

TẠO KHÁNG HUYẾT THANH ĐA DÒNG BẰNG PROTEIN VỎ TÁI TỔ HỢP CỦA *Passiflora mottle virus* NHIỄM TRÊN CÂY CHANH LEO TẠI VIỆT NAM

Hà Viết Cường*, Lê Thị Tuyết, Trần Nguyễn Hà, Nguyễn Đức Huy, Đỗ Tấn Dũng

Khoa Nông học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Tác giả liên hệ: hvcuongnh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 28.09.2020

Ngày chấp nhận đăng: 16.12.2020

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là tạo được kháng huyết thanh đa dòng thử chẩn đoán *Passiflora mottle virus* (PaMoV), một potyvirus mới (chi *Potyvirus*, họ *Potyviridae*) hại chanh leo, được phát hiện và đặt tên đầu tiên tại Việt Nam. Toàn bộ gen mã hóa protein vỏ (coat protein, CP) của PaMoV đã được dòng hóa trên vector pET28a và được đánh giá biểu hiện trong chủng vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) Rosetta (DE3). Protein CP tái tổ hợp của PaMoV ở điều kiện biến tính đã được gây miễn dịch trên thỏ. Hiệu giá và tính đặc hiệu của kháng huyết thanh (KHT) thỏ đã được đánh giá bằng các thử nghiệm chấm thấm miễn dịch (Dot-ImmunoBinding Assay, DIBA) và miễn dịch liên kết enzyme kiểu bẫy kháng nguyên trước (Plate Trapped Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assay, PTA-ELISA). Kết quả các thí nghiệm cho thấy: (i) Rosetta (DE3) là chủng ký chủ thích hợp để biểu hiện protein CP của PaMoV, (ii) KHT thỏ không phản ứng với dịch cây chanh leo khỏe và phát hiện PaMoV dễ dàng trong mẫu lá chanh leo bằng thử nghiệm DIBA và PTA-ELISA và (iv) KHT cũng phản ứng với *Telosma mosaic virus* (TelMV) và *East Asian passiflora virus-IB* (EAPV-IB), hai potyvirus đang nhiễm trên chanh leo tại Việt Nam.

Từ khóa: *Passiflora mottle virus*, potyvirus, DIBA, ELISA, passion fruit, Vietnam

Production of Polyclonal Antiserum using Recombinant Coat Protein of *Passiflora mottle virus* Infecting Passion Fruit in Vietnam

ABSTRACT

The major aim of this work was to produce polyclonal antibodies for diagnosis of *Passiflora mottle virus* (PaMoV), a putative novel potyvirus (the genus *Potyvirus*, the family *Potyviridae*), which was first discovered from passion fruit (*Passiflora edulis*) and named in Vietnam. The entire gene encoding coat protein (CP) of PaMoV was cloned on pET28a vector and the expression of this protein was evaluated in the *Escherichia coli* (*E. coli*) strain Rosetta (DE3). The denatured recombinant PaMoV CP protein was used as an antigen for rabbit injection. The titer and specificity of the rabbit antiserum were evaluated by Dot-ImmunoBinding Assay (DIBA) and Plate Trapped Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA). The experimental results showed: (i) Rosetta (DE3) was a suitable host strain for expression of the PaMoV CP protein, (ii) the PaMoV CP antiserum did not react with healthy passion fruit sap and detected easily cognate in passion fruit leaves, and (iii) the antiserum also reacted with two potyviruses, *Telosma mosaic virus* (TelMV) and *East Asian passiflora virus strain IB* (EAPV-IB), both are infecting passion fruit in Vietnam.

Keywords: *Passiflora mottle virus*, potyvirus, DIBA, ELISA, passion fruit, Vietnam.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây chanh leo (*Passiflora edulis*) hiện là cây ăn quả quan trọng tại Việt Nam. Tuy nhiên, cây chanh leo đang bị nhiễm một số bệnh nguy hiểm, trong đó có bệnh do virus. Các nghiên cứu gần đây tại Bộ môn Bệnh cây và

Trung tâm nghiên cứu Bệnh cây Nhiệt đới (Học viện Nông nghiệp Việt Nam (VNUA)), dựa trên giải trình tự gen các mẫu virus chanh leo thu thập tại Nghệ An, Lâm Đồng, Ninh Bình, đã xác định được một potyvirus hoàn toàn mới và virus được đặt tên là *Passiflora mottle virus* (PaMoV). Tên virus do nhóm nghiên cứu của

Học viện đặt và trình tự gen của 4 mẫu virus thu thập tại Nghệ An và Lâm Đồng đã được gửi tại Ngân hàng gen (GenBank) với Mã truy cập MG087833, MG087834, MG087835 và MG087836 (ngày 13/8/2018).

PaMoV gây triệu chứng khảm lá, đốm biến vàng lá, cây còi cọc và đặc biệt làm quả biến dạng và hóa gỗ dẫn tới năng suất và chất lượng quả bị suy giảm nghiêm trọng. PaMoV thuộc chi *Potyvirus*, họ *Potyviridae*. Các potyvirus là các virus có bộ gen RNA sợi đơn, cực dương, lan truyền ngoài tự nhiên qua vector rệp muội (họ Aphididae) theo kiểu không bền vững và qua nhân giống vô tính (Wylie & cs., 2017). Đối với các bệnh virus, một trong các chiến lược phòng trừ quan trọng là phòng chống vector. Tuy nhiên chiến lược này không hiệu quả đối với các virus truyền theo kiểu không bền vững như potyvirus (Gadhav & cs., 2020). Chính vì vậy, sử dụng giống sạch bệnh và loại bỏ cây bệnh có thể xem là biện pháp quan trọng nhất hiện nay nhằm quản lý bệnh do potyvirus trên chanh leo tại Việt Nam. Để đáp ứng được yêu cầu này, hiển nhiên, chẩn đoán nhanh và chính xác virus là cần thiết.

Đối với virus thực vật, các kỹ thuật chẩn đoán dựa trên kháng thể như ELISA, DIBA và que thử nhanh hiện vẫn được sử dụng phổ biến do có nhiều ưu điểm như thao tác đơn giản, không đòi hỏi trang thiết bị và có thể được thực hiện với số lượng mẫu thử lớn (Sastry, 2013; Abd El-Aziz, 2019). Hiện nay, các kỹ thuật chẩn đoán PaMoV dựa trên kháng thể chưa được nghiên cứu và kháng thể đặc hiệu virus này không sẵn có trên thị trường. Chính vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là tạo ra được kháng thể có thể chẩn đoán được PaMoV trên cây chanh leo.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu chính

Mẫu chanh leo nhiễm virus và khỏe được bảo quản khô trong silicagel tự chỉ thị hoặc được trồng trong nhà lưới Trung tâm Nghiên cứu Bệnh cây nhiệt đới (VNUA).

Môi trường nuôi cấy: LB (tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l), TB (tryptone

12 g/l, yeast extract 24 g/l, glycerol 4 ml/l, KH_2PO_4 17mM, K_2HPO_4 72mM), 2xTY (tryptone 16 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 5 g/l)

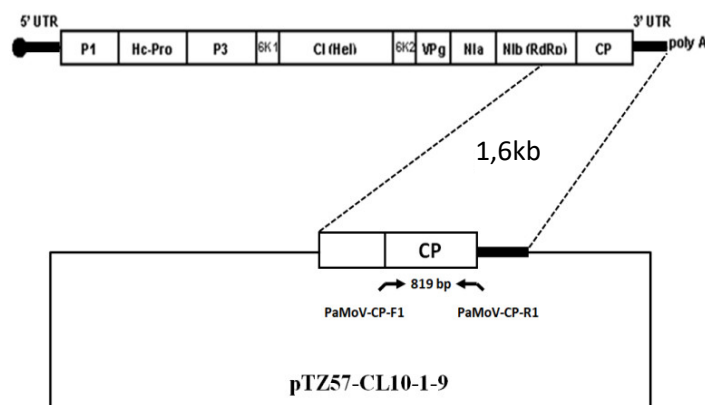
Plasmid pTZ57-CL10-1-9 mang 1 đoạn ~ 1,6kb đầu 3' của bộ gen PaMoV được xây dựng từ trước. Đoạn này chứa toàn bộ gen mã hóa protein vỏ của PaMoV (819bp) (Hình 1).

2.2. Xây dựng cấu trúc biểu hiện gen CP của PaMV trên vector pET28a

Toàn bộ gen mã hóa protein CP của PaMoV được nhân bằng PCR với kit 2X PCR Master mix Solution (i-pfu) (iNtRON Biotechnology) dùng cặp mồi PaMoV-CP-F1/PaMoV-CP-R1 (Bảng 1) và khuôn DNA là dòng plasmid pTZ57-CL10-1-9 (Hình 1). Sản phẩm PCR được ghép nối với vector pET28a (Novagen) tại vị trí BamHI/EcoRI và được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng Rosetta (DE3) (Novagen) bằng phương pháp sốc nhiệt. Các dòng vi khuẩn tái tổ hợp được chọn lọc trên môi trường LB agar chứa kháng sinh chloramphenicol (34 $\mu\text{g/ml}$) và kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) và được kiểm tra bằng PCR khuôn lạc dùng mồi T7-pro/T7-ter (đặc hiệu vector) và PaMV-CP-F1/PaMV-CP-R1 (đặc hiệu gen CP) (Bảng 1). Phản ứng PCR được thực hiện với 2X PCR Master mix Solution (i-Taq) (iNtRON Biotechnology).

2.3. Biểu hiện gen CP của PaMoV trong vi khuẩn *E. coli* chủng Rosetta (DE3)

Các thí nghiệm biểu hiện gen CP của PaMoV được thực hiện trong ống nghiệm thủy tinh (20 × 2cm) chứa 5ml môi trường LB bổ sung chloramphenicol (34 $\mu\text{g/ml}$) và kanamycin (50 $\mu\text{g/ml}$) ở điều kiện lắc 250 vòng/phút. Cảm ứng biểu hiện bằng bổ sung Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) được bắt đầu khi OD_{600} của dịch vi khuẩn đạt 0,6. Nhiệt độ nuôi cấy và cảm ứng, thời gian nuôi cấy và cảm ứng, nồng độ IPTG được thay đổi theo thí nghiệm. Khả năng biểu hiện protein của vi khuẩn được phân tích bằng điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 13%. Để đảm bảo đánh giá chính xác, trước khi phân tích SDS-PAGE, lượng tế bào vi khuẩn ở các công thức thí nghiệm được điều chỉnh về cùng mức tương đương nhau bằng đo OD_{600} .



Hình 1. Cấu trúc plasmid pTZ57-CL10-1-9 mang toàn bộ gen mã hóa protein CP của PaMoV và vị trí cặp mỗi để nhân toàn bộ gen này

Bảng 1. Môi sử dụng trong nghiên cứu

Môi	Trình tự (5'-3')	Mục đích
PaMoV-CP-F1	AGAGGATCCATGTCAGGCAAAGTCGAAAAG	Nhân toàn bộ gen CP, kích thước: 819bp
PaMoV-CP-R1	TCTGAATTC TTA CTG CACGGGGCCAA	
T7-Pro	TAATACGACTCACTATAGGG	Kiểm tra sản phẩm nối trên vector pET28a
T7-Ter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

2.4. Tinh chiết protein CP tái tổ hợp

Dòng vi khuẩn mang cấu trúc biểu hiện CP của PaMoV được nuôi trong 50ml môi trường LB chứa chloramphenicol (34 µg/ml) và kanamycin (50 µg/ml) ở 37°C, lắc 250 vòng/phút tới OD₆₀₀ ~ 0,6. Tiếp theo, dịch vi khuẩn được bổ sung IPTG tới 1mM và nuôi cảm ứng biểu hiện ở 250 vòng/phút, 30°C qua đêm. Qui trình xử lý tế bào vi khuẩn, tinh chiết protein bằng sắc kí ái lực Ni-NTA-Agarose ở điều kiện biến tính bằng 8M urea được thực hiện theo QIAgenes *E. coli* Handbook (2009). Protein tinh chiết được phân tích bằng điện di SDS-PAGE và định lượng theo phương pháp được mô tả bởi Grintzalis & cs. (2015).

2.5. Gây miễn dịch trên thỏ

Protein CP tái tổ hợp được kết tủa bằng ethanol (Zellner & cs., 2005) và được hòa trong NaCl 0,9% chứa 2M urea ở nồng độ 1 mg/ml. Thỏ trắng New Zealand (3 tháng tuổi) được gây miễn dịch bằng cách tiêm hỗn hợp 0,25ml dịch protein + 0,25ml tá chất hỗ trợ miễn dịch (Freund's complete adjuvant) vào bắp đùi sau của thỏ. Quá trình tiêm được thực hiện liên tục 5 lần, mỗi lần

trên 1 đùi và cách nhau 1 tuần. Ở 4 lần tiêm sau, tá chất hỗ trợ miễn dịch được thay bằng Freund's incomplete adjuvant. Ở 1 tuần sau lần tiêm thứ 4 và thứ 5, khoảng 0,5ml máu thỏ được lấy từ ven tai và ly tâm 10.000g trong 15 phút để lấy KHT nhằm kiểm tra sự có mặt của kháng thể virus PaMoV bằng ELISA và DIBA.

2.6. DIBA

Mô lá được nghiền với đệm Carbonate (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35mM, pH 9,6) theo tỉ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được nhỏ lên màng nitrocellulose (lỗ màng 0,45µm, Sigma) với lượng 1 µl/dot. Màng được khóa với skim milk 5% được chuẩn bị trong đệm TBS (Tris 150mM, NaCl 150mM, pH 7,5) trong một 1 giờ ở 37°C. Màng được rửa 3 lần với đệm TBS-T (TBS chứa Tween20 0,05%). Màng được ủ 1 giờ ở 37°C với KHT (được hòa trong đệm kháng thể (TBS-T chứa Polyvinylpyrrolidone 2% và skim milk 3%) và được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Màng được ủ 1 giờ ở 37°C với kháng thể đơn dòng chuột liên kết Alkaline Phosphatase (AP) đặc hiệu kháng thể thỏ (A2556, Sigma) được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/35.000. Màng

được rửa 3 lần với đệm TBS-T. Phản ứng được phát hiện bằng cơ chất 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT) (S3841, Promega).

2.7. PTA-ELISA

Mô lá được nghiền với đệm Carbonate theo tỉ lệ 1:10 (khối lượng/thể tích). Dịch cây được nhỏ vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ qua đêm ở 4°C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T (Na_2HPO_4 8mM, NaCl 150mM, KH_2PO_4 2mM, KCl 3mM, Tween 20 0,05%, pH 7,4). KHT được hòa trong đệm kháng thể (đệm PBS-T chứa PVP 2%, ovalbumin 0,2%) và được nhỏ vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37°C và được rửa 3 lần với đệm PBS-T. Kháng thể đơn dòng chuột liên kết AP đặc hiệu kháng thể thỏ (A2556, Sigma) được hòa trong đệm kháng thể theo tỉ lệ 1/5.000 và được cho vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 4 giờ ở 37°C và được rửa 5 lần với đệm PBS-T. Dịch cơ chất p-nitrophenyl phosphate (SIGMAFAST, Sigma) được cố định vào giếng với lượng 100 μ l/giếng. Bản ELISA được ủ 1 giờ ở 25°C trong tối. Phản ứng được đo bằng máy đọc ELISA ở bước sóng 405nm.

2.8. Phân tích thống kê

So sánh giá trị OD của KHT không hấp thụ

chéo với KHT có hấp thụ chéo nhằm đánh giá tính đặc hiệu của KHT PaMoV được thực hiện bằng kiểm định t-test trên phần mềm SPSS 2.0.

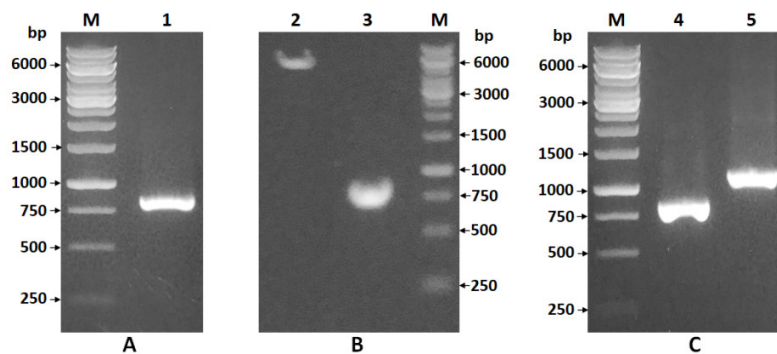
3. KẾT QUẢ

3.1. Tạo kháng nguyên tái tổ hợp dựa trên gen mã hóa CP của PaMoV

3.1.1. Xây dựng cấu trúc biểu hiện gen CP của PaMoV trên vector pET28a

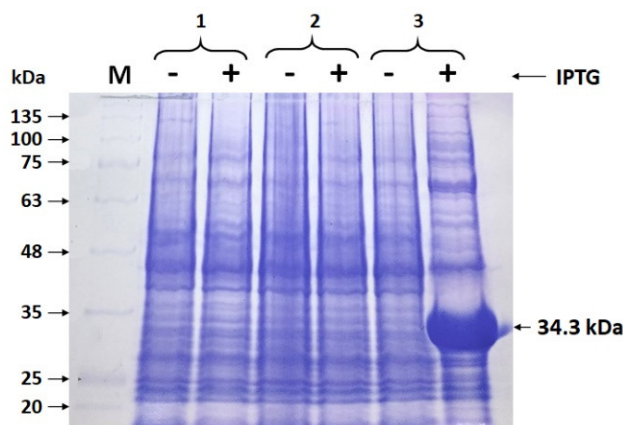
Để phân lập gen mã hóa CP, phản ứng PCR được thực hiện với khuôn là plasmid pTZ-CL10-1-9 chứa toàn bộ gen CP của PaMoV tạo ra từ trước và cặp mồi PaMoV-CP-F1/PaMoV-CP-R1 (Hình 1). Để đảm bảo chống lỗi do PCR, *Pfu* DNA polymerase đã được sử dụng thay vì *Taq* DNA polymerase. Phản ứng PCR đã tạo ra sản phẩm có kích thước mong muốn ~ 0,8kb khi điện di trên gel agarose (Hình 2A).

Sản phẩm PCR được nối với vector pET28a (Hình 2B) và được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* chủng Rosetta (DE3). Kiểm tra PCR các khuẩn lạc với 2 cặp mồi là PaMoV-CP-F1/R1 (đặc hiệu gen CP) và mồi vector T7-pro/T7-ter (đặc hiệu vector) đã xác định 1 dòng vi khuẩn Rosetta (DE3), ký hiệu là pET-PaMoV-CP-1, tạo sản phẩm có kích thước mong muốn với cả 2 cặp mồi (Hình 2C).



Ghi chú: (A): PCR nhân toàn bộ gen mã hóa CP của PaMoV (giếng 1); (B): Điện di kiểm tra hàm lượng pET28a (giếng 2) và gen CP của PaMoV (giếng 3) sau khi được cắt kép bằng *Bam*HI/*Eco*RI và tinh sạch; (C): PCR khuẩn lạc kiểm tra dòng vi khuẩn Rosetta (DE3) pET-PaMoV-CP-1 bằng 2 cặp mồi đặc hiệu đoạn chèn (PaMoV-CP-F1/PaMoV-CP-R1, giếng 4) và đặc hiệu vector (T7-pro/T7-ter, giếng 5). M là thang DNA 1kb (GeneRuler 1kb DNA ladder, Thermo Scientific) với các băng tham khảo được chỉ bằng mũi tên.

Hình 2. PCR và điện di agarose các sản phẩm trong quá trình xây dựng cấu trúc biểu hiện gen CP của PaMoV



Ghi chú: M là thang protein (GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder, iNtRON BIO). Dấu (+) và (-) là có và không bổ sung IPTG. Các cặp giếng: 1) Rosetta (DE3), 2) Rosetta (DE3) mang vector pET28a, 3) Rosetta (DE3) mang cấu trúc pET-PaMoV-CP-1. Băng sản phẩm protein tái tổ hợp mong muốn 34,3kDa được chỉ bằng mũi tên.

Hình 3. SDS-PAGE kiểm tra biểu hiện protein CP (PaMoV) của cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3) ở điều kiện chuẩn

Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ IPTG, nhiệt độ cảm ứng và môi trường tới mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng Rosetta (DE3)

Yếu tố ảnh hưởng	Công thức	Nồng độ IPTG (mM)	Môi trường	Nhiệt độ cảm ứng (°C)	Mức độ biểu hiện protein
Nồng độ IPTG	CT1 (đối chứng)	0	LB	37	-
	CT2	0,1	LB	37	+++
	CT3	0,5	LB	37	+++
	CT4	1,0	LB	37	+++
Nhiệt độ cảm ứng	CT5	1,0	LB	37	+++
	CT6	1,0	LB	30	++
	CT7	1,0	LB	25	+
Môi trường nuôi cấy	CT8	1,0	LB	37	+++
	CT9	1,0	2TY	37	+++
	CT10	1,0	TB	37	+++

Ghi chú: * Dựa trên độ đậm của băng protein biểu hiện trong phân tích SDS-PAGE (Hình 6); mỗi công thức lặp lại 3 lần.

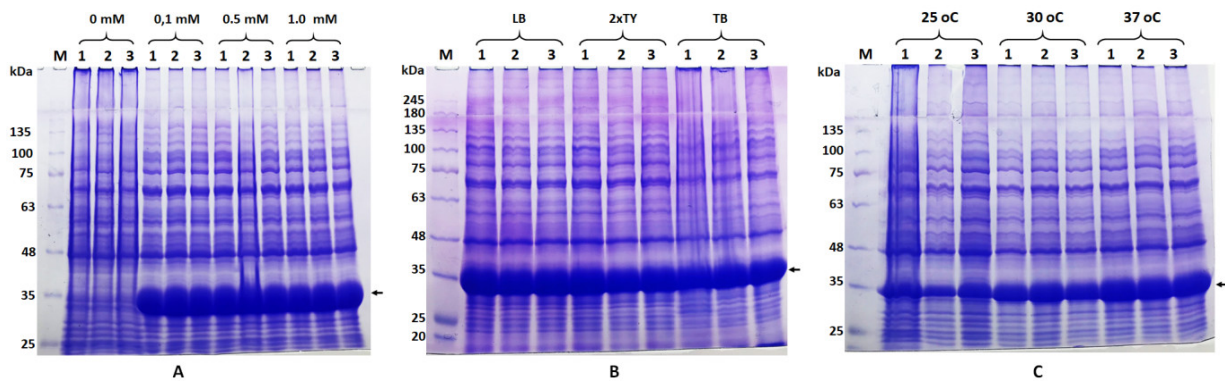
3.1.2. Đánh giá biểu hiện gen CP của cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 trong chủng Rosetta (DE3)

Ba dòng vi khuẩn Rosetta (DE3) mang cấu trúc pET-PaMoV-CP-1, pET28a, và không mang cấu trúc đã được thí nghiệm biểu hiện trong điều kiện được và không được cảm ứng với IPTG.

Kết quả kiểm tra SDS-PAGE (Hình 3) cho thấy chỉ dòng vi khuẩn Rosetta (DE3) mang cấu

trúc pET-PaMoV-CP-1 được cảm ứng với IPTG mới tạo 1 băng protein rõ rệt với kích thước mong muốn = 34,3kDa gồm 3,6kDa của protein dung hợp đầu N sẵn trên vector và 30,7kDa của CP. Trái lại 5 đối chứng còn lại gồm Rosetta (DE3) mang cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 (không bổ sung IPTG), Rosetta (DE3) mang vector pET28a (có và không bổ sung IPTG) và Rosetta (DE3) (có và không bổ sung IPTG) đều không tạo sản phẩm protein có kích thước tương tự.

Tạo kháng huyết thanh đa dòng bằng protein vỏ tái tổ hợp của *Passiflora mottle virus* nhiễm trên cây chanh leo tại Việt Nam



Ghi chú: Điều kiện thí nghiệm được trình bày ở bảng 2. M là thang protein (GangNam-STAIN™ Prestained Protein Ladder, iNtRON BIO). Băng sản phẩm protein tái tổ hợp mong muốn 34,3kDa được chỉ bằng mũi tên. Các số 1, 2, 3 trên các giếng là lần lặp.

Hình 4. SDS-PAGE đánh giá ảnh hưởng của nồng độ IPTG (A), môi trường (B) và nhiệt độ cảm ứng (C) tới mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng Rosetta (DE3)

3.1.3. Đánh giá ảnh hưởng của IPTG, nhiệt độ cảm ứng và môi trường tới mức độ biểu hiện protein CP của cấu trúc pET-PaMoV-CP-1 trong chủng Rosetta (DE3)

Ba yếu tố chủ chốt ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3) gồm nồng độ IPTG, nhiệt độ cảm ứng và môi trường nuôi cấy đã được đánh giá.

Phân tích SDS-PAGE (Bảng 2, Hình 4A, 4B) cho thấy khả năng biểu hiện protein CP của PaMoV tương tự nhau trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3) ở cả 3 nồng độ IPTG và 3 loại môi trường khi tất cả các băng protein đều có độ đậm tương đương ở mức cao nhất +++.

Phân tích SDS-PAGE cho thấy rõ ảnh hưởng của nhiệt độ đến mức độ biểu hiện protein CP của PaMoV trong chủng vi khuẩn Rosetta (DE3). Mức biểu hiện protein CP cao nhất (+++) là ở 37°C, thấp hơn (++) ở 30°C và thấp nhất (+) ở 25°C (Hình 4C).

3.2. Tạo kháng huyết thanh thể đa dòng thỏ

3.2.1. Đánh giá sự hình thành kháng thể đặc hiệu PaMoV trong máu thỏ sau khi gây miễn dịch bằng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA (Hình 5) cho thấy cả 2 mẫu KHT thu sau tiêm lần 4 và sau tiêm lần 5

đều chứa kháng thể đặc hiệu PaMoV. Đáng chú ý, KHT không chứa kháng thể phản ứng không đặc hiệu với protein cây khỏe. Do KHT sau tiêm lần 5 chứa nhiều kháng thể đặc hiệu PaMoV nên KHT từ toàn bộ máu thỏ được thu thập và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Đánh giá độ hòa loãng của kháng huyết thanh bằng DIBA

Kết quả kiểm tra DIBA với 7 độ hòa loãng KHT 1/500, 1/1.000, .000, .000, 1/8.000, 1/16.000 và 1/32.000 cho thấy độ đậm của các ô mẫu bệnh giảm dần theo độ hòa loãng KHT (Hình 6). KHT ở độ hòa loãng 32.000 lần vẫn có phản ứng rõ với protein kháng nguyên và bằng mắt thường phản ứng dương tính vẫn có thể được phát hiện ở 2/3 mẫu cây bệnh.

3.2.3. Đánh giá độ nhạy và tính đặc hiệu của kháng huyết thanh bằng PTA-ELISA

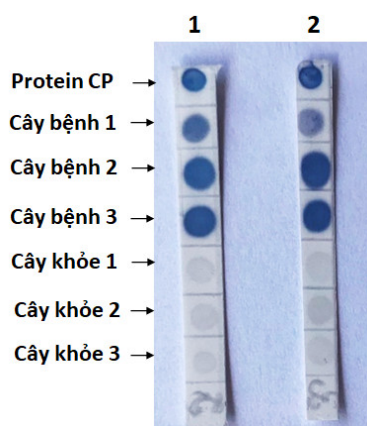
Kiểm tra PTA-ELISA (Bảng 3) cho thấy KHT phát hiện PaMoV trong cây rất tốt. Ở độ hòa loãng KHT từ 1/200 đến 1/1.000, giá trị OD trung bình của các mẫu cây bệnh không khác nhau nhiều và rất cao, từ 1,729 đến 2,056. Thậm chí ở độ hòa loãng 1/5.000, giá trị OD của các mẫu cây bệnh OD cũng vẫn > 1.

Quan trọng nhất, KHT không phản ứng với protein của cây khỏe. Giá trị OD trung bình của các mẫu cây khỏe ở độ hòa loãng từ 1/500 đến

1/1000 rất thấp, từ 0,173 đến 0,234, tương đương với giá trị của các giếng nền chỉ cho dịch cơ chất (OD trung bình 0,193). Một cách phát hiện kháng thể không đặc hiệu phản ứng với protein cây khỏe là so sánh giá trị OD của KHT được hòa trực tiếp trong đệm (không hấp thụ chéo) với KHT được ủ trước với dịch cây khỏe (có hấp thụ chéo). Phân tích t-test giá trị OD của tất cả các cặp KHT (có và không hấp thụ chéo) ở tất cả các độ hòa loãng và trên 2 nhóm cây bệnh và cây khỏe đều cho thấy không có khác biệt có ý nghĩa thống kê (các giá trị P đều > mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$, Bảng 3).

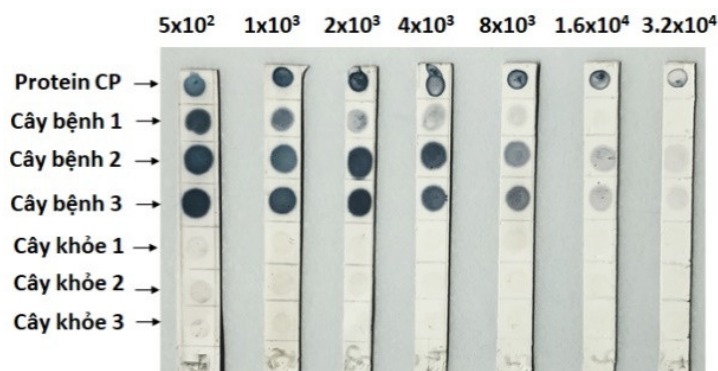
Ngoài ra, KHT cũng được kiểm tra liệu có phản ứng chéo với 2 potyvirus khác nhiễm trên chanh leo tại Việt Nam là EAPV-IB và TelMV và 2 protein thường được sử dụng làm tác nhân khóa (blocker) là BSA và skim milk.

Kết quả kiểm tra PTA-ELISA (Bảng 4) cho thấy KHT không phản ứng với BSA và Skim milk. Giá trị OD của chúng rất thấp (< 0,2) và tương đương với OD của các giếng nền. Đáng chú ý, KHT phản ứng khá mạnh với EAPV-IB và đặc biệt với TelMV (giá trị OD lần lượt 0,366 và 1,861 ở độ hòa loãng 1/5.000).



Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá chanh leo khô, thu thập 2016, bảo quản ở nhiệt độ phòng, chỉ nhiễm PaMoV được xác định bằng giải trình tự. Cây khỏe 1, 2, 3 là các cây chanh leo trồng từ hạt. Protein CP được hòa trong đệm carbonate tối lượng ~ 20 $\mu\text{g/ml}$. Độ hòa loãng kháng huyết thanh: 1/200. Số trên các băng DIBA: 1 và 2 lần lượt là kháng huyết thanh thu sau lần tiêm thứ 4 và 5.

Hình 5. Đánh giá sự hình thành kháng thể đặc hiệu PaMoV trong kháng huyết thanh thô được gây miễn dịch với protein CP tái tổ hợp bằng DIBA



Ghi chú: Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá chanh leo khô, thu thập 2016, bảo quản ở nhiệt độ phòng, được xác định chỉ nhiễm PaMoV bằng giải trình tự. Cây khỏe 1, 2, 3 là các cây chanh leo trồng từ hạt. Protein CP được hòa trong đệm carbonate tối lượng ~20 $\mu\text{g/ml}$. Số trên các băng DIBA là độ hòa loãng kháng huyết thanh.

Hình 6. Phản ứng DIBA đánh giá độ hòa loãng kháng huyết thanh thô đặc hiệu PaMoV

Tạo kháng huyết thanh đa dòng bằng protein vỏ tái tổ hợp của *Passiflora mottle virus* nhiễm trên cây chanh leo tại Việt Nam

Bảng 3. Đánh giá độ nhạy và tính đặc hiệu của kháng huyết thanh thử đặc hiệu PaMoV bằng PTA-ELISA

Loại mẫu	Độ hòa loãng kháng huyết thanh	Hấp thụ chéo ²	Giá trị OD (405nm) sau ủ 60 phút		P (t-test, two-tailed, $\alpha = 0,05$)
			Trung bình	Độ lệch chuẩn	
Cây khỏe (n = 3)	1/200	Có	0,273	0,009	0,88
		Không	0,274	0,014	
	1/500	Có	0,231	0,012	0,09
		Không	0,208	0,013	
	1/1.000	Có	0,203	0,005	0,12
		Không	0,191	0,010	
	1/5.000	Có	0,173	0,009	0,93
		Không	0,173	0,008	
Cây nhiễm PaMoV ¹ (n = 3)	1/200	Có	2,065	0,022	0,56
		Không	2,055	0,014	
	1/500	Có	1,929	0,043	0,40
		Không	1,892	0,053	
	1/1.000	Có	1,909	0,032	0,05
		Không	1,729	0,106	
	1/5.000	Có	1,157	0,127	0,64
		Không	1,096	0,164	
Nền (chỉ dịch cơ chất), n = 8			0,193	0,008	

Ghi chú: ¹Cây bệnh 1, 2, 3 là các mẫu lá chanh leo khô, thu thập 2016, bảo quản ở nhiệt độ phòng, chỉ nhiễm PaMoV được xác định bằng giải trình tự. Cây khỏe là các cây chanh leo trồng từ hạt. ²Hấp thụ chéo: Kháng huyết thanh được hòa trong dịch cây khỏe nghiền trong đệm kháng thể và ủ ở 37°C 45 phút trước khi cho vào giếng ELISA.

Bảng 4. Phản ứng của kháng huyết thanh với 2 potyvirus chanh leo (EAPV-IB và TelMV) và 2 protein (BSA và Skim milk)

Độ hòa loãng kháng huyết thanh (không hấp thụ chéo)	Giá trị OD (405nm) sau ủ 60 phút			
	EAPV-IB	TelMV	BSA	Skim milk
1/200	1,810	2,175	0,196	0,194
1/500	1,325	2,039	0,179	0,177
1/1000	0,925	1,993	0,165	0,176
1/5000	0,366	1,861	0,167	0,169

Ghi chú: Đối chứng giếng nền: xem bảng 3; Hai mẫu virus EAPV-IB và TelMV là mẫu chanh leo tươi, được xác định bằng giải trình tự. BSA và skim milk: 3% trong đệm carbonate.

4. THẢO LUẬN

4.1. Gen mã hóa protein CP của PaMoV được biểu hiện tốt trong vi khuẩn *E. coli* chủng Rosetta (DE3)

Hiện nay, loại kháng nguyên phổ biến nhất được sử dụng để tạo kháng thể chẩn đoán virus

thực vật là protein CP tái tổ hợp được biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* (Lima & cs., 2012; Souiri & cs., 2014). Vì bộ gen của PaMoV, cũng như của các virus RNA thực vật khác, đã thích ứng để được dịch mã trong tế bào sinh vật nhân chuẩn nên chúng có thể khó được dịch mã trong tế bào vi sinh vật tiền nhân như *E. coli* do khác

biệt lớn về hiệu suất sử dụng mã bộ ba (Rosano & Ceccarelli, 2014). Các kết quả thí nghiệm biểu hiện trong nghiên cứu này đã chứng tỏ trình tự gen mã hóa protein CP của PaMV hoàn toàn thích ứng với bộ máy dịch mã của chủng Rosetta (DE3) và do đó không cần phải tối ưu trình tự dịch mã. Kết quả này có thể do chủng Rosetta (DE3) là chủng *E. coli* cải biến, cho phép tăng cường biểu hiện các protein có nguồn gốc từ sinh vật nhân chuẩn và chứa 6 mã hiếm được sử dụng trong vi khuẩn *E. coli* như AUA, AGG, AGA, CUA, CCC và GGA.

Quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp trong *E. coli* bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố (Costa & cs., 2014). Các thí nghiệm đánh giá các yếu tố chủ chốt ảnh hưởng đến quá trình biểu hiện gen như nồng độ IPTG, môi trường nuôi cấy, nhiệt độ cảm ứng cũng cho thấy protein CP của PaMoV không gây độc tế bào Rosetta (DE3) và có thể được biểu hiện dễ dàng trong chủng vi khuẩn này ở các điều kiện cảm ứng thay đổi.

4.2. Kháng huyết thanh đa dòng PaMoV nhận biết các epitope liên tục của protein CP

Các epitope (điểm quyết định kháng nguyên) của một protein được chia làm 2 nhóm là liên tục gồm các amino acid liên kế trên chuỗi bậc 1 và không liên tục gồm các amino acid không liên nhau trên chuỗi bậc 1 nhưng xếp gần nhau do sự gấp xoắn của protein (Van Regenmortel, 2014). Đối với potyvirus, các phân tích cấu trúc và huyết thanh học cho thấy: (i) đầu N và đầu C của protein CP được hiển thị trên bề mặt của phân tử virus, (ii) phần đầu N là vùng biến động nhất và chứa các epitope đặc hiệu loài, (iii) vùng trung tâm và vùng đầu C khá bảo thủ và chứa các epitope đặc hiệu cho chi, và (iv) các epitope đặc hiệu loài ở vùng đầu là phần lớn là các epitope liên tục (Shukla & cs., 1989; Peng & cs., 2018). Trong nghiên cứu này, protein CP gây miễn dịch ở dạng cấu trúc bậc 1 do được chuẩn bị trong điều kiện biến tính nên các epitope của protein thuộc nhóm liên tục. Đặc điểm này cho phép kháng thể đa dòng thu được sẽ chứa các dòng kháng thể chỉ phản ứng với các epitope liên tục nằm trên toàn bộ protein CP

của PaMoV. Trên phân tử virus nguyên vẹn, protein CP ở dạng cấu trúc thứ cấp và do đó các epitope liên tục ở phần trung tâm phân tử không được hiển thị trên bề mặt (Shukla & cs., 1988; Van Regenmortel, 1992). Đặc điểm này dẫn tới kháng thể đa dòng thu được chỉ phản ứng với các epitope liên tục có mặt trên đầu N và đầu C của protein CP trên bề mặt phân tử virus và do đó làm tăng tính đặc hiệu. Một ưu điểm nữa khi gây miễn dịch bằng protein CP ở cấu trúc bậc 1 là ở trạng thái này, các epitope liên tục không bị mất do quá trình gấp xoắn hậu dịch mã của protein trong tế bào *E. coli* không giống trong tế bào thực vật, đặc biệt khi phần protein dung hợp ở đầu N của protein CP có thể ảnh hưởng tới quá trình gấp xoắn.

Sử dụng protein kháng nguyên dưới dạng cấu trúc bậc 1 như protein trong gel polyacrylamide được cắt ra từ điện di SDS-PAGE đã được sử dụng trong sản xuất kháng thể chẩn đoán virus thực vật (Abdel-Salam & cs., 2013; Ha & cs., 2019). Trong nghiên cứu này, tất cả các công đoạn trong quá trình tinh chiết protein CP tái tổ hợp của PaMoV đều sử dụng đệm chứa urea 8M. Quy trình có nhiều ưu điểm vì đơn giản và đặc biệt urea gây biến tính các protease nên protein CP không bị phân hủy trong quá trình tinh chiết.

4.3. Kháng huyết thanh đa dòng PaMoV có giá trị chẩn đoán cao

Một kháng thể đa dòng có giá trị chẩn đoán virus thực vật phải không phản ứng với protein của cây ký chủ nhằm tránh phản ứng dương tính giả. Kháng thể đa dòng thường chứa các dòng kháng thể không đặc hiệu phản ứng với protein của cây do quá trình đáp ứng miễn dịch của động vật phụ thuộc nhiều yếu tố, chủ yếu do đặc điểm miễn dịch của động vật và bản chất của nguồn kháng nguyên (Lima & cs., 2012; Van Regenmortel, 2014). KHT đa dòng tạo được trong nghiên cứu này đã chứng tỏ mức độ đặc hiệu và độ nhạy cao. KHT không phản ứng với protein của cây chanh leo khỏe, không phản ứng với BSA và skim milk, hai loại protein thường sử dụng làm tác nhân khóa trong các thử nghiệm miễn dịch. KHT có thể phát hiện

PaMoV trong mẫu lá chanh leo khô (bảo quản 4 năm ở nhiệt độ phòng) ở độ hòa loãng ít nhất 5000 lần trong phản ứng PTA-ELISA với giá trị OD cao (~ 2). Đáng chú ý, KHT phát hiện PaMoV trong phản ứng DIBA có độ nhạy cao hơn nhiều so với ELISA, phù hợp với các kết luận chung về độ nhạy của 2 kỹ thuật (Abd El-Aziz, 2019). Kết quả này là quan trọng vì kỹ thuật DIBA đơn giản hơn nhiều so với ELISA và có thể áp dụng dễ dàng tại cơ sở sản xuất.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng nhận thấy KHT PaMoV phản ứng chéo với 2 potyvirus đang gây hại chanh leo tại Việt Nam là EAPV-IB và đặc biệt TelMV. Shukla & cs. (1992) đã kết luận phần lớn các kháng thể đa dòng potyvirus có phản ứng chéo ở các mức độ khác nhau với các potyvirus khác, chủ yếu là do chúng có nhiều epitope chung ở phần trung tâm của protein CP. Trong dịch cây, ngoài phân tử virus nguyên vẹn, các phân tử protein CP chưa lắp ráp cũng tồn tại nhiều và do đó các epitope chung ở phần trung tâm có thể được hiển thị và được nhận biết bởi các kháng thể tương ứng có trong kháng thể đa dòng. Cũng cần chỉ ra ở đây TelMV là virus gần gũi nhất với PaMoV và protein CP của 2 virus có mức đồng nhất trình tự amino acid tới 80% (Xie & cs., 2019).

Như vậy, ngoài áp dụng trong các nghiên cứu cơ bản về PaMoV như phát hiện virus trong cây lây nhiễm khi nghiên cứu về tính gây bệnh và phổ ký chủ của virus này, KHT PaMoV có thể được áp dụng để chọn tạo giống chanh leo sạch potyvirus tại Việt Nam.

5. KẾT LUẬN

Gen mã hóa protein CP của PaMoV đã được xây dựng thành công trên vector pET28a và Rosseta (DE3) là chủng *E. coli* phù hợp để biểu hiện gen này.

KHT đa dòng thô được gây miễn dịch với protein CP của PaMoV không phản ứng với protein của cây chanh leo và có thể phát hiện dễ dàng PaMoV trong mẫu lá chanh leo bệnh bằng 2 kỹ thuật PTA-ELISA và DIBA.

KHT PaMoV cũng phản ứng với hai potyvirus đang gây hại chanh leo tại Việt Nam là

TelMV và EAPV-IB và do đó có thể được ứng dụng để chọn tạo giống chanh leo sạch potyvirus.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được hỗ trợ từ đề tài cấp Bộ (mã số WB.05/20). Các tác giả chân thành cảm ơn Trung tâm Kiểm dịch Thực vật Sau nhập khẩu I đã cung cấp các mẫu chanh leo nhiễm bệnh virus.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abd El-Aziz M.H. (2019). Three modern serological methods to detect plant viruses. *Journal of Plant Science and Phytopathology*. 3: 101-106.
- Abdel-Salam A.M., El-Attar A.K. & Soliman A.M. (2013). The use of native and denatured recombinant coat protein forms for induction of good quality antisera for Potato virus X and Potato leaf roll virus. *American Journal of Research Communication*. 1(17): 70-86.
- Costa S., Almeida A., Castro A. & Domingues L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*. 5: 63.
- Gadhav K.R., Gautam S., Rasmussen D.A. & Srinivasan R. (2020). Aphid Transmission of Potyvirus: The Largest Plant-Infecting RNA Virus Genus. *Viruses*. 12(7): 773.
- Grintzalis K., Georgiou C.D. & Schneider Y.-J. (2015). An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical biochemistry*. 480: 28-30.
- Ha V.C., Tran N.H., Do T.D., Nguyen D.H., Wei S.F., Qin W. & Lyu R.H. (2019). Production of polyclonal antisera for diagnosis of rice yellow stunt virus (RYSV) in Vietnam. *Journal of Southern Agriculture*. 50(7): 1472:1482.
- Lima J.A.A., Nascimento A.K.Q., Radaelli P. & Purcifull D.E. (2012). Serology applied to plant virology. Serological diagnosis of certain human, animal and plant diseases. Rijeka, Croatia: InTech. 1: 71-94.
- Peng D., Zheng G., Zheng Z., Tong Q. & Ming Y. (2018). High variability in the N terminus of coat protein among potyviruses and its advantage in producing a specific antibody. *European Journal of Plant Pathology*. 152(2): 385-393.
- QIAGENES *E. coli* Handbook (2009). QIAGENES expression kit *E. coli* for high-Level expression of His-tagged proteins in *E. coli* systems.

- Rosano G.L. & Ceccarelli E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 5: 172.
- Sastry K.S. (2013). Diagnosis and Detection of Plant Virus and Viroid Diseases. In: *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*. Springer. pp. 233-353.
- Shukla D.D., Lauricella R. & Ward C. W. (1992). Serology of potyviruses: current problems and some solutions. In: *Potyvirus Taxonomy*. pp. 57-69.
- Shukla D.D., Tribbick G., Mason T., Hewish D.R., Geysen H. & Ward C.W. (1989). Localization of virus-specific and group-specific epitopes of plant potyviruses by systematic immunochemical analysis of overlapping peptide fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(21): 8192-8196.
- Souiri A., Zemzami M., Amzazi S. & Ennaji M.M. (2014). Polyclonal and monoclonal antibody-based methods for detection of plant viruses. *European Journal of Scientific Research*. 123(3): 281-295.
- Van Regenmortel M.H. (1992). The conformational specificity of viral epitopes. *FEMS microbiology letters*. 100(1-3): 483-487.
- Van Regenmortel M.H. (2014). Specificity, polyspecificity and heterospecificity of antibody-antigen recognition. *Journal of Molecular Recognition*. 27(11): 627-639.
- Wylie S.J., Adams M., Chalam C., Kreuze J., López-Moya J.J., Ohshima K., Praveen S., Rabenstein F., Stenger D. & Wang A. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. *The Journal of general virology*. 98(3): 352.
- Xie L., Gao F., Zheng S., Zhang X., Zhang L. & Li T. (2019). Molecular characterization of a new potyvirus infecting passion fruit. *Archives of virology*. 164(7): 1903-1906.
- Zellner M., Winkler W., Hayden H., Diestinger M., Eliassen M., Gesslbauer B., Miller I., Chang M., Kungl A. & Roth E. (2005). Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*. 26(12): 2481-2489.