

ỨNG DỤNG KHÁNG NGUYÊN ORF2 TÁI TỔ HỢP CỦA PCV2 TRONG ELISA CHẨN ĐOÁN PHÁT HIỆN KHÁNG THỂ KHÁNG PCV2 TRONG HUYẾT THANH LỢN

*Trần Thị Thanh Hà¹, Nguyễn Thị Bích Thủy¹, Đặng Vũ Hoàng¹, Lý Đức Việt¹,
Nguyễn Thị Huyền¹, Nguyễn Thị Lương¹, Đặng Thị Kiều Anh¹,
Nguyễn Thúy Duyên¹, Nguyễn Thế Vinh¹, Takehiro Kokuho²*

TÓM TẮT

Kết quả của những nghiên cứu gần đây cho thấy, protein mã hóa bởi khung đọc mở 2 (ORF2) của 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. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng hệ thống baculovirus nhằm sản xuất kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp phục vụ công tác chẩn đoán và làm nguyên liệu chế tạo vaccine phòng bệnh. Phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp nhằm phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn cũng đã được thiết lập. 286 mẫu huyết thanh thực địa được sử dụng để thiết lập ELISA nhằm phát hiện kháng thể kháng PCV2 và được so sánh với hai phương pháp: IPMA và kit ELISA thương mại. Kết quả thử nghiệm cho thấy phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp có độ đặc hiệu (97,16%) và độ nhạy (100%) là hoàn toàn phù hợp cho công tác chẩn đoán huyết thanh học phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn và điều tra dịch tễ các bệnh có liên quan tới PCV2 tại Việt Nam.

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

Uses of recombinant ORF2 protein of PCV2 as antigen for ELISA to detect specific antibodies against PCV2 in swine sera

*Tran Thi Thanh Ha, Nguyen Thi Bích Thủy, Dang Vu Hoang, Ly Duc Viet,
Nguyen Thi Huyen, Nguyen Thi Luong, Dang Thi Kieu Anh,
Nguyen Thuy Duyên, Nguyen The Vinh, Takehiro Kokuho*

SUMMARY

Results of recent studies indicated that the ORF2- encoded protein of porcine circovirus type 2 carried the major immunogen. Additionally, the recombinant ORF2 protein reacted strongly with swine serum after pig was infected with PCV2. It indicated a possibility to use the recombinant ORF2 protein in the diagnostic assays such as ELISA. In this study, we have employed the baculovirus expression system to produce recombinant ORF2 protein as antigen for serological diagnosis and materials for vaccine production. An ELISA method using recombinant ORF2 antigen for detecting specific antibodies against PCV2 in swine sera was also established. 286 field serum samples were used to develop an ELISA to detect specific antibodies against PCV2 and compared with IPMA and commercial ELISA kit. The tested results indicated that the ELISA using recombinant ORF2 protein as antigen possessed a specific level reaching 97.16% and a sensitivity of 100%. This indicates that our ELISA is suitable for serological diagnosis in order to detect specific antibodies against PCV2 in swine sera and for epidemiological surveys of PCV2 associated diseases.

Keywords: Swine, Porcine circovirus type 2, Open reading frame 2, Recombinant protein

¹ Bộ môn Hóa sinh Miễn dịch - Viện Thú y

² Viện Thú y Nhật Bản

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

PCV lần đầu tiên được mô tả như một sự tập nhiễm trên tế bào PK15 (Tischer và cs., 1982) và sau đó được phân loại thuộc họ *Circoviridae* (Lukert và cs., 1995). Các virion của PCV có dạng hình cầu, đường kính 17 nm, có chứa DNA sợi đơn vòng tròn và có kích thước khoảng 17kb (Tischer và cs., 1982). Nhiều nghiên cứu chỉ ra rằng PCV tập nhiễm từ tế bào PK15 không tham gia vào hội chứng PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome). Tuy nhiên, những nghiên cứu gần đây cho thấy PCV tiếp tục được phát hiện trong hội chứng còi cọc sau cai sữa - PMWS (Allan và cs., 1998). Để giải thích cho hiện tượng này, những phân tích xa hơn về bộ gen đã chứng minh rằng có 2 loại PCV hoàn toàn khác biệt, PCV loại 1 (hay còn được biết với ký hiệu PCV1) và PCV2, trong đó PCV1 không có khả năng gây bệnh, còn PCV2 tham gia vào hội chứng PMWS. Khả năng tương tác khác biệt với các kháng thể đơn dòng của PCV1 và PCV2 đã chỉ ra sự khác biệt về tính kháng nguyên của chúng (Allan và cs., 1998). Tuy nhiên, phản ứng chéo giữa 2 loại kháng thể cũng được mô tả ở những thực nghiệm gần đây, trong đó kháng thể kháng PCV1 phản ứng với PCV2 ở mức độ thấp.

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 (Morozov và cs., 1998). Nhiều nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng ORF2 của PCV1 và PCV2 có kích thước giống nhau (Morozov và cs., 1998). Nawagitgul và cs đã chỉ ra rằng ORF2 của PCV2 mã hóa cho một protein cấu trúc có kích thước khoảng 30 kDa và tái tổ hợp ORF2 được biểu hiện trên tế bào côn trùng có thể tạo nên các phân tử giống virus (virus like particles) (Nawagitgul và cs., 2000). 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 (Nawagitgul và cs., 2002). 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).

Nhận thức được tầm quan trọng của việc sản xuất protein tái tổ hợp sử dụng trong y tế, nông nghiệp, công nghiệp chế biến, bảo vệ môi trường và an ninh quốc phòng, Bộ Khoa học và Công nghệ đã đưa việc “Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ sản xuất protein và vacxin tái tổ hợp” vào Danh mục những đề tài trọng điểm cấp Nhà nước giai đoạn 2011- 2015. Cho đến nay, các nghiên cứu về protein tái tổ hợp tại Việt Nam đang phát triển mạnh mẽ, từ nghiên cứu đến ứng dụng đã đạt được nhiều thành tựu. Đây được xem là sự khởi đầu tiềm năng, thúc đẩy nước ta trên con đường phát triển công nghệ sinh học nói chung và protein tái tổ hợp nói riêng nhằm phát triển sản phẩm phục vụ trong và tiến tới ngoài nước.

Trong nghiên cứu gần đây, chúng tôi đã ứng dụng thành công hệ thống biểu hiện baculovirus nhằm tái tổ hợp protein ORF2 của PCV2 phân lập tại Việt Nam. Kết quả IPMA cho thấy, protein ORF2 của PCV2 tái tổ hợp bằng hệ thống biểu hiện baculovirus mang đặc tính sinh học tự nhiên. Ngoài ra, protein ORF2 của 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 tiến tới sản xuất vacxin. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài “Ứng dụng kháng nguyên ORF2 của PCV2 tái tổ hợp trong ELISA chẩn đoán phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn”.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu huyết thanh tham chiếu: 286 mẫu huyết thanh lợn thực địa được Trung tâm Chẩn đoán Thú y trung ương cung cấp và được đánh giá phát hiện kháng thể kháng PCV2.

2.2. Phương pháp

- *Chuẩn bị mẫu huyết thanh tham chiếu:*

Huyết thanh lợn đã được đánh giá phát hiện kháng thể kháng PCV2 bằng phương pháp IPMA sử dụng tế bào côn trùng (Đặng Vũ Hoàng và cs., 2016) và bằng sử dụng kit ELISA thương mại (PCV Kit, Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co., LTD, Trung Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- **Phương pháp tinh khiết protein** sử dụng kit thương mại (His-tagged protein PURIFICATION KIT - code 3310 của hãng MBL, Nhật Bản) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

- **Phương pháp điện di SDS-PAGE và Western Blot** được thực hiện theo phương pháp của Liu và cs., 2004.

- **Phương pháp ELISA phát hiện kháng thể PCV2** sử dụng kháng nguyên tự chế theo qui trình

ELISA theo phương pháp của Liu và cs., 2004.

- **Phương pháp tính độ nhạy và độ đặc hiệu** theo Blanchard và cs., 2003.

* Độ nhạy - DSn (%) = (Số mẫu dương tính thật/số mẫu dương tính thật cộng số mẫu âm tính giả) x100.

* Độ đặc hiệu - DSp (%) = (Số mẫu âm tính thật/số mẫu âm tính thật cộng số mẫu dương tính giả) x100.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Mẫu huyết thanh lợn tham chiếu (Reference samples)

Kết quả kiểm tra phát hiện kháng thể kháng PCV2 từ 286 mẫu huyết thanh lợn do Trung tâm Chẩn đoán Thú y trung ương thực hiện được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả kiểm tra kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn thực địa

Mẫu huyết thanh lợn	IPMA sử dụng tế bào côn trùng High FIVE	Kit ELISA thương mại
Mẫu dương tính	149	149
Mẫu âm tính	137	137
Tổng số mẫu	286	286

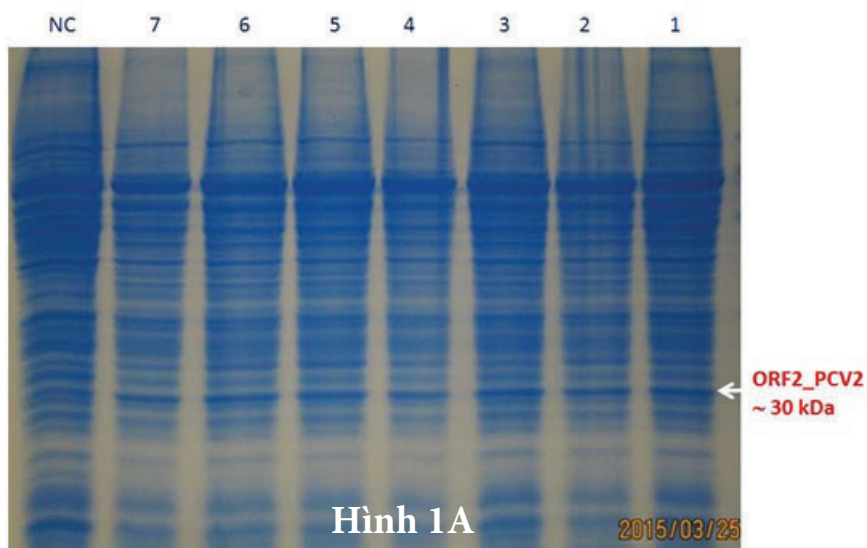
Bảng 1 cho thấy: Trong 286 mẫu kiểm tra có 149 mẫu dương tính và 137 mẫu âm tính với PCV2 bằng cả hai phương pháp IPMA và Kit ELISA thương mại. Kết quả cho thấy sự tương đồng cao giữa Kit ELISA thương mại và phương pháp IPMA sử dụng tế bào côn trùng High FIVE được phát triển trong nghiên cứu trước đây của chúng tôi (Đặng Vũ Hoàng và cs., 2016). Đồng thời, kết quả này cũng chỉ ra rằng phương pháp IPMA sử dụng tế bào côn trùng với baculovirus mang protein ORF2 tái tổ hợp là hoàn toàn phù hợp cho công tác chẩn đoán phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn tại Việt Nam.

3.2. Kiểm tra hoạt tính sinh học của protein ORF2 của PCV2 sau khi tinh sạch bằng kit tinh sạch thương mại

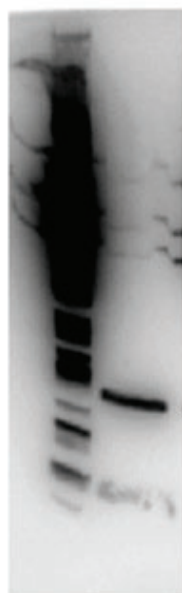
Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã gắn thêm đuôi his-tag vào protein ORF2 tái tổ hợp nên việc tinh sạch ORF2 tái tổ hợp được

thực hiện kit tinh sạch của hãng MBL (Medical and Biological Laboratories Co., LTD, Nhật Bản). Các bước tiến hành theo sự hướng dẫn của nhà sản xuất ([htTps://www.mblintl.com/products/3310](http://www.mblintl.com/products/3310))

Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy protein thô (chưa tinh sạch) xuất hiện rất nhiều băng protein, trong đó có 1 băng protein ORF2 đậm khoảng 30kDa (hình 1A). Sau khi tinh sạch bằng kit thương mại, chúng tôi kiểm tra hoạt tính sinh học bằng phương pháp Western Blot với huyết thanh kháng PCV2 của lợn, kết quả cho thấy chỉ thấy xuất hiện băng protein ORF2 phản ứng đặc hiệu với huyết thanh kháng PCV2 (hình 1B). Từ kết quả này đưa đến kết luận rằng protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2 đã được tinh sạch từ môi trường nuôi cấy và tế bào côn trùng High FIVE (High FIVE insect cells) bằng sắc ký ái lực đặc hiệu đuôi His-tag.



Tế bào côn trùng High FIVE.



Môi trường nuôi cấy



Hình 1B

Hình 1. Tinh sạch protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2

A) Kết quả kiểm tra SDS-PAGE chiết thô protein; B) Kết quả Western Blot với huyết thanh lợn kháng PCV2 sau khi tinh sạch bằng kit thương mại.

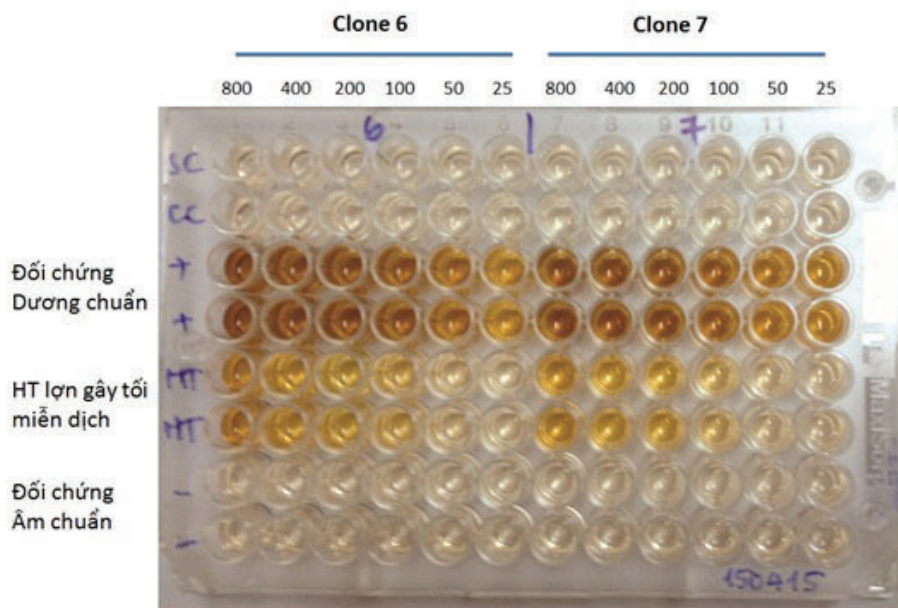
3.3. Thiết lập ELISA sử dụng kháng nguyên ORF2 sau khi tinh sạch nhằm phát hiện kháng thể kháng PCV2

Kháng nguyên sử dụng để thiết lập ELISA là protein ORF2 sau khi tinh sạch bằng kit tinh

sạch thương mại của hãng MBL, Nhật bản. Để xác định nồng độ kháng nguyên tối ưu cho phản ứng ELISA, chúng tôi tiến hành phủ đĩa với các nồng độ khác nhau. Cụ thể: 800, 400, 200, 100, 50 và 25 nanogram protein ORF2 sau khi tinh

sạch được phủ lên mỗi giếng. Theo Liu và cs, 2004, đối với kháng nguyên ORF2 của PCV2 được tái tổ hợp bằng hệ thống baculovirus, tỷ lệ pha loãng huyết thanh tối ưu là 1/50 và tỷ lệ pha loãng conjugate là 1/2500 (Liu và cs, 2004).

Các mẫu huyết thanh lợn dương chuẩn và âm chuẩn đối với PCV2 từ Viện Thú y Nhật bản. Mẫu huyết thanh gây tối miễn dịch với PCV2 được thực hiện tại Bộ môn Hóa sinh miễn dịch, Viện Thú y. Kết quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Kết quả chuẩn độ kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp dùng cho ELISA phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn

Từ kết quả trên, chúng tôi lựa chọn nồng độ kháng nguyên tái tổ hợp tối ưu cho ELISA là 200 nanogram/giếng (giá trị $P < 0,05$), huyết thanh pha loãng 1/50 và tỷ lệ pha loãng conjugate là 1/2500.

3.4. Đánh giá độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp tự chế

286 mẫu huyết thanh đã được kiểm tra phát hiện kháng thể kháng PCV2 bằng 2 phương pháp IPMA và kit ELISA thương mại được sử dụng làm tham chiếu để đánh giá độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên ORF2 tự chế. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ đặc hiệu và độ nhạy của phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp tự chế

Mẫu huyết thanh lợn	IPMA kết hợp kit ELISA thương mại	ELISA với kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp tự chế
Mẫu dương tính	149	153
Mẫu âm tính	137	133
Độ đặc hiệu (%)	97,16 %	
Độ nhạy (%)	100 %	

Kết quả ở bảng 2 cho thấy trong 286 mẫu huyết thanh lợn, có 153 mẫu dương tính và 133 mẫu âm tính với ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp ORF2. Khi so sánh với kết quả hai phương pháp IPMA sử dụng tế bào côn trùng và kit ELISA thương mại thì phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên tự chế có độ đặc hiệu là 97,16% (4 mẫu dương tính giả) và độ nhạy là 100%. Kết quả này cho thấy, chúng tôi đã thiết lập thành công phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên tự chế và phương pháp này hoàn toàn phù hợp trong công tác chẩn đoán phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn.

IV. KẾT LUẬN

Thiết lập thành công phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên ORF2 tái tổ hợp của PCV2 bằng hệ thống biểu hiện baculovirus. Phương pháp ELISA sử dụng kháng nguyên tái tổ hợp có độ đặc hiệu 97,36% và độ nhạy 100% là hoàn toàn phù hợp cho công tác chẩn đoán huyết thanh học phát hiện kháng thể kháng PCV2 trong huyết thanh lợn.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu biểu hiện protein tái tổ hợp của PCV2 để chế tạo sinh phẩm chẩn đoán và làm nguyên liệu tiến tới sản xuất vaccin” do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tài trợ thông qua Chương trình Công nghệ Sinh học Nông nghiệp và Thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tischer, I., H. Gelderblom, W. Vettermann, and M. A. Koch. 1982. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA. *Nature* 295:64–66
2. Lukert, P., G. F. de Boer, J. L. Dale, P. Keese, M. S. McNulty, J. W. Randles, and I. Tischer. 1995. The Circoviridae, p. 166–168. In F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.), *Virus taxonomy sixth report of the International Committee on Taxonomy of viruses*. Springer-Verlag, Vienna, Austria
3. Allan, G. M., F. McNeilly, S. Kennedy, B. Daft, E. G. Clarke, J. A. Ellis, D. M. Haines, B. M. Meehan, and B. M. Adair. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Investig.* 10:3–10
4. Morozov, I., Sirinarumitr, T., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Morgan, M.K., Yoon, K.J., Paul, P.S., 1998. Detection of a novel strain of porcine circovirus in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 36 (9), 2535–2541
5. 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
6. 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
7. Nawagitgul, P., Harms, P.A., Morozov, I., Thacker, B.J., Sorden, S.D., Lekcharoensuk, C., Paul, P.S., 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9,33–40.
8. Liu C1, Ihara T, Nunoya T, Ueda S., 2004. Development of an ELISA based on the baculovirus-expressed capsid protein of porcine circovirus type 2 as antigen. *J Vet Med Sci.*;66(3):237-42.
9. Đặng Vũ Hoàng, Trương Quốc Phong, Trần Thị Thanh Hà, Nguyễn Thị Huyền, Takehiro Kokuho và cs. 2016. Ứng dụng hệ thống biểu hiện baculovirus nhằm sản xuất protein ORF2 tái tổ hợp của PCV2. *Tạp chí KHKT Thú y Tập XXII (2) 14-21*

Nhận ngày 21-7-2016

Phản biện ngày 28-9-2016