BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Hồ Thị Thương

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG NGUYÊN S CỦA VIRUS GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN (PEDV) TRÊN CÂY THUỐC LÁ *NICOTIANA BENTHAMIANA* CÓ TÍNH SINH MIỄN DỊCH ĐỊNH HƯỚNG TẠO VACXIN THẾ HỆ MỚI

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

Hồ Thị Thương

NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG NGUYÊN S CỦA VIRUS GÂY BỆNH TIÊU CHẢY CẤP Ở LỢN (PEDV) TRÊN CÂY THUỐC LÁ *NICOTIANA BENTHAMIANA* CÓ TÍNH SINH MIỄN DỊCH ĐỊNH HƯỚNG TẠO VACXIN THẾ HỆ MỚI

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC
Mã số: 9 420 201

Xác nhận của Học viện Khoa học và Công nghệ	Thầy hướng dẫn 1 *(Ký, ghi rõ họ tên)*	Thầy hướng dẫn 2 *(Ký, ghi rõ họ tên)*
	GS.TS. Chu Hoàng Hà	**TS. Phạm Đình Minh**

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Nghiên cứu tạo kháng nguyên S của virus gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV) trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* có tính sinh miễn dịch định hướng tạo vacxin thế hệ mới" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày 18 tháng 09 năm 2023

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

Thương

Hồ Thị Thương

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành nhất tới hai Thầy hướng dẫn GS.TS. Chu Hoàng Hà và TS. Phạm Đình Minh đã hướng dẫn tận tình, định hướng nghiên cứu, bàn thảo về kết quả và cho những lời khuyên hữu ích, đúng đắn trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Phạm Bích Ngọc, TS. Vũ Huyền Trang, TS. Hoàng Thị Thu Hằng, ThS. Trịnh Thái Vy, ThS. Nguyễn Thị Trà và tập thể cán bộ Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học đã luôn giúp đỡ, chia sẻ những kiến thức quý báu và tạo những điều kiện tốt nhất cho tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án. Tôi xin trân trọng cảm ơn GS.TS. Udo Conrad và TS. Phan Trọng Hoàng, Viện di truyền thực vật và nghiên cứu cây trồng Leibniz, CHLB Đức đã cung cấp nguồn vật liệu vector đồng thời cho tôi các lời khuyên và góp ý quý báu trong quá trình chỉnh sửa các bản thảo công bố.

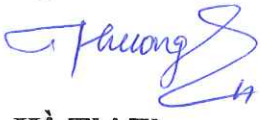
Tôi xin trân trọng cảm ơn các cán bộ Phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, PGS.TS. Lê Văn Phan và các cán bộ Bệnh viện Thú y - Học viện Nông nghiệp Việt Nam, TS. Trần Xuân Hạnh và các cán bộ Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương NAVETCO, TS. Nguyễn Tuấn Hùng và các cán bộ Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương VETVACO, TS. Nguyễn Hồng Minh và các cán bộ Công ty cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC đã hỗ trợ tôi trong các thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch trên động vật và trung hòa virus. Luận án được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam do TS. Vũ Huyền Trang chủ nhiệm và nhiệm vụ khoa học và công nghệ theo nghị định thư, Bộ Khoa học và Công nghệ do TS. Hoàng Thị Thu Hằng chủ nhiệm. NCS. Hồ Thị Thương được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup – Công ty CP và hỗ trợ bởi Chương trình học bổng thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn, mã số VINIF.2021.TS.066.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ, các phòng chức năng của Viện Công nghệ sinh học đã tạo điều kiện cho tôi học tập và hoàn thành luận án.

Cuối cùng, tôi vô cùng biết ơn Bố mẹ, chồng, con, các em, các bạn bè và các đồng nghiệp đã luôn động viên, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận án này.

Hà Nội, ngày 18 tháng 09 năm 2023

Nghiên cứu sinh



Hồ Thị Thương

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN i

LỜI CẢM ƠN ii

DANH MỤC VIẾT TẮT vii

DANH MỤC BẢNG xi

DANH MỤC HÌNH xii

MỞ ĐẦU 1

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU 4

1.1. Bệnh tiêu chảy cấp ở lợn 4

1.1.1. Tình hình dịch bệnh PED trên thế giới 4

1.1.2. Tình hình dịch bệnh PED tại Việt Nam 5

1.2. Tác nhân gây bệnh của PED 6

1.2.1. Phân loại PEDV 6

1.2.2. Đặc điểm hình thái của PEDV 6

1.2.3. Đặc điểm cấu trúc hệ gen và chức năng của các protein PEDV 7

1.2.4. Protein S của PEDV 8

1.2.5. Dịch tễ học phân tử các chủng PEDV trên thế giới 10

1.2.6. Dịch tễ học phân tử của các chủng PEDV tại Việt Nam 12

1.3. Vacxin phòng PEDV 14

1.3.1. Vacxin bất hoạt và vacxin nhược độc 15

1.3.2. Vacxin tiểu đơn vị 18

1.3.3. Vacxin axit nucleic 20

1.3.4. Các vấn đề tồn tại trong phát triển vacxin phòng PEDV 21

1.4. Vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật 23

1.4.1. Hệ thống biểu hiện tạm thời trên thực vật 23

1.4.2. Vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật phòng PEDV trên thế giới 24

1.4.3. Motif GCN4-pII và motif tp của IgM 26

1.4.4. Vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật phòng các bệnh động vật tại Việt Nam 29

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP 30

2.1. Vật liệu 30

2.1.1. Chủng vi sinh vật, tế bào và plasmid 30

2.1.2. Mồi 31

2.1.3. Nguồn vật liệu thực vật 32

2.1.4. Nguồn vật liệu động vật 32

2.1.5. Hóa chất 32

2.1.6. Thiết bị và vật tư 34

2.2. Phương pháp 35

2.2.1. Thu thập thông tin, tách dòng, tối ưu mã biểu hiện và tổng hợp nhân tạo đoạn gen mã hóa protein S 36

2.2.2. Thiết kế các vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên tái tổ hợp 37

2.2.3. Biểu hiện các kháng nguyên tái tổ hợp tạm thời trong cây thuốc lá N. benthamiana 39

2.2.4. Phân tích mức độ biểu hiện của các kháng nguyên tái tổ hợp bằng SDS-PAGE và Western blot 40

2.2.5. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của các kháng nguyên tái tổ hợp 41

2.2.6. Nhân nuôi và tinh sạch PEDV từ tế bào nuôi cấy 43

2.2.7. Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột 43

2.2.8. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG, IgA, IgM đặc hiệu PEDV trong huyết thanh chuột bằng ELISA 44

2.2.9. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh chuột bằng Western blot 45

2.2.10. Phân tích khả năng kích thích sinh cytokine trong huyết thanh chuột 45

2.2.11. Phân tích khả năng trung hòa PEDV của huyết thanh chuột 45

2.2.12. Gây đáp ứng miễn dịch trên lợn mẹ và công cường độc trên lợn con 46

2.2.13. Gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII 46

2.2.14. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG và IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh lợn bằng ELISA 47

2.2.15. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh lợn bằng Western blot 47

2.2.16. Phân tích khả năng kích thích sinh cytokine trong huyết thanh lợn *48*

2.2.17. Phân tích khả năng trung hòa PEDV của huyết thanh lợn *48*

2.2.18. Phương pháp xử lý thống kê *48*

Chương 3. KẾT QUẢ **49**

3.1. Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G1a **49**

3.1.1. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng *49*

3.1.2. Biểu hiện kháng nguyên COE/G1a-pII tạm thời trong lá thuốc lá N. benthamiana *51*

3.1.3. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G1a-pII *52*

3.1.4. Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp trên chuột *54*

3.2. Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G2a gây bệnh tại Việt Nam **59**

3.2.1. Thu thập thông tin, lựa chọn và tách dòng gen mã hóa protein S của chủng PEDV gây bệnh tại Việt Nam *59*

3.2.2. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng *60*

3.2.3. Biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII tạm thời trong lá thuốc lá N. benthamiana *62*

3.2.4. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII *66*

3.2.4.2. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng SEC và phản ứng liên kết chéo *68*

3.2.5. Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn *69*

3.3. Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G2a gây bệnh tại Việt Nam **78**

3.3.1. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp, S2/G2a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng 78

3.3.2. Biểu hiện các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII tạm thời trong lá thuốc lá N. benthamiana..... 83

3.3.3. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII tái tổ hợp..... 87

3.3.4. Đánh giá tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII trên chuột..... 93

3.3.5. Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trên lợn 101

Chương 4. THẢO LUẬN.....112

4.1. Mức độ biểu hiện và khả năng thu hồi của các kháng nguyên tái tổ hợp từ lá thuốc lá *N. benthamiana*..... 112

4.2. Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII trên chuột 115

4.3. Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a pII trên lợn nái và khả năng bảo hộ lợn con chống lại chủng PEDV G2a độc lực cao..... 116

4.4. So sánh tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII với kháng nguyên COE/G2a-pII trên chuột 119

4.5. So sánh tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII với kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn con..... 122

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ 126

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN 128

TÀI LIỆU THAM KHẢO 129

DANH MỤC VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên nguyên gốc tiếng anh	Tên tiếng việt
aa	amino acid	axit amin
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*	*Agrobacterium tumefaciens*
Act1-I	Rice actin 1 gene - I	Gen mã hóa actin lúa 1-I
bp	Base pair	Cặp base
BS3	Bis[sulfosuccinimidyl] suberate	Bis[sulfosuccinimidyl] suberate
CaMV	Cauliflower mosaic virus	Virus khảm súp lơ
Co1	M cell-targeting ligand	Phối tử nhắm mục tiêu tế bào M
COE	CO-26K equivalent	CO-26K tương đương
CTB	Cholera toxin B subunit	Tiểu đơn vị độc tố tả B
DAB	Diaminobenzidine	Diaminobenzidine
DCpep	Dendritic cell peptide	Tín hiệu tế bào tua
DNA	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
dNTP	Deoxyribo nucleotide triphosphate	Deoxyribo nucleotit triphotphat
E. coli	*Escherichia coli*	*Escherichia coli*
E	Elute	Dịch chứa protein tinh sạch
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
ELP	Elastin-like polypeptide	Polypeptit giống Elastin
Fc	Fragment crystallizable	Mảnh kết tinh
FT	Flow through	Dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni-sepharose lên cột
HA	Hemagglutinin	Hemagglutinin
HR1	Heptad repeat region 1	Vùng lặp lại Heptad 1

HRP	Horseradish peroxidase	Peroxidaza cải ngựa
HR2	Heptad repeat region 2	Vùng lặp lại Heptad 2
IFN-γ	Interferon gama	Interferon gama
IgA	Immunoglobulin A	Immunoglobulin A
IgG	Immunoglobulin G	Immunoglobulin G
IgM	Immunoglobulin M	Immunoglobulin M
IMAC	Immobilized metal ion chromatography	Sắc ký ái lực kim loại cố định
INDEL	Insertion deletion	Chèn xóa
Kb	Kilobase	Kilobase
kDa	Kilodalton	Kilodalton
LB	Luria and Bertani	Luria and Bertani
LTB	Heat-labile enterotoxin B subunit Escherichia	Enterotoxin B tiểu đơn vị không bền nhiệt ở Escherichia
M	Membrane	Màng
mARN	Messenger ribonucleic acid	Axit ribonucleic thông tin
N. benthamiana	*Nicotiana benthamiana*	*Nicotiana benthamiana*
NTD	N-terminal domain	Miền tận cùng đầu N
N	Nucleocapsid	Vỏ bọc nhân
OD	Optical density	Mật độ quang
PBS	Phosphate-buffered saline	Đệm muối phosphat
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PED	Porcine epidemic diarrhea	Bệnh tiêu chảy cấp ở lợn
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	Virus gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn
pII	GCN4pII	GCN4pII
PIGS	Polymer immunoglobulin G	Polymer immunoglobulin G
PLGA	Poly-lactic-co-glycolic-acid	Axit poly-lactic-co-glycolic

RAmy3D	Promoter rice a-amylase 3D	Vùng gen khởi động alpha-amylase 3D lúa
RE	Raw extract	Dịch thô
RT-PCR	Reverse transcript polymerase chain reaction	Phản ứng sao chép chuỗi polymerase ngược
S	Spike	Spike
S1	S1 subunit of spike protein	Tiểu phần S1 của protein Spike
S2	S2 subunit of spike protein	Tiểu phần S1 của protein Spike
SEC	Size exclusion chromatography	Sắc ký lọc gel
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di gel polyacrylamide sodium dodecyl sulfat
TCID50	Median tissue culture infectious dose	Liều gây nhiễm 50% tế bào
TGEV	Transmissible gastroenteritis virus	Virus gây bệnh viêm dạ dày ruột truyền nhiễm trên lợn
TMB	3,3',5,5' tetramethylbenzidine	3,3',5,5' tetramethylbenzidine
TMV	Tobacco mosaic virus	Virus khảm thuốc lá
TOL	TMV omega-prime leader	Trình tự đầu 5' chưa được dịch mã của virus khảm thuốc lá
TSP	Total soluble protein	Protein tan tổng số
tp	tailpiece	Mảnh đuôi
VLP	Virus-like particle	Hạt giả virus
W	Wash	Dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa
WT	Wild type	Loài hoang dã

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Tóm tắt về chức năng của các protein PEDV 8
Bảng 1.2. Các loại vacxin phòng PEDV đã được thương mại hóa và cấp phép có điều kiện 16
Bảng 1.3. Các nghiên cứu về vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV 20
Bảng 1.4. Các nghiên cứu phát triển vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật phòng PEDV 24
Bảng 2.1. Danh sách các chủng vi sinh vật, tế bào và plasmid 30
Bảng 2.2. Danh sách các mồi được sử dụng trong nghiên cứu 31
Bảng 2.3. Danh sách các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu 33
Bảng 2.4. Danh sách các thiết bị, vật tư được sử dụng trong nghiên cứu 34
Bảng 3.1. Mức độ tích lũy của các kháng nguyên tái tổ hợp từ trong lá thuốc lá *N. benthamiana* 87
Bảng 3.2. Độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi sau tinh sạch các kháng nguyên tái tổ hợp từ lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp IMAC 93

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hạt PEDV được quan sát dưới kính hiển vi điện tử 6
Hình 1.2. Cấu trúc hệ gen và cấu trúc hạt PEDV..... 7
Hình 1.3. Cấu trúc mô hình của protein S..... 8
Hình 1.4. Cấu trúc protein S của PEDV và các vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với kháng thể trung hòa 9
Hình 1.5. Con đường lan truyền tiềm năng của PEDV trên toàn thế giới 11
Hình 1.6. Tạo đáp ứng miễn dịch khi tiêm vacxin tiểu đơn vị 18
Hình 1.7. Cấu trúc tinh thể của GCN4-pII..... 27
Hình 1.8. Sơ đồ cấu trúc của IgM dạng monomer (bên trái) và dạng pentamer 28
Hình 2.1. Sơ đồ mô tả tóm tắt các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận án..... 36 27
Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa các kháng nguyên tái tổ hợp và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector tương ứng..... 39 27
Hình 3.1. Kết quả thiết kế vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a-pII và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng 50
Hình 3.2. Biểu hiện protein COE/G1a-pII tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana* 51
Hình 3.3. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A) và Western blot (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G1a-pII bằng IMAC. 52
Hình 3.4. Xác định đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G1a-pII dựa vào phản ứng liên kết chéo (A) và điện di không biến tính (B) và Western blot (C). 53
Hình 3.5. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột với kháng nguyên COE/G1a..... 54
Hình 3.6. Phân tích đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV ở chuột được tiêm bằng phản ứng Western blot (A) và ELISA (B)..... 55
Hình 3.7. Xác định mức độ đáp ứng sinh kháng thể IgA (A) và IgM (B) đặc hiệu với PEDV thông qua phản ứng ELISA..... 56
Hình 3.8. Kết quả đánh giá khả năng sinh các kháng thể trung hòa PEDV ở các nhóm chuột được tiêm bằng phản ứng trung hòa virus trên tế bào 58

Hình 3.9. Kết quả tách dòng gen mã hóa protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 60
Hình 3.10. Kết quả thiết kế vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII và tạo chủng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tương ứng 61
Hình 3.11. Kết quả tối ưu tuổi cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh được sử dụng cho biểu hiện của protein COE/G2a-pII. 63
Hình 3.12. Kết quả tối ưu giá trị OD_{600} của dịch khuẩn dùng để biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII trên cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh. 64
Hình 3.13. Kết quả tối ưu số ngày thu lá sau biến nạp để biểu hiện protein COE/G2a-pII trên cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh. 65
Hình 3.14. Kiểm tra sự tích lũy của protein COE/G2a-pII bằng Western blot sau khi biến nạp vào lá thuốc lá *N. benthamiana* ở điều kiện tối ưu 66
Hình 3.15. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A, C) và Western blot (B, D) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII sử dụng phương pháp IMAC với đệm rửa có nồng độ imidazole 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM. 67
Hình 3.16. Kết quả tinh sạch, phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo 68
Hình 3.17. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên lợn nái và công cường độc trên lợn con với kháng nguyên COE/G2a-pII 69
Hình 3.18. Đáp ứng sinh kháng thể IgG và IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của lợn nái mang thai sau tiêm 70
Hình 3.19. Đáp ứng miễn dịch sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong huyết thanh của lợn nái mang thai sau khi tiêm 71
Hình 3.20. Đáp ứng sinh cytokine IFN-γ trong huyết thanh của lợn nái mang thai sau khi gây đáp ứng miễn dịch 72
Hình 3.21. Đáp ứng sinh kháng thể IgG và IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các lợn con được sinh ra từ các lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc 73
Hình 3.22. Đáp ứng sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong các huyết thanh lợn con được sinh ra từ các lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc 74

Hình 3.23. Đáp ứng sinh cytokine IFN-γ trong huyết thanh của các lợn con được đẻ ra từ lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc 75
Hình 3.24. Điểm phân và trọng lượng cơ thể của các lợn con được đẻ ra từ lợn nái đã tiêm trước và sau công cường độc 76
Hình 3.25. Điểm lâm sàng và tỷ lệ sống sót của các lợn con được đẻ ra từ lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc 77
Hình 3.26. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa protein COE-S1D/G2a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng 79
Hình 3.27. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII-tp và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng 81
Hình 3.28. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa protein S2/G2a-pII và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng 82
Hình 3.29. Biểu hiện protein COE-S1D/G2a-pII tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana*..... 84
Hình 3.30. Biểu hiện protein COE/G2a-pII-tp tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana*..... 85
Hình 3.31. Biểu hiện protein S2/G2a-pII tái tổ hợp tạm thời trên thuốc lá *N. benthamiana*..... 87
Hình 3.32. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A) và Western blot (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII sử dụng phương pháp IMAC. 88
Hình 3.33. Kết quả tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo..... 89
Hình 3.34. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A) và Western blot (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII-tp sử dụng phương pháp IMAC..... 90
Hình 3.35. Kết quả tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo..... 91
Hình 3.36. Kết quả điện di SDS-PAGE, Western blot (A) và nhuộm Coomassie blue (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên S2/G2a-pII sử dụng phương pháp IMAC..... 92

Hình 3.37. Kết quả tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên S2/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo 93
Hình 3.38. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột với các kháng nguyên PEDV G2a tái tổ hợp 94
Hình 3.39. Phân tích đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu của PEDV trong huyết thanh của các nhóm chuột sử dụng ELISA 95
Hình 3.40. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh các nhóm chuột sau 2 lần tiêm bằng Western blot 96
Hình 3.41. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các nhóm chuột bằng ELISA. 97
Hình 3.42. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV trong huyết thanh ở các nhóm chuột bằng ELISA 98
Hình 3.43. Phân tích đáp ứng trung hòa PEDV của huyết thanh ở nhóm chuột bằng thí nghiệm trung hòa virus trên tế bào. 99
Hình 3.44. Nồng độ IFN-γ trong huyết thanh của các nhóm chuột thí nghiệm bằng bộ kit ELISA 100
Hình 3.45. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch protein COE-S1D/G2a-pII trên lợn con lần 1 102
Hình 3.46. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng ELISA. 102
Hình 3.47. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng Western blot. 103
Hình 3.48. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng ELISA 104
Hình 3.49. Phân tích đáp ứng trung hòa PEDV trong huyết thanh của các nhóm lợn thí nghiệm bằng thí nghiệm trung hòa virus. 105
Hình 3.50. Phân tích đáp ứng sinh IFN-γ trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng bộ kit ELISA. 106
Hình 3.51. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch protein COE-S1D/G2a-pII trên lợn con lần 2 107
Hình 3.52. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng ELISA. 108
Hình 3.53. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII của PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng phản ứng Western blot. 109

Hình 3.54. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng phản ứng ELISA. 110
Hình 3.55. Phân tích khả năng trung hòa PEDV của huyết thanh ở các nhóm lợn thí nghiệm bằng thí nghiệm trung hòa virus. 111

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Tiêu chảy cấp ở lợn hay tiêu chảy thành dịch (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) là một bệnh nguy hiểm và có khả năng lây lan trên lợn ở tất cả các độ tuổi. Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), một loại virus thuộc họ Coronaviridae, là tác nhân gây ra bệnh PED. Tỷ lệ tử vong ở lợn cao, lên đến 80-100% sau khi mắc bệnh PED, đặc biệt ở lợn con mới sinh dưới 7 ngày tuổi [1]. Dịch PED đã bùng phát và gây ra tổn thất kinh tế nghiêm trọng ở nhiều nước trên thế giới đặc biệt là Châu Á và Châu Mỹ [2]. Tại Việt Nam, dịch PED đã có mặt ở nhiều tỉnh thành khắp cả nước [3]. Các chủng PEDV được phát hiện tại ba miền Bắc, Trung, Nam từ năm 2015 đến năm 2016 thuộc về nhóm gen G1b, G2a và G2b [4]. Các chủng PEDV G2 đã gây ảnh hưởng đến kinh tế nghiêm trọng, làm giảm năng suất đàn lợn nái và lợn giống ở nhiều tỉnh thành [5].

Hiện nay, hầu hết các vacxin phòng PEDV được sử dụng ở Việt Nam là vacxin truyền thống có nguồn gốc ngoại nhập hoặc sử dụng các chủng nhập khẩu thuộc nhóm G1a cổ điển để sản xuất vacxin. Sự khác biệt trong trình tự bộ gen của các chủng PEDV mới bùng phát và các chủng PEDV trong vacxin, đặc biệt là ở các thụ thể trung hòa, dẫn đến vacxin hiện tại có hiệu quả bảo hộ thấp chống lại các chủng PEDV trên thực địa [3]. Vì vậy, để đảm bảo an toàn cho ngành chăn nuôi lợn tại Việt Nam, cần có những nghiên cứu phát triển vacxin phòng PEDV, đặc biệt là các chủng virus thuộc nhóm G2 gây bệnh thực địa. Vacxin tiểu đơn vị được tạo ra nhờ sử dụng hệ thống thực vật có nhiều lợi thế bao gồm mức đầu tư sản xuất thấp, dễ dàng nhân rộng, độ ổn định cao và thời hạn sử dụng lâu dài [6]. Phương pháp biểu hiện tạm thời dựa trên agro-infiltration có lợi thế trong việc sản xuất các protein tái tổ hợp nhanh chóng với số lượng lớn, điều này cho phép phản ứng kịp thời khi xảy ra các dịch bệnh [7].

Protein S của PEDV là nhân tố không thể thiếu trong tương tác của virus với các thụ thể tế bào [8] và được xem là mục tiêu chính để phát triển vacxin [9]. Vùng CO-26K equivalent (COE) (aa 499-638) là một vùng quyết định kháng nguyên trên protein S của PEDV phản ứng với kháng thể trung hòa [8] và được nhận diện bởi kháng thể đơn dòng 2C10 ở đầu C của protein S [10]. Kháng nguyên COE được xem là mục tiêu chính để sản xuất vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV [11]. Vùng COE đã được nghiên cứu biểu hiện trên hệ thống thực vật trong nhiều công bố trước đây [12, 13]. Protein COE tái tổ hợp ở dạng monomer có khả năng sinh đáp ứng miễn dịch trên chuột. Dạng cấu trúc pentamer của COE đã được biểu hiện thành công nhưng chưa có các đánh giá về khả năng gây miễn dịch [12].

Ngoài vùng COE thuộc protein S của PEDV, vùng S1D (aa 636-789) có 2 vùng được nhận biết bởi thụ thể tế bào lympho B là SS2 (aa 748-755) và vùng SS6 (aa 764-771) cũng là các vùng kháng nguyên quan trọng tương tác với các kháng thể có khả năng trung hòa [14]. Thêm vào đó, tiểu phần S2 có chứa các vùng kháng nguyên tương tác với các kháng thể có khả năng trung hòa virus bao gồm các aa 744-759, các aa 747-774, các aa 756-771 và các aa 1371-1377 [15]. Tiểu phần S2 đã được biểu hiện dưới dạng từng phần hoặc đầy đủ trong *E. coli* [16, 17]. Chuột được tiêm tiểu phần S2 có sự hiện diện của các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV [16].

Protein S đã được phát hiện có sự biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá *N. benthamiana* ở mức độ thấp [18] hoặc không biểu hiện [19]. Toàn bộ protein S1 dung hợp motif GCN4pII (pII) đã được báo cáo có mức độ biểu hiện tạm thời tương đối thấp trong cây thuốc lá *N. benthamiana,* chỉ đạt 0,005% protein hòa tan tổng số (TSP) [20]. Tính đến nay, chưa có công bố nào ở trong và ngoài nước nghiên cứu về việc biểu hiện vùng COE (aa 499-638), COE-S1D (aa 499-789) hoặc S2 (aa 730-1324) thuộc protein S dung hợp motif GCN4pII hoặc dung hợp motif GCN4pII-tp trên hệ thống cây thuốc lá *N. benthamiana* cũng như chứng minh được tính sinh miễn dịch của các protein này trên động vật.

Chính vì vậy, một số câu hỏi nghiên cứu lần lượt được đặt ra trong khuôn khổ của luận án bao gồm: i). Liệu có tạo được kháng nguyên COE tái tổ hợp của chủng PEDV thuộc nhóm G1a dung hợp motif GCN4pII (viết tắt COE/G1a-pII) trên cây thuốc lá *N. benthamiana* có tính sinh miễn dịch tương đương với vacxin thương mại sẵn có chứa chủng PEDV thuộc nhóm G1a hay không? ii). Liệu có tạo được kháng nguyên COE tái tổ hợp của chủng PEDV thuộc nhóm G2a gây bệnh tại Việt Nam dung hợp motif GCN4pII (viết tắt là COE/G2a-pII) trên cây thuốc lá *N. benthamiana* có tính sinh miễn dịch và khả năng bảo hộ tốt hay không? iii). Liệu có tạo ra được các kháng nguyên tái tổ hợp khác như kháng nguyên COE-S1D, S2 từ chủng PEDV G2a gây bệnh tại Việt Nam dung hợp motif GCN4pII (lần lượt viết tắt là COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII) và kháng nguyên COE từ PEDV G2a gây bệnh tại Việt Nam dung hợp motif GCN4pII-tp (viết tắt là COE/G2a-pII-tp) trên cây thuốc lá *N. benthamiana* có mức độ biểu hiện và tính sinh miễn dịch tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII hay không?

Xuất phát từ cơ sở khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành đề tài: '**Nghiên cứu tạo kháng nguyên S của virus gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV) trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* có tính sinh miễn dịch định hướng tạo vacxin thế hệ mới**'.

Mục tiêu nghiên cứu của luận án

Tạo được kháng nguyên S tái tổ hợp của PEDV từ cây thuốc lá *N. benthamiana* và đánh giá tính sinh miễn dịch trên động vật thí nghiệm phục vụ phát triển vacxin.

Các nội dung nghiên cứu chính của luận án

Nội dung 1: Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G1a

Nội dung 2: Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G2a gây bệnh tại Việt Nam

Nội dung 3: Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G2a gây bệnh tại Việt Nam

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Các chủng PEDV thuộc nhóm G2 đang là tác nhân gây bệnh chính trong các đợt dịch PED tại Việt Nam. Việc phát triển một loại vacxin có hiệu quả phòng các chủng PEDV thuộc nhóm G2 gây bệnh ở Việt Nam là điều vô cùng cần thiết. Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy các protein tái tổ hợp được tạo ra trên cây thuốc lá *N. benthamiana* sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời như COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp đều tính kháng nguyên cao, tính sinh miễn dịch tốt và có thể là các ứng viên vacxin đầy triển vọng định hướng ứng dụng trong công tác phòng chống PED tại Việt Nam.

Những đóng góp mới của luận án

Luận án đã nghiên cứu một cách hệ thống về tạo kháng nguyên COE tái tổ hợp từ chủng PEDV DR13 nhược độc thuộc nhóm G1a và các kháng nguyên COE, COE-S1D và S2 tái tổ hợp từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao thuộc nhóm G2a gây bệnh thực địa tại Việt Nam dung hợp motif pII hoặc motif pII-tp trên cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện tạm thời; và đã đánh giá được đáp ứng miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp tạo ra trên động vật thử nghiệm.

Kháng nguyên COE/G2a-pII tiêm cho lợn nái (100µg/liều) có khả năng bảo vệ lợn con sinh ra từ lợn nái chống lại PEDV sau công cường độc. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50µg/liều) kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) đã kích thích sinh đáp ứng kháng thể IgG đặc hiệu PEDV mạnh hơn, đồng thời sinh đáp ứng kháng thể IgA đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV tương đương vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology). Đây là các ứng viên tiềm năng để sản xuất vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV gây bệnh tại Việt Nam.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Bệnh tiêu chảy cấp ở lợn

1.1.1. Tình hình dịch bệnh PED trên thế giới

Từ sau khi được báo cáo về sự xuất hiện lần đầu ở Anh và Bỉ năm 1970, dịch bệnh PED tiếp tục được phát hiện ở nhiều nước khác ở Châu Âu, Châu Á và Châu Mỹ. Dịch bệnh PED nghiêm trọng được phát hiện ở Nhật Bản và Hàn Quốc vào các năm 1980 và 1990 [2]. Trong cùng khoảng thời gian đó, ở Châu Âu, các đợt bùng phát PED xuất hiện không thường xuyên nhưng tác nhân gây bệnh PED tiếp tục lây lan và tồn tại ở dạng đặc hữu trong quần thể lợn. Sự bùng phát của PED đã được quan sát thấy ở Hà Lan vào năm 1989–1991, ở Hungary vào năm 1995, và ở Anh vào năm 1998. Dịch bệnh PED lây lan và được phát hiện có tỷ lệ gây chết cao trên lợn con mới đẻ ở Ý vào các năm 2005–2006 [21].

Tại Mỹ, bệnh PED được báo cáo lần đầu tiên vào tháng 4/2013. Tác nhân gây bệnh PED đã thoát khỏi các các hệ thống kiểm soát và an toàn sinh học, lây lan rất nhanh chóng đến các khu vực khác và lây nhiễm cho hàng trăm trang trại. Đến tháng 3/2015, sự hiện diện của bệnh PED đã được xác nhận tại 31 tiểu bang của Mỹ. Dịch bệnh PED dẫn đến thiệt hại kinh tế đáng kể tại Mỹ, với gần 10% số lợn (bảy triệu con lợn) đã bị chết do dịch PED gây ra, gây thiệt hại gần 440 triệu USD [22]. Bệnh PED có các dấu hiệu đặc trưng như tiêu chảy nhiều nước, mất nước, và nôn mửa liên tục. Tất cả các con lợn đều bị ảnh hưởng bởi dịch PED, nhưng tỷ lệ chết ở lợn sữa đạt tới 95-100% [23].

Tại Châu Âu, bệnh PED không nằm trong danh sách các bệnh được thống kê ở Tổ chức Thú y thế giới (World Organisation for Animal Health, WOAH), do đó rất khó để mô tả chính xác sự xuất hiện của bệnh này trong Châu Âu. Trong 10 năm qua, chỉ một số quốc gia có các trường hợp lâm sàng được báo cáo về PED và/hoặc có huyết thanh lợn dương tính với PEDV [24]. Các đợt bùng phát dịch PED ở Châu Âu có các đặc điểm khác biệt so với dịch bệnh PED được phát hiện ở Mỹ hoặc Châu Á. Sau khi bệnh PED bùng phát năm 2013 ở Mỹ, các trường hợp mắc PED cũng được xác nhận ở Áo, Bỉ, Pháp, Đức, Ý, Hà Lan, Bồ Đào Nha và Slovenia. Ở Đức, bệnh PED được báo cáo vào năm 2014, gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% với các triệu chứng cấp tính trên lợn [25]. Ở Slovenia, PED đã được xác nhận trong phòng thí nghiệm vào năm 2015 [26]. Gần như đồng thời, chủng PEDV có tính độc lực cao gây ra dịch PED được phát hiện ở Ukraine.

Tại Châu Á, dịch PED đã lây lan ra và gây tổn thất kinh tế ở nhiều nước như Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc, Việt Nam, Philippin, Đài Loan, Thái Lan [27]. Tại Trung Quốc, dịch PED được báo cáo lần đầu vào năm 1973. Trong hơn 30 năm

tiếp theo, việc sử dụng vacxin phòng PEDV dạng vô hoạt đã hạn chế sự xuất hiện của PEDV tại quốc gia này. Tuy nhiên, dịch PED quay lại và lây lan mạnh ở Trung Quốc vào năm 2010-2012 [28]. Từ tháng 2/2010 đến 11/2011, khoảng 50.000 con lợn mắc PED, trong đó chủ yếu là lợn con sơ sinh dưới 1 tuần tuổi tại Trung Quốc đã bị chết, với tỷ lệ chết lên đến 90-100% [29]. Ở Nhật, dịch PED được báo cáo vào các năm 1993 và năm 1996 gây chết lần lượt 14.000 con lợn và 39.509 con. Tại Hàn Quốc, dịch PED được công bố lần đầu vào năm 1992 và cũng được báo cáo ở những năm sau đó. Từ những năm 2007 đến 2008, dịch PED cũng liên tiếp được ghi nhận ở nhiều nước ở khu vực Đông Nam Á như Việt Nam, Thái Lan và Philippines.

1.1.2. Tình hình dịch bệnh PED tại Việt Nam

Ở Việt Nam, dịch PED đã được báo cáo lần đầu tiên ở vài tỉnh nằm tại khu vực phía Nam vào năm 2008. Sau đó, trong những năm 2008-2009, dịch PED nhanh chóng được báo cáo ở nhiều tỉnh phía Nam, khiến vô số lợn con mới sinh bị chết, gây thiệt hại lớn đến chăn nuôi trong nước [30]. Đầu năm 2010, dịch PED đã phát hiện ở 31 trại trong cả nước, tập trung ở các tỉnh ở khu vực phía Nam trong đó tỉnh Đồng Nai có số trại bị nhiễm PED nhiều nhất với 15 trại. Tại khu vực miền đông Nam Bộ, lợn con sơ sinh có tỷ lệ mắc bệnh PED và tỷ lệ tử vong rất cao tương ứng là 93,94% và 81,67% [31]. Tại tỉnh Tiền Giang, tỷ lệ mắc PEDV trên đàn lợn nái là 33,72% [31]. Trong đó, lợn nái mắc bệnh PED với tỷ lệ ở các huyện lần lượt là huyện Chợ Gạo (59,22%), huyện Cai Lậy (27,66%), Cái Bè (14,52%) và huyện Châu Thành (10,20%). Ở trang trại có quy mô đàn nái trên 50 con có tỷ lệ mắc PED cao nhất đạt 34,95%. Tỷ lệ mắc bệnh PED ở lợn nái với 4–5 lứa đẻ (56,67%), lợn nái trên 5 lứa đẻ (38,59%). Những nái hậu bị hoặc chỉ mới sinh sản 1 lứa (33,33%) và thấp nhất là nái đã sinh sản 2–3 lứa (27,50%) [31]. Như vậy, nhiều đợt dịch bệnh PED lớn được công bố ở khu vực phía Nam.

Ở khu vực phía Bắc và Trung Bộ, bệnh PED cũng đã được phát hiện vào năm 2013-2014 ở các tỉnh như Bắc Ninh, Hưng Yên, Hải Dương, Bắc Giang, Thái Nguyên, Thái Bình. Dịch PED cũng được phát hiện tại 26 trại nuôi lợn ở 6 tỉnh phía Bắc, trong đó nhiều trại có lợn nhiễm đồng thời cả TGEV và Rotavirus [32]. Thời điểm bùng phát dịch PED mạnh tại miền Bắc tập trung vào mùa lạnh từ tháng 11 năm trước đến tháng 4 năm sau với khả năng lây nhiễm nhanh. Dịch PED được phát hiện trên lợn nái với tỷ lệ lợn có triệu chứng tiêu chảy lên đến 76,8%. Tỷ lệ chết do dịch PED ở lợn con đang bú mẹ khoảng 68,6%, tỷ lệ lợn bị tiêu chảy có thể lên tới 100% ở tất cả lứa tuổi [32]. Ngoài ra, từ năm 2013-2014, khi đánh giá sự có mặt của PEDV trong 148 mẫu bệnh phẩm gồm các mẫu phân và ruột của lợn nghi mắc bệnh PED thu thập được từ ba tỉnh Quảng Trị, Thái Bình, Thái Nguyên bằng phương

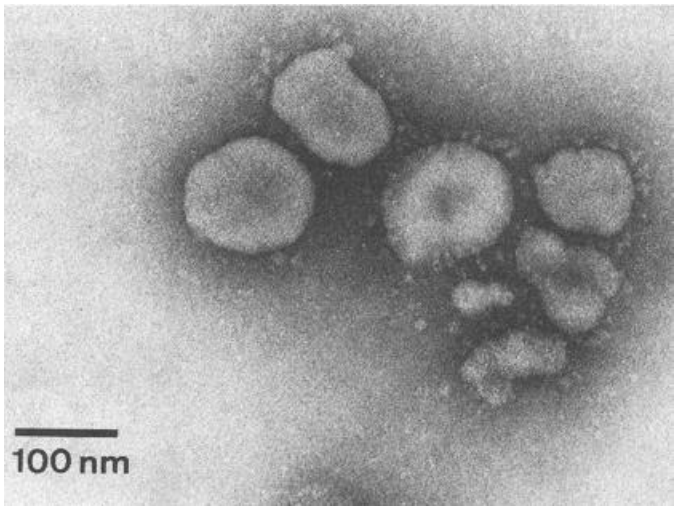
pháp RT-PCR cho thấy 57/148 (38,51%) mẫu bệnh phẩm phát hiện có PEDV [33]. Trong thời gian từ năm 2013-2015, PEDV được tìm thấy trong nhiều các mẫu bệnh phẩm ở 32/52 trại tại 10 tỉnh miền Bắc Việt Nam (Thái Nguyên, Lào Cai, Bắc Giang, Hòa Bình, Vĩnh Phúc Hải Dương, Thái Bình, Hưng Yên, Hà Nội, Hải Phòng). Tỷ lệ các trang trại dương tính với PEDV ở vùng đồng bằng (68,42%) là cao hơn rõ rệt so với ở các tỉnh trung du miền núi (35,29%) [34]. Từ tháng 9/2018 đến tháng 8/2019, Trần Đức Hoàn và cộng sự (2021) đã khảo sát và nghiên cứu tình hình dịch PED ở tỉnh Bắc Giang bằng phương pháp PCR [35]. Kết quả cho thấy 26/64 (40,63%) mẫu bệnh phẩm phát hiện sự có mặt của PEDV [35]. Trong thời gian từ năm 2019-2020, Hoàng Văn Sơn và cộng sự (2020) đã nghiên cứu tình hình bệnh PED trên 16.443 con lợn nuôi tại các trại ở 6 huyện của tỉnh Thanh Hóa [36]. Kết quả cho thấy tỷ lệ lợn nhiễm PEDV và tỷ lệ lợn chết do PED tại Thanh Hoá lần lượt là 14,56% và 53,38%. Huyện Tĩnh Gia có tỷ lệ lợn mắc PED cao nhất đạt 16,12%. Nhóm lợn con theo mẹ có tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ tử vong cao nhất, lần lượt là 22,01% và 72,63%. Nhóm lợn đực giống có tỷ lệ nhiễm bệnh là 5,81% và tỷ lệ chết là 0% [36]. Như vậy, cho tới nay, bệnh PED đã xuất hiện ở tất cả các vùng chăn nuôi lợn chính ở Việt Nam.

1.2. Tác nhân gây bệnh của PED

1.2.1. Phân loại PEDV

PEDV được phân loại vào họ *Coronaviridae* (phân họ *Coronavirinae*, họ *Coronaviridae*, bộ *Nidovirales*) [37]. Họ *Coronaviridae* bao gồm một nhóm lớn virus với bộ gen ARN dương, sợi đơn có kích thước từ 26 đến 32 kb.

1.2.2. Đặc điểm hình thái của PEDV

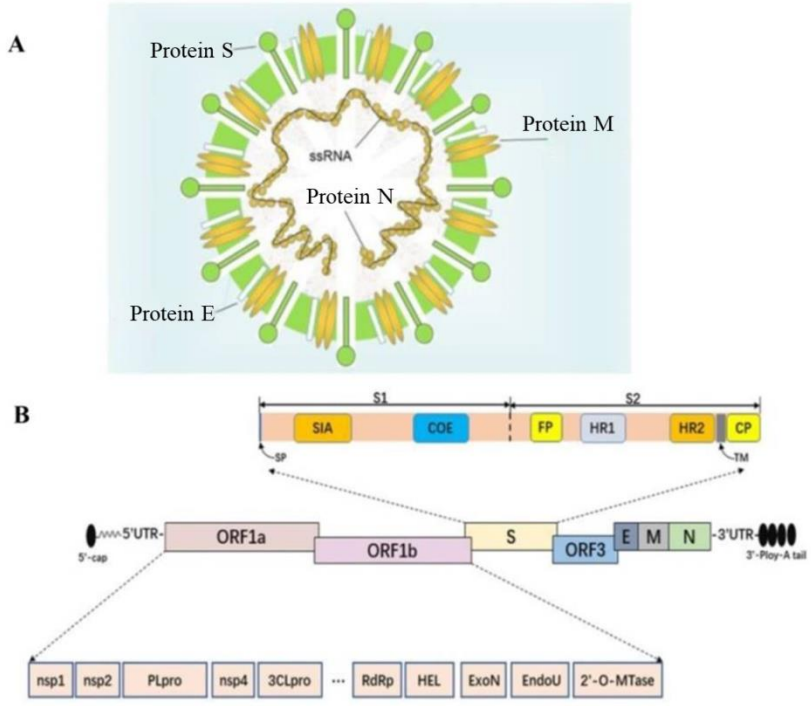


Hình 1.1. Hạt PEDV được quan sát dưới kính hiển vi điện tử
PEDV được cấy truyền 26 đời trên tế bào Vero). Độ phóng đại x128.000 [38]

Hạt PEDV tồn tại ở dạng hình cầu có đường kính từ 90 đến 160 nm dưới kính hiển vi điện tử. Các protein gai đặc trưng với kích thước từ 12 đến 15 nm được sắp xếp trên bề mặt hình cầu tạo thành một vương miện xung quanh hạt virus, đây là hình thái điển hình của coronavirus [38] (Hình 1.1).

1.2.3. Đặc điểm cấu trúc hệ gen và chức năng của các protein PEDV

PEDV có hệ gen là ARN đơn dương với kích thước khoảng 28 kb [37]. Cấu trúc hệ gen và cấu trúc hạt của PEDV được thể hiện ở Hình 1.2. Từ đầu 5', hai phần ba hệ gen mã hóa các protein cần thiết cho quá trình sao chép ARN, trong khi một phần ba hệ gen ở đầu 3 ′ có chứa 7 khung đọc mở (ORF) mã hóa 4 protein cấu trúc PEDV như: N (Nucleocapsid), S (Spike), E (Envolope), M (Membrane) và ba protein không cấu trúc PEDV như ORF 1a và 1b và ORF3. ORF1a và ORF1b mã hóa cho protein enzyme ARN polymerase. ORF3 mã hóa protein không tham gia cấu trúc, chưa rõ chức năng, protein này được cho rằng có vai trò trong độc lực của virus [39]. Trong hệ gen, các protein cấu trúc được định vị theo thứ tự 5'-replicase (1a/1b)-S-ORF3-E-M-N-3′. Hệ gen ARN của virus liên kết với protein N để tạo thành một chuỗi dài, phức hợp ribonucleoprotein (RNP) dạng xoắn. Lõi virus được bao bọc bởi một vỏ lipoprotein, chứa các protein S, E và M [1]. Mỗi protein cấu trúc và không cấu trúc giữ các nhiệm vụ thiết yếu trong quá trình sao chép, phiên mã và dịch mã của virus như cũng như trao đổi của virus và tế bào chủ.



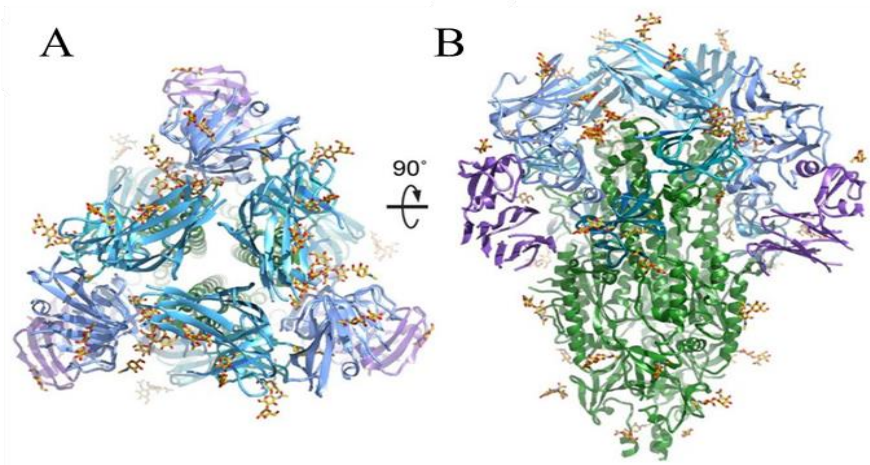
Hình 1.2. Cấu trúc hệ gen và cấu trúc hạt PEDV
A. Sơ đồ virion của PEDV. B. Sơ đồ hệ gen của PEDV [37]

Chức năng của các protein PEDV được thể hiện tóm tắt ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Tóm tắt về chức năng của các protein PEDV [40]

ORF/protein	Chức năng chính của ORF/protein
ORF1a/b	ORF1 bao gồm 2 ORF: 1a và 1b. ORF1a mã hóa protease và ORF1b mã hóa exonuclease, endoribonuclease, RNA dependent RNA polymerase và melthytranferase.
S	Có nhiệm vụ chính trong trao đổi, tương tác của virus với thụ thể của tế bào chủ và sự thâm nhập của virus vào tế bào.
ORF3	Có vai trò trong độc tính của virus.
E	Giữ nhiệm vụ trong sự hình thành của hạt virus liên kết với protein M; có trách nhiệm quan trọng trong kênh ion liên quan tới sự giải phóng của virus.
M	Có thể cảm ứng α-interferon; có thể có vai trò trong việc trung hòa và quá trình lắp ráp của hạt virus.
N	Là phosphoprotein có vai trò cấu trúc hệ gen của virus; có lợi cho phân tích sự lây nhiễm của PEDV.

1.2.4. Protein S của PEDV



Hình 1.3. Cấu trúc mô hình của protein S

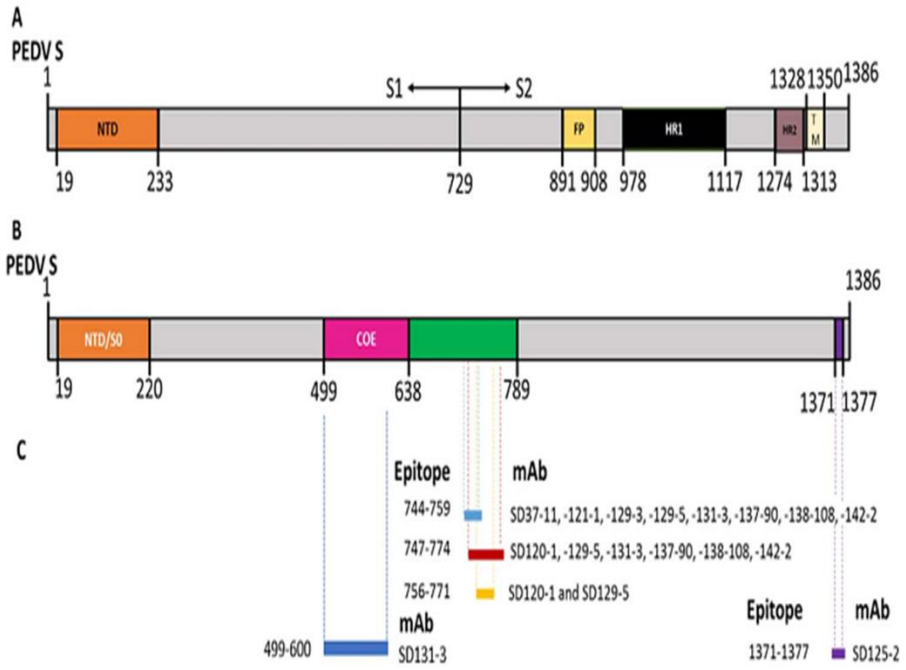
A. Góc nhìn protein S dạng trimer từ màng. B. Góc nhìn 90^o protein S dạng trimer [41]

Protein S của PEDV được chứng minh là có tính kháng nguyên mạnh nhất trong số các protein của PEDV. Protein S nằm ở bề mặt của virus, thể hiện mức độ đa dạng di truyền cao và giữ nhiệm vụ quan trọng trong quá trình xâm nhập của virus vào tế bào chủ, kích thích cơ thể sản sinh các kháng thể có khả năng trung hòa virus và độc lực của virus *in vivo* [42]. PEDV đã sử dụng protein S dạng homotrimer glycoprotein với khoảng hơn 29 vị trí N-glycosyl hóa để tương tác với các thụ thể của tế bào chủ [43]. Sự liên kết của protein S với thụ thể tế bào chủ là

cần thiết cho quá trình xâm nhập của virus và có vai trò trong kích thích kháng thể trung hòa chống lại virus [8]. Mô hình cấu trúc protein S được thể hiện ở Hình 1.3.

Protein S của PEDV có khối lượng phân tử khoảng 180–220 kDa [44]. Protein S có chứa 1383 axit amin (aa), trong đó peptit tín hiệu nằm ở aa 1-18, tiếp đến là vùng chứa yếu tố quyết định tính kháng nguyên, vùng xuyên màng nằm ở aa 1334-1356 và một vùng trong tế bào chất. Protein S có thể được chia thành tiểu phần S1 và tiểu phần S2, trong đó tiểu phần S1 chứa aa 1-729 và tiểu phần S2 chứa aa 730-1383 [15].

Protein S dạng monomer bao gồm tiểu đơn vị S1 gần như hoàn toàn chứa các tấm β và tiểu đơn vị S2 được tạo thành từ một chuỗi các xoắn α không liên tục [45]. Tiểu đơn vị coronavirus S1 liên kết với thụ thể tế bào, sau đó sự hợp nhất của màng virus và tế bào được thực hiện bởi chuỗi sáu vòng xoắn gói (6-helix bundle) bao gồm vùng HR1 và vùng HR2 trong tiểu đơn vị S2 [46]. Trong quá trình xâm nhập của PEDV tự nhiên vào trong tế bào, cần thiết có quá trình phân cắt của protein S thành S1 và S2. Tuy nhiên, với PEDV đã thích ứng trong nuôi cấy tế bào, điều này có thể không cần thiết.



Hình 1.4. Cấu trúc protein S của PEDV và các vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với kháng thể trung hòa

A. Sơ đồ mô tả các vùng chức năng của protein S, bao gồm: vị trí phân cắt giả định giữa S1 và S2 tại aa 729, peptide tín hiệu (aa 1-18), vùng đầu N (aa 19-233), peptide dung hợp (aa 891-908), vùng lặp lại heptad 1 (HR1, aa 978-1111), vùng lặp lại heptad 2 (HR2, aa 1274-1313) và vùng xuyên màng (aa 1328-1350). B. Sơ đồ mô tả các vùng quyết định kháng nguyên được nhận biết bởi thụ thể tế bào B (đầu N [NTD]/S0: aa 19-202, vùng COE: aa 499-638, và aa 638-789) và các vùng mục tiêu phản ứng với các kháng thể trung hòa (NTD/S0, aa 19-220, COE, aa 499-638 và aa 1371-1377). C. Các vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với kháng thể trung hòa trên protein S (aa 499-600, aa 744-759, aa 747-774, aa 756-771 và aa 1371-1377) và các kháng thể đơn dòng tương tác với các vùng quyết định kháng nguyên [15].

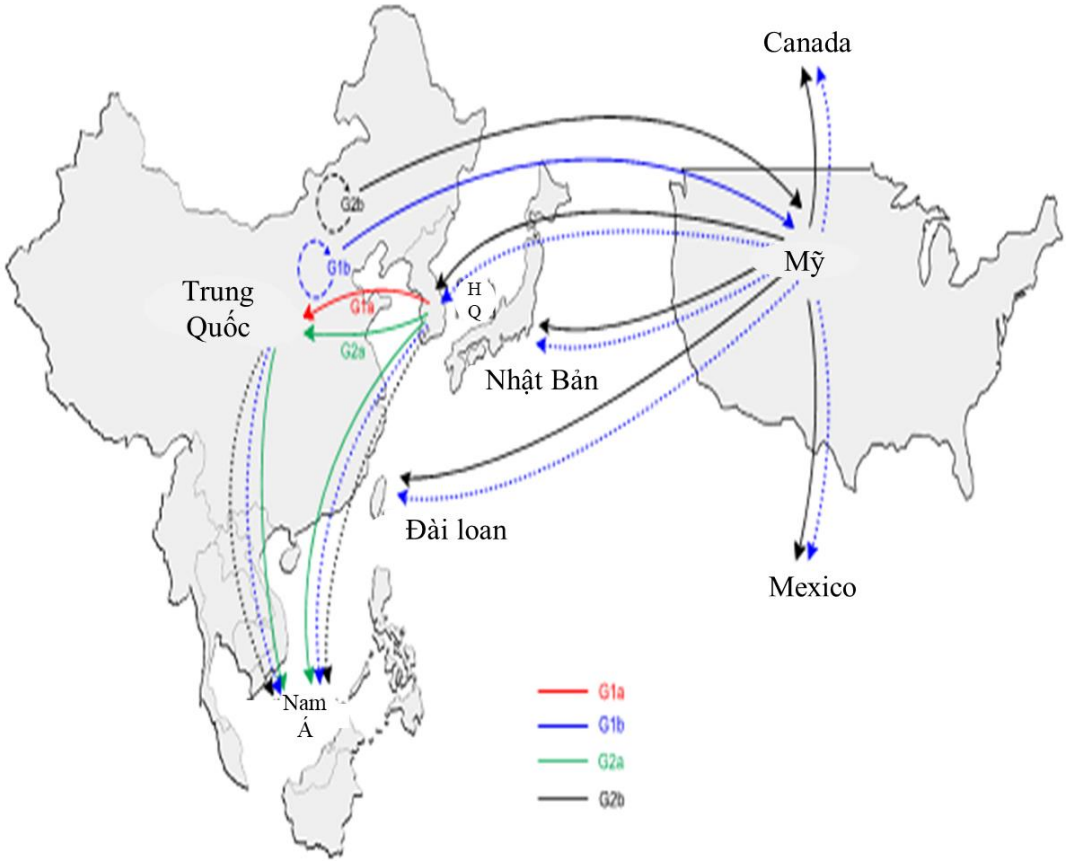
Các vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên được nhận biết bởi thụ thể tế bào B và phản ứng với kháng thể trung hòa trên protein S bao gồm đầu N [NTD]/S0 (aa 19-202), CO-26K equivalent (COE) (từ aa 499 đến 638), S1D (từ aa 636-789 được nhận biết bởi 2 thụ thể tế bào lympho B là SS2 (aa 748-755) và SS6 (aa 764-771)) và 2C10 (aa 1368-1374, aa 1371-1377) [8, 14, 15, 22]. Ngoài ra, còn có các vùng chứa quyết định kháng nguyên trên tiểu phần S2 tương tác với kháng thể trung hòa PEDV là các aa từ 744 đến 759, các aa từ 747 đến 774, các aa từ 756 đến 771 và các aa từ 1371 đến 1377. Các vùng này trên tiểu phần S2 được nhận nhiện bởi 10 dòng kháng thể đơn dòng đặc hiệu protein S [15]. Sơ đồ mô tả các vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên được nhận biết bởi thụ thể tế bào B và vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên tương tác với kháng thể trung hòa trên protein S được thể hiện ở Hình 1.4. Các vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên trên protein S được xem là ứng viên chính cho các nghiên cứu phát triển vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV [47].

1.2.5. Dịch tễ học phân tử các chủng PEDV trên thế giới

Park và cộng sự (2007) đã nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử của PEDV và phân loại các chủng PEDV thành 3 nhóm (G1, G2 và G3) dựa trên trình tự gen S và M [48]. Một số nghiên cứu khác đã trên gen M và ORF3 [14] đôi khi cả gen E để phân loại các chủng PEDV [49].

Ngoài ra, hầu hết các nghiên cứu dựa trên trình tự toàn bộ gen S hoặc S1 (aa 1–735) để xem xét sự liên quan về đặc điểm di truyền của các chủng PEDV [50, 51]. Các nghiên cứu đặc điểm di truyền dựa trên gen S cho thấy PEDV có thể được phân loại thành 2 nhóm: nhóm G1 cổ điển và nhóm G2 gây dịch thực địa. Nhóm G1 và nhóm G2 được phân tiếp thành các nhóm nhỏ lần lượt là G1a, G1b, G2a và G2b. Các chủng PEDV thích nghi trên tế bào, chủng PEDV vacxin và chủng PEDV nguyên mẫu CV777 được phân loại vào nhóm G1a. Một số biến chủng PEDV được ghi nhận ở Trung Quốc, Mỹ, Hàn Quốc và Châu Âu được phân loại vào nhóm G1b. Một số chủng PEDV được phát hiện ở Châu Á trước đây thuộc nhóm G2a, trong khi các chủng PEDV được phát hiện ở Châu Á và Bắc Mỹ gần đây thuộc nhóm G2b [2]. Sự bùng phát toàn cầu của các chủng G2b độc dường như là kết quả của biến đổi di truyền xuất hiện ở các chủng PEDV G1a độc. Có sự khác nhau trong trình tự gen S của các chủng PEDV trong nhóm G1b và các chủng PEDV ở nhóm G1a và G2. Các chủng PEDV thuộc nhóm G1b có độ tương đồng hơn 95% trong trình tự gen S (từ đầu N đến một phần ba gen S) so với các chủng cổ điển G1a, nhưng so với chủng thuộc nhóm G2 gây dịch có mức độ tương đồng không lớn hơn 89%. Ngược lại, các chủng PEDV G1b có độ tương đồng hơn 99% trong trình tự gen S

(phần còn lại) so với các chủng PEDV thuộc nhóm G2 [50]. Hơn nữa, phân tích phát sinh loài dựa trên toàn bộ hệ gen cho thấy các chủng G1b có liên quan gần gũi với các chủng PEDV thuộc nhóm G2 gây dịch. Như vậy, các chủng PEDV G1b có thể được tạo ra từ quá trình tái tổ hợp giữa các chủng PEDV G1a cổ điển và nhóm G2 gây dịch. Trên cơ sở di truyền sẵn có và dữ liệu phát sinh loài về các chủng PEDV trên thế giới, con đường tiềm năng mà qua đó PEDV có thể đã lan sang Châu Á và Bắc Mỹ đã được đề xuất [2] (Hình 1.5).



Hình 1.5. Con đường lan truyền tiềm năng của PEDV trên toàn thế giới
Các phân nhóm di truyền của PEDV được đánh dấu với các màu sắc khác nhau được ký hiệu trong phần ghi chú. Đường đậm thể hiện sự lan truyền của PEDV đã xảy ra giữa các quốc gia, đường dứt thể hiện sự lan truyền của PEDV được dự đoán xảy ra. HQ: Hàn Quốc [2].

Các chủng PEDV G1a cổ điển có thể đã xuất hiện ở Trung Quốc do nhập khẩu bất hợp pháp vacxin sống giảm độc lực từ Hàn Quốc hoặc thao tác trên các chủng PEDV từ vacxin. Các chủng PEDV G2a từ Hàn Quốc có thể đã lây lan sang Trung Quốc. Chủng PEDV G2a của Trung Quốc sau đó đã được truyền sang các nước khác như Thái Lan và Việt Nam. Các chủng G2a xuất hiện ở Thái Lan và Việt Nam có thể đã được lây truyền qua đường vận chuyển trực tiếp từ Hàn Quốc. Tại Trung Quốc, PEDV nhóm G1b cổ điển mới và nhóm đại dịch G2b dường như đã phát sinh đồng thời từ trong năm 2010 và 2011 do quá trình tái tổ hợp giữa G1a thực địa và các chủng G2a hoặc đột biến điểm ở PEDV G2a. Các chủng này có thể

cùng xuất hiện ở Mỹ. Chủng PEDV G1b và G2b giống các chủng Mỹ sau đó phát tán vào Hàn Quốc. Nguồn gốc của các chủng G2b gây dịch có thể từ quá trình tiến hóa từ các chủng PEDV G2a thực địa ở Hàn Quốc. Ngoài ra, các virus G2b giống Mỹ lây lan xa hơn đến miền Bắc các nước như Châu Mỹ, Đài Loan và Nhật Bản. Hiện tại, không có báo cáo chính thức nào về sự xuất hiện của PEDV G1b ở các nước này [2].

Trong nhóm G2, các gen S của các chủng PEDV thường gồm 4161 nucleotit mã hóa 1386 aa. So với chủng PEDV CV777, các gen S trong nhóm G2 thường có số nucleotit và aa dài hơn tương ứng là 9 nucleotit và 3 aa. Do vậy, PEDV có thể được phân thành 2 nhóm: non-S INDEL và S INDEL căn cứ vào sự thêm - xóa ở gen mã hóa S [52]. Ở Mỹ, các chủng PEDV thuộc nhóm S INDEL là nguyên nhân của các đợt dịch với biểu hiện lâm sàng nhẹ [52]. Các gen S của các chủng PEDV G2 thường có sự chèn-xóa (S INDELS) 4 aa ở 2 vị trí aa là 55 và 56, chèn 1 aa ở các vị trí aa 135 và 136, và một sự mất đoạn 2 aa duy nhất nằm giữa các aa 160 và 161 trong vùng siêu biến đầu N ở protein S [53]. Thêm vào đó, ở các chủng G2 có kiểu S INDEL là tương đồng với các chủng G2 mới khác, FL2013 [GenBank: KP765609] và MF3809 [GenBank: KF779469] lần lượt được phát hiện ở Trung Quốc và Hàn Quốc, có sự xóa 7 aa ở cuối đầu C trên protein S hoặc bị xóa 204 aa ở các các aa 713–916 trên protein S [54].

1.2.6. Dịch tễ học phân tử của các chủng PEDV tại Việt Nam

Kể từ lần đầu tiên được phát hiện tại Việt Nam vào năm 2008 cho tới nay, PEDV vẫn được xem nguyên nhân chủ yếu gây bùng phát dịch tiêu chảy trên lợn. Đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam đã được nhiều nhà khoa học trong nước nghiên cứu. Từ năm 2013-2014, Nguyễn Trung Tiến và cộng sự (2015) đã nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng PEDV trong các mẫu bệnh phẩm tại 3 tỉnh Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình. Kết quả phân tích trình tự nucleotit và aa trên cơ sở giải trình tự một phần gene S cho thấy các chủng virus PED thu thập được trong nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng về nucleotit và aa rất cao khi so sánh với các chủng virus PED tham chiếu khác trước đây của Việt Nam, tỷ lệ tương đồng nucleotit từ 94,8-98,6% và aa từ 93,5-98,8%. Kết quả phân tích cây phả hệ cho thấy các chủng virus PED trong nghiên cứu này thuộc nhóm G1-1 [33].

Tiếp theo, Nguyễn Trung Tiến (2018) đã phân tích các thông tin di truyền và dịch tễ học phân tử của các chủng PEDV trong các mẫu bệnh phẩm được thu thập tại 10 tỉnh miền Bắc trong giai đoạn 2013-2015 [34]. Kết quả cho thấy các chủng PEDV xuất hiện ở các tỉnh miền Bắc không bắt nguồn từ các chủng PEDV trong vacxin, thể hiện ở chỉ số tương đồng trong trình tự gen S và gen ORF3 lần lượt là

63,7% - 87,9% và 93% - 99%. Các chủng PEDV có các đột biến thêm-xóa ở các vị trí aa: 57-58 (vùng số 1), 110 (vùng số 2), 135-136 (vùng số 3), 158-159 (vùng số 4), 379-380 (vùng số 5) và 1194 (vùng số 6) và không thuộc các vùng chứa yếu tố quyết định tính kháng nguyên tương tác với các kháng thể trung hòa như COE, S1D và 2C10. Vì vậy, điều này có thể không liên quan tới tính kháng nguyên của virus. Khi đánh giá 2 vùng quyết định tính kháng nguyên trên protein S của 38 chủng PEDV tại miền Bắc cho thấy có biến đổi ở 31 aa, nhiều nhất tại 8 vị trí aa là 517, 521, 527, 549, 594, 605, 612 và 635 [34]. Kết quả nghiên cứu đặc điểm dịch tễ học phân tử cho thấy các chủng PEDV xuất hiện ở Việt Nam có thể bắt nguồn từ nhiều nơi. Trong khi các chủng PEDV thuộc nhóm G1 và chủng PEDV nhánh châu Á thuộc nhóm G2 bắt nguồn từ Trung Quốc. Các chủng PEDV thuộc nhánh Bắc Mỹ bắt nguồn từ Mỹ. Sự xuất hiện của các chủng PEDV ban đầu được dự đoán là trước khi xảy ra dịch PEDV khoảng 6-9 năm. Kể từ khi xuất hiện, các chủng PEDV của Việt Nam có khả năng đã tạo thành những nhánh di truyền riêng biệt và tiếp tục lây lan ra các địa phương khác [34].

Đặc điểm dịch tễ học phân tử của các chủng PEDV tại 6 tỉnh miền Bắc Việt Nam (Hưng Yên, Hà Nội, Hòa Bình, Thái Bình, Vĩnh Phúc, Quảng Ninh, Sơn La) giai đoạn 2012-2015 đã được Nguyễn Văn Điệp và cộng sự (2018) nghiên cứu. Kết quả cho thấy dựa vào trình tự gen S, các PEDV của Việt Nam được phân loại thành 4 kiểu gen, cụ thể là G2b-Bắc Mỹ và Châu Á non-S INDEL, G2a-Châu Á non-S INDEL, G1b-S INDEL mới và G1a-S INDEL cổ điển. Nghiên cứu này cho thấy sự tồn tại trước của các chủng PEDV bắt nguồn từ Mỹ tại Việt Nam. Các tác giả đã phát hiện đột biến mất đoạn (261 aa) và thêm đoạn (8 aa) và biến đổi một số aa trên gen S của các chủng PEDV. Khi so sánh với trình tự protein S của các chủng PEDV trong vacxin thương mại, các chủng PEDV của Việt Nam khác xa về mặt di truyền và có nhiều khác biệt về aa trong vùng quyết định kháng nguyên và vị trí N-glycosyl hóa trong protein S [55].

Tác giả Than Van Thai và cộng sự (2020) đã nghiên cứu đặc điểm di truyền của 30 chủng phân lập tại 11 tỉnh thành của Việt Nam (Hà Nội, Lào Cai, Hải Phòng, Thái Nguyên, Hưng Yên, Thái Bình, Tuyên Quang, Vĩnh Phúc, Nghệ An, Đồng Nai, Hồ Chí Minh) trong giai đoạn 2015-2016 [4]. Kết quả thể hiện 28 chủng PEDV được thu thập ở miền Bắc và miền Trung Việt Nam thuộc nhóm G2 (cả hai phân nhóm G2a và G2b), trong khi 2 chủng PEDV khác (HUAPED176 và HUA-PED254) được thu thập ở khu vực phía Nam thuộc nhóm G1 (phân nhóm G1b). Phân tích nucleotit và aa của protein S hoàn chỉnh cho thấy các chủng PEDV xuất hiện ở Việt Nam có mối liên hệ mật thiết với nhau và có độ tương đồng về nucleotit

và aa lần lượt là 93,2%–99,9% và 92,6% –99,9%. Các dạng N-glycosyl hóa và đột biến trong vùng kháng nguyên đã được phát hiện ở các chủng PEDV Việt Nam [4].

Ngoài ra, Đồng Văn Quyền và cộng sự tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tiến hành đề tài "Nghiên cứu sự biến đổi di truyền và nguồn gốc phả hệ của virus Porcine epidemic diarrhea (PEDV) gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn tại miền Bắc Việt Nam" trong thời gian 2019-2020 với mục tiêu tiếp tục nghiên cứu các đặc điểm dịch tễ học phân tử của PEDV đang xuất hiện. Nhóm tác giả đã giải trình tự toàn bộ hệ gen của một chủng PEDV (IBT/VN/2018) được thu thập tại Hưng Yên năm 2018. Kết quả nghiên cứu và phân tích phả hệ cho thấy chủng PEDV (IBT/VN/2018) là chủng thuộc phân nhóm G2b cùng nhóm với các chủng S-INDEL của Bắc Mỹ và Châu Á và có độc lực cao. Bên cạnh đó, phân tích trình tự aa của S, N và ORF3 của chủng PEDV IBT/VN/2018 cho thấy có nhiều đột biến mới trong các gen này xuất hiện so với các chủng vacxin, điều này có thể liên quan đến tính đặc hiệu của thụ thể, đặc tính gây bệnh của virus và khiến virus trốn tránh hệ thống miễn dịch của vật chủ [56].

Bùi Thị Thùy Dương và cộng sự (2022) đã giải trình tự vùng S1-CTD (630 bp) của 26 mẫu bệnh tại từ 7 tỉnh miền Bắc từ 6/2018-1/2019 và phân tích chúng với 35 trình tự từ các nghiên cứu trước đây, đại diện cho G1a và các kiểu gen 1b, G2a và 2b, và tái tổ hợp (G1c) và vacxin PEDV. Kết quả cho thấy hầu hết các chủng PEDV thu thập được thuộc phân nhóm G2b. Có 7 chủng được nhóm lại thành một "nhóm phụ gen riêng biệt" độc lập (được đặt tên là dis-subG), tách biệt với cả G1a và G1b và các G2a, 2b và 1c khác (các chủng tái tổ hợp). Khi so sánh với chủng CV777 (AF353511), kết quả phân tích cho thấy những thay đổi rõ rệt của 513T>S, 520G>D, 527V>(I/L/M), 591L>F, 669A>(S/P), 691V>I trong vùng COE và S1D của protein S1-CTD. Cụm này là một phân nhóm biến thể kháng nguyên mới và cần có các nghiên cứu sâu hơn để điều tra tính dị nguyên của nó. Kết quả trong nghiên cứu này cho thấy sự tiến hóa liên tục trong vùng S1, trong đó nhấn mạnh sự cần thiết phải cập nhật vacxin thường xuyên để bảo vệ lợn khỏi sự xâm nhiễm của PEDV [57].

1.3. Vacxin phòng PEDV

Các vacxin phòng PEDV truyền thống chủ yếu là vacxin chứa toàn bộ virus như vacxin bất hoạt và vacxin sống nhược độc. Các vacxin bất hoạt có lợi thế là không gây độc và quy trình sản xuất đơn giản. Tuy nhiên, khả năng sinh miễn dịch của vacxin bất hoạt có thể bị thay đổi trong quá trình bất hoạt, thường yêu cầu hàm lượng virus cao và nhiều lần tiêm nhắc lại [58]. Trong khi đó, các vacxin sống nhược độc thường có tính sinh miễn dịch cao và cần ít liều tiêm lặp lại hơn so với vacxin bất hoạt để tạo ra khả năng miễn dịch bảo vệ. Tuy nhiên, độ an toàn của loại

vacxin sống nhược độc kém, rủi ro trong quá trình sử dụng, có khả năng chuyển ngược thành loại hoang dã có tính độc cao đã làm hạn chế khả năng ứng dụng của loại vacxin này [59]. Chìa khóa để phát triển vacxin là chọn được các chủng có độc lực thấp, hiệu giá cao và sinh miễn dịch cao. Tuy nhiên, việc phân lập các chủng PEDV trong *in vitro* là rất khó khăn, đặc biệt là đối với các biến chủng đại dịch và ngay cả khi các chủng được phân lập thành công và khả năng gây đáp ứng miễn dịch của chúng có thể không cao.

Trước năm 2013, PEDV chỉ có mặt ở Châu Âu và Châu Á. Ở Châu Âu, PED ít gây dịch và ảnh hưởng ít đến kinh tế hơn, do đó, không có vacxin đã được phát triển và sử dụng. Ngược lại, PEDV đã lưu hành ở Châu Á trong vài thập kỷ và dẫn đến ảnh hưởng nghiêm trọng đến nền kinh tế, đặc biệt tại Trung Quốc, Nhật Bản và miền Nam Hàn Quốc. Ngoài ra, PEDV đã gây ảnh hưởng kinh tế đáng kể ở Mỹ, do vậy các nghiên cứu phát triển vacxin PEDV chủ yếu được tiến hành ở Châu Á và Châu Mỹ.

1.3.1. Vacxin bất hoạt và vacxin nhược độc

Ngay từ năm 1993, vacxin bất hoạt PEDV được sản xuất từ tế bào có hiệu quả bảo vệ lợn trong thời gian 6 tháng [60]. Năm 1994, chủng PEDV CV777 giảm độc lực nuôi cấy trên tế bào sau 28 lần cấy truyền, bảo vệ hơn 80% số lợn con sau khi tiêm tại vị trí giữa hậu môn và gốc đuôi của lợn [61]. Tương tự, vacxin PEDV có thể kích thích tạo ra miễn dịch bảo hộ 90% sau 90 đời cấy truyền trong ống nghiệm [62]. Năm 1995, Trung Quốc đã sản xuất vacxin nhị giá TGEV-PEDV [61] để kiểm soát dịch bệnh tiêu chảy trên lợn. Ở Trung Quốc, ba loại vacxin dựa trên chủng PEDV CV777 bất hoạt và nhược độc nhị giá và tam giá đã được lần lượt cấp phép vào năm 1999, 2003 và 2014. Tuy nhiên, vì vacxin bất hoạt không thể nhân lên trong vật chủ, nên yêu cầu nhiều lần tiêm chủng và liều lượng cao để kích thích đáp ứng miễn dịch. Vào tháng 3 năm 2015, vacxin sống giảm độc lực phòng 3 loại virus (PEDV, TGEV và Rotavirus) đã được phê duyệt ở Trung Quốc. Vacxin nhị giá giảm độc lực dựa trên chủng ZJ08 thuộc genotype 2a đã được Bộ Nông nghiệp Trung Quốc cấp phép vào năm 2015. Vacxin bất hoạt dựa trên chủng AJ1102 thuộc genotype 2b do công ty Wuhan Keqian phát triển đã được phê duyệt cho lâm sàng thử nghiệm năm 2014. Ở Nhật bản, vacxin bất hoạt sử dụng chủng thích ứng trên tế bào 83P-5 có tên P-5V cũng đã được đăng ký thử nghiệm trên lợn nái từ năm 1997 [9] và sau đó chủng 83P-5 được cấy chuyền 100 đời đã được cấp phép sử dụng dưới dạng vacxin nhược độc đơn giá và nhị giá của công ty Nisseiken Co., Ltd., Tokyo, Nhật Bản [63].

Vacxin nhược độc từ chủng DR13 giảm độc lực thích ứng trên tế bào (100 đời) đã được cấp giấy phép và đưa vào sử dụng tại Hàn Quốc và Philippines lần lượt vào 2004 và 2011 [9]. Chủng SM98-1 đã được sử dụng như là một vacxin nhược độc hoặc vacxin bất hoạt sử dụng qua đường tiêm bắp. Vacxin kết hợp, vacxin sống, vacxin bất hoạt từ chủng SM98P được phát triển bởi công ty Komipharm International Co., Ltd. Kyonggi-Do, Hàn Quốc. Trong năm 2016, các nhà nghiên cứu đã sản xuất vacxin PEDV bất hoạt bằng cách sử dụng chủng gây dịch PEDV KNU-141112 của Hàn Quốc. Sáu và ba tuần trước khi đẻ, lợn nái chửa đã được tiêm bắp với vacxin bất hoạt đơn giá kèm bổ trợ. Tỷ lệ sống của lợn con được tiêm phòng có thể đạt khoảng 92% sau khi công cường độc và mức độ nghiêm trọng của tiêu chảy bao gồm cả sự bài thải virus trong phân giảm đáng kể [64]. Chủng virus gây dịch có tính độc cao đã được nuôi cấy trên các dòng Vero lên đến 120 đời (P120) và P120 có hiệu giá virus cao hơn và tính thích nghi trên dòng tế bào tốt hơn với các bệnh tích tế bào rõ ràng hơn. Ngoài ra, P120 cho thấy giảm đáng kể các triệu chứng lâm sàng với tỷ lệ sống 100% ở lợn con khi sử dụng [65].

Danh sách các loại vacxin phòng PEDV đã được thương mại hóa và cấp phép có điều kiện được liệt kê ở Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Các loại vacxin phòng PEDV đã được thương mại hóa và cấp phép có điều kiện [66]

Năm	**Loại**	**Công ty/Viện, Quốc gia**	**Chủng vacxin**	**Genotype**	**Đường tiêm**
Đã cấp giấy phép					
1999	Vacxin chết, nhị giá PEDV và TGEV (P-T)	Viện nghiên cứu thú y Harbin, Trung Quốc	CV777	1a	Vị trí giữa hậu môn và gốc đuôi của lợn
2003	Vacxin sống, nhị giá PEDV và TGEV (P-T)	Viện nghiên cứu thú y Harbin, Trung Quốc	CV777, nhược độc	1a	Vị trí giữa hậu môn và gốc đuôi của lợn
2004, 2011	Vacxin sống	Hàn Quốc, Philipin	DR13, nhược độc	1a	Đường uống
-	Vacxin chết , SuiShot® PT-100	Viện Hàn lâm Khoa học Nông nghiệp Trung Quốc	-	-	Tiêm bắp
-	Vacxin chết, PRO-VAC® PED-Fc	Komipharm, Hàn Quốc	-	-	Tiêm bắp
-	Vacxin sống,	Komipharm, Hàn	SM98P	1a	Tiêm bắp

	PRO-VAC ®PED	Quốc			
-	Vacxin sống, PRO-VAC ®TRP	Komipharm, Hàn Quốc	SM98P	1a	Tiêm bắp
-	Vacxin chết, PRO-VAC ®TP	Komipharm, Hàn Quốc	SM98P	1a	Tiêm bắp
-	Vacxin sống	Nisseiken, Nhật Bản	P-5V	1a	Tiêm bắp
-	Vacxin sống, nhị giá PEDV và TGEV	Nisseiken, Nhật Bản	P-5V	1a	Tiêm bắp
2014	Vacxin sống, tam giá PEDV, TGEV và Rotavirus	Viện nghiên cứu thú y Harbin, Trung Quốc	CV777, nhược độc	1a	Vị trí giữa hậu môn và gốc đuôi của lợn
2015	Vacxin sống, nhị giá PEDV và TGEV	Tập đoàn công nghệ DBN Bắc Kinh, Trung Quốc	ZJ08, nhược độc	2a	Tiêm bắp
Cấp phép có điều kiện					
2014	Vacxin ARN	Merck, Mỹ	-	-	Tiêm bắp
-	Vacxin chết	Zoetis, Mỹ	-	-	Tiêm bắp

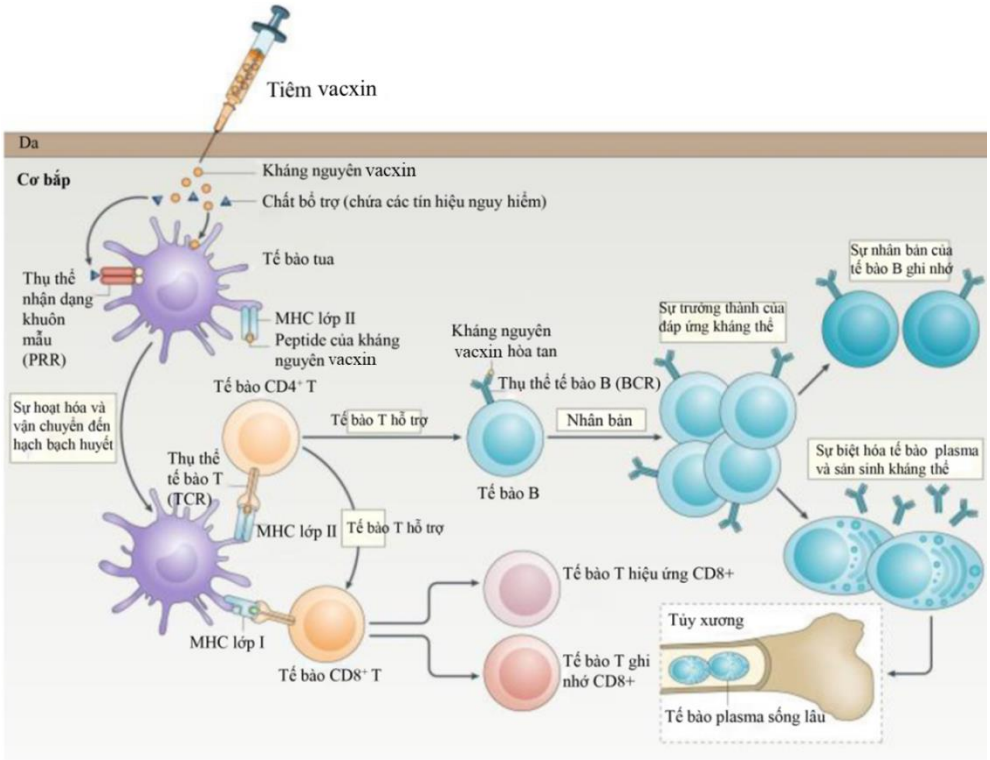
Các loại vacxin bất hoạt và vacxin nhược độc đã được chứng minh là có khả năng bảo hộ động vật dưới điều kiện thí nghiệm, nhưng hiệu quả của chúng trong thực nghiệm vẫn còn tranh cãi. Ở Hàn Quốc, chương trình tiêm chủng đa liều lượng (tiêm 3 hoặc 4 vacxin virus sống dưới cơ theo thứ tự sau: vacxin sống-bất hoạt-bất hoạt hoặc vacxin sống-vacxin sống-bất hoạt-bất hoạt) tại thời điểm khoảng 2 hoặc 3 tuần bắt đầu từ trước khi đẻ thường được áp dụng ở lợn nái chửa hoặc lợn nái hậu bị để giữ nồng độ kháng thể trung hòa ở mức cao trong sữa non và huyết thanh [49]. Cơ quan kiểm dịch động vật và thực vật Hàn Quốc đã nghiên cứu hiệu lực của các vacxin PED nội địa và vacxin PED thương mại nhập khẩu hiện có ở Hàn Quốc. Việc tiêm vacxin thương mại theo hướng dẫn sử dụng tương ứng (2 lần ở cả 3 tuần và 5 tuần trước khi lợn đẻ) đã tăng tỷ lệ sống sót của lợn con từ 18,2% lên hơn 80%. Tuy nhiên, tất cả các vacxin đều không làm giảm một cách đáng kể triệu chứng tiêu chảy khi virus vẫn được phát hiện trong phân lợn. Mặc dầu khả năng bảo vệ lợn chống lại các bệnh đường ruột chủ yếu phụ thuộc vào sự có mặt của các kháng thể IgA được tiết ra ở niêm mạc ruột, tuy vậy, hiệu quả của vacxin có mối liên hệ mật thiết với việc giữ đáp ứng kháng thể trung hòa PEDV ở mức cao ở trong sữa non và huyết thanh của lợn nái đã được tiêm phòng [49].

Mặc dù tính độc của PEDV đã bị suy giảm sau nhiều cấy truyền, nhưng chủng này có thể đã mất một phần hoặc toàn bộ tính sinh miễn dịch so với chủng ban đầu. Do đó, một số nhà nghiên cứu bắt đầu nghiên cứu chỉnh sửa các chủng PEDV làm giảm độc lực của virus nhưng giữ tính sinh miễn dịch cao bằng công nghệ di truyền ngược để phát triển vacxin nhược độc hiệu quả [37]. Các nhà khoa học đã chỉnh sửa một số gen như H226A của nsp15 [67], KDKE/AAAA của nsp16 [68], F44A của nsp1, H226A và H241A của nsp15, D129A của nsp16 [69], protein S [68], ORF3 [70].

Ngoài các loại vacxin như bất hoạt, vacxin nhược độc được tạo thành qua việc cấy truyền và vacxin nhược được phát triển dựa trên công nghệ di truyền ngược thì các chiến lược phát triển vacxin phòng PEDV thế hệ mới khác cũng đã được các nhà khoa học nghiên cứu.

1.3.2. Vacxin tiểu đơn vị

So với vacxin toàn bộ virus, vacxin tiểu đơn vị có nhiều lợi thế như không chứa axit nucleic virus lây nhiễm nên có tính an toàn cao và chỉ sử dụng kháng nguyên đồng nhất có tính chất được xác định rõ. Để tăng cường tính sinh miễn dịch của kháng nguyên, chất bổ trợ hoặc các chất dung hợp thường được bổ sung kèm với kháng nguyên. Quá trình tạo đáp ứng miễn dịch sau khi tiêm vacxin tiểu đơn vị được trình bày ở Hình 1.6.



Hình 1.6. Tạo đáp ứng miễn dịch khi tiêm vacxin tiểu đơn vị [71]

Khi vacxin được tiêm vào cơ bắp, kháng nguyên protein được xử lý bởi các tế bào tua. Các tế bào tua được kích hoạt thông qua các thụ thể nhận dạng khuôn mẫu (Pattern recognition receptors, PRR) bằng các tín hiệu nguy hiểm trong chất bổ trợ, sau đó chúng được vận chuyển đến các hạch bạch huyết dẫn lưu. Tại đây, các peptit của kháng nguyên vacxin được trình diện bởi các phân tử MHC trên tế bào tua. Điều này giúp hoạt hóa các tế bào T thông qua thụ thể tế bào T (TCR) của chúng. Kết hợp với tín hiệu (bởi kháng nguyên hòa tan) thông qua thụ thể tế bào B (BCR), các tế bào T kích thích các tế bào B phát triển ở hạch bạch huyết. Sự phát triển của tế bào B phụ thuộc vào tế bào T dẫn đến sự trưởng thành của đáp ứng kháng thể làm tăng ái lực của kháng thể và kích thích sinh các kiểu các kháng thể khác nhau. Sự sinh các tế bào plasma có thời gian sống ngắn, tích cực tiết ra các kháng thể đặc hiệu với các kháng nguyên vacxin, làm tăng nồng độ kháng thể trong huyết thanh trong 2 tuần tiếp theo. Các tế bào B ghi nhớ cũng được sản sinh, làm trung gian cho đáp ứng miễn dịch. Các tế bào plasma tồn tại lâu dài có thể tiếp tục tạo ra các kháng thể trong xương hốc tuỷ. Các tế bào T ghi nhớ CD8+ có thể nhân lên nhanh chóng khi chúng gặp tác nhân gây bệnh và các tế bào T tác động CD8+ rất quan trọng để loại bỏ các tế bào bị nhiễm bệnh [71].

Việc thiết lập một hệ thống sản xuất vacxin tiểu đơn vị để phản ứng nhanh với tình huống có thể xảy ra dịch bệnh là điều vô cùng cấp bách. Protein S của PEDV được xem là mục tiêu chính để phát triển vacxin tiểu đơn vị. Trong nhiều năm gần đây, một phần của protein S của PEDV bao gồm COE, S1 hoặc toàn bộ protein S đã được tạo ra trong *E. coli*, *Bacillus subtilis*, Baculovirus, Adenovirus, *Lactobacillus* và thực vật. Chuột hoặc lợn được gây đáp ứng miễn dịch với các loại vacxin này qua đường uống, tiêm bắp, tiêm dưới da hoặc tiêm dưới màng bụng đã kích thích sản sinh kháng thể IgG và IgA với nồng độ cao. Mặc dù một số thụ thể trên protein M và N đã được báo cáo nhưng chưa có nghiên cứu phát triển vacxin tiểu đơn vị nào dựa vào các kháng nguyên trên [72]. Ngoài ra, chưa có nghiên cứu nào về việc sử dụng các protein không cấu trúc của PEDV nhằm phát triển vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV. Các nghiên cứu phát triển vacxin tiểu đơn vị dựa vào protein S được liệt kê ở Bảng 1.3. Mặc dầu cho đến nay, đã có nhiều nghiên cứu phát triển vacxin tiểu đơn vị dựa vào protein S trên thế giới, chưa có vacxin tiểu đơn vị nào được cấp phép và thương mại hóa.

Bảng 1.3. Các nghiên cứu về vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV [37]

Hệ thống/chủng PEDV	**Protein mục tiêu**	**Tài liệu tham khảo**
Adenovirus	S	[73]
Baculovirus	S	[74]
Vesicular stomatitis virus	S	[75]
Lactococcus lactis (CH/JLDH/2016)	S1	[76]
Bacillus subtilis	COE	[77]
HEK 293T (PEDV-PT)	S	[78]
E. coli (PEDV BM1)	NTD 231–501aa	[79]
HEK 293T	S	[72]
Baculovirus (PEDV-PT)	S1 và S	[80]
E. coli (PEDV GDS01)	rSF, COE , COE/rSF	[81]
Orf virus (PEDV CO13)	S	[82]
Lactococcus lactis	COE-DCpep	[83]
E. coli (PEDV GDS01)	COE, rSF-COE-3D, rSF-COE-N, rSF-COE-C	[84]
E. coli	S1 (744YSNIGVCK752), S2 (756SQYGQVKI771), S3 1371GPRLQPY137, M (195WAFYVR200, S1/S2/S3/M	[85]
Lactococcus lactis	COE	[86]
Swinepox virus (SQ2014)	S (386-815aa)	[87]
293T PEDV MN	S (21-737aa)	[88]
Nấm men (PEDV CV777)	S1	[89]
ORF virus	S	[90]
HEK 293T (USA/Colorado/2013)	S1	[91]

1.3.3. Vacxin axit nucleic

Mặc dù thời gian phát triển vacxin bất hoạt là ngắn nhưng vacxin bất hoạt có tính sinh miễn dịch kém. Vacxin nhược độc có tính sinh miễn dịch tốt, nhưng kém an toàn và thời gian phát triển dài. Do sự biến đổi liên tục trong bộ gen PEDV, việc

phát triển vacxin có hiệu quả cao trong thời gian ngắn là điều rất có ý nghĩa. Do đó, các loại vacxin axit nucleic bao gồm vacxin ADN và vacxin mARN được phát triển. Những lợi thế các loại vacxin này bao gồm độ an toàn cao, thời gian phát triển ngắn. Một loại vacxin ADN nhị giá/tam giá được sản xuất bằng cách kết hợp PEDV với TGEV và/hoặc Rotavirus đã được phát triển nhưng chưa được thử nghiệm lâm sàng, có thể do tính sinh miễn dịch kém [92]. Mặc dù hiệu lực của vacxin ADN đã được nâng cao bằng cách tối ưu hóa các codon, lựa chọn các trình tự promoter thích hợp, tối ưu hóa vector plasmid và bổ sung các phân tử chất bổ trợ, vẫn cần một số bước đột phá để tạo ra vacxin ADN có hiệu quả trong ngăn ngừa bệnh [93].

Kể từ tháng 4/2013, PEDV bùng phát đã gây tổn thất lớn cho ngành chăn nuôi lợn ở Mỹ. Để giải quyết nhu cầu khẩn cấp, công ty của Harrisvacxins ở Mỹ đã ứng dụng công nghệ SirraVaxSM nhằm sản xuất vacxin mARN PEDV dựa trên vector alphavirus mang gen S của PEDV và một vacxin chết (Zoetis, Florham Park, NJ, Mỹ). Vacxin này đã được Bộ Nông nghiệp Mỹ cấp giấy phép có điều kiện năm 2014. So với vacxin ADN, vacxin mARN có hiệu lực miễn dịch cao hơn nhưng kém ổn định trong điều kiện *in vivo* [94]. ARN tự khuếch đại (Self-amplifying RNA, saRNA) mã hóa replicase alphaviral và một gen của virus cho phép sự sao chép của ARN trong tế bào chất [95]. Do đó, ứng dụng vacxin sa-RNA và các vector vận chuyển tương ứng có thể mang lại nhiều ưu điểm trong quá trình phát triển các vacxin mARN phòng PEDV hoặc các coronavirus.

1.3.4. Các vấn đề tồn tại trong phát triển vacxin phòng PEDV

Mặc dầu vacxin dựa trên chủng PEDV G1a cổ điển đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát các ca nhiễm PEDV tuy nhiên hiệu quả của chúng trên thực địa, đặc biệt là trong các đợt bùng phát bởi các biến thể mới sau năm 2010, vẫn đang được tranh luận [96]. Ngày nay, nhiều nhà khoa học đã nghiên cứu nhằm sản xuất thêm vacxin hiệu quả phòng chủng PEDV gây dịch thực địa. Ở đây, việc lựa chọn chủng loại vacxin và đường tiêm chủng cũng đang là vấn đề được quan tâm trong phát triển vacxin PEDV hiện nay.

Một chủng ứng viên lý tưởng cho phát triển vacxin phòng PEDV là chủng có khả năng bảo hộ lợn chống lại các chủng PEDV khác nhau trên thực địa. Cho đến nay, có rất ít nghiên cứu thử nghiệm về khả năng bảo hộ chéo giữa các chủng PEDV của các kiểu gen khác nhau. Goede và cộng sự đã chứng minh tỷ lệ nhiễm bệnh và tử vong (đến 1 tuần tuổi) ở lợn con 3 ngày tuổi được sinh ra từ lợn nái tiếp xúc 7 tháng trước với một chủng PEDV độc lực thấp (OH851, kiểu gen 1b) sau khi công cường độc với chủng Mỹ có kiểu gen độc lực 2a là lần lượt là 43% và 0%, trong khi đó lợn con được sinh ra từ lợn nái trước đó đã không tiếp xúc thì tỷ lệ mắc

bệnh và tử vong lần lượt là 100% và 67% [97]. Kết quả nghiên cứu của Wang và cộng sự (2016) cho thấy cần sử dụng nhiều kháng thể đa dòng kháng S hơn cần thiết để trung hòa chéo các chủng PEDV có kiểu gen khác nhau trong phản ứng trung hòa huyết thanh trên tế bào Vero [72].

Hiện nay, các vacxin phòng PEDV có thể không ngăn ngừa được PEDV gây bệnh thực địa do virus thường xuyên biến đổi và vacxin không thể tạo ra đủ miễn dịch niêm mạc. Việc kiểm soát PEDV thường đòi hỏi các chiến lược tiêm phòng cho lợn mẹ để kích thích đáp ứng miễn dịch qua sữa nhằm bảo vệ thụ động lợn con [9]. Hiệu quả bảo vệ động vật trước các bệnh đường ruột chủ yếu phụ thuộc vào sự hiện diện của kháng thể IgA tiết ra trong niêm mạc ruột và vacxin đường uống có thể kích thích miễn dịch niêm mạc và tạo ra kháng thể bảo vệ niêm mạc và kháng thể IgA trong huyết thanh với hiệu giá kháng thể cao hơn so với các đường tiêm chủng khác như tiêm bắp. Song và cộng sự (2007) đã chứng minh lợn nái chửa được cho uống vacxin PEDV DR13 nhược độc đã làm giảm tỷ lệ chết của lợn sữa so với qua đường tiêm bắp và kích thích sinh mức kháng thể IgA cao hơn. Khi cho lợn nái chửa uống vacxin PEDV DR13 nhược độc, tỷ lệ chết của lợn sữa là 13% trong khi đó lợn nái chửa tiêm vacxin qua bắp, tỷ lệ chết của lợn sữa là 60% [98]. Tuy nhiên, cũng tồn tại một số thách thức trong quá trình phát triển vacxin PEDV qua đường uống/nhỏ mũi bao gồm tăng cường tính sinh miễn dịch của vacxin đường uống, cải thiện sự bất tiện khi đưa vacxin uống vào đàn lợn và lựa chọn chất bổ trợ hiệu quả [98].

Có nhiều nghiên cứu phát triển vacxin PEDV kích thích miễn dịch niêm mạc tốt. Thứ nhất, sử dụng chất mang phù hợp để phân phối vacxin bằng các đường niêm mạc. PEDV nhược độc được bao bọc trong nguyên liệu hydroxypropyl metyl cellulose phthalate (HPMCP) đã kích thích thành công cả miễn dịch niêm mạc và miễn dịch toàn thân sau khi đưa vacxin vào bằng đường uống ở lợn con cai sữa [99]. Các kháng nguyên vacxin chết PEDV (KAg) được bao bọc trong các hạt poly-lactic-co-glycolic-acid (PLGA) được nhỏ qua đường mũi cho lợn nái ở 28 và 14 ngày trước khi đẻ. Lợn nái chửa được chủng ngừa bằng PLGA-KAg có nồng độ kháng thể IgG và IgA trong huyết thanh cao nhất, nồng độ kháng thể IgA trong sữa non và đáp ứng miễn dịch trên tế bào tốt nhất [100]. Thứ hai, sử dụng vacxin tiêm bắp với chất bổ trợ thích hợp. Gần đây, các nhà nghiên cứu đã phát triển một loại vacxin bất hoạt có thể kích thích sản sinh kháng thể IgA và IgG đặc hiệu kháng nguyên S ở lợn 5 tuần tuổi chỉ bằng cách tiêm bắp kháng nguyên PEDV bất hoạt kết hợp với các protein gắn chemokine của lợn như CCL25, CCL27 và CCL28 [101].

1.4. Vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật

1.4.1. Hệ thống biểu hiện tạm thời trên thực vật

Hệ thống biểu hiện tạm thời thường được sử dụng để biểu hiện của các gen mã hóa protein vacxin trong mô tế bào thực vật. Vì gen biểu hiện tạm thời không được tích hợp vào nhiễm sắc thể, gen chuyển không bị ảnh hưởng bởi hiệu ứng vị trí. Ngoài ra, biểu hiện của gen chuyển ngoài nhiễm sắc thể có thể được phát hiện trong khoảng thời gian rất ngắn, khoảng 3 giờ sau khi chuyển gen và có thể kéo dài trong khoảng 10 ngày [102]. So với biểu hiện ổn định, biểu hiện tạm thời trên thực vật đang được quan tâm nhiều hơn do tính linh hoạt và tốc độ nhanh trong việc sản xuất số lượng lớn các protein dược phẩm sinh học tái tổ hợp, bao gồm thuốc thử chẩn đoán, ứng viên vacxin hoặc kháng thể đơn dòng để đáp ứng nhu cầu trong thời kỳ khủng hoảng dịch bệnh hoặc đại dịch [103].

Hệ thống biểu hiện tạm thời được sử dụng rộng rãi để tạo ra protein tái tổ hợp ở các loài thực vật khác nhau như *Lactuca sativa* [104], *Arabidopsis thaliana* [105], *Nicotiana tabacum* [106] và *Nicotiana benthamiana* [107]. Trong số đó *N. benthamiana* là loài thực vật được sử dụng phổ biến nhất cho biểu hiện tạm thời các protein tái tổ hợp. Thông thường, cây *N. benthamiana* 4–6 tuần tuổi trồng trên giá thể đất được sử dụng để biểu hiện tạm thời nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* tái tổ hợp chứa các vector chuyển gen hoặc vector virus [108]. *N. benthamiana* là cây chủ để biểu hiện tạm thời các loại protein tái tổ hợp ở nhiều công ty như Medicago Inc. (https:// www.medicago.com), Kentucky BioProcessing (https://kentuckybioprocessing.com), Icon Genetics (https://www.icongenetics.com), iBio (https://www.ibioinc.com/) và UniBio (https://unibio-jp.com/en/).

Trong gần ba thập kỷ, các hệ thống biểu hiện thực vật đã được khai thác để tạo ra rất nhiều loại protein tái tổ hợp/vacxin và các chất có hoạt tính sinh học [109]. Vacxin phòng bệnh Newcastle cho gia cầm là vacxin sản xuất từ thực vật đầu tiên trên thế giới đã được Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ cấp phép năm 2006 [110]. Ngoài ra, nhiều loại vacxin có nguồn gốc thực vật chống lại các dịch bệnh bao gồm bệnh cúm, Ebola, bệnh dại, bệnh viêm gan B, bệnh sốt rét do norovirus, bệnh than và bệnh do virus rota, đã bước vào các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng khác nhau [111]. Vacxin ‘4 bệnh’ được phát triển bởi công ty Medicago, Canada cho bệnh cúm theo mùa đã hoàn thành thử nghiệm lâm sàng giai đoạn 3; tính hiệu quả, an toàn và tính sinh miễn dịch trên người của loại vaccine này đã được chứng minh [112]. Gần đây, một loại vacxin phòng bệnh do virus corona 2019 gây ra (COVID-19) được sản xuất sử dụng phương pháp biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana* do Medicago phát triển đã được phê duyệt ở Canada (https://www.cbc.ca/news/health/medicago-s-homegrown-plant-based-covid-19-

vacxin-approved-by-health-canada-1.6362745). Đây là bước tiến quan trọng trong việc sản xuất vacxin có nguồn gốc từ thực vật, khẳng định tiềm năng to lớn trong việc phát triển một ngành công nghiệp sản xuất vacxin thực vật đầy triển vọng, kịp thời trong tương lai.

1.4.2. Vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật phòng PEDV trên thế giới

Cho tới nay, một số nghiên cứu phát triển vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV dựa trên hệ thống thực vật đã được công bố. Trong đó, đa số các nghiên cứu báo cáo về việc biểu hiện vùng COE của protein S. Toàn bộ protein S được báo cáo có mức độ biểu hiện thấp [18] hoặc không biểu hiện [19]. Protein COE hoặc S1 đã biểu hiện với mức độ, hàm lượng khác nhau ở các đối tượng thực vật được sử dụng trong nghiên cứu. Cây thuốc lá là đối tượng được sử dụng trong hầu hết các nghiên cứu sản xuất protein COE với mức độ biểu hiện cao (Bảng 1.4). Trong các nghiên cứu đó, protein COE đã được biểu hiện tạm thời hoặc biểu hiện ổn định trong thực vật.

Bảng 1.4. Các nghiên cứu phát triển vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật phòng PEDV [18]

Thực vật chủ	**Biểu hiện ổn định/ biểu hiện tạm thời**	**Kháng nguyên**	**Mức độ tích lũy**	**Promoter và/hoặc yếu tố tăng cường**	**Tài liệu tham khảo**
Thuốc lá	Chuyển gen	COE	10 mg/kg protein trên trọng lượng tươi	2x35S, TOL	[12]
Thuốc lá	Biểu hiện tạm thời	COE	5% TSP	TMV ARN	[113]
Thuốc lá không chứa nicotine	Chuyển gen	COE	2,1% TSP	2x35S, TOL	[13]
Thuốc lá	Chuyển gen	COE	0,1% TSP	2x35S, TOL	[114]
Khoai tây	Chuyển gen	COE	0,1% TSP	2x35S, TOL	[115]
Bèo tấm	Chuyển gen	COE	Không báo cáo	35S	[116]
Khoai lang	Chuyển gen	COE	Không báo cáo	35S	[117]
Hạt ngô	Chuyển gen	COE	0,122% TSP	2x35S, intron Hsp70 ở ngô	[118]
Cà rốt	Chuyển gen	COE	Không báo cáo	2x35S, TOL	[119]
Thuốc lá	Chuyển gen	COE-LTB	1,6% TSP	Vùng gen khởi động Ubiquitin	[120]
Rau diếp	Chuyển gen	COE-CTB	0,0065%	Vùng gen khởi	[121]

			TSP	động Ubiquitin	
Rau diếp	Chuyển gen	COE-LTB	0,048% TSP	Vùng gen khởi động Ubiquitin	[122]
Nội nhũ lúa	Chuyển gen	COE-LTB	1,3% TSP	HMW-Bx17-p, Act1-I	[123]
Calli lúa	Chuyển gen	COE-Co1	0,083% TSP	RAmy3D	[11]
Ngô	Chuyển gen	S1-LTB, S1-dendritic cell binding peptide (DCpep)	20 mg/kg	Vùng gen khởi động có nguồn gốc từ gen globulin-1 ngô (pr25 hoặc pr44)	[124]
Thuốc lá	Biểu hiện tạm thời	M-ELP, N-ELP, E-ELP, S-ELP	M-ELP, N-ELP, E-ELP có biểu hiện; S-ELP không biểu hiện	2x35S	[19]
Thuốc lá	Biểu hiện tạm thời	Polymer IgG-Fc	0,74% TSP	MagnIcon®, pICH31070	[125]
Thuốc lá	Biểu hiện tạm thời	VLP (S+M+E)	Mức độ biểu hiện thấp	Không báo cáo	[18]

TSP: protein tan tổng số

Khả năng sinh miễn dịch của protein COE được sản xuất từ thực vật cũng đã được thể hiện trong một số công bố. COE-LTB được tạo ra trong lá thuốc lá có thể liên kết với thụ thể màng ruột GM1-ganglioside [120]. Chuột được cho ăn protein COE-S dung hợp phối tử nhắm tế bào M (Co1) biểu hiện trong cây lúa đã kích thích sinh kháng thể IgG và IgA trong tế bào bạch cầu lần lượt tăng gấp ba lần và gấp tám lần so với chuột không được gây đáp ứng miễn dịch [11].

Trong một nghiên cứu khác, chuột được cho ăn lá thuốc lá chuyển gen đông khô có chứa COE đã tạo ra đáp ứng miễn dịch, ức chế PEDV tới 49,7% so với nhóm đối chứng [12]. Trong một nghiên cứu gần đây, lợn được cho uống protein S1-LTB hoặc S1-Dcpep, được biểu hiện trong ngô chuyển gen, đã kích thích sinh kháng thể trung hòa [124].

Ngoài ra, protein COE dung hợp với polymer immunoglobulin G (PIGS) đã được sản xuất trong cây thuốc lá cải tiến glycosyl hóa. Hoạt tính sinh học của COE-PIGS được chứng minh bằng cách liên kết với thành phần C1q của hệ thống bổ thể, cũng như bề mặt của tế bào trình diện kháng nguyên (APC) trong *in vitro*. Chuột

được tiêm hoặc cho ăn protein COE-PIGS đã có các đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào đặc hiệu cho PEDV [125]. Tuy nhiên, hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV không được báo cáo trong nghiên cứu trên.

Ngoài protein S, sự biểu hiện tạm thời của protein M dung hợp với elastin polypeptide (M-ELP) hoặc đồng biểu hiện protein S với các protein M-ELP, N-ELP và E-ELP trong *N. benthamiana* hình thành dạng hạt giả virus (Virus Like Particle, VLP) cũng đã được báo cáo [19]. Thêm vào đó, sự hình thành VLP cũng đã được báo cáo khi đồng biểu hiện protein E, M và S của PEDV trong cây thuốc lá *N. benthamiana*. Tuy nhiên các dạng VLP có mức độ biểu hiện thấp, gây khó khăn cho quá trình tinh sạch, định lượng và xác định đặc tính sau này [18].

Cho đến nay, chưa có vacxin phòng PEDV sản xuất từ thực vật được thương mại hóa. Đồng thời, việc biểu hiện vùng COE, COE-S1D hoặc S2 dung hợp motif GCN4pII hoặc GCN4pII-tp trên hệ thống thực vật cũng như chứng minh được tính sinh miễn dịch của protein ở dạng cấu trúc này chưa được công bố ở trong và ngoài nước.

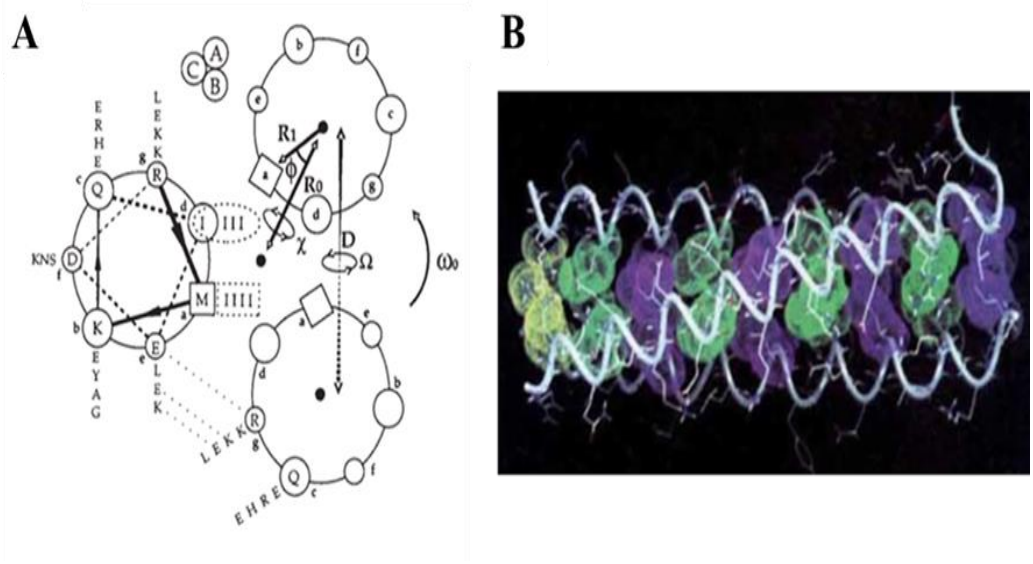
1.4.3. Motif GCN4-pII và motif tp của IgM

1.4.3.1. Motif GCN4-pII

GCN4 là một yếu tố phiên mã chịu trách nhiệm điều hòa sinh tổng hợp aa trong nấm men [126]. GCN4 là một dimer và quá trình dimer hóa được thực hiện qua trung gian là một tiểu phần ngắn tại đầu C, được gọi là dây kéo leucine [127], tạo thành một chuỗi aa rất ổn định. Dạng oligomer của chuỗi aa dây kéo leucine này có thể là thay đổi theo những cách xác định bằng cách biến đổi phần còn lại của lõi kỵ nước của nó [128]. Về bản chất, phần phân nhánh beta trong *a* (Ile, Val) và phần phân nhánh gamma trong *d* (Leu) tạo thành các dimer, sự đảo ngược của các chuỗi bên tại các vị trí này tạo thành các tetramer, một lõi được hình thành hoàn toàn từ các nhánh beta tạo thành các trimer. GCN4 nguyên bản và đột biến đã được dung hợp với các protein để tạo thành các protein dạng khảm dưới dạng protein liên kết ADN dạng dimer [129], các protein vỏ virus dạng dimer [130] và trimer [131]. Biểu hiện của các tiểu phần riêng lẻ từ các protein này nói chung không mang lại vật liệu hữu ích cho các nghiên cứu cấu trúc, vì các protein thường không tan, gấp lại không hiệu quả hoặc hình thành hỗn hợp của các oligomer khác nhau. Những vấn đề này đã được khắc phục khi dung hợp protein với motif GCN4-pII [132] với đầu N hoặc đầu C của protein.

GCN4-pII là motif được thiết kế nhân tạo và được tạo ra bởi một lõi được hình thành hoàn toàn từ các gốc phân nhánh beta. GCN4-pII đã được sử dụng để

dung hợp vào các protein như Hemagglutinin (HA) của virus A/H5N1, virus A/H7N9 [133, 134], HA của virus A/H10N8 [135] và protein S của PEDV [43]. Trong đó, GCN4-pII được sử dụng để kích hoạt quá trình trimer hóa các protein quan tâm đồng thời tăng tính ổn định, độ hòa tan của protein và có thể tăng gấp ba lần kích thước protein mục tiêu. Cấu trúc tinh thể của motif GCN4-pII được trình bày ở Hình 1.7.



Hình 1.7. Cấu trúc tinh thể của GCN4-pII

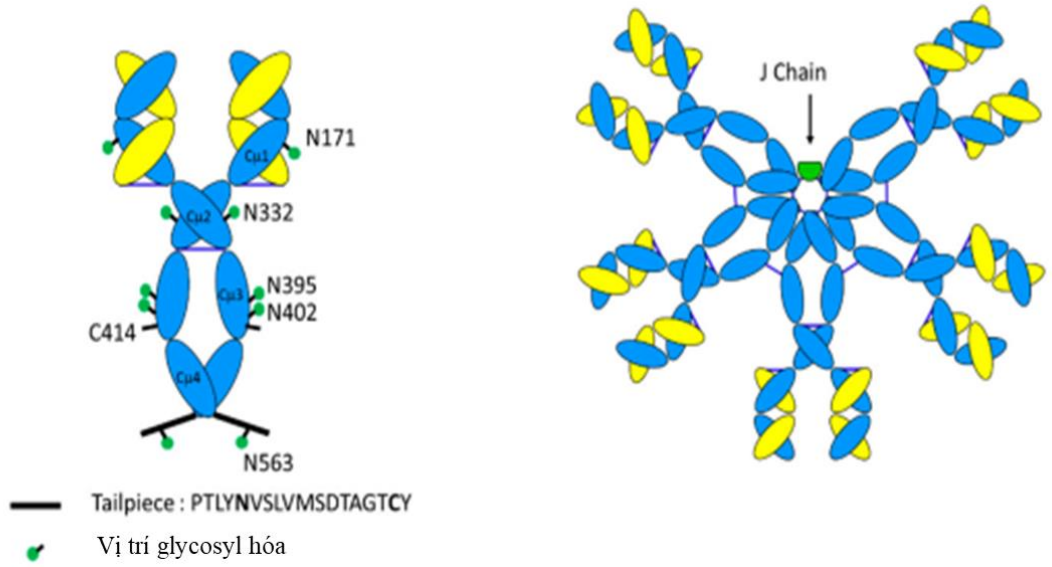
A. Cấu trúc xoắn từ aa 1 (Arg) đến aa 32 (Glu) của trình tự GCN4-pII. B. Hình bên của cấu trúc trimer [132]

1.4.3.2. Motif tp của IgM

IgM là một globulin miễn dịch đầu tiên được sản xuất dưới dạng phân tử liên kết bề mặt trong quá trình biệt hóa tế bào lympho B sớm. Sau đó trong phản ứng miễn dịch, IgM được được sản xuất bởi các tế bào plasma biệt hóa từ tế bào lympho B tiếp nhận kháng nguyên và được tiết ra dưới dạng pentamer hòa tan có chứa 10 vị trí liên kết kháng nguyên và chuỗi nối (J), hoặc dưới dạng hexamer chứa 12 vị trí liên kết kháng nguyên và không có chuỗi nối (chuỗi J). Do tính chất đa hóa trị của IgM, chúng có ái lực tương tác với kháng nguyên tốt hơn so với IgG. Ngoài việc vô hiệu hóa mầm bệnh, các kháng thể IgM có hiệu quả cao trong việc thu hút bổ thể để ly giải tế bào và tác nhân gây bệnh.

Các kháng thể IgM thường được tìm thấy ở dạng pentamer hoặc hexamer. Sơ đồ cấu trúc của IgM dạng monomer và dạng pentamer [136] được thể hiện ở Hình 1.8. Mỗi monomer của IgM xấp xỉ 190 kDa, bao gồm một chuỗi nặng μ với năm miền (Vμ, Cμ1, Cμ2, Cμ3, và Cμ4) và một chuỗi nhẹ có hai vùng chức năng (Vκ-Cκ hoặc Vλ-Cλ) [137]. IgM dạng monomer có cấu trúc tương đồng nhiều hơn với IgE so với các kháng thể khác. Các vùng cố định của chuỗi nặng, CH1, CH2 và

CH3 của IgG tương ứng với Cμ1, Cμ3, và Cμ4 của IgM. Ngược lại, vùng bản lề của IgG tương ứng với Cμ2 của IgM, là một miền cố định bổ sung cũng được tìm thấy trong các isotype khác (IgE của động vật có vú và IgY của gia cầm). Vùng này hoạt động giống như vùng bản lề của IgG và cung cấp tính linh hoạt cần thiết để cho phép IgM liên kết nhiều bản sao của kháng nguyên trên bề mặt tế bào. Các chuỗi nặng trong mỗi monomer liên kết cộng hóa trị với nhau bằng liên kết disulfua ở Cys 337 [138]. Dạng polymer IgM có các cysteine C337, C414, C575 hình thành các cầu nối disulfide bên trong chuỗi.



Hình 1.8. Sơ đồ cấu trúc của IgM dạng monomer (bên trái) và dạng pentamer (bên phải)

IgM monomer được phân biệt với IgG bằng các vị trí glycosyl hóa rộng rãi của chúng ở gốc asparagine, sự hiện diện của vùng bổ sung Cμ2 ở vị trí bản lề và sự hiện diện của trình tự peptit ngắn tp là quan trọng đốivới quá trình polyme hóa. IgM dạng pentamer có thêm 137 axit amin của chuỗi J [136].

Tp là một trình tự peptit ngắn gồm 18 aa (PTLYNVSLVMSDTAGTCY) tại đầu C của IgM [139]. Các monome IgM được liên kết cộng hóa trị bởi các liên kết disulfit giữa cysteine của tp. Các peptide của tp rất quan trọng cho quá trình polymer hóa của IgM [140] bao gồm cầu disulfit bên trong phân tử liên quan đến Cys575, axit amin gần cuối trong đuôi tp [141]. Sự hình thành dạng pentamer/hexamer được kiểm soát bởi cơ chế thông qua Cys575. Tp có thể kích hoạt quá trình polymer hóa khi dung hợp đầu C của các kháng thể khác như IgG. Ngoài ra, các liên kết disulfua trong các monome giữa các gốc Cys 414 trong Cμ3 giữ vai trò trung tâm của IgM trong một cấu trúc giống như dạng vòng được xác định rõ.

1.4.4. Vacxin tiểu đơn vị có nguồn gốc từ thực vật phòng các bệnh động vật tại Việt Nam

Nắm được nhiều ưu điểm vượt trội của việc sản xuất vacxin từ thực vật sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời, các nhà khoa học trong nước cũng đã bắt tay vào nhiều dự án nghiên cứu ứng viên vacxin phòng các bệnh động vật trên hệ thống thực vật. Những nghiên cứu đầu tiên về phát triển vacxin từ thực vật được triển khai tại nhóm nghiên cứu của Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Nhận được sự chuyển giao từ Viện nghiên cứu di truyền thực vật và cây trồng (IPK), CHLB Đức về công nghệ sản xuất protein từ cây trồng, nhóm nghiên cứu tại Viện Công nghệ sinh học đã thành công trong nghiên cứu và sản xuất nhiều kháng nguyên protein của các loại virus khác nhau như cúm gia cầm A/H5N1, virus gây bệnh tai xanh (PRRSV), cúm người A/H7N9 trên cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện tạm thời và chứng minh được hoạt tính gây đáp ứng miễn dịch tiềm năng của các loại kháng nguyên này trên động vật chủ [142-146]. Các kháng nguyên HA từ virus cúm A/H5N1 và A/H7N9 đã được sản xuất thành công trong thực vật khi dung hợp với các motif GCN4pII và GCN4pII-tp [143-146]. Gà con được tiêm dịch chiết thực vật chứa protein H5 dung hợp motif GCN4pII-tp tái tổ hợp đã tạo ra kháng thể trung hòa virus cúm A/H5N1 và được bảo hộ với tỷ lệ 92% khỏi sự xâm nhiễm của virus cúm A/H5N1 [145]. Đây sẽ là những tiền đề quan trọng cho việc nghiên cứu phát triển vacxin phòng PEDV từ thực vật.

Tính đến nay, hầu hết các vacxin phòng PEDV được sử dụng ở Việt Nam là vacxin ngoại nhập hoặc sử dụng các chủng nhập khẩu thuộc nhóm G1a cổ điển để sản xuất vacxin ví dụ vacxin chủng nhược độc DR13, Hàn Quốc; vacxin nhập khẩu nhị giá PRO-VAC®PT hoặc Bayovac® SuiShot® PT-100 chứa chủng PEDV dòng SM98P và TGEV dòng 175L vô hoạt của công ty Komipharm, Hàn Quốc; vacxin AVAC/VR/PED.SM 98 dạng nhược độc do công ty MTV sản xuất. Do đó, để đảm bảo an toàn cho ngành chăn nuôi lợn khỏi các dịch PED ở Việt Nam trong thời gian tới, nhu cầu cấp bách đặt ra là phải nghiên cứu phát triển nhanh chóng vacxin phòng các PEDV đang gây bệnh trong nước. Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về phát triển vacxin phòng PEDV dựa trên hệ thống thực vật được báo cáo. Các nghiên cứu về PEDV cho đến nay chủ yếu liên quan đến đặc điểm dịch tễ học phân tử, nguồn gốc phả hệ, giải trình tự hệ gen và phân lập của PEDV. Một số chủng PEDV tại Việt Nam đã được phân lập từ các mẫu bệnh phẩm và được nuôi cấy thành công trên tế bào Vero trong các môi trường thích hợp, thể hiện ở hiệu giá virus đạt 107,3 TCID50/mL sau 4 đời cấy chuyển [147]. Kết quả này là tiền đề tốt cho các nghiên cứu về sản xuất vacxin trong phòng bệnh PED ở lợn.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.1.1. Chủng vi sinh vật, tế bào và plasmid

Danh sách các chủng vi sinh vật, tế bào và plasmid sử dụng trong luận án được trình bày ở Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Danh sách các chủng vi sinh vật, tế bào và plasmid

Loại vật liệu	Tên chủng, tế bào, plasmid	Mục đích sử dụng	Nguồn gốc, xuất xứ
Chủng vi sinh vật	Chủng *E. coli* G10	Nhân dòng và thiết kế vector chuyển gen	GS. TS. Udo Conrad và TS. Phan Trọng Hoàng, Viện di truyền thực vật và nghiên cứu cây trồng Leibniz, CHLB Đức
	Agrobacterium tumefaciens AGL1	Chứa vector chuyển gen thực vật phục vụ thí nghiệm biểu hiện tạm thời	
	Chủng *A. tumefaciens* AGL1 mang vector pMON65305/Hc-Pro	Đồng biểu hiện trong thí nghiệm biểu hiện tạm thời với vector đích tái tổ hợp	Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học [148]
	Chủng PEDV DR13	Sử dụng trong thí nghiệm ELISA, trung hòa virus trên tế bào vero	Bệnh viện thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
	Chủng PEDV SM98	Sử dụng trong thí nghiệm ELISA, trung hòa virus trên tế bào vero	Công ty cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC
	Chủng NAVET/PEDV/PS6 /2010 độc lực cao	Sử dụng trong thí nghiệm trung hòa virus trên tế bào vero, công cường độc trên lợn con	Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương NAVETCO
Tế bào	Tế bào vero	Nhân nuôi virus	Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương NAVETCO và Công ty cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC

Plasmid	pRTRA-35S-H5-GCN4pII-His-cmyc-KDEL (viết tắt là pRTRA-H5-pII)	Sử dụng làm vector tách dòng	GS. TS. Udo Conrad và TS. Phan Trọng Hoàng, Viện di truyền thực vật và nghiên cứu cây trồng Leibniz, CHLB Đức
	pRTRA-35S-His-H5-GCN4pII-tp-cmyc-KDEL (viết tắt là pRTRA-H5-pII-tp)		
	pCB301-35S-H5-GCN4pII-His-cmyc-KDEL (viết tắt là pCB301-H5-pII)	Sử dụng làm vector chuyển gen	

2.1.2. Mồi

Danh sách các mồi được thiết kế và sử dụng trong luận án được trình bày ở Bảng 2.2.

Bảng 2.2. Danh sách các mồi được sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Mục đích
1	S-F	ATGAAGTCTTTAACCTACTTCTGGTTGTTC	Khuếch đại gen S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010
2	S-R	TCACTGCACGTGGACCTTTTC	
3	1-F	ATGAAGTCTTTAACCTACTTCTGG	Giải trình tự gen S của chủng NAVET /PEDV/PS6 /2010
4	1-R	GTGGAGGTTGTGCTATGCA	
5	2-F	ACAGTGGAGGTTGTGCTAT	
6	2-R	TCATGGCACTGACGGTGACG	
7	3-F	TCATGGCACTGACGGTGACG	
8	3-R	GTGAGTTGATTCTTGGCACGC	
9	4-F	GTGAGTTGATTCTTGGCACGC	
10	4-R	ACTCACCCAGTACACTGCAG	
11	5-F	ACTCACCCAGTACACTGCAG	
12	5-R	CCTGCTAGCCTGAACCTCAG	
13	6-F	CTGAGGTTCAGGCTAGCAGG	
14	6-R	GAGCCACTCAAGGTCAACTA	
15	7-F	TAGTTGACCTTGAGTGGCTC	
16	7-R	TGAAAAGGTCCACGTGCAGTGA	
17	*Bam*HI-COE/G1a-F	agggatccGTGACTTTGCCTAG	Khuếch đại gen mã hóa kháng nguyên

18	*Psp*OMI-COE/G1a-R	gcgcgggcccAACGTCCGTGACACCTT	COE/G1a sau khi tổng hợp nhân tạo
19	*Bam*HI-COE/G2a-F1	agggatccGTGACTCTGCC	Khuếch đại gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a sau khi tổng hợp nhân tạo
20	*Psp*OMI-COE/G2a-R	gcgcgggcccCACATCGGTCACA	
21	*Bam*HI-COE/G2a-F2	gcggatccACTTCTTTTGTTACTTTGCCATCAT	Khuếch đại gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a
22	*Psp*OMI-S1D/G2a-R	gcgggcccACTAAAGTTGGTGGGAATACTAATA	
23	*Bam*HI-S2/G2a-F	cgcggatccGAGTTGCCTGGTTTCTTCTACCA	Khuếch đại gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a
24	*Psp*OMI-S2/G2a-R	cgcgggcccCGGCCACTTGATATATGTCTCAAC	
25	35S-SQF	CACTGACGTAAGGGATGACGC	Giải trình tự plasmid tái tổ hợp mang gen đích
26	35STerm	CTGGGAACTACTCACACA	

Các chữ cái viết thường, gạch chân biểu thị trình tự điểm cắt của enzyme giới hạn

2.1.3. Nguồn vật liệu thực vật

Cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* thủy canh 6-8 tuần tuổi do Phòng Công nghệ ADN ứng dụng và Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

2.1.4. Nguồn vật liệu động vật

Chuột nhắt trắng cái BALB/C 4-5 tuần tuổi được nuôi và chăm sóc tại phòng thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học và Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương VETVACO. Lợn nái mang thai và lợn con 4-5 tuần tuổi được nuôi và chăm sóc tại Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương NAVETCO và Công ty cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC.

2.1.5. Hóa chất

Danh sách các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được liệt kê tại Bảng 2.3.

Bảng 2.3. Danh sách các hóa chất được sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên hóa chất	Nguồn gốc, xuất xứ	Mục đích sử dụng
1	Enzyme Phusion® high-fidelity DNA polymerase	Thermo Fisher Scientific	Sử dụng trong thiết kế tách dòng và vector biểu hiện
	Kit CloneJET PCR Cloning	Thermo Fisher Scientific	
2	Kit tách chiết plasmid DNA-spin™ Plasmid DNA Purification	Intron	
3	Kit tinh sạch DNA MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification	Intron	
4	Marker DNA 1 Kb	Thermo Fisher Scientific	
5	Marker protein PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific	
6	Enzyme cắt giới hạn *Bam*HI, *Psp*OMI, *SAP*, *Nco*I, *Not*I, *Hin*dIII	Thermo Fisher Scientific	
7	T4 DNA ligase	Thermo Fisher Scientific	
8	Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Đo nồng độ protein tổng số
9	Kháng thể đơn dòng kháng c-myc	GS.TS. Udo Conrad, Viện di truyền thực vật và nghiên cứu cây trồng Leibniz, CHLB Đức	Sử dụng trong thí nghiệm Western blot, ELISA tách dòng và vector biểu hiện
10	Kháng thể ScFv-cmyc đặc hiệu H5		
11	Protein H5-pII		
12	Protein S1 (50 ng/µl) của SARS-Cov-2	Sinobiological	
13	Kháng thể kháng His-tag	Invitrogen	
14	Kháng thể anti-mouse IgG (H+L) dung hợp HRP	Invitrogen	
15	Kháng thể anti-porcine IgG (H+L) dung hợp HRP	SouthernBiotech	
16	Kháng thể anti-mouse IgA dung hợp HRP	Invitrogen	
17	Kháng thể anti-mouse IgM dung hợp HRP	Invitrogen	
18	Kháng thể anti-pig IgA dung hợp HRP	Invitrogen	
19	TMB (3,3’,5,5’ tetramethylbenzidine,	Thermo Fisher Scientific	
20	DAB (Diaminobenzidine)	BioWorld	
21	Amersham ECL Prime	Cytiva	

22	Huyết thanh của lợn được tiêm vacxin thương mại Corning, vô hoạt chứa PEDV AJ1102	Công ty cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC	
23	INgezim PEDV 11.PED.K.1/5	Eurofins INGENASA	Phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu PEDV
24	PED IgA Ab ELISA	Bionote	Phát hiện kháng thể IgA đặc hiệu PEDV
25	Kit hiệu chuẩn sắc ký lọc gel có chứa các protein chuẩn từ 44-2000 kDa	GE Healthcare	Sử dụng làm thang protein chuẩn trong sắc ký lọc gel
26	Chất bổ trợ Montanide ISA™ 201	SEPPIC	Thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch trên động vật
27	Chất bổ trợ Emulsigen®-D	MVP	
28	Vacxin thương mại CTC Vacc PED	Hàn Quốc	
29	Vacxin vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100	Bayer	
30	Vacxin thương mại Corning, vô hoạt chứa PEDV AJ1102	Keqian Biology, Wuhan Keqian Biology, Trung Quốc	

2.1.6. Thiết bị và vật tư

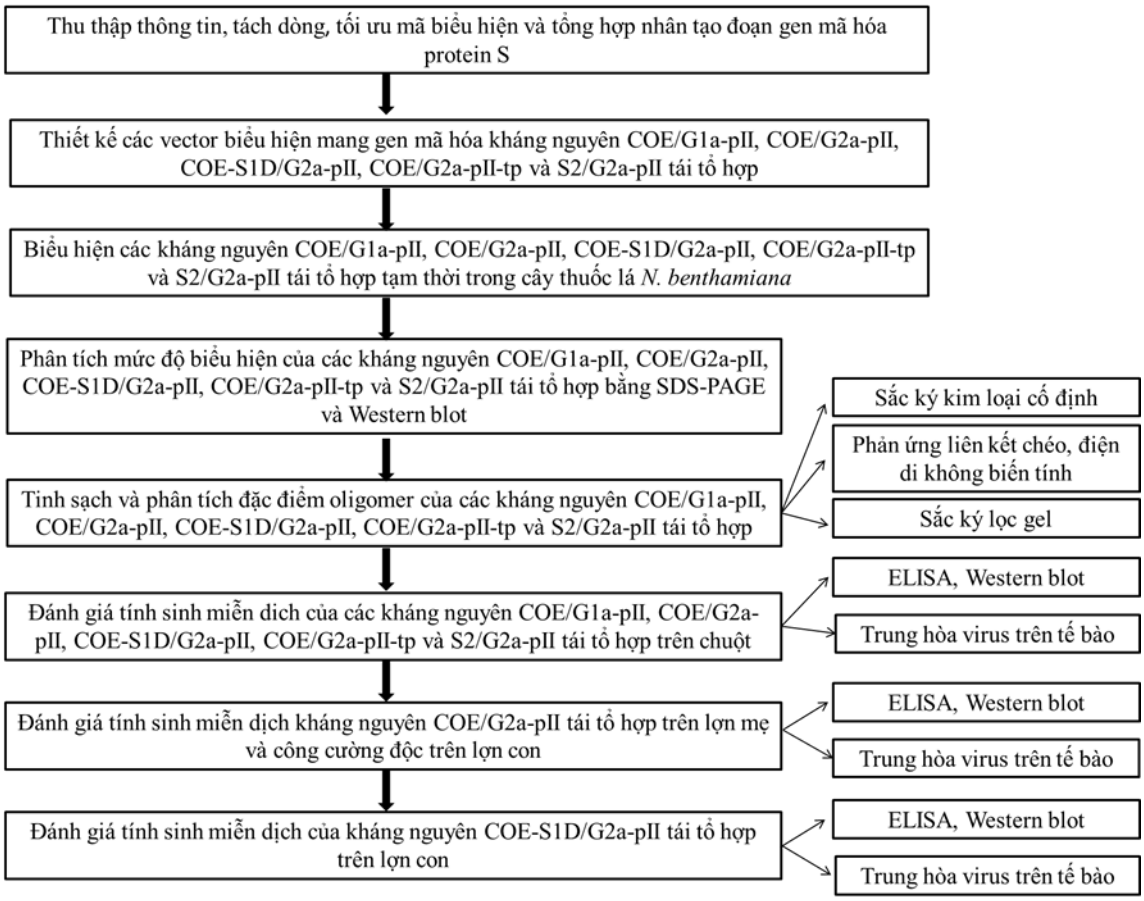
Các thiết bị và vật tư sử dụng trong nghiên cứu do Phòng Công nghệ ADN ứng dụng và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học cung cấp được liệt kê tại Bảng 2.4.

Bảng 2.4. Danh sách các thiết bị, vật tư được sử dụng trong nghiên cứu

STT	**Tên thiết bị, vật tư**	**Nguồn gốc, xuất xứ**
1	Máy PCR ProFlex™	Appiled Biosystems, ThermoFisher Scientific, Mỹ
2	Máy điện di Powerpac300	Bio-Rad, Mỹ
3	Máy chụp ảnh gel và màng lai huỳnh quang Amersham Imager 680 RGB	Cytiva, GE Healthcare, Nhật Bản
4	Máy chuyển màng bán khô siêu tốc Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, Singapore
5	Hệ thống tinh sạch nhanh protein AKTA pure 25L	Cytiva, GE Healthcare, Thụy Điển
6	Hệ thống đọc ELISA Multiskan Sky	Thermo Fisher Scientific, Mỹ

7	Máy rửa đĩa ELISA	Thermo Fisher Scientific, Mỹ
8	Máy ủ đĩa ELISA	Thermo Fisher Scientific, Mỹ
9	Máy vortex	Mimishaker, IKA, Đức
10	Máy hút chân không Speed-Vac 110A	Savant, Mỹ
11	Máy lắc ổn nhiệt	New Jersey, Mỹ
13	Máy ly tâm lạnh đa năng 5804R	Eppendorf, Đức
14	Máy đo pH	Thermo Fisher Scientific, Mỹ
15	Máy đo quang phổ	Biorad, Mỹ
16	Cột tinh sạch protein Superose™ 6 increase 10/300GL	GE Healthcare, Mỹ
17	Pipet man các loại	Eppendorf, Mỹ
18	Tủ an toàn sinh học cấp II loại A2 S@femate Eco 1.2	BioAir S.P.A, Ý

2.2. Phương pháp



Hình 2.1. Sơ đồ mô tả tóm tắt các phương pháp nghiên cứu được sử dụng trong luận án

Sơ đồ mô tả tóm tắt các phương pháp nghiên cứu sử dụng trong luận án được trình bày ở Hình 2.1.

2.2.1. Thu thập thông tin, tách dòng, tối ưu mã biểu hiện và tổng hợp nhân tạo đoạn gen mã hóa protein S

Sáu mươi tư trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S của các chủng PEDV đã xuất hiện ở Việt Nam và một số trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S của các chủng PEDV đại diện trên thế giới được thu thập từ cơ sở dữ liệu NCBI vào tháng 6/2020. Danh sách các trình tự gen mã hóa protein S của các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam đăng ký trên Ngân hàng gen được thể hiện ở Phụ lục 1. Các trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S của các chủng PEDV đã xuất hiện ở Việt Nam được căn trình tự và phân tích bằng phần mềm DNASTAR Lasergene 7. Trình tự bảo thủ của gen mã hóa kháng nguyên S từ các chủng PEDV ở Việt Nam được sử dụng để thiết kế mồi bảo thủ nhằm khuếch đại gen S.

Chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được tách chiết ARN sử dụng Trizon (Thermo Fisher Scientific). ARN của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được sử dụng để tổng hợp cADN theo hướng dẫn của bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). Toàn bộ gen mã hóa kháng nguyên S được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi được liệt kê ở Bảng 2.2. Phản ứng PCR sử dụng enzyme Phusion® High-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các sản phẩm PCR được tinh sạch sử dụng bộ kit MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification (Intron). Sản phẩm PCR được gắn vào vector pJET sử dụng bộ kit CloneJET PCR Cloning (Thermo Fisher Scientific) để tạo thành plasmid tái tổ hợp pJET-S.

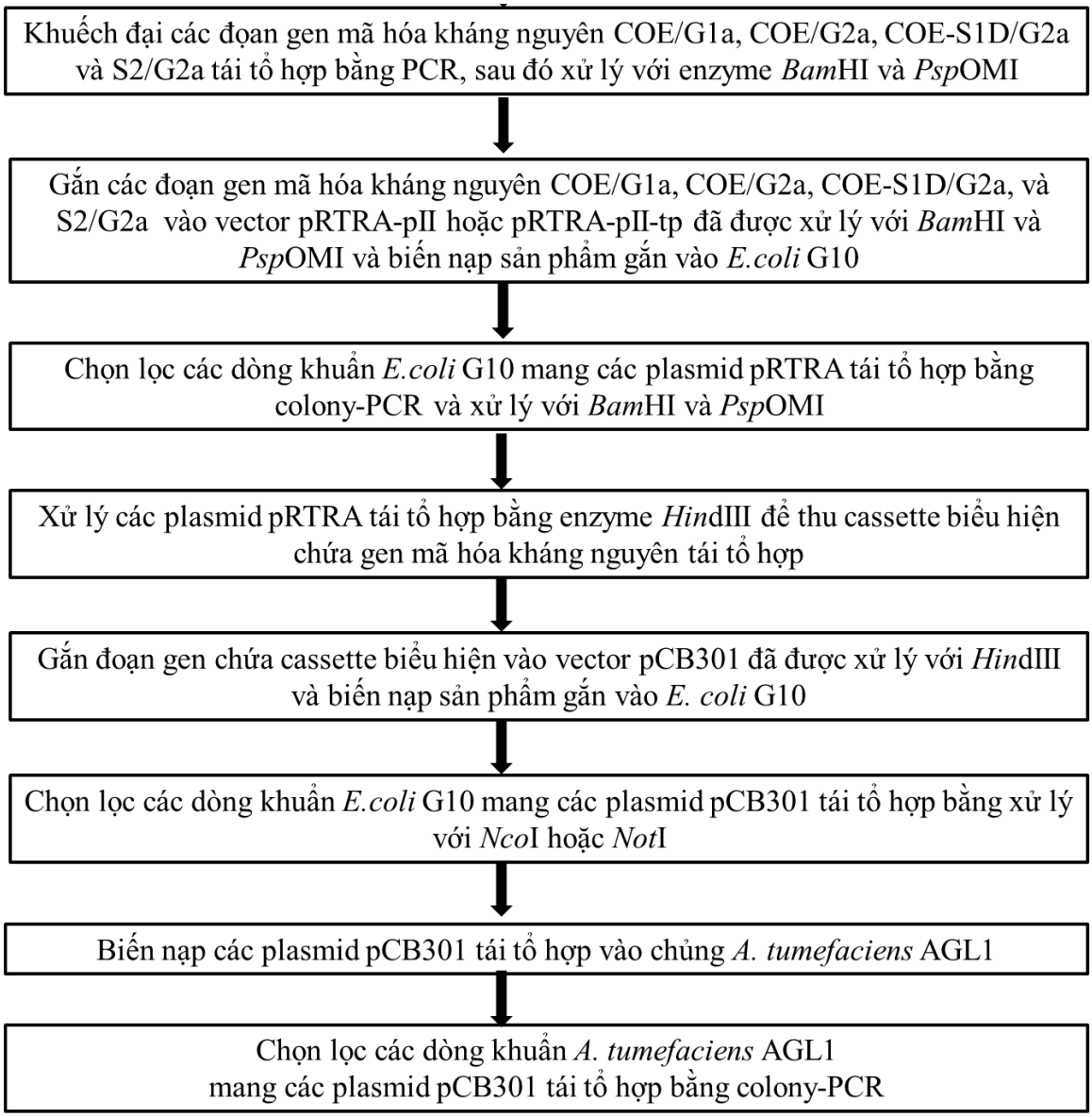
Plasmid pJET-S được sử dụng làm khuôn để đọc trình tự nucleotit của gen S bằng phương pháp Sanger với các cặp mồi được liệt kê ở Bảng 2.2. Các trình tự được xử lý và căn trình tự sử dụng phần mềm Bio Edit và MegAlign/Lasergen 7.0. Trình tự nucleotit của gen mã hóa kháng nguyên S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được dùng để xây dựng cây phân loại cùng với các trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S của một số chủng PEDV đã xuất hiện ở Việt Nam và trên thế giới sử dụng phần mềm Mega X.

Các trình tự nucleotit của gen mã hóa kháng nguyên COE (aa 499-638) của chủng PEDV DR13 nhược độc (Hàn Quốc), mã số truy cập NCBI: JQ023162.1 (ký hiệu COE/G1a) và COE của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 (ký hiệu COE/G2a) được tối ưu mã di truyền thích hợp cho sự biểu hiện của các kháng nguyên này trên cây thuốc lá *N. benthamiana* sử dụng công cụ tối ưu của Genewiz (Mỹ), sau đó thêm vị trí nhận biết của các enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. Các trình tự gen này được đặt tổng hợp và đưa vào vector pUC57 bởi công ty Genewiz (Mỹ). Các plasmid

pUC57-COE/G1a và pUC57-COE/G2a được cung cấp bởi công ty Genewiz (Mỹ) dưới dạng đông khô.

2.2.2. Thiết kế các vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên tái tổ hợp

Sơ đồ mô tả tóm tắt phương pháp thiết kế các vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên tái tổ hợp được trình bày ở Hình 2.2.



Hình 2.2. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa các kháng nguyên tái tổ hợp và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector tương ứng

Các đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE (từ aa 499 đến 638) của chủng PEDV DR13 nhược độc (Hàn Quốc) và chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 khuếch đại từ các plasmid pUC57-COE/G1a và pUC57-COE/G2a bằng PCR sử dụng các cặp mồi *Bam*HI-COE/G1a-F và *Psp*OMI-COE/G1a-R hoặc *Bam*HI-COE/G2a-F1 và *Psp*OMI-COE/G2a-R. Đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a và COE/G2a

được thu nhận sau khi điện di trên gel agarose 1% sử dụng bộ kit MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification (Intron). Sản phẩm sau tinh chế được cắt với enzyme *Psp*OMI và *Bam*HI.

Đoạn gen mã hóa từ aa 499 đến 789 (ký hiệu COE-S1D/G2a) của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn là plasmid pJET-S và cặp mồi *Bam*HI-COE/G2a-F2 và *Psp*OMI-S1D/G2a-R. Đoạn gen mã hóa từ aa 730 đến 1324 (ký hiệu S2/G2a) được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng khuôn là plasmid pJET-S và cặp mồi *Bam*HI-S2/G2a-F/*Psp*OMI-S2/G2a-R. Các đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a và S2/G2a được thu nhận sau khi điện di trên gel agarose 1% sử dụng bộ kit MEGAquick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification (Intron). Sản phẩm sau tinh chế được cắt với enzyme *Psp*OMI và *Bam*HI.

Các plasmid pRTRA-H5-pII và pRTRA-H5-pII-tp được cắt với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI nhằm loại bỏ gen mã hóa kháng nguyên H5 và thu nhận các khung vector pRTRA-pII và vector pRTRA-pII-tp. Tiếp theo, các vector pRTRA-pII và pRTRA-pII-tp được xử lý với enzyme *SAP* (Thermo Fisher Scientific) để loại bỏ gốc phosphate theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đoạn gen mã hóa các kháng nguyên COE/G1a, COE/G2a, COE-S1D/G2a và S2/G2a sau khi cắt và thu nhận từ gel được gắn vào các vector pRTRA-pII và vector pRTRA-pII-tp sử dụng enzyme T4 DNA ligase (5U/µl, Thermo Fisher Scientific). Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 22 ^{o}C trong 2 giờ, sau đó được nhân dòng trong chủng *E. coli* G10 và chọn lọc trên môi trường có kháng sinh carbenicillin 50 mg/l. Các dòng khuẩn chứa các vector pRTRA tái tổ hợp được chọn lọc bằng colony-PCR (sử dụng cặp mồi 35S-F/35S-R) và xử lý với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. Các dòng khuẩn lạc dương tính trong phản ứng colony-PCR được nuôi lỏng để phục vụ tách chiết plasmid. Quá trình tách chiết plasmid được thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất bộ kit DNA-spin™ Plasmid DNA Purification (Hàn Quốc). Các plasmid sau tách được dùng để kiểm tra sự có mặt của các gen mã hóa các kháng nguyên COE/G1a, COE/G2a, COE-S1D/2a và S2/G2a bằng enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI.

Các vector pRTRA tái tổ hợp đã thiết kế xong bao gồm pRTRA-COE/G1a-pII, pRTRA-COE/G2a-pII, pRTRA-COE-S1D/G2a-pII, pRTRA-COE/G2a-pII-tp và pRTRA-S2/G2a-pII được cắt với enzyme *Hin*dIII để thu đoạn gen chứa cassette biểu hiện. Đồng thời, vector pCB301 cũng được xử lý với enzyme *Hind*III để thu khung vector. Tiếp đến, các đoạn gen chứa cassette biểu hiện được gắn với vector pCB301 sử dụng enzyme T4 DNA ligase (5 U/µl, Thermo Fisher Scientific). Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 22 ^{o}C trong 2 giờ, sau đó sản phẩm được biến nạp vào chủng chủng *E. coli* G10 và các dòng tế bào sau biến nạp được chọn lọc trên môi trường

có kháng sinh kanamycin 50 mg/L. Các dòng khuẩn được nuôi lỏng để phục vụ tách chiết plasmid theo hướng dẫn của bộ kit DNA-spin™ Plasmid DNA Purification (Intron). Các dòng khuẩn chứa các vector pCB301 tái tổ hợp được kiểm tra với enzyme *Nco*I hoặc *Not*I. Trình tự các đoạn gen mã hóa các kháng nguyên tái tổ hợp trong vector pCB301 được xác nhận lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35Sterm được liệt kê ở Bảng 2.2. Cuối cùng, các plasmid pCB301 tái tổ hợp được chuyển vào chủng *A. tumefaciens* AGL1 sử dụng xung điện [149]. Các dòng khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 mang các vector pCB301 tái tổ hợp được chọn lọc bằng colony-PCR với cặp mồi 35S-SQF và 35Sterm.

2.2.3. Biểu hiện các kháng nguyên tái tổ hợp tạm thời trong cây thuốc lá N. benthamiana

Một khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 mang vector pCB301 chứa gen đích và 1 khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 chứa đoạn gen mã hóa HcPro được lựa chọn và nuôi riêng rẻ trong 5 mL môi trường LB có bổ sung carbenicillin 50 mg/L, kanamycin 50 mg/L và rifamycin 50 mg/L qua đêm. Dịch nuôi được bổ sung nuôi thêm 45 mL LB có chứa carbenicillin 50 mg/L, kanamycin 50 mg/L và rifamycin 50 mg/L qua đêm. Dịch nuôi (50 mL) được chuyển vào 450 mL môi trường LB bổ sung carbenicillin 50 mg/L, kanamycin 50 mg/L và rifamycin 50 mg/L và nuôi qua đêm. Khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 4000 v/p trong 30 phút ở 4 ^{o}C và hòa trong đệm MES 0,01 M và $MgCl_2$ 0,01 M, pH 5,6 cho tới OD_{600} 0,6-1,0. Hai dung dịch khuẩn được trộn theo tỷ lệ 1:1 (V/V) trong ca nhựa 2 L và ủ ở nhiệt độ 25 ^{o}C trong 2 giờ trước khi biến nạp. Dịch khuẩn được biến nạp vào cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 6-8 tuần tuổi sử dụng kỹ thuật hút chân không ở 25 inches Hg với thời gian hút chân không là 1 phút 30 giây. Sau khi biến nạp, cây thuốc lá được đặt trở lại hệ thống nuôi cây thuỷ canh được điều khiển với nhiệt độ từ 22 đến 25 °C, 16 giờ chiếu sáng và độ ẩm 70%. Ba đến sáu ngày sau khi biến nạp, lá thuốc lá được thu hoạch và bảo quản ở tủ -80 ^{o}C cho tới khi phân tích.

Một số điều kiện thích hợp cho biểu hiện tạm thời của kháng nguyên COE/G2a-pII trong cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh cần được tối ưu bao gồm tuổi cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh, nồng độ dịch khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp và thời gian thu lá sau biến nạp. Cặn khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen mã kháng nguyên COE/G2a-pII và cặn khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen mã hóa HcPro được trộn đều với nhau với tỷ lệ 1:1 trong đệm MES (10 mM $MgCl_2$, 10 mM MES, pH 5,6) tới khi OD_{600} đạt các giá trị 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 hoặc 0,6. Cây *N. benthamiana* thủy canh (5 tuần tuổi, 6 tuần tuổi hoặc 7 tuần tuổi tính từ lúc gieo hạt) được biến nạp với các dịch vi khuẩn trên bằng kỹ thuật hút chân không ở 1 phút 30 giây, 27 inches, 0 atm. Mỗi công

thức thí nghiệm bao gồm 3 cây thuốc lá. Các cây thuốc lá sau khi biến nạp được đưa trở lại vào nhà lưới để tiếp tục phát triển. Lá của các cây thuốc lá được thu sau 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày hoặc 6 ngày sau khi biến nạp. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Toàn bộ lá được thu và bảo quản ở -80 ^{o}C cho đến khi phân tích.

2.2.4. Phân tích mức độ biểu hiện của các kháng nguyên tái tổ hợp bằng SDS-PAGE và Western blot

Sự biểu hiện của kháng nguyên tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* sau biến nạp được kiểm tra bằng phản ứng Western Blot được mô tả trong nghiên cứu trước đó [150]. Mẫu lá sau khi lấy từ tủ -80 ^{o}C được nghiền lạnh trong nitơ lỏng sử dụng cối chày sứ. Đệm SDS 1X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 0,1% bromophenolblue (w/v), 10% glycerol (v/v), 5% β-mercaptoethanol (v/v), pH 8,3) được bổ sung vào lá sau khi nghiền mịn với tỷ lệ 1:2 (w/v) để thu nhận protein tan tổng số (TSP). Sau đó, hỗn hợp được ủ ở 95 ^{o}C trong 10 phút. Dịch chiết chứa protein tổng số được thu nhận sau khi ly tâm 13.000 vòng/phút trong 30 phút.

Nồng độ protein tổng số trong dịch lá được tính toán theo phương pháp của Bradford năm 1976 sử dụng đường chuẩn BSA (Bovine Serum Albumin) được đo ở bước sóng 595 nm [151]. Đường chuẩn của BSA được xây dựng sau khi đo mật độ quang của dung dịch chứa 790 µl nước deion, 200 µl Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) và 1 µl BSA với dải nồng độ (500 µg/µL; 250 µg/µL; 125 µg/µL; 62,5 µg/µL; 31,25 µg/µL; 15,625 µg/µL; 7,81 µg/µL; 3,9 µg/µL; 0 µg/µL) trên máy SmartSpec Plus spectrophotometer (Biorad) ở bước sóng 595 nm. Sau khi dựng được đường chuẩn của BSA trên máy, nồng độ protein tổng số trong dịch chiết lá được hiển thị khi đo dung dịch chứa 790 µl nước deion, 200 µl Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Scientific™) và 1 µl dịch chiết lá ở bước sóng 595 nm.

Protein tổng số (30-50 µg) được phân tách bằng điện di SDS-PAGE trên gel 10-12% polyacrylamide ở 100V trong 2 giờ. Protein trên gel được chuyển qua màng polyvinylidene fluoride (PVDF) ở 18 V trong thời gian 15 giờ. Màng được ngâm trong 2 giờ với dung dịch có 5% sữa tách béo pha trong PBS. Tiếp đến, kháng thể đơn dòng kháng c-myc hoặc kháng thể đơn dòng kháng 6x-His tag được sản xuất ở chuột được bổ sung vào màng. Kế tiếp, màng được ngâm trong 1 giờ với dung dịch có kháng thể anti-mouse IgG có gắn HRP (Horseradish Peroxidase) pha trong PBS chứa 5% sữa tách béo. Trước khi phủ kháng thể, màng được làm sạch 3 lần, mỗi lần phút với dung dịch có 0,5% sữa tách béo pha trong PBS. Protein được phát hiện trên màng sử dụng dung dịch có chứa DAB (Diaminobenzidine) và H_2O_2 hoặc dung dịch Amersham ECL Prime. Máy chụp ảnh Amersham™ Imager 680 (Cytiva) được sử dụng để ghi nhận ảnh kết quả Western blot. Sự tích lũy của các kháng nguyên tái

tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được ước tính sử dụng đường chuẩn được xây dựng từ tín hiệu băng protein chuẩn dựa vào phần mềm ImageJ hoặc ImageQuant TL 8.0 (Cytiva).

Ngoài ra, sự hiện diện của các kháng nguyên tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* cũng được xác nhận bằng SDS-PAGE và Western blot. Huyết thanh của lợn sau khi gây đáp ứng với vacxin Corning chứa PEDV AJ1102 (Keqian Biology, Wuhan Keqian Biology, Trung Quốc) dạng vô hoạt được sử dụng như là kháng thể 1 và kháng thể kháng lợn IgG (H+L) dung hợp HRP (SouthernBiotech) được sử dụng như là kháng thể 2.

Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của các protein được thực hiện sử dụng chương trình dự đoán glycosyl hóa (glycosylation prediction program, GPP) của nhóm tác giả từ Đại học Nottingham [152].

2.2.5. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của các kháng nguyên tái tổ hợp

2.2.5.1. Tinh sạch kháng nguyên dựa vào sắc ký ái lực kim loại cố định IMAC

Lá thuốc lá *N. benthamiana* có chứa các kháng nguyên tái tổ hợp đã được xác nhận bằng Western blot, được sử dụng cho tinh sạch bằng phương pháp IMAC (Immobilized Metal ion Chromatography). Lá được nghiền lạnh thành dạng mịn trong nitơ lỏng bằng cối cháy sứ. Bột lá thuốc lá (80 g) được chiết trong 240 mL đệm chiết lạnh gồm 20 mM sodium phosphate, 0,5 M NaCl (pH 7,4), 10% glycerol, 1 viên cOmplete^{TM} protease inhibitor cocktail (Roche), sau đó hỗn hợp được xay đồng nhất sử dụng máy xay sinh tố. Dịch chiết được phân tách bằng ly tâm 3 lần (13,000 rpm/p, 40 phút, 4^{o}C), sau đó được trộn với 20 mL Ni Sepharose Fast Flow (Cytiva). Hỗn hợp được khuấy nhẹ nhàng bằng khuấy từ qua đêm, 4 ^{o}C. Hỗn hợp được nhồi vào cột sắc ký IMAC. Dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột (FT) được thu nhận để phân tích. Cột được rửa 2 lần, mỗi lần với 500 mL đệm rửa lạnh (20 mM sodium phosphate, 0,5 M NaCl, 10-30 mM Imidazole, pH 7,4). Dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa lần 1 (W1), lần 2 (W2) được thu nhận để phân tích. Protein tinh sạch (E) sau đó được tách ra khỏi cột bằng cách bổ sung 20 mL đệm hòa tan (20 mM sodium phosphate, 0,5 M NaCl, 500 mM Imidazole, pH 7,4), lặp lại 2 lần và được thu nhận để phân tích. Protein tinh sạch (E) được thẩm tích qua đêm ở 4 ^{o}C sử dụng màng thẩm tích Spectra/Por® Regenerated Cellulose cutoff 6-8 kDa (Spectrum) trong đệm PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4) ở 4^{o}C. Protein tinh sạch được cô trên cột Pierce™ Protein Concentrator PES, 10K MWCO, 5-20 mL (Thermo Fisher Scientific), sau đó bổ sung 50% glycerol và bảo quản ở -20^{o}C. Các phân đoạn thu được sau tinh sạch kháng nguyên bằng IMAC bao

gồm RE, FT, W1, W2 và E được phân tích bằng điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.4.

2.2.5.2. Phản ứng liên kết chéo

Phản ứng liên kết chéo (cross-linking reaction) được tiến hành dưới chỉ dẫn đã được mô tả của Weldon và cộng sự, 2010 [133]. Đầu tiên, Bis [sulfosuccinimidyl] suberate (BS3) được hòa tan trong nước để đạt nồng độ 50 mM. BS3 được bổ sung vào kháng nguyên tinh sạch (1 µg) cho tới nồng độ 5 mM. Hỗn hợp được để ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút. Để dừng phản ứng, dung dịch 1M Tris-HCl pH 8,0 được bổ sung vào hỗn hợp cho tới nồng độ 50 mM và hỗn hợp được để tiếp ở nhiệt độ phòng 15 phút. Dung dịch hỗn hợp sau phản ứng được phân tách trên gel SDS-PAGE 10-12%, sau đó protein được chuyển lên màng để phân tích Western blot như mục 2.2.4.

2.2.5.3. Điện di không biến tính

Protein COE/G1a dạng tự nhiên được phân tách bằng điện di không biến tính (Blue native PAGE) theo mô tả bởi Wittig và cộng sự [153]. Protein được phân tách trong đệm mẫu 50 mM NaCl, 50 mM imidazole, 0,5% coomassie blue G-250, 10% glycerol, pH 7,0) sử dụng 3,5-10% polyacrylamide gradient gel (75 mM Imidazole, 500 mM 6-aminohexanoic acid, pH 7,0). Phản ứng được tiến hành sử dụng đệm với blue cathode A (50 mM tricine, 7,5 mM imidazole, 0,02% coomassie blue G-250, pH 7,0) và đệm anode (25 mM imidazole, pH 7,0). Sau khi chạy được 1/3 bể, đệm cathode A được loại bỏ và thay thế bởi đệm cathod A/10 (50 mM Tricine, 7,5 mM Imidazole, 0,002% coomassie blue G-250, pH 7,0). Kết thúc quá trình điện di, protein được chuyển sang màng PVDF trong đệm (50 mM tricine, 7,5 mM imidazole, pH 7,0) qua đêm ở 18 V. Màng ủ với methanol để rửa coomassie dye. Western blot được thực hiện theo phương pháp của Manfred và Udo (2009) [150] và quy trình đã mô tả ở mục 2.2.4.

2.2.5.4. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên bằng sắc ký lọc gel

Các kháng nguyên thu được sau khi tinh sạch bằng IMAC được tiếp tục tinh sạch bằng sắc ký lọc gel (Size-exclusion chromatography, SEC). 100 µg protein tinh sạch IMAC được nạp vào cột Superose™ 6 tăng 10/300GL (GE Healthcare) và quá trình tinh sạch được thực hiện trên hệ thống máy AKTA pure (Cytiva). Bộ kit gồm các protein chuẩn có kích thước lớn trong khoảng từ 44 đến 2000 kDa được đưa lên cột để ước tính trọng lượng của các protein quan tâm. 500 µl của từng phân đoạn được thu nhận. Sự hiện diện của protein trong các phân đoạn SEC được phân tích bằng SDS-PAGE và Western blot. Các phân đoạn SEC có chứa sự hiện diện của protein đích được dồn lại và cô đặc trên cột Pierce™ Protein Concentrators

PES, 10K MWCO, 5-20 mL (Thermo Fisher Scientific), sau đó bổ sung 50% glycerol và bảo quản ở - 20^{o}C.

2.2.6. Nhân nuôi và tinh sạch PEDV từ tế bào nuôi cấy

2.2.6.1. Nhân nuôi và tinh sạch chủng PEDV DR13 và PEDV SM98

Quy trình nhân nuôi và tinh sạch PEDV DR13 và SM98 từ tế bào nuôi cấy được tiến hành tại Bệnh viện Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam và công ty cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC theo quy trình trước đó [38] với một số cải tiến. Dòng tế bào Vero E6 (ATCC R CRL-1587TM) được nhân nuôi và ủ 37^{o}C trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) có chứa 10% fetal bovine serum (FBS) và kháng sinh (100 µg/mL penicillin/streptomycin). Các tế bào được nhân nuôi dưới điều kiện 5% CO_2 ở 37^{o}C. Sau đó, chủng PEDV-DR13 hoặc chủng PEDV-SM98 được nhân nuôi các tế bào Vero với 10 µg/mL tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone được xử lý trypsin (TPCK) (Worthington, Lakewood, NJ, USA). Sau khi nuôi cấy 36-48 giờ, khi các tế bào thể hiện 100% bệnh tích tế bào, dịch tế bào được thu nhận bằng cách làm đông và rã đông 3 lần. Xác tế bào được loại bỏ sau khi ly tâm ở 10,000×g, 30 phút. Dịch nổi chứa PEDV được làm sạch bằng ly tâm ở tốc độ 30,000 xg. Để tinh sạch PEDV, gradient sucrose (20, 40, 60%) được bổ sung, sau đó PEDV được thu nhận bằng ly tâm.

2.2.6.2. Nhân nuôi chủng NAVET/PEDV/PS6/2010

Quy trình nhân nuôi chủng virus NAVET/PEDV/PS6/2010 được tiến hành tại công ty CP thuốc thú y trung ương NAVETCO. Tế bào Vero (ATCC CCL-81) được nhân nuôi sử dụng môi trường thiết yếu tối thiểu của Eagle (EMEM, Gibco) chứa 10% huyết thanh bào thai bò (FBS, Gibco) và gentamycin 50 µg/mL ở 37^{o}C và 5% CO_2. Các mẫu ruột của heo con bị nhiễm PEDV được sử dụng để phân lập chủng NAVET/PEDV/PS6/2010. Chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được nhân nuôi trong các tế bào Vero theo quy trình được mô tả trước đây [38]. Chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 ở đời cấy chuyển thứ 5 đã được sử dụng cho các thí nghiệm công cường độc ở lợn con. Chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 ở đời cấy chuyển thứ 5 có trình tự nucleotit của gen S giống với trình tự nucleotit của chủng virus này ở đời đầu tiên.

2.2.7. Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột

2.2.7.1. Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột với kháng nguyên COE từ chủng PEDV G1a

Các dịch chiết thực vật biểu hiện các kháng nguyên COE/G1a-pII (hoặc tên khác trong công bố là COE-GCN4pII), COE/G1a-pII-tp hoặc dịch chiết của cây thuốc lá không chuyển gen hoặc vacxin thương mại (4x10^{6} TCID50/liều, CTC Vacc PED, Hàn Quốc) được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. Các dịch chiết

được trộn đều với chất bổ trợ Emulsigen ®-D (MVP Technologies, 4805 G Street, Omaha, NE 68117, USA) với tỷ lệ 8:2 (v/v) bằng khuấy từ trong 2 h ở 4 ^{o}C. Chuột nhắt cái trắng BALB/C 6 tuần tuổi được tiêm dưới da háng ba lần vào các ngày 0, 14 và 21. Mỗi con chuột được tiêm 200 µl chứa dịch chiết thực vật chứa 18,76 µg kháng nguyên COE/G1a-pII hoặc dịch chiết của cây thuốc lá không chuyển gen hoặc vacxin thương mại ($4x10^6$ TCID50/liều, CTC Vacc PED, Hàn Quốc). Bảy ngày sau tiêm lần thứ hai và lần thứ ba, máu của những con chuột được thu nhận ở hốc mắt. Tất cả huyết thanh chuột được thu nhận bằng cách ly tâm. Huyết thanh chuột được ủ trong 30 phút ở 56^{o}C sau đó bảo quản ở -20^{o}C.

2.2.7.2. Gây đáp ứng miễn dịch trên chuột với các kháng nguyên tái tổ hợp từ chủng PEDV G2a

Chuột nhắt trắng cái BALB/C 4 tuần tuổi được cung cấp bởi Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương VETVACO. Các kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII hoặc PBS được phối trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) theo tỷ lệ 8:2 trong 2 h ở 4^{o}C. Thí nghiệm bao gồm sáu nhóm chuột (n=8). Hỗn hợp chứa kháng nguyên (1 µg kháng nguyên/liều) hoặc PBS và chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) được tiêm dưới da háng vào mỗi con chuột. Ở nhóm đối chứng âm, chuột được gây đáp ứng với hỗn hợp chứa PBS và chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP). Chuột được gây đáp ứng 2 lần với thể tích 200 µl/con, mỗi lần cách nhau 2 tuần. Một tuần sau khi tiêm lần 2, dùng xilanh thu máu chuột ở vị trí hốc mắt. Huyết thanh phân tách sau đó ly tâm được sử dụng để đánh giá sự có mặt kháng thể IgG, IgA, IgM đặc hiệu PEDV, hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV và interferon gamma (IFN-γ).

2.2.8. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG, IgA, IgM đặc hiệu PEDV trong huyết thanh chuột bằng ELISA

Phương pháp ELISA được tiến hành dựa trên mô tả trước đó [143] có cải tiến. PEDV tinh sạch được pha loãng trong đệm phage PBS (100 mM NaCl, 32 mM Na_2HPO4, 17 mM NaH_2PO_4, pH 7,2), sau đó được sử dụng để phủ vào đĩa microtiter (ImmunoPlate Maxisorp, Nalgen Nunc International, Roskilde, Denmark) ở 4^{o}C qua đêm. Đĩa được ủ trong 2 giờ với dung dịch có chứa 5% sữa không béo pha trong PBS 1X. Tiếp đến, huyết thanh chuột được bổ sung vào đĩa và giữ trong 2 giờ. Sau đó, đĩa được ủ trong 1 giờ với kháng thể kháng chuột IgG dung hợp Horseradish peroxidase (HRP) được pha với tỷ lệ 1: 2500 hoặc kháng thể kháng chuột IgA có gắn HRP được pha với tỷ lệ 1:2000 hoặc kháng thể kháng chuột IgM có gắn HRP được pha với tỷ lệ 1:1000 trong dung dịch PBS 1X. Giữa các lần phủ kháng thể, đĩa được rửa 3 lần với dung dịch có chứa 0,05% Tween 20 (PBS-T) pha trong PBS 1X. Đĩa được ủ trong 15 phút với dung dịch

tetramethylbenzidine (TMB). Sau đó đĩa được ủ với dung dịch HCl 1N. Kết quả ELISA được đọc ở bước sóng 450nm.

2.2.9. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh chuột bằng Western blot

PEDV DR13 hoặc PEDV SM98 tinh sạch (1 µg) hoặc 500 ng kháng nguyên tinh sạch SEC được tra vào từng giếng, sau đó điện di trên gel SDS-PAGE (10%). Protein trên gel được chuyển qua màng PDVF ở 18 V qua đêm. Dung dịch PBS 1X chứa 5% (w/v) sữa không béo được sử dụng để khóa màng trong 2 giờ. Tiếp đến, từng giếng chứa protein trên màng được phân tách riêng rẽ và ngâm trong huyết thanh chuột pha loãng ở tỷ lệ 1:100 trong PBS 1X chứa 5% (w/v) sữa không béo trong 2 giờ. Sau đó, các màng được rửa 3 lần, mỗi lần 5 phút bằng dung dịch chứa 0,5% (w/v) sữa không béo pha trong PBS 1X. Dung dịch chứa kháng thể kháng chuột IgG gắn HRP pha loãng ở tỷ lệ 1:2000 trong PBS 1X chứa 5% sữa không béo được phủ vào các màng trong 1 giờ. Sự hiện diện của các băng vạch trên màng được nhận diện sau khi ngâm màng 10 phút trong dung dịch diaminobenzidine (DAB, Thermo Science Pierce) pha 0,05 M Tris-HCl, pH 7.2. Ảnh Western blot được ghi nhận sử dụng máy chụp ảnh Amersham™ Imager 680 (Cytiva).

2.2.10. Phân tích khả năng kích thích sinh cytokine trong huyết thanh chuột

Nồng độ interferon-gamma (IFN-γ) trong huyết thanh của chuột được kiểm tra sử dụng bộ kit ELISA (Mouse IFN-γ (HRP), Mabtech). Quy trình thực hiện được tiến hành theo chỉ dẫn của hãng. Để chuẩn bị cho thí nghiệm đánh giá khả năng kích thích sinh cytokine, huyết thanh chuột được pha loãng với tỷ lệ 1:20 trong dung dịch chứa 0,1% BSA và 0,05% Tween 20 pha trong PBS 1X. Đường chuẩn xây dựng dựa trên nồng độ IFN-γ chuột tái tổ hợp với khoảng 4-400 pg/mL, được sử dụng để ước tính nồng độ IFN-γ trong huyết thanh chuột sau khi pha loãng (IFN-γ PL). Nồng độ IFN-γ trong huyết thanh chuột ban đầu được tính bằng hai mươi lần nồng độ của IFN-γ PL.

2.2.11. Phân tích khả năng trung hòa PEDV của huyết thanh chuột

Quy trình thí nghiệm trung hòa virus trên tế bào được thực hiện theo công bố trước đó [154]. Đầu tiên, huyết thanh chuột đã bất hoạt ở 56^{o}C , 30 phút được pha loãng theo cơ số 2 trong môi trường α-Minimum Essential Medium (MEM) có bổ sung 1% kháng sinh anti-mycotic (Invitrogen, USA). PEDV DR13 (10^3 TCID50/0,1 mL) PEDV SM98 (10^3 TCID50/0,1 mL) được ủ với huyết thanh chuột pha loãng ở 37 ^{o}C trong 1 giờ. Sau đó, 100 µl hỗn hợp chứa virus và huyết thanh ở các tỷ lệ pha loãng được tra vào từng giếng trên đĩa đã có sẵn tế bào Vero. Đĩa được giữ trong 1 giờ ở 37^{o}C. Tiếp đến, đĩa được làm sạch với dung dịch PBS trong 10 phút. Đĩa được ủ trong 200 µl dung dịch chứa trypsin pha trong môi trường MEM. Đĩa được giữ

trong tủ ấm CO_2 ở 37^oC trong 6 ngày. Tỷ lệ pha loãng huyết thanh cao nhất mà không gây ra bệnh tích tế bào được xác định là hiệu giá kháng thể trung hòa.

2.2.12. Gây đáp ứng miễn dịch trên lợn mẹ và công cường độc trên lợn con

Để lựa chọn lợn nái hậu bị mang thai âm tính với PEDV, huyết thanh của các con lợn nái được sử dụng để phân tích sự hiện diện của các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV. Thí nghiệm được tiến hành tại công ty CP thuốc thú y trung ương NAVETCO. Hai lợn nái hậu bị mang thai không có các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV được sử dụng trong nghiên cứu. Kháng nguyên COE/G2a-pII tinh sạch hoặc PBS được trộn với chất bổ trợ dầu (NAVETCO, Việt Nam) với tỷ lệ 3:7. Lợn nái mang thai (khoảng 80 ngày tuổi) được tiêm bắp trên cổ với kháng nguyên COE/G2a-pII (liều 100 µg) hoặc PBS kèm chất bổ trợ vào ngày 0 và 14 sau khi tiêm chủng (pi). Mẫu máu của lợn nái được thu nhận vào các ngày 0, 35 (trước khi đẻ) và 50 pi. Lợn con (n= 8) được đẻ ra từ lợn nái trước đó được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII (n= 8) và lợn con (n= 2) được đẻ ra từ lợn nái được tiêm PBS, được cho bú và nuôi chung với mẹ nái của chúng. Mỗi lợn con (5 ngày tuổi) được công cường độc bằng cho uống với 1 mL chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 có độc lực cao (10^3 TCID50). Lợn con được theo dõi hàng ngày về các đặc điểm lâm sàng, trọng lượng, sự tiêu chảy và tỷ lệ chết từ ngày 0 đến ngày 14 sau công cường độc (pc). Điểm lâm sàng bao gồm trạng thái hoạt động được ghi lại để phân tích. Điểm lâm sàng được xác định như sau: khỏe mạnh= 0; chán ăn, trầm cảm, nôn mửa, tiều tụy = 1; chết= 2. Trọng lượng cơ thể của lợn con được đánh giá vào các ngày 0 và 10. Điểm phân được đánh giá như sau: bình thường= 0, nhão= 1, bán rắn= 2, tiêu chảy nhiều nước= 3. Mẫu máu của tất cả các lợn con được thu thập vào các ngày 0 và 10 sau công để phân tích. Tất cả các mẫu được bảo quản ở -20^oC cho đến khi phân tích.

2.2.13. Gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII

Thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con được thực hiện tại Công ty cổ phần sản xuất và thương mại thuốc thú y CNC. Các lợn con 4-5 tuần tuổi âm tính với các kháng thể đặc hiệu và kháng thể trung hòa PEDV được sử dụng cho thí nghiệm.

Thí nghiệm 1: So sánh tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII (liều 12,5 µg) trên lợn con; so sánh ảnh hưởng của chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) và chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) đến tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trên lợn con

Lợn con được chia thành 5 nhóm. Lợn con được tiêm bắp 2 lần, mỗi lần cách nhau 2 tuần. Các lợn con ở nhóm 1 và nhóm 2 (n= 3) lần lượt được tiêm với 2 mL

hỗn hợp chứa kháng nguyên COE/G2a-pII (12,5 µg/con) hoặc COE-S1D/G2a-pII (12,5 µg/con) trộn với chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) tỷ lệ 1: 1 bằng máy trộn đến khi đồng nhất. Các lợn con ở nhóm 3 (n= 3) được tiêm với hỗn hợp chứa kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (12,5 µg/con) trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) tỷ lệ 8: 2 ở 4^{o}C trong 2 giờ sử dụng khuấy từ. Các lợn con ở nhóm 4 (n= 3) được tiêm với 3 mL vacxin vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100 (hãng Bayer chứa PEDV dòng SM98P, ít nhất: ≥ 107.0 TCID50) theo chỉ dẫn của hãng Bayer. Các lợn con ở nhóm 5 (n= 2) được tiêm với 2 mL hỗn hợp PBS trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP). Máu của lợn con được thu nhận và chắt lấy huyết thanh 3 tuần sau tiêm mũi 2.

Thí nghiệm 2: So sánh tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (liều 50 µg/con) và vacxin thương mại trên lợn con

Lợn con được chia thành 3 nhóm. Lợn con được tiêm bắp 2 lần, mỗi lần cách nhau 2 tuần. Các lợn con ở nhóm 1 (n= 3) được tiêm với 2 mL dung dịch chứa kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/con) trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) tỷ lệ 8:2 ở 4^{o}C trong 2 giờ sử dụng khuấy từ. Các lợn con ở nhóm 2 (n= 3) được tiêm với 2 mL vacxin Corning chứa PEDV AJ1102 (Keqian Biology, Wuhan Keqian Biology, Trung Quốc) dạng vô hoạt. Lợn con ở nhóm 3 (n= 3) được tiêm với 2 mL PBS trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP). Các lợn con được thu máu để chắt lấy huyết thanh vào ngày thứ 35.

2.2.14. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG và IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh lợn bằng ELISA

Huyết thanh của lợn nái và lợn con được dùng để kiểm tra kháng thể IgG đặc hiệu PEDV sử dụng bộ kit ELISA thương mại (INgezim PEDV 11.PED.K.1/5, Eurofins INGENASA). Các giá trị S/P được tính theo công thức: (Giá trị mẫu thử nghiệm - giá trị đối chứng âm)/(giá trị đối chứng dương - giá trị đối chứng âm). Các mẫu được xác định là có kháng thể IgG đặc hiệu PEDV nếu giá trị S/P lớn hơn 0,35. Kháng thể IgA đặc hiệu PEDV được phân tích bằng ELISA gián tiếp sử dụng kháng nguyên COE/G2a-pII tinh sạch SEC (1 µg/mL). Quy trình ELISA phát hiện kháng thể IgA đặc hiệu PEDV được tiến hành theo quy trình mô tả ở mục 2.2.8.

2.2.15. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh lợn bằng Western blot

Kháng nguyên COE tinh sạch SEC (500 ng) được được tra vào từng giếng, sau đó điện di trên gel SDS-PAGE (10%). Protein trên gel được chuyển qua màng PDVF ở 18 V qua đêm. Dung dịch PBS 1X chứa 5% (w/v) sữa không béo được sử

dụng để khóa màng trong 2 giờ. Tiếp đến, từng giếng chứa protein trên màng được phân tách riêng rẽ và ngâm trong huyết thanh lợn pha loãng ở tỷ lệ 1:100 trong PBS 1X chứa 5% (w/v) sữa không béo trong 2 giờ. Sau đó, các màng được rửa 3 lần, mỗi lần 5 phút bằng dung dịch chứa 0,5% (w/v) sữa không béo pha trong PBS 1X. Dung dịch chứa kháng thể kháng lợn IgG gắn HRP pha loãng ở tỷ lệ 1:4000 trong PBS 1X chứa 5% sữa không béo được phủ vào các màng trong 1 giờ. Sự hiện diện của các băng vạch trên màng được nhận diện sau khi ngâm màng 10 phút trong dung dịch diaminobenzidine (DAB, Thermo Science Pierce) pha 0,05 M Tris-HCl, pH 7.2. Ảnh Western blot được ghi nhận sử dụng máy chụp ảnh Amersham™ Imager 680 (Cytiva).

2.2.16. Phân tích khả năng kích thích sinh cytokine trong huyết thanh lợn

Nồng độ interferon-gamma (IFN-γ) trong huyết thanh lợn được kiểm tra sử dụng bộ kit ELISA (Porcine IFN-γ (HRP), Mabtech). Quy trình thực hiện được tiến hành theo chỉ dẫn của hãng. Để chuẩn bị cho thí nghiệm đánh giá khả năng kích thích sinh cytokine, huyết thanh lợn được pha loãng với tỷ lệ 1:20 trong dung dịch chứa 0,1% BSA và 0,05% Tween 20 pha trong PBS 1X. Đường chuẩn xây dựng dựa trên nồng độ IFN-γ lợn tái tổ hợp với khoảng 16-1600 pg/mL, được sử dụng để ước tính nồng độ IFN-γ trong huyết thanh lợn sau khi pha loãng (IFN-γ PL). Nồng độ IFN-γ trong huyết thanh lợn ban đầu được tính bằng hai mươi lần nồng độ của IFN-γ PL.

2.2.17. Phân tích khả năng trung hòa PEDV của huyết thanh lợn

Hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV của huyết thanh lợn được kiểm tra bằng xét nghiệm trung hòa virus theo quy trình đã được mô tả ở mục 2.2.11. Chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 ($2x10^2$ TCID50/0,1mL) hoặc chủng PEDV SM98 (10^3 TCID50/0,1mL) được sử dụng cho thử nghiệm.

2.2.18. Phương pháp xử lý thống kê

Các dữ liệu thu thập được trong nghiên cứu đều được xử lý bằng phần mềm thống kê Sigma Plot. Thử nghiệm Mann-Whitney U trong phần mềm Sigma Plot được sử dụng để so sánh sự khác biệt về mặt thống kê giữa hai nhóm thí nghiệm. Dữ liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Giá trị $p < 0,05$ được sử dụng để xác định hai nhóm có khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê.

Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G1a

3.1.1. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng

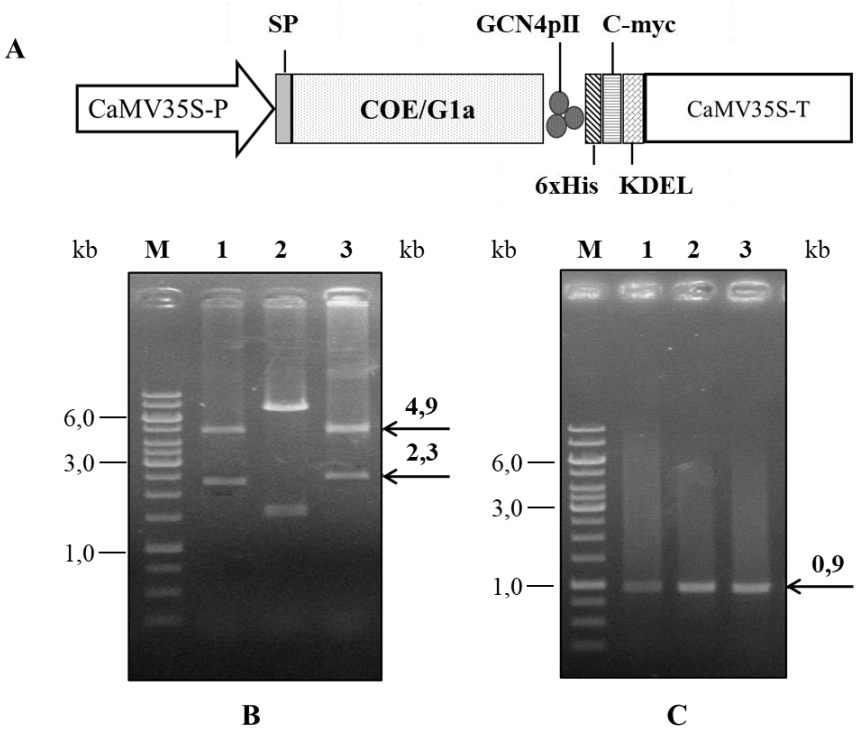
Hiện nay, hầu hết các vacxin phòng PEDV được sử dụng ở Việt Nam là vacxin truyền thống có nguồn gốc ngoại nhập hoặc sử dụng các chủng nhập khẩu thuộc nhóm G1a cổ điển để sản xuất vacxin. Do vậy, trong khuôn khổ của luận án, với mục đích so sánh khả năng gây đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp được tạo ra từ thực vật với vacxin thương mại chứa virus PEDV DR13 nhược độc thuộc nhóm G1a, trình tự gen mã hóa kháng nguyên COE (ký hiệu COE/G1a) của chủng PEDV nhược độc DR13 (Hàn Quốc), với mã số truy cập NCBI: JQ023162.1 được lựa chọn.

Trình tự gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a được tối ưu mã biểu hiện ở *N. benthamiana* nhờ công cụ được cung cấp bởi Genewiz (USA). Các mã di truyền được thay đổi trình tự nucleotit sao cho thích hợp để biểu hiện kháng nguyên COE/G1a trong hệ thống cây thuốc lá *N. benthamiana* nhưng trình tự aa không thay đổi. Trước và sau khi đổi mã di truyền, trình tự nucleotit (Phụ lục 2) và trình tự aa (Phụ lục 3) của các đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a được so sánh sử dụng phần mềm BioEdit**.** Kết quả cho thấy sau khi đổi mã, mặc dầu có một số sự biến đổi trong trình tự nucleotit của gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a, trình tự aa của kháng nguyên COE/G1a là không thay đổi so với trước khi đổi mã.

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a sau khi tối ưu mã biểu hiện được chèn vào vector pRTRA-pII tại vị trí của hai enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. Để chọn lọc các dòng khuẩn lạc mang vector pRTRA-COE/G1a-pII tái tổ hợp, chúng tôi tiến hành phản ứng được kiểm tra bằng colony-PCR (Phụ lục 4A) và xử lý với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI (Phụ lục 4B). Kết quả của phản ứng colony-PCR và xử lý enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI cho thấy cả 4 dòng khuẩn lạc thu được đều có các băng với kích thước đúng với tính toán lý thuyết. Điều này cho thấy vector tách dòng pRTRA-COE/G1a-pII đã được thiết kế thành công. Sơ đồ vector tách dòng chứa gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a-pII được thể hiện ở Phụ lục 5. Kháng nguyên COE/G1a-pII còn được gọi là COE-GCN4pII trong công bố.

Tiếp tục, để tạo vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a, plasmid pRTRA-COE/G1a-pII được xử lý bằng enzyme *Hin*dIII. Cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa COE/G1a-pII được thu nhận. Sơ đồ cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa COE/G1a-pII được trình bày ở Hình 3.1A. Đoạn gen này sau đó được nối ghép vào vector pCB301 đã được xử lý *Hin*dIII và

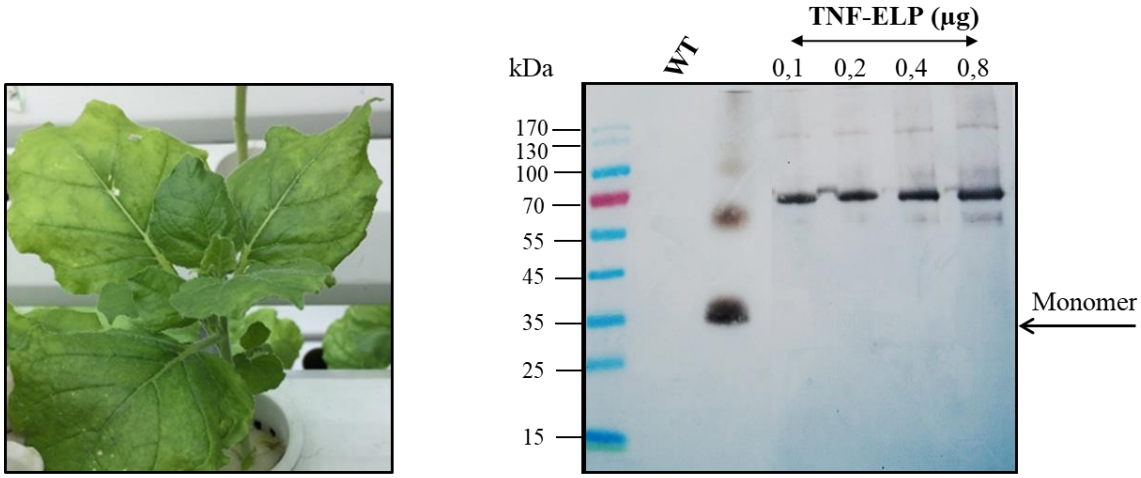
SAP. Các plasmid chứa vector pCB301 tái tổ hợp (viết tắt là pCB301-COE/G1a-pII) được chọn lọc bằng cách xử lý với enzyme *Nco*I (Hình 3.1B). Kết quả xử lý với enzyme *Nco*I cho thấy plasmid số 1 và số 3 có 2 băng với kích thước khoảng 4,9 kb và 2,3 kb, đúng so với kích thước lý thuyết tính toán. Kết quả đọc trình tự chứng tỏ trình tự nucleotit của COE/G1a trong các plasmid pCB301 tái tổ hợp giống 100% so với trình tự COE/G1a ban đầu. Như vậy, vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa COE/G1a-pII đã được thiết kế thành công. Plasmid pCB301-COE/G1a-pII số 3 được chuyển vào tế bào *A. tumefaciens* AGL1. Để chọn dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 mong muốn, phản ứng colony-PCR được tiến hành sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35STerm. Kết quả chứng tỏ cả 3 dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 đều có băng có kích thước khoảng 0,9 kb theo đúng tính toán về mặt lý thuyết (Hình 3.1C). Như vậy dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE/G1a-pII đã được tạo thành công. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE/G1a-pII được thể hiện ở Phụ lục 6.



Hình 3.1. Kết quả thiết kế vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a-pII và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng

A. Sơ đồ cassette biểu hiện gen mã hóa COE/G1a-pII. CaMV35S-P: promoter 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV). SP: peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa. KDEL: peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt. CaMV35S-T: terminator từ CaMV. B. Điện di đồ sản phẩm cắt với enzyme *Nco*I kiểm tra plasmid pCB301 từ *E. coli* mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a-pII. C. Điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR từ dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-3: các khuẩn lạc số 1-3 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

3.1.2. Biểu hiện kháng nguyên COE/G1a-pII tạm thời trong lá thuốc lá N. benthamiana



Hình 3.2. Biểu hiện protein COE/G1a-pII tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana*

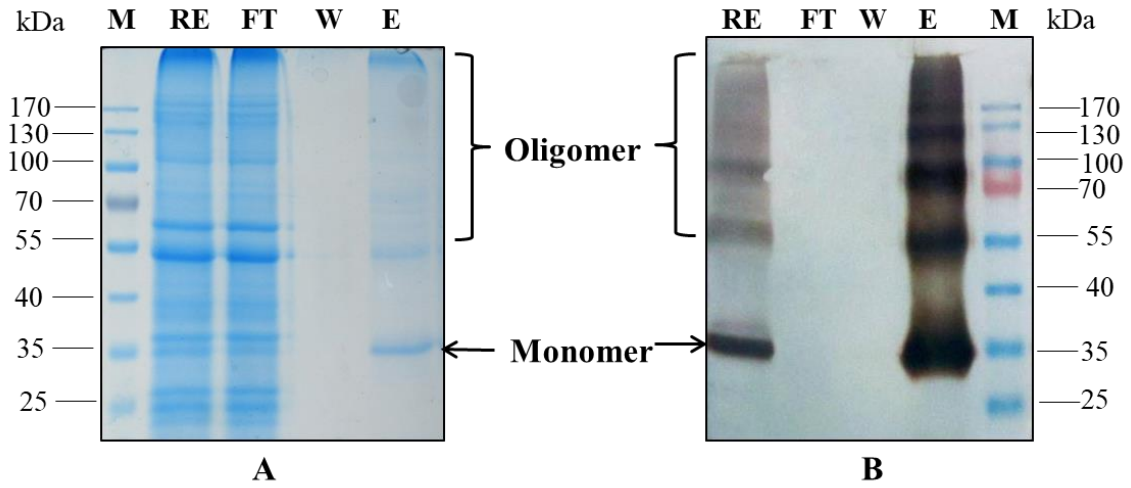
A. Hình ảnh cây thuốc lá 6 ngày sau khi biến nạp. B. Kiểm tra sự biểu hiện tạm thời của protein COE/G1a-pII bằng Western blot. Protein hòa tan tổng số (11,25 µg) được chiết từ lá thuốc lá *N. benthamiana* không chuyển gen (WT) hoặc lá thuốc lá *N. benthamiana* chuyển gen tạm thời biểu hiện protein COE/G1a-pII và protein chuẩn anti-TNFα-nanobody-ELP (0,1; 0,2; 0,4; 0,8 µg protein) được phân tách bởi SDS-PAGE. Kháng thể kháng c-myc được sử dụng làm kháng thể sơ cấp.

Chủng *A. tumefaciens* mang vector chứa HcPro và chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE/G1a-pII tái tổ hợp được nuôi lỏng, thu nhận và pha loãng về giá trị OD_{600} là 1,0. Hỗn hợp dịch khuẩn được đồng biến nạp vào lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 6-7 tuần tuổi. Sáu ngày sau khi biến nạp, lá thuốc lá được thu nhận (Hình 3.2A). Sự tích lũy của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE và phản ứng Western blot. Kết quả chứng tỏ kháng nguyên COE/G1a-pII đã được tích lũy thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana,* thể hiện ở băng trên màng có kích thước lớn hơn 35 kDa (Hình 3.2B). Khối lượng phân tử của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp dạng monomer theo tính toán lý thuyết là 26 kDa, tuy nhiên, khối lượng phân tử thực tế thu được của kháng nguyên COE/G1a-pII dạng monomer là lớn hơn 35 kDa. Có sự chênh lệch giữa khối lượng lý thuyết và thực tế của kháng nguyên COE/G1a-pII có thể là do ảnh hưởng của glycosyl hóa trên protein COE/G1a làm ảnh hưởng đến sự di chuyển và phân tách của kháng nguyên trong quá trình điện di SDS-PAGE. Có 18 vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G1a được dự đoán (Phụ lục 7). Kháng nguyên COE/G1a-pII không được phát hiện trong lá thuốc lá *N. benthamiana* không chuyển gen (WT).

Mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp trong thực vật được bán định lượng bằng Western blot (Hình 3.2B). Hàm lượng kết hợp với tín hiệu của các băng chuẩn của anti-TNFα-nanobody-ELP [155] trên màng được sử dụng để xây dựng đường chuẩn tính hàm lượng bằng phần mềm ImageJ. Sau khi định lượng, mức độ biểu hiện của kháng nguyên COE/G1a-pII trong lá thuốc lá đạt xấp xỉ 234 mg/kg lá tươi, chiếm khoảng 4 % protein tan tổng số (TSP). Sự tích lũy của protein COE/G1a trong cây thuốc lá *N. benthamiana* có thể đã được tăng cường đáng kể thông qua quá trình tối ưu mã biểu hiện và sử dụng hệ thống biểu hiện mạnh.

3.1.3. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G1a-pII

3.1.3.1. Tinh sạch kháng nguyên COE/G1a-pII bằng IMAC



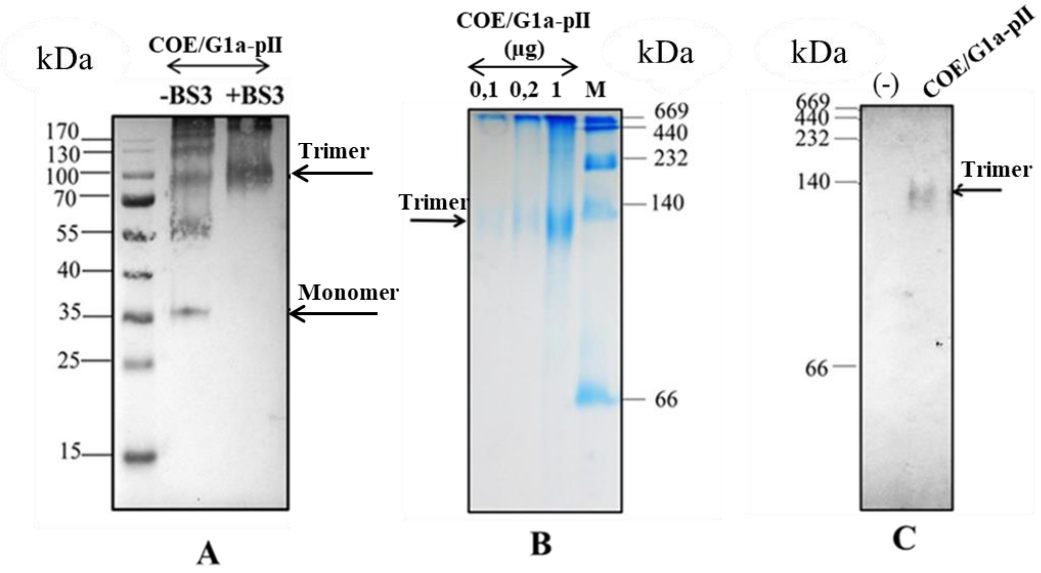
Hình 3.3. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A) và Western blot (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G1a-pII bằng IMAC.
RE: Dịch chiết thô; FT: dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột; W: dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa; E: Kháng nguyên tinh sạch. 30 µg protein tan tổng số của RE, FT, W và 30 µl kháng nguyên tinh sạch được phân tách trên gel SDS-PAGE.

Để tinh sạch kháng nguyên COE/G1a-pII từ lá *N. benthamiana*, dịch chiết thuốc lá có chứa kháng nguyên COE/G1a-pII được ủ với Ni Sepharose Fast Flow. Ở bước rửa loại bỏ các protein tạp, đệm rửa có bổ sung imidazole 30 mM được sử dụng. Nồng độ imidazole 30 mM trong đệm rửa cũng đã được sử dụng để tinh sạch các kháng nguyên khác như H7-GCN4pII [143]. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch bằng sắc ký ái lực IMAC của kháng nguyên COE/G1a-pII từ thực vật bao gồm dịch chiết thô (RE), dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột (FT), dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa (W) và phân đoạn chứa kháng nguyên tinh sạch (E) được thu nhận để phân tích. Nồng độ protein tan tổng số trong các phân đoạn được đo bằng phương pháp Bradford. Sự hiện diện của kháng nguyên COE/G1a-pII trong các phân đoạn này được kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE, nhuộm bằng Coomassie

Blue và đánh giá bằng Western blot (Hình 3.3). Các kết quả thể hiện kháng nguyên COE/G1a-pII không có mặt ở các phân đoạn FT và W, điều này chứng tỏ kháng nguyên COE/G1a-pII đã bám tốt với Ni Sepharose Fast Flow. Kháng nguyên COE/G1a-pII tinh sạch thu được sau khi rửa giải cột có hàm lượng và độ sạch cao. Như vậy, đã tinh sạch thành công kháng nguyên COE/G1a-pII từ lá thuốc lá bằng phương pháp IMAC.

Dựa vào kết quả đo protein tổng số bằng Bradford và kết quả bán định lượng bằng Western blot, kháng nguyên COE/G1a-pII được xác định có độ tinh khiết đạt xấp xỉ 85%, với hiệu suất thu hồi kháng nguyên COE/G1a-pII từ dịch chiết thực vật sau tinh sạch IMAC đạt xấp xỉ 35%.

3.1.3.2. Phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G1a-pII bằng phản ứng liên kết chéo và điện di không biến tính



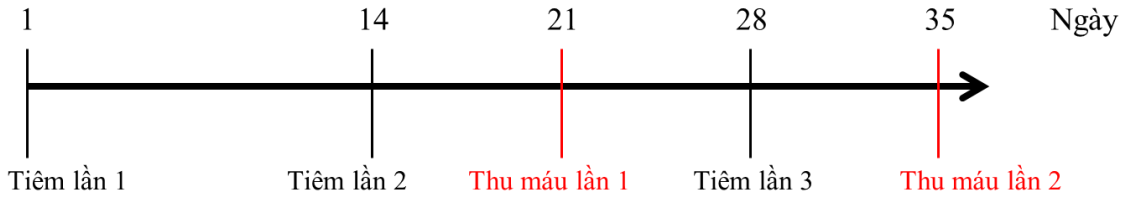
Hình 3.4. Xác định đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G1a-pII dựa vào phản ứng liên kết chéo (A) và điện di không biến tính (B) và Western blot (C). (–) và (+) BS3: sự hiện diện của BS3 ở nồng độ 0 và 5 mM. A. Sản phẩm được phân tách trên SDS-PAGE dưới điều kiện biến tính, chuyển màng và phát hiện sử dụng kháng thể kháng c-myc. B. Kháng nguyên COE/G1a-pII (0,1; 0,2: 1 µg) được phân tách trên gel không biến tính 4-15%, sau đó được nhuộm Coomassie blue và Western blot. (C). (-): Đối chứng âm là PBS.

Trạng thái oligomer của kháng nguyên COE/G1a-pII được đánh giá thông qua phản ứng liên kết chéo sử dụng BS3 (Hình 3.4A), điện di không biến tính và Western blot (Hình 3.4B, C). Bissulfosuccinimidyl suberate (BS3) là một chất liên kết ngang giữa amin với amin có chức năng đồng phân, hòa tan trong nước, không phân cắt và không thấm qua màng. BS3 chứa một este N-hydroxysulfosuccinimide (NHS) phản ứng amin ở mỗi đầu của nhánh đệm carbon-8. NHS este phản ứng với các amin bậc một ở pH 7-9 để tạo thành các liên kết amit ổn định, cùng với việc giải

phóng nhóm rời N-hydroxysulfosuccinimide. Kháng nguyên thường có một số amin bậc một trong chuỗi bên của gốc lysine (K) và đầu tận cùng N của mỗi polypeptit nên chúng là mục tiêu cho thuốc thử liên kết ngang NHS-este. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot cho thấy xuất hiện băng khoảng 100 kDa, tương đương kích thước kháng nguyên COE/G1a dạng trimer dưới sự hiện diện của BS3, điều này chứng tỏ kháng nguyên COE/G1a trimer đã được tạo thành khi dung hợp COE/G1a với motif pII.

3.1.4. Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII tái tổ hợp trên chuột

Với mục tiêu sản xuất vacxin phòng PEDV có giá thành rẻ, việc giảm thiểu/loại bỏ các chi phí trong quá trình sản xuất vacxin, đặc biệt là chi phí liên quan đến quá trình tinh sạch kháng nguyên là rất cần thiết. Do vậy, dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên hòa tan tổng số trong đó có biểu hiện kháng nguyên COE/G1a-pII được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch. Dịch chiết thực vật được bảo quản ở 4 ^{o}C trong sáu ngày. Thật thú vị, kết quả phân tích Western blot cho thấy hàm lượng kháng nguyên COE/G1a-pII vẫn được giữ ổn định sau sáu ngày lưu trữ ở 4 ^{o}C (Phụ lục 8). Khả năng gây đáp ứng miễn dịch của dịch chiết thực vật từ cây thuốc lá không chuyển gen (đối chứng âm, G1), vacxin thương mại CTC Vacc PED (Hàn Quốc) chứa chủng PEDV DR13 nhược độc (G2), dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII (G2) được đánh giá trên chuột. Mỗi con chuột được tiêm với 18,76 µg kháng nguyên COE (được xác định hàm lượng bằng Western blot dựa vào đường chuẩn được xây dựng từ protein anti-TNFα-nanobody-ELP đã biết rõ nồng độ). Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII trên chuột được trình bày ở Hình 3.5.

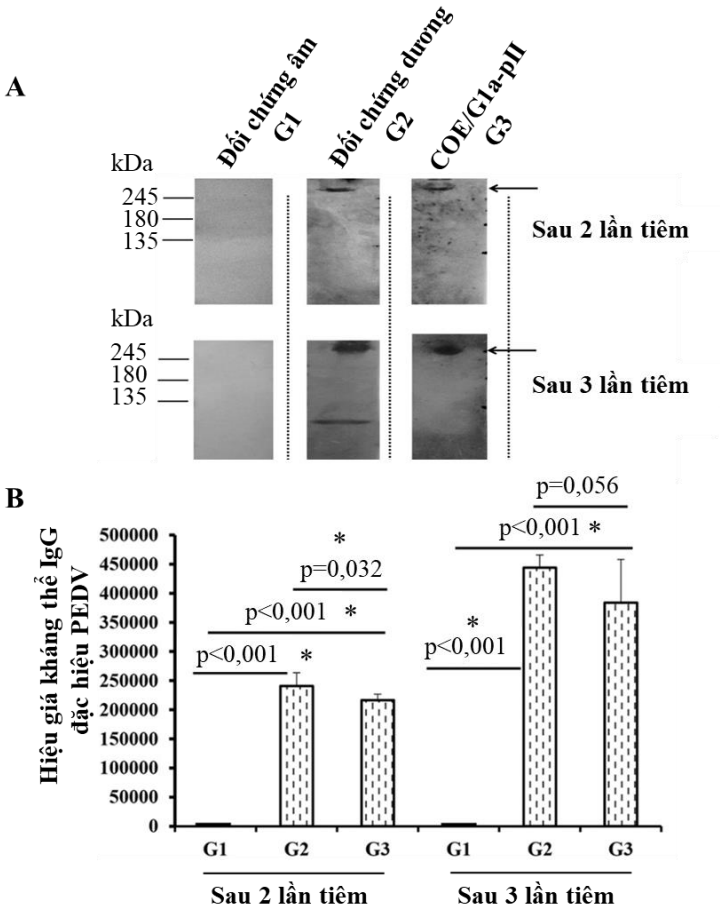


Hình 3.5. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột với kháng nguyên COE/G1a

Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG, IgA và IgM đặc hiệu PEDV

Khả năng kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của chuột sau khi gây đáp ứng miễn dịch được xác nhận ở bằng phản ứng Western blot và ELISA. Kháng nguyên PEDV DR13 tinh sạch được phân tách trên SDS-PAGE và phát hiện bằng Western blot.

Kết quả Western blot cho thấy có một băng có kích thước trên 245 kDa được phát hiện ở huyết thanh của nhóm chuột G2 (đã được tiêm vacxin thương mại phòng PEDV) và nhóm G3 (được tiêm bằng chiết xuất thô có chứa COE/G1a-pII) sau 2 lần tiêm và 3 lần tiêm. Băng này có kích thước lớn hơn kích thước về mặt lý thuyết của protein S PEDV (151,38 kDa). Điều này có thể được giải thích là do ảnh hưởng của các vị trí N-glycosyl hóa đến quá trình phân tách protein S của PEDV trong quá trình điện di. Ngoài ra, kết quả Western blot cho thấy đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu với PEDV ở nhóm chuột G2 và G3 tăng mạnh sau lần tiêm thứ 3. Ngược lại, kháng thể IgG đặc hiệu PEDV không được phát hiện ở nhóm chuột G1 được tiêm dịch chiết xuất từ cây thuốc lá không chuyển gen (Hình 3.6A).

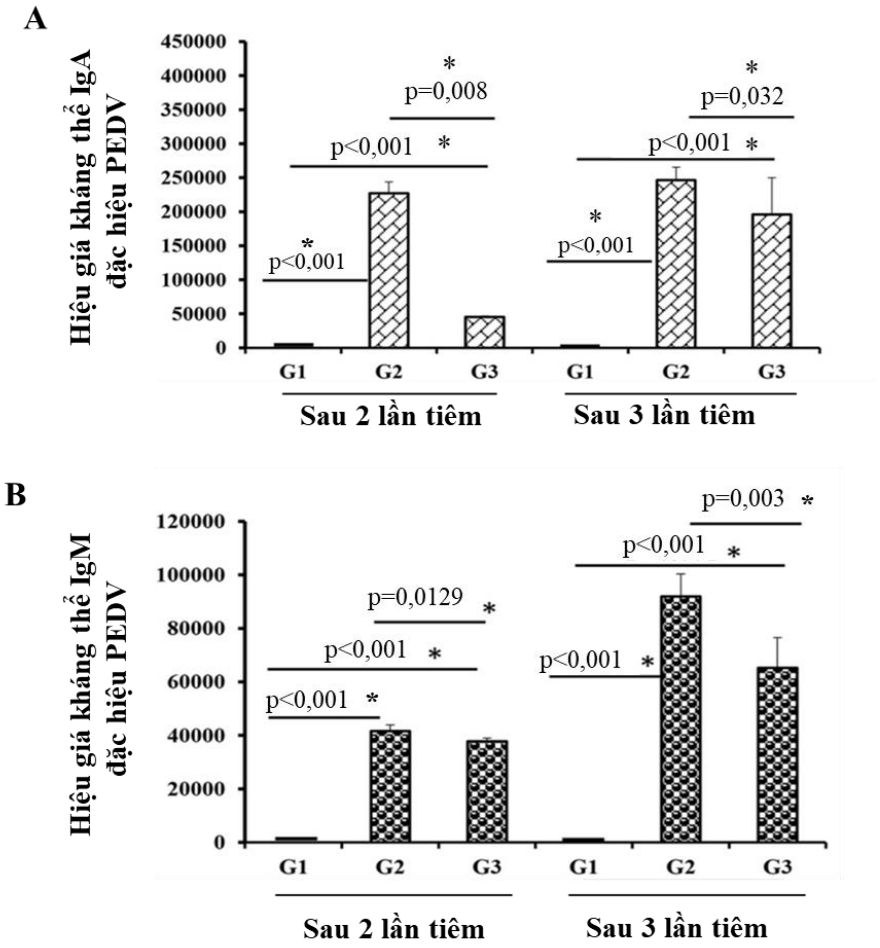


Hình 3.6. Phân tích đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV ở chuột được tiêm bằng phản ứng Western blot (A) và ELISA (B).

A. PEDV DR13 tinh sạch được phân tách trên SDS-PAGE gel và được phát hiện bằng huyết thanh hỗn hợp các của nhóm chuột được tiêm với dịch chiết của cây không chuyển gen (G1), vacxin thương mại (G2) và dịch chiết thực vật chứa COE/G1a-pII (G3). B. Hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong mỗi nhóm huyết thanh chuột được thể hiện dưới dạng hiệu giá trung bình hình học của mỗi nhóm. Hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu PEDV của các nhóm huyết thanh chuột được phân tích thống kê và so sánh sử dụng t-test (SigmaPlot) và được thể hiện trên hình. * p< 0,05 : khác biệt có ý nghĩa thống kê

Ngoài ra, đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong các nhóm chuột được đánh giá bằng phản ứng ELISA. Kết quả ELISA chứng tỏ sau 2 lần tiêm, có

sự khác biệt về mặt thống kê trong hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong nhóm chuột G3 tiêm dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII và nhóm chuột G2 tiêm vacxin thương mại. Tuy nhiên, sau 3 lần tiêm, không có sự khác biệt về mặt thống kê trong hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu PEDV ở hai nhóm trên, với giá trị p=0,056> 0,05. Do đó, dịch chiết xuất thô thực vật có chứa kháng nguyên COE/G1a-pII có mức độ kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV DR13 tương tự như của vacxin thương mại sau khi mũi tiêm thứ ba. Hiệu giá kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong nhóm chuột G3 gây đáp ứng miễn dịch với dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII ở ngày 21 và ngày 35 sau tiêm lần lượt đạt 1: 1:216178; 1:383711 (Hình 3.6B).



Hình 3.7. Xác định mức độ đáp ứng sinh kháng thể IgA (A) và IgM (B) đặc hiệu với PEDV thông qua phản ứng ELISA

A. Hiệu giá kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong mỗi nhóm huyết thanh chuột được thể hiện dưới dạng hiệu giá trung bình hình học của năm con chuột của mỗi nhóm được tiêm đối chứng âm (dịch chiết thô, G1) hoặc đối chứng dương tính (vacxin thương mại, G2) hoặc dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII (G3). B. Hiệu giá kháng thể IgM đặc hiệu PEDV của các nhóm huyết thanh chuột được phân tích thống kê và so sánh sử dụng t-test (SigmaPlot) và được thể hiện trên hình. * p < 0,05: khác biệt có ý nghĩa thống kê

Về đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV, kết quả ELISA cho thấy sau 2 lần tiêm và 3 lần tiêm đều có sự khác biệt về mặt thống kê trong hiệu giá kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm chuột G3 tiêm dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII và nhóm chuột G2 tiêm vacxin thương mại ($p<0,05$). Tuy nhiên, sau lần tiêm thứ 3 có sự thu hẹp về khoảng cách hiệu giá kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong hai nhóm chuột G2 và G3. Mức độ đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm chuột G3 thấp hơn so với ở nhóm chuột G2. Hiệu giá kháng thể IgA đặc hiệu PEDV của nhóm chuột G3 được gây đáp ứng với dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII ở ngày thứ 21 và 35 sau tiêm lần tiêm lần lượt đạt 1: 1:45429; 1:195985 (Hình 3.7A).

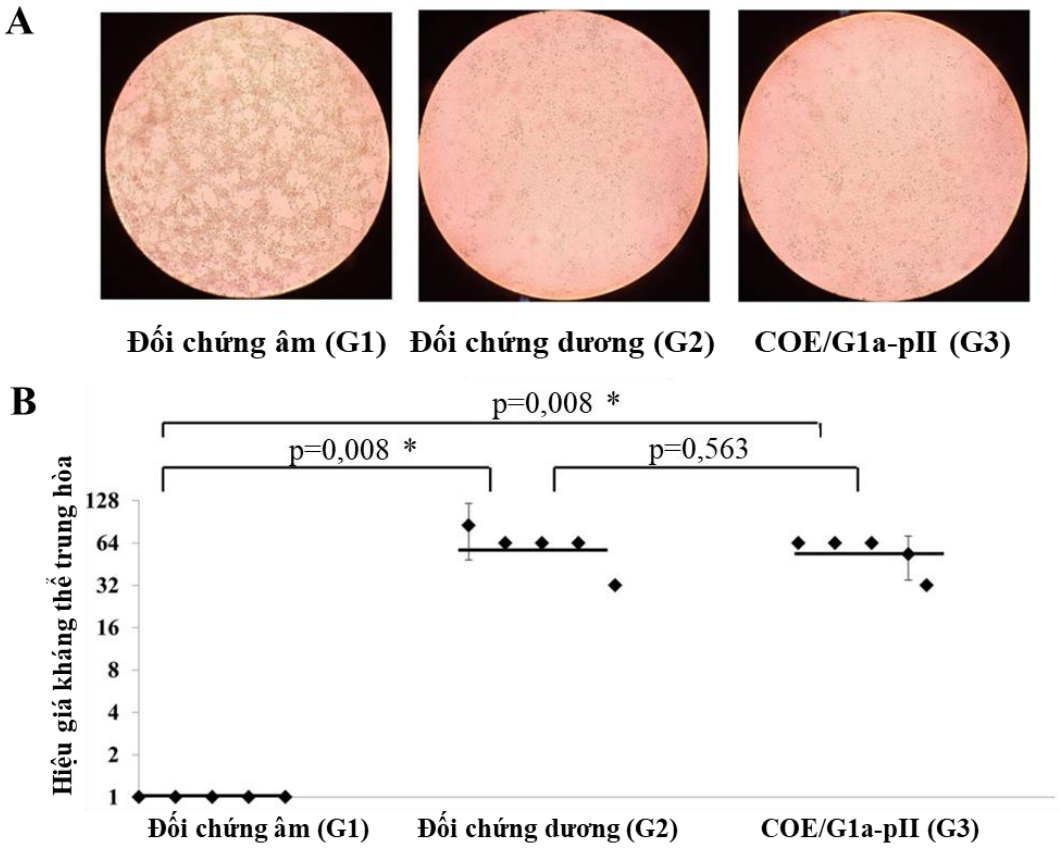
Về đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV, kết quả ELISA cũng cho thấy sau 2 lần tiêm và 3 lần tiêm đều có sự khác biệt về mặt thống kê trong hiệu giá kháng thể IgM đặc hiệu PEDV trong nhóm chuột nhóm chuột G3 tiêm dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII và nhóm chuột G2 tiêm vacxin thương mại ($p<0,05$). Tuy nhiên, sau lần tiêm thứ 3 khoảng cách hiệu giá kháng thể IgM đặc hiệu PEDV trong hai nhóm chuột G2 và G3 cũng được thu hẹp. Mức độ đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV ở nhóm chuột G3 thấp hơn so với ở nhóm chuột G2. Hiệu giá kháng thể IgM đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của nhóm chuột G3 tiêm dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII ở ngày 21 và 35 sau tiêm lần lượt đạt 1:37801; 1:65198 (Hình 3.7B).

So với đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA và IgM đặc hiệu PEDV được sản sinh ở huyết thanh của các nhóm chuột G2 và G3, đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được sinh mạnh nhất. Điều này có thể được giải thích bởi đường tiêm được sử dụng để đưa các ứng viên vacxin vào chuột là dưới da. Nhìn chung, các kết quả ELISA chứng tỏ dịch chiết thô chứa COE/G1a-pII (G3) và vacxin thương mại (G2) đã kích thích sản sinh mạnh các đáp ứng miễn dịch dịch thể bao gồm kháng thể IgG, IgA và IgM đặc hiệu PEDV ở các ngày 21 và 35 sau tiêm. Các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể đặc hiệu PEDV đều được tăng cường mạnh ở ngày thứ 35 sau tiêm. Trong khi đó, đáp ứng miễn dịch sinh các kháng thể IgG, IgA và IgM đặc hiệu PEDV gần như không được phát hiện ở nhóm chuột G1 được tiêm với dịch chiết của lá thuốc lá *N. benthamiana* không chuyển gen.

Khả năng trung hòa PEDV

Sự hiện diện của các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong các nhóm chuột sau tiêm được kiểm tra thông qua phản ứng trung hòa virus trên tế bào. Bệnh tích trên các tế bào Vero được ghi nhận sử dụng kính điện vi quang học (Hình 3.8A). Hiệu giá kháng thể trung hòa được xác định tại hệ số pha loãng cao nhất của huyết thanh mà không gây ra bệnh tích trên tế bào. Hiệu giá kháng thể trung hòa

của mỗi huyết thanh được thể hiện ở từng điểm màu đen (Hình 3.8B). Đúng như dự đoán, khả năng ức chế PEDV được gây ra bởi các kháng thể trung hòa ở các nhóm chuột đối chứng âm (G1) là rất thấp, với hiệu giá kháng thể trung hòa gần bằng 1. Trong khi đó, các huyết thanh của nhóm chuột được tiêm với dịch chiết thực vật chứa COE/G1a-pII (G3) và vacxin thương mại (G2) đều có khả năng trung hòa PEDV, thể hiện ở hiệu giá kháng thể trung hòa lần lượt đạt 57,6 và 61,86. Kết quả đánh giá khả năng trung hòa PEDV chứng tỏ hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV trong huyết thanh của nhóm chuột được gây đáp ứng với dịch chiết thực vật có chứa COE/G1a-pII và những con chuột được gây đáp ứng với vacxin thương mại chứa chủng PEDV DR13 nhược độc là không có sự khác biệt về mặt thống kê, với giá trị p là 0,187. Vì vậy, các kết quả này cho thấy dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII đã kích thích sinh đáp ứng miễn dịch và sinh các kháng thể trung hòa với hiệu giá tương tự như vacxin thương mại CTC Vacc PED (Hàn Quốc) phòng ngừa chủng PEDV DR13.



Hình 3.8. Kết quả đánh giá khả năng sinh các kháng thể trung hòa PEDV ở các nhóm chuột được tiêm bằng phản ứng trung hòa virus trên tế bào

A. Hình ảnh bệnh tích tế bào được ghi nhận bằng kính hiển vi quang học. B. Hiệu giá kháng thể trung hòa ở các nhóm chuột được tiêm. p<0,05: sai khác có ý nghĩa thống kê.

Những kết quả này cho thấy dịch chiết thực vật có chứa proten COE/G1a-pII có thể là một ứng viên vacxin đầy hứa hẹn chống lại sự xây nhiễm của chủng PEDV

G1a. Tuy nhiên, gần đây, chủng PEDV thuộc kiểu gen G2 được phát hiện là tác nhân chủ yếu gây ra đợt dịch PED tại Việt Nam. Do vậy, phần tiếp theo của luận án tập trung vào việc tạo và đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp từ chủng PEDV độc lực cao thuộc G2 xuất hiện ở Việt Nam.

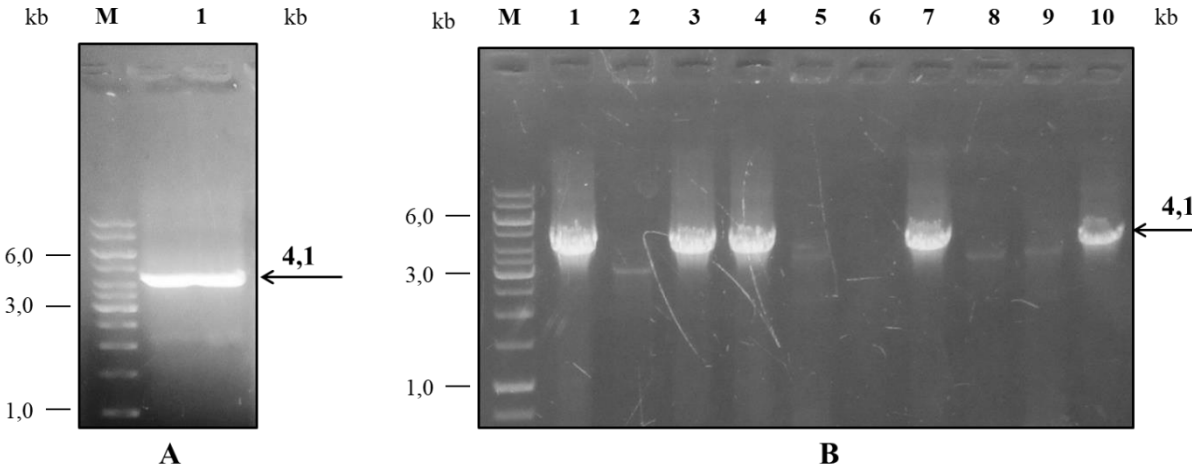
3.2. Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G2a gây bệnh tại Việt Nam

3.2.1. Thu thập thông tin, lựa chọn và tách dòng gen mã hóa protein S của chủng PEDV gây bệnh tại Việt Nam

Trình tự gen mã hóa protein S của các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam được tìm kiếm. Sau khi tìm kiếm các trình tự gen mã hóa kháng nguyên S của PEDV trên ngân hàng gen NCBI, 64 trình tự gen mã hóa kháng nguyên S của các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam được thu nhận. Kết quả xây dựng cây phả hệ kết hợp với các dữ liệu nghiên cứu về phân loại kiểu gen của các chủng PEDV đang gây bệnh tại Việt Nam của các tác giả Than Van Thai và cộng sự, 2020 [4], các chủng PEDV xuất hiện ở Việt Nam được phân thành các nhóm như G1b, G2a và G2b. Trong 64 trình tự gen mã hóa protein S của PEDV tại Việt Nam, có 35 trình tự (chiếm 54,7%) thuộc nhóm G2a, 23 trình tự (chiếm 35,9%) thuộc nhóm G2b, 08 trình tự thuộc nhóm G1b (12,5%). Như vậy, các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam chủ yếu thuộc nhóm G2. Danh sách các trình tự gen mã hóa protein S của các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam sau khi phân loại theo nhóm kiểu gen được liệt kê ở Phụ lục 1. Các trình tự gen mã hóa protein S của các chủng PEDV tại Việt Nam được căn trình tự sử dụng phần mềm MegAlign, DNA star để tìm trình tự bảo tồn. Trình tự bảo tồn sau căn tất cả các trình tự gen mã hóa protein S của các chủng PEDV tại Việt Nam được sử dụng để thiết kế mồi bảo thủ.

Trong khuôn khổ của luận án, chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao được lựa chọn để phục vụ nghiên cứu tiếp theo. Chủng này đã được phân lập và nhân nuôi thành công tại Công ty cổ phần thuốc thú y trung ương NAVETCO, Việt Nam. Vùng gen mã hóa toàn bộ protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao được khuếch đại sử dụng các cặp mồi được liệt kê ở Bảng 2.2. Sản phẩm PCR khuếch đại toàn bộ gen S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được trình bày ở Hình 3.9A. Kết quả chứng tỏ sản phẩm PCR có băng sáng với kích thước theo đúng tính toán lý thuyết là khoảng 4,1 kb. Sản phẩm PCR chứa gen S được tinh sạch, sau đó gắn vào vector pJET. Sản phẩm PCR được chèn vào vector pJET-S. Kết quả kiểm tra bằng colony-PCR với các dòng khuẩn chứa plasmid pJET-S được thể hiện ở Hình 3.9B. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR cho thấy băng 4,1 kb xuất hiện ở 5 dòng khuẩn số 1, 3, 4, 7 và 10. Ba dòng khuẩn số 1, 3 và 4 mang

vector pJET-S được nuôi lỏng và tách plasmid phục vụ đọc trình tự 2 chiều bằng phương pháp Sanger sử dụng các mồi được liệt kê ở Bảng 2.2.



Hình 3.9. Kết quả tách dòng gen mã hóa protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010

A. Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen mã hóa protein S của chủng PEDV NAVET/PS6/2010. B. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra các dòng khuẩn lạc mang vector pJET-S. 1-10: các dòng khuẩn lạc số 1-10 được kiểm tra

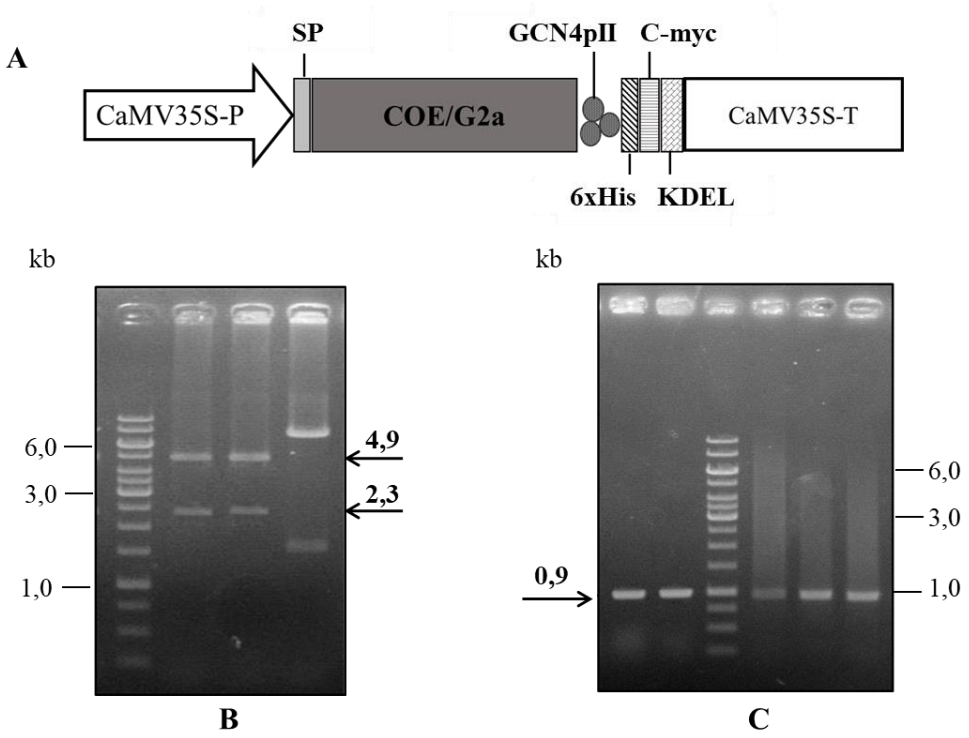
Sau khi xử lý các trình tự thu được từ giải trình tự bằng phần mềm Bioedit và DNAstar, trình tự gen mã hóa protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được lắp ráp và hoàn thiện (dữ liệu không công bố). Cây phả hệ được xây dựng dựa vào trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010, một số các trình tự PEDV ở Việt Nam và trên thế giới được thể hiện ở Phụ lục 9. Từ kết quả xây dựng cây phả hệ dựa vào trình tự gen mã hóa protein S cho thấy chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao thuộc kiểu gen G2a.

3.2.2. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng

Trong mục 3.1, dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII đã kích thích sinh kháng thể trung hòa PEDV tương đương với vacxin thương mại. Kế thừa kết quả trên, trong nội dung nghiên cứu này, chúng tôi muốn chứng minh liệu có thể tạo ra một biến thể COE từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 (COE/G2a) có khả năng gây đáp ứng miễn dịch tốt hay không? Do vậy, đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a từ aa 499 đến aa 638 của protein S từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được lựa chọn để phục vụ nghiên cứu.

Khi so sánh với gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a, trình tự nucleotit và aa của COE/G2a có độ tương đồng lần lượt là 95,7% (Phụ lục 10, 11) và 96,4% (Phụ lục 12, 13). Trình tự nucleotit của gen mã hóa kháng nguyên COE/2a được tối ưu mã biểu hiện ở *N. benthamiana* nhờ công cụ được cung cấp bởi Genewiz (USA). Các mã di truyền được thay đổi trình tự nucleotit sao cho thích hợp để biểu hiện

kháng nguyên COE/G2a trong hệ thống cây thuốc lá *N. benthamiana* nhưng trình tự aa không thay đổi. Trước và sau khi đổi mã di truyền, trình tự nucleotit (Phụ lục 14) và trình tự aa (Phụ lục 15) của các đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a được so sánh bằng phần mềm BioEdit. Kết quả chứng tỏ sau khi đổi mã, mặc dầu có một số sự biến đổi trong trình tự nucleotit của gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a, trình tự aa của kháng nguyên COE/G2a là không thay đổi so với trước khi đổi mã. Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit của kháng nguyên COE/G1a và kháng nguyên COE/G2a sau khi đổi mã là 75,5% (Phụ lục 16).



Hình 3.10. Kết quả thiết kế vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII và tạo chủng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tương ứng

A. Sơ đồ cassette biểu hiện gen. CaMV35S-P: promoter 35S từ CaMV. SP: peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa. KDEL: peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt. CaMV35S-T: terminator từ CaMV. B. Điện di đồ sản phẩm cắt với enzyme *Nco*I kiểm tra các plasmid pCB301 từ *E. coli* mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII. 1-3: các plasmid số 1-3 được kiểm tra. C. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra các dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-5: các khuẩn lạc số 1-5 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a được chèn vào vector pRTRA-pII tại vị trí enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. Các dòng khuẩn lạc mang vector pRTRA tái tổ hợp được kiểm tra bằng colony-PCR (Phụ lục 17A) và xử lý với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI (Phụ lục 17B). Các kết quả cho thấy sản phẩm cắt thu được có băng với kích thước đúng so với tính toán lý thuyết. Do vậy, vector tách dòng pRTRA-COE/G2a-pII đã được thiết kế thành công. Sơ đồ vector tách dòng chứa gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII được thể hiện ở Phụ lục 18. Tiếp tục, để thiết kế vector

biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa COE/G2a, plasmid pRTRA-COE/G2a-pII được xử lý bằng enzyme *Hin*dIII. Cassette biểu hiện mang đoạn gen mã hóa COE/G2a-pII được thu nhận. Sơ đồ cassette biểu hiện chứa gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII (hoặc tên khác trong bài báo là COE/PS6 trimer) được thể hiện ở Hình 3.10A.

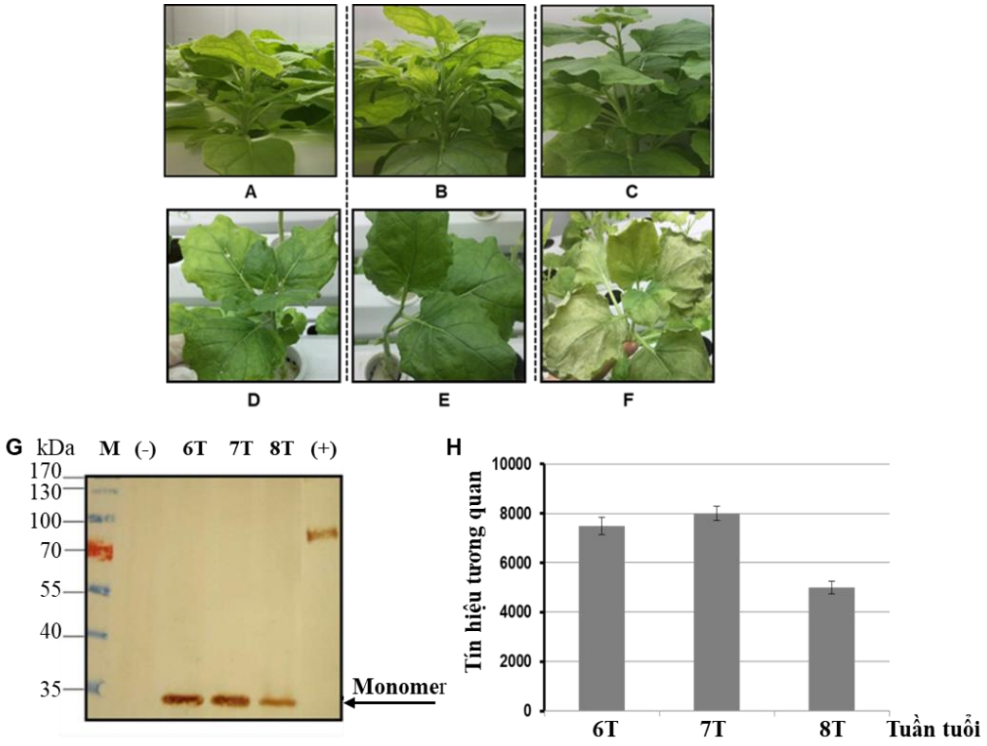
Đoạn gen này sau đó được nối ghép vào vector pCB301 đã được xử lý *Hin*dIII và *SAP*. Các plasmid chứa vector pCB301 tái tổ hợp (viết tắt là pCB301-COE/G2a-pII) được chọn lọc bằng cách xử lý với enzyme *Nco*I (Hình 3.10B). Kết quả chứng tỏ dòng khuẩn số 1 và số 2 chứa plasmid tái tổ hợp khi có 2 băng có kích thước khoảng 4,9 kb và 2,3 kb, đúng so với kích thước lý thuyết được tính toán. Kết quả phân tích trình tự chứng tỏ không có sự sai khác trong trình tự COE/G2a trong các plasmid pCB301 tái tổ hợp so với trình tự COE/G2a ban đầu. Như vậy, vector biểu hiện pCB301-COE/G2a-pII đã được tạo thành công. Plasmid pCB301-COE/G2a-pII số 2 được biến nạp vào tế bào *A. tumefaciens* AGL1. Để chọn dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 mong muốn, phản ứng colony-PCR với cặp mồi 35S-SQF và 35STerm được tiến hành. Kết quả chứng tỏ cả 5 dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 đều có băng theo kích thước lý thuyết được tính toán là khoảng 0,9 kb (Hình 3.10C). Như vậy dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE/G2a-pII đã được tạo thành công. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE/G2a-pII được thể hiện ở Phụ lục 19.

3.2.3. Biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII tạm thời trong lá thuốc lá N. benthamiana

Ban đầu, quy trình biểu hiện của kháng nguyên COE/G2a-pII tạm thời trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được tiến hành theo quy trình biểu hiện của kháng nguyên COE/G1a-pII. Tuy nhiên, chỉ ba ngày sau khi biến nạp hỗn hợp dịch khuẩn chứa chủng *A. tumefaciens* mang vector chứa HcPro và chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE/G2a-pII tái tổ hợp với giá trị OD_{600} 1,0 vào lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 6-7 tuần tuổi, toàn bộ lá thuốc lá *N. benthamiana* bị vàng và héo úa. Do vậy, các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên COE/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được khảo sát. Các điều kiện thích hợp cho sự biểu hiện của kháng nguyên COE/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana* bao gồm tuổi cây thuốc lá thủy canh, giá trị OD_{600} của dịch khuẩn, số ngày thu lá sau biến nạp được nghiên cứu.

Quan sát về mặt hình thái lá của cây thuốc lá *N. benthamiana* ở các tuần tuổi khác nhau tính từ lúc gieo hạt (6, 7, 8 tuần tuổi, Hình 3.11A-C) cho thấy, sau khi biến nạp lá cây vẫn xanh tươi khi cây ở tuần tuổi thứ 6 và thứ 7, ngược lại lá bị vàng và héo khi biến nạp vào cây ở tuần tuổi thứ 8 (Hình 3.11D-F). Kết quả phân

tích Western blot cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII đã biểu hiện trong lá thuốc lá, với băng kháng nguyên có kích thước gần 35 kDa, kích thước này cao hơn kích thước tính toán lý thuyết (26 kDa) có thể do ảnh hưởng của glycosyl hóa. Có 19 vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G2a được dự đoán (Phụ lục 20). Phân tích độ đậm nhạt của các băng kháng nguyên COE/G2a-pII sử dụng phần mềm ImageJ chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII biểu hiện cao nhất ở tuần tuổi thứ 7 (Hình 3.11G, H). Do vậy, độ tuổi của cây thuốc lá *N. benthamiana* được trồng thủy canh phù hợp để biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII là 7 tuần tuổi.

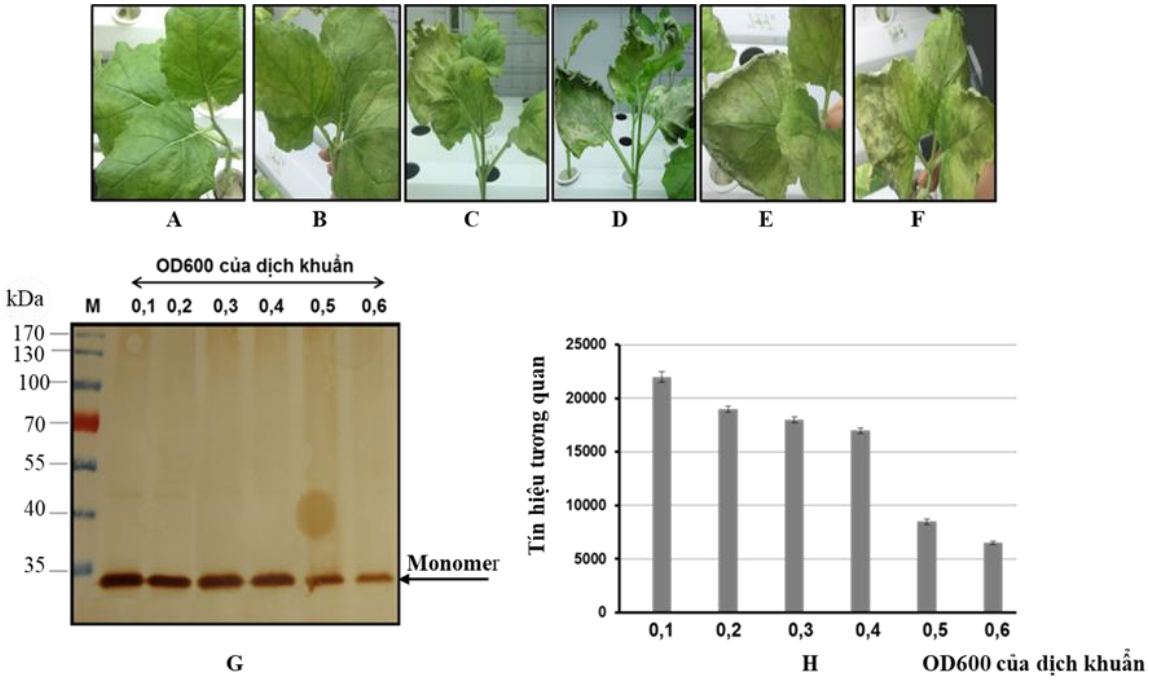


Hình 3.11. Kết quả tối ưu tuổi cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh được sử dụng cho biểu hiện của protein COE/G2a-pII.

A-C: cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 6 tuần tuổi, 7 tuần tuổi và 8 tuần tuổi trước khi biến nạp. D-F: cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 6 tuần tuổi, 7 tuần tuổi và 8 tuần tuổi sau khi biến nạp chủng khuẩn *A. tumefaciens* mang gen mã hóa protein COE/G2a-pII. G: Kiểm tra sự tích lũy của protein COE/G2a-pII trong lá thuốc lá ở các độ tuổi cây khác nhau bằng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc: (-): dịch chiết cây thuốc lá không chuyển gen, (+): protein H5-pII. H. Phân tích tín hiệu tương quan giữa các băng protein COE/G2a-pII bằng phần mềm ImageJ sử dụng ảnh Western blot.

Giá trị OD_{600} của dịch vi khuẩn phản ánh mật độ vi khuẩn trong dung dịch được sử dụng cho biến nạp là một yếu tố quan trọng tiếp theo cần phải được tối ưu trong quá trình biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá. Để biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII ở mức độ cao, nhiều giá trị OD_{600} của dịch vi khuẩn được kiểm tra bao gồm 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6. Quan sát về mặt hình thái của lá sau khi biến nạp cho thấy, lá chỉ xanh tươi khi sử dụng dịch khuẩn có giá trị OD_{600} 0,1 - 0,2, ngược lại khi sử dụng dịch vi khuẩn với giá trị OD_{600} trong khoảng 0,3 đến 0,6, lá bị

vàng và héo chỉ 3 ngày sau khi biến nạp (Hình 3.12A-F). Mức độ vàng và héo của lá tăng lên khi sử dụng dịch khuẩn có giá trị OD_{600} tăng dần. Khối lượng lá tươi thu được bị giảm khi lá bị vàng và héo. Phân tích sự biểu hiện của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng Western blot và phân tích độ đậm nhạt của các băng kháng nguyên COE/G2a-pII bằng phần mềm ImageJ cho thấy khi tăng nồng độ vi khuẩn trong dung dịch sử dụng cho biến nạp (tăng giá trị OD_{600} từ 0,1 - 0,6) thì kháng nguyên COE/G2a-pII có mức độ tích lũy không tăng lên. Kháng nguyên này có mức độ tích lũy đạt cao nhất khi sử dụng dịch vi khuẩn biến nạp có giá trị OD_{600} 0,1 (Hình 3.12G, H). Kết hợp các dữ liệu trên cho thấy dịch vi khuẩn biến nạp tại OD_{600} 0,1 là thích hợp để biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII.

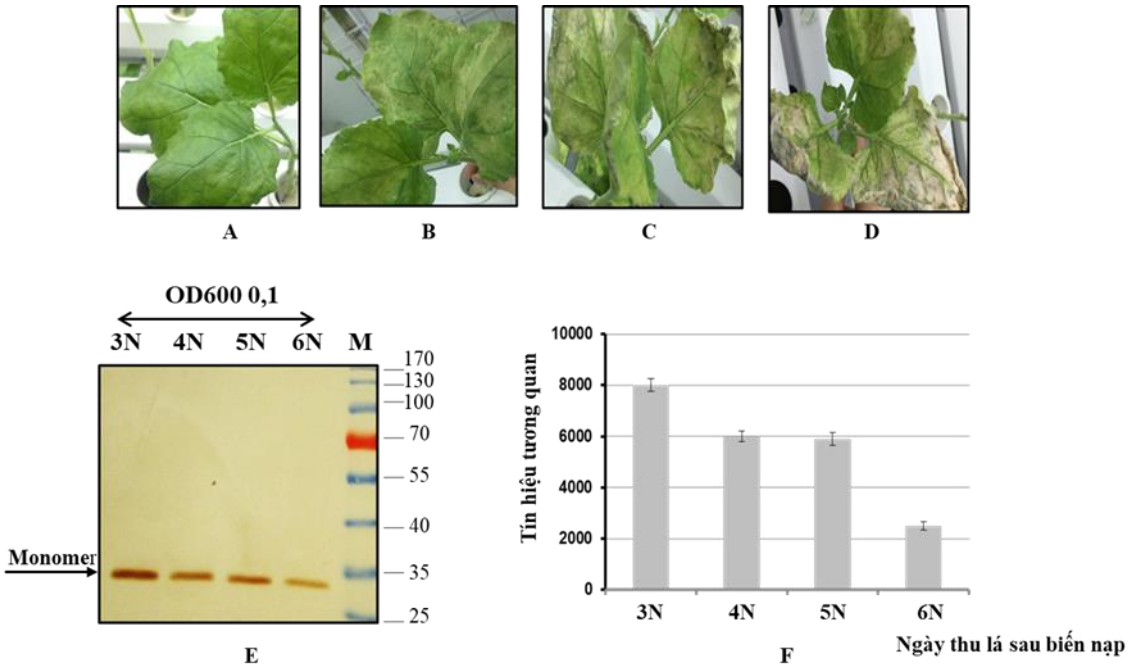


Hình 3.12. Kết quả tối ưu giá trị OD_{600} của dịch khuẩn dùng để biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII trên cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh.

A-F: Lá thuốc lá sau 3 ngày biến nạp các dịch khuẩn *A. tumefaciens* mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII với OD_{600} tương ứng là 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6. G. Đánh giá sự biểu hiện của kháng nguyên COE/G2a-pII trong lá thuốc lá ở các giá trị OD_{600} dịch khuẩn khác nhau bằng Western blot. H. Phân tích tín hiệu tương quan giữa các băng kháng nguyên COE/G2a-pII bằng phần mềm ImageJ.

Trong quá trình biểu hiện kháng nguyên trên hệ thống cây thuốc lá *N. benthamiana* dựa vào phương pháp biểu hiện tạm thời, lá thường có thể được thu trong khoảng thời gian từ 3 đến 6 ngày sau khi biến nạp. Kết quả quan sát hình thái của lá sau khi biến nạp cho thấy, lá sau biến nạp vẫn còn xanh tươi ở ngày thứ 3, sang ngày thứ 4 lá bắt đầu chuyển vàng, và lá bị vàng, héo úa nặng ở các ngày thứ 5 và thứ 6 khi sử dụng dịch vi khuẩn cho biến nạp có giá trị OD_{600} 0,1 (Hình 3.13A-

D). Phát hiện sự tích lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng Western blot và phân tích độ đậm nhạt của các băng kháng nguyên này sử dụng phần mềm ImageJ chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII tích lũy đạt cao nhất tại ngày thứ 3 sau khi biến nạp (Hình 3.13E, F). Như vậy, kháng nguyên COE/G2a-pII có mức độ biểu hiện cao nhất khi sử dụng cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 7 tuần tuổi, dịch vi khuẩn *A. tumefacien*s có giá trị OD_{600} 0,1 và thu lá sau khi biến nạp 3 ngày.



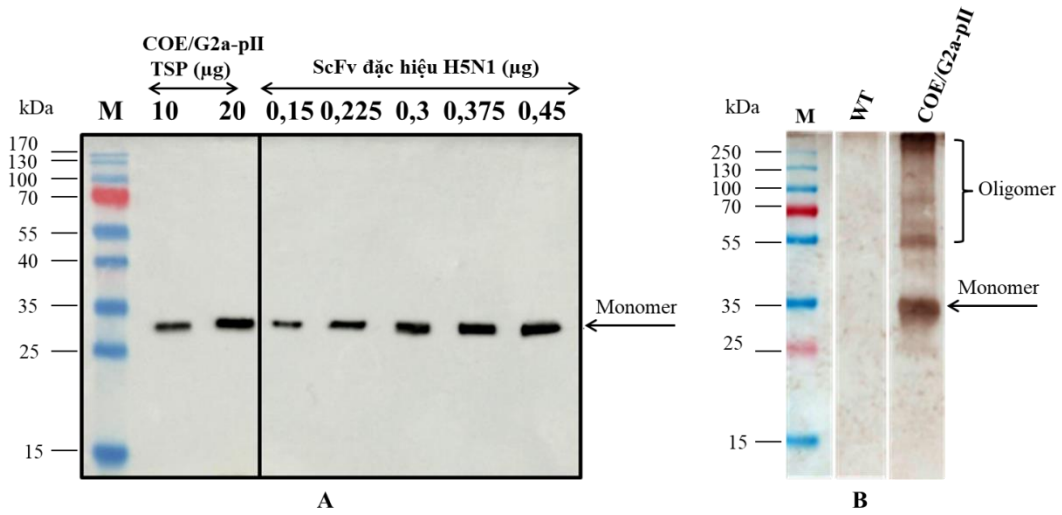
Hình 3.13. Kết quả tối ưu số ngày thu lá sau biến nạp để biểu hiện protein COE/G2a-pII trên cây thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh.

A, B, C, D: Lá thuốc lá sau khi biến nạp dịch khuẩn có giá trị OD_{600} 0,1 được thu tương ứng sau 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày; E. Đánh giá sự biểu hiện của protein COE/G2a-pII trong lá thuốc lá sử dụng dịch khuẩn có giá trị OD_{600} dịch khuẩn 0,1 ở thời gian thu lá khác nhau bằng Western blot. 3N, 4N, 5N, 6N: 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày; F. Phân tích tín hiệu tương quan giữa các băng protein COE/G2a-pII bằng phần mềm ImageJ.

Mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh ở các điều kiện tối ưu được kiểm tra thông qua phản ứng Western blot (Hình 3.14A). Kết quả bán định lượng của Western blot dựa vào đường chuẩn của ScFv đặc hiệu với H5N1 [156] được xây dựng bằng phần mềm ImageQuant TL (Cytiva) cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII tích lũy trong lá thuốc lá ở mức xấp xỉ 118 mg/kg lá tươi, chiếm 2,01% protein tan tổng số. So với mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G1a-pII trong lá thuốc lá, mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII là thấp hơn. Điều này có thể được giải thích bằng sự khác biệt về trình tự nucleotit và trình tự aa của hai biến thể COE. Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit và aa của COE/G2a-pII so với COE/G1a-pII lần lượt là 95,7 và 96,4% (Phụ lục 11, Phụ lục 13). Sau khi tối ưu mã di truyền để phù hợp cho

biểu hiện trong *N. benthamiana*, mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit của hai biến thể COE là 75,5% (Phụ lục 16).

Ngoài ra, sự biểu hiện của kháng nguyên COE/G2a tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh được phát hiện bằng huyết thanh lợn tiêm vacxin Corning (Wuhan Keqian Biology) chứa chủng PEDV AJ1102 dạng vô hoạt (Hình 3.14B). Kết quả Western blot ở Hình 3.14B cho thấy băng được phát hiện trên màng có kích thước theo đúng tính toán lý thuyết là gần 35 kDa. Do đó, protein COE/G2a-pII được sản xuất từ lá thuốc lá *N. benthamiana* có tính kháng nguyên tương tự như kháng nguyên COE của PEDV tự nhiên. Như vậy, protein COE/G2a-pII có tính kháng nguyên tương tự như kháng nguyên COE của PEDV tự nhiên đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh.



Hình 3.14. Kiểm tra sự tích lũy của protein COE/G2a-pII bằng Western blot sau khi biến nạp vào lá thuốc lá *N. benthamiana* ở điều kiện tối ưu

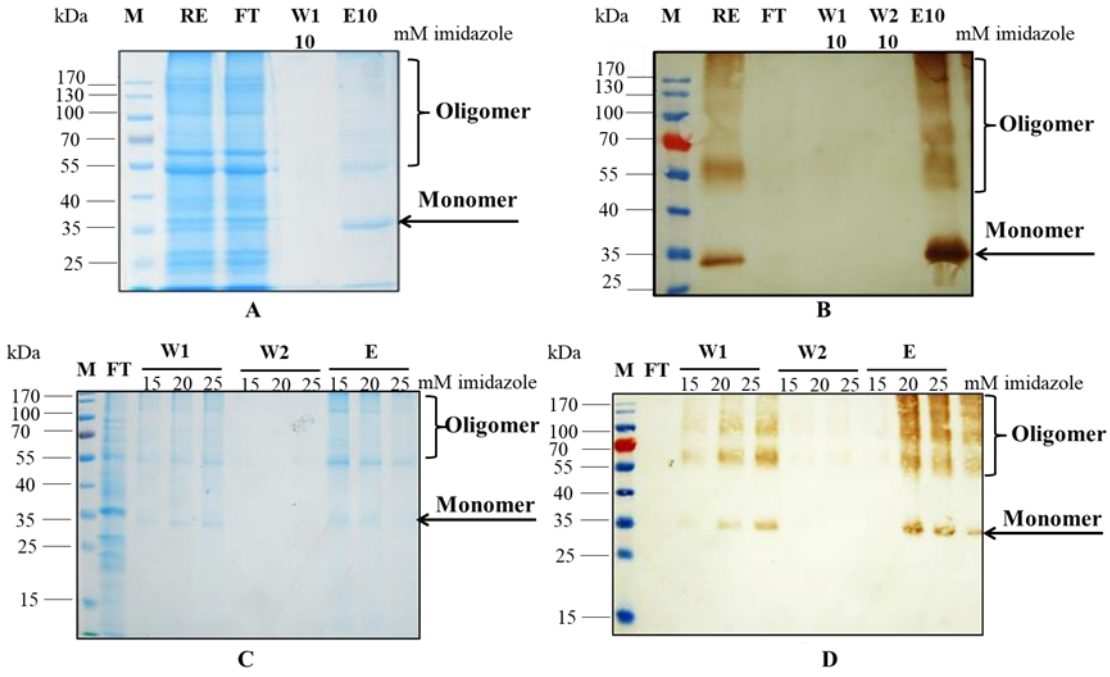
A. Đánh giá sự biểu hiện của protein COE/G2a-pII bằng Western blot sử dụng kháng thể đơn dòng kháng c-myc. TSP: Protein hòa tan tổng số; B. Kết quả phát hiện protein COE/G2a-pII bằng Western blot sử dụng huyết thanh của lợn được tiêm vacxin Corning chứa PEDV AJ1102. WT: cây thuốc lá không chuyển gen

3.2.4. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII

3.2.4.1. Tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII bằng IMAC

Để tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII, dịch chiết thuốc lá có chứa kháng nguyên COE/G2a-pII cũng được ủ với Ni Sepharose Fast Flow. Tuy nhiên, ở bước rửa nhằm loại bỏ các protein lẫn tạp, kháng nguyên COE/G2a-pII bị rửa trôi khá nhiều khi sử dụng đệm rửa có bổ sung imidazole nồng độ 30 mM tương tự đệm rửa sử dụng tinh sạch kháng nguyên COE/G1a-pII. Do vậy, nồng độ imidazole trong đệm rửa dùng tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII được tối ưu. Dải nồng độ imidazole 10 mM, 15 mM, 20 mM và 30 mM trong đệm rửa được sử dụng trong

đệm rửa. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII bằng sắc ký ái lực IMAC từ thực vật bao gồm dịch chiết thô (RE), dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột (FT), dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa (W) và phân đoạn chứa kháng nguyên tinh sạch (E) được thu nhận để phân tích. Nồng độ protein tan tổng số trong RE, FT, W và E được đo sử dụng phương pháp Bradford. Sự hiện diện của kháng nguyên COE/G2a-pII trong các phân đoạn này được kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE, nhuộm bằng Coomassie Blue và đánh giá bằng Western blot.



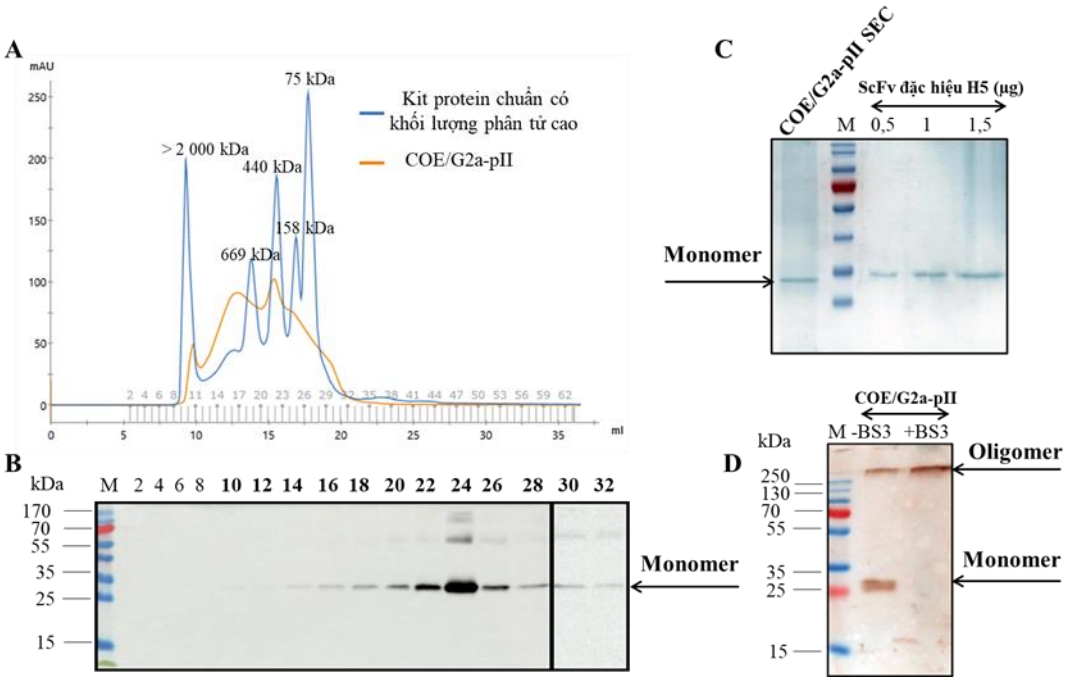
Hình 3.15. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A, C) và Western blot (B, D) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII sử dụng phương pháp IMAC với đệm rửa có nồng độ imidazole 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM.

RE: Dịch chiết thô; FT: dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột; W1, W2: dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa lần 1, lần 2; E: Kháng nguyên tinh sạch. 30 µg protein tan tổng số của RE, FT, W và 30 µl kháng nguyên tinh sạch được phân tách trên gel SDS-PAGE.

Các kết quả chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII không hiện diện trong FT, điều này chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII bám tốt với Ni Sepharose Fast Flow. Kháng nguyên COE/G2a-pII không bị rửa trôi khỏi cột khi sử dụng đệm rửa với nồng độ imidazole 10 mM (Hình 3.15A, B). Kháng nguyên COE/G2a-pII được phát hiện trong W với đệm rửa bổ sung imidazole ở các nồng độ 15 mM, 20 mM và 30 mM, điều này chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII bị rửa trôi khỏi cột khi sử dụng đệm rửa có nồng độ imidazole ở các nồng độ 15mM đến 30 mM (Hình 3.15C, D). Do vậy đệm rửa có bổ sung imidazole nồng độ 10 mM là thích hợp cho quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII. Như vậy đã tinh sạch thành công kháng

nguyên COE/G2a-pII bằng phương pháp IMAC. Dựa vào kết quả đo protein tổng số bằng Bradford và kết quả bán định lượng bằng Western blot cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII được xác định có độ tinh sạch đạt xấp xỉ 82%, với hiệu suất thu hồi kháng nguyên COE/G2a-pII từ dịch chiết thực vật sau tinh sạch IMAC đạt xấp xỉ 25%.

3.2.4.2. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng SEC và phản ứng liên kết chéo



Hình 3.16. Kết quả tinh sạch, phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo

A. Biểu đồ biểu diễn kết quả tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII bằng SEC. Bộ kit chứa các protein có trọng lượng phân tử lớn từ 75-2000 kDa (GE Healthcare) được dùng nhằm ước tính trọng lượng phân tử của kháng nguyên COE/G2a-pII. B. Kết quả Western blot kiểm tra các phân đoạn sau tinh sạch các kháng nguyên COE/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC sử dụng kháng thể kháng c-myc. C. Kháng nguyên COE/G2a-pII sau tinh sạch SEC. D. Xác định đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII dựa vào phản ứng liên kết chéo. (–) và (+) BS3: sự hiện diện của BS3 ở nồng độ 0 và 5 mM. Sản phẩm được phân tách trên SDS-PAGE, chuyển màng và nhận diện với sự có mặt của kháng thể kháng His-tag.

Protein COE/G2a-pII sau tinh sạch IMAC được dùng để kiểm tra đặc điểm oligomer bằng SEC và phản ứng liên kết chéo. Kết quả tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII bằng SEC và kết quả kiểm tra các phân đoạn sau tinh sạch SEC bằng Western blot cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII được phát hiện ở các phân đoạn từ 10-32 (Hình 3.16A, B). Kháng nguyên COE/G2a-pII chủ yếu tập trung ở phân đoạn 22-26, tương ứng với khối lượng khoảng 158-440 kDa. Như vậy, protein COE/G2a-pII tồn tại ở dạng oligomer. Sau tinh sạch SEC, kháng nguyên COE/G2a

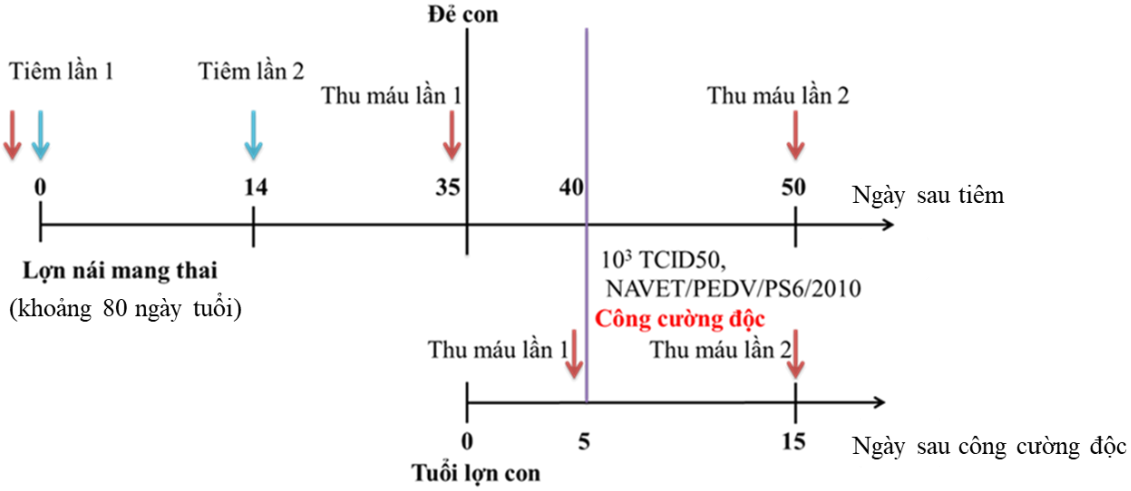
có độ sạch cao thể hiện ở băng rõ nét trên gel sau khi nhuộm Coomassie blue (Hình 3.16C).

Trạng thái oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII cũng được kiểm tra sử dụng BS3 trong phản ứng liên kết chéo. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot chứng tỏ khi có sự hiện diện của BS3, xuất hiện băng có kích thước lớn hơn 250 kDa trên màng (Hình 3.16D). Do đó, các dữ liệu phân tích trạng thái oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng SEC và phản ứng liên kết chéo đều cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII tự nhiên tồn tại ở dạng oligomer. Sự khác nhau trong khối lượng phân tử tự nhiên của protein COE/G1a-pII và protein COE/G2a-pII được ước tính có thể được giải thích bởi sự khác biệt trong trình tự aa của hai protein dẫn đến sự thay đổi trong số lượng vị trí glycosyl hóa của hai protein trên, điều này ảnh hưởng tới sự phân tách protein trên gel và trên cột SEC.

3.2.5. Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn

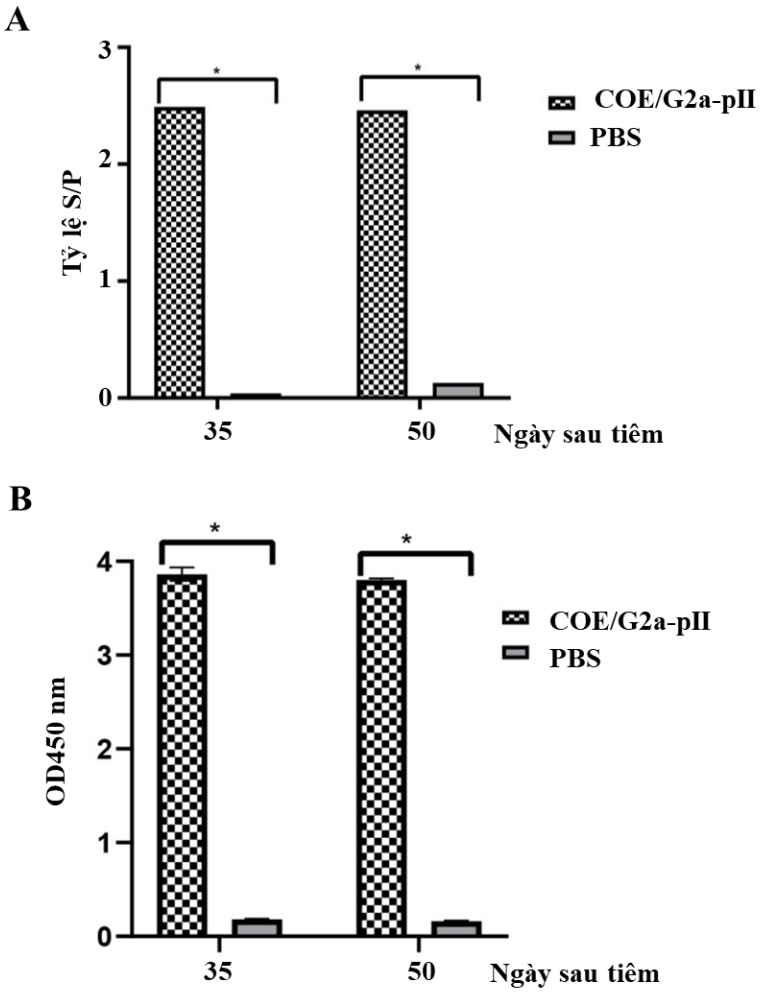
Vì PEDV gây tỷ lệ tử vong cao nhiều nhất trên lợn con mới sinh dưới 1 tuần tuổi, một vacxin thương mại lý tưởng phòng PEDV nên tiêm cho lợn nái để tạo điều kiện cho đáp ứng miễn dịch truyền từ sữa lợn mẹ sang lợn con mới sinh. Do vậy, chúng tôi đánh giá liệu việc gây đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a-pII từ thực vật trên lợn nái có thể kích thích miễn dịch bảo hộ lợn con được đẻ ra từ lợn nái chống lại chủng PEDV G2a độc lực cao bùng phát tại Việt Nam hay không.

3.2.5.1. Đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn nái mang thai sau tiêm



Hình 3.17. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên lợn nái và công cường độc trên lợn con với kháng nguyên COE/G2a-pII

Kháng nguyên COE/G2a-pII tinh sạch (100 µg/liều) hoặc PBS được trộn với chất bổ trợ dầu (NAVETCO, Việt Nam) để tiêm vào lợn nái mang thai. Mỗi lợn con (5 ngày tuổi) được sinh ra từ các lợn nái được công cường độc theo đường miệng với 1 mL chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 có độc lực cao (10^3 TCID50). Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên lợn nái và công cường độc trên lợn con được thể hiện ở Hình 3.17.



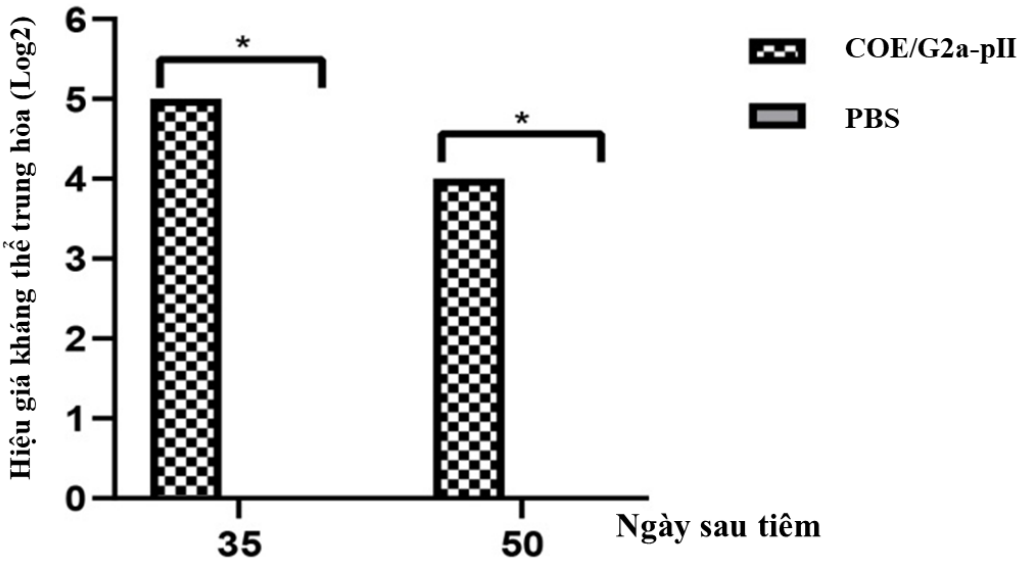
Hình 3.18. Đáp ứng sinh kháng thể IgG và IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của lợn nái mang thai sau tiêm

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. A. Kháng thể IgG đặc hiệu với PEDV ở huyết thanh lợn nái được tiêm chủng COE/G2a-pII hoặc PBS được đánh giá bằng bộ ELISA thương mại INgezim PEDV 11.PED.K.1/5, Eurofins INGENASA; B. Kháng thể IgA đặc hiệu COE trong huyết thanh của lợn nái được đánh giá bằng ELISA sử dụng kháng nguyên COE/G2a-pII tinh sạch SEC làm kháng nguyên phủ đĩa

Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong các huyết thanh của lợn nái mang thai được kiểm tra sử dụng bộ kit ELISA thương mại. Kết quả ELISA cho thấy đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được phát hiện trong huyết thanh lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII với giá trị S/P là 2,49 vào ngày thứ 35 sau khi tiêm. Theo hướng dẫn của bộ kit ELISA thương mại, mẫu có giá trị S/P> 0,8 được xem là dương tính với kháng thể IgG đặc hiệu

PEDV. Điều này chứng tỏ, kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trên lợn nái mang thai vào ngày thứ 35 sau tiêm. Không có sự gia tăng đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu với PEDV ở lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII vào ngày thứ 50 so với với ngày thứ 35 sau tiêm. Không phát hiện được đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV ở lợn nái được tiêm PBS ở ngày thứ 35 và ngày thứ 50 sau tiêm (Hình 3.18A).

Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các lợn nái mang thai được kiểm tra bằng phản ứng ELISA sử dụng kháng nguyên COE tinh sạch SEC để phủ đĩa. Kết quả ELISA cho thấy lợn nái mang thai được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII có kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh vào ngày thứ 35 sau tiêm với giá trị trung bình OD450 là 3,8. Tương tự như đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG, IgA đặc hiệu PEDV không tăng trong huyết thanh của lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII vào ngày thứ 50 sau tiêm. Kháng thể IgA đặc hiệu PEDV không tìm thấy trong huyết thanh của lợn nái được tiêm với PBS ở ngày thứ 35 và 50 sau tiêm (Hình 3.18B).



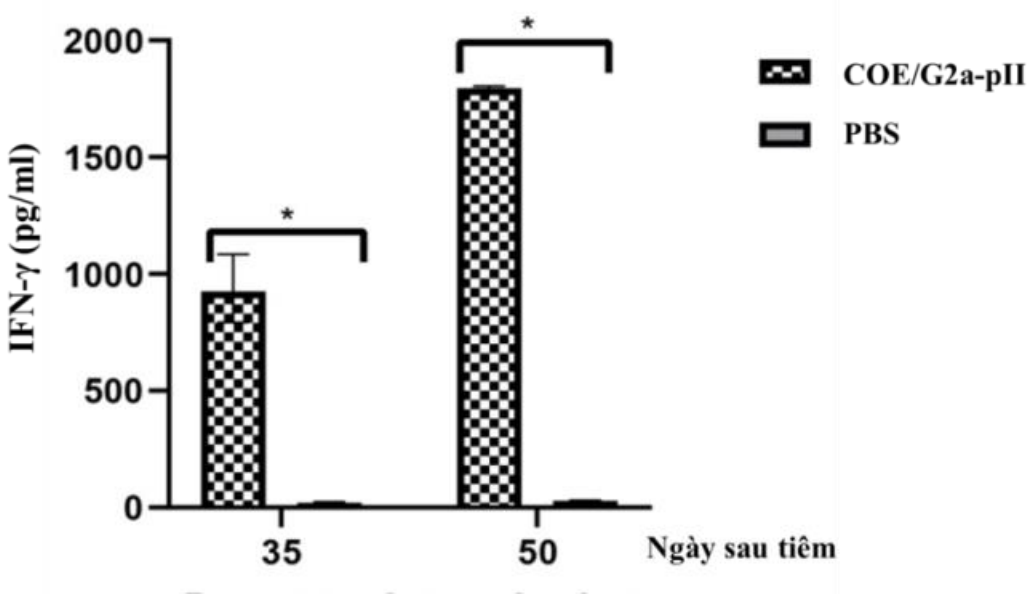
Hình 3.19. Đáp ứng miễn dịch sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong huyết thanh của lợn nái mang thai sau khi tiêm

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p <0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 ($2x10^3$ TCID50/mL) được dùng trong thí nghiệm. Mẫu có hiệu giá kháng thể trung hòa ≥8 được xem là dương tính

Hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV của huyết thanh lợn nái được xác định bằng xét nghiệm kháng thể trung hòa virus sử dụng tế bào Vero. Vào ngày thứ 35 sau khi tiêm, hiệu giá kháng thể trung hòa của huyết thanh lợn nái mang thai được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII là 32. Mẫu huyết thanh có hiệu giá kháng thể trung hòa ≥ 8 được xem là dương tính với kháng thể trung hòa PEDV. Do vậy,

kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể trung hòa PEDV trên lợn nái mang thai sau khi tiêm. Tuy nhiên, đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể trung hòa PEDV của lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII đã giảm vào ngày thứ 50 sau tiêm. Kháng thể trung hòa PEDV không được phát hiện trong huyết thanh của lợn nái được tiêm với PBS ở ngày thứ 35 và 50 sau tiêm (Hình 3.19).

Nồng độ cytokine trong huyết thanh của lợn nái mang thai sau khi gây đáp ứng miễn dịch với kháng nguyên COE/G2a-pII được đánh giá bằng bộ kit ELISA thương mại. Kết quả ELISA cho thấy huyết thanh của lợn nái mang thai được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII có đáp ứng IFN-γ ở mức cao, đạt nồng độ 932,3 ± 145,2 pg/mL vào ngày thứ 35 sau tiêm. Đáng chú ý là mức IFN-γ tăng gấp hai lần (1796,1 ± 8,6 pg/mL) ở lợn nái này vào ngày thứ 50 sau tiêm. IFN-γ không được tìm thấy ở lợn nái đối chứng âm được tiêm PBS ở ngày thứ 35 và 50 sau tiêm (Hình 3.20).



Hình 3.20. Đáp ứng sinh cytokine IFN-γ trong huyết thanh của lợn nái mang thai sau khi gây đáp ứng miễn dịch

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. * p<0,05: khác biệt có ý nghĩa thống kê. Mức IFN-γ trong huyết thanh lợn nái được đánh giá bằng bộ kit ELISA thương mại (Porcine IFN-γ ELISA Basis kit, Mabtech)

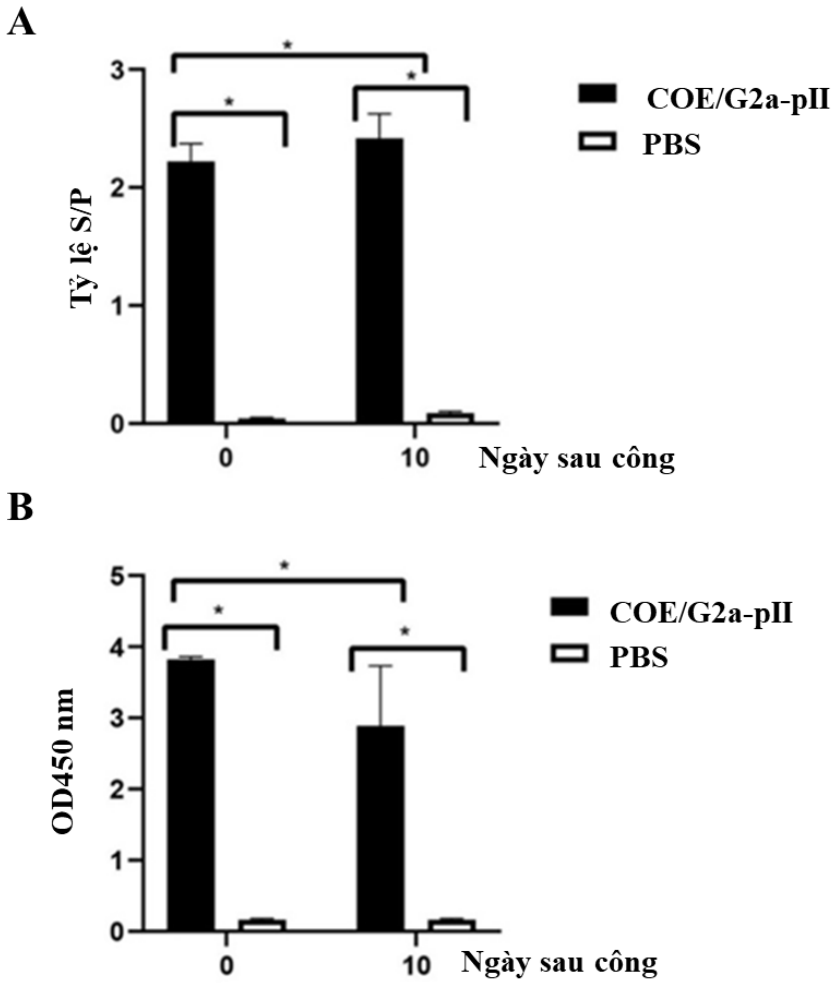
Những dữ liệu này cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV với hiệu giá trung hòa cao và đáp ứng cytokine mạnh ở lợn nái mang thai.

3.2.5.2. Đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng cytokine ở lợn con được đẻ ra từ lợn nái sau tiêm

Sau khi tiêm phòng, do các kháng thể từ sữa non/sữa lợn nái mẹ thường được chuyển sang lợn con qua đường bú nên miễn dịch thụ động của lợn con đã được

đánh giá bằng ELISA, xét nghiệm kháng thể trung hòa virus và xét nghiệm cytokine.

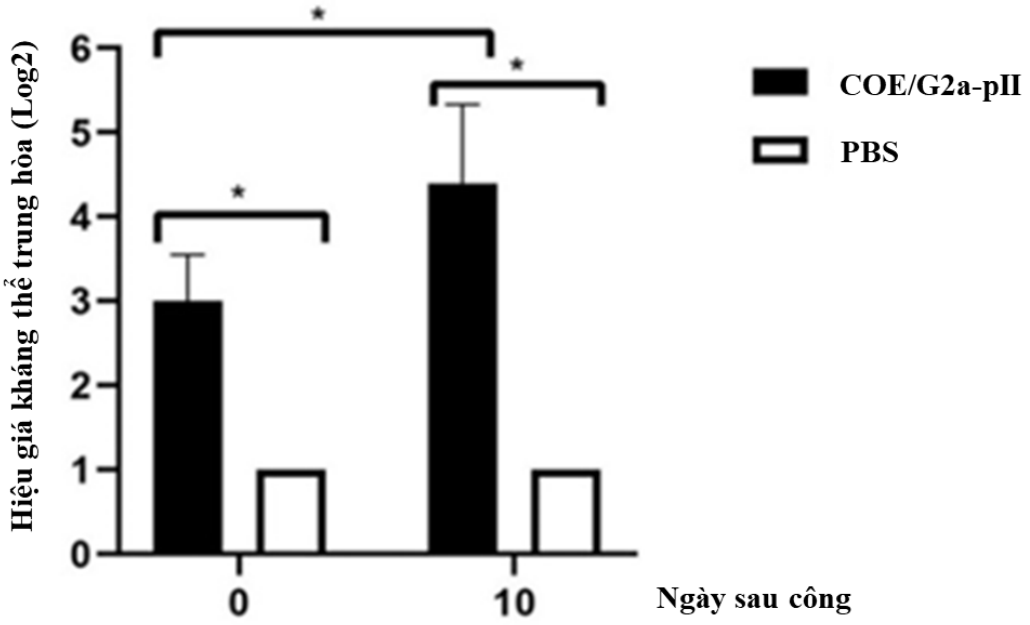
Trước và sau công cường độc, đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các lợn con được sinh ra từ lợn nái mang thai được kiểm tra bằng bộ kit ELISA thương mại. Kết quả ELISA cho thấy đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được phát hiện trong huyết thanh của các lợn con 5 ngày tuổi (ngày thứ 0 sau công) với giá trị S/P trung bình là 2,22. Sau khi công cường độc 10 ngày, sự gia tăng mức độ kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được tìm thấy trong huyết thanh của các lợn con với giá trị S/P trung bình là 2,41. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV ở các lợn con sinh ra từ lợn nái được tiêm PBS ở ngày thứ 10 sau công cường độc không được phát hiện (Hình 3.21A).



Hình 3.21. Đáp ứng sinh kháng thể IgG và IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các lợn con được sinh ra từ các lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. A. Kháng thể IgG đặc hiệu với PEDV ở huyết thanh của các lợn con được sinh ra từ lợn nái sau tiêm COE/G2a-pII hoặc PBS được đánh giá bằng bộ ELISA thương mại INgezim PEDV 11.PED.K.1/5, Eurofins INGENASA; B. Kháng thể IgA đặc hiệu COE trong huyết thanh của các lợn con được sinh ra từ lợn nái sau tiêm COE/G2a-pII hoặc PBS được đánh giá bằng ELISA sử dụng protein COE/G2a-pII tinh sạch SEC làm kháng nguyên phủ đĩa

Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các lợn con được kiểm tra thông qua phản ứng ELISA sử dụng kháng nguyên COE tinh sạch SEC để phủ đĩa. Kết quả ELISA chứng tỏ kháng thể IgA đặc hiệu PEDV có mặt trong huyết thanh của các lợn con sau tiêm với giá trị trung bình OD_{450} là 3,8 trước khi công cường độc. Các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV không tăng trong huyết thanh của các lợn con sau công cường độc 10 ngày. Kháng thể IgA đặc hiệu với PEDV không được tìm thấy trong huyết thanh của lợn nái được tiêm với PBS trước khi công cường độc và ngày thứ 10 sau công cường độc (Hình 3.21B).



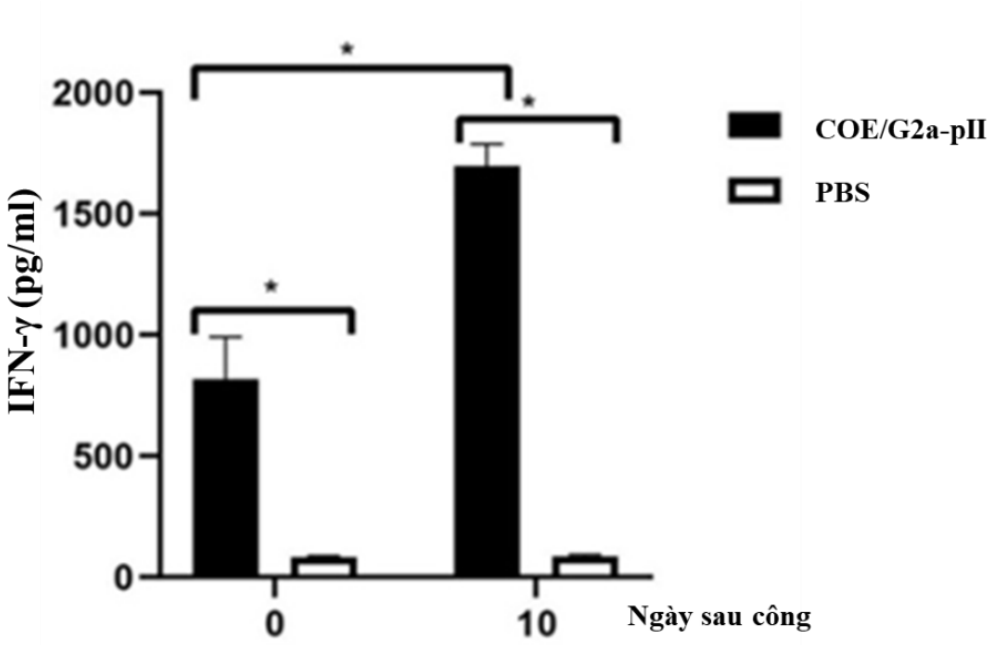
Hình 3.22. Đáp ứng sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong các huyết thanh lợn con được sinh ra từ các lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: $p<0,05$, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 ($2x10^3$ TCID50/mL) được dùng cho thí nghiệm. Mẫu có hiệu giá kháng thể trung hòa ≥8 được xem là dương tính

Hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV của huyết thanh của các lợn con cũng được đánh giá bằng xét nghiệm kháng thể trung hòa virus sử dụng tế bào Vero. Trước khi công cường độc, hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình trong huyết thanh của các lợn con 5 ngày tuổi được đẻ ra từ lợn nái tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII là 8. Điều này chứng tỏ các lợn con trước khi công cường độc đã có kháng thể trung hòa PEDV. Ngoài ra, hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV được xác nhận ở các lợn con sau công cường độc 10 ngày là cao hơn gấp hai lần so với trước khi công cường độc, với hiệu giá đạt 16. Các kháng thể có khả năng trung hòa

PEDV không được tìm thấy trong huyết thanh của các lợn con được đẻ ra từ lợn nái được gây đáp ứng với PBS trước và sau khi công cường độc 10 ngày (Hình 3.22).

Đáp ứng cytokine trong huyết thanh của các lợn con được sinh ra từ lợn nái trước và sau công cường độc được đánh giá bằng bộ kit ELISA thương mại. Nồng độ IFN-γ trong huyết thanh của các lợn con được xác định dựa trên đường chuẩn của IFN-γ tái tổ hợp với nồng độ 16-1600 pg/mL. Kết quả ELISA cho thấy các lợn con được đẻ ra từ lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII có đáp ứng IFN-γ ở mức cao, đạt nồng độ cao vào ngày thứ 0 với hàm lượng 824,5 ± 157,68 pg/mL. Đáng chú ý là đã có sự gia tăng mạnh nồng độ IFN-γ ở các lợn con của lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII vào ngày thứ 10. Ngược lại, đáp ứng cytokine IFN-γ không được phát hiện ở các lợn con được sinh ra từ lợn nái tiêm PBS trước và sau khi công cường độc 10 ngày (Hình 3.23).



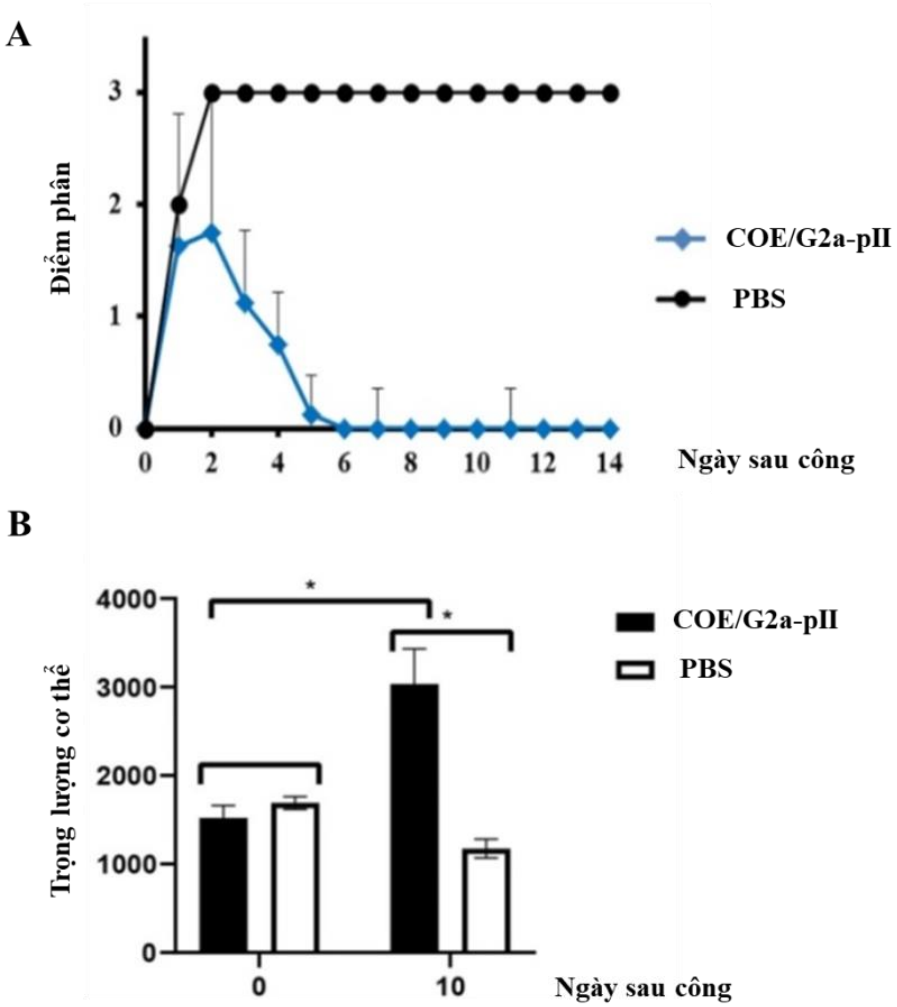
Hình 3.23. Đáp ứng sinh cytokine IFN-γ trong huyết thanh của các lợn con được đẻ ra từ lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. * p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nồng độ IFN-γ trong huyết thanh lợn nái được xác định sử dụng bộ kit ELISA (Porcine IFN-γ ELISA Basis kit, Mabtech)

Những dữ liệu này chứng tỏ có sự truyền miễn dịch thụ động của các kháng thể đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV và đáp ứng IFN-γ từ lợn nái sang lợn con qua sữa/sữa non của lợn nái.

3.2.5.3. Đáp ứng miễn dịch bảo hộ lợn con chống lại chủng PEDV G2a có độc lực cao

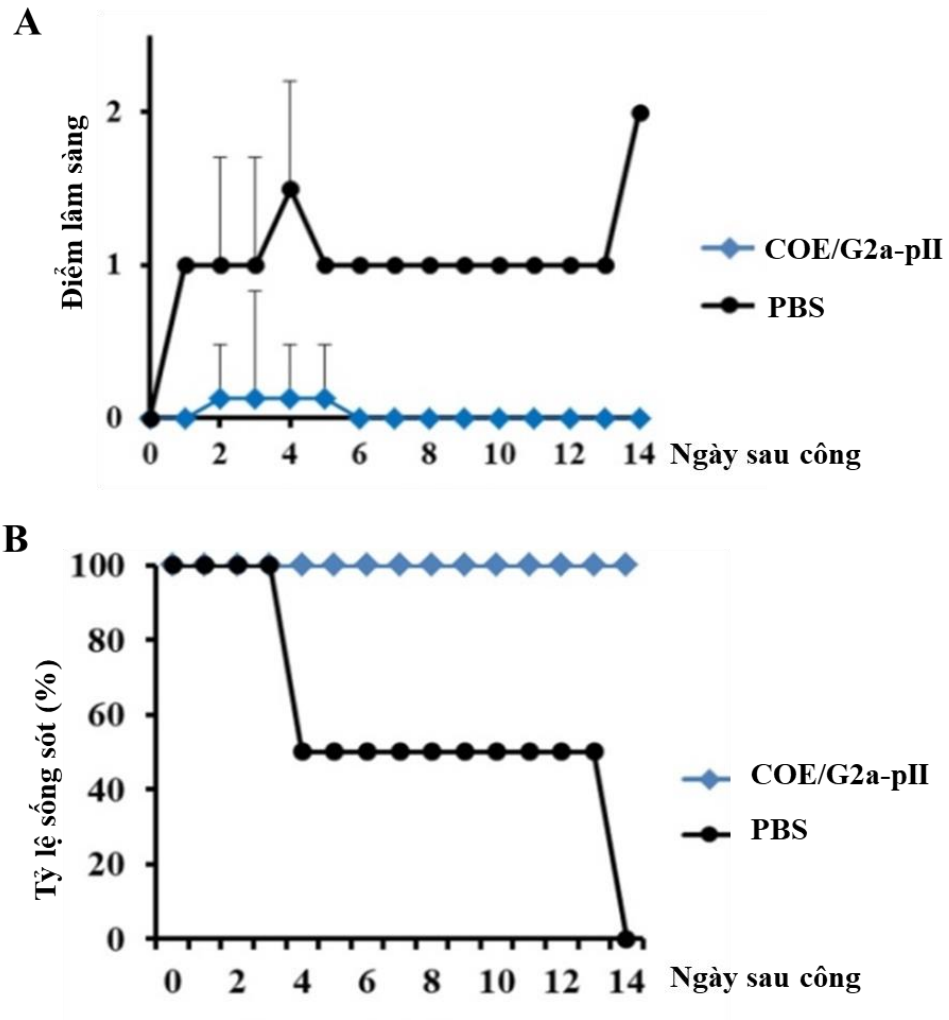
Đáp ứng miễn dịch bảo hộ các lợn con được đẻ ra từ lợn mẹ tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII được đánh giá sau khi công cường độc lợn con với chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 có độc lực cao



Hình 3.24. Điểm phân và trọng lượng cơ thể của các lợn con được đẻ ra từ lợn nái đã tiêm trước và sau công cường độc

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. * p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. A. Điểm số phân của lợn con được ghi nhận hàng ngày sau khi công cường độc với chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 có độc lực cao. B. Trọng lượng cơ thể lợn con được tính vào các ngày 0 và ngày 14

Một ngày sau công cường độc, tất cả lợn con được đẻ ra từ lợn nái được tiêm kháng nguyên COE G2a-pII đều có phân nhão và bán rắn (điểm phân từ 1 đến 2). Tuy nhiên, một số lợn con trong nhóm này có phân bình thường với điểm 0 bắt đầu từ ngày thứ 4. Tất cả lợn con trong nhóm này đều trở về điểm phân là 0 vào ngày thứ 6. Ngược lại, các lợn con của lợn nái được tiêm PBS có phân nửa rắn với điểm số là 2 vào ngày thứ nhất. Phân của những con lợn con này có nhiều nước với điểm phân là 3 bắt đầu từ ngày thứ 2 cho đến các ngày sau đó (Hình 3.24A). Trước công cường độc, không có sự khác biệt đáng kể về trọng lượng cơ thể của hai nhóm lợn con. Mười ngày sau công cường độc, trọng lượng cơ thể của lợn con sinh ra từ lợn nái được tiêm COE/G2a-pII đã tăng gấp hai lần. Ngược lại, hai lợn con được sinh ra từ lợn nái đối chứng âm có trọng lượng cơ thể giảm mạnh sau công so với trước công (Hình 3.24B).



Hình 3.25. Điểm lâm sàng và tỷ lệ sống sót của các lợn con được đẻ ra từ lợn nái đã tiêm chủng trước và sau công cường độc

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. A. Điểm lâm sàng của lợn con được ghi nhận hàng ngày sau khi công cường độc với chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 có độc lực cao. B. Tỷ lệ sống sót của các lợn con được tính vào các ngày 0 và ngày 14

Tất cả lợn con được đẻ ra từ lợn nái tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII đều có điểm lâm sàng bình thường sau công xung quanh 0 và sống sót 100% sau công cường độc (Hình 3.25A, B). Ngược lại, các đặc điểm lâm sàng của lợn con được đẻ ra từ lợn nái được tiêm PBS là khoảng 1 (biếng ăn, suy nhược, nôn mửa và hốc hác) bắt đầu từ ngày thứ 2 và điểm số lâm sàng của nhóm này tăng lên 1,5 con vào ngày thứ 4 (Hình 3.25A). Vào ngày thứ 4, một lợn con của lợn nái được tiêm PBS đã chết. Một con lợn con khác trong nhóm này chết vào ngày thứ 14 (Hình 3.25B). Do đó, 100% lợn con thuộc nhóm đối chứng âm đều chết sau khi công cường độc virus. Nguyên nhân gây ra cái chết của lợn con trong nhóm đối chứng âm là do nhiễm PEDV được xác minh thông qua tổn thương tổng thể ở ruột non của lợn con đã chết (dữ liệu không công bố).

Như vậy, trong nội dung nghiên cứu này, kháng nguyên COE/G2a-pII đã được chứng minh có khả năng kích thích sinh miễn dịch dịch thể và đáp ứng IFN-γ ở nồng độ cao trong huyết thanh của lợn nái sau 2 lần tiêm (100 µg/liều) và miễn dịch này truyền thụ động cho lợn con qua sữa lợn nái, giúp bảo hộ toàn bộ lợn con khỏi chủng PEDV G2a độc lực cao. Những kết quả này cho thấy rằng kháng nguyên COE/G2a-pII là một ứng viên tiềm năng để ngăn ngừa lây nhiễm của chủng PEDV G2a trên lợn ở Việt Nam. Những dữ liệu sơ bộ nhưng quan trọng này là cơ sở để thực hiện các nghiên cứu mở rộng hơn nhằm phát triển một vacxin dựa vào kháng nguyên COE/G2a-pII từ thực vật.

3.3. Tạo và đánh giá tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII tái tổ hợp từ chủng PEDV thuộc nhóm G2a gây bệnh tại Việt Nam

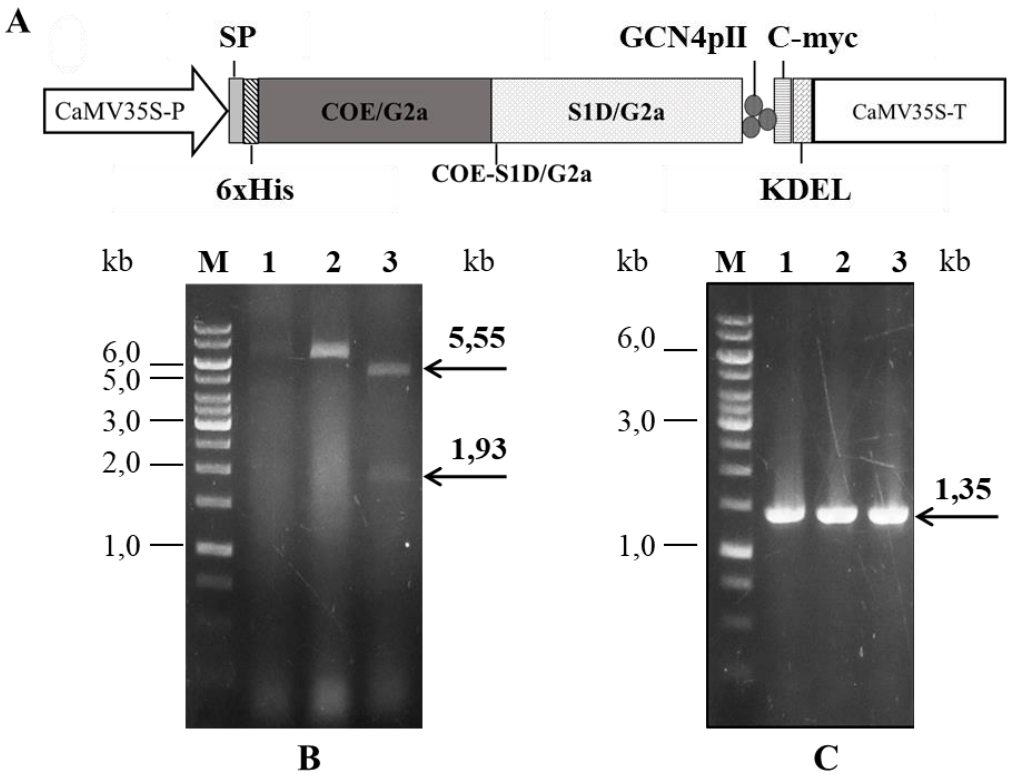
Trong mục 3.2, kháng nguyên COE/G2a-pII đã được chứng minh là một ứng viên tiềm năng để phát triển vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV. Trong phần tiếp theo, chúng tôi muốn chứng minh liệu có tạo ra các ứng viên kháng nguyên tái tổ hợp khác có mức độ biểu hiện và khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII hay không? Vì vậy, thông qua việc thay đổi/mở rộng vùng kháng nguyên trên protein S hoặc tạo dạng kháng nguyên có khối lượng phân tử lớn hơn bằng cách dung hợp thêm motif tp, chúng tôi nghiên cứu tạo các kháng nguyên tái tổ hợp khác thuộc protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6 thuộc nhóm G2a bao gồm các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, S2/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp. Mức độ biểu hiện và khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp này được so sánh với kháng nguyên COE/G2a-pII.

3.3.1. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp, S2/G2a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng

3.3.1.1. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a từ aa 499 đến aa 789 trên protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được sử dụng. Trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a được thể hiện ở Phụ lục 21. Đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu *Bam*HI-COE/G2a-F2 và *Psp*OMI-S1D/G2a-R được liệt kê trong Bảng 2.2, sau đó chèn vào vector pRTRA-pII tại vị trí enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. Các dòng khuẩn lạc mang vector pRTRA tái tổ hợp được kiểm tra bằng colony-PCR (Phụ lục 22A) và xử lý với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI (Phụ lục 22B).

Kết quả cho thấy thu được các băng đúng theo tính toán lý thuyết. Do vậy, đã thiết kế thành công vector tách dòng pRTRA-COE-S1D/G2a-pII. Sơ đồ vector tách dòng chứa gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được thể hiện ở Phụ lục 23.



Hình 3.26. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa protein COE-S1D/G2a-pII và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng

A. Sơ đồ cassette biểu hiện mang gen mã hóa COE-S1D/G2a-pII. CaMV35S-P: promoter 35S từ CaMV. SP: peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa. KDEL: peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt. CaMV35S-T: terminator từ CaMV. B. Điện di đồ sản phẩm cắt với enzyme *Nco*I kiểm tra các plasmid pCB301 từ *E. coli* mang gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII. 1-3: các plasmid số 1-3 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). C. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra các dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-3: các khuẩn lạc số 1-3 được kiểm tra

Tiếp tục, để thiết kế vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa COE-S1D/G2a-pII, plasmid pRTRA-COE-S1D/G2a-pII được xử lý bằng enzyme *Hin*dIII. Cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa COE-S1D/G2a-pII được thu nhận. Sơ đồ cassette biểu hiện chứa gen mã hóa COE-S1D/G2a-pII được thể hiện ở Hình 3.26A. Đoạn gen này sau đó được nối ghép vào vector pCB301 đã được xử lý *Hin*dIII và *SAP*. Các dòng khuẩn chứa vector pCB301 tái tổ hợp (viết tắt là pCB301-COE-S1D/G2a-pII) được chọn lọc bằng cách xử lý với enzyme *Not*I (Hình 3.26B**)**. Kết quả chứng tỏ dòng khuẩn lạc số 1 và số 2 có 2 băng khoảng 5,55 kb và 1,93 kb, đúng so với tính toán lý thuyết tương ứng là 5555 bp và 1929 bp. Kết quả đọc trình tự thể hiện trình tự COE-S1D/G2a trong các plasmid pCB301 tái tổ hợp là

giống 100% so với trình tự COE-S1D/G2a ban đầu. Như vậy, vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã được thiết kế thành công.

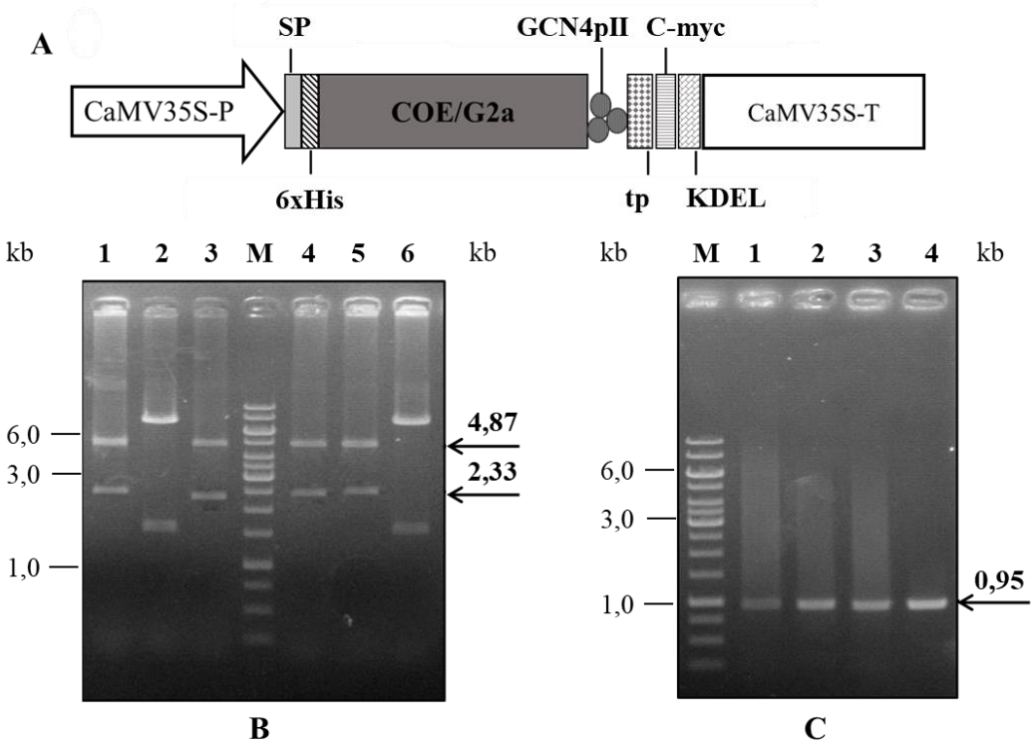
Plasmid pCB301-COE-S1D/G2a-pII số 1 được chuyển vào tế bào *A. tumefaciens* AGL1. Để chọn dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 mong muốn, phản ứng colony-PCR sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35Sterm. Kết quả cho thấy cả 5 dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 đều có băng với kích thước tương tự lý thuyết là khoảng 1,35 kb (Hình 3.26C**)**. Như vậy dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE-S1D/G2a-pII đã được tạo thành công. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE-S1D/G2a-pII được thể hiện ở Phụ lục 24.

3.3.1.2. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII-tp và tạo chủng A. tumefaciens mang vector tương ứng

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được thu nhận từ các vector thương mại pUC57 sau khi cắt với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI sau đó được chèn vào vector pRTRA-pII-tp (đã xử lý *Bam*HI, *Psp*OMI và *SAP*) bằng enzyme T4 DNA ligase. Các dòng khuẩn lạc mang vector pRTRA tái tổ hợp được kiểm tra bằng colony-PCR (Phụ lục 25A) và xử lý với enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI (Phụ lục 25B). Các kết quả cho thấy đã thu được các băng theo đúng tính toán lý thuyết. Như vậy, đã thiết kế thành công vector tách dòng pRTRA-COE/G2a-pII-tp. Sơ đồ vector tách dòng chứa gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII-tp được thể hiện ở Phụ lục 26.

Tiếp tục, để thiết kế vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa COE/G2a-pII-tp, plasmid pRTRA-COE/G2a-pII-tp được xử lý bằng enzyme *Hin*dIII. Cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa COE/G2a-pII-tp được thu nhận sau khi cắt. Sơ đồ cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa COE/G2a-pII-tp được thể hiện ở Hình 3.27A. Đoạn gen này sau đó được nối ghép vào vector pCB301 đã được xử lý *Hin*dIII và *SAP*. Các plasmid chứa vector pCB301 tái tổ hợp (viết tắt là pCB301-COE/G2a-pII-tp) được chọn lọc bằng cách xử lý với enzyme *Nco*I (Hình 3.27B**)**. Kết quả chứng tỏ các plasmid ở dòng khuẩn số 1, 3, 4, 5 đều có xuất hiện 2 băng có kích thước khoảng 4,9 kb và 2,3 kb, theo đúng kích thước lý thuyết được tính toán. Kết quả đọc trình tự thể hiện trình tự COE/G2a trong các plasmid pCB301-COE/G2a-II-tp tái tổ hợp là giống 100% so với trình tự COE/G2a ban đầu. Như vậy, vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa COE/G2a-pII-tp đã được thiết kế thành công. Plasmid pCB301-COE/G2a-pII-tp số 1 được chuyển vào tế bào *A. tumefaciens* AGL1. Để chọn dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 mong muốn, phản ứng colony-PCR với cặp mồi 35S-SQF và 35STerm được tiến hành. Kết quả cho thấy ở cả 4/4 dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 đều có băng có kích thước

khoảng 0,95 kb, đúng theo kích thước được tính toán về mặt lý thuyết (Hình 3.27C**)**. Như vậy dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE/G2a-pII-tp đã được tạo thành công. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE/G2a-pII-tp được thể hiện ở Phụ lục 27.



Hình 3.27. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII-tp và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng

A. Sơ đồ cassette biểu hiện mang gen mã hóa COE/G2a-pII-tp. CaMV35S-P: promoter 35S từ CaMV. SP: peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa. KDEL: peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt. CaMV35S-T: terminator từ CaMV. B. Điện di đồ sản phẩm cắt với enzyme *Nco*I kiểm tra các plasmid pCB301 từ *E. coli* mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII-tp. 1-6: các plasmid số 1-6 được kiểm tra. C. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra các dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

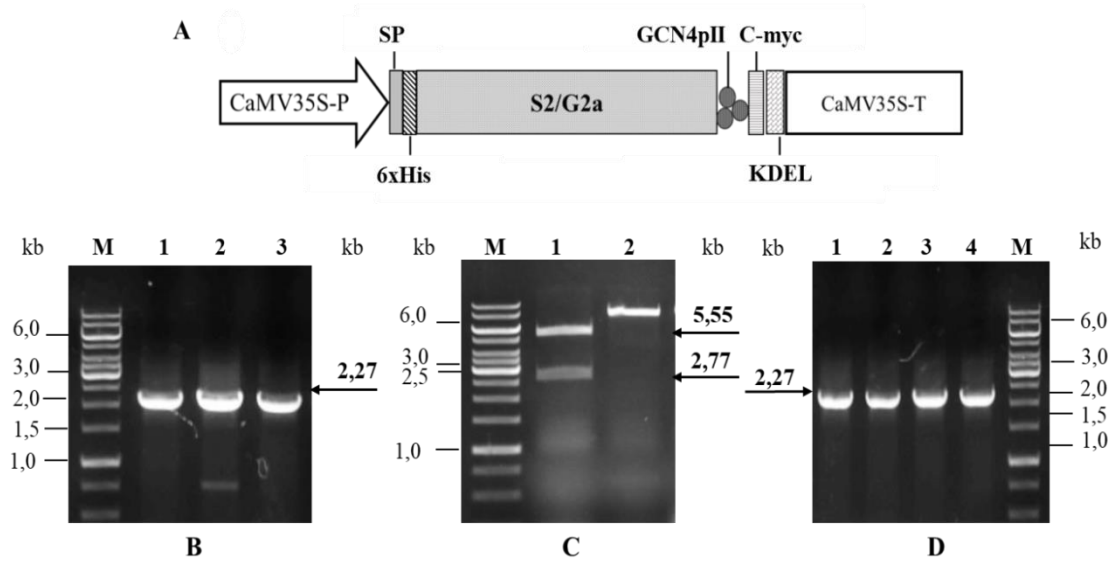
3.3.1.3. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a-pII

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a từ aa 730 đến aa 1324 trên kháng nguyên S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu *Bam*HI-S2/G2a-F và *Psp*OMI-S2/G2a-R. Trình tự đoạn gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a được thể hiện ở Phụ lục 28.

Đoạn gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a được chèn vào vector pRTRA-pII tại vị trí hai enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. Các dòng khuẩn lạc mang plasmid pRTRA-S2/G2a-pII tái tổ hợp được chọn lọc bằng colony-PCR (Phụ lục 29A) và cắt với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI (Phụ lục 29B). Kết quả cho thấy đã thu được các băng theo đúng tính toán lý thuyết. Plasmid pRTRA-S2/G2a-pII tái tổ hợp số 1

được dùng cho thí nghiệm tiếp theo. Do vậy, vector tách dòng pRTRA-S2/G2a-pII đã được thiết kế thành công. Sơ đồ vector tách dòng chứa gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a-pII được thể hiện ở Phụ lục 30. Kháng nguyên S2/G2a-pII còn được gọi là S2-pII trong công bố.

Tiếp tục, để thiết kế vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa S2/G2a-pII, plasmid pRTRA-S2/G2a-pII được xử lý bằng enzyme *Hin*dIII để thu cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a-pII. Sơ đồ cassette biểu hiện chứa đoạn gen mã hóa S2/G2a-pII được thể hiện ở Hình 3.28A. Đoạn gen này sau đó được nối ghép vào vector pCB301 đã được xử lý *Hin*dIII và SAP. Dòng khuẩn lạc chứa vector pCB301 tái tổ hợp (viết tắt là pCB301-S2/G2a-pII) được chọn lọc bằng colony-PCR và xử lý với enzyme *Not*I (Hình 3.28B, C**)**. Các kết quả cho thấy, dòng khuẩn số 1 cho băng khoảng 2,27 kb trong phản ứng colony-PCR và hai băng 5,55 kb và 1,93 kb trong phản ứng cắt với *Not*I, đúng so với tính toán lý thuyết tương ứng là 5555 bp và 1929 bp. Kết quả đọc trình tự các dòng plasmid pCB301 tái tổ hợp cho thấy trình tự gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a là giống 100% so với trình tự gen *S2/G2a* ban đầu. Như vậy, vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa kháng nguyên S2/G2a-pII đã được thiết kế thành công.



Hình 3.28. Kết quả thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa protein S2/G2a-pII và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp tương ứng

A. Sơ đồ cassette biểu hiện mang gen mã hóa S2/G2a-pII. CaMV35S-P: promoter 35S từ CaMV. SP: peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa. KDEL: peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt. CaMV35S-T: terminator từ CaMV. B. Kết quả colony-PCR chọn lọc các dòng khuẩn lạc mang vector pCB301-S2/G2a-pII tái tổ hợp bằng cặp mồi 35SS-QF/35-Term-R. C. Điện di đồ sản phẩm cắt với enzyme *Not*I kiểm tra các plasmid pCB301 từ *E. coli* mang gen mã hóa kháng nguyên kháng nguyên S2/G2a-pII. 1-2: các plasmid số 1-2 được kiểm tra. D. Kết quả điện di sản phẩm colony-PCR kiểm tra các dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301 tái tổ hợp sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-4: các khuẩn lạc số 1-4 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Plasmid pCB301-S2/G2a-pII số 1 được chuyển vào tế bào *A. tumefaciens* AGL1. Để chọn dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 mong muốn, phản ứng colony-PCR với cặp mồi 35S-SQF và 35STerm được tiến hành. Kết quả cho thấy ở cả 4/4 dòng khuẩn lạc *A. tumefaciens* AGL1 đều thu được băng có kích thước khoảng 2,27 kb, kích thước này là đúng so với kích thước được tính toán về lý thuyết (Hình 3.28D).

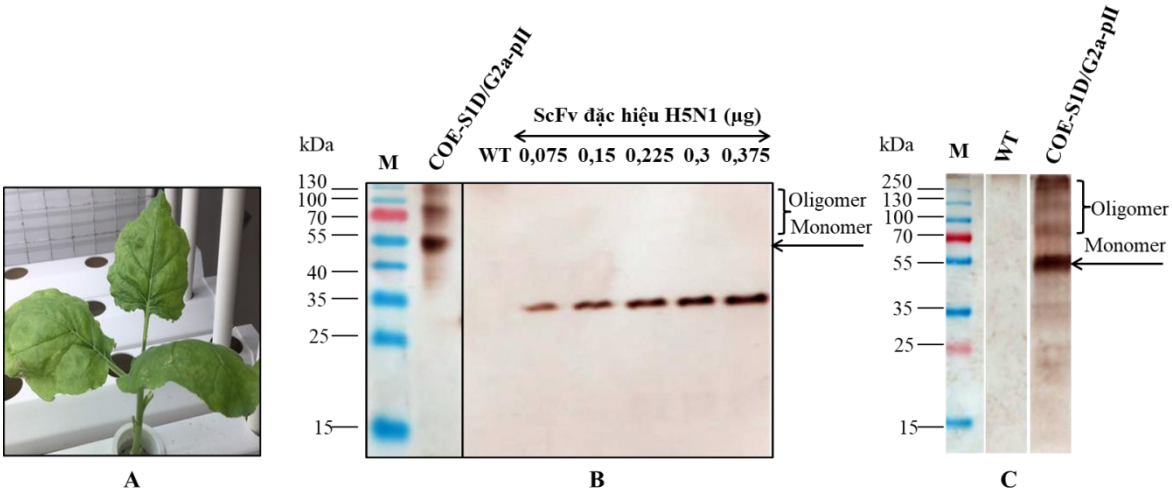
Như vậy dòng khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pCB301-S2/G2a-pII đã được tạo thành công. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-S2/G2a-pII được thể hiện ở Phụ lục 31.

3.3.2. Biểu hiện các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII tạm thời trong lá thuốc lá N. benthamiana

3.3.2.1. Biểu hiện kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tạm thời trên cây thuốc lá N. benthamiana

Quy trình biểu hiện của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tạm thời trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được tiến hành theo quy trình biểu hiện của kháng nguyên COE/G1a-pII có cải tiến. Năm ngày sau khi biến nạp hỗn hợp dịch khuẩn chứa chủng *A. tumefaciens* mang vector chứa HcPro và chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE-S1D/G2a-pII tái tổ hợp với giá trị OD_{600} 0,6 vào lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 7 tuần tuổi, lá thuốc lá *N. benthamiana* vẫn xanh tốt (Hình 3.29A). Sự tích lũy của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được phát hiện bằng phản ứng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc. Kết quả điện di SDS-PAGE và Western blot cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá, thể hiện ở băng trên màng có kích thước lớn hơn 55 kDa (Hình 3.29B).

Theo tính toán lý thuyết, khối lượng phân tử của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tái tổ hợp dạng monomer theo tính toán lý thuyết là 38,2 kDa, tuy nhiên, khối lượng phân tử thực tế thu được của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII dạng monomer là lớn hơn 55 kDa. Sự chênh lệch giữa khối lượng lý thuyết và khối lượng thực tế của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII có thể là do ảnh hưởng của các vị trí glycosyl hóa làm ảnh hưởng đến sự di chuyển và phân tách của kháng nguyên trong quá trình điện di SDS-PAGE. Có 39 vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE-S1D/G2a được dự đoán (Phụ lục 32). Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII không được phát hiện ở dịch chiết lá thuốc lá *N. benthamiana* không chuyển gen.



Hình 3.29. Biểu hiện protein COE-S1D/G2a-pII tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana*.

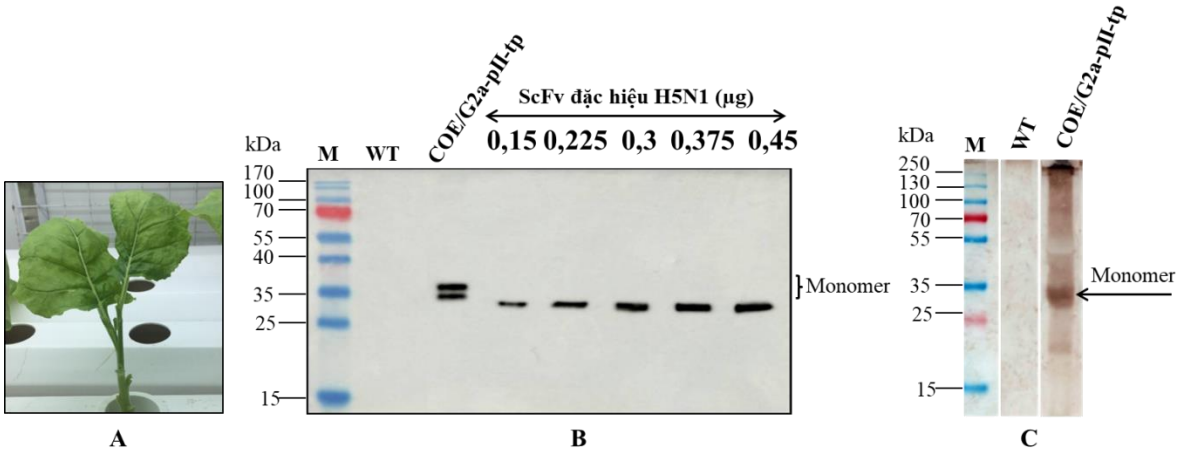
A. Lá thuốc lá *N. benthamiana* sau khi biểu hiện tạm thời protein COE-S1D/G2a-pII. B. Kiểm tra sự tích lũy của protein COE-S1D/G2a-pII bằng Western blot. 30 µg TSP được chiết từ lá WT, hoặc protein COE-S1D/G2a-pII và protein ScFv đặc hiệu H5N1 được điện di bằng SDS-PAGE. Kháng thể kháng c-myc được dùng làm kháng thể sơ cấp. C. Phát hiện protein COE-S1D/G2a-pII bằng Western blot sử dụng huyết thanh của lợn được tiêm vacxin Corning chứa PEDV AJ1102 dạng vô hoạt

Mức độ tích lũy của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tái tổ hợp trong lá thuốc lá được bán tính lượng bằng Western blot (Hình 3.29B). Hàm lượng và tín hiệu của các băng ScFv đặc hiệu H5 [156] được sử dụng để xây dựng đường chuẩn bằng phần mềm ImageQuant TL (Cytiva) sau khi chụp ảnh bằng máy Amersham™ Imager 680 (Cytiva). Kết quả bán định lượng cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tích lũy trong lá thuốc lá ở mức xấp xỉ 115 mg/kg lá tươi chiếm 1,95% protein tan tổng số (Hình 3.29B). Như vậy, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII có mức độ tích lũy trong lá thuốc lá *N. benthamiana* xấp xỉ với kháng nguyên COE/G2a.

Ngoài ra, sự biểu hiện của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh cũng được phát hiện bằng huyết thanh lợn tiêm vacxin Corning (Wuhan Keqian Biology) chứa chủng PEDV AJ1102 (Hình 3.29C). Kết quả Western blot ở Hình 3.29C cho thấy băng được phát hiện trên màng có kích thước theo đúng tính toán lý thuyết là gần 55 kDa. Điều này cũng cho thấy protein COE-S1D/G2a-pII được sản xuất từ lá thuốc lá *N. benthamiana* là có hoạt tính kháng nguyên tương tự với kháng nguyên của PEDV tự nhiên. Như vậy, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana*.

3.3.2.2. Biểu hiện kháng nguyên COE/G2a-pII-tp tạm thời trên lá thuốc lá N. benthamiana

Quy trình biểu hiện của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp tạm thời trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được tiến hành theo quy trình biểu hiện của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII có cải tiến. Sáu ngày sau khi biến nạp hỗn hợp dịch khuẩn chứa chủng *A. tumefaciens* mang vector chứa HcPro và chủng *A. tumefaciens* mang vector pCB301-COE/G2a-pII-tp tái tổ hợp với giá trị OD_{600} 0,6 vào lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh 7 tuần tuổi, lá thuốc lá *N. benthamiana* vẫn xanh tốt (Hình 3.30A). Sau khi biến nạp, tất cả các lá thuốc lá được thu nhận và bảo quản ở tủ -80 ^{o}C.



Hình 3.30. Biểu hiện protein COE/G2a-pII-tp tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana.*

A. Lá thuốc lá *N. benthamiana* biểu hiện protein COE/G2a-pII-tp tạm thời. B. Kiểm tra sự tích lũy của protein COE/G2a-pII-tp bằng Western blot. 30 µg protein tan tổng số được chiết từ lá WT, 10 µg protein tan tổng số chứa protein COE/G2a-pII-tp và protein ScFc đặc hiệu H5N1 được phân tách bằng SDS-PAGE. Kháng thể kháng c-myc được dùng làm kháng thể sơ cấp. C. Phát hiện protein COE/G2a-pII-tp bằng Western blot sử dụng huyết thanh của lợn được tiêm vacxin Corning chứa PEDV AJ1102 (Keqian Biology, Wuhan Keqian Biology, Trung Quốc) dạng vô hoạt

Sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* được phát hiện bằng phản ứng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc. Kết quả điện di SDS-PAGE và Western blot cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII-tp đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá, thể hiện ở các băng trên màng có kích thước gần 35 kDa (Hình 3.30B). Kết quả bán định lượng bằng Western blot sử dụng đường chuẩn của kháng nguyên ScFv đặc hiệu H5N1 [170] được xây dựng bằng phần mềm ImageQuant TL (Cytiva) cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII-tp tích lũy trong lá thuốc lá ở mức xấp xỉ 590 mg/kg lá tươi, chiếm 5,62% protein tan tổng số.

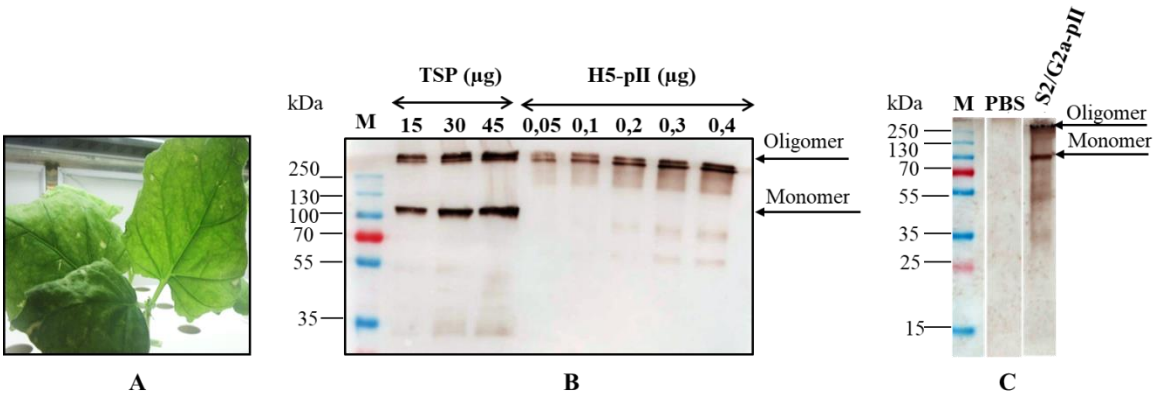
Sự tích lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh cũng được phát hiện bằng huyết thanh lợn tiêm vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology) chứa chủng PEDV AJ1102 (Hình 3.30C). Kết quả Western blot ở Hình 3.30C cho thấy băng được phát hiện trên màng có kích thước theo đúng tính toán lý thuyết là gần 35 kDa. Điều này cũng cho thấy protein COE/G2a-pII-tp được tạo ra trong lá thuốc lá *N. benthamiana* có tính kháng nguyên tương tự với kháng nguyên tự nhiên của PEDV. Như vậy, kháng nguyên COE/G2a-pII-tp đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana*.

3.3.2.3. Biểu hiện kháng nguyên S2/G2a-pII tạm thời trên lá thuốc lá N. benthamiana

Kháng nguyên S2/G2a-pII được biểu hiện tạm thời trong lá thuốc lá *N. benthamiana* theo quy trình biểu hiện của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII. Năm ngày sau khi biến nạp, lá được thu nhận vẫn xanh tốt (Hình 3.31A). Sự tích lũy của kháng nguyên S2/G2a tái tổ hợp được kiểm tra bằng phản ứng Western blot. Kết quả Western blot cho thấy kháng nguyên S2/G2a-pII đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá, thể hiện ở 2 băng được phát hiện trên màng là khoảng 100 kDa và lớn hơn 250 kDa.

Khối lượng phân tử của kháng nguyên S2-pII tái tổ hợp dạng monomer theo tính toán lý thuyết là 72,33 kDa, tuy nhiên, khối lượng phân tử thực tế thu được của kháng nguyên S2-pII dạng monomer là lớn hơn 100 kDa (Hình 3.31B). Sự chênh lệch giữa khối lượng lý thuyết và thực tế của kháng nguyên S2-pII có thể là do ảnh hưởng của các vị trí glycosyl hóa dẫn đến đến sự thay đổi trong quá trình di chuyển và phân tách của kháng nguyên dưới điện di SDS-PAGE. Có 67 vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein S2/G2a được dự đoán (Phụ lục 33).

Khi biểu hiện kháng nguyên S2 trong hệ thống *E. coli*, nếu không có glycosyl hóa trên kháng nguyên S2 thì kháng nguyên S2 có kích thước khoảng 90 kDa [17]. Mức độ tích lũy của các kháng nguyên S2/G2a-pII tái tổ hợp trong lá thuốc lá được bán tính lượng dựa vào hàm lượng và tín hiệu của các băng kháng nguyên chuẩn H5-pII [133] để xây dựng đường chuẩn bằng phần mềm ImageQuant TL 8.0 (Cytiva). Sau khi định lượng, mức độ biểu hiện của kháng nguyên S2/G2a-pII trong lá thuốc lá đạt xấp xỉ 86,7 mg/kg lá tươi, chiếm khoảng 1,47 % protein tan tổng số.



Hình 3.31. Biểu hiện protein S2/G2a-pII tái tổ hợp tạm thời trên thuốc lá *N. benthamiana.*

A. Lá thuốc lá *N. benthamiana* sau 5 ngày biến nạp. B. Kết quả đánh giá mức độ biểu hiện của protein S2/G2a-pII bằng Western blot sử dụng kháng thể kháng c-myc. 15, 30, 45 µg TSP được chiết từ lá biểu hiện protein S2/G2a-pII được phân tách bằng SDS-PAGE. Protein H5-pII được sử dụng để định lượng protein S2/G2a-pII trong dịch chiết lá; C. Kết quả phát hiện protein S2/G2a-pII bằng Western blot sử dụng huyết thanh của lợn được tiêm vacxin thương mại Corning chứa PEDV AJ1102 dạng vô hoạt

Sự biểu hiện của kháng nguyên S2/G2a-pII tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* thủy canh cũng được phát hiện bằng huyết thanh lợn tiêm vacxin Corning (Wuhan Keqian Biology) chứa chủng PEDV AJ1102 (Hình 3.31C). Kết quả Western blot ở Hình 3.31C cho thấy băng được phát hiện trên màng có kích thước tương tự được phát hiện ở Hình 3.31B. Điều này cũng cho thấy protein S2/G2a-pII được sản xuất từ lá thuốc lá có tính kháng nguyên tương tự như kháng nguyên của PEDV tự nhiên. Như vậy, kháng nguyên S2/G2a-pII đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana*.

Mức độ tích lũy của các kháng nguyên tái tổ hợp trên cây thuốc lá *N. benthamiana* được trình bày ở Bảng 3.1.

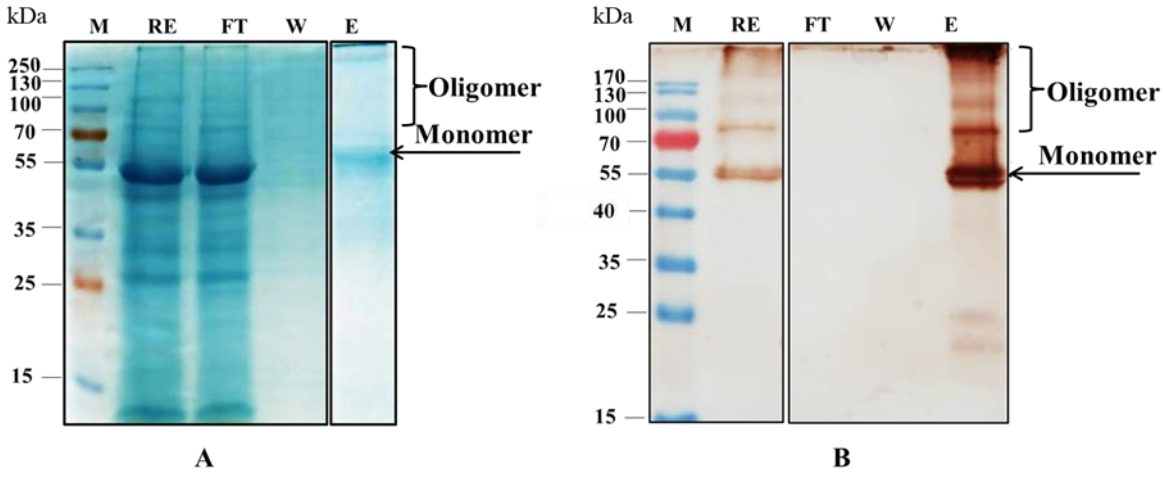
Bảng 3.1. Mức độ tích lũy của các kháng nguyên tái tổ hợp từ trong lá thuốc lá *N. benthamiana*

STT	Tên kháng nguyên	Mức độ tích lũy của kháng nguyên tái tổ hợp trong lá thuốc lá *N. benthamiana* (mg/kg lá tươi)	% Protein tan tổng số
1	COE/G1a-pII	234	4
2	COE/G2a-pII	118	2,01
3	COE-S1D/G2a-pII	115	1,95
4	COE/G2a-pII-tp	590	5,62
5	S2/G2a-pII	86,7	1,97

3.3.3. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII tái tổ hợp

3.3.3.1. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII

Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được tinh sạch theo quy trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII sử dụng Ni Sepharose Fast Flow. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII bằng sắc ký ái lực IMAC từ thực vật bao gồm dịch chiết thô (RE), dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột (FT), dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa (W) và phân đoạn chứa kháng nguyên tinh sạch (E) được thu nhận để phân tích. Nồng độ protein tan tổng số trong RE, FT, W và E được đo bằng thử nghiệm Bradford. Sự hiện diện của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trong các phân đoạn này được kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE, nhuộm bằng Coomassie Blue và đánh giá bằng Western blot (Hình 3.32).



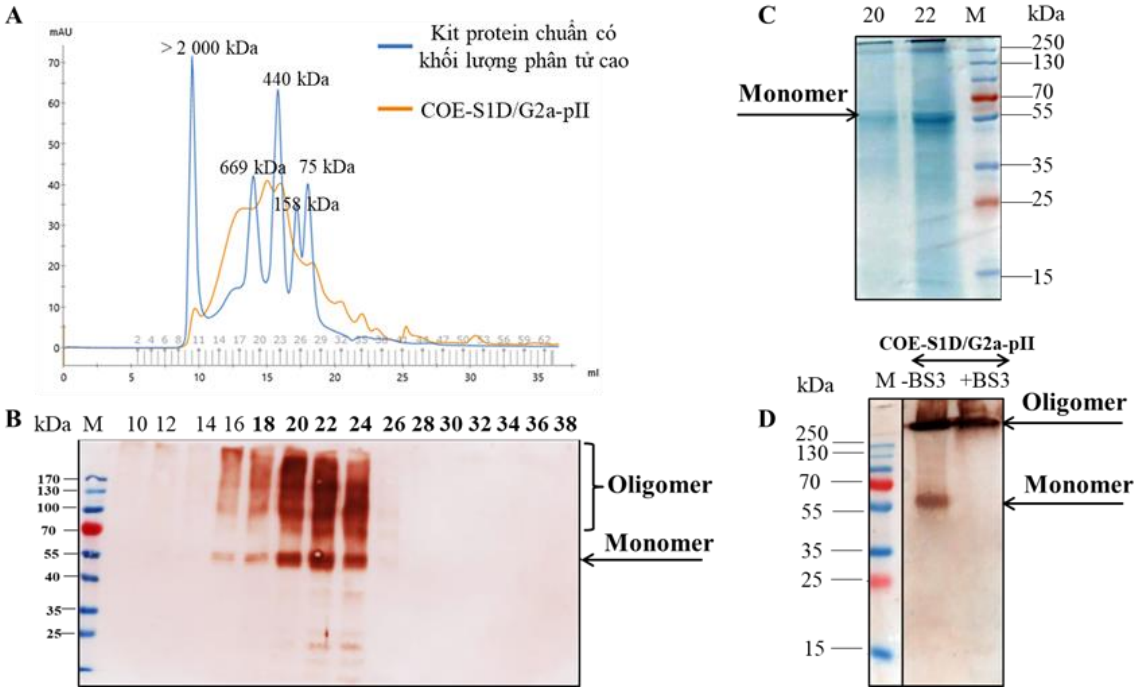
Hình 3.32. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A) và Western blot (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII sử dụng phương pháp IMAC.

RE: dịch chiết thô; FT: dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột; W: dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa; E: kháng nguyên tinh sạch. 30 µg protein tan tổng số của RE, FT, W và 30 µl kháng nguyên tinh sạch được phân tách trên gel SDS-PAGE.

Các kết quả cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII không hiện diện trong FT và W. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tinh sạch được phát hiện với hàm lượng cao trong phân đoạn E. Dựa vào kết quả đo protein tổng số bằng Bradford và kết quả bán định lượng bằng Western blot, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được xác định có độ tinh khiết đạt xấp xỉ 80%, với hiệu suất thu hồi kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII từ dịch chiết thực vật sau tinh sạch IMAC đạt xấp xỉ 27%.

Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII sau tinh sạch IMAC được sử dụng để đánh giá đặc điểm oligomer bằng SEC và phản ứng liên kết chéo. Kết quả tinh sạch kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII bằng SEC và kết quả kiểm tra các phân đoạn sau

tinh sạch SEC bằng Western blot cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được phát hiện ở các phân đoạn từ 16-24, tương ứng với khối lượng phân tử khoảng 440 kDa-669 kDa (Hình 3.33A, B). Sau tinh sạch SEC, sự hiện diện của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII ở phân đoạn 20 và 22 được đánh giá bằng điện di SDS-PAGE và nhuộm Coomassie blue (Hình 3.33C). Kết quả cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII sau SEC có độ tinh khiết cao.



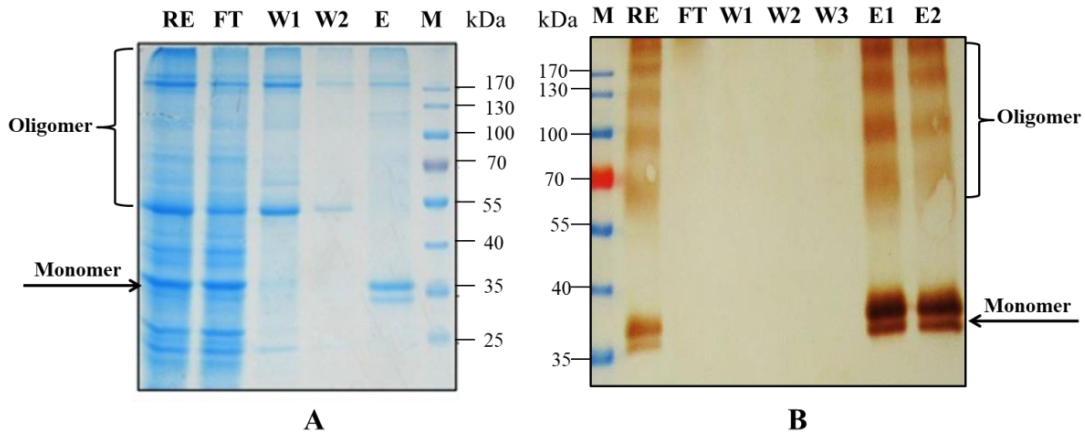
Hình 3.33. Kết quả tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo

A. Biểu đồ biểu diễn kết quả tinh sạch kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII bằng SEC. Bộ kit chứa các protein có trọng lượng phân tử lớn từ 75-2000 kDa (GE Healthcare) được dùng để ước tính khối lượng phân tử của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII. B. Kết quả Western blot kiểm tra các phân đoạn sau tinh sạch các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC sử dụng kháng thể kháng c-myc. C. Kết quả điện di SDS-PAGE và nhuộm Coomassie blue kiểm tra kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII ở phân đoạn 20 và 22 sau tinh sạch SEC. D. Xác định đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII dựa vào phản ứng liên kết chéo. (–) và (+) BS3: sự hiện diện của BS3 ở nồng độ 0 và 5 mM. Sản phẩm được phân tách trên SDS-PAGE, chuyển màng và nhận diện khi có mặt kháng thể kháng His-tag.

Ngoài ra, trạng thái oligomer của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII cũng được đánh giá sử dụng BS3 trong phản ứng liên kết chéo. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot cho thấy khi có sự hiện diện của BS3, xuất hiện băng có kích thước lớn hơn 250 kDa trên màng (Hình 3.33D). Do đó, các dữ liệu phân tích trạng thái oligomer của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII bằng SEC và phản ứng liên kết chéo đều cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tự nhiên tồn tại ở dạng oligomer.

3.3.3.2. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp

Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp được tinh sạch bằng phương pháp IMAC để phục vụ các thí nghiệm tiếp theo. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp được tinh sạch theo quy trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII có cải tiến sử dụng Ni Sepharose Fast Flow. Ở bước rửa nhằm loại bỏ các kháng nguyên lẫn tạp, khi sử dụng đệm rửa có bổ sung imidazole nồng độ 30 mM. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng IMAC từ thực vật bao gồm dịch chiết thô (RE), dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột (FT), dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa (W) và phân đoạn chứa kháng nguyên tinh sạch (E) được thu nhận để phân tích. Nồng độ protein tổng số trong các phân đoạn được đo bằng phương pháp Bradford. Sự hiện diện của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp trong các phân đoạn này được kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE, nhuộm bằng Coomassie Blue và đánh giá bằng Western blot (Hình 3.34).

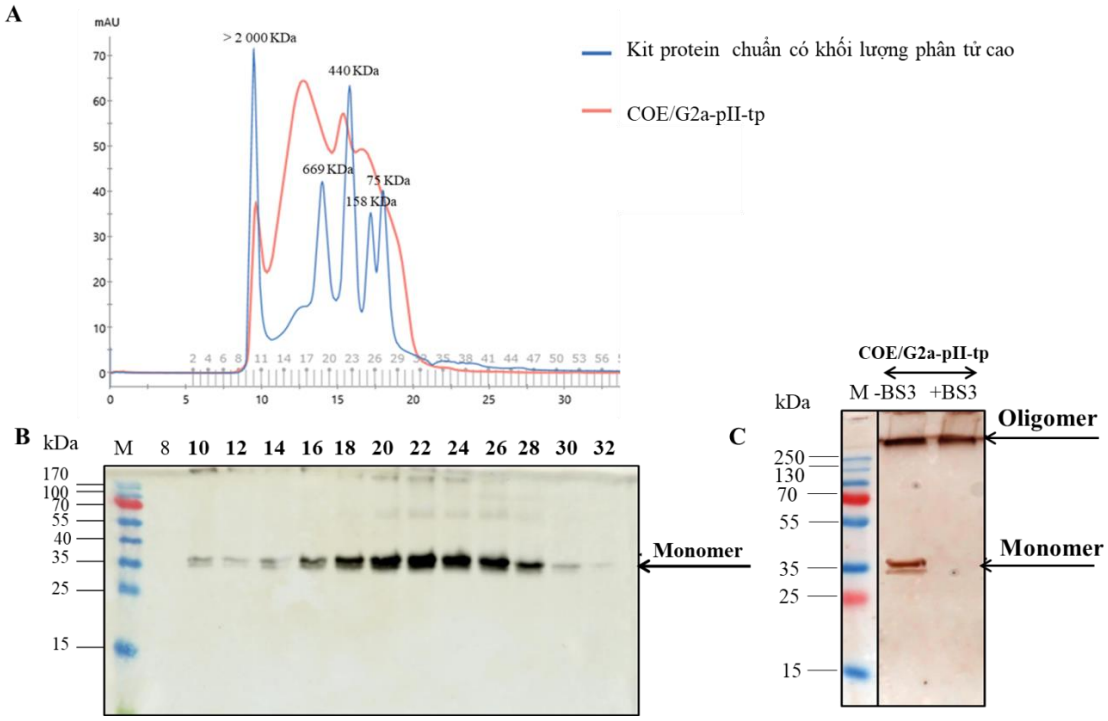


Hình 3.34. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue (A) và Western blot (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII-tp sử dụng phương pháp IMAC.

RE: dịch chiết thô; FT: dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột; W1, W2, W3: dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa lần 1, lần 2 và lần 3; E: kháng nguyên tinh sạch. 30 µg protein tổng số của RE, FT, W1, W2 và 30 µl protein tinh sạch được phân tách trên gel SDS-PAGE.

Các kết quả cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII-tp không được phát hiện trong dịch FT và W, điều này chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bám tốt với cột Ni Sepharose Fast Flow và không bị rửa trôi khỏi cột khi sử dụng đệm rửa với nồng độ imidazole 30 mM. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp tinh sạch được phát hiện với hàm lượng và độ tinh khiết cao trong phân đoạn E. Dựa vào kết quả đo protein tổng số bằng Bradford và kết quả bán định lượng bằng Western blot cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII-tp được xác định có độ tinh khiết đạt xấp xỉ 82%,

với hiệu suất thu hồi kháng nguyên COE/G2a-pII-tp từ dịch chiết thực vật sau tinh sạch IMAC đạt xấp xỉ 20%.



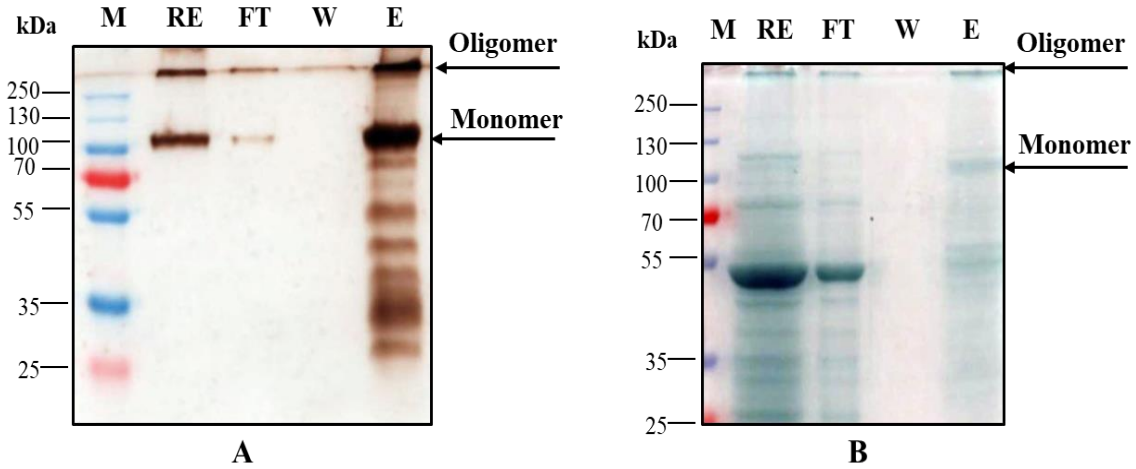
Hình 3.35. Kết quả tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo

A. Biểu đồ biểu diễn kết quả tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng SEC. Bộ kit chứa các protein có trọng lượng phân tử lớn từ 75-2000 kDa (GE Healthcare) được dùng để ước tính khối lượng phân tử của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp. B. Kết quả Western blot kiểm tra các phân đoạn sau tinh sạch các kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC sử dụng kháng thể kháng c-myc. C. Xác định đặc điểm oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp dựa vào phản ứng liên kết chéo. (–) và (+) BS3: sự hiện diện của BS3 ở nồng độ 0 và 5 mM. Sản phẩm được phân tách trên SDS-PAGE dưới điều kiện biến tính và nhận diện khi có mặt kháng thể kháng His-tag.

Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp sau tinh sạch IMAC được dùng để kiểm tra đặc điểm oligomer bằng SEC và phản ứng liên kết chéo (Hình 3.35). Kết quả tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng SEC và kết quả kiểm tra các phân đoạn sau tinh sạch SEC bằng Western blot cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII được phát hiện tại các phân đoạn từ 10-30, trong đó phần lớn kháng nguyên COE/G2a-pII-tp được phát hiện tại nhiều phân đoạn từ 18-26, với khối lượng phân tử khoảng 158-669 kDa (Hình 3.35A, B). Ngoài ra, trạng thái oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp cũng được phân tích sử dụng BS3 trong phản ứng liên kết chéo. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot cho thấy khi có sự hiện diện của BS3, xuất hiện băng có kích thước lớn hơn 250 kDa trên màng (Hình 3.35C). Do đó, các dữ liệu phân tích trạng thái oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng SEC và phản ứng liên kết chéo đều cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII-tp tự nhiên tồn tại ở dạng oligomer.

3.3.3.3. Tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên S2/G2a-pII

Kháng nguyên S2/G2a-pII được tinh sạch theo quy trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII sử dụng Ni Sepharose Fast Flow. Các phân đoạn trong quá trình tinh sạch kháng nguyên S2/G2a-pII bằng sắc ký ái lực IMAC từ thực vật bao gồm dịch chiết thô (RE), dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột (FT), dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa (W) và phân đoạn chứa kháng nguyên tinh sạch (E) được thu nhận để phân tích. Nồng độ protein tổng số trong các phân đoạn được đo bằng phương pháp Bradford.



Hình 3.36. Kết quả điện di SDS-PAGE, Western blot (A) và nhuộm Coomassie blue (B) kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên S2/G2a-pII sử dụng phương pháp IMAC.

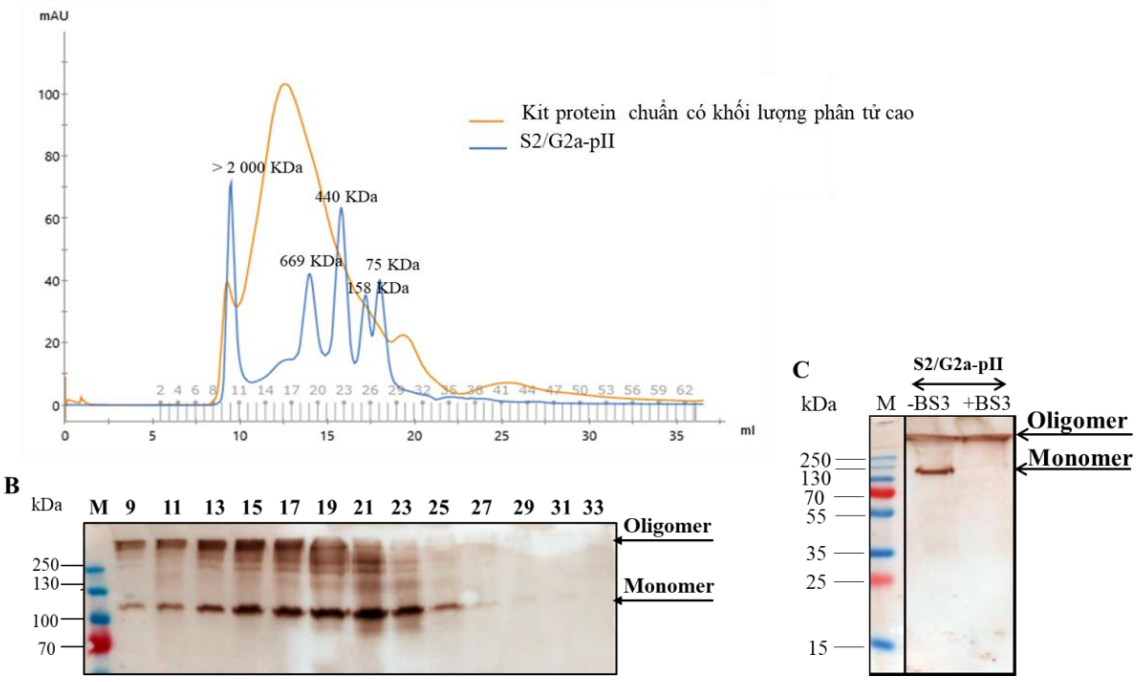
RE: dịch chiết thô; FT: dịch chảy qua cột sau khi đưa hỗn hợp dịch chiết thô trộn Ni Sepharose Fast Flow lên cột; W: dịch rửa chảy qua cột sau khi bổ sung đệm rửa; E: kháng nguyên tinh sạch. 30 µg protein tan tổng số của RE, FT, và 30 µl protein tinh sạch được phân tách bằng SDS-PAGE.

Sự hiện diện của kháng nguyên S2/G2a-pII trong các phân đoạn này được kiểm tra sử dụng phương pháp điện di SDS-PAGE, nhuộm bằng Coomassie Blue và đánh giá bằng Western blot (Hình 3.36). Kết quả kiểm tra quá trình tinh sạch kháng nguyên S2/G2a-pII bằng SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot cho thấy phần lớn kháng nguyên S2/G2a-pII đã bám với Ni Sepharose Fast Flow, kháng nguyên S2/G2a-pII hầu như không bị rửa trôi trong quá trình bổ sung đệm rửa vào cột. Kháng nguyên S2/G2a-pII thu nhận được sau tinh sạch có hàm lượng cao (Hình 3.36A, B). Như vậy, kháng nguyên S2/G2a-pII đã được tinh sạch thành công từ lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp IMAC. Dựa vào kết quả đo protein tổng số bằng Bradford và kết quả bán định lượng bằng Western blot cho thấy kháng nguyên S2/G2a-pII được xác định có độ tinh khiết xấp xỉ 81%, với hiệu suất thu hồi kháng nguyên S2/G2a-pII từ dịch chiết thực vật sau tinh sạch IMAC đạt xấp xỉ 22%.

Độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi sau tinh sạch các kháng nguyên tái tổ hợp từ lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp IMAC được thể hiện ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Độ tinh khiết và hiệu suất thu hồi sau tinh sạch các kháng nguyên tái tổ hợp từ lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp IMAC

STT	Tên kháng nguyên	Độ tinh khiết của kháng nguyên sau tinh sạch IMAC (%)	Hiệu suất thu hồi kháng nguyên sau tinh sạch IMAC (%)
1	COE/G1a-pII	85	35
2	COE/G2a-pII	82	25
3	COE-S1D/G2a-pII	80	27
4	COE/G2a-pII-tp	82	20
5	S2/G2a-pII	81	22



Hình 3.37. Kết quả tinh sạch và phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên S2/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC và phản ứng liên kết chéo

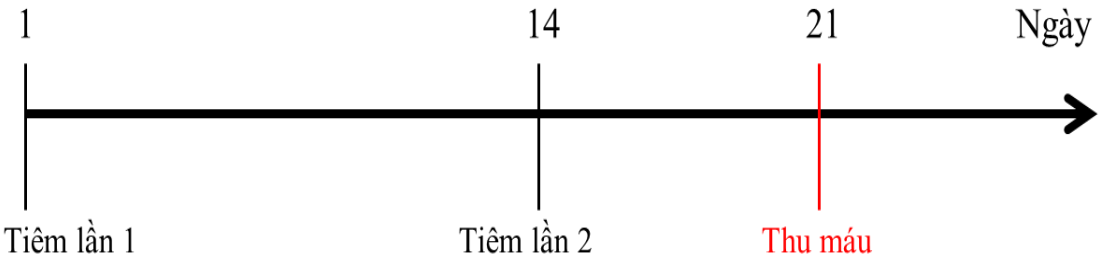
A. Biểu đồ biểu diễn kết quả tinh sạch kháng nguyên S2/G2a-pII bằng SEC. Bộ kit chứa các protein có khối lượng phân tử lớn từ 75-2000 kDa (GE Healthcare) được dùng để ước tính khối lượng phân tử của kháng nguyên S2/G2a-pII. B. Kết quả Western blot kiểm tra các phân đoạn sau tinh sạch các kháng nguyên S2/G2a-pII bằng phương pháp sắc ký lọc gel SEC sử dụng kháng thể kháng c-myc. C. Xác định đặc điểm oligomer của kháng nguyên S2/G2a-pII dựa vào phản ứng liên kết chéo. (–) và (+) BS3: sự hiện diện của BS3 ở nồng độ 0 và 5 mM. Sản phẩm được phân tách trên SDS-PAGE, chuyển màng và nhận diện khi có mặt kháng thể kháng His-tag.

Kháng nguyên S2/G2a-pII sau tinh sạch IMAC được dùng để kiểm tra đặc điểm oligomer bằng SEC. Kết quả tinh sạch kháng nguyên S2/G2a-pII bằng SEC và kết quả kiểm tra các phân đoạn sau tinh sạch SEC bằng Western blot cho thấy

kháng nguyên S2/G2a-pII được phát hiện ở các phân đoạn từ 9 đến 25 (Hình 3.37A, B). Kháng nguyên S2/G2a-pII chủ yếu tập trung ở các phân đoạn từ 15 đến 23, tương ứng với khối lượng ước tính khoảng 440 đến 669 kDa. Trạng thái oligomer của kháng nguyên S2/G2a-pII cũng được phân tích sử dụng BS3 trong phản ứng liên kết chéo. Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot cho thấy khi có sự hiện diện của BS3, xuất hiện băng có kích thước lớn hơn 250 kDa (Hình 3.37C). Như vậy, các kết quả phân tích đặc điểm oligomer của kháng nguyên S2/G2a-pII bằng SEC và phản ứng liên kết chéo đều cho thấy kháng nguyên S2/G2a-pII tự nhiên tồn tại ở dạng oligomer

3.3.4. Đánh giá tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII trên chuột

Khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp bao gồm COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII được so sánh với kháng nguyên COE/G2a-pII trên chuột.



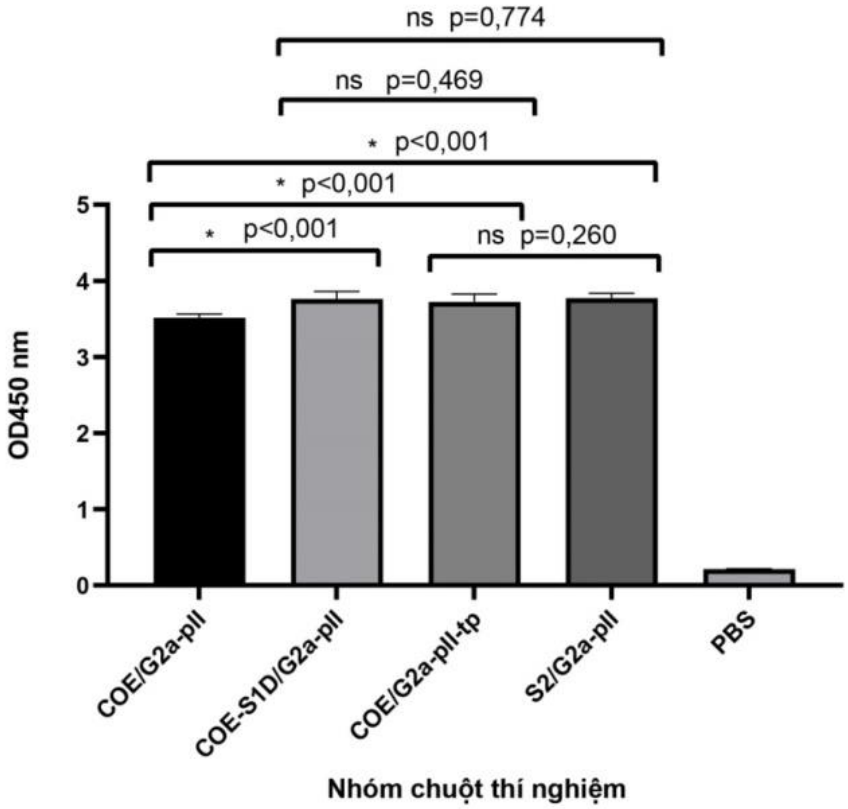
Hình 3.38. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột với các kháng nguyên PEDV G2a tái tổ hợp

Mỗi con chuột được tiêm 2 lần với 1 µg kháng nguyên tái tổ hợp/liều hoặc PBS trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP). Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột của các kháng nguyên tái tổ hợp được thể hiện ở Hình 3.38. Khả năng kích thích sinh các kháng thể IgG, IgA, IgM đặc hiệu PEDV, hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV và nồng độ cytokine IFN-γ được phân tích dựa trên huyết thanh của các con chuột sau tiêm lần 2.

Đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV

Đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các nhóm chuột được phân tích thông qua ELISA. Kết quả ELISA chứng tỏ có sự hiện diện của kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của cả 4 nhóm chuột tiêm các kháng nguyên tái tổ hợp COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII. Điều này có nghĩa là cả bốn loại kháng nguyên tái tổ hợp này đều có khả năng kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV. Ngoài ra, đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII và các nhóm nhóm chuột tiêm kháng nguyên

COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII là có sự khác biệt, thể hiện ở giá trị p<0,001 (Hình 3.39).



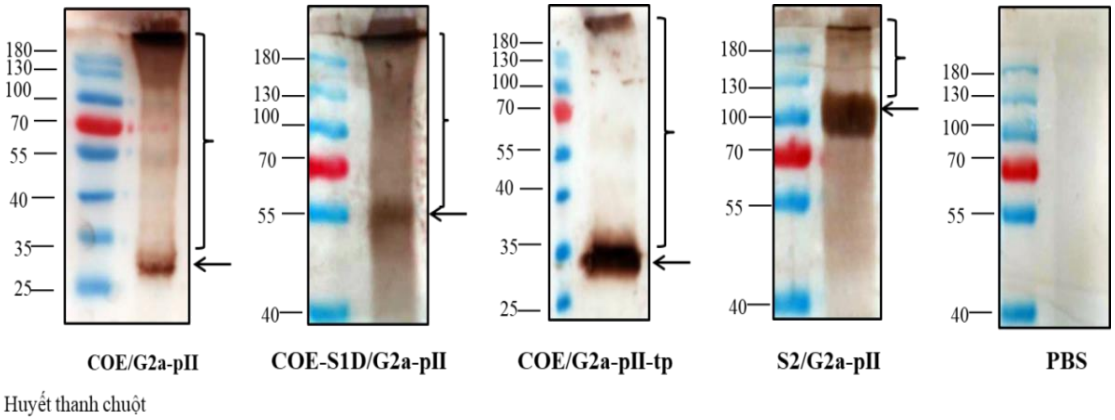
Hình 3.39. Phân tích đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu của PEDV trong huyết thanh của các nhóm chuột sử dụng ELISA

Đĩa ELISA được phủ với PEDV SM98 ($10^{4,37}$ TCID50/mL). Huyết thanh của nhóm chuột được tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII và PBS được dùng làm kháng thể 1. Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± Độ lệch chuẩn. *: p <0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: không có sự khác biệt về thống kê

Các nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII có giá trị OD450 trung bình lần lượt là 3,51; 3,76; 3,72; 3,77. Kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong các nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII được kích thích sinh ra mạnh hơn so với nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII. Điều này có nghĩa các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII có khả năng kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV tốt hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV giữa nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII-tp là tương tự nhau, thể hiện ở giá trị p= 0,496> 0,05. Thêm vào đó, đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV giữa nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và nhóm chuột tiêm kháng nguyên S2/G2a-pII là tương tự nhau, thể hiện ở giá trị p= 0,774> 0,05. Nhóm chuột tiêm kháng nguyên

COE/G2a-pII-tp và nhóm chuột tiêm kháng nguyên S2/G2a-pII cũng không có sự khác biệt về mặt thống kê trong đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV, thể hiện ở giá trị p= 0,260> 0,05. Điều này có nghĩa là các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII có khả năng kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV tương đương nhau. Kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong nhóm chuột được tiêm PBS không được tìm thấy (Hình 3.39).

Khả năng kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các nhóm chuột được kiểm tra bằng Western blot. Kết quả Western blot chứng tỏ kháng thể IgG đặc hiệu các kháng nguyên tái tổ hợp của PEDV đã được kích thích sinh ra trong các nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII. Không phát hiện kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV trong nhóm chuột được tiêm PBS (Hình 3.40).



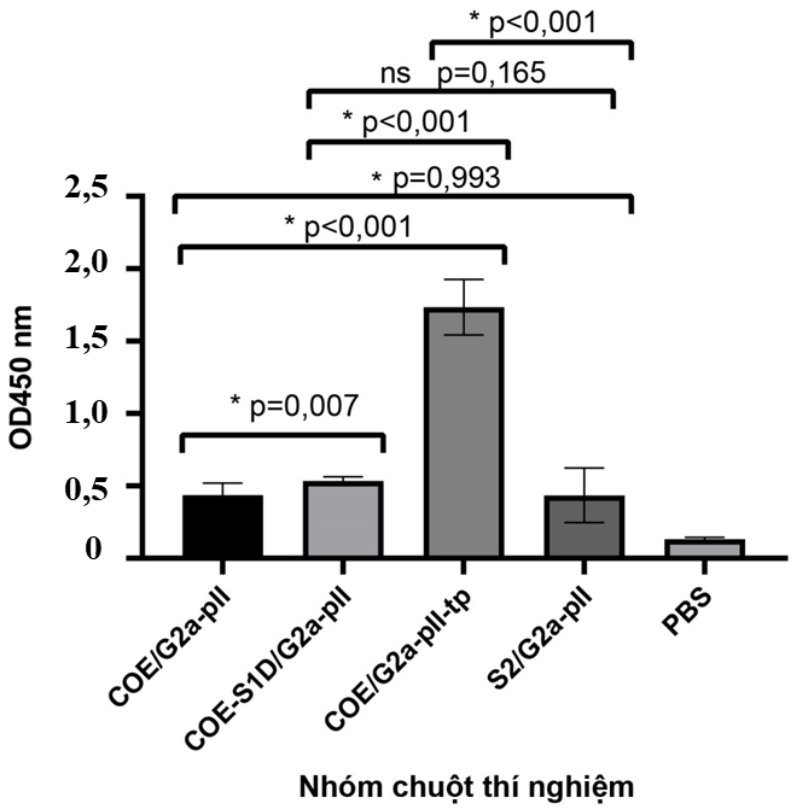
Hình 3.40. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trong huyết thanh các nhóm chuột sau 2 lần tiêm bằng Western blot

Kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII tinh sạch SEC được sử dụng để đưa vào giếng. Huyết thanh của các nhóm chuột được tiêm với các protein này và PBS được dùng làm kháng thể 1.

Đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV

Về đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV, kết quả ELISA chứng tỏ có sự hiện diện của kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong cả bốn nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII. Điều này có nghĩa là cả bốn kháng nguyên này đều có khả năng kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trên chuột. Các nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII có giá trị OD_{450} trung bình lần lượt là 0,44; 0,53; 1,73; 0,43 (Hình 3.41). Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII và các nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII

hoặc COE/G2a-pII-tp là có sự khác biệt về mặt thống kê, thể hiện ở giá trị p<0,05. Các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV mạnh hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII trên chuột. Đặc biệt, đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV được ghi nhận cao nhất ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII-tp và có sự khác biệt về mặt thống kê với các nhóm chuột được tiêm các kháng nguyên còn lại với giá trị p<0,05. Điều này chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII-tp có khả năng kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, S2/G2a-pII và COE/G2a-pII. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp có khả năng kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV với giá trị OD450 cao hơn gấp hơn 3 lần so với các kháng nguyên còn lại. Kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tương tự như kháng nguyên S2/G2a-pII trên chuột, thể hiện ở giá trị p= 0,993. Ngoài ra, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII cũng đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tương tự như kháng nguyên S2/G2a-pII trên chuột, thể hiện ở giá trị p= 0,165. Không tìm thấy kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong nhóm chuột tiêm PBS (Hình 3.41).

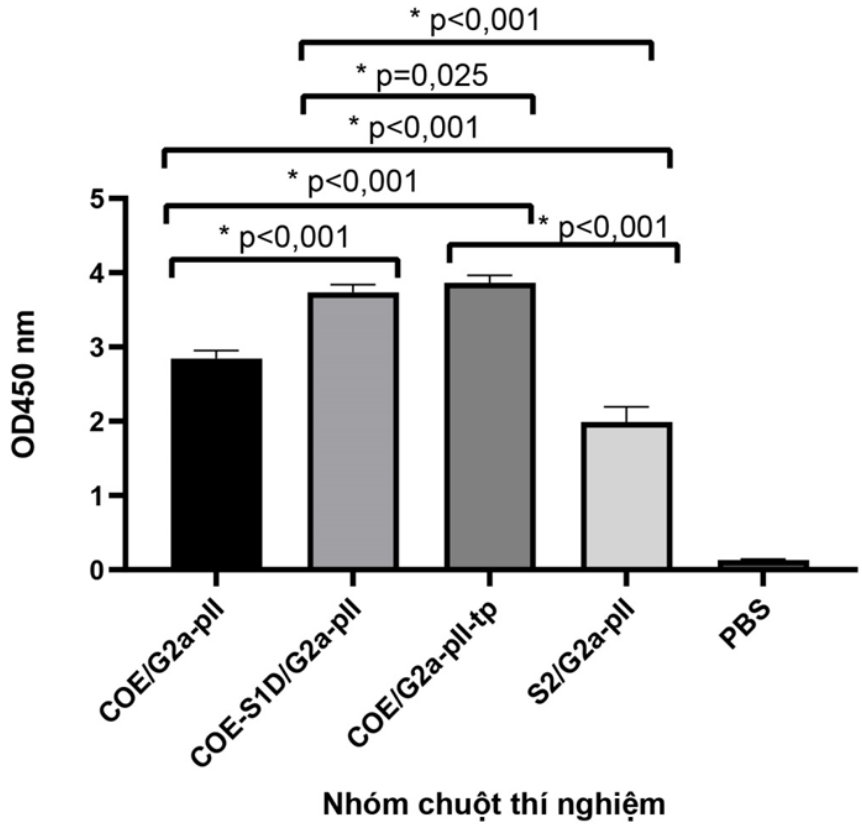


Hình 3.41. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh của các nhóm chuột bằng ELISA.

Đĩa ELISA được phủ với PEDV SM98 ($10^{4,27}$ TCID50/mL). Huyết thanh của nhóm chuột được tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII hoặc PBS được dùng làm kháng thể 1. Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: không có sự khác biệt về thống kê

Đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV

Về đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV, kết quả ELISA chứng tỏ kháng thể IgM đặc hiệu PEDV đã được sinh ra trong cả bốn nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII. Hay nói cách khác, cả bốn kháng nguyên này đều đã kích thích sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV trên chuột. Các nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII có giá trị OD_{450} trung bình lần lượt là 2,84; 3,80; 3,86; 1,98. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII là có sự khác biệt về mặt thống kê với các nhóm chuột tiêm các kháng nguyên khác, với giá trị p<0,005 (Hình 3.42).



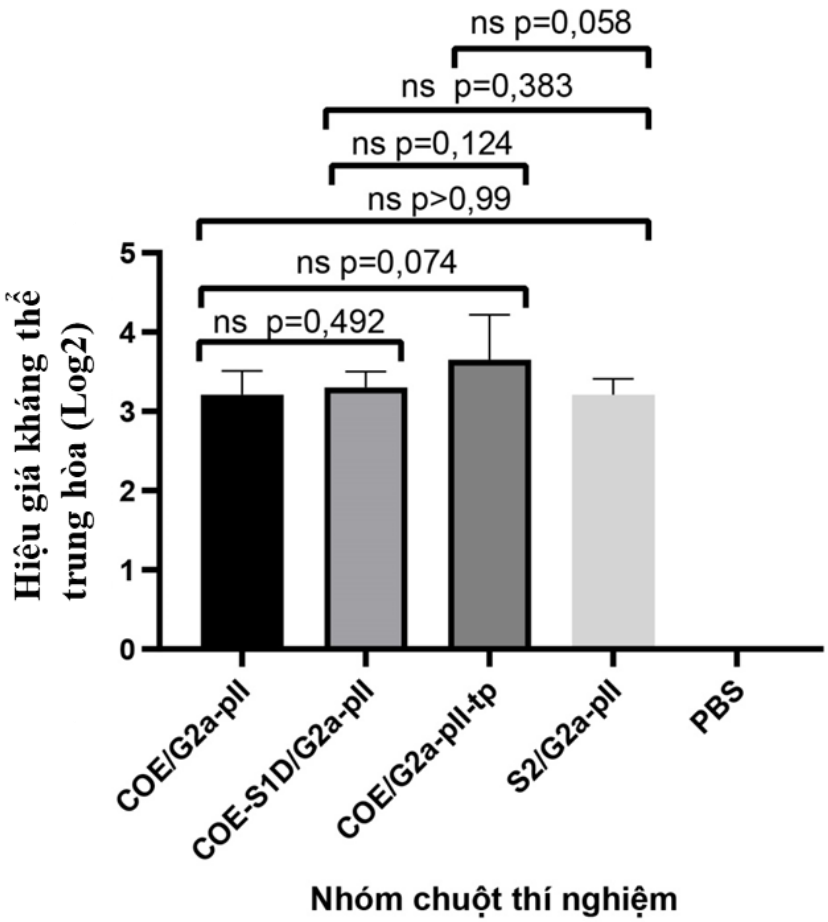
Hình 3.42. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV trong huyết thanh ở các nhóm chuột bằng ELISA

Đĩa ELISA được phủ với PEDV SM98 ($10^{4,37}$ TCID50/mL). Huyết thanh của nhóm chuột được tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII hoặc PBS được dùng làm kháng thể 1. Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV ở nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp là cao hơn đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII; trong khi đó, đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên

S2/G2a-pII lại thấp hơn so với nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII. Điều này có nghĩa là các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp đã kích thích sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII, trong khi kháng nguyên S2/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgM kém hơn kháng nguyên COE/G2a-pII. Kháng thể IgM đặc hiệu PEDV được sinh ra trong hai nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII-tp là có sự khác biệt, thể hiện ở giá trị p= 0,025< 0,05. Đáp ứng kháng thể IgM đặc hiệu PEDV được phát hiện mạnh nhất ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII-tp và thấp nhất ở nhóm chuột tiêm kháng nguyên S2/G2a-pII-tp. Không phát hiện thấy kháng thể IgM đặc hiệu PEDV trong nhóm chuột được tiêm PBS (Hình 3.42).

Khả năng trung hòa PEDV



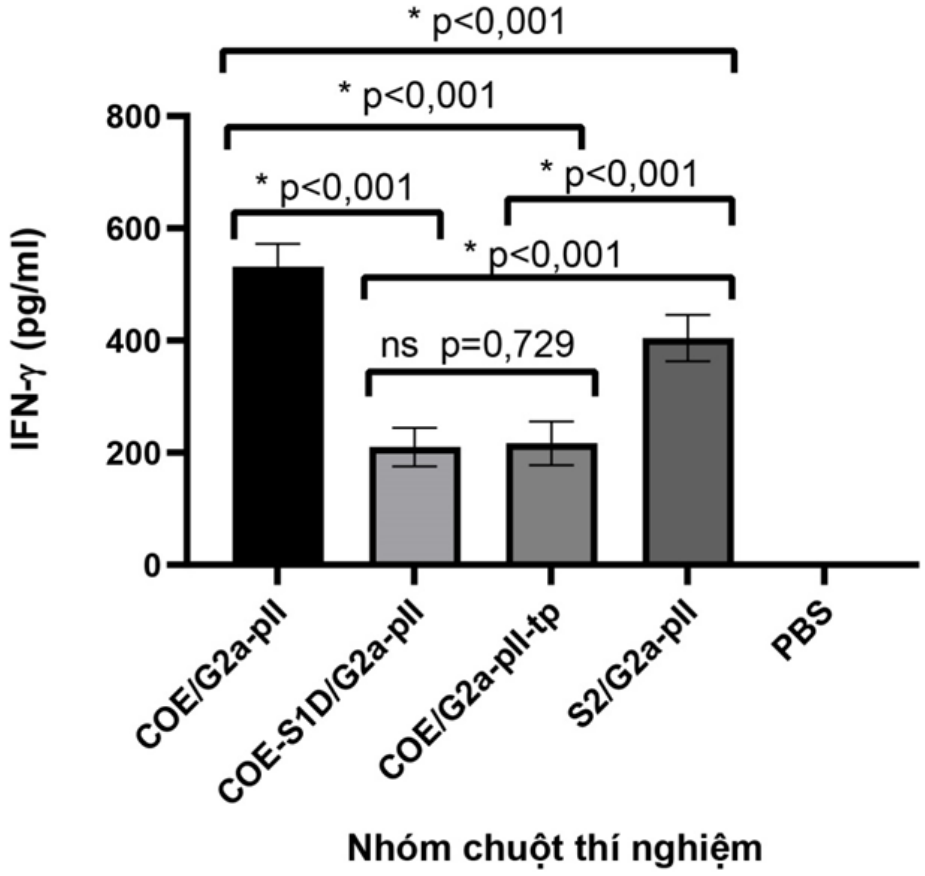
Hình 3.43. Phân tích đáp ứng trung hòa PEDV của huyết thanh ở nhóm chuột bằng thí nghiệm trung hòa virus trên tế bào.

Số liệu về hiệu giá kháng thể trung hòa của huyết thanh từng nhóm chuột được thể hiện dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. ns: không có sự khác biệt về thống kê khi p>0,05.

Sự hiện diện của các kháng thể trung hòa PEDV trong huyết thanh chuột được đánh giá thông qua thí nghiệm trung hòa virus trên tế bào. Kết quả chứng tỏ

phát hiện được kháng thể trung hòa PEDV trong cả bốn nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII. Điều này cho thấy cả bốn loại kháng nguyên này đã kích thích sinh các kháng thể đặc hiệu có khả năng trung hòa PEDV trên chuột. Hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV trung bình được xác định ở các nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII lần lượt là 9,25; 10,05; 12,55; 9,25. Tuy nhiên, đáp ứng sinh kháng thể trung hòa PEDV trong các nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII là không có sự sai khác về mặt thống kê, thể hiện ở giá trị p> 0,05. Ở nhóm chuột tiêm PBS, kháng thể trung hòa PEDV không được tìm thấy (Hình 3.43).

Đáp ứng sinh cytokine IFN-γ



Hình 3.44. Nồng độ IFN-γ trong huyết thanh của các nhóm chuột thí nghiệm bằng bộ kit ELISA

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê; ns: không có sự khác biệt về thống kê

Nồng độ cytokine IFN-γ trong huyết thanh của lợn con được xác định sử dụng bộ kit ELISA (Mouse IFN-γ ELISA Basis kit, Mabtech). Kết quả ELISA chứng tỏ IFN-γ được tìm thấy trong huyết thanh của các nhóm chuột tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-

pII, trong khi đó IFN-γ không được tìm thấy trong nhóm chuột tiêm PBS. Điều này chứng tỏ cả bốn kháng nguyên này đều có khả năng kích thích sản sinh IFN-γ trên chuột (Hình 3.44). Đáp ứng sinh IFN-γ trung bình trong huyết thanh của nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII lần lượt đạt 531,8 ± 40,58 pg/mL; 210,2 ± 34,2 pg/mL; 216,6 ± 38,8 pg/mL; 404,15± 41,2 pg/mL. Đáp ứng sinh IFN-γ của nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII và các nhóm chuột tiêm các kháng nguyên khác là có sự khác biệt về thống kê, với giá trị $p<0,05$. Đáp ứng sinh IFN-γ được ghi nhận đạt giá trị cao nhất trong nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII; đạt giá trị thấp nhất trong hai nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp. Điều này có nghĩa là kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh đáp ứng IFN-γ cao gấp 2,5 lần so với các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp và cao gấp 1,3 lần so với kháng nguyên S2/G2a-pII. Đáp ứng sinh IFN-γ ở các nhóm chuột tiêm kháng nguyên S2/G2a-pII là khác biệt về thống kê so với các nhóm chuột tiêm các kháng nguyên còn lại, với giá trị $p<0,05$. Nhóm chuột được tiêm kháng nguyên S2/G2a-pII có mức độ đáp ứng IFN-γ thấp hơn so với nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII nhưng lại cao hơn so với các nhóm chuột được tiêm COE-S1/G2a-pII hoặc S2/G2a-pII. Đáp ứng IFN-γ được ghi nhận tại nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp là tương đương nhau, không có sự khác biệt về mặt thống kê, thể hiện ở giá trị $p=0,729$ (Hình 3.44).

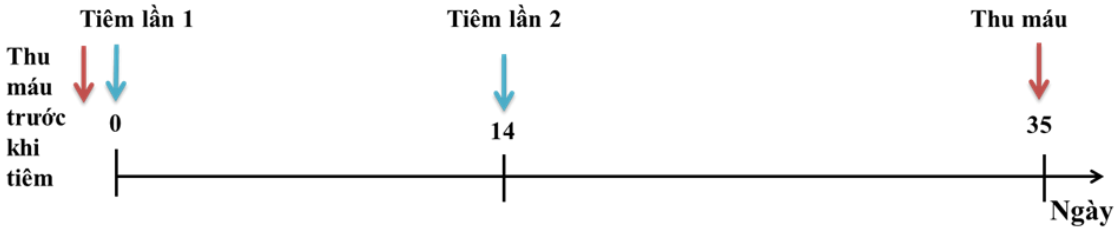
Như vậy, dựa vào mức độ biểu hiện, hiệu suất thu hồi sau tinh sạch và khả năng kích thích sinh miễn dịch trên chuột của các kháng nguyên chứng tỏ ngoài kháng nguyên COE/G2a-pII tái tổ hợp thì hai kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp có thể là các ứng viên tiềm năng trong phòng PEDV. Tuy nhiên, trong khuôn khổ của luận án, do có giới hạn về thời gian thực hiện, kháng nguyên COE-S1/G2a-pII được lựa chọn để đánh giá khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch trên lợn.

3.3.5. Đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trên lợn

- *Thí nghiệm 1:* So sánh tính miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII (liều 12,5 µg) trên lợn con; so sánh ảnh hưởng của chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) và chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) đến tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII

Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được so sánh với kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn con. Lợn con được chia thành 5 nhóm. Nhóm 1 và nhóm 2 lần lượt được tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-

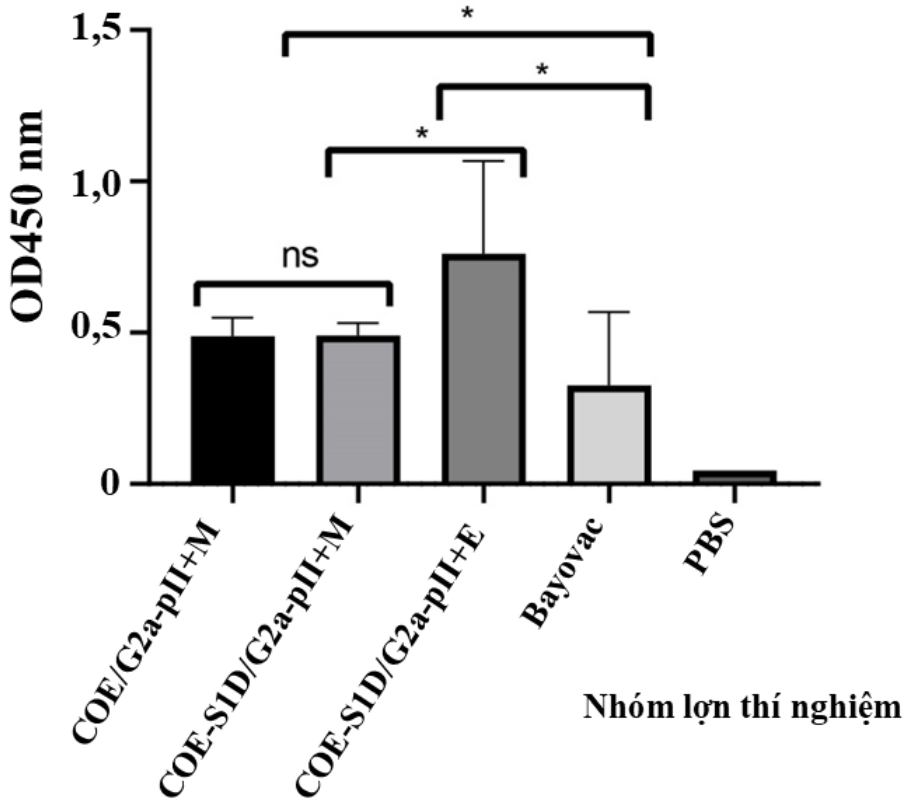
S1D/G2a-pII (12,5 µg/con) trộn với chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC). Nhóm 3 được tiêm với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (12,5 µg/con) trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D(MVP). Nhóm 4 được tiêm với vacxin vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer). Nhóm 5 được tiêm với PBS trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D(MVP).



Hình 3.45. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch protein COE-S1D/G2a-pII trên lợn con lần 1

Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch protein COE-S1D/G2a-pII trên lợn con lần 1 được thể hiện ở Hình 3.45.

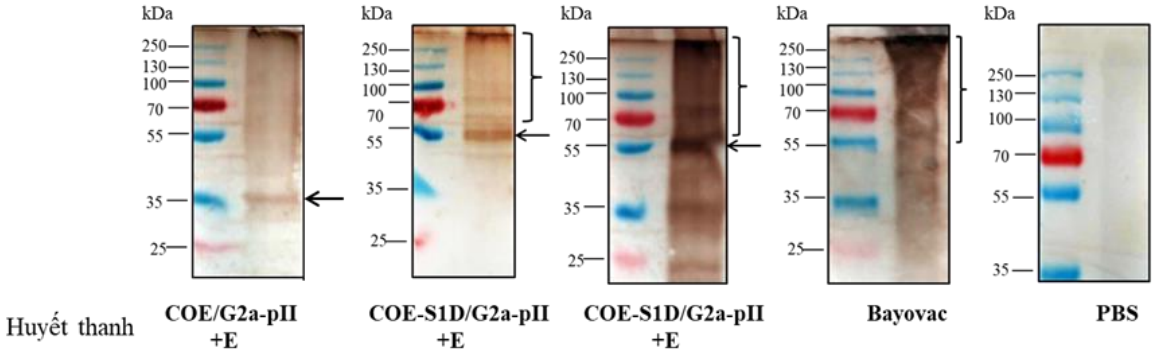
+ Đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV



Hình 3.46. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng ELISA.

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: không có sự khác biệt về thống kê. M: Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), E: Emulsigen®-D (MVP), Bayovac: Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer)

Đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được đánh giá bằng ELISA. Kết quả ELISA cho thấy cả 3 nhóm lợn 1, 2, 3 được tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII đều có sự sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV và đáp ứng IgG đặc hiệu PEDV ở các nhóm này đều cao hơn với nhóm tiêm vacxin vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer) ($p<0,05$). Không có sự khác biệt về mặt thống kê trong đáp ứng IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV giữa 2 nhóm lợn con được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII khi trộn với chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), với giá trị OD_{450} trung bình của hai nhóm xấp xỉ 0,48. Tuy nhiên, khả năng sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV giữa 2 nhóm lợn tiêm COE-S1D/G2a-pII khi sử dụng chất bổ trợ khác nhau là có sự khác biệt về thống kê. Đáp ứng IgG đặc hiệu PEDV mạnh hơn được ghi nhận ở nhóm lợn con được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) so cùng loại kháng nguyên này trộn với chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), với giá trị OD_{450} trung bình của nhóm 3 đạt 0,76. Kháng thể IgG đặc hiệu PEDV không được tìm thấy ở nhóm lợn con tiêm PBS trộn Emulsigen®-D (MVP) (Hình 3.46).



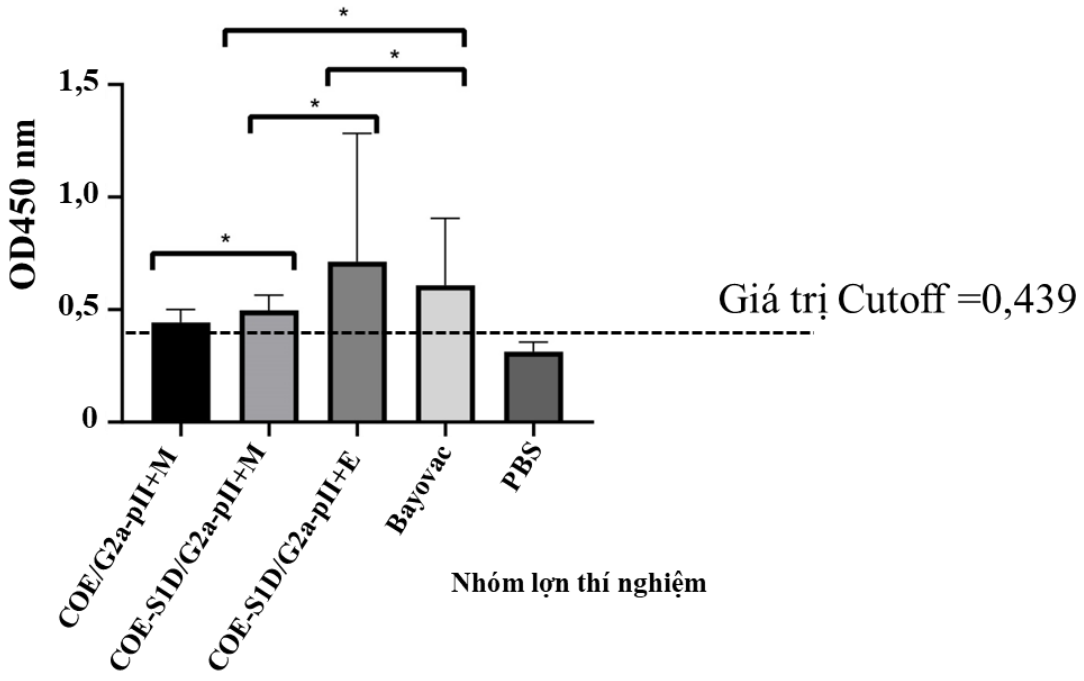
Hình 3.47. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng Western blot.

Huyết thanh của các nhóm lợn được dùng làm kháng thể 1. Mũi tên chỉ băng protein dạng monomer, dấu ngoặc chỉ băng protein dạng oligomer. M: Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), E: Emulsigen®-D (MVP); Bayovac: Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer)

Tương tự như kết quả ELISA, kết quả Western blot sử dụng kháng nguyên PEDV cũng cho thấy kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII được phát hiện trong huyết thanh của các nhóm lợn 1, 2, 3 tiêm với các kháng nguyên tương ứng, trong khi đó các kháng thể IgG đặc hiệu các kháng nguyên PEDV tái tổ hợp không có mặt trong nhóm lợn đối chứng âm sau 2 lần tiêm (Hình 3.47). Kết quả Western blot cho thấy nhóm lợn 3 tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trộn chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) có tín hiệu băng kháng

nguyên đậm hơn trên màng Western blot so với nhóm lợn 2 tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trộn chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) (Hình 3.47).

+ Đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV



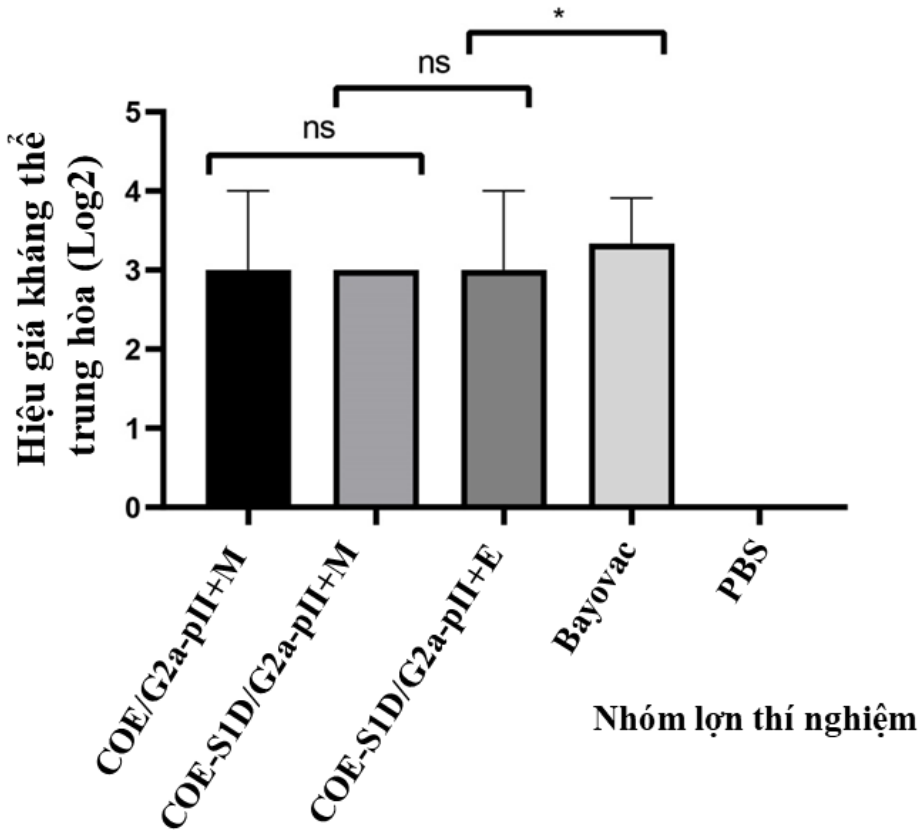
Hình 3.48. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng ELISA

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. M: Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), E: Emulsigen®-D (MVP), Bayovac: Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer)

Sự sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV được kiểm tra bằng bộ kit ELISA (PED IgA Ab ELISA, Binote, Korea). Theo hướng dẫn của nhà sản xuất, giá trị OD_{450} > giá trị cutoff (0,35+ mean OD_{NC}) được xem là dương tính với kháng thể IgA đặc hiệu PEDV. Trong thí nghiệm này giá trị cutoff được xác định bằng 0,439 theo chỉ dẫn của bộ kit. Kết quả ELISA cho thấy cả 3 nhóm lợn được tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII đều dương tính với kháng thể IgA đặc hiệu PEDV. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm lợn 2 tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII là cao hơn so với nhóm lợn 1 tiêm COE/G2a-pII khi trộn cùng chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC). Đặc biệt, đáp ứng IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm lợn 3 tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) là cao hơn so với đáp ứng IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm lợn 2 tiêm chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), với giá trị OD_{450} trung bình của hai nhóm lợn lần lượt đạt 0,71 và 0,49. Trong khi đáp ứng IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm lợn 3 cao hơn so với nhóm tiêm vacxin vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer), thì đáp ứng IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm lợn 1 và 2 lại

thấp hơn so với nhóm tiêm vacxin vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer) ($p<0,05$). Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV không được phát hiện ở nhóm lợn con tiêm PBS trộn Emulsigen®-D (MVP) (Hình 3.48).

+ *Đánh giá khả năng trung hòa PEDV*



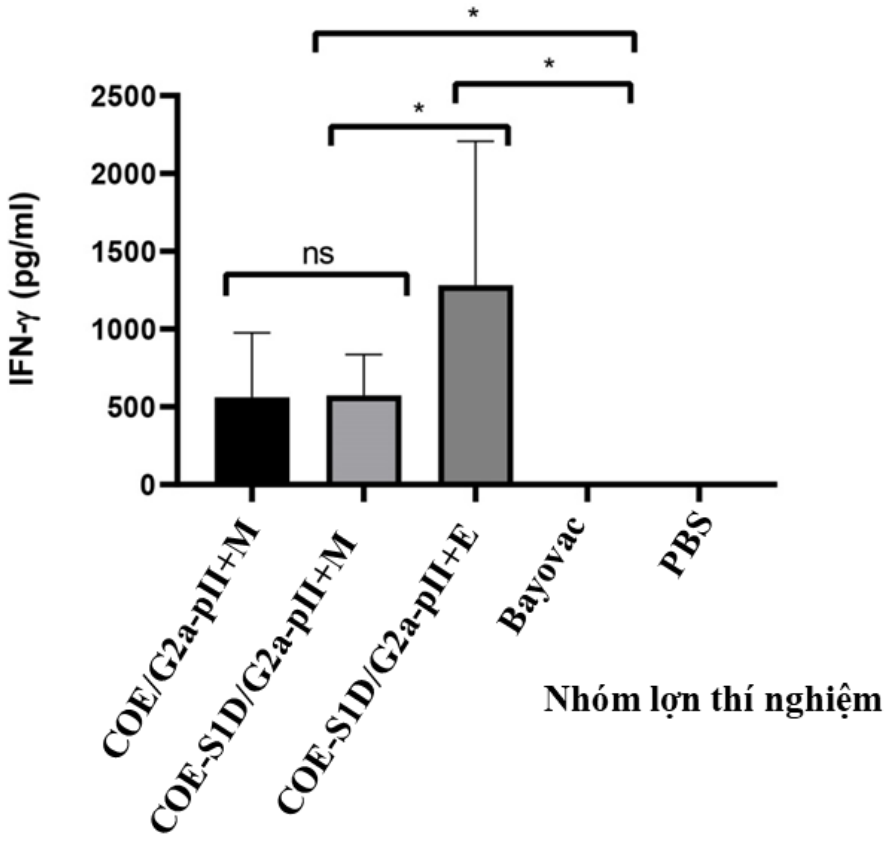
Hình 3.49. Phân tích đáp ứng trung hòa PEDV trong huyết thanh của các nhóm lợn thí nghiệm bằng thí nghiệm trung hòa virus.

Hiệu giá kháng thể trung hòa ≥ 8 được xem là dương tính. * sai khác có ý nghĩa thống kê ($p<0,05$). ns: không có sự khác biệt về thống kê. M: Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), E: Emulsigen®-D (MVP), Bayovac: Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer)

Khả năng trung hòa PEDV của các huyết thanh lợn được xác định bằng thí nghiệm trung hòa virus. Kết quả đánh giá trung hòa cho thấy ở 4 nhóm lợn thí nghiệm được tiêm với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII hoặc vacxin vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer) đều có mặt các kháng thể đặc hiệu có khả năng trung hòa kháng PEDV. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể có khả năng trung hòa PEDV ở các nhóm lợn được tiêm với COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII trộn chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) hoặc COE-S1D/G2a-pII trộn chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP), thể hiện ở hiệu giá trung hòa trung bình ở các nhóm là 8. Các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể có khả năng trung hòa PEDV ở nhóm lợn tiêm vacxin thương mại cao hơn một chút so với các nhóm lợn được tiêm các kháng nguyên tái tổ hợp.

Điều này có thể được giải thích bởi sự tương thích về chủng của vacxin thương mại (SM98) với chủng PEDV được dùng cho phản ứng trung hòa. Các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong nhóm lợn được tiêm với PBS kèm chất bổ trợ không được tìm thấy (Hình 3.49).

+ Đáp ứng sinh IFN-γ trong các nhóm lợn thí nghiệm



Hình 3.50. Phân tích đáp ứng sinh IFN-γ trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng bộ kit ELISA.

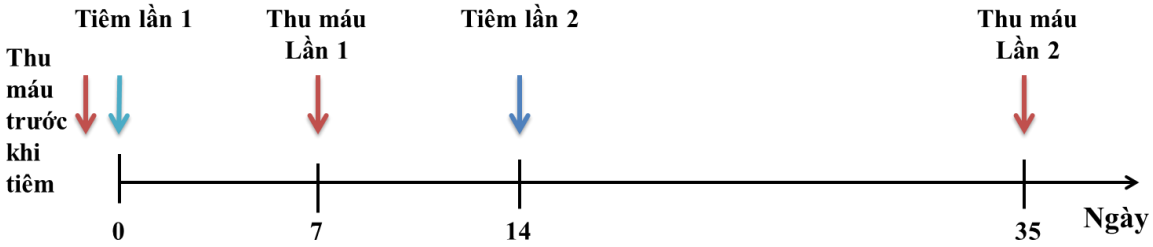
Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: không có sự khác biệt về thống kê. M: Montanide ISA™ 201 (SEPPIC), E: Emulsigen®-D (MVP), Bayovac: Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer)

Nồng độ IFN-γ trong huyết thanh của lợn con được xác định bằng bộ kit ELISA (Porcine IFN-γ ELISA Basis kit, Mabtech). Kết quả chứng tỏ IFN-γ đã được tạo ra trong các nhóm lợn con tiêm với kháng nguyên COE/G2a-pII hoặc COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ, trong khi đó IFN-γ không được tạo ra trong các nhóm lợn con tiêm với vacxin thương mại vô hoạt Bayovac® SuiShot® PT-100 (Bayer) và nhóm lợn con đối chứng âm. Không có sự khác biệt về đáp ứng IFN-γ trong huyết thanh của nhóm 1 và nhóm 2 được tiêm với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII kèm chất bổ trợ Montanide ISA™ 201, với nồng độ IFN-γ đạt hơn 500 pg/mL. Hai nhóm lợn 2 và 3 tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trộn với hai loại chất bổ trợ khác nhau là Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) hoặc

Emulsigen®-D (MVP) là có sự sai khác về mặt thống kê trong đáp ứng IFN-γ, với giá trị p<0,05. Đáp ứng IFN-γ được ghi nhận đạt giá trị cao nhất đạt 1281,77 pg/mL ± 23,7 pg/mL ở nhóm lợn con được tiêm với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) (Hình 3.50).

Các kết quả so sánh khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII. Tuy nhiên, các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV, khả năng trung hòa PEDV và đáp ứng IFN-γ của hai kháng nguyên này là tương đương nhau ở trên lợn con. Ngoài ra, các kết quả cho thấy chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) có tác dụng tốt hơn chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) khi trộn với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG, IgA đặc hiệu PEDV và đáp ứng IFN-γ.

- *Thí nghiệm 2:* So sánh tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D-G2a-pII (liều 50 µg) với vacxin thương mại trên lợn con



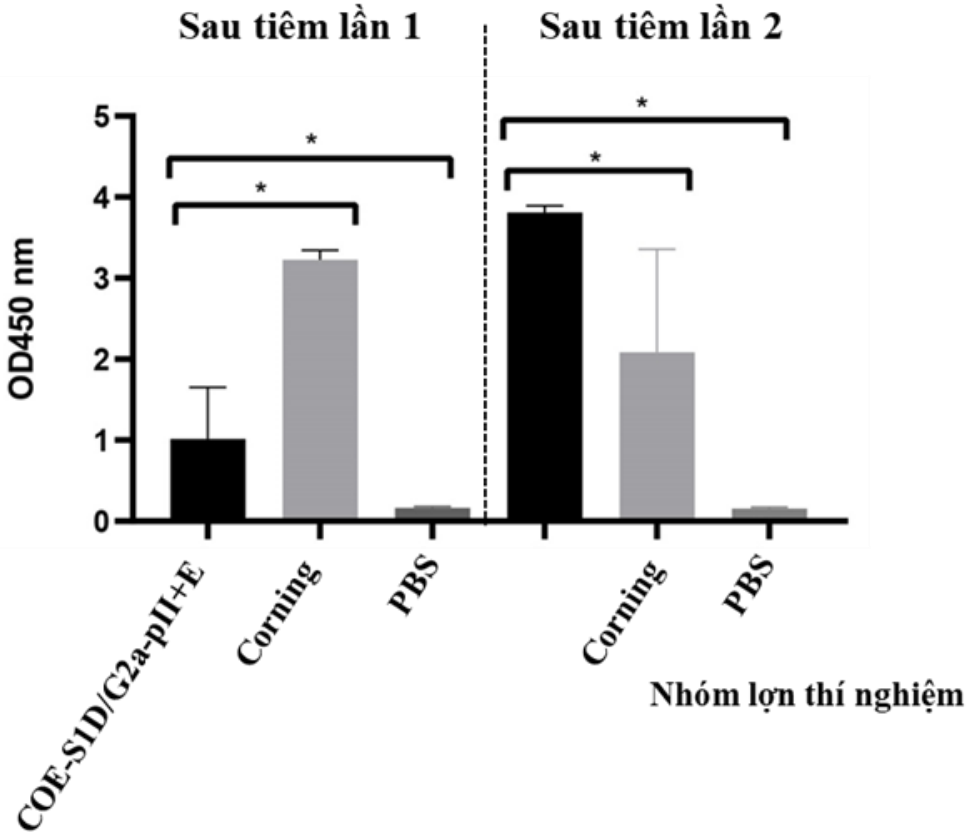
Hình 3.51. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch protein COE-S1D/G2a-pII trên lợn con lần 2

Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (liều 50 µg) được so sánh với vacxin thương mại Corning chứa chủng PEDV AJ1102 dạng vô hoạt (Wuhan Keqian Biology) thuộc nhóm G2b trên lợn con. Lợn con được chia thành 3 nhóm. Nhóm 1 được tiêm với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/con) trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP). Nhóm 2 được tiêm với vacxin thương mại Corning, vô hoạt chứa chủng PEDV AJ1102. Nhóm 3 được tiêm với PBS trộn với chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP). Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con được trình bày ở Hình 3.51.

+ Đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV

Khả năng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được kiểm tra bằng ELISA. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tinh sạch SEC (1 µg/mL) được dùng để phủ đĩa ELISA. Kết quả ELISA cho thấy, sau tiêm lần 1, cả 2 nhóm lợn được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) hoặc vacxin thương mại Corning đều có sự sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV. Sau 1 lần tiêm, đáp ứng IgG đặc hiệu PEDV ở các nhóm tiêm vacxin thương mại Corning cao

hơn với nhóm tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D ($p<0,05$). Tuy nhiên, sau lần tiêm thứ 2, đáp ứng IgG đặc hiệu PEDV ở nhóm tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D cao hơn so với ở nhóm tiêm vacxin thương mại Corning ($p<0,05$), với ở giá trị OD_{450} trung bình của 2 nhóm lần lượt là 3,8 và 2,087. So với đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể sau tiêm lần 1, khả năng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV sau tiêm lần 2 ở nhóm lợn tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã tăng 4 lần, trong khi đó khả năng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV ở nhóm tiêm vacxin thương mại Corning lại giảm 1,6 lần. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV không được tìm thấy ở nhóm lợn con tiêm PBS và Emulsigen®-D sau tiêm lần 1 và lần 2 (Hình 3.52).

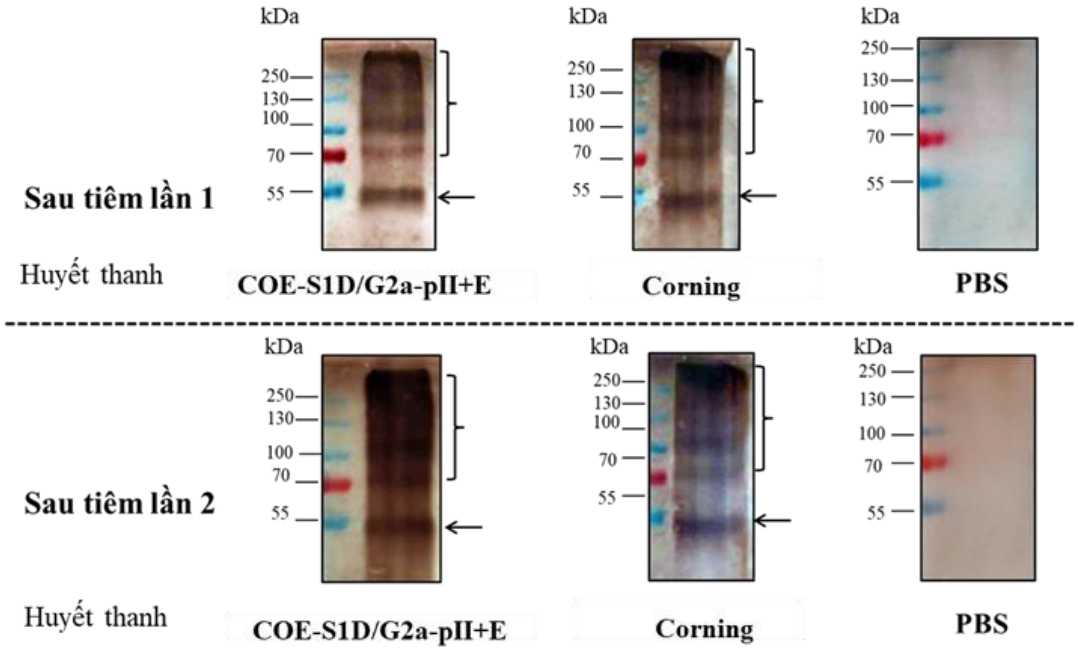


Hình 3.52. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng ELISA.

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± SD. * p <0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. E: Emulsigen®-D (MVP), Corning: vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology)

Tương tự như kết quả ELISA, kết quả Western blot cũng cho thấy, sau tiêm lần 1 và lần 2 đều có sự hiện diện của kháng thể IgG đặc hiệu COE-S1D/G2a-pII trong các nhóm lợn được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D và nhóm lợn tiêm vacxin thương mại Corning. Trong khi đó các

kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV tái tổ hợp không tìm thấy trong nhóm lợn đối chứng âm PBS trộn chất bổ trợ Emulsigen®-D sau tiêm lần 1 và lần 2 (Hình 3.53).

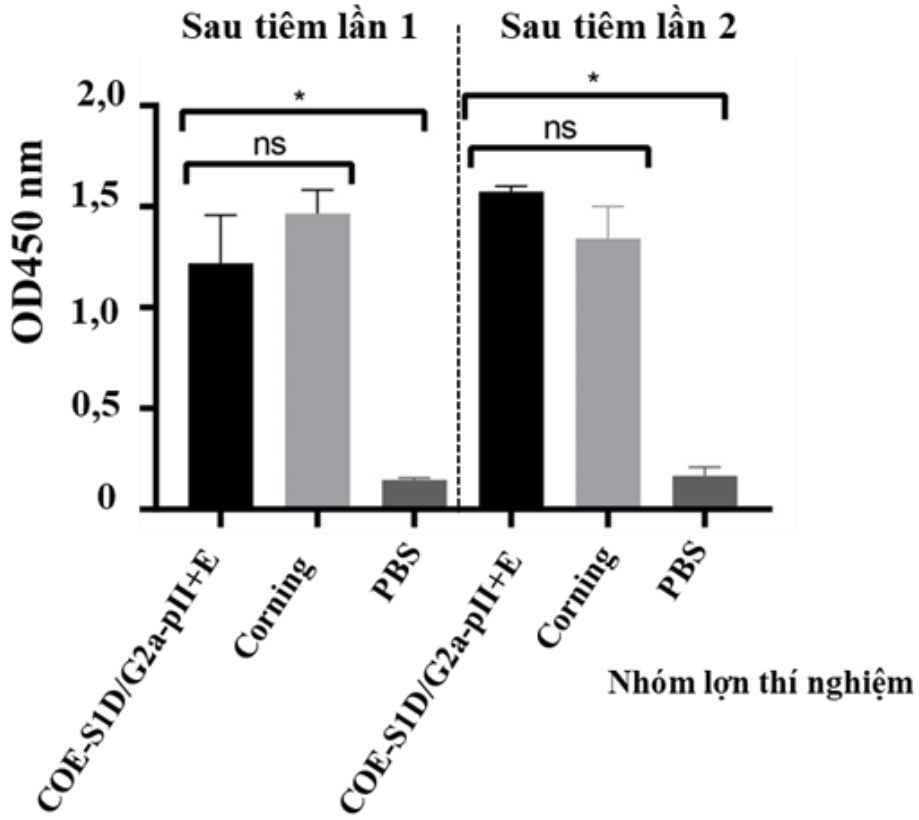


Hình 3.53. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII của PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng Western blot.
Huyết thanh của các nhóm lợn được dùng làm kháng thể 1. Mũi tên chỉ băng protein dạng monomer, dấu ngoặc chỉ băng protein dạng oligomer. E: Emulsigen®-D (MVP), Corning: vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology)

+ Đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu kháng nguyên PEDV

Khả năng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV được kiểm tra bằng ELISA. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tinh sạch SEC (1 µg/mL) được sử dụng để làm kháng nguyên cho phản ứng ELISA. Kết quả ELISA chứng tỏ sau 1 lần tiêm, cả 2 nhóm lợn được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D hoặc vacxin thương mại Corning đều có sự sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV. Khả năng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở 2 nhóm lợn là tương tự nhau, với giá trị $p>0,05$. Sau 1 lần tiêm, kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm lợn tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được tạo ra tương đối mạnh, đạt giá trị OD_{450} là 1,2. Sau 2 lần tiêm, có sự gia tăng đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm lợn tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D, với giá trị OD_{450} là 1,57, trong khi đó có sự giảm nhẹ trong đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm tiêm vacxin thương mại Corning. Tuy vậy, đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở 2 nhóm lợn này là tương tự nhau, thể hiện ở giá trị $p>0,05$. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc

hiệu PEDV không tồn tại ở nhóm lợn con tiêm PBS và chất bổ trợ Emulsigen®-D (Hình 3.54).



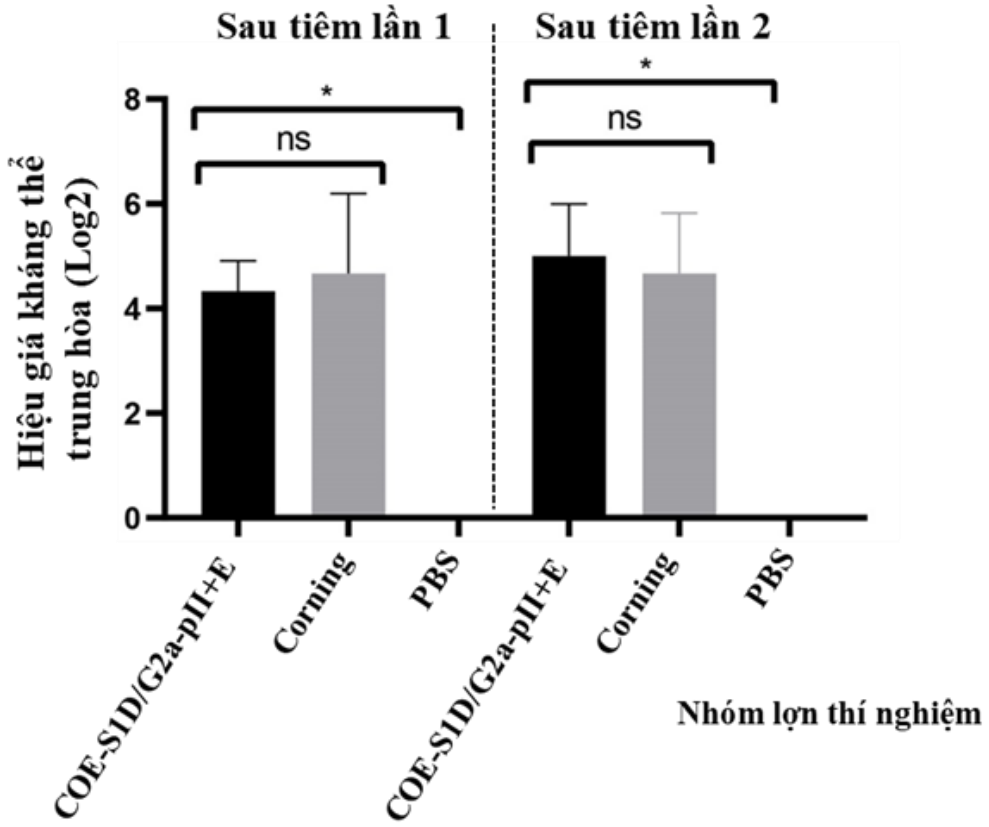
Hình 3.54. Phân tích đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng ELISA.

Số liệu được thể hiện ở dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. *: p<0,05, khác biệt có ý nghĩa thống kê. ns: không có sự khác biệt về thống kê. E: Emulsigen®-D (MVP), Corning: vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology)

+ Khả năng trung hòa PEDV

Khả năng trung hòa PEDV của các huyết thanh lợn được xác định thông qua thí nghiệm trung hòa virus. Kết quả đánh giá trung hòa cho thấy ở cả 2 nhóm lợn thí nghiệm tiêm với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D hoặc vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology) đều có mặt các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV. Sau 1 lần tiêm, hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình của nhóm lợn tiêm COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D và vacxin thương mại Corning lần lượt là 20,11 và 25,45. Sau 2 lần tiêm, hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình của nhóm lợn tiêm COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D là 32, hiệu giá này đã tăng 1,6 lần so với sau 1 lần tiêm, trong khi đó hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình của nhóm lợn tiêm vacxin thương mại Corning vẫn không thay đổi. Tuy nhiên, sau 1 lần tiêm và sau 2 lần tiêm, đáp ứng sinh kháng thể trung hòa PEDV ở 2 nhóm lợn trên là tương tự nhau, thể hiện ở

giá trị p>0,05. Ở nhóm lợn tiêm với PBS kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D, kháng thể trung hòa PEDV không được tồn tại (Hình 3.55).



Hình 3.55. Phân tích khả năng trung hòa PEDV của huyết thanh ở các nhóm lợn thí nghiệm bằng thí nghiệm trung hòa virus.

Hiệu giá kháng thể trung hòa ≥ 8 được xem là dương tính với kháng thể trung hòa PEDV. * có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p <0,05). ns: không có sự khác biệt về thống kê.
E: Emulsigen®-D (MVP), Corning: vacxin thương mại Corning

Như vậy, các kết quả cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/liều) kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D đã khả năng kích thích sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV tương đương với vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology) trên lợn con 4-5 tuần tuổi sau 2 lần tiêm.

Tóm lại trong khuôn khổ của luận án, các kháng nguyên COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp tái tổ hợp được tạo ra trên cây thuốc lá *N. benthamiana* có thể là các ứng viên tiềm năng để phát triển vacxin tiểu đơn vị ngăn ngừa sự lây nhiễm của chủng PEDV G2a trên lợn ở Việt Nam.

Chương 4. THẢO LUẬN

4.1. Mức độ biểu hiện và khả năng thu hồi của các kháng nguyên tái tổ hợp từ lá thuốc lá *N. benthamiana*

Dịch PED đã và đang gây tổn thất nghiêm trọng về mặt kinh tế cho ngành chăn nuôi lợn ở nhiều quốc gia trên thế giới. Việc phát triển chiến lược sản xuất vacxin nhanh chóng, hiệu quả, an toàn và tiết kiệm chi phí để bảo vệ lợn chống lại PEDV là vấn đề vô cùng cần thiết, đặc biệt là ở các nước châu Á, trong đó có Việt Nam. Trong khuôn khổ của luận án này, đầu tiên, chúng tôi muốn so sánh tính sinh miễn dịch của kháng nguyên tái tổ hợp được sản xuất từ thực vật với vacxin thương mại chứa chủng PEDV thuộc nhóm G1a, do đó, trình tự gen mã hóa protein COE của chủng PEDV DR13 nhược độc thuộc nhóm G1a được lựa chọn. Đúng như kỳ vọng, kháng nguyên COE/G1a-pII đã được biểu hiện thành công trên cây thuốc lá *N. benthamiana* sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời. Kháng nguyên COE/G1a-pII đã biểu hiện trong lá thuốc lá *N. benthamiana* ở mức độ cao, đạt 234 mg/kg lá tươi, chiếm xấp xỉ 4 % protein hòa tan tổng số (Hình 3.2, Bảng 3.1).

Tiếp đến, chủng PEDV thuộc kiểu gen G2 được phát hiện là tác nhân chủ yếu gây ra đợt dịch PED tại Việt Nam [5, 6], nên trong phần tiếp theo của luận án, trình tự gen mã hóa protein COE, COE-S1D và S2 của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao thuộc nhóm G2a đã lựa chọn để phục vụ nghiên cứu. Bốn loại kháng nguyên tái tổ hợp có nguồn gốc từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 thuộc nhóm G2a đã được tạo ra trong cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện tạm thời bao gồm các kháng nguyên COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII. Các kháng nguyên COE/G2a-pII và COE-S1D/G2a-pII có mức độ tích lũy trong lá thuốc lá *N. benthamiana* xấp xỉ nhau, lần lượt đạt 118 mg/kg lá tươi (Hình 3.14, Bảng 3.1) và 115 mg/kg lá tươi (Hình 3.29, Bảng 3.1), chiếm xấp xỉ lần lượt 2,01 và 1,95% protein hòa tan tổng số. So với các kháng nguyên khác trong nghiên cứu, mức độ tích lũy của kháng nguyên S2/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana* là thấp nhất, đạt 86,7 mg/kg lá tươi, chiếm xấp xỉ 1,47% protein hòa tan tổng số (Hình 3.31, Bảng 3.1).

Mặc dầu cùng dung hợp motif pII nhưng mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII từ chủng chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao thuộc nhóm G2a là thấp hơn 2 lần so với mức độ biểu hiện của kháng nguyên COE/G1a của chủng PEDV DR13 thuộc nhóm G1a. Điều này có thể được giải thích bằng sự khác biệt về trình tự nucleotit và trình tự aa của hai biến thể COE. Khi so sánh với trình tự gốc của COE/G1a, sự tương đồng trong trình tự nucleotit và aa của COE/G2a lần

lượt là 95,7 và 96,4% (Phụ lục 11, Phụ lục 13). Sau khi tối ưu mã biểu hiện trong *N. benthamiana*, mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit của hai biến thể COE là 75,5% (Phụ lục 16).

Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp có mức độ tích lũy trong lá thuốc lá *N. benthamiana* cao nhất trong số các kháng nguyên tái tổ hợp được nghiên cứu, đạt xấp xỉ 590 mg/kg lá tươi, chiếm gần 5,62% protein hòa tan tổng số (Hình 3.30, Bảng 3.1). Mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp gấp 2,52 lần so với mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G1a-pII; gấp 5 lần so với mức độ tích lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII và kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII; gấp 6,8 lần so với mức độ tích lũy của kháng nguyên S2/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana*. Như vậy, dựa vào mức độ tích lũy của các kháng nguyên COE/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII-tp trong lá thuốc lá cho thấy việc gắn thêm motif tp đã góp phần làm tăng mức độ tích lũy của kháng nguyên trong lá thuốc lá lên 5 lần. Trong một nghiên cứu của Phan Trong Hoang (2020), mức độ biểu hiện kháng nguyên H5-pII-tp (H5 oligomer tp) chỉ đạt khoảng 0,02 % TSP dựa vào kết quả bán định lượng bằng Western blot [145]. Như vậy, mức độ biểu hiện của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp là cao hơn rất nhiều lần so với mức độ biểu hiện của kháng nguyên H5-pII-tp trong nghiên cứu trước. Mức độ biểu hiện cao của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp là một lợi thế rất lớn trong quá trình sản xuất sản xuất vacxin, điều này có thể giúp nâng cao sản lượng kháng nguyên tái tổ hợp trên cùng một số lượng cây thuốc lá *N. benthamiana* dẫn đến giảm giá thành của vacxin thành phẩm trong tương lai.

Mức độ tích lũy của các kháng nguyên COE trong cây thuốc lá và một số cây trồng khác cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đó. Khi sử dụng hệ thống cây thuốc lá, kháng nguyên COE đã được tạo ra bằng chuyển gen ổn định hoặc biểu hiện tạm thời. Tuy nhiên, mức độ biểu hiện của kháng nguyên COE trong cây thuốc lá sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời thường cao hơn. Về mức độ biểu hiện của các kháng nguyên COE trong cây thuốc lá, ở một số nghiên cứu của Kang và cộng sự, mức độ tích lũy của kháng nguyên COE sử dụng chuyển gen ổn định đạt 0,1% protein hòa tan tổng số [114] và 2,1% protein hòa tan tổng số [13]. Mức độ tích lũy của kháng nguyên COE trong cây thuốc lá *N. benthamiana* sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời đạt 5% protein hòa tan tổng số [113]. Ngoài ra, gần đây, trong một nghiên cứu khác, mức độ tích lũy của kháng nguyên COE dung hợp Poly-Fc của IgG trên cây thuốc lá *N. benthamiana* sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời được báo cáo đạt 0,74 % protein hòa tan tổng số [125]. Như vậy, khi cùng sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana,* mức độ tích

lũy của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp trong nghiên cứu này là cao hơn 1,1 lần so với mức độ tích lũy của kháng nguyên COE trong nghiên cứu của Kang và cộng sự [113]; và cao hơn 7,5 lần so với mức độ tích lũy của kháng nguyên COE dung hợp Poly-Fc của IgG trong nghiên cứu của Nguyen Quang Duc Tien và cộng sự [125]. Mức độ tích lũy của các kháng nguyên tái tổ hợp khác như COE/G1a-pII, COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana* cũng cao hơn 2-3 lần so với mức độ biểu hiện của kháng nguyên COE dung hợp Poly-Fc của IgG [125].

Sự biểu hiện của kháng nguyên COE trong các đối tượng thực vật khác cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Mức độ tích lũy của kháng nguyên COE trong củ khoai tây đạt 0,1% protein hòa tan tổng số [115], trong ngô đạt 0,122% protein hòa tan tổng số [118]. Kháng nguyên COE dung hợp phối tử nhắm tế bào M (Co1) có mức độ tích lũy đạt 0,083% protein hòa tan tổng số trong calli khi sử dụng promoter rice α-amylase 3D (RAmy3D) [11]. Mức độ tích lũy trong nội nhũ của COE dung hợp LTB khi sử dụng promoter đặc hiệu nội nhũ lúa mì tiểu đơn vị glutenin Bx17 có trọng lượng phân tử cao (HMW-Bx17-p) và intron hoạt hóa đầu tiên của lúa (Act1-I) đạt 1,3 % protein hòa tan tổng số [123]. Như vậy, các kết quả trong các nghiên cứu trên cho thấy mức độ tích lũy của kháng nguyên COE trong khoai tây, ngô, lúa đều thấp hơn mức độ tích lũy của các kháng nguyên COE/G2a-pII-tp, COE/G1a-pII, COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana*.

Ngoài ra, sự biểu hiện của kháng nguyên S1 dung hợp motif GCN4pII (S1-pII) trên cây thuốc lá *N. benthamiana* sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời cũng đã được báo cáo trong nghiên cứu trước đây. Tuy nhiên, mức độ tích lũy của kháng nguyên S1-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana* chỉ đạt 0,005% protein hòa tan tổng số [20]. Như vậy, mức độ biểu hiện tạm thời trong lá thuốc lá *N. benthamiana* của các kháng nguyên COE/G2a-pII-tp, COE/G2a, COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII cao lần lượt gấp 1124; 402; 390; 294 lần so với kháng nguyên S1-pII trong nghiên cứu trước đó.

Độ tinh khiết và khả năng thu hồi các kháng nguyên tái tổ hợp từ lá thuốc lá *N. benthamiana* bằng phương pháp tinh sạch IMAC đã được tổng hợp ở Bảng 3.2. Kết quả cho thấy, sau khi tinh sạch bằng phương pháp IMAC, các kháng nguyên tái tổ hợp COE/G1a-pII, COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII đều có độ tinh khiết trên 80%. Hiệu suất thu hồi của các kháng nguyên sau tinh sạch IMAC từ lá thuốc lá dao động từ 22-35 %. Sau tinh sạch bằng IMAC, kháng nguyên COE/G1a-pII có khả năng thu hồi sau tinh sạch IMAC cao nhất, đạt 35%, trong khi đó, kháng nguyên COE/G2a-pII-tp có khả năng thu hồi thấp nhất,

đạt 20%, kế tiếp là kháng nguyên S2/G2a-pII với hiệu suất thu hồi đạt 22%. Các kháng nguyên COE/G2a-pII và COE-S1D/G2a-pII có hiệu suất thu hồi sau tinh sạch IMAC xấp xỉ nhau, đạt lần lượt 25% và 27%.

4.2. Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G1a-pII trên chuột

Khả năng sinh đáp ứng miễn dịch của dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII được so sánh với vacxin thương mại CTC Vacc PED (Hàn Quốc) chứa chủng PEDV DR13 nhược độc trên chuột. Trong thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch, chuột được tiêm 3 liều với dịch chiết thực vật chứa 18,76 µg kháng nguyên COE/G1a-pII. Đúng như kỳ vọng, các kết quả Western blot và ELISA (Hình 3.6A, B) cho thấy dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII đã kích thích sinh mạnh đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV và đặc biệt mức độ đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được tìm thấy ở nhóm chuột tiêm dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII là tương tự như nhóm chuột được tiêm vacxin thương mại PEDV sau lần tiêm thứ ba. Mặc dầu, đáp ứng miễn dịch niêm mạc đóng vai trò quan trọng trong việc phòng PEDV và đáp ứng sinh kháng thể IgA niêm mạc có sự liên quan chặt chẽ tới hiệu quả bảo vệ lợn trước sự xâm nhiễm của PEDV [157, 158], tuy nhiên đáp ứng dịch thể trung gian qua kháng thể IgG cũng rất cần thiết để bảo vệ lợn mới sinh đáp ứng sinh kháng thể khỏi sự lây nhiễm PEDV [157, 158]. Các nghiên cứu trước đây cũng cho thấy vai trò quan trọng của kháng thể IgG trong việc bảo vệ đường tiêu hóa [159, 160]. Trong nghiên cứu này, kháng nguyên COE/G1a-pII được tiêm vào chuột thông qua đường tiêm dưới da, đây là con đường tiêm chủng được sử dụng phổ biến trên người và nhiều động vật khác nhau nhằm kích thích sản sinh các đáp ứng miễn dịch dịch thể qua trung gian kháng thể IgG. Ngoài ra, bên cạnh đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV, các đáp ứng sinh kháng thể IgA và IgM đặc hiệu PEDV cũng được phát hiện trên nhóm chuột được tiêm dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII, tuy nhiên các đáp ứng này thấp hơn so với nhóm chuột được tiêm vacxin thương mại PEDV DR13 nhược độc. Nhiều công bố đã chứng minh kháng thể IgG, IgA và IgM đặc hiệu với kháng nguyên cũng được tồn tại trong huyết thanh của động vật khi sử dụng đường tiêm dưới da [161-164]. Ngoài ra, Su và cộng sự cũng đã chứng minh trong một số trường hợp (tùy thuộc vào loại chất bổ trợ, kháng nguyên và con đường tiêm) các con đường thường gây ra miễn dịch dịch thể có thể cũng kích thích đồng thời đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch niêm mạc nhằm phòng tác nhân gây bệnh [164].

Trong quá trình trung hòa virus, các kháng thể trung hòa đã ức chế chu kỳ lây nhiễm của virus thông qua việc ức chế liên kết bề mặt, hợp nhất, xâm nhập, nhập bào và sao chép của virus [165]. Việc tăng cường các đáp ứng sinh kháng thể

trung hòa được sinh trên người/động vật sau khi tiêm phòng là một yêu cầu quan trọng đối với phát triển vacxin do có mối tương quan mạnh giữa hiệu quả của một vacxin với đáp ứng kháng thể trung hòa [166]. Dịch chiết thực vật có chứa kháng nguyên COE/G1a-pII (18,76 µg) đã kích thích sinh kháng thể trung hòa trên chuột, với hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình của nhóm là 57,6. Hiệu giá kháng thể trung hòa càng cao thể hiện khả năng trung hòa PEDV càng cao. Để tăng cường đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là miễn dịch niêm mạc chống lại PEDV, việc sử dụng vacxin đường miệng có chứa kháng nguyên COE cũng đã được báo cáo là có khả năng kích thích miễn dịch niêm mạc chống lại PEDV [11, 167]. Ngoài ra, vì PEDV chủ yếu gây ra nhiễm trùng đường ruột, kháng nguyên COE đã được dung hợp với peptit nhắm vào tế bào tua (DCpep) và peptit nhắm vào tế bào M (Col) nhằm hướng đến tương ứng các tế bào tua (DC) và các tế bào vi nếp gấp đường ruột (M) [11, 167, 168]. Hoạt tính sinh miễn dịch qua đường miệng của chủng *Lactobacillus* chứa gen mã hóa kháng nguyên COE dung hợp DCpep và Col trên chuột đã được nghiên cứu trước đó [167, 168]. Khi so sánh với công bố của Ma và cộng sự, hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV trong huyết thanh của các con chuột được uống chủng *Lactobacillus casei* tái tổ hợp mang gen biểu hiện COE dung hợp với DCpep hoặc Col hoặc cả DCpep và Col lần lượt là 24, 24 và 36 [168], như vậy hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV trong nghiên cứu trên là thấp hơn so với trong nghiên cứu của chúng tôi. Những kết quả này cho thấy dịch chiết thực vật có chứa kháng nguyên COE/G1a-pII có thể là một ứng viên vacxin đầy hứa hẹn chống lại sự xây nhiễm của chủng PEDV G1a.

4.3. Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE/G2a pII trên lợn nái và khả năng bảo hộ lợn con chống lại chủng PEDV G2a độc lực cao

PEDV chủ yếu gây tỷ lệ tử vong cao ở lợn con mới sinh dưới 1 tuần tuổi, chính vì vậy, để phòng PEDV hiệu quả, vacxin nên được tiêm vào lợn nái để kích thích sinh đáp ứng miễn dịch trong sữa lợn mẹ, giúp bảo vệ lợn con mới sinh. Vì vậy, kháng nguyên COE/G2a-pII (100 µg/liều) được tiêm 2 liều cho lợn nái mang thai (trọng lượng khoảng 60 kg). Việc lựa chọn liều tiêm của kháng nguyên COE/G2a-pII cho lợn nái được căn cứ vào các yếu tố như liều tiêm của kháng nguyên COE/G1a-pII trên chuột nhắt trắng; công thức chuyển đổi liều dựa trên trọng lượng và diện tích bề mặt của động vật được xây dựng và công bố trước đó [169]. Trong thí nghiệm trước đó, dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a (18,76 µg/liều) đã kích thích sinh kháng thể trung hòa với hiệu giá trung bình là 57,6 trên chuột nhắt trắng (có trọng lượng trung bình 20 g). Do liều kháng nguyên sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch sẽ ảnh hưởng đến giá thành sản xuất của vacxin sau này, trong thí nghiệm tiếp theo, chúng tôi muốn lựa chọn liều kháng nguyên

COE/G2a-pII thấp nhất để tiêm vào lợn nái mà vẫn kích thích đáp ứng miễn dịch tốt, thể hiện thông qua hiệu giá kháng thể trung hòa lớn hơn 16. Sau khi tính toán dựa trên công thức chuyển đổi liều được công bố bởi Anroop và Shery (2016) [169], kết hợp với các tính toán để cân đối giá thành vacxin sau này, chúng tôi hy vọng kháng nguyên COE/G2a-pII sẽ kích thích sinh kháng thể trung hòa PEDV với hiệu giá trung hòa trung bình khoảng 32 trên lợn nái nhằm bảo vệ lợn con sinh ra từ lợn nái. Do vậy, hàm lượng của kháng nguyên COE/G2a-pII thích hợp trong một liều để tiêm vào lợn nái mang thai là 100 µg.

Đúng như kỳ vọng, các kết quả nghiên cứu cho thấy 100% lợn con 5 ngày tuổi được sinh ra từ lợn mẹ tiêm 2 liều kháng nguyên COE/G2a-pII (100 µg/liều) đều sống sót, phân có trạng thái bình thường và có sự tăng trọng lượng cơ thể sau thí nghiệm công cường độc với chủng PEDV G2a độc lực cao (Hình 3.24, 3.25). Trong khi đó, tất cả lợn con được sinh ra từ lợn mẹ tiêm PBS đều chết. Tỷ lệ chết của lợn con được đẻ ra từ lợn mẹ tiêm PBS sau khi công cường độc cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đó, thể hiện ở tỷ lệ chết của lợn con có độ tuổi nhỏ hơn 7 ngày mà bị nhiễm PEDV là từ 80% đến 100% [171]. Tỷ lệ tử vong bằng 0% ở các lợn con của lợn nái tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII sau khi công cường độc có thể được giải thích một phần bởi các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV (hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV trung bình 32) và đáp ứng IFN-γ ở lợn nái đã được truyền thụ động sang lợn con thông qua sữa mẹ. Mức độ đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể có khả năng trung hòa PEDV ở lợn nái sau tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII (Hình 3.19) và lợn con của chúng (Hình 3.22) là khá tương tự với các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể có khả năng trung hòa PEDV xuất hiện ở lợn nái sau tiêm vacxin PEDV bất hoạt và lợn con của chúng [172]. Sự giảm khả năng đáp ứng miễn dịch dịch thể của lợn nái sau tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII vào ngày thứ 50 có thể được giải thích bởi sự truyền kháng thể từ máu vào sữa của lợn nái. Các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA, IgG đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV trong huyết thanh của lợn con vào ngày thứ 10 là khá tương tự với các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể này trong huyết thanh lợn nái ở ngày thứ 50 sau tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII. Điều này cũng đã từng được ghi nhận trong một nghiên cứu trước đây của Bandrick và cộng sự (2014), cho thấy mức độ đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG và IgA ở lợn con cũng tương tự mức độ đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG và IgA trong sữa non và huyết thanh của lợn nái [173]. Ngoài ra, các đáp ứng miễn dịch dịch thể được sinh ở lợn nái và lợn con có thể không giống nhau tại các thời điểm lấy mẫu khác nhau. Do vậy, nghiên cứu tiếp theo nên đánh giá đáp ứng miễn dịch dịch thể của lợn nái và lợn con tại một số mốc thời gian khác nhau.

Cytokine được tạo ra trong lợn mẹ, có thể được truyền thụ động cho lợn con thông qua sữa mẹ, do đó giúp lợn con nhận được khả năng miễn dịch của lợn mẹ. IFN-γ, một cytokine quan trọng thuộc lớp loại II của interferon, có vai trò quan trọng trong khả năng miễn dịch bẩm sinh và thích ứng [174]. Tế bào T hoạt hóa và tế bào tiêu diệt tự nhiên là các tế bào tạo ra IFN-γ. IFN-γ là nhân tố không thể thiếu nhằm kích hoạt các đại thực bào và kích thích tế bào lympho T hỗ trợ liên quan đến Th1 [174]. Vì vậy, IFN-γ giúp tăng cường phản ứng tế bào, hỗ trợ các phản ứng miễn dịch nhằm bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân như vi khuẩn và virus, hỗ trợ quá trình kháng nguyên được bộc lộ cho tế bào miễn dịch, kiểm soát hoạt động của hệ thống miễn dịch bẩm sinh, liên kết các tế bào lympho và nội mô, kiểm soát Th1/điều chỉnh Th2 và cân bằng quá trình sản sinh các tế bào cũng như quá trình chết tế bào lập trình [174]. Chính vì thế, khả năng sinh IFN-γ được đánh giá nhằm thể hiện một phần tính sinh miễn dịch ở mức độ tế bào của vacxin. Đáng chú ý là nồng độ IFN-γ ở lợn nái (ngày thứ 35 sau tiêm) và các lợn con 5 ngày tuổi (trước khi công cường độc) được phát hiện ở nồng độ rất cao lần lượt là 932,3 ± 145,2 pg/mL (Hình 3.20) và 824,5 ± 157,68 pg/mL (Hình 3.23). So với các nghiên cứu trước đây, nồng độ IFN-γ ở lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII lúc đẻ là cao gấp 5 lần so với lợn nái tiêm vacxin PEDV chết bổ sung kháng nguyên Flagellin (Vac201-FliC) [172] và cao gấp 10 lần so với lợn nái được tiêm vacxin bất hoạt PEDV có chứa IgG-Fc [175]. Các mức độ đáp ứng IFN-γ ở lợn nái (ngày thứ 50 sau tiêm) và các lợn con của nó (ngày thứ 10 sau công cường độc) đều tăng gấp 2 lần so với các mức độ đáp ứng IFN-γ của chúng trước khi công cường độc.

Trong nghiên cứu này, kháng nguyên COE/G2a-pII được tiêm vào lợn nái mang thai 2 lần, mỗi lần 100 µg kèm chất bổ trợ. Hàm lượng kháng nguyên COE/G2a-pII trên liều thấp hơn 4 lần so với hàm lượng kháng nguyên được sử dụng trong nghiên cứu trước đây [91]. Lợn nái mang thai trong nghiên cứu trước đây được tiêm 3 lần với kháng nguyên S1 (400 µg/liều) kết hợp với chất bổ trợ [91]. Sau khi công cường độc, tỷ lệ sống sót của lợn con được đẻ ra từ lợn nái đã được tiêm kháng nguyên S1 trong nghiên cứu trước là 87,5%, tỷ lệ này là thấp hơn so với tỷ lệ sống sót của lợn con được sinh ra từ lợn nái tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII (tỷ lệ sống sót 100%). Việc sử dụng hàm lượng kháng nguyên COE/G2a-pII trên liều thấp hơn để gây đáp ứng miễn dịch trên lợn mẹ mà vẫn đảm bảo hiệu quả bảo hộ lợn con (100%) chống lại chủng PEDV G2a độc lực cao có thể một phần được giải thích bằng sự hình thành kháng nguyên COE/G2a-pII dạng oligomer có khối lượng phân tử cao. Những dữ liệu này chứng tỏ kháng nguyên COE/G2a-pII được sản xuất trong thực vật có thể là một là một ứng viên vacxin tiềm năng để phòng sự lây nhiễm của PEDV. Tuy nhiên, nghiên cứu này vẫn có một số hạn chế do số lợn

nái và lợn con sử dụng trong nghiên cứu không lớn. Các nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành trên số lượng lớn lợn nái và lợn con để có dữ liệu đầy đủ hơn. Hơn nữa, lượng kháng nguyên COE/G2a-pII trên liều và ảnh hưởng của các chất bổ trợ khác nhau giúp cải thiện khả năng gây đáp ứng miễn dịch cũng nên được nghiên cứu. Ngoài ra, sự hiện diện hoặc không hiện diện của PEDV trong phân lợn con sau công cường độc cũng nên được đánh giá để có dữ liệu đầy đủ hơn.

4.4. So sánh tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII với kháng nguyên COE/G2a-pII trên chuột

Trong phần tiếp theo, chúng tôi đã đặt ra mục tiêu tạo ra các ứng viên kháng nguyên tái tổ hợp có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII. Do vậy, khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII được so sánh với kháng nguyên COE/G2a-pII trên chuột nhắt trắng. Trong thí nghiệm này, kế thừa kết quả của các thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch trước đó và dựa vào công thức chuyển đổi liều được công bố bởi Anroop và Shery (2016) [169] cũng như nhằm nhận biết rõ sự khác biệt giữa các kháng nguyên tái tổ hợp trong việc kích thích sinh miễn dịch, chúng tôi lựa chọn liều của các kháng nguyên tái tổ hợp thấp nhất, được dự đoán có thể kích thích sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trên chuột nhắt trắng. Do vậy, hàm lượng của các kháng nguyên tái tổ hợp COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII trong một liều gây đáp ứng miễn dịch trên chuột là 1 µg. Đúng như kỳ vọng, các kết quả đánh giá tính sinh miễn dịch trên chuột chứng tỏ các kháng nguyên tái tổ hợp này (với liều 1 µg/con) đều đã kích thích sản sinh kháng thể IgG, IgA, IgM đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV và đáp ứng IFN-γ trên chuột.

Về kháng thể IgG đặc hiệu PEDV, ba loại kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII có khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII. Các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII có khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV tương đương nhau (Hình 3.39). Về đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV, kháng nguyên COE/G2a-pII-tp có khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV với giá trị OD450 cao hơn gấp hơn 3 lần so với các kháng nguyên còn lại. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII có khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII (Hình 3.41). Về đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp đã kích thích sản sinh kháng thể IgM

đặc hiệu PEDV tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII, trong khi kháng nguyên S2/G2a-pII đã kích thích sản sinh kháng thể IgM kém hơn kháng nguyên COE/G2a-pII. Đáp ứng sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV được phát hiện đạt giá trị cao nhất ở nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII-tp và thấp nhất ở nhóm chuột được tiêm kháng nguyên S2/G2a-pII (Hình 3.42). Về khả năng trung hòa PEDV, các kháng nguyên COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII có khả năng kích thích sản sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV tương đương nhau, với hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV của các nhóm đều lớn hơn 9,25 (Hình 3.43). Về đáp ứng sinh cytokine IFN-γ, kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sản sinh đáp ứng IFN-γ cao nhất, gấp 2,5 lần so với các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp và gấp 1,3 lần so với kháng nguyên S2/G2a-pII. Kháng nguyên S2/G2a-pII có mức độ đáp ứng sinh IFN-γ thấp hơn so với nhóm chuột được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII nhưng lại cao hơn so với các nhóm chuột được tiêm COE-S1/G2a-pII hoặc S2/G2a-pII. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp có mức độ đáp ứng sinh IFN-γ là tương đương nhau (Hình 3.44).

Với dạng kháng nguyên dung hợp motif pII, các kháng nguyên COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII có mức độ kích thích sản sinh kháng thể IgG, IgM và IgA đặc hiệu PEDV và cytokine IFN-γ khác nhau. Điều này có thể được giải thích bởi sự khác nhau trong thụ thể được nhận biết bởi các tế bào lympho B hoặc sự khác nhau trong đặc điểm cấu trúc của từng kháng nguyên. Các kháng nguyên COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII khác nhau ở vùng thụ thể được nhận biết bởi các tế bào B. Kháng nguyên COE/G2a-pII chứa thụ thể nhận biết bởi tế bào lympho B từ aa 499-638; kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII chứa thụ thể nhận biết bởi tế bào lympho B từ aa 499-789; kháng nguyên S2/G2a-pII chứa thụ thể nhận biết bởi tế bào lympho B [8, 14, 15]. So với kháng nguyên COE/G2a-pII, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII có thêm 1 vùng thụ thể được nhận biết bởi tế bào lympho B từ aa 638-789. Dựa vào kết quả phân tích các phân đoạn SEC bằng Western blot cho thấy trọng lượng phân tử của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII là lớn hơn so với trọng lượng phân tử của kháng nguyên COE/G2a-pII. Khi kháng nguyên COE/G2a-pII chủ yếu tập trung ở phân đoạn 22-26 với trọng lượng phân tử 158-440 kDa (Hình 3.16) thì kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII lại chủ yếu có mặt ở các phân đoạn từ 16-24 với trọng lượng phân tử 440-669 kDa (Hình 3.33). Khi phân tách các protein kháng nguyên bằng SEC, các protein có có kích thước lớn sẽ đi ra khỏi cột sớm hơn các protein có kích thước nhỏ. Điều này có thể lý giải một phần tại sao kháng nguyên COE-S1/G2a-pII đã kích thích sản sinh kháng thể IgG, IgA, IgM đặc hiệu PEDV tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn.

Ngoài ra, trong khuôn khổ luận án, chúng tôi muốn nghiên cứu xem liệu việc dung hợp thêm motif tp có thể tạo ra kháng nguyên dạng oligomer có trọng lượng phân tử lớn hơn và hoạt tính sinh miễn dịch tốt hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII hay không. Kết quả đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của hai kháng nguyên COE/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII-tp có khả năng kích thích sản sinh kháng thể IgG, IgA, IgM đặc hiệu PEDV tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII trên chuột. Đặc biệt, kháng nguyên COE/G2a-pII-tp đã kích thích sản sinh kháng thể IgA đặc hiệu kháng nguyên COE/G2a-pII cao hơn 4 lần so với kháng nguyên COE/G2a-pII trên chuột thể hiện ở giá trị OD_{450} trung bình của hai nhóm chuột trong phản ứng ELISA lần lượt là 1,73 và 0,43. Điều này có thể được giải thích một phần bởi sự khác nhau trong đặc điểm oligomer của hai loại kháng nguyên. Các kết quả phân tích trạng thái oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII-tp bằng SEC kèm bộ kit chứa các kháng nguyên có trọng lượng phân tử lớn kết hợp với các kết quả Western blot cho thấy trong khi phần lớn kháng nguyên COE/G2a-pII được phát hiện tại phân đoạn từ 22-26 với trọng lượng phân tử khoảng 158-440 kDa (Hình 3.16) thì phần lớn kháng nguyên COE/G2a-pII-tp được phát hiện tại nhiều phân đoạn từ 18-26 với trọng lượng phân tử khoảng 158-669 kDa (Hình 3.35). Như vậy, việc dung hợp motif tp của IgM có thể đã làm tăng trọng lượng phân tử của kháng nguyên. Điều này có thể được giải thích bởi cầu disulfide bên trong phân tử tp liên quan đến Cys575, axit amin gần cuối trong đuôi tp [140, 141]. Sự tăng về khối lượng phân tử dẫn đến sự tăng khả năng gây đáp ứng miễn dịch và khả năng bảo hộ động vật cũng đã được báo cáo trong nghiên cứu trước đây khi dung hợp kháng nguyên H5 với motif pII-tp [145]. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh các đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV có sự tương quan với khả năng bảo hộ lợn con chống lại sự xâm nhiễm của PEDV [157, 158]. Do vậy, mức độ tăng cường 4 lần đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV được sản sinh trong nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII-tp so với nhóm chuột tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII có thể có ý nghĩa trong việc chống lại sự xâm nhiễm của PEDV. Tuy nhiên, khả năng trung hòa PEDV của hai kháng nguyên này là tương đương nhau trên chuột (Hình 3.43).

Như vậy, các kết quả bước đầu cho thấy ngoài kháng nguyên COE/G2a-pII thì các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp có thể là các ứng viên tiềm năng trong phòng PEDV. Tuy nhiên, do có giới hạn về thời gian thực hiện, kháng nguyên COE-S1/G2a-pII được lựa chọn để đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch trên lợn.

4.5. So sánh tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII với kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn con

Việc bố trí các thí nghiệm đánh giá tính sinh miễn dịch của kháng nguyên trên lợn nái mang thai khá phức tạp và tốn kém, do vậy, trong khuôn khổ của luận án, tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được so sánh với kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn con 4-5 tuần tuổi. Việc sử dụng lợn con 4-5 tuần tuổi cho thí nghiệm đánh giá ứng viên vacxin phòng PEDV cũng đã được thể hiện trong nhiều công bố trước đó [73, 74, 80, 81, 88].

Tính sinh miễn dịch trên lợn con của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được so sánh với kháng nguyên COE/G2a-pII. Liều các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con được căn cứ vào kết quả của thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII trên chuột trước đó kết hợp với công thức chuyển đổi liều được công bố bởi Anroop và Shery (2016) [169]. Do đó, trong thí nghiệm đầu tiên trên lợn con, sau khi tính toán, hàm lượng của các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII trong một liều tiêm trên lợn con là 12,5 µg.

Các kết quả của thí nghiệm gây đáp ứng miễn dịch thứ nhất trên lợn con cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII (Hình 3.48). Kết quả này là có sự tương quan với kết quả đánh giá trên chuột. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA có mối liên hệ chặt chẽ với hiệu quả bảo hộ động vật trước sự xâm nhiễm của PEDV [157, 158], do vậy đây là yếu tố quan trọng để so sánh khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII. Tuy nhiên, các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV (Hình 3.46), khả năng trung hòa PEDV (thể hiện ở hiệu giá kháng thể trung hòa trên lợn con trung bình là 8, Hình 3.49) và đáp ứng sinh IFN-γ (của hai kháng nguyên này là tương đương nhau ở trên lợn con. Như vậy, có sự khác nhau về kết quả về đáp ứng IgG đặc hiệu PEDV và đáp ứng IFN-γ giữa hai nhóm được tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII trong thí nghiệm trên lợn con và trên chuột. Điều này có thể được giải thích bởi có sự khác nhau về đáp ứng miễn dịch trong cơ thể của chuột và lợn con hoặc do ảnh hưởng bởi sự khác nhau về số lượng động vật được thử nghiệm trên nhóm.

Khi vacxin tiểu đơn vị được cấu thành bởi protein kháng nguyên mà không phối trộn với chất bổ trợ thì có khả năng sinh miễn dịch kém vì các protein kháng nguyên không dễ dàng được các tế bào miễn dịch nhận ra. Các protein kháng nguyên đơn lẻ thường có tính thấm thấp do trọng lượng phân tử cao và đặc tính ưa

nước [176]. Ngoài ra, các protein kháng nguyên đều dễ bị phân hủy bởi enzyme, do đó có thời gian bán hủy ngắn trong cơ thể sống. Vì vậy, vacxin tiểu đơn vị hoàn chỉnh cần có sự phối trộn của kháng nguyên với các chất bổ trợ [177]. Chất bổ trợ được là bất kỳ chất, hợp chất hoặc thậm chí là chiến lược nào có thể làm tăng cường đáp ứng miễn dịch, đặc biệt là đáp ứng miễn dịch thích ứng, khi được phối trộn cùng với một kháng nguyên [178]. Chất bổ trợ chủ yếu được sử dụng để bắt chước tín hiệu nguy hiểm và được thụ thể nhận dạng khuôn mẫu (Pattern recognition receptors, PRR) nhận ra để tạo điều kiện hấp thu kháng nguyên thông qua các loại tế bào đích chính (ví dụ: bạch cầu đơn nhân, đại thực bào và tế bào tua), do đó tăng cường khả năng sinh miễn dịch. Ngoài ra, chất bổ trợ có thể kích hoạt và làm trưởng thành các đại thực bào, tế bào lympho T, tế bào lympho B, tế bào tiêu diệt tự nhiên [179] và các dòng tế bào siêu nhỏ, các tín hiệu tiền viêm và chống viêm, gây ra phản ứng chemokine và cytokine gây viêm [180]. Các chức năng chính của một chất bổ trợ thành công không chỉ bao gồm khả năng kích thích miễn dịch của nó để giảm liều lượng kháng nguyên và số lần tiêm chủng tăng cường cần thiết để kích hoạt khả năng miễn dịch bảo vệ lâu dài mà còn cả đảm bảo sự an toàn và ổn định của kháng nguyên trong vacxin [181]. Chất bổ trợ có vai trò để bảo vệ kháng nguyên và giúp cho kháng nguyên được giải phóng ra từ từ để kích thích sinh miễn dịch [181].

Do vậy, trong khuôn khổ của luận án, ảnh hưởng của các chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) và Emulsigen®-D (MVP) đến khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII cũng đã được đánh giá. Chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) và Emulsigen®-D (MVP) cũng đã được sử dụng trong các nghiên cứu phát triển vacxin phòng PEDV [172, 173]. Motanide ISA™ 201 (SEPPIC) là chất bổ trợ dạng nhũ tương pha nước liên tục bên trong các giọt dầu chứa pha nước thứ cấp (nhũ tương kép), trong khi đó Emulsigen®-D (MVP) là chất bổ trợ dạng nhũ tương kép dầu trong nước. Các kết quả cho thấy chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) có tác dụng tốt hơn chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) khi trộn với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG, IgA đặc hiệu PEDV và đáp ứng IFN-γ. Tuy nhiên, với liều 12,5 µg kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, các đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể đặc hiệu PEDV và khả năng trung hòa PEDV của huyết thanh ở nhóm lợn tiêm kháng nguyên này trộn chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) vẫn chưa cao, do vậy việc tăng hàm lượng kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trên liều cho thí nghiệm kích thích sinh đáp ứng miễn dịch trên lợn là điều cần thiết.

Trong thí nghiệm thứ hai trên lợn con, nhằm tăng cường đáp ứng miễn dịch, đặc biệt tăng cường đáp ứng sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong

huyết thanh lợn, hàm lượng của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trong một liều để gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con được tăng lên 4 lần so với trong thí nghiệm thứ nhất. Liều kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch trên lợn con là 50 µg. Các kết quả phân tích cho thấy, so với thí nghiệm thứ nhất, đã có sự tăng cường trong đáp ứng sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trong huyết thanh của lợn con được tiêm 2 liều kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/liều), thể hiện ở hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình của huyết thanh lợn con là 32 (Hình 3.55). Đặc biệt, các kết quả phân tích còn cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/liều) kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D có hiệu quả tương đương với vacxin thương mại Corning (Keqian Biology, Wuhan Keqian Biology, Trung Quốc) trong việc kích thích sinh đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA (Hình 3.54) và khả năng trung hòa PEDV trên lợn con 4-5 tuần tuổi sau 2 lần tiêm. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV (Hình 3.52) được sinh trên lợn con được tiêm 2 liều kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/liều) kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MPV) là cao hơn so vacxin thương mại Corning (Keqian Biology, Wuhan Keqian Biology, Trung Quốc). Khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch của ứng viên vacxin phòng PEDV trên lợn con đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu Subramaniam và cộng sự (2017), nhóm lợn con 4 tuần tuổi được kích thích sinh đáp ứng miễn dịch với 2 liều kháng nguyên S1-NTD dung hợp Fc lợn và kháng thể đơn chuỗi ScFv đặc hiệu tế bào tua (200 µg kháng nguyên/liều) trộn với 50 µg chất bổ trợ cholera toxin (CT) bằng cách thẩm thấu qua da (lần 1) và tiêm bắp (lần 2) cũng đã kích thích sinh kháng thể trung hòa với hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình nhóm là 32 [88]. Do đó, kháng nguyên S1-NTD-Fc-ScFv được tiêm vào lợn con với liều 200 µg (cao gấp 4 lần so với liều của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII) đã kích thích sinh kháng thể trung hòa trên lợn con tương đương với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII. Trong một nghiên cứu khác của Chang và cộng sự (2018), lợn con 4 tuần tuổi được tiêm bắp 2 liều với 2 mL dung dịch chứa 10^9 TCID50/mL Baculovirus trình diện S1 và 2 mL dung dịch chứa 10^9 TCID50/mL Baculovirus trình diện S có hiệu giá trung hòa trung bình lần lượt là 16 ± 12 và 24 ± 8 [80]. Hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình của hai nhóm trong nghiên cứu của Chang và cộng sự (2018) là thấp hơn so với hiệu giá kháng thể trung hòa trong nhóm lợn con được tiêm với 50 µg kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII. Những kết quả này cho thấy kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII là một ứng viên tiềm năng để sản xuất vacxin tiểu đơn vị phòng PEDV.

Tổng kết lại, các kết quả của luận án đã cho thấy tiềm năng của việc sử dụng các kháng nguyên COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp được sản

xuất trên hệ thống cây thuốc lá *N. benthamiana* bằng công nghệ biểu hiện tạm thời trong phát triển vacxin tiểu đơn vị ngăn ngừa sự lây nhiễm của chủng PEDV G2a trên lợn ở Việt Nam.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Kháng nguyên COE/G1a-pII từ chủng PEDV DR13 nhược độc thuộc nhóm G1a đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana* với hàm lượng 234 mg/kg lá tươi. Dịch chiết lá chứa kháng nguyên COE/G1a-pII đã kích thích sinh các kháng thể IgG, IgA và IgM đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV với hiệu giá kháng thể trung hòa cao trên chuột. Khả năng kích thích sinh các kháng thể trung hòa PEDV của dịch chiết lá chứa kháng nguyên COE/G1a-pII là tương đương với vacxin thương mại CTC Vacc PED (Hàn Quốc) trên chuột.
2. Kháng nguyên COE/G2a-pII từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao thuộc nhóm G2a đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana* với hàm lượng 118 mg/kg lá tươi. Kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh các kháng thể IgG, IgA đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV và IFN-γ cao trên lợn nái sau 2 lần tiêm (100 µg/liều). Sau khi công cường độc với chủng PEDV G2a độc lực cao, 100% lợn con được đẻ ra từ lợn nái tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII đều sống sót, có triệu chứng lâm sàng bình thường và có sự tăng trọng lượng cơ thể.
3. Các kháng nguyên COE/G2a-pII-tp, COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao thuộc nhóm G2a đã được biểu hiện thành công trong lá thuốc lá *N. benthamiana* với hàm lượng đạt lần lượt là 590; 115; 86,7 mg/kg lá tươi. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt nhất trong số các kháng nguyên còn lại trên chuột. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn con. Khi trộn cùng với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) có tác dụng tốt hơn chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 (SEPPIC) trong việc kích thích đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG, IgA đặc hiệu PEDV và đáp ứng IFN-γ trên lợn con. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/liều) kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) có hiệu quả tương đương với vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology) trong việc kích thích sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trên lợn con. Đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được sinh trên lợn con được tiêm 2 liều kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/liều) kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) là cao hơn so vacxin thương mại Corning (Wuhan Keqian Biology) trên lợn con.

KIẾN NGHỊ

1. Hoàn thiện quy trình sản xuất kháng nguyên COE/G2a-pII tái tổ trên cây thuốc lá *N. benthamiana* và đánh giá khả năng kích thích miễn dịch bảo hộ trên số lượng lớn lợn con được đẻ ra từ lợn nái tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII chống lại chủng PEDV thuộc nhóm G2 gây bệnh thực địa ở Việt Nam.
2. Gây đáp ứng miễn dịch các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp trên lợn nái và đánh giá khả năng bảo hộ lợn con được sinh ra từ lợn nái sau khi công cường độc với chủng PEDV thuộc nhóm G2 gây bệnh thực địa ở Việt Nam.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Ho Thi Thuong, Nguyen Thu Giang, Pham Bich Ngoc, Le Van Phan, Trinh Thi Bich Ngoc, Vu Huyen Trang, Phan Trong Hoang, Udo Conrad and Chu Hoang Ha, 2020, Plant-derived trimeric CO-26K-Equivalent epitope induced neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus, *Front Immunol*, 11, pp. 2152. doi: 10.3389/fimmu.2020.02152.
2. Hồ Thị Thương, Trịnh Thái Vy, Nguyễn Thị Trà, Hoàng Thị Thu Hằng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, 2021, Thiết kế và tối ưu biểu hiện tạm thời protein COE trimer của chủng Porcine epidemic diarrhea virus gây bệnh tại Việt Nam trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*, *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, tr. 2-8. ISBN 978-604-9987-88-5.
3. Ho Thi Thuong, Trinh Thai Vy, Tran Xuan Hanh, Le Thi Thu Phuong, Nguyen Thi Tra, Hoang Thi Thu Hang, Pham Dinh Minh, Udo Conrad, Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha, 2022, The immunogenicity of plant-based COE-GCN4pII protein in pigs against the highly virulent porcine epidemic diarrhea virus strain from genotype 2, *Front Vet Sci*, 9, pp. 940395. doi: 10.3389/fvets.2022.940395.
4. Ho Thi Thuong, Trinh Thai Vy, Hoang Thi Thu Hang, Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha, 2022, Transient expression and purification of S2 protein from Porcine epidemic diarrhea virus in plants, *Vietnam Journal of Biotechnology*, 20 (4), tr. 1-11. doi: 10.15625/1811-4989/1750.
5. Hồ Thị Thương, Trịnh Thái Vy, Nguyễn Thị Thu Hiền, Lê Thị Trà My, Phạm Đình Minh, Phạm Bích Ngọc, Hoàng Thị Thu Hằng, Chu Hoàng Hà, 2023, Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên S2 từ virus gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (PEDV) dung hợp motif GCN4pII trên chuột, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, 228(13), tr. 298 – 305. doi: https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8349.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Jung K., Saif L.J., 2015, Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis, *Vet J*, 204, pp. 134–43.
2. Lee C., 2015, Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re–emerging epizootic swine virus, *Virol J*, 12, pp. 193.
3. Ngan Thi Mai, Bui Thanh Phong, Huynh Thi My Le, et al., 2020, Evaluating the risk factors for porcine epidemic diarrhea virus infection in an endemic area of Vietnam, *Front Vet Sci*, 7, pp. 433.
4. Than Van Thai, Choe S.E., Vu Thi Thu Hang, et al., 2020, Genetic characterization of the spike gene of porcine epidemic diarrhea viruses (PEDVs) circulating in Vietnam from 2015 to 2016, *Vet Med Sci*, 6(3), pp. 535–542.
5. Huỳnh Minh Trí, Nguyễn Ngọc Hải và Nguyễn Hoàng Việt, 2017, Khảo sát tỷ lệ nhiễm virus gây bệnh tiêu chảy cấp (Porcine epidemic diarhea virus – PEDV) trên heo nái và xác định các yếu tố nguy cơ liên quan đến bệnh PED tại tỉnh Tiền Giang, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 52b, tr. 1–7.
6. Topp E., Irwin R., McAllister T., et al., 2016, The case for plant–made veterinary immunotherapeutics, *Biotechnol Adv*, 34(5), pp. 597–604.
7. Chen Q., Lai H., Hurtado J., et al., 2013, Agroiniltration as an efective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins, *Adv Tech Biol Med*, 1, pp. 103.
8. Chang S.H., Bae J.L., Kang T.J., et al., 2002, Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus, *Mol Cells*, 14, pp. 295–9.
9. Song D., Park B., 2012, Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology diagnosis and vaccines, *Virus genes*, 44(2), pp. 167–175.
10. Yang D.K., Kim H.H., Lee S.H., et al., 2018, Isolation and characterization of a new porcine epidemic diarrhea virus variant that occurred in Korea in 2014, *J Vet Sci*, 19, pp. 71–8.
11. Nguyen Xuan Huy, Kim S.H., Yang M.S., et al., 2012, Immunogenicity of a neutralizing epitope from porcine epidemic diarrhea virus: M cell targeting ligand fusion protein expressed in transgenic rice calli, *Plant Cell Rep*, 31, pp. 1933–1942.

12. Bae J.L., Lee J.G., Kang T.J., et al., 2003, Induction of antigen–specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen, *Vaccine*, 21, pp. 4052–8.
13. Kang T.J., Kim Y.S., Jang Y.S., Yang M.S., et al., 2005, Expression of the synthetic neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in tobacco plants without nicotine, *Vaccine*, 23, pp. 2294–7.
14. Kong N., Meng Q., Jiao Y., et al., 2020, Identification of a novel B–cell epitope in the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus, *Virol J*, 17, pp. 46.
15. Okda F.A., Lawson S., Singrey A., et al., 2017, The S2 glycoprotein subunit of porcine epidemic diarrhea virus contains immunodominant neutralizing epitopes, *Virology*, 509, pp. 185–194.
16. Zhao P., Wang B., Ji C.M., et al., 2018, Identification of a peptide derived from the heptad repeat 2 region of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) spike glycoprotein that is capable of suppressing PEDV entry and inducing neutralizing antibodies, *Antiviral Res*, 150, pp. 1–8.
17. Sritun J., Inthong N., Jala S., et al., 2012, Expression of recombinant S2 domain of Spike protein of Porcine epidemic diarrhea virus, *Thai J Vet Med*, 51(2), pp. 221–230.
18. Peyret H., Steele J.F.C., Jung J.W., et al., 2021, Producing vaccines against enveloped viruses in plants: Making the Impossible, Difficult, *Vaccines (Basel)*, 9(7), pp. 780.
19. Khamis Z., 2016, *Producing a subunit vaccine for porcine epidemic diarrhea virus*, Electronic Thesis and Dissertation Repository.
20. Hồ Thị Thương, Lê Thu Ngọc, Nguyễn Thu Giang et al., 2021, 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.
21. Guo J., Fang L., Ye X., et al., 2019, Evolutionary and genotypic analyses of global porcine epidemic diarrhea virus strains, *Transbound Emerg Dis*, 66, pp. 111–118.
22. Jarvis M.C., Lam H.C., Zhang Y., et al., 2016, Genomic and evolutionary inferences between American and global strains of porcine epidemic diarrhea virus, *Prev Vet Med*, 123, pp. 175–184.

23. Hanke D., Pohlmann A., Sauter-Louis C., et al., 2017, Porcine epidemic diarrhea in Europe: indetail analyses of disease dynamics and molecular epidemiology, *Viruses*, 9, pp. 177.
24. European Food Safety Authority (EFSA): EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) Scientific opinion on porcine epidemic diarrhea and emerging porcine deltacoronavirus, 2014, *EFSA J*, 12, pp. 1–68.
25. Stadler J., Moser L., Numberger J., et al., 2018, Investigation of three outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Germany in 2016 demonstrates age dependent differences in the development of humoral immune response, *Prev Vet Med*, 150, pp. 93–100.
26. Plut J., Toplak I., Štukelj M., 2018, Variations in the detection of anti PEDV antibodies in serum samples using three diagnostic tests –short communication, *Acta Vet Hung*, 66, pp. 337–342.
27. Jinghui F., Yijing L., 2005, Cloning and sequence analysis of the M gen of porcine epidemic diarrhea virus LJB/03, *Virus Gens*, 30, pp. 69-73.
28. Toyomaki H., Sekiguchi S., Sasaki Y., et al., 2018, Factors associated with farm–level infection of porcine epidemic diarrhea during the early phase of the epidemic in Japan in 2013 and 2014, *Prev Vet Med*, 150, pp. 77–85.
29. Chen X., Yang J., Yu F., et al., 2012, Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) samples from field cases in Fujian China, *Virus Genes*, pp. 45.
30. Do Tien Duy, Nguyen Tat Toan, Puranaveja S., et al., 2011, Genetic characterization of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) isolates from southern Vietnam during 2009–2010 outbreaks, *Thai J Vet Med*, 41(1), pp. 55–64.
31. Nguyễn Tất Toàn và Đỗ Tiến Duy, 2012, Đặc trưng kiểu gien của virus gây bệnh tiêu chảy cấp (PEDV) trên heo ở một số tỉnh miền Đông Nam Bộ, *Tạp chí Khoa học Kĩ thuật Thú y*, 19(7), tr. 34–41.
32. Nguyễn Văn Điệp, Nguyễn Thị Lan, Nguyễn Thị Hoa et al., 2014, Một số đặc điểm dịch tễ và bệnh lý của bệnh tiêu chảy thành dịch trên heo ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam, *Tạp chí Khoa học Kĩ thuật Thú y*, 21 (2), tr. 43–55.
33. Nguyễn Trung Tiến, Vũ Thị Thu Hằng, Huỳnh Thị Mỹ Lệ, et al., 2015, Một số đặc điểm sinh học phân tử của virus gây ra dịch tiêu chảy cấp ở lợn (porcine epidemic diarrhea – ped) tại Quảng Trị, Thái Nguyên và Thái Bình từ năm 2013 –2014, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 13(7), tr. 1089–1100.

34. Nguyễn Trung Tiến, 2018, *Luận án Tiến sỹ*, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam, Hà Nội.
35. Trần Đức Hoàn, 2021, Đặc điểm dịch tễ học phân tử của virus gây bệnh tiêu chảy cấp ở lợn (Porcine epidemic diarrhea virus–PEDV) tại tỉnh Bắc Giang, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 11, tr. 133–140.
36. Hoàng Văn Sơn, Phạm Ngọc Thạch, Nguyễn Thị Lan, 2020, Tình hình dịch tiêu chảy cấp (Porcine Epidemic Diarrhea – PED) và xác định kháng thể ped sau khi sử dụng phương pháp "gut feedback" ở đàn lợn tại tỉnh thanh hoá, *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(8), tr. 599–606.
37. Li Z., Ma Z., Li Y., et al., 2020, Porcine epidemic diarrhea virus: Molecular mechanisms of attenuation and vaccines, *Microb Pathog*, 149, pp. 104553.
38. Hofmann M., Wyler R., 1988, Propagation of the virus of porcine epidemic diarrhea in cell culture, *J Clin Microbiol*, 26, pp. 2235–9.
39. Sun R., Leng Z., Zhai S.L., et al., 2014, Genetic variability and phylogeny of current Chinese porcine epidemic diarrhea virus strains based on spike, ORF3, and membrane genes, *Scientific World Journal*, pp. 208439.
40. Song D., Moon H., Kang B., 2015, Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines, *Clin Exp Vaccine Res*, pp. 166–76.
41. Kirchdoerfer R.N., Bhandari M., Martini O., et al., 2012, Structure and immune recognition of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein, *Structure*, 29(4), pp. 385–392.e5.
42. Chen Y., Zhang Z., Li J., et al., 2018, Porcine epidemic diarrhea virus S1 protein is the critical inducer of apoptosis, *Virol J*, 15, pp. 170.
43. Walls A.C., Tortorici M.A., Bosch B.J,. et al., 2016, Cryo–electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer, *Nature*, 531, pp. 114–117.
44. Wanitchang A., Saenboonrueng J., Kaewborisuth C., et al., 2019, A single V672F substitution in the spike protein of field– isolated PEDV promotes cell–cell fusion and replication in VeroE6 cells, *Viruses*, 11(3), pp. 282.
45. Wrapp D., McLellan J.S., 2019, The 3.1–angstrom cryo–electron microscopy structure of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein in the prefusion conformation, *J Virol*, pp. 93.
46. Xia S., Yan L., Xu W., et al., 2019, A pan–coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike, *Sci Adv*, pp. 5 eaav4580.

47. Gong L., Lin Y., Qin J., et al., 2018, Neutralizing antibodies against porcine epidemic diarrhea virus block virus attachment and internalization, *Virol J*, 15(1), pp. 133.
48. Park S.J., Moon H.J., Yang J.S., et al., 2007, Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea, *Virus Genes*, 35(2), pp. 321–32.
49. Park C.K., Lee K.K., Lee C., 2011, PED past, present, and future, *Proc Asian Pig Vet Soc Congr*, pp. 19–20.
50. Lee S., Ko D.K., Lim C.H., et al., 2014, Reemergence of porcine epidemic diarrhea virus on Jeju Island, *Korean J Vet Res*, 54, pp. 185–8.
51. Chen Q., Li G., Stasko J., et al., 2014, Isolation and characterization of porcine epidemic diarrhea viruses associated with the 2013 disease outbreak among swine in the United States, *J Clin Microbiol*, 52, pp. 234–43.
52. Vlasova A.N., Marthaler D., Wang Q., et al., 2014, Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013–February 2014, *Emerg Infect Dis*, 20, pp. 1620–8.
53. Lee D.K., Park C.K., Kim S.H., et al., 2010, Heterogeneity in spike protein genes of porcine epidemic diarrhea virusesisolated in Korea, *Virus Res*, 149, pp. 175–82.
54. Zhang X., Pan Y., Wang D., et al., 2015, Identification and pathogenicity of a variant porcine epidemic diarrhea virus field strain with reduced virulence, *Virol J*, 12, pp. 88.
55. Nguyen Van Diep, Sueyoshi M., Izzati U., et al., 2018, Appearance of US–like porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) strains before US outbreaks and genetic heterogeneity of PEDVs collected in Northern Vietnam during 2012–2015, *Transbound Emerg Dis*, 65, pp. e83–93.
56. Tran Xuan Thach, Nguyen Thi Kim Lien, Ha Thi Thu, et al., 2021, Changes in the spike and nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea virus strain in Vietnam–a molecular potential for the vaccine development?, *Peer J*, 9, pp. e12329.
57. Bui Thi Thuy Duong, Pham Thi Phuong Thao, Nguyen Thi Hoa, et al., 2022, Molecular analysis reveals a distinct subgenogroup of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in Northern Vietnam in 2018–2019, *Arch Virol*, 167, pp. 2337–2346.

58. DeZure A.D., Berkowitz N.M., Graham B.S., et al., 2016, Whole–inactivated and virus–like particle vaccine strategies for chikungunya virus, *J Infect Dis*, 214, pp. 497–499.
59. Yong C.Y., Ong H.K., Yeap S.K., et al., 2019, Recent advances in the vaccine development against Middle East respiratory syndrome–coronavirus, *Front Microbiol*, 10, pp. 1781.
60. Wang M., Ma S., Zhou J., et al., 1993, Development of the inactivated vaccine of porcine epidemic diarrhea virus, *Chin Anim Infect Dis*, 5, pp. 17–19.
61. Ma S., Wang M., Zhou J., et al., 1994, Adaptation of porcine epidemic diarrhea virus to Vero cells and evaluation of the inactivated vaccine against porcine epidemic diarrhea virus, *Chin Anim Infect Dis*, 2, pp. 15–18.
62. Tong Y., Feng L., Li W., et al., 1998, Development of attenuated vaccine strain of porcine epidemic diarrhea virus, *Chin Anim Infect Dis*, 20, pp. 329–332.
63. Sato T., Takeyama N., Katsumata A., et al., 2011, Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuation of virulence in vivo, *Virus Genes*, 43(1), pp. 72–78.
64. Baek P.S., Choi H.W., Lee S., et al., 2016, Efficacy of an inactivated genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus vaccine in neonatal piglets, *Vet Immunol Immunopathol*, 174, pp. 45–49.
65. Wu Y., Li W., Zhou Q., et al., 2019, Characterization and pathogenicity of Vero cell–attenuated porcine epidemic diarrhea virus CT strain, *Virol J*, 16, pp. 121.
66. Lv C., Xiao Y., Li X., et al., 2016, Porcine epidemic diarrhea virus: current insights, *Virus Adapt Treat*, 8, pp. 1–12.
67. Chen J., Wang C., Shi H., et al., 2010, Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China, *Arch Virol*, 155, pp. 1471–1476.
68. Hou Y., Ke H., Kim J., et al., 2019, Engineering a live attenuated porcine epidemic diarrhea virus vaccine candidate via inactivation of the viral 2'–O–methyltransferase and the endocytosis signal of the spike protein, *J Virol*, 93(15), pp. e00406-19.
69. Deng X., Buckley A.C., Pillatzki A., et al., 2020, Inactivating three interferon antagonists attenuates pathogenesis of an enteric coronavirus, *J Virol*, 94(17), pp. e00565-20.

70. Beall A., Yount B., Lin C.M., et al., 2016, Characterization of a pathogenic full–length cDNA clone and transmission model for porcine epidemic diarrhea virus strain PC22A, *mBio*, 7, pp. e01451–15.
71. Pollard A.J., Bijker E.M., 2021, A guide to vaccinology: from basic principles to new developments, *Nat Rev Immunol*, 21(2), pp. 83–100.
72. Wang K., Xie C., Zhang J., et al., 2016, The identification and characterization of two novel epitopes on the nucleocapsid protein of the porcine epidemic diarrhea virus, *Sci Rep*, 6, pp. 1–14.
73. Liu X., Zhao D., Zhou P., et al., 2019, Evaluation of the efficacy of a recombinant adenovirus expressing the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus in pigs, *BioMed Res Int*, pp. 8530273.
74. Chang C.Y., Hsu W.T., Tsai P.S., et al., 2020, Oral administration of porcine epidemic diarrhea virus spike protein expressing in silkworm pupae failed to elicit immune responses in pigs, *Amb Express*, 10, pp. 1–10.
75. Ke Y., Yu D., Zhang F., et al., 2019, Recombinant vesicular stomatitis virus expressing the spike protein of genotype 2b porcine epidemic diarrhea virus: a platform for vaccine development against emerging epidemic isolates, *Virology*, 533, pp. 77–85.
76. Guo M., Yi S., Guo Y., et al., 2019, Construction of a recombinant lactococcus lactis strain expressing a variant porcine epidemic diarrhea virus S1 gene and its immunogenicity analysis in mice, *Viral Immunol*, 32, pp. 144–150.
77. Wang J., Huang L., Mou C., et al., 2019, Mucosal immune responses induced by oral administration recombinant Bacillus subtilis expressing the COE antigen of PEDV in newborn piglets, *Biosci Rep*, pp. 39.
78. Chang Y.C., Chang C.Y., Tsai P.S., et al., 2018, Efficacy of heat–labile enterotoxin B subunit–adjuvanted parenteral porcine epidemic diarrhea virus trimeric spike subunit vaccine in piglets, *Appl Microbiol Biotechnol*, 102, pp. 7499–7507.
79. Kim S.H., Cho B.H., Lee K.Y., et al., 2018, N–terminal domain of the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus as a new candidate molecule for a mucosal vaccine, *Immune Netw*, 18(3), pp. e21.
80. Chang C.Y., Hsu W.T., Chao Y.C., et al., 2018, Display of porcine epidemic diarrhea virus spike protein on baculovirus to improve immunogenicity and protective efficacy, *Viruses*, 10, pp. 346.

81. Li Q., Xu Z., Wu T., et al., 2018, A flagellin–adjuvanted PED subunit vaccine improved protective efficiency against PEDV variant challenge in pigs, *Vaccine*, 36, pp. 4228–4235.
82. Joshi L.R., Okda F.A., Singrey A., et al., 2018, Passive immunity to porcine epidemic diarrhea virus following immunization of pregnant gilts with a recombinant orf virus vector expressing the spike protein, *Arch Virol*, 163, pp. 2327–2335.
83. Hou X., Jiang X., Jiang Y., et al., 2018, Oral immunization against PEDV with recombinant Lactobacillus casei expressing dendritic cell–targeting peptide fusing COE protein of PEDV in piglets, *Viruses*, 10, pp. 106.
84. Li Q., Peng O., Wu T., et al., 2018, PED subunit vaccine based on COE domain replacement of flagellin domain D3 improved specific humoral and mucosal immunity in mice, *Vaccine*, 36, pp. 1381–1388.
85. Gillam F., Zhang J., Zhang C., 2018, Hepatitis B core antigen based novel vaccine against porcine epidemic diarrhea virus, *J Virol Methods*, 253, pp. 61–69.
86. Yu M., Wang L., Ma S., et al., 2017, Immunogenicity of eGFP–marked recombinant Lactobacillus casei against transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus, *Viruses*, 9(10), pp. 274.
87. Yuan X., Lin H., Li B., et al., 2017, Efficacy and immunogenicity of recombinant swinepox virus expressing the truncated S protein of a novel isolate of porcine epidemic diarrhea virus, *Arch Virol*, 162, pp. 3779–3789.
88. Subramaniam S., Cao D., Tian D., et al., 2017, Efficient priming of CD4 T cells by Langerin–expressing dendritic cells targeted with porcine epidemic diarrhea virus spike protein domains in pigs, *Virus Res*, 227, pp. 212–219.
89. Wang C., Yan F., Zheng X., et al., 2017, Porcine epidemic diarrhea virus virus–like particles produced in insect cells induce specific immune responses in mice, *Virus Gene*, 53, pp. 548–554.
90. Hain K.S., Joshi L.R., Okda F., et al., 2016, Immunogenicity of a recombinant parapoxvirus expressing the spike protein of Porcine epidemic diarrhea virus, *J Gen Virol*, 97, pp. 2719–2731.
91. Makadiya N., Brownlie R., van den Hurk J., et al., 2016, S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen, *Virol J*, 13, pp. 57.
92. Yin Y., Zhu L., Liu P., et al., 2019, Evaluation on the efficacy and immunogenicity of recombinant DNA plasmids expressing S gene from

porcine epidemic diarrhea virus and VP7 gene from porcine rotavirus, *Braz J Microbiol*, 50, pp. 279–286.

93. Li L., Petrovsky N., 2016, Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity, *Expert Rev Vaccines*, 15, pp. 313–329.
94. Pardi N., Hogan M.J., Porter F.W., et al., 2018, mRNA vaccines – a new era in vaccinology, *Nat Rev Drug Discov*, 17, pp. 261–279.
95. Blakney A.K., McKay P.F., Yus B.I., et al., 2019, Inside out: optimization of lipid nanoparticle formulations for exterior complexation and in vivo delivery of saRNA, *Gene Ther*, 26, pp. 363–372.
96. Ayudhya S.N., Assavacheep P., Thanawongnuwech R., 2012, One world – one health: the threat of emerging swine diseases. An Asian perspective, *Transbound Emerg Dis*, 59, pp. 9–17.
97. Goede D., Murtaugh M.P., Nerem J., et al., 2015, Previous infection of sows with a "mild" strain of porcine epidemic diarrhea virus confers protection against infection with a "severe" strain, *Vet Microbiol*, 176(1–2), pp. 161–164.
98. Song D.S., Oh J.S., Kang B.K., et al. 2007, Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain, *Res Vet Sci*, 82(1), pp. 134–140.
99. Choe S., Song S., Piao D., et al., 2020, Efficacy of orally administered porcine epidemic diarrhea vaccine–loaded hydroxypropyl methylcellulose phthalate microspheres and RANKL–secreting L. lactis, *Vet Microbiol*, 242, pp. 108604.
100. Li B., Du L., Yu Z., et al., 2017, Poly (d,l–lactide– co–glycolide) nanoparticle–entrapped vaccine induces a protective immune response against porcine epidemic diarrhea virus infection in piglets, *Vaccine*, 35, pp. 7010–7017.
101. Hsueh F.C., Chang Y.C., Kao C.F., et al., 2020, Intramuscular immunization with chemokine–adjuvanted inactive porcine epidemic diarrhea virus induces substantial protection in pigs, *Vaccines*, 8(1), pp: 102.
102. Komarova T.V., Baschieri S., Donini M., et al., 2010, Transient expression systems for plant–derived biopharmaceuticals, *Expert Rev Vaccines*, 9, pp. 859–876.
103. Rattanapisit K., Shanmugaraj B., Manopwisedjaroen S., et al., 2020, Rapid production of SARS–CoV–2 receptor binding domain (RBD) and spike specific monoclonal antibody CR3022 in Nicotiana benthamiana, *Sci Rep*, 10(1), pp. 17698

104. Maharjan P.M., Choe S., et al., 2019, Transient expression of hemagglutinin antigen from canine influenza virus H3N2 in *Nicotiana benthamiana* and *Lactuca sativa*, *Clin Exp Vaccine Res*, 8, pp. 124–131.
105. Bernat-Silvestre C., De Sousa Vieira V., Sánchez-Simarro J., et al., 2021, Transient transformation of *A. thaliana* seedlings by vacuum infiltration, *Methods Mol Biol*, 2200, pp. 147–155.
106. Gengenbach B.B., Keil L.L., Opdensteinen P., et al., 2019, Comparison of microbial and transient expression (tobacco plants and plant–cell packs) for the production and purification of the anticancer mistletoe lectin viscumin, *Biotechnol Bioeng*, 116, pp. 2236–2249.
107. Siriwattananon K., Manopwisedjaroen S., Kanjanasirirat P., et al., 2021, Development of plant–produced recombinant ACE2–Fc fusion proteinas a potential therapeutic agent against SARS–CoV–2, *Front Plant Sci*, 11, pp. 2117.
108. Pogue G.P., Vojdani F., Palmer K.E., et al., 2010, Production of pharmaceutical–grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plant–based transient expression systems, *Plant Biotechnol J*, 8, pp. 638–654.
109. He W., Baysal C., Lobato Gómez M., et al., 2021, Contributions of the international plant science community to the fight against infectious diseases in humans—Part 2: Affordable drugs in edible plants for endemic and re–emerging diseases, *Plant Biotechnol J*, 19(10), pp. 1921–1936.
110. Rybicki E.P., 2009, Plant–produced vaccines: Promise and reality, *Drug Discov Today*, 14, pp. 16–24.
111. Maharjan P.M., Choe S., 2021, Plant–Based COVID–19 Vaccines: Current Status, Design, and Development Strategies of Candidate Vaccines, *Vaccines (Basel)*, 9(9), pp. 992.
112. Ward B.J., Makarkov A., Séguin A., et al., 2020, Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant–derived, quadrivalent, virus–like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥65 years): Two multicentre, randomised phase 3 trials, *Lancet*, 396, pp. 1491–1503.
113. Kang T.J., Kang K.H., Kim J.A., et al., 2004, High–level expression of the neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus by a tobacco mosaic virus–based vector, *Protein Expr Purif*, 38, pp. 129–135.
114. Kang T.J., Seo J.E., Kim D.H., et al., 2005, Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus and

expression of its neutralizing epitope in plants, *Protein Expr Purif*, 41(2), pp. 378–383.

115. Kim YS., Kang TJ., Jang YS., et al., 2005, Expression of neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus in potato plants, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 82, pp. 125–130.
116. Ko S.M., Sun H.J., Oh M.J., et al., 2011, Expression of the protective antigen for PEDV in transgenic duckweed, Lemna minor, *Hortic Environ Biotech*, 52, pp. 511–515.
117. Yang KS., Kwon L., Kim S.H., et al., 2005, Transgenic sweet potato (Ipomoea batatas) expressing spike gene of porcine epidemic diarrhea virus, *J Plant Biotech*, 32, pp. 263–268.
118. Kang T.J., Kim Y.S., Jang Y.S., et al., 2014, Expression of core neutralizing epitope gene of porcine epidemic diarrhea virus in maize, *J Agric Sci Technol*, 16, pp. 28–35.
119. Kim Y.S., Kwon T.H., Yang M.S., 2003, Expression of porcine epidemic diarrhea virus spike gene in transgenic carrot plants, *Korean J Plant Resour*, 6, pp. 108–113.
120. Kang T.J., Han S.C., Yang M.S., et al., 2006, Expression of synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of Escherichia coli heat–labile enterotoxin in tobacco plants, *Protein Expr Purif*, 46, pp. 16–22.
121. Nguyen Xuan Huy, Yang M.S., Kim T.G., 2011, Expression of a cholera toxin B subunit neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (Lactuca sativa L), *Mol Biotechnol*, 48, pp. 201–9.
122. Nguyen Xuan Huy, Kim Y.S., Jun S.C., et al., 2009, Production of a heat–labile enterotoxin B subunit–porcine epidemic diarrhea virus–neutralizing epitope fusion protein in transgenic lettuce (Lactuca sativa), *Biotechnol Bioproc E*, 14(6), pp. 731–737.
123. Oszvald M., Kang T.J., Tomoskozi S., et al., 2007, Expression of a synthetic neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus fused with synthetic B subunit of Escherichia coli heat labile enterotoxin in rice endosperm, *Mol Biotechnol*, 35, pp. 215–223.
124. Egelkrout E., Hayden C., Fake G., et al., 2020, Oral delivery of maize–produced porcine epidemic diarrhea virus spike protein elicits neutralizing antibodies in pigs, *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 142(1), pp. 1–8.

125. Nguyen Quang Duc Tien, Yang M.S., Jang Y.S., et al., 2021, Systemic and oral immunogenicity of porcine epidemic diarrhea virus antigen fused to poly–Fc of immunoglobulin G and expressed in ΔXT/FT *Nicotiana benthamiana* plants, *Front Pharmacol*, 12, pp. 653064.
126. Arndt K, Fink GR, 1986, GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5’ TGACTC 3’ sequences, *Proc Natl Acad Sci USA*, 83, pp. 8516–20.
127. Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L., 1988, The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science*, 240 (4860), pp. 1759–64.
128. Harbury P.B., Zhang T., Kim P.S., et al., 1993, A switch between two–, three–, and four–stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants, *Science*, 262(5138), pp. 1401–7.
129. Wolfe S.A., Grant R.A., Pabo C.O., 2003, Structure of a designed dimeric zinc finger protein bound to DNA, *Biochemistry*, 42(46), pp. 13401–9.
130. Perera R., Navaratnarajah C., Kuhn R.J., 2003, A heterologous coiled coil can substitute for helix I of the Sindbis virus capsid protein, *J Virol*, 77 (15), pp. 8345–53.
131. Yang R., Wek S.A., Wek R.C., 2020, Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase, *Mol Cell Biol*, 20(8), pp. 2706–17.
132. Harbury P.B., Kim P.S., Alber T., 1994, Crystal structure of an isoleucine–zipper trimer, *Nature*, 371(6492), pp. 80–3.
133. Weldon W.C., Wang B.Z., Martin M.P., et al., 2010, Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin, *PLoS One*, 5(9),pp. e12466.
134. Lin S.C., Huang M.H., Tsou P.C., et al., 2011, Recombinant trimeric HA protein immunogenicity of H5N1 avian influenza viruses and their combined use with inactivated or adenovirus vaccines, *PLoS One*, 6(5), pp. e20052.
135. Kuah L.F., Tang L.H., Sutton T., et al., 2017, Induction of protective immunity against influenza A/Jiangxi–Donghu/346/2013 (H10N8) in mice, *J Gen Virol*, 98(2), pp. 155–165.
136. Keyt B.A., Baliga R., Sinclair A.M., et al., 2020, Structure, function, and therapeutic use of IgM Antibodies, *Antibodies (Basel)*, 9(4), pp. 53.
137. Davis A.C., Roux K.H., Shulman M.J., 1998, On the structure of polymeric IgM, *Eur J Immunol*, 18, pp. 1001–1008.

138. Fazel S., Wiersma E.J., Shulman M.J., 1997, Interplay of J chain and disulfide bonding in assembly of polymeric IgM, *Int Immunol*, 9(8), pp. 1149–58.
139. Sørensen V., Rasmussen I.B., Norderhaug L., et al., 1996, Effect of the IgM and IgA secretory tailpieces on polymerizationand secretion of IgM and IgG, *J Immunol*, 156, pp. 2858.
140. Pasalic D., Weber B., Giannone C., et al., 2017, A peptide extension dictates IgM assembly, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(41), pp. E8575–E8584.
141. Müller R., Gräwert M.A., Kern T., et al., 2013, High–resolution structures of the IgM Fc domains reveal principles of its hexamer formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(25), pp. 10183–8.
142. Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Chu Thị Kim Hoàng, et al., 2015, Nghiên cứu sự biểu hiện tạm thời của kháng nguyên GP5 của virus gây bệnh lợn tai xanh trong cây thuốc lá (Nicotiana benthamiana) bằng phương pháp agro–infiltration, *Tạp chí khoa học, chuyên san Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 31, tr. 1.
143. Pham Bich Ngoc, Ho Thi Thuong, Nguyen Thu Giang, et al., 2017, Nanodiamond enhances immune responses in mice against recombinant HA/H7N9 protein, *J. Nanobiotechnology*, 15, pp. 69.
144. Pham Thi Van, Ho Thi Thuong, Phan Trong Hoang, et al., 2019, A plant–based artificial hemagglutinin (A/H5N1) strongly induced neutralizing immune responses in mice, *MDPI Applied Science*, 9, pp. 4605.
145. Phan Trong Hoang, Pham Thi Van, Ho Thi Thuong, et al., 2020, Immunization with plant–derived multimeric H5 hemagglutinins protect chicken against highly pathogenic avian influenza virus H5N1, *MDPI Vaccines*, 8, pp. 593.
146. Phan Trong Hoang, Tran Xuan Hanh, Ho Thi Thuong, et al., 2023, Plant crude extracts containing oligomeric hemagglutinins protect chickens against highly pathogenic avian influenza virus after one dose of immunization, *Vet Res Commun*, 47, pp. 191–205.
147. Nguyễn Thị Hoa, Nguyễn Thị Lan, Trương Quang Lâm, et al., 2018, Nghiên cứu phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học của virus ped (porcine epidemic diarrhea virus), *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 16(3), tr. 257–267.
148. Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Lê Minh Quang, et al., 2015, Nghiên cứu thiết kế và đánh giá ảnh hưởng của vector hỗ trợ mang gen mã hóa protein 2b

CMV và protein HC–Pro lên biểu hiện tạm thời của GFP ở lá thuốc lá, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 1, tr. 151–159.

149. Mersereau M., Pazour G.J., Das A., 1990, Efficient transformation of Agrobacterium tumefaciens by electroporation, *Gene*, 90, pp. 149–151.
150. Gahrtz M., Conrad U., 2009, Immunomodulation of plant function by in vitro selected single–chain Fv intrabodies, *Methods Mol Biol*, 483, pp. 289–312.
151. Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
152. Hamby S.E., Hirst J.D., 2008, Prediction of glycosylation sites using random forests, *BMC Bioinformatics*, 9, pp. 500.
153. Wittig I., Braun H.P., Schägger H., 2006, Blue native PAGE, *Nat Protoc*, 1, pp. 418–428.
154. Kusanagi K., Kuwahara H., Katoh T., et al., 1992, Isolation and serial propagation of porcine epidemic diarrhea virus in cell cultures and partial characterization of the isolate, *J Vet Med Sci*, 54, pp. 313–318.
155. Conrad U., Plagmann I., Malchow S., et al., 2011, ELPylated anti–human TNF therapeutic single–domain antibodies for prevention of lethal septic shock, *Plant Biotechnol J*, 9, pp. 22–31.
156. Pham Van Dong, Hoang Ha, Phan Trong Hoang, et al., 2012, Production of antibody labeled gold nanoparticles for influenza virus H5N1 diagnosis kit development, *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*, 3, pp. 045017.
157. de Arriba M.L., Carvajal A., Pozo J., et al., 2002, Mucosal and systemic isotypespecific antibody responses and protection in conventional pigs exposed to virulent or attenuated porcine epidemic diarrhoea virus, *Vet Immunol Immunopathol*, 85, pp. 85–97.
158. Annamalai T., Lin C.M., Gao X., et al., 2017, Cross protective immune responses in nursing piglets infected with a US spike–insertion deletion porcine epidemic diarrhea virus strain and challenged with an original US PEDV strain, *Vet Res*, 48, pp. 61.
159. Ward L.A., Rich E.D., Besser T.E., 1996, Role of maternally derived circulating antibodies in protection of neonatal swine against porcine group A rotavirus, *J Infect Dis*, 174, pp. 276–82.
160. Parre O.V., Hodgins D.C., de Arriba L., et al., 1999, Serum and intestinal isotype antibody responses to Wa human rotavirus in gnotobiotic pigs are modulated by maternal antibodies, *J Gen Virol*, 80, pp. 11417–1428.

161. Hägglund S., Hu K., Vargmar K., et al., 2011, Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs–Immunity, protection and safety in young conventional calves, *Vaccine*, 29, pp. 8719–30.
162. Cheng C., Pal S., Bettahi I., et al., 2011, Immunogenicity of a vaccine formulated with the Chlamydia trachomatis serovar F, native major outer membrane protein in a nonhuman primate model, *Vaccine*, 29, pp. 3456–64.
163. Yang G.B., Wang Y., Babaahmady K., et al., 2021, Immunization with recombinant macaque major histocompatibility complex class I and II and human immunodeficiency virus gp140 inhibits simianhuman immunodeficiency virus infection in macaques, *J Gen Virol*, 93, pp. 1506–18.
164. Su F., Patel G.B., Hu S., et al., 2016, Induction of mucosal immunity through systemic immunization: phantom or reality?, *Human Vacc Immunother*,12, pp. 1070–9.
165. Klasse P.J., Sattentau Q.J., 2002, Occupancy and mechanism in antibody–mediated neutralization of animal viruses, *J Gen Virol*, 83, pp. 2091–108.
166. Zinkernagel RM, 2001, Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases, *N Engl J Med*, 345, pp. 1331–5.
167. Wang X., Wang L., Huang X., et al., 2017, Oral delivery of probiotics expressing dendritic cell–targeting peptide fused with porcine epidemic diarrhea virus COE antigen: a promising vaccine strategy against PEDV, *Viruses*, 9, pp. 312.
168. Ma S., Wang L., Huang X., et al., 2018, Oral recombinant Lactobacillus vaccine targeting the intestinal microfold cells and dendritic cells for delivering the core neutralizing epitope of porcine epidemic diarrhea virus, *Microb Cell Fact*, 17, pp. 20.
169. Nair A.B., Jacob S., 2016, A simple practice guide for dose conversion between animals and human, *J Basic Clin Pharm*, 7(2), pp. 27-31.
170. Stevenson G.W., Hoang H., Schwartz K.J., et al., 2013, Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences, *J Vet Diagn Invest*, 25, pp. 649–54.
171. Carvajal A, Argüello H, Martínez-Lobo FJ, et al., 2015, Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease, *Porc Health Manag*, 1, pp. 12.
172. Xu X., Du L., Fan B., Sun B., et al., 2020, A flagellin–adjuvanted inactivated porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) vaccine provides enhanced immune protection against PEDV challenge in piglets, *Arch Virol*, 165, pp. 1299–309.

173. Bandrick M., Ariza-Nieto C., Baidoo S.K., et al., 2014, Colostral antibody mediated and cell–mediated immunity contributes to innate and antigen–specific immunity in piglets, *Dev Comp Immunol*, 43, pp. 114–20.
174. Vinay K., Abul A.K., Jon A.C., 2020, *Robbins & cotran pathologic basis of disease*, 10th Edn, Philadelphia, PA El Sevier.
175. Park J.E., Jang H., Kim J.H., et al., 2020, Immunization with porcine epidemic diarrhea virus harbouring Fc domain of IgG enhances antibody production in pigs, *Vet Q*, 40, pp. 183–9.
176. Bergeon J.A., Chan Y.N., Charles B.G., et al., 2008, Oral absorption enhancement of dipeptide L-Glu-L-Trp-OH by lipid and glycosyl conjugation, *J Pept Sci*, 90, pp. 633–643.
177. Skwarczynski M, Toth I., 2016, Peptide-based synthetic vaccines, *Chem Sci*, 7, pp. 842–854.
178. Sarkar I, Garg R, van Drunen Littel-van den Hurk S., 2019, Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens, *Expert Rev Vaccines*, 18, pp. 505–521.
179. Sun B., Yu S., Zhao D., et al., 2018, Polysaccharides as vaccine adjuvants, *Vaccine*, 36, pp. 5226–5234.
180. Bose R.J., Kim M., Chang J.H., et al., 2019, Biodegradable polymers for modern vaccine development, *Ind Eng Chem Res*, 77, pp. 12–24.
181. Bashiri S., Koirala P., Toth I., et al., 2020, Carbohydrate Immune Adjuvants in Subunit Vaccines, *Pharmaceutics*, 12(10), pp. 965.

Mục lục Phụ lục

Phụ lục 1. Danh sách các trình tự đầy đủ của gen mã hóa protein S của các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam đăng ký trên Ngân hàng gen I
Phụ lục 2. So sánh trình tự nucleotit của COE/G1a của chủng PEDV DR13 (Hàn Quốc) trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật bằng phần mềm Bioedit IV
Phụ lục 3. So sánh trình tự axit amin của protein COE/G1a của chủng PEDV DR13 (Hàn Quốc) trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật IV
Phụ lục 4. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA-COE/G1a-pII.....V
Phụ lục 5. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE/1a-pII.....VI
Phụ lục 6. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE/1a-pII VII
Phụ lục 7. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G1a VIII
Phụ lục 8. Western blot phát hiện hàm lượng COE/G1a-pII trong dịch chiết thô trước và sau khi bảo quản ở 4°C sử dụng kháng thể kháng c-myc.....X
Phụ lục 9. Cây phả hệ được xây dựng từ trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S.....XI
Phụ lục 10. So sánh trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G2a từ chủng PEDV NAVET/PS6/2010 XII
Phụ lục 11. Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao..... XII
Phụ lục 12. So sánh trình tự axit amin của protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự axit amin của protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 XII
Phụ lục 13. Mức độ tương đồng trong trình tự axit amin của protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự axit amin của protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao.....XIII

Phụ lục 14. So sánh trình tự nucleotide của COE/G2a của chủng PEDV NAVET/PS6/2010 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật XIII
Phụ lục 15. So sánh trình tự axit amin của COE/G2a của chủng PEDV NAVET/PS6/2010 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật bằng XIII
Phụ lục 16. Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit sau khi tối ưu mã biểu hiện ở cây thuốc lá *N. benthamiana* của gen mã hóa protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự nucleotit sau khi tối ưu mã biểu hiện ở cây thuốc lá *N. benthamiana* của gen mã hóa protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao XIV
Phụ lục 17. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA-COE/G2a-pII XIV
Phụ lục 18. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE/2a-pII XV
Phụ lục 19. Sơ đồ vector biển hiện pCB301-COE/G2a-pII XVI
Phụ lục 20. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G2a XVII
Phụ lục 21. Trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa protein COE-S1D của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 XIX
Phụ lục 22. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA-COE-S1D/G2a-pII XIX
Phụ lục 23. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE-S1D/G2a-pII XX
Phụ lục 24. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE-S1D/G2a-pII XXI
Phụ lục 25. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA-COE/G2a-pII-tp XXII
Phụ lục 26. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE/2a-pII-tp XXIII
Phụ lục 27. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE/2a-pII-tp XXIV
Phụ lục 28. Trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S2/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 XXV
Phụ lục 29. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA-S2/G2a-pII XXVI
Phụ lục 30. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-S2/G2a-pII XXVII
Phụ lục 31. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-S2/G2a-pII XXVIII
Phụ lục 32. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE-S1D/G2a XXIX
Phụ lục 33. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein S2/G2a XXXII

PHỤ LỤC

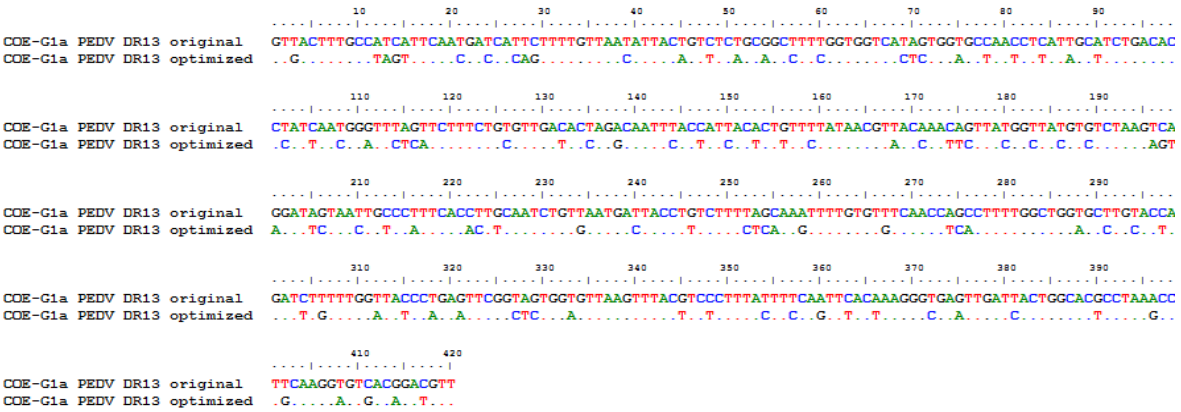
Phụ lục 1. Danh sách các trình tự đầy đủ của gen mã hóa protein S của các chủng PEDV xuất hiện tại Việt Nam đăng ký trên Ngân hàng gen

STT	Mã Genbank	Nơi xuất hiện	Năm	Tên chủng	Kiểu gen
1	KX982553	Hưng Yên	2013	VN01/HY/2013	G2b
2	KX982557	Hưng Yên	2013	VN12/HY/2013	
3	KX982561	Hà Nội	2013	VN97/HN/2013	
4	KX982572	Thái Bình	2014	VN385/TB/2014	
5	KX982570	Hà Nội	2014	VN344/HN/2014	
6	KX982569	Hòa Bình	2014	VN297/HB/2014	
7	KX708906	Hà Nội	2015	HUA-PED94	
8	KX982566	Vĩnh Phúc	2014	VN270/VP/2014	
9	KX982555	Hưng Yên	2013	VN06/HY/2013	
10	KX982559	Hưng Yên	2013	VN19/HY/2013	
11	KX982558	Hưng Yên	2013	VN15/HY/2013	
12	KX982556	Hưng Yên	2012	VN11/HY/2012	
13	KX982563	Hưng Yên	2013	VN112/HY/2013	
14	KX982560	Quảng Ninh	2013	VN44/QN/2013	
15	KX982562	Hưng Yên	2012	VN101/HY/2012	
16	KX982574	Hà Nội	2015	VN-K23/HN/2015	
17	KX982575	Thái Bình	2015	VN-K28/TB/2015	
18	KX982577	Hòa Bình	2015	KX982577	
19	KX982567	Sơn La	2014	VN288/SL/2014	
20	MK435392	Hà Nội	2015	HUA-PED120	
21	KX708907	Hà Nội	2015	HUA-PED96	
23	MT198679	Hưng Yên	2018	IBT/2018	
22	KJ960180	Hưng Yên	2013	VN/KCHY-310113/2013/KhoaiChau/ HungYen/Vietnam	
24	KP455313	Hà Nội	2013	HUAPED45	
25	KP455314	Hà Nội	2013	HUAPED47	
26	KJ960179	Vũng Tàu	2013	VN/VAP1113_1/2013/ Vung Tua/Vietnam	

27	KJ960178	Vĩnh An	2013	VN/JFP1013_1/2013/Vinh An/Vietnam	G2a
28	KR941556	Miền Bắc	2013	GF0413-1/NorthVietnam/2013	
29	KX982554	Hưng Yên	2013	VN02/HY/2013	
30	KX982568	Hà Nội	2014	VN292/HN/2014	
31	KX982571	Vĩnh Phúc	2014	VN367/VP/2014	
32	KX982573	Hưng Yên	2015	VN-K2/HY/2015	
33	KX708901	Hà Nội	2015	HUAPED88	
34	KX708902	Hà Nội	2015	HUAPED86	
35	KX982576	Hưng Yên	2015	VN-TH15/HY/2015	
36	KX708895	Hà Nội	2015	HUAV2	
37	KX708903	Hà Nội	2015	HUAPED111	
38	KX708896	Hà Nội	2015	HUAPED113	
39	KX708897	Hà Nội	2015	HUAPED114	
40	KX708898	Hà Nội	2015	HUAPED115	
41	KX708899	Hà Nội	2015	HUAPED118	
42	KX708900	Hà Nội	2015	HUAPED117	
43	KX708904	Hà Nội	2015	PED103	
44	KX708905	Hà Nội	2015	PED106	
45	MK435383	Hà Nội	2016	HUAPED180	
46	KX708894	Hà Nội	2016	HUAM17	
47	MK435378	Hà Nội	2016	HUAPED230	
48	MK435388	Hà Nội	2016	HUA-PED155	
49	KT941120	Hà Nội	2016	HUA-14PED96	
50	KX982554	Hưng Yên	2013	VN02/HY/2013	
51	KR941552	Miền nam	2013	VN2-0514/SouthVietnam/2014	
52	KX982564	Hòa Bình	2013	VN232/HB/2013	
53	KR941553	Miền nam	2014	VN1-0514/SouthVietnam/2014	
54	KR941554	Miền nam	2014	VN6-0514/SouthVietnam/2014	
55	KR941555	Miền bắc	2013	VN0114-1/NorthVietnam/2013	

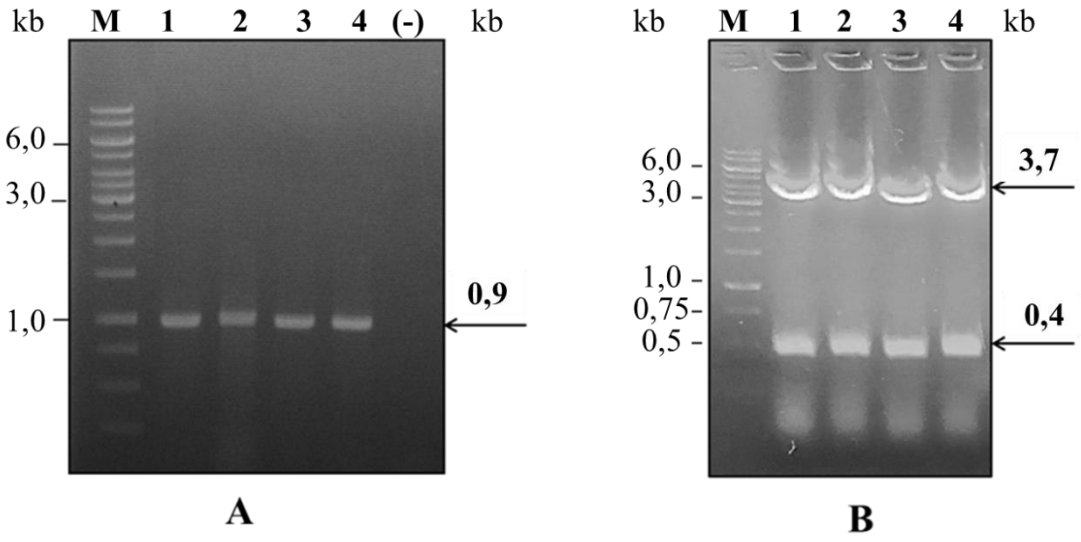
56	MG373534	Vĩnh Long	2015	VL2	
57	KP455315	Hà Nội	2014	HUAPED55	G1b
58	KP455318	Hà Nội	2014	HUAPED63	
59	KP455316	Hà Nội	2014	HUAPED58	
60	KP455317	Hà Nội	2014	HUAPED60	
61	KP455319	Hà Nội	2014	HUAPED67	
62	MK435385	Hà Nội	2015	HUAPED176	
63	MK435377	Hà Nội	2016	HUAPED254	
64	KX982564	Hòa Bình	2013	VN232/HB/2013	

Phụ lục 2. So sánh trình tự nucleotit của COE/G1a của chủng PEDV DR13 (Hàn Quốc) trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật bằng phần mềm Bioedit



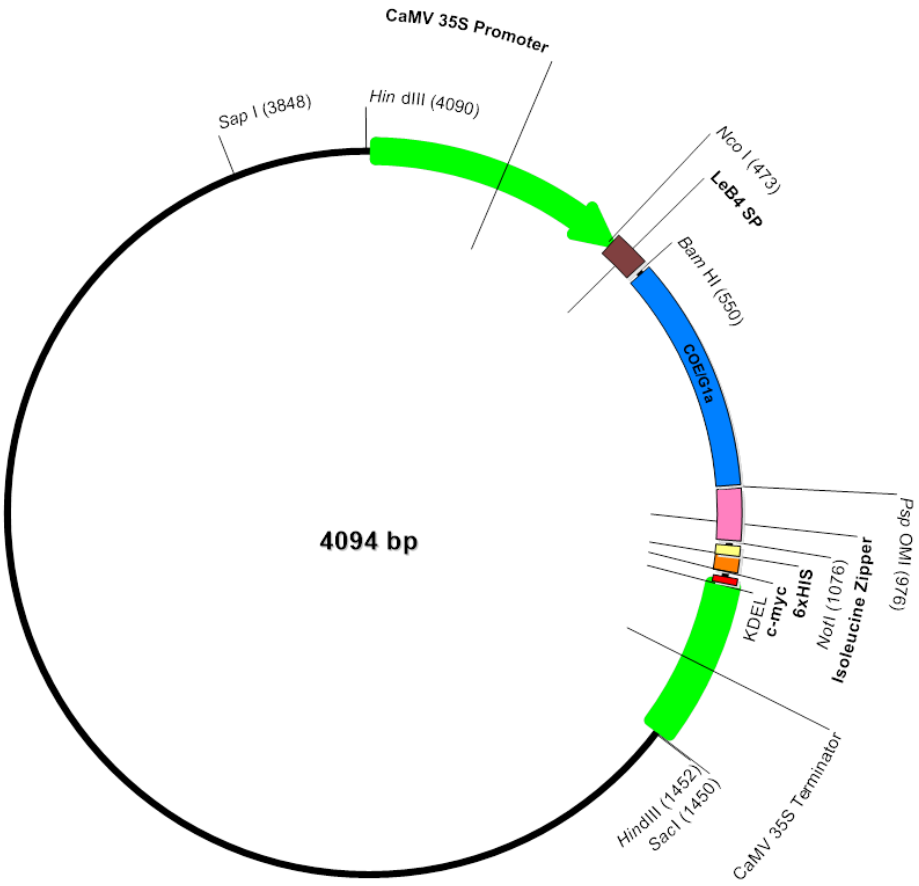
Phụ lục 3. So sánh trình tự axit amin của protein COE/G1a của chủng PEDV DR13 (Hàn Quốc) trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật

Phụ lục 4. Kết quả thiết kế vector tách dòng mang gen mã hóa kháng nguyên COE/G1a-pII



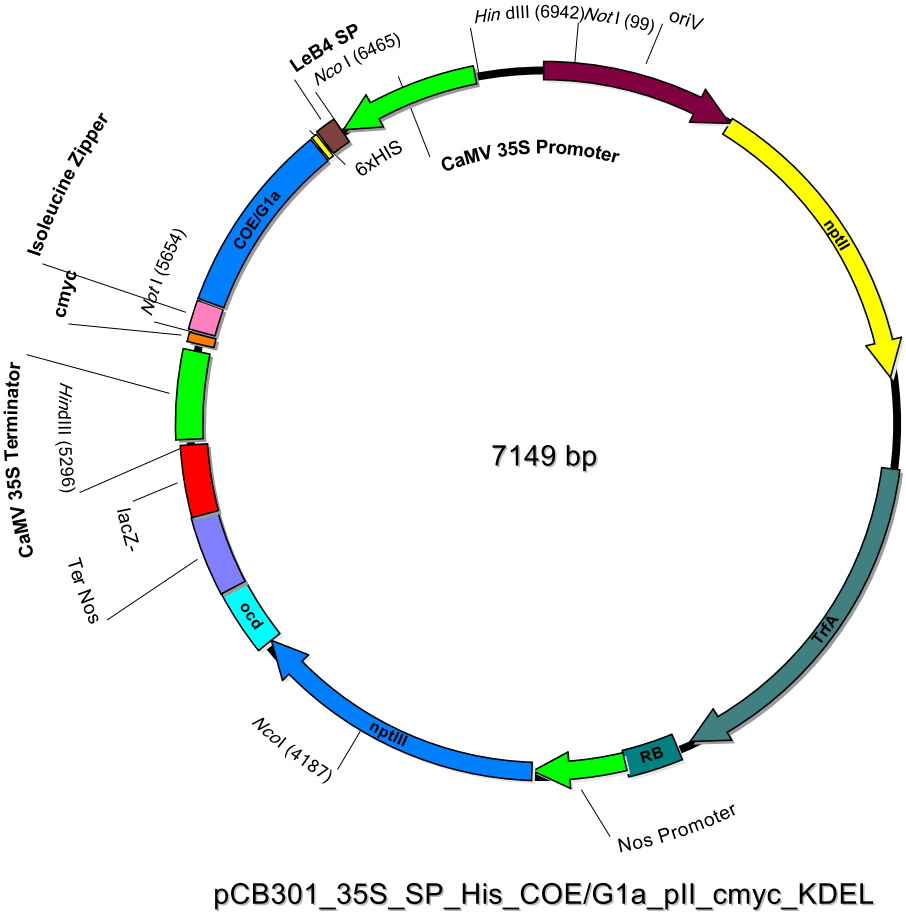
A. Kết quả colony-PCR sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-4: các khuẩn lạc số 1-4 được kiểm tra, (-): đối chứng âm; B. Điện di sản phẩm cắt các plasmid pRTRA tái tổ hợp với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. 1-4: các plasmid số 1-4 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Phụ lục 5. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE/1a-pII



Màu xanh lá: Promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV); Màu đỏ nâu: LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa; Màu xanh da trời: COE/G1a; Màu hồng: isoleucine zipper, GCN4pII; Màu vàng: đuôi 6xHis; Màu cam: đuôi c-myc; Màu đỏ: KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt.

Phụ lục 6. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE/1a-pII



Vùng gen từ vị trí *Hin*dIII (6465) đến vị trí *Hin*dIII (5296) chứa cassette biểu hiện bao gồm promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV): màu xanh lá; LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa: màu đỏ nâu; COE/G1a: màu xanh da trời; isoleucine zipper, GCN4pII: màu hồng; đuôi 6xHis: màu vàng; đuôi c-myc: Màu cam; KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt: màu đỏ.

OriV: điểm khởi đầu sao chép; nptII: gen kháng kháng sinh kanamycin; TrfA: mã hóa protein khởi đầu sao chép, cần thiết cho hoạt động của OriV; RB: right bolder: vùng biên giới bên phải; Nos promoter: promoter của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; nptIII: gen kháng kanamycin; Ter Nos: terminator của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; LacZ: mã hóa enzyme phân cắt đường lactose thành đường đơn.

Phụ lục 7. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G1a

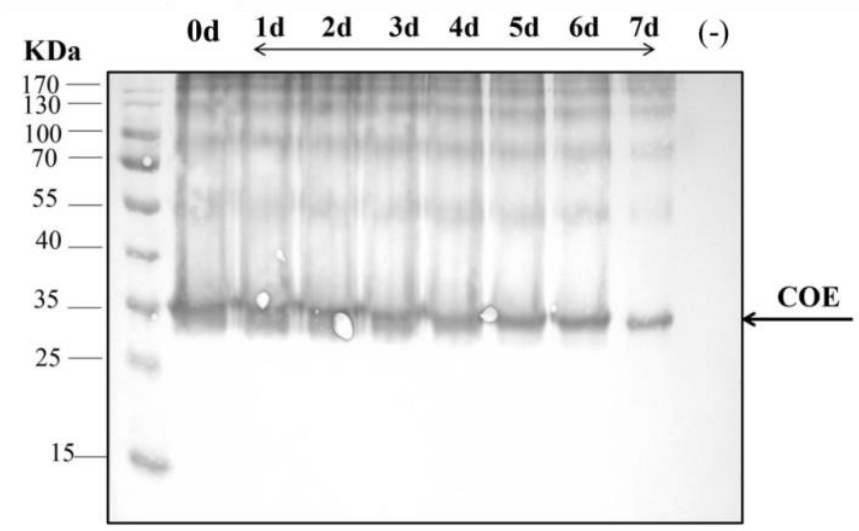
STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
1 V -		37 G -		72 P -		107 E -	
2 T G	1	38 F -		73 F -		108 F -	
3 L -		39 S G	7	74 T G	14	109 G -	
4 P -		40 S n		75 L -		110 S n	
5 S G	2	41 F -		76 Q -		111 G -	
6 F -		42 C -		77 S n		112 V -	
7 N G	3	43 V -		78 V -		113 K -	
8 D -		44 D -		79 N G	15	114 F -	
9 H -		45 T G	8	80 D -		115 T n	
10 S n		46 R -		81 Y -		116 S G	16
11 F -		47 Q -		82 L -		117 L -	
12 V -		48 F -		83 S n		118 Y -	
13 N G	4	49 T n		84 F -		119 F -	
14 I -		50 I -		85 S n		120 Q -	
15 T n		51 T n		86 K -		121 F -	
16 V -		52 L -		87 F -		122 T n	
17 S n		53 F -		88 C -		123 K -	
18 A -		54 Y -		89 V -		124 G -	
19 A -		55 N G	9	90 S n		125 E -	
20 F -		56 V -		91 T n		126 L -	
21 G -		57 T G	10	92 S n		127 I -	
22 G -		58 N G	11	93 L -		128 T G	17
23 H -		59 S G	12	94 L -		129 G -	
24 S n		60 Y -		95 A -		130 T n	
25 G -		61 G -		96 G -		131 P -	
26 A -		62 Y -		97 A -		132 K -	
27 N n		63 V -		98 C -		133 P -	
28 L -		64 S n		99 T n		134 L -	
29 I -		65 K -		100 I -		135 Q -	
30 A -		66 S n		101 D -		136 G -	
31 S n		67 Q -		102 L -		137 V -	
32 D -		68 D -		103 F -		138 T G	18
33 T n		69 S n		104 G -		139 D -	
34 T G	5	70 N G	13	105 Y -		140 V -	

35 I -		71 C -		106 P -			

"G" = Glycosyl hóa; "n" = Không được glycosyl hóa; "-" = Khác

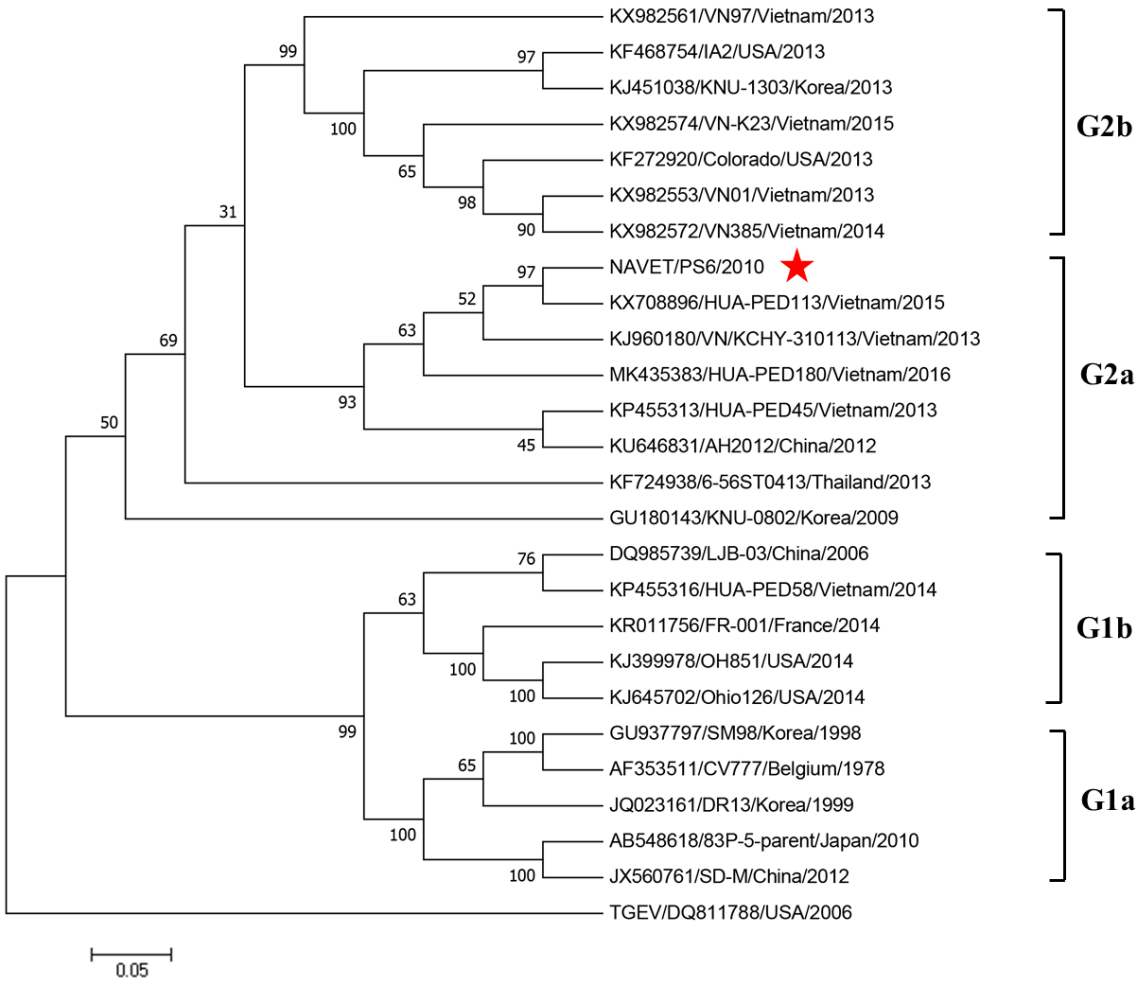
Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G1a được thực hiện sử dụng công cụ dự đoán GPP của nhóm tác giả [152] Đại học Nottingham.

Phụ lục 8. Western blot phát hiện hàm lượng COE/G1a-pII trong dịch chiết thô trước và sau khi bảo quản ở 4°C sử dụng kháng thể kháng c-myc



0d: dịch chiết thô trước khi bảo quản; 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d: Dịch chiết thô được bảo quản trong 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày và 7 ngày. Protein hòa tan tổng số (11 µg) được phân tách trên 4-12% SDS-PAGE

Phụ lục 9. Cây phả hệ được xây dựng từ trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S



Cây phả hệ được xây dựng bằng phần mềm MEGA-X, phương pháp Neighbor joining với bootstrap 1000. Dấu sao đỏ thể hiện trình tự PEDV chủng NAVET/PS6/2010. Chủng TGEV được sử dụng làm nhóm ngoài.

Phụ lục 10. So sánh trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010

```
                               10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
COE-G2a-NAVET-PS6-2010 GTTACTTTGCCATCATTTAATGATCATTCTTTTGTTAATATTACTGTCTCTGCTGCTTTTGGTGGTCATAGTGGTGCCAACCTTATTGCATCTGACACTA
COE-G1a-DR13           .................C...................................G.............................C................

                              110       120       130       140       150       160       170       180       190       200
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
COE-G2a-NAVET-PS6-2010 CTATCAATGGGTTTAGTTCTTTCTGTGTTGACACTAGACAATTTACCATTTCACTGTTTTATAACGTTACAAACAGTTATGGTTATGTGTCTAAATCACA
COE-G1a-DR13           ..................................................A...........................................G.....

                              210       220       230       240       250       260       270       280       290       300
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
COE-G2a-NAVET-PS6-2010 AGACAGTAATTGCCCTTTTACCTTGCAATCTGTTAATGATTACCTGTCTTTTAGCAAATTTTGTGTTTCTACCAGCCTTTTGGCTAGTGCCTGTACCATA
COE-G1a-DR13           G..T..............C..................................................A...............G....T.........

                              310       320       330       340       350       360       370       380       390       400
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
COE-G2a-NAVET-PS6-2010 GATCTTTTTGGTTACCCTGAGTTTGGTAGTAGTGTTAAGTTTACGTCCCTCTACTTTCAATTCACAAAGGGTGAGTTGATTACTGGCACGCCTAAACCAT
COE-G1a-DR13           .......................C......G...................T..T.............................................C

                              410       420
                       ....|....|....|....|
COE-G2a-NAVET-PS6-2010 TTGAAGGTGTTACGGACGTT
COE-G1a-DR13           ..C.......C.........
```

Phụ lục 11. Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự nucleotit của gen mã hóa protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao

Phần trăm tương đồng (hàng trên) / **Phần trăm khác biệt** (cột trái)

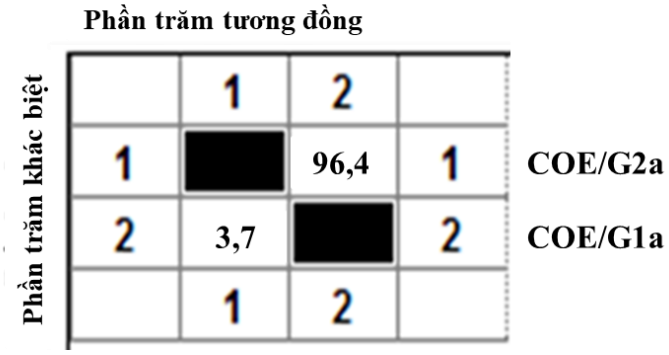
	1	2		
1		95,7	1	COE/G2a
2	4,4		2	COE/G1a
	1	2		

Phụ lục 12. So sánh trình tự axit amin của protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự axit amin của protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010

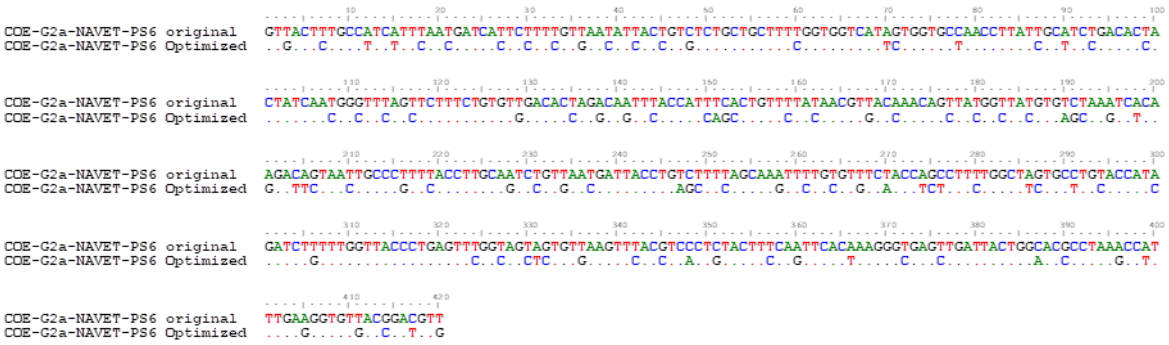
```
                               10        20        30        40        50        60        70        80        90       100
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
COE-G2a-NAVET-PS6-2010 VTLPSFNDHSFVNITVSAAFGGHSGANLIASDTTINGFSSFCVDTRQFTISLFYNVTNSYGYVSKSQDSNCPFTLQSVNDYLSFSKFCVSTSLLASACTI
COE-G1a-DR13           ..................................................T.............................................G....

                              110       120       130       140
                       ....|....|....|....|....|....|....|....|
COE-G2a-NAVET-PS6-2010 DLFGYPEFGSSVKFTSLYFQFTKGELITGTPKPFEGVTDV
COE-G1a-DR13           ..........G......................LQ.....
```

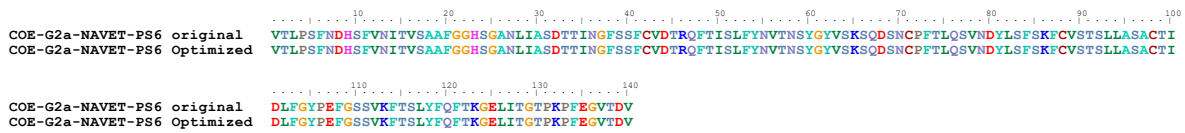
Phụ lục 13. Mức độ tương đồng trong trình tự axit amin của protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự axit amin của protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao



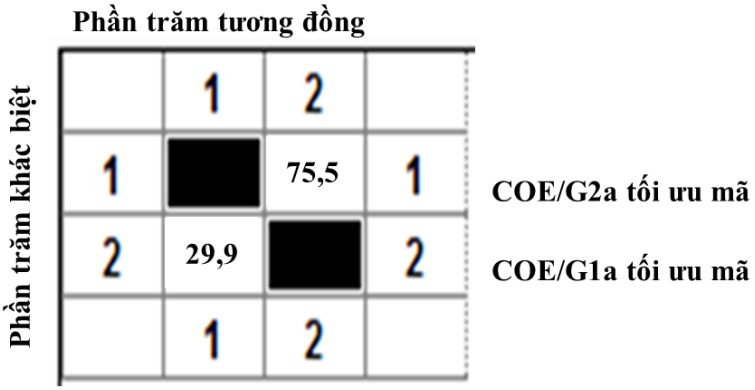
Phụ lục 14. So sánh trình tự nucleotide của COE/G2a của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật



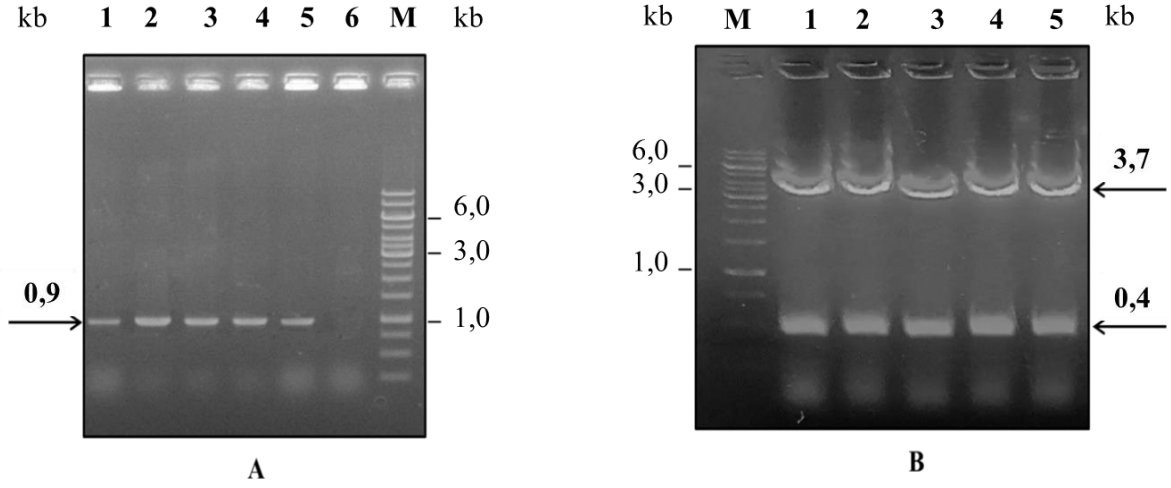
Phụ lục 15. So sánh trình tự axit amin của COE/G2a của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 trước và sau khi tối ưu mã biểu hiện ở thực vật bằng



Phụ lục 16. Mức độ tương đồng trong trình tự nucleotit sau khi tối ưu mã biểu hiện ở cây thuốc lá *N. benthamiana* của gen mã hóa protein COE/G1a từ chủng PEDV DR13 nhược độc và trình tự nucleotit sau khi tối ưu mã biểu hiện ở cây thuốc lá *N. benthamiana* của gen mã hóa protein COE/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao

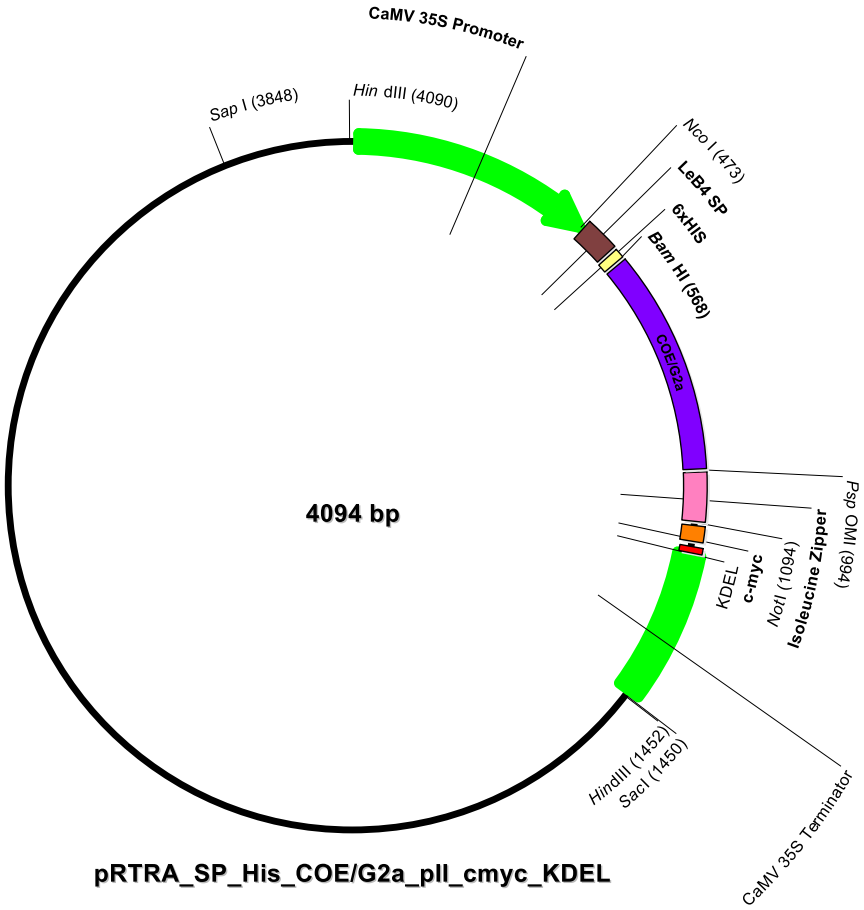


Phụ lục 17. Kết quả thiết kế vector tách dòng pRTRA-COE/G2a-pII



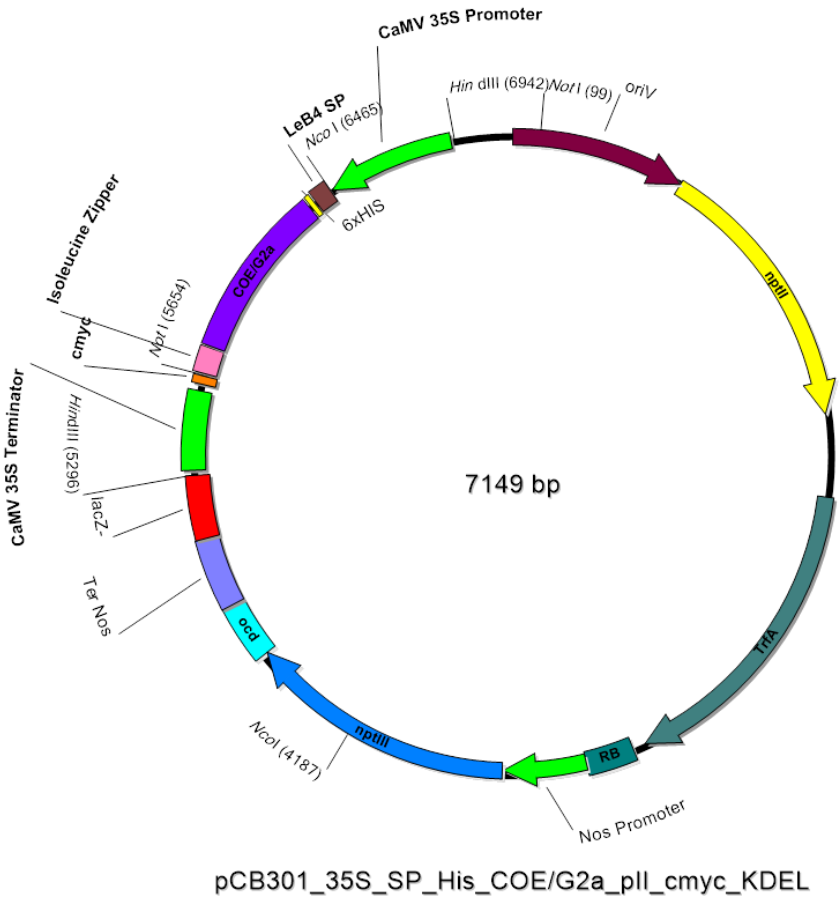
A. Kết quả colony-PCR sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-6: các khuẩn lạc số 1-6 được kiểm tra; B. Điện di sản phẩm cắt plasmid pRTRA tái tổ hợp với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. 1-5: các plasmid số 1-5 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Phụ lục 18. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE/2a-pII



Màu xanh lá: Promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV); Màu đỏ nâu: LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa; Màu tím: COE/G2a; Màu hồng: isoleucine zipper, GCN4pII; Màu vàng: đuôi 6xHis; Màu cam: đuôi c-myc; Màu đỏ: KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt.

Phụ lục 19. Sơ đồ vector biển hiện pCB301-COE/G2a-pII



Vùng gen từ vị trí *Hin*dIII (6942) đến vị trí *Hin*dIII (5296) chứa cassette biểu hiện bao gồm promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV): màu xanh lá; LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa: màu đỏ nâu; COE/G2a: màu tím; isoleucine zipper, GCN4pII: màu hồng; đuôi 6xHis: màu vàng; đuôi c-myc: Màu cam; KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt: màu đỏ.

OriV: điểm khởi đầu sao chép; nptII: gen kháng kháng sinh kanamycin; TrfA: mã hóa protein khởi đầu sao chép, cần thiết cho hoạt động của OriV; RB: right bolder: vùng biên giới bên phải; Nos promoter: promoter của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; nptIII: gen kháng kanamycin; Ter Nos: terminator của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; LacZ: mã hóa enzyme phân cắt đường lactose thành đường đơn.

Phụ lục 20. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G2a

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
1 V -		33 T n		65 K -		107 E -	
2 T G	1	34 T G	5	66 S n		108 F -	
3 L -		35 I -		67 Q -		109 G -	
4 P -		36 NG	6	68 D -		110 S n	
5 S G	2	37 G -		69 S n		111 Sn	
6 F -		38 F -		70 N G	13	112 V -	
7 N G	3	39 S G	7	71 C -		113 K -	
8 D -		40 S n		79 N G	14	114 F -	
9 H -		41 F -		80 D -		115 T G	16
10 S n		42 C -		81 Y -		116 S G	17
11 F -		43 V -		82 L -		117 L -	
12 V -		44 D -		83 S n		118 Y -	
13 N G	4	45 T N		84 F -		119 F -	
14 I -		46 R -		85 S n		120 Q -	
15 T n		47 Q -		86 K -		121 F -	
16 V -		48 F -		87 F -		122 T n	
17 S n		49 T n		88 C -		123 K -	
18 A -		50 I -		89 V -		124 G -	
19 A -		51 S G	8	90 S n		125 E -	
20 F -		52 L -		91 T n		126 L -	
21 G -		53 F -		92 S n		127 I -	
22 G -		54 Y -		93 L -		128 T G	18
23 H -		55 N G	9	94 L -		129 G -	
24 S n		56 V -		95 A -		130 T n	
25 G -		57 T G	10	96 SG	15	131 P -	
26 A -		58 N n		97 A -		132 K -	
27 N n		59 S G	11	98 C -		133 P -	
28 L -		60 Y -		99 T n		134 F -	
29 I -		61 G -		100 I -		135 E -	
30 A -		62 Y -		101 D -		136 G -	
31 S n		63 V -		102 L -		137 V -	
32 D -		64 S n		103 F -		138 T G	19
33 T n		69 S n		104 G -		139 D -	
34 T G	5	70 N G	12	105 Y -		140 V -	

35 I -		71 C -		106 P -			

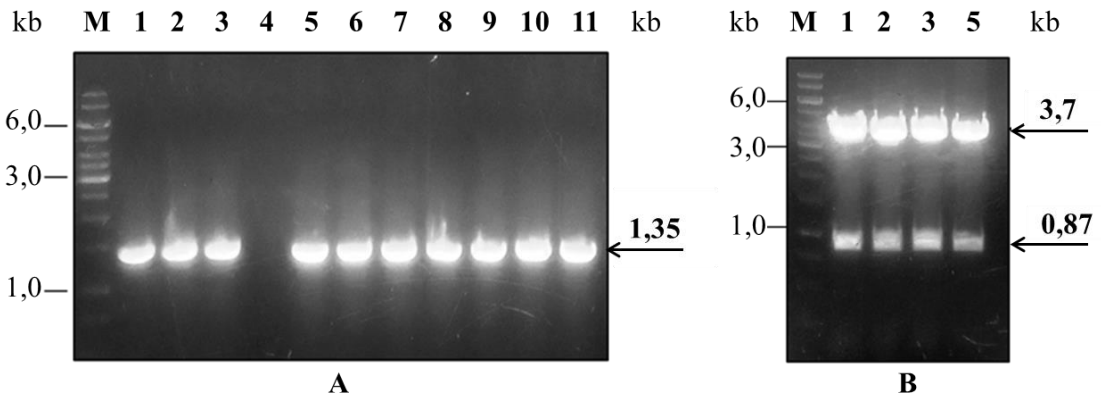
"G" = Glycosyl hóa; "n" = Không được glycosyl hóa; "-" = Khác

Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE/G2a được thực hiện sử dụng công cụ dự đoán GPP của nhóm tác giả [152] Đại học Nottingham.

Phụ lục 21. Trình tự nucleotit của đoạn gen mã hóa protein COE-S1D của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010

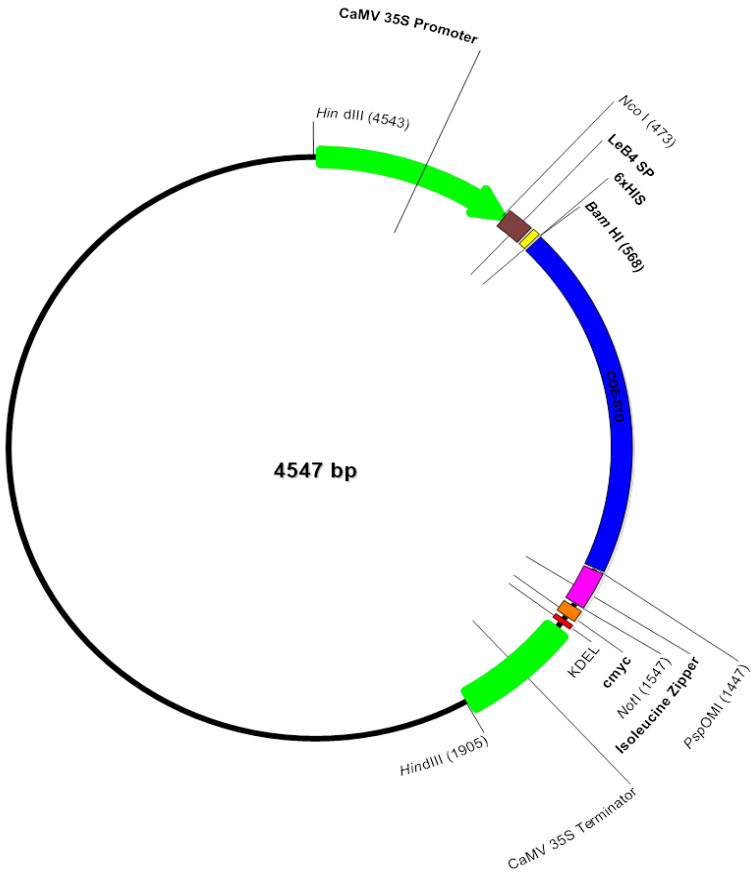
```
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  ACTTCTTTTGTTACTTTGCCATCATTTAATGATCATTCTTTTGTTAATATTACTGTCTCTGCTGCTTTTGGTGGTCATAGTGGTGCCAACCTCATTGCAT
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  CTGACACTACTATTAATGGGTTTAGTTCTTTCTGTGTTGACACTAGACAATTTACCATTACACTGTTTTATAACGTTACAAACAGTTATGGTTATGTGTC
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  TAAATCACAGGATAGTAATTGCCCTTTCACCTTGCAATCTGTTAATGATTACCTGTCTTTTAGCAAATTTTGTGTTTCTACCAGCTTTTTGGCTAGTGCT
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  TGTACCATAGATCTTTTTGGTTACCCTGAGTTTGGTAGTGGTGTTAAGTTCACGTCCCTTTACTTTCAATTCACAAAGGGTGAGTTGATTCTTGGCACGC
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  CTAAACCACTTGAAGGTGTTACGGACGTTTCTTTTATGACTCTGGATGTGTGTACCAAGTATACTATCTATGGCTTTAAAGGTGAGGGTATCATTACCCT
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  TACAAATTCTAGCTTTTTGGCAGGTGTTTATTATACATCTGATTCTGGACAGTTGTTAGCTTTTAAGAATGTCACTAGTGGTGCTGTTTATTCTGTCACG
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  CCGTGTTCTTTTTCAGAGCAGGCTGCATATGTTGATGATGATATAGTGGGTGTTATTTCTAGTTTGTCTAGCTCCACTTTTAACAGTACTAGGGAGTTGC
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  CTGGTTTCTTCTACCATTCTAATGATGGCTCTAATTGTACAGAGCCTGTGTTGGTGTATAGTAACATAGGTGTTTGTAAATCTGGCAGTATTGGCTATGT
COE-S1D/PEDV/NAVET/PS6/2010  CCCATCTCAGTCTGGCCAAGTCAAGATTGCACCCACGGTTACTGGGAATATTAGTATTCCCACCAACTTTAGT
```

Phụ lục 22. Kết quả thiết kế vector tách dòng mang gen mã hóa protein COE-S1D/G2a-pII



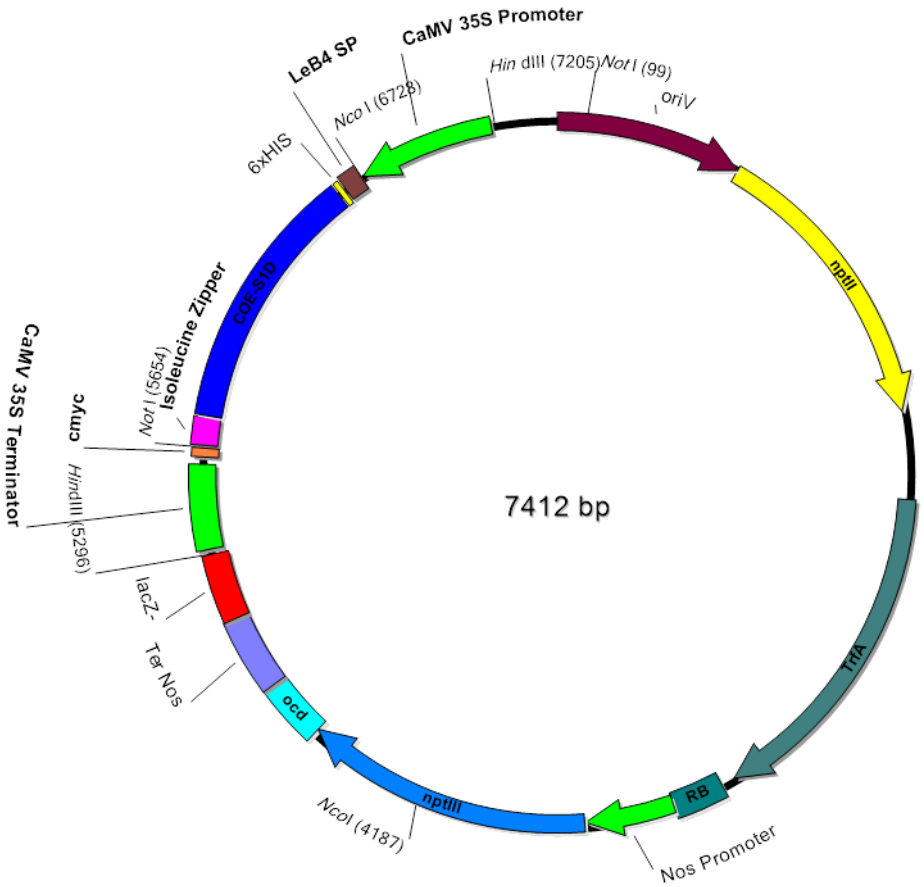
A. Kết quả colony-PCR chọn lọc các dòng khuẩn lạc mang gen mã hóa COE-S1D/G2a-pII cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-11: các khuẩn lạc số 1-11 được kiểm tra; B. Kết quả điện di sản phẩm cắt các plasmid với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. 1-5: các plasmid số 1-5 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Phụ lục 23. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE-S1D/G2a-pII



Màu xanh lá: Promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV); Màu đỏ nâu: LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa; Màu xanh nước biển: COE-S1D/G2a; Màu hồng: isoleucine zipper, GCN4pII; Màu vàng: đuôi 6xHis; Màu cam: đuôi c-myc; Màu đỏ: KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt.

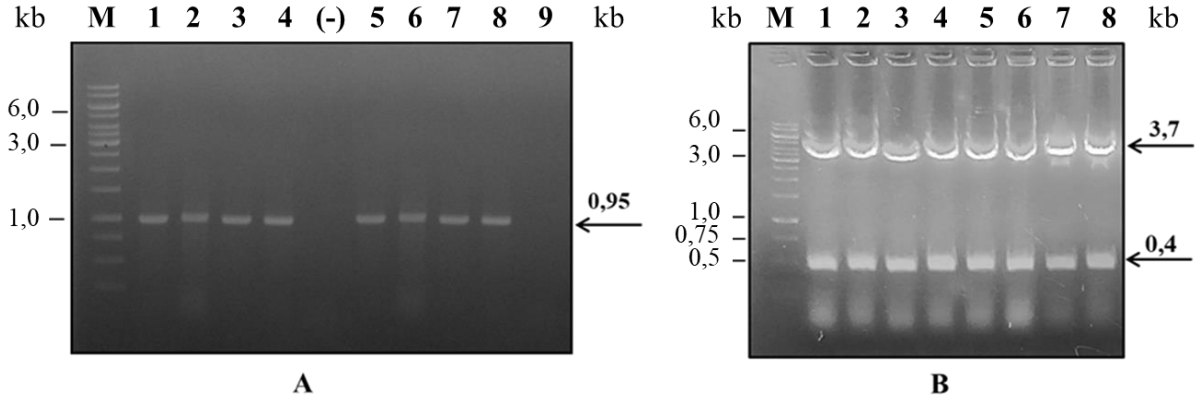
Phụ lục 24. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE-S1D/G2a-pII



Vùng gen từ vị trí *Hin*dIII (7205) đến vị trí *Hin*dIII (5296) chứa cassette biểu hiện bao gồm promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV): màu xanh lá; LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa: màu đỏ nâu; COE-S1D/G2a: màu xanh nước biển; isoleucine zipper, GCN4pII: màu hồng; đuôi 6xHis: màu vàng; đuôi c-myc: Màu cam; KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt: màu đỏ.

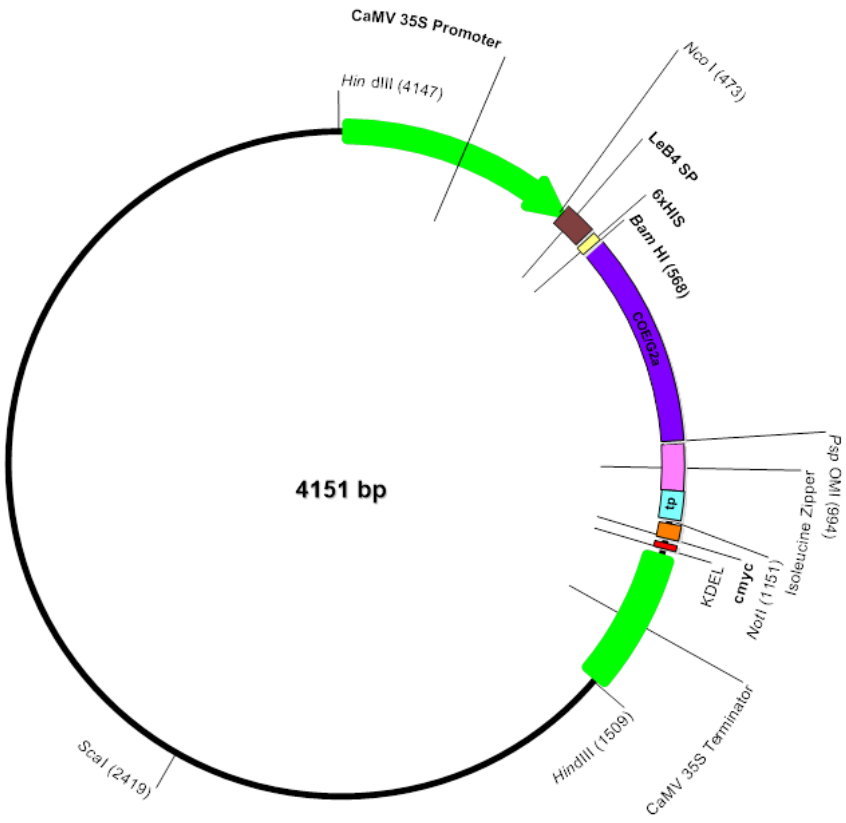
OriV: điểm khởi đầu sao chép; nptII: gen kháng kháng sinh kanamycin; TrfA: mã hóa protein khởi đầu sao chép, cần thiết cho hoạt động của OriV; RB: right bolder: vùng biên giới bên phải; Nos promoter: promoter của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; nptIII: gen kháng kanamycin; Ter Nos: terminator của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; LacZ: mã hóa enzyme phân cắt đường lactose thành đường đơn.

Phụ lục 25. Kết quả thiết kế vector tách dòng chứa gen mã hóa kháng nguyên COE/G2a-pII-tp



A.Kết quả colony-PCR chọn lọc các dòng khuẩn lạc mang gen mã hóa COE/G2a-pII-tp sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-9: các khuẩn lạc số 1-9 được kiểm tra; B. Điện di sản phẩm cắt plasmid pRTRA tái tổ hợp với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. 1-6: các plasmid số 1-6 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).(-): đối chứng âm

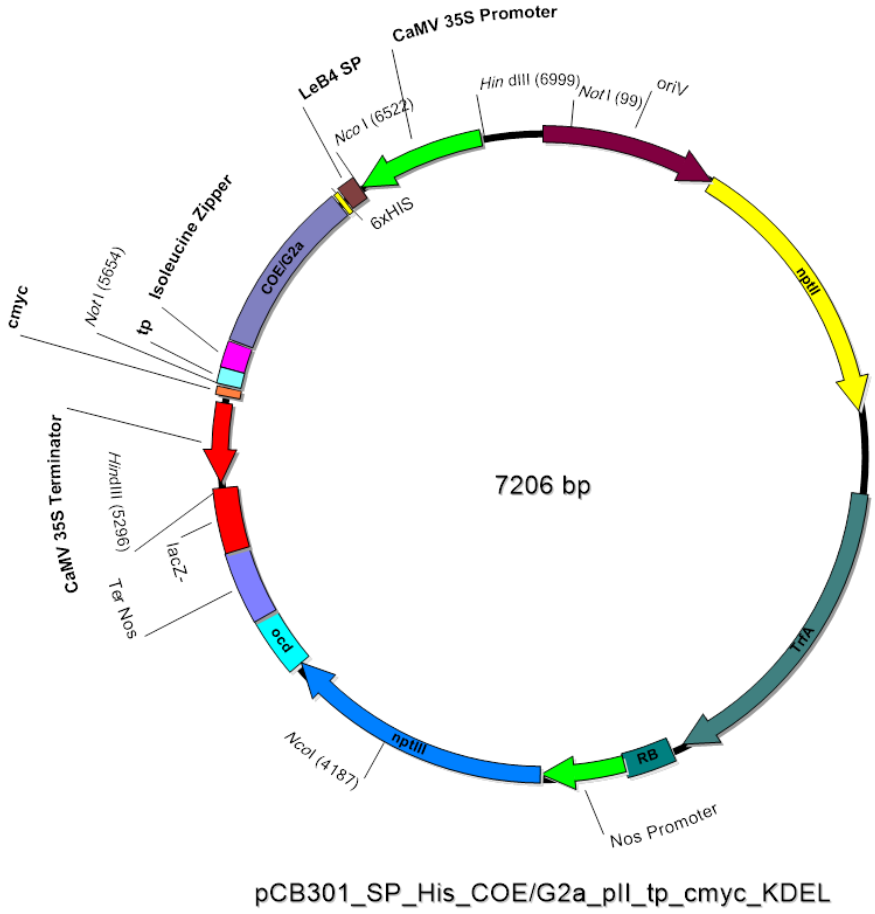
Phụ lục 26. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-COE/2a-pII-tp



pRTRA_SP_His_COE/G2a_pII_tp_cmyc_KDEL

Màu xanh lá: Promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV); Màu đỏ nâu: LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa; Màu tím: COE/G2a; Màu hồng: isoleucine zipper, GCN4pII; tp: màu xanh da trời; Màu vàng: đuôi 6xHis; Màu cam: đuôi c-myc; Màu đỏ: KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt.

Phụ lục 27. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-COE/2a-pII-tp

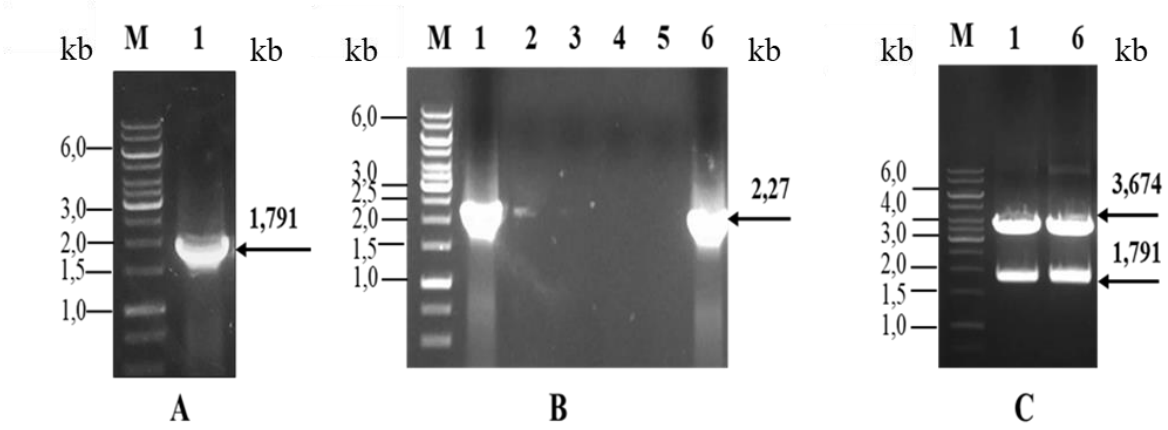


Vùng gen từ vị trí *Hin*dIII (6999) đến vị trí *Hin*dIII (5296) chứa cassette biểu hiện bao gồm promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV): màu xanh lá; LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa: màu đỏ nâu; COE/G2a: màu tím; isoleucine zipper, GCN4pII: màu hồng; đuôi 6xHis: màu vàng; đuôi c-myc: Màu cam; KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt: màu đỏ.

OriV: điểm khởi đầu sao chép; nptII: gen kháng kháng sinh kanamycin; TrfA: mã hóa protein khởi đầu sao chép, cần thiết cho hoạt động của OriV; RB: right bolder: vùng biên giới bên phải; Nos promoter: promoter của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; nptIII: gen kháng kanamycin; Ter Nos: terminator của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; LacZ: mã hóa enzyme phân cắt đường lactose thành đường đơn.

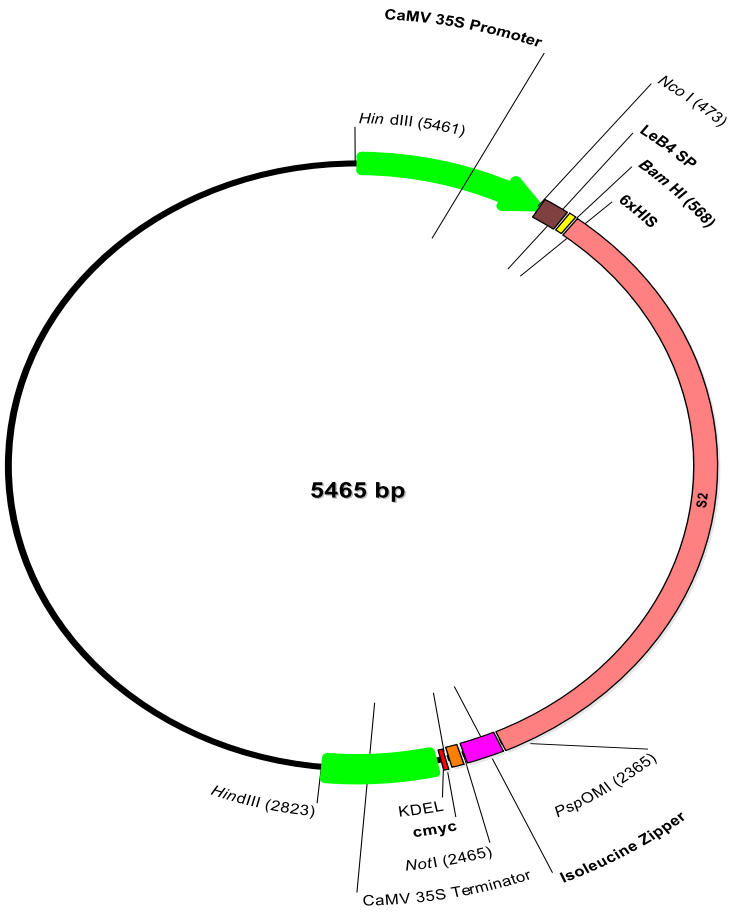
Phụ lục 28. Trình tự nucleotit của gen mã hóa protein S2/G2a từ chủng NAVET/PEDV/PS6/2010

Phụ lục 29. Kết quả thiết kế vector tách dòng mang gen mã hóa protein S2/G2a-pII



Khuếch đại đoạn gen mã hóa protein S2/G2a bằng PCR. B. Kết quả colony-PCR sử dụng cặp mồi 35S-SQF và 35S-Term-R. 1-6: các khuẩn lạc số 1-6 được kiểm tra; C. Điện di sản phẩm cắt plasmid pRTRA tái tổ hợp với enzyme *Bam*HI và *Psp*OMI. 1, 6: các plasmid số 1, 6 được kiểm tra. Marker: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

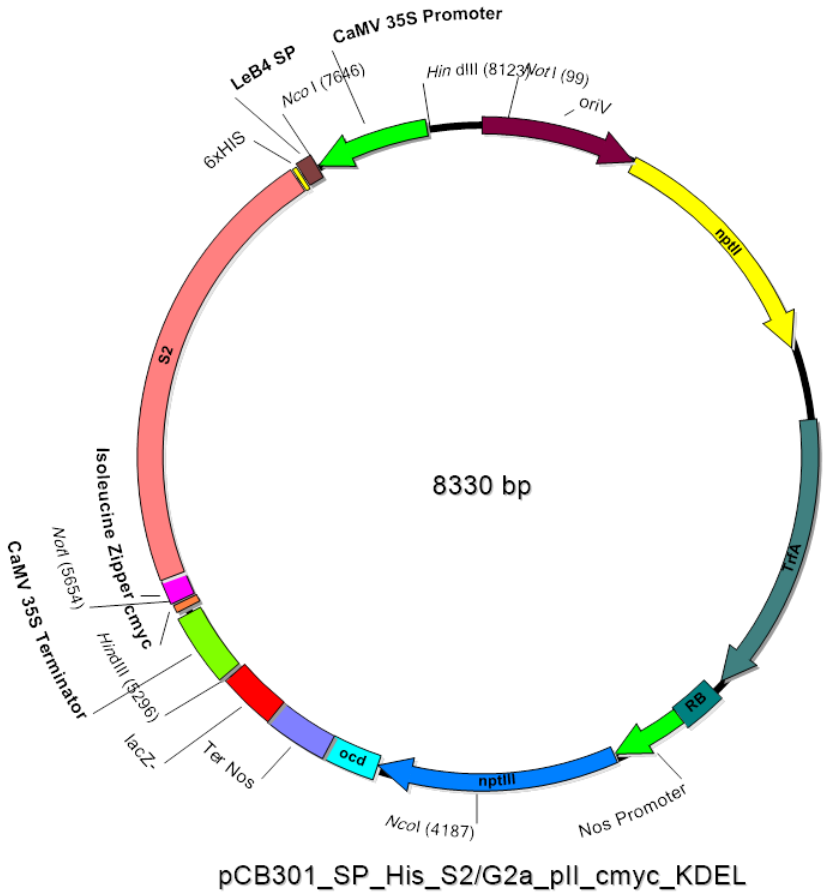
Phụ lục 30. Sơ đồ vector tách dòng pRTRA-S2/G2a-pII



pRTRA_SP_His_S2/G2a_pII_cmyc_KDEL

Màu xanh lá: Promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV); Màu đỏ nâu: LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa; Màu hồng cam: S2/G2a; Màu hồng: isoleucine zipper, GCN4pII; Màu vàng: đuôi 6xHis; Màu cam: đuôi c-myc; Màu đỏ: KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt.

Phụ lục 31. Sơ đồ vector biểu hiện pCB301-S2/G2a-pII



Vùng gen từ vị trí *Hin*dIII (8123) đến vị trí *Hin*dIII (5296) chứa cassette biểu hiện bao gồm promoter và terminator 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV): màu xanh lá; LeB4 SP, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa: màu đỏ nâu; S2/G2a: màu hồng cam; isoleucine zipper, GCN4pII: màu hồng; đuôi 6xHis: màu vàng; đuôi c-myc: Màu cam; KDEL, peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt: màu đỏ.

OriV: điểm khởi đầu sao chép; nptII: gen kháng kháng sinh kanamycin; TrfA: mã hóa protein khởi đầu sao chép, cần thiết cho hoạt động của OriV; RB: right bolder: vùng biên giới bên phải; Nos promoter: promoter của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; nptIII: gen kháng kanamycin; Ter Nos: terminator của vi khuẩn, chịu trách nhiệm sinh tổng hợp nopaline; LacZ: mã hóa enzyme phân cắt đường lactose thành đường đơn.

Phụ lục 32. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE-S1D/G2a

STT axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
1 V -		35 I -		69 S n		103 F -	
2 T G	1	36 N G	6	70 N G	13	104 G -	
3 L -		37 G -		71 C -		105 Y -	
4 P -		38 F -		72 P -		106 P -	
5 S G	2	39 S G	7	73 F -		107 E -	
6 F -		40 S n		74 T G	14	108 F -	
7 N G	3	41 F -		75 L -		109 G -	
8 D -		42 C -		76 Q -		110 S n	
9 H -		43 V -		77 S n		111 G -	
10 S n		44 D -		78 V -		112 V -	
11 F -		45 T G	8	79 N G	15	113 K -	
12 V -		46 R -		80 D -		114 F -	
13 N G	4	47 Q -		81 Y -		115 T n	
14 I -		48 F -		82 L -		116 S G	17
15 T n		49 T n		83 S n		117 L -	
16 V -		50 I -		84 F -		118 Y -	
17 S n		51 T n		85 S n		119 F -	
18 A -		52 L -		86 K -		120 Q -	
19 A -		53 F -		87 F -		121 F -	
20 F -		54 Y -		88 C -		122 T n	
21 G -		55 N G	9	89 V -		123 K -	
22 G -		56 V -		90 S n		124 G -	
23 H -		57 T G	10	91 T n		125 E -	
24 S n		58 N G	11	92 S n		126 L -	
25 G -		59 S G	12	93 F -		127 I -	
26 A -		60 Y -		94 L -		128 L -	
27 N n		61 G -		95 A -		129 G -	
28 L -		62 Y -		96 S G	16	130 T G	18
29 I -		63 V -		97 A -		131 P -	
30 A -		64 S n		98 C -		132 K -	
31 S n		65 K -		99 T n		133 P -	
32 D -		66 S n		100 I -		134 L -	
33 T n		67 Q -		101 D -		135 E -	
34 T G	5	68 D -		102 L -		136 G -	

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
136 G -		155 G -		193 V -		231 P -	
137 V -		156 F -		194 Y -		232 G -	
138 T G	19	157 K -		195 S G	24	233 F -	
139 D -		158 G -		196 V -		234 F -	
140 V -		159 E -		197 T n		235 Y -	
141 S G	20	160 G -		198 P -		236 H -	
142 F -		161 I -		199 C -		237 S n	
143 M -		162 I -		200 S G	25	238 N n	
144 T n		163 T n		201 F -		239 D -	
145 L -		164 L -		202 S n		240 G -	
146 D -		165 T n		203 E -		241 S n	
147 V -		166 N G	22	204 Q -		242 N G	32
148 C -		167 S n		205 A -		243 C -	
149 T G	21	168 S n		206 A -		244 T G	
150 K -		169 F -		207 Y -		245 E -	
151 Y -		170 L -		208 V -		246 P -	
152 T n		171 A -		209 D -		247 V -	
153 I -		172 G -		210 D -		248 L -	
154 Y -		173 V -		211 D -		249 V -	
136 G -		174 Y -		212 I -		250 Y -	
137 V -		175 Y -		213 V -		251 S G	33
138 T G	19	176 T n		214 G -		252 N n	
139 D -		177 S n		215 V -		253 I -	
140 V -		178 D -		216 I -		254 G -	
141 S G	20	179 S n		217 S G	26	255 V -	
142 F -		180 G -		218 S n		256 C -	
143 M -		181 Q -		219 L -		257 K -	
144 T n		182 L -		220 S G	27	258 S n	
145 L -		183 L -		221 S n		259 G -	
146 D -		184 A -		222 S n		260 S n	
147 V -		185 F -		223 T G	28	261 I -	
148 C -		186 K -		224 F -		262 G -	
149 T G	21	187 N G	23	225 N G	29	263 Y -	
150 K -		188 V -		226 S G	30	264 V -	
151 Y -		189 T n		227 T G	31	265 P -	
152 T n		190 S n		228 R -		266 S G	34
153 I -		191 G -		229 E -		267 Q -	
154 Y -		192 A -		230 L -		268 S n	

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
269 G -		274 A -		279 G -		284 P -	
270 Q -		275 P -		280 N G	35	285 T G	37
271 V -		276 T n		281 I -		286 N G	38
272 K -		277 V -		282 S G	36	287 F -	
273 I -		278 T n		283 I -		288 S G	39

"G" = Glycosyl hóa; "n" = Không được glycosyl hóa; "-" = Khác

Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein COE-S1D/G2a được thực hiện sử dụng công cụ dự đoán GPP của nhóm tác giả [152] Đại học Nottingham

Phụ lục 33. Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein S2/G2a

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
1 E -		34 G -		67 Y -		100 A -	
2 L -		35 Y -		68 L -		101 C -	
3 P -		36 V -		69 Q -		102 K -	
4 G -		37 P -		70 L -		103 T G	14
5 F -		38 S G	4	71 Y -		104 I -	
6 F -		39 Q -		72 N n		105 E -	
7 Y -		40 S n		73 T n		106 S G	15
8 H -		41 G -		74 P -		107 A -	
9 S n		42 Q -		75 V -		108 L -	
10 N n		43 V -		76 S n		109 Q -	
11 D -		44 K -		77 V -		110 L -	
12 G -		45 I -		78 D -		111 S G	16
13 S n		46 A -		79 C -		112 A -	
14 N G	1	47 P -		80 A -		113 R -	
15 C -		48 T n		81 T n		114 L -	
16 T G	2	49 V -		82 Y -		115 E -	
17 E -		50 T G	5	83 V -		116 S n	
18 P -		51 G -		84 C -		117 A -	
19 V -		52 N G	6	85 N G	13	118 E -	
20 L -		53 I -		86 G -		119 V -	
21 V -		54 S G	7	87 N n		120 N n	
22 Y -		55 I -		88 S n		121 S G	17
23 S G	3	56 P -		89 R -		122 M -	
24 N n		57 T G	8	90 C -		123 L -	
25 I -		58 N G	9	91 K -		124 T n	
26 G -		59 F -		92 Q -		125 I -	
27 V -		60 S G	10	93 L -		126 S n	
28 C -		61 M -		94 L -		127 E -	
29 K -		62 S G	11	95 T n		128 E -	
30 S n		63 I -		96 Q -		129 A -	
31 G -		64 R -		97 Y -		130 L -	
32 S n		65 T G	12	98 T n		131 Q -	
33 I -		66 E -		99 A -		132 L -	

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
133 A -		171 L -		209 V -		247 Y -	
134 T n		172 L -		210 M -		248 A -	
135 I -		173 F -		211 V -		249 V -	
136 S G	18	174 N n		212 L -		250 Q -	
137 S n		175 K -		213 P -		251 A -	
138 F -		176 V -		214 G -		252 R -	
139 N G	19	177 V -		215 V -		253 L -	
140 G -		178 T n		216 V -		254 N n	
141 D -		179 N n		217 D -		255 Y -	
142 G -		180 G -		218 A -		256 L -	
143 Y -		181 L -		219 E -		257 A -	
144 N G	20	182 G -		220 K -		258 L -	
145 F -		183 T G	23	221 L -		259 Q -	
146 T n		184 V -		222 H -		260 T n	
147 N n		185 D -		223 M -		261 D -	
148 V -		186 E -		224 Y -		262 V -	
149 L -		187 D -		225 S G	25	263 L -	
150 G -		188 Y -		226 A -		264 Q -	
151 V -		189 K -		227 S n		265 R -	
152 S G	21	190 R -		228 L -		266 N G	27
153 V -		191 C -		229 I -		267 Q -	
154 Y -		192 S n		230 G -		268 Q -	
155 D -		193 N n		231 G -		269 L -	
156 P -		194 G -		232 M -		270 L -	
157 A -		195 R -		233 V -		271 A -	
158 S G	22	196 S n		234 L -		272 E -	
159 G -		197 V -		235 G -		273 S G	28
160 R -		198 A -		236 G -		274 F -	
161 V -		199 D -		237 F -		275 N n	
162 V -		200 L -		238 T G	26	276 S G	
163 Q -		201 V -		239 A -		277 A -	
164 K -		202 C -		240 A -		278 I -	
165 R -		203 A -		241 A -		279 G -	
166 S n		204 Q -		242 A -		280 N G	29
167 F -		205 Y -		243 L -		281 I -	
168 I -		206 Y -		244 P -		282 T G	30
169 E -		207 S G	24	245 F -		283 S G	31
170 D -		208 G -		246 S n		284 A -	

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
285 F -		321 T n		357 L -		394 V -	
286 E -		322 Q -		358 I -		395 K -	
287 S n		323 L -		359 T n		396 S n	
288 V -		324 T n		360 G -		397 Q -	
289 K -		325 V -		361 R -		398 S G	43
290 E -		326 Q -		362 L -		399 Q -	
291 A -		327 L -		363 S n		400 R -	
292 I -		328 Q -		364 A -		401 Y -	
293 S G	32	329 H -		365 L -		402 G -	
294 Q -		330 N G	36	366 N n		403 F -	
295 T G	33	331 F -		367 A -		404 C -	
296 S n		332 Q -		368 F -		405 G -	
297 K -		333 A -		369 V -		406 G -	
298 G -		334 I -		370 A -		407 D -	
299 L -		335 S G	37	371 Q -		408 G -	
300 N n		336 S G	38	372 T n		409 E -	
301 T G	34	337 S G	39	373 L -		410 H -	
302 V -		338 I -		374 T n		411 I -	
303 A -		339 D -		375 K -		412 F -	
304 H -		340 D -		376 Y -		413 S G	44
305 A -		341 I -		377 T n		414 L -	
306 L -		342 Y -		379 V -		415 V -	
307 T n		343 S G	40	380 Q -		416 Q -	
308 K -		344 R -		381 A -		417 A -	
309 V -		345 L -		382 S n		418 A -	
310 Q -		346 D -		383 R -		419 P -	
311 E -		347 I -		384 K -		420 Q -	
312 V -		348 L -		385 L -		421 G -	
313 V -		349 S G	41	386 A -		422 L -	
314 N G	35	350 A -		387 Q -		423 L -	
315 S n		351 D -		388 Q -		424 F -	
316 Q -		352 V -		389 K -		425 L -	
317 G -		353 Q -		390 V -		426 H -	
318 A -		354 V -		391 N G	42	427 T n	
319 A -		355 D -		392 E -		428 V -	
320 L -		356 R -		393 C -		429 L -	

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
430 V -		468 T n		509 P -		547 L -	
431 P -		469 A -		510 E -		548 N G	58
432 G -		470 T G	46	511 V -		549 L -	
433 D -		471 E -		512 I -		550 T G	59
434 F -		472 Y -		513 P -		551 G -	
435 V -		473 F -		514 D -		552 E -	
436 N G	45	474 V -		515 Y -		553 I -	
437 V -		475 S G	47	516 I -		554 A -	
438 S n		476 S n		517 D -		555 D -	
439 A -		477 R -		518 V -		556 L -	
440 I -		478 R -		519 N G	51	557 E -	
441 A -		479 M -		520 K -		558 Q -	
442 G -		480 Y -		521 T G	52	559 R -	
443 L -		481 E -		522 L -		560 S G	60
444 C -		482 P -		523 D -		561 E -	
445 V -		483 R -		524 E -		562 S G	61
446 N n		484 K -		525 I -		563 L -	
447 D -		485 P -		526 L -		564 R -	
448 E -		486 T G	48	527 A -		565 N G	62
449 I -		487 V -		528 S G	53	566 T n	
450 A -		488 G -		529 L -		567 T G	63
451 L -		489 D -		530 P -		568 E -	
452 T n		490 F -		531 N G	54	569 E -	
453 L -		491 V -		532 R -		570 L -	
454 R -		492 Q -		533 T n		571 Q -	
455 E -		493 I -		534 G -		572 S G	64
456 P -		494 E -		535 P -		573 L -	
457 G -		495 S n		536 S G	55	574 I -	
458 L -		496 C -		537 L -		575 Y -	
459 V -		497 V -		538 S G	56	576 N G	65
460 L -		498 V -		539 L -		577 I -	
461 F -		499 T G	49	540 D -		578 N G	66
462 T n		503 L -		541 V -		579 N n	
463 H -		504 T n		542 F -		580 T n	
464 E -		505 R -		543 N G	57	581 L -	
465 L -		506 D -		544 A -		582 V -	
466 Q -		507 Q -		545 T n		583 D -	
467 D -		508 L -		546 Y -		584 L -	

STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa	STT/axit amin/dự đoán glycosyl hóa	STT vị trí glycosyl hóa
585 E -		589 R -		593 Y -		597 P -	
586 W -		590 V -		594 I -			
587 L -		591 E -		595 K -			
588 N G	67	592 T n		596 W -			

"G" = Glycosyl hóa; "n" = Không được glycosyl hóa; "-" = Khác

Dự đoán các vị trí glycosyl hóa trong trình tự axit amin của protein S2/G2a được thực hiện sử dụng công cụ dự đoán GPP của nhóm tác giả [152] Đại học Nottingham