

## SO SÁNH ĐỘT BIẾN AMINO ACID Ở 8 CẶP CHŨNG VI-RÚT PRRS CƯỜNG ĐỘC GỐC/ VẮC-XIN NHƯỢC ĐỘC

Bùi Anh Thy<sup>1,2</sup>, Lê Thanh Hòa<sup>3</sup>, Trần Xuân Hạnh<sup>1</sup>, Trần Linh Thuộc<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm Nghiên cứu thú y, Công ty cổ phần Thuốc thú y Trung ương NAVETCO

<sup>2</sup> Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>3</sup> Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở heo (PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome) là bệnh truyền nhiễm nguy hiểm trên heo ở mọi lứa tuổi, hiện đang được chủng ngừa bằng các loại vắc-xin nhược độc. Trong bài báo này, chúng tôi so sánh sự biến đổi amino acid và tỷ lệ đột biến trên các protein của cặp chủng vi-rút cường độc gốc BG81/vi-rút nhược độc BG895 do chúng tôi tạo ra tại NAVETCO với 7 cặp chủng cường độc/vắc-xin nhược độc đã được tạo ra trên thế giới. Trong số 19 protein của vi-rút PRRS, hai protein không cấu trúc NSP6 và NSP8 không xảy ra đột biến. Tỷ lệ đột biến trên protein cấu trúc màng cao hơn trên protein không cấu trúc. Protein cấu trúc E có mức độ đột biến cao nhất. Đặc biệt, các đột biến ở vị trí 143 trên protein GP3, vị trí 196 trên protein GP5 được ghi nhận ở cặp chủng BG81/BG895 và các cặp chủng của Trung Quốc là CH-1a/CH-1R, HuN4/HuN4-F112, TJ/TJM và XH-GD/XH-GDP122. Điều này gợi ra sự liên quan của đột biến ở hai vị trí này với đặc tính giảm độc lực ở các chủng đã được nhược độc hóa bằng nuôi cấy tiếp truyền này.

*Từ khóa:* Bệnh tai xanh, hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp, PRRS, vi-rút nhược độc.

### MỞ ĐẦU

Bệnh tai xanh với các đặc điểm rối loạn sinh sản ở heo nái và suy giảm đường hô hấp, đặc biệt ở heo bú sữa xảy ra chủ yếu ở những vùng đồng bằng có mật độ chăn nuôi cao, trung bình cứ hai năm một lần tái bùng phát trên diện rộng. Tác nhân gây bệnh là một loại vi-rút thuộc nhóm *Arterivirus*, họ *Arteriviridae*, bộ *Nidovirales*. Hệ gen vi-rút PRRS là phân tử RNA sợi đơn, mạch dương, có vỏ bọc bên ngoài, dài khoảng 15,3 - 15,5 kb gồm 10 khung đọc mở (ORF): ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF5a, ORF6 và ORF7. Trong đó, ORF1a,b nằm gần đầu 5', mã hoá cho phức hợp RNA-dependent RNA polymerase, chiếm khoảng 75% trình tự của hệ gen. Phía đầu 3' chứa những vùng gen mã hoá cho các protein cấu trúc (ORF2-7) của vi-rút, trong đó, ORF2-3-4 là các gen mã hoá protein chức năng GP2-3-4, được glycosyl hoá; ORF5 mã hóa glycoprotein vỏ ngoài (GP5) mang tính kháng nguyên cao; ORF6 mã hóa cho protein màng M, cùng với GP5 hình thành phức hợp màng heterodimer. Tiếp theo là ORF7 mã hóa cho protein nucleocapsid N, là protein màng nhân, không được glycosyl hóa, và có mức độ bảo tồn cao. Các gen có đặc điểm gổ đầu một phần 3' của gen trước với phần 5' của gen sau, gen sau tận dụng một phần cuối chuỗi nucleotide của gen trước làm promoter hoạt động (Kappes, Faaberg, 2015).

Để phòng bệnh tai xanh ở heo, nhiều dạng vắc-xin nhược độc đã được tạo ra, thương mại hóa và sử dụng trên thế giới (Chen *et al.*, 2016; Leng *et al.*, 2012). Các vắc-xin này được tạo ra bằng phương pháp nuôi cấy tiếp truyền chủng gốc cường độc trong tế bào động vật cho đến khi thu nhận được vi-rút không còn độc lực nhưng vẫn giữ được tính kháng nguyên và hiệu lực bảo vệ. Các công bố trước đây cho thấy trong quá trình tiếp truyền vi-rút PRRS trên tế bào MARC-145, ở các đời tiếp truyền nhất định xảy ra các biến đổi nucleotide, dẫn đến thay đổi amino acid ở một số protein (An *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009). Việc nghiên cứu so sánh biến đổi hệ gen ở các chủng vi-rút trong quá trình tiếp truyền để thu được chủng nhược độc dùng làm vắc-xin sẽ cung cấp thông tin khoa học về những biến đổi di truyền trong hệ gen của vi-rút qua quá trình nuôi cấy tiếp truyền, giúp xác định đột biến quyết định tính nhược độc (mất độc lực), tạo cơ sở cho việc kiểm tra giám sát đặc điểm phân tử của giống nhược độc gốc dùng trong chế tạo vắc-xin phòng bệnh PRRS.

Từ chủng vi-rút PRRS cường độc được phân lập từ heo bệnh tại Việt Nam, chủng BG8 được nuôi cấy tiếp truyền trên tế bào MARC-145 đến đời tiếp truyền thứ 95 tại Trung tâm Nghiên cứu thú y thuộc Công ty cổ phần Thuốc thú y Trung ương NAVETCO để thu nhận được chủng BG895 có tính nhược độc được dùng làm vắc-xin phòng bệnh PRRS ở Việt Nam. Chúng tôi quan tâm đến những biến đổi di truyền trong hệ gen của vi-rút qua quá trình nuôi cấy tiếp truyền và các đột biến amino acid có vai trò quyết định đến tính nhược độc ở chủng BG895 này. Trong bài báo được công bố trước đây (Bui *et al.*, 2020), chúng tôi đã trình bày các kết quả đánh giá độc lực các chủng vi-rút PRRS thu được qua 95 lần tiếp truyền trên dòng tế bào MARC-145 và kết quả phân tích biến đổi trình tự nucleotide và amino acid của các chủng vi-rút qua quá trình cấy chuyển. Ở bài báo này, chúng tôi phân tích sự biến đổi amino acid và tỷ lệ đột biến trên protein của vi-rút PRRS ở cặp chủng vi-rút cường độc BG81/vi-rút nhược độc BG895 so với các cặp chủng cường độc/vắc-xin nhược độc đã được tạo ra trên thế giới để phân tích các đột biến amino acid xuất hiện trên các protein kháng nguyên của vi-rút PRRS, thảo luận về xu hướng

chung của các biến đổi này và nhận định các đột biến amino acid liên quan đến tính nhược độc của chủng BG895 sau quá trình làm nhược độc bằng phương pháp nuôi cấy tiếp truyền.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nguyên vật liệu thí nghiệm

Chủng vi-rút BG8 cường độc được phân lập trên tế bào MARC-145 từ heo thực địa tại Việt Nam, kí hiệu BG81; và được tiếp truyền nhiều đời nhất định trên tế bào MARC-145 (nhược độc hóa) nhằm thu được chủng nhược độc BG895 để làm vắc-xin.

Số lượng, vị trí và tỷ lệ đột biến amino acid ở cặp chủng vi-rút cường độc BG81/vắc-xin nhược độc BG895 được phân tích so sánh với 7 cặp chủng cường độc gốc/chủng vắc-xin nhược độc đã được tạo ra tại Mỹ và Trung Quốc. Thông tin về 8 cặp chủng cường độc gốc/chủng vắc-xin nhược độc trong nghiên cứu này được trình bày trên Bảng 1.

**Bảng 1. Thông tin của 8 cặp chủng cường độc gốc/chủng vắc-xin nhược độc thu hoạch sau tiếp truyền được sử dụng để phân tích trong nghiên cứu này**

Cặp chủng	Tên chủng	Năm phân lập	Nước phân lập/ tiếp truyền	Số lần truyền	Độc lực	Số đăng kí trên Ngân hàng gen	Tài liệu trích dẫn/tham khảo
Cặp 1	BG81	2008	Việt Nam	1	Siêu cường độc	Đang đăng kí	Nghiên cứu này (Bui <i>et al.</i> , 2020)
	BG895			95	Nhược độc/Vắc-xin	Đang đăng kí	
Cặp 2	VR2322	1993	Mỹ		Cường độc	U87392	Opriessnig <i>et al.</i> , 2002 (An <i>et al.</i> , 2011)
	RespPRRS MLV			N/A	Nhược độc/Vắc-xin	AF066183	
Cặp 3	JA142	1999	Mỹ	N/A	Cường độc	AY424271	Ropp <i>et al.</i> , 2004 (An <i>et al.</i> , 2011)
	Ingelvac ATP			N/A	Nhược độc/Vắc-xin	DQ988080	
Cặp 4	CH-1a	1999	Trung Quốc	N/A	Siêu cường độc	AY032626	Harbin, 2008 (An <i>et al.</i> , 2011)
	CH-1R			N/A	Nhược độc/Vắc-xin	EU807840	
Cặp 5	HuN4	2006	Trung Quốc	1	Siêu cường độc	EF635006	An <i>et al.</i> , 2011
	HuN4-F112			112	Nhược độc/Vắc-xin	N/A	
Cặp 6	JXA1	2006	Trung Quốc	1	Siêu cường độc	EF112445	Han <i>et al.</i> , 2009
	JXA1-R			80	Nhược độc/Vắc-xin	FJ548853	
Cặp 7	TJ	2006	Trung Quốc	3	Siêu cường độc	EU860248	Leng <i>et al.</i> , 2012
	TJM			92	Nhược độc/Vắc-xin	N/A	
Cặp 8	XH-GD	2007	Trung Quốc	1	Siêu cường độc	EU624117	Chen <i>et al.</i> , 2016
	XH-GDP122			122	Nhược độc/Vắc-xin	N/A	

*Cường độc: Chỉ mức độ độc lực của các chủng cổ điển (phân lập trước 2006); Siêu cường độc: Chỉ các chủng có độc lực rất cao (HP-PRRSV) phân lập sau 2006 (Chen *et al.*, 2016; Leng *et al.*, 2012). N/A: (not available): Chưa rõ cụ thể.*

Dòng tế bào: Dòng tế bào MARC-145 được cung cấp bởi AAHL (Australian Animal Health Laboratory). Môi trường nuôi cấy tế bào EMEM (Minimum Essential Medium with Earle's salts); huyết thanh bào thai bê (FBS); lactalbumin hydrolysate 25%; sodium pyruvate 100 mM; L – glutamine 200 mM; HEPES 1 M; sodium hydrogen carbonate.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Cấy chuyển vi-rút nhiều đời trên tế bào MARC-145

Tiến hành tiếp truyền vi-rút PRRS nhiều đời trên tế bào MARC-145 theo AAHL và được nuôi cấy trong bình T25. Bổ sung 1 mL huyền dịch vi-rút vào mỗi T25. Ủ tế bào đã nhiễm vi-rút trong tủ ấm 37°C, 5% CO<sub>2</sub> thay môi trường mới sau 24 giờ nuôi cấy. Theo dõi, và thu hoạch huyền dịch vi-rút khi bệnh tích tế bào đạt 80%.

#### Thu toàn bộ hệ gen của vi-rút và giải trình tự

Hệ gen của vi-rút PRRS được tách chiết theo QIAampViral RNA kit của QIAGEN (Đức), thu nhận RNA. Tiếp đến, RNA được chuyển đổi thành cDNA, bằng môi ngẫu nhiên (random hexamer), sử dụng bộ kit Maxima của hãng Thermo Fisher Scientific. Thành phần 20 µl dung tích phản ứng gồm: 5 µl RNA tổng số mỗi chủng (10-20 ng/µl), 1 µl mỗi hexamer (100 pmol/µl), 1 µl dNTP (10 mM), 8 µl nước không có nuclease, 4 µl đệm 5X, 1 µl enzym Maxima Reverse Transcriptase (20 U/µl). Phản ứng chuyển đổi cDNA được tiến hành ở 50°C/60 phút và vô hoạt ở 85°C/5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở -20°C.

Phản ứng PCR thực hiện từ khuôn cDNA trong dung tích 50 µl gồm: 25 µl PCR mastermix (Thermo Fisher Scientific), 2 µl mỗi loại mỗi (10 pmol/µl), 4 µl khuôn cDNA, 2 µl DMSO (dimethyl sulfoxide) và 17 µl nước không có nuclease. Chu trình nhiệt PCR bao gồm 1 chu kỳ ở 98°C/30 giây, 35 chu kỳ ở [98°C/10 giây, 60-64°C/30 giây,

72°C/3 phút (điều chỉnh tùy phản ứng)], chu kỳ cuối ở 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên thạch agarose 1%, nhuộm bằng SYBR™ Safe DNA gel stain và quan sát sản phẩm, chụp ảnh trên máy soi gel Wealtec (Mỹ).

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit GeneAll®Combo GP theo hướng dẫn của nhà sản xuất GeneAll, tạo dòng vào pCR-XL-2-TOPO để lưu trữ toàn bộ chuỗi gen và gửi đi giải trình tự tại 1<sup>st</sup>Base theo phương pháp “lao mồi” từng đoạn. Trình tự nucleotide các chuỗi được sắp xếp lồng vào nhau để có trình tự đầy đủ toàn bộ gen.

### Xử lý chuỗi gen và phân tích số liệu

Trình tự các chuỗi nucleotide được xử lý bằng các phần mềm Chromas LITE v2.01; các chuỗi thu được từ nghiên cứu và thu thập từ Ngân hàng gen (GenBank) được so sánh đối chiếu, xử lý số liệu và suy diễn trình tự amino acid của hệ gen và từng gen bằng chương trình GeneDoc2.7. Các chủng được so sánh về thành phần nucleotide và amino acid, xem xét mối quan hệ tương đồng, xác định các loại hình đột biến nucleotide và amino acid.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Biến đổi amino acid của chủng BG895 so với chủng gốc BG81

Qua quá trình nuôi cấy tiếp truyền đến đời 95, độ dài hệ gen của chủng vi-rút BG81 vẫn là 15.321 bp, không thay đổi (Bui *et al.*, 2020); tuy nhiên, đã xuất hiện các biến đổi về nucleotide dẫn đến thay đổi amino acid. Kết quả trong Bảng 2 cho thấy trên ORF1ab mã hóa phức hợp sao chép phiên mã (RNA - dependent RNA polymerase - RdRp), có sự biến đổi nucleotide dẫn đến làm thay đổi 4 vị trí amino acid P<sub>168</sub>T/NSP1, Y<sub>1871</sub>H/NSP4, R<sub>318</sub>Q/NSP9, T<sub>1031</sub>N/NSP10. Trên hai protein màng nhỏ (GP2, GP4) và protein màng nhân N đều có 1 vị trí thay đổi amino acid: A<sub>56</sub>S/GP2, D<sub>43</sub>G/GP4, K<sub>28</sub>N/N. Trong khi đó, trên protein màng nhỏ nhất E và protein xuyên màng lớn GP5 có đến 2 vị trí thay đổi amino acid: L<sub>48</sub>F/E, C<sub>54</sub>F/E, Y<sub>106</sub>C/GP5 và Q<sub>196</sub>R/GP5. Các vị trí này có ảnh hưởng nhất định đến chức năng polypeptide do có sự hình thành arginine (R) và cysteine (C) tạo nên điểm cắt của protease giải phóng oligopeptide siêu kháng nguyên về phương diện miễn dịch. Điều đặc biệt, trên protein cấu trúc màng nhỏ GP3 có tính kháng nguyên cao, có đến 3 vị trí thay đổi amino acid lần lượt tại vị trí 79 (H>Y), vị trí 143 (F>L), và vị trí 225 (T>A).

**Bảng 2. Vị trí amino acid thay đổi trong các polypeptide của vi-rút PRRS (từ BG81 đến BG895)**

ORF	Protein	Chức năng	Vị trí amino acid biến đổi (aa <sub>BG81</sub> > aa <sub>BG895</sub> )
ORF1a	NSP1	Papain-like cysteine protease, ức chế IFN và TNFα	168 (P > T)
	NSP2	Cysteine protease, ức chế IFN và TNFα	
	NSP3	Protein xuyên màng	
	NSP4	Serine protease	1871 (Y > H)
	NSP5	Protein xuyên màng	
	NSP6	Chưa có thông tin	
	NSP7	Chưa có thông tin	
	NSP8	Chưa có thông tin	
ORF1b	NSP9	RNA-dependent RNA polymerase	318 (R > Q)
	NSP10	Helicase	1031 (T > N)
	NSP11	Endoribonuclease, ức chế IFN	
	NSP12	Chưa có thông tin	
ORF2a	GP2	Protein màng, tương tác với CD163; trung hòa vi-rút	56 (A > S)
ORF2b	E	Protein màng, tạo kênh ion oligomeric	48 (L > F), 54 (C > F)
ORF3	GP3	Protein màng; tính kháng nguyên cao, trung hòa vi-rút	79 (H > Y), 143 (F > L), 225 (T > A)
ORF4	GP4	Protein màng, tương tác với CD163; trung hòa vi-rút	43 (D > G)
ORF5	GP5	Protein xuyên màng, tương tác với sialoadhesin và protein M, giúp vi-rút xâm nhập vào tế bào; có chức năng trung hòa vi-rút và bảo vệ	106 (Y > C), 196 (Q > R)
ORF6	M	Protein xuyên màng, tương tác với heparan sulfate; được bảo tồn cao nhất; hợp nhất các thành phần của vi-rút và giải phóng vi-rút khỏi tế bào chủ	
ORF7	N	Màng nhân (nucleocapsid)	28 (K > N)

**Số lần tiếp truyền chủng cường độc gốc cần thiết để nhược độc hóa tạo vắc-xin**

Các loại vắc-xin nhược độc đang sử dụng hiện nay trên thế giới được tạo ra từ các chủng cổ điển và mới xuất hiện bằng phương pháp tiếp truyền nhiều đời trên môi trường tế bào (chủ yếu là MARC-145) từ chủng cường độc (phân lập trước năm 2006) hoặc “siêu cường độc” (sau năm 2006) (Chen *et al.*, 2016; Leng *et al.*, 2012). Các chủng vắc-xin chính được tạo ra chủ yếu ở Mỹ và Trung Quốc. Một số vắc-xin cổ điển được tạo ra từ những năm đầu 2000. Sau năm 2006, vi-rút PRRS có những dòng đột biến sâu tạo nên các dòng có độc lực rất cao (“siêu cường độc”) đòi hỏi cần có những loại vắc-xin mới, phù hợp và tương thích kháng nguyên-miễn dịch với các chủng đang lưu hành (Chen *et al.*, 2016; Leng *et al.*, 2012). Do vậy, những năm gần đây các chủng vắc-xin xuất phát từ những chủng siêu cường độc mới phân lập được tạo ra ngày càng nhiều, đại diện là các vắc-xin nhược độc của Trung Quốc. Xét về số lần tiếp truyền chủng cường độc gốc cần thiết để nhược độc hóa tạo vắc-xin giữa cặp chủng BG81/BG895 với 7 cặp chủng tương ứng được dùng làm đối tượng so sánh ở Bảng 1, ngoại trừ trường hợp 3 cặp không có số liệu được công bố (cặp 2, 3 và 4), các cặp chủng còn lại đều đảm bảo nhược độc hoàn toàn sau 80 đời (cặp chủng JXA1/JXA1-R đến 112, 122 đời tiếp truyền (cặp HuN4/HuN4-F112 và cặp XH-GD/XH-GDP122)). Cặp chủng BG81/BG895 có số lần tiếp truyền để đạt tính nhược độc là 95, tương đương với cặp TJ/TJM (92 lần).

**Bảng 3. So sánh đột biến amino acid (aa) trên 19 protein của vi-rút PRRS giữa 8 cặp chủng cường độc gốc và chủng vắc-xin nhược độc thu hoạch sau tiếp truyền**

ORF	Protein	Số amino acid đã thay đổi và tỷ lệ thay đổi (%) ở từng cặp chủng cường độc/nhược độc							
		BG81/BG895	VR2322/RespPRRSMLV	JA142/IngelvacATP	CH-1a/CH-1R	HuN4/HuN4-F112	JXA1/JXA1-R	TJ/TJM	XH-GD/XH-GDP122
ORF1a	NSP1	1 (0,26)	2 (0,52)	4 (1,04)	0 (0)	2 (0,52)	3 (0,78)	2 (0,52)	1 (0,26)
	NSP2	0 (0)	5 (0,51)	13 (1,33)	11 (1,12)	6 (0,63)	10 (1,16)	19 (2,0)	6 (0,51)
	NSP3	0 (0)	1 (0,22)	2 (0,44)	4 (0,89)	2 (0,44)	3 (0,67)	3 (0,67)	3 (1,30)
	NSP4	1 (0,49)	0 (0)	0 (0)	1 (0,49)	1 (0,49)	0 (0)	1 (0,49)	1 (0,49)
	NSP5	0 (0)	1 (0,59)	0 (0)	3 (1,76)	0 (0)	0 (0)	1 (0,59)	0 (0)
	NSP6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	NSP7	0 (0)	0 (0)	2 (0,77)	1 (0,38)	1 (0,38)	1 (0,38)	2 (0,77)	3 (1,16)
	NSP8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ORF1b	NSP9	1 (0,16)	0 (0)	2 (0,31)	6 (0,93)	7 (1,09)	3 (0,47)	4 (0,62)	2 (0,31)
	NSP10	1 (0,23)	3 (0,68)	3 (0,68)	5 (1,13)	2 (0,45)	5 (1,13)	4 (0,91)	1 (0,23)
	NSP11	0 (0)	4 (1,79)	0 (0)	2 (0,90)	1 (0,45)	2 (0,90)	1 (0,45)	1 (0,45)
	NSP12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,3)	1 (0,65)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ORF2a	GP2	1 (0,39)	1 (0,39)	3 (1,17)	3 (1,17)	6 (2,33)	5 (1,95)	1 (0,39)	2 (0,78)
ORF2b	E	2 (2,74)	1 (1,37)	0 (0)	2 (2,74)	2 (2,74)	2 (2,74)	0 (0)	2 (2,74)
ORF3	GP3	3 (1,18)	2 (0,79)	5 (1,97)	7 (2,76)	1 (0,39)	4 (1,57)	2 (0,79)	7 (2,76)
ORF4	GP4	1 (0,56)	0 (0)	2 (1,12)	1 (0,56)	5 (2,81)	6 (3,37)	3 (1,69)	2 (1,12)
ORF5	GP5	2 (1,0)	2 (1,0)	3 (1,5)	3 (1,5)	2 (1,0)	2 (1,0)	4 (2,0)	2 (1,0)
ORF6	M	0 (0)	2 (1,15)	1 (0,57)	1 (0,57)	1 (0,57)	0 (0)	0 (0)	2 (1,15)
ORF7	N	1 (0,81)	0 (0)	0 (0)	2 (1,63)	0 (0)	0 (0)	1 (0,81)	0 (0)
Số protein đột biến		10	11	11	16	15	12	14	14
Số aa đột biến		14	24	40	54	40	46	48	35

**Đột biến amino acid trên các protein của vi-rút PRRS sau quá trình nhược độc hóa**

Bảng 3 tổng hợp các đột biến làm thay đổi amino acid (aa) trên 19 protein của vi-rút PRRS ở 8 cặp chủng gốc/nhược độc vắc-xin thu hoạch sau tiếp truyền. Trong 8 cặp chủng vi-rút PRRS nhược độc hóa làm vắc-xin được phân tích, tổng số amino acid đột biến cao nhất là CH-1a/CH-1R (54 aa); ít nhất là BG81/BG895 (14 aa). Một số cặp chủng có tỷ lệ đột biến amino acid cao là do có sự mất một lượng lớn amino acid trong protein NSP2. Ở cặp chủng BG81/BG895, đột biến nucleotide trong gen *nsp2* không dẫn đến đột biến amino acid trên protein NSP2, trong khi đó protein NSP2 ở một số chủng có đột biến amino acid đến 1,13 - 2,0% (JA142/Ingelvac ATP, TJ/TJM) (Leng *et al.*, 2012). NSP4 xảy ra đột biến mức trung bình (0,49%) ở 5/8 cặp chủng. NSP6 và NSP8 hoàn toàn không xảy ra đột biến ở tất cả 8 cặp chủng. Mặc dù có kích thước nhỏ (73 aa) nhưng protein E có tỷ lệ đột biến cao (2,74%) ở đa số cặp chủng, bao gồm cặp BG81/BG895 nhưng không xảy ra đột biến ở 2 cặp JA142/Ingelvac ATP và TJ/TJM. Trên protein GP3 có tỷ lệ đột biến amino acid cao nhất ở tất cả mọi cặp chủng, cao nhất (2,76%) ở cặp chủng CH-1a/CH-1R và GD/XH-GDP122 và ít nhất (0,39%) ở cặp chủng HuN4/HuN4-F112. Đối với, cặp chủng BG81/BG895, tỷ lệ đột biến trên GP3 ở mức trung bình (1,18%). GP4 có tỷ lệ đột biến không đều ở các cặp chủng: cặp VR-2322/RespPRRS MLV không có đột biến; trong khi đó, cặp JXA1/JXA1-R có tỷ lệ 3,37%, cao nhất trong 8 cặp chủng so sánh; cặp HuN4/HuN4-F112 cũng có tỷ lệ đột biến cao (2,81%); cặp BG81/BG895 có

1 đột biến aa, chiếm tỷ lệ 0,56%. Trái lại, GP5 có đột biến amino acid (2-4 aa) ở tất cả các cặp chủng với tỷ lệ 1 - 2%, cho thấy GP5 có thể có vai trò làm giảm độc lực của vi-rút PRRS trong quá trình tiếp truyền ở tất cả 8 chủng được phân tích. Protein M không có biến động lớn, 5 cặp chủng chỉ đột biến với tỷ lệ 0,57 - 1,15%; tuy nhiên, 3 cặp chủng, trong đó có BG81/BG895, không có đột biến ở protein này. Tương tự, protein N chỉ có 3 cặp chủng có đột biến tỷ lệ thấp (0,81 - 1,63%), trong khi đó 5 cặp chủng còn lại hoàn toàn không xảy ra đột biến.

**Khác biệt về số lượng và loại protein đột biến ở 8 cặp chủng**

Bảng 3 cũng cho thấy, về số lượng protein đột biến, hai cặp chủng CH-1a/CH-1R và HuN4/HuN4-F112 có số protein đột biến cao nhất, lần lượt là 15 và 16 protein; hai cặp chủng GD/XH-GDP122 và TJ/TJM cũng có số protein đột biến cao là 14 protein. Cặp chủng JXA1/JXA1-R có số lượng protein đột biến vừa phải (12/19); hai cặp chủng VR-2322/RespPRRS MLV và JA142/Ingelvac ATP đều có 11/19 protein bị đột biến. Cặp chủng BG81/BG895 chỉ có 10 protein đột biến, là cặp có số lượng protein đột biến ít nhất trong 8 cặp chủng. Ngoài ra ở cặp chủng này, tỷ lệ đột biến amino acid ở các protein nói chung thấp hơn các cặp chủng khác, ngoại trừ protein E (2,74%).

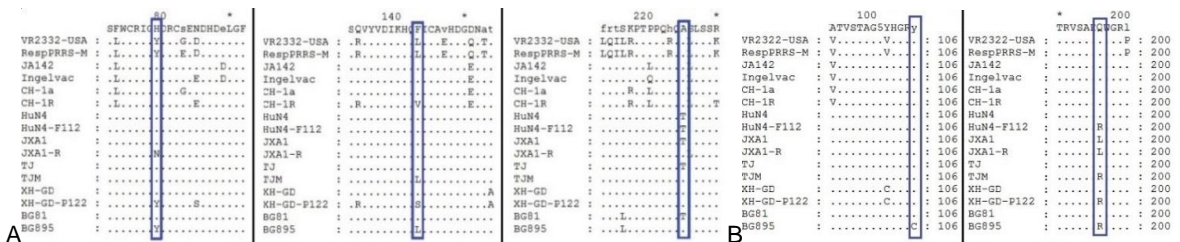
So sánh sự khác biệt về mức độ đột biến của các protein theo nhóm chức năng, Bảng 3 cho thấy các protein không cấu trúc (gồm 12 protein NSP1-12) là nhóm có số lượng protein đột biến cao nhất (9/12 NSPs) ở 3 cặp chủng CH-1a/CH-1R, HuN4/HuN4-F112 và TJ/TJM; 2 cặp chủng VR-2322/RespPRRS MLV và JA142/Ingelvac ATP có số lượng protein không cấu trúc bị đột biến ở mức trung bình (6/12 NSPs) và cặp chủng BG81/BG895 của Việt Nam là ít nhất (4/12 NSPs). Đối với nhóm protein cấu trúc là glycoprotein có tính kháng nguyên gồm 5 protein là GP2, E, GP3, GP4, GP5, ngoại trừ 3 cặp chủng VR-2322/RespPRRS MLV, JA142/Ingelvac ATP và TJ/TJM, 5 cặp chủng còn lại đều có đột biến trên tất cả 5 protein này. Trường hợp protein cấu trúc nền M và N, ở cặp chủng CH-1a/CH-1R có đột biến trên cả M và N; ở cặp JXA1/JXA1-R không ghi nhận đột biến nào trên hai protein này, trong khi đó, đột biến xảy ra trên M hoặc N được ghi nhận ở 6 cặp chủng còn lại.

**Đột biến amino acid liên quan đến tính nhược độc**

Các phân tích cụ thể về biến đổi amino acid ở các cặp chủng trên Bảng 4 cho thấy, trừ 3 cặp VR-2322/RespPRRS MLV, JA142/Ingelvac ATP và JXA1/JXA1-R, ở 5 cặp chủng còn lại có các đột biến đáng ghi nhận sau đây: luôn xảy ra đột biến aa ở vị trí 143 trên GP3 (CH-1a/CH-1R) hoặc vị trí 196 trên GP5 (HuN4/HuN4-F112), hoặc ở cả hai vị trí này trên GP3 và GP5 (TJ/TJM, XH-GD/XH-GDP122 và BG81/BG895) (Bảng 4, Hình 1). Tuy cặp chủng JXA1/JXA1-R không xảy ra đột biến tại 2 vị trí trên, nhưng lại xảy ra đột biến ở vị trí 79 và 225 trên GP3, cũng giống như cặp chủng BG81/BG895. Điều này gợi ý rằng, ở các chủng được nhược độc hóa bằng nuôi cấy tiếp truyền này, đặc tính giảm độc lực có liên quan chủ yếu đến vị trí đột biến amino acid tại 2 vị trí F<sub>143</sub>L/GP3 và Q<sub>196</sub>R/GP5 như đã được ghi nhận bởi tác giả khác (Tian *et al.*, 2009). Ngoài ra, một điều đặc biệt khác nữa xảy ra ở GP3 của cặp BG81/BG895 của Việt Nam là bộ mã TTC (nucleotide 13032-13034 trong hệ gen; amino acid 143 trong GP3) đều bị đột biến cả hai nucleotide của bộ mã để chuyển thành CTT dẫn đến xuất hiện đột biến amino acid F<sub>143</sub>L (Bui *et al.*, 2020).

**Bảng 4. Các đột biến amino acid trên protein GP3 và GP5 ở 8 cặp chủng khảo sát**

Protein	Vị trí aa thay đổi	Các đột biến amino acid trên protein GP3 và GP5 ở 8 cặp chủng khảo sát							
		BG81/BG895	VR2322/RespPRR SMLV	JA142/Ingelvac ATP	CH-1a/CH-1R	HuN4/HuN4-F112	JXA1/JXA1-R	TJ/TJM	XH-GD/XH-GDP122
GP3	79	H>Y	Y	H	H	H	H>N	H	H>Y
	143	F>L	L	F	F>V	F	F	F>L	F>S
	225	T>A	A	A	A	T	T>A	T>A	A
GP5	106	Y>C	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	196	Q>R	Q	Q	Q	Q>R	L	Q>R	Q>R



**Hình 1. Các vị trí thay đổi amino acid đáng lưu ý trên GP3 (A) và trên GP5 (B) ở 8 cặp chủng khảo sát, được so sánh dựa trên phần mềm GeneDoc 2.7**

Cũng giống như qui luật đột biến ở các chủng tiếp truyền ở Trung Quốc và Mỹ, vùng gen không cấu trúc (ORF1ab) và vùng gen nền (ORF6-7) có đột biến ít hơn so với vùng gen cấu trúc chứa các gen kháng nguyên và độc lực (ORF2a,b, ORF3, ORF4, ORF5). Đột biến nhiều nhất và quan trọng nhất xảy ra ở GP3 và GP5, còn ít nhất vẫn là ở protein M và N. Đột biến amino acid trong các protein của vi-rút PRRS (từ chủng BG81 thành chủng BG895) có khả năng ảnh hưởng đến đặc điểm sinh học của các chủng. Một số đột biến amino acid có thể có mức độ ảnh hưởng nhất định đến chức năng của protein: các thay đổi tạo thành arginine (R), cysteine (C) sẽ hình thành điểm cắt bởi protease giải phóng oligopeptide siêu kháng nguyên, hoặc tạo thành các amino acid có hoạt tính cao, như asparagine (N); aspartic acid (D), lysine (K) quyết định các đặc tính protein (ưa nước, kỵ nước, ái lực liên kết, cấu trúc bậc 3...) (Tian *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013). Những thay đổi về amino acid trong protein này có thể làm tăng cường hoặc giảm bớt chức năng sinh học của chúng. Sau 95 đời tiếp truyền trên tế bào MARC-145, các chủng cường độc/siêu cường độc vi-rút PRRS đã có biến đổi trong hệ gen đủ để làm vắc-xin, mặc dù không có khả năng gây bệnh, nhưng tính kháng nguyên vẫn bảo tồn như chủng gốc (Tian *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013). Dĩ nhiên, cần thận trọng không tiếp truyền quá mức (overattenuation) như nghiên cứu của Yu và đồng tác giả (2013) đã chỉ rõ tính “lợi bất cập hại” của qui trình nhược độc hóa làm vắc-xin.

## KẾT LUẬN

Kết quả phân tích biến đổi amino acid trên các protein của chủng cường độc gốc BG81 và chủng nhược độc vắc-xin BG895 qua nhiều đời tiếp truyền so với các biến đổi tương ứng ở 7 cặp chủng cường độc/chủng vắc-xin được tạo ra tại Mỹ, Trung Quốc, đã trình bày ở trên cho phép chúng tôi ghi nhận được những đặc điểm chung trong các cặp chủng được khảo sát về đột biến amino acid trên các protein của vi-rút PRRS sau quá trình nhược độc hóa, về số lượng và loại protein đột biến. Trong số 19 protein của vi-rút PRRS, có 2 protein không cấu trúc (NSP6 và NSP8) được bảo tồn, không xảy ra đột biến, được xem là không liên quan với quá trình nhược độc của vi-rút. Tỷ lệ đột biến trên protein cấu trúc màng cao hơn trên protein không cấu trúc. Vùng gen biểu hiện protein cấu trúc nhỏ nhất (E) có mức độ đột biến cao nhất trong số tất cả các protein và được xem là đối tượng có tính biến đổi cao. Đặc biệt, các đột biến ở vị trí 143 trên protein GP3, vị trí 196 trên protein GP5 được ghi nhận ở cặp chủng BG81/BG895 và các cặp chủng của Trung Quốc là CH-1a/CH-1R, HuN4/HuN4-F112, TJ/TJM và XH-GD/XH-GDP122. Điều này gợi ý rằng, ở các chủng được nhược độc hóa bằng nuôi cấy tiếp truyền này, đặc tính giảm độc lực có liên quan đến vị trí đột biến amino acid này trên protein GP3 và GP5. Các nghiên cứu tiếp theo sẽ được tiến hành nhằm kiểm chứng vai trò của các đột biến amino acid trên hai protein này đối với tính nhược độc ở chủng BG895.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- An TQ, Tian ZJ, Zhou YJ, Xiao Y, Peng JM, Chen J, Jiang YF, Hao XF, Tong GZ (2011). Comparative genomic analysis of five pairs of virulent parental/ attenuated vaccine strains of PRRSV. *Vet Microbiol* 149(1-2):104-12.
- Bui AT, Le TH, Tran XH, Tran LT (2020). Phân tích biến đổi gen của các chủng vi-rút gây bệnh tai xanh (PRRSV) qua tiếp truyền trên tế bào từ chủng vi-rút thực địa. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ ĐHQG-HCM* (đang in).
- Chen Y, He S, Sun L, Luo Y, Sun Y, Xie J, Zhou P, Su S, Zhang G (2016). Genetic variation, pathogenicity, and immunogenicity of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain XH-GD at different passage levels. *Arch Virol* 161(1):77-86.
- Han W, Wu JJ, Deng XY, Cao Z, Yu XL, Wang CB, Zhao TZ, Chen NH, Hu HH, Bin W, Hou LL, Wang LL, Tian KG, Zhang ZQ (2009). Molecular mutations associated with the in vitro passage of virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes* 38(2): 276-84.
- Kappes M, Faaberg K (2015). PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity. *Virology*: 475-486
- Leng X, Li Z, Xia M, Li X, Wang F, Wang W, Zhang X, Wu H (2012). Mutations in genome of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus potentially related to attenuation. *Vet Microbiol* 157: 50-60
- Tian ZJ, An TQ, Zhou YJ, Peng JM, Hu SP, Wei TC, Jiang YF, Xiao Y, Tong GZ (2009). An attenuated live vaccine based on highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) protects piglets against HP-PRRS. *Vet Microbiol* 138: 34-40.
- Yu X, Chen N, Deng X, Cao Z, Han W, Hu D, Wu J, Zhang S, Wang B, Gu X, Tian K (2013). Genomic sequencing reveals mutations potentially related to the overattenuation of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Vaccine Immunol* 20(4): 613-9.

## COMPARISON OF AMINO ACID MUTATIONS ON EIGHT PAIRS OF PRRSV VIRULENT PARENTAL/ATTENUATED VACCINE STRAINS

Bui Anh Thy<sup>1,2</sup>, Le Thanh Hoa<sup>3</sup>, Tran Xuan Hanh<sup>1</sup>, Tran Linh Thuoc<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Veterinary Research Centre, NAVETCO National Veterinary Joint Stock Company*

<sup>2</sup> *University of Science, Vietnam National University Ho Chi Minh City*

<sup>3</sup> *Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a seriously widespread disease affecting all age groups of domestic pigs, is currently prevented by vaccination using attenuated strains. In this study, we compared amino acid mutations and mutation rates on viral proteins of the BG81/BG895 pair of virulent parental/attenuated strain, made by us at NAVETCO, with those of other seven virulent parental/attenuated vaccine strains in the world. Among 19 PRRSV proteins, amino acid mutation did not exist on the two NSP6, NSP8 proteins. Mutation rates of envelope-associated structural proteins were obviously higher than those of non-structural proteins. E protein had the highest mutation rate. Interestingly, amino acid mutations at position 143 on GP3 protein and position 196 on GP5 protein were detected in BG81/BG895 and the four pairs CH-1a/CH-1R, HuN4/HuN4-F112, TJ/TJM, XH-GD/XH-GDP122 from China. This issue suggests the possible role of amino acid mutation in these positions on GP3 and GP5 proteins in the attenuation of these attenuated vaccine strains obtained by serial cell line passages.

*Keywords:* Attenuated strain, PRRS, porcine reproductive and respiratory syndrome virus.