

**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
VACCIN THỂ HỆ MỚI**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Mã số: 9 42 02 01

Hà Nội – 2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: GS.TS. Chu Hoàng Hà

Người hướng dẫn khoa học 2: TS. Phạm Đình Minh

Phản biện 1: GS. TS. Chu Hoàng Mậu

Phản biện 2: PGS.TS. Trần Đăng Khánh

Phản biện 3: PGS.TS. Trương Văn Dung

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi 9 giờ 00', ngày 02 tháng 11 năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

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 [1]. 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].

Sự khác biệt trong trình tự bộ gen của các chủng PEDV mới bùng phát và các chủng PEDV trong vaccin, đặc biệt là ở các thụ thể trung hòa, dẫn đến vaccin hiện tại có hiệu quả bảo hộ thấp chống lại các chủng PEDV trên thực địa [3]. Vaccin 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 vaccin [9]. Vùng CO-26K equivalent (COE) (aa 499-638), vùng S1D (aa 636-789), và tiểu phần S2 được xem là các vùng có tính kháng nguyên trên protein S [14].

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 (viết tắt là pII) hoặc dung hợp motif GCN4pII-tp (viết tắt là pII-tp) trên hệ thống cây thuốc lá *N. benthamiana* cũng như chứng minh được khả năng gây đáp ứng miễn dịch của các protein này trên động vật thí nghiệm.

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 vaccin thể 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 vaccin.

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 vaccin 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 như COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và COE/G2a-pII-tp được tạo ra trên cây thuốc lá *N. benthamiana* sử dụng công nghệ biểu hiện tạm thời đều tính kháng nguyên cao, tính sinh miễn dịch tốt và có thể là các ứng viên vaccin 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.

1.1.2. Tình hình dịch bệnh PED tại Việt Nam

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 PEDV

1.2.1. Phân loại PEDV

PEDV được phân loại vào họ Coronaviridae (phân họ Coronavirinae, họ Coronaviridae, bộ Nidovirales) [37].

1.2.2. Đặc điểm hình thái của PEDV

Hạt PEDV tồn tại ở dạng hình cầu có đường kính từ 90 đến 160 nm dưới kính hiển vi điện tử.

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

PEDV có hệ gen là RNA đơn dương với kích thước khoảng 28 kb [37] có chứa 7 khung đọc mở (ORF) mã hóa 4 protein cấu trúc PEDV như: N (Nucleocapsid), S (Spike), E (Envelope), M (Membrane) và ba protein không cấu trúc PEDV như ORF 1a và 1b và ORF3.

1.2.4. Protein S của PEDV

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]. Các vùng chứa yếu tố quyết định kháng nguyên trên protein S được xem là ứng viên chính cho các nghiên cứu phát triển vaccin tiểu đơn vị phòng PEDV [47].

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

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. 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].

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

Hai mươi tám 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) [4].

1.3. Vaccin phòng PEDV

1.3.1. Vaccin bất hoạt và vaccin nhược độc

Một số vaccin bất hoạt và vaccin nhược độc đã được cấp phép và thương mại hóa ở Trung Quốc, Nhật bản và Hàn Quốc. Các loại vaccin bất hoạt và vaccin 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.

1.3.2. Vaccin tiểu đơn vị

Trong nhiều năm gần đây, một phần của protein PEDV S bao gồm COE, S1 hoặc toàn bộ protein S đã được biểu hiện trong hệ thống *E. coli*, *Bacillus subtilis*, Baculovirus, Adenovirus, *Lactobacillus* và thực vật. Chuột hoặc lợn được gây đáp ứng miễn dịch với các loại vaccin này qua đường uống, tiêm bắp, tiêm dưới da hoặc tiêm dưới màng bụng đã kích thích sản sinh nồng độ kháng thể IgG và IgA cao.

1.3.3. Vaccin axit nucleic

Vaccin mRNA PEDV dựa trên vector alphavirus mang gen S của PEDV của công ty của Harrisvaxins ở Mỹ đã được Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ cấp giấy phép có điều kiện năm 2014.

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

Hiện nay, các vaccin phòng chống PEDV có thể không ngăn ngừa được PEDV gây bệnh thực địa do virus thường xuyên biến đổi và vaccin không thể tạo ra đủ miễn dịch niêm mạc.

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

1.4.1. Hệ thống biểu hiện tạm thời trên thực vật

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 được phẩm sinh học tái tổ hợp [103]. *N. benthamiana* là loài thực vật được sử dụng phổ biến nhất cho biểu hiện tạm thời các protein tái tổ hợp.

1.4.2. Vaccin từ thực vật phòng chống PEDV trên thế giới

Đa số các nghiên cứu 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]. 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. Protein COE có mức độ tích lũy cao trong thực vật khi biểu hiện tạm thời.

1.4.3. Motif GCN4pII và motif tailpiece của IgM

1.4.3.1. Motif GCN4pII

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

1.4.3.2. Motif tp của IgM

Tp là một trình tự peptit ngắn tại đầu C của IgM gồm 18 aa có trình

tự PTLYNVSLVMSDTAGTCY [139]. 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.

1.4.4. Vacxin từ thực vật phòng chống các bệnh thú y tại Việt Nam

Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về phát triển vacxin phòng chống PEDV dựa trên hệ thống thực vật được báo cáo.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

2.2.1. Chủng vi sinh vật, tế bào, plasmid và trình tự gen

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

2.1.2. Môi

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

2.1.3. Nguồn vật liệu thực vật

Cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* thủy canh 6-8 tuần tuổi.

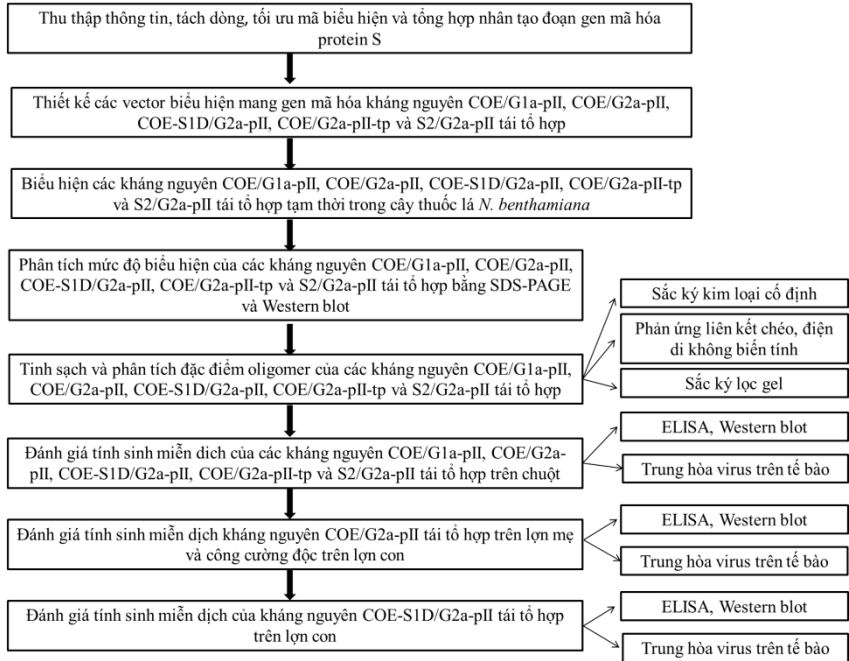
2.1.4. Nguồn vật liệu động vật

Chuột nhắt trắng cái 4-5 tuần tuổi, lợn nái mang thai và lợn con 4-5 tuần tuổi.

2.1.5. Hóa chất

2.1.6. Thiết bị và vật tư

2.2. Phương pháp



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

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

Các kết quả chọn lọc các dòng khuẩn bằng colony-PCR và xử lý plasmid với enzyme *NcoI* cho thấy đã thiết kế thành công vector biểu hiện pCB301-COE/G1a-pII và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector tương ứng.

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

Sáu ngày sau khi biến nạp, lá thuốc lá được thu nhận. Mức độ tích lũy 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.

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

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%.

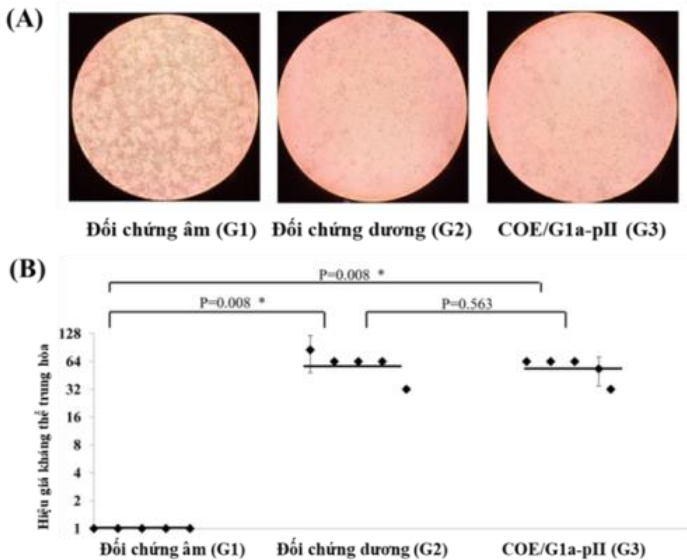
Kết quả điện di SDS-PAGE, nhuộm Coomassie blue và Western blot cho thấy xuất hiện băng khoảng 100 kDa, tương đương kích thước kháng nguyên COE/G1a dạng trimer dưới sự hiện diện của BS3, điều này chứng tỏ kháng nguyên COE/G1a trimer đã được tạo thành khi dung hợp COE/G1a với motif pII.

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

Về đáp ứng sinh IgG đặc hiệu PEDV, 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 CTC Vacc PED (Hàn Quốc) sau khi mũi tiêm thứ ba. Dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII đã kích thích sản sinh kháng thể IgA, IgM đặc hiệu PEDV.

Về khả năng trung hòa PEDV, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV trong huyết thanh của những con chuột được tiêm dịch chiết thực vật có chứa COE/G1a-pII (G3)

và những con chuột được tiêm vaccin thương mại CTC Vacc PED (Hàn Quốc) chứa chủng PEDV DR13 nhược độc (G2), với giá trị p là 0,187. Các huyết thanh của nhóm chuột được tiêm với dịch chiết thực vật chứa COE/G1a-pII (G3) và vaccin 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. Khả năng ức chế PEDV được gây ra bởi các kháng thể có khả năng trung hòa ở các nhóm chuột đối chứng âm (G1) là rất thấp, với hiệu giá kháng thể trung hòa gần bằng 1 (Hình 3.8).



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.

Vì vậy, các kết quả này cho thấy dịch chiết thực vật chứa kháng nguyên COE/G1a-pII đã kích thích sinh các kháng thể có khả năng trung hòa với hiệu giá tương tự như vaccin thương mại CTC Vacc PED (Hàn Quốc) phòng ngừa chủng PEDV DR13.

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

Trong khuôn khổ của luận án, trình tự gen mã hóa protein S của chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao được lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo. Chủng này đã được phân lập và nhân nuôi thành công tại Việt Nam. 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

Các kết quả chọn lọc các dòng khuẩn bằng colony-PCR và xử lý plasmid với enzyme *NcoI* cho thấy đã thiết kế thành công vector biểu hiện pCB301-COE/G2a-pII và tạo chủng *A. tumefaciens* mang vector tương ứng.

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

Kháng nguyên COE/G2a-pII tích lũy trong lá thuốc lá ở mức xấp xỉ 118 mg/kg lá tươi, chiếm 2,01% proteintan tổng số. 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 chứa chủng PEDV AJ1102 (Wuhan Keqian Biology) dạng vô hoạt. Kết quả này chứng tỏ protein COE/G2a-pII được tạo ra trong lá thuốc lá *N. benthamiana* có

tính kháng nguyên tương tự với kháng nguyên COE của PEDV tự nhiên.

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

Đệm rửa có bổ sung imidazole nồng độ 10 mM là thích hợp cho quá trình tinh sạch kháng nguyên COE/G2a-pII. 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

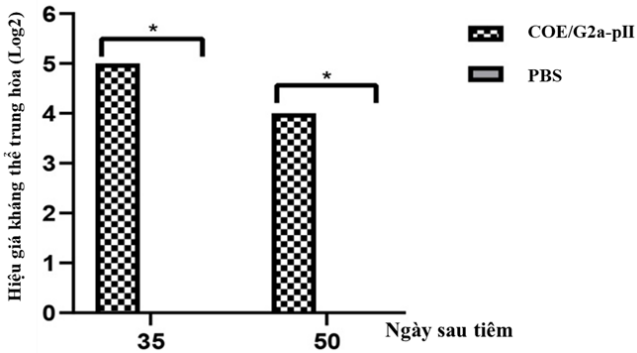
Kết quả phân tích trạng thái oligomer của kháng nguyên COE/G2a-pII bằng SEC và phản ứng liên kết chéo dựa vào BS3 cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII tự nhiên tồn tại ở dạng oligomer với khối lượng khoảng 158-440 kDa. Sự khác nhau trong khối lượng phân tử tự nhiên của protein COE/G1a-pII và protein COE/G2a-pII 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

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

Về đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV, kết quả ELISA cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV trên lợn nái mang thai vào ngày thứ 35 và 50 sau tiêm.

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 không được phát hiện. Về đáp ứng miễn dịch sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV, kết quả ELISA cho thấy lợn nái mang thai được tiêm phòng kháng nguyên COE/G2a-pII có sự hiện diện kháng thể IgA đặc hiệu PEDV trong huyết thanh ở ngày thứ 35 và 50. Kháng thể IgA đặc hiệu 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. 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

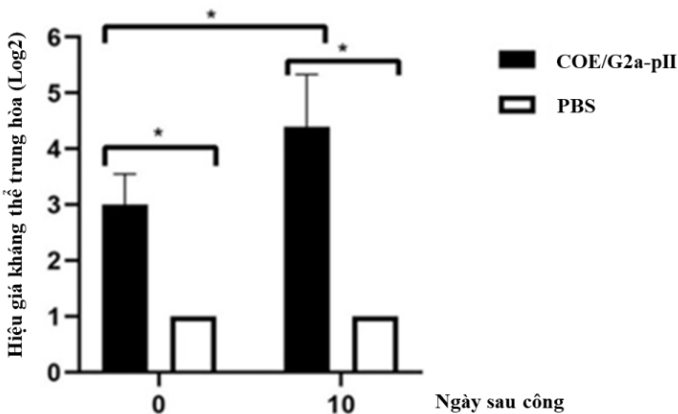
Về khả năng trung hòa PEDV, kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trên lợn nái mang thai sau tiêm với hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình là 32 ở ngày thứ 35. Các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV không được phát hiện trong huyết thanh của lợn nái được tiêm với PBS ở ngày thứ 35 và 50 sau tiêm (Hình 3.19).

Về đáp ứng sinh cytokine IFN- γ , kết quả ELISA cho thấy huyết thanh của lợn nái mang thai được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII có đáp ứng sinh IFN- γ ở mức cao, đạt nồng độ $932,3 \pm 145,2$ pg/ml vào ngày thứ 35 sau tiêm. Đáng chú ý là mức IFN- γ tăng gấp hai lần ($1796,1 \pm 8,6$

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. Những dữ liệu này cho thấy kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sản sinh đáp ứng kháng thể đặc hiệu PEDV có khả năng trung hòa PEDV 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 sinh ra từ lợn nái sau tiêm

Kết quả ELISA cho thấy đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV được phát hiện trong huyết thanh của các lợn con 5 ngày tuổi trước và sau công cường độ. Đáp ứng 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 độ không được phát hiện. Kết quả ELISA cho thấy có sự hiện diện của kháng thể IgA đặc hiệu COE trong huyết thanh của các lợn con trước và sau công cường độ. Kháng thể IgA đặc hiệu với COE không được phát hiện trong huyết thanh của lợn nái được tiêm với PBS trước khi công cường độ và ngày thứ 10 sau công cường độ.



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 độ

Về khả năng trung hòa PEDV, hiệu giá kháng thể trung hòa PEDV được phát hiện ở các lợn con vào ngày thứ 10 sau công cường độc 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 phát hiện 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).

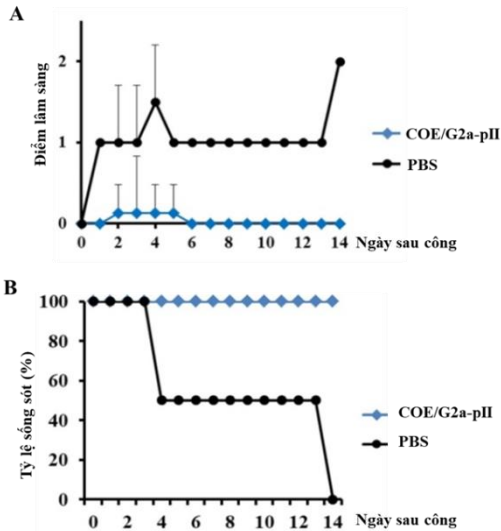
Kết quả ELISA cho thấy đã có sự gia tăng mạnh nồng độ IFN- γ ở các lợn con sinh ra từ lợn nái được tiêm kháng nguyên COE/G2a-pII vào ngày thứ 10 sau công cường độc. Ngược lại, đáp ứng sinh cytokine IFN- γ không được phát hiện ở các lợn con được sinh ra từ lợn nái tiêm PBS trước và sau khi công cường độc 10 ngày. Những dữ liệu này chứng tỏ có sự truyền miễn dịch thụ động của kháng thể IgG, IgA 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

Tất cả lợn con được sinh ra từ lợn nái được tiêm phòng với kháng nguyên COE G2a-pII trở về điểm phân là 0 vào ngày thứ 6. Ngược lại, lợn con được sinh ra từ lợn nái được tiêm PBS có điểm phân là 3 bắt đầu từ ngày thứ 2 cho đến các ngày sau đó. 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.

Tất cả lợn con được sinh ra từ lợn nái tiêm phòng với 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 hóc 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). Tất cả lợn con trong nhóm đối chứng âm tính đều chết sau khi công cường độc virus (Hình 3.25B).



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

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

3.3.1. Thiết kế 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

Các kết quả chọn lọc các dòng khuẩn bằng colony-PCR và xử lý

plasmid với enzyme *Nco*I cho thấy đã thiết kế thành công các vector biểu hiện pCB301-COE-S1D/G2a-pII, pCB301-COE/G2a-pII-tp, pCB301-S2/G2a-pII và tạo các chủng *A. tumefaciens* mang các vector tương ứng.

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

Kết quả bán định lượng bằng Western blot cho thấy các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp, S2/G2a-pII tích lũy trong lá thuốc lá ở mức lần lượt là 115 mg/kg lá tươi, chiếm 1,95% protein tan tổng số; 590 mg/kg lá tươi, chiếm 5,62% protein tan tổng số; 86,7 mg/kg lá tươi, chiếm khoảng 1,47 % protein tan tổng số. Sự biểu hiện của các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII trong lá thuốc lá *N. benthamiana* cũng được phát hiện bằng huyết thanh lợn được tiêm vaccin Corning chứa chủng PEDV AJ1102 (Wuhan Keqian Biology) dạng vô hoạt. Kết quả này chứng tỏ các protein COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII được tạo ra trong lá thuốc lá *N. benthamiana* có tính kháng nguyên tương tự với kháng nguyên tự nhiên của PEDV.

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

Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII sau tinh sạch IMAC có độ tinh khiết đạt xấp xỉ 80%, với hiệu suất thu hồi kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII từ dịch chiết thực vật đạt xấp xỉ 27%. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII tự nhiên tồn tại ở trạng thái oligomer với khối lượng phân tử khoảng 440 kDa-669 kDa. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp sau tinh sạch IMAC có độ tinh khiết đạt xấp xỉ 82%, với hiệu suất thu hồi kháng nguyên COE/G2a-pII-tp từ dịch chiết thực vật đạt xấp xỉ 20%. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp tự nhiên tồn tại ở trạng thái oligomer với khối lượng phân tử khoảng

158-669 kDa. Kháng nguyên S2/G2a-pII sau tinh sạch IMAC có độ tinh khiết xấp xỉ 81%, với hiệu suất thu hồi kháng nguyên S2/G2a-pII từ dịch chiết thực vật đạt xấp xỉ 22%. Kháng nguyên S2/G2a-pII tồn tại ở trạng thái oligomer với khối lượng khoảng 440 đến 669 kDa.

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

Tính sinh 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.

Về đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII hoặc COE/G2a-pII-tp hoặc S2/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV mạnh hơn so với 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 sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV tương đương nhau. Về đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV, 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. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp có khả năng kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn so với các kháng nguyên còn lại. Kháng nguyên S2/G2a-pII đã kích thích kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tương đương với kháng nguyên COE/G2a-pII. 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 mạnh hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII; trong khi đó, kháng nguyên S2/G2a-pII đã kích thích sản sinh kháng thể IgM đặc hiệu PEDV thấp hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII. Về khả năng trung hòa PEDV, các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII đã kích thích sinh các kháng

thể có khả năng trung hòa PEDV tương đương với kháng nguyên COE/G2a-pII. Về đáp ứng sinh cytokine IFN- γ , kháng nguyên COE/G2a-pII đã kích thích sinh đáp ứng IFN- γ cao hơn so với các kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII.

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

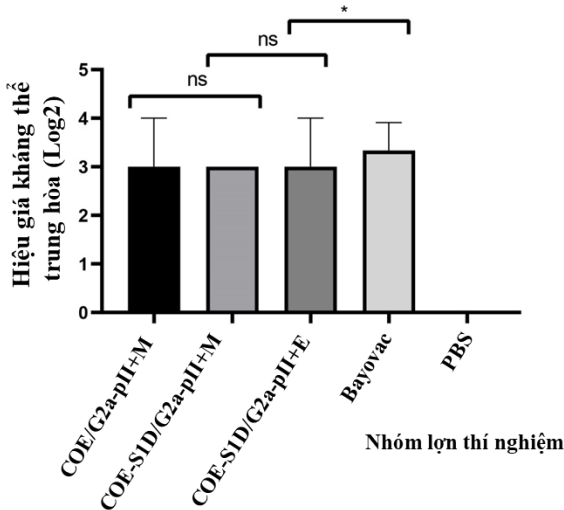
Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII được so sánh với nhau trên lợn con 4-5 tuần tuổi.

Thí nghiệm 1: So sánh tính miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII và kháng nguyên COE/G2a-pII (liều 12,5 μ g) 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

Về đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV, kháng COE-S1D/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV tương đương với kháng nguyên COE/G2a-pII khi trộn với chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 trên lợn. Khi trộn với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, chất bổ trợ Emulsigen®-D có tác dụng kích thích kháng thể IgG đặc hiệu PEDV tốt hơn so với chất bổ trợ Montanide ISA™ 201. Về đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV mạnh hơn so với kháng nguyên COE/G2a-pII khi trộn cùng chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 trên lợn. Khi trộn kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, chất bổ trợ Emulsigen®-D có tác dụng tốt hơn chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 trong việc kích thích sản sinh đáp ứng IgA đặc hiệu PEDV.

Về khả năng trung hòa PEDV, kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã kích thích sản sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV tương

đương với kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn. Khi trộn với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 và chất bổ trợ Emulsigen®-D đã kích thích sinh đáp ứng kháng thể có khả năng trung hòa PEDV tương đương nhau trên lợn con (Hình 3.49).



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.

Về đáp ứng sinh IFN- γ , kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã kích thích đáp ứng IFN- γ tương đương với kháng nguyên COE/G2a-pII khi trộn với chất bổ trợ Montanide ISA™ 201 trên lợn. Khi trộn với kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII, chất bổ trợ Emulsigen®-D đã kích thích sinh IFN- γ tốt hơn chất bổ trợ Montanide ISA™ 201.

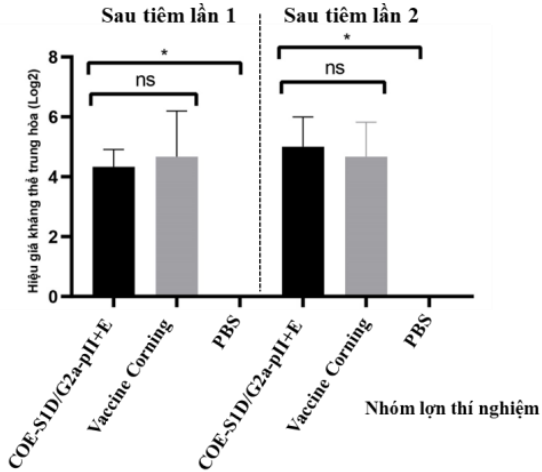
- *Thí nghiệm 2*: So sánh tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D-G2a-pII (liều 50 μ g) với vaccin thương mại trên lợn con

Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (liều 50

(μg) được so sánh với tính sinh miễn dịch của vaccin thương mại Corning, vô hoạt chứa chủng PEDV AJ1102 (Wuhan Keqian Biology) thuộc nhóm G2b trên lợn con. Về đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu kháng nguyên PEDV, kết quả ELISA cho thấy, sau lần tiêm thứ 2, đáp ứng sinh IgG đặc hiệu PEDV ở nhóm tiêm kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D cao hơn so với nhóm tiêm vaccin thương mại Corning ($p < 0,05$), thể hiện ở giá trị OD_{450} trung bình của 2 nhóm lần lượt là 3,8 và 2,087. Đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu PEDV không được phát hiện ở nhóm lợn con tiêm PBS trộn Emulsigen®-D sau tiêm lần 1 và lần 2.

Về đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu kháng nguyên PEDV, kết quả ELISA cho thấy 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 kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở nhóm tiêm vaccin thương mại Corning. Tuy vậy, không có sự khác biệt về mặt thống kê về đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV ở 2 nhóm lợn này với giá trị $p > 0,05$. Đáp ứng sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV không được phát hiện ở nhóm lợn con tiêm PBS trộn chất bổ trợ Emulsigen®-D.

Về khả năng trung hòa PEDV, 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, trong khi đó hiệu giá kháng thể trung hòa trung bình của nhóm lợn tiêm vaccin thương mại Corning là 25,45. Tuy nhiên, không có sự khác biệt về mặt thống kê trong đáp ứng sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV ở 2 nhóm lợn tiêm COE-S1D/G2a-pII và vaccin thương mại Corning với giá trị $p > 0,05$. Các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV không được tìm thấy trong nhóm lợn được tiêm với PBS kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (Hình 3.55).



Hình 3.55. Kết quả đánh giá đáp ứng sinh các kháng thể có khả năng trung hòa PEDV trên các nhóm lợn thí nghiệm bằng phản ứng trung hòa virus.

E: Emulsigen®-D (MVP)

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*

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

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

4.4. Tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên tái tổ hợp COE-S1D/G2a-pII, COE/G2a-pII-tp và S2/G2a-pII trên động vật thí nghiệm

4.4.1. 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

4.4.2. Tính sinh miễn dịch của kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII trên lợn con

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Kháng nguyên COE/G1a-pII từ chủng PEDV DR13 nhược độc thuộc nhóm G1a đã được tạo ra trong lá thuốc lá *N. benthamiana*. Dịch chiết lá thuốc lá chứa kháng nguyên COE/G1a-pII đã kích thích sinh kháng thể trung hòa PEDV tương đương với vaccin 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 tạo ra trong lá thuốc lá *N. benthamiana*. Kháng nguyên COE/G2a-pII (100 µg/liều) đã kích thích sinh kháng thể trung hòa PEDV, IFN- γ trên lợn nái và bảo vệ lợn con sau khi công cường độc với chủng NAVET/PEDV/PS6/2010 độc lực cao.
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 tạo ra trong lá thuốc lá *N. benthamiana*. Kháng nguyên COE/G2a-pII-tp đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn các kháng nguyên COE/G2a-pII, COE-S1D/G2a-pII và S2/G2a-pII trên chuột. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII đã kích thích sinh kháng thể IgA đặc hiệu PEDV tốt hơn kháng nguyên COE/G2a-pII trên lợn con. Kháng nguyên COE-S1D/G2a-pII (50 µg/liều) kèm chất bổ trợ Emulsigen®-D (MVP) đã kích thích sinh kháng thể trung hòa tương đương với vaccin 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 lợn 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 CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN

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>.