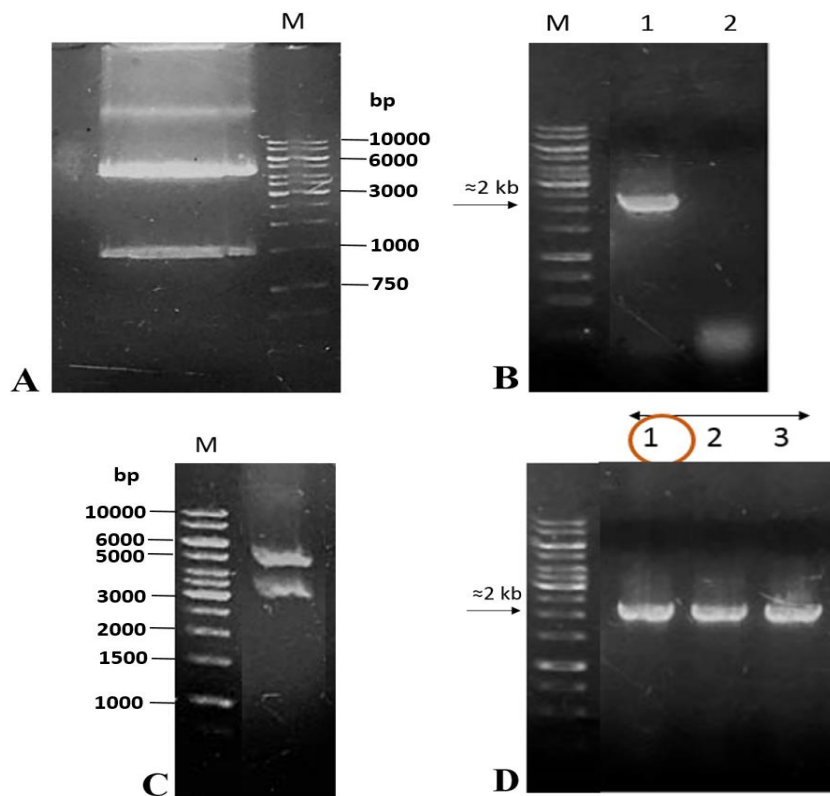


Hình 3.2. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA_H5_VLP

A. Kết quả cắt plasmid pUC-H5 (H5-VLP) với enzyme cắt giới hạn NcoI và NotI. B. Kết quả Colony PCR khuẩn E. coli 10G sau khi ghép nối đoạn H5 (N/N) vào vector tách dòng pRTRA (N/N/SAP); M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1 đến 7: số thứ tự của dòng khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên.

Kết quả thể hiện trên hình 3.2A cho thấy đoạn gen H5 sau khi cắt với enzyme NcoI và NotI có kích thước khoảng 1,5 kb, phù hợp với tính toán lý

thuyết. Hình 3.2B là kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR khuôn lạc sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35STerm, các dòng khuẩn *E. coli* 10G đều xuất hiện băng có kích thước khoảng 2 kb (bằng kích thước đoạn gen H5 + 500 bp), điều này là đúng với tính toán lý thuyết. Như vậy, từ kết quả kiểm tra phản ứng PCR khuôn lạc và xử lý enzyme giới hạn đều cho các băng với kích thước đúng theo lý thuyết. Qua đó, ta nhận thấy đã thiết kế thành công vector tách dòng pRTRA mã hóa kháng nguyên H5 dạng VLP và vector tách dòng này đã được biến nạp thành công vào khuẩn *E. coli* 10G.



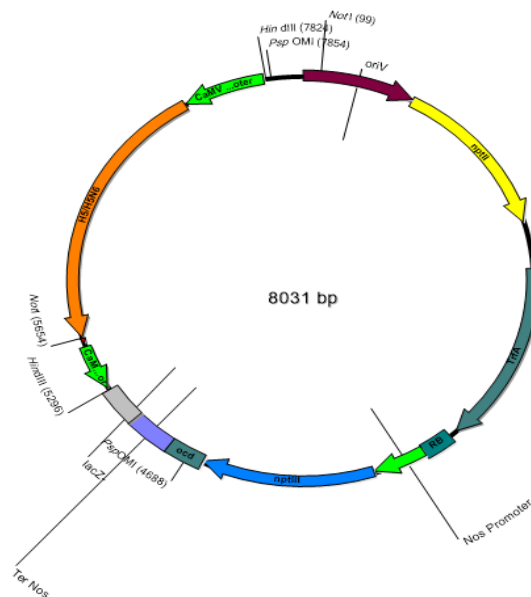
Hình 3.3. Kết quả thiết kế vector biểu hiện pCB301_H5_VLP

A. Kết quả xử lý plasmid mang vector tách dòng pRTRA với HindIII; B. Kết quả PCR khuôn lạc E. coli 10G sau khi nối plasmid đã xử lý HindIII vào vector pCB301; C. Chọn lọc các dòng khuẩn pCB301 tái tổ hợp ngược chiều mang gen mã hóa H5-VLP qua xử lý với enzyme NotI; D. Chọn lọc dòng khuẩn AGL1 mang vector tái tổ hợp bằng PCR khuôn lạc; 1 đến 3: số thứ tự của dòng khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên.

Plasmid mang vector tách dòng pRTRA_H5_VLP tái tổ hợp sẽ được xử lý với *HindIII* để thu đoạn gen mang thông tin mã hóa kháng nguyên H5-VLP (kích thước 1,5 kb) rồi được chèn vào vector biểu hiện pCB301 tại vị trí

*Hind*III (Hình 3.3A). Dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng Colony PCR (sử dụng cặp mồi 35S-SQF/35STerm) và phản ứng cắt chọn dòng khuẩn mang plasmid tái tổ hợp pCB301 đảo chiều bằng enzyme *Not*I. Kết quả điện di sản phẩm Colony PCR (hình 3.3B) cho thấy xuất hiện 1 dòng khuẩn *E. coli* 10G mang băng có kích thước khoảng 2 kb (bằng kích thước đoạn gen H5-VLP + 500 bp), điều này là đúng với tính toán lý thuyết. Hình 3.3C là kết quả điện di kiểm tra dòng khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pCB301 bằng cách xử lý với enzyme *Not*I đều cho các băng vạch đúng với kích thước tính toán lý thuyết. Các plasmid pCB301 tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện. Các dòng khuẩn lạc AGL1 dương tính đã được chọn lọc bằng phản ứng Colony PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu 35S-SQF và 35STerm. Kết quả điện di để kiểm tra các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 cho thấy cả 3 dòng khuẩn AGL1 đều có băng với kích thước là khoảng 2 kb (trùng với kích thước lý thuyết tính toán của gen H5 + 500 bp) (hình 3.3D).

Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện pCB301_H5_VLP được minh họa theo hình 3.4 dưới đây.

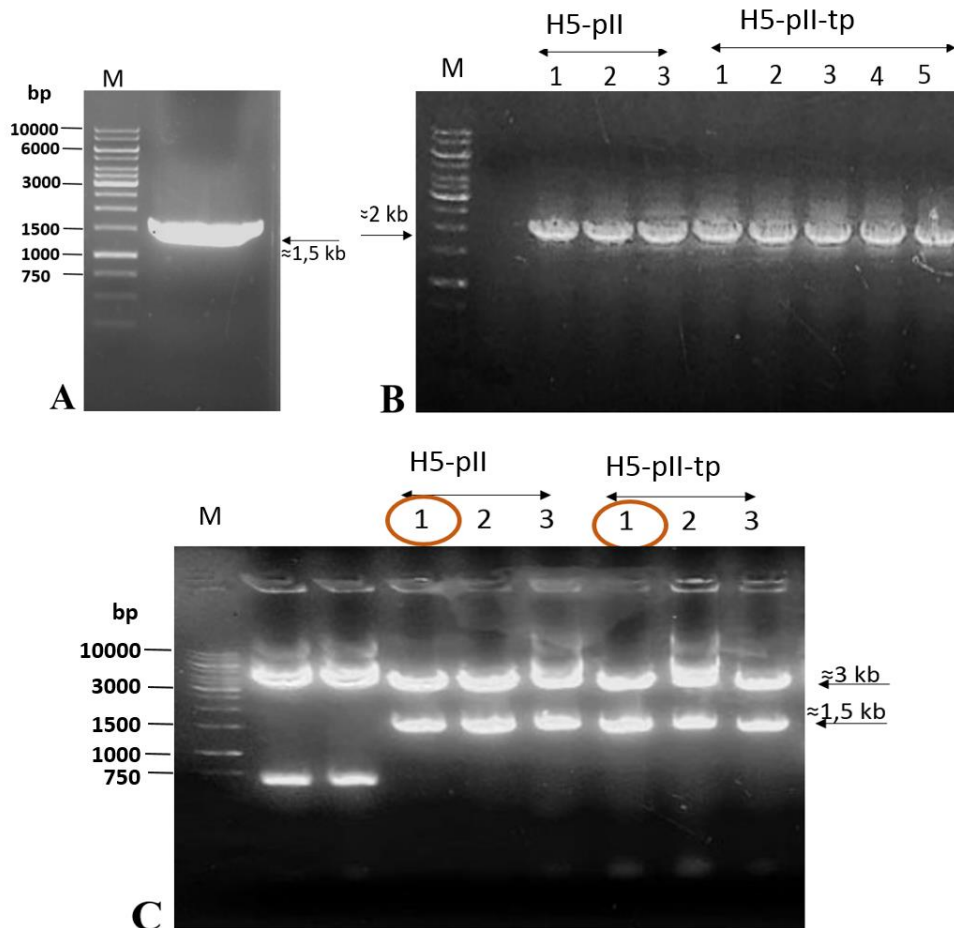


Hình 3.4. Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện pCB301_H5_VLP

Như vậy, chúng tôi đã thiết kế thành công cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa cho kháng nguyên H5 dạng hạt giả virus và tạo chủng *A.*

tumefaciens AGL1 mang vector tương ứng. Đây chính là nguồn nguyên liệu phục vụ cho mục đích sản xuất kháng nguyên H5 dạng VLP của virus cúm A/H5N6 bằng phương pháp biểu hiện protein tạm thời agroinfiltration.

3.1.3. Tạo chủng *Agrobacterium* mang vector biểu hiện mã hóa kháng nguyên H5-GCN4pII và kháng nguyên H5-GCN4pII-tp



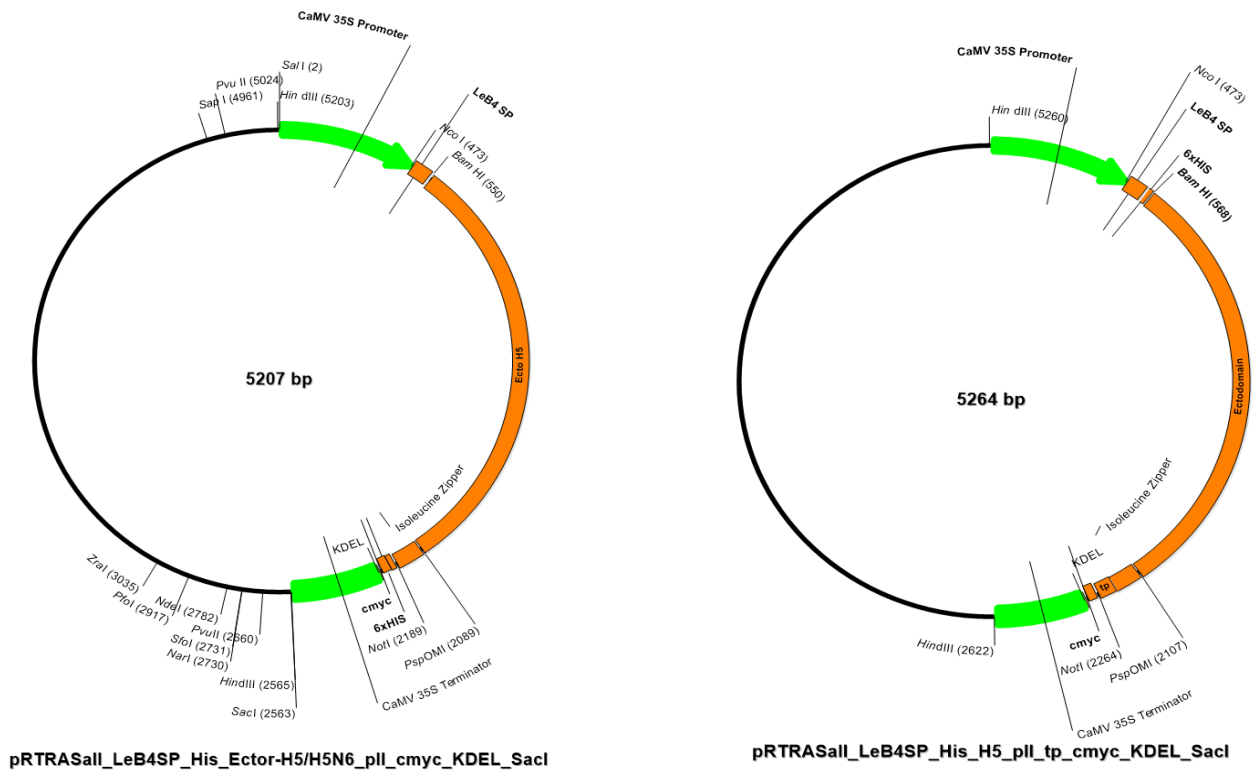
Hình 3.5. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA mang gen mã hóa protein H5 dạng trimer và oligomer

A. PCR nhân gen H5 sử dụng môi đặc hiệu; B. Kết quả Colony PCR khuẩn *E. coli* 10G sau khi nối đoạn ecto H5 vào vector pRTRA-pII hoặc PRTRA- pII-tp bằng phản ứng nối; C. Kết quả điện di sau khi cắt xử lý sản phẩm với enzyme BamHI và pspMI chọn lọc dòng khuẩn mang vector tách dòng pRTRA; M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1 đến 3: số thứ tự của dòng khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên.

Kết quả thể hiện trên hình 3.5A cho thấy đoạn gen ecto H5 sau khi nhân bằng môi đặc hiệu (Ectodomain-H5-BamHI-F/ Ectodomain-H5-H5N6-

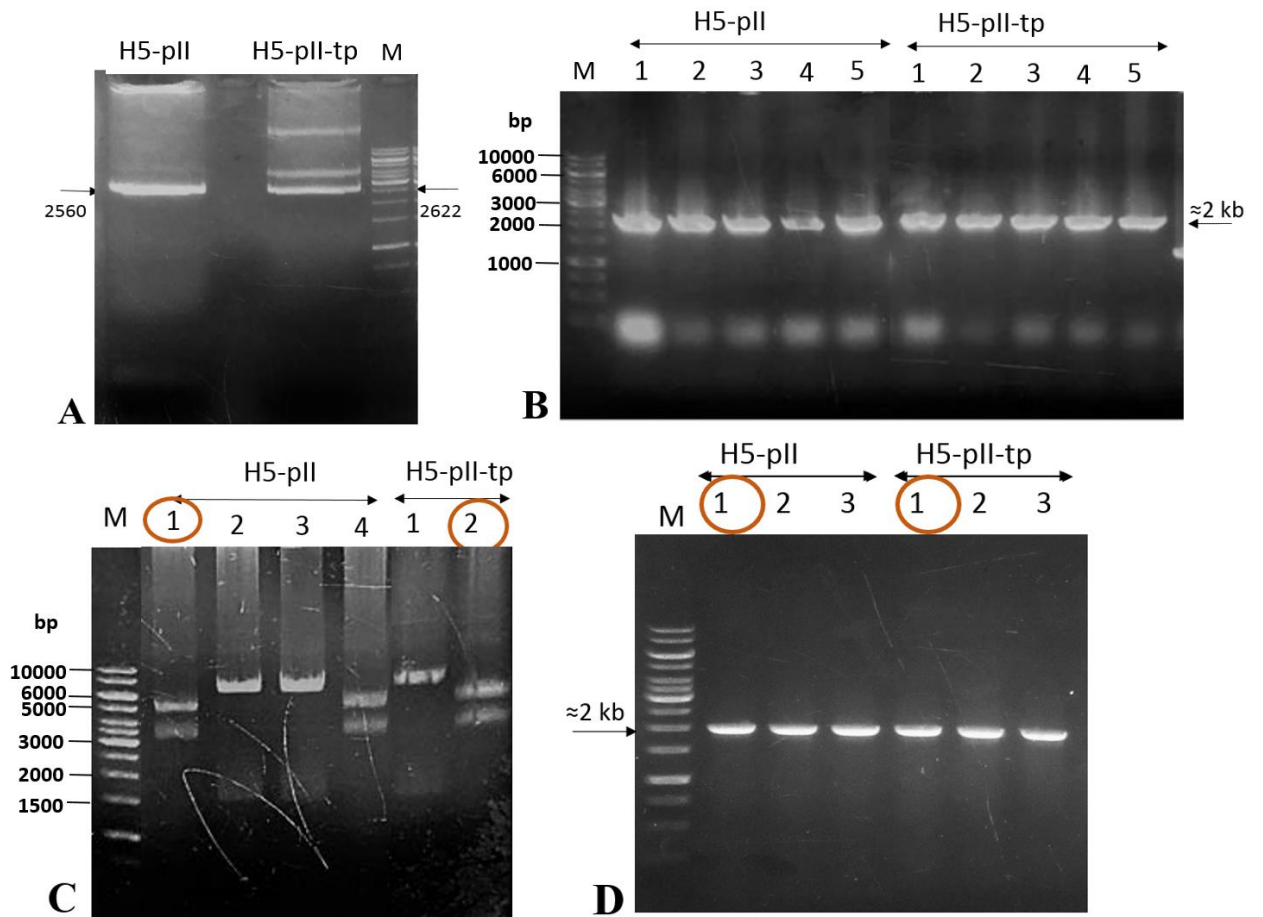
pspOMI-R) có kích thước khoảng 1,5 kb phù hợp với tính toán lý thuyết. Đoạn gen mã hóa H5 của chủng virus cúm A/H5N6 sau khi được khuếch đại bằng PCR xử lý với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI sẽ được nối vào vector tách dòng đã xử lý với enzyme *SAP* và biến nạp trong khuẩn *E. coli* 10G. Hình 3.5B là kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR khuẩn lạc sử dụng cặp mồi 35S-SQF/35Sterm, các dòng khuẩn *E. coli* 10G xuất hiện băng vạch có kích thước khoảng 2 kb (bằng kích thước của đoạn gen ecto H5 + 500 bp), điều này là đúng với tính toán lý thuyết. Ngoài ra, để kiểm tra sự hiện diện của các plasmid tái tổ hợp trong các dòng khuẩn, các plasmid được xử lý bằng hai enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI. Kết quả điện di ở hình 3.5C cho thấy các plasmid tái tổ hợp mang vector tách dòng pRTRA_H5/H5N6_pII hoặc pRTRA_H5/H5N6_pII_tp được kiểm tra cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI cho 2 băng vạch đúng tính toán lý thuyết khoảng 3 kb và 1,5 kb.

Như vậy, từ kết quả kiểm tra phản ứng PCR khuẩn lạc và xử lý enzyme giới hạn đều cho các băng vạch theo đúng tính toán lý thuyết. Qua đó chúng tôi có thể khẳng định đã thiết kế thành công vector tách dòng pRTRA mã hóa kháng nguyên H5 dạng trimer (GCN4pII) hoặc dạng oligomer (GCN4pII-tp) trong dòng khuẩn *E. coli* 10G. Sơ đồ của hai vector tách dòng pRTRA đề cập ở trên được thể hiện qua hình 3.6.



Hình 3.6. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA mang gen mã hóa protein H5 dạng trimer và oligomer

Plasmid mang vector tách dòng được tiếp tục xử lý với *Hind*III. Kết quả tại hình 3.7A cho thấy sự có mặt của đoạn gen mã hóa kháng nguyên H5 trimer (cấu trúc dung hợp GCN4pII) có kích thước 2560 bp và đoạn gen mã hóa kháng nguyên H5 oligomer (cấu trúc dung hợp GCN4pII-tp) 2622 bp theo đúng lí thuyết. Sau đó những đoạn gen này được chèn vào vector biểu hiện pCB301 tại vị trí *Hind*III. Dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp được lựa chọn bằng phản ứng PCR khuẩn lạc (sử dụng cặp môi 35S-SQF/35STerm), phản ứng cắt chọn dòng plasmid tái tổ hợp pCB301 bằng enzyme *Not*I. Các plasmid pCB301 tái tổ hợp được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* và chọn lọc các dòng khuẩn lạc AGL1 dương tính bằng phản ứng Colony PCR sử dụng cặp môi đặc hiệu 35S-SQF và 35STerm.



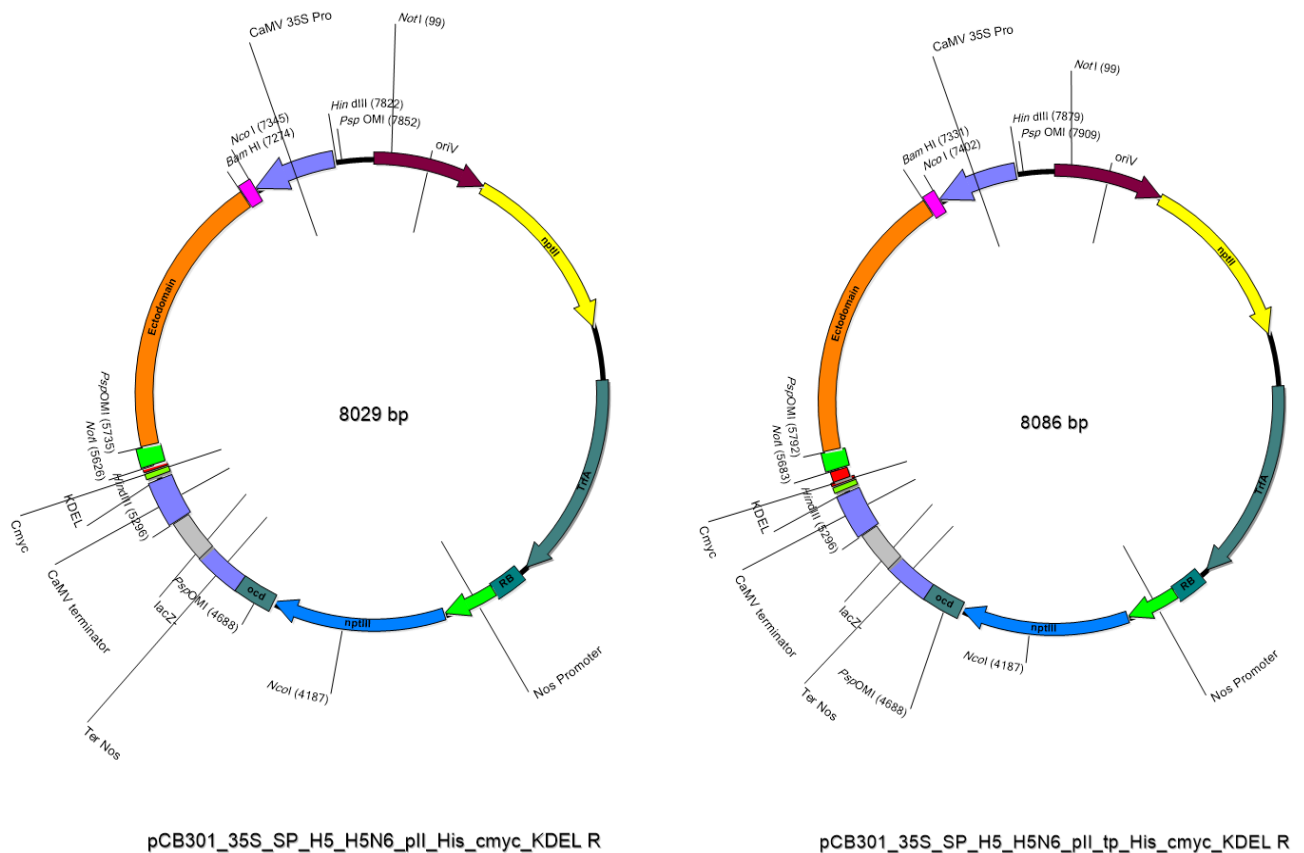
Hình 3.7. Kết quả thiết kế vector biểu hiện gen mã hóa kháng nguyên H5 cấu trúc dạng trimer (GCN4pII) và cấu trúc dạng oligomer (GCN4pII-tp)

A. Plasmid mang vector tách dòng pRTRA với cắt với HindIII; B. Kết quả Colony PCR khuẩn *E. coli* 10G sau khi nối đoạn H5-pII hoặc H5-tp đã xử lý với HindIII vào vector pCB301; C. Sản phẩm sau khi xử lý với enzyme NotI chọn lọc các dòng khuẩn ngược chiều pCB301 tái tổ hợp; D. Chọn lọc dòng khuẩn AGL1 mang vector tái tổ hợp bằng Colony PCR; M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1 đến 5: số thứ tự của dòng khuẩn lạc được chọn ngẫu nhiên.

Kết quả điện di sản phẩm PCR khuẩn lạc (hình 3.7B) cho thấy cả 2 dòng khuẩn *E. coli* 10G đều xuất hiện băng có kích thước khoảng 2 kb (bằng kích thước đoạn gen H5 + 500 bp), điều này là đúng với tính toán lý thuyết. Hình 3.7C 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 trùng với kích thước tính toán lý thuyết là khoảng 3 kb và 1,5 kb. Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng Colony PCR sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35STerm để

kiểm tra các dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 cho thấy cả 3 dòng khuẩn AGL1 đều có các băng với kích thước là khoảng 2 kb (trùng với kích thước lý thuyết tính toán của gen H5 + 500 bp) (hình 3.7D).

Như vậy, chúng tôi đã thiết kế thành công cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5 gắn kết pII hoặc pII-tp và tạo chủng *A. tumefaciens* AGL1 mang vector tương ứng. Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện thiết kế thành công được minh họa qua hình 3.8.

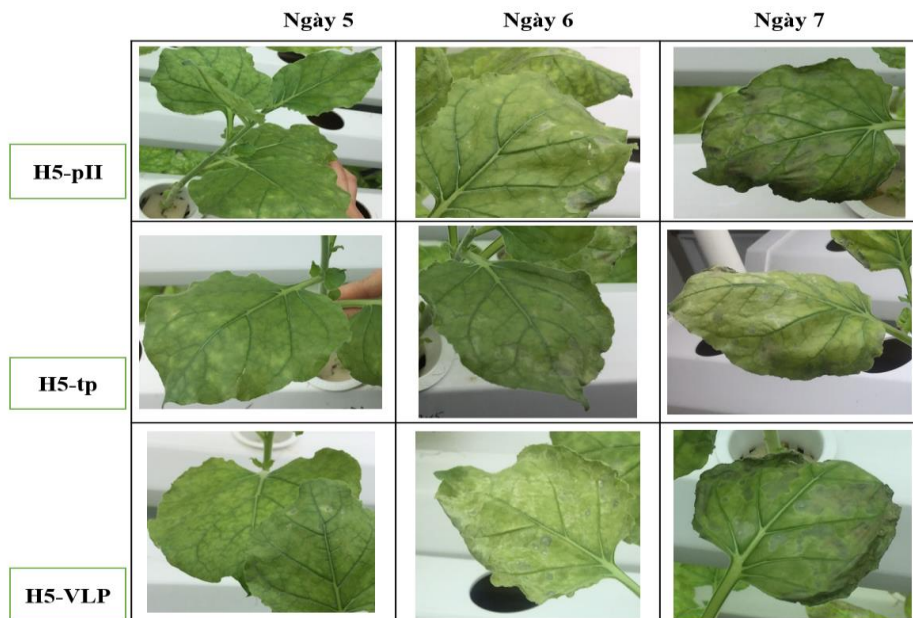


Hình 3.8. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa protein H5 dạng trimer và oligomer

Đây chính là nguồn nguyên liệu phục vụ cho mục đích sản xuất kháng nguyên H5 dạng trimer và oligomer của virus cúm A/H5N6 bằng phương pháp biểu hiện protein tạm thời agroinfiltration phục vụ cho những thí nghiệm tiếp theo.

3.2. BIỂU HIỆN TẠM THỜI CỦA CÁC KHÁNG NGUYÊN H5 (H5N6) TÁI TỔ HỢP TRÊN CÂY THUỐC LÁ *NICOTIANA BENTHAMIANA* BẰNG AGROINFILTRATION

Sự biểu hiện của protein sau biến nạp là yếu tố quan trọng để đánh giá hiệu quả biến nạp và biểu hiện gen. Trong nghiên cứu này, các kháng nguyên tái tổ hợp H5-VLP, H5-pII và H5-pII-tp đã được biến nạp vào cây thuốc lá bằng hệ thống biểu hiện tạm thời agroinfiltration qua chủng khuẩn *A. tumefaciens* AGL1. Cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 7 tuần tuổi tính từ lúc gieo hạt trong bình *in vitro* mang các đặc điểm như sau sẽ được sử dụng cho quá trình biến nạp: 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). Sau khi biến nạp chủng khuẩn AGL1 mang gen mã hóa các loại kháng nguyên H5 tái tổ hợp vào lá cây thuốc lá cùng với khuẩn hỗ trợ HcPRO, chúng tôi nhận thấy tại các vùng lá được biến nạp đã có sự thay đổi màu sắc và chất lượng theo từng ngày. Cụ thể ở mỗi cấu trúc, vào các ngày thứ 5, 6, 7 sau khi biến nạp, lá cây có hiện tượng khảm và héo úa vàng dần vào ngày 6 và ngày 7. Cây phát triển khỏe mạnh, lá xanh tốt không có biểu hiện khảm hoặc úa vàng sau biến nạp 5 ngày trên hệ thống nuôi cây thủy canh (Xem hình 3.9).



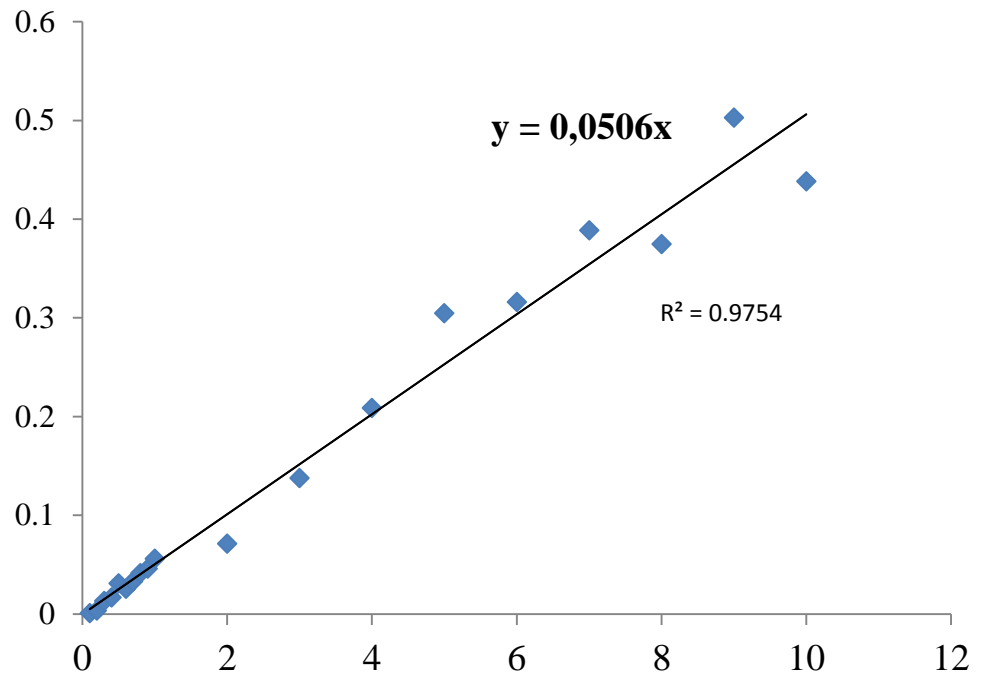
Hình 3.9. Ảnh lá thuốc lá sau 5, 6, 7 ngày biến nạp cấu trúc H5 trimer, H5 oligomer và H5-VLP

- Đo nồng độ protein tổng số bằng phương pháp Bradford

Bảng 3.1. Giá trị nồng độ protein chuẩn BSA đo tại bước sóng 595 nm

Nồng độ BSA (mg/ml)	OD595nm
0,1	0,001
0,2	0,003333333
0,3	0,013333333
0,4	0,016666667
0,5	0,031
0,6	0,025666667
0,7	0,033
0,8	0,041333333
0,9	0,046
1	0,056
2	0,071333333
3	0,137666667
4	0,208666667
5	0,304666667
6	0,316
7	0,388666667
8	0,374666667
9	0,502666667
10	0,438333333

Dãy các giá trị OD ở bảng 3.1 được sử dụng để dựng đường chuẩn trong excel. Kết quả dựng đường chuẩn là $y=0.0506x$ với $R^2 = 0,9754$ (Xem hình 3.10).



Hình 3.10. Đồ thị đường chuẩn của protein bằng phương pháp Bradford.

Mẫu lá từ tủ lạnh âm sâu được nghiền thành bột đồng nhất bằng nitor lỏng. Sau đó, bổ sung 250 μ l SDS sample buffer 1X vào 100 mg bột lá đem tách chiết protein tổng số. Sau khi tách protein tổng số, nồng độ protein tổng số được tính bằng thử nghiệm Bradford.

Bảng 3.2. Kết quả xác định hàm lượng protein tổng số trong mẫu dịch chiết lá bằng phương pháp Bradford

Mẫu	OD _{595nm}	μ g protein tổng số / μ l dịch chiết
H5 trimer (H5-GCN4pII)	0,168	3,32
H5 oligomer (H5-GCN4pII-tp)	0,175	3,46
H5-VLP	0,182	3,6
Dịch chiết lá <i>N. benthamiana</i> không chuyển gen (Wild type)	0,16	3,16

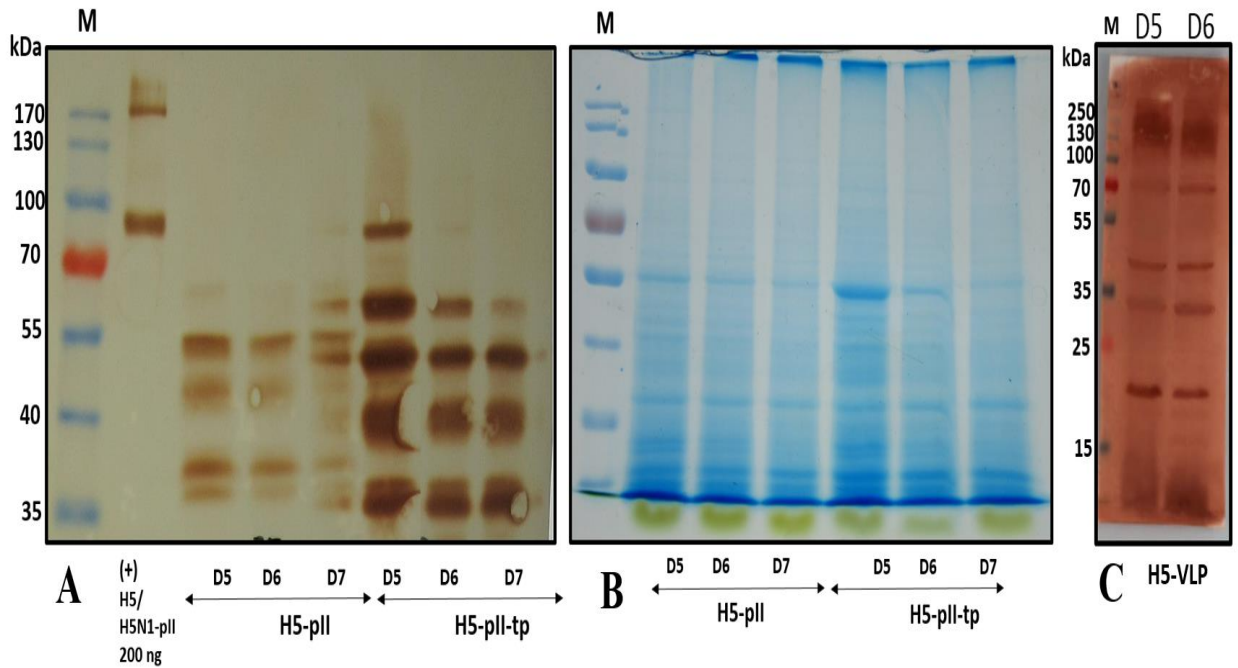
Như vậy, hàm lượng protein tổng số thu được từ dịch chiết lá biến nạp cấu trúc H5 trimer, H5 oligomer, H5-VLP và lá cây thuốc lá wild type (WT) lần lượt là 3,32; 3,46; 3,6 và 3,16 mg/ml (theo bảng 3.2). Trong đó nồng độ

của protein tổng số trong dịch chiết mẫu H5-VLP đạt cao nhất. Dịch chiết protein tổng số từ lá của các cây thuốc lá được biến nạp khuẩn *A. tumefaciens* được sử dụng để kiểm tra biểu hiện của các protein H5 mục tiêu bằng phân tích trên SDS-PAGE và Western blot.

Sự biểu hiện tạm thời của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp được đánh giá bằng phản ứng Western blot và phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA assay).

Protein H5 dung hợp cấu trúc trimer (GCN4pII) và protein H5 dung hợp cấu trúc oligomer (GCN4pII-tp) được phát hiện với kháng thể 1 là 6x-His tag, kháng thể 2 là anti-mouse IgG có gắn HRP (horseradish Peroxidase); còn protein H5 dạng VLP được phát hiện với kháng thể 1 là huyết thanh gà chứa kháng thể chống chủng cúm H5N1 – kết quả thuộc nhóm nghiên cứu của Phan và cộng sự [44], kháng thể 2 là anti-rabbit IgG có gắn HRP. Cơ chất hiện màu là DAB bổ sung H₂O₂. Đối chứng dương sử dụng để so sánh trong thí nghiệm này là protein H5/H5N1-pII (kết quả của Phan và cộng sự [44]).

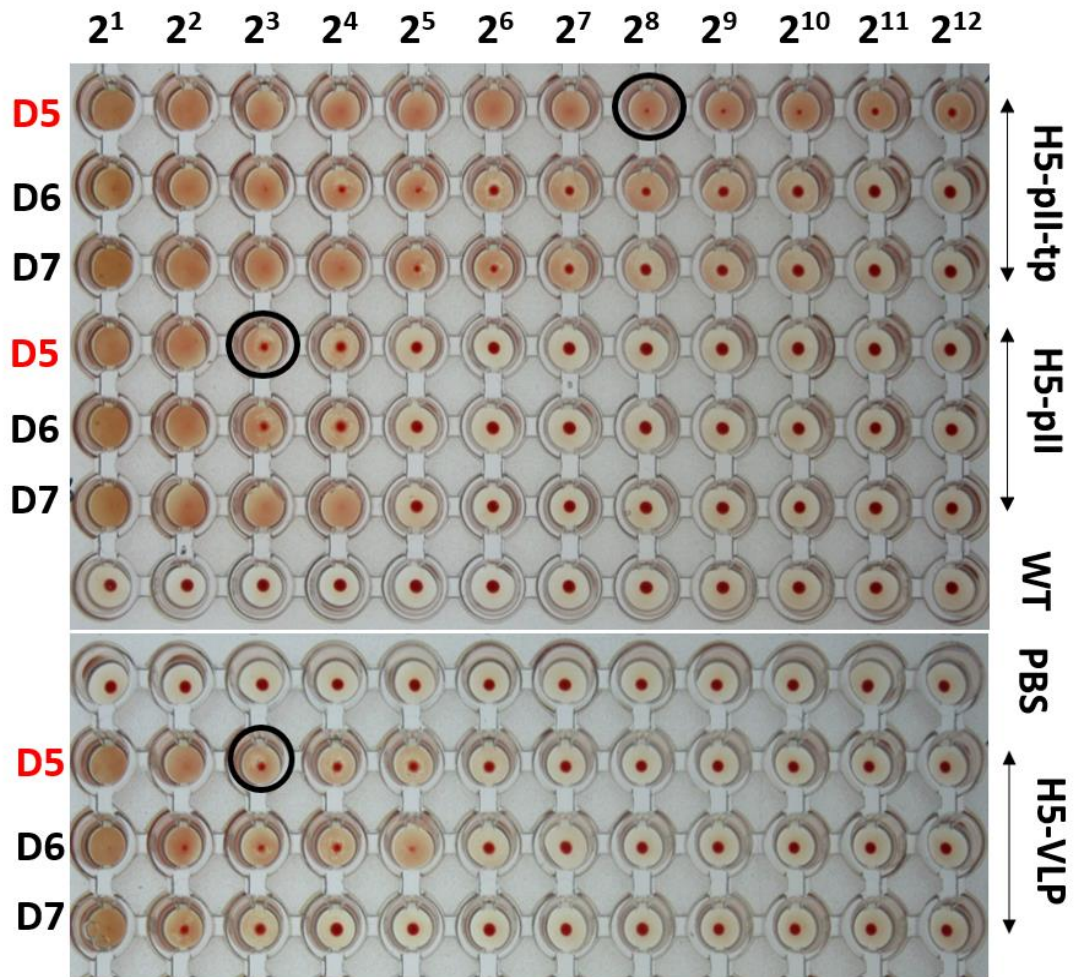
Kết quả Western Blot và nhuộm gel Coomassie Brilliant blue cho thấy mức độ biểu hiện của protein H5 có gắn kết pII biểu hiện thấp hơn nhiều so với mức độ biểu hiện của protein H5 gắn kết pII-tp (hình 3.11A và 3.11B). Sự biểu hiện của từng loại protein H5 trimer hoặc H5 oligomer hoặc H5-VLP cùng protein hỗ trợ HC-Pro trong lá thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp agroinfiltration nhờ chủng AGL1 đều đạt giá trị cao nhất ở ngày thứ 5 sau khi biến nạp, có xu hướng giảm dần vào ngày 6 và ngày 7 (Hình 3.11A và 3.11C). Điều này khá tương đồng với biểu hiện hình thái của lá cây sau biến nạp với sự xuất hiện của các vết khảm bắt đầu từ ngày thứ 6 trở đi. Theo những nghiên cứu của nhóm tác giả Vũ Huyền Trang và cộng sự [64], các protein HA tái tổ hợp thông thường sẽ biểu hiện ở lá sau 3 ngày được biến nạp trở lên. Khi theo dõi quá trình phát triển của cây sau biến nạp, thời điểm thu hoạch lá tốt nhất là trước khi lá xảy ra có hiện tượng khảm vàng và héo úa vì lúc đó biểu hiện và chất lượng protein có sự giảm sút.



Hình 3.11. Mức độ biểu hiện của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp trong dịch chiết từ lá cây thuốc lá sau 5, 6, 7 ngày biến nạp

A. Kết quả kiểm tra mức độ biểu hiện kháng nguyên H5 trimer và oligomer bằng Western Blot (Kháng thể 1: his-tag; Kháng thể 2: anti-mouse IgG cộng hợp HRP, phát hiện bằng DAB có bổ sung H_2O_2); D5, D6, D7 tương ứng với ngày 5, 6, 7 sau khi biến nạp; M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10-170 kDa hoặc 10-250 kDa; (+): Đối chứng dương – protein H5/H5N1-pII; B. Kết quả điện di SDS-PAGE và nhuộm gel Coomassie Brilliant blue kiểm tra protein tan tổng số từ dịch chiết lá; C. Mức độ biểu hiện kháng nguyên H5-VLP (Kháng thể 1: huyết thanh gà H5N1; Kháng thể 2: anti-rabbit IgG cộng hợp HRP).

Hoạt tính sinh học của các protein H5 tái tổ hợp dạng trimer, oligomer và dạng VLP được kiểm tra hoạt tính sinh học thông qua phản ứng ngưng kết hồng cầu (Hemagglutination assay – HA). Đây như một phương pháp để định lượng nồng độ tương đối của virus, trong thí nghiệm này được hiểu là nồng độ của kháng nguyên tái tổ hợp mục tiêu.



Hình 3.12. Kiểm tra hoạt tính sinh học của kháng nguyên H5 tái tổ hợp bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu (HA)

D5, D6, D7 tương ứng với ngày 5, 6, 7; WT: mẫu lá Nicotiana benthamiana không chuyển gen (Wild type).

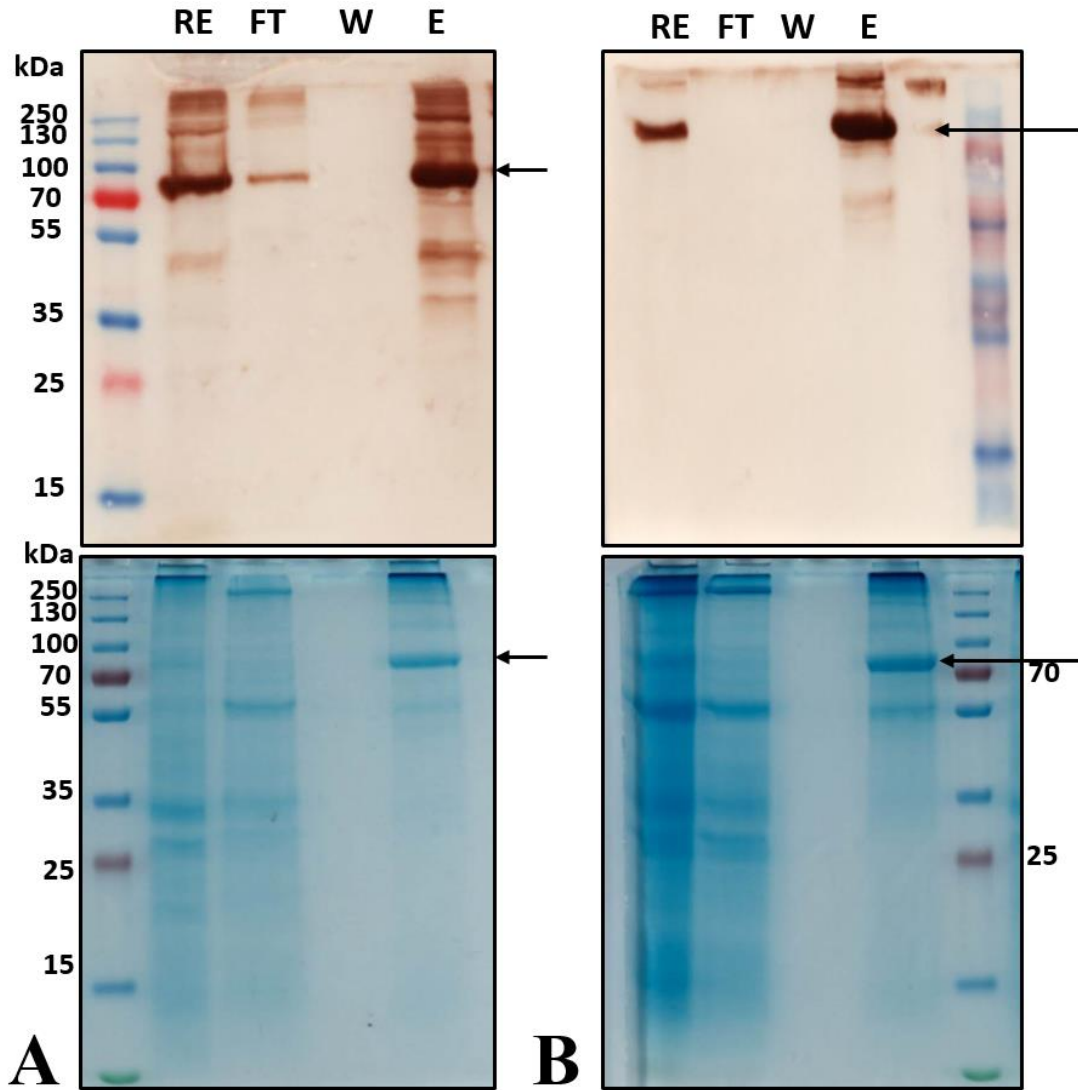
Kiểm tra hoạt tính sinh học của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu cho thấy hiệu giá HA đạt cao nhất cũng vào ngày thứ 5 sau khi biến nạp, tương đồng với kết quả western blot, trong đó cấu trúc H5 trimer, H5 oligomer và H5-VLP có hiệu giá HA lần lượt là 2^3 , 2^8 , 2^3 (Hình 3.12). Điều đó chỉ ra rằng protein H5 oligomer có đặc tính ngưng kết tế bào hồng cầu mạnh hơn so với hai protein còn lại.

3.3. TINH SẠCH PROTEIN TÁI TỔ HỢP H5 TRIMER, OLIGOMER VÀ H5-VLP

3.3.1. Tinh sạch kháng nguyên H5 dung hợp cấu trúc pII và pII-tp bằng sắc ký ái lực kim loại cố định (IMAC)

Phương pháp sử dụng sắc ký ái lực kim loại cố định (IMAC) được dùng rất nhiều trong các nghiên cứu vắc-xin để tinh sạch các protein tái tổ hợp chứa một thẻ ái lực gắn bao gồm các gốc polyhistidine dựa trên sự tương tác đặc hiệu mạnh giữa các axit amin này và các ion kim loại cố định (Co^{2+} , Ni^{2+}). Để phát hiện chính xác chức năng và cấu trúc của các protein HA nghiên cứu, dịch chiết xuất thô của protein H5 đã được sử dụng cho phương pháp tinh chế bằng IMAC. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch bằng IMAC của các protein COE từ thực vật bao gồm dịch chiết thô, phân đoạn không bám Ni-agarose, phân đoạn rửa và phân đoạn chứa protein tinh sạch. Dịch chiết thuốc lá (đệm chiết sử dụng là binding buffer với các thành phần 20mM sodium phosphate, 500 mM NaCl, pH 7,4) có chứa protein được ủ với Ni-NTA agarose. Các protein H5 có chứa các đuôi histidine sẽ được giữ lại một cách hiệu quả 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. Đối với H5 trimer và oligomer, nồng độ imidazole 10 và 500 mM lần lượt được sử dụng cho bước rửa và hoà tan protein.

Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch bằng IMAC của các protein H5 trimer và H5 oligomer tp được đo nồng độ protein bằng phương pháp đo Bradford, sau đó kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE, nhuộm bằng Coomassiblue và đánh giá bằng Western blot. Kết quả cho thấy rằng, các protein H5 trimer và H5 oligomer đã được tinh sạch thành công từ thực vật sử dụng phương pháp sắc ký ái lực (IMAC) với độ tinh sạch trên 80% (hình 3.13). Các kháng nguyên H5 trimer bám chưa hoàn toàn với hạt Ni-agarose và trong quá trình rửa protein mục tiêu không bị thất thoát, còn kháng nguyên H5 oligomer bám hoàn toàn với hạt. Các protein có chứa các dạng trimer, oligomer được phân tách ở điều kiện điện di biến tính.

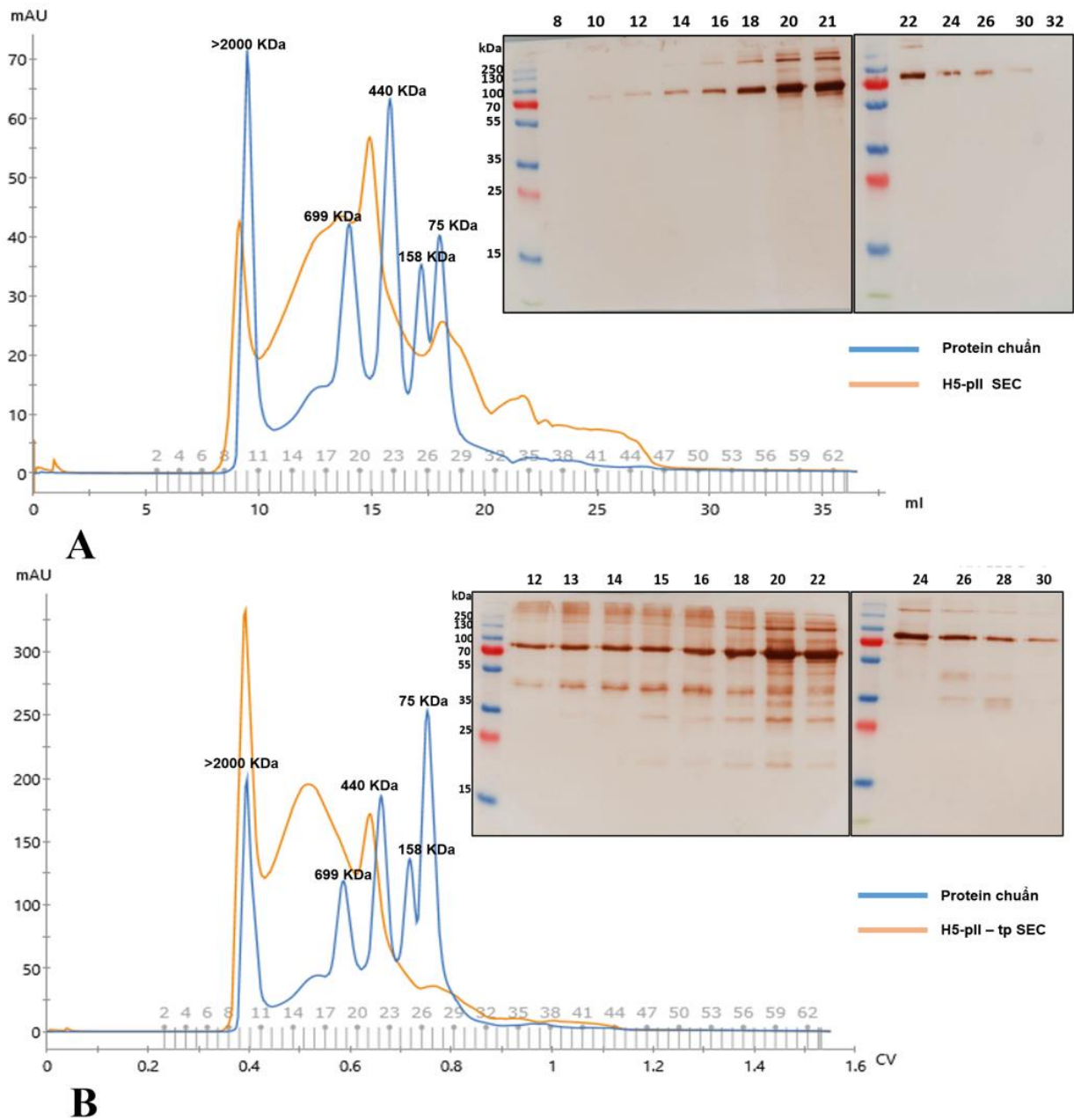


Hình 3.13. Kết quả Western Blot và điện di SDS-PAGE kiểm tra quá trình tinh sạch các protein H5 trimer (A) và H5 oligomer (B) bằng IMAC.

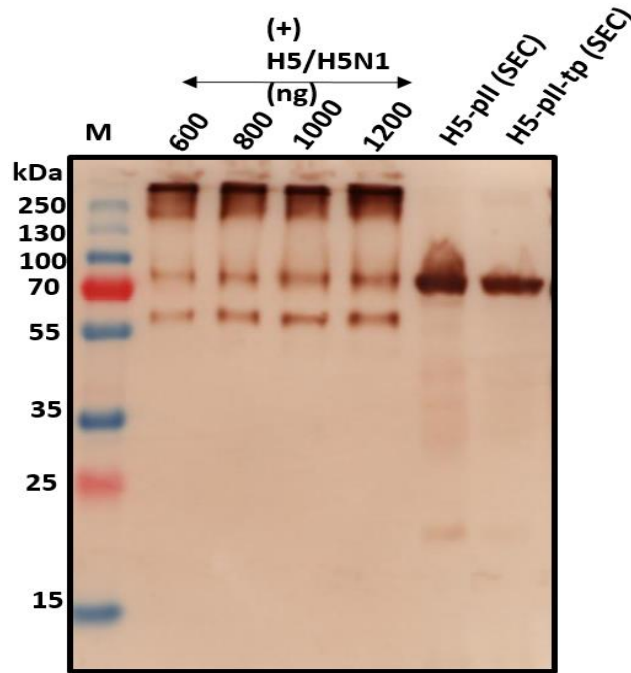
RE: Dịch chiết tổng số, FT: Dịch không bám Ni-Agarose chảy qua, W: Dịch rửa chảy qua, E: Protein tinh sạch. 15 μ g protein tổng số của RE, FT, W và 5 μ l protein tinh sạch được phân tách trên gel SDS-PAGE 12%.

Để cải thiện độ tinh sạch đồng thời đánh giá đặc điểm cấu trúc trimer, oligomer của các protein H5 sau khi tinh sạch bằng IMAC, phương pháp sắc ký lọc gel (SEC) được sử dụng. Kết quả phân tích các phân đoạn sau tinh sạch protein H5 bằng SEC sử dụng Western blot cho thấy protein H5 trimer tập trung ở các phân đoạn từ 18 đến 21 (hình 3.14 A), các protein H5 oligomer tập trung ở các phân đoạn từ 12 đến 24 (hình 3.14 B). Điều này chứng tỏ rằng, so với H5 dạng monomer, việc dung hợp motif pII và H5 đã tạo ra dạng dung

hợp trimer, hoặc dung hợp motif pII-tp vào protein H5 đã tạo thành H5 dạng oligomer có kích thước lớn hơn trimer. Lượng protein tinh sạch bằng SEC đều có độ tinh sạch cao.

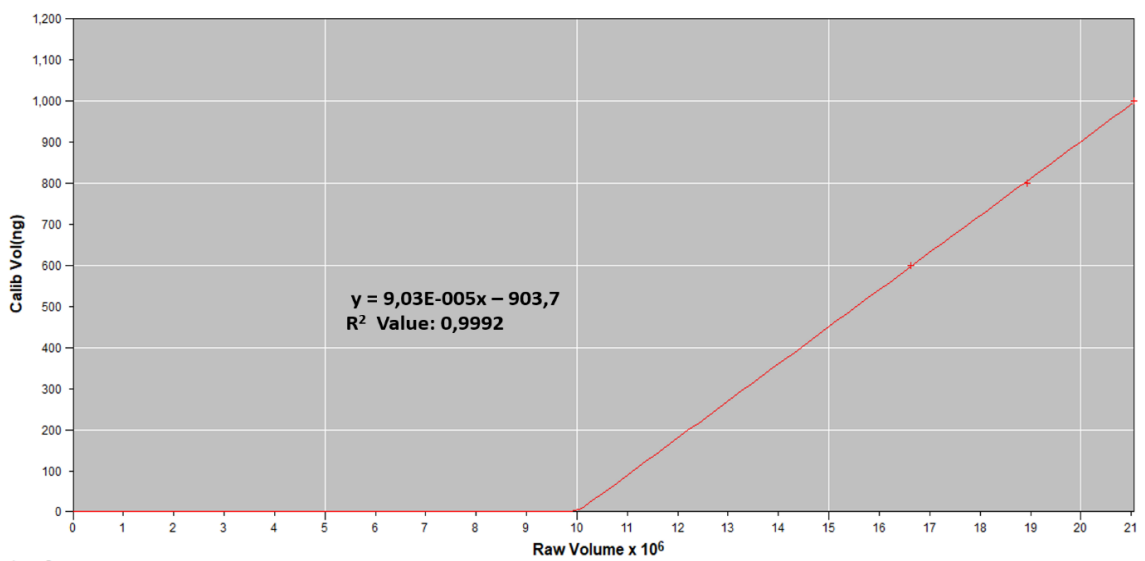


Hình 3.14. Kết quả tinh sạch protein H5 trimer (A) và H5 oligomer (B) trimer bằng SEC.



Hình 3.15. Định lượng protein H5 trimer và H5 oligomer tinh sạch SEC bằng Western Blot

Các protein H5 tái tổ hợp tinh sạch bằng SEC được định lượng dựa vào đường chuẩn được xây dựng từ protein H5/H5N1-pII (kết quả của Phan và cộng sự [44]) sử dụng phần mềm ImageQuant TL 8.0 (Cytiva) để phục vụ cho thí nghiệm đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp trên chuột.

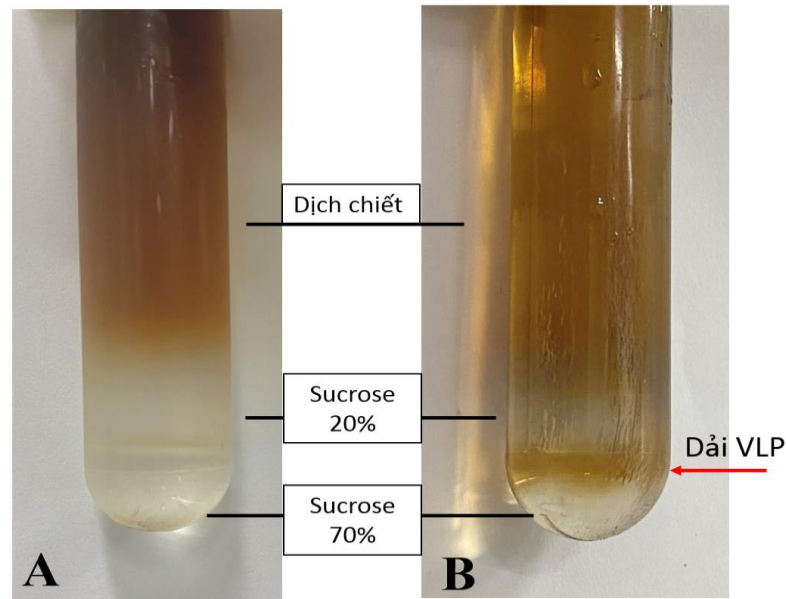


Hình 3.16. Đường chuẩn định lượng được xây dựng từ protein HA bằng phần mềm

Phân tích kết quả từ hình 3.15 và 3.16, mẫu kháng nguyên H5 trimer (SEC) và H5 oligomer (SEC) được tính toán cho nồng độ lần lượt là 71,5 ng/ μ l và 93,8 ng/ μ l. Mỗi mẫu thu được thể tích khoảng 500 μ l. Như vậy tổng hàm lượng kháng nguyên H5 trimer (SEC) đạt 35,75 μ g và H5 oligomer (SEC) đạt 46,9 μ g.

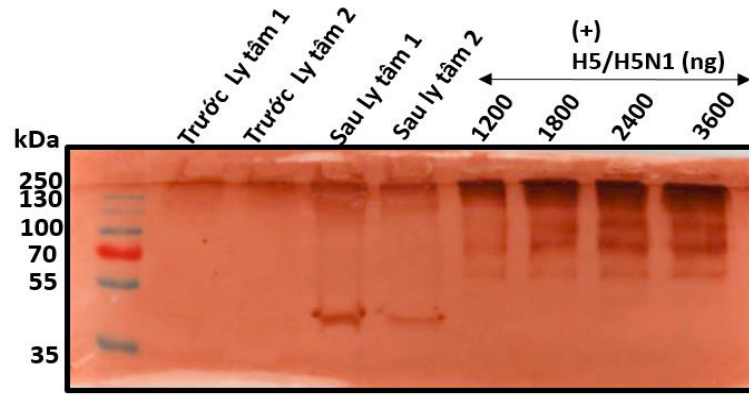
3.3.2. Tinh sạch kháng nguyên H5-VLP

Tinh sạch phần dịch chiết thô chứa kháng nguyên VLP bằng phương pháp sử dụng dung dịch sucrose 20% và 70% kết hợp siêu ly tâm trong 2 giờ với tốc độ 60.000 v/p, ta thu được kết quả xuất hiện dải phân lớp trong ống ly tâm: gần miệng ống ly tâm là phần màu dịch chiết thô, tiếp sau đó là lớp sucrose 20%, nằm ngay bên dưới là dải VLP mà nâu vàng, cuối cùng nằm dưới đáy ống là lớp sucrose 70% (Hình 3.17B). Trong khi đó, ở mẫu trước khi siêu ly tâm không xuất hiện dải màu nâu vàng nằm giữa lớp sucrose 20% và 70% (Hình 3.17A).



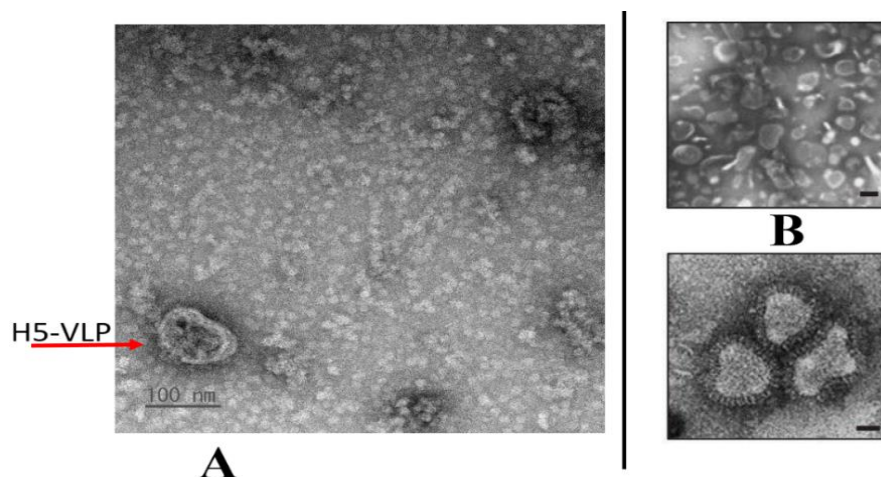
Hình 3.17. Dịch chiết thô chứa kháng nguyên H5-VLP trước (A) và sau (B) khi tinh sạch bằng đệm sucrose kết hợp siêu ly tâm

Thu phần dải VLP quan sát được bằng kim tiêm, mẫu được kiểm tra bằng Western Blot. Kháng thể 1 sử dụng là huyết thanh H5N1 từ gà (độ pha loãng 1:100) và kháng thể 2 là anti-rabbit IgG (độ pha loãng 1:2500). Qua hình 3.18, cho thấy sự xuất hiện của kháng nguyên H5-VLP tăng sau khi tinh sạch bằng phương pháp siêu ly tâm cùng dải nồng độ sucrose.



Hình 3.18. Biểu hiện của kháng nguyên H5-VLP tinh sạch bằng sucrose.

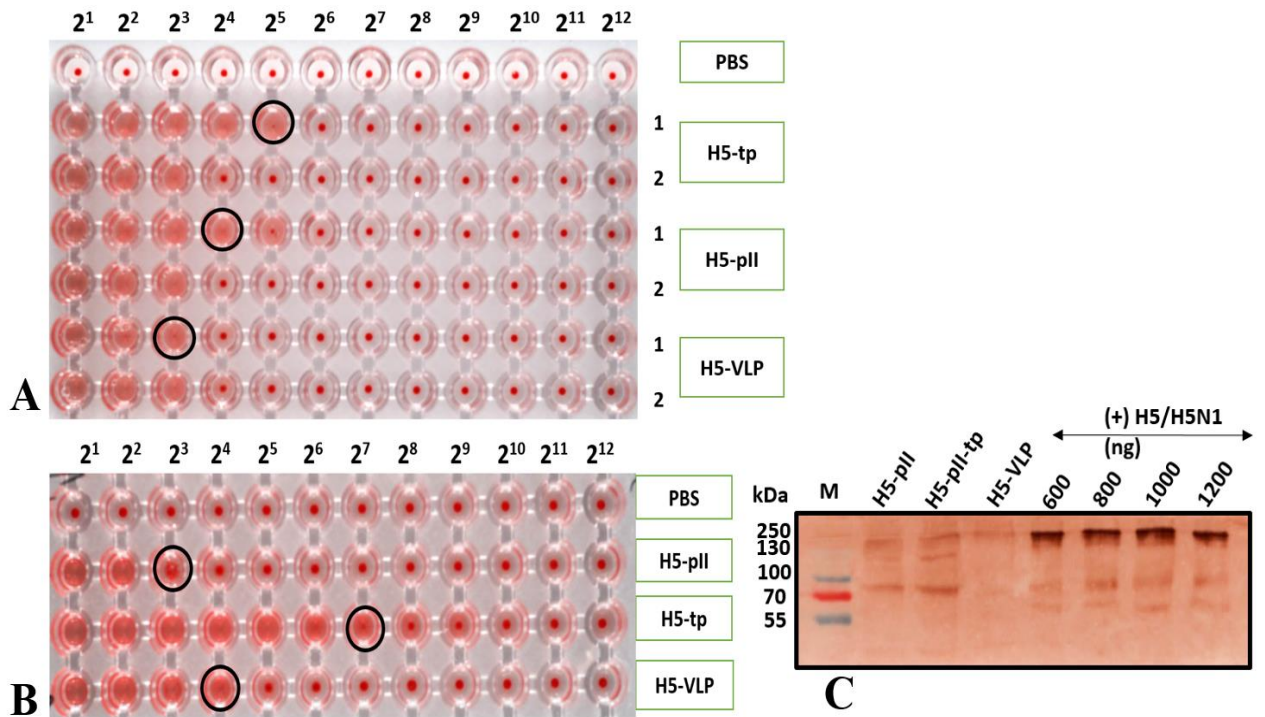
Mẫu kháng nguyên H5-VLP tinh sạch được gửi đến Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương để quan sát hình thái bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). So sánh ảnh chụp hình thái mẫu kháng nguyên H5-VLP từ chủng cúm A/H5N6 (Hình 3.19A) bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) với nghiên cứu trước đây được Marc-André D'Aoust và cộng sự công bố [53] (Hình 3.19 B), ta nhận thấy sự tương đồng về hình thái (kích thước khoảng 100 nm). Kháng nguyên tinh sạch H5-VLP từ chủng cúm A/H5N6 đã được kiểm chứng sự biểu hiện qua bản Western Blot, đồng thời xuất hiện hình dạng tương đồng khi chụp qua kính hiển vi, bởi vậy nên có thể khẳng định được đã tạo được kháng nguyên H5 dạng VLP qua hệ thống biểu hiện trên cây thuốc lá. Tuy nhiên mật độ xuất hiện của kháng nguyên chưa nhiều nên cần có phương pháp để tăng nồng độ của kháng nguyên VLP trong mẫu tinh sạch.



Hình 3.19. Hình chụp hạt giả virus của kháng nguyên H5 thuộc chủng cúm A/H5N6 (A) và hạt giả virus của kháng nguyên H5 thuộc chủng cúm A/H5N1 (B) [53]

3.4. ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP H5 TRÊN CHUỘT THÍ NGHIỆM

Các dịch chiết thực vật biểu hiện protein H5 –VLP, H5 dung hợp cấu trúc trimer và H5 dung hợp cấu trúc oligomer sử dụng để đánh giá tính sinh miễn dịch trên chuột. Lá biểu hiện kháng nguyên được chiết trong đệm PBS hoặc đệm Binding.



Hình 3.20. Hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp và bán định lượng mẫu kháng nguyên bằng Western Blot

A. Kết quả khả năng ngưng kết hồng cầu của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp sử dụng đệm chiết PBS (1) hoặc đệm Binding (2); B. Kết quả hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các mẫu kháng nguyên dùng để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột; C. Định lượng mẫu kháng nguyên dùng để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột bằng Western Blot (Kháng thể 1: huyết thanh gà H5N1; Kháng thể 2: goat anti-rabbit IgG cộng hợp HRP), M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa), (+) Đối chứng dương H5/H5N1-pII.

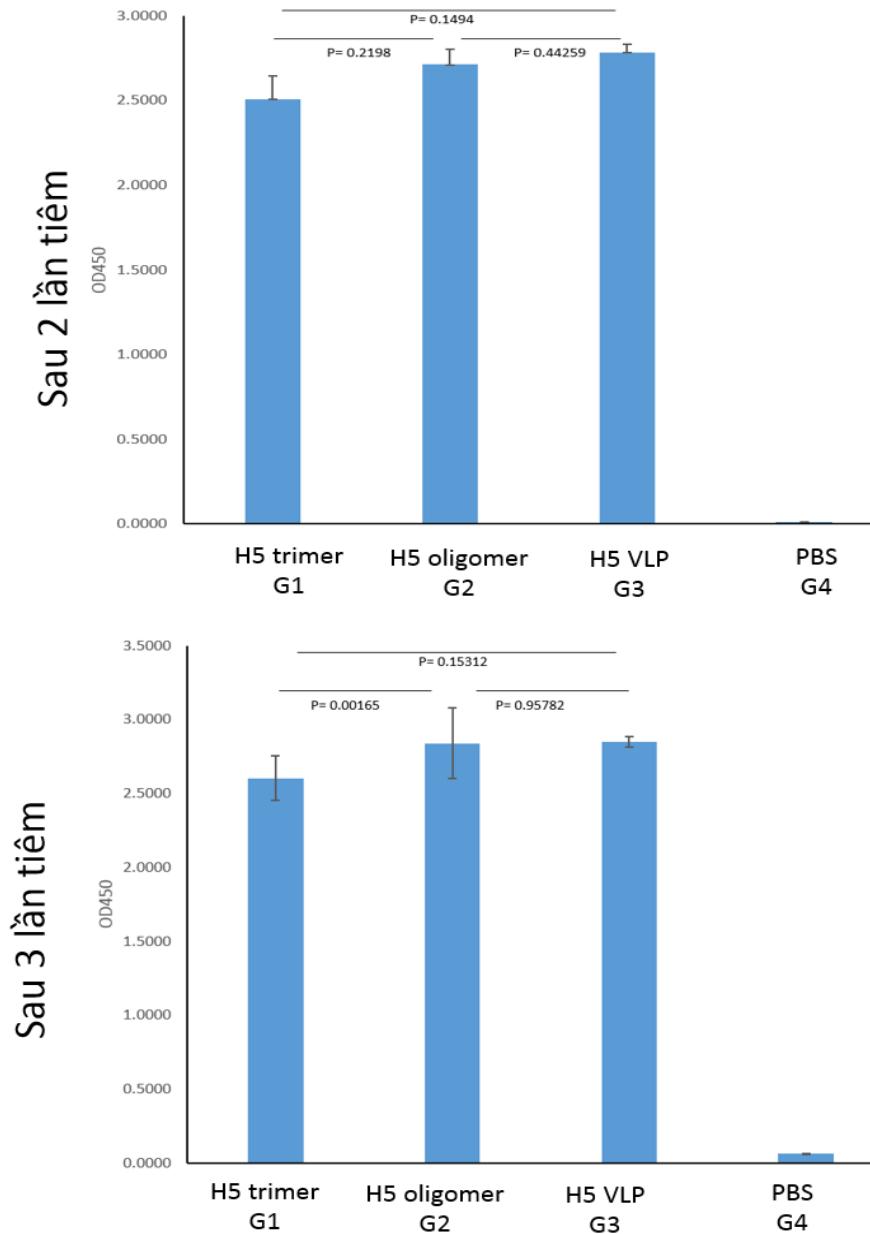
Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu dịch chiết trong đệm PBS đều cho giá trị HA cao hơn so với mẫu chiết bằng đệm Binding lần lượt là 2⁵, 2⁴, 2³ tương ứng với mẫu kháng nguyên H5 oligomer tp, H5 trimer và H5-VLP (theo hình 3.20A). Như vậy, lựa chọn chiết các mẫu lá chứa kháng nguyên tái

tổ hợp trong đệm PBS để đặc tính chức năng của kháng nguyên đạt cao nhất trong mẫu thí nghiệm tiêm chuột. Dịch chiết thô của các kháng nguyên H5 tái tổ hợp tiếp tục được cô bằng muối PEG 6000 với mục đích nhằm nâng cao nồng độ kháng nguyên. Nhận thấy đối với mẫu H5-GCN4pII-tp và H5-VLP khi cô dịch chiết bằng PEG có sự tăng hiệu giá HA, cụ thể cấu trúc oligomer tăng từ 2^5 lên 2^7 và H5-VLP tăng từ 2^3 lên 2^4 , còn kháng nguyên dung hợp trimer pII thì không có sự tăng mà giảm từ 2^4 xuống 2^3 (Hình 3.20B). Kiểm tra nồng độ của mẫu kháng nguyên, định lượng dựa trên dải nồng độ của protein H5/H5N1 cho thấy các kháng nguyên tái tổ hợp được biểu hiện nhưng nồng độ nằm dưới ngưỡng có thể tính toán được bằng phần mềm (Xem hình 3.20C).

Như vậy, mẫu kháng nguyên tiêm chuột sẽ được lựa chọn dựa vào điều kiện mà giá trị HA titer tại đó đạt giá trị cao nhất trong nghiên cứu. Các nhóm chuột trong nghiên cứu khả năng gây đáp ứng miễn dịch của dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên H5 tái tổ hợp bao gồm H5-GCN4pII trimer (G1) hoặc H5-GCN4pII-tp oligomer (G2) hoặc H5-VLP (G3), đệm chiết PBS (đối chứng âm G4).

3.4.1. Đánh giá khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu bằng phản ứng ELISA và Western blot

Đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu H5N6 được đánh giá trên các huyết thanh chuột được tiêm bằng phản ứng ELISA gián tiếp sử dụng kháng nguyên là H5 trimer tái tổ hợp tinh sạch bằng SEC.



Hình 3.21. Kết quả đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu trên các huyết thanh chuột được tiêm bằng phản ứng ELISA.

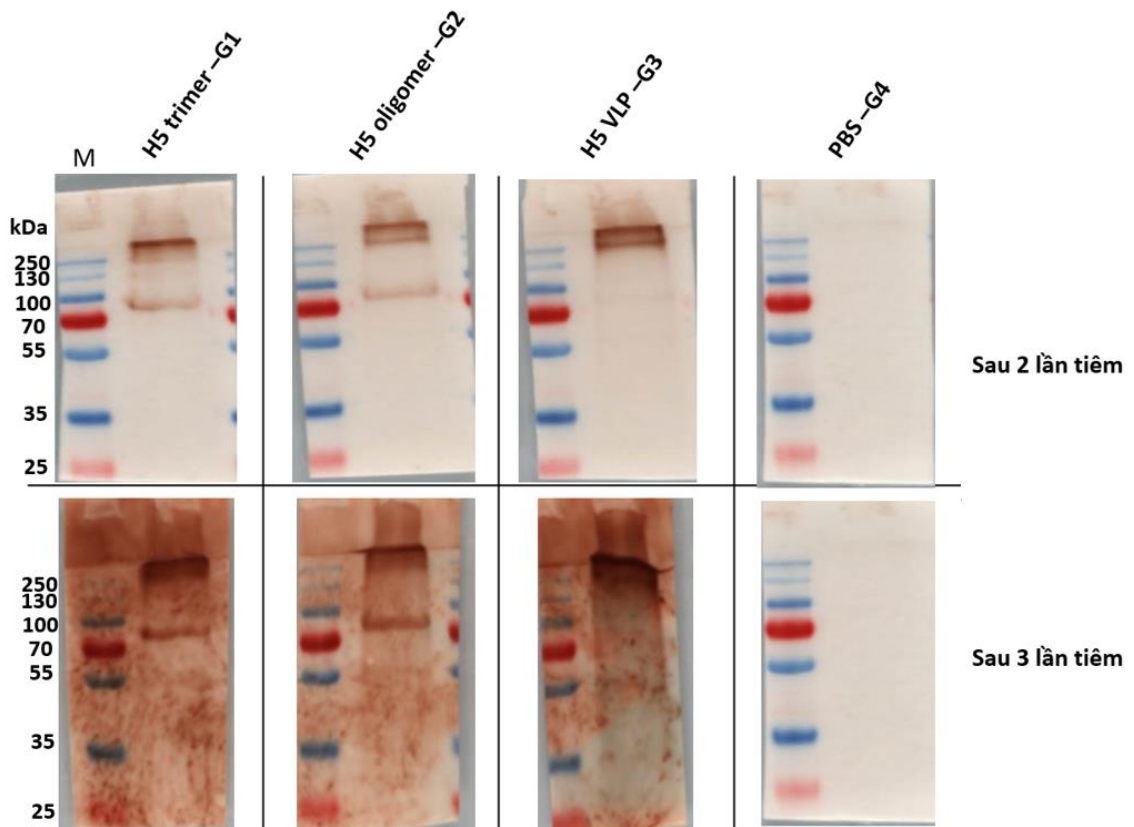
($P < 0,05$: sai số có ý nghĩa thống kê)

Kết quả cho thấy kháng thể IgG đặc hiệu được phát hiện ở tất cả các nhóm chuột được tiêm với kháng nguyên H5 tái tổ hợp trong nghiên cứu (H5 trimer hoặc H5 oligomer-tp hoặc H5-VLP, trong đó nhóm chuột được tiêm với kháng nguyên H5-VLP có kết quả đáp ứng kháng thể cao nhất ở cả mẫu huyết thanh thu sau 2 lần tiêm và 3 lần tiêm. Trong khi đó, ở các nhóm chuột đối chứng âm (được tiêm với PBS) không phát hiện có đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu. Không có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nhóm chuột được tiêm với các kháng nguyên H5 mục tiêu bao gồm H5 trimer (G1) hoặc H5

oligomer-tp (G2) với nhóm được tiêm H5-VLP với 2 lần tiêm (với giá trị $P=0,1494$ và $P=0,44259 > 0,05$) (Xem hình 3.21).

Khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu còn được xác nhận ở huyết thanh chuột được tiêm qua phản ứng Western blot. Kháng nguyên H5 trimer tái tổ hợp tinh sạch bằng SEC được phân tách bằng điện di SDS-PAGE gel 12%, chuyển màng và được phát hiện bằng hỗn hợp các huyết thanh của nhóm chuột thu được sau 2 lần tiêm và 3 lần tiêm.

Kết quả phản ứng Western blot đã một lần nữa khẳng định sự hiện diện của kháng thể IgG đặc hiệu trong các nhóm chuột được tiêm với dịch chiết chứa kháng nguyên tái tổ hợp mục tiêu cả sau 2 lần tiêm và 3 lần tiêm, trong khi không có sự hiện diện của kháng thể IgG đặc hiệu đối với nhóm đối chứng âm (Xem hình 3.22).



Hình 3.22. Đánh giá đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu ở chuột được tiêm bằng phản ứng Western blot.

3.4.2. Đánh giá khả năng kích thích sản sinh kháng thể đặc hiệu bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI)

Sau khi có kết quả đáp ứng miễn dịch trên chuột qua ELISA và Western blot, mẫu huyết thanh chuột thu sau 3 lần tiêm được gửi đến Trung Tâm Chẩn Đoán Thú Y Trung Ương xét nghiệm bằng phản ứng HI. Đối với huyết thanh chuột thu sau tiêm lần 3 khi tiêm kháng nguyên tái tổ hợp H5 dung hợp cấu trúc trimer hoặc oligomer, hiệu giá HI không được phát hiện kháng chéo chủng cúm H5N1 và H5N8 (âm tính), chỉ có khả năng bảo hộ với chính chủng cúm H5N6 (dương tính). Đặc biệt, khi tiêm cho chuột mẫu chiết có chứa kháng nguyên H5-VLP, kết quả mẫu huyết thanh thu được có hiệu giá HI đạt $5\log_2$ ($\geq 4\log_2$, dương tính) đối với cả chủng H5N6 và chủng H5N8 (theo bảng 3.3). Như vậy, trong nghiên cứu này, kháng nguyên tái tổ hợp H5-VLP có khả năng bảo hộ chéo chủng cúm H5N8, tạo tiềm năng sản xuất vắc-xin cúm có khả năng chống lại nhiều virus cúm khác nhau.

Bảng 3.3. Hiệu giá kháng thể HI và kết quả bảo hộ chéo chủng của kháng nguyên H5 tái tổ hợp

Ghi chú: Hiệu giá kháng thể Cúm gia cầm $\geq 4\log_2$: Dương tính

Kháng nguyên	Kháng thể cúm gia cầm subtype H5N1		Kháng thể cúm gia cầm subtype H5N6		Kháng thể cúm gia cầm subtype H5N8	
	Hiệu giá (log ₂)	Kết quả	Hiệu giá (log ₂)	Kết quả	Hiệu giá (log ₂)	Kết quả
H5 trimer	0	Âm tính	5	Dương tính	0	Âm tính
H5 oligomer	0	Âm tính	6	Dương tính	3	Âm tính
H5-VLP	0	Âm tính	5	Dương tính	5	Dương tính
PBS	0	Âm tính	3	Âm tính	0	Âm tính

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Thiết kế thành công các vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên H5-GCN4pII trimer, kháng nguyên H5-GCN4pII-tp oligomer, kháng nguyên H5-VLP và tạo chủng *Agrobacterium* mang cassette biểu hiện tương ứng theo đúng tính toán lý thuyết.
2. Các protein tái tổ hợp H5 trimer, oligomer, VLP được biểu hiện thành công trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* Domin và có hoạt tính sinh học kiểm tra bằng phản ứng ngưng kết hồng cầu với hiệu giá HA lần lượt là 2^3 , 2^8 và 2^3 .
3. Kháng nguyên H5-GCN4-pII, H5-GCN4pII-tp và H5-VLP đều được tinh sạch thành công. Phát hiện được sự có mặt, hình thái của dạng cấu trúc H5-VLP trong sản phẩm tinh sạch sơ bộ kháng nguyên bằng đệm sucrose.
4. Các kháng nguyên H5 tái tổ hợp đều có khả năng kích thích sản sinh kháng thể đặc hiệu và kháng thể trung hòa virus đối với chủng cúm A/H5N6, đặc biệt cấu trúc H5 dạng VLP còn có khả năng bảo hộ chéo chủng với cúm A/H5N8.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu và thực hiện tối ưu quá trình tinh sạch kháng nguyên H5-VLP để thu được nồng độ cao hơn và quan sát được cấu trúc dạng VLP với mật độ dày hơn bằng kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM). Bên cạnh đó, tiếp tục tiến hành kiểm tra khả năng sinh miễn dịch và khả năng bảo hộ của kháng nguyên H5 dạng VLP trên gà để hoàn thiện thêm bộ số liệu chứng minh tính toàn diện về hoạt tính sinh học của kháng nguyên tái tổ hợp tạo ra.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Hữu Côn, Bùi Quang Anh, 2004, *Bệnh cúm gia cầm và biện pháp phòng chống*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Morens D.M., North M., Taubenberger J.K., 2010, Eyewitness accounts of the 1510 influenza pandemic in Europe, *The Lancet*, 376(9756), pp. 1894–1895.
3. Potter C.W., 2001, A history of influenza, *Journal of Applied Microbiology*, 91(4), pp. 572–579.
4. Saunders-Hastings P.R., Krewski D., 2016, Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission, *Pathogens*, 5(4), pp. 66.
5. Morens D.M., Taubenberger J.K., Folkers G.K., Fauci A.S., 2010, Pandemic influenza's 500th anniversary, *Clinical Infectious Diseases*. 51(12), pp. 1442–1444.
6. Peteranderl C., Herold S., Schmoldt C., 2016, Human Influenza Virus Infections, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(4), pp. 487–500.
7. Allen J.D., Ross T.M., 2018, H3N2 influenza viruses in humans: Viral mechanisms, evolution, and evaluation, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 14(8), pp. 1840–1847.
8. Einav T., Gentles L.E., Bloom J.D., 2020, SnapShot: Influenza by the Numbers, *Cell*, 182(2), pp. 532–532.
9. Can L., Chuangen L., Anna J.X.Z., Kelvin K.W.T., Andrew C.Y.L., Houshun Z., Hazel W.L.W., Jasper F.W.C., Honglin C., Ivan F.N.H., Lanjuan L., Kwok-Yung Y., 2014, Avian Influenza A H7N9 Virus Induces Severe Pneumonia in Mice without Prior Adaptation and Responds to a Combination of Zanamivir and COX-2 Inhibitor, *PLoS ONE*, 9(9), pp. 107966.
10. Qi X., Cui L., Yu H., Ge Y., Tang F., 2014, Whole-Genome Sequence of a Reassortant H5N6 Avian Influenza Virus Isolated from a Live Poultry Market in China 2013, *Genome Announcements*, 2(5), pp. 706-714.

11. Claes B.G, Von Dobschuetz F., Kamata S., Newman A., Chanthavisouk S., Phommachanh C., Wongsathapornchai P., Fusheng F., 2014, Avian influenza A(H5N6): the latest addition to emerging zoonotic avian influenza threats in East and Southeast Asia, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 30, pp. 1–6.
12. Báo Pháp luật Việt Nam, Dịch cúm gia cầm A/H5N6 xuất hiện tại 5 tỉnh, thành phố của Việt Nam 2020.
13. Hui D.S., 2008, Review of clinical symptoms and spectrum in humans with influenza A/H5N1 infection, *Respirology*, 13, pp. 10-13.
14. Kutter J.S., Spronken M.I., Fraaij P.L., Fouchier R.A., Herfst S., 2018, Transmission routes of respiratory viruses among humans, *Current Opinion in Virology*, 28, pp. 142–151.
15. Killingley B., Nguyen-Van-Tam J., 2013, Routes of influenza transmission, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7(2), pp. 42–51.
16. Dharmapalan D., 2020, Influenza, *Indian Journal of Pediatrics*, 87(10), pp. 828–832.
17. Krammer F., Smith G.J., Fouchier R.A., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G., García-Sastre A., 2018, Influenza, *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), pp. 3.
18. Beard C.W., 1998, Avian influenza (fowl plague) : Isolation and identification of avian pathogens, In: US Animal Health Association Committee on Foreign Animal Disease. Foreign animal diseases: the gray book, Kennett Square.
19. Alexander D.J., 2000, A review of avian influenza in different bird species, *Veterinary Microbiology*, 74, pp. 3-13.
20. Centers for Disease Control and Prevention, Bird Flu Virus Infections in Humans.
21. Li Y.T., Linster M., Mendenhall I.H., Su Y.C., Smith G.J., 2019, Avian influenza viruses in humans: lessons from past outbreaks, *British Medical Bulletin*, 132(1), pp. 81–95.
22. Joseph U., Su Y.C., Vijaykrishna D., Smith G.J., 2017, The ecology and

- adaptive evolution of influenza A interspecies transmission, *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 11(1), pp. 74–84.
- 23.Asha K., Kumar B., 2019, Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far!, *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), pp. 192.
- 24.Sederdahl B.K., Williams J.V., 2020, Epidemiology and Clinical Characteristics of Influenza C Virus, *Viruses*, 12(1), pp. 89.
- 25.Dadonaite B., Vijayakrishnan S., Fodor E., Bhella D., Hutchinson E.C., 2016, Filamentous influenza viruses, *The Journal of General Virology*, 97(8), pp. 1755–1764.
- 26.Bouvier N.M., Palese P., 2008, The biology of influenza viruses, *Vaccine*, 26(4), 49.
- 27.Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D., 2005, Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls, *Journal of Virology*, 79(5), pp. 2814-2822.
- 28.Suzuki Y., 2005, Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2 (3), pp. 399–408.
- 29.Lynch J.P., Walsh E.E., 2007, Influenza: evolving strategies in treatment and prevention, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 28(2), pp. 144–158.
- 30.Murphy B.R., Webster R.G., 1996, *Orthomyxoviruses*, Virology, Philadelphia, pp. 1397-1445.
- 31.CUSABIO, Influenza Virus.
- 32.Eisfeld A.J., Neumann G., Kawaoka Y., 2015, At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins, *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), pp. 28–41.
- 33.Sriwilaijaroen N., Suzuki, Y., 2012, Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus, *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 88(6), pp. 226–249.

34. Bahadoran A., Lee S.H., Wang S.M., Manikam R., Rajarajeswaran J., Raju C.S., Sekaran S.D., 2016, Immune Responses to Influenza Virus and Its Correlation to Age and Inherited Factors, *Frontiers in Microbiology*, pp. 7.
35. Khapersky D.A., Schmaling S., Larkins-Ford J., McCormick C., Gaglia M.M., 2016, Selective Degradation of Host RNA Polymerase II Transcripts by Influenza A Virus PA-X Host Shutoff Protein, *PLOS Pathogens*, 12(2).
36. Noda T., 2011, Native morphology of influenza virions, *Frontiers in Microbiology*, 2, pp. 26.
37. Nakatsu S., Murakami S., Shindo K., Horimoto T., Sagara H., Noda T., Kawaoka Y., 2018, Influenza C and D Viruses Package Eight Organized Ribonucleoprotein Complexes, *Journal of Virology*, 92(6), pp. 2084–2017.
38. Tong S., Li Y., Rivaitter P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., Donis R.O., 2012, A distinct lineage of influenza A virus from bats, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(11), pp. 4269–4274.
39. Hao W., Wang L., Li S., 2020, Roles of the Non-Structural Proteins of Influenza A Virus, *Pathogens*, 9(10), pp. 812.
40. Jung H.E., Lee H.K., 2020, Host Protective Immune Responses against Influenza A Virus Infection, *Viruses*, 12(5), pp. 504.
41. Bi Y., Chen J., Chen Q., Mei K., Zhao L., Yu X., Gao Z., Gao G.F., Liu D., Shi W., (2015), Two novel reassortants of avian influenza A (H5N6) virus in China, *Journal of General Virology*, 96(5), pp. 975–981.
42. Capua I., Alexander D.J., 2008, Ecology, epidemiology and human health implications of avian influenza viruses: why do we need to share genetic data?, *Zoonoses Public Health*, 55(1), pp. 2-15.
43. 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.
44. 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., Meister A., Gresch U., Conrad U., 2020, Immunization with Plant-Derived Multimeric H5 Hemagglutinins Protect Chicken against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1, *Vaccines (Basel)*, 8(4), pp. 593.
45. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., Ahmadian G., 2021, Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers, *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), pp. 59.
46. Chung Y.H., Cai H., Steinmetz N.F., 2010, Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156, pp. 214–235.
47. Steinmetz N.F., 2010, Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices, *Nanomedicine*, 6(5), pp. 634–641.
48. Pushko P., Pumpens P., Grens E., 2013, Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures, *Intervirology*, 56(3), pp. 141–165.
49. Bayer M.E., Blumberg B.S., Werner B., 1968, Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndr Hepatitis, *Nature*, 218(5146), pp. 1057–1059.
50. Balke I., Zeltins A., 2019, Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 145, pp. 119–129.
51. Lee Y.T., Ko E.J., Lee Y., Kim K.H., Kim M.C., Lee Y.N., Kang S.M., 2018, Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses, *PLoS ONE*, 13(1), pp. 190868.
52. Zheng X.C., Gai W., Wong G., Wang H., Jin H., Feng N., Zhao Y., Zhang W., Li N., Zhao G., Li J., Yan J., Gao Y., Hu G., Yang S., Xia X., 2017, Novel chimeric virus-like particles vaccine displaying MERS-CoV receptor-

- binding domain induce specific humoral and cellular immune response in mice, *Antiviral Research*, 140, pp. 55–61.
53. D'Aoust M., Lavoie P., Couture M.M., Trépanier S., Guay J., Dargis M., Mongrand S., Landry N., Ward B.J., Vézina L.P., 2008, Influenza virus-like particles produced by transient expression in *Nicotiana benthamiana* induce a protective immune response against a lethal viral challenge in mice, *Plant Biotechnology Journal*, 6(9), pp. 930-940.
54. Landry N., Ward B.J., Trépanier S., Montomoli E., Dargis M., Lapini G., Vézina L., Fouchier R.A.M., 2010, Preclinical and Clinical Development of Plant-Made Virus-Like Particle V against Avian H5N1 Influenza, *PLoS ONE*, 5(12), pp. 15559.
55. Ward B.J., Gobeil P., Séguin A., Atkins J., Boulay I., Charbonneau P.Y., Couture M., D'Aoust M., Dhaliwall J., Finkle C., Hager K., Mahmood A., Makarkov A., Cheng M.P., Pillet S., Schimke P., Martin S., Trépanier S., Landry N., 2021, Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19, *Nature Medicine*, 27(6), pp. 1071–1078.
56. 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.
57. Sambrook J. and Russell D.W., 2006, Transformation of *E. coli* by electroporation, *Cold Spring Harbor Protocols*, pp. 3933.
58. 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, pp. 940395.
59. Mersereau M., Pazour G.J. and Das A., 1990, Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation, *Gene*, 90, pp. 149-151.
60. 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, pp. 53.

61. Laemmli U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), pp. 680-685.
62. 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.
63. Albertha R. van Z, and Inga I.H., 2016, Purification of Virus-Like Particles (VLPs) from Plants, *Methods in Molecular Biology Vaccine Design*, 1404(37), pp. 569–579.
64. Vũ Huyền Trang, Hồ Thị Thương, Lê Thu Ngọc, Nguyễn Thu Giang, Trịnh Thái Vy, Phan Trọng Hoàng, Phạm Bích Ngọc, Hoàng Thị Thu Hằng, Chu Hoàng Hà, 2020, Nghiên cứu sự biểu hiện của kháng nguyên S1 tái tổ hợp của virus gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (porcine epidemic diarrhea virus) trong cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 19(1), tr. 95-105.

PHỤ LỤC

Phụ lục 1: Danh sách các cặp mồi sử dụng

STT	Tên mồi	Trình tự 5' - 3'
I.	Mồi nhân gen H5 trimer và oligomer	
1	Ectodmain H5 -BamHI-F	agGGATCCCAGATCTGTATT GGTTACCATGC
2	Ectodomain-H5-pspOMI-R	gcgggcccAATCTGGTATGTTC CAATAGATTC
II	Mồi PCR khuôn lặc và đọc trình tự	
1	35S-SQF	CACTGACGTAAGGGATGAC GC
2	35STerm	CTGGGAACTACTCACACA

Phụ lục 2:

Trình tự nucleotide của HA chủng công H5N6 để gửi tổng hợp nhân tạo

>A/chicken/Vietnam/LaoCai/NCVD-17A261/2017(H5N6)

ccATGGctAAAATAGTGCTTCTTCTTGCAGTGGTTAGCCTTGTCAAAA
GTGATCAGATTTGCATTGGTTACCATGCAAATAACTCGACAGAGCA
GGTTGACACGATAATGGAAAAAACGTCACTGTTACACATGCCCA
AGACATACTAGAAAAGACACACAACGGGAGGCTTTGCGATTTGAA
TGGAGTGAAACCTCTGATTTTAAAGGATTGTAGTGTAGCTGGATGG
CTCCTTGAAACCCAATGTGCGACGAGTTCATCAGAGTGCCGGAA
TGGTCTTACATAGTGGAGAGGGCTAACCCGCCCAATGACCTCTGTT
ACCCCGGGAACCTCAACGACTATGAAGA ACTGAAACATCTATTGA
GCAGAATAAATCATT TTTGAGAAGACTCTGATCATCCCCAAAAGTTC
TTGGCCCAATCATGAAACATCATTAGGAGTGAGCGCTGCATGTCA
ATACCAGGGAATGCCCTCCTTTTTCAGAAATGTGGTATGGCTCATC
AAGAAGAACGATGCATACCCAACAATAAAGATGAGCTACAATAAT
ACCAATAGTGAAGATCTTTTGATACTGTGGGGGATTCATCATTCTA
ACAACGCAGCAGAACAACAGATCTCTATAAAAACCCAACCACCT

ATGTTTCCGTTGGGACATCAACATTAACCAGAGATTGGTACCCAA
AATAGCTACTAGATCCCAAGTAAACGGGCAACGTGGAAGAATGGA
TTTCTTCTGGACAATTTTAAAACCGAATGATGCAATCCACTTCGAG
AGTAATGGAAATTTTATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCA
AGAAAGGGGACTCAACAATCATGAAAAGTGAAATGGAATATGGCC
ATTGCAACACCAAATGTCAAACCTCCAATAGGGGCGATAAACTCTA
GTATGCCATTCCACAATATACACCCCCTCACAATCGGGGAATGCCC
CAAATACGTGAAATCAAACAAATTAGTACTTGCGACTGGGCTCAG
AAATAGTCCCCTAAGGGAGAGGAGAGGACTATTTGGAGCTATAGC
AGGATTTATAGAGGGAGGATGGCAAGGGATGGTAGATGGTTGGTA
TGGGTACCACCATAGCAATGAACAGGGAAGTGGGTACGCTGCAGA
CAAAGAATCCACCCAAAAGGCAATAGATGGAGTTACCAATAAGGT
CAACTCGATCATTGACAAGATGAACACTCAATTTGAGGCCGTTGG
AAGGGAATTTAATAACTTAGAACGGAGAATAGAGAATTTAAACAA
GAAAATGGAAGACGGATTCCTAGATGTCTGGACTTATAATGCGGA
ACTTCTAGTTCTCATGGAAAATGAGAGAACCCTAGATTTCCATGAC
TCAAATGTCAAGAACCTTTATGACAAAGTCCGACTACAGCTTAGG
GACAATGCAAAGGAGCTGGGTAATGGTTGCTTTGAGTTCTATCACA
AATGTGATAATGAATGTATGGAAAGTGTAAGAAATGGGACATATA
ACTACCCTCAGTATTCAGAAGAAGCAAGATTGAAAAGAGAAGAAA
TAAGCGGAGTGAAATTGGAATCAATAGGAACTTACCAGATACTGT
CAATTTATTCAACAGTGGCGAGTTCCCTAGCACTGGCAATCATTGT
GGCTGGTCTATCTTTATGGATGTGCTCCAATGGGTCATTACAATGC
AGAATTTGCATCTGAgcggccgc

Phụ lục 3:

Trình tự amino acid của HA chủng công H5N6 để gửi tổng hợp nhân tạo

>A/chicken/Vietnam/LaoCai/NCVD-17A261/2017(H5N6)

MEKIVLLLVVSLVKSDQICIGYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDI
LEKTHNGRLCDLNGVKPLILKDCSVAGWLLGNPMCDEFIRVPEWSYI
VERANPPNDLCYPGNLNDYEELKHLISRINHFECTLIIPKSSWPNHETS
LGVSAACQYQGMPSFFRNVVWLIKKNDAYPTIKMSYNNNTNSEDLLIL
WGIHHSNNAAEQTDLYKNPTTYVSVGTSTLNQRLVPKIATRSQVNGQ
RGRMDFFWTILKPNDAIHFESNGNFIAPEYAYKIVKKGDSTIMKSEME

YGH CNTKCQTPIGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKS NKLVLATGLR
NSPLRERRGLFGAIAGFIEGGWQGMVDGWYGYHHSNEQGS
GYAADK ESTQKAIDGVTNKVNSIIDKMNTQFEAVGREFNNL
ERRIENLNKKMED GFLDVWWTYNAELLVLMENERTLDFHDS
NVKNLYDKVRLQLRDNAKE LGNGCFEFYHKCDNECMES
VRNGTYNYPQYSEEARLKREEISGVKLE SIGTYQILSIY
STVASSLALAIIVAGLSLWMCSNGSLQCRICI

Phụ lục 4:

>Trình tự gen HA dạng VLP (H5-VLP) của chủng H5N6 tối ưu cho thực vật (*Nicotiana benthamiana*)

CCATGGCTAAAATTGTGCTTTTGTGGCTGTGGTGTCTTTGGTGAA
GTCAGACCAGATCTGTATTGGTTACCATGCTAATAACTCAACTGAA
CAAGTTGATACAATTATGGAGAAGAATGTGACAGTGACTCACGCT
CAAGATATCCTTGAGAAGACTCATAATGGTAGACTTTGTGATCTTA
ATGGTGTTAAGCCATTGATCCTTAAGGATTGCTCAGTGGCTGGATG
GCTTTTGGGAAATCCAATGTGCGACGAGTTCATTAGAGTGCCAGA
ATGGTCTTATATCGTGGAGAGGGCAAACCCTCCTAACGACCTTTGT
TACCCGGGTAACCTGAATGATTATGAAGAGTTGAAGCATTGCTTT
CTAGGATTAATCACTTCGAGAAAACCTTATTATTCTAAGTCTTC
ATGGCCTAACACGAGACATCTCTTGGAGTGTCTGCAGCATGCCAG
TACCAAGGTATGCCATCTTTCTTTAGAAATGTGGTTTGGTTGATTA
AGAAGAACGATGCTTATCCTACTATTA AAAATGTCTTATAACAATAC
TAATTCTGAAGACCTTTTGATCCTTTGGGGTATTCACCACTCAAAC
AACGCTGCTGAGCAGACAGATCTTTATAAAAATCCTACA ACTTATG
TTTCTGTTGGA ACTTCTACATTGAACCAGAGGTTGGTTCCTAAGAT
CGCAACTAGGTCTCAAGTTAACGGTCAGAGGGGTAGGATGGACTT
CTTTTGGACAATCTTGAAGCCTAACGACGCAATCCACTTCGAGTCT
AACGGAACTTCATCGCACCAGAATACGCATACAAAATTGTTAAA
AAAGGAGATTCTACTATTATGAAGTCTGAGATGGAGTACGGTCAC
TGCAACACTAAGTGCCAGACTCCTATCGGAGCTATCAACTCTTCTA
TGCCATTCCATAACATTCACCCACTTACTATCGGTGAGTGCCCTAA
ATATGTTAAGTCAAATAAACTTGTGTTGGCAACTGGACTTAGGAAC
TCTCCACTTAGGGAGAGAAGGGGACTTTTCGGTGCAATCGCTGGTT
TCATCGAGGGTGGATGGCAAGGTATGGTTGACGGTTGGTACGGTT

ACCACCACTCTAACGAACAAGGTTCTGGTTACGCTGCTGACAAGG
AGTCAACTCAGAAGGCAATCGACGGTGTGACTAACAAGGTTAACT
CTATTATCGACAAGATGAACACTCAGTTTGAGGCAGTGGGAAGGG
AGTTCAACAACCTTGAGAGAAGAATTGAAAATTTGAATAAGAAGA
TGGAGGACGGATTCTTGGACGTGTGGACTTATAATGCTGAATTGTT
GGTGTGATGGAGAACGAGAGGACACTTGACTTCCACGACTCAA
TGTTAAGAATTTGTATGATAAAGTGAGACTTCAGCTTAGGGACAAC
GCTAAGGAGCTTGGTAACGGATGCTTCGAATTTTATCACAAGTGCG
ACAATGAATGCATGGAGTCTGTGAGGAATGGTACTTACAATTACC
CTCAGTACTCTGAGGAGGCAAGGTTGAAGAGGGAGGAGATCTCTG
GTGTGAAGTTGGAATCTATTGGAACATAACCAGATTCTTTCTATTTA
TTCTACTGTTGCATCTTCACTTGCCTTGCTATCATCGTGGCTGGTC
TTTCATTGTGGATGTGCTCTAACGGTTCCTCAGTGTAGAATCTG
CATTGAGCGGCCGC

Phụ lục 5:

>Ectodomain H5/H5N6 (Ecto-H5)

CAGATCTGTATTGGTTACCATGCTAATAACTCAACTGAACAAGTTG
ATACAATTATGGAGAAGAATGTGACAGTGACTCACGCTCAAGATA
TCCTTGAGAAGACTCATAATGGTAGACTTTGTGATCTTAATGGTGT
TAAGCCATTGATCCTTAAGGATTGCTCAGTGGCTGGATGGCTTTTG
GGAAATCCAATGTGCGACGAGTTCATTAGAGTGCCAGAATGGTCT
TATATCGTGGAGAGGGCAAACCCTCCTAACGACCTTTGTTACCCGG
GTA ACTTGAATGATTATGAAGAGTTGAAGCATTGCTTTCTAGGAT
TAATCACTTCGAGAAA ACTCTTATTATTCCTAAGTCTTCATGGCCT
AACCACGAGACATCTCTTGGAGTGTCTGCAGCATGCCAGTACCAA
GGTATGCCATCTTTCTTTAGAAATGTGGTTTGGTTGATTAAGAAGA
ACGATGCTTATCCTACTATTA AAAATGTCTTATAACAATACTAATTC
TGAAGACCTTTTGATCCTTTGGGGTATTCACCACTCAAACAACGCT
GCTGAGCAGACAGATCTTTATAAAAATCCTACA ACTTATGTTTCTG
TTGGA ACTTCTACATTGAACCAGAGGTTGGTTCCTAAGATCGCAAC
TAGGTCTCAAGTTAACGGTCAGAGGGGTAGGATGGACTTCTTTTGG
ACAATCTTGAAGCCTAACGACGCAATCCACTTCGAGTCTAACGGA
AACTTCATCGCACCAGAATACGCATACAAAATTGTTAAAAAAGGA
GATTCTACTATTATGAAGTCTGAGATGGAGTACGGTCACTGCAACA

CTAAGTGCCAGACTCCTATCGGAGCTATCAACTCTTCTATGCCATT
CCATAACATTCACCCACTTACTATCGGTGAGTGCCCTAAATATGTT
AAGTCAAATAAACTTGTGTTGGCAACTGGACTTAGGAACTCTCCAC
TTAGGGAGAGAAGGGGACTTTTCGGTGCAATCGCTGGTTTCATCGA
GGGTGGATGGCAAGGTATGGTTGACGGTTGGTACGGTTACCACCA
CTCTAACGAACAAGGTTCTGGTTACGCTGCTGACAAGGAGTCAACT
CAGAAGGCAATCGACGGTGTGACTAACAAGGTAACTCTATTATC
GACAAGATGAACACTCAGTTTGAGGCAGTGGGAAGGGAGTTCAAC
AACCTTGAGAGAAGAATTGAAAATTTGAATAAGAAGATGGAGGAC
GGATTCTTGGACGTGTGGACTTATAATGCTGAATTGTTGGTGTGTA
TGGAGAACGAGAGGACACTTGACTTCCACGACTCAAATGTTAAGA
ATTTGTATGATAAAGTGAGACTTCAGCTTAGGGACAACGCTAAGG
AGCTTGGTAACGGATGCTTCGAATTTTATCACAAGTGCGACAATGA
ATGCATGGAGTCTGTGAGGAATGGTACTTACAATTACCCTCAGTAC
TCTGAGGAGGCAAGGTTGAAGAGGGAGGAGATCTCTGGTGTGAAG
TTGGAATCTATTGGAACATAACCAGATT