

# ỨNG DỤNG HỆ THỐNG BIỂU HIỆN BACULOVIRUS NHẪM SẢN XUẤT PROTEIN ORF2 TÁI TỔ HỢP CỦA VIRUS PCV2

*Đặng Vũ Hoàng<sup>1</sup>, Trương Quốc Phong<sup>2</sup>, Trần Thị Thanh Hà<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Huyền<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lương<sup>1</sup>, Đặng Thị Kiều Anh<sup>1</sup>, Nguyễn Thúy Duyên<sup>1</sup>, Nguyễn Thế Vinh<sup>1</sup>, Takehiro Kokuho<sup>3</sup>*

## TÓM TẮT

Những nghiên cứu gần đây cho thấy protein mã hóa bởi khung đọc mở 2 (ORF2) của virus PCV2 là protein có mang hoạt tính miễn dịch chủ yếu. Ngoài ra, các protein ORF2 tái tổ hợp cũng phản ứng mạnh với huyết thanh của lợn bị nhiễm PCV2 cho thấy khả năng sử dụng ORF2 protein tái tổ hợp trong các phản ứng chẩn đoán như ELISA hay IPMA. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống biểu hiện baculovirus nhằm tái tổ hợp protein ORF2 của virus PCV2 phân lập tại Việt Nam. Kết quả phản ứng chẩn đoán IPMA cho thấy protein ORF2 của virus PCV2 tái tổ hợp bằng hệ thống biểu hiện *baculovirus* mang đặc tính sinh học tự nhiên. Ngoài ra, protein ORF2 của virus PCV2 tái tổ hợp thu được từ nghiên cứu này có thể được sử dụng để chế tạo sinh phẩm chẩn đoán và nguyên liệu tiên tiến sản xuất vắc xin

*Từ khóa:* PCV2, Khung đọc mở 2 (ORF2), Protein ORF2 tái tổ hợp, *Baculovirus*

## Application of the baculovirus expression system to produce recombinant ORF2 protein of PCV2

*Dang Vu Hoang, Truong Quoc Phong, Tran Thi Thanh Ha, Nguyen Thi Huyen, Nguyen Thi Luong, Dang Thi Kieu Anh, Nguyen Thuy Duyen, Nguyen The Vinh, Takehiro Kokuho*

## SUMMARY

Result of the recent studies indicated that the ORF2- encoded protein of porcine *circovirus* type 2 (PCV2) carried the major immunogen. Additionally, the recombinant ORF2 protein reacted strongly with swine serum after swine was infected with PCV2, indicating that this protein was possible to use in diagnostic assays as ELISA or IPMA. In this study, we employed *baculovirus* expression system to produce recombinant ORF2 protein of PCV2 that was isolated in Viet Nam. The result from the IPMA reaction indicated that this recombinant protein possessed naturally biological properties. Additionally, the ORF2- encoded protein obtained from this study can be used for producing the biological materials which can be used in diagnostics and vaccine production.

*Keywords:* Porcine *circovirus* type 2 (PCV2), Open reading frame 2 (ORF2), Recombinant ORF2 protein, *Baculovirus*

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, hệ thống biểu hiện baculovirus đã được sử dụng để tái tổ hợp nhiều loại protein khác nhau với số lượng

protein tái tổ hợp lớn đáng kể (Martijan và cs., 2007). Khả năng biến nạp vào tế bào động vật và khả năng sửa đổi hậu dịch mã chính xác được xem như những đặc tính quan trọng của hệ thống biểu hiện này (Gould, 2004). Yu-Chen và cộng sự đã chỉ ra rằng, hệ thống baculovirus được sử dụng nhiều như công cụ hữu ích để “vận chuyển” hay “biểu hiện” vaccin (Yu-

<sup>1</sup> Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch - Viện Thú y

<sup>2</sup> Đại học Bách khoa Hà Nội

<sup>3</sup> Viện Thú y Nhật Bản

Chen và cs., 2008). Hệ thống này cũng đã được sử dụng như vector biểu hiện để chế tạo vaccin chống lại virus SARS-CoV (Bai và cs., 2008). Những thành công bước đầu trong việc sử dụng hệ thống baculovirus để chế tạo vaccin tái tổ hợp đối với cúm gia cầm cũng được ghi nhận, trong đó chỉ ra tính ưu việt về hiệu lực cũng như giá thành vaccin rẻ hơn. Nhiều loại vaccin dùng cho thú y được sản xuất trên tế bào côn trùng hiện đang được bán rộng rãi trên thị trường, bao gồm cả vaccin tái tổ hợp phòng PCV2 thương phẩm như vaccin Porcilis PCV.

Về cấu trúc bộ gen, virus PCV1 và PCV2 là tương đồng. Cả PCV1 và PCV2 đều mang 2 khung đọc mở chính (Open Reading Frame - ORF): ORF1 và ORF2. Nhiều nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng ORF2 của PCV1 và PCV2 có kích thước giống nhau. Các protein ORF2 tái tổ hợp cũng phản ứng mạnh với huyết thanh của lợn bị nhiễm PCV2 (Nawagitgul và cs 2000). Một nghiên cứu gần đây được thực hiện trên 322 mẫu huyết thanh lợn đã cho thấy với độ nhạy 98,2% và độ đặc hiệu 94,5%, kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp bằng hệ thống baculovirus hoàn toàn phù hợp để phát hiện kháng thể PCV2 bằng phương pháp ELISA (Blanchard và cs., 2003).

Hiện nay có rất nhiều loại vaccin đã được phát triển chống lại PCV2 như vaccin nhược độc, vaccin vô hoạt (chỉ có capsid), vaccin tái tổ hợp sử dụng gen mã hóa cho protein vỏ nhờ vector mang, vaccin tiểu phần (Porcilis PCV) và vaccin DNA. Những bằng chứng khoa học gần đây đã cho thấy ORF2 là protein có tính miễn dịch chủ yếu (Shen và cs. 2008). Khả năng tạo đáp ứng miễn dịch của vaccin tiểu phần ORF2 được phát triển bằng hệ thống biểu hiện baculovirus, chống lại PCV2 trong điều kiện thực địa đã được mô tả trong nghiên cứu gần đây của Paolo Martelli (Paolo Martelli và cs. 2011), cho thấy hệ thống baculovirus là sự lựa chọn tối ưu trong ứng dụng sản xuất vaccin tái tổ hợp phòng PCV2 hiện nay.

Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu “*Ứng dụng hệ thống biểu hiện baculovirus nhằm sản xuất protein tái tổ hợp của virus PCV2 để chế tạo sinh phẩm chẩn đoán và làm*

*nguyên liệu tiến tới sản xuất vaccin*”.

## II. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

+ Ứng dụng hệ thống biểu hiện baculovirus nhằm tái tổ hợp ORF2 của virus PCV2

+ Thiết lập phương pháp Immuno Peroxydase Monolayer Assay (IPMA) trên tế bào côn trùng nhằm đánh giá hoạt tính sinh học của protein tái tổ hợp ORF2 của virus PCV2.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

+ Tái tổ hợp ORF2 của virus PCV2 sử dụng hệ thống biểu hiện baculovirus (Bac-to-Bac Expression System) của hãng Invitrogen, Mỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất

+ Đánh giá protein ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2 trên tế bào côn trùng theo phương pháp thường qui của Viện Thú y Nhật bản và Bộ môn hóa sinh miễn dịch, Viện Thú y.

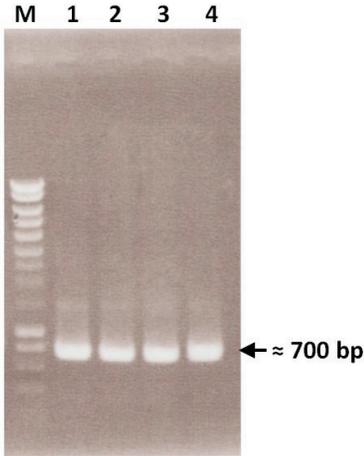
## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Thiết kế cặp mồi đặc hiệu và khuếch đại gen ORF2 của virus PCV2 bằng kỹ thuật RT-PCR

Trong nghiên cứu này, để thiết kế cặp mồi đặc hiệu gen ORF2 của virus PCV2, 12 trình tự gen ORF2 đã công bố trên Ngân hàng dữ liệu NCBI được sử dụng để so sánh tìm ra trình tự đặc trưng. Phần mềm FastPCR được sử dụng để tính toán các thông số của mồi, cho phép xác định được trình tự mồi phù hợp với các yêu cầu đặt ra. Kết quả của phản ứng RT-PCR cho thấy xuất hiện một băng DNA khoảng 700 bp trên cả bốn đường chạy. Kích thước này là phù hợp với kích thước dự kiến của gen ORF2 theo thiết kế khi được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu. Sản phẩm PCR của gen ORF2 thu được sẽ được sử dụng làm nguyên liệu để thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

Orf2-F: 5' - ACGTATCCAAGGAG-GCGTTTC-3'

Orf2-R: 5' - TCACTTAGGGTGAA-GTGGGGGGT-3'



**Hình 1. Phổ điện di sản phẩm phản ứng RT-PCR.**

*M, thang DNA chuẩn; giếng 1-4: sản phẩm RT-PCR từ khuôn mRNA mẫu*

**3.2. Tạo dòng gen ORF2 của virus PCV2 trong vector tách dòng pFastBac/NT TOPO**

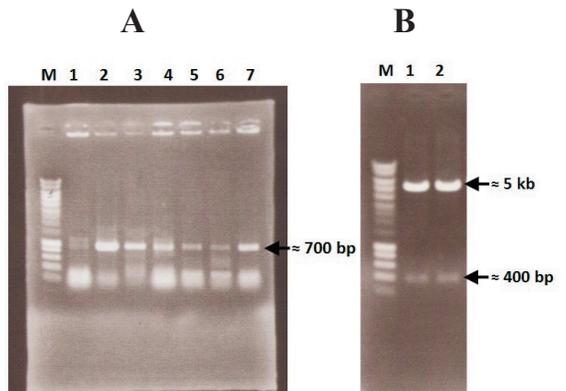
Vector pFastBac/NT Topo là vector tách dòng hiệu quả để tạo cấu trúc tái tổ hợp, sau đó được biến nạp vào *E.coli* DH10Bac tạo Bacmid tái tổ hợp. Sản phẩm sau đó được biến nạp vào chủng *E.coli* MJ109 khả biến bằng phương pháp sốc nhiệt và được sàng lọc bước đầu trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh ampicilin nồng độ 100µg/ml. Trong nghiên cứu này, 7 khuẩn lạc ngẫu nhiên đã được lựa chọn để kiểm tra khả năng mang vector pFB\_ORF2 tái tổ hợp (hình 2).

Để kiểm tra xem plasmid thu được có mang gen ORF2 và đoạn gen ORF2 có gắn vào vector đúng chiều hay không, trước tiên chúng tôi tiến hành phản ứng PCR sử dụng plasmid thu được làm khuôn với mỗi xuôi bắt cặp đặc hiệu với vector và mỗi ngược đặc hiệu gen ORF2. Kết quả cho thấy xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 700 bp (giếng 1-7) trùng với kích thước của đoạn gen ORF2 được gắn vào vector (hình 3A). Kết quả này cho thấy rằng plasmid từ 7 dòng lựa chọn đều mang gen ORF2. Để khẳng định chắc chắn thêm, plasmid từ 2 dòng (2 và 3) được xử lý đồng thời với hai enzyme cắt hạn chế EcoRI và HindIII. Enzyme EcoRI có điểm cắt



**Hình 2. Bảy khuẩn lạc ngẫu nhiên đã được lựa chọn để kiểm tra khả năng mang vector pFB\_ORF2 tái tổ hợp**

nằm ở vị trí 307 của gen ORF2, enzyme HindIII có vị trí cắt nằm ở vị trí 27 tính từ vị trí đầu mở vòng của vector pFastBac/NT Topo. Do vậy, nếu đoạn gen ORF2 được gắn vào vector pFastBac/NT Topo thì khi cắt sẽ tạo ra một đoạn DNA có kích thước khoảng 422 bp và băng DNA plasmid tương ứng (khoảng 5,1 kb). Kết quả ở hình 3B cho thấy, cả hai dòng được chọn lựa để kiểm tra đều xuất hiện hai băng với kích thước như dự kiến (hình 3B). Điều này chứng minh rằng, plasmid thu được mang gen ORF2 và đoạn gen ORF2 gắn vào vector đúng chiều.



**Hình 3. A. Phổ điện di sản phẩm PCR sử dụng mỗi đặc hiệu gen ORF2 trên khuôn plasmid từ các khuẩn lạc lựa chọn. M: thang DNA chuẩn; các giếng 1 – 7, sản phẩm PCR từ 7 khuôn plasmid tương ứng với 7 dòng lựa chọn. B. Phổ điện di sản phẩm cắt plasmid bằng enzyme hạn chế. M: thang DNA chuẩn**

Đoạn gen ORF2 từ dòng lựa chọn (dòng 2) được sử dụng để xác định trình tự nucleotide. Trình tự gen và khung đọc của đoạn gen ORF2 đã được tách dòng được thể hiện trên hình 4. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen ORF2 gồm 702 nucleotide mã hóa cho 233 amino acid và một mã kết thúc. Kết quả kiểm tra khung đọc

cho thấy đoạn gen thu được có khung đọc mở từ mã đầu (mã ATG) nằm ở vector pFastBac/NT Topo và mã cuối (TGA) nằm ở gen ORF2. Kết quả này rất quan trọng, khẳng định được rằng gen ORF2 đã được đưa vào vector pFastBac/NT topo thành công và xác định được khung đọc mở nối giữa vector và gen đích.

#### 5'3' Frame 1

```

atgtctgggttctcatcatcatcatcatcatggtagcagcggcgaaaacctgtattttcag
M S G S H H H H H G S S G E N L Y F Q
tcccttacgatatccaaggaggcgtttccgcagacgaagacaccgccccgcagccatctt
S L T Y P R R R F R R R R H R P R S H L
ggccagatcctccgcccgcgccccctggctcgtccacccccgccaccggttacgctggaga
G Q I L R R R P W L V H P R H R Y R W R
aggaaaaatggcatcttcaacaccgcctctcccgcaccttcggatatactgtgaagaaa
R K N G I F N T R L S R T F G Y T V K K
accacagtcagaaagccctcctgggcggtggacatgatgagatttaattaacgatttc
T T V R T P S W A V D M M R F N I N D F
ctccccagggagggggtcaaacccccctcactgtgcctttgaatactacagaataaga
L P P G G G S N P L T V P F E Y Y R I R
aaggttaagggtgaattctggccctgctcccaatcacccagggtgacaggggagttgga
K V K V E F W P C S P I T Q G D R G V G
tccactgctgttattctagatgataactttgtaccaaaggccacagccctgacttatgat
S T A V I L D D N F V P K A T A L T Y D
ccctatgtaaactactcctcccgccataccataaccagcccttctcctaccactccgg
P Y V N Y S S R H T I T Q P F S Y H S R
tactttacccccaaacctgttcttgattccactattgattacttccaacaaataacaaa
Y F T P K P V L D S T I D Y F Q P N N K
aggaatcagctttggctgaggctacaaacctctgcaaagtggaccacgtaggcctcggc
R N Q L W L R L Q T S A N V D H V G L G
actgcgttcgaaaacagtatatacgaccaggactacaataatccgtgtaaccatgtatgta
T A F E N S I Y D Q D Y N I R V T M Y V
caattcagagaatttaattcttaaagacccccacttcaccctaagtga
Q F R E F N L K D P P L H P K -

```

**Hình 4. Trình tự gen và khung đọc của gen ORF2 được tách dòng**

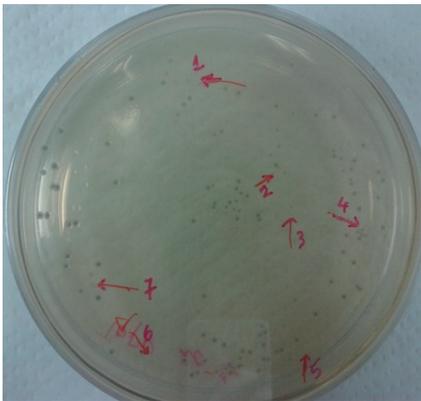
Trình tự đoạn gen ORF2 được sử dụng để blast lên Ngân hàng dữ liệu NCBI. Kết quả được thể hiện trên hình 5 và cho thấy đoạn gen ORF2 được tách dòng trong nghiên cứu này có độ tương đồng 99% so với gen ORF2 của virus

PCV2 dòng phân lập của NAVETCO. Khi so sánh trình tự, chúng tôi nhận thấy gen ORF2 được tách dòng có sự sai khác chỉ 1 nucleotide so với dòng đã được công bố bởi NAVETCO.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate NAVET vietnam3, complete genome	1297	1297	100%	0.0	100%	<a href="#">JX506730.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate HUN-11, complete genome	1297	1297	100%	0.0	100%	<a href="#">HM776443.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus-2 isolate PCV2Izn-218-13, complete genome	1291	1291	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ729074.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus-2 isolate PCV2Izn-89-13, complete genome	1291	1291	100%	0.0	99%	<a href="#">KJ729072.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate Han6-12, complete genome	1291	1291	100%	0.0	99%	<a href="#">JQ181588.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate P477LG, complete genome	1286	1286	100%	0.0	99%	<a href="#">JX099781.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 strain 10QH, complete genome	1286	1286	100%	0.0	99%	<a href="#">HQ395058.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 strain 10GX, complete genome	1286	1286	100%	0.0	99%	<a href="#">HQ395056.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate NBiao10 capsid protein gene, complete cds	1286	1286	100%	0.0	99%	<a href="#">JN411098.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate PCV-Y20, complete genome	1280	1280	100%	0.0	99%	<a href="#">KC815012.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate P789NH, complete genome	1280	1280	100%	0.0	99%	<a href="#">JX099784.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 strain 10AH, complete genome	1280	1280	100%	0.0	99%	<a href="#">HQ395049.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate INDON01-P009-10-01, complete genome	1280	1280	100%	0.0	99%	<a href="#">EU302139.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate P902NH, complete genome	1275	1275	100%	0.0	99%	<a href="#">JX099785.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate P485YH, complete genome	1275	1275	100%	0.0	99%	<a href="#">JX099782.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate TN5-3, complete genome	1275	1275	100%	0.0	99%	<a href="#">JQ181607.1</a>
<input type="checkbox"/> Porcine circovirus 2 isolate HB1-4, complete genome	1275	1275	100%	0.0	99%	<a href="#">JQ181587.1</a>

**Hình 5. Kết quả so sánh trình tự gen và nhận diện loài sử dụng công cụ Blast giữa trình tự gen ORF2 và ngân hàng NCBI**

### 3.3. Tạo baculovirus tái tổ hợp sử dụng tế bào côn trùng

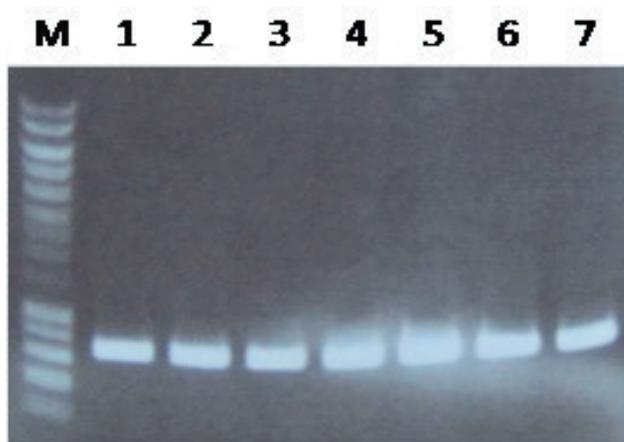


**Hình 6. Hình ảnh khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc chứa kháng sinh và chất chỉ thị Bluo-gal và các khuẩn lạc này có thể là các dòng chứa bacmid tái tổ hợp**

Vector pFB\_ORF2 được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E.coli* DH10Bac bằng phương pháp

sốc nhiệt. Trong vi khuẩn *E.coli* DH10Bac có chứa bacmid và một plasmid trợ giúp. Khi vector pFB\_ORF2 được đưa vào *E.coli* DH10Bac sẽ xảy ra hiện tượng bắt cặp và trao đổi chéo giữa pFB\_ORF2 và bacmid tại hai vị trí Tn7L và Tn7R để tạo thành thể bacmid tái tổ hợp. Kết quả biến nạp cho thấy xuất hiện 7 khuẩn lạc trắng trên môi trường chọn lọc. Các khuẩn lạc này có thể là các dòng chứa bacmid tái tổ hợp (hình 6).

Để kiểm tra, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy 7 khuẩn lạc này trong môi trường lỏng có bổ sung kháng sinh như trên môi trường thạch đĩa và tách bacmid. Bacmid thu được được sử dụng làm khuôn để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu gen ORF2. Kết quả được thể hiện trên hình 7. Kết quả cho thấy cả 7 dòng lựa chọn đều xuất hiện băng DNA với kích thước mong đợi của gen ORF2. Từ các kết quả thu được, chúng tôi kết luận rằng đã tạo được 7 dòng mang bacmid tái tổ hợp.

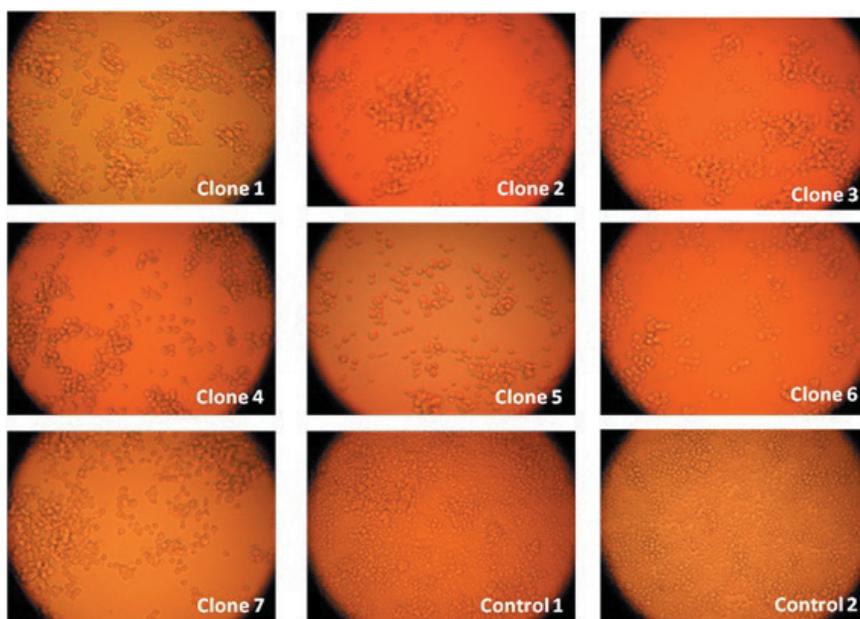


**Hình 7. Phổ điện di sản phẩm PCR.**

*M, thang DNA chuẩn; 1-7, sản phẩm PCR sử dụng bacmid từ 7 dòng khuẩn lạc trắng*

Để tạo baculovirus tái tổ hợp, 7 dòng bacmid tái tổ hợp được sử dụng để chuyển nạp vào

tế bào côn trùng. Kết quả được thể hiện trên hình 8.



**Hình 8. Hình ảnh tế bào côn trùng SF201AE sau gây nhiễm bởi bacmid và nuôi ở 27°C trong 72 giờ**

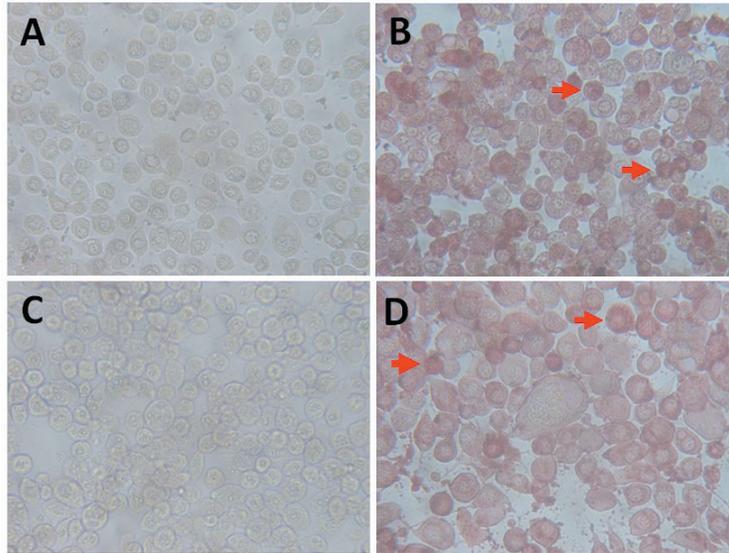
Kết quả cho thấy xuất hiện các bệnh tích tế bào (CPE) sau 72 giờ nuôi cấy đối với các mẫu được gây nhiễm bởi bacmid tái tổ hợp (clone 1-7). Mẫu đối chứng không gây nhiễm với bac-

mid tái tổ hợp (control 1 và 2) phát triển bình thường và hoàn toàn không thấy xuất hiện CPE. Kết quả này cho thấy đã tái tổ hợp thành công baculovirus mang gen ORF2 vào tế bào côn trùng.

### 3.4. Kiểm tra hoạt tính sinh học của protein tái tổ hợp bằng phương pháp IPMA trên tế bào côn trùng

Để kiểm tra hoạt tính sinh học của protein

ORF2 tái tổ hợp, chúng tôi lần đầu tiên thiết lập phương pháp IPMA sử dụng tế bào côn trùng dòng High FIVE (TN5) nhằm phát hiện sự có mặt của protein ORF2 tái tổ hợp tại Việt Nam.



**Hình 9. Kết quả IPMA sử dụng tế bào côn trùng High FIVE gây nhiễm với baculovirus tái tổ hợp**

A. Đối chứng âm (không sử dụng huyết thanh lợn); B. Đối chứng dương (sử dụng kháng thể thương mại kháng PCV2); C. Đối chứng âm (sử dụng huyết thanh âm tính với PCV2); D. Huyết thanh gây tối miễn dịch với virus PCV2

Quy trình thiết lập phản ứng IPMA được thực hiện theo các bước tóm tắt như sau:

**Bước 1:** Chuẩn bị tế bào gây nhiễm virus và cố định tế bào

Tế bào côn trùng TN5 có mật độ  $2 \times 10^5$  tế bào/ml đã gây nhiễm virus Baculovirus mang protein ORF2 tái tổ hợp của virus PCV2 được nuôi cấy trên đĩa 96 giếng trong 24-48 giờ, sau đó cố định tế bào bằng formaldehyde và NP40 (Sigma).

**Bước 2:** Kháng thể 1

Huyết thanh sử dụng để phát hiện kháng nguyên là kháng thể đa dòng kháng đặc hiệu PCV2 (Cat No: PAB-PCV2; vmrd) được pha loãng ở 1/400 và ủ ở 37°C trong 30 phút, sau đó rửa đĩa 3 lần bằng dung dịch PBS 0.5% tween 80.

**Bước 3:** Kháng thể cộng hợp (Anti pig IgG

Peroxidase antibody produced in Rabbit (Cat No: 5670; Sigma)

Pha loãng conjugate ở 1/1600, tiếp tục ủ đĩa ở 37°C trong 30 phút và rửa đĩa như trên.

**Bước 4:** Cơ chất

Cơ chất sử dụng trong phản ứng là 3-Amino-9-ethylcarbazole (Cat No:A6926; Sigma) pha loãng theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Ủ đĩa ở 37°C trong 30 phút.

**Bước 5:** Dừng phản ứng

Dừng phản ứng bằng cách thêm PBS hoặc H<sub>2</sub>O.

**Bước 6:** Đọc kết quả

Dương tính: Tế bào hoặc đám tế bào co cụm và bắt màu đỏ đậm trong nguyên sinh chất.

Âm tính: Tế bào bắt màu hồng nhạt đồng đều.

Ưu điểm của dòng tế bào này là khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp gấp 10 lần so với các dòng tế bào côn trùng thông dụng khác như SF9 hay SF21AE. Hơn nữa, tế bào High FIVE nuôi cấy không cần bổ sung huyết thanh, rất phù hợp để thiết lập phương pháp IPMA phát hiện protein tái tổ hợp bằng hệ thống baculovirus. Kết quả được trình bày ở hình 9.

Kết quả cho thấy ở giếng đối chứng âm (không bổ sung huyết thanh lợn), thăm tế bào không bắt màu khi nhuộm, ngược lại ở giếng đối chứng dương sử dụng kháng thể thương mại kháng PCV2 (PAB-PCV2 của hãng VMRD, Mỹ) của lợn xuất hiện nhiều tế bào bắt màu đỏ đậm trong nguyên sinh chất. Tương tự, đối với giếng sử dụng huyết thanh lợn âm tính với PCV2 khi nhuộm thăm tế bào cũng không bắt màu, nhưng ở giếng sử dụng huyết thanh gây tối miễn dịch với virus PCV2 thì ngược lại, các tế bào bắt màu nâu đỏ trong nguyên sinh chất khi nhuộm, chứng tỏ rằng protein ORF2 tái tổ hợp phản ứng mạnh và được nhận diện bởi kháng thể tự nhiên kháng virus PCV2. Điều này chỉ ra rằng, protein ORF2 tái tổ hợp bằng hệ thống biểu hiện baculovirus mang đặc tính sinh học tự nhiên.

#### IV. KẾT LUẬN

Tái tổ hợp thành công protein ORF2 của virus PCV2 trên tế bào côn trùng bằng hệ thống biểu hiện baculovirus. Protein ORF2 tái tổ hợp có hoạt tính sinh học tự nhiên.

##### Lời cảm ơn

Tác giả xin chân thành cảm ơn PGS.TS Nguyễn Viết Không, nguyên Trưởng bộ môn Hóa sinh Miễn dịch, Viện Thú y đã cung cấp chủng PCV2.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Martijan AL, German RA, Klass M, Van GW (2007). Production of sumoylated proteins using a baculovirus expression system. *J. Virol. Methods*, 139: 189-194
- Gould AR, 2004. Virus evolution: disease emergence and spread. *Aust. J. experim. Agric.*, 44: 1085-1094
- Yu-Chen H, Kun Y, Tzong-Yuan W, 2008. Baculovirus as an expression and/or delivery vehicle for vacxin antigens. *Expert Review of Vaccines* 7: 363-371
- Bai B, Lu X, Meng J, Hu Q, Mao P, Lu B, Chen Z, Yuan Z, Wang H (2008). Vaccination of mice with recombinant baculovirus expressing spike or nucleocapsid protein of SARS-like coronavirus generates humoral and cellular immune responses. *Mol Immunol.* 45: 868-75
- Nawagitgul, P., I. Morozov, S. R. Bolin, P. A. Harms, S. D. Sorden, and P. S. Paul. 2000. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J. Gen. Virol.* 81:2281-2287
- Ph. Blanchard, D. Mahé, R. Cariolet, C. Truong, M. Le Dimna, C. Arnauld, N. Rose, E. Eveno, E. Albina, F. Madec, A. Jestin, 2003 An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome *Veterinary Microbiology* 94 183-194
- Hui-Gang Shen, Ji-Yong Zhou, Zhen-Yu Huang, Jun-Qing Guo, Gang Xing, Jia-Ling He, Yan Yan and Li-Yang Gong 2008 Protective immunity against porcine circovirus 2 by vaccination with ORF2-based DNA and subunit vacxins in mice *Journal of General Virology*, 89, 1857-1865
- Paolo Martelli, Luca Ferrari, Marina Morganti, Elena De Angelis, Paolo Bonilauri, Stefano Guazzetti, Antonio Caleffi, Paolo Borghetti, 2011. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vacxin induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. *J. Vet. Microb.* 149; 339-351
- Kokuho T, Dang VH, Yasue H., 2012. Molecular Cloning of the Swine Interleukin-23 Subunit p19 and of Its Receptor Components Interleukin -23R $\alpha$  and -12R $\beta$ 1 *J Vet Med Sci*;74(3):367-372

Nhận ngày 7-9-2015

Phản biện ngày 20-10-20015