

TẠO DÒNG GEN E^{RNS} CỦA VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ HEO - HƯỚNG TỚI TẠO VACCINE TIỂU ĐƠN VỊ PHÒNG CHỐNG BỆNH DỊCH TẢ HEO

NGUYỄN MINH NAM^{1,2,3}, NGUYỄN THỊ PHƯƠNG BÌNH⁴, LẠI CÔNG DANH⁵, NGUYỄN NGỌC HẢI^{5,*}

¹ Trung tâm Nghiên cứu Di truyền và Sức khỏe Sinh sản, Khoa Y, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

² Bộ môn Kỹ thuật Y Sinh, Khoa Y, Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

³ Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh

⁴ Công Ty TNHH Dịch vụ chăn nuôi P&Y

⁵ Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

*Tác giả liên hệ: nguyenngochai@hcmuaf.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstiuh.v59i05.4591>

Tóm tắt. Virus dịch tả heo cổ điển (CSFV) được cấu tạo gồm 4 protein cấu trúc, trong đó E^{RNS} là một yếu tố độc lực quan trọng trong chẩn đoán huyết thanh học và chế tạo vaccine. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm tạo ra các dòng tế bào *E. coli* mang đầy đủ trình tự gen E^{RNS} và bước đầu đánh giá tính khả thi trong việc tạo ra protein E^{RNS} tái tổ hợp. 21 trình tự của gen E^{RNS} đã được thu thập, chèn vào plasmid, và được biến nạp vào các tế bào *E. coli* khả nạp. Plasmid từ những dòng vi khuẩn được chèn gen thành công được ly trích và giải trình tự nhằm đánh giá hiệu quả của phương pháp tạo dòng. Kết quả giải trình tự cho thấy, nghiên cứu đã tạo thành công 21 dòng *E. coli* mang gen E^{RNS} của các chủng thực địa. 21 trình tự này có độ tương đồng rất cao về nucleotide (88,99 – 98,38%) và amino acid (87,67 – 99,56%) với 100 trình tự có độ tương đồng cao nhất trên NCBI.

Từ khóa. CSFV, E^{RNS} , Tạo dòng, Vaccine

1. GIỚI THIỆU

Virus gây bệnh Dịch tả heo cổ điển (Classic Swine Fever Virus - CSFV) là virus nhỏ chứa một sợi RNA, có vỏ bọc ngoài, thuộc giống *Pestivirus*, họ *Flaviviridae*. CSFV có bộ gen khoảng 12,3 kb bao gồm một khung đọc mở dài (ORF) mã hóa cho một polyprotein gồm 3,898 amino acid nằm cạnh hai vùng 5' và 3' không được dịch mã (UTR) [1]. Bộ gen hoàn chỉnh của CSFV đã được giải mã bao gồm 4 protein cấu trúc là C, E^{RNS} , E1, E2 và 8 protein không cấu trúc là Npro, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A và NS5B [2, 3]. E^{RNS} hay E0 (còn gọi là gp/4488) với kích thước 41 - 44 kDa, bao gồm 227 amino acid, phân bố ở bề mặt ngoài của virion, tham gia vào việc kết dính và xâm nhập vào tế bào cảm nhiễm. E^{RNS} có hoạt tính ribonuclease đối với uridine và có thể bị ức chế bởi ion kẽm [4]. Ngoài chức năng là một protein cấu trúc liên kết với vỏ bọc, E^{RNS} còn hỗ trợ bài thải virus qua một màng đặc biệt. E^{RNS} có khả năng gây ra apoptosis trong tế bào lympho của một số loài [5]. E^{RNS} tái tổ hợp có khả năng gây độc tế bào lympho in vitro, gây giảm bạch cầu trong nhiễm tự nhiên. Protein này có thể được tìm thấy cả trên bề mặt của các tế bào bị nhiễm pestivirus và trong môi trường nuôi cấy tế bào [6].

Bên cạnh đó, E^{RNS} đóng vai trò rất quan trọng trong việc gắn kết và xâm nhập của CSFV vào các tế bào nhạy cảm [7]. Sự tương tác của E^{RNS} với glycoaminoglycan trên bề mặt tế bào (heparan sulfate) đóng góp một phần trong sự gắn kết của virus lên tế bào nhạy cảm [8]. E^{RNS} cũng có thể đóng một vai trò quan trọng trong các giai đoạn sau khi virus xâm nhiễm. Các nghiên cứu cho thấy E^{RNS} cũng góp phần quyết định độc lực CSFV [4]. Protein E^{RNS} được biết là có khả năng kích thích tạo ra các kháng thể trung hòa CSFV và mang lại khả năng miễn dịch bảo hộ [9]. Ngoài ra, glycoprotein E^{RNS} tái tổ hợp được tinh chế đã được chứng minh là loại kháng nguyên tốt để phát hiện kháng thể chống lại CSFV [10]. Năm 2013, Aebischer đã nghiên cứu hai phương pháp ELISA gián tiếp (để sàng lọc và xác nhận) sử dụng protein E^{RNS} tái tổ hợp có thể phân biệt heo bị nhiễm CSFV với heo được tiêm vaccine sau 10 ngày heo bị nhiễm bệnh [11]. Lin và cs (2005) nghiên cứu phản ứng kháng thể đối với E^{RNS} , xác định sau khi heo bị nhiễm CSFV bằng phương pháp ELISA [12].

Sử dụng hai vùng kháng nguyên của protein E^{rns} là amino acid 109 - 145 và amino acid 109 - 160 có khả năng phát hiện kháng thể ở heo ngay sau 7 ngày bị nhiễm trùng. Việc biến đổi vị trí amino acid ở 2 vùng này cũng có thể ảnh hưởng đến khả năng kích ứng kháng thể trung hòa.

Như vậy, protein E^{rns} không chỉ có vai trò quan trọng tạo nên độc lực cho CSFV mà còn có nhiều ý nghĩa trong việc tạo vaccine và chẩn đoán huyết thanh học. Nhận thấy những vai trò to lớn của loại protein này, chúng tôi bước đầu đã tiến hành tạo ra những dòng *E. coli* mang đầy đủ trình tự gen E^{rns} của CSFV. Các dòng vi khuẩn sau khi được biến nạp sẽ được đánh giá hiệu quả của phương pháp tạo dòng này. Nghiên cứu này sẽ là cơ sở cho các nghiên cứu sau này nhằm tạo ra protein E^{rns} tái tổ hợp phục vụ cho công tác chẩn đoán và phòng bệnh.

2. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP THỰC NGHIỆM

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm: 21 mẫu bệnh phẩm dương tính với CSFV được thu thập từ các trại heo có biểu hiện của bệnh CSF ở một số tỉnh thành miền Nam.

Thiết bị: máy ly tâm lạnh, nồi hấp khử trùng, máy lắc ủ nhiệt, bồn điện di, máy PCR, máy vortex, bồn nước ủ nhiệt, lò vi sóng, tủ âm, tủ lạnh, và tủ ATSH cấp 2.

Môi trường và hóa chất: Môi trường Luria Bertani (LB); Môi trường thạch Agar LB bổ sung ampicillin, IPTG và X-gal với lượng lần lượt là 1 µl/ml, 5 µl/ml và 2 µl/ml; Môi trường SOC.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí thí nghiệm

21 mẫu mẫu bệnh phẩm được thu thập là những mẫu đã được xác định dương tính với CSFV tại Phòng chẩn đoán xét nghiệm thú y Việt – Hàn. Các mẫu này sau đó được ly trích RNA và được khuếch đại đoạn gen E^{rns} bằng phương pháp RT-PCR. Sản phẩm khuếch đại sẽ được gắn vào Vector pGEM - T Easy (Promega, Mỹ). Tiếp đến, vector mang đoạn gen mục tiêu được tiếp tục biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α khả nạp. Các tế bào này được nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc với kháng sinh ampicillin. Những khuẩn lạc được chèn gen sẽ được chọn và tăng sinh trong môi trường lỏng. Sau đó được ly trích sốc nhiệt để đánh giá liệu rằng chúng có mang đúng gen mục tiêu E^{rns} hay không. Nếu mang đúng gen cần chèn, các dòng vi khuẩn này sẽ được ly trích plasmid tinh khiết bằng bộ kit thương mại. Sản phẩm plasmid tái tổ hợp sẽ được giải trình tự và được phân tích sâu hơn.

2.2.2. Thu nhận gen E^{rns} của CSFV bằng kỹ thuật RT – PCR

Các mẫu bệnh phẩm thu thập được ly trích RNA bằng bộ kit GeneJET Viral DNA/ RNA Purification Kit (Thermo, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, các trình tự RNA này được tổng hợp thành cADN bằng bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, Mỹ). Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen E^{rns} với kích thước 704 bp sử dụng cặp mồi đặc hiệu gồm CSF - E^{rns} F (5'-GGCGGAATTTCGAGAATATAACTCAATGGAACCT-3'), CSF - E^{rns} R (5'-TATTGAGCTCTTAGGCATAGGCACCGAACCA-3'). Các thành phần gồm: 12,5 µl GoTaq G2 Green Master Mix; 1,0 µl mỗi mồi (nồng độ cuối là 0,4 µM); 5 µl DNA mẫu và thêm Nuclease free water để đạt tổng thể tích 25 µl cho mỗi phản ứng. Quy trình nhiệt gồm: 1 chu kỳ 95°C, 5 phút; 35 chu kỳ 95°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 60 giây; và kết thúc tại 72°C trong 7 phút. Kết quả sau khi điện di sản phẩm (Agarose 1%) được đọc trên buồng chiếu UV. ADN sau đó được tinh sạch từ gel bằng bộ kit GenJET Gel Extraction and DNA Micro Kit (Thermo, Mỹ).

2.2.3. Tạo dòng gen E^{rns} vào vector pGEM - T Easy

2.2.3.1. Phản ứng nối gen E^{rns} vào vector pGEM - T Easy

Mỗi gen E^{rns} sau khi được khuếch đại được tiến hành 1 phản ứng nối vào vector pGEM – T Easy. Phản ứng này gồm: 5 ul Rapid Ligation Buffer 1X, 1 ul Vector pGEM - T Easy (Promega, Mỹ) (5 ng/µl), 2 ul sản phẩm PCR tinh sạch, 1 ul T4 DNA ligase (0,3 U/µl), và thêm Nuclease - free water để đạt tổng thể tích là 10 µl. Hỗn hợp phản ứng được trộn đều và ủ trong vòng 1 giờ ở nhiệt độ phòng.

2.3.3.2. Chuẩn bị tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp

Tế bào *E. coli* DH5 α được tạo khả nạp bằng phương pháp CaCl₂. Hút 100 μ l dịch vi khuẩn đã nuôi cấy qua đêm vào bình tam giác chứa 50 ml môi trường LB lỏng, và nuôi cấy lắc trong vòng 3 - 4 giờ ở 37°C (lắc 150 vòng/phút). Sau đó, chuyển bình tam giác chứa vi khuẩn vào thùng đá giữ lạnh trong 30 phút. Kế đến hút 1,5 ml dịch nuôi cấy cho vào eppendorf 1,5 ml, ly tâm 4000 vòng trong 10 phút ở 4°C. Đổ bỏ phần dịch bên trên, thu phần sinh khối kết tủa bên dưới, lặp lại thêm 2 lần. Sau đó, cho 1 ml CaCl₂ 100 mM lạnh vào eppendorf chứa phần sinh khối vừa thu được và dùng pipette trộn nhẹ để hoà tan phần sinh khối. Ly tâm 4000 vòng trong 10 phút ở 4°C. Đổ bỏ phần dịch bên trên và cho 100 μ l dung dịch (85% CaCl₂ 100 mM, 15% glycerol) lạnh vào hoà tan phần sinh khối trên và lưu trữ ở -70°C.

2.2.3.3. Biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp

Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật sốc nhiệt nhằm biến nạp vector tái tổ hợp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Chúng tôi đã tiến hành 1 phản ứng trên 1 mẫu. Khi cho các sản phẩm của phản ứng nổi vào dung dịch tế bào khả nạp, hỗn hợp được giữ ngay trên đá trong 10 phút. Sau đó, nhúng hỗn hợp vào bồn nước ấm 42°C trong 45 - 50 giây. Tiếp đến đặt hỗn hợp lên đá ngay lập tức và đợi trong 2 phút. Thêm môi trường SOC lạnh vào mỗi phản ứng biến nạp và ủ trong 1,5 giờ ở 37°C (lắc 150 vòng/phút). Hỗn hợp sau đó được ly tâm ở 4000 vòng trong 10 phút để thu phần cặn. Cặn sau đó được hòa trong môi trường SOC và trải lên mỗi đĩa LB/ampicillin/IPTG/X-Gal để nuôi cấy. Các đĩa vi khuẩn sẽ được ủ qua đêm ở 37°C.

2.2.3.4. Chọn lọc và xác định các dòng vi khuẩn mang gen *E^{rms}*

Các khuẩn lạc mọc trên đĩa sau khi được ủ qua đêm sẽ mang hai loại màu sắc khác nhau. Những khuẩn lạc không mang gen *E^{rms}* sẽ có màu xanh, trong khi khuẩn lạc mang gen chèn sẽ thể hiện màu trắng. Hai khuẩn lạc nghi ngờ mang gen mục tiêu sẽ được chọn chuyển vào ống nghiệm chứa 5 ml môi trường LB có bổ sung thêm 5 μ l ampicillin, vortex đều và ủ trong 24 giờ ở 37°C. Các gốc vi khuẩn này sẽ được ly trích bằng phương pháp sốc nhiệt để thu plasmid. Ban đầu, vortex đều dung dịch nuôi cấy và hút 1 ml hỗn hợp tăng sinh vào eppendorf, ly tâm thu cặn ở 8000 vòng trong 5 phút. Thêm 100 μ l nước Nuclease – free và đun hỗn hợp ở 100°C trong 10 phút. Sau đó, ly tâm hỗn hợp ở 13000 vòng trong 5 phút, thu dịch trong và chuyển sang eppendorf mới. Plasmid thu được sẽ được bảo quản ở -20°C. Phản ứng PCR được thực hiện nhằm kiểm tra liệu rằng gen *E^{rms}* có được chèn đúng hay không. Tổng phản ứng là 25 μ l gồm: 12,5 μ l Go Taq G2 Green master mix 2X, 1 μ l primer T7 (0,4 μ M), 1 μ l primer SP6 (0,4 μ M), 5 μ l Plasmid và nước. Quy trình nhiệt gồm 1 chu kỳ ở 95°C, 5 phút; 35 chu kỳ với 30 giây ở 95°C, 30 giây ở 45°C, 1,5 phút ở 72°C; kết thúc tại 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel 1,5 % để kiểm tra.

2.2.3.5. Ly trích plasmid tái tổ hợp

Để ly trích và thu được các plasmid tinh sạch nhất, nghiên cứu sử dụng kit GenJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo, Mỹ).

2.2.4. Giải trình tự và phân tích

Những sản phẩm plasmid sau khi được tinh sạch sẽ được gửi đến công ty Nam Khoa để tiến hành giải trình tự. Kết quả giải trình tự được xử lý và phân tích bằng phần mềm Sequencher 5.4.6 (Genecodes). Trình tự nucleotide của các mẫu được phân tích và so sánh với các trình tự tham khảo đã công bố trên ngân hàng gen bằng trang web NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

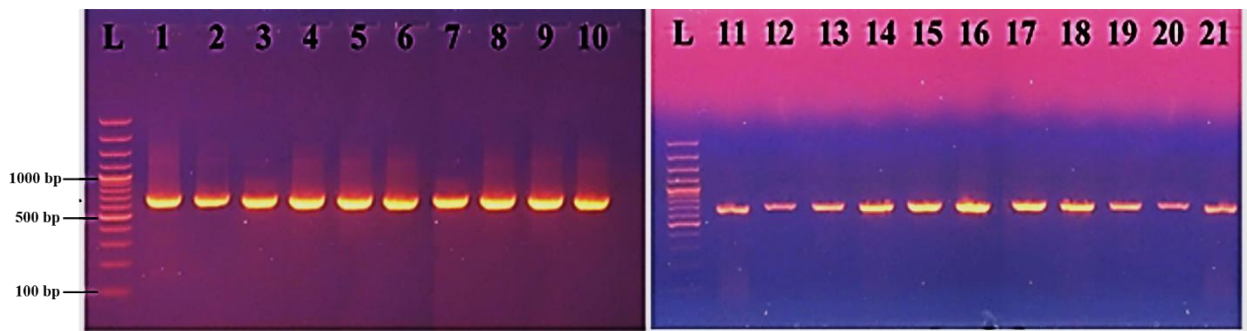
3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1 Kết quả RT-PCR thu gen *E^{rms}*

21 mẫu bệnh phẩm dương tính với CSFV đã được ly trích và tinh sạch bằng kit GeneJET Viral DNA and RNA Purification Kit (Thermo, Mỹ). Các cADN cũng đã được tổng hợp thành công từ các sản phẩm ly trích bằng bộ kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, Mỹ). Phản ứng PCR đã được thực hiện với mục tiêu khuếch đại toàn bộ đoạn gen *E^{rms}* của CSFV.

Kết quả của phản ứng PCR cho thấy chỉ có một vạch duy nhất tương ứng kích thước 704 bp được ghi nhận trên gel agarose 1% (Hình 1). Điều này cho thấy nghiên cứu đã khuếch đại thành công trình tự toàn bộ gen *E^{rms}* từ 21 mẫu bệnh phẩm dương tính CSFV.

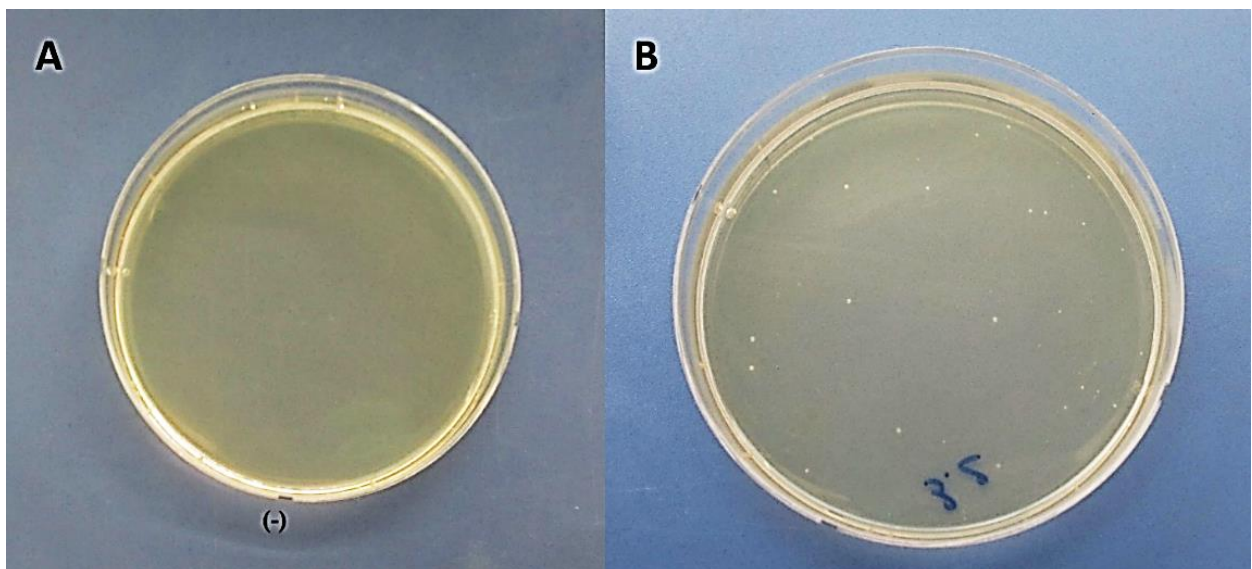
TẠO DÒNG GEN E^{RNS} CỦA VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ HEO...



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen E^{RNS} . (L): Thang ADN 100 bp Plus; (1-21): Kí hiệu 21 mẫu.

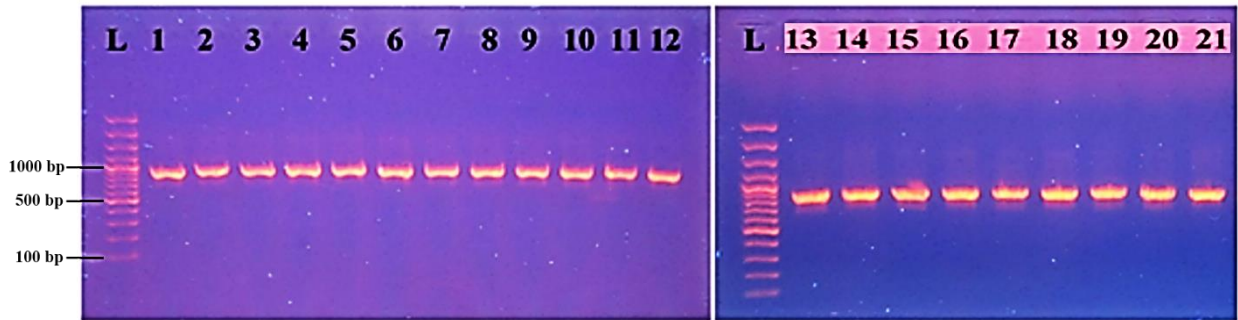
3.2. Kết quả tạo dòng *E. coli* mang gen E^{RNS}

Các trình tự gen E^{RNS} của 21 mẫu từ phản ứng PCR được tinh sạch và chuyển trực tiếp vào vector pGEM - T Easy. Vector này tiếp tục được biến nạp vào các tế bào *E. coli* DH5 α khả nạp. Các tế bào này sau đó được cấy trên môi trường LA có bổ sung kháng sinh ampicillin, chất cảm ứng IPTG và cơ chất X - Gal. Việc nuôi cấy này có thể đánh giá được liệu các tế bào *E. coli* có nhận được các plasmid hay không. Kết quả cho thấy có nhiều dòng tế bào mang plasmid- thể hiện qua những khuẩn lạc trắng (Hình 2).



Hình 2. Kết quả nuôi cấy các dòng *E. coli* được biến nạp plasmid chứa gen E^{RNS} trên môi trường LA/amp/IPTG/X - Gal. (A) Đĩa đối chứng âm; (B) Khuẩn lạc chứa plasmid tái tổ hợp

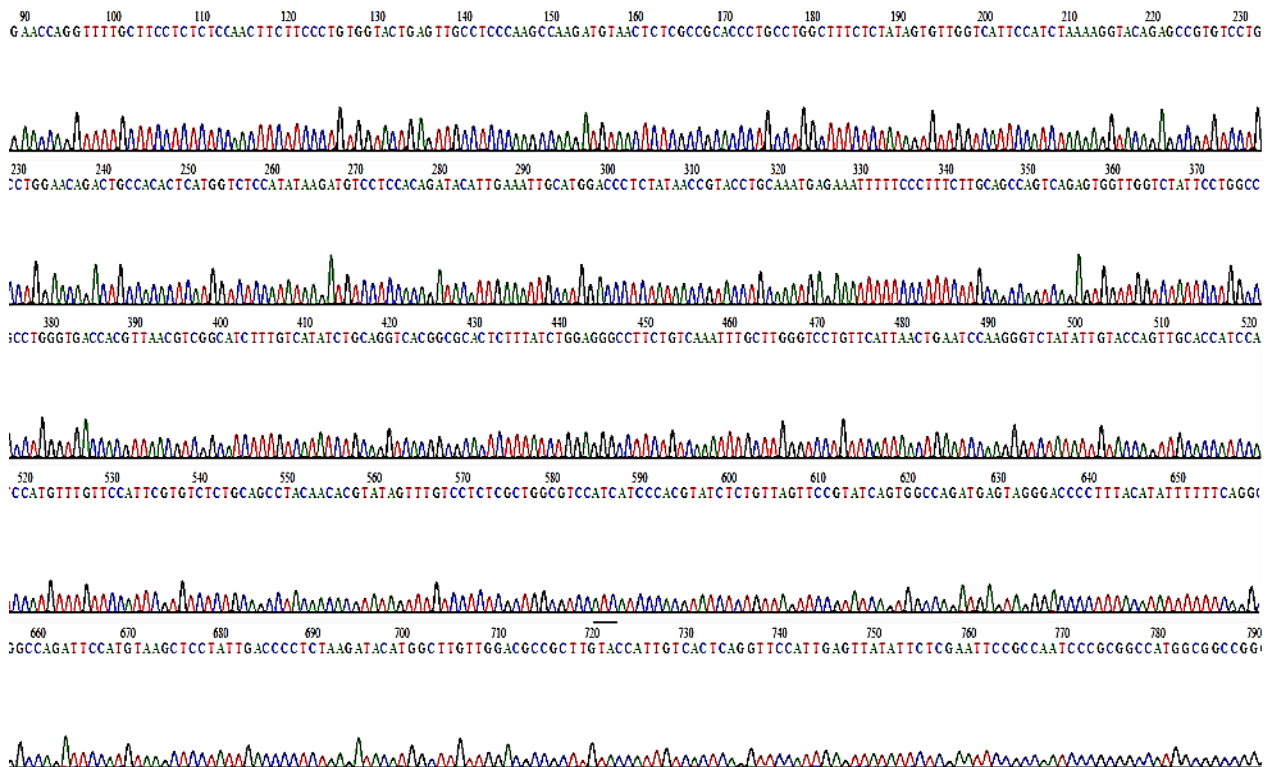
Quá trình ly trích plasmid sau khi tăng sinh và khuếch đại đoạn gen E^{RNS} được thực hiện nhằm đánh giá các dòng vi khuẩn *E. coli* thu được có mang plasmid chứa đầy đủ trình tự gen mục tiêu hay không. Kết quả phản ứng PCR chỉ ghi nhận 1 vạch duy nhất khoảng 881 bp tương ứng với kích thước sản phẩm theo lý thuyết của gen E^{RNS} (Hình 3). Điều này cho thấy nghiên cứu đã tạo thành công các dòng tế bào vi khuẩn mang gen mục tiêu của 21 chủng CSFV từ các mẫu bệnh phẩm.



Hình 3. Kết quả kiểm tra plasmid tái tổ hợp gen E^{ms} . (L): Thang ADN 100 bp; (1-21): kí hiệu 21 mẫu.

3.3. Kết quả giải trình tự gen

Plasmid chứa đầy đủ trình tự gen E^{ms} được tinh sạch bằng bộ kit GenJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo, Mỹ) từ các tế bào *E. coli* được biến nạp. Các plasmid này sau đó được gửi đi giải trình tự và xử lý trên Sequencher 5.4.6 (Genecodes). Kết quả giải trình tự 21 trình tự gen E^{ms} cho thấy các peak rất rõ ràng và không bị chồng chéo (Hình 4). Do đó có thể khẳng định nghiên cứu đã giải trình tự thành công 21 trình tự gen E^{ms} được biến nạp vào các dòng *E. coli*. 21 trình tự này được đăng kí trên Genbank với mã số từ MZ869047 - MZ869067.



Hình 4. Một phần kết quả giải trình tự gen E^{ms} được biến nạp vào tế bào *E. coli*

Kết quả blast trên NCBI cho thấy 21 trình tự gen E^{ms} trong nghiên cứu đều được xác định là trình tự của Classical swine fever virus (CSFV). Khi so với 100 trình tự có độ tương đồng cao nhất trên NCBI, các trình tự này có độ tương đồng rất cao, đạt 88,99 – 98,38% (Bảng 1). Những kết quả này thể hiện nghiên cứu đã tạo thành công các dòng *E. coli* mang gen E^{ms} của 21 chủng CSFV thực địa tại Việt Nam. 21 chủng CSFV phân lập trong nghiên cứu này đã được nhóm tác giả xây dựng cây sinh dòng và được phân tích sâu hơn về sự biến đổi ở các vùng kháng nguyên quan trọng [13].

TAO DÒNG GEN E^{RNS} CỦA VIRUS GÂY BỆNH DỊCH TẢ HEO...

Bảng 1. Kết quả Blast các trình tự gen E^{rns} của CSFV được biến nạp với 100 trình tự có độ tương đồng cao nhất trên NCBI

Trình tự	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Taxonomy
HVDN1	1027-1246	1027-1246	99-100	0	92,80-98,38	Classical swine fever virus
HVDN2	1021-1246	1021-1246	99-100	0	92,66-98,38	Classical swine fever virus
HVDN3	1004-1200	1004-1200	99-100	0	92,22-97,21	Classical swine fever virus
HVDN4	1027-1240	1027-1240	99-100	0	92,80-98,24	Classical swine fever virus
HVDN5	1027-1211	1027-1211	99-100	0	92,80-97,50	Classical swine fever virus
HVDN6	1015-1240	1015-1240	99-100	0	92,51-98,24	Classical swine fever virus
HVDN7	1021-1246	1021-1246	99-100	0	92,66-98,38	Classical swine fever virus
HVDN8	1015-1235	1015-1235	99-100	0	92,51-98,09	Classical swine fever virus
HVDN9	1010-1206	1010-1206	99-100	0	92,36-97,36	Classical swine fever virus
HVDN10	998-1211	998-1211	99-100	0	92,07-97,50	Classical swine fever virus
HVVT1	1010-1229	1010-1229	99-100	0	92,36-97,94	Classical swine fever virus
HVVT2	1004-1223	1004-1223	99-100	0	92,22-97,08	Classical swine fever virus
HVVT3	1015-1235	1015-1235	99-100	0	92,51-98,09	Classical swine fever virus
HVVT4	998-1211	998-1211	99-100	0	92,07-97,50	Classical swine fever virus
HVKH1	1027-1223	1027-1223	99-100	0	92,80-97,80	Classical swine fever virus
HVHCM1	992-1177	992-1177	99-100	0	91,92-96,62	Classical swine fever virus
HVLA1	906-1148	906-1148	99-100	0	89,72-95,89	Classical swine fever virus
HVTG1	908-1142	908-1142	99-100	0	89,72-95,74	Classical swine fever virus
HVTN1	877-1113	877-1113	99-100	0	88,99-95,01	Classical swine fever virus
HVBD1	1010-1229	1010-1229	97-100	0	92,36-97,94	Classical swine fever virus
HVLD1	1010-1235	1010-1235	99-100	0	92,36-98,09	Classical swine fever virus

Nhằm đánh giá độ tương đồng về trình tự amino acid của 21 trình tự trong nghiên cứu, chúng tôi tiến hành blast các trình tự amino acid dự đoán với các trình tự trên NCBI. Kết quả cho thấy các trình tự amino acid trong nghiên cứu có độ tương đồng cao (87,67 – 99,56%) với 100 trình tự tương ứng trên genbank. Các kết quả blast về trình tự gen và amino acid trên là cơ sở để chúng tôi nghiên cứu biểu hiện protein E^{rns} tái tổ hợp mang đặc điểm của các chủng CSFV tại Việt Nam, vật liệu cho việc tạo ra các kit xét nghiệm và vaccine phòng bệnh CSFV. Năm 2004, Lin và cs đã thực hiện nghiên cứu xác định vùng kháng nguyên của protein E^{rns} trên heo khi nhiễm CSFV [14]. Trong protein E^{rns} có ba vùng kháng nguyên chồng chéo: AR1 (amino acid 65 - 145), AR2 (amino acid 84 - 160) và AR3 (amino acid 109 - 220). Việc xóa hoặc làm thay đổi amino acid ở các vùng này làm gián đoạn khả năng phản ứng của chúng với các kháng thể. Điều này cho thấy chúng là những vị trí tối thiểu để nhận biết bởi kháng thể kháng CSFV. Mỗi vùng riêng lẻ và một đoạn protein gồm AR1, AR2 và AR3 phản ứng tốt như nhau với huyết thanh kháng CSFV. Khi thay đổi các amino acid tại 3 vùng này ảnh hưởng đến khả năng kích ứng tạo kháng thể trung hòa, ảnh hưởng khả năng miễn dịch bảo hộ chống lại CSFV. Trong những nghiên cứu trước đây, protein E^{rns} là một kháng nguyên quan trọng được dùng để sản xuất vaccine [4]. E^{rns} glycoprotein đại diện cho một yếu tố quyết định cảm ứng miễn dịch bảo vệ chống lại CSFV. Các báo cáo ghi nhận, động vật được tiêm vắc-xin tái tổ hợp biểu hiện E^{rns} đã phát triển các kháng thể trung hòa chống lại CSFV [15, 16]. So với các loại virus khác trong họ *Flaviviridae*, đầu cuối N (N-terminal) của E^{rns} ở CSFV là duy nhất đối với Pestivirus và có liên quan đến việc tránh các phản ứng interferon của vật chủ (IFN) [17]. Nghiên cứu của Uttenthal và cs (2001) đã chứng minh, heo sau khi tiêm chủng vaccine chứa protein E2 hoặc protein E^{rns} có thể được bảo hộ sau khi công cường độc CSFV [18].

Bảng 2: Kết quả Blast các trình tự amino acid của gen E^{ms} với 100 trình tự có độ tương đồng cao nhất trên NCBI

Trình tự	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. ident	Taxonomy
HVDN1	439-485	439-485	92-100	5E-173 – 9E-154	88,99-99,56	Classical swine fever virus
HVDN2	436-482	436-482	92-100	8E-172 – 1E-152	88,55-99,12	Classical swine fever virus
HVDN3	436-484	436-484	92-100	1E-172 – 3E-153	88,11-99,12	Classical swine fever virus
HVDN4	439-485	439-485	92-100	5E-173 – 8E-154	88,99-99,56	Classical swine fever virus
HVDN5	438-487	438-487	92-100	6E-174 – 2E-154	88,99-99,56	Classical swine fever virus
HVDN6	436-481	436-481	92-100	2E-171 – 2E-152	88,11-98,68	Classical swine fever virus
HVDN7	439-485	439-485	92-100	5E-173 – 8E-154	88,99-99,56	Classical swine fever virus
HVDN8	439-485	439-485	92-100	5E-173 – 8E-154	88,99-99,56	Classical swine fever virus
HVDN9	438-486	438-486	92-100	2E-173 – 5E-154	88,55-99,56	Classical swine fever virus
HVDN10	434-477	434-477	92-100	4E-170 – 1E-152	88,55-97,36	Classical swine fever virus
HVVT1	439-485	439-485	92-100	5E-173 – 8E-154	88,99-99,56	Classical swine fever virus
HVVT2	437-483	437-483	92-100	3E-172 – 4E-153	88,55-99,12	Classical swine fever virus
HVVT3	436-482	436-482	92-100	1E-171 – 1E-152	88,55-99,12	Classical swine fever virus
HVVT4	436-482	436-482	92-100	1E-171 – 1E-152	88,11-98,68	Classical swine fever virus
HVKH1	437-486	437-486	92-100	2E-173 – 5E-154	88,55-99,12	Classical swine fever virus
HVHCM1	436-481	436-481	92-100	2E-171 – 3E-152	87,67-98,24	Classical swine fever virus
HVLA1	439-479	439-479	94-100	2E-169 – 1E-151	88,99-98,68	Classical swine fever virus
HVTG1	438-472	438-472	94-100	3E-167 – 2E-150	88,99-97,36	Classical swine fever virus
HVTN1	426-469	426-469	92-100	3E-166 – 7E-150	88,11-96,48	Classical swine fever virus
HVBD1	435-479	435-479	92-100	9E-171 – 9E-152	88,55-98,68	Classical swine fever virus
HVLD1	437-485	437-485	92-100	5E-173 – 9E-154	88,55-99,56	Classical swine fever virus

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã tạo dòng thành công 21 dòng *E. coli* mang plasmid chứa đầy đủ trình tự gen E^{ms} của các chủng CSFV thu thập từ mẫu bệnh phẩm thực địa. Đây là cơ sở để tiến hành biểu hiện protein E^{ms} từ các trình tự được biến nạp vào *E. coli* phục vụ cho việc phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng ngừa CSFV tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Wu H, Wang J, Zhang C, Fu L, Pan Z, Wang N, Zhang P, Zhao W (2001) Attenuated lapinized chinese strain of classical swine fever virus: complete nucleotide sequence and character of 3'-noncoding region. *Virus Genes* 23(1):69-76.
- [2] Meyers G, Thiel H-J (1996) Molecular characterization of pestiviruses. *Advances in virus research* 47:53-118.
- [3] Thiel H, Stark R, Weiland E, Rümenapf T, Meyers G (1991) Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *Journal of virology* 65(9):4705-4712.
- [4] Dong X-N, Chen Y-H (2007) Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines. *Vaccine* 25(2):205-230.
- [5] Bruschke C, Hulst MM, Moormann R, Van Rijn P, Van Oirschot J (1997) Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *Journal of virology* 71(9):6692-6696.
- [6] Rümenapf T, Unger G, Strauss JH, Thiel H-J (1993) Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *Journal of virology* 67(6):3288-3294.
- [7] Hulst M, Moormann R (1997) Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E (rns) and E2 of classical swine fever virus: E (rns) and E2 interact with different receptors. *Journal of General Virology* 78(11):2779-2787.
- [8] Hulst M, Van Gennip H, Moormann R (2000) Passage of classical swine fever virus in cultured swine kidney cells selects virus variants that bind to heparan sulfate due to a single amino acid change in envelope protein Erns. *Journal of virology* 74(20):9553-9561.

- [9] Bouma A, De Smit A, De Jong M, De Kluijver E, Moormann Rd (2000) Determination of the onset of the herd-immunity induced by the E2 sub-unit vaccine against classical swine fever virus. *Vaccine* 18(14):1374-1381.
- [10] Ahuja A, Sen A, Yogisharadhya R, Rajak K, Shivachandra S (2012) Prokaryotic expression and purification of highly soluble partial Glycoprotein Erns of Indian strain of classical swine fever virus. *Indian Journal of Virology* 23(3):397-401.
- [11] Aebischer A, Müller M, Hofmann MA (2013) Two newly developed Erns-based ELISAs allow the differentiation of Classical Swine Fever virus-infected from marker-vaccinated animals and the discrimination of pestivirus antibodies. *Veterinary microbiology* 161(3-4):274-285.
- [12] Lin M, Trottier E, Pasick J (2005) Antibody responses of pigs to defined Erns fragments after infection with classical swine fever virus. *Clinical and Vaccine Immunology* 12(1):180-186.
- [13] Nguyen NH, Nguyen BTP, Do DT, Nguyen TQ, Nguyen DTM, Nguyen MN (2021) Genetic diversity and molecular characterization of classical swine fever virus envelope protein genes E2 and Erns circulating in Vietnam from 2017 to 2019. *Infection, Genetics and Evolution* 96:105140.
- [14] Lin M, Trottier E, Pasick J, Sabara M (2004) Identification of antigenic regions of the Erns protein for pig antibodies elicited during classical swine fever virus infection. *Journal of biochemistry* 136(6):795-804.
- [15] Van Gennip H, Van Rijn P, Widjoatmodjo M, De Smit A, Moormann R (2000) Chimeric classical swine fever viruses containing envelope protein ERNS or E2 of bovine viral diarrhoea virus protect pigs against challenge with CSFV and induce a distinguishable antibody response. *Vaccine* 19(4-5):447-459.
- [16] Borca MV, Gudmundsdottir I, Fernández-Sainz IJ, Holinka LG, Risatti GR (2008) Patterns of cellular gene expression in swine macrophages infected with highly virulent classical swine fever virus strain Brescia. *Virus research* 138(1-2):89-96.
- [17] Fernandez-Sainz I, Holinka L, Gavrilo B, Prarat M, Gladue D, Lu Z, Jia W, Risatti G, Borca M (2009) Alteration of the N-linked glycosylation condition in E1 glycoprotein of Classical Swine Fever Virus strain Brescia alters virulence in swine. *Virology* 386(1):210-216.
- [18] Uttenthal Å, Le Potier M-F, Romero L, De Mia GM, Floegel-Niesmann G (2001) Classical swine fever (CSF) marker vaccine: Trial I. Challenge studies in weaner pigs. *Veterinary Microbiology* 83(2):85-106.

CLONING E^{RNS} GENE OF CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS – TOWARDS CREATION OF SUBUNIT VACCINE AGAINST CLASSICAL SWINE FEVER

MINH NAM NGUYEN^{1,2,3}, PHUONG BINH THI NGUYEN⁴, DANH CONG LAI⁵, NGOC HAI NGUYEN^{5,*}

¹ *Research Center for Genetics and Reproductive Health (CGRH), School of Medicine, Vietnam National University HCMC,*

² *Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, Vietnam National University HCMC,*

³ *Vietnam National University HCMC,*

⁴ *P&Y Livestock Service Company Limited, Thu Duc, HCMC,*

⁵ *Faculty of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Nong Lam University-HCMC;*

**Corresponding: nguyennngochai@hcmuaf.edu.vn*

Abstract. Classical swine fever virus (CSFV) is composed of 4 structural proteins, in which E^{rns} is an important virulence factor in the serological diagnosis and vaccine development. This study was conducted to generate *E. coli* lines carrying the full-length E^{rns} gene sequence and initially evaluated the feasibility of generating recombinant E^{rns} protein. Twenty-one E^{rns} gene sequences were collected, inserted into the plasmid, and transformed into *E. coli* competent cells. Plasmids from successfully inserted bacterial lines were extracted and sequenced to evaluate the effectiveness of the cloning method. Sequencing results show that the study has successfully created 21 lines of *E. coli* carrying the E^{rns} gene of field strains. These 21 sequences have very high similarity at nucleotides (88.99 - 98.38%) and amino acids (87.67 - 99.56%) levels to 100 sequences having the highest similarity on NCBI.

Keywords. CSFV, E^{rns}, cloning, vaccine.

Ngày gửi bài: 16/06/2022

Ngày chấp nhận đăng: 06/10/2022