# Tổng hợp và đánh giá tính sinh miễn dịch của epitope không liên tục được dự đoán từ kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1

• **Trần Thị Hồng Kim**
• **Trần Linh Thước**
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM
*( Bài nhận ngày 11 tháng 03 năm 2015, nhận đăng ngày 12 tháng 06 năm 2015)*

## TÓM TẮT

*Nhằm phát triển vắc-xin có hiệu lực ổn định đối với virus dễ biến đổi như virus cúm A/H5N1, chúng tôi sử dụng công cụ Tin Sinh học để dự đoán các epitope bảo tồn từ các kháng nguyên của virus dùng làm vật liệu để phát triển vắc-xin đa giá phòng chủng virus cúm này. Với cách tiếp cận này, chúng tôi đã dự đoán được một epitope không liên tục nhận diện bởi tế bào B, là một peptide gồm 14 acid amin, chứa các acid amin gần nhau về cấu trúc trên vùng bảo tồn kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1. Để làm tăng tính sinh miễn dịch đặc hiệu của epitope tế bào B này, chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen với chủng chủ là vi khuẩn Escherichia coli để tổng hợp epitope tế bào B này dưới dạng protein có trình tự peptide lặp lại 3 lần và dung hợp với kháng nguyên flagellin H:1,2 của Salmonella* Typhimurium. *Tính sinh miễn dịch của dạng epitope được tổng hợp hóa học và epitope tái tổ hợp được tổng hợp trong E. coli này được kiểm tra bằng cách gây miễn dịch trên chuột. Bằng phương pháp ức chế ngưng kết hồng cầu (Hemagglutination inhibition - HI), chúng tôi đã chứng minh được rằng cả hai loại kháng huyết thanh thu nhận được từ chuột được tiêm epitope tái tổ hợp ở dạng dung hợp với kháng nguyên flagellin H:1,2 của S.* Typhimurium *hoặc chuột được tiêm epitope tổng hợp hóa học đều có khả năng nhận diện và ức chế đặc hiệu hoạt tính ngưng kết hồng cầu của các kháng nguyên virus cúm A/Vietnam /CL26/2004 (H5N1) và A/H5N1/Chicken13/ Vietnam /LA/ 2006 phân lập từ các bệnh phẩm người và gà ở Việt Nam.*

***Từ khóa:*** *Epitope tế bào B, flagellin, ức chế ngưng kết hồng cầu, vaccine đa giá, virus cúm A/H5N1.*

## MỞ ĐẦU

Virus cúm độc lực cao A/H5N1 đã gây thiệt hại nghiêm trọng cho ngành chăn nuôi gia cầm, đồng thời ảnh hưởng đến sức khỏe và tính mạng con người trên thế giới từ năm 2003 đến nay [5]. Tính đến tháng 1 năm 2015, thế giới đã có 694 ca nhiễm cúm A/H5N1 trên người, với 58 % trường hợp tử vong, trong đó Việt Nam là một trong ba quốc gia có số người mắc và tử vong do cúm A/H5N1 cao nhất [17]. Cho đến nay, nguy cơ bùng phát dịch H5N1 vẫn còn rất lớn và điều đáng lo ngại nhất là khả năng tiềm ẩn lây nhiễm trực tiếp từ người sang người của virus cúm A/H5N1 [8].

Hiện nay, tiêm phòng vắc-xin là liệu pháp y học chính nhằm khống chế đại dịch cúm gia cầm A/H5N1 cũng như ngăn chặn virus lây nhiễm trên người. Theo Hampson (2008), có nhiều loại vắc-xin phòng cúm A/H5N1 đã được phát triển và sử dụng như vắc-xin bất hoạt, vắc-xin nhược độc và vắc-xin virus tái tổ hợp [7]. Tuy nhiên, virus cúm A/H5N1 có khả năng biến đổi kháng nguyên bề mặt liên tục và nhanh chóng, tạo ra nhiều chủng mới có thể kháng lại hiệu quả bảo vệ của các vắc-xin đang lưu hành [6, 14]. Do đó, các phương pháp mới để phát triển vắc-xin vẫn tiếp tục được nghiên cứu nhằm cải thiện các loại vắc-xin hiện có, khắc phục vấn đề hàng năm phải tạo vắc-xin mới cho các chủng virus cúm mới, đồng thời nhằm nghiên cứu tạo ra một loại vắc-xin đa trị có khả năng phòng ngừa được nhiều chủng virus cúm khác nhau [1, 6]. Vì vậy, việc phát triển một loại vắc-xin đa giá, có phổ bảo vệ rộng đang rất được quan tâm nghiên cứu.

Một trong các hướng tiếp cận đang được quan tâm hiện nay là phát triển vắc-xin phổ rộng, dựa trên các epitope bảo tồn của hai kháng nguyên bề mặt quan trọng HA và NA của virus cúm [3]. Epitope là một vùng nhỏ định vị trên bề mặt cấu trúc protein và có khả năng gây đáp ứng miễn dịch. Dựa trên cơ chế gây đáp ứng miễn dịch, epitope được phân thành epitope tế bào T (nhận diện bởi tế bào T) và epitope tế bào B (nhận diện bởi tế bào B). Ưu điểm chính của vắc-xin dựa trên epitope là khả năng gây đáp ứng miễn dịch với cấu trúc kháng nguyên tối thiểu; do vậy, nếu chứa đầy đủ các epitope cần thiết, vắc-xin sẽ kích thích đáp ứng miễn dịch chuyên biệt trong khi tránh được những ảnh hưởng không mong muốn. Nhược điểm của vắc-xin epitope là tính sinh miễn dịch thấp, tuy nhiên đặc tính này có thể khắc phục bằng cách tăng cường tính sinh miễn dịch của các kháng nguyên epitope thông qua việc tăng số lần lặp lại của epitope trên một phân tử và dung hợp epitope với một protein mang [15].

Các nghiên cứu trước đây cho thấy flagellin (H:1,2) của vi khuẩn *Salmonella* Typhimurium có vai trò hoạt hóa hệ miễn dịch của vật chủ do sự hoạt hóa thụ thể TLR-5 (Toll-like receptor 5) hiện diện trên các tế bào trình diện kháng nguyên [4, 15]. Kháng nguyên flagellin là thành phần cấu tạo thành lông roi, giúp vi khuẩn di động và là một protein có vai trò trong độc lực của vi khuẩn này. Bên cạnh hiệu quả gây ra các đáp ứng viêm khi được đưa vào cơ thể vật chủ, flagellin có thể được sử dụng như một tá dược nhiều tiềm năng do khả năng gây đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên mục tiêu khi chúng cùng hiện diện trong cùng một phân tử protein dung hợp. Ở dạng này, flagellin trực tiếp gây ra sự trưởng thành các DC (dendritic cells), kích hoạt sự điều chỉnh tăng cường các tín hiệu đồng kích thích và các phân tử trình diện kháng nguyên CD80, CD83, CD86, MHC lớp II, TNFα, IL-8, IL-1β, CCL2, CCL5.

Trước đây, bằng công cụ Tin Sinh học, chúng tôi đã dự đoán được các epitope nhận diện bởi tế bào B và tế bào T từ kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 [12]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành tổng hợp một epitope tế bào B không liên tục được dự đoán từ vùng bảo tồn của kháng nguyên HA virus cúm A/H5N1 dưới dạng protein dung hợp với kháng nguyên flagellin H:1,2 của *S.* Typhimurium, kí hiệu là H:1,2-$(HaBdc)_3$ và đánh giá hiệu quả bảo vệ của kháng nguyên này trên chuột. Đây là một bước quan trọng để sàng lọc các kháng nguyên tiềm năng hướng đến việc phát triển vắc-xin cúm gia cầm A/H5N1 phổ rộng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu sinh học

Plasmid pVFT được sử dụng cho mục đích biểu hiện epitope tái tổ hợp. pVFT là dẫn xuất của plasmid biểu hiện pET-28a(+) (Novagen) được cải biến theo Kim et al. (2006) [9] để protein mục tiêu được biểu hiện ở dạng dung hợp với GST và trình tự peptide nhận diện bởi TEV protease ở đầu N của protein mục tiêu, giúp loại bỏ protein GST sau tinh chế. Chủng *E. coli* DH5α (*F– endA1 hsdR17 (rk–/mk–) supE44 thi λ– recA1 gyrA96 Δlac U169 (ϕ80 lacZ ΔM15)*) được sử dụng để lưu trữ plasmid tái tổ hợp. Chủng chủ *E. coli* BL21 (DE3) (*F- dcm ompT hsdSB (r-B m-B) gal λ(DE3)*) được sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp.

Peptide HaBdc (NDAAEQTKLYQNPT) được tổng hợp bởi công ty SBS Bioscience, có độ tinh sạch 95 – 98 %. Đây là 1 epitope tế bào B không liên tục bảo tồn đã được dự đoán bằng phương pháp Tin Sinh học từ kháng nguyên HA virus cúm A/H5N1, được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. Protease TEV được cung cấp bởi Công ty TNHH Công nghệ Sinh học HT. Vắc-xin cúm gia cầm subtype H5N1 – vô hoạt nhũ dầu NAVET-VIFLUVAC được cung cấp bởi Công ty thuốc Thú y Trung ương 2 được dùng tiêm cho lô chuột đối chứng dương.

Các kháng nguyên virus cúm A/H5N1 dạng bất hoạt (A/H5N1/Chicken13/Vietnam/LA/2006) và A/Vietnam/CL26/2004 (H5N1) đã được phân lập từ bệnh phẩm gà và người tại Việt Nam, được cung cấp bởi Đơn vị Nghiên cứu lâm sàng Đại học Oxford - Bệnh viện Bệnh Nhiệt đới TP. Hồ Chí Minh [2]. Chuột nhắt trắng (*Mus musculus var. albino*) cái, 6-7 tuần tuổi, trọng lượng 20-22 g (Viện Pasteur TP.HCM) được dùng để tiêm các kháng nguyên epitope, thu nhận kháng huyết thanh và kiểm chứng khả năng nhận diện và gắn kháng thể trong kháng huyết thanh với kháng nguyên chuyên biệt.

### Cấu trúc plasmid tái tổ hợp *pVFT–fljB–(habdc)$_3$* và tạo dòng *E. coli* biểu hiện protein tái tổ hợp GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$

Gen mã hóa cho epitope tế bào B không liên tục lặp lại 3 lần *(habdc)$_3$* được tổng hợp bởi Công ty GenScript (Mỹ) có chứa trình tự nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Xho*I và *Sal*I được nối vào plasmid *pVFT-fljB* [11] có mang gen *fljB* mã hóa kháng nguyên roi H:1,2 của vi khuẩn *S.* Typhimurium tạo plasmid tái tổ hợp *pVFT-fljB-(habdc)$_3$*. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp để tạo các dòng *E. coli* DH5α/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$*. Sàng lọc các thể biến nạp bằng môi trường LB-Kan 30. Tuyển chọn các dòng *E. coli* DH5α chứa plasmid tái tổ hợp bằng PCR khuẩn lạc với cặp mồi *habdc-F* (ggccatgtc gacaacga tgcggcg gaacagacc)/ *T7*- ter (caccgctgagcaataactag), PCR plasmid với cặp mồi *gst*-F (agagcgtg cagagatttcaatg)/ *T7*- ter; *fljB*-F (ggccatgaattcg cacaagtaatcaacactaacagt)/ *T7*-ter và giải trình tự với cặp mồi *fljB*-F và *T7*-ter bởi công ty Macrogen, Hàn Quốc.

Plasmid tái tổ hợp *pVFT-fljB-(habdc)$_3$* được biến nạp vào chủng chủ *E. coli* BL21 (DE3) để tạo các dòng *E. coli* BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$* có khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$. Tuyển chọn các dòng *E. coli* BL21 (DE3) chứa plasmid tái tổ hợp bằng PCR khuẩn lạc nhờ cặp mồi *fljB*-F, *T7*-ter.

### Cảm ứng, biểu hiện và thu nhận epitope tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$

Nuôi cấy dòng *E. coli* BL21 (DE3) chứa plasmid tái tổ hợp trong 400 mL môi trường LB-Kan 30, lắc 250 vòng/phút, 37 $^oC$ và cảm ứng tổng hợp protein tái tổ hợp GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$ bằng IPTG 0,1 mM khi $OD_{600nm}$ của canh khuẩn đạt 0,9 -1,0 trong 4 giờ. Sinh khối tế bào được tạo huyền phù trong 40 mL dung dịch PBS 1X (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4$, 1,8 mM $KH_2PO_4$, pH 7,3).

Bổ sung lysozyme 1 µg/mL, ủ 37 ºC trong 30 phút; bổ sung 0,1 mM PMSF (phenyl methyl sulphonyl fluoride). Phá tế bào bằng sóng siêu âm 12 Watt trong 30 giây, nghỉ 30 giây, lặp lại 20 lần. Thu dịch nổi sau ly tâm (13.000 vòng/phút trong 10 phút, ở 4 ºC) và lọc qua màng lọc có đường kính 0,45 µm. Nạp mẫu vào cột GSTrap FF 5 mL (GE Healthcare, Mỹ), rửa cột bằng 25 mL dung dịch PBS 1X, loại bỏ đuôi dung hợp GST khỏi protein tái tổ hợp GST-H:1,2-$(HaBdc)_3$ bằng cách bổ sung protease TEV vào cột, ủ trong 2 giờ, 37 ºC, sau đó thu nhận protein H:1,2-$(HaBdc)_3$ bằng 20 mL dung dịch PBS 1X, protein GST được giữ lại trên cột GSTrap sau đó cũng được thu nhận bằng 20 mL dung dịch ly giải pH 8 (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutathione khử). Thu nhận và kiểm tra các phân đoạn gắn cột, rửa và ly giải protein GST và H:1,2-$(HaBdc)_3$ bằng SDS-PAGE và lai Western với kháng thể kháng GST.

**Gây đáp ứng miễn dịch chuột bằng các kháng nguyên epitope và thu nhận kháng huyết thanh**

Chuột thí nghiệm được chia thành 4 nhóm (n =5) gồm: (i) Nhóm chuột được tiêm kháng nguyên H:1,2 (25 µg/ con chuột); (ii) Nhóm chuột được tiêm peptide HaBdc (25 µg/ con chuột); (iii) Nhóm chuột tiêm protein H:1,2-(HaBdc)3 (25 µg/ con chuột) và (iv) Nhóm chuột được tiêm vaccine thương mại (20 µl/ con chuột). Tá chất Complete Freund Adjuvant (CFA-Sigma) được sử dụng cho lần tiêm đầu tiên (kháng nguyên: CFA = 1:1). Tiến hành tiêm nhắc vào các ngày 28 và 35 với liều kháng nguyên bằng ½ liều kháng nguyên ban đầu với tá chất là Incomplete Freund Adjuvant (IFA-Sigma). Sau lần tiêm cuối 10 ngày, thu 300 µL máu từ hốc mắt chuột. Máu được ly tâm 3.000 vòng/phút, 30 phút, 4 ºC, thu kháng huyết thanh và trữ lạnh ở -30 ºC.

**Kiểm tra sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu với epitope HaBdc trong các kháng huyết thanh bằng phương pháp ELISA**

Cố định 100 µL kháng nguyên (peptide HaBdc hoặc protein H:1,2-$(HaBdc)_3$) vào các giếng của đĩa ELISA 96 giếng (3,12 ng/µL). Khóa các vị trí không gắn kháng nguyên bằng 100 µL dung dịch sữa gầy (PBS bổ sung 5 % sữa gầy, PBS: 14,61 g NaCl, 1 mL Tween 20) trong 1 giờ. Sau bước rửa giếng bằng PBS, kháng huyết thanh chuột được bổ sung vào giếng và ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Bổ sung kháng thể anti-(IgA + IgG + IgM) chuột cộng hợp horseradish peroxidase (HRP) (Anti mouse IgA+IgG+IgM-HRP; Abcam) ở độ pha loãng 1: 5000 (100 µL/giếng), ủ 37 °C trong 1 giờ. Phức hợp miễn dịch tạo thành được phát hiện bằng cơ chất *o*-phenylenediamine (OPD; Sigma) (40 µg OPD/ 1 ml citrate buffer pH 5), $H_2O_2$ 0,5 µL. Phản ứng hiện màu được kết thúc bằng 100 µl $H_2SO_4$ 2N sau 20 phút. Đo cường độ màu của đĩa phản ứng ở bước sóng 492 nm bằng máy đọc đĩa ELISA (Thermo Multiskan Ascent). Kháng nguyên có tính sinh miễn dịch đặc hiệu khi giá trị $OD_{492}$ của phức hợp miễn dịch này lớn hơn hoặc bằng 0,278 [13].

**Xác nhận sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu virus cúm A/H5N1 bằng phương pháp ức chế ngưng kết hồng cầu (Hemagglutination inhibition test – HI test)**

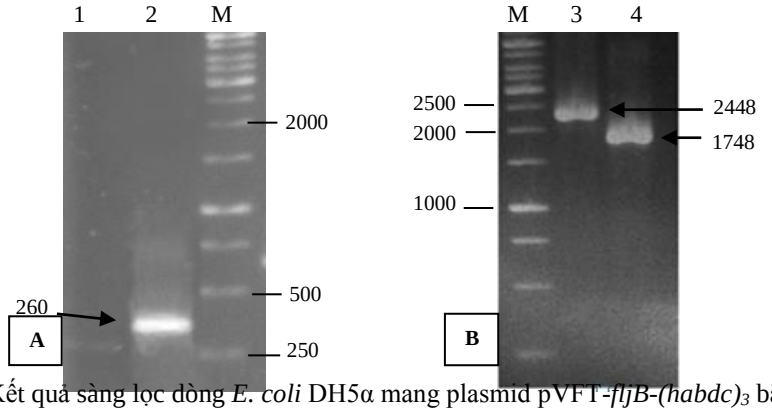
Sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu virus A/H5N1 được kiểm chứng bằng thử nghiệm HI. Kháng huyết thanh thu nhận từ chuột đã được tiêm kháng nguyên lần lượt được xử lý bằng RDE (Receptor-destroying enzyme) nhằm loại bỏ các chất kìm hãm không đặc hiệu. Pha loãng bậc hai kháng huyết thanh đã xử lý RDE trong đĩa 96 giếng đáy hình chữ V (25 µL/ giếng). Bổ sung 25 µL kháng nguyên virus A/H5N1 bất hoạt chứa 4 đơn vị HA vào các giếng kháng huyết thanh, ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 50 µL hồng cầu gà tây (0,5 %), lắc đều, ủ ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Quan sát kết quả dựa trên hiện tượng ức chế ngưng kết hồng cầu trong các giếng.

Phản ứng dương tính khi kháng thể ức chế kháng nguyên HA ngăn không cho các phân tử này ngưng kết hồng cầu, làm cho hồng cầu không ngưng kết và bị sa lắng ở đáy giếng. Ngược lại, phản ứng âm tính khi kháng nguyên không bị ức chế và gây ngưng kết hồng cầu. Đơn vị hiệu giá kháng thể kháng HA là độ pha loãng cao nhất của huyết thanh vẫn còn ức chế ngưng kết hồng cầu [16].

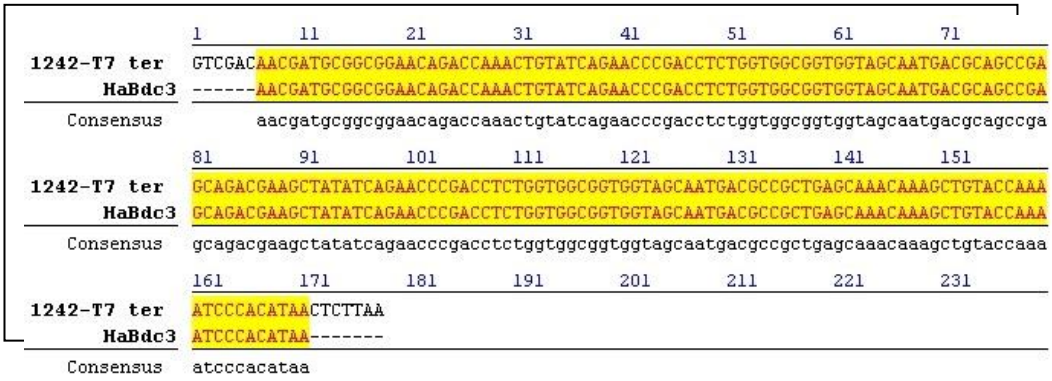
## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Tạo dòng *E. coli* DH5α mang vector tái tổ hợp *pVFT-fljB-(habdc)$_3$*

Kết quả PCR khuẩn lạc các thể biến nạp mọc trên môi trường LB-Kan 30 bằng cặp mồi *habdc*-F và *T7*-ter ở Hình 1A cho thấy chỉ xuất hiện một vạch đúng với kích thước cộng gộp của gen *(habdc)$_3$* và trình tự đến vị trí *T7* terminator trên plasmid là 260 bp (giếng 2), trong khi đó chứng âm, sản phẩm PCR của tế bào không được biến nạp với cặp mồi trên không xuất hiện vạch này (giếng 1). Sự hiện diện các gen *gst*, *fljB* và *(habdc)$_3$* trên plasmid được tách chiết từ dòng *E. coli* DH5α mang plasmid tái tổ hợp dự tuyển bằng phương pháp PCR sử dụng các cặp mồi *gst*-F, *T7*-ter và *fljB*-F, *T7*-ter. Hình 1B cho thấy sản phẩm PCR lần lượt có kích thước 2448 bps và 1748 bps ở giếng 3 và giếng 4 tương ứng với kích thước cộng gộp của các gen *gst*, *fljB* và *(habdc)$_3$* theo thứ tự được thiết kế trên plasmid lý thuyết. Kết quả giải trình tự bằng cặp mồi *fljB*- F và *T7*-ter trên plasmid *pVFT-fljB-(habdc)$_3$* cho thấy trình trự gen *(habdc)$_3$* có độ tương đồng 100 % so với trình tự lý thuyết và đồng khung với trình tự mã hóa gen *gst* và *fljB* (Hình 2).

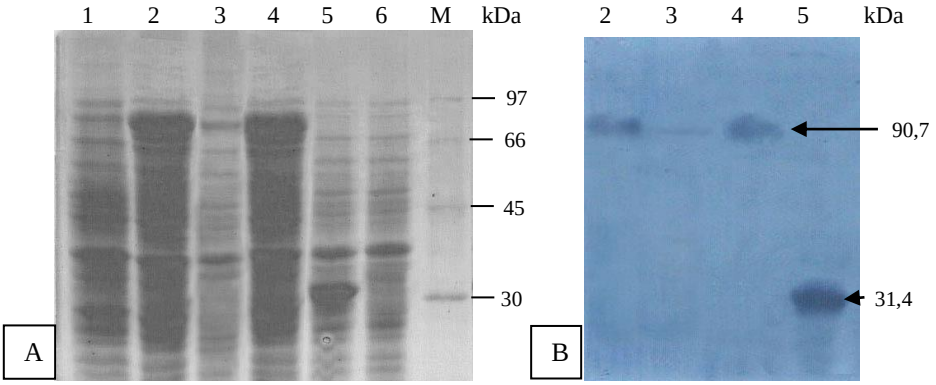



**Hình 1.** Kết quả sàng lọc dòng *E. coli* DH5α mang plasmid pVFT-*fljB-(habdc)$_3$* bằng PCR khuẩn lạc (A) và PCR plasmid (B). M, thang DNA; 1, (-)/ *habdc*-F, *T7*-ter; 2, *E. coli* DH5α/ *habdc*-F, *T7*-ter; 3, pVFT-*fljB-(habdc)$_3$*/ *gst*-F, *T7*- ter; 4, pVFT-*fljB-(habdc)$_3$*/ *fljB*-F, *T7*- ter.




**Hình 2.** Kết quả giải trình tự gen *(habdc)$_3$* trong plasmid pVFT-*fljB-(habdc)$_3$* bằng mồi *T7*-ter

**Biểu hiện protein GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$ từ chủng *E. coli* BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$***



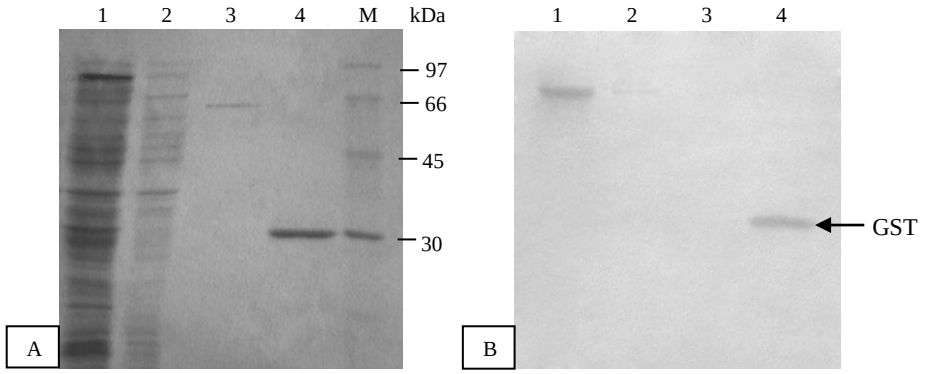

**Hình 3**. Phân tích biểu hiện của protein GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$ trong chủng *E. coli* BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$* bằng điện di SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng GST (B). 1, BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$*, IPTG (-); 2, BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$*, IPTG (+), pha tổng; 3, BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$*, IPTG (+), pha tủa; 4, BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$*, IPTG (+), pha tan; 5, BL21 (DE3)/ *pVFT*, IPTG (+); 6, BL21 (DE3)/ *pVFT*, IPTG (-); M, Thang protein (Amersham).

Hình 3A trình bày kết quả phân tích sự biểu hiện protein từ các chủng *E.coli* BL21 (DE3) mang plasmid *pVFT* hoặc *pVFT-fljB-(habdc)$_3$* khi được cảm ứng hoặc không được cảm ứng bởi IPTG bằng phương pháp SDS-PAGE. Khi được cảm ứng bởi IPTG 0,1 mM, protein GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$ (90,7 kDa) của chủng *E. coli* BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$* được biểu hiện vượt mức chiếm 20,3 % tổng protein của tế bào (giếng 2), vạch này không xuất hiện khi chủng *E. coli* BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)$_3$* không được cảm ứng IPTG (giếng 1). Kết quả này cũng tương tự đối với chủng *E. coli* BL21 (DE3)/ *pVFT* có biểu hiện protein GST (31,4 kDa) khi được cảm ứng IPTG 0,1 mM (giếng 5) và không biểu hiện protein này khi không được cảm ứng IPTG (giếng 6). Điều đó cho thấy *pVFT* có khả năng biểu hiện mạnh protein tái tổ hợp khi có sự hiện diện IPTG dưới sự kiểm soát của promoter *T7*. Bên cạnh đó, Giếng 4 cho thấy hơn 90 % protein GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$ được biểu hiện trong pha tan của tổng protein tái tổ hợp được biểu hiện từ dòng *E.coli* BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)3*.

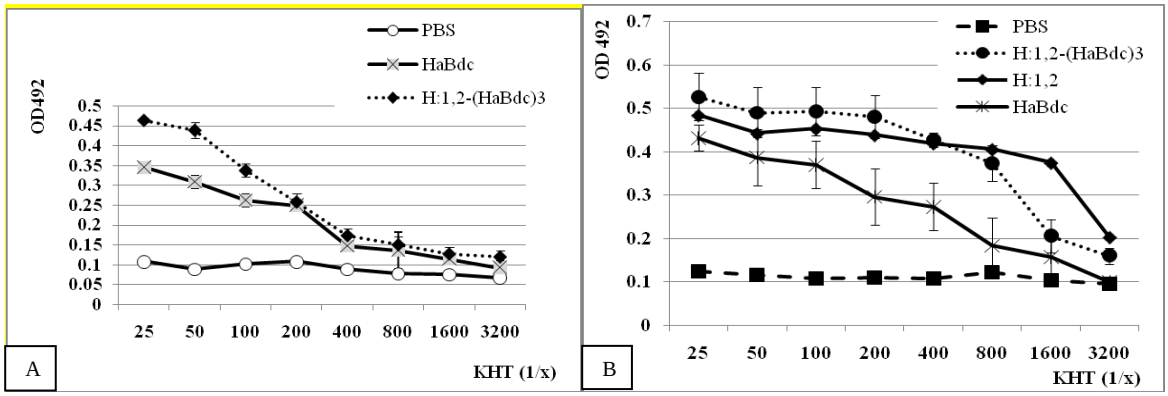
Tiến hành xác nhận sự hiện diện của các protein được biểu hiện bằng phương pháp lai với kháng thể kháng GST (Hình 3B) cho thấy chỉ xuất hiện các vệt đen tương ứng với kích thước của các vạch protein GST (Giếng 5) hoặc protein tái tổ hợp GST-H:1,2-(HaBdc)3 (Giếng 2, 3 và 4). Như vậy, protein tái tổ hợp GST-H:1,2-(HaBdc)3 đã được biểu hiện thành công từ chủng *E. coli* BL21 (DE3)/ *pVFT-fljB-(habdc)3*.

**Thu nhận epitope tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$ bằng phương pháp tinh chế sắc ký ái lực**

Nhằm thu nhận epitope tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$, chúng tôi tiến hành loại bỏ protein GST khỏi protein dung hợp GST-H:1,2-(HaBdc)$_3$ thông qua phản ứng cắt nhờ protease TEV (Tobacco Etch Virus). Peptide tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$ được thu nhận bằng phương pháp sắc ký ái lực nhờ cột GS Trap FF. Hình 4 cho thấy protein GST (31,4 kDa) đã được loại bỏ thành công (giếng 4) và phân đoạn peptide tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$ được thu nhận có trọng lượng phân tử 59,3 KDa (giếng 3).




**Hình 4.** Phân tích quá trình thu nhận H:1,2-(HaBdc)$_3$ bằng điện di SDS – PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng GST (B). 1, Protein tổng trước khi qua cột GS Trap; 2, Phân đoạn sau khi qua cột GS Trap; 3, Phân đoạn rửa cột sau khi ủ protease TEV; 4, Phân đoạn ly giải; M, Thang protein phân tử lượng thấp.




**Hình 5.** Kiểm tra khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu HaBdc (A) và H:1,2-(HaBdc)$_3$ (B) của các kháng huyết thanh (KHT) chuột tiêm các kháng nguyên HaBdc, GST-H:1,2 và H:1,2-(HaBdc)$_3$ bằng phương pháp ELISA (Mean ± SD, n = 5).

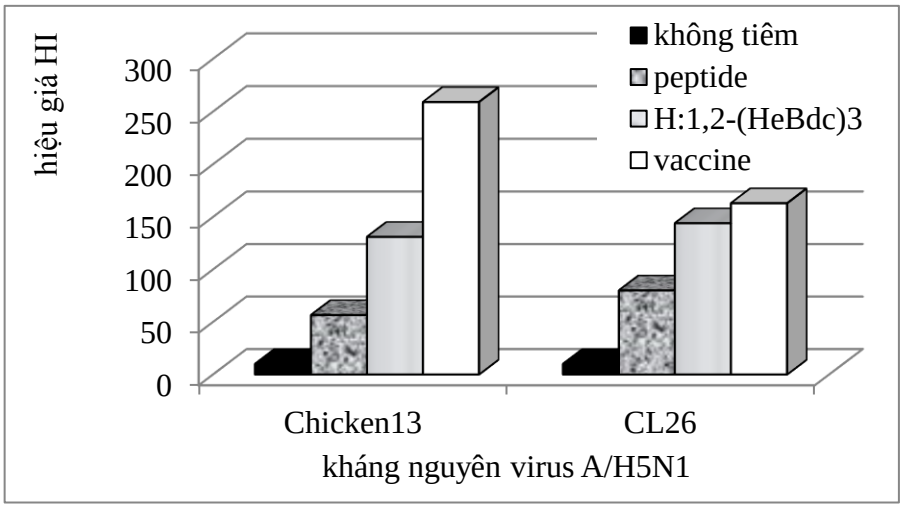
**Xác định hiệu giá kháng thể đặc hiệu epitope HaBdc của các kháng huyết thanh chuột tiêm peptide HaBdc và peptide tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$**

Kết quả Hình 5 cho thấy các kháng nguyên peptide HaBdc và peptide tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$ đều có khả năng sinh miễn dịch trên chuột, tạo kháng thể nhận diện kháng nguyên chuyên biệt epitope HaBdc. Hiệu giá kháng thể (IgA + IgM + IgG) từ chuột được tiêm peptide HaBdc nhận diện được kháng nguyên H:1,2-(HaBdc)$_3$ là 200 (Hình 5B). Giá trị này cũng tương tự đối với kháng huyết thanh từ chuột được tiêm peptide tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$ có thể nhận diện và gắn đặc hiệu với kháng nguyên peptide HaBdc cố định trên giếng (Hình 5A). Bên cạnh đó, đường biểu diễn giá trị $OD_{492}$ của kháng huyết thanh chuột được tiêm epitope tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$ luôn nằm về phía bên phải của đường biểu diễn giá trị $OD_{492}$ kháng huyết thanh chuột được tiêm peptide HaBdc (Hình 5). Điều này chứng tỏ kháng nguyên H:1,2-(HaBdc)$_3$ có tính sinh miễn dịch mạnh hơn kháng nguyên peptide, do hiệu quả tăng cường sinh miễn dịch của kháng nguyên H:1,2 đối với kháng nguyên dung hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$.

**So sánh hiệu quả ức chế kháng nguyên virus cúm A/H5N1 của kháng huyết thanh chuột tiêm peptide HaBdc và epitope tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$**

Kết quả ở Hình 6 cho phép kết luận epitope tế bào B không liên tục (HaBdc) được tổng hợp hóa học hoặc epitope tái tổ hợp được tổng hợp di truyền (H:1,2-(HaBdc)$_3$) có khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch đặc hiệu trên chuột đối với các chủng virus cúm gia cầm được phân lập từ bệnh phẩm gà (A/H5N1/Chicken13/Vietnam /LA/2006) và người (A/Vietnam /CL26/2004(H5N1)). Hiệu giá kháng thể (HI) của kháng huyết thanh từ chuột được tiêm kháng nguyên H:1,2-(HaBdc)$_3$ cao hơn hiệu giá này của kháng huyết thanh chuột được tiêm kháng nguyên HaBdc lần lượt 2,3 và 1,8 lần đối với các chủng A/H5N1/Chicken13/Vietnam/LA/2006 và A/Vietnam/CL26/2004 (H5N1).

Mặc dù protein HA là một trong hai protein chủ yếu trên bề mặt của virus cúm A/H5N1. Tuy nhiên, thế giới chỉ có một vài nghiên cứu trên protein này để tạo vắc-xin phổ rộng, phòng được nhiều chủng virus cúm. Trong đó đã có một vắc-xin nhỏ mũi dựa trên epitope đã được cấp Patent số 7192595 theo Arnon et al. (2004). Vắc-xin này là hỗn hợp bao gồm bốn epitope của virus cúm A được biểu hiện trong flagellin của *Samonella* Dublin. Trong đó, đoạn epitope HA (từ acid amin 91-108) được nhận diện bởi tế bào B là một trong bốn epitope đó. Kết quả thử nghiệm cho thấy vắc-xin này có hiệu quả trên một số chủng virus cúm H1, H2, H3 [1]. Bên cạnh đó, cũng có một nghiên cứu khác tập trung vào vùng bảo tồn trên phần thân thẳng của protein HA. Nghiên cứu này chỉ ra rằng khi tiêm phần thân của protein HA (bỏ vùng khối cầu) cho chuột sẽ tạo đáp ứng miễn dịch tốt hơn so với việc tiêm một protein HA với đầy đủ độ dài [14]. Các công bố cho thấy ứng dụng hiện nay của flagellin H:1,2 trong phát triển vắc-xin chủ yếu là ở dạng protein dung hợp với epitope trong vắc-xin tái tổ hợp kháng nguyên-flagellin. Ở dạng này, flagellin trực tiếp gây ra sự trưởng thành các tế bào tua (Dendritic Cells), kích hoạt tăng cường các tín hiệu đồng kích thích và các phân tử trình diện kháng nguyên (CD80, CD83, CD86, MHC lớp II, TNFα, IL-8, IL-1β, CCL2, CCL5) [15]. Năm 2005, Arnon và cộng sự đã tổng hợp các epitope của virus cúm dưới dạng là các protein dung hợp với flagellin H:1,2 của *Salmonella* trong hệ thống biểu hiện của vi khuẩn *S.* dublin. Các kết quả kiểm tra tính sinh miễn dịch của các protein dung hợp cho thấy khả năng tạo đáp ứng miễn dịch trên chuột cao hơn rất nhiều so với khả năng này ở epitope không được dung hợp flagellin hoặc hỗn hợp gồm epitope trộn với flagellin riêng lẻ [3] [4]. Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã tổng hợp các epitope tế bào B và epitope tế bào T bảo tồn từ kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 dưới dạng dung hợp với kháng nguyên H:1,2 của vi khuẩn *S.* Typhimurium [10]. Kết quả đánh giá tính sinh miễn dịch trên chuột đã cho thấy các kháng nguyên tái tổ hợp này có thể tạo kháng thể trên chuột nhận diện và gắn đặc hiệu kháng nguyên virus cúm A/H5N1 (chủng A/H5N1/Chicken13/Vietnam/LA/2006) [11]. Việc dung hợp các epitope bảo tồn với flagellin của *S.* Typhimurium trong nghiên cứu này cũng đã mở ra hướng đi mới trong việc nghiên cứu vắc-xin đa giá phòng cúm gia cầm A/H5N1, tránh việc phải nghiên cứu thay đổi vắc-xin hàng năm. Nếu tạo được kháng nguyên phức gồm các epitope tế bào B và các epitope tế bào T của các kháng nguyên bề mặt khác nhau của virus cúm A/H5N1 thì hiệu quả bảo vệ của hỗn hợp kháng nguyên này có thể được tăng lên. Đồng thời việc dung hợp với flagellin của *Salmonella* sẽ làm tăng đáng kể khả năng đáp ứng miễn dịch của vật chủ. Các kết quả này mở ra hướng nghiên cứu sử dụng các kháng nguyên epitope dung hợp flagellin làm kháng nguyên thành phần để phát triển vắc-xin phòng ngừa nhiều chủng virus cúm A/H5N1 ở Việt Nam.




**Hình 6.** Phân tích hiệu giá kháng thể (HI) ức chế kháng nguyên virus cúm chủng A/H5N1/Chicken13/Vietnam/LA/2006 và A/Vietnam/CL26/2004 (H5N1).

## KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tổng hợp thành công epitope tế bào B không liên tục lặp lại ba lần được dự đoán từ vùng bảo tồn của kháng nguyên HA virus cúm A/H5N1 dưới dạng dung hợp với kháng nguyên flagellin H:1,2 của *S.* Typhimurium bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen trong tế bào vi khuẩn *E. coli*. Epitope HaBdc được tổng hợp hóa học và epitope tái tổ hợp H:1,2-(HaBdc)$_3$ được tổng hợp di truyền đều có khả năng tạo đáp ứng miễn dịch khi được tiêm trên chuột, tạo kháng thể ức chế đặc hiệu hoạt tính ngưng kết hồng cầu của hai kháng nguyên virus A/H5N1/Chicken13/ Vietnam/LA/2006 và A/Vietnam/CL26/2004 (H5N1). Ngoài ra, các kết quả cũng cho thấy vai trò kháng nguyên H:1,2 của *S.* Typhimurium gây ra hiệu quả tăng cường đáp ứng miễn dịch của kháng nguyên H:1,2-(HaBdc)$_3$ trên chuột.

***LỜI CẢM ƠN**: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh trong khuôn khổ đề tài mã số C2013-18-01.*

# Synthesis and immunogenicity evaluating of a discontinuous B-cell epitope predicted from influenza virus A/H5N1 HA antigen

• **Tran Thi Hong Kim**
• **Tran Linh Thuoc**
University of Science, VNU-HCM

## ABSTRACT

*To develop vaccine with stable efficiency against easily transforming virus such as influenza A/H5N1 virus, bioinformatic tools have been used to predict conserved epitopes from viral antigens to be used as materials for the development of polyvalent vaccine against this virus. Using this approach, we have successfully predicted one discontinuous B-cell epitope, a peptide of 14 aminoacids on conserved domains of HA antigen from H5N1 influenza A virus. In this study, we report results of the preparation of this discontinuous B-cell epitope as the recombinant fusion form with H:1,2 flagellin from Salmonella typhimurium to increase the immunogenicity of this epitope using genetic manipulating techniques with Escherichia coli as host cell. The immunogenicity of the chemically synthesized predicted epitope and the recombinant epitope was examined by immunization of each of these epitopes to mice. Using hemagglutination inhibition (HI) method, we successfully demonstrated that both anti-sera from mice immunized either with chemically synthesized peptide or with recombinant flagellin H:1,2 fused epitope could recognize and inhibit the agglutination of inactivated influenza H5N1 virus strains, such as A/H5N1/ Chicken13/ Vietnam/LA/2006 and A/Vietnam/CL26/2004 (H5N1) isolated from infected chicken and human in Vietnam.*

***Key words:*** *B-cell epitope, flagellin, Salmonella typhimurium, influenza A/H5N1 virus.*

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. R. Arnon, T. Ben-Yedidia, R. Levi, Peptide-based vaccine for influenza, *U.S. Patent No. 6,740,325*. *Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office*, 25 May (2004).

[2]. M. Babakir-Mina , M. Ciccozzi, M. Ciotti, F. Marcuccilli, E. Balestra, S. Dimonte, C.F. Perno, S. Aquaro, Phylogenetic analysis of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated in asian and african populations. *New Microbiologica*, 32, 397-403 (2009).

[3]. T. Ben-Yedidia, R. Arnon, Review Towards an Epitope-Based Human Vaccine for Influenza. *Human Vaccines*, 1, 3, 95-101 (2005).

[4]. C. Cuadros, F.J. Lopez-Hernandez, A.L. Dominguez, M. McClelland, J. Lustgarten, Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infection and Immunity*, 72, 5, 2810-2816 (2004).

[5]. C. Gerdil, The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine*, 21, 16, 1776-1779 (2003).

[6]. W. Gerhard, K. Mozdzanowska, D. Zharikova, Prospects for universal influenza virus vaccine. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 4, 569-574 (2006).

[7]. A.W. Hampson, Vaccines for pandemic influenza. The history of our current vaccines, their limitations and the requirements to deal with a pandemic threat. *Annals-Academy of Medicine Singapore*, 37, 6, 510 (2008).

[8]. B.S. Kamps, C. Hoffmann, W. Preiser, Influenza Report 2006. Flying Publisher 3-924774-51-X, 1-225 (2006).

[9]. M.K. Kim, J.H. Lee, H.Kim, S.J. Park, S.H. Kim, G.B. Kang, Y.S. Lee, J.B. Kim, K.K. Kim, S.W. Suh, Crystal structure of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor 1/nicotinamide phosphoribosyl transferase, free and in complex with the anti-cancer agent FK-866. *Journal of Molecular Biology*, 362, 1, 66-77 (2006).

[10]. T.T.H. Kim, H.H. Dũng, N.T.T. Vy, T.L. Thước, Kiểm tra tính sinh miễn dịch của các epitope tế bào T trên kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1 được dự đoán *in silico*. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 9, 4B, 907-913 (2011).

[11]. T.T.H. Kim, T.T.N. Thùy, T.L. Thước, Tổng hợp và kiểm chứng tính sinh miễn dịch của epitope tế bào B được dự đoán bằng phương pháp tin sinh học từ kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1. *Tạp chí Phát triển Khoa học & Công nghệ*, 15, 3, 45-55 (2012).

[12]. B.V. Lệ, Báo cáo tổng hợp kết quả đề tài khoa học công nghệ trọng điểm cấp nhà nước, Nghiên cứu, ứng dụng tin sinh học trong việc thiết kế phát triển văcxin và thuốc (mã số KC.04.18/06-10). *Cục Thông tin Khoa học và Công nghệ Quốc gia (Bộ Khoa học và Công nghệ)*.

[13]. S.A. Pourbakhsh, F. Moosakhani, M. Kianizadeh, Standardization of ELISA for detection of avian influenza virus antibodies. *Archives of Razi Institute*, 50, 19-28 (1999).

[14]. J. Steel, A.C. Lowen, T.T. Wang, M. Yondola, Q. Gao, K. Haye, P. Palese, Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*, 1, 1, 1-9 (2010).

[15]. F. Steinhagen, T. Kinjo, C. Bode, D.M. Klinman, TLR-based immune adjuvants. *Vaccine*, 29, 17, 3341-3355 (2011).

[16]. R. Webster, WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. *World Health Organization* (2002).

[17]. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/ EN_GIP_20140106