

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

Trần Thị Hồng Kim, Trần Thị Như Thùy, Trần Linh Thuộc

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 21 tháng 06 năm 2012, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 06 tháng 11 năm 2012)

TÓM TẮT: Nhằm phát triển vaccine 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 vaccine đa giá phòng ngừa virus cúm này. Với cách tiếp cận này, chúng tôi đã dự đoán được một epitope tế bào B là một peptide gồm 21 axit amin liên tục trên vùng bảo tồn của kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1. Để kiểm chứng tính sinh miễn dịch của epitope này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp gen để tổng hợp trong tế bào *E. coli* epitope tái tổ hợp ở dạng dung hợp với kháng nguyên roi H:1,2 của *Salmonella Typhimurium* và glutathione *S-transferase*. Kháng nguyên tái tổ hợp này được thu nhận, tinh chế và được dùng làm kháng nguyên để gây đáp ứng miễn dịch ở chuột. Bằng phương pháp ELISA, chúng tôi đã chứng minh được rằng kháng huyết thanh thu nhận được từ chuột này có khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu với kháng nguyên HA của chủng virus cúm H5N1 đã được phân lập từ bệnh phẩm gà tại Việt Nam tương tự như kháng thể từ chuột tiêm vaccine bất hoạt thương mại phòng chống virus H5N1 dùng cho gia cầm.

Từ khóa: epitope tế bào B, tạo dòng, biểu hiện, ELISA, virus cúm A/H5N1.

MỞ ĐẦU

Dịch cúm A/H5N1 là một bệnh dịch có khả năng lây lan rộng và gây thiệt hại nghiêm trọng ở gia cầm cũng như ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Cho đến nay, nhiều phương pháp ngăn ngừa và điều trị bệnh dịch H5N1 đã được phát triển như các loại vaccine [6, 15] và thuốc ức chế protein của virus [5, 7]. Tuy nhiên, virus cúm có khả năng biến đổi kháng nguyên một cách liên tục và nhanh chóng, tạo ra nhiều chủng mới có thể kháng lại các loại vaccine đang lưu hành [13, 14]. Do đó, các phương pháp mới để phát triển vaccine vẫn tiếp tục được nghiên cứu nhằm cải thiện các loại

vaccine hiện có, khắc phục vấn đề hàng năm phải tạo vaccine mới cho các chủng virus cúm mới, đồng thời nhằm nghiên cứu tạo ra một loại vaccine đa trị có khả năng phòng ngừa được nhiều chủng virus cúm khác nhau [1, 4].

Một trong những hướng nghiên cứu triển vọng để tạo vaccine phòng bệnh do virus cúm A/H5N1 là sử dụng các epitope bảo tồn ở các chủng virus thuộc các phân type khác nhau của virus cúm A [2]. 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 vaccine 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, vaccine sẽ kích thích phản ứng miễn dịch chuyên biệt trong khi tránh được những ảnh hưởng không mong muốn [2]. Một trong những cách tiếp cận để phát triển vaccine có hiệu lực ổn định đối với biến chủng virus cúm A/H5N1 là dựa vào các epitope bảo tồn được dự đoán *in silico* nhờ sự hỗ trợ của phương pháp tin sinh học [11, 12].

Trước đây, chúng tôi đã dự đoán được một số epitope tế bào B từ vùng bảo tồn của virus H5N1 [10]. Trong bài báo này, chúng tôi báo cáo kết quả tổng hợp, thu nhận epitope tái tổ hợp bằng kỹ thuật gen và kết quả kiểm chứng tính sinh miễn dịch bằng phương pháp ELISA của một epitope liên tục nhận diện bởi tế bào B được dự đoán từ vùng bảo tồn từ kháng nguyên HA của virus cúm A/H5N1. Đây là một bước cần thiết để tìm ra những ứng viên kháng nguyên mới, góp phần cho chiến lược tạo vaccine virus cúm có phổ kháng rộng. Để tăng cường khả năng gây đáp ứng miễn dịch của epitope dự đoán ở vật chủ là chuột, epitope này được gắn với khuẩn mao flagellin (H:1,2) của vi khuẩn *Salmonella typhimurium*, được biết có vai trò kích thích đáp ứng miễn dịch ở vật chủ [3], bằng kỹ thuật tái tổ hợp gen. Gen mã hóa protein tái tổ hợp này được thiết kế để biểu hiện trong tế bào *E. coli* bằng hệ thống vector biểu hiện ở dạng dung hợp với glutathione S transferase (GST).

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu sinh học

Chủng chủ *E. coli* DH5 α (*F- endA1 hsdR17 (rk-/mk-) supE44 thi λ - recA1 gyrA96 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15)*) 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 epitope tái tổ hợp.

Vector pVFT được sử dụng cho mục đích biểu hiện epitope tái tổ hợp, có kích thước 6023 bp, mang gen mã hóa cho glutathione S transferase (GST) nằm ngay sau promoter T7 được điều khiển bằng cách cảm ứng với IPTG. pVFT là dẫn xuất của vector biểu hiện pET-28a(+) (Novagen) được cải biến để protein mục tiêu được biểu hiện ở dạng dung hợp với GST và trình tự peptide nhận diện bởi TEV protease [9].

Chuột nhắt trắng (*Mus musculus var. Albino*) 6-7 tuần tuổi, cái, trọng lượng 20-22 g (Viện Pasteur TP.HCM) được dùng để tiêm epitope tái tổ hợp, 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.

Vaccine H5N1 thương mại dạng virus bất hoạt dùng cho gia cầm (Reassortant Avian Influenza Virus Vaccine, Inactivated – H5N1 subtype, Re-1 strain; mã lô: 2009020; ngày sản xuất: 30/ 09/2009; Harbin Weike Biotechnology Development Co. – Harbin Veterinary Research Institute, CAAS) được cung cấp bởi Công ty thuốc Thú y Trung ương 2 được dùng làm chứng dương trong

phương pháp ELISA để kiểm chứng khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu của kháng thể kháng epitope đã dự đoán.

Kháng nguyên HA của chủng virus cúm H5N1 (chủng A/H5N1/Chicken13Vietnam/LA/2006) đã được phân lập từ bệnh phẩm gà 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) được dùng làm kháng nguyên phù giếng trong phương pháp ELISA dùng để kiểm chứng khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu của kháng thể trong kháng huyết thanh chuột.

Tạo dòng plasmid tái tổ hợp mang gen mã hóa epitope tế bào B (HeBc) dung hợp với GST

Epitope tế bào B đã dự đoán là một peptide gồm 21 axit amin có trình tự là FGAIAAGFIEGGWQGMVDGWYG [8] [10]. Gen mã hóa epitope này (ký hiệu là *hebc*) với hai đầu dính của enzyme cắt giới hạn *SalI* và *XhoI* được thu nhận bằng phản ứng PCR tái tổ hợp với cặp oligonucleotide *hebc-F SalI* (5'-ggccatgctgactttggcgcgattgcgggctttattgaaggcggctggcaggg-3')/ *hebc-R XhoI* (5'-gaaggcggctggcagggcattggatggctggctgtatggctaactcgatggcc-3'). Gen *hebc* và plasmid pVFT được xử lý bằng hai enzyme *SalI* và *XhoI* để tạo đầu dính và nối bằng enzyme T4 ligase tạo plasmid tái tổ hợp pVFT-*hebc*. Trong plasmid này, *hebc* được dung hợp với đầu 3' của gen mã hóa GST. Hóa biến nạp sản phẩm nối vào *E. coli* DH5 α và sàng lọc thể biến nạp bằng môi trường LB có bổ sung Kanamycin 30 μ g/ml

(LB-Kan 30). Các khuẩn lạc trên môi trường LB-Kan 30 được tiếp tục tuyển chọn bằng phương pháp PCR khuẩn lạc với cặp mồi *gst-F* (5'-agagcgtgcagagatttcaatg-3') và *pvt-R* (5'-atccgatatagttcctccttc-3'). Các thể biến nạp chứa plasmid tái tổ hợp dự tuyển là các khuẩn lạc cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 802 bp trên gel điện di agarose 1%.

Tạo dòng plasmid tái tổ hợp chứa gen *hebc* dung hợp với gen mã hóa GST và gen mã hóa lông roi H:1,2

Gen *fljB* mã hóa lông roi H:1,2 được thu nhận bằng phản ứng PCR tái tổ hợp với cặp mồi *fljB-F* (5'-ggccatgaattcgcaagaatcaacactaacagt-3') và *fljB-R* (5'-gcacaagtaatcaacactaacagtgtcgacatggcc-3'). Sản phẩm PCR thu được và plasmid pVFT-*hebc* được xử lý bằng hai enzyme *EcoRI-SalI* và nối bằng ligase. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Thể biến nạp *E. coli* DH5 α /pVFT-*fljB-hebc* được sàng lọc bằng môi trường LB-Kan 30 và xác nhận bằng PCR khuẩn lạc, PCR plasmid và giải trình tự.

Tạo dòng *E. coli* biểu hiện epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc

Plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc* được thu nhận từ *E. coli* DH5 α /pVFT-*fljB-hebc* và biến nạp vào chủng chủ *E. coli* BL21(DE3) để tạo dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* có khả năng biểu hiện epitope ở dạng dung hợp với GST và H:1,2 là (GST-H:1,2-HeBc). Sàng lọc các thể biến nạp bằng môi trường LB-Kan 30. Tuyển chọn các dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* bằng PCR khuẩn

lạc nhờ các cặp môi *fljB-F*, *fljB-R* và *fljB-F*, *hebc-R*.

Cảm ứng và biểu hiện epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc

Nuôi cấy lắc dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* trong 5 ml môi trường LB-Kan 30 trong 4 giờ. Cảm ứng sinh tổng hợp protein tái tổ hợp bằng IPTG 0,5 mM. Tiếp tục nuôi cấy canh khuẩn trong 4 giờ. Ly tâm 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu sinh khối. Tế bào *E. coli* được phá bằng sóng siêu âm, thu nhận protein tổng và kiểm tra sự biểu hiện của epitope tái tổ hợp bằng điện di SDS-PAGE và lai Western với kháng thể kháng GST.

Thu nhận, tinh chế epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc

Nuôi cấy dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* trong 200 ml môi trường LB-Kan 30, lắc 150 vòng/phút trong 4 giờ, 37°C và cảm ứng tổng hợp GST-H:1,2-HeBc bằng IPTG 0,5 mM. Sinh khối tế bào được huyền phù hóa trong 20 ml dung dịch PBS 1X (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3). Bổ sung lysozyme 1μg/ml, ủ 37°C trong 30 phút; bổ sung 0,1 mM PMSF (phenyl methyl sulphonyl fluoride). Phá tế bào bằng sóng siêu âm 12W 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°C) và lọc qua màng lọc có đường kính 0,45μm. Nạp mẫu vào cột GSTrap FF 5ml (GE healthcare), rửa cột bằng 25 ml dung dịch PBS 1X, ly giải protein tái tổ hợp bằng 5 ml dung dịch ly giải pH 8 (50 mM Tris-HCl, 10 mM glutathione khử); tốc độ chảy khi cân bằng cột và rửa cột là

0,5 ml/phút, tốc độ chảy khi nạp mẫu và ly giải protein là 0,2 ml/phút. Thu nhận các phân đoạn ly giải và kiểm tra protein tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc bằng SDS-PAGE và lai Western. Xác định hàm lượng protein tái tổ hợp tinh sạch bằng phương pháp Bradford.

Gây đáp ứng miễn dịch chuột bằng epitope tái tổ hợp và thu nhận tế bào kháng huyết thanh

Chuột thí nghiệm được chia thành 3 nhóm (n =5). (i) Nhóm chứng âm: chuột chỉ được tiêm PBS; (ii) Nhóm thử nghiệm: chuột được tiêm GST-H:1,2-HeBc (0,5 μg/μl); (iii) Nhóm chứng dương: chuột được tiêm vaccine thương mại (1 μl/g thể trọng). Tá chất Complete Freund Adjuvant (CFA-Difco) được sử dụng cho lần tiêm đầu tiên (kháng nguyên: CFA = 1:1). Tiến hành tiêm nhắc vào các ngày 21, 28 và 35 với liều kháng nguyên bằng ½ liều kháng nguyên ban đầu với tá chất là Incomplete Freund Adjuvant (IFA-Difco). Sau lần tiêm cuối 10 ngày, thu 300 μl máu từ tĩnh mạch mắt chuột. Máu được ly tâm 3.000 vòng/ph, 30 phút, 4°C, thu kháng huyết thanh và trữ lạnh ở -30°C.

Kiểm tra sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu với GST-H:1,2-HeBc trong kháng huyết thanh bằng phương pháp ELISA

Cố định protein HA của virus H5N1 bất hoạt chủng A/H5N1/Chicken13Vietnam/LA/2006 (16 đơn vị ngưng kết hồng cầu, HAU) trên giếng của đĩa ELISA 96 giếng (100 μl/giếng). Khóa các vị trí không gắn kháng nguyên virus bằng 100 μl dung dịch sữa gầy (PBS bổ sung 5% sữa tách béo, PBS: 14,61g NaCl, 1ml

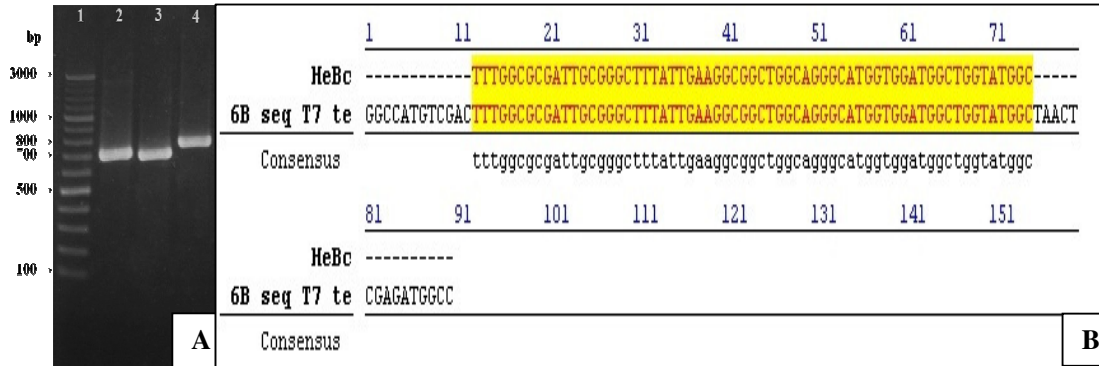
Tween 20) trong 1 giờ. Sau bước rửa giếng bằng PBS, kháng huyết thanh chuột được bổ sung vào giếng (100 μ l/giếng) và ủ ở 37°C trong 2 giờ. Bổ sung kháng thể anti-IgG chuột cộng hợp Horseradish peroxidase (HRP) (Anti mouse IgG-HRP; Abcam) ở độ pha loãng 1: 5000 (100 μ l/giếng), ủ 37°C trong 1 giờ. Phản ứng được phát hiện bằng cơ chất o-phenylenediamine (OPD; Sigma) (40 μ g OPD/1ml citrate buffer pH 5), H₂O₂ 0,5 μ l (100 μ l/giếng). Phản ứng hiện màu được kết thúc bằng 100 μ l H₂SO₄ 2N sau 20 phút. Ghi nhận cường độ màu của đĩa phản ứng ở bước sóng 492nm bằng máy đọc đĩa ELISA (Thermo Multiskan Ascent).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo dòng plasmid biểu hiện gen mã hóa epitope tế bào B dung hợp với GST và kháng nguyên lông roi H:1,2 của vi khuẩn *Salmonella Typhimurium*

Trước tiên, chúng tôi tổng hợp gen *hebc* mã hóa epitope HeBc có kích thước 78 bp (bao gồm hai đầu nối chứa trình tự nhận biết của hai enzyme cắt giới hạn và codon kết thúc) bằng phương pháp PCR tái tổ hợp và dung hợp với gen mã hóa GST trong plasmid biểu hiện pVFT để tạo plasmid tái tổ hợp pVFT-*hebc* trong đó

gen *hebc* được dung hợp vào đầu 3' của gen mã hóa GST. Mục đích của việc dung hợp GST với epitope HeBc là nhằm hỗ trợ việc thu nhận, tinh chế epitope tái tổ hợp thông qua GST và phân tích khẳng định sự biểu hiện của epitope tái tổ hợp bằng lai Western sử dụng kháng thể kháng GST. Plasmid tái tổ hợp pVFT-*hebc* được thu nhận bằng cách tạo dòng trong *E.coli* DH5 α . Dòng tái tổ hợp *E.coli* DH5 α /pVFT-*hebc* mang plasmid tái tổ hợp này được sàng lọc bằng môi trường LB-Kan 30 và tuyển chọn, xác nhận bằng PCR khuôn lạc và giải trình tự. Kết quả phân tích plasmid tái tổ hợp pVFT-*hebc* thu nhận từ dòng *E.coli* DH5 α /pVFT-*hebc* (Hình 1A) với cặp mồi *gst-F* và *pvft-R* cho thấy sản phẩm PCR có kích thước khoảng 793 bp (giếng 4); trong khi đó phản ứng PCR tương tự với khuôn là plasmid pVFT cho sản phẩm PCR có kích thước khoảng 715 bp (giếng 2, 3). Sự chênh lệch về kích thước sản phẩm của phản ứng PCR với khuôn là plasmid pVFT-*hebc* và phản ứng PCR với khuôn là plasmid pVFT là 78 bp tương ứng với kích thước gen *hebc*. Kết quả giải trình tự plasmid pVFT-*hebc* bằng mồi T7 terminator thu được một trình tự hoàn toàn tương đồng với trình tự gen *hebc* (Hình 1B).

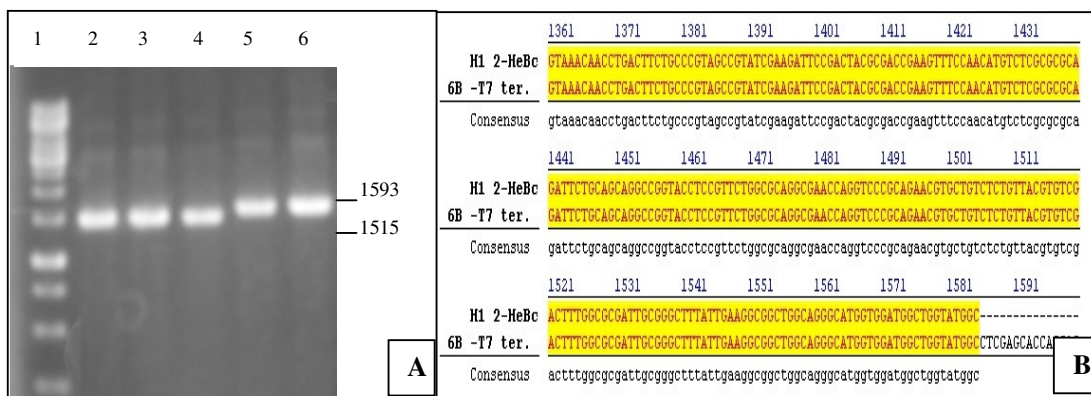


Hình 1. Kết quả phân tích plasmid pVFT-*hebc* bằng PCR phản ứng PCR (A) và giải trình tự đoạn gen *hebc* (B). 1, Thang DNA 100 bp plus; 2-3, Sản phẩm PCR với plasmid pVFT và cặp mồi *gst-F.pvft-R*; 4, Sản phẩm PCR với plasmid pVFT/*hebc* và cặp mồi *gst-F.pvft-R*.

Tiếp theo, để tăng cường mức đáp ứng miễn dịch ở chuột thông qua việc sử dụng kháng nguyên lông roi H:1,2 của *Salmonella Typhimurium* như là tá chất sinh học trong gây đáp ứng miễn dịch, chúng tôi tiến hành tạo plasmid tái tổ hợp cho phép biểu hiện epitope mục tiêu ở dạng dung hợp với kháng nguyên lông roi H:1,2 (bên cạnh việc dung hợp với GST ở thí nghiệm trên). Gen *fljB* mã hóa lông roi H:1,2 của *Salmonella Typhimurium* được tổng hợp bằng phương pháp PCR tái tổ hợp và chèn đồng khung dịch mã vào plasmid pVFT-*hebc* để biểu hiện epitope ở dạng dung hợp GST-H:1,2-HeBc. Plasmid tái tổ hợp (ký hiệu là pVFT-*fljB-hebc*) được biến nạp vào chủng chủ biểu hiện *E. coli* BL21(DE3). Dòng tái tổ hợp *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* mang plasmid tái tổ hợp này được sàng lọc bằng môi trường LB-Kan 30 và tuyển chọn, xác nhận

bằng PCR khuôn lạc và giải trình tự. Kết quả phân tích plasmid tái tổ hợp pVFT-*fljB-hebc* thu nhận từ dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* bằng phản ứng PCR (Hình 2A) sử dụng plasmid này làm khuôn và cặp mồi *fljB-F*, *fljB-R* cho sản phẩm có kích thước 1515 bp (giếng 4) tương ứng với kích thước của gen *fljB* được tổng hợp bằng phương pháp PCR tái tổ hợp (giếng 2, 3). Trong khi đó, phản ứng PCR (Hình 2A) sử dụng plasmid này làm khuôn và cặp mồi *fljB-F*, *hebc-R* cho sản phẩm có kích thước 1593 bp (giếng 5, 6). Sự chênh lệch về kích thước sản phẩm của hai phản ứng PCR này là 78bp tương ứng với trình tự gen *hebc*.

Kết quả giải trình tự gen *fljB* trong plasmid pVFT-*fljB-hebc* cho thấy các trình tự gen *fljB* và *hebc* là đồng khung, độ tương đồng là 100% (Hình 2B).



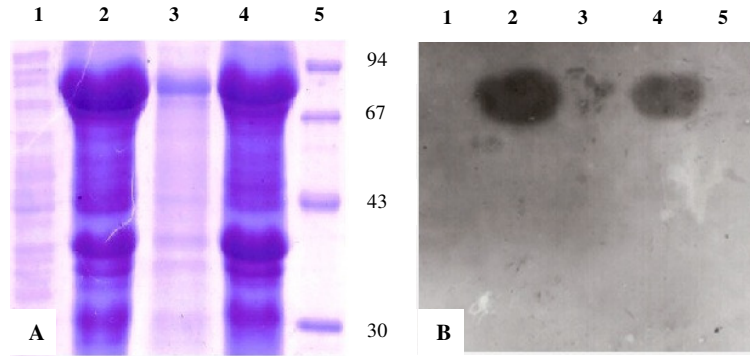
Hình 2. Kết quả phân tích plasmid pVFT-*fljB-hebc* ly trích từ dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* bằng phản ứng PCR (A) và giải trình tự đoạn trình tự *fljB-hebc* (B). 1, Thang DNA 1kb; 2-3, *fljB* được tổng hợp bằng PCR tái tổ hợp; 4, Sản phẩm PCR với khuôn là pVFT-*fljB-hebc*, cặp mỗi *fljB*-F, *fljB*-R; 5-6, Sản phẩm PCR với khuôn là pVFT-*fljB-hebc*, cặp mỗi *fljB*-F, *hebc*-R.

Các kết quả trình bày ở Hình 1 và Hình 2 cho thấy chúng tôi đã thành công trong việc tạo và thu nhận được dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* mang plasmid pVFT-*fljB-hebc* là plasmid được thiết kế để biểu hiện epitope tái tổ hợp ở dạng dung hợp với GST và H:1,2 (GST-H:1,2-HeBc) trong chủng chủ *E. coli* BL21(DE3).

Biểu hiện và thu nhận epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc

Chủng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* được nuôi cấy và cảm ứng biểu hiện epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc. Hình 3 trình bày kết quả phân tích và kiểm chứng sự biểu hiện của epitope tái tổ hợp bằng điện di SDS-PAGE

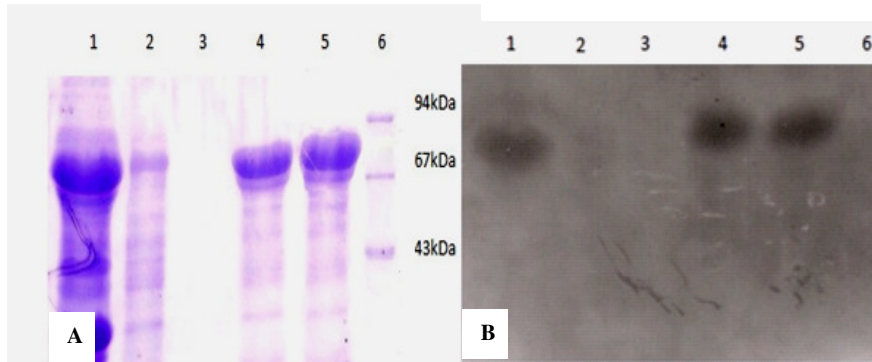
(Hình 3A) và lai Western (Hình 3B). Khi được cảm ứng bằng IPTG, chủng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* tổng hợp vượt mức một protein có khối lượng 87,3 kDa tương ứng với kích thước của protein dung hợp GST-H:1,2:HeBc (Hình 3A, giếng 2) chủ yếu hiện diện ở pha tan (giếng 4), cho vạch lai tương ứng với kháng thể kháng GST (Hình 3B, giếng 2, giếng 4). Vạch protein 87,3 kDa này chiếm 11,3% tổng protein trong tế bào (định lượng bằng phần mềm Quantity One). Kết quả này cho phép kết luận là chủng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* có khả năng biểu hiện vượt mức epitope dung hợp GST-H:1,2-HeBc trong tế bào.



Hình 3. Phân tích sự biểu hiện epitope tái tổ hợp dung hợp GST-H:1,2-HeBc bằng SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng GST (B). 1, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc*, IPTG (-); 2, BL21(DE3)/pVFT/*fljB-hebc*, IPTG (+); 3, BL21(DE3)/ pVFT-*fljB-hebc*, IPTG (+), pha tủa; 4, BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc*, IPTG (+), pha tan; 5, Thang protein.

Để thu nhận epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc dùng làm vật liệu gây nhiễm chuột, chủng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* được nuôi trong 200 ml môi trường LB-Kan 30, cấy ứng tổng hợp epitope tái tổ hợp bằng IPTG và tinh chế bằng cột sắc ký ái lực chuyên biệt GSTrap FF 5 ml. Kết quả trình bày trên

Hình 4 cho thấy chúng tôi đã thành công trong việc thu nhận và tinh chế epitope GST-H:1,2-HeBc. Phần lớn các vạch protein tạp trong dịch đồng nhất ban đầu (Hình 4A, giếng 1) đã được loại bỏ sau khi tinh chế (Hình 4A, giếng 4, 5) với hiệu suất thu hồi sau tinh chế là 74,3%.

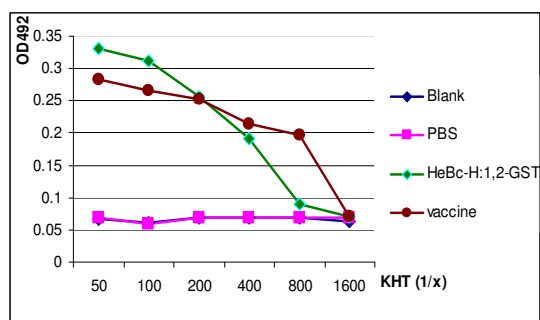


Hình 4. Kết quả phân tích hiệu quả tinh chế epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc bằng cột GSTrap FF bằng SDS-PAGE (A) và lai Western với kháng thể kháng GST (B). 1, Protein tổng; 2, Phân đoạn qua cột; 3, Phân đoạn rửa; 4-5, Các phân đoạn dung ly; 6, Thang protein (LWM)

Kiểm tra sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu của epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc trong kháng huyết thanh chuột bằng phương pháp ELISA

Hình 5 là kết quả ELISA kiểm tra sự hiện diện của kháng thể đặc hiệu của epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc trong kháng huyết thanh chuột. Giá trị OD₄₉₂ của kháng huyết thanh chuột tiêm GST-H:1,2-HeBc ở độ pha loãng 1/50 là 0,33, gấp 4,9 lần so với tín hiệu nền và gấp 4,8 lần so với kháng huyết thanh chuột chỉ

tiêm PBS. Hơn thế nữa, giá trị này còn cao hơn 1,15 lần so với kháng huyết thanh chuột tiêm vaccine thương mại, có lẽ do hiệu lực của kháng nguyên lông roi H:1,2. Như vậy, epitope tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc có khả năng gây đáp ứng miễn dịch ở chuột tạo kháng thể gắn được với kháng nguyên HA của virút cúm A/H5N1.



Hình 5. Kết quả ELISA phân tích hiệu giá kháng thể IgG trong kháng huyết thanh chuột tiêm kháng nguyên tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã thành công trong việc tạo dòng *E. coli* BL21(DE3)/pVFT-*fljB-hebc* có khả năng biểu hiện epitope tế bào B HeBc ở dạng dung hợp với GST và flagellin H:1,2 của *Salmonella* Typhimurium là GST-H:1,2-HeBc. Sự biểu hiện protein tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc được phân tích bằng SDS-PAGE và xác nhận bằng lai Western. Protein tái tổ hợp GST-H:1,2-HeBc được thu nhận, tinh chế và được dùng để gây đáp ứng miễn dịch trên chuột nhằm kiểm chứng tính sinh miễn dịch của epitope HeBc đã được dự đoán bằng phương

pháp Tin Sinh học. Sử dụng phương pháp ELISA, chúng tôi đã xác nhận được rằng kháng huyết thanh chuột đã được gây nhiễm bằng GST-H:1,2-HeBc có khả năng nhận diện và gắn đặc hiệu với kháng nguyên HA của virút cúm A/H5N1.

**SYNTHESIS AND IMMUNOGENICITY TESTING OF A BIOINFORMATICS-
PREDICTED B-CELL EPITOPE ON THE HA ANTIGEN FROM INFLUENZA
H5N1 VIRUS**

Tran Thi Hong Kim, Tran Thi Nhu Thuy, Tran Linh Thuoc

University of Science, VNU-HCMC

ABSTRACT: *In order to develop vaccine with stable efficiency against easily transforming virus such as influenza H5N1 virus, bioinformatic tools were 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 B-cell continuous epitope consisting of 21 amino acids on conserved domains of HA antigen from H5N1 influenza A virus. To confirm the immunogenicity of this epitope, genetic manipulating techniques have been used to prepare the recombinant epitope in E. coli as a fusion form with H:1,2 flagellin antigen from Salmonella Typhimurium and with glutathione S-transferase. This recombinant antigen has been collected, purified and used for immunizing mice. Using ELISA method, we could successfully prove that the anti-recombinant GST-H:1,2-HeBc antibodies could recognize and bind specifically to the HA antigen derived from an influenza H5N1 virus strain isolated from infected chickens in Vietnam in the same way as did the antiserum from mice immunized with commercial inactivated H5N1 influenza vaccine.*

Key words: *B cell epitope, ELISA, influenza H5N1 virus*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. R. Arnon, T. Ben-Yedidia, R. Levi. *Peptide-based vaccine for influenza, Google Patents* (2007).
- [2]. T. Ben-Yedidia, R. Arnon. Review: Towards an epitope-based human vaccine for influenza, *Human vaccines*, 1, 95-101 (2005)
- [3]. 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, 2810 - 2816 (2004).
- [4]. W. Fiers, M. De Filette, K.E. Bakkouri, B. Schepens, K. Roose, M. Schotsaert, A. Birkett, X. Saelens. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*, 27, 6280-6283 (2009).
- [5]. T. Horimoto, Y. Kawaoka; Strategies for developing vaccines against H5N1 influenza A viruses, *Trends in molecular medicine*, 12, 506-514 (2006).
- [6]. P.O. Lang, S. Govind, W.A. Mitchell, C.A. Siegrist, R. Aspinnall, Vaccine effectiveness in older individuals: What has been learned from the influenza-

- vaccine experience, *Ageing research reviews*, 10, 389-395 (2011).
- [7]. D.B. Lewis, Avian flu to human influenza, *Annu. Rev. Med.*, 57, 139-154 (2006).
- [8]. B.V. Lê, 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 vắc xin 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), 2010
- [9]. K. Mun-Kyoung, H.L. Jun, K. Hin, J.P. Soo, H.K. Sung, B.K. Gil, S.L. Yun, B.K. Jae, K.K. Kyeong, W.S. Se, H.E. Soo, Crystal structure of Visfatin/Pre-B cell Colony-enhancing Factor 1/Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, Free and in Complex with the Anti-cancer Agent FK-866, *Journal of Molecular Biology*, 362, 66-77 (2006).
- [10]. N.T.T. Minh, N.Đ. Duy, T.T.D. Trang, V.C. Quy, T.L. Thuốc. *Dự đoán epitope tế bào B trên protein virus cúm A H5N1*. Kỷ yếu Hội nghị CNSH toàn quốc: CNSH phục vụ nông – lâm nghiệp, thủy sản, công nghiệp, y dược và bảo vệ môi trường, ĐH Thái Nguyên, 828-633 (2009).
- [11]. P. Nuin, Z. Wang, E. Tillier, The accuracy of several multiple sequence alignment programs for proteins. *BMC bioinformatics*, 7, 471 (2006).
- [12]. W. Pirovano, J. Heringa, Multiple sequence alignment, *Methods in molecular biology*, 452, 143 (2008).
- [13]. Y. Suzuki. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28, 399-408 (2005).
- [14]. S. Tamura, T. Kurata, Defense mechanisms against influenza virus infection in the respiratory tract mucosa, *Jpn J Infect Dis.*, 57, 236-247 (2004).
- [15]. E.J. Yager, C. Stagnar, R. Gopalakrishnan, A. Franchini, A. Narendran, J.T. Fuller, D.H. Fuller, Particle-mediated DNA vaccines against seasonal and pandemic influenza viruses elicit strong mucosal antibody and T cell responses in the lung, *Procedia in vaccinology*, 3, 2-11 (2010).