

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đào Mạnh Cường

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH
MIỄN DỊCH CỦA PROTEIN P72 TÁI TỔ HỢP CỦA VIRUS
GÂY BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI (AFRICAN SWINE
FEVER) TRÊN *NICOTIANA BENTHAMIANA***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2024

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



Đào Mạnh Cường

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH SINH
MIỄN DỊCH CỦA PROTEIN P72 TÁI TỔ HỢP CỦA VIRUS
GÂY BỆNH DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI (AFRICAN SWINE
FEVER) TRÊN *NICOTIANA BENTHAMIANA***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Mã số: 8420114

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC :

TS. Bùi Văn Ngọc

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a long horizontal stroke extending to the right.

Hà Nội – 2024

LỜI CAM ĐOAN

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

Tác giả luận văn

Cường

Đào Mạnh Cường

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên tôi xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới thầy cô giáo hướng dẫn là TS. Bùi Văn Ngọc và PGS.TS. Phạm Bích Ngọc đã tận tình hướng dẫn, tạo điều kiện, dạy bảo, đưa ra giải pháp giúp tôi có thể thực hiện và hoàn thành được luận văn này. Tiếp theo, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nghiêm Thị Hà Liên tại Trung tâm Điện tử học lượng tử, Viện Vật lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã cung cấp hạt nano silica và các kiến thức về hạt nano để giúp tôi hoàn thành luận văn này. Đặc biệt, tôi xin gửi lời cảm ơn đến ThS. Nguyễn Thu Giang, ThS. Trần Thu Hoài cùng tập thể cán bộ phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện, hướng dẫn, chỉ bảo các kỹ thuật và kiến thức phòng thí nghiệm để giúp tôi hoàn thành luận văn tốt nghiệp.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup, Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VINIF-VinBigdata) đã cấp kinh phí cho đề tài “Nghiên cứu biểu hiện và đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của một số kháng nguyên tái tổ hợp của virus gây bệnh dịch tả lợn Châu Phi (African Swine Fever virus) từ cây thuốc lá định hướng phát triển vắc xin tiểu đơn vị” có mã số VINIF.2020.DA2022 để giúp tôi có thể thực hiện luận văn này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn ban Lãnh đạo, phòng Đào tạo, các phòng chức năng của Học viện Khoa học và Công nghệ và các thầy cô giáo khoa Công nghệ sinh học thuộc Học viện Khoa học và Công nghệ đã tổ chức, đào tạo, truyền đạt kiến thức quý báu cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi muốn bày tỏ sự biết ơn tới gia đình, người thân, bạn bè đã luôn ủng hộ, động viên, khích lệ tôi trong suốt thời gian học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 18 tháng 11 năm 2024

Học viên

Cường

Đào Mạnh Cường

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Lý do chọn đề tài:	1
Mục đích nghiên cứu:	2
Nội dung nghiên cứu :	2
Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài :	3
Những đóng góp của luận văn :	3
NỘI DUNG	4
Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU	4
1.1. DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI	4
1.2. AFRICAN SWINE FEVER VIRUS	6
1.2.1. Cấu trúc virus	6
1.2.2. Hệ gen virus	8
1.3. PROTEIN P72 CỦA VIRUS	9
1.4. HỆ THỐNG BIỂU HIỆN TẠM THỜI Ở THỰC VẬT	11
1.5. PHƯƠNG PHÁP AGROINFILTRATION	13
1.6. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VACCINE	14
1.6.1. Vaccine vô hoạt	14
1.6.2. Vaccine nhược độc	14
1.6.3. Vaccine tiểu đơn vị	15
1.7. HẠT NANO SILICA	16
1.7.1. Giới thiệu	16
1.7.2. Sinh tổng hợp hạt nano silica	16
1.7.3. Đặc tính của hạt nano silica	17
1.7.4. Sự kết hợp SiNPs với protein	18

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	19
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	19
2.1.1. Vật liệu	19
2.1.2. Hóa chất, thiết bị	20
2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu	21
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	21
2.2.1. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên ASFV	21
2.2.2. Phương pháp biểu hiện tạm thời ở thực vật bằng agroinfiltration	24
2.2.3. Phương pháp khảo sát điều kiện tách chiết protein tái tổ hợp từ thực vật	25
2.2.4. Phương pháp tinh sạch và xác định mức độ oligomer hóa của protein p72	25
2.2.5. Phương pháp tạo phức hợp nano silica-p72	26
2.2.6. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột	26
2.2.7. Phương pháp ELISA xác định kháng thể IgG đặc hiệu protein p72	27
2.2.8. Phương pháp xử lý thống kê	27
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	28
3.1. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên p72	28
3.2. Nghiên cứu biểu hiện protein p72 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi trên cây thuốc lá	31
3.3. Khảo sát điều kiện tách chiết protein từ thực vật	33
3.4. Tinh sạch và xác định mức độ polymer hóa của protein p72 tái tổ hợp	36
3.5. Nghiên cứu tạo phức hợp nano silica gắn protein p72	39

3.6. Đánh giá tính sinh miễn dịch của protein tái tổ hợp	43
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	46
KẾT LUẬN	46
KIẾN NGHỊ	46
DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO	47

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ CÁI VIẾT TẮT

Tên viết tắt	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
ADN	Deoxyribonucleic acid	Axit deoxyribonucleic
ARN	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
ASF	African swine fever	Bệnh dịch tả lợn châu Phi
ASFV	African swine fever virus	Virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BSA	Bovine serum albumin	Albumin huyết thanh bò
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzyme
IgG	Immunoglobulin G	Globulin miễn dịch G
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography	Sắc ký ái lực kim loại cố định
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
LB	Lysogeny broth	Môi trường Lysogeny broth
OD	Optical density	Mật độ quang
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di gel polyacrylamide
PBS	Phosphate-buffered saline	Đệm muối phosphat
PBST	Phosphate-buffered saline with Tween	Đệm muối phosphat bổ sung Tween
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
PVDF	Polyvinylidene difluoride	Màng lai polyvinylidene difluoride

rpm	Revolutions per minute	Vòng quay mỗi phút
SDS-PAGE	Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	Điện di gel polyacrylamide sodium dodecyl sulfat
SEC	Size-exclusion chromatography	Sắc ký lọc gel
SEM	Scanning electron microscope	Kính hiển vi điện tử quét
SiNPs	Silica nanoparticles	Hạt nano silica
v/v	Volume/volume	Thể tích/thể tích
w/v	Weight/volume	Khối lượng/thể tích
w/w	Weight/weight	Khối lượng/khối lượng

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1: Thành phần phản ứng PCR.....	22
Bảng 2.2: Thành phần phản ứng cắt enzyme giới hạn <i>Bam</i> HI và <i>Psp</i> OMI ...	22
Bảng 2.3: Thành phần phản ứng ghép nối	23
Bảng 2.4: Thành phần phản ứng cắt enzyme giới hạn <i>Hind</i> III/ <i>Nco</i> I.....	23
Bảng 3.1: Hàm lượng protein tổng số ở trong đệm chiết khác nhau	34
Bảng 3.2: Hàm lượng protein tổng số trong dịch chiết khi xử lý ở các khoảng nhiệt độ khác nhau	35
Bảng 3.3: Khảo sát hàm lượng protein gắn với các hạt nano	40
Bảng 3.4: Hàm lượng protein gắn với hạt SiO ₂ -COOH ở các nhiệt độ khác nhau	41

DANH MỤC HÌNH VẼ, ĐỒ THỊ

Hình 1.1: Bản đồ thế giới thể hiện các quốc gia có sự xuất hiện của dịch tả lợn châu Phi từ tháng 01 năm 2020 đến tháng 12 năm 2022	6
Hình 1.2: Thành phần của hạt virus và các protein liên quan.....	8
Hình 1.3: Cấu trúc và sắp xếp của protein p72.....	10
Hình 2.1: Sơ đồ vector tách dòng pRTRAp72-pII.....	20
Hình 3.1: Hình ảnh điện di.....	28
Hình 3.2: Kết quả cắt vector pRTRAp72-pII bằng enzyme <i>HindIII</i>	29
Hình 3.3: Kết quả điện di thiết kế vector biểu hiện	29
Hình 3.4: Sơ đồ vector pCB301p72-pII tái tổ hợp	30
Hình 3.5: Điện di kiểm tra sản phẩm colony-PCR được khuếch đại từ chủng <i>A. tumefaciens</i> AGL1	31
Hình 3.6: Cấu trúc biểu hiện phần Ectodomain của protein p72.....	32
Hình 3.7: Biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá bằng phương pháp agroinfiltration	32
Hình 3.8: Kiểm tra khả năng biểu hiện bằng thử nghiệm Western blot	33
Hình 3.9: Đường chuẩn BSA	34
Hình 3.10: Kiểm tra khả năng tách chiết của các đệm chiết bằng thử nghiệm Western blot.	35
Hình 3.11: Mảnh vụn tế bào và bảo quan kết tủa sau khi xử lý nhiệt	36
Hình 3.12: Kiểm tra khả năng tinh sạch bằng thử nghiệm Western blot.....	37
Hình 3.13: Sắc ký đồ giá trị UV ở các phân đoạn khác nhau của mẫu và thang chuẩn	38
Hình 3.14: Kiểm tra protein đích sau khi chạy sắc ký lọc gel bằng thử nghiệm Western blot.....	39
Hình 3.15: Hình ảnh phức hợp protein p72-nano silica dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM).....	41
Hình 3.16: Đồ thị biểu thị lượng protein gắn hạt và protein còn dư ở các tỷ lệ hạt nano:protein (w/w) khác nhau	42

Hình 3.17: Thử nghiệm Western blot khảo sát tỷ lệ gắn hạt nano silica với protein p72.....	43
Hình 3.18: Sơ đồ thí nghiệm trên chuột.....	43
Hình 3.19: Tính sinh miễn dịch của các nhóm kháng nguyên khác nhau	44

MỞ ĐẦU

Lý do chọn đề tài:

Tả lợn châu Phi là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm. Hiện nay, bệnh được liệt kê là căn bệnh cần được giám sát thường xuyên và phải báo cáo cho Tổ chức Thú y Thế giới. Mức thiệt hại về kinh tế đối với ngành chăn nuôi trên thế giới nói chung và tại Việt Nam nói riêng là nghiêm trọng. Theo tổ chức Thú y Thế giới từ năm 2021-2023, thế giới đã bị thiệt hại 1.450.133 con lợn. Gần đây, khu vực châu Phi, châu Á, châu Mỹ và châu Đại dương không diễn ra các đợt bùng phát dịch bệnh và không xuất hiện các ổ dịch mới, nhưng ở châu Âu và một quốc gia châu Phi vẫn đang diễn ra dịch tả lợn châu Phi và xuất hiện thêm các đợt bùng phát mới gây thiệt hại 767 con lợn. Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Dịch tả lợn châu Phi bắt đầu xuất hiện tại Việt Nam từ tháng 2/2019 tại Hưng Yên. Sau 4 tháng tràn vào Việt Nam, đến tháng 7/2019, dịch tả lợn châu Phi đã xảy ra tại 5.422 xã thuộc 513 huyện của 62 tỉnh, thành phố với tổng số lợn bị tiêu hủy lên tới trên 3,3 triệu con. Do đó, chiến dịch kiểm soát và diệt trừ dịch tả lợn châu Phi là vô cùng quan trọng. Vaccine là chính sách tối ưu để ngăn chặn và kiểm soát bệnh dịch. Tại Việt Nam 2 loại vaccine sống giảm độc lực là NAVET-ASFVAC và AVAC ASF LIVE đã cho thấy mức độ hiệu quả cao và an toàn trong các cuộc thử nghiệm. 40.000 liều trong tổng số 600.000 liều đã được người chăn nuôi sử dụng mà không có điều gì bất thường xảy ra. Bên cạnh vaccine truyền thống, vaccine tiểu đơn vị đang được nghiên cứu và sản xuất cho thấy hiệu quả phòng bệnh tốt. Một số protein cấu trúc của ASFV như p54, p30, p72, p12 và CD2v [1]–[3] đã được nghiên cứu biểu hiện trên các hệ thống vi khuẩn, côn trùng, tế bào động vật [4], [5] và đánh giá tiềm năng bảo vệ của chúng. Kết quả đã cho thấy mức độ nhất định trong việc phát triển kháng thể trung hòa trong lợn và bảo hộ lợn khỏi virus độc lực. Tuy nhiên, các hệ thống biểu hiện trên có những nhược điểm như thiếu khả năng glycosyl hóa chính xác, không phù hợp cho biểu hiện protein có kích thước lớn, cải biến sau dịch mã không chính xác, chi phí cao, tốn nhiều thời gian. Hướng nghiên cứu sản xuất vaccine tiểu đơn vị trên hệ thống biểu hiện trong thực vật là hướng nghiên cứu mới và đang được thực hiện ở nhiều nơi trên thế giới và cả ở Việt Nam với những ưu điểm như khả năng cải biến sau

dịch mã, an toàn với môi trường và con người, giá thành thấp, dễ tăng qui mô sản xuất và thời gian sản xuất nhanh chóng. Hiện nay trên thế giới vaccine và sinh phẩm y tế có nguồn gốc từ thực vật đã được nghiên cứu, sản xuất và đưa vào sử dụng như công ty Medicago (Canada) đã nghiên cứu tạo thành công vaccine cúm (QIV – quadrivalent influenza vaccine) cho người, protein liệu pháp, kháng thể đơn dòng trên thuốc lá trong thời gian từ 6 – 8 ngày [6], công ty Kentucky Bioprocessing (Mỹ) đã phát triển sinh phẩm Zmapp để điều trị Ebola và cũng đã nghiên cứu vaccine COVID-19 [7], tại Việt Nam các nhà khoa học cũng đã nghiên cứu thành công tạo protein tái tổ hợp của H5N1, H7N9 và PEDV từ cây thuốc lá có tính sinh miễn dịch cao. Như vậy một số câu hỏi đặt ra là có thể tạo vaccine phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi bằng công nghệ tái tổ hợp trên thực vật hay không?, protein cấu trúc nào có thể được biểu hiện để tạo vaccine? và khả năng sinh miễn dịch của chúng như thế nào?. Vì vậy, chúng tôi thực hiện đề tài “Nghiên cứu biểu hiện và đánh giá hoạt tính sinh miễn dịch của protein p72 tái tổ hợp của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi (african swine fever) trên *Nicotiana benthamiana*”.

Mục đích nghiên cứu:

Biểu hiện, tinh sạch được protein p72 tái tổ hợp được biểu hiện trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* và đánh giá tính sinh miễn dịch của protein tái tổ hợp trên mô hình chuột thí nghiệm.

Nội dung nghiên cứu :

Nội dung 1 : Nghiên cứu biểu hiện protein p72 tái tổ hợp trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* bằng phương pháp agroinfiltration.

Nội dung 2 : Nghiên cứu tách chiết và tinh sạch protein tái tổ hợp từ thực vật.

Nội dung 3 : Nghiên cứu tăng cường tính sinh miễn dịch bằng phức hệ nano silica-p72.

Nội dung 4 : Thử nghiệm khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể trên chuột.

Cơ sở khoa học và tính thực tiễn của đề tài :

Vaccine tiêu đơn vị dựa trên các protein cấu trúc của virus có tiềm năng cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Trên cơ sở những ưu điểm của hệ thống biểu hiện thực vật và thành công của những nghiên cứu trước đó trong việc tạo protein tái tổ hợp từ cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch tốt. Vì vậy, đề tài được thực hiện nhằm định hướng tạo vaccine tái tổ hợp phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi.

Những đóng góp của luận văn :

Luận văn đã chứng minh được protein p72 có thể biểu hiện mạnh trên cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*.

Luận văn đã tối ưu được phương pháp tách chiết và tinh sạch protein tái tổ hợp từ thực vật.

Luận văn đã tạo được hạt nano silica chứa nhóm chức gắn protein tái tổ hợp.

Luận văn đã chứng minh được protein p72 tái tổ hợp được biểu hiện trên thực vật có khả năng sinh đáp ứng miễn dịch cao và đáp ứng miễn dịch được tăng cường khi gắn kháng nguyên lên hạt nano silica.

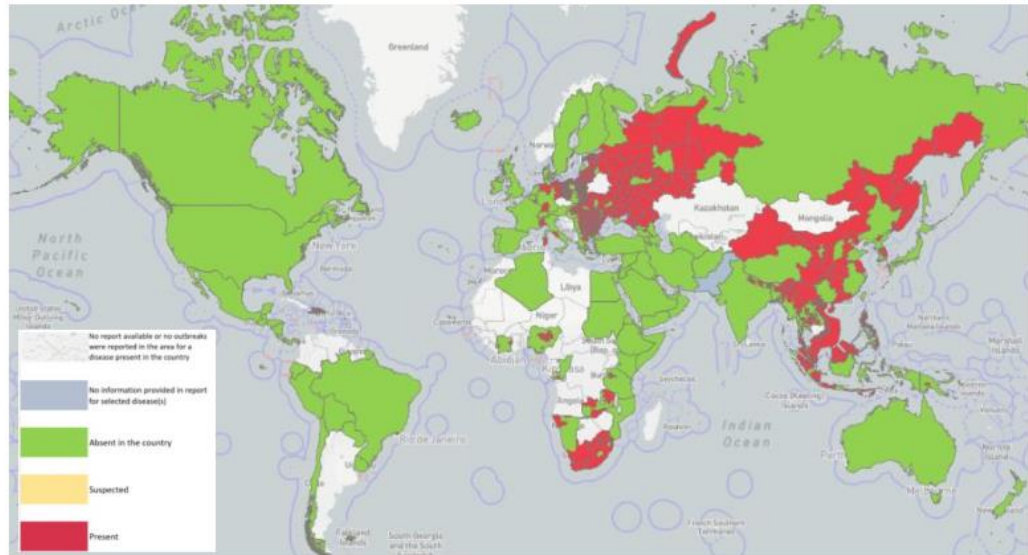
NỘI DUNG

Chương 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. DỊCH TẢ LỢN CHÂU PHI

Dịch tả lợn châu Phi (ASF) là bệnh do African swine fever virus (AFSV) thuộc chi *Asfivirus*, họ *Asfarviridae* gây ra ở lợn, được phát hiện đầu tiên ở Kenya từ tháng 6 năm 1910 [8]. Các đợt bùng phát liên lục địa ở châu Âu và Nam Mỹ những năm 1960 và ở Georgia (Caucasus) năm 2007 đã dẫn tới sự lây lan sau đó sang các nước láng giềng phía đông Georgia. Cùng với các đợt bùng phát ở lãnh thổ phía đông Liên Bang Nga, các đợt bùng phát cấp tính đã được báo cáo ở Trung Quốc vào năm 2018 và xuất hiện ở Việt Nam trong khoảng từ ngày 15 đến 31 tháng 1 năm 2019 [9]. Lợn rừng được coi là nguồn lây dịch bệnh sang lợn nuôi ở các trang trại chăn thả gia súc. Lợn rừng thuộc chi *Phacochoerus* rất phổ biến ở Đông Phi, đã có sự bùng phát dịch bệnh trong chúng được ghi nhận. Trên thực tế, người dân ở các nước Đông Phi có dịch bệnh đã xây dựng chuồng nuôi để hạn chế sự tiếp xúc của lợn nhà và lợn rừng và kết quả là tỷ lệ mắc bệnh đã giảm đáng kể. Con vật bị mắc bệnh khi đứng thì cụp đầu xuống, không quẫy đuôi, hai bên sườn trống, đi lại khó khăn sau 24 giờ bắt đầu xuất hiện triệu chứng, phần thắt lưng và 2 chân sau có biểu hiện lác lư trong nhiều trường hợp 2 chân sau kéo lê như bị liệt. Nhiệt độ luôn luôn tăng lên 40° C hoặc cao hơn, có thể gần 42° C trong thời gian 12 giờ gần lúc chết, lợn biếng ăn và thường xuyên uống nước. Tiêu chảy hiếm khi xuất hiện, thậm chí phân cứng hơn bình thường, có dính chất nhầy và đôi khi có vệt máu. Vết tím tái xuất hiện đầu tiên ở tai và đùi, sau đó toàn bộ cơ thể cũng trở nên tím tái. Lợn chết trong vòng 48 giờ có các dấu hiệu của bệnh, thường kèm theo co giật, mặc dù trong một số trường hợp tình trạng hôn mê có thể kéo dài thêm 24 giờ. Lợn thuộc bất kỳ độ tuổi, giới tính, khỏe mạnh hoặc đang mắc bệnh đều có khả năng bị dịch tả lợn châu Phi. Khi giải phẫu bệnh phẩm, dạ dày bị xung huyết hình thành các điểm có màu rươi vang đậm, lá lách có kích thước gấp đôi so với bình thường, dày, sẫm màu và chắc, thận bị xuất huyết hình thành các vết lốm đốm, tim xuất hiện những vết bầm rỗ rệt ở trên và bên trong tâm thất trái, phổi bị phù gian bào khoảng 50%, hệ bạch huyết các tuyến đều tăng sản và bị

xuất huyết [8]. Bệnh dịch sẽ không lây từ con vật bị bệnh sang con khỏe mạnh khi được cách ly ở thời điểm mới đầu biểu hiện triệu chứng như tăng nhiệt tới $40 - 41^{\circ}\text{C}$. Phân của con vật bị bệnh vẫn chứa virus có khả năng lây nhiễm sau 11 ngày ở trong điều kiện tối và nhiệt độ bình thường. Xác lợn chết nếu không được đem đi tiêu hủy thì sẽ là nguồn lây cho các con khỏe mạnh, thực tế là lợn khỏe mạnh sẽ mắc bệnh sau khi tiếp xúc với xác chết được 17 giờ. Virus tồn tại trong nước tiểu tới 2 ngày, trong phân ở điều kiện bình thường trên 11 ngày và xâm nhiễm vào vật chủ khi thức ăn lẫn phân hoặc nước tiểu của lợn bệnh. Dịch tả lợn châu Phi không lây truyền qua không khí [8]. Vật chủ trung gian truyền bệnh bao gồm chấy, bọ chét và loài ve *Ornithodoros erraticus* [10]. Vật nuôi được nhốt trong chuồng riêng biệt để cách ly tốt thì không bị mắc bệnh. Tỷ lệ tử vong do dịch tả lợn châu Phi là rất cao, có thể lên tới 100% [11] gây thiệt hại rất lớn cho ngành chăn nuôi, nếu đàn gia súc bị nhiễm bệnh mà không được phát hiện kịp thời để cách ly những con bị bệnh thì chủ trang trại có thể bị thiệt hại toàn bộ. Với khí hậu nhiệt đới ẩm gió mùa như ở Việt Nam, chuồng trại có lợn mắc dịch tả lợn châu Phi nên được dọn dẹp hết chất thải, thức ăn thừa, chất độn chuồng và khử trùng sạch sẽ, để khô ráo mới được tái đàn trở lại. Theo Tổ chức Lương Nông Liên Hiệp Quốc (FAO), sản lượng thịt thế giới dự báo giảm lần đầu tiên vào năm 2019 sau hơn hai thập kỷ, khi dịch tả lợn châu Phi bùng phát ở Trung Quốc làm suy giảm đàn lợn [12]. Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, riêng đối với Gia Lai từ tháng 5 năm 2019 đến tháng 10 năm 2020 đã gây thiệt hại 30 nghìn con [13], trong thời gian 10 tháng năm 2021 dịch tả lợn châu Phi đã gây thiệt hại 241,214 kg lợn trên địa bàn tỉnh Hà Giang [14].



Hình 1.1: Bản đồ thế giới thể hiện các quốc gia có sự xuất hiện của dịch tả lợn châu Phi từ tháng 01 năm 2020 đến tháng 12 năm 2022 “Nguồn: Tổ chức Thú y thế giới, 2022 [15]”

1.2. AFRICAN SWINE FEVER VIRUS

1.2.1. Cấu trúc virus

African swine fever virus (ASFV) là virus lớn có vỏ bao bọc với hình thái là khối đa diện có 20 mặt và đường kính trung bình 200 nm. ASFV có cấu trúc nhiều lớp từ trong ra ngoài bao gồm lõi (vùng nhân), vỏ lõi, vỏ trong, capsid, vỏ ngoài.

Lõi trong được hình thành bởi vùng nhân chứa hệ gen virus có cấu trúc kẹp tóc ở đầu cuối và một số nucleoprotein như protein gắn ADN p10 và protein pA104R tương tự protein giống histone của vi khuẩn [16]. Hơn nữa, phần lõi chứa các yếu tố cần thiết cho sinh tổng hợp các phân tử ARN sớm như: enzyme ARN polymerase đa tiểu phần, enzyme poly(A) polymerase, enzyme gắn mũ và các yếu tố phiên mã sớm.

Vỏ lõi là một lớp protein dày khoảng 30 nm bao quanh lõi, có đường kính 180 nm. Hai phức hệ (polyproteins) pp220 và pp62 được phân cắt bởi enzyme phân hủy protein (pS273R) tạo thành các sản phẩm thành thực tham gia hình thành vỏ lõi [17]. Các protein như p150, p37, p34, p14 và p5 có nguồn gốc từ polyprotein pp220, trong khi p35, p15 và p8 là sản phẩm của pp62 [18],

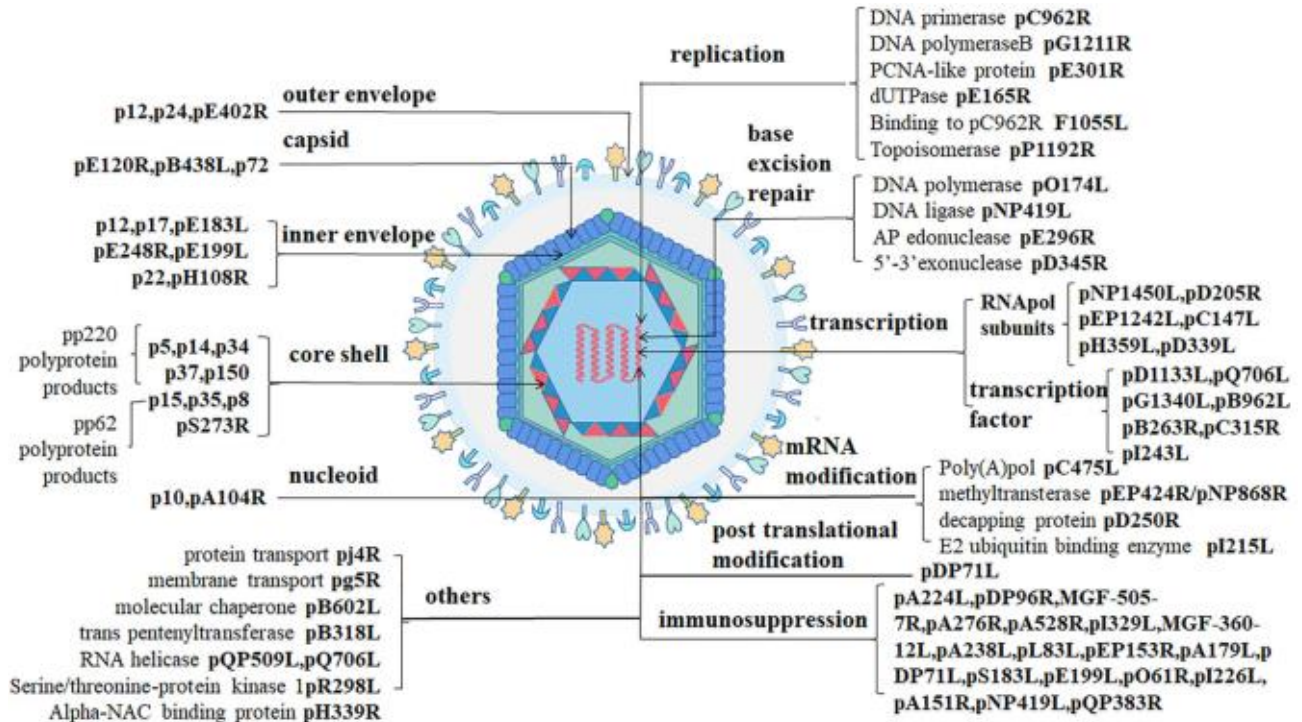
[19]. Tất cả các sản phẩm này được xuất hiện trong số lượng cân bằng trong các hạt virus hoàn chỉnh và cấu thành nên 32% khối lượng hạt virus. Cơ chế biểu hiện gen là duy nhất giữa các loại virus có hệ gen là ADN và nó phản ánh sự cần thiết để duy trì một sự sắp xếp có trật tự các protein cấu trúc trong hạt virion.

Vỏ bao bên trong nằm ngay sát vỏ lõi là lớp màng lipid lớp kép dày 70-Å có nguồn gốc từ lưới nội chất (endoplasmic reticulum-ER) [19]. Các nghiên cứu trước đó đã chỉ ra rằng pE183R là protein chính tham gia vào hình thành vỏ trong. Gần đây, một nghiên cứu đã báo cáo sự hiện diện của p17, pE183L, p12, pE248R và pH108R trong vỏ trong sử dụng kính hiển vi điện tử miễn dịch (immunolectron microscopy) [20]–[22]. Các protein p17 và pE183L chủ yếu giúp lắp ráp lớp capsid, trong khi p12, pE248R và pE199L tham gia vào quá trình xâm nhiễm của virus vào tế bào. pE248R và pE199L là một phần của cơ chế tích hợp virus. Ngoài ra, một số nghiên cứu đã cho rằng protein p22 cũng là một thành phần của màng trong virus [18].

Vỏ capsid của ASFV có đường kính lớn nhất là xấp xỉ 250 nm. Thành phần vỏ capsid gồm 2.760 capsomer giả lục giác và 12 capsomer ngũ giác. Protein p72 được mã hóa bởi gen *B646L* là thành phần chủ yếu của capsomer, chiếm khoảng 1/3 khối lượng protein của virion [23]. Cứ 3 phân tử protein p72 kết hợp một cấu trúc cuộn jelly kép hình thành một capsomer giả lục giác và 5 protein penton khác cấu tạo nên capsomer ngũ giác [24]. Protein pB438L cần thiết cho hình thành đỉnh của capsid [25]. Ngoài protein p72 và pB438L, pE120R cũng thuộc vỏ capsid [18].

Các hạt virus ngoại bào được phủ thêm một lớp bên ngoài khi virus xuất bào [26]. Một số đoạn của protein pE402R (CD2v) đã được xác định trên lớp ngoài cùng của các hạt virus khi xuất bào [18]. Protein p12 thúc đẩy sự hấp phụ của các hạt virus lên các tế bào chủ như một protein vỏ ngoài bằng cách gắn với thụ thể đặc hiệu trên màng tế bào chủ trung gian xâm nhập vào tế bào [22]. Protein p12 cũng được định vị ở màng trong của virus, sử dụng kính hiển vi điện tử miễn dịch (immunolectron microscopy) [18], [27]. Ngoài ra, protein

p24 có nguồn gốc từ màng nguyên sinh chất cũng được tìm thấy trên các hạt virus [28].



Hình 1.2: Thành phần của hạt virus và các protein liên quan “Nguồn: Wang và cộng sự, 2021 [29]”

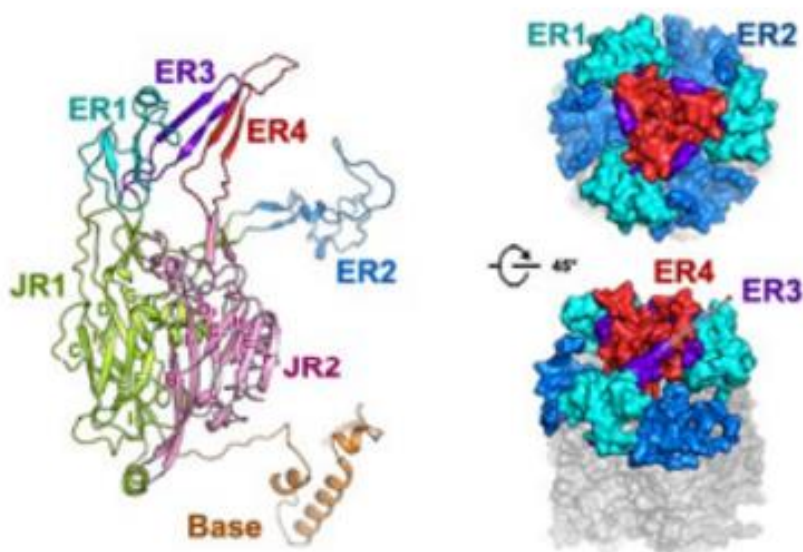
1.2.2. Hệ gen virus

Hệ gen của virus là một phân tử ADN sợi kép, mạch thẳng, kết thúc cộng hóa trị. Kích thước hệ gen từ 170 – 190 Kbp, có 151 – 167 khung đọc mở, mã hóa 54 protein cấu trúc và hơn 100 protein phi cấu trúc [30], [31]. Sự khác nhau về kích thước hệ gen do sự biến đổi về kích thước các khung đọc mở, đặc biệt trong họ đa gen, và sự khác nhau của trình tự lặp lại ngẫu nhiên ngắn trong các gen và các vùng giữa các gen. Các gen của ASFV phân bố gần nhau, được mã hóa trong cả hai chuỗi ADN mà không có vùng intron. Đầu cuối hệ gen là các cấu trúc kẹp tóc liên kết chéo với nhau bằng liên kết cộng hóa trị, tồn tại ở dạng đảo và bổ sung với nhau. Dựa vào gen *B646L* mã hóa protein vỏ p72, virus dịch tả lợn châu Phi được chia vào 24 kiểu gen khác nhau, tất cả chúng được xác định ở châu Phi. Hai kiểu gen của ASFV đã mở rộng ra các lục địa khác nhau. Kiểu gen I của ASFV xuất hiện ở châu Âu những năm 1950 và đã bị tiêu diệt khỏi hầu hết các quốc gia châu Âu khoảng giữa những năm 1990. Kiểu gen II của ASFV xuất hiện đầu tiên ở Georgia năm 2007 [32] và sau đó trở lên phổ

biến ở các quốc gia châu Âu, năm 2018 virus đã lây nhiễm sang lợn ở Trung Quốc và 10 quốc gia châu Á trong đó có Việt Nam [9], [33], [34]. Ở Việt Nam, đợt bùng phát dịch bệnh dịch tả lợn châu Phi 2019-2021 chủ yếu lưu hành chủng virus thuộc kiểu gen II p72, p54, nhóm huyết thanh 8 CD2v và biến thể gen CVR loại I [35]. Phân tích mối quan hệ di truyền cho thấy chủng virus lưu hành ở Việt Nam giống với chủng Georgia 2007/1 (số truy cập genbank: FR682468) có kích thước hệ gen 189.344 bp mã hóa cho 166 ORFs, có 37 thành viên thuộc các họ đa gen (MGFs) khác nhau [9], [36].

1.3. PROTEIN P72 CỦA VIRUS

Vỏ protein ngoài cùng của hạt virus là một lớp vỏ capsid đa diện chủ yếu được lắp ráp bởi protein p72. Protein p72 là thành phần cấu trúc chủ yếu nhất của hạt virus cấu thành khoảng 31 – 33% tổng khối lượng của virion [19] điều này khiến chúng trở thành một trong những kháng nguyên chính được xác định trong lợn bị nhiễm bệnh [37]. Protein p72 có khối lượng phân tử tương đối 73,2 kDa là protein cấu trúc chính của ASFV và nó là protein kháng nguyên chủ yếu được mã hóa bởi gen *B646L* (*VP72*) [38]. Kháng thể trung hòa p72 có thể ngăn cản sự hấp phụ virus lên đại thực bào, do đó protein p72 tham gia vào quá trình xâm nhiễm của virus [39]. P72 là một trong những kháng nguyên quan trọng được nhận biết bởi hệ thống đáp ứng miễn dịch đối với ASFV [40]. Kháng thể đơn dòng nhận biết p72 đã cho thấy khả năng trung hòa chủng ASFV độc lực [41]. P72 có thể có các epitope trung hòa tiềm năng [42]. Hai vùng ER1 (exposed region 1) và ER2 (exposed region 2) hình thành vương miện của p72 capsomer hướng ra ngoài vỏ capsid, nó có thể trở thành một epitope hình thái. Chuỗi β của ER3 và ER4 cấu thành một phiến β có 4 chuỗi nó hình thành phần đầu của p72 capsomer và có thể là một epitope hình thái khác. ER3 có thể liên kết 2 epitope hình thái đó và 4 vùng ER (exposed region) này có lẽ hình thành epitope trung hòa [24], [43]. Phân tích trình tự của gen mã hóa p72 từ 2 chủng ASFV có nguồn gốc từ Uganda và Cộng hòa Dominica cho thấy p72 có tính bảo thủ cao trong các chủng được phân lập từ các nơi khác nhau trên thế giới. Điều này cho thấy rằng tính sinh miễn dịch của p72 là ổn định [44].



Hình 1.3. Cấu trúc và sắp xếp của protein p72. Giản đồ ribbon của p72 monomer gồm domain Base, JR1 (jelly-roll 1), JR2 (jelly-roll 2), ER1-4 (exposed region) có màu sắc khác nhau (bên trái); Bề mặt của p72 trimer gồm các domain ER1-4 (exposed region) với màu sắc khác nhau (bên phải) “Nguồn: Wang và cộng sự, 2019 [24]”

P72 cũng có một chaperone phân tử là pB602L giúp cho việc cuộn gấp p72 chính xác. Quá trình lắp ráp virus bị thay đổi nghiêm trọng khi thiếu pB602L, với sự tạo thành cấu trúc giống khóa kéo khác thường thay vì các hạt virus 20 mặt [45]. Các nghiên cứu trước đó cho thấy rằng B602L của ASFV được yêu cầu cho sự hình thành vỏ capsid đa diện [46] và giúp hỗ trợ tạo ra p72 kháng trypsin [47]. Nghiên cứu khác cho thấy biểu hiện riêng p72 trong tế bào HEK293F dẫn đến sự hình thành p72 hòa tan. Trong khi đó p72 được lắp ráp và cuộn gấp chính xác có thể có được chỉ khi p72 và B602L được đồng biểu hiện trong tế bào HEK293F [37]. Hơn nữa, sự ức chế sinh tổng hợp pB602L ảnh hưởng đến quá trình phân giải polyprotein như pp220 và pp62 và giảm mức độ biểu hiện của p72 [46]. Tuy nhiên, cơ chế mà pB602L ảnh hưởng p72 chưa rõ ràng và tương tác này có thể là trực tiếp. Hiểu cấu trúc và chức năng của pB602L có thể cung cấp hiểu biết có giá trị trong cấu trúc của p72.

Capsid của ASFV được cấu tạo bởi capsomer ngũ giác và giả lục giác. Mỗi capsomer giả lục giác cấu tạo bởi 3 phân tử p72 và mỗi capsomer ngũ giác được cấu tạo bởi 5 protein penton (H240R). P72 hình thành một cấu trúc trimer, với mỗi monomer có một cấu trúc cuộn kép để tạo thành capsomer lục

giác giả [45]. Lắp ráp vỏ capsid là một quá trình diễn ra từ từ có sự tham gia của p72. Đầu tiên, phức hợp penton gắn với màng trong, nơi huy động p72 capsomer, nó hình thành lõi penton và bắt đầu sự lắp ráp. Đơn vị khung xương M1249L sau đó gắn vào lõi penton, p72 capsomer và p17 (tham gia hình thành khóa kéo). Các khóa kéo kết nối với các lõi penton gần kề và cấu trúc dần dần một khung đa diện [45]. Cuối cùng, đi kèm với hình thành khung đa diện, p72 capsomer gắn vào trisymmetrons và hoàn thành việc lắp ráp capsid [24], [48]. P72 capsomer là không đủ để lắp ráp các cấu trúc bậc cao hơn mà nó cần tương tác với các protein khác để xây dựng mạng lưới giúp lắp ráp toàn bộ vỏ capsid. H240R được đóng gói bởi vỏ p72 nó lấp đầy capsomer ngũ giác và hình thành một đỉnh để tạo điều kiện cho lắp ráp toàn bộ capsid [45]. M1249L tương tác với p17 và p72 capsomer để hình thành cấu trúc khóa kéo cứng nhắc, tạo điều kiện hình thành capsid [24]. P17 liên kết chặt chẽ với domain cơ sở của p72, với 3 bản sao của p17 bao quanh mỗi p72 capsomer trong vỏ capsid trong, nó giúp p72 capsomer bám giữ chắc chắn lên màng trong, đảm bảo sự ổn định của capsid [43].

1.4. HỆ THỐNG BIỂU HIỆN TẠM THỜI Ở THỰC VẬT

Hệ thống biểu hiện thực vật có một số thuận lợi hơn so với các hệ thống biểu hiện truyền thống khác. Bên cạnh đó, khả năng sản xuất các protein có giá trị cao đã được ghi nhận như việc sản xuất hooc môn sinh trưởng người thông qua thuốc lá chuyển gen và mô sẹo hoa hướng dương năm 1986 [49]. Hơn nữa, liệu pháp điều trị có nguồn gốc từ thực vật biến đổi gen đầu tiên được chấp thuận bởi FDA ví dụ như taliglucerase alfa được sản xuất bằng cách nuôi cấy huyền dịch tế bào cà rốt biến đổi gen [50]. Trong các hệ thống biểu hiện thực vật, *Nicotiana benthamiana* là vật chủ sản xuất lõi thường được sử dụng. Loài thuốc lá này có tính nhạy cảm lớn với tác nhân gây bệnh, là vật chủ tốt để biểu hiện gen tạm thời [51]. Đối với việc sử dụng hệ thống biểu hiện tạm thời này, cây thuốc lá *N. benthamiana* được trồng trong 4 – 7 tuần sau đó được cho gây nhiễm *Agrobacterium tumefaciens* chứa gen quan tâm. Sau đó, sản phẩm của gen quan tâm đạt mức độ cao nhất trong khoảng 3 – 7 ngày sau gây nhiễm. Gần đây, các nhà nghiên cứu thuộc Viện Công nghệ sinh học đã thành công trong việc nghiên cứu tạo kháng nguyên tái tổ hợp từ cây thuốc lá *N. benthamiana*

thông qua phương pháp agroinfiltration để phòng bệnh cúm A/H5N1, bệnh cúm A/H7N9, bệnh tai xanh ở lợn, bệnh tiêu chảy cấp trên lợn do PEDV gây lên [52]–[54]. Thực vật rõ ràng có một số ưu điểm cho việc sản xuất protein tái tổ hợp như: chi phí thấp, an toàn... Thực vật hoàn toàn khác với động vật do đó nguy cơ tạp nhiễm và phát tán tác nhân gây bệnh cho con người được loại trừ trong quá trình nghiên cứu và sản xuất. Vì điều kiện vô trùng là không cần thiết cho nên nuôi trồng cây đơn giản hơn, ngoài ra chi phí dung dịch dinh dưỡng cho cây cũng không cao (khoảng 0,002 EUR/L), trong khi đó môi trường nuôi cấy đất đã được dùng trong nuôi cấy tế bào động vật (khoảng 50 EUR/L). Hơn nữa, chi phí cho tinh sạch protein đích và kiểm tra virus tự do giảm trong hệ thống biểu hiện thực vật. Bằng cách sử dụng *A. tumefaciens* và/hoặc biểu hiện tạm thời thông qua vector virus, biểu hiện protein tái tổ hợp trong thực vật có thể có được sau khoảng 8 tuần kể từ khi có trình tự ADN tương ứng. Ngoài ra, hệ thống biểu hiện thực vật có ưu điểm biểu hiện các protein lớn và phức tạp tốt hơn các hệ thống biểu hiện khác như hệ thống biểu hiện tế bào vi khuẩn và tế bào động vật [55].

Hiệu suất tạo protein tái tổ hợp rất được quan tâm vì chi phí xử lý và thu hồi protein sẽ tăng cao nếu hỗn hợp protein quan tâm có nồng độ thấp. Để tạo thực vật chuyển gen, điều này tốn khoảng 4 – 6 tháng hoặc nhiều hơn. Ngược lại, hệ thống biểu hiện tạm thời cho phép sản xuất nhanh với số lượng lớn protein tái tổ hợp. Có hai loại hệ thống biểu hiện protein tạm thời ở thực vật. Một loại dựa trên virus thực vật như tobacco mosaic virus (TMV); loại khác là hệ thống biểu hiện gen tạm thời trung gian *Agrobacterium* [56]. Hệ thống dựa trên virus có một số rủi ro của việc vector virus lây nhiễm ra các cây khác trong hệ sinh thái do virus thực vật được nhân lên. Đối với phương pháp agroinfiltration, huyền dịch *A. tumefaciens* được đưa vào lá bằng cách tiêm hoặc xâm nhập bằng chân không, ở đó vi khuẩn chuyển gen quan tâm vào nhân của tế bào chủ thông qua cơ chế của T-ADN. Nhìn chung, sự biểu hiện của protein tái tổ hợp thông qua agroinfiltration cao hơn và hiệu quả hơn các phương pháp chuyển gen truyền thống. Để có hiệu suất biểu hiện cao hơn bằng phương pháp agroinfiltration, vector dựa trên virus đã được nghiên cứu và phát triển. Bởi vì hệ gen virus chứa một số gen cho tái bản các hạt virus như gen mã hóa protein vỏ capsid và không phải tất cả các gen là thiết yếu cho sự biểu hiện

của protein tái tổ hợp. Vì vậy, các gen không cần thiết sẽ được loại bỏ, trong khi các gen cần để cho quá trình tái bản và phiên mã được giữ lại trong cấu trúc vector virus. Bởi vì loại bỏ một số gen không thiết yếu cho nên quá trình gây nhiễm vào nhân tế bào thực vật thông qua cơ chế T-ADN được thực hiện bởi *Agrobacterium* và sự khuếch đại, biểu hiện gen nội bào được diễn ra trong nhân tế bào thực vật với sự trợ giúp của hệ thống tái bản của virus. Do đó, kích thước của vector virus biến đổi được thuyên giảm và phần chèn của gen chuyển là lớn hơn [57]. Các hệ thống tái bản của Tobacco mosaic virus (TMV), Potato virus X (PVX), Geminivirus bean yellow dwarf virus (BeYDV), Cowpea mosaic virus (CPMV) thường được sử dụng để tạo protein tái tổ hợp.

1.5. PHƯƠNG PHÁP AGROINFILTRATION

Phương pháp thâm nhập mô thực vật với *Agrobacterium* tái tổ hợp (agroinfiltration) có thể thực hiện bằng bơm kim tiêm hoặc hút chân không. Đối với phương pháp hút chân không, lá được làm ngập trong đệm biến nạp chứa chủng *Agrobacterium* tái tổ hợp, quá trình biến nạp được diễn ra trong hộp chân không. Khi máy hút chân không hoạt động, khí trong khoảng gian bào của mô lá sẽ đi ra ngoài qua khí khổng tạo áp suất âm trong mô lá, khi áp suất hộp chân không cân bằng với áp suất khí quyển, chủng *Agrobacterium* sẽ được đưa vào mô lá. Cả hai phương pháp đều có ứng dụng trong việc tạo ra protein được phẩm bằng cách biểu hiện tạm thời. Phương pháp thâm nhập mô thực vật bằng bơm kim tiêm cho phép đánh giá nhanh mức độ biểu hiện của protein quan tâm trong điều kiện cụ thể. Hạn chế của phương pháp dùng bơm kim tiêm là khả năng tăng quy mô thấp. Trong khi đó, phương pháp agroinfiltration bằng hút chân không cho phép sản xuất lượng lớn protein có hoạt tính sinh học một cách nhanh chóng. Trong phòng thí nghiệm, phương pháp agroinfiltration bằng hút chân không được sử dụng để thu lượng protein đủ cho phân tích đặc điểm sinh hóa, nghiên cứu chức năng tiềm lâm sàng, cũng như phát triển các phương pháp tinh sạch.

1.6. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VACCINE

1.6.1. Vaccine vô hoạt

Các nhà nghiên cứu đã chỉ ra ASFV bất hoạt không được sử dụng như vaccine [58], điều này có thể là do kháng thể đặc hiệu ASFV không trung hòa virus [59]. Quá trình bất hoạt virus để tạo vaccine vô hoạt đã không cảm ứng miễn dịch tế bào hiệu quả trong hệ thống miễn dịch bẩm sinh của vật chủ. Mặc dù các nhà nghiên cứu đã sử dụng các loại tá dục khác nhau như Polygen và Emulsigen D để tăng hiệu quả của vaccine nhưng cả hai kháng thể được tạo ra đều không có hoạt tính trung hòa và sau khi công cường độc lợn đều có dấu hiệu lâm sàng trầm trọng [60]. Mặc dù vaccine bất hoạt có tính kháng nguyên nhưng chúng không thể kích thích đáp ứng miễn dịch tế bào hoàn toàn dẫn đến sự bảo vệ không hoàn toàn [61]. Tiêm vaccine vô hoạt từ chủng ASFV Mỹ 2008 độc lực cao cho lợn con sau cai sữa sau đó công cường độc chủng đó sau 42 ngày tiêm chủng đã cho thấy rằng lợn được tiêm vaccine có kháng thể IgG đặc hiệu nhưng không có hiệu quả bảo hộ [62]. Các nghiên cứu trên cho thấy việc chế tạo vaccine bất hoạt hiện tại vẫn chưa hiệu quả để phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi.

1.6.2. Vaccine nhược độc

Vaccine nhược độc chứa tác nhân gây bệnh được xử lý miễn dịch mạnh và có khả năng sống cao, nó có thể tăng độc lực và quay trở lại gây bệnh. Một số chủng ASFV yếu tự nhiên có thể được phát triển vaccine nhược độc [63]. Vaccine nhược độc từ chủng OURT88/3 có hiệu quả bảo vệ lợn khỏi sự tấn công từ chủng tương đồng, nhưng tỷ lệ bảo vệ không cao tùy từng cá thể lợn, liều vaccine và chủng gây bệnh [63]. Lợn được tiêm vaccine sống nhược độc tự nhiên biểu hiện tác dụng phụ nghiêm trọng như sốt, sảy thai, nhiễm trùng mãn tính hoặc dai dẳng điều này cản trở sự phát triển vaccine từ chủng nhược độc tự nhiên [64]. Vaccine được phát triển từ chủng suy yếu tự nhiên đặt ra rủi ro phát tán virus ra môi trường điều này giới hạn việc sử dụng của chúng [63]. Mặc dù vaccine nhược độc bằng cách bất hoạt một số gen độc đã trao cho sự bảo vệ chống lại hoàn toàn chủng tương đồng hoặc một phần đối với dị chủng, nhưng độc tính virus, tính sinh miễn dịch và quan trọng hơn là kiểu hình virus

và vấn đề đa dạng kháng nguyên tiếp tục ảnh hưởng đến vai trò của vaccine sống nhược độc ASF [19].

1.6.3. Vaccine tiểu đơn vị

Ngoài vaccine vô hoạt và vaccine nhược độc, vaccine tiểu đơn vị đang trở thành ứng cử viên đầy triển vọng nhằm kiểm soát dịch tả lợn châu Phi. Vaccine tiểu đơn vị ASFV là một loại vaccine tiềm năng tạo đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch trung gian tế bào hiệu quả sau khi biểu hiện protein đặc hiệu. Vaccine tiểu đơn vị sử dụng protein tái tổ hợp được tinh sạch hoặc peptide tổng hợp mã hóa epitope virus đặc hiệu có thể cảm ứng đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Điều này được thực hiện bằng công nghệ ADN tái tổ hợp hoặc hóa sinh truyền thống để tạo ra một kháng nguyên được công thức với tá dược. Vaccine tiểu đơn vị vẫn trong giai đoạn nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và vẫn chưa được ứng dụng trong thực tiễn. Một số kháng nguyên ASFV đã được đánh giá tiềm năng bảo vệ của chúng, bao gồm các protein cấu trúc p54, p30, p72 và CD2v gây ngưng kết hồng cầu và những protein này là mục tiêu chính của công nghệ vaccine tiểu đơn vị [3], [65], [66]. Các thí nghiệm ban đầu về vaccine dựa trên kháng nguyên sử dụng p54 và p30 tái tổ hợp được biểu hiện trong baculovirus đã trao mức độ bảo vệ đối với ASFV khác nhau từ việc trì hoãn khởi phát bệnh đến bảo vệ hoàn toàn [1]. Liên hợp protein p54 và p30 được biểu hiện trong cùng một hệ thống baculovirus cũng có một số thành công nhất định như phát triển kháng thể trung hòa trong lợn và bảo hộ lợn khỏi virus độc lực [67]. Liên hợp protein p72 và p54 tạo đáp ứng ức chế sự hấp phụ virus; p72 và p30 kích hoạt đáp ứng tế bào T gây độc, và p30 ức chế sự xâm nhập của virus [68]. CD2v được biểu hiện trên hệ thống biểu hiện baculovirus cũng đã cho thấy một có mức độ bảo vệ chống lại virus độc lực [69], tạo kháng thể ức chế sự ngưng kết hồng cầu và bảo hộ lợn khi công cường độc. Protein p12 tái tổ hợp được biểu hiện trên tế bào côn trùng có tác dụng cảm ứng tạo kháng thể trung hòa [70]. Tuy nhiên, trên thế giới và tại Việt Nam chưa có nghiên cứu về biểu hiện protein p72 trên cây thuốc lá *N. benthamiana*.

1.7. HẠT NANO SILICA

1.7.1. Giới thiệu

Hạt nano thường được định nghĩa là các hạt có đường kính nhỏ hơn 100 nm, tuy nhiên định nghĩa dựa trên đường kính này không có cơ sở khoa học chắc chắn. Một định nghĩa khác của hạt nano là dựa trên diện tích bề mặt thay vì kích thước ở đó một hạt nano nên có diện tích bề mặt $> 60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ [71].

Silica là tên của một loại vật liệu chứa SiO_2 và thường ở trạng thái tinh thể và vô định hình. Tinh thể silica tồn tại ở nhiều trạng thái: thạch anh, trydimite, cristobalite và porosil. Silica vô định hình có thể được chia thành các mẫu vật tự nhiên (đất tảo cát, thủy tinh opal và thủy tinh silica) và các sản phẩm tạo ra bởi con người (hạt nano silica-SiNPs). SiNPs đã được tạo ra trên quy mô công nghiệp như phụ gia mỹ phẩm, phụ gia thực phẩm, tá dược,... Ngoài ra, nanosilica đang được phát triển như một yếu tố chủ chốt trong ứng dụng y sinh và công nghệ sinh học như liệu pháp ung thư [72], dẫn truyền ADN [73], phân phối thuốc [74], cố định enzyme [75].

1.7.2. Sinh tổng hợp hạt nano silica

Nano silica có thể được tổng hợp bằng các phương pháp khác nhau, tạo ra hạt nano có kích thước từ 10 – 500 nm với nhiều hình dạng và đặc tính lý-hóa. Phương pháp được sử dụng để sinh tổng hợp SiNPs thường xuyên nhất là phương pháp Stober và phương pháp vi nhũ tương. Phương pháp Stober được giới thiệu đầu tiên vào năm 1968 để sinh tổng hợp hạt silica đơn phân tán có kích thước $< 1 \mu\text{m}$ [76]. Kỹ thuật này sử dụng tiền chất silica là tetraethyl orthosilicate (TEOS) trong sự xuất hiện của ethanol và ammonium hydroxide (NH_2OH), trải qua quá trình thủy phân được theo sau phản ứng đa ngưng tụ để tạo các hạt nano đặc có kích thước dưới 200 nm. Bề mặt của các hạt nano tạo ra rất giàu nhóm sianol (SiOH) nó có thể được sử dụng như mỏ neo cho sự thay đổi bề mặt với tác nhân liên kết organosilane như (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) và (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane (MPTMS) [77] để cho phép gắn kết và hấp phụ các phân tử sinh học. Một phương pháp khác để sinh tổng hợp hạt SiNPs là kỹ thuật vi nhũ tương giúp hình thành các

hạt micelle dầu trong nước hoặc các hạt micelle đảo nước trong dầu [78], [79]. Các hạt micelle này được ổn định bởi các chất hoạt động bề mặt như tween hoặc pluronic có vai trò như lò phản ứng nano ở đó tiền chất silica trải qua phản ứng thủy phân và phản ứng ngưng tụ để hình thành SiNPs.

SiNPs có thể chức năng hóa bề mặt một cách dễ dàng. Bề mặt của SiNPs sở hữu nhiều nhóm silanol (Si-OH) được dùng như vị trí gắn cho mẫu dò bề mặt. Phương pháp thay đổi cộng hóa trị này bao gồm đồng ngưng tụ hoặc ghép sau tổng hợp của silane chức năng khác nhau lên nhóm silanol bề mặt. Ghép nối sau tổng hợp bao gồm liên kết của các nhóm chức lên bề mặt hạt nano [80], trong khi cách tiếp cận đồng ngưng kết đòi hỏi sự xuất hiện của nhóm chức thậm chí trong lõi của hạt nano. Những thay đổi trên bề mặt hạt nano ngoài chức năng hóa bề mặt còn để cải thiện tính ổn định keo của hạt nano khi chúng có xu hướng kết dính lại với nhau.

1.7.3. Đặc tính của hạt nano silica

Các tham số lý hóa như kích thước, hình dạng và độ xốp đóng vai trò quan trọng trong việc phân phối tải trọng đến các vị trí đích và sự loại bỏ của chúng sau đó ra khỏi cơ thể. Kích thước là một yếu tố quy định việc hấp thụ vào trong tế bào của các hạt nano và đặc tính sinh học của nó. Nhìn chung, SiNPs được tổng hợp có kích thước từ 10 đến 500 nm. Giống như kích thước, hình dạng cũng đóng vai trò chi phối hoạt động của hạt nano. Thanh nano dài có thời gian tồn tại trong cơ thể lâu hơn so với thanh nano ngắn và hạt nano [81]. Trong khi kích thước và hình dạng là những yếu tố chính quyết định sự hấp thụ và phân phối sinh học của hạt nano, độ xốp đóng vai trò quan trọng hơn trong việc phân phối tải trọng. Thông thường lỗ xốp của SiNPs có thể được kiểm soát trong khoảng 2 đến 50 nm bởi các thông số tổng hợp khác nhau. Trong khi kích thước lỗ nhỏ hơn có thể dẫn đến việc vận chuyển và giải phóng của tải trọng ở vị trí đích bị giới hạn thì kích thước lỗ lớn hơn có thể dẫn đến sự giải phóng trước khi đến vị trí đích dẫn đến tác dụng phụ không mong muốn hoặc gây độc.

1.7.4. Sự kết hợp SiNPs với protein

Phân tử protein được cấu thành bởi chuỗi các axit amin liên kết với nhau bằng liên kết peptide. Mỗi axit amin đều chứa một gốc R với tính chất riêng như phân cực, không phân cực, chứa nhóm SH. Thông qua các nhóm chức, protein có thể hình thành liên kết với bề mặt hạt nano silica. Trên cơ sở đó, nhiều phương pháp khác nhau trong việc cố định protein lên hạt nano silica đã được phát triển, chủ yếu dựa vào các tương tác cộng hóa trị (liên kết với gốc carbohydrate, xúc tác của enzyme, liên kết với nhóm hydroxyl, phản ứng của các gốc tự do, liên kết với nhóm thiol); tương tác không cộng hóa trị (tương tác tĩnh điện trực tiếp, tương tác qua trung gian protein A và protein G, tương tác qua trung gian ADN, tương tác qua trung gian aptamer, tương tác qua trung gian His-tag, tương tác biotin-avidin, tương tác qua trung gian phối tử); phản ứng “click”; liên kết amide giữa nhóm carboxyl và amine [82]. Cố định protein lên bề mặt hạt nano silica được ứng dụng rất nhiều trong các lĩnh vực khác nhau như y sinh, cảm biến sinh học,... Hạt nano silica với protein cố định thông qua liên kết cộng hóa trị được phủ lên điện cực cảm biến thần kinh giúp tăng cường sự tương hợp với tế bào thần kinh, tăng cường thuộc tính lý hóa của điện cực và giảm đáp ứng không mong muốn của mô vật chủ [83]. Hạt nano silica chứa nhóm chức NH_2 , được tạo ra bằng phản ứng Stober, được cố định phân tử sinh học thông qua axit itaconic, một tác nhân liên kết mới giúp cố định protein và axit nucleic lên bề mặt hạt nano, được ứng dụng làm tăng độ nhạy của phản ứng ELISA [84]. Nghiên cứu đưa peptide Buforin II (BUF-II) và protein OmpA vào trong tế bào bằng chất mang là hạt nano silica cho thấy kết quả là phức hợp nano-protein có khả năng xâm nhập tế bào cao mà không làm chết tế bào, ngoài ra phức hợp nanno-protein không gây tan máu và đông máu [85]. Cố định β -Glucosidase lên hạt nano silica giúp cải thiện sự bền nhiệt và khả năng tái sử dụng của enzyme, đồng thời đạt được khả năng xúc tác cao [86]. Các đại phân tử sinh học được cố định lên bề mặt hạt nano silica nhờ với sự trợ giúp của chất keo phân tử được giải phóng từ từ và vẫn giữ được chức năng sinh học, điều này khiến nano silica trở thành chất mang hướng đích tiềm năng của các protein liệu pháp [87]. Như vậy, việc cố định protein lên bề mặt hạt nano đã được nghiên cứu trên nhiều lĩnh vực như cảm biến sinh học, điều trị bệnh, phân phối thuốc hướng đích và đạt được nhiều kết quả khả quan.

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

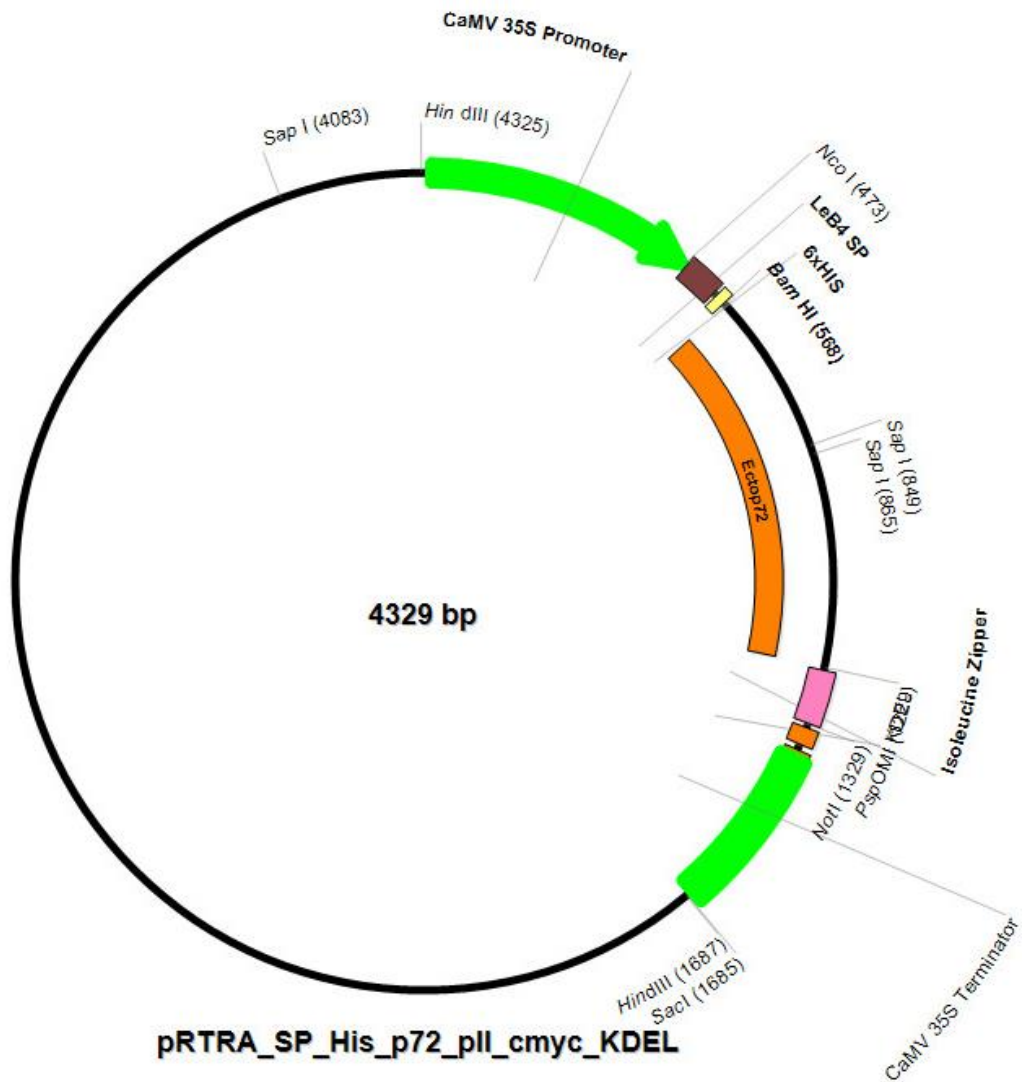
2.1.1. Vật liệu

Chủng *E. coli* G10 được dùng làm tế bào chủ cho nhân dòng gen, chủng *A. tumefaciens* AGL1 được dùng cho biểu hiện tạm thời trong cây thuốc lá, vector nhân dòng pRTRA-SP-His-H5-GCN4pII-cmyc-KDEL, vector biểu hiện pCB301-35S-H5-GCN4pII-His-cmyc-KDEL, một phần gen mã hóa của protein p72 của ASFV được cung cấp bởi phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana* *in vitro* do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Hạt nano silica gắn nhóm chức COOH, NH₂, CHO được cung cấp bởi Trung tâm Điện tử học lượng tử, Viện Vật lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chuột BALB/c do Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.



Hình 2.1: Sơ đồ vector tách dòng pRTRAp72-pII

2.1.2. Hóa chất, thiết bị

Hóa chất, sinh phẩm: các enzyme cắt giới hạn (New England Biolabs, Mỹ), enzyme T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific), Kit tách chiết plasmid DNA-spin TM Plasmid DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc), kit tinh sạch ADN AccuPrep Gel Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc), Ni-NTA agarose (Qiagen, Đức), peptone (Bio Basic, Canada), cao nấm men (Bio Basic, Canada), agarose (Merck, Mỹ), NaCl (Trung Quốc), glycerol (Merck, Mỹ), imidazole (Merck, Mỹ), tween 20 (Promega, Mỹ), Na₂HPO₄ (Trung Quốc), KH₂PO₄ (Trung Quốc), Pierce Bradford Plus Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Mỹ).

Thiết bị: máy PCR ProFlex™ (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Mỹ), máy điện di Powerpac 300 (Bio-Rad, Mỹ), máy chụp ảnh gel Amersham Imager 680 (Cytiva, Mỹ), bộ máy điện di protein đứng (Cleaver Scientific, Anh), máy ly tâm himac CR20G (Hitachi, Nhật Bản), hệ thống sắc ký AKTA pure (Cytiva, Mỹ), máy Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific, Mỹ) cùng với các trang thiết bị khác của phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen và phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

2.1.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Các nghiên cứu được thực hiện ở phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong khoảng thời gian từ tháng 9 năm 2023 đến tháng 2 năm 2024.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên ASFV

Trình tự mã hóa vùng Ectodomain của protein p72 có bổ sung trình tự nhận biết của một số enzyme cắt giới hạn cho mục đích thiết kế vector được đưa vào vector pUC57 và tổng hợp bởi Công ty Genewiz (Mỹ). Đoạn gen mã hóa kháng nguyên từ vector pUC57-p72 được khuếch đại bằng phản ứng PCR có thành phần như trong Bảng 2.1 sử dụng các cặp mồi đặc hiệu Ecto p72-BamHI-F (agGGATCCATTCACAATCTTTTTGTGAAGAGG) và Ecto p72-*pspOMI*-R (gcggggcccCACAGCAGAACCGTTCT) theo chu trình: 94° C trong 3 phút, 35 chu kỳ (94° C trong 1 phút, 55° C trong 1 phút, 72° C trong 1 phút), hoàn tất kéo dài 72° C trong 10 phút.

Bảng 2.1: Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (μL)
5x PCR buffer	10
dNTPs 10 mM	4
Mồi xuôi (10 pmol)	2
Mồi ngược (10 pmol)	2
Taq polymerase (5U/ μL)	0,25
ADN (10 pg - 0,5 μg)	0,5
Nước khử ion	31,25
Tổng	50

Sản phẩm phản ứng khuếch đại trên được thu nhận sau khi điện di trên gel agarose 1% sử dụng kit tinh sạch ADN AccuPrep Gel Purification Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất và cắt bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI theo phản ứng có thành phần như trong Bảng 2.2 ở 37° C trong 3 giờ. Đồng thời, vector pRTRA-SP-His-H5-GCN4pII-cmyc-KDEL cũng được cắt tại vị trí *Bam*HI và *Psp*OMI.

Bảng 2.2: Thành phần phản ứng cắt enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI

Thành phần	Thể tích (μL)
Tango Buffer (10x)	1,5
ADN	5
Nước khử ion	7,5
<i>Bam</i> HI (5U/ μL)	0,5
<i>Psp</i> OMI (5U/ μL)	0,5
Tổng	15

Trình tự gen mã hóa protein p72 được ghép nối với vector tách dòng pRTRA bằng enzyme T4 DNA ligase theo phản ứng với thành phần như trong Bảng 2.3 trong 2 giờ ở 22° C.

Bảng 2.3: Thành phần phản ứng ghép nối

Thành phần	Thể tích (μL)
T ₄ DNA Ligase Buffer (10x)	1
ADN mẫu (50 ng)	7
Vector	1
T ₄ DNA Ligase (5U/ μL)	1
Tổng	10

Vector tạo ra được biến nạp vào chủng *E. coli* G10 bằng phương pháp sốc nhiệt [88] và chọn lọc trên môi trường có kháng sinh Carbenicillin 50 mg/L. Dòng khuẩn mang vector pRTRA-p72-pII được lựa chọn bằng phản ứng colony-PCR có thành phần như trong Bảng 2.1 với cặp mồi: 35S-F (CACTGACGTAAGGGATGACG) và 35S-R (ATCTGGGAACTACTCACACA) và phản ứng cắt enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI. Sau đó, đoạn gen chứa cassette biểu hiện được thu nhận bằng cách xử lý vector pRTRA tái tổ hợp với *Hind*III theo phản ứng có thành phần như trong Bảng 2.4 ở 37° C trong 3 giờ và nó sẽ được chèn vào vector biểu hiện pCB301 tại vị trí *Hind*III.

Bảng 2.4: Thành phần phản ứng cắt enzyme giới hạn *Hind*III/*Nco*I

Thành phần	Thể tích (μL)
Buffer R/O (10x)	4
ADN	12
Nước khử ion	21,5
<i>Hind</i> III/ <i>Nco</i> I (10U/ μL)	2,5
Tổng	40

Plasmid pCB301-p72-pII sẽ được biến nạp vào chủng *E. coli* G10 và chọn lọc trên môi trường có kháng sinh Kanamycin 10 mg/L. Dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp chứa đoạn gen p72 gắn ngược chiều phiên mã của gen kháng kháng sinh trên khung vector pCB301 được lựa chọn bằng phản ứng cắt với enzyme giới hạn *Nco*I theo phản ứng có thành phần như trong Bảng 2.4 ở 37° C trong 3 giờ và colony-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu Ecto p72-BamHI-F và Ecto p72-pspOMI-R. Plasmid pCB301 tái tổ hợp sau đó được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện [89] và được

chọn lọc bằng phản ứng colony-PCR có thành phần như trong Bảng 2.1 với cặp mồi 35S-F và 35S-R.

2.2.2. Phương pháp biểu hiện tạm thời ở thực vật bằng agroinfiltration

Phương pháp được thực hiện theo như mô tả trước đó bởi Ho và cộng sự, 2020 [90]. Chủng *A. tumefaciens* AGL1 chứa vector cho biểu hiện protein tái tổ hợp và vector thực vật cho biểu hiện HcPro được nuôi cấy cấp 1, 2, 3 trong môi trường LB có bổ sung 50 µg/mL Kanamycin, 50 µg/mL Carbenicillin và 50 µg/mL Rifampicin qua đêm, ở 28°C, 200 rpm. Sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 4.000 rpm trong 15 phút, ở 4°C, sau đó được tái huyền phù vào đệm biến nạp (10 mM 2-Morpholinoethanesulphonic acid [MES], 10 mM MgSO₄, pH 5,6) sao cho mật độ tế bào vi khuẩn đạt giá trị OD₆₀₀ = 1. Chủng vi khuẩn chứa vector biểu hiện được trộn với chủng khuẩn chứa vector mã hóa HcPro theo tỷ lệ 1 : 1 (v/v) sau đó điều chỉnh giá trị OD₆₀₀ về 0,85 bằng đệm biến nạp. *N. benthamiana* 4 tuần tuổi (*in vivo*) được loại bỏ lá già, lá non, cành nhánh và ngọn dùng để biểu hiện tạm thời. Vi khuẩn được đưa vào mô lá bằng cách nhấn chìm toàn bộ lá cây vào dung dịch chứa vi khuẩn và được đặt trong buồng hút chân không. Hút chân không được thực hiện ở 25 inches Hg trong 2 phút. Sau đó, áp suất trong buồng được cân bằng với áp suất khí quyển bằng cách mở nắp từ từ. Cây sau khi được lây nhiễm sẽ được nuôi trồng trong nhà kính có nhiệt độ 21-26°C.

Mức độ biểu hiện của protein tái tổ hợp trong mô lá lây nhiễm vi khuẩn sau 5 ngày được đánh giá bằng phương pháp lai miễn dịch Western blot. Đầu tiên, hỗn hợp protein được phân tách bằng cách điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12%. Sau đó, protein được chuyển lên màng PVDF (Millipore) bằng bộ chuyển màng của Bio-Rad ở chế độ 100 V và 400 mA trong 2 giờ, 4°C. Màng PVDF được khóa bằng sữa tách béo pha trong dung dịch PBS pH 7,4 trong vòng 3 h. Kháng nguyên được lai với kháng thể kháng His-tag hòa trong dung dịch sữa tách béo 2% trong 2 h tiếp theo và kháng thể thứ cấp anti-mouse IgG có gắn Horseradish Peroxidase-HRP (Invitrogen) với độ pha loãng 1/2.500 lần trong dung dịch sữa tách béo 2% được lai trong 1 h. Cuối cùng, protein p72 tái tổ hợp được phát hiện bằng cách ngâm màng trong dung dịch Tris-HCl 0,05

M (pH 7,4) chứa 0,15% cơ chất DAB (Diaminobenzidine) trong 10 phút và chụp ảnh dựa vào phần mềm ImageQuant TL 8.0 của máy chụp ảnh gel và màng lai huỳnh quang Amersham Imager 680 RGB.

2.2.3. Phương pháp khảo sát điều kiện tách chiết protein tái tổ hợp từ thực vật

Theo De Jong và cộng sự [91] các loại đệm chiết khác nhau được sử dụng để tách chiết protein: Đệm chiết 1: đệm Binding (20 mM Sodium phosphate [0,0151 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ và 0,0049 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] và 500 mM NaCl) có pH 7,4; 1% (v/v) Tween 20; 1 mM Ascorbic acid; 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Đệm chiết 2: đệm Binding có pH 7,4; 1% (v/v) Tween 20. Mẫu lá thu hoạch được để trong tủ -80°C , sau đó được nghiền mịn với N_2 lỏng và được đồng nhất bằng đệm chiết với tỷ lệ bột lá : đệm chiết là 1 : 3 (g/mL). Hỗn hợp sau đó được siêu âm với độ lớn (amplitude) 70% trong 30 phút và ly tâm 12.000 rpm trong 30 phút để loại bỏ xác tế bào. Các mẫu đệm chiết khác nhau được xử lý ở các khoảng nhiệt độ 35°C trong 20 phút, 40°C trong 15 phút và 45°C trong 10 phút, sau đó ly tâm 13.000 rpm trong 30 phút để loại bỏ mảnh vụn tế bào. Các mẫu dịch chiết được đo hàm lượng protein tổng số bằng phương pháp Bradford, điện di SDS-PAGE và làm thử nghiệm Western blot để xác định hiệu quả của các loại đệm chiết sử dụng.

2.2.4. Phương pháp tinh sạch và xác định mức độ oligomer hóa của protein p72

Protein p72 được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC) theo phương pháp nghiên cứu trước đó [90] và có một số thay đổi theo như mô tả sau đây. Sau 5 ngày biến nạp, mẫu lá được thu hoạch và được tách chiết bằng đệm chiết 1 theo quy trình đã được khảo sát bằng phương pháp ở mục 2.2.3. Tiếp theo, dịch chiết được trộn với 15 mL Ni-NTA agarose resin ở 4°C , qua đệm trên máy khuấy từ. Sau đó, hạt Ni-NTA agarose resin có gắn protein p72 được đưa lên cột sắc ký và rửa bằng đệm rửa (binding buffer; 5 mM imidazole; pH 7,4). Cuối cùng, protein tái tổ hợp được rửa giải khỏi cột với đệm rửa giải (binding buffer; 500 mM imidazole; pH 7,4). Protein thu được sẽ được thẩm tích trong dung dịch PBS 1x không có

NaCl ở 4° C và được cô lại bằng PEG 6000. Protein thu được tiếp tục được tinh sạch lần 2 bằng cột tinh sạch His Trap HP (Cytiva) trên máy AKTA (Cytiva). Để xác định mức độ polymer hóa, protein sau khi được tinh sạch bằng phương pháp IMAC tiếp tục được phân tách bằng phương pháp sắc ký lọc gel (size exclusion chromatography, SEC) trên máy AKTA theo mô tả của Phan và cộng sự (2007)[52].

2.2.5. Phương pháp tạo phức hợp nano silica-p72

Khả năng gắn protein của các hạt nano silica có nhóm chức -COOH, -NH₂, -CHO được tạo theo phương pháp của Pham và cộng sự (2012) [92], điều kiện nhiệt độ gắn hạt ở 4° C và 28° C, tỷ lệ hạt nano:protein p72 (w/w) là 1:0,19; 1:0,38; 1:0,96; 1:1,35; 1:1,73; 1:2,31 được thực hiện theo phương pháp liên kết chéo carbodiimide của Wang và cộng sự (2019) [93] như mô tả sau: hạt nano silica được trộn với protein theo tỷ lệ nhất định phụ thuộc vào từng thí nghiệm, dưới xúc tác của 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC.HCl) và N-hydroxysuccinimide (NHS) phản ứng liên kết diễn ra trong điều kiện khuấy liên tục trong vòng 12 h ở 4° C hoặc 28° C, phức hợp nano-p72 được thu nhận bằng cách ly tâm 13.000 rpm, trong 10 phút, hạt nano gắn p72 được rửa 3 lần với dH₂O và được hoàn nguyên trong đệm PBS pH 7,4 và lưu giữ ở 4° C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2.6. Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột

Tính sinh miễn dịch của protein p72 và phức hệ nano-p72 được đánh giá trên chuột BALB/c 6 tuần tuổi. Hỗn dịch tiêm chứa 15% tá dược Montanide gel 02 PR (SEPPIC, Pháp) và kháng nguyên được trộn đều. Chuột được chia thành 5 nhóm (5 con/nhóm): nhóm G1 tiêm 5 µg protein p72, nhóm G2 tiêm 5 µg phức hệ nano gắn protein p72, nhóm G3 tiêm 2,5 µg phức hệ nano gắn protein p72, nhóm đối chứng G4 tiêm hạt nano silica và nhóm đối chứng G5 tiêm PBS. Quy trình được thực hiện như sau: chuột được tiêm dưới da bụng 3 mũi với liều 200 µL/con, mỗi mũi tiêm cách nhau 14 ngày. Huyết thanh được thu vào ngày thứ 7 sau mũi tiêm thứ 2 và thứ 3 [90].

2.2.7. Phương pháp ELISA xác định kháng thể IgG đặc hiệu protein p72

Phương pháp ELISA gián tiếp được thực hiện theo như nghiên cứu trước đó [54]. Đầu tiên, đĩa 96 giếng Maxibinding (SPL Life Sciences, Hàn Quốc) được phủ với 100 ng protein p72/giếng trong đệm PBS (pH 7,4), ủ qua đêm ở 4° C. Sau đó, các giếng được khóa bằng dung dịch PBS 1x chứa 5% (w/v) sữa tách béo trong 2 h và được rửa 5 lần với dung dịch PBST (đệm PBS chứa 0,05% (v/v) Tween 20). Huyết thanh chuột thuộc các nhóm khác nhau có độ pha loãng 1:50 được bổ sung vào các giếng và ủ trong 2 h, sau đó được rửa 5 lần với PBST 1x. Đĩa được nhỏ kháng thể thứ cấp antimouse IgG có gắn Horseradish peroxidase (HRP) với độ pha loãng 1:1500 trong 1,5 h và được rửa sau đó 5 lần với dung dịch PBST 1x. Cơ chất 1-Step Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) được nhỏ vào mỗi giếng và được dừng bằng HCl 1N. Độ hấp thụ quang được đo ở bước sóng 450 nm bằng máy Multiskan SkyHigh.

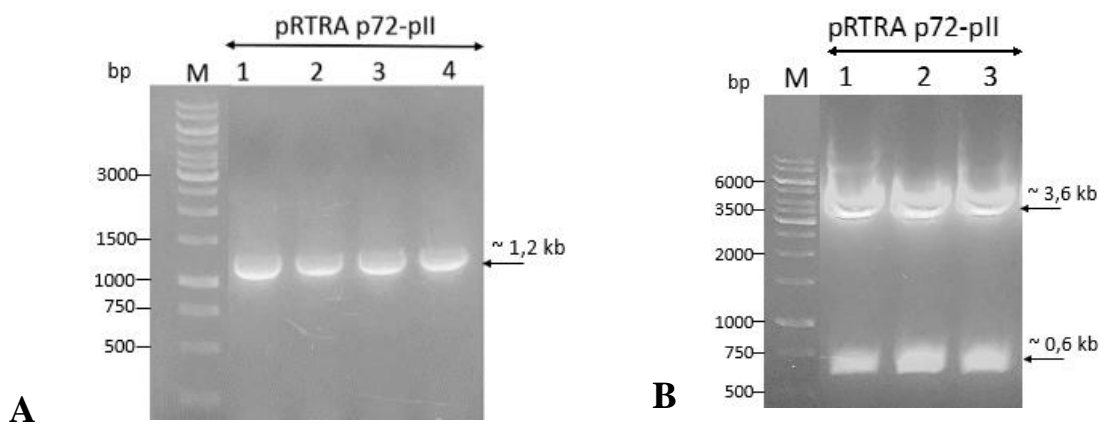
2.2.8. Phương pháp xử lý thống kê

Sự khác nhau giữa các công thức thí nghiệm được xác định bằng cách phân tích phương sai sử dụng chương trình SAS Studio trực tuyến và phần mềm Excel. Phương pháp kiểm định sau phân tích phương sai được chọn là Tukey's HSD. Giá trị $P < 0,01$ được coi là khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế cấu trúc vector biểu hiện mang gen mã hóa kháng nguyên p72

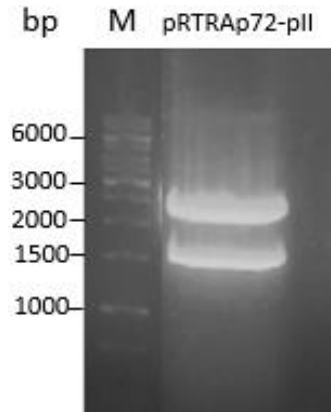
Sau khi khuếch đại từ vector pUC57 bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu, đoạn gen mã hóa kháng nguyên p72 được cắt bằng cặp enzyme cắt giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI và chèn vào vector pRTRA-pII đã mở vòng tại vị trí của 2 enzyme tương ứng bằng phản ứng ghép nối của enzyme ligase. Sau khi biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào khả biến *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt, vi khuẩn được cấy trải trên môi trường LB agar có bổ sung kháng sinh Carbenicillin chọn lọc ở 37° C trong khoảng 18 giờ. Dòng khuẩn mang vector tái tổ hợp pRTRA-p72-pII được chọn lọc bằng phản ứng colony-PCR với kích thước đoạn khuếch đại khoảng 1,2 kb (xem Hình 3.1A) và xử lý với enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI cho thấy các khuẩn lạc được chọn đều chứa vector tái tổ hợp mong muốn với kích thước đoạn gen mã hóa kháng nguyên là 0,6 kb đúng với tính toán lý thuyết (xem Hình 3.1B).



Hình 3.1: Hình ảnh điện di. (A): sản phẩm colony-PCR các khuẩn lạc 1-4, (B): sản phẩm cắt pRTRAp72-pII được tách từ 3 khuẩn lạc 1, 2, 3 bằng enzyme giới hạn *Bam*HI và *Psp*OMI. M: thang chuẩn ADN

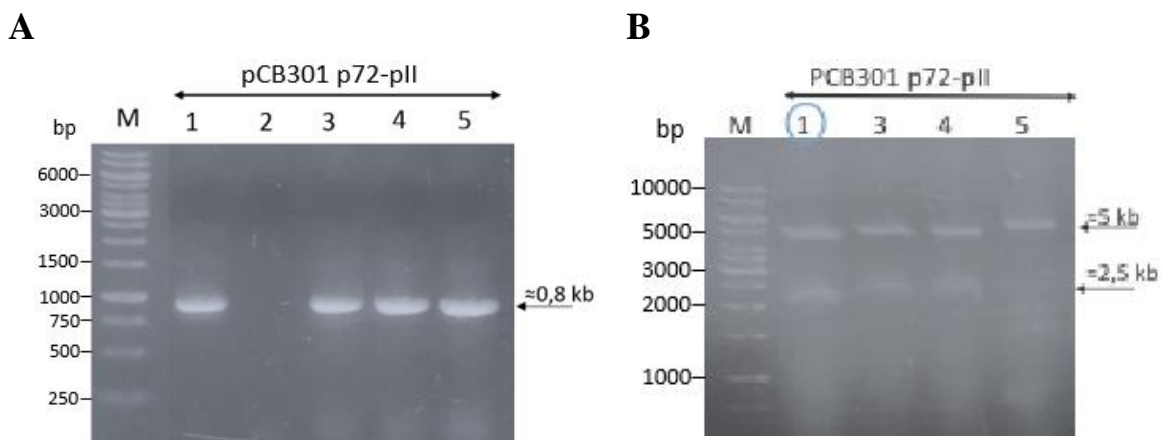
Điều này chứng tỏ vector tách dòng pRTRAp72-pII đã được thiết kế thành công. Tiếp theo, để tạo vector biểu hiện pCB301-p72-pII thì plasmid pRTRA-p72-pII được xử lý bằng enzyme *Hind*III và sản phẩm được điện di trên gel agarose 1% để thu cassette biểu hiện có kích thước khoảng 1,5 kb (xem Hình 3.2) bằng cách thổi gel sử dụng kit tinh sạch ADN AccuPrep Gel

Purification Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất và đoạn gen này được ghép nối vào khung vector pCB301, cũng được xử lý bằng enzyme tương tự.

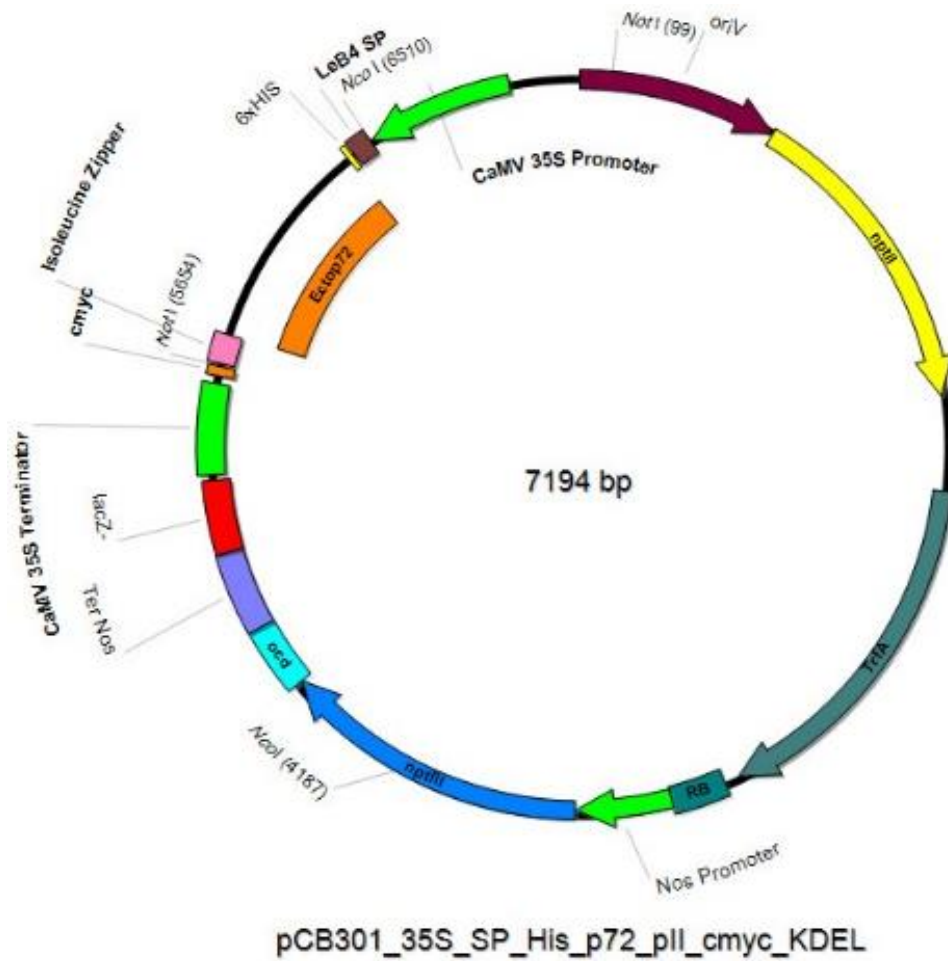


Hình 3.2: Kết quả cắt vector pRTRAp72-pII bằng enzyme *Hind*III

Sau khi biến nạp vector pCB301 tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* bằng phương pháp sốc nhiệt, huyền phù tế bào sẽ được cấy trải trên môi trường LB agar có bổ sung Kanamycin và ủ trong tủ ấm 37° C trong khoảng 18 giờ. Dòng khuẩn mang vector pCB301 tái tổ hợp được xác nhận bằng phản ứng colony-PCR với kích thước đoạn khuếch đại khoảng 0,8 kb (xem Hình 3.3A) và chọn lọc bằng cách xử lý với enzyme *Nco*I. Kết quả cắt bằng enzyme giới hạn *Nco*I cho thấy plasmid của các khuẩn lạc 1, 3, 4 được chọn đều có 2 băng tương ứng với kích thước khoảng 2,5 kb và 5 kb, đúng với tính toán lý thuyết, trong đó khuẩn lạc số 1 được lựa chọn do có băng vạch đậm hơn (xem Hình 3.3B), như vậy, vector biểu hiện pCB301 mang gen mã hóa p72-pII đã được thiết kế thành công có sơ đồ như Hình 3.4.



Hình 3.3: Kết quả điện di thiết kế vector biểu hiện. (A): sản phẩm colony-PCR các khuẩn lạc 1-5, (B): sản phẩm cắt pCB301p72-pII của khuẩn lạc 1, 3, 4, 5 bằng enzyme giới hạn *Nco*I, M: thang chuẩn ADN



Hình 3.4: Sơ đồ vector pCB301p72-pII tái tổ hợp

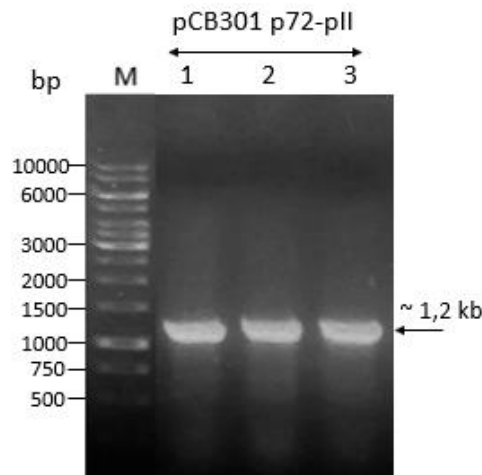
Vector biểu hiện pCB301-p72-pII được tách từ chủng *E. coli* G10 bằng kit DNA-spin TM Plasmid DNA Purification Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất sẽ được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* AGL1, huyền phù vi khuẩn được trải trên môi trường LB agar bổ sung Kanamycin, Carbenicillin, Rifampicin và được ủ trong tủ ấm 28°C trong 2 ngày, những dòng khuẩn dương tính được chọn bằng colony-PCR có kích thước đoạn khuếch đại khoảng 1,2 kb (xem Hình 3.5) được sử dụng để biến nạp vào cây thuốc lá. Kết quả giải trình tự gen cho thấy chủng *A. tumefaciens* AGL1 dương tính chứa trình tự mã hóa Ectodomain của p72 như sau:

```

ATTCACAATCTTTTTGTGAAGAGGGTGAGATTTTCTCTTATTAGGG
TGCATAAGACACAAGTGACACATACAAACAACAACCACCATGATG
AAAACTTATGTCTGCACTTAAATGGCCTATCGAATACATGTTTCAT
TGGTCTTAAGCCAACTTGAATATTTCTGACCAGAACCCTCACCAG

```

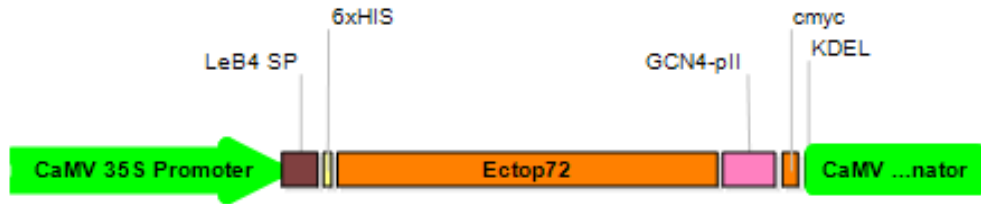
CATAGAGACTGGCACAAATTCGGTCACGTGGTGAATGCAATCATG
 CAGCCTACACACCACGCAGAGATTTTCATTCCAAGATAGAGATACT
 GCTCTTCCAGATGCATGCTCTTCTATCTCAGATATTTACACCAGTTAC
 ATATCCAATTACATTGCCAATCATTAAGAATATTTTCAGTGACTGCA
 CATGGAATCAATCTTATTGACAAGTTCCCATCTAAATTTTGTTCCTC
 TTATATTCCTTTTCACTATGGTGGAAACGCTATTAAGACTCCAGAC
 GACCCGGGTGCTATGATGATCACATTCGCACTTAAGCCAAGGGAG
 GAGTATCAGCCTTCTGGACACATCAACGTGTCAAGAGCTAGAGAA
 TTTTATATCTCTTGGGATACTGACTACGTGGGTTCTATCACAACCTG
 CTGACCTTGTGGTGTCTGCTTCTGCTATCAACTTTTTGTTGTTGCAG
 AACGGTTCTGCTGTG.



Hình 3.5: Điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuẩn lạc được khuếch đại từ chủng *A. tumefaciens* AGL1

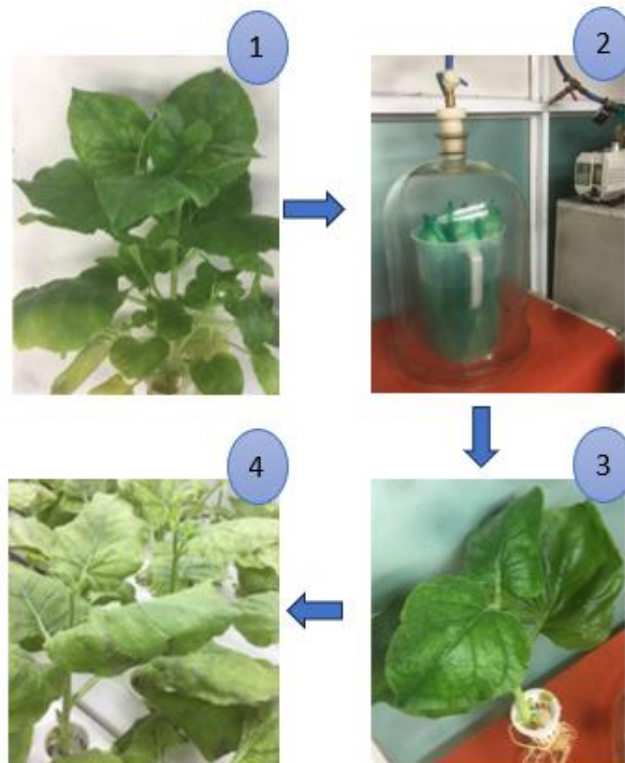
3.2. Nghiên cứu biểu hiện protein p72 của virus gây bệnh dịch tả lợn châu Phi trên cây thuốc lá

Để biểu hiện hiệu quả p72 trong tế bào thực vật, trình tự mã hóa Ectodomain của p72 được tạo dòng trong cấu trúc biểu hiện như trong Hình 3.6. Protein p72 tái tổ hợp dưới sự kiểm soát của promoter CaMV 35S bao gồm motif trimer hóa (GCN4-pII), c-myc tag cho xác định protein đích thông qua thử nghiệm Western blot, 6x-His tag dùng để tinh sạch protein thông qua phương pháp sắc ký ái lực và xác định protein đích thông qua thử nghiệm Western blot, peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa (LeB4 SP) và motif KDEL ở đầu cuối C giúp cho việc giữ sản phẩm protein tái tổ hợp ở lưới nội chất.



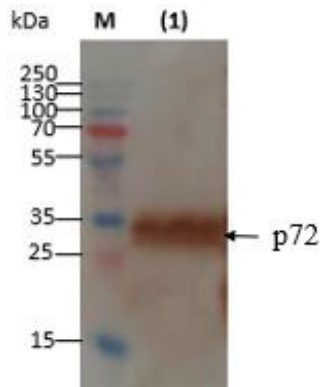
Hình 3.6: Cấu trúc biểu hiện phần Ectodomain của protein p72. CaMV 35S Promoter: promoter 35S của Cauliflower mosaic virus (CaMV), LeB4 SP: peptide tín hiệu từ cây đậu răng ngựa, 6xHIS: đuôi his-tag, Ectop72: một phần trình tự của p72, GCN4-pII: motif trimer hóa, cmyc: đuôi c-myc, KDEL: peptide định hướng tích lũy ở lưới nội chất hạt, CaMV 35S Terminator: terminator từ CaMV

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium* trong đệm MES được đưa vào lá bằng phương pháp agroinfiltration hút chân không, sau khi biến nạp lá cây chuyển từ màu xanh nhạt sang màu xanh đậm (xem Hình 3.7). Quan sát bằng mắt thường nếu lá cây biểu hiện protein ngoại lai sẽ chuyển sang màu vàng ở phần thịt lá, mô lá không bị hoại tử chứng tỏ nồng độ vi khuẩn $OD_{600} = 0,85$ là thích hợp và protein mục tiêu không gây độc cho lá (xem Hình 3.7).



Hình 3.7: Biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá bằng phương pháp agroinfiltration. (1) Cây thuốc lá 4 tuần tuổi => (2) Biến nạp bằng agroinfiltration => (3) Cây ngay sau khi biến nạp => (4) Cây sau 5 ngày biến nạp

Sau 5 ngày kể từ khi biến nạp, lá cây được thu hoạch để kiểm tra mức độ biểu hiện, kết quả cho thấy p72 đã được biểu hiện trong mô lá tương ứng với băng có kích thước 35 kDa khi thực hiện thử nghiệm lai miễn dịch Western blot với kháng thể sơ cấp kháng His-tag (xem Hình 3.8).



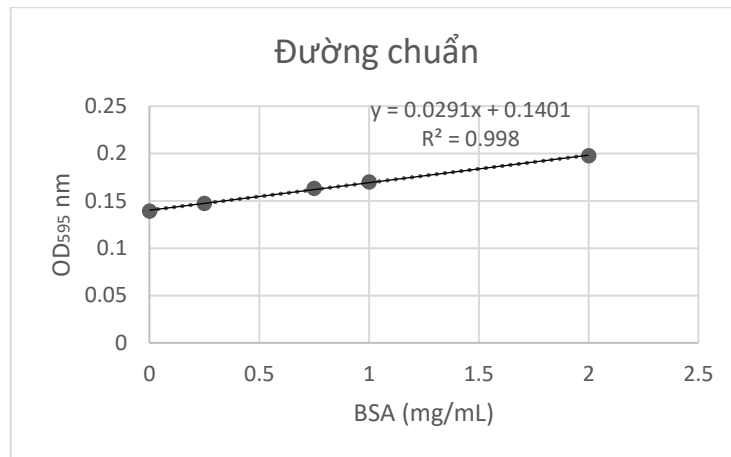
Hình 3.8: Kiểm tra khả năng biểu hiện bằng thử nghiệm Western blot.
M : thang chuẩn protein, (1) : mẫu kiểm tra biểu hiện

Phương pháp agroinfiltration hút chân không đã được thực hiện thành công khi protein chỉ thị GFP phát huỳnh quang xanh được biểu hiện sau 6 ngày biến nạp trên *N. benthamiana* [57]. Hơn nữa, phương pháp agroinfiltration hút chân không cũng đã được sử dụng để biểu hiện tạm thời kháng nguyên COE (CO-26K-equivalent) của PEDV (porcine epidemic diarrhea virus) [90] hay kháng nguyên H7 của H7N9 [54] và đã cho kết quả đáp ứng miễn dịch tốt. Kết quả đã cho thấy protein p72 đã được biểu hiện thành công trên cây thuốc lá *N. benthamiana*. Protein tái tổ hợp được biểu hiện trong khoảng 7 ngày kể từ khi thiết kế được gen chuyển. Phương pháp agroinfiltration hút chân không có hiệu quả cao hơn phương pháp agroinfiltration sử dụng xy lanh khi mà toàn bộ mô lá được biến nạp trong 2 phút và lên tới 5 cây được biến nạp trên một lần, điều này giúp rút ngắn thời gian và tăng hiệu quả biểu hiện. Công nghệ agroinfiltration hút chân không đã được sử dụng bởi các công ty công nghệ sinh học để chuyển gen trên quy mô lớn, ví dụ hàng tấn lá *N. benthamiana* biến nạp được tạo ra mỗi giờ nhờ công nghệ này bởi công ty Kentucky Bioprocessing [94].

3.3. Khảo sát điều kiện tách chiết protein từ thực vật

Đầu tiên, đường chuẩn BSA được dựng với các nồng độ 0 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,75 mg/mL; 1 mg/mL và 2 mg/mL theo công thức: 799 μ L dH₂O +

200 μL thuốc thử Pierce Bradford Plus Protein Assay Reagent + 1 μL mẫu, phản ứng diễn ra trong 10 phút và độ hấp thụ quang ở bước sóng 595 nm được đo bằng máy Multiskan SkyHigh. Đường chuẩn BSA dựng được có giá trị $R^2 = 0,998$ (xem Hình 3.9) và được dùng để xác định protein tổng số của mẫu chiết thực vật bằng phương pháp Bradford.



Hình 3.9: Đường chuẩn BSA

Hai loại đệm chiết khác nhau ở thành phần axit ascorbic và sodium metabisulfite được sử dụng để khảo sát điều kiện tách chiết p72 từ thuốc lá. Kết quả cho thấy, lượng protein tổng số thu được khi sử dụng đệm chiết 1 không khác nhau đáng kể ($P < 0,01$) so với sử dụng đệm chiết 2 (xem Bảng 3.1).

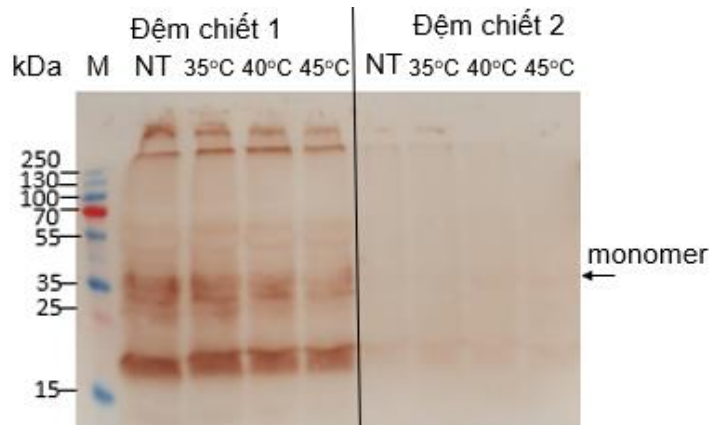
Bảng 3.1: Hàm lượng protein tổng số ở trong đệm chiết khác nhau

Thí nghiệm	Giá trị OD trung bình	Hàm lượng protein tổng số (mg/mL)
Đệm chiết 1	0.1628 ^a ± 0,0044	3,12
Đệm chiết 2	0,1626 ^a ± 0,0048	3,09

Ghi chú: các giá trị có cùng chữ cái thì khác nhau không đáng kể

Tuy nhiên, khi điện di SDS-PAGE dịch chiết thu được bằng đệm 1, 2 và thực hiện Western blot thì kết quả cho thấy protein p72 được chiết bằng đệm 1 cho băng vạch rõ nét hơn so với chiết bằng đệm 2 (xem Hình 3.10). Điều này là do acid ascorbic và sodium metabisulfite trong đệm 1 đã ngăn cản sự hình thành polyphenol thông qua sự ức chế hoạt động của enzyme polyphenol oxidase [95]–[97]. Polyphenol có ảnh hưởng đáng kể lên thành phần

polypeptide của protein, khi tách chiết protein cùng với các hợp chất phenolic thì tương tác protein-phenolic làm tăng khối lượng phân tử protein điều này làm cho protein không thể đi vào phần gel tách do đó không xuất hiện băng vạch [98], hơn nữa một số hợp chất polyphenol còn làm tăng khả năng hình thành trạng thái kết tủa của protein dẫn đến sự thất thoát protein trong quá trình tinh sạch hoặc làm cho kích thước protein quá lớn dẫn tới không xuất hiện băng vạch [99]. Một lý do khác là polyphenol án ngữ protein p72 làm cho p72 không gắn được với kháng thể sơ cấp dẫn đến không thể phát hiện được bằng phản ứng lai miễn dịch Western blot [100]. Vì vậy, đệm chiết 1 được sử dụng để tách chiết protein p72 từ thuốc lá.



Hình 3.10: Kiểm tra khả năng tách chiết của đệm chiết bằng thử nghiệm Western blot. M: thang chuẩn protein, NT: không xử lý nhiệt

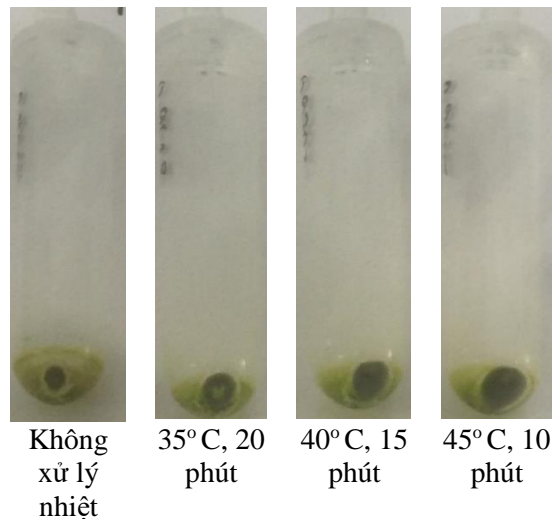
Sau khi tách chiết bằng đệm chiết 1, dịch chiết được xử lý ở các khoảng nhiệt độ khác nhau. Kết quả cho thấy nhiệt độ khác nhau không làm ảnh hưởng đến lượng protein tổng số thu được ($P < 0,01$), xem Bảng 3.2.

Bảng 3.2: Hàm lượng protein tổng số trong dịch chiết khi xử lý ở các khoảng nhiệt độ khác nhau

Thí nghiệm	Giá trị OD trung bình	Hàm lượng protein tổng số (mg/mL)
Không xử lý nhiệt	0.1628 ^a ± 0,0044	3,12
35° C, 20 phút	0,1638 ^a ± 0,0022	3,26
40° C, 15 phút	0,1596 ^a ± 0,0052	2,68
45° C, 10 phút	0,1588 ^a ± 0,0052	2,57

Ghi chú: các giá trị có cùng chữ cái thì khác nhau không đáng kể

Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ thì lượng mảnh vụn tế bào và bào quan bị kết tủa càng nhiều (xem Hình 3.11). Khi xử lý ở 45° C, mảnh vụn tế bào kết tủa nhiều nhất, điều này làm giảm thời gian và tăng hiệu quả tinh sạch protein khi mà yêu cầu cần phải loại bỏ hoàn toàn mảnh vụn tế bào và bào quan ra khỏi dịch chiết thực vật. Các nghiên cứu trước đó cho thấy rằng hiệu quả tinh sạch protein tái tổ hợp từ cây thuốc lá được tăng cường bằng cách kết tủa hầu hết protein tế bào chủ. Bằng chứng cho thấy nhiệt độ càng cao thì phần trăm protein hòa tan tổng số trong dịch chiết kết tủa càng nhiều và có thể kết tủa 58% protein hòa tan tổng số khi xử lý 60° C trong 30 phút ở pH thấp [101]. Cách xử lý nhiệt độ cao như trên chỉ áp dụng với các protein tái tổ hợp bền nhiệt, do protein p72 tái tổ hợp nhạy cảm với nhiệt độ nên chúng chỉ được xử lý ở 35° C - 45° C và kết quả cũng đã kết tủa đáng kể các bào quan và mảnh vụn tế bào. Vì protein p72 có thể kết tủa cùng các mảnh vụn của bào quan nên hàm lượng p72 có xu hướng giảm dần khi xử lý nhiệt độ càng cao tương ứng với băng vạch có màu nhạt dần khi thử nghiệm Western blot (xem Hình 3.10), nhưng để tăng hiệu quả tinh sạch protein thì xử lý nhiệt độ 45° C nên được áp dụng.

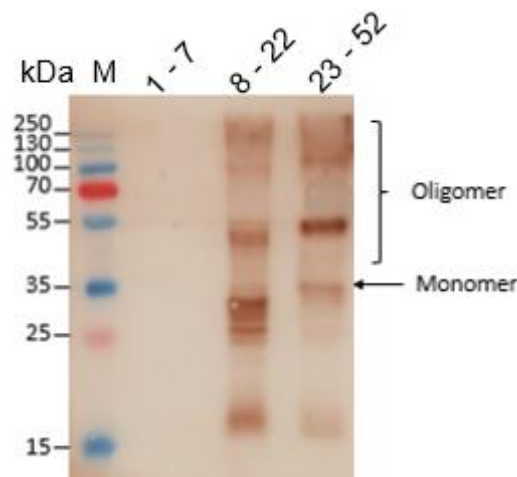


Hình 3.11: Mảnh vụn tế bào và bào quan kết tủa sau khi xử lý nhiệt

3.4. Tinh sạch và xác định mức độ polymer hóa của protein p72 tái tổ hợp

Protein tái tổ hợp thường được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký ái lực dựa vào đuôi hexahistidine [102], ở đó ion kim loại hóa trị 2 như Ni^{2+} được cố định lên ma trận keo sử dụng tác nhân tạo phức như nitrilotriacetic acid (NTA) sẽ tạo ái lực với histidine. Protein tái tổ hợp sau khi được tinh sạch lần một

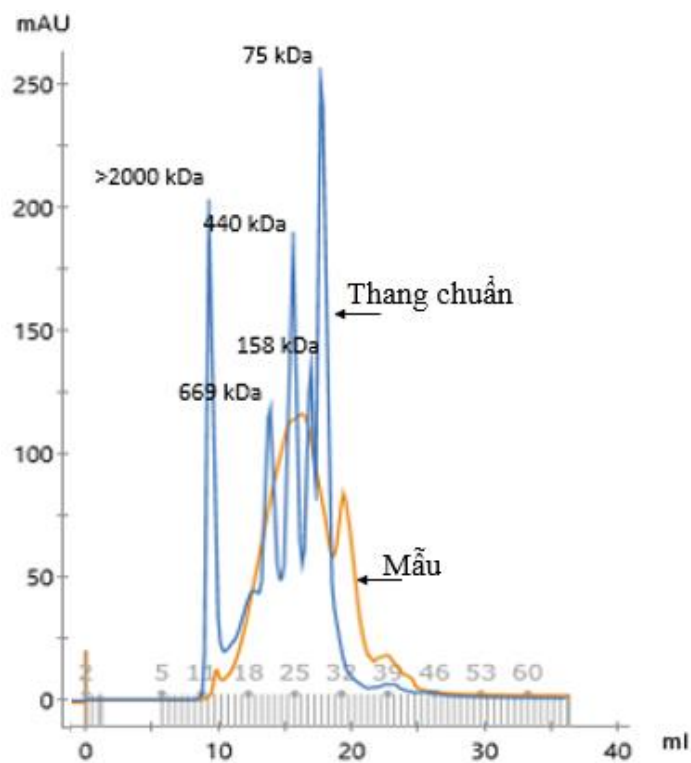
bằng Ni-NTA agarose resin sẽ được chảy qua cột His Trap HP với tốc độ 0,5 mL/phút. Protein không bám cột sẽ được rửa bằng đệm Binding 1x, pH 7,4. Cuối cùng, protein đích được thu nhận bằng cách rửa giải với đệm Binding 1x có bổ sung 500 mM imidazole (pH 7,4) theo 52 phân đoạn. Nồng độ protein ở các phân đoạn được xác định bằng khả năng hấp thụ tia UV ở bước sóng 280 nm, giá trị UV trên giản đồ càng cao chứng tỏ nồng độ protein ở phân đoạn tương ứng càng cao. Theo sắc ký đồ, protein bắt đầu được rửa giải khỏi cột từ phân đoạn 8 và phần lớn protein được rửa giải khỏi cột từ phân đoạn 8 – 22 tương ứng với đỉnh trên sắc ký đồ, với giá trị UV cao nhất là 1.200 mAU. Lượng protein còn lại được rửa giải khỏi cột với giá trị UV = 200 mAU từ phân đoạn 23 đến 52. Các phân đoạn được gộp tương ứng với mẫu 1: phân đoạn 1 – 7, mẫu 2: phân đoạn 8 – 22, mẫu 3: phân đoạn 23 – 52 và được kiểm tra bằng thử nghiệm Western blot để xác định nồng độ và protein đích. Mẫu 1 không xuất hiện băng vạch chứng tỏ không có protein đích tương ứng với giá trị UV = 0 mAU. Vì nồng độ protein trong các phân đoạn từ 23 – 52 thấp nên mẫu số 3 được cô đặc lại để thuận tiện cho thực hiện Western blot. So sánh mẫu số 2 và số 3 ta thấy mẫu số 2 không được cô đặc nhưng vẫn cho tín hiệu băng vạch đậm nét gần bằng với mẫu số 3 đã được cô đặc (xem Hình 3.12), chứng tỏ nồng độ protein trong mẫu số 2 cao hơn số 3 tương ứng với giá trị UV trên sắc ký đồ.



Hình 3.12: Kiểm tra khả năng tinh sạch bằng thử nghiệm Western blot.

Mẫu protein p72 tinh sạch được kiểm tra trạng thái polymer hóa bằng phương pháp sắc ký lọc gel. Mẫu được đưa vào chạy sắc ký lọc gel qua cột Superose 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Mỹ) với tốc độ dòng là 0,5 ml/phút, kết quả thu được 60 phân đoạn từ 1 - 60 với thể tích 0,5 mL/phân đoạn.

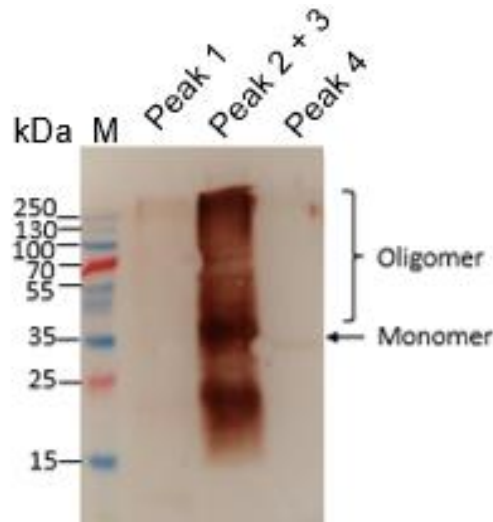
Protein qua cột được đo bởi thiết bị giám sát UV ở bước sóng 280 nm, nồng độ protein càng cao thì tín hiệu hấp thụ UV càng lớn. Đồ thị Hình 3.13 cho thấy đường màu cam biểu thị giá trị UV của mẫu p72 còn đường màu xanh biểu thị thang chuẩn protein gồm các protein chuẩn có khối lượng phân tử cao (75 – 2.000 kDa) tương ứng. Sắc ký đồ cho thấy protein có 4 đỉnh: đỉnh 1 (phân đoạn 11 – 14), đỉnh 2 (phân đoạn 15 - 30), đỉnh 3 (phân đoạn 31 - 35), đỉnh 4 (phân đoạn 36 - 46), mỗi đỉnh khác nhau tương ứng với protein có khối lượng phân tử khác nhau.



Hình 3.13: Sắc ký đồ giá trị UV ở các phân đoạn khác nhau của mẫu và thang chuẩn

Thử nghiệm Western blot kiểm tra protein sau khi chạy SEC cho thấy đỉnh 1 tương ứng với trạng thái đa phân (aggregates) của protein, có khối lượng phân tử cao, nhưng vì nồng độ protein thấp nên băng vạch bắt màu nhạt. Đỉnh 2 và 3 tương ứng với trạng thái oligomer và trimer của protein p72, để thuận tiện cho việc sử dụng protein ở các thí nghiệm sau nên các phân đoạn tương ứng với đỉnh 2 và 3 được gộp lại với nhau, do diện tích của 2 đỉnh này lớn nhất nên lượng protein thu được cũng cao tương ứng và cho băng vạch đậm nét. Đỉnh 4 tương ứng với trạng thái monomer có kích thước 35 kDa, do nồng độ thấp nên cho băng vạch bắt màu nhạt (xem Hình 3.14). Protein p72 tái tổ hợp

biểu hiện với khối lượng phân tử kỳ vọng trong khoảng 35 – 105 kDa chứng tỏ phần Ectodomain liên hợp với motif trimer hóa (GCN4-pII) đã được biểu hiện thành công trên thuốc lá tạo trạng thái oligomer. Các nghiên cứu trước đó đã cho thấy cấu trúc biểu hiện liên hợp motif GCN4-pII với phần Ectodomain của protein HA chủng H5N1 [53], kháng nguyên COE của PEDV [103] cũng đã được biểu hiện tốt trên *N. benthamiana*.



Hình 3.14: Kiểm tra protein đích sau khi chạy sắc ký lọc gel bằng thử nghiệm Western blot

3.5. Nghiên cứu tạo phức hợp nano silica gắn protein p72

Khả năng gắn protein p72 của hạt nano silica chứa các nhóm chức khác nhau (-COOH, -NH₂, -CHO) có kích thước 60 nm với nồng độ 4 mg/mL được xác định dựa trên lượng protein còn dư sau phản ứng gắn kết. 307,5 µg protein được gắn với 320 µg hạt nano silica mỗi loại ở 4°C. Sau khi gắn, phức hệ nano-p72 được thu lại bằng cách ly tâm ở 13.000 rpm, hàm lượng protein dư không gắn hạt còn lại trong dịch nổi được xác định bằng cách đo quang phổ theo phương pháp Bradford. Phức hệ hạt nano gắn p72 tạo ra được chụp ảnh bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Kết quả cho thấy cả ba loại hạt nano đều có khả năng gắn với protein như nhau ($P < 0,01$), trong khoảng 270,7-282,9 µg protein trên 320 µg hạt nano silica khi mà hàm lượng protein còn lại trong dịch nổi sau khi ly tâm thu phức hệ nano-protein là khác nhau không đáng kể, với lượng protein còn dư trong thí nghiệm đối với SiO₂-COOH, SiO₂-CHO, SiO₂-NH₂ lần lượt là $24,6 \pm 13,4$ µg; $35,7 \pm 36,0$ µg và $36,8 \pm 12,2$ µg (xem Bảng

3.3). Như vậy, protein có thể dễ dàng cố định lên bề mặt hạt nano silica để hình thành phức hệ nano-protein có hoạt tính sinh học.

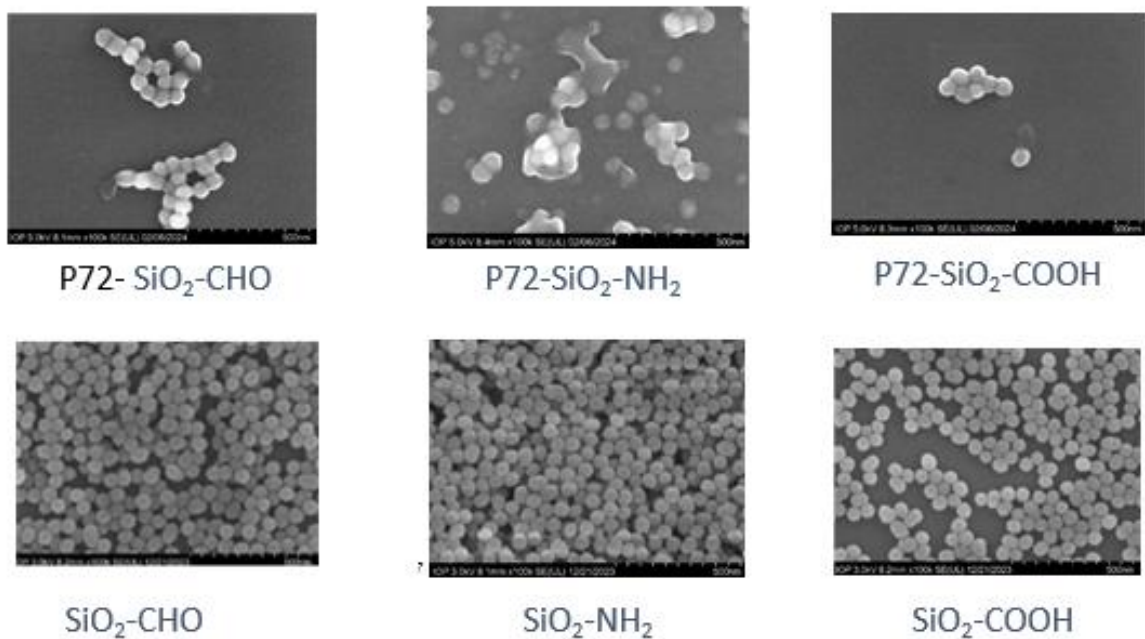
Bảng 3.3: Khảo sát hàm lượng protein gắn với các hạt nano

Thí nghiệm	Hàm lượng protein ban đầu (µg)	Hàm lượng protein dư (µg)	Hàm lượng protein gắn hạt (µg)
SiO ₂ -COOH	307,5	24,6 ^a ± 13,4	282,9
SiO ₂ -NH ₂	307,5	36,8 ^a ± 12,2	270,7
SiO ₂ -CHO	307,5	35,7 ^a ± 36,0	271,8

Ghi chú: các giá trị có cùng chữ cái thì khác nhau không đáng kể

Phản ứng liên kết chéo giữa hạt nano chứa nhóm chức với protein xảy ra là do hai chất xúc EDC.HCl và NHS. Trong dung dịch, EDC phản ứng với nhóm chức -COOH để tạo nên sản phẩm trung gian o-acylisourea. Sản phẩm này tương tác với nhóm -NH₂ để hình thành liên kết amide cộng hóa trị bền chắc. Tuy nhiên, phản ứng giữa o-acylisourea với gốc amine diễn ra chậm và sản phẩm trung gian dễ bị thủy phân trong nước, do đó NHS được sử dụng để hỗ trợ khả năng xúc tác của EDC. Ngoài sự cố định protein lên bề mặt hạt nano thì phản ứng liên kết chéo còn xảy ra giữa các phân tử protein với nhau để hình thành trạng thái đa phân. Lipase tuyến tụy của lợn được cố định lên hạt nano từ tính phủ silica có nhóm chức carboxyl nhờ cặp xúc tác EDC/NHS đã cho thấy độ hoạt động enzyme, sự ổn định về nhiệt, độ bền của Lipase được cố định vượt trội hơn hẳn với enzyme ở trạng thái tự do [104]. Tác nhân liên kết chéo EDC và NHS đã cho thấy hiệu quả trong việc liên kết các phân tử collagen loại I để tạo sợi collagen [105]. Phương pháp liên kết chéo bằng EDC và NHS đã tạo ra mật độ liên kết chéo thấp hơn so với các phương pháp liên kết chéo bằng vật lý (xử lý dehydrothermal) và hóa học khác (dựa trên glutaraldehyde) nhưng nó đã cho thấy đáp ứng sinh học tốt [106] không như một số phương pháp khác làm kích thích phản ứng viêm và hoạt tính sinh học giảm [107]. Để kiểm tra xác nhận sự gắn kết giữa protein và hạt nano, hình ảnh hạt nano gắn protein được chụp bằng kính hiển vi điện tử quét cho thấy protein liên kết và bao phủ bề mặt hạt nano tạo thành lớp màng trắng, khác với hạt nano đối chứng tương ứng không gắn protein (xem Hình 3.15). Như vậy, cả ba loại hạt đều có khả năng

gắn tốt với protein nhưng trong khuôn khổ đề tài chỉ có hạt $\text{SiO}_2\text{-COOH}$ được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.15: Hình ảnh phức hợp protein p72-nano silica dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM)

Nhiệt độ 4°C và 28°C được khảo sát để kiểm tra khả năng gắn kết và độ ổn định của phức hệ nano-p72. Kết quả cho thấy nhiệt độ không ảnh hưởng đến khả năng hình thành liên kết chéo ($P < 0,01$) (xem Bảng 3.4). Bản chất tự nhiên của kháng nguyên tái tổ hợp quyết định sự ổn định của nó ở các nhiệt độ và pH khác nhau [108]. Để tránh ảnh hưởng đến protein tinh sạch khi ủ ở nhiệt độ cao trong thời gian dài cho nên phản ứng gắn kết được thực hiện ở 4°C .

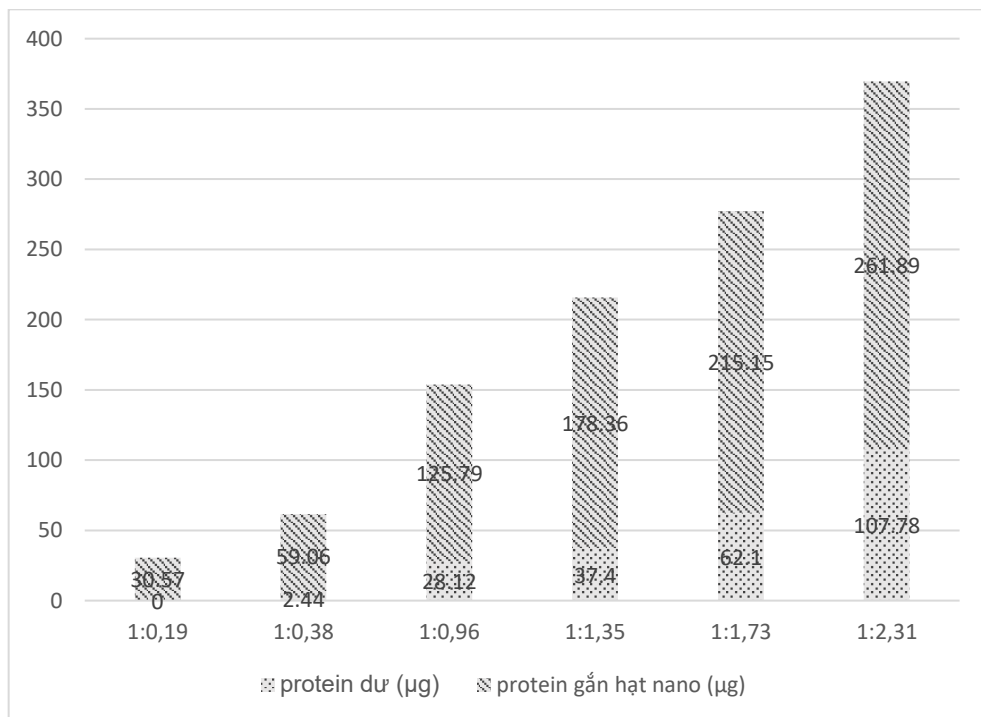
Bảng 3.4: Hàm lượng protein gắn với hạt $\text{SiO}_2\text{-COOH}$ ở các nhiệt độ khác nhau

Thí nghiệm	Hàm lượng protein ban đầu (μg)	Hàm lượng protein dư (μg)	Hàm lượng protein gắn hạt (μg)
4°C	307,5	$6.5^a \pm 12,6$	301
28°C	307,5	$0^a \pm 0$	307,5

Ghi chú: các giá trị có cùng chữ cái thì khác nhau không đáng kể

Tỷ lệ hạt nano:protein (w/w) như 1:0,19; 1:0,38; 1:0,96; 1:1,35; 1:1,73; 1:2,31 được khảo sát để xác định mức độ gắn protein của hạt nano $\text{SiO}_2\text{-COOH}$.

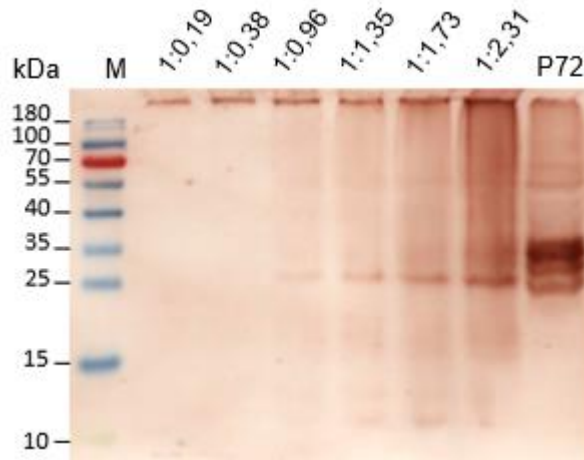
Kết quả cho thấy khi lượng protein càng tăng thì lượng kết lắng sau ly tâm càng cao và lượng protein trong dịch nổi càng nhiều (xem Hình 3.16). Kết quả này là do sau khi hạt nano đã gắn bão hòa với protein thì các protein còn dư lại gắn kết với nhau tạo trạng thái đa phân có kích thước lớn lắng xuống cùng phức hệ nano-protein trong quá trình ly tâm. Tỷ lệ 1:0,19 có diện tích bề mặt hạt nano lớn tạo không gian cho toàn bộ protein gắn kết với hạt và không còn lượng protein dư thừa trong dịch nổi ly tâm. Từ tỷ lệ 1:0,38 hạt nano bắt đầu gắn kết bão hòa protein và xuất hiện protein dư thừa trong dịch nổi ly tâm với lượng 2,44 μg trên 61,5 μg protein tổng số được bổ sung vào ban đầu (xem Hình 3.16).



Hình 3.16: Đồ thị biểu thị lượng protein gắn hạt và protein còn dư ở các tỷ lệ hạt nano:protein (w/w) khác nhau

Kết quả điện di SDS-PAGE và Western blot phân lắng cặn sau ly tâm cũng cho kết quả tương tự như phân tích trên khi mà ở tỷ lệ 1:0,19 và 1:0,38 lượng hạt gắn toàn bộ protein dẫn đến phức hệ nano-protein có kích thước lớn và không đi vào được phần gel tách tương ứng với giếng (1) và (2) trong bản điện di (xem Hình 3.17). Từ tỷ lệ 1:0,96 trở đi lượng protein tự gắn kết với nhau tạo thành các trạng thái đa phân khác nhau bắt đầu tăng tạo thành các băng vạch có màu đậm dần từ giếng (3)-(6) trong khi giếng số (7) protein tồn tại

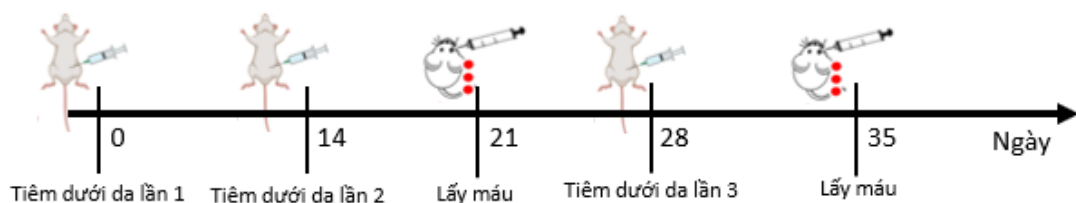
hiều ở trạng thái đơn phân (35 kDa). Như vậy, 1 g hạt nano SiO₂-COOH với kích thước 60 nm có thể gắn tối đa với 0,38 g protein.



Hình 3.17: Thử nghiệm Western blot khảo sát tỷ lệ gắn hạt nano silica với protein p72

3.6. Đánh giá tính sinh miễn dịch của protein tái tổ hợp

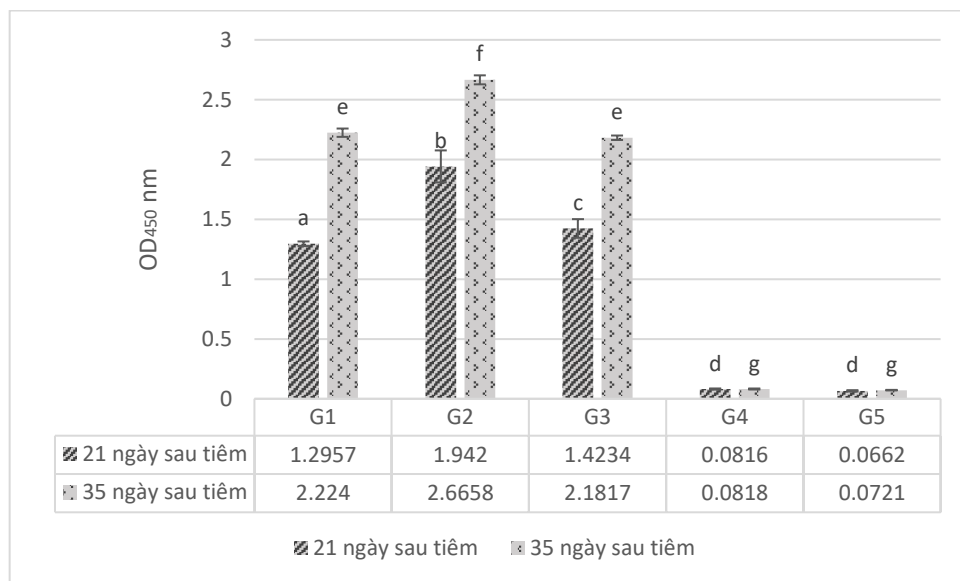
Chuột BALB/c được chia thành 5 nhóm thí nghiệm (5 con/ nhóm): nhóm G1 tiêm 5 μ g protein p72, nhóm G2 tiêm 5 μ g phức hệ hạt nano silica gắn p72, nhóm G3 tiêm 2,5 μ g phức hệ hạt nano gắn p72, nhóm G4 tiêm hạt nano silica, nhóm G5 tiêm đối chứng đệm PBS. Huyết thanh chuột 1 tuần sau khi tiêm mũi 2 và mũi 3 được sử dụng để xác định mức độ đáp ứng kháng thể IgG của mỗi nhóm chuột (xem Hình 3.18).



Hình 3.18: Sơ đồ thí nghiệm trên chuột

Kết quả phản ứng ELISA gián tiếp cho thấy rằng sau 1 tuần tiêm mũi số 2 chuột thuộc nhóm G2 có mức độ kháng thể IgG trong máu với giá trị OD₄₅₀ = 1,9420 \pm 0,1339 cao hơn đáng kể so với nhóm G1 và G3 có giá trị OD₄₅₀ lần lượt là 1,2957 \pm 0,0193 và 1,4234 \pm 0,0781 ($P < 0,01$). Hơn nữa, nhóm chuột G3 có lượng kháng thể trong máu cao hơn đáng kể so với nhóm chuột G1 (xem Hình 3.19). Đặc biệt, chuột được tiêm hạt nano silica không gắn protein tái tổ hợp và chuột được tiêm đệm PBS đều không tạo kháng thể IgG trong máu đặc

hiệu protein đích với giá trị OD₄₅₀ thấp hơn hẳn so với các nhóm còn lại (xem Hình 3.19). Sau khi tiêm mũi 3, kháng thể IgG được tăng cường ở cả 3 nhóm G1, G2, G3 lần lượt với giá trị OD₄₅₀ là $2,224 \pm 0,0348$; $2,6658 \pm 0,0376$; $2,1817 \pm 0,0186$. Nhóm chuột tiêm 5 μg phức hệ nano gắn protein có lượng kháng thể IgG vẫn cao hơn đáng kể so với nhóm chuột được tiêm protein tái tổ hợp hoặc được tiêm phức hệ nano gắn protein nhưng với lượng thấp hơn, trong khi nhóm chuột G1 có mức kháng thể IgG bằng với nhóm chuột G3. Sau cả 3 lần tiêm, 2 nhóm chuột đối chứng G4 và G5 đều không sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu.



Hình 3.19: Tính sinh miễn dịch của các nhóm kháng nguyên khác nhau

Để tăng cường đáp ứng miễn dịch của vaccine tiêu đơn vị, kháng nguyên thường được gắn lên bề mặt hạt nano để cải thiện mức độ đáp ứng miễn dịch dịch thể và miễn dịch trung gian tế bào [109]. Nghiên cứu trước đó đã cho thấy hạt nano kim cương gắn kháng nguyên H7 đã kích thích đáp ứng IgG đặc hiệu kháng nguyên cao hơn 15,4 lần so với tiêm kháng nguyên không gắn hạt sau lần tiêm số 2 [54]. Hơn nữa, kháng nguyên của SARS-CoV-2 kết hợp với hạt nano silica đã kích thích đáp ứng miễn dịch dịch thể đặc hiệu kháng nguyên mạnh hơn so với protein đơn lẻ [109]. Ngoài ra, theo nghiên cứu của Barbey và cộng sự [109]: hạt nano silica gắn kháng nguyên SARS-CoV-2 với kích thước 100 nm là tối ưu cho vận chuyển hiệu quả phức hệ miễn dịch vào hạch bạch huyết, độ ổn định của phức hệ nano silica-kháng nguyên có thể kéo dài ít nhất 4 tháng ở điều kiện bảo quản hoặc trong điều kiện *in vivo*, nhờ việc gắn lên bề

mặt hạt nano mà kháng nguyên dễ dàng được tiếp cận và trình diện bởi tế bào trình diện kháng nguyên, khi tiêm phức hệ nano-kháng nguyên cùng với tá dược monophosphoryl-Lipid A (MPLA) cho thấy đáp ứng tế bào T CD4⁺ mạnh và khả năng trung hòa virus tăng. Tương tự các hạt giả virus, hạt nano silica hình cầu có đính các kháng nguyên bề mặt cụ thể bắt trước cấu trúc tự nhiên của virus, vì vậy, nó được nhận diện tốt hơn bởi hệ thống miễn dịch - kích thích, cấu trúc và cấu hình kháng nguyên lặp lại thúc đẩy đáp ứng miễn dịch được cải thiện so với các cấu trúc bị phân cắt hoặc vaccine tiểu đơn vị tái tổ hợp [6].

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Thu nhận được protein p72 biểu hiện tạm thời trên cây thuốc lá *N. benthamiana* trong thời gian 5 ngày sau biến nạp.
2. Điều kiện thích hợp nhất để tách chiết p72 như sau:
 - Dung dịch đệm chiết 1: Đệm Binding (20 mM Sodium phosphate [0,0151 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ và 0,0049 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] và 500 mM NaCl) pH 7,4; 1% (v/v) Tween 20; 1 mM Ascorbic acid; 2% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$.
 - Xử lý nhiệt ở 45° C trong 10 phút.
3. Phức hệ nano silica-protein có thể được tạo ra ở 4° C dưới sự xúc tác của EDC.HCl và NHS. 1 g hạt nano $\text{SiO}_2\text{-COOH}$ với kích thước 60 nm có thể gắn tối đa với 0,38 g protein.
4. Protein p72 tái tổ hợp có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch trên chuột. Mức độ đáp ứng kháng thể IgG trong máu được tăng cường khi kháng nguyên được gắn với hạt nano silica.

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đánh giá tính sinh miễn dịch và khả năng bảo hộ trên lợn của protein p72 tái tổ hợp định hướng tạo vắc xin phòng bệnh dịch tả lợn châu Phi.

DANH MỤC TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] P. Gómez-Puertas, F. Rodríguez, J. M. Oviedo, A. Brun, C. Alonso, J. M. Escribano, 1998, The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response, *Virology*, 243(2), pp. 461–471.
- [2] J. G. Neilan, L. Zsak, Z. Lu, T. G. Burrage, G. F. Kutish, D. L. Rock, 2004, Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection, *Virology*, 319(2), pp. 337–342.
- [3] J. Rui, Z. Gaiping, B. Yilin, L. Hongliang, C. Yumei, D. Peiyang, Z. Jingming, F. Hua, L. Mingyang, T. Yuanyuan, W. Aiping, 2022, Identification of Linear B Cell Epitopes on CD2V Protein of African Swine Fever Virus by Monoclonal Antibodies, *Microbiology Spectrum*, 10(2), pp. e01052-21.
- [4] H. Zhang, S. Zhao, H. Zhang, Y. Shen, P. Zhang, H. Shan, X. Cai, 2022, Orally administered recombinant Lactobacillus expressing African swine fever virus antigens that induced immunity responses, *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 1103327.
- [5] A. Mazloum, I. U. Zhukov, E. B. Aronova, A. S. Igolkin, N. N. Vlasova, 2019, ASF virus replication features in the presence of recombinant proteins CD2v, pX69R and pE248R, *Voprosy Virusologii*, 64 (4), pp. 193–200.
- [6] M. T. Waheed, J. Gottschamel, S. W. Hassan, A. G. Lössl, 2012, Plant-derived vaccines, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(3), pp. 403–406.
- [7] A. Uthaya Kumar, K. Kadiresen, W. C. Gan, A. P. K. Ling, 2021, Current updates and research on plant-based vaccines for coronavirus disease 2019, *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 10(1), pp. 13–23.
- [8] R. Eustace Montgomery, 1921, On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony), *The Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 34, pp. 159–191.
- [9] V. P. Le, D. G. Jeong, S. Yoon, H. Kwon, T. B. N. Trinh, T. L. Nguyen, T. T. N. Bui, J. Oh, J. B. Kim, K. M. Cheong, V. T. Nguyen, E. Bae, T. T. H. Vu, M. Yeom, W. Na, D. Song, 2019, Outbreak of African Swine Fever, Vietnam, *Emerging Infectious Diseases*, 25(7), pp. 1433–1435.
- [10] R. J. Rowlands, M. M. Duarte, F. Boinas, G. Hutchings, L. K. Dixon, 2009, The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*, *Virology*, 393(2), pp. 319–328.
- [11] J. D. Hemmink, E. M. Khazalwa, H. M. Abkallo, B. Oduor, J. Khayumbi, N. Svitek, S. P. Henson, S. Blome, G. Keil, R. P. Bishop, L. Steinaa, 2022, Deletion of the CD2v Gene from the Genome of ASFV-Kenya-IX-1033 Partially Reduces Virulence and Induces Protection in Pigs, *Viruses*, 14(9).
- [12] Cổng thông tin điện tử Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, FAO dự báo sản lượng thịt thế giới giảm do dịch tả lợn châu Phi.
- [13] Cổng thông tin điện tử Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Ngăn chặn dịch tả lợn châu Phi tại Gia Lai.
- [14] Cổng thông tin điện tử Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, Hà Giang: Bệnh dịch tả lợn châu Phi tiếp tục gây thiệt hại nặng.

- [15] The World Organization of Animal Health, African Swine Fever Situation Report 24.
- [16] G. Andrés, R. García-Escudero, M. L. Salas, J. M. Rodríguez, 2002, Repression of African swine fever virus polyprotein pp220-encoding gene leads to the assembly of icosahedral core-less particles, *Journal Virology*, 76(6), pp. 2654–2666.
- [17] G. Andrés, A. Alejo, J. Salas, M. L. Salas, 2002, African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell, *Journal of Virology*, 76(24), pp. 12473–12482.
- [18] A. Alejo, T. Matamoros, M. Guerra, G. Andrés, 2018, A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle, *Journal of Virology*, 92(23).
- [19] Y. Revilla, D. Pérez-Núñez, J. A. Richt, 2018, African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches, *Advances in Virus Research*, 100, pp. 41–74.
- [20] C. Suárez, J. Gutiérrez-Berzal, G. Andrés, M. L. Salas, J. M. Rodríguez, 2010, African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates, *Journal of Virology*, 84(15), pp. 7484–7499.
- [21] I. Rodríguez, M. L. Nogal, M. Redrejo-Rodríguez, M. J. Bustos, M. L. Salas, 2009, The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event, *Journal of Virology*, 83(23), pp. 12290–12300.
- [22] A. L. Carrascosa, I. Saastre, P. González, E. Viñuela, 1993, Localization of the African swine fever virus attachment protein P12 in the virus particle by immunoelectron microscopy, *Virology*, 193(1), pp. 460–465.
- [23] R. García-Escudero, G. Andrés, F. Almazán, E. Viñuela, 1998, Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72, *Journal of Virology*, 72(4), pp. 3185–3195.
- [24] N. Wang, D. Zhao, J. Wang, Y. Zhang, M. Wang, Y. Gao, F. Li, J. Wang, Z. Bu, Z. Rao, X. Wang, 2019, Architecture of African swine fever virus and implications for viral assembly, *Science (New York, N.Y.)*, 366(6465), pp. 640–644.
- [25] C. Epifano, J. Krijnse-Locker, M. L. Salas, J. Salas, J. M. Rodríguez, 2006, Generation of filamentous instead of icosahedral particles by repression of African swine fever virus structural protein pB438L, *Journal of Virology*, 80(23), pp. 11456–11466.
- [26] S. S. J. Breese, C. J. DeBoer, 1966, Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells, *Virology*, 28(3), pp. 420–428.
- [27] A. Angulo, E. Viñuela, A. Alcamí, 1993, Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12, *Journal of Virology*, 67(9), pp. 5463–5471.
- [28] A. Sanz, B. García-Barreno, M. L. Nogal, E. Viñuela, L. Enjuanes, 1985, Monoclonal antibodies specific for African swine fever virus proteins, *Journal of Virology*, 54(1), pp. 199–206.
- [29] Y. Wang, W. Kang, W. Yang, J. Zhang, D. Li, H. Zheng, 2021, Structure of African Swine Fever Virus and Associated Molecular Mechanisms Underlying Infection and Immunosuppression: A Review., *Frontiers in immunology*, 12,

- pp 715582.
- [30] E. P. de Villiers, C. Gallardo, M. Arias, M. da Silva, C. Upton, R. Martin, R. P. Bishop, 2010, Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences, *Virology*, 400(1), pp. 128–136.
 - [31] A. Malogolovkin, G. Burmakina, I. Titov, A. Sereda, A. Gogin, E. Baryshnikova, D. Kolbasov, 2015, Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups, *Emerging Infectious Diseases*, 21(2), pp. 312–315.
 - [32] Z. Pejsak, M. Truszczyński, K. Niemczuk, E. Kozak, I. Markowska-Daniel, 2014, Epidemiology of African Swine Fever in Poland since the detection of the first case, *Polish Journal Veterinary Sciences*, 17(4), pp. 665–672.
 - [33] X. Wen, X. He, X. Zhang, X. Zhang, L. Liu, Y. Guan, Y. Zhang, Z. Bu, 2019, Genome sequences derived from pig and dried blood pig feed samples provide important insights into the transmission of African swine fever virus in China in 2018, *Emerging Microbes & Infections*, 8(1), pp. 303–306.
 - [34] H.-J. Kim, K.-H. Cho, S.-K. Lee, D.-Y. Kim, J.-J. Nah, H.-J. Kim, H.-J. Kim, J.-Y. Hwang, H.-J. Sohn, J.-G. Choi, H.-E. Kang, Y.-J. Kim, 2020, Outbreak of African swine fever in South Korea, 2019, *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(2), pp. 473–475.
 - [35] V. T. Nguyen, K.-H. Cho, N. T. A. Mai, J.-Y. Park, T. B. N. Trinh, M.-K. Jang, T. T. H. Nguyen, X. D. Vu, T. L. Nguyen, V. D. Nguyen, A. Ambagala, Y.-J. Kim, V. P. Le, 2022, Multiple variants of African swine fever virus circulating in Vietnam, *Archives of Virology*, 167(4), pp. 1137–1140.
 - [36] D. A. G. Chapman, A. C. Darby, M. Da Silva, C. Upton, A. D. Radford, L. K. Dixon, 2011, Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus, *Emerging Infectious Diseases*, 17(4), pp. 599–605.
 - [37] Q. Liu, B. Ma, N. Qian, F. Zhang, X. Tan, J. Lei, Y. Xiang, 2019, Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72, *Cell research*, 29(11), pp. 953–955.
 - [38] N. Jia, Y. Ou, Z. Pejsak, Y. Zhang, J. Zhang, 2017, Roles of African Swine Fever Virus Structural Proteins in Viral Infection, *Journal of Veterinary Research*, 61(2), pp. 135–143.
 - [39] N. N. Gaudreault, D. W. Madden, W. C. Wilson, J. D. Trujillo, J. A. Richt, 2020, African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus, *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 215.
 - [40] J. M. Escribano, I. Galindo, C. Alonso, 2013, Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts, *Virus Research*, 173(1), pp. 101–109.
 - [41] L. Zsak, D. V. Onisk, C. L. Afonso, D. L. Rock, 1993, Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein, *Virology*, 196(2), pp. 596–602.
 - [42] C. Miao, S. Yang, J. Shao, G. Zhou, Y. Ma, S. Wen, Z. Hou, D. Peng, H. C. Guo, W. Liu, H. Chang, 2023, Identification of p72 epitopes of African swine fever virus and preliminary application, *Frontiers in Microbiology*, 14(February), pp. 1–11.
 - [43] G. Andrés, D. Charro, T. Matamoros, R. S. Dillard, N. G. A. Abrescia, 2020, The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique

- architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes, *The Journal of Biological Chemistry*, 295(1), pp. 1–12.
- [44] M. Yu, C. J. Morrissy, H. A. Westbury, 1996, Strong sequence conservation of African swine fever virus p72 protein provides the molecular basis for its antigenic stability, *Archives of Virology*, 141(9), pp. 1795–1802.
- [45] S. Yang, C. Miao, W. Liu, G. Zhang, J. Shao, H. Chang, 2023, Structure and function of African swine fever virus proteins: Current understanding, *Frontiers in Microbiology*, 14, p. 1043129.
- [46] C. Epifano, J. Krijnse-Locker, M. L. Salas, J. M. Rodríguez, J. Salas, 2006, The African swine fever virus nonstructural protein pB602L is required for formation of the icosahedral capsid of the virus particle, *Journal of Virology*, 80(24), pp. 12260–12270.
- [47] C. Cobbold, M. Windsor, T. Wileman, 2001, A virally encoded chaperone specialized for folding of the major capsid protein of African swine fever virus, *Journal of Virology*, 75(16), pp. 7221–7229.
- [48] K. Meng, Y. Zhang, Q. Liu, Y. Huyan, W. Zhu, Y. Xiang, G. Meng, 2022, Structural Design and Assessing of Recombinantly Expressed African Swine Fever Virus p72 Trimer in *Saccharomyces cerevisiae*, *Frontiers in Microbiology*, 13, p. 802098.
- [49] A. Barta, K. Sommergruber, D. Thompson, K. Hartmuth, M. A. Matzke, A. J. Matzke, 1986, The expression of a nopaline synthase - human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue, *Plant Molecular Biology*, 6(5), pp. 347–357.
- [50] A. Zimran, E. Brill-Almon, R. Chertkoff, M. Petakov, F. Blanco-Favela, E. T. Muñoz, S. E. Solorio-Meza, D. Amato, G. Duran, F. Giona, R. Heitner, H. Rosenbaum, P. Giraldo, A. Mehta, G. Park, M. Phillips, D. Elstein, G. Altarescu, M. Szleifer, S. Hashmueli, D. Aviezer, 2011, Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease, *Blood*, 118(22), pp. 5767–5773.
- [51] J. Bally, K. Nakasugi, F. Jia, H. Jung, S.Y.W. Ho, M. Wong, C. M. Paul, F. Naim, C. C. Wood, R. N. Crowhurst, R. P. Hellens, J. L. Dale, P. M. Waterhouse, 2015, The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour, *Nature plants*, 1, p. 15165.
- [52] H. T. Phan, T. T. Ho, H. H. Chu, T. H. Vu, U. Gresch, U. Conrad, 2017, Neutralizing immune responses induced by oligomeric H5N1-hemagglutinins from plants, *Veterinary Research*, 48(1), p. 53.
- [53] H. T. Phan, J. Pohl, D. M. Floss, F. Rabenstein, J. Veits, B. T. Le, H. H. Chu, G. Hause, T. Mettenleiter, U. Conrad, 2013, ELPylated haemagglutinins produced in tobacco plants induce potentially neutralizing antibodies against H5N1 viruses in mice, *Plant Biotechnology Journal*, 11(5), pp. 582–593.
- [54] N. B. Pham, T. T. Ho, G. T. Nguyen, T. T. Le, N. T. Le, H.-C. Chang, M. D. Pham, U. Conrad, H. H. Chu, 2017, Nanodiamond enhances immune responses in mice against recombinant HA/H7N9 protein, *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), p. 69.
- [55] Y. Y. Gleba, D. Tusé, A. Giritch, 2014, Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 375, pp.

- 155–192.
- [56] M. J. B. Burnett, A. C. Burnett, 2020, Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities, *Plants People Planet*, 2(2), pp. 121–132.
- [57] Q. Chen, H. Lai, J. Hurtado, J. Stahnke, K. Leuzinger, M. Dent, 2013, Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins, *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, 1(1).
- [58] D. L. Rock, 2017, Challenges for African swine fever vaccine development- "... perhaps the end of the beginning.", *Veterinary Microbiology*, 206, pp. 52–58.
- [59] E. Cadenas-Fernández, J. M. Sánchez-Vizcaíno, E. van den Born, A. Kosowska, E. van Kilsdonk, P. Fernández-Pacheco, C. Gallardo, M. Arias, J. A. Barasona, 2021, High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge, *Vaccines*, 9(3).
- [60] S. Blome, C. Gabriel, M. Beer, 2014, Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation, *Vaccine*, 32(31), pp. 3879–3882.
- [61] J. L. Tlaxca, S. Ellis, R. L. J. Remmele, 2015, Live attenuated and inactivated viral vaccine formulation and nasal delivery: potential and challenges, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 93, pp. 56–78.
- [62] J. Pikalo, L. Porfiri, V. Akimkin, H. Roszyk, K. Pannhorst, R. T. Kangethe, V. Wijewardana, J. Sehl-Ewert, M. Beer, G. Cattoli, S. Blome, 2022, Vaccination With a Gamma Irradiation-Inactivated African Swine Fever Virus Is Safe But Does Not Protect Against a Challenge, *Frontiers in Immunology*, 13, p. 832264.
- [63] W. Chen, D. Zhao, X. He, R. Liu, Z. Wang, X. Zhang, F. Li, D. Shan, H. Chen, J. Zhang, L. Wang, Z. Wen, X. Wang, Y. Guan, J. Liu, Z. Bu, 2020, A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs, *Science China. Life Sciences*, 63(5), pp. 623–634.
- [64] C. L. Netherton, L. C. Goatley, A. L. Reis, R. Portugal, R. H. Nash, S. B. Morgan, L. Gault, R. Nieto, V. Norlin, C. Gallardo, C. -S. Ho, P. J. Sánchez-Cordón, G. Taylor, L. K. Dixon, 2019, Identification and Immunogenicity of African Swine Fever Virus Antigens, *Frontiers in Immunology*, 10, p. 1318.
- [65] N. Zheng, C. Li, H. Hou, Y. Chen, A. Zhang, S. Han, B. Wan, Y. Wu, H. He, N. Wang, Y. Du, 2023, A Novel Linear B-Cell Epitope on the P54 Protein of African Swine Fever Virus Identified Using Monoclonal Antibodies, *Viruses*, 15(4).
- [66] G. Zhang, W. Liu, Z. Gao, Y. Chang, S. Yang, Q. Peng, S. Ge, B. Kang, J. Shao, H. Chang, 2022, Antigenic and immunogenic properties of recombinant proteins consisting of two immunodominant African swine fever virus proteins fused with bacterial lipoprotein OprI, *Virology Journal*, 19(1), p. 16.
- [67] M. G. Barderas, F. Rodríguez, P. Gómez-Puertas, M. Avilés, F. Beitia, C. Alonso, J. M. Escribano, 2001, Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins, *Archives of Virology*, 146(9), pp. 1681–1691.

- [68] P. Gómez-Puertas, F. Rodríguez, J. M. Oviedo, F. Ramiro-Ibáñez, F. Ruiz-Gonzalvo, C. Alonso, J. M. Escribano, 1996, Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization, *Journal of Virology*, 70(8), pp. 5689–5694.
- [69] F. Ruiz-Gonzalvo, F. Rodríguez, J. M. Escribano, 1996, Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus, *Virology*, 218(1), pp. 285–289.
- [70] A. L. Carrascosa, I. Sastre, E. Viñuela, 1995, Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12, *Journal of Biotechnology*, 40(2), pp. 73–86.
- [71] W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, Q. Chaudhry, 2010, A complementary definition of nanomaterial, *Nano Today*, 5(3), pp. 165–168.
- [72] D. Dhinasekaran, R. Raj, A. R. Rajendran, B. Purushothaman, B. Subramanian, A. Prakasarao, G. Singaravelu, 2020, Chitosan mediated 5-Fluorouracil functionalized silica nanoparticle from rice husk for anticancer activity, *International journal of biological macromolecules*, 156, pp. 969–980.
- [73] A. M. Carvalho, R. A. Cordeiro, H. Faneca, 2020, Silica-Based Gene Delivery Systems: From Design to Therapeutic Applications, *Pharmaceutics*, 12(7).
- [74] E. D. Mohamed Isa, H. Ahmad, M. B. Abdul Rahman, M. R. Gill, 2021, Progress in Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Agents for Cancer Treatment, *Pharmaceutics*, 13(2).
- [75] C. Engelmann, N. Ekambaram, J. Johannsen, O. Fellechner, T. Waluga, G. Fieg, A. Liese, P. Bubenheim, 2020, Enzyme Immobilization on Synthesized Nanoporous Silica Particles and their Application in a Bi-enzymatic Reaction, *ChemCatChem*, 12(8), pp. 2245–2252.
- [76] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, 1968, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), pp. 62–69.
- [77] S. Stermann, J. G. Marsden, 1966, SILANE COUPLING AGENTS, *Industrial and Engineering Chemistry*, 58(3), pp. 33–37.
- [78] F. J. Arriagada, K. Osseo-Asare, 1995, Synthesis of Nanosize Silica in Aerosol OT Reverse Microemulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 170(1), pp. 8–17.
- [79] M. A. López-Quintela, 2003, Synthesis of nanomaterials in microemulsions: formation mechanisms and growth control, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(2), pp. 137–144.
- [80] B. Punz, L. Johnson, M. Geppert, H. -H. Dang, J. Horejs-Hoeck, A. Duschl, M. Himly, 2022, Surface Functionalization of Silica Nanoparticles: Strategies to Optimize the Immune-Activating Profile of Carrier Platforms, *Pharmaceutics*, 14(5).
- [81] Y. Zhao, Y. Wang, F. Ran, Y. Cui, C. Liu, Q. Zhao, Y. Gao, D. Wang, S. Wang, 2017, A comparison between sphere and rod nanoparticles regarding their in vivo biological behavior and pharmacokinetics, *Scientific Reports*, 7(1), p. 4131.
- [82] K.T. Le, T. Pham, H. Tran-Van, 2022, Protein immobilization on the surface of silica nanoparticles: Applications and prospects in biomedicine, *Science & Technology Development Journal: Natural Sciences*, 6(1 SE -Review).

- [83] D. Shi, S. Narayanan, K. Woepfel, X. T. Cui, 2024, Improving the Biocompatibility and Functionality of Neural Interface Devices with Silica Nanoparticles., *Accounts of chemical research*, 57(12), pp. 1684-1695.
- [84] S. Udomsom, K. Kanthasap, P. Paengnakorn, P. Jantrawut, S. Kumphune, S. Auephanwiriyaikul, U. Mankong, N. Theera-Umpon, P. Baipaywad, 2024, Itaconic Acid Cross-Linked Biomolecule Immobilization Approach on Amine-Functionalized Silica Nanoparticles for Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)., *ACS omega*, 9(12), pp. 13636-13643.
- [85] E. Ravelo-Nieto, J. Cifuentes, P. Ruiz Puentes, L. Rueda-Gensini, V. Quezada, C. Ostos, C. Muñoz-Camargo, L. H. Reyes, A. Duarte-Ruiz, J. C. Cruz, 2023, Unlocking cellular barriers: silica nanoparticles and fullereneol conjugated cell-penetrating agents for enhanced intracellular drug delivery., *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11, p. 1184973.
- [86] G. Pota, N. Gallucci, D. Cavasso, I. R. Krauss, G. Vitiello, F. López-Gallego, A. Costantini, L. Paduano, V. Califano, 2023, Controlling the Adsorption of β -Glucosidase onto Wrinkled SiO₂ Nanoparticles To Boost the Yield of Immobilization of an Efficient Biocatalyst., *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 39(4), pp. 1482-1494.
- [87] J. Bizeau, A. Adam, C. Nadal, G. Francius, D. Siniscalco, M. Pauly, S. Bégin-Colin, D. Mertz, 2022, Protein sustained release from isobutyramide-grafted stellate mesoporous silica nanoparticles., *International journal of pharmaceutics: X*, 4, p. 100130.
- [88] A. Froger, J. E. Hall, 2007, Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method, *Journal of visualized experiments: JoVE*, 6, p. 253.
- [89] M. Mersereau, G. J. Pazour, A. Das, 1990, Efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens* by electroporation, *Gene*, 90(1), pp. 149–151.
- [90] T. T. Ho, G. T. Nguyen, N. B. Pham, V. P. Le, T. B. N. Trinh, T. H. Vu, H. T. Phan, U. Conrad, H. H. Chu, 2020, Plant-Derived Trimeric CO-26K-Equivalent Epitope Induced Neutralizing Antibodies Against Porcine Epidemic Diarrhea Virus, *Frontiers in immunology*, 11, p. 2152.
- [91] G. A. H. De Jong, P. Geerdink, P. J. T. Bussmann, N. Hylkema, 2014, WO 2014/104880 A1 - Economical process for the isolation of functional protein from plants, *World Intellectual Property Organization*.
- [92] M. T. Pham, T. V. Nguyen, T. D. Vu Thi, H. L. N. Thi, K. T. Tong, T. T. Tran, V. H. Chu, J. C. Brochon, H. N. Tran, 2012, Synthesis, photophysical properties and application of dye doped water soluble silica-based nanoparticles to label bacteria *E. coli* O157:H7, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 3(4).
- [93] Q. L. Wang, J. Xie, J. Liang, G. T. Dong, L. S. Ding, P. Luo, L. S. Qing, 2019, Competitive protein binding assay of naproxen by human serum albumin functionalized silicon dioxide nanoparticles, *Molecules*, 24(14).
- [94] K. Leuzinger, M. Dent, J. Hurtado, J. Stahnke, H. Lai, X. Zhou, Q. Chen, 2013, Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins, *Journal of visualized experiments : JoVE*, 7.
- [95] W. Y. Lim, C. W. Wong, 2018, Inhibitory effect of chemical and natural anti-browning agents on polyphenol oxidase from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Journal of food science and technology*, 55(8), pp. 3001–3007.

- [96] J. Kolniak-Ostek, J. Oszmiański, A. Wojdyło, 2013, Effect of l-ascorbic acid addition on quality, polyphenolic compounds and antioxidant capacity of cloudy apple juices, *European Food Research and Technology*, 236(5), pp. 777–798.
- [97] F. Pizzocaro, D. Torreggiani, G. Gilardi, 1993, Inhibition of apple polyphenoloxidase (ppo) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride, *Journal of Food Processing and Preservation*, 17(1), pp. 21–30.
- [98] M. A. Malik, H. K. Sharma, C. S. Saini, 2016, Effect of removal of phenolic compounds on structural and thermal properties of sunflower protein isolate, *Journal of food science and technology*, 53(9), pp. 3455–3464.
- [99] A. Freyssin, G. Page, B. Fauconneau, A. Rioux Bilan, 2018, Natural polyphenols effects on protein aggregates in Alzheimer's and Parkinson's prion-like diseases, *Neural regeneration research*, 13(6), pp. 955–961.
- [100] N. Plundrich, M. A. Lila, E. Foegeding, S. Laster, 2017, Protein-bound polyphenols create 'ghost' band artifacts during chemiluminescence-based antigen detection, *F1000Research*, 6(254).
- [101] P. Opdensteinen, A. Lobanov, J. F. Buyel, 2021, A combined pH and temperature precipitation step facilitates the purification of tobacco-derived recombinant proteins that are sensitive to extremes of either parameter, *Biotechnology Journal*, 16(4), p. e2000340.
- [102] D. S. Waugh, 2005, Making the most of affinity tags, *Trends in Biotechnology*, 23(6), pp. 316–320.
- [103] T. T. Ho, V. T. Trinh, H. X. Tran, P. T. T. Le, T. T. Nguyen, H. T. T. Hoang, M. D. Pham, U. Conrad, N. B. Pham, H. H. Chu, 2022, The immunogenicity of plant-based COE-GCN4pII protein in pigs against the highly virulent porcine epidemic diarrhea virus strain from genotype 2, *Frontiers in veterinary science*, 9, p. 940395.
- [104] Y. T. Zhu, X. Y. Ren, Y. M. Liu, Y. Wei, L. S. Qing, X. Liao, 2014, Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: characterization and application for enzymatic inhibition assays., *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 38, pp. 278-285.
- [105] S. J. Kew, J. H. Gwynne, D. Enea, R. Brookes, N. Rushton, S. M. Best, R. E. Cameron, 2012, Synthetic collagen fascicles for the regeneration of tendon tissue, *Acta biomaterialia*, 8(10), pp. 3723–3731.
- [106] K. G. Cornwell, P. Lei, S. T. Andreadis, G. D. Pins, 2007, Crosslinking of discrete self-assembled collagen threads: Effects on mechanical strength and cell-matrix interactions, *Journal of biomedical materials research. Part A*, 80(2), pp. 362–371.
- [107] M. Chvapil, D. Speer, W. Mora, C. Eskelson, 1983, Effect of tanning agent on tissue reaction to tissue implanted collagen sponge, *The Journal of surgical research*, 35(5), pp. 402–409.
- [108] M. M. Rigano, G. De Guzman, A. M. Walmsley, L. Frusciante, A. Barone, 2013, Production of pharmaceutical proteins in solanaceae food crops, *International journal of molecular sciences*, 14(2), pp. 2753–2773.
- [109] C. Barbey, J. Su, M. Billmeier, N. Stefan, R. Bester, G. Carnell, N. Temperton, J. Heeney, U. Protzer, M. Breunig, R. Wagner, D. Peterhoff, 2023,

Immunogenicity of a silica nanoparticle-based SARS-CoV-2 vaccine in mice, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 192(June), pp. 41–55.