

## ĐÁNH GIÁ TÍNH SINH MIỄN DỊCH CỦA PROTEIN TÁI TỔ HỢP MÃ HÓA VÙNG RBD CỦA VIRUS VIÊM PHẾ QUẢN TRUYỀN NHIỄM Ở GÀ

Nguyễn Thị Trà<sup>1</sup>, Lê Thị Trà My<sup>1</sup>, Chu Thanh Tâm<sup>1</sup>, Trịnh Thái Vy<sup>1</sup>,  
Ngô Hồng Dương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Thu Hiền<sup>1</sup>, Lê Thị Kim Xuyên<sup>1</sup>,  
Đoàn Thị Thanh Hương<sup>1</sup>, Hoàng Thị Thu Hằng<sup>1,2,\*</sup>, Phạm Bích Ngọc<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

### TÓM TẮT

Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (Infectious Bronchitis, IB) là một bệnh cấp tính nguy hiểm trên gà, do infectious bronchitis virus (IBV) gây ra. Hiện nay, bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gà đang là mối lo ở các nước chăn nuôi gà tập trung phát triển mạnh ở châu Á trong đó có Việt Nam. Tiêm phòng vaccine được xem là biện pháp hiệu quả nhất để kiểm soát sự bùng phát của dịch bệnh này. Tuy nhiên, các vaccine phòng IBV hiện nay ở nước ta đa phần là vaccine nhập ngoại từ Trung Quốc, Hàn Quốc, Ấn Độ... hoặc một số công ty thuốc thú y trong nước (MTV, AVAC...) nhập chủng IBV từ nước ngoài về để sản xuất vaccine nhược độc đồng khả năng giá hoặc nhị giá (kết hợp vacxin phòng bệnh New Castle), dẫn tới hiệu quả bảo hộ thấp hoặc không còn khả năng bảo hộ trước những biến chủng IBV mới. Trong nghiên cứu trước, protein RBD-VAC dung hợp motif GCN4pII đã được biểu hiện và sản xuất thành công từ lá thuốc lá *Nicotiana benthamiana*. Trong nghiên cứu này, khả năng kích thích đáp ứng miễn dịch của protein RBD-VAC-pII được đánh giá trên mô hình chuột, gà thí nghiệm và công cường độc bằng chủng IBHYM. Huyết thanh của chuột và gà được thu nhận để đánh giá đáp ứng sinh kháng thể IgG và IgY đặc hiệu RBD-VAC-pII thông qua phản ứng ELISA và Western blot. Kết quả cho thấy protein RBD-VAC-pII tái tổ hợp đã kích thích sinh kháng thể đặc hiệu trên động vật thí nghiệm, đồng thời đã ngăn chặn và giảm thiểu các triệu chứng cho gà trước thử thách công cường độc ở mức độ gần như ngang bằng với vaccine thương mại. Những kết quả này chứng tỏ tiềm năng của việc sử dụng kháng nguyên RBD-VAC-pII trong phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng IBV.

*Từ khóa:* Hiệu giá kháng thể, IBV, tính sinh miễn dịch, vaccine thực vật, vùng gắn kết thụ thể.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (infectious bronchitis, IB) là một bệnh cấp tính nguy hiểm trên gà, xảy ra quanh năm và trên mọi lứa tuổi ở gà, với tỷ lệ mắc bệnh 50-100%, gây chết 0-25%. Bệnh đặc biệt nguy hiểm đối với gà con dưới 1 tháng tuổi, và gây thiệt hại nghiêm trọng trên gà nuôi lấy trứng giống và trứng thương phẩm. Các dấu hiệu đầu tiên dễ thấy nhất bao gồm: thở khó kèm tiếng ran, chảy dịch mũi, gà con có ủ rũ, giảm ăn, bỏ ăn, đứng túm vào nhau. Gà lớn có biểu hiện giảm ăn nhẹ, thở hỗn hển, ho, xuất huyết khí quản và chảy nước mũi. Nhiều trường hợp phát hiện bệnh tích trên khí quản, phổi, thận và ống dẫn trứng ở gà đẻ, sản lượng trứng giảm có thể tới 50-70%. Tác nhân gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) thuộc họ *Coronaviridae*, giống *Gammacoronavirus*, cấu tạo bên ngoài giống hình “vương miện”. Virus có đường kính xấp xỉ 120 nm với lớp vỏ bọc ngoài, bề mặt có gai hình dạng chùy dài khoảng 20 nm, bên trong chứa bộ gene là chuỗi RNA đơn dương (Cavanagh, 2007; Cook *et al.*, 2012; Bande *et al.*, 2017).

Cho tới nay, tất cả các loại vaccine thương mại được sử dụng phổ biến là vaccine sống nhược độc hoặc vaccine bất hoạt. Vaccine IBV nhược độc có một số hạn chế cần được khắc phục như khả năng lại độc và tổn thương mô (Jackwood *et al.*, 2017). Khả năng sản sinh kháng thể của vaccine bất hoạt tương đối thấp so với vaccine nhược độc và không tạo được đáp ứng qua trung gian tế bào T. Do đó, thông thường, vaccine bất hoạt phòng IBV được tiêm lần thứ hai sau khi đã kích thích miễn dịch bằng vaccine nhược độc, dẫn tới gia tăng giá thành của vaccine. Mặc dù hứa hẹn nhiều tiềm năng và khắc phục được một số hạn chế của vaccine nhược độc, những vaccine sử dụng hệ vector virus, vaccine tiểu đơn vị, hay vaccine DNA vẫn có một số hạn chế như các đáp ứng miễn dịch không mong muốn đối với hệ vector, sự giảm khả năng thu nhận kháng nguyên của các tế bào trình diện kháng nguyên, sự biến đổi kháng nguyên sau dịch mã, gấp cuộn và glycosyl hóa không hoàn chỉnh trong tế bào chủ ảnh hưởng đến tính sinh miễn dịch của kháng nguyên đích (Bande *et al.*, 2015). Vaccine tiểu đơn vị được sản xuất từ thực vật sử dụng phương pháp biểu hiện tạm thời có nhiều ưu điểm, trong đó ưu điểm lớn nhất là có thể tạo ra một lượng lớn các protein tái tổ hợp trong thời gian ngắn (vài ngày đến vài tuần) sau khi biến nạp, chính vì vậy đáp ứng kịp thời với dịch bệnh xảy ra.

Vùng gene đầu 3' của virus mã hóa cho 4 protein cấu trúc: S (gai), M (màng), N (nucleoprotein) và protein vỏ (E) trong đó S1 là yếu tố quyết định khả năng gây bệnh và tính đặc hiệu của virus đối với tế bào vật chủ. Miễn dịch bảo hộ, phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu (HI) và kháng thể trung hòa virus đều được tạo ra bởi protein S1 (Li *et al.*, 2008). Tiểu phần S1 chứa vùng gắn kết thụ thể (Receptor Binding Domain-RBD, là phần biến đổi nhiều nhất của protein S và là cơ sở để xác định được kiểu huyết thanh (serotype) phân biệt giữa các chủng IBV khác nhau (Abro *et al.*, 2012; Promkuntod *et al.*, 2014). Điều này cho thấy tiềm năng của việc phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng chống IBV dựa vào tiểu phần S, đặc biệt là vùng RBD. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã biểu hiện và tinh sạch thành công protein RBD-VAC<sub>plI</sub> từ lá thuốc lá *N. benthamiana* (Nguyen *et al.*, 2023). Trong nghiên cứu này, khả năng kích thích sinh miễn dịch của kháng nguyên RBD-VAC<sub>plI</sub> có nguồn gốc từ thực vật được đánh giá trên chuột nhắt trắng và gà Leghorn. Các kết quả nghiên cứu cho thấy kháng nguyên tái tổ hợp này đã kích thích sinh kháng thể đặc hiệu. Đặc biệt, nó còn giúp gà giảm thiểu và chống lại các triệu chứng do virus gây ra. Những kết quả này cho thấy tiềm năng của việc sử dụng kháng nguyên RBD-VAC<sub>plI</sub> có nguồn gốc từ thực vật trong việc phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng IBV.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Nguồn nguyên liệu thực vật: Lá thuốc lá đã biểu hiện thành công protein tái tổ hợp RBD-VAC<sub>plI</sub> do phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp (Nguyen *et al.*, 2023).

Nguồn nguyên liệu động vật: Chuột cái BALB/C 6 tuần tuổi được cung cấp bởi Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Trứng gà Leghorn trắng sạch bệnh được nhập khẩu từ Công ty VALO Biomedica (Đức), ấp nở và nuôi tại phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chủng IBHYM gây bệnh tại Hưng Yên, Việt Nam phân lập năm 2021 cung cấp bởi phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Roan *et al.*, 2023).

### Phương pháp nghiên cứu

#### **Phương pháp tinh sạch protein tái tổ hợp bằng sắc ký ái lực (Immobilized affinity chromatography, IMAC)**

Các protein đích tái tổ hợp sau khi được kiểm tra đã biểu hiện thành công trên cây thuốc lá thì tiến hành tinh sạch bằng sắc ký ái lực theo công bố của Nguyen và đồng tác giả (2023). Lá được nghiền thành bột mịn với nitơ lỏng, sau đó bổ sung đệm binding buffer ((50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 1% Triton X100, pH 8.0) với tỉ lệ 1:3 để tách chiết. Dịch chiết được làm sạch bằng các ly tâm 2 lần trong 60 phút, ở 4 °C với tốc độ 13.000 rpm. Dịch chiết sau đó được trộn với Ni-NTA agarose (Qiagen, Singapore) qua đêm ở 4°C. Đưa hỗn hợp lên cột (Disposable Gravity Flow Columns, Marvelgent Biosciences, USA) và rửa cột với đệm rửa (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 10 mM Imidazole, pH 8.0). Protein sau đó được hoà tan khỏi cột với đệm hòa tan (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 300 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 500 mM Imidazole, pH 8.0) và được đổi sang đệm PBS không chứa NaCl qua đêm ở 4°C. Sau đó, protein tái tổ hợp được cô bằng cột cô protein cutoff 10K (Thermo Fisher Scientific, USA), được xác định bằng Western Blot và bảo quản với glycerol 30% (Merk, Đức) ở nhiệt độ -30°C. Các protein sau khi tinh sạch bằng IMAC tiếp tục được tinh sạch bằng phương pháp sắc ký lọc gel (Size exclusion chromatography, SEC) bằng cột SuperoseTM 6 increase 10/300GL column (GE Healthcare, USA) theo công bố của Phan và đồng tác giả (2017).

#### **Phương pháp Western Blot**

Nồng độ của protein tái tổ hợp tinh sạch bằng IMAC và SEC được xác định bằng phương pháp lai miễn dịch Western Blot. Protein tái tổ hợp cùng đối chứng dương thương mại SARS-CoV2 S1 (Sino Biological, China) được điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide-SDS 12%, protein được chuyển qua màng bằng máy chuyển màng của Bio rad ở chế độ 25 V qua đêm. Màng chứa kháng nguyên được phủ bằng 5% sữa tách béo pha trong dung dịch PBS trong 2 giờ. Dùng kháng thể anti-His tag (Invitrogen, USA) với độ pha loãng 1.000 lần trong dung dịch sữa tách béo 5% phủ màng trong 2 giờ. Tiếp tục sử dụng kháng thể thứ cấp anti-mouse IgG có gắn Horseradish Peroxidase (HRP) (Invitrogen, USA) với độ pha loãng 400 lần trong sữa tách béo 5% phủ màng trong 2 giờ. Rửa màng bằng dung dịch PBS 3 lần, mỗi lần 10 phút. Hiện màu trong dung dịch hiện màu có chứa cơ chất Diaminobenzidine (DAB) (BioWorld, USA). Nồng độ protein tái tổ hợp sau khi được tinh sạch IMAC và SEC xác định được nồng độ bằng máy chụp AmershamTM Imager 680 và phần mềm ImageQuant TL 8.0 (Cytiva, USA).

#### **Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch trên chuột**

Các protein sau khi tinh sạch IMAC, PBS và vaccine thương mại (Jovac IB H120- Jordan Bio-industries center) được sử dụng để đánh giá tính sinh miễn dịch trên chuột. Kháng nguyên, PBS được trộn đều với tá được Emulsigen-D (MVP adjuvants, USA) bằng ống trộn theo tỉ lệ 4:1. Chuột cái trắng BALB/C 6 tuần tuổi được tiêm

dưới da háng ba lần, mỗi lần tiêm cách nhau 14 ngày, mỗi con được tiêm 5 ug protein, mỗi nhóm 6 con. Huyết thanh từ máu chuột được thu vào ngày thứ 7 sau lần tiêm thứ 2 và thứ 3 (Ho *et al.*, 2022)

**Phương pháp đánh giá đáp ứng kháng thể IgG ở chuột thí nghiệm bằng phản ứng ELISA**

Đáp ứng kháng thể IgG được sản sinh từ các con chuột sau khi gây đáp ứng miễn dịch được đánh giá bằng phản ứng ELISA theo quy trình như sau: Đĩa microtiter (Immunoplate Maxibinding, SPL, Hàn Quốc) được phủ với protein tái tổ hợp tinh sạch SEC trong đệm PBS với nồng độ 30 ng/well và ủ qua đêm ở 4°C. Sau đó rửa đĩa lại 10 lần với dung dịch rửa PBST. Đĩa được phủ trong dung dịch PBS chứa 5% sữa không béo trong 2 giờ, lắc đều trên máy lắc. Đĩa tiếp tục được rửa 5 lần với PBST. Tiếp đến, đĩa được ủ với huyết thanh của chuột trong 2 giờ. Rửa đĩa 10 lần với PBST sau khi hết thời gian ủ với huyết thanh. Đĩa được ủ với kháng thể anti-mouse IgG có gắn Horseradish Peroxidase (HRP) (Invitrogen, USA) với độ pha loãng 2000 lần trong 2 giờ. Màng được rửa lại bằng dung dịch PBST 10 lần. Tín hiệu được phát hiện bằng dung dịch có chứa cơ chất 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Thermo, USA) trong 20 phút. Sản phẩm phản ứng cho màu xanh, sau đó cố định màu bằng HCl 1M, màu vàng của phản ứng được đo ở bước sóng 450nm bằng máy Multiskan™ SkyHigh (Thermo Scientific, USA).

**Phương pháp gây đáp ứng miễn dịch và công cường độc trên gà**

Nhóm gà Leghorn trắng sạch bệnh được sử dụng để gây đáp ứng miễn dịch bằng cách tiêm dưới da cổ. Nhóm gà tiêm protein tái tổ hợp RBD-VAC-pII (7 con) mỗi con gà được tiêm với 200 µl chứa 5 µg protein tinh sạch IMAC và tá được Emulsigen-D ở lần 1 vào ngày thứ 7 và lần 2 vào ngày thứ 21 sau khi gà nở. Gà đối chứng âm (6 con) được tiêm với 200 µl chứa PBS và tá được Emulsigen-D. Nhóm đối chứng dương (7 con) được tiêm 200 µl vaccine thương mại H120 Jovac theo liều hướng dẫn của nhà sản xuất. Huyết thanh của gà được thu nhận sau 3 tuần tiêm mũi 2 để đánh giá sự có mặt của kháng thể IgY đặc hiệu với protein tái tổ hợp IBV. Sau khi tiêm mũi 2 được 24 ngày, tiến hành công cường độc trên gà. Chủng IBHYM được dùng để công cường độc với liều 0.2 ml 1000 EID<sub>50</sub> theo đường nhỏ mắt mũi. Huyết thanh được thu sau 7 và 14 ngày công cường độc để sử dụng tiến hành các thí nghiệm ELISA đánh giá đáp ứng miễn dịch IgY. Các bước thực hiện giống như phương pháp đánh giá đáp ứng kháng thể IgG ở chuột như đã nêu ở trên nhưng thay thế huyết thanh chuột bằng huyết thanh gà, kháng thể thứ cấp là anti-chicken IgY có gắn HRP (Invitrogen, USA) với độ pha loãng 1:5000.

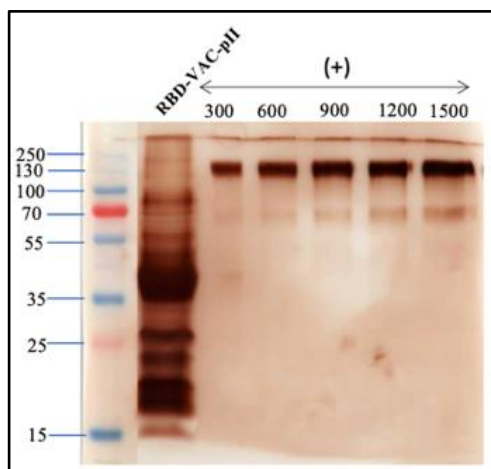
**Phương pháp xử lý thống kê**

Phân tích thống kê cho ELISA được tiến hành sử dụng phần mềm Excel và SPSS. Sự sai khác giữa giá trị trung bình được biểu diễn là X±SD. Giá trị p<0,05 được xác định là sai khác có ý nghĩa thống kê.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Tinh sạch protein VAC-RBD tái tổ hợp bằng phương pháp sắc kí ái lực (IMAC)**

Để phục vụ cho mục đích đánh giá khả năng gây đáp ứng miễn dịch của protein RBD-VAC-pII tái tổ hợp trên mô hình động vật thí nghiệm, lá thuốc lá sau biến nạp được tinh sạch bằng phương pháp sắc kí ái lực (IMAC), sau đó được tinh sạch bằng phương pháp sắc kí lọc gel (SEC) để sử dụng cho các phản ứng ELISA hay Western blot.



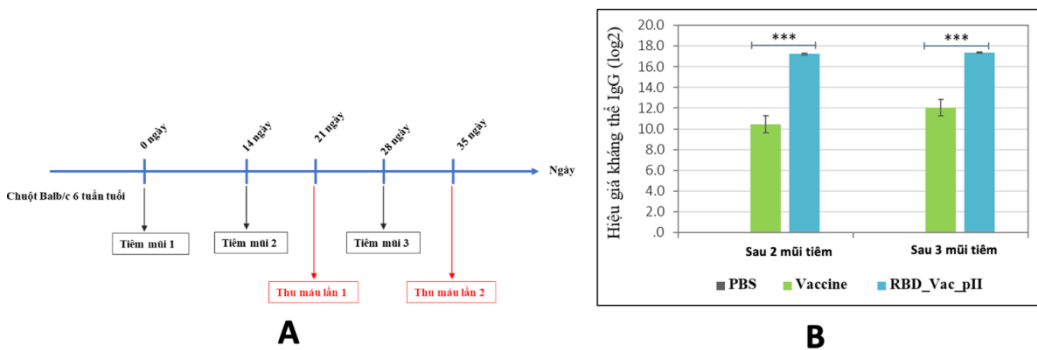
**Hình 1. Kết quả Western blot kiểm tra protein tái tổ hợp sau khi tinh sạch bằng IMAC**

Thang chuẩn protein được đặt của hãng Thermo Fisher Scientific (Cat.No. 26619). 40 µL dịch protein tái tổ hợp sau khi tinh sạch và cô bằng cột cô protein kích thước 10 kDa cut-off (Thermo Fisher Scientific, USA) được tra vào các giếng chỉ ra trên hình. Protein SARS-CoV2 S1 được sử dụng làm đối chứng dương với các nồng độ khác nhau được chú thích trên mỗi giếng (300, 600, 900, 1200 và 1500 ng/µL, Sino Biological, China).

Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng phương pháp IMAC theo công bố của Nguyen và đồng tác giả (2023) trước đó với sự thay đổi về khối lượng lá thuốc lá ban đầu là 220 g thay vì 110-140 g. Sau khi tiến hành thu được protein RBD-VAC-pII thì định lượng nồng độ bằng phần mềm ImageQuant TL 1D v8.2.0 với đối chứng dương là protein thương mại SARS-CoV2 S1 (Sino Biological, China). Kết quả ở Hình 1 cho thấy rằng, protein RBD-VAC-pII đã được tinh sạch thành công từ thực vật sử dụng phương pháp sắc ký ái lực (IMAC) đúng với kích thước tính toán lý thuyết của protein này (khoảng 40 kDa ở dạng monomer) và có một số băng vạch có kích thước lớn hơn do trạng thái trimer, glycosyl hóa với nồng độ là 932 ng/μl.

**Đánh giá tính sinh kháng thể đặc hiệu của kháng nguyên RBD-VAC-pII trên mô hình chuột thí nghiệm bằng phản ứng ELISA**

Để phục vụ cho việc đánh giá tính sinh miễn dịch của protein tái tổ hợp RBD-VAC-pII trên chuột, kháng nguyên RBD-VAC-pII tinh sạch bằng IMAC, PBS và vaccine thương mại được trộn với chất bổ trợ, sau đó được sử dụng theo sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột được thể hiện ở Hình 2A. Đáp ứng sản sinh kháng thể IgG đặc hiệu trong huyết thanh của các nhóm chuột sau tiêm được đánh giá bằng phản ứng ELISA. Kết quả ELISA ở Hình 2B cho thấy không phát hiện được kháng thể đặc hiệu trong huyết thanh của nhóm tiêm PBS. Trong khi đó, nhóm chuột tiêm protein tái tổ hợp có hiệu giá kháng thể lớn hơn đáng kể so với nhóm tiêm vaccine đối chứng về mặt thống kê. Sau cả 2 và 3 mũi tiêm, hiệu giá kháng thể IgG của nhóm RBD-VAC-pII đều xấp xỉ 17 log<sub>2</sub>, trong khi đó vaccine thương mại có hiệu giá sau 2 và 3 lần tiêm lần lượt là 10.44 và 12.04 (log<sub>2</sub>), chứng tỏ được rằng kháng nguyên tái tổ hợp RBD-VAC-pII đã kích thích sinh kháng thể IgG đặc hiệu trên mô hình chuột thí nghiệm.

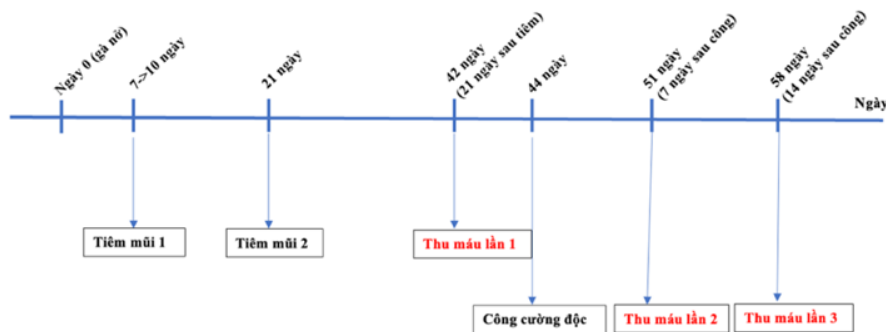


**Hình 2. Đánh giá đáp ứng sinh kháng thể IgG đặc hiệu trong huyết thanh chuột thí nghiệm bằng phản ứng ELISA**

(A). Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên chuột. (B). Hiệu giá kháng thể đặc hiệu IgG trong huyết thanh chuột sau khi tiêm. Huyết thanh thu từ chuột của 3 nhóm được đánh giá hàm lượng kháng thể đặc hiệu bằng phản ứng ELISA gián tiếp. Hiệu giá IgG của mỗi mẫu huyết thanh là hệ số pha loãng cao nhất cho giá trị OD<sub>450nm</sub> cao hơn giá trị cut-off. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ±SD cho mỗi nhóm chuột, \*\*\*: P<0.001.

**Đánh giá tính sinh miễn dịch và khả năng bảo hộ của kháng nguyên RBD-VAC-pII tái tổ hợp trên mô hình gà thí nghiệm**

Theo kết quả đánh giá trên mô hình chuột thí nghiệm đã cho thấy kháng nguyên RBD-VAC-pII tái tổ hợp có khả năng kích thích sinh hàm lượng kháng thể cao ở chuột. Đây là loại protein tái tổ hợp có nguồn gốc từ chủng vaccine thương mại, là tiểu phần RBD đầu tiên của IBV được biểu hiện thành công trong cây thuốc lá, chứng minh tính khả thi của mô hình thiết kế (Nguyen *et al.*, 2023). Do đó, chúng tôi quyết định tiếp tục sử dụng kháng nguyên này để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo trên gà. Để đánh giá được khả năng gây đáp ứng miễn dịch cũng như khả năng bảo hộ gà của protein tái tổ hợp, các nhóm gà thí nghiệm được bố trí như Hình 3. Sau khi tiêm protein tái tổ hợp hoặc vaccine thương mại, gà phát triển khỏe mạnh, không có sự khác biệt giữa các nhóm thí nghiệm. Huyết thanh được thu ở thời điểm 21 ngày sau khi tiêm vaccine, 7 ngày và 14 ngày sau công cường độc.



**Hình 3. Sơ đồ gây đáp ứng miễn dịch trên mô hình gà thí nghiệm**

## CÔNG NGHỆ GEN

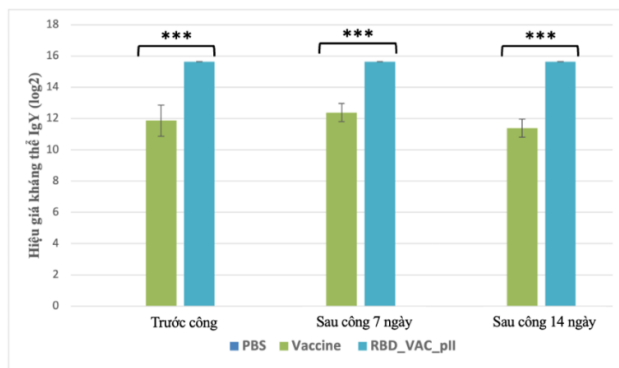
Quan sát thể trạng và các triệu chứng của gà trong khi tiến hành thí nghiệm chúng tôi có một số kết quả triệu chứng lâm sàng của gà ở ngày thứ 7 sau công cường độc như Bảng 1 dưới đây:

**Bảng 1. Triệu chứng lâm sàng của gà thí nghiệm ở ngày thứ y sau công cường độc**

STT	Nhóm	Triệu chứng			Điểm thể trạng
		Chảy nước mũi, hắt hơi, thờ khò khè	Mệt mỏi, ủ rũ, run lạnh	Chậm lớn	
1	Nhóm tiêm PBS	++++	+++	+	1
2	Nhóm tiêm RBD_VAC_pII	+	-	-	2
3	Nhóm tiêm vaccine thương mại	+	-	-	2

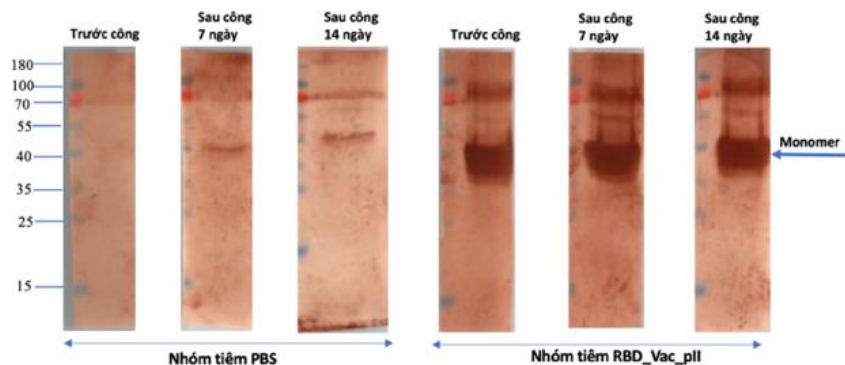
-. Không có dấu hiệu; +: Có dấu hiệu (số lượng dấu cộng thể hiện mức độ tăng dần của triệu chứng).

Gà thuộc nhóm tiêm PBS biểu hiện các triệu chứng điển hình của bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (chảy nước mũi, hay hắt hơi, thờ khò khè, gà ủ rũ, đứng co cụm, chậm lớn). Những triệu chứng này rất rõ ràng trong vòng 1-10 ngày đầu, sau đó có xu hướng giảm nhưng vẫn kéo dài tới ngày 14 của thí nghiệm. Ngược lại, gà thuộc nhóm tiêm protein tái tổ hợp RBD-VAC-pII và nhóm tiêm vaccine thương mại chỉ có những biểu hiện nhẹ; những biểu hiện này biến mất dần trong khoảng thời gian 7-10 ngày sau công cường độc. Như vậy, có thể khẳng định được rằng, tương tự như tiêm vaccine thương mại, việc tiêm protein tái tổ hợp này có thể giúp gà giảm các triệu chứng, hoặc tránh được các tác động không mong muốn khi bị nhiễm IBV. Song song với việc quan sát thể trạng và biểu hiện bệnh của các nhóm gà thí nghiệm, chúng tôi đánh giá khả năng sản sinh kháng thể đặc hiệu IgY đặc hiệu bằng phản ứng ELISA và Western blot. Kết quả ở Hình 4 cho thấy hiệu giá kháng thể IgY trong huyết thanh gà nhóm PBS rất thấp, gần như không được phát hiện và thấp hơn nhiều so với hai nhóm còn lại. Trong khi đó, nhóm gà tiêm protein tái tổ hợp có hiệu giá kháng thể lớn hơn đáng kể so với nhóm tiêm vaccine đối chứng về mặt thống kê. Hiệu giá của nhóm tiêm kháng nguyên tái tổ hợp ổn định ở cả ba thời điểm trước công, sau công 7, 14 ngày với giá trị xấp xỉ 15. Trong khi đó, nhóm tiêm vaccine có hiệu giá là 11.8 trước khi công, tăng nhẹ lên 12.3 sau khi công cường độc được 7 ngày và giảm xuống còn 11.3 log<sub>2</sub> sau khi công cường độc 14 ngày.



**Hình 4. Hiệu giá kháng thể đặc hiệu IgY ở gà trước và sau khi công cường độc**

Huyết thanh thu từ gà của 3 nhóm được đánh giá hàm lượng kháng thể đặc hiệu bằng phản ứng ELISA gián tiếp. Hiệu giá IgY của mỗi mẫu huyết thanh là hệ số pha loãng cao nhất cho giá trị OD<sub>450nm</sub> cao hơn giá trị cut-off. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ±SD cho mỗi nhóm gà, \*\*\*: P<0.001.



**Hình 5. Đánh giá đáp ứng sinh kháng thể IgY đặc hiệu trong huyết thanh gà thí nghiệm bằng Western blot**

Song song với phản ứng ELISA, chúng tôi cũng tiến hành thí nghiệm Western blot để đánh giá khả năng sinh kháng thể đặc hiệu IgY ở các nhóm gà thí nghiệm. Đúng như dự đoán và phù hợp với kết quả của phản ứng ELISA như đã trình bày ở trên, Hình 5 thể hiện nhóm được tiêm protein tái tổ hợp sản sinh kháng thể rất mạnh mẽ tại cả ba thời điểm thu mẫu huyết thanh (nhất là sau công cường độc 7 ngày). Ở nhóm được tiêm PBS trước khi công hầu như không quan sát thấy sự xuất hiện của tín hiệu, sau công 7 và 14 ngày thì có xuất hiện tín hiệu nhưng không đáng kể so với nhóm tiêm protein tái tổ hợp. Kết quả này cho thấy rằng, protein tái tổ hợp RBD-VAC-p11 có khả năng kích thích sinh kháng thể đặc hiệu rất mạnh. Điều này có thể được lí giải bởi vùng biểu hiện có chứa epitope quan trọng có tính kháng nguyên mạnh của IBV là RBD (receptor binding domain). Nó cũng đã được chứng minh ở nghiên cứu trước đây của Promkuntod và đồng tác giả (2014). Ngoài ra, việc biểu hiện trên hệ thống thực vật có một số ưu điểm như khả năng cải biến protein sau dịch mã, độ an toàn cao và có thể dễ dàng nhân rộng, nhanh mô hình để đáp ứng được dịch bệnh (Gidding *et al.*, 2001). Do đó, đây là một kháng nguyên tiềm năng cho sản xuất vaccine tái tổ hợp có nguồn gốc từ thực vật để phòng chống IBV.

## KẾT LUẬN

Đã tinh sạch thành công protein tái tổ hợp RBD-VAC-p11 bằng phương pháp IMAC và SEC với hàm lượng là 932 ng/μl từ 220 g lá sau biến nạp. Đặc biệt, đã đánh giá được khả năng sản sinh kháng thể của protein tái tổ hợp tinh sạch bằng IMAC trên mô hình chuột và gà thí nghiệm, với hiệu giá kháng thể IgG, IgY lần lượt xấp xỉ 17 và 15 (log<sub>2</sub>). Cùng với đó chứng minh được khả năng chống chịu tốt của gà tiêm RBD-VAC-p11 trước thử thách công cường độc của chủng virus IBHYM là tương đương với vaccine thương mại (Jovac IB H120). Những kết quả mở rộng khả năng sản xuất protein đích dựa trên hệ thống biểu hiện tạm thời ở thực vật, đồng thời chứng tỏ kháng nguyên RBD-VAC-p11 có nguồn gốc từ lá thuồng lá có thể là một ứng viên tiềm năng để phát triển vaccine tiểu đơn vị phòng IBV tại Việt Nam.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu đánh giá đặc tính sinh học của protein Spike tái tổ hợp từ thực vật của virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm ở gà (*Avian Infectious virus-IBV*)”, cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số đề tài: VAST02.03/21-22. Nghiên cứu có sự dụng thiết bị Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen, Phòng Công nghệ Tế bào Thực vật và sự hỗ trợ của phòng Miễn dịch học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abro SH, Renström LHM, Ullman K, Belák S, Baule C (2012). Characterisation and analysis of the full-length genome of a strain of the European QX-like genotype of infectious bronchitis virus. *Arch Virol*, 157: 1211-1215.
- Bande F, Arshad SS, Hair Bejo M, Moeini H, Omar AR (2015). Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. *J Immunol Res*, 2015:424860.
- Cavanagh D (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*, 38: 281-297.
- Cook JKA, Jackwood M, Jones RC (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology*, 4(3): 239-250.
- Do TR, Nguyen TK, Luu MD, Nguyen TTH, Le TH, Le TH, Le TKX, Doan TH (2023). Whole genome sequencing analysis of Avian Infectious bronchitis virus isolated in Hung Yen province in 2021. *Vietnam J Biotechnol*. 21(4): 645-654.
- Giddings G, Allison G, Brokks D, Carter A (2001). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol*, 18: 1151-1155.
- Ho TT, Trinh VT, Tran HX, Le PTT, Nguyen TT *et al* (2022). The immunogenicity of plant-based COE-GCN4p11 protein in pigs against the highly virulent porcine epidemic diarrhea virus strain from genotype 2. *Front Vet Sci*, 9: 940395.
- Jackwood MW (1999). Current and future recombinant viral vaccines for poultry. *Advances in Veterinary Medicine*, 41: 517-522.
- Li L, Kang H, Liu P, Makinje N, Williamson ST, Leibowitz JL, Giedroc DP (2008). Structural lability in stem-loop 1 drives a 5' UTR-3' UTR interaction in coronavirus replication. *J of Mol Bio*. 377: 790-803.
- Nguyen TT, Ngo HD, Trinh TV, Le TTM, Nguyen TTH, Pham TV, Doan TTH, Pham BN, Chu HH, Hoang TTH (2023). Study on the transient expression of infectious bronchitis virus spike protein in *Nicotiana Benthamiana* leaves. *Vietnam J Biotechnol*. 21(3): 1-11.
- Phan HT, Ho TT, Chu HH, Vu TH, Gresch U, Conrad U (2017). Neutralizing immune responses induced by oligomeric H5N1-hemagglutinins from plants. *Vet Res*. 48:53.
- Promkuntod N, van Eijndhoven REW, de Vrieze G, Gröne A, Verheije MH (2014). Mapping of the receptor binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology*, 448:26-32.

## INVESTIGATING THE IMMUNOGENICITY OF THE RECOMBINANT AVIAN IBV RECEPTOR-BINDING DOMAIN

Nguyen Thi Tra<sup>1</sup>, Le Thi Tra My<sup>1</sup>, Chu Thanh Tam<sup>1</sup>, Trinh Thai Vy<sup>1</sup>,  
Ngo Hong Duong<sup>1</sup>, Nguyen Thi Thu Hien<sup>1</sup>, Le Thi Kim Xuyen<sup>1</sup>,  
Doan Thi Thanh Huong<sup>1</sup>, Hoang Thi Thu Hang<sup>1,2\*</sup> Pham Bich Ngoc<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology*

### ABSTRACT

Infectious Bronchitis (IB) is an acute disease affecting chickens caused by the avian infectious bronchitis virus (IBV). Currently, infectious bronchitis is a concern in highly developed chicken-raising countries in Asia, including Vietnam. Vaccination is considered the most effective measure to control IB outbreaks. However, the current IBV vaccines available in Vietnam are mostly imported vaccines from China, Korea, and India, in the form of monovalent or New Castle-combined bivalent vaccines. These imported IBV vaccine strains led to low or no protection against new IBV strains. In our previous research, RBD-VAC fused with GCN4pII motif was successfully expressed in *Nicotiana benthamiana*. In this study, the immunogenicity of RBD-VAC-pII was evaluated in mice and experimental chickens challenged with the IBHYM strain. Sera from mice and chickens were collected for the evaluation of RBD-VAC-pII-specific IgG and IgY antibody responses by ELISA and Western blot. The results showed that the recombinant RBD-VAC-pII protein stimulated the production of specific antibodies in experimental animals, prevented and minimized symptoms in chickens against virus challenge. These results demonstrate the potential of using the RBD-VAC-pII plant-derived recombinant protein in the development of subunit vaccines against IBV.

*Keywords:* Antibody titer, IBV, immunogenicity, plant-derived vaccines, receptor-binding domain.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0975394838; Email: thuhanghoang2010@gmail.com. Tel: 0912247887; Email: pbngoc@ibt.ac.vn